ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

1. Potato dextrose agar (PDA)

อาหารผงสำเร็จรูป PDA ยี่ห้อ Merck	39	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Plate count agar (PCA)

อาหารผงสำเร็จรูป PCA	23.5	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน

Sucrose	10	กรัมต่อลิตร
K2HPO4	0.5	กรัมต่อลิตร
K2HPO4	0.5	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ปรับ pH = 7 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Tryptic soy broth (TSB)

อาหารผงสำเร็จรูป PCA	3	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	0.1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Peptone water (PW)

อาหารผงสำเร็จรูป PW	1	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

วิธีการตรวจวิเคราะห์ Total viable count (TVC)

1. เตรียมสารละลายอาหารโดยชั่งตัวอย่างอาหารแข็ง 25 กรัมใส่ในถุงตีป่น เติมสารละลาย peptone water เข้มข้นร้อยละ 0.1 จำนวน 225 มิลลิลิตร นำเข้าเครื่องตีป่นนาน 1-2 นาที จะได้สารละลายอาหารความเข้มข้น 1:10 หรือ 10^{-1} จากนั้นทำเจือจางทีละ 10 เท่า โดยดูดสารละลายอาหารความเข้มข้น 10^{-1} จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดสารละลาย peptone water ซึ่งบรรจุในหลอดๆ ละ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดี ทำเช่นนี้ซ้ำจนได้ระดับสารละลายอาหารความเข้มข้นที่เหมาะสม

2. ใช้ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายอาหารจากหลอดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 3 ระดับติดกัน จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 1 จาน (duplicate คือทำความเข้มข้นละ 2 จาน) และทำซ้ำเช่นนี้ในทุกความเข้มข้น

3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมเหลวอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส จำนวน 10-15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ผสมสารละลายเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้กระจายเข้ากันดีวางจานเพาะเชื้อไว้ให้วุ้นแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

4. นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนของเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็น CFU/กรัม หรือ มิลลิลิตร

วิธีการตรวจวิเคราะห์ Spore count (SPC)

1. วิธีการเตรียมสารละลายอาหารทำเหมือนกับการตรวจวิเคราะห์ Total viable count ยกเว้นนำสารละลายอาหารไปต้มในน้ำร้อน 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ก่อนนำมาทำเจือจางทีละ 10 เท่า และ

2. ใช้ปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายอาหารจากหลอดที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 3 ระดับติดกัน จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ทำเช่นนี้ซ้ำอีก 1 จาน (duplicate คือทำความเข้มข้นละ 2 จาน) และทำซ้ำเช่นนี้ในทุกความเข้มข้น

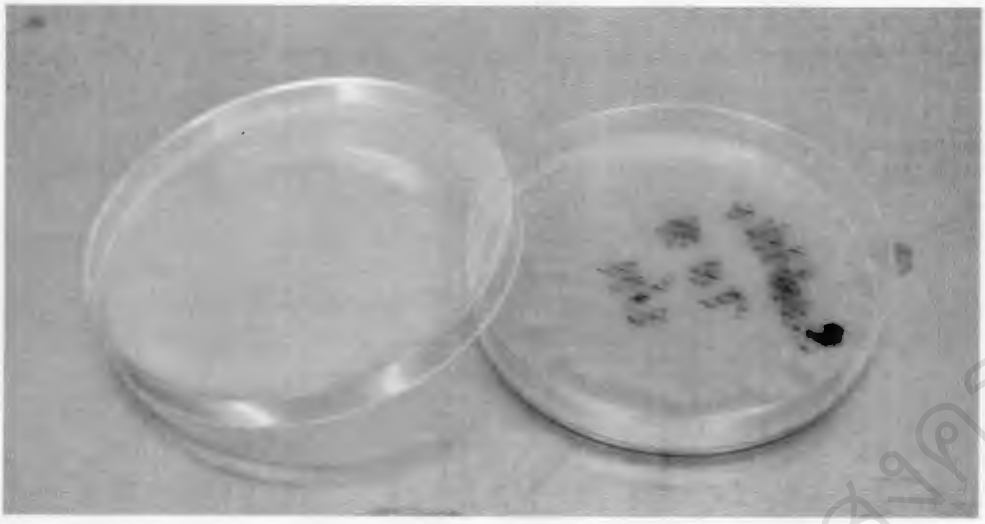
3. เทอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ที่หลอมเหลวอุณหภูมิไม่เกิน 50 องศาเซลเซียส จำนวน 10-15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ผสมสารละลายเชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อให้กระจายเข้ากันดีวางจานเพาะเชื้อไว้ให้วุ้นแข็งตัว คว่ำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

4. นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีขึ้นอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี นำไปคำนวณหาจำนวนของเชื้อที่มีอยู่ในตัวอย่างเป็น CFU/กรัม หรือ มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

ภาพการหมักผงกล้าเชื้อ *B. subtilis* TN51 และการดำเนินงาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม



ภาพ 19 แบคทีเรีย *B. subtilis* TN51 เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA

ภาพ 20 ลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มีส่วนผสมของแป้งสาลีร้อยละ 30 40 และ 50 ก่อนและหลังการหมักเชื้อ *B. subtilis* TN51

ภาพ 21 แป้งหมัก *B. subtilis* TN51 ก่อนนำไปอบแห้ง

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ภาคผนวก ค
การนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

การนำเสนองานวิจัยในที่ประชุมวิชาการ

งานประชุมสัมมนาวิชาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติและนานาชาติ เครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 11 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ 15 กุมภาพันธ์ 2556

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสำหรับเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis*

จักรกฤษ แจ่มจันทร์*
เกตุการ ดาจันทา**

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปสำหรับหมักถั่วเน่าจากแป้ง โดยได้ศึกษาหาชนิดของแป้งที่เหมาะสมเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมแป้ง (ชุดควบคุม) และอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า trypticase soy broth (TSB) นอกจากนี้ยังได้ศึกษาปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานอีกด้วย ผลการศึกษาพบว่าสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* TN51 มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งข้าวและแป้งถั่วเหลือง และตรวจพบจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า TSB มากถึง 12 และ 17 เท่า ตามลำดับ ปริมาณของแป้งสาลีที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานคือร้อยละ 40 โดยพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งสาลีเป็นส่วนผสมร้อยละ 30 และ 50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปจากแป้งที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และแป้งสาลี 400 กรัมต่อลิตร โดยตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมด 8.46 และ 6.85 log CFU/g ตามลำดับ

คำสำคัญ : บาซิลลัส, อาหารเลี้ยงเชื้อ, กล้าเชื้อ, อาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้ง

* หลักสูตรวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี, E-mail: molbutter_07@hotmail.com
** ดร., อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

มหาวิทยาลัยราชภัฏธนบุรี

The Development of Media From Flour for Culturing *Bacillus Subtilis*

Jakkrit Jamjan*
Katekan Dajanta**

ABSTRACT

This research aims to study preliminary culture media for *Bacillus subtilis* TN51 before developed to starter powder from flour for Thua Nao fermentation. The optimal flour added in basal medium was investigated and compared with basal medium without flour (control) and commercial trypticase soy broth (TSB). Furthermore, optimal amount of flour in basal medium was also studied. The results found that wheat flour medium (WFM) showed the superior promote growth of *B. subtilis* TN51 than rice flour and soy flour mediums. In addition, the higher levels of total viable count and total spore count were accounted in WFM than those in TSB for 12 and 17 times, respectively. The optimal amount of wheat flour added in basal medium was 40%. Total viable count in WFM was significantly higher than those found in 30 and 50% of wheat flour media ($P \leq 0.05$). This study obtained the preliminary culture media for *B. subtilis* TN51 before developed to starter powder from flour that composed of 10 g/L of sucrose, 0.5 g/L of potassium dihydrogen phosphate, 0.05 g/L of dipotassium hydrogen phosphate and 400 g/L of wheat flour. The contents of 8.46 log CFU/g total viable count and 6.85 log CFU/g spore count were found in this medium.

KEYWORDS : Bacillus, Culture medium, Starter culture, Flour medium

* Educational Administration Master of Food Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, E-mail: maibaba_07@hotmail.com
** Dr., Thesis Advisor

บทนำ

Bacillus subtilis เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน มีสปอร์ทำให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและสามารถเก็บรักษาไว้ได้ที่อุณหภูมิห้อง แบคทีเรียชนิดนี้สามารถเจริญได้ในถั่วเหลืองและเมล็ดธัญพืชอื่นได้ดี เนื่องจากสามารถใช้แหล่งของคาร์บอนและไนโตรเจนที่ซับซ้อนที่มีอยู่พืชเกษตรได้ ต้องการวิตามินบีและ ไบโอตินในการเจริญของเซลล์และการงอกของสปอร์ (Watanabe *et al.*, 1975) แร่ธาตุแคลเซียมและแมกนีเซียมช่วยกระตุ้นให้มีการสร้างสปอร์ได้ดีขึ้น (Cote and Ghema, 1999) กรดอะมิโนกลูตามิค แอสปาติค และซิสทีนหรือ ซีสทีอีนช่วยกระตุ้นให้เชื้อ *Bacillus* เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานหรือสารละลายเกลือ (mineral salt medium) ได้ดี (Singer *et al.*, 1966; Nickerson and Bulla, 1975) นอกจากสารอาหารต่างๆ แล้วระดับความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีผลต่อการเจริญแบบ solid state ของ *Bacillus* ด้วย (Zhao *et al.*, 2008)

มีรายงานการพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *Bacillus* เพื่อใช้เพิ่มปริมาณของสปอร์และสาวต้านจุลินทรีย์จากวัสดุการเกษตรหลายชนิด โดย Vora and Shethna (1999) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมการตะมีโน ซิสทีน ถั่วเหลือง ไร้ไขมันและสารสกัดจาก groundnut meal ช่วยกระตุ้นให้ *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* เจริญและสร้างสปอร์ได้ดี ขณะที่ Zhao *et al.* (2008) ได้พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* ในสภาวะ solid state fermentation จากสารละลายเกลือที่มีส่วนผสมของซังข้าวโพดละเอียด จมูกข้าวสาลี กลูโคส เปปโตนและยีสต์เอกแหรกส์ และไวรุจน์และคณะ (2550) ได้ศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *B. subtilis* เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ โดยสูตรอาหารที่มีกากน้ำตาล 19.85 กรัม/ลิตรและสูตรที่มีกากถั่วเหลือง 20 กรัม/ลิตร เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการสร้างสปอร์ของเชื้อ จากรายงานของ ชุติมุข (2543) ที่ได้ศึกษาชนิดของแป้งที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารพยุงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตปลาส้ม โดยการดัดแปรชนิดของแป้ง 3 ชนิด คือ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวเหนียวและแป้งข้าวเจ้าผสมแป้งข้าวเหนียวพบว่าแป้งทั้ง 3 ชนิดสามารถใช้เป็นสารพยุงที่ดีทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการรอดที่สูงและจากการศึกษาของเพิ่มพงษ์ (25524) พบว่าการกระตุ้นให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเจริญในสภาพ solid state ให้เหมาะสมก่อนการทำเป็นผงแห้งด้วยการเติมสารพยุงช่วยให้ได้ผงกล้าเชื้อที่มีคุณภาพดี

ถั่วเน่าเป็นถั่วเหลืองหมักของไทยที่ได้จากหมักถั่วเหลืองต้มสุกด้วยแบคทีเรียโปรจีนัส *Bacillus* กระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักหรือถั่วเน่าของไทยในปัจจุบันยังเป็นการผลิตแบบพื้นบ้านคือการหมักถั่วพาเลืองที่ ต้มสุกแล้วในตะกร้าไม้ไผ่และคลุมด้วยใบตองหรือวัสดุอื่น หมักบ่มที่อุณหภูมิห้องและอาศัยการหมักย่อยจากเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่ปนเปื้อนอยู่กับเมล็ดถั่วเหลืองหรือภาชนะที่ใช้ในการผลิต ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอขึ้นอยู่กับสุขลักษณะของผู้ผลิต มีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียค่อนข้างแรง บางครั้งอาจเกิดการเน่าเสียเนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์และบังเสื่องต่ออันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดที่ปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต (Nout *et al.*, 1998; Dike and Odunfa, 2003; Leejeerajumnean, 2003) กระบวนการผลิตถั่วเหลืองหมักของไทยแตกต่างจากนัตโตะซึ่งเป็นถั่วเหลืองหมักของญี่ปุ่นที่ใช้กล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* บริสุทธิ์และควบคุมสภาวะการหมักบ่มทำให้สามารถควบคุมคุณภาพได้ดีและเป็นที่ยอมรับของคนทั่วโลก มีรายงานการใช้กล้าเชื้อ *B. subtilis* บริสุทธิ์ในการหมักถั่วเหลืองเพื่อช่วยแก้ปัญหาด้านคุณภาพ สุขอนามัยและรองรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ในถั่วเหลืองหมักที่ปีมา (ถั่วเหลืองหมักของประเทศอินเดีย) (Sarkar and Tamang, 1995; Tamang and Nikkuni, 1996) ดาวาดาวา (ถั่วเหลืองหมักของประเทศไนจีเรียและกานา) (Omafuvbe *et al.*, 2002; Omafuvbe, 2008) และจุงคุกแจง (ถั่วเหลืองหมักของประเทศเกาหลี) (Lee *et al.*, 2005) สำหรับประเทศไทยได้มีความพยายามในการยกระดับกระบวนการผลิตถั่วเน่าโดยการใช้กล้าเชื้อ *B. subtilis* บริสุทธิ์เช่นกัน แต่ยังต้องอาศัยกล้าเชื้อที่เตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ (Dajanta *et al.*, 2011) ทำให้ไม่สะดวกต่อการใช้งานจริง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการเพิ่มปริมาณ *B. subtilis* ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อด้วยวิธีการใช้สารพยุงจากแป้ง โดยได้ศึกษาหาชนิดของแป้งและปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่มีสารช่วยกระตุ้นการสร้างสปอร์ก่อนนำไปพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปสำหรับหมักถั่วเน่าต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสำหรับเพาะเลี้ยง Bacillus subtilis

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แหล่งของจุลินทรีย์

แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* TN51 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.เอกชัย ชูเกียรติไวจน์ มหาวิทยาลัยแม่ฟ้าหลวง เป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากถั่วเน่าพื้นเมืองและมีความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเนสสูง (Dajanta *et al*., 2009) เตรียมกล้าเชื้อสำหรับการทดลองโดยการเพาะเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar บ่มในตู้บ่มเพาะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth (TSB) บ่มในตู้บ่มเพาะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

2. การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้ง 3 ชนิด คือ แป้งถั่วเหลืองชนิดไขมันเต็ม แป้งข้าว และแป้งสาลีอเนกประสงค์ โดยเติมแป้งที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ในอัตรา 200 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน (basal medium; BSM) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ประกอบด้วยน้ำตาลทราย 10 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.5 กรัมต่อลิตร และ ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.5 กรัมต่อลิตร (Vora and Shethna, 1999; Farzana *et al*., 2005)

เติมกล้าเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาณร้อยละ 2 ลงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งทั้ง 3 ชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน และอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มในตู้บ่มเพาะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total viable count; TVC) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (Merck, Germany) ด้วยวิธี pour plate บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี (AOAC, 2000) และตรวจวัดปริมาณสปอร์ทั้งหมด (spore count; SPC) โดยการปนเปื้อนสารละลายตัวอย่างในอ่างน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที หลังจากทำให้เย็นลงและทำเจือจางในระดับที่เหมาะสมเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar ด้วยวิธี pour plate บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี (AOAC, 2000)

3. การศึกษาปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 2 ดัดแปรปริมาณของแป้งชนิดที่เหมาะสมกับการเจริญของ *B. subtilis* 3 ระดับ คือร้อยละ 30 40 และ 50 เติมกล้าเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาณร้อยละ 2 ลงในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้ง บ่มในตู้บ่มเพาะอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณสปอร์ทั้งหมดด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2

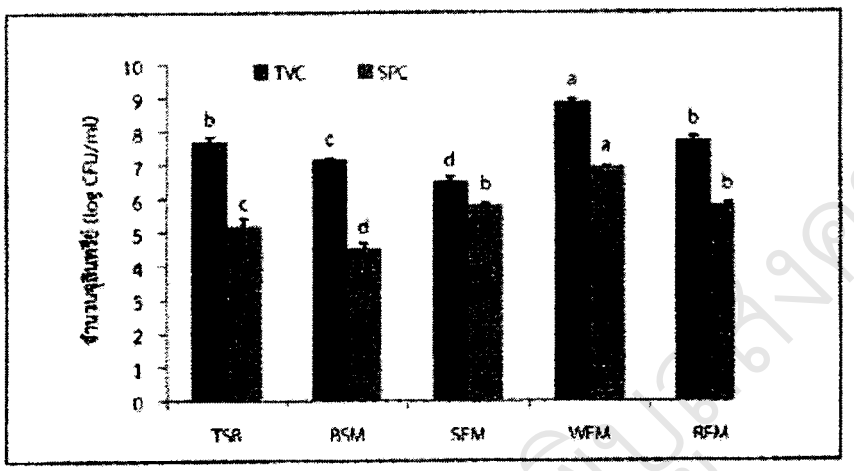
4. แผนการทดลองและวิเคราะห์สถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range tests (DMRT) ที่ $P \leq 0.05$

ผลการวิจัย

1. การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51

จากการทดลองประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากแป้ง ถั่วเหลืองชนิดไขมันเต็ม แป้งข้าวเจ้า และแป้งสาลี เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อผลิตภัณฑ์การค้า TSB และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ไม่มีแป้งเป็นส่วนผสม (ชุดควบคุม) พบว่า *B. subtilis* TN51 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากแป้งทั้ง 3 ชนิด โดยตรวจพบแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 6.50 – 8.88 log CFU/ml และตรวจพบแบคทีเรียที่มีสปอร์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 5.79-6.93 log CFU/ml (รูป 1)



รูป 1 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่เติมแป้งถั่วเหลือง แป้งสาลีและแป้งข้าว เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเพลาะทางการค้า TSB และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมแป้ง (ชุดควบคุม): TSB = อาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า trypticase soy broth; BSM = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ไม่เติมแป้ง; SFM = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานเติมแป้งถั่วเหลือง; WFM = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานเติมแป้งสาลี; RFM = อาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานเติมแป้งข้าวเจ้า

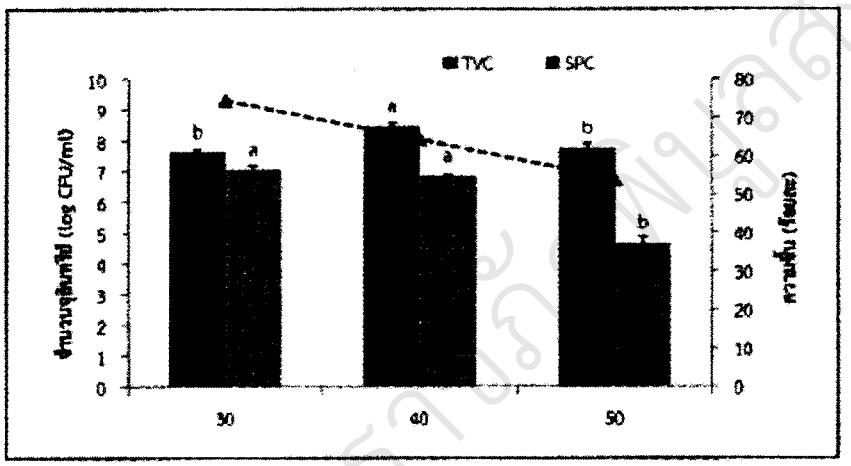
แป้งทั้ง 3 ชนิดที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียเจริญได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานที่ไม่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีและแป้งข้าวเจ้าตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (TVC) และปริมาณสปอร์ (SPC) สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งถั่วเหลืองแม้ว่าแบคทีเรียทั้งหมดที่ตรวจพบมีปริมาณน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) แต่กลับพบปริมาณของสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐานมากถึง 12.9 เท่า ในการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในครั้งนี้ต้องการให้แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในรูปที่มีสปอร์มากกว่าเซลล์ vegetative เนื่องจากสปอร์สามารถทนต่อความแห้งและความร้อนสูง รวมทั้งทนต่อการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมได้ดีกว่าเซลล์ vegetative ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียสามารถทนต่อกระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อและสามารถเหลือรอดในระหว่างการเก็บรักษาได้ดี

อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของแป้งช่วยส่งเสริมให้แบคทีเรียสร้างสปอร์ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า TSB อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยพบเซลล์ที่สร้างสปอร์ทั้งหมดในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งทั้ง 3 ชนิดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า 6-17 เท่า และอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีตรวจพบจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมดในปริมาณที่สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า TSB มากถึง 12 และ 17 เท่า ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากแป้งทั้ง 3 ชนิด พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีมีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *B. subtilis* TN51 มากที่สุด โดยตรวจพบจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งข้าวเจ้าและแป้งถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นผลจากคุณสมบัติทางเคมีของแป้งที่มีความแตกต่างกัน เช่น น้ำตาล โปรตีนและกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ดังนั้นจึงเลือกแป้งสาลีไปใช้ในการศึกษาปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อในตอนต่อไป

2. การศึกษาปริมาณของแป้งที่เหมาะสมในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งสาลีโดยการดัดแปรปริมาณของแป้ง 3 ระดับคือร้อยละ 30 40 และ 50 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมดดังแสดงในรูป 2 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 40 มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 มากที่สุด โดยตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 30 และ 50 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบคือ 8.46 7.62 และ 7.4 log CFU/g ตามลำดับ



รูป 2 ปริมาณจุลินทรีย์และสปอร์ทั้งหมด และความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีในปริมาณที่แตกต่างกัน

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 30 และ 40 ตรวจพบสปอร์ทั้งหมดไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยมีปริมาณ 7.05 และ 6.85 log CFU/g ตามลำดับ และมีปริมาณสปอร์ทั้งหมดสูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 50 คิดเป็น 24 และ 22 เท่า ตามลำดับ

จากการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งในครั้งนี้ทำให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* TN51 ในเบื้องต้นก่อนนำไปพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร และแป้งสาลี 400 กรัมต่อลิตร โดยตรวจพบปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดและสปอร์ทั้งหมด 8.46 และ 6.85 log CFU/g ตามลำดับ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งเป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ง่าย ไม่ซับซ้อนและมีราคาถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า และสามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเป็นผงกล้าเชื้อสำเร็จรูปได้ต่อไป

อภิปรายผล

แป้งถั่วเหลืองเป็นแป้งที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบมากกว่าแป้งสาลีเอนกประสงค์และแป้งข้าวคือร้อยละ 38-44 10-11 และ 8.9 ตามลำดับ (สมชาย, 2535; อรอนงค์, 2540) โปรตีนถั่วเหลืองมีกรดอะมิโนซีสทีนซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของ *Bacillus* ค่อนข้างต่ำขณะที่โปรตีนในแป้งสาลีคือไกลอะดินและกลูเตนินมีองค์ประกอบของซีสทีนและซีสทีอีนค่อนข้างสูง (Yoda, 2004) ดังนั้นจึงอาจส่งผลต่อการเจริญที่ดีกว่าของ *Bacillus* ได้ นอกจากนี้ชนิดและปริมาณของน้ำตาลซึ่งแบคทีเรียใช้เป็นแหล่งคาร์บอนก็อาจส่งผลต่อการเจริญที่แตกต่างกันนี้ด้วย แบคทีเรีย *B. subtilis*

สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลอิสระโดยเฉพาะอย่างยิ่งราฟฟิโนสและสตาชิโอสในปริมาณสูง และอาจหยุดการเจริญเมื่อมีปริมาณของน้ำตาลดังกล่าวสูงเกินไป (Taira *et al.*, 1989; 1990; Taira, 1992) การหมักแบบ solid state fermentation นอกจากสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์แล้วความชื้นก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การที่ *B. subtilis* สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีในปริมาณต่างๆ ได้แตกต่างกันนั้นอาจเป็นผลจากความเข้มข้นของสารอาหารต่างๆ และระดับความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันตามปริมาณของแป้งสาลีที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรพื้นฐาน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 40 มีค่าความชื้นเริ่มต้นร้อยละ 64.41 อาจมีความเหมาะสมสำหรับการเจริญของ *B. subtilis* TN51 ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมแป้งสาลีร้อยละ 30 และ 50 ซึ่งมีค่าความชื้นสุดเริ่มต้นร้อยละ 74.56 และ 53.92 ตามลำดับ (รูป 2) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Zhao *et al.* (2008) ที่ได้ระบุว่าค่าความชื้นของวัสดุหมักแบบ solid state fermentation ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสปอร์ของ *B. licheniformis* อยู่ที่ระดับร้อยละ 65

ข้อเสนอแนะ

ควรตรวจวัดคราะห์การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมี เช่น ปริมาณน้ำตาลอิสระ กรดอะมิโนชนิดต่างๆ และค่าความชื้นในระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากแป้งเพื่อให้สามารถอธิบายผลของการศึกษาความแตกต่างของแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

เอกสารอ้างอิง

เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐ. (2524). *การผลิตและการเก็บเชื้อบักเตรีแลกติคที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุกรในรูปเชื้อผง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยมหิดล.

โวรุจน์ เดชมหิทกุล จันทร์จิรา อยู่คง กนกวรรณ ทุ่มสุพรา แสงชัย เอกประทุมชัย และเพ็ญจันทร์ เมธาวิจิตรแสง. (2550). การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. ปีที่ 30 ฉบับที่ 2 เมษายน-มิถุนายน 2550

ชุติบุช อุรชิต. (2543). *การเตรียมกล้าเชื้อผงสำหรับการผลิตปลาส้ม*. รายงานการวิจัยการเตรียมกล้าเชื้อผงสำหรับการผลิตปลาส้ม สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล.

สมชาย ประภาวัต. (2535). *เทคโนโลยีในการทำแป้งถั่วเหลือง*. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. 61 หน้า.

อรอนงค์ นัยวิกุล. (2540). *ข้าวสาลี*. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร. 371หน้า.

AOAC. (2000). Official methods of analysis of AOAC International, 17th edition. AOAC International, Gaithersburg, MD.

Cote, R. and Ghema, R.L. (1999). Medium Formulation and Design, *E.coli* and *Bacillus* spp. In Encyclopedia of Bioprocess Technology : Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation, Flickinger, M.C. and Drew, S.W. (Eds.), John Wiley & Sons, New York, pp. 1676-1683.

Dajanta, K., Chukeatirote, E. and Apichartsrangkoon, A. (2011). Improvement of thua nao production using protein-rich soybean and *Bacillus subtilis* TN51 starter culture. Annals of Microbiology. 1-11.

Dajanta K., Wongkham, S, Thirach, P., Baophoeng, P., Apichartsrangkoon, A., Santithum, P. and Chukeatirote, E. (2009). Comparative study of proteolytic activity of protease-producing bacteria isolated from *thua nao*. Maejo International Journal of Science and Technology. 3: 269-276.

Dike, E.N. and Odunfa, S.A. (2003). Microbiological and biochemical evaluation of a fermented soyabean product-Soy-dadawadwa. Journal of Food Science and Technology. 40: 606-610.

Farzana, K., Shah, S.N.H., Butt, F.B. and Awan, S.B. (2005). Biosynthesis of bacitracin in solid-state fermentation by *Bacillus licheniformis* using defatted oil seed cakes as substrate. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences. 18(1): 55-57.

Lee, M.Y., Park, S.-Y., Jung, K.-O., Park, K.-Y. and Kim, S.D. (2005). Quality and functional characteristics of Chungkukjang prepared with various *Bacillus* sp. isolated from traditional Chungkukjang. Journal of Food Science. 70: M191-M196.

Leejeerajumnean, A. (2003). Thua nao: alkali fermented soybean from *Bacillus subtilis*. Silpakorn University International Journal. 3: 277-292.

Nickerson, K.W. and Bulla, L.A. Jr. (1975). Lipid metabolism during bacterial growth, sporulation and germination: an obligate nutritional requirement in *Bacillus thuringiensis* for compounds that stimulate fatty acid synthesis. Journal of Bacteriology. 123(2): 598-603.

Nout, M.J.R., Bakshi, D. and Sarkar, P.K. (1998). Microbiological safety of kinema, a fermented soya bean food. Food Control. 9: 357-362.

Omafuvbe, B.O., Abiose, S.H. and Shonukan, O.O. (2002). Fermentation of soybean (Glycine max) for soy-daddawa production by starter cultures of *Bacillus*. Food Microbiology. 19: 561-566.

Omafuvbe, B.O. (2008). Effect of temperature on biochemical changes induced by *Bacillus subtilis* (SDA3) during starter culture fermentation of soybean into condiment (soy-Daddawa). American Journal of Food Technology. 3: 33-41.

Sarkar, P.K. and Tamang, J.P. (1995). Changes in the microbial profile and proximate composition during natural and controlled fermentation of soybeans to produce kinema. Food Microbiology. 12: 317-325.

Singer, S., Goodman, N.S. and Rogoff, M.H. (1966). Defined media for the study of Bacilli pathogenic to insects. Annals of the New York Academy of Sciences. 139(16): 16-23.

Taira, H., Tanaka, H. and Saito, M. (1989). Total sugar, free type of sugar, and free sugar contents of domestic soybean seeds. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi. 36: 968-980.

Taira, H., Tanaka, H., Saito, M. and Saito, M. (1990). Effect of cultivar, seed size and crop year on total and free sugar contents of domestic soybean. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology. 37: 203-213.

Taira, H. (1992). Quality and its variation on soybeans in Japan. Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology. 39: 122-133.

Tamang, J.P. and Nikkuni, S. (1996). Selection of starter cultures for the production of kinema, a fermented soybean food of the Himalaya. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 12: 629-635.

Vora, D. and Shethna, Y.I. (1999). Enhanced growth, sporulation and toxin production by *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* in oil seed meal extract media containing cystine. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 15: 747-749.

Watanabe, T., Ebine, H. and Ohta, T. (1975). Natto bacilli and their characteristics. In S.C. Kohrin (Ed.), Soybean Food (pp. 124-125). Tokyo.

Yada, R.Y. (2004). Protein in Food Processing. Boca Raton: CRC Press.

Zhao, S., Hu, N., Huang, J., Liang, Y. and Zhao, B. (2006). High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. Biotechnology Letters. 30: 295-297.

ภาคผนวก ง
จดอนุสิทธิบัตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

เลขที่อนุสิทธิบัตร 9285 อสป/200 - ธ

อนุสิทธิบัตร

อาศัยอำนาจตามความในพระราชบัญญัติสิทธิบัตร พ.ศ. 2522
แก้ไขเพิ่มเติมโดยพระราชบัญญัติสิทธิบัตร (ฉบับที่ 3) พ.ศ. 2542
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญาออกอนุสิทธิบัตรฉบับนี้ให้แก่

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

สำหรับการประดิษฐ์ตามรายละเอียดการประดิษฐ์ ข้อถือสิทธิ และรูปเขียน (ถ้ามี) ที่ปรากฏในอนุสิทธิบัตร

เลขที่คำขอ 1203000376
วันยื่นคำขอรับอนุสิทธิบัตร 28 มีนาคม 2555
ผู้ประดิษฐ์ นางสาวเกตุการ ดารันหา

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์ ธาตุอาหารสัตว์ *Bacillus subtilis* สายพันธุ์เฉพาะจากแป้ง

ให้ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรมีสิทธิแต่เพียงผู้เดียวที่จะใช้การประดิษฐ์ตามกฎหมายว่าด้วยสิทธิบัตรทุกประการ

ออกให้ 22 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2557
หมดอายุ 27 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2561

(ลงชื่อ) .....
(นายสมศักดิ์ ศรีสมภาค)
รองอธิบดี ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมทรัพย์สินทางปัญญา

พนักงานเจ้าหน้าที่

หมายเหตุ 1. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรต้องชำระค่าธรรมเนียมรายปีในแต่ปีที่ 5 ของอายุสิทธิบัตร มิฉะนั้น อนุสิทธิบัตรจะสิ้นอายุ
2. ผู้ทรงอนุสิทธิบัตรจะขอชำระค่าธรรมเนียมรายปีล่วงหน้าโดยชำระทั้งหมดในคราวเดียวก็ได้
3. ภายใน 90 วันก่อนวันสิ้นอายุอนุสิทธิบัตร ผู้ทรงสิทธิบัตรมีสิทธิขอต่ออายุอนุสิทธิบัตรได้ 2 คราว มีกำหนดคราวละ 1 ปี โดยยื่นคำขอต่ออายุ ต่อพนักงานเจ้าหน้าที่
4. การอนุญาตให้ใช้สิทธิตามอนุสิทธิบัตรและการโอนอนุสิทธิบัตรต้องทำเป็นหนังสือและจดทะเบียนต่อพนักงานเจ้าหน้าที่

019373

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

รายละเอียดการประดิษฐ์

ชื่อที่แสดงถึงการประดิษฐ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง

สาขาวิทยาการที่เกี่ยวข้องกับการประดิษฐ์

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร

ภูมิหลังของศิลปหรือวิทยาการที่เกี่ยวข้อง

ในประเทศไทยมีรายงานการผลิตผงกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการผลิตอาหารหมักพื้นบ้านหลายชนิด เช่น ผงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับการผลิตหน่อไม้ปี๊บอ (วรรณทิชาและศิริเวียง, 2539) ผงกล้าเชื้อแบคทีเรีย *Acetobacter* สำหรับการผลิตน้ำส้มสายชู (รสสุคนธ์และนภา, 2532) และผงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับการผลิตปลาส้ม (ชุดินุช, 2543) เป็นต้น กระบวนการผลิตผงกล้าเชื้อมีหลายวิธี เช่น วิธีการพ่นฝอย การทำแห้งด้วยวิธีการแช่เข็งแบบระเหิด และการใช้สารพยุง การผลิตผงกล้าเชื้อด้วยวิธีการใช้สารพยุงเป็นวิธีการที่มีต้นทุนในการผลิตต่ำเนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือชั้นสูงที่มีราคาแพงเช่นเดียวกับวิธีการพ่นฝอยและการทำแห้งด้วยวิธีการแช่เข็งแบบระเหิดซึ่งต้องใช้เครื่อง spray dryer และ freeze-dryer ตามลำดับ จากรายงานของชุดินุช (2543) ที่ได้ศึกษาชนิดของแป้งที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารพยุงกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตปลาส้ม โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus brevis* TISTR 860 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR423 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 กรัม เปปโตน 10 กรัม อีสต์แอกซ์ทรกต์ 10 กรัม โซเดียมอะซิเตต 10 กรัม สารละลายบี (ประกอบด้วย แมกนีเซียมซัลเฟต 0.2 กรัม แมงกานีสซัลเฟต 10 กรัม เฟอร์รัสซัลเฟต 10 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 10 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร) จำนวน 5 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงแยกเอาเฉพาะเซลล์ของแบคทีเรียนำไปผสมกับสารพยุงแป้งข้าวแป้งข้าวหนียวและแป้งข้าวจ้าผสมแป้งข้าวหนียวจะได้ผงกล้าเชื้อสำหรับหมักปลาส้ม ผลการศึกษาพบว่าแป้งทั้ง 3 ชนิดสามารถใช้เป็นสารพยุงที่ดีทำให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีอัตราการรอดที่สูง

สำหรับการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเลี้ยงแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มีรายงานการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโมลาส (molasses broth medium) ซึ่งมีส่วนประกอบคือ โมลาส 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร (Younis et al., 2010) นอกจากนี้ยังมีรายงานของโสพลและคณะ (2010) ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลและกากถั่วเหลืองในเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* ในระดับอุตสาหกรรม และไวรุฬห์และคณะ (2550) ได้รายงานสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติกในสัตว์ 2 สูตร คือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาล 19.85 กรัม/ลิตร แคลเซียมคลอไรด์ 0.35 กรัม/ลิตร และ

แมงกานีสซัลเฟตในไนโอเดรต 0.15 กรัม/ลิตร และสูตรที่มีกากถั่วเหลือง 20 กรัม/ลิตร กากน้ำตาล 3 กรัม/ลิตร และไดโปแตสเซียมฟอสเฟต 0.5 กรัม/ลิตร สำหรับการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวจากแป้งสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* เพื่อพัฒนาเป็นผงกล้าเชื้อสำหรับหมักถั่วเน่าหรือถั่วเหลืองหมักของไทยยังไม่พบการรายงาน ปัญหาที่พบในการประดิษฐ์ที่มีอยู่คือ ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ผลิตได้จากผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ตามการประดิษฐ์เดิมนั้น จะมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียมาก อีกทั้งยังอาจประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เป็นสาเหตุให้ไม่ได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคเท่าที่ควร การประดิษฐ์นี้มีขึ้นเพื่อต้องการแก้ไขข้อบกพร่องดังกล่าว โดยการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ขึ้นมาใหม่ ที่ซึ่งมีราคาไม่สูง และสามารถทำได้ง่าย

ลักษณะและความมุ่งหมายของการประดิษฐ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วยแป้งสาลี 200-400 กรัม น้ำตาลซูโครส 10 กรัม ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส 0.5 กรัม ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส 0.5 กรัม และน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร โดยมีขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงดังกล่าว เริ่มจากการนำส่วนผสมไปฆ่าเชื้อก่อนเติมแป้งสาลี และสารละลายแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* จากนั้นนำแป้งสาลีหมักไปอบแห้ง แล้วบดในเครื่องปั่นป่นจนเป็นผงละเอียด

วัตถุประสงค์ในการประดิษฐ์อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งนี้ เพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* ก่อนนำไปพัฒนาเป็นกล้าเชื้อชนิดผง ซึ่งนอกจากจะเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีราคาไม่สูงแล้วยังสามารถทำได้ง่าย และใช้เทคโนโลยีการผลิตที่ไม่ซับซ้อน กล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดผงที่ผลิตได้ตามการประดิษฐ์นี้ จะมีลักษณะภายนอกเป็นผงละเอียด สีขาวครีม ความชื้นร้อยละ 10 - 13 มีปริมาณเชื้อ *Bacillus subtilis* 10^{9}-10^{7} สปอร์ ในผงแป้ง 1 กรัม สามารถนำไปใช้ในการหมักถั่วเหลืองได้ 1 กิโลกรัม ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ผลิตได้จาก ผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ตามการประดิษฐ์นี้ จะมีกลิ่นเหม็นของแอมโมเนียน้อยกว่าการหมักด้วยวิธีดั้งเดิม ปลอดภัยจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคมากกว่าถั่วเหลืองที่หมักด้วยวิธีดั้งเดิม

การปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วย

น้ำตาลซูโครส	10	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส	0.5	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

แป้งสาลี 200-400 กรัม

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง มีขั้นตอนเริ่มจากการละลายส่วนประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งทั้งหมดในน้ำกลั่น โดยยกเว้นแป้งสาลีที่ทำการแยกส่วนในการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ในอัตราร้อยละ 20 - 40 ของน้ำหนัก แล้วจึงเขย่าผสมให้เข้ากันดี

เพื่อให้ได้หลักเชื้อ *Bacillus subtilis* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง มีขั้นตอนเริ่มจาก การเพาะเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 – 48 ชั่วโมง แล้วจึงเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ในอัตราส่วนร้อยละ 2 - 4 โดยปริมาตร ก่อนทำการบ่มในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 - 48 ชั่วโมง

จากนั้นจึงเติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งที่ผ่านการบ่มเรียบร้อยแล้วในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปหมักต่อในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง

จากนั้นจึงทำการอบแห้งแป้งหมักในตู้อบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 - 6 ชั่วโมง แล้วจึงบดแป้งหมักอบแห้งในเครื่องปั่นปลอดเชื้อจนเป็นผงละเอียด จึงจะได้หลักเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดผง

วิธีการในการประดิษฐ์ที่ดีที่สุด

เช่นเดียวกับที่กล่าวไว้แล้วในหัวข้อการเปิดเผยการประดิษฐ์โดยสมบูรณ์

ข้อถือสิทธิ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ที่มีลักษณะเฉพาะประกอบด้วย

น้ำตาลซูโครส	10	กรัม
โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส	0.5	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
แป้งสาลี	200-400	กรัม

2. กรรมวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามข้อถือสิทธิ 1 มีขั้นตอนดังนี้

ละลายส่วนประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งทั้งหมดในน้ำกลั่น โดยยกเว้นแป้งสาลีที่ทำการแยกส่วนในการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ในอัตราร้อยละ 20 - 40 ของน้ำหนัก แล้วจึงเขย่าผสมให้เข้ากัน

3. กรรมวิธีการเตรียมผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* จากอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามข้อถือสิทธิ 1 มีขั้นตอนดังนี้

เพาะเชื้อ *Bacillus subtilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ trypticase soy broth ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วจึงทำการบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 – 48 ชั่วโมง แล้วจึงเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้ง ตามข้อถือสิทธิ 1 ในอัตราส่วนร้อยละ 2 - 4 โดยปริมาตร ก่อนทำการบ่มในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 - 48 ชั่วโมง แล้วจึง

เติมแป้งสาลีปลอดเชื้อ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งที่ผ่านการบ่มเรียบร้อยแล้วในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสมให้เข้ากันดี ก่อนนำไปหมักต่อในตู้บ่มเพาะที่อุณหภูมิ 37 - 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึง

ทำการอบแห้งแป้งหมักในตู้อบแห้งแบบลมร้อนที่อุณหภูมิ 80 - 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 - 6 ชั่วโมง แล้วจึงบดแป้งหมักอบแห้งในเครื่องปั่นป่นปลอดเชื้อจนเป็นผงละเอียด

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงคราม

บทสรุปการประดิษฐ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* ชนิดเหลวจากแป้งตามการประดิษฐ์นี้ ประกอบด้วยแป้งสาลี น้ำตาลซูโครส ไปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส และน้ำกลั่น โดยมีขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงดังกล่าว เริ่มด้วยการนำส่วนผสมไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ แล้วเติมแป้งสาลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ก่อนจะเขย่าผสมให้เข้ากันดี

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นายจักรกฤษ แจ่มจันทร์
วัน เดือน ปีเกิด	31 ธันวาคม 2531
ที่อยู่ปัจจุบัน	12/2 หมู่ 3 ตำบลซุมแสงสงคราม อำเภอบางระกำ จังหวัดพิษณุโลก 65240

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2550	มัธยมศึกษาปีที่ 6 (สายวิทย์-คณิต) โรงเรียนบ้านกร่างวิทยาคม
พ.ศ. 2554	วิทยาศาสตรบัณฑิต (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
พ.ศ. 2558	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร) มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม

มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม