



วิทยานิพนธ์

การยืดอายุของโปรไบโอติกสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้
เทคนิคการดักจับ

**Shelf – Life Extension of Probiotic for Feeding Black Tiger
Shrimps Using Entrapment Technique**

นางสาวปจรรย์ เรืองกลับ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๕๕



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

เทคโนโลยีชีวภาพ

ภาควิชา

เรื่อง การยืดอายุของโปรไบโอติกสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิคการดักจับ

Shelf-Life Extension of Probiotic for Feeding Black Tiger Shrimps Using
Entrapment Technique

นามผู้วิจัย นางสาวปาริย์ เรืองกลับ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์สุชาวดี จิตประเสริฐ, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์ปราโมทย์ สิริโรจน์, D.Agr. Sci.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อัจฉกหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 26 เดือน เมษายน พ.ศ. 2549

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การยืดอายุของโปรไบโอติกสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิคการดักจับ

Shelf – Life Extension of Probiotic for Feeding Black Tiger Shrimps Using
Entrapment Technique

โดย

นางสาวปาริษฐ์ เรืองกลับ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1580-9

ปาจริย์ เรื่องกลับ 2549: การยืดอายุของโปรไบโอติกสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้
เทคนิคการดักจับ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาวิชา
เทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประชานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์
มังกร โรจน์ประภากร, Ph.D. 161 หน้า
ISBN 974-16-1580-9

การยืดอายุแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* LP 64 ซึ่งเป็นโปรไบโอติกในกุ้ง โดยใช้
เทคนิคการดักจับ มีการคัดเลือกสารพาหะที่ใช้ในการดักจับจากพอลิเมอร์ 4 ชนิด คือ โพลีเอทิลีนไกลคอล
โกลโทซาน คาร์ราจีแนนและเซลลูโลส แอซีเตต พบว่าโพลีเอทิลีนไกลคอลเป็นสารพาหะที่
เหมาะสมที่สุดในการดักจับแบคทีเรีย *L. plantarum* LP 64 เม็ดเชื้อส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นทรงกลม
เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยเท่ากับ 0.896 มิลลิเมตร และมีประสิทธิภาพในการดักจับ *L. plantarum* LP 64 สูง
กว่าสารพาหะชนิดอื่น (63%) นอกจากนี้เซลล์ยังหลุดออกจากเม็ดเชื้อได้ตั้งแต่วันที่ 5 เมื่ออยู่ในสภาวะ
ลำไส้กุ้งจำลอง สภาวะที่เหมาะสมในการดักจับ *L. plantarum* LP 64 คือใช้สารละลายโพลีเอทิลีนไกลคอล
ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วการกววน 800 รอบต่อนาที อัตราส่วนระหว่างสารละลายของเซลล์
ต่อสารละลายโพลีเอทิลีนไกลคอลเท่ากับ 12 มิลลิลิตร : 48 มิลลิลิตร ปริมาณน้ำมันและสารละลาย
โพลีเอทิลีนไกลคอลเท่ากับ 150 มิลลิลิตร และ 300 มิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อนำเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก
มาศึกษาการยับยั้งเชื้อไวรัส ซึ่งเป็นการเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ 3 ชนิด คือ *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio*
haverii และ *Vibrio parahaemolyticus* เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าส่วนของเซลล์อิสระและเม็ด
เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้ แต่บริเวณที่เกิดจากเซลล์อิสระจะมี
ขนาดใหญ่มากกว่าบริเวณของเม็ดเชื้อ เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้า แป้งมัน
สำปะหลัง และแป้งข้าวโพด ซึ่งผ่านเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไรเซชัน พบว่าที่อุณหภูมิห้องสามารถเก็บ
รักษาเม็ดเชื้อได้นาน 60 วัน ในขณะที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเม็ดเชื้อได้นานกว่า
180 วัน โดยความสามารถในการผลิตกรดยังคงอยู่ เมื่อศึกษาประสิทธิภาพของ *L. plantarum* LP 64 ต่อ
การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่ากุ้งในกลุ่มที่เติม *L. plantarum* LP 64 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g มีอัตรา
การรอดสูงกว่ากลุ่มที่เติม *L. plantarum* LP 64 2×10^7 , 4×10^7 CFU/g และกลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูป
อย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญ แต่อัตราการเจริญจำเพาะของทุกกลุ่มการทดลองและกลุ่มควบคุมไม่มีความ
แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

Pajaree Ruangklub 2006: Shelf – Life Extension of Probiotic for Feeding Black Tiger Shrimps Using Entrapment Technique. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Mangkorn Rodprapakorn, Ph.D. 161 pages.
ISBN 974-16-1580-9

This experiment used the entrapment technique for shelf-life extension of *Lactobacillus plantarum* LP 64 which is probiotic in shrimps. Four carriers including sodium alginate, chitosan, carrageenan and cellulose acetate phthalate were used to form the beads. The results showed that sodium alginate was the best carrier for entrapment of *L. plantarum* LP 64. The most of alginate beads were sphere, mean diameter were 0.896 mm and efficiency of entrapment was higher than others carriers (63%). Moreover, cell could be released at 5 minute in artificial condition of shrimp's intestine. Optimal conditions for entrapment of *L. plantarum* LP 64 were 3% sodium alginate solution to form gel beads in 300 ml CaCl_2 and 150 ml palm oil. The speed of agitation was 800 rpm and the ratio of cell suspension to sodium alginate solution was 12 ml : 48 ml. Supernatant of entrapped cell in alginate beads also inhibited the black tiger shrimp's pathogens such as *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* and *Vibrio parahaemolyticus*. The shelf-life of entrapped cell in alginate bead at 30°C was short only 60 days. However, they could be alived more than 180 days at 4°C. The survival rates of shrimps which were fed with commercial feed adding probiotic *L. plantarum* LP 64 1×10^8 CFU/g (84%) and 1×10^8 CFU/g (76%) were significantly higher than control group (68%) and shrimps which were added *L. plantarum* LP 64 4×10^7 CFU/g (68%) and 2×10^7 CFU/g (67%) respectively.

Pajaree Ruangklub
Student's signature

Mangkorn Rodprapakorn
Thesis Advisor's signature

18 / 4 / 2006

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มังกร โรจน์ประภากร ประธานกรรมการที่ปรึกษา ซึ่งให้คำแนะนำและแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์ที่ดี และสละเวลาในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ในสมบูรณ์ ขอขอบคุณอาจารย์สุชาวดี จิตประเสริฐ กรรมการวิชาเอก อาจารย์ปราโมทย์ ศิริโรจน์ กรรมการวิชาการ และอาจารย์มัทนา แสงจินดาวงษ์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์

ขอขอบคุณครอบครัวเรื่องกลับ พ่อและแม่ อาจารย์คนแรกและผู้มีอุปการคุณของข้าพเจ้าที่ให้คำแนะนำและกำลังใจที่ดีเสมอในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้จนสมบูรณ์ ขอขอบคุณท่านอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์และมหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้และวิชาจนข้าพเจ้ามาถึง ณ จุดนี้ ขอขอบคุณญาติที่เข้าใจและให้กำลังใจข้าพเจ้าเสมอ ขอขอบคุณพี่นุช กอล์ฟ และพี่อู๋ สำหรับข้อมูลและคำแนะนำในการเลี้ยงกุ้ง ขอขอบคุณตุ๊กตา เอ็ม เปรม สำหรับแรงกายที่ช่วยเหลือในการทำวิจัย ขอขอบคุณ ก๊ับ อัน เก๋ ที่คอยให้หยิบยืมอุปกรณ์ในการทดลองเสมอมา และขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพรวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกคนที่อำนวยความสะดวกในการเรียนและการทำวิจัยเป็นอย่างดี

ประโยชน์อันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอนและมอบแต่สิ่งที่ดีเสมอมา

ปาริย์ เรื่องกลับ

เมษายน 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(4)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	30
ผลและวิจารณ์	39
สรุปผลการทดลอง	122
ข้อเสนอแนะ	124
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	125
ภาคผนวก	138
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	139
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	144
ภาคผนวก ค ตารางแสดงผลการทดลอง	147

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นพาหะในการตรึงเซลล์	22
2	การหลุดของเซลล์ <i>L. plantarum</i> LP 64 จากสารพาหะในลำไส้กึ่งจำลอง	47
3	สรุปการดักจับ <i>L. plantarum</i> LP 64 ของสารพาหะชนิดต่างๆ	47
4	ประสิทธิภาพการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติก <i>L. plantarum</i> LP64 ใน สภาวะการทดลองที่ 1	63
5	ประสิทธิภาพการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติก <i>L. plantarum</i> LP64 ใน สภาวะการทดลองที่ 2	65
6	ความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งทั้ง 3 ชนิด และปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก หลังผ่านเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไชเบค	71
7	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสบนอาหาร NA + 1.5% NaCl	108
8	ร้อยละของอัตราการรอดและอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกึ่งกลาดำที่ได้ รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกับเชื้อ <i>L. plantarum</i> LP64 ที่ปริมาณต่าง ๆ กัน	111
9	ผลการตรวจแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในน้ำ	113
10	ผลการตรวจแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในตะกอน	115
11	ผลการตรวจแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในกึ่งกลาดำ	116
12	คุณภาพน้ำในตู้เลี้ยงกึ่งกลาดำ	120

ตารางผนวกที่

ค1	น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อที่ติดอยู่บนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆของสารพาหะ ทั้ง 3 ชนิด	148
ค2	น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้ สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 1 เปอร์เซ็นต์ สภาวะการทดลองที่ 1	150
ค3	น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้ สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ สภาวะการทดลองที่ 1	151

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค4 น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้ สารละลายโซเดียมอัลจินต 3 เปอร์เซ็นต์ สภาวะการทดลองที่ 1	152
ค5 น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้ สารละลายโซเดียมอัลจินต 1 เปอร์เซ็นต์ สภาวะการทดลองที่ 2	153
ค6 น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้ สารละลายโซเดียมอัลจินต 2 เปอร์เซ็นต์ สภาวะการทดลองที่ 2	154
ค7 น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้ สารละลายโซเดียมอัลจินต 3 เปอร์เซ็นต์ สภาวะการทดลองที่ 2	155
ค8 ปริมาณแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> LP64 และความชื้นของเม็ดเชื้อผสม แป้งข้าวเจ้า เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	156
ค9 ปริมาณแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> LP64 และความชื้นของเม็ดเชื้อผสม แป้งมันสำปะหลัง เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	158
ค10 ปริมาณแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> LP64 และความชื้นของเม็ดเชื้อผสม แป้งข้าวโพด เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	160

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อวัยวะที่สำคัญของกิ้งกูดาคำ	6
2	แผนภาพทฤษฎีสาเหตุของการเกิดโรคในลูกกิ้งกูดาคำ	12
3	โครงสร้างทางเคมีของอัลจินต	23
4	โครงสร้างทางเคมีของไคโทซาน	24
5	โครงสร้างทางเคมีของแคปปา-คาร์ราจีแนน	25
6	โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส แอซิเตต พทาเลต	26
7	เครื่องกวนผสมความเร็วสูง	38
8	ผู้ทดลองที่ใช้เลี้ยงกิ้งกูดาคำ	38
9	ภาพถ่ายของเม็ดเชื้อที่ถูกดักจับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า	40
10	สัดส่วนน้ำหนักของเม็ดเชื้อที่ดักจับด้วยโซเดียมอัลจินตบนตะแกรงร้อน ขนาดต่างๆ	43
11	สัดส่วนน้ำหนักของเม็ดเชื้อที่ดักจับด้วยไคโทซานบนตะแกรงร้อนขนาดต่างๆ	43
12	สัดส่วนน้ำหนักของเม็ดเชื้อที่ดักจับด้วยคาร์ราจีแนนบนตะแกรงร้อนขนาดต่างๆ	44
13	การกระจายตัวของเม็ดเชื้อบนตะแกรงร้อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลาย โซเดียมอัลจินต 1 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 1	51
14	การกระจายตัวของเม็ดเชื้อบนตะแกรงร้อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลาย โซเดียมอัลจินต 2 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 1	53
15	การกระจายตัวของเม็ดเชื้อบนตะแกรงร้อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลาย โซเดียมอัลจินต 3 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 1	55
16	การกระจายตัวของเม็ดเชื้อบนตะแกรงร้อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลาย โซเดียมอัลจินต 1 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 2	57
17	การกระจายตัวของเม็ดเชื้อบนตะแกรงร้อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลาย โซเดียมอัลจินต 2 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 2	59
18	การกระจายตัวของเม็ดเชื้อบนตะแกรงร้อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลาย โซเดียมอัลจินต 3 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 2	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	ลักษณะของเม็ดเชื้อหลังผ่านเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไชเบค	69
20	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้า ที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	72
21	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้า ที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	75
22	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้า ที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	76
23	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน	77
24	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน	78
25	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน	79
26	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน	80
27	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน	81
28	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 120 วัน	82
29	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	83
30	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งมัน สำปะหลังที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	85
31	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งมัน สำปะหลังที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	86
32	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งมัน สำปะหลังที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	87
33	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลังซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน	88
34	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลังซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน	89
35	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลังซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน	90
36	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลังซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน	91
37	การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลังซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน	92

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
38	การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลังซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 120 วัน	93
39	การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลังซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	94
40	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาติ เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	97
41	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาติ เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	98
42	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาติ เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	99
43	การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน	100
44	การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน	101
45	การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน	102
46	การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน	103
47	การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน	104
48	การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 120 วัน	105
49	การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน	106
50	การยับยั้งเชื้อก่อโรค <i>V. alginolyticus</i> ของแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> LP 64	108
51	การยับยั้งเชื้อก่อโรค <i>V. harveyi</i> ของแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> LP 64	109
52	การยับยั้งเชื้อก่อโรค <i>V. parahaemolyticus</i> ของแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> LP 64	109

การยืดอายุของโปรไบโอติกสำหรับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำโดยใช้เทคนิคการดักจับ

Shelf-Life Extension of Probiotic for Feeding Black Tiger Shrimps Using Entrapment Technique

คำนำ

ในระยะสิบกว่าปีที่ผ่านมาธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้เจริญก้าวหน้าไปอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (black tiger shrimp) ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญมากทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นธุรกิจที่ให้ผลตอบแทนสูงเมื่อเปรียบเทียบกับธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ โดยเฉลี่ยผลตอบแทนที่ได้จากการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำมีประมาณ 200,000 บาท/ไร่ นอกจากนี้กุ้งกุลาดำยังเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางอาหารสูง และมีรสอร่อยเป็นที่นิยมของผู้บริโภคภายในและภายนอกประเทศ (ไตรรัตน์, 2541) แต่ในสภาวะปัจจุบันการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำต้องเผชิญกับปัญหาการเกิดโรคและปรสิตอย่างรุนแรง การแก้ปัญหาหมักใช้สารปฏิชีวนะแต่วิธีการดังกล่าวไม่สามารถรักษาอาการป่วยที่เกิดจากการติดเชื้อแบคทีเรียได้และเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเกิดการดื้อยาขึ้น ทำให้ต้องใช้สารปฏิชีวนะในปริมาณมากขึ้น ส่งผลให้กุ้งกุลาดำมีการเจริญเติบโตช้า เลี้ยงไม่ได้ขนาดตามที่ตลาดต้องการและอ่อนแอ เนื่องจากการใช้ยาที่มากเกินไปจะส่งผลเสียหายนต่อดับและดื้อยาทำให้เกิดการฟุ้งของดื้อยา สุขชัย (2538) พบว่าเชื้อไวรัสจากดินก้นบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำในเขตจันทบุรี จำนวน 40 สายพันธุ์ คือต่อสารปฏิชีวนะออกซิเตตราไซคลินและ 20 สายพันธุ์ คือต่อสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล นอกจากนี้การใช้สารปฏิชีวนะปริมาณมากยังทำให้เกิดสารตกค้างในเนื้อกุ้งซึ่งมีผลต่อการส่งออกไปยังประเทศในแถบยุโรปอีกด้วย ตั้งแต่ปี 2534 – 2536 พบตัวอย่างกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็งมีสารปฏิชีวนะออกซิเตตราไซคลินตกค้างอยู่เป็นจำนวน 6, 2 และ 32 ตัวอย่าง คิดเป็นน้ำหนักที่ส่งออก 170.5, 34 และ 835.7 ตัน (กนกพรรณ, 2536) เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจึงหันมาให้ความสนใจในการใช้จุลินทรีย์เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวแทน

ผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการเลี้ยงกุ้งมีหลายชนิด แบ่งเป็นกลุ่มสารเสริมชีวนะหรือโปรไบโอติก ซึ่งใช้เพื่อป้องกันการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ก่อโรคในท่อทางเดินอาหาร จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ เช่น *Lactobacillus* spp. และ *Enterococcus* spp. เป็นต้น กลุ่มจุลินทรีย์ควบคุมและบำบัดน้ำเสีย ทำหน้าที่ควบคุมบำบัดและรักษาคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เช่น แบคทีเรียในตระกูล

Bacillus spp. และกลุ่มหมักดองหรือน้ำหมักชีวภาพ ใช้บำบัดน้ำในบ่อกึ่งและส่งเสริมการเจริญของ กุ้ง เป็นต้น

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria , LAB) สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* LP64 ซึ่งผ่านการทดสอบแล้วว่ามีสมบัติเป็นโปรไบโอติกที่ดีและปลอดภัยต่อการใช้งานในการ เลี้ยงกุ้งก้ามกราม (วลัยพร, 2544) และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม แต่ ปัจจุบันยังมีปัญหาด้านข้อจำกัดเรื่องอายุการใช้งาน และปัญหาอัตราการรอดชีวิตต่ำระหว่างการเก็บ รักษา ดังนั้นเพื่อศึกษาหาวิธีการแก้ไขปัญหานี้ให้โปรไบโอติกที่ได้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมในการใช้งานและมีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มสูงขึ้น จึงพิจารณานำเทคนิคที่เรียกว่าการดักจับ (entrapment) มาใช้ในการพัฒนายืดอายุการใช้งานของโปรไบโอติกสำหรับการเลี้ยงกุ้ง เนื่องจาก เทคนิคนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของเชื้อจุลินทรีย์ และจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาให้โปรไบโอติกเหล่านี้สามารถถูกนำไปใช้งานเพื่อเพิ่มความ แข็งแรงของกุ้งและทนทานต่อโรคอย่างสะดวกและมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาชนิดของสารและสถานะที่เหมาะสมสำหรับการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งเป็นโปรไบโอติกสำหรับกึ่ง
โรคของแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งเป็นโปรไบโอติกเหล่านี้
2. เพื่อทดสอบผลของการดักจับต่อการยืดอายุการเก็บรักษาและการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งเป็นโปรไบโอติกเหล่านี้
3. เพื่อทดสอบผลของการใช้งานโปรไบโอติกซึ่งถูกดักจับเหล่านี้ที่มีต่อการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของกึ่งกูลาดำ

การตรวจเอกสาร

1. กุ้งกุลาดำ

1.1 ชีวิตวิทยาของกุ้งกุลาดำ

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์น้ำเค็มมีชื่อสามัญว่า แบล็ค ไทเกอร์ ชริมพ์ (Black tiger shrimp) หรือ แบล็ค ไทเกอร์ พรอว์น (Black tiger prawn) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า ฟิเนียส โมโนดอน (*Penaeus monodon* Fabricius) เป็นกุ้งในกลุ่ม Penaeid ที่ขนาดใหญ่ที่สุด โดยทั่วไปมีขนาดประมาณ 18 – 25 เซนติเมตร กุ้งกุลาดำมีรสชาติดี มีคุณค่าทางอาหารสูง เป็นสินค้าส่งออกนํารายได้เข้าสู่ประเทศเป็นอันดับหนึ่งในบรรดาสัตว์น้ำ

กุ้งกุลาดำมีอายุประมาณ 18 – 24 เดือน มีหนวดหลายข้างไม่ชัดเจน ลำตัวสีแดงอมน้ำตาลถึงน้ำตาลเข้ม มีลายพาดขวางด้านหลังประมาณ 9 ลาย ขอบปลายหางและขาว่ายน้ำมีขนสีแดง ชอบอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีพื้นดินเป็นทรายปนโคลน หรือทรายปนเปลือกหอยและหินปะการัง กินแพลงก์ตอน หนอนและแมลงน้ำเป็นอาหาร

กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์ที่มีกระดูกหุ้มเนื้อ หรือมีเปลือกหุ้มหัวและตัว มีลักษณะเป็นแผ่นบางและค่อนข้างแข็ง มี 2 ชั้น ซ้อนกันอยู่ ประกอบด้วยสารไคติน โปรตีน และเกลือแคลเซียมคาร์บอเนตรวมอยู่กับไคตินค่อนข้างสูง เปลือกกุ้งกุลาดำจะแบ่งออกเป็นปล้องๆ แต่ละปล้องจะเชื่อมติดกัน เพื่อให้สะดวกในการเคลื่อนไหวของลำตัวและรยางค์ เปลือกกุ้งกุลาดำมีส่วนที่ยึดติดกับโครงร่างภายในด้วย กุ้งกุลาดำเจริญเติบโตโดยการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์กล้ามเนื้อกับการลอกคราบอย่างสัมพันธ์กันและต่อเนื่องกัน ก่อนการลอกคราบกุ้งจะกินอาหารเต็มที่ เพื่อเตรียมสะสมอาหารและแร่ธาตุสำหรับสร้างเปลือกใหม่ เพราะในกระบวนการลอกคราบ กุ้งกุลาดำต้องการใช้แร่ธาตุในจำนวนมาก เมื่อมีการลอกคราบเปลือกเก่าจะถูกสลัดทิ้ง เมื่อเปลือกใหม่ภายในถูกสร้างเสร็จ โดยเปลือกใหม่จะมีขนาดใหญ่กว่าเดิมเพื่อให้ตัวกุ้งกุลาดำเจริญเติบโตขึ้น เปลือกใหม่จะมีการแข็งตัวขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากมีการสะสมแคลเซียมไว้ หลังจากตัวกุ้งกุลาดำมีเปลือกใหม่ที่ขนาดใหญ่กว่าเดิมก็จะเป็นช่วงที่กุ้งกุลาดำเจริญเติบโตสร้างเนื้อจนเต็ม เริ่มสะสมอาหารและแร่ธาตุเพื่อลอกคราบใหม่

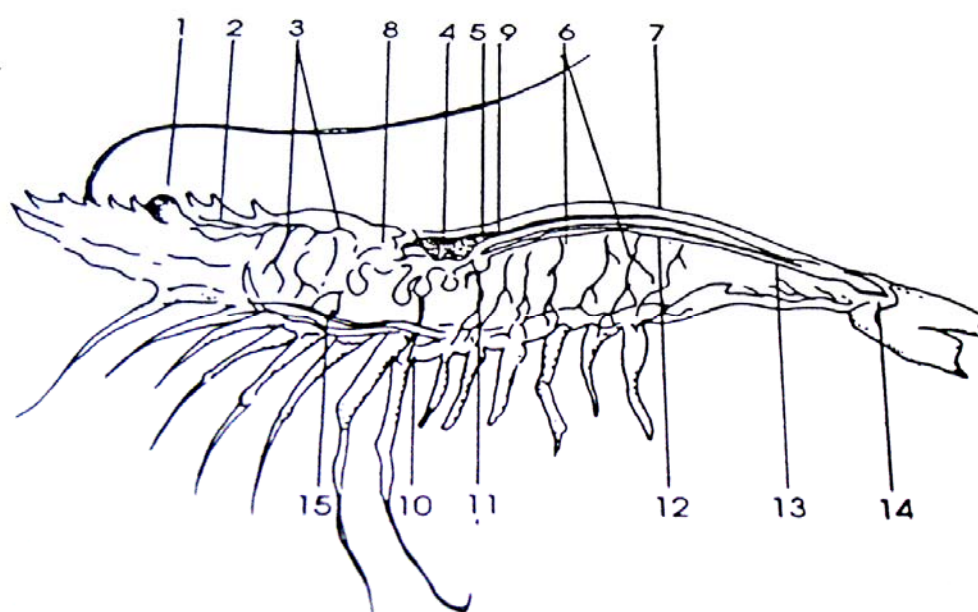
กึ่งกลาดำหายใจทางเหงือกและผิวหนัง เนื่องจากออกซิเจนสามารถซึมผ่านผิวหนังเข้าไปเพื่อใช้ในการหายใจได้ แต่โดยหลักแล้วกึ่งกลาดำต้องใช้เหงือกในการหายใจ เหงือกที่กึ่งกลาดำใช้หายใจจึงเป็นสิ่งที่สำคัญมาก เนื่องจากเหงือกค่อนข้างที่จะบอบบางต่อการกระทำรุนแรง ถ้ามีการใส่สารเคมีที่มีฤทธิ์กัดกร่อนในปริมาณมากเกินไป สามารถทำให้เหงือกบอบช้ำและเปื่อยยุ่ยได้ เหงือกของกึ่งกลาดำมีลักษณะเป็นซี่ จึงง่ายต่อการเกาะติดของตะกอนและโปรโตซัวที่เป็นโทษต่อกึ่งกลาดำ ทำให้ประสิทธิภาพในการหายใจลดลงและส่งผลให้เกิดการอ่อนแอได้ จึงมีความจำเป็นต้องสังเกต และดูแลสภาพเหงือกของกึ่งกลาดำเสมอ

การกินอาหารของกึ่งกลาดำจะใช้หนวดคู่ที่ 2 และคู่ที่ 3 คอยจับอาหารเม็ดหรือเหยื่อที่มีขนาดพอจะจับได้ส่งเข้าปาก การให้อาหารเม็ดควรให้ขนาดพอเหมาะกับปริมาณที่ใช้จับอาหารเพื่อให้กึ่งกินอาหารได้ดี ส่งผลที่ดีต่อการเจริญเติบโตและสุขภาพของกึ่งกลาดำ สำหรับการหาอาหารของกึ่งกลาดำ จะมีเส้นประสาทรับความรู้สึกทางกลิ่นที่หนวด บริเวณปาก ขาเดิน หัวเหงือก ลำตัว และแพนหาง (มะลิ, 2531) ดังนั้นอาหารที่มีกลิ่นดึงดูดดีก็จะช่วยเพิ่มความอยากกินอาหารของกึ่งเพิ่มขึ้น

ระบบการย่อยอาหารภายในของตัวกึ่งกลาดำ มีปากทำหน้าที่บดหรือฉีกอาหารให้มีขนาดเล็กลง แล้วลงสู่การย่อยด้วยเอนไซม์ ส่วนที่ย่อยไม่หมดก็จะผ่านลงไปถึงตอมน้ำย่อย และถูกย่อยอีกครั้ง แต่เนื่องจากกึ่งกลาดำมีลำไส้ตรงและสั้นอาหารจึงควรย่อยได้ง่าย และหากสารอาหารที่ย่อยเป็นสารละลายแล้วควรอยู่ในรูปที่สามารถดูดซึมไปเลี้ยงร่างกายได้ดีด้วย

ระบบการหมุนเวียนเลือดของกึ่งกลาดำเป็นระบบเปิด ประกอบด้วย หัวใจ แอ่งเลือด และน้ำเหลือง เลือดจากหัวใจจะไหลเข้าไปในแอ่งเลือดแล้วไหลไปเลี้ยงเนื้อเยื่อของเซลล์ในร่างกาย องค์ประกอบของเลือดกึ่งกลาดำประกอบด้วยแร่ธาตุสำคัญคือ คาร์บอน ไนโตรเจน ไฮโดรเจน กำมะถัน และ คอปเปอร์ เลือดของกึ่งกลาดำเป็นเลือดสีน้ำเงิน เนื่องจากมีธาตุคอปเปอร์เป็นองค์ประกอบอยู่

การขับถ่ายของเสียของกึ่งกลาดำ อวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการขับถ่ายได้แก่ เปลือก ต่อมโคนขา และบริเวณเหงือก สำหรับของเสียที่เป็นกากอาหารจะถูกขับถ่ายออกทางรูทวาร ของเสียที่ถูกขับถ่ายออกมาจะอยู่ในรูปแอมโมเนีย กรดยูริก และมียูเรียกับของเสียในรูปไนโตรเจนเล็กน้อย



- | | |
|------------------------------------|-------------------------|
| 1. ตา | 2. เส้นประสาทการมองเห็น |
| 3. ท่อนำเลือดเลี้ยงอวัยวะย่อยอาหาร | 4. หัวใจ |
| 5. ตับ/ตับอ่อน | 6. แอ่งเลือด |
| 7. ท่อนำเลือดเลี้ยงลำตัวและปล้อง | 8. รังไข่ |
| 9. พู่ไข่ | 10. ท่อรังไข่ |
| 11. ลำไส้ส่วนหน้า | 12. ลำไส้ส่วนกลาง |
| 13. ลำไส้ส่วนท้าย | 14. ทวาร |
| 15. เหงือก | |

ภาพที่ 1 อวัยวะที่สำคัญของกุ้งกุลาดำ

ที่มา: เบญจมินทร์ (2547)

1.2 วิวัฒนาการของกุ้งกุลาดำวัยอ่อน

ลูกกุ้งกุลาดำวัยอ่อนมีวิวัฒนาการออกเป็น 4 ขั้น คือ

1.2.1 ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่หนึ่ง เรียกว่า “ นอเพลียส ” (nauplius) เป็นลูกกุ้งที่ฟักออกเป็นตัวใหม่ๆ มีขนาดเล็ก มองด้วยตาเปล่าไม่เห็น รูปร่างค่อนข้างกลม มีรยางค์สามคู่ช่วยในการเคลื่อนไหว ในระยะนี้ลูกกุ้งยังไม่กินอาหาร แต่จะได้อาหารส่วนใหญ่จากถุงอาหารที่ติดตัวมา (yolk sac) ซึ่งจะใช้หมดภายใน 36 – 48 ชั่วโมง ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 45 – 50 ชั่วโมง ลอกคราบหนึ่งครั้งและจะมีชีวิตส่วนใหญ่อยู่ตามหน้าดิน

1.2.2 ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สอง เรียกว่า “ โซเอีย ” (zoea) ลูกกุ้งจะมีลำตัวยาวขึ้น ส่วนหัวโตเห็นได้ชัด ลูกกุ้งจะค่อยๆ ลอยตัวสู่น้ำและเริ่มกินอาหาร อาหารของลูกกุ้งระยะนี้ส่วนใหญ่เป็นพวกแพลงก์ตอนพืชขนาด 50 – 100 ไมครอน (บรรจง, 2529) ใช้เวลาในการเจริญอยู่ในระยะนี้ประมาณ 4 วัน มีการเจริญเติบโตสามระยะ ลอกคราบสามครั้ง ครั้งหนึ่งๆ ห่างกันประมาณ 24 ชั่วโมง การลอกคราบแต่ละครั้งลูกกุ้งจะมีรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

1.2.3 ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สาม เรียกว่า “ ไมซิส ” (mysis) ลูกกุ้งในระยะนี้มีลักษณะคล้ายพ่อ-แม่มากขึ้น สามารถมองเห็นส่วนหัวและส่วนท้องได้อย่างชัดเจน ส่วนนอกนั้นยังรวมอยู่กับส่วนหัวมีเปลือกคลุม กริเห็นได้ชัดเจน ลำตัว (วัดจากปลายกริถึงปลายหาง) ยาว 2.56 มิลลิเมตร จะกินอาหารจำพวกไรน้ำเค็ม เช่น โรติเฟอร์ อาร์ทีเมีย อาศัยอยู่ตามผิวน้ำ ลูกกุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณเจ็ดวัน ลอกคราบสามครั้งก็จะเจริญเติบโตเป็นลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สี่

1.2.4 ลูกกุ้งวัยอ่อนระยะที่สี่ เรียกว่า “ โพสต์ลาร์วา ” (postlarva) เป็นลูกกุ้งวัยอ่อนระยะสุดท้าย ลูกกุ้งระยะนี้เปลี่ยนนิสัยมากินอาหารจำพวกเนื้อ เริ่มมีรยางค์ครบเหมือนกุ้งเต็มวัย และจะมีวิวัฒนาการไปเรื่อยๆ จนเข้าสู่กุ้งวัยรุ่น กุ้งจะอยู่ในระยะนี้ประมาณ 30 วัน ลอกคราบวันละครั้ง มีความยาวประมาณ 1.5 – 2 เซนติเมตร หนักประมาณ 1.01 – 1.02 กรัม ลูกกุ้งจะเลี้ยงตัวอยู่บริเวณป่าไม้ชายเลนหรือในแหล่งน้ำกร่อยประมาณ 3 – 4 เดือน ก็จะโตเป็นกุ้งวัยรุ่น เมื่อมีอายุได้ประมาณหกเดือนกุ้งจะเดินทางสู่ทะเลเพื่อผสมพันธุ์ต่อไป

1.3 คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง

น้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เป็นตัวกลางให้กุ้งกุลาดำและสิ่งมีชีวิตในน้ำได้อาศัยดำรงชีพอยู่ คุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ หมายถึง คุณสมบัติรวมทั้งในด้านกายภาพ เคมีและชีวภาพของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ถ้าน้ำมีคุณภาพดี มีความเหมาะสม กุ้งกุลาดำในบ่อก็จะอยู่ดี กินดี สุขภาพดี และการเจริญเติบโตก็จะดีด้วย แต่ถ้าคุณภาพน้ำไม่ดี ปัญหาที่จะเกิดขึ้นได้

น้ำในแหล่งน้ำธรรมชาติที่อุดมไปด้วยแร่ธาตุ จะช่วยให้กุ้งเจริญเติบโตได้ดี แร่ธาตุจึงเป็นตัวกำหนดความอุดมสมบูรณ์ของน้ำในบ่อเลี้ยง นอกจากแร่ธาตุแล้วยังจำเป็นต้องมีการจัดการควบคุมตัวแปรต่างๆของคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำให้เหมาะสมกับการเจริญเติบโต แข็งแรงไม่เป็นโรคและอัตราการรอดสูง

ตัวแปรคุณภาพน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำที่ควรนำมาพิจารณา ได้แก่

1.3.1 อุณหภูมิ (temperature) กุ้งกุลาดำเป็นสัตว์เลือดเย็น ไม่สามารถรักษาอุณหภูมิของร่างกายให้คงที่เหมือนสัตว์เลือดอุ่น อุณหภูมิร่างกายของกุ้งกุลาดำจะเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิของน้ำ กุ้งกุลาดำสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในช่วงจำกัด ร่างกายจึงสามารถเปลี่ยนตามอุณหภูมิของน้ำในขอบเขตที่เหมาะสมเท่านั้น อุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงกุ้ง มีผลต่อกิจกรรมต่างๆ ในการดำรงชีวิตของกุ้ง เช่น การเผาผลาญอาหารและการสร้างพลังงาน การหายใจ การเคลื่อนไหว ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้น กิจกรรมในการดำรงชีวิตก็จะสูงขึ้น และเมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง กิจกรรมเหล่านี้ก็จะลดลงไปด้วย (เบญจมินทร์, 2547) กิจกรรมเหล่านี้จะมีผลกระทบต่ออัตราการเจริญเติบโตของกุ้งตามมา กุ้งจะโตเร็วถ้าอุณหภูมิสูง แต่ถ้าสูงเกินไปกุ้งก็ตาย โดยอุณหภูมิของน้ำที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของกุ้งจะอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิของน้ำสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส กุ้งก็สามารถจะทนอยู่ได้แต่จะอ่อนเพลียและตายได้ในที่สุด หรือถ้าอุณหภูมิของน้ำในบ่อเลี้ยงต่ำกว่า 12 องศาเซลเซียส กุ้งจะหนาวและตายได้ (กลุ่มบัณฑิตเกษตรก้าวหน้า, 2531)

1.3.2 ความเค็ม หมายถึงปริมาณของแข็ง (solid) หรือปริมาณเกลือแร่ต่างๆทั้งหมดที่ละลายอยู่ในน้ำ 1 กิโลกรัม ความเค็มมีหน่วยเป็นกรัมต่อกิโลกรัม หรือส่วนในพัน (part per thousand) เรียกทั่วไปว่า พีพีที (ppt) ความเค็มของน้ำมีผลต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำโดยเฉพาะ

ระบบการควบคุมปริมาณน้ำภายในร่างกายและน้ำภายนอก อย่างไรก็ตามสัตว์น้ำรวมทั้งกุ้งกุลาดำสามารถปรับตัวให้เข้ากับสภาพความเค็มของน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงได้ แต่ต้องเป็นไปอย่างช้าๆ กุ้งกุลาดำสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในความเค็มระหว่าง 0.2 – 70 ส่วนในหนึ่งพัน แต่ก็จะโตช้าลงเมื่อน้ำนั้นมีความเค็มสูงกว่า 25 ส่วนในหนึ่งพัน กุ้งกุลาดำจะโตได้ดีที่สุดในน้ำที่มีช่วงความเค็มระหว่าง 10 – 20 ส่วนในหนึ่งพัน (บรรจง, 2529)

1.3.3 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำในบ่อเลี้ยง ถือเป็นตัวแปรตัวหนึ่งที่มีผลต่อตัวกุ้งทั้งทางตรงและทางอ้อม น้ำกุ้งที่ดีควรมีค่ากรด-ด่างอยู่ระหว่าง 7.8 – 8.3 เพราะเป็นช่วงที่กุ้งสามารถเจริญเติบโตและกินอาหารได้ดี (เบญจมิตร, 2547) ถ้าในบ่อเลี้ยงมีค่ากรด-ด่างค่อนข้างต่ำ ผลกระทบโดยตรงที่เกิดกับตัวกุ้ง คือ การใช้ออกซิเจนของตัวกุ้งจะเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะบ่อที่น้ำมีความเค็มต่ำจะมีผลกระทบมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีผลต่อการลอกคราบของกุ้งด้วย โดยผลรวมแล้วสามารถส่งผลให้กุ้งเครียด การกินอาหารสะดุด อ่อนแอ และภูมิคุ้มกันลดลงได้ กรณีที่ค่ากรด-ด่างต่ำมาก ๆ ส่งผลให้กล้ามเนื้อบริเวณหางซ็อก ขุ่นขาว และกล้ามเนื้อตายได้ ผลกระทบที่เกิดจากสภาพกรด-ด่างที่ค่อนข้างต่ำ ยังส่งผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์บางกลุ่ม โดยเฉพาะกลุ่มที่ย่อยไนไตรต์ (NO_2^-) คือ กลุ่มไนโตรแบคทีเรีย เพราะสภาพที่เป็นกรด หรือค่ากรด-ด่างค่อนข้างต่ำ ไนไตรต์จะเปลี่ยนเป็นกรดไนตริก ซึ่งมีพิษต่อตัวไนโตรแบคทีเรีย ทำให้การเจริญเติบโตของกุ้งชะงัก ในกรณีที่ค่ากรด-ด่างสูงผลกระทบโดยรวมต่อตัวกุ้งก็จะเป็นเช่นเดียวกับปัจจัยที่ไม่เหมาะสมอื่นๆ คือ กุ้งกุลาดำเครียด อ่อนแอ นอกจากนี้ยังมีผลต่อสภาพการละลายได้ของธาตุ หรือการแตกตัวของแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการลอกคราบของกุ้งกุลาดำ เช่น เมื่อค่ากรด-ด่างค่อนข้างสูง การละลายของแคลเซียม และแมกนีเซียมจะลดน้อยลงเรื่อยๆ เมื่อแร่ธาตุไม่ละลาย การลอกคราบของกุ้งก็จะชะงักทำให้เกิดปัญหาลอกคราบไม่ออก ในสภาพที่ค่ากรด-ด่างสูงยังส่งผลให้แอมโมเนียเปลี่ยนรูปเป็นก๊าซแอมโมเนียซึ่งเป็นพิษมากขึ้น (สุภมาส, 2539)

1.3.4 ออกซิเจน ปริมาณออกซิเจนในน้ำ (dissolved oxygen หรือ DO) มีความสำคัญต่อชีวิตและความเป็นอยู่ของกุ้งเนื่องจากออกซิเจนจะมีผลต่อการกินอาหาร การเจริญเติบโต และสุขภาพของกุ้ง ที่ระดับความเข้มข้นของออกซิเจนมากกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นช่วงที่ดีที่สุดต่อการเจริญเติบโตของกุ้งมากที่สุด กุ้งจะไม่กินอาหารถ้าในบ่อมีออกซิเจนต่ำกว่า 3 ส่วนในหนึ่งล้าน และกุ้งจะตายภายในเวลา 3 – 4 ชั่วโมงเมื่อความเข้มข้นของออกซิเจนอยู่ที่ระดับต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมต่อลิตร ช่วงที่จะทำให้เกิดอันตรายจากการขาดออกซิเจนในบ่อเลี้ยงกุ้งคือ ในช่วงกลางคืนถึงเช้ามืด และในช่วงเช้ามืดเป็นช่วงที่วิกฤตที่สุด ออกซิเจนในบ่อจะมีอย่างน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับความ

เค็มและอุณหภูมิด้วย โดยปริมาณของออกซิเจนที่ละลายน้ำจะลดลงถ้าในบ่อมีความเค็มและอุณหภูมิสูงขึ้น ตามปกติกุ้งขนาดเล็กต้องการออกซิเจนสูงกว่ากุ้งขนาดใหญ่ กุ้งขนาด 0.1 – 0.5 กรัม จะใช้ออกซิเจนประมาณชั่วโมงละ 1 – 2 มิลลิกรัม ส่วนกุ้งขนาด 10.0 – 20.0 กรัม จะใช้ออกซิเจนประมาณชั่วโมงละ 0.3 มิลลิกรัม กุ้งจะใช้ออกซิเจนสูงกว่าปกติถ้าอยู่ในระยะที่ลอกคราบ (บรรจง, 2529)

1.3.5 ไนโตรเจน ได้แก่ ไนเตรตและ ไนไตรต์ ปริมาณของไนเตรตในน้ำที่เป็นพิษต่อกุ้งนั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่พบว่าแม้ในน้ำจะมีไนเตรตอยู่ถึง 300 ส่วนในหนึ่งล้าน กุ้งก็อยู่ได้ปกติ การเจริญเติบโตไม่ชะงัก (Wickins, 1976) ส่วนไนไตรต์จะเป็นพิษต่อกุ้งเมื่อน้ำมีปริมาณไนเตรตสูงประมาณ 10 ส่วนในหนึ่งล้าน การเกิดไนไตรต์ในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ เกิดขึ้นจากกระบวนการไนตริฟิเคชัน (nitrification) มีการสะสม ทำให้ไนไตรต์ไม่สามารถถูกย่อยต่อเป็นไนเตรตได้ หรือเกิดจากกระบวนการดีไนตริฟิเคชัน (denitrification) จึงเกิดการสะสมของไนไตรต์ขึ้น กุ้งจะทนต่อไนไตรต์ได้สูงกว่าปลามาก เพราะปลาจะตายทันทีเมื่อน้ำมีไนไตรต์อยู่เพียง 0.55 ส่วนในหนึ่งพัน (Smith and William, 1974) ทั้งนี้เนื่องจากไนไตรต์สามารถไปออกซิไดซ์ฮีโมโกลบิน เกิดเป็นเมทฮีโมโกลบิน (methaemoglobin) ทำให้เลือดไม่สามารถนำเอาออกซิเจนไปใช้ในการหายใจได้ ส่วนกุ้งนั้นในเลือดมี hemocyanin ไม่ทำปฏิกิริยากับไนไตรต์ ไนไตรต์อาจจะซึมเข้าไปในเลือดกุ้งแต่ก็จะถูกกุ้งขับออกจากร่างกายได้ แต่ในภาวะที่บ่อเลี้ยงมีค่ากรด-ด่างต่ำ ความเป็นพิษของไนไตรต์ที่มีต่อตัวกุ้งก็จะสูงขึ้น ในบ่อเลี้ยงกุ้งที่เกิดปัญหามีไนไตรต์เป็นเวลานาน จะส่งผลให้ตัวกุ้งเครียด การกินอาหารสะสม ผอม กรอบแกรบ และจะอ่อนแอลงเรื่อยๆ จนมีการตายเกิดขึ้นได้ หากมีการจับกุ้งที่สภาวะดังกล่าวก็จะได้กุ้งที่มีน้ำหนักไม่ดี และคุณภาพต่ำ

1.3.6 แอมโมเนีย แอมโมเนียที่เกิดในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ โดยปกติเกิดจากการเน่าเปื่อยของอินทรีย์สารต่างๆ ที่เกิดการสะสมในบ่อ เช่น เศษอาหารกุ้งที่ตกค้าง ซากแพลงก์ตอนต่างๆ จี๊กุ้ง และซากจุลินทรีย์ต่างๆ แอมโมเนียที่เกิดขึ้นในบ่อเลี้ยงกุ้ง มีอยู่ทั้งในรูปของแอมโมเนีย (NH_3) และในรูปของแอมโมเนียมไอออน (NH_4^+) ถ้าในบ่อเลี้ยงมีค่ากรด-ด่างสูงแอมโมเนียจะอยู่ในรูป NH_3 มากกว่า NH_4^+ โดยปกติแล้วแอมโมเนียมไอออนจะไม่เป็นพิษต่อกุ้งเพราะไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ได้ (Milne et al., 1988) ในขณะที่แอมโมเนีย (NH_3) ซึ่งเป็นก๊าซสามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์ได้ดีจึงเป็นพิษต่อกุ้งกุลาดำและสัตว์น้ำ ถ้าในน้ำมีก๊าซแอมโมเนียอยู่มากตัวกุ้งก็ไม่สามารถขับถ่ายของเสียออกมาได้ ก๊าซแอมโมเนียสามารถทำให้เซลล์เหงือกบวมน้ำและเสื่อมสภาพได้ ทำให้ความสามารถในการนำออกซิเจนเข้าสู่ร่างกายลดลง หากกุ้งอยู่ในน้ำที่มีก๊าซ

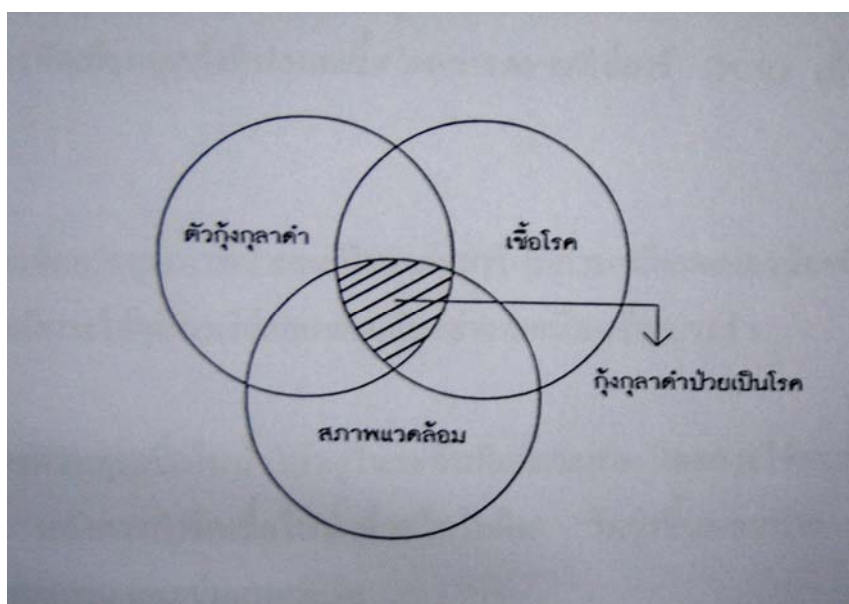
แอมโมเนียเป็นเวลานาน ส่งผลให้กุ้งเครียด และอ่อนแอได้ การกินอาหารก็จะสะดุด กุ้งจะมีขนาดลดลง และติดเชื้อแบคทีเรียได้ในที่สุด แอมโมเนียในน้ำจะมีมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและค่ากรด-ด่าง ถ้าค่ากรด-ด่างของน้ำสูงขึ้น แอมโมเนียจะมีปริมาณมากขึ้น ปริมาณแอมโมเนียในบ่อกุ้งไม่ควรสูงกว่า 0.10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนึ่งลิตร ถ้าในน้ำหนึ่งลิตรมีแอมโมเนียสูงกว่า 0.45 มิลลิกรัม อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งจะลดลงประมาณร้อยละ 50 (Wickins, 1976)

1.3.7 ไฮโดรเจนซัลไฟด์ ก๊าซชนิดนี้จะเป็นพิษต่อกุ้ง และมักเกิดตามพื้นนาหรือในบ่อหลังจากที่เก็บกักน้ำไว้นานๆ หรือเกิดจากกระบวนการย่อยสลายของแบคทีเรียในสภาพที่ขาดออกซิเจน Shiguene (1975) รายงานว่า กุ้งของญี่ปุ่นจะเสียชีวิตถ้าในน้ำมีไฮโดรเจนซัลไฟด์ประมาณ 0.1 – 0.2 มิลลิกรัมต่อน้ำหนึ่งลิตร และกุ้งจะตายทันทีถ้าในน้ำหนึ่งลิตรมีไฮโดรเจนซัลไฟด์ประมาณ 4 มิลลิกรัม

1.3.8 ความเป็นด่างของน้ำ (alkalinity) ความเป็นด่างหรือที่เรียกกันโดยทั่วไปว่า “อัลคาไลน์” ในน้ำเค็มหรือทะเลลึกจะมีระบบอัลคาไลน์เป็นบัฟเฟอร์ควบคุมค่ากรด-ด่าง ทำให้ค่ากรด-ด่างคงที่อยู่ตลอด อัลคาไลน์มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่ากรด-ด่าง ดังนั้นเมื่อค่ากรด-ด่างมีปัญหาหรือไม่เหมาะสมอาจทำให้อัลคาไลน์มีผลกระทบต่อตัวกุ้งกุลาดำ และปัจจัยคุณภาพน้ำอื่นๆได้ ค่าอัลคาไลน์ที่เหมาะสมกับการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ คือ 80 – 150 มิลลิกรัมต่อลิตร

1.4 โรคกุ้งกุลาดำ

ปัญหาการติดเชื้อโรคของลูกกุ้งกุลาดำ มีการพยายามหาทางแก้ไขกันมากขึ้น เพื่อให้ลูกกุ้งที่ซื้อไปเลี้ยงตายก่อนกำหนด หรือตายขณะที่ตัวยังเล็กอยู่ สาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ ตามทฤษฎี (เบญจมินทร์, 2547) สามารถแสดงเป็นแผนภาพได้



ภาพที่ 2 แผนภาพทฤษฎีสาเหตุของการเกิดโรคในลูกกุ้งกุลาดำ
ที่มา: เบญจมินทร์ (2547)

จากแผนภาพอธิบายได้ว่า เมื่อตัวกุ้งกุลาดำ เชื้อโรค และสภาพแวดล้อมเกิดปัญหาขึ้นพร้อมกันหรือโน้มน้าวให้เกิดปัญหาตามกันก็จะทำให้กุ้งเป็นโรคได้ หมายถึงกุ้งกุลาดำต้องอ่อนแอ มีปริมาณเชื้อที่เป็นอันตรายมากและสภาพแวดล้อมในบ่อไม่เหมาะสมทั้ง 3 ปัจจัยเกิดพร้อมกันหรือทยอยเกิดทีละปัญหาจนครบทั้ง 3 ปัจจัย อันเนื่องจากทั้ง 3 ปัจจัยโน้มน้าวให้เกิดปัญหาตามกันได้ กุ้งกุลาดำจึงป่วยเป็นโรค การสนใจแต่สภาพแวดล้อมภายในบ่อเป็นหลักและพยายามทำสภาพแวดล้อมภายในบ่อให้สมบูรณ์แบบที่สุคนธ์ทำได้ยาก เนื่องจากสภาพอากาศที่ค่อนข้างแปรปรวน และคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำธรรมชาติมีการปนเปื้อนมากจึงเปิดโอกาสให้เกิดโรคได้ การให้ความสนใจกับเรื่องเชื้อโรคจะสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ไม่น้อย โดยเฉพาะกับพื้นที่ที่มีการเลี้ยงต่อโรคสูง นอกจากนี้การหาจังหวะการเลือกลูกกุ้งในช่วงที่มีความเสี่ยงต่อการติดเชื้อน้อยก็จะสร้างโอกาสให้ประสบผลสำเร็จในการเลี้ยงมากขึ้นเช่นกัน

1.5 แนวทางการป้องกันโรค

การป้องกันโรคที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในกุ้งสามารถทำได้โดย

การคัดเลือกลูกกุ้งที่ปลอดเชื้อโดยการตรวจพีซีอาร์ (PCR) เป็นต้น และคัดลูกกุ้งที่แข็งแรง

การจัดการคุณภาพน้ำและปัจจัยต่างๆให้มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด และอยู่ในระดับที่เหมาะสม อาจมีการใช้จุลินทรีย์ย่อยของเสียอย่างต่อเนื่องเป็นประจำ

การควบคุมเชื้อในน้ำให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม โดยการใช้สารละลายไอโอดีนเพราะไม่ทำลายสีน้ำ หลังการกำจัดเชื้อในน้ำด้วยไอโอดีนควรเพิ่มจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เพื่อทดแทนและข่มแบคทีเรียก่อโรค

ในการรักษา ควรใช้ยาที่มีประสิทธิภาพในการรักษาและตรงจุด เช่น โรคที่เกี่ยวข้องทางเดินอาหาร ควรใช้ยาต้านจุลชีพที่ไม่ค่อยมีการดื้อซึมที่ลำไส้ ส่วนการรักษาโรคที่ตับ หรือตามเนื้อเยื่อควรเลือกยาที่มีการดื้อซึมและแพร่กระจายไปยังอวัยวะดังกล่าวสูง รวดเร็ว และการให้กุ้งกินยาควรรักษาตั้งแต่กุ้งเริ่มป่วยซึ่งยังกินอาหารอยู่ โอกาสรักษาหายจะมีสูง และควรเคลือบเม็ดอาหารเพื่อป้องกันการสูญเสียของยาควบคู่กับการฆ่าเชื้อในน้ำเสมอ และควรตรวจเช็คสุขภาพกุ้งอย่างน้อยสัปดาห์ละครั้ง

เสริมสร้างความแข็งแรงและป้องกันการเกิดโรคโดยการใช้อาหารเสริม วิตามิน เกลือแร่ โปรไบโอติก เช่น การใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์บาซิลลัส การใช้ยีสต์สายพันธุ์พิเศษที่มีคุณสมบัติในการดูดซับสารพิษ ควบคุมแบคทีเรียได้

2. จุลินทรีย์กับการเลี้ยงกุ้ง

โดยทั่วไปในร่างกายของมนุษย์ และสัตว์ มักจะมีจุลินทรีย์แทรกอยู่โดยทั่วไป ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ หน้าที่พื้นฐาน คือ เป็นด่านแรกของกลไกการต่อสู้โรค หรือการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ก่อโรค หรือสิ่งแปลกปลอม ตัวอย่างที่มีการยอมรับ คือ กลไกการแข่งขันและข่มหรือที่เรียกว่า “ คอมเพทิทีฟเอ็กсклюชัน ” (Competitive Exclusion / CE) เป็นการกระทำร่วมกันของกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการป้องกันการเกาะติดหรือทำลายจุลินทรีย์ก่อโรค เกรียงศักดิ์ (2546) ได้สรุปกลไกการทำงานของ ซี.อี.ดังนี้ คือ

1. ในขั้นแรกจุลินทรีย์จะแทรกอยู่ตามเยื่อของอวัยวะกลาง จึงเป็นแผ่นฟิล์มเคลือบป้องกันการเกาะติดของจุลินทรีย์ตัวก่อโรคร่วมกับเยื่อของตัวอาศัย

2. จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถจะสร้างผลิตภัณฑ์จากกระบวนการสันดาปได้ ที่สำคัญคือ

กรด (acid) ที่สำคัญคือ กรดแลคติก (lactic acid) กรดไขมันระเหิด (volatile fatty acid) ซึ่งกรดพวกนี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตและทำลายจุลินทรีย์ตัวก่อโรคได้

แบคทีริโอซิน (bacteriocin) เป็นสารปฏิชีวนะที่สร้างขึ้นมาจากพวกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติหลายชนิด เช่น *Pediococci* spp. สามารถสร้าง Pediocin-A และ Pediocin-PA1 เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ *Staphylococci* spp. และ *Clostridia* spp. ตามลำดับ

น้ำย่อย (enzyme) จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างน้ำย่อยออกมาช่วยย่อยอาหารทำให้สัตว์เจริญอาหารและมีระบบขับถ่ายที่ดีส่งผลให้มีภูมิต้านทานโรคสูงขึ้น

วิตามิน (vitamin) เป็นผลิตภัณฑ์อีกชนิดที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นเพื่อช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต ที่สำคัญ ได้แก่ วิตามินบี

กรดอะมิโน (amino acid) เมื่อจุลินทรีย์ตายลงจะสลายตัวเป็นโปรตีนเซลล์เดียว ซึ่งเป็นส่วนประกอบจากกรดอะมิโน

3. กระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันโรค (immunomodulator) ในปศุสัตว์ได้มีการพิสูจน์เด่นชัดว่าจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรคได้ ซึ่งได้มีการทดลองทำในไก่แล้ว (เกรียงศักดิ์, 2537 ; เชิดชัย และคณะ, 2538)

4. ย่อยสลายสารพิษ (toxins degrading) Stamley et al. (1993) ได้ทดลองให้ไก่กินอาหารที่มีสารพิษอะฟลา (aflatoxin) ผสมกับเชื้อสำ (*Saccharomyces cerevisiae*) พบว่าไก่ที่กินเชื้อสำผสมสารพิษ อัตราการเจริญเติบโตปกติเมื่อเทียบการแกรีนกับกลุ่มที่ได้รับสารพิษอย่างเดียว

5. ประสิทธิภาพอื่นๆ จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติประโยชน์ สามารถลดอัตราการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ลดอัตราการเกิดอาการท้องเสีย หรือ อุจจาระร่วง (ธารารัตน์, 2542)

2.1 จุลินทรีย์โปรไบโอติก

โปรไบโอติก มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกมีความหมายว่า “ เพื่อชีวิต ” (for life) ความหมายของโปรไบโอติก คือ จุลินทรีย์ หรือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อคนหรือสัตว์บริโภคเข้าไปสามารถดำรงชีวิตอยู่ในระบบทางเดินอาหารและก่อให้เกิดประโยชน์แก่ผู้บริโภค จุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมทางชีวภาพ ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารของกึ่ง ลดปริมาณเชื้อที่เป็นโทษและก่อให้เกิดโรค เพิ่มปริมาณเชื้อที่มีประโยชน์ให้มีปริมาณมากขึ้น

โปรไบโอติก (probiotic) ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell ในปี พ.ศ.2508 เพื่อกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของสารปฏิชีวนะ(antibiotic) ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด

คำจำกัดความล่าสุด ซึ่งเสนอโดย Fuller ในปี พ.ศ.2532 อธิบายคำว่าโปรไบโอติก คือ อาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย

Rengpipat et al. (2000) ได้ทดลองให้กึ่งกินเชื้อ *Bacillus* S11 พบว่ามีประสิทธิภาพในการป้องกันการติดเชื้อไวรัสโออีไอได้ นอกจากนี้ได้ทดลองใช้แบคทีเรียสายพันธุ์ที่แยกจากตัวกึ่งผสมอาหารให้กึ่งกินเมื่อกึ่งอายุ 40 วัน พบว่าน้ำหนักและความยาวกึ่งจะมากกว่ากึ่งที่ไม่ใช้จุลินทรีย์ และมีอัตราการรอดร้อยละ 76 ในขณะที่กึ่งกลุ่มที่ไม่ใช้โปรไบโอติกมีอัตราการรอดร้อยละ 65

จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่เหมาะสมกับกึ่งอุตสาหกรรมจะมีลักษณะดังต่อไปนี้

เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดประโยชน์แก่กึ่ง คือ ทำให้กึ่งแข็งแรงขึ้น เช่น การช่วยย่อยหรือการสร้างน้ำย่อยไปย่อยสารอาหารให้มีขนาดเล็กลง จนกึ่งดูดซึมไปใช้ได้เร็วกว่าการย่อยอาหารตามปกติส่งผลให้กึ่งมีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ทนต่อความเครียดได้มากขึ้น ความต้านทานโรคสูงขึ้น

ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโทษ

จุลินทรีย์โปรไบโอติกในรูปผลิตภัณฑ์ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและต้องมีปริมาณมากพอที่จะก่อให้เกิดประโยชน์กับกึ่งเมื่อกึ่งกินเข้าไป

ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถเกาะติดอยู่กับผนังของทางเดินอาหาร และดำรงชีวิตอยู่ในทางเดินอาหารของกึ่งได้ดี แพทย์ขยายพันธุ์ในตัวกึ่งได้โดยไม่เบียดเบียนการดำรงชีวิตของกึ่ง

จุลินทรีย์โปรไบโอติกที่อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์ต้องมีชีวิตอยู่ได้นาน เก็บรักษาได้ง่ายและมีชีวิตอยู่ได้จนกว่าจะถึงเวลาใช้งาน

ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมที่คงที่ ไม่มีการกลายพันธุ์

ราคาต้องไม่สูงจนไม่คุ้มทุนในการใช้งาน

ต้องใช้ได้อย่างต่อเนื่องยาวนาน ไม่ออกฤทธิ์ช่วงสั้นแบบสารปฏิชีวนะ

การทำงานของโปรไบโอติกที่ทำหน้าที่ป้องกันการเกิดโรค และทำให้กึ่งแข็งแรงขึ้น จะทำหน้าที่สองประการด้วยกัน คือ เมื่อจุลินทรีย์โปรไบโอติกเข้าสู่ตัวกึ่งโดยวิธีกินก็จะเข้าไปยึดเกาะกับผนังของลำไส้และสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัส ทำให้ปริมาณเชื้อที่อาจก่อให้เกิดโรคมียานวนลดลงเป็นการลดความเสี่ยงจากการเกิดโรค และจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะไปกระตุ้นให้ภูมิคุ้มกันโรคของกึ่งมีสูงขึ้น

การใช้โปรไบโอติกสามารถใช้ได้ตลอดเวลา ไม่มีผลเสีย ไม่มีปัจจัยในเรื่องขนาดอายุ แต่ไม่ควรใช้พร้อมกับการใช้ยาเพื่อกำจัดจุลชีพ เพราะทำให้ต้องใช้จุลินทรีย์จำนวนมากขึ้น และนานขึ้น ทำให้ต้นทุนการใช้สูงเกินจำเป็น การใช้ให้สังเกตจากจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในตัวกึ่ง ถ้ามีการลดลงอย่างมากในเวลาสั้นหรือมีการเปลี่ยนชนิดจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่ไม่เหมาะสม จะเป็นการเปิดโอกาสให้เชื้อก่อโรคเพิ่มจำนวน ต้องเพิ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติกให้มากและบ่อยครั้งมากขึ้น

3. การตรึงเซลล์

3.1 ความหมายของเซลล์ที่ถูกตรึง

เซลล์ที่ถูกตรึง (Immobilized cells) หมายถึง เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางฟิสิกส์ ให้อยู่ในบริเวณที่ทำให้จุลินทรีย์ไม่สูญเสียความสามารถในการเป็นตัวเร่ง และสามารถนำกลับมาใช้ซ้ำได้หลายครั้งหรือใช้ได้อย่างต่อเนื่อง โดยเซลล์ที่ถูกตรึงอาจอยู่ในสภาพเซลล์ที่กำลังเจริญ เซลล์ระยะพัก หรือเซลล์ที่ตายแล้วก็ได้

3.2 ประวัติการตรึงเซลล์จุลินทรีย์

การใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงเริ่มมีมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1823 Schuetzenbach ได้ทำการผลิตน้ำส้มสายชูแบบเร็วโดยใช้ฟิล์มจุลินทรีย์ที่ติดอยู่บนเศษไม้ หลังจากนั้นมาไม่มีผู้สนใจจนกระทั่งเริ่มมีการพัฒนาเกี่ยวกับการใช้เอนไซม์เพื่อเป็นตัวเร่งในอุตสาหกรรม และมีการศึกษาเกี่ยวกับการตรึงเอนไซม์เพื่อให้ใช้ได้นานและสะดวกขึ้น และทำให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้เป็นตัวเร่งในอุตสาหกรรมมากขึ้น

อย่างไรก็ตามเนื่องจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งสำคัญในการผลิตเอนไซม์ แต่การสกัดเอนไซม์จากเซลล์โดยทั่วไปเสียค่าใช้จ่ายสูงและในบางกรณีเอนไซม์ที่ได้อาจไม่คงตัว ดังนั้นจึงเริ่มมีผู้ให้ความสำคัญสนใจศึกษาเกี่ยวกับการตรึงเซลล์ เพื่อนำไปใช้เป็นตัวเร่งแทนเอนไซม์ที่ถูกตรึงซึ่งจะทำให้สามารถลดต้นทุนในการสกัดเอนไซม์ การทำให้บริสุทธิ์ และลดปัญหาความไม่คงตัวของเอนไซม์

ในปี ค.ศ.1959 Hattori และ Furusaka ได้ตรึงเซลล์ที่มีชีวิตของ *Escherichia coli* และ *Azotobacter agilis* โดยยึดไว้บนโพลีเอทิลีน-1 พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงสามารถออกซิไดส์กลูโคส และกรดซัคซินิกได้ ต่อมาในปี ค.ศ.1966 Mosbach ได้ตรึงเซลล์ *Umbilicaria pustulata* ด้วยโพลีอะคริลามิด (polyacrylamide) พบว่าความสามารถของเอนไซม์ orsellinic acid decarboxylase ยังคงมีอยู่ในระหว่างการทดลองเป็นเวลานานกว่า 3 เดือน หลังจากนั้นก็มีรายงานเกี่ยวกับเซลล์ที่ถูกตรึงเพิ่มมากขึ้น จนกระทั่งในปี ค.ศ.1973 Chibata ได้ประสบความสำเร็จในการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแอล-แอสพาร์ติก ซึ่งนับว่าเป็นอุตสาหกรรมแห่งแรกของโลกที่ใช้ระบบเซลล์ที่ถูกตรึง

ปัจจุบันมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการใช้จุลินทรีย์ที่ถูกตรึงในการผลิตสารชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง ที่ประสบความสำเร็จในอุตสาหกรรมแล้ว เช่น การผลิตกรดแอล-แอสพาร์ติก และกรดแอล-มาร์ลิก ฟรุทโทส เป็นต้น

3.3 ข้อดีและข้อเสียของเซลล์ที่ถูกตรึงเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อดี คือ สามารถใช้ซ้ำในระบบกะหรือระบบต่อเนื่องได้ง่ายกว่า มีโอกาสปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้น้อยลง การแยกผลผลิตทำได้ง่ายกว่า เซลล์ที่ถูกตรึงซึ่งเป็นเซลล์ในระยะพักต้องการพลังงานน้อยเพียงเพื่อรักษาสภาพความอยู่รอด ทำให้ได้ผลผลิตสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระ

เซลล์ที่ถูกตรึงมีข้อเสีย คือ เซลล์อาจสูญเสียความสามารถบางส่วนในระหว่างการตรึง

3.4 วิธีการตรึงเซลล์

วิธีการตรึงเซลล์จะสามารถแบ่งได้เช่นเดียวกับการตรึงเอนไซม์ ซึ่งทำได้หลายวิธีดังนี้

3.4.1 การตรึงเซลล์ด้วยพันธะโควาเลนต์ (covalent binding method)

เป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรึงเอนไซม์เนื่องจากได้ผลดี แต่ไม่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์ เนื่องจากจำเป็นต้องใช้สารเคมีซึ่งมักมีพิษ จึงอาจทำให้เซลล์ตายและเอนไซม์ถูกทำลายได้

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้เป็นการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับสารพาหะ โดยสารที่ใช้เป็นตัวยึดจับนั้นสามารถเชื่อมต่อกับหมู่อะตอมซึ่งเป็นส่วนประกอบที่ผิวเซลล์ เช่น หมู่อะมิโน หมู่คาร์บอกซิล หมู่ไฮดรอกซิล หมู่ซัลไฟด์ไฮดริล หมู่อิมิดาโซล หรือหมู่ฟีนอล ของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดีคือ เซลล์จะเชื่อมอยู่กับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และมีการรั่วไหลของเซลล์ได้น้อย แต่ก็มีข้อเสีย คือการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรง เนื่องจากการสร้างพันธะโควาเลนต์ตามปกติจำเป็นต้องใช้สารตัวนำที่มีการดัดแปลงโดยใช้สารเคมี ซึ่งมักจะมีความเป็นพิษ และอาจทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ วิธีนี้จึงเหมาะสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการเอนไซม์เพียงชนิดเดียวและเอนไซม์ที่ต้องการเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ ซึ่งไม่ต้องสัมผัสกับสารเคมีที่ใช้ในระหว่างการเตรียม

3.4.2 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดติด (adsorption method)

เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับอยู่กับสารที่เป็นตัวนำของแข็ง ซึ่งแรงยึดระหว่างเซลล์กับพื้นผิวของแข็งอาจจะเป็นพันธะไอออนิก พันธะไฮโดรโฟบิก หรือพันธะไฮโดรเจน โดยอาศัยหลักธรรมชาติทางเคมี เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือยีสต์ประกอบด้วยกรดไดอะมิโนพิมลิก (diaminopimelic acid) และ เฮกโซซามีน (hexosamine) ซึ่งสามารถเกิดแรงดึงดูดระหว่างประจุกับตัวนำที่ใช้ได้ โดยแรงดูดซับจะขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของเซลล์ รวมทั้งปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง การตรึงเซลล์วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อน และมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่ายเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่ากรด-ด่าง ความแรงของไอออน การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศ และเมื่อมีการแบ่งเซลล์ ดังนั้นวิธีนี้จึงไม่เหมาะสำหรับการตรึงเซลล์ในกรณีที่ต้องการผลผลิตที่ปราศจากการปนเปื้อนของเซลล์ แต่ก็อาจปรับปรุงแรงดูดซับให้สูงขึ้นได้โดยทำการเชื่อมโยงไว้หลังการดูดซับ นอกจากนี้การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ยังมีอัตราการดูดซับเซลล์ต่อหนึ่งหน่วยของตัวนำค่อนข้างต่ำ แต่ก็อาจแก้ไขได้โดยการใช้สารที่มีรูพรุนเป็นตัวดูดซับ

3.4.3 การล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเหลว (liquid membrane encapsulation)

หมายถึงการล้อมรอบเซลล์ด้วยเนื้อเยื่อเหลว เป็นวิธีการตรึงเซลล์ไว้ในหยดของเหลว ทำโดยการผสมสารละลายแขวนลอยของเซลล์เข้ากับสารผสมของน้ำมัน เซอร์เฟกแทนต์ สารเพิ่มความแข็งและไอออนที่ช่วยให้มีการขนส่งสารอาหารได้ดีขึ้น กวนผสมด้วยความเร็ว 600 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิของสารผสมไว้ที่ 18 องศาเซลเซียส จะได้อิมัลชันแล้วเทลงในสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในบัฟเฟอร์ วิธีการนี้สามารถตรึงเซลล์ได้ 500 – 600 เซลล์ ในหยดของเหลว

3.4.4 การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับ (entrapment)

เป็นการดักจับเซลล์ด้วยสารพาหะที่มีลักษณะเป็นเจล ซึ่งอาจจะเป็นสารอินทรีย์ที่พบในธรรมชาติหรือได้จากการสังเคราะห์ การตรึงเซลล์โดยวิธีดักจับไว้ในสารพาหะสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

ผสมสารละลายแขวนลอยของเซลล์เข้ากับสารละลายพอลิเมอร์ เทลงในถาด จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น และตัดเจลให้มีขนาดเล็กลงเป็นรูปลูกบาศก์ วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่ายแต่ได้ขนาดของเซลล์ตรึงที่ไม่สม่ำเสมอ ซึ่งจะทำให้สารละลายอาหารไหลผ่านไม่สะดวกเมื่อบรรจุเซลล์ตรึงลงในคอลัมน์

ใช้สารผสมของเซลล์กับสารละลายพอลิเมอร์ก่อกวนเข้มข้นลงในสารละลายของเกลือทำให้เม็ดพอลิเมอร์คงรูปอยู่ได้ วิธีนี้จะให้เม็ดของเซลล์ตรึงมีขนาดสม่ำเสมอ แต่วิธีนี้ไม่เหมาะกับการเตรียมในปริมาณมากและเหมาะที่จะใช้กับสารพาหะบางชนิดเท่านั้น สารพาหะที่นิยมใช้กันมากคือ โซเดียมอัลจิเนตและแคลโป-คาร์ราจีแนน

การเตรียมโดยใช้ระบบ 2 เฟส (two-phase system) เริ่มจากการกวนผสมสารละลายแขวนลอยของเซลล์เข้ากับพอลิเมอร์ในไฮโดรโฟบิกเฟส พร้อมทั้งกวนสารละลายเพื่อเหนี่ยวนำให้เปลี่ยนเป็นเจล เซลล์ตรึงที่เตรียมได้โดยวิธีนี้จะมีลักษณะกลมและปล่อยให้สารละลายอาหารไหลผ่านได้สะดวก นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมได้ปริมาณมากด้วย

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักจับสามารถทำให้เซลล์ยังมีชีวิตอยู่หลังการตรึงและเป็นวิธีการที่ป้องกันเซลล์หลุดออกจากสารพาหะได้มากกว่าการตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดูดติดและการใช้พันธะโควาเลนต์

3.5 สารพาหะที่ใช้ตรึงเซลล์ (carrier)

มีสารหลายชนิดที่สามารถใช้จับยึดหรือตรึงเซลล์ได้ ซึ่งสารแต่ละชนิดมีความเหมาะสมในการตรึงเซลล์ได้แตกต่างกัน สารเหล่านี้บางชนิดจะมีกลุ่มฟังก์ชันนัลที่สามารถจับกับผนังเซลล์ได้ ในการเลือกใช้สารพาหะเพื่อทำการตรึงเซลล์จะอาศัยการสังเกตประกอบกับความชำนาญ สารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์จุนทรีย์แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือสารพาหะที่เป็นสารอินทรีย์และสารพาหะที่เป็นสารอนินทรีย์ (Kolot, 1981) แต่ที่นิยมใช้กันมากคือสารอินทรีย์ เนื่องจากมีกลุ่มฟังก์ชันนัลจำนวนมากที่สามารถทำปฏิกิริยากับกลุ่มต่างๆของผนังเซลล์ซึ่งส่วนมาก ได้แก่ กลุ่มอะมิโน คาร์บอกซิลและไฮดรอกซิล

3.5.1 สารอินทรีย์

สารอินทรีย์ที่นิยมใช้เป็นพาหะในการตรึงเซลล์จัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ พอลิแซ็กคาไรด์ โปรตีนและพอลิเมอร์สังเคราะห์ เทคนิคในการตรึงเซลล์ที่ใช้สารพาหะเหล่านี้คือการดูดติด (adsorption) การยึดโดยใช้พันธะโควาเลนต์ การเชื่อมโยง การดักจับ (entrapment) และการล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเหลว (liquid membrane encapsulation)

ตารางที่ 1 สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นพาหะในการตรึงเซลล์

พอลิแซ็กคาไรด์	โปรตีน	พอลิเมอร์สังเคราะห์
เซลลูโลส (cellulose)	คอลลาเจน (collagen)	พอลิเอไครเลไมด์
เอการ์/อกาโรส (agar/agarose)	เจลาติน (gelatin)	(polyacrylamide)
ไคโทซาน (chitosan)	อัลบูมิน (albumin)	อีพอกซีเรซิน (epoxy -resin)
เดกซ์แทรน (dextran)	ไฟบริน (fibrin)	พอลิเอสเตอร์ (polyester)
คาร์ราจีแนน (carrageenan)		เมทาไครเลต (methacrylate)
แซนแทนกัม (xanthan gum)		พอลิยูริเทน (polyurethane)

ที่มา: ภาวิณี (2531)

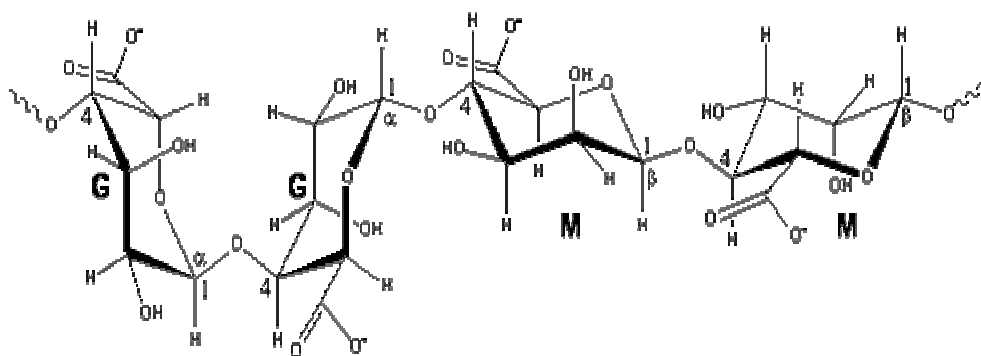
3.5.2 สารอินทรีย์

สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นพาหะในการตรึงเซลล์เป็นสารประกอบออกไซด์ที่พบในธรรมชาติ เช่น อลูมินา (alumina) ซิลิกา (silica) แก้ว เซรามิกส์ ทราช นอกจากนี้ยังมีสารที่เป็นอนุพันธ์ของสารเหล่านี้ซึ่งได้จากปฏิกิริยา coupling กับโลหะ โดยทั่วไปสารพาหะประเภทนี้จะทนต่ออุณหภูมิสูง เมื่อผสมกับตัวทำละลายจะมีลักษณะข้นเหนียว และบริเวณผิวของสารเหล่านี้จะถูกไฮโดรไลซ์ทำให้มีกลุ่มไฮดรอกซิลเกิดขึ้น ซึ่งจะสามารถจับเข้ากับกลุ่มคาร์บอกซิลและกลุ่มอะมิโนของผนังเซลล์ได้ เทคนิคที่นิยมใช้สารอินทรีย์เป็นพาหะในการตรึงเซลล์ ได้แก่ การดูดติด (adsorption) และการใช้พันธะโควาเลนต์

3.6 สารพาหะที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์

3.6.1 อัลจิเนต (alginate)

เป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้กันมาก โครงสร้างของอัลจิเนตจะแสดงดังรูป



ภาพที่ 3 โครงสร้างทางเคมีของอัลจินต

ที่มา: Chaplin (2005)

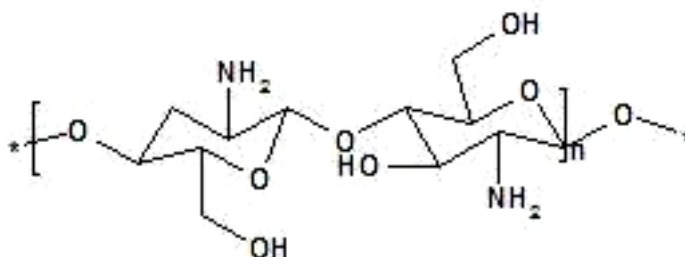
อัลจินตประกอบไปด้วยกลุ่มคาร์บอกซิลในแต่ละหน่วยย่อย (โมโนแซ็กคาร์ไรด์) ที่จะไปยึดจับกับไอออนของโลหะบางชนิด เช่น แคลเซียมไอออน คอปเปอร์ไอออน เป็นต้น ทำให้ได้เจลที่มีความเสถียรและตรึงเซลล์ได้ในสภาวะที่ไม่รุนแรง เป็นผลให้เซลล์ส่วนมากไม่ตาย ลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่ตรึงจะเป็นเม็ดกลม เตรียมได้โดยการดูดสารละลายผสมของเซลล์กับสารละลายอัลจินตผ่านเข็มฉีดยา และรองรับหยดของสารเหล่านี้ด้วยสารละลายของแคลเซียมคลอไรด์ที่เย็น เม็ดเจลที่ได้จะมีความแข็งเนื่องจากแคลเซียมไอออนจะเข้าไปแทนที่โซเดียมไอออนของโซเดียมอัลจินต นอกจากนี้ความแข็งของเม็ดเจลจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและชนิดของโซเดียมอัลจินต

Bekers et al. (2001) ใช้โซเดียมอัลจินตในการดักจับเซลล์ *Zymomonas mobilis* เพื่อผลิตเอทานอล เปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ พบว่าการผลิตเอทานอลของเซลล์อิสระและเซลล์ที่ถูกตรึงให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน

Bučko et al. (2004) ทดลองตรึงเซลล์ *Nocardia tartarican* ที่ผลิตเอนไซม์ cis-epoxysuccinate hydrolase ด้วยโซเดียมอัลจินต- เซลลูโลส ซัลเฟต - โพลีเมทิลีน- โค- กัวนิดินเพื่อเปลี่ยน epoxysuccinate ให้เป็น L-(+)- tartaric acid นอกจากนี้ยังมีการประยุกต์ใช้โซเดียมอัลจินตในการตรึงเซลล์ยีสต์ เซลล์พืช และเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Koyama and Seki, 2004)

3.6.2 ไคโทซาน (chitosan)

เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งประกอบด้วยอนุภาคของไคติน (chitin) ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไคตินกับสารละลายด่างเข้มข้น สามารถนำมาใช้เป็นพาหะในการตรึงเซลล์ได้ โครงสร้างทางเคมีของไคโทซานจะแสดงดังรูป



ภาพที่ 4 โครงสร้างทางเคมีของไคโทซาน

ที่มา: Macquarrie (2004)

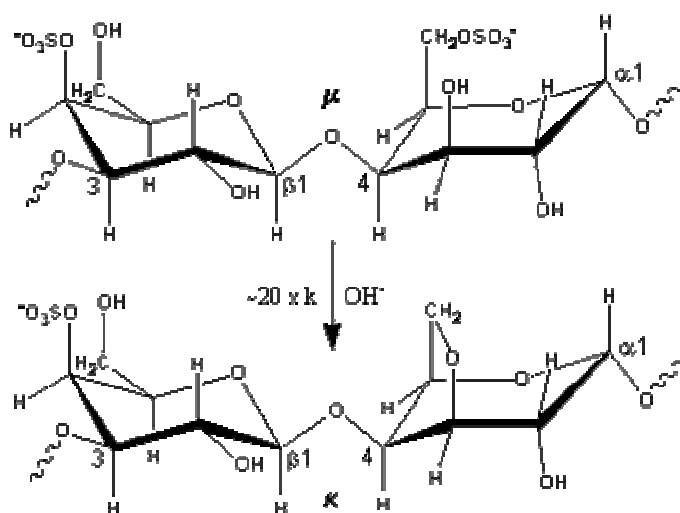
ไคโทซานจะเกิดเจลได้เมื่อมีไอออนที่สัมพันธ์กับกลุ่มฟังก์ชันนัล ซึ่งไอออนดังกล่าวได้แก่ เพอร์ไรโซยานด์ (ferricyanide) เพอร์โรโซยานด์ (ferrocyanide) พอลิฟอสเฟต (polyphosphate) พอลิเมอร์ของกรดอัลดีไฮด์ไฮโดรคาร์บอนิก (polyaldehydehydrocarbonic acid) (Vorlop and Klei, 1987)

Kaya and Picard (1999) ได้ทดลองตรึงเซลล์ *Scenedesmus bicellularis* ด้วยไคโทซาน เปรียบเทียบระหว่างไคโทซานความหนืดสูงและไคโทซานความหนืดต่ำ เพื่อกำจัดแอมโมเนียและฟอสเฟตในน้ำเสียที่มีเกลือฟอสเฟตเข้มข้นสูง พบว่าไคโทซานความหนืดสูงเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ จะเสถียรในน้ำเสียที่มีเกลือฟอสเฟตสูงได้ดีกว่าไคโทซานความหนืดต่ำ นอกจากนี้ยังใช้ไคโทซานในทางการแพทย์ เช่น ใช้หุ้มยาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษา (Sinha et al., 2004) เป็นต้น

3.6.3 คาร์ราจีแนน (carrageenan)

คาร์ราจีแนน เป็นสารโพลีแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล ประกอบด้วย β -D-galactose sulfate และ 3,6-anhydro- α -D-galactose คาร์ราจีแนนที่สกัดได้จากสาหร่ายทะเล สามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด คือ แคปปา (kappa) ไอโอตา (iota) และแลมดา (lambda) แต่ที่สามารถเกิดเจลได้มีสองชนิด คือ แคปปา และไอโอตา แต่การตรึงเซลล์โดยทั่วไปนิยมใช้คาร์ราจีแนนชนิดแคปปาเนื่องจากทำให้เกิดเจลที่มีลักษณะแข็งแรงกว่า

การตรึงเซลล์ด้วยคาร์ราจีแนนมีข้อดี คือ วิธีการตรึงเซลล์สามารถทำได้ง่าย สะดวก รวดเร็ว และปลอดภัย เนื่องจากคาร์ราจีแนนได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นวัตถุเจือปนในอาหารมาเป็นเวลานานแล้ว และในการตรึงไม่มีการใช้สารเคมีอื่นที่เป็นพิษ จึงไม่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถเตรียมเจลรูปร่างต่างๆกันได้หลายแบบให้เหมาะสมต่อสภาพการใช้งาน เจลที่ได้สามารถละลายในน้ำเกลือจึงสามารถศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์ภายในเจลหลังการตรึงเซลล์ได้ ข้อเสียของคาร์ราจีแนน คือ ความแข็งแรงและความคงตัวของเจลค่อนข้างต่ำ และเมื่ออยู่ในสถานะที่ไม่มีสารช่วยในการคงเม็ดเจล เซลล์จะร่วออกมาจากเจลได้



ภาพที่ 5 โครงสร้างทางเคมีของแคปปา-คาร์ราจีแนน

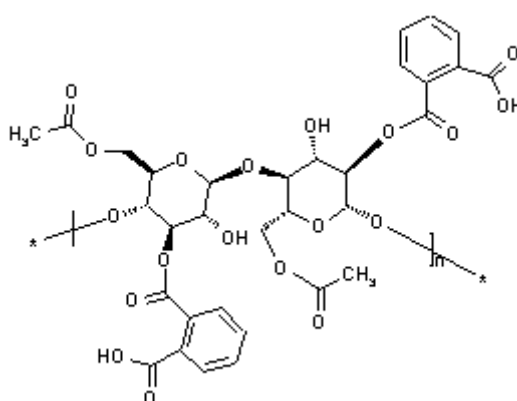
ที่มา: Chaplin (2005)

Cañizares et al. (2003) ทดลองตรึงเซลล์สาหร่าย *Spirulina maxima* ด้วยแคลปปา-คาร์ราจีแนน เพื่อบำบัดน้ำเสียในเล้าหมู พบว่าเม็ดเชื้อสามารถกำจัดแอมโมเนียไนโตรเจนและฟอสฟอรัสทั้งหมดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยที่น้ำเสียเจือจาง 50 เปอร์เซ็นต์ เม็ดเชื้อสามารถกำจัดไนโตรเจนและฟอสฟอรัสได้ 80 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

Para and Baratti (2002) พบว่าการตรึงเซลล์ *E.intermedia* ด้วยแคลปปา-คาร์ราจีแนน สามารถสังเคราะห์ L-Dopa จาก catechol pyruvate และแอมโมเนียได้ไม่แตกต่างจากเซลล์อิสระ นอกจากนี้ยังพบว่าคาร์ราจีแนนเป็นสารพาหะที่เหมาะสมที่สุดในการดักจับ *E.coli* เพื่อผลิตกรดอะมิโน L-tryptophan เมื่อเปรียบเทียบกับสารพาหะชนิดอื่น (Langrene et al., 2002)

3.6.4 เซลลูโลส แอซีเตต พทาเลต (cellulose acetate phthalate)

เซลลูโลส แอซีเตต พทาเลต เป็นอนุพันธ์ของเซลลูโลส (cellulose) ที่ค่อนข้างไวต่อการเปลี่ยนแปลงของค่ากรด-ด่าง สามารถนำมาใช้เป็นเมทริกซ์ได้ แต่โดยทั่วไปแล้วมักจะนิยมนำมาใช้ในทางยาเพื่อเป็นตัวเคลือบยาเม็ดหรือแคปซูล เนื่องจากเซลลูโลส แอซีเตต พทาเลตจะมีกลุ่มพทาเลต (phthalate group) ซึ่งละลายที่ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 6 หรือสูงกว่า แต่จะไม่ละลายที่ค่ากรด-ด่างเท่ากับ 5 หรือต่ำกว่า (Rao et al., 1989) ดังนั้นเซลลูโลส แอซีเตต พทาเลตจึงละลายได้ในลำไส้เล็ก ทำให้ยาถูกปล่อยออกมา



ภาพที่ 6 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส แอซีเตต พทาเลต

ที่มา: Yalkowsky (1981)

3.7 ปัจจัยในการเลือกใช้สารพาหะ

ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์และสิ่งแวดล้อม

ไม่กระทบกระเทือนต่อระบบเมแทบอลิซึมของเซลล์

มีความจุ (ปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงต่อสารพาหะ 1 กรัม) มากพอสมควร

การตรึงเซลล์ในสภาวะปลอดเชื้อ (sterile) จะต้องเลือกสารพาหะที่ทนต่อความร้อนได้สูง เนื่องจากต้องทำให้สารพาหะนั้นปลอดเชื้อซึ่งใช้อุณหภูมิและความดันสูง

การตรึงเซลล์ปริมาณมากควรเลือกใช้สารพาหะที่มีรูพรุนขนาดใหญ่ เพื่อช่วยให้ซับสเตรตซึมผ่านได้ดีขึ้น

ควรเลือกใช้สารพาหะที่มีราคาถูกสามารถนำกลับมาใช้ได้

4. แบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์และเอนไซม์อะมัยเลส มีรูปร่างกลมหรือท่อนและผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมักคาร์โบไฮเดรต(Alexander, 1993) มีอัตราส่วนของเบสในดีเอ็นเอ (G+C content) น้อยกว่า 55 โมลเปอร์เซ็นต์ (Stiles and Holzapfel, 1997) มีความต้องการอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อนและอุดมสมบูรณ์(Prescott and Dunn, 1952) เชื้อเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มี growth factor และวิตามินหลายชนิด และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง (Tittsler et al., 1952) แหล่งที่สามารถพบแบคทีเรียกรดแลกติกได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมและอาหารหมักดอง เป็นต้น (นภา, 2534)

แบคทีเรียกรดแลกติกมีความสามารถในการสร้างสารที่มีผลในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆหลายชนิด และมนุษย์ก็ใช้ประโยชน์จากคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกมาตั้งแต่ยุคประวัติศาสตร์จวบจนปัจจุบันมีการนำกรดแลกติกมาใช้เป็นโปรไบโอติก เพื่อส่งเสริมให้แบคทีเรียประจำถิ่นในลำไส้ทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพและช่วยรักษาสมดุลของปริมาณจุลินทรีย์

กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกจะลดปริมาณคาร์โบไฮเดรตและทำให้เกิดกรดอินทรีย์ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น กรดแลคติก กรดแอซิดิกและกรดโพรไพโอนิก นอกจากการสร้างสารยับยั้งประเภทปฐมภูมิแล้ว ยังมีสารยับยั้งชนิดอื่นๆอีกเช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดแอซีทิล และแบค เทอริโอซิน เป็นต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

1.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* LP 64 ที่คัดเลือกโดยวลัยพร (2544)

1.2 เชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ จากสถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
3 สายพันธุ์ คือ *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio harveyi* และ *Vibrio parahaemolyticus*

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

- 3.1 ตู้ปลอดเชื้อ Biological safety cabinets
- 3.2 วอร์เทก มิกซ์เซอร์ VELP scientific
- 3.3 หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) Hirayama
- 3.4 ตู้เป่าเชื้อ (oven) Mammert
- 3.5 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Spectronic 20 Bausch & Lomb
- 3.6 เครื่องเซนตริฟิวจ์ Sigma 3 K 18
- 3.7 เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง Schott CG 842
- 3.8 ตะแกรงร่อน (sieve) Retsch
- 3.9 เครื่องกวนผสมความเร็วสูง Kika model RW 20 h
- 3.10 เครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไชน์เบด Sherwood scientific
- 3.11 ตู้เลี้ยงปลา ขนาด 60 ลิตร ป้อนออกซิเจน และหัวทราย

วิธีการ

1. การศึกษาหาชนิดของสารที่เหมาะสมสำหรับการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติก

1.1 ศึกษาการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

1.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในการดักจับ

ถ่ายแบคทีเรียกรดแลกติก *L. plantarum* LP64 1 โคโลนี ลงเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่สถานะเดิม ถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่สถานะเดียวกัน หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดอาหารและสิ่งสกปรกที่หลงเหลืออยู่ ออก และแขวนลอยเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์

1.1.2 วิธีการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยโซเดียมอัลจิเนต

เซลล์จะถูกดักจับโดยการผสมสารละลายแขวนลอยของเซลล์ 10 มิลลิลิตร ลงในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมของผสมลงไปใต้น้ำมันปาล์มปริมาตร 250 มิลลิลิตร ที่มี Tween 80 ผสมอยู่ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมความเร็ว 600 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จนกระทั่งสารละลายมีลักษณะเป็นอิมัลชันชนิดน้ำในน้ำมัน จากนั้นหยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงไปทางด้านข้างของบีกเกอร์อย่างรวดเร็ว ตั้งของผสมทิ้งไว้ นาน 30 นาที จนกระทั่งเกิดการแยกชั้นระหว่างแคลเซียมคลอไรด์กับน้ำมัน เทชั้นของน้ำมันออก และล้างเม็ดเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ที่มีกลีเซอรอลผสมอยู่ 5 เปอร์เซ็นต์ คัดแยกขนาดของเม็ดเชื้อด้วยการกรองผ่านตะแกรงร่อนหมายเลข 14, 18, 25, 40, 80 และ 120 ซึ่งมีขนาดของช่อง 1.400 1.000, 0.710, 0.425, 0.180 และ 0.125 มิลลิเมตร ตามลำดับ สุ่มเก็บตัวอย่างเม็ดเชื้อมาชั่งด้วยสิซาฟรานินโอ และส่องดูลักษณะรูปร่างของเม็ดเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่

กำลังขยาย 40 เท่า ถ่ายรูปลักษณะของเม็ดเชื้อ วัดขนาดของเม็ดเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดย คัดเลือกจากตะแกรงร่อนที่มีเม็ดเชื้อดกค้างมากที่สุด

1.1.3 การนับจำนวนเซลล์

ศึกษาประสิทธิภาพการดักจับและอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลกติก โดยหั่นเม็ดเชื้อ 1 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นทำ dilution plate count บนอาหารแข็ง MRS ที่มีบรอมครีซอลเพอเฟิลเป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

1.2 ศึกษาการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยไคโทซาน

1.2.1 วิธีการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยไคโทซาน

เซลล์จะถูกดักจับโดยการผสมสารละลายแขวนลอยของเซลล์ 5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายไคโทซานซึ่งมีความหนืด 200 – 400 mPa.s ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมของผสมลงไป ใน mineral oil ที่มี Span 85 อยู่ 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยเครื่องกวนผสมความเร็ว 260 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เกิดอิมัลชันแบบน้ำในน้ำมันขึ้น จากนั้นทำการหยดกลูตารัลดีไฮด์ 0.3 มิลลิลิตร ลงไปอย่างช้า ๆ กวนเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งของผสมทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นและเพ้นของน้ำมัน ออก ล้างเม็ดเชื้อด้วยสารละลายเปปโตน คัดแยกขนาดของเม็ดเชื้อและศึกษาลักษณะของเม็ดเชื้อ ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 1.1.2

1.2.2 การนับจำนวนเซลล์

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 1.1.3 โดยใช้กรดแอซิดิก pH 2.0 ในการละลายไคโทซาน

1.3 ศึกษาการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยคาร์ราจีแนน

1.3.1 วิธีการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยคาร์ราจีแนน

เซลล์จะถูกดักจับโดยการผสมสารละลายแขวนลอยของเซลล์ลงในสารละลายคาร์ราจีแนนความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน 1:1 ผสมให้เข้ากัน ปริมาตร 20 มิลลิลิตร จากนั้นเติมของผสมลงไปใต้น้ำมันปาล์มและกวนด้วยเครื่องกวนผสมความเร็ว 400 รอบต่อนาที จนได้เม็ดยูเนียนที่ต้องการ นำเม็ดยูเนียนที่ได้ไปแช่ในสารละลายเกลือโพแทสเซียมความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ ปริมาตร 300 มิลลิลิตร เพื่อให้เม็ดยูเนียนแข็งมากขึ้น คัดแยกขนาดเม็ดยูเนียนและศึกษาลักษณะของเม็ดยูเนียนด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 1.1.2

1.3.2 การนับจำนวนเซลล์

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 1.1.3 โดยใช้สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 8 เปอร์เซ็นต์ ในการละลายคาร์ราจีแนน

1.4 ศึกษาการตรึงเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกด้วยเซลลูโลส แอซีเตต พทาเลต

1.4.1 วิธีการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยเซลลูโลส แอซีเตต พทาเลต

ผสมสารละลายแขวนลอยของเซลล์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในน้ำมันพาราฟิน 300 มิลลิลิตร กวนด้วยความเร็ว 260 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 – 3 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายเซลลูโลส แอซีเตต พทาเลต ซึ่งมีความหนืด 3 MPAS ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ลงไป 30 มิลลิลิตร กวนด้วยความเร็ว 400 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้เพื่อให้เกิดการแยกชั้นเทส่วนใสด้านบนทิ้งและกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 3 นำเม็ดยูเนียนที่ได้มาแขวนลอยในปิแวกซ์ 1 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 – 15 นาที คัดแยกขนาดเม็ดยูเนียนและศึกษาลักษณะของเม็ดยูเนียนด้วยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองข้อ 1.1.2

1.4.2 การนับจำนวนเซลล์

ใช้วิธีการเดียวกับข้อ 1.1.3 โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.43 ในการละลายเม็ดเชื้อ

1.5 การศึกษาความสามารถของเม็ดเชื้อในสภาวะลำไส้กึ่งจำลอง

ซังเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ดักจับด้วยโซเดียมอัลจิเนต ไคโทซาน คาร์ราจีแนน และเซลลูโลส แอซีเตต พทาเลต อย่างละ 5 กรัม ใส่ลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ซึ่งเป็นค่ากรด-ด่างในลำไส้กึ่งกลูตาต้า ปริมาตร 45 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที จากนั้นนำมาทำ dilution plate count บนอาหารแข็ง MRS ที่มีบรอมครีซอลเพอเฟิลเป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ศึกษาปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกที่หลุดออกมาจากเม็ดเชื้อแต่ละชนิดเมื่ออยู่ในสภาวะลำไส้กึ่งจำลอง

2. การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการดักจับ

ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการดักจับ *L. plantarum* LP 64 ด้วยโซเดียมอัลจิเนต โดยการแปรผันความเร็วการกวน 400, 600 และ 800 รอบต่อนาที ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนต 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ แบ่งสภาวะการทดลองเป็น 2 สภาวะ

2.1 สภาวะที่ 1 น้ำมันปริมาตร 250 มิลลิลิตร สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 500 มิลลิลิตร อัตราส่วนระหว่างสารละลายโซเดียมอัลจิเนตต่อสารละลายแขวนลอยของเซลล์เท่ากับ 10 มิลลิลิตร : 40 มิลลิลิตร

2.2 สภาวะที่ 2 น้ำมันปริมาตร 150 มิลลิลิตร สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 300 มิลลิลิตร อัตราส่วนระหว่างสารละลายโซเดียมอัลจิเนตต่อสารละลายแขวนลอยของเซลล์เท่ากับ 12 มิลลิลิตร : 48 มิลลิลิตร

นำเม็ดเชื้อที่ได้จากแต่ละสภาวะกรองผ่านตะแกรงร่อนหมายเลข 14, 18, 25, 40, 60 และ 120 ที่มีขนาดของช่อง 1.400, 1.000, 0.710, 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร ตามลำดับ เพื่อศึกษาการกระจายขนาดของเม็ดเชื้อ

3. การศึกษาผลการดักจับต่อการยืดอายุการเก็บรักษา

ผสมเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L.plantarum* LP64 กับแป้งที่เป็นสื่อผสม 3 ชนิด คือ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง ก่อนผ่านเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดซ์เบด ซึ่งใช้ความเร็วลม 1 เมตรต่อวินาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Lievense, 1990b) และแปรผันเวลาในการทำแห้ง 15, 30 และ 45 นาที ตามลำดับ จากนั้นบรรจุเม็ดเชื้อแห้งใส่ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ ปิดผนึกปากถุงด้วยระบบสุญญากาศ แบ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างที่เก็บไว้ในวันที่ 7, 15, 30, 60, 90, 120 และ 180 เพื่อวัดปริมาณความชื้นโดยวิธีของ AOAC (1990) ตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี dilution plate count บนอาหารแข็ง MRS ที่มีบรอมครีซอลเพอเฟิลเป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และศึกษาความสามารถในการผลิตกรดของเม็ดเชื้อโดยชั่งเม็ดเชื้อ 2.5 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างอาหารมาวัดค่ากรด-ด่างทุก 4 ชั่วโมง

4. การศึกษาการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีเรียที่ถูกดักจับเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ

เลี้ยงเชื้อก่อโรค *V. alginolyticus* , *V. parahaemolyticus* และ *V. harveyi* จากอาหาร NA ในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งเม็ดเชื้อ 2.5 กรัม เติมนลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเหวี่ยงแยกเม็ดเชื้อออกจากอาหารด้วยความเร็ว 7000 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ไปทดสอบการยับยั้งโดยการหยดลงไปบนอาหารแข็งที่เจาะด้วย cork borer เบอร์ 4 ซึ่งมีเชื้อก่อโรคถูก spread อยู่บนอาหารก่อนแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลการยับยั้งจากการเกิดบริเวณใสรอบหลุมของเชื้อที่ใช้ทดสอบและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น

5. การศึกษาอิทธิพลของโปรไบโอติกต่ออัตราการรอดและอัตราการเจริญของกุ้งกุลาดำ

5.1 การเตรียมน้ำที่ใช้ในการทดลอง

เตรียมน้ำโดยผสมน้ำทะเลกับน้ำจืดสะอาด ให้มีระดับความเค็ม 10 พีพีที แล้วนำไปเติมในตู้เลี้ยงปลาขนาด $38 \times 60 \times 35$ เซนติเมตร ปริมาตรที่เติม 40 มิลลิตร จำนวน 6 ตู้ เติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ลงไปอัตราส่วน 10 พีพีเอ็ม เพื่อฆ่าเชื้อในน้ำ ทำการเติมอากาศด้วยเครื่องให้อากาศ เพื่อไล่คลอรีนให้ระเหยออกเป็นเวลา 2-3 วัน (ธรรณชัย, 2546)

5.2 การเตรียมลูกกุ้ง

เตรียมลูกกุ้งกุลาดำระยะโพสต์ลาร์วา 15 ทำการคัดขนาดของกุ้งให้มีขนาดใกล้เคียงกัน โดยการวัดน้ำหนักและวัดความยาวของกุ้งก่อนการเพาะเลี้ยง ให้อาหารกุ้งวันละประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักกุ้ง (สุกิจ และคณะ, 2537) โดยจะแบ่งการให้อาหารเป็น 3 มื้อคือ 8.00 น. 12.00 น. และ 18.00 น. ทำการเปลี่ยนน้ำออก 2 ใน 3 ของตู้และดูดตะกอนก้นตู้ออกทุกสัปดาห์ จากนั้นเติมน้ำที่ปรับความเค็มแล้วให้มีปริมาตรเท่าเดิม

5.3 การทดสอบผลของโปรไบโอติกที่มีต่อการรอดชีวิตและการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

5.3.1 อัตราการรอดและอัตราการเจริญของกุ้งกุลาดำ

การทดลองนี้แบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม คือ

กลุ่มควบคุม ให้อาหารสำเร็จรูปผสมอาหารเหลว MRS

กลุ่มทดลองที่ 1 ให้อาหารผสมเชื้อ *L. plantarum* LP64 2×10^7 CFU/g

กลุ่มทดลองที่ 2 ให้อาหารผสมเชื้อ *L. plantarum* LP64 4×10^7 CFU/g

กลุ่มทดลองที่ 3 ให้อาหารผสมเชื้อ *L. plantarum* LP64 1×10^8 CFU/g

กลุ่มทดลองที่ 4 ให้อาหารผสมเชื้อ *L. plantarum* LP64 2×10^8 CFU/g

5.3.2 การตรวจคุณสมบัติของน้ำในตู้เลี้ยงกุ้ง

วัดอุณหภูมิและค่ากรด-ด่างของน้ำในตู้ทดลองทุกวัน ๆ ละหนึ่งครั้ง และวัดค่าแอมโมเนีย ไนไตรต์ โดยชุดทดสอบสำเร็จรูปของ HACH สัปดาห์ละครั้ง

5.3.3 การตรวจนับจำนวนของแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด

เก็บตัวอย่างน้ำ และตะกอนจากตู้เลี้ยงกุ้งทุกสัปดาห์ ๆ ละครั้ง ในภาชนะที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วิเคราะห์แบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดโดยวิธี dilution plate count บนอาหารแข็ง NA อาหารแข็ง MRS และอาหารแข็ง TCBS สัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง ทำการเก็บตัวอย่างลูกกุ้งในแต่ละกลุ่มไปวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดบนอาหาร NA ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกบนอาหาร MRS และปริมาณเชื้อไวรัสบนอาหาร TCBS เปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียในกุ้งกุลาดำระหว่างก่อนการทดลองกับหลังการทดลอง

5.3.4 การวัดการเจริญเติบโต

การวัดการเจริญเติบโตหาได้จากการชั่งน้ำหนัก และวัดความยาวของลูกกุ้งแต่ละกลุ่มการทดลองในสัปดาห์สุดท้ายของการเพาะเลี้ยง จากนั้นนำมาหาน้ำหนักและความยาวเฉลี่ยทั้งหมด แบ่งเป็นกลุ่มตามความยาว อัตราการเจริญจำเพาะสามารถหาได้จาก (เบญจมาศ, 2539)

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ} = \frac{\ln(W_{t_2}) - \ln(W_{t_1})}{T_2 - T_1}$$

โดย W_{t_1} คือ น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำเมื่อเริ่มทดลอง (กรัม)
 W_{t_2} คือ น้ำหนักเฉลี่ยของกุ้งกุลาดำเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)
 T_1 คือ เวลาที่เริ่มทำการทดลอง
 T_2 คือ เวลาที่สิ้นสุดการทดลอง

5.3.5 การหาอัตราการรอด

นับจำนวนกึ่งที่เหลือรอดในสัปดาห์สุดท้าย แล้วนำมาคำนวณหาค่าอัตราการรอดจาก

$$\text{อัตราการรอด (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนกึ่งที่เหลือรอดในสัปดาห์สุดท้าย} \times 100}{\text{จำนวนกึ่งเริ่มต้น}}$$

5.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์หาค่าทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS for Window

6. สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพฯ

7. ระยะเวลาทำการวิจัย

ระหว่างเดือน กรกฎาคม 2547 ถึง มีนาคม 2549



ภาพที่ 7 เครื่องกวนผสมความเร็วสูง



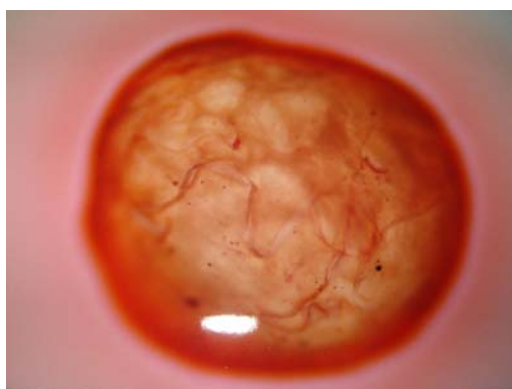
ภาพที่ 8 ตู้ทดลองที่ใช้เลี้ยงกิ้งกูดำ

ผลและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาชนิดของสารพาหะ (carriers) ที่ใช้ในการดักจับ *Lactobacillus plantarum* LP64

1.1 การศึกษาประสิทธิภาพในการดักจับของสารพาหะ

โดยส่วนใหญ่การดักจับเซลล์แบคทีเรียที่ทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติก มักนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมนมและการหมัก วัตถุประสงค์หลักของการดักจับเพื่อป้องกันเซลล์จากสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และเพื่อยืดอายุในการเก็บรักษาเซลล์ (Krasaekoopt et al., 2003) สารพาหะที่ใช้ในการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* LP64 ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ โซเดียมอัลจิเนต ไคโทซาน คาร์ราจีแนน และ เซลลูโลส แอซีเตด พทาเลต ซึ่งต่างมีคุณสมบัติในการดักจับที่แตกต่างกัน เม็ดเชื้อที่เกิดจากการดักจับด้วยโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ไคโทซาน 1 เปอร์เซ็นต์ และคาร์ราจีแนน 2 เปอร์เซ็นต์ มีความคงตัว สามารถคงสภาพเป็นเม็ดอยู่ได้ เม็ดเชื้อที่ได้ส่วนใหญ่จะมีลักษณะเป็นทรงกลม เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นว่าผิวรอบเม็ดเชื้อไม่เรียบ ดังภาพที่ 9 เม็ดเชื้อที่ได้มีขนาดที่แตกต่างกัน โดยเม็ดเชื้อที่ดักจับด้วยไคโทซานจะมีขนาดเล็กที่สุด รองลงมาคือ เม็ดเชื้อที่ดักจับด้วยโซเดียมอัลจิเนต และเม็ดเชื้อที่ดักจับด้วยคาร์ราจีแนนมีขนาดใหญ่ที่สุด



ภาพที่ ๑ ภาพถ่ายของเมล็ดเชื้อที่ถูกดักจับภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า

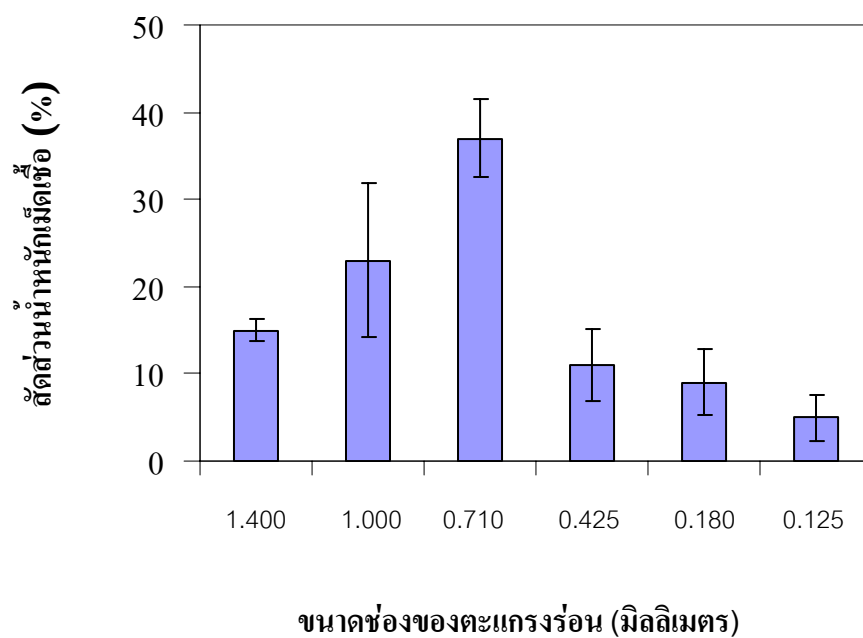
- a) เมล็ดเชื้อที่ถูกดักจับด้วยโซเดียมอัลจินต 2 เปอร์เซ็นต์
- b) เมล็ดเชื้อที่ถูกดักจับด้วยไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์
- c) เมล็ดเชื้อที่ถูกดักจับด้วยคาร์ราจีแนน 2 เปอร์เซ็นต์

เม็ดเชื้อที่ถูกดักจับด้วยโซเดียมอัลจินเต เมื่อกรองผ่านตะแกรงร่อนพบว่าเม็ดเชื้อส่วนใหญ่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 0.710 มิลลิเมตร คิดสัดส่วนของน้ำหนักเป็น 37 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ตะแกรงขนาด 1.000, 1.400, 0.425, 0.180 และ 0.125 มิลลิเมตร มีเม็ดเชื้อตกค้างคิดเป็นสัดส่วนของน้ำหนักเป็น 23, 15, 11, 9 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 10 เมื่อวัดขนาดเม็ดเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเม็ดเชื้อมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 0.896 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับการทดลองของ Larisch et al. (1994) ซึ่งใช้ 2 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมอัลจินเต ในการดักจับ *Lc. lactis* ssp.cremoris ได้เม็ดเชื้อที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.50 – 1.00 มิลลิเมตร

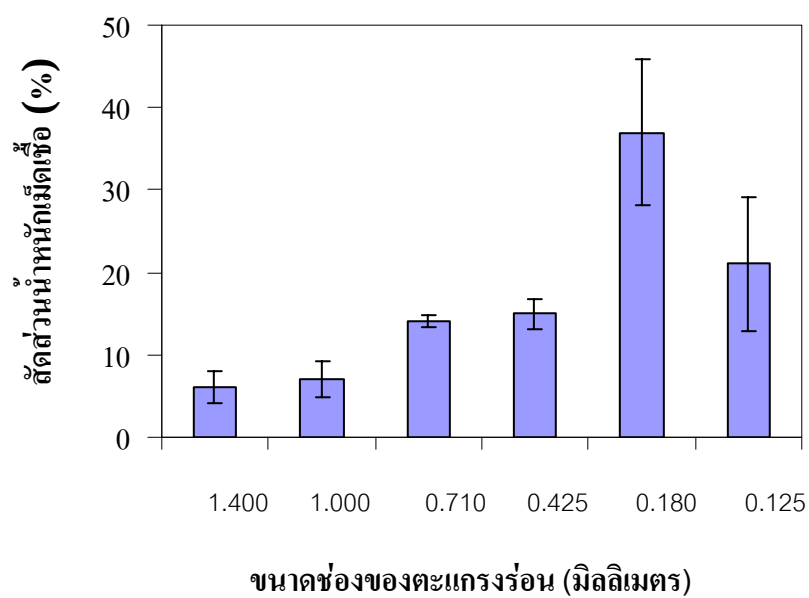
เมื่อทำการคัดแยกขนาดเพื่อวิเคราะห์ขนาดของเม็ดเชื้อที่ถูกดักจับด้วยไคโตซานโดยใช้ตะแกรงร่อนที่มีขนาดของช่อง 6 ขนาด คือ 1.400, 1.000, 0.710, 0.425, 0.180 และ 0.125 มิลลิเมตร พบว่าเม็ดเชื้อส่วนใหญ่จะตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 0.180 มิลลิเมตร สัดส่วนของน้ำหนักคิดเป็น 37 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เม็ดเชื้อที่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 0.125, 0.425, 0.710, 1.000 และ 1.400 มิลลิเมตร โดยสัดส่วนของเม็ดเชื้อคิดเป็น 21, 15, 14, 7 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังภาพที่ 11 เมื่อวัดขนาดของเม็ดเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเม็ดเชื้อมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 0.186 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการตรึงเซลล์ *Lactobacillus lactis* โดย Groboillot et al. (1993) ที่ได้เม็ดเชื้อจากการดักจับด้วยไคโตซานมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 0.150 มิลลิเมตร ซึ่งจัดว่ามีขนาดค่อนข้างเล็กมาก

เม็ดเชื้อจากการดักจับด้วยคาร์ราจีแนนจะมีขนาดใหญ่ที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมอัลจินเตและไคโตซาน ดังภาพที่ 12 โดยเม็ดเชื้อส่วนใหญ่จะตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.400 มิลลิเมตร รองลงมาคือ 1.000, 0.710 และ 0.425 มิลลิเมตร โดยคิดสัดส่วนของน้ำหนักเป็น 63, 30, 5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่จะไม่มีเม็ดเชื้อคาร์ราจีแนนตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 0.180 และ 0.125 มิลลิเมตร เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของเม็ดเชื้อเท่ากับ 1.597 มิลลิเมตร Audet et al. (1988) ได้ทดลองดักจับเซลล์ *Streptococcus thermophilus* ด้วย 3 เปอร์เซ็นต์ แคลป-คาร์ราจีแนน เพื่อใช้สำหรับผลิตโยเกิร์ต พบว่าเม็ดเชื้อที่ได้มีขนาด 0.5 -2.0 มิลลิเมตร ในส่วนของเม็ดเชื้อจากสารพาหะทั้ง 3 ชนิดที่ตกค้างในถาดชั้นล่างสุดของตะแกรงร่อนนั้นมีปริมาณน้อยมากจึงไม่นำมาแสดง ส่วนเม็ดเชื้อที่ดักจับด้วยเซลลูโลส แอซิเตท พทาเลต ไม่คงตัว เนื่องจากคงสภาพอยู่ได้ประมาณ 10 วินาที ก็แตก สาเหตุอาจเนื่องจากคุณสมบัติของเซลลูโลส แอซิเตท พทาเลต และลักษณะของเครื่องกวนที่ใช้ในการทดลองกับเอกสารอ้างอิงต่างกัน คือในการทดลองใช้เซลลูโลส

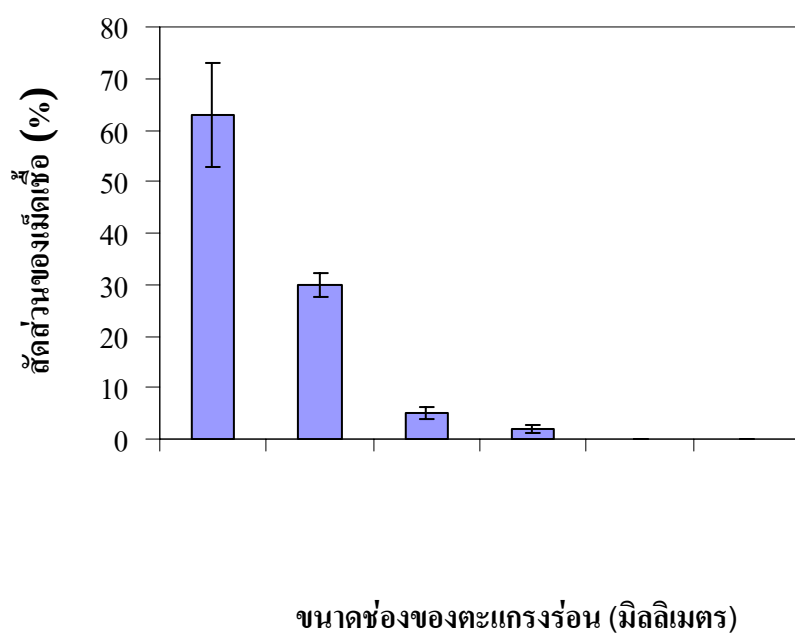
แอชีเตท พทาเลต ของ Fluka ความหนืด 3 MPAS แต่ในเอกสารอ้างอิงใช้เซลลูโลส แอชีเตท พทาเลตของ Sigma ไม่มีการระบุความหนืดที่ใช้ และใบกวนในการทดลองเป็นแบบ 4 ใบพัด ในขณะที่เอกสารอ้างอิงใช้ใบกวนแบบ 6 ใบพัด ปัจจัยที่ต่างกันมีผลต่อการจั่นรูปของเม็ดเชื้อ นอกจากนี้ในเอกสารอ้างอิงใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่อยู่ในรูปผง เนื่องจากโดยทั่วไปเซลลูโลส แอชีเตท พทาเลต นิยมใช้ในการเคลือบหรือหุ้มยาซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะแห้งเป็นผง (Malm et al., 1951) การนำเซลลูโลส แอชีเตท พทาเลต มาหุ้มสารละลายแขวนลอยของเซลล์ซึ่งมีน้ำเป็นองค์ประกอบจึงทำให้ได้เม็ดเชื้อที่ไม่คงรูป



ภาพที่ 10 สัดส่วนน้ำหนักของเม็ดยาที่ดักจับด้วยโซเดียมอัลจินเตบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ



ภาพที่ 11 สัดส่วนน้ำหนักของเม็ดยาที่ดักจับด้วยไคโทซานบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ



ภาพที่ 12 สัดส่วนน้ำหนักของเมล็ดเชื้อที่ดักจับด้วยคาร์ราจีแนบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ

เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติกของสารพาหะทั้ง 3 ชนิด พบว่าโซเดียมอัลจิเนตมีประสิทธิภาพในการดักจับสูงสุด ดังตารางผนวกที่ ก1 เนื่องจากปริมาณเซลล์ที่หลุดออกจากเม็ดเชื้อเมื่อละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 เท่ากับ 3.22×10^{10} CFU/g จากเซลล์เริ่มต้น 5.14×10^{10} CFU/g คิดเป็นประสิทธิภาพในการดักจับ 62.65 %

ส่วนเม็ดเชื้อคาร์ราจีแนนซึ่งถูกละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 8 เปอร์เซ็นต์ และเม็ดเชื้อไคโทซานที่ถูกละลายในสารละลายกรดแอสติก pH 2.0 มีเซลล์หลุดออกมา 8.61×10^8 และ 7.25×10^5 CFU/g คิดเป็นประสิทธิภาพในการดักจับเท่ากับ 1.675 % และ 0.001 % ตามลำดับ แสดงว่าประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกของไคโทซาน และคาร์ราจีแนนต่ำกว่าโซเดียมอัลจิเนต หรืออาจมีเซลล์บางส่วนที่ยังหลงเหลืออยู่ในเม็ดเชื้อและไม่สามารถหลุดออกมาได้

การตรึงเซลล์ด้วยไคโทซานจะใช้กลูตารัลดีไฮด์เพื่อขึ้นรูปเม็ดเชื้อ เนื่องจากกลูตารัลดีไฮด์สามารถสร้างพันธะโควาเลนต์เชื่อมไคโทซานที่มีหมู่เอมีนเป็นหมู่ฟังก์ชัน กับหมู่อะมิโนที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้สามารถดักจับเซลล์จุลินทรีย์ไว้ภายในไคโทซานได้ เม็ดเชื้อที่ได้มีความเสถียรดีมาก (Guesdon and Avrameas, 1976) ทำให้การทำลายพันธะโควาเลนต์เพื่อปล่อยเซลล์ที่อยู่ภายในออกมาทำได้ยาก อาจเป็นสาเหตุให้เซลล์แบคทีเรียที่อยู่ภายในเม็ดเชื้อไคโทซานหลุดออกมาได้น้อย นอกจากนี้กลูตารัลดีไฮด์ยังเป็นพิษต่อเซลล์ ต่างจากอัลจิเนตและคาร์ราจีแนน ซึ่งได้รับการยอมรับให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากมีความปลอดภัย จึงอาจทำให้ปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดชีวิตภายหลังการดักจับด้วยไคโทซานลดลง ดังนั้นเซลล์มีชีวิตที่หลุดออกจากไคโทซานจึงมีปริมาณน้อยกว่าสารพาหะอื่นๆ

ส่วนคาร์ราจีแนนที่ใช้ในการทดลองซึ่งเป็นเกรดที่ใช้ในระดับอุตสาหกรรมอาหาร เม็ดเชื้อที่ได้จากการดักจับมีขนาดค่อนข้างใหญ่ และแข็งแรง เนื่องจากมีการแช่เม็ดเชื้อในโพแทสเซียมคลอไรด์ เพื่อให้เม็ดเจลคงรูปอยู่ได้ (Takata, 1977) จึงทำให้การละลายคาร์ราจีแนนเพื่อปล่อยเซลล์ที่อยู่ภายในออกมาทำได้ยากเช่นกัน นอกจากนี้คาร์ราจีแนนที่ใช้ไม่บริสุทธิ์เท่ากับระดับที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ จึงมีสารอื่นปะปนอยู่ทำให้ไปกีดขวางการหลุดออกของแบคทีเรียกรดแลคติกได้

1.2 ศึกษาความสามารถในการหลุดของเซลล์จากเม็ดเชื้อในสภาวะลำไส้กึ่งกลาดำจำลอง

โดยปกติแล้วลำไส้กึ่งจะมีสภาวะเป็นกรดเล็กน้อย ค่าพีเอชประมาณ 5.0 เนื่องจากกึ่งมีลำไส้สั้น ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เติมลงไปเป็นโปรไบโอติกควรจะหลุดออกจากสารพาหะได้ง่าย เพื่อให้สามารถไปยังเคาะที่ผนังลำไส้ได้ จากการจำลองสภาวะในลำไส้กึ่งโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 5.0 ทำการทดลองเป็นเวลา 0, 5, 15, 30, 45 และ 60 นาที เพื่อดูการหลุดออกของเซลล์จากเม็ดเชื้อที่ผ่านการดักจับด้วยโซเดียมอัลจินต ไคโทซาน และคาร์ราจีแนน ผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 2

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถหลุดออกจากเม็ดเชื้อโซเดียมอัลจินตได้ตั้งแต่นาทีที่ 5 ของการทดลอง ปริมาณเซลล์ที่หลุดออกมาเท่ากับ 4.58×10^7 CFU/ml และเพิ่มขึ้นเป็น 10^9 และ 10^{10} CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 15 และ 30 นาที ตามลำดับ ส่วนเซลล์จะหลุดออกจากคาร์ราจีแนนเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที ปริมาณเซลล์ที่หลุดออกมาเท่ากับ 3.84×10^7 CFU/ml และเพิ่มเป็น 10^8 CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที ในขณะที่เซลล์จะหลุดออกจากเม็ดเชื้อไคโทซานเมื่อเวลา 45 นาที ปริมาณเซลล์ที่หลุดออกมาเท่ากับ 2.02×10^2 CFU/ml และเพิ่มขึ้นเป็น 2.17×10^4 CFU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที เนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยไคโทซานเม็ดเชื้อที่ได้มีเสถียรภาพดีมาก การละลายเพื่อเอาเซลล์ที่อยู่ภายในออกจึงทำได้ยาก สรุปผลการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติกแสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ปริมาณเซลล์เฉลี่ย *L. plantarum* LP 64 ที่หลุดออกจากเมดเซียในสภาวะลำไส้กึ่งจำลอง

เวลา (นาที่)	ปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่หลุดจากเมดเซีย (CFU/ml)		
	โซเดียมอัลจิเนต	คาร์ราจีแนน	ไคโตซาน
0	-	-	-
5	4.58×10^7	-	-
15	8.04×10^9	3.84×10^7	-
30	1.01×10^{10}	1.05×10^8	-
45	1.10×10^{10}	1.15×10^8	2.02×10^2
60	1.23×10^{10}	2.15×10^8	2.17×10^4

ตารางที่ 3 สรุปการดักจับ *L. plantarum* LP 64 ด้วยเทคนิคมีลชั้นของสารพาหะชนิดต่างๆ

สารพาหะ	ปริมาณสาร (%)	สารที่ช่วยในการ ขึ้นรูปเมดเซีย	ขนาดเมดเซียเฉลี่ย ^a (มิลลิเมตร)
โซเดียมอัลจิเนต	2	แคลเซียมคลอไรด์	0.896
คาร์ราจีแนน	2	โพแทสเซียมคลอไรด์	1.597
ไคโตซาน	1	กลูตาร์รัลดีไฮด์	0.186
เซลลูโลส แอซิเตท พทาเลต	10	บีแวกซ์	-

^a ขนาดเมดเซียเฉลี่ยที่วัดภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าโซเดียมอัลจิเนตและคาร์ราจีแนนเป็นสารพาหะที่เหมาะสมในการดักจับ *L. plantarum* LP64 เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกหลุดออกจากสารพาหะทั้ง 2 ได้อย่างรวดเร็ว เหมาะสมกับกึ่งกลาดำซึ่งเป็นสัตว์ที่มีลำไส้สั้นมาก โอกาสที่จุลินทรีย์จะไปยังเคาะลำไส้และทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติกได้จึงสูง นอกจากนี้การดักจับเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนตและคาร์ราจีแนนยังเป็นวิธีการตรึงเซลล์ที่ใช้สภาวะไม่รุนแรง ทำให้ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตมีมาก และสารพาหะทั้ง 2 ยังได้รับการยอมรับให้ใช้ในทางอาหารจึงไม่เป็นอันตรายต่อกึ่งหากกึ่งกินเข้าไป

เมื่อเปรียบเทียบความเหมาะสมในการนำไปใช้งาน พบว่าโซเดียมอัลจิเนตมีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากมีประสิทธิภาพในการดักจับแบคทีเรียได้สูงสุด เซลล์สามารถหลุดออกมาจากเม็ดเชื้อได้รวดเร็วและสูงกว่าคาร์ราจีแนนเมื่อเข้าไปสู่ลำไส้กึ่ง นอกจากนี้เม็ดเชื้อที่ได้จากการดักจับด้วยคาร์ราจีแนนมีขนาดค่อนข้างใหญ่จึงไม่เหมาะสมที่จะไปผสมอาหารกึ่ง เพราะอาหารกึ่งเบอร์ศูนย์จะมีขนาดประมาณ 0.5 - 1 มิลลิเมตรและลูกกึ่งจะกินอาหารที่เข้าสามารถหยิบกินได้เท่านั้น ในขณะที่โคโทซานจุลินทรีย์หลุดออกมาได้ช้าและปริมาณก็น้อยมากจึงไม่เหมาะสมในการเลี้ยงกึ่ง นอกจากนี้ในการดักจับเซลล์ด้วยโคโทซานมีการใช้กลูตาไรต์ไฮโดรซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ ถ้าใช้เลี้ยงกึ่งก็อาจเป็นอันตรายได้

2. ศึกษาหาสภาวะการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติก *L. plantarum* LP 64 ด้วยโซเดียมอัลจิเนตที่เหมาะสม

โซเดียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะที่ใช้ในการตรึงเซลล์ได้ง่ายและสะดวก Stenroos et al. (1982) ใช้โซเดียมอัลจิเนตในการตรึงเซลล์ *L.bulgaricus* เพื่อผลิตกรดแลกติก Kurazatokowski et al.(1982)) ตรึงรา *Penicillium chrysogenum* ด้วยโซเดียมอัลจิเนต เพื่อผลิตสารปฏิชีวนะเพนนิซิลินจี นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยหลายงานที่ตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยโซเดียมอัลจิเนต เพื่อผลิตเอทานอล (Veliky and Williams, 1981; Hahn-Hagerdal and Mattiasson, 1982; Chiang et al., 1982., 1983) รวมทั้งการนำเม็ดเชื้อที่ได้จากการดักจับด้วยโซเดียมอัลจิเนตมาประยุกต์ใช้ทาง การแพทย์ เช่น การรักษาโรคบกพร่องทางฮอร์โมน หรือโปรตีนบางชนิด(AIHendy, 1996) และการบำบัดโรคมะเร็ง (Read et al., 2001; Cirone, 2003) เป็นต้น

เมื่อพิจารณาจากงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่ พบว่าโซเดียมอัลจิเนตเป็นพอลิเมอร์ธรรมชาติที่ใช้ในการตรึงเซลล์มากที่สุด เนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนตเป็นวิธีการที่รวดเร็วใช้เวลาสั้นๆในแต่ละขั้นตอนของการเตรียม ทำได้ง่ายเพราะมีขั้นตอนในการตรึงน้อย ปลอดภัยเพราะสารทุกชนิดที่ใช้ในระหว่างการตรึงเซลล์ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ราคาถูกเนื่องจากใช้สารเคมีจำนวนไม่มากและแต่ละชนิดก็มีราคาถูก และสามารถประยุกต์ใช้ได้ดีในการตรึงเซลล์ (ภาวิณี, 2531)

จากการคัดเลือกชนิดของสารพาหะที่เหมาะสมในการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่าโซเดียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะที่มีความเหมาะสมที่สุดในการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติก จึงทำการศึกษาต่อเพื่อหาสภาวะการดักจับที่เหมาะสมที่สุดในการนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงกึ่งอุตสาหกรรม

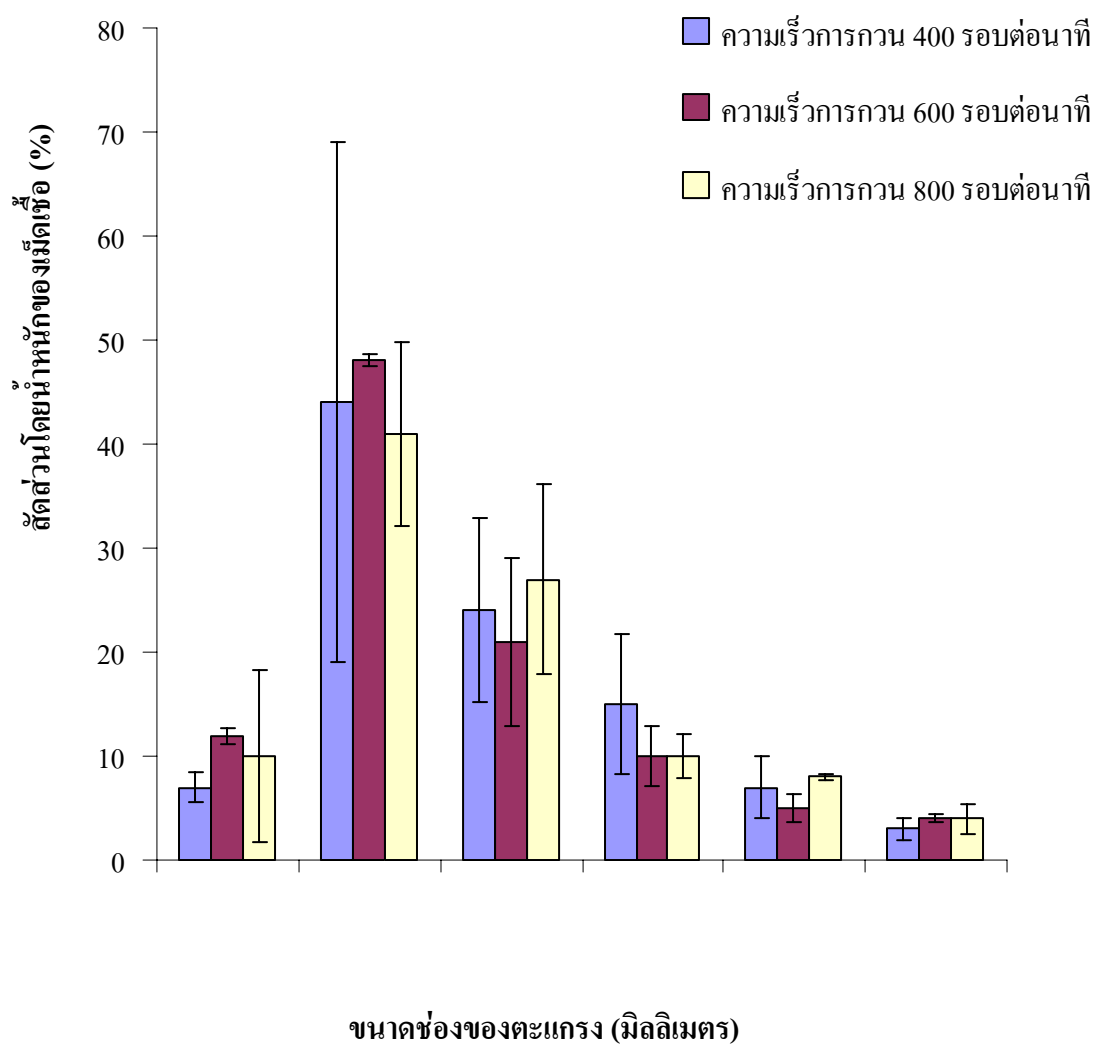
2.1 ศึกษาขนาดและการกระจายตัวของเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก *L.plantarum* LP64

จากการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการดักจับแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยสารละลายโซเดียมอัลจิเนตทั้ง 2 สภาวะ พบว่าในสภาวะการทดลองที่ 1 แสดงผลดังตารางผนวกที่ ค2 – ค4

เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจินต์ที่ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วการกวน 400 รอบต่อนาที จะได้เม็ดเชื่อน้ำหนักรวม 17.51 กรัม เมื่อทำการวิเคราะห์ขนาดโดยการกรองผ่านตะแกรงร่อน 6 ขนาด ที่มีขนาดช่องของตะแกรง 1.400, 1.000, 0.710, 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร ซึ่งแสดงผลการกระจายของเม็ดเชื่อดังภาพ 13 พบว่าเม็ดเชื้อส่วนใหญ่จะตกค้างบนตะแกรงขนาด 1.000 มิลลิเมตร มากที่สุด คิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนัก 44 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ตะแกรงขนาด 0.710, 0.425, 1.400, 0.250 และ 0.125 ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนัก 24, 15, 7, 7 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ที่ความเร็ว 600 รอบต่อนาที น้ำหนักของเม็ดเชื้อรวมเป็น 16.70 กรัม เมื่อวิเคราะห์ขนาดพบว่าเม็ดเชื้อตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.000 มิลลิเมตร มากที่สุด คิดเป็นสัดส่วน 48 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เม็ดเชื้อที่ตกค้างบนตะแกรงขนาด 0.710, 1.400, 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร คิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนัก 21, 12, 10, 5 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที เม็ดเชื้อที่ได้มีน้ำหนักรวม 15.49 กรัม และตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.000 มิลลิเมตร มากที่สุดเช่นเดียวกับที่ความเร็ว 400 และ 600 รอบต่อนาที คิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนัก 41 เปอร์เซ็นต์ รองลงคือเม็ดเชื้อที่ตกค้างบนตะแกรงขนาด 0.710, 0.425, 1.400 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งมีสัดส่วนโดยน้ำหนักในแต่ละชั้น 27, 10, 10, 8 และ 4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

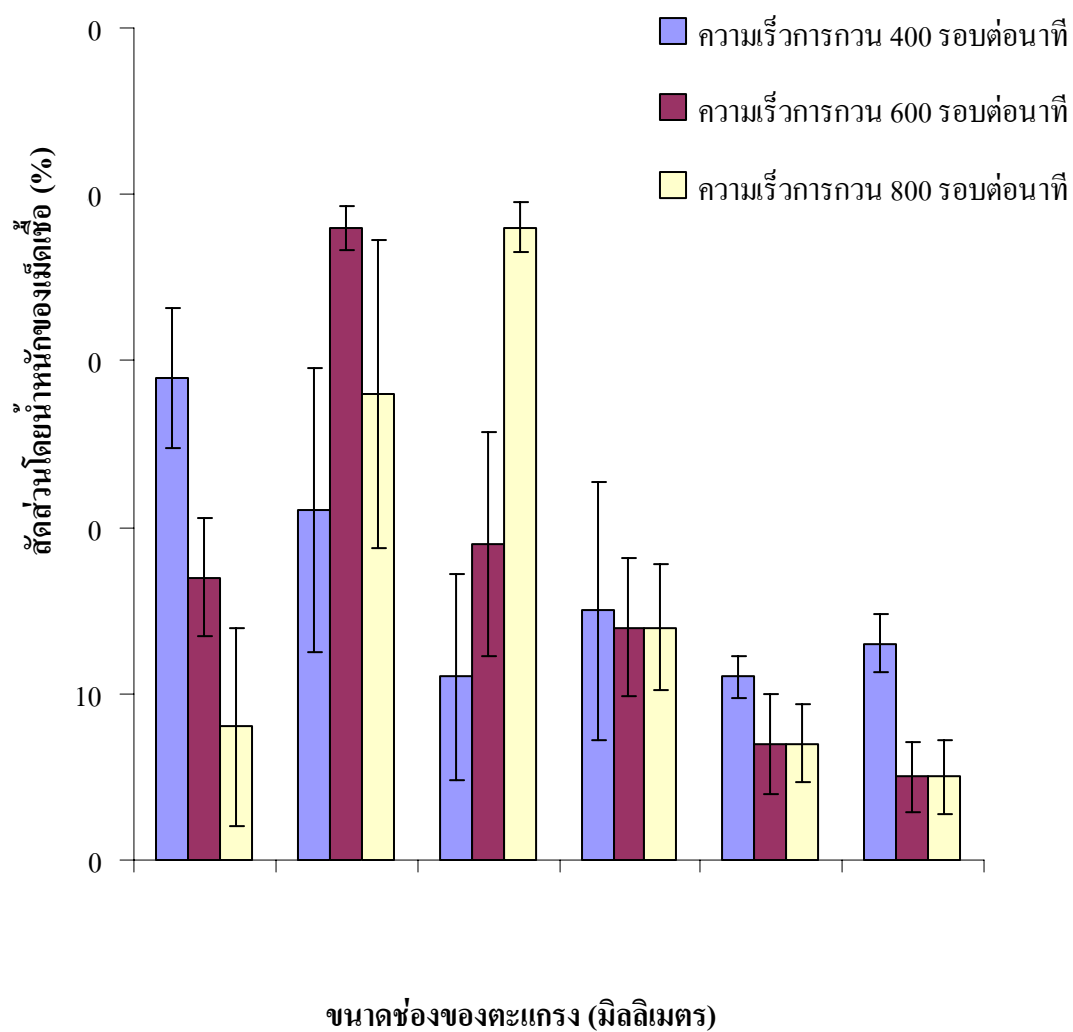


ภาพที่ 13 การกระจายตัวของเมล็ดเชื้อบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 1 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 1

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินเตเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำหนักรวมของเม็ดเชื้อที่ได้เพิ่มขึ้นจากการใช้โซเดียมอัลจินเต 1 เปอร์เซ็นต์ 1.53 เท่า การกระจายของเม็ดเชื้อบนตะแกรงขนาดต่างๆแสดงดังภาพที่ 14 ที่ความเร็วการกวน 400 รอบต่อนาที น้ำหนักรวมของเม็ดเชื้อ คิดเป็น 25.35 กรัม เม็ดเชื้อส่วนใหญ่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.400 มิลลิเมตร คิดเป็นสัดส่วน 29 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งใกล้เคียงกับเม็ดเชื้อบนตะแกรงร่อนขนาด 1.000 ซึ่งมีสัดส่วนโดยน้ำหนัก 21 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เม็ดเชื้อตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 0.425, 0.710, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร มีสัดส่วนโดยน้ำหนัก 15, 3, 11 และ 11 เปอร์เซ็นต์

เมื่อเพิ่มความเร็วการกวนเป็น 600 รอบต่อนาที เม็ดเชื้อจะมีขนาดเล็กลง เนื่องจากเม็ดเชื้อตกค้างบนตะแกรงขนาด 1.000 มากกว่าตะแกรงขนาด 1.400 มิลลิเมตร โดยคิดเป็นสัดส่วนของเม็ดเชื้อบนตะแกรงขนาด 1.000 มิลลิเมตร เป็น 38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เม็ดเชื้อที่ติดอยู่บนตะแกรงขนาด 0.710, 1.400, 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร คิดเป็นสัดส่วน 19, 17, 14, 7 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อความเร็วการกวนเพิ่มเป็น 800 รอบต่อนาที พบว่าเม็ดเชื้อมีขนาดเล็กลงกว่าที่ความเร็ว 400 และ 600 รอบต่อนาที เพราะเม็ดเชื้อส่วนใหญ่ตกค้างบนตะแกรงขนาด 0.710 มิลลิเมตร คิดเป็นสัดส่วน 38 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ตะแกรงขนาด 1.000 มิลลิเมตร ที่มีเม็ดเชื้อตกค้าง 28 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเม็ดเชื้อที่ติดอยู่บนตะแกรงขนาด 1.400 มิลลิเมตร ที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที มีน้อยกว่าที่ความเร็ว 400 และ 600 รอบต่อนาที เพราะเม็ดเชื้อมีสัดส่วนเพียง 8 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักเท่านั้น ส่วนเม็ดเชื้อที่ติดบนตะแกรงขนาด 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร มีสัดส่วนโดยน้ำหนัก 14, 7 และ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

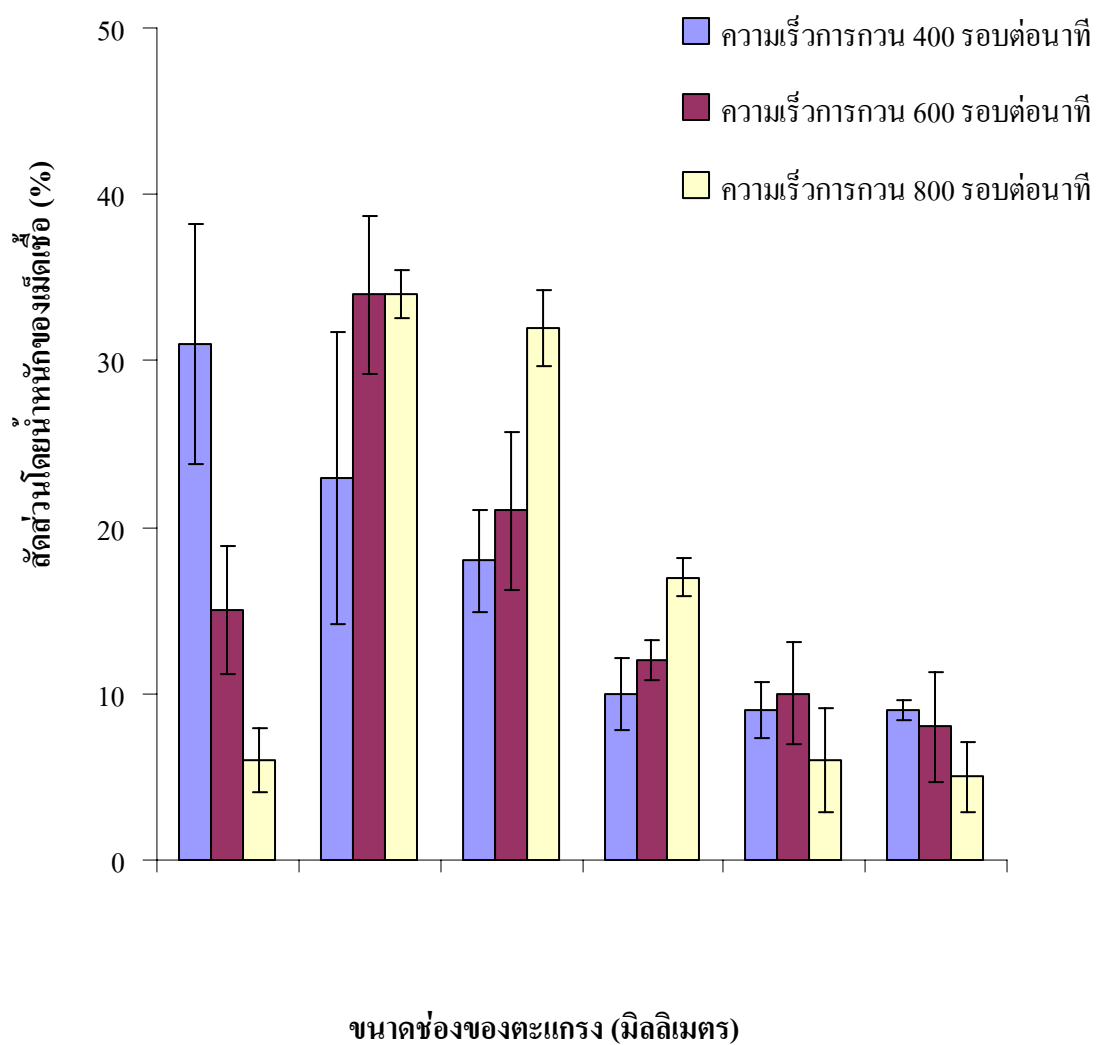


ภาพที่ 14 การกระจายตัวของเมล็ดเชื้อบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 1

เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเพิ่มเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักของเม็ดเชื้อรวมที่ได้เพิ่มขึ้นจากการใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ 1.22 เท่า และจากการใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 1 เปอร์เซ็นต์ 1.87 เท่า โดยน้ำหนักรวมของเม็ดเชื้อที่ความเร็วการกววน 400 600 และ 800 รอบต่อนาที เป็น 30.56 29.74 และ 32.54 กรัม ตามลำดับ

เมื่อศึกษาขนาดและการกระจายของเม็ดเชื้อบนตะแกรงร่อนทั้ง 6 ขนาด ซึ่งแสดงผลการกระจายดังภาพที่ 15 พบว่าที่ความเร็วการกววน 400 รอบต่อนาที เม็ดเชื้อมีขนาดใหญ่กว่าที่ความเร็ว 600 และ 800 รอบต่อนาที เพราะเม็ดเชื้อที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที ส่วนใหญ่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.400 มิลลิเมตร คิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนัก 31 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเร็ว 600 และ 800 รอบต่อนาที เม็ดเชื้อส่วนใหญ่จะตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.000 มิลลิเมตร คิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนัก 34 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน

เมื่อเปรียบเทียบเม็ดเชื้อที่ความเร็ว 600 รอบต่อนาที กับเม็ดเชื้อที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที พบว่าเม็ดเชื้อที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาทีมีขนาดเล็กกว่าเม็ดเชื้อที่ความเร็ว 600 รอบต่อนาที เพราะที่ความเร็ว 800 รอบต่อนาที มีเม็ดเชื้อตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 0.710, 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นตะแกรงร่อนที่มีขนาดช่องเล็ก สัดส่วนรวมกัน 60 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ความเร็ว 600 รอบต่อนาที สัดส่วนโดยน้ำหนักของเม็ดเชื้อรวมกันทั้ง 4 ตะแกรง คิดเป็น 51 เปอร์เซ็นต์

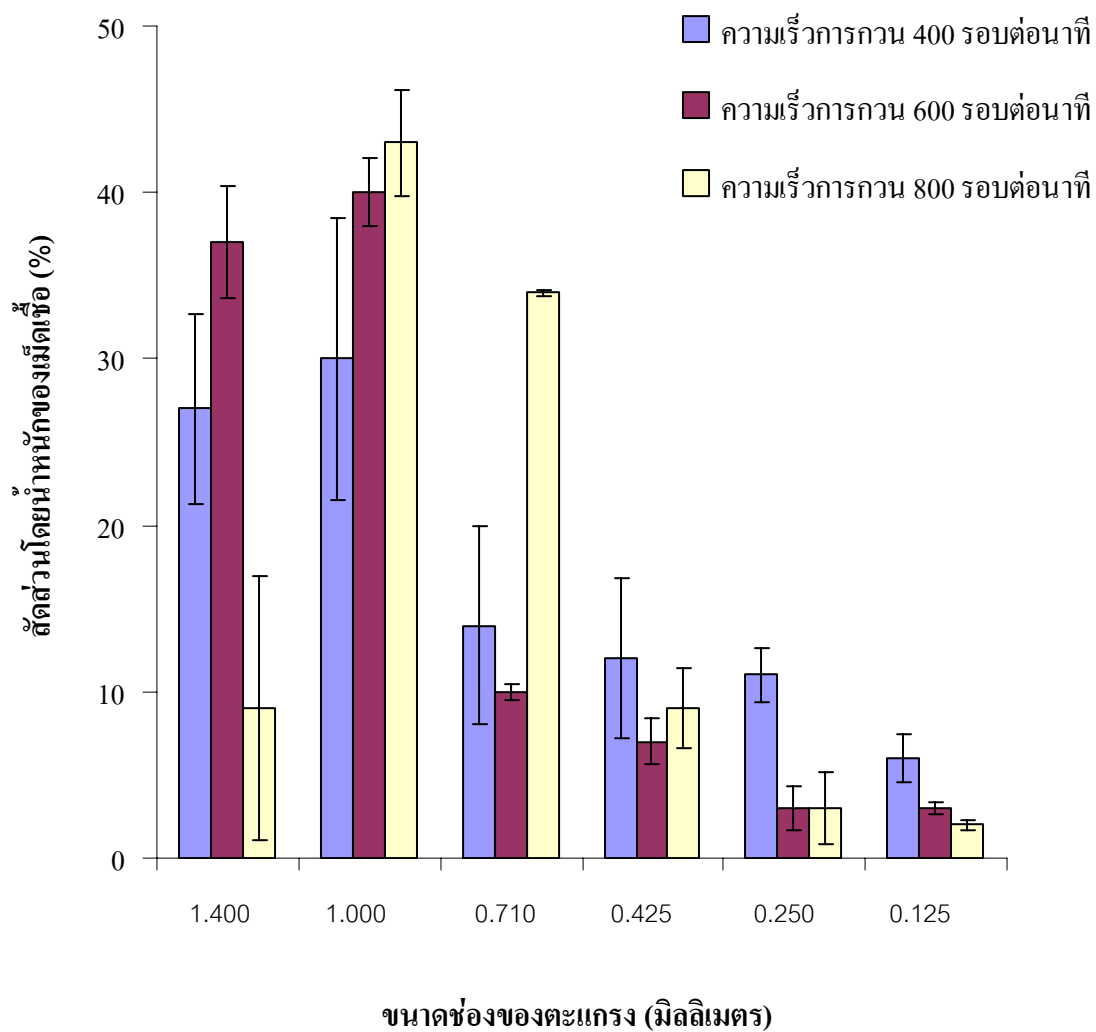


ภาพที่ 15 การกระจายตัวของเมล็ดเชื้อบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 1

ในสภาวะการทดลองที่ 2 จะแสดงผลดังตารางผนวกที่ ค5 - ค7 พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินต 1 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วการกวน 400, 600 และ 800 รอบต่อนาที เม็ดเชื้อส่วนใหญ่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.000 มิลลิเมตร มากที่สุด คิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนัก 30, 40 และ 43 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาเม็ดเชื้อจะตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.400, 0.710, 0.425, 0.250 และ 0.125 ซึ่งคิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนัก 27, 14, 12, 11 และ 6 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็วการกวน 400 รอบต่อนาที และคิดเป็นสัดส่วน 37, 10, 7, 3 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็วการกวน 600 รอบต่อนาที

ที่ความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาที ตะแกรงร่อนที่มีขนาดเม็ดเชื้อตกค้างรองลงมาจากตะแกรงขนาด 1.000 มิลลิเมตร คือตะแกรงร่อนขนาด 0.710 มิลลิเมตร ซึ่งมีเม็ดเชื้อคิดเป็นสัดส่วน 34 เปอร์เซ็นต์ ตามด้วยตะแกรงร่อนขนาด 1.400 และ 0.425 มิลลิเมตร ซึ่งคิดเป็นสัดส่วน 9 เปอร์เซ็นต์ เท่ากัน และตะแกรงร่อนขนาด 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร มีเม็ดเชื้อตกค้างอยู่น้อยที่สุดคิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนัก 3 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

น้ำหนักเปียกรวมของเม็ดเชื้อที่ได้จากการใช้สารละลายโซเดียมอัลจินต 1 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วการกวน 400, 600 และ 800 รอบต่อนาที คือ 16.20, 19.52 และ 16.31 ตามลำดับ การกระจายของเม็ดเชื้อบนตะแกรงทั้ง 6 ขนาด แสดงผลดังภาพที่ 16

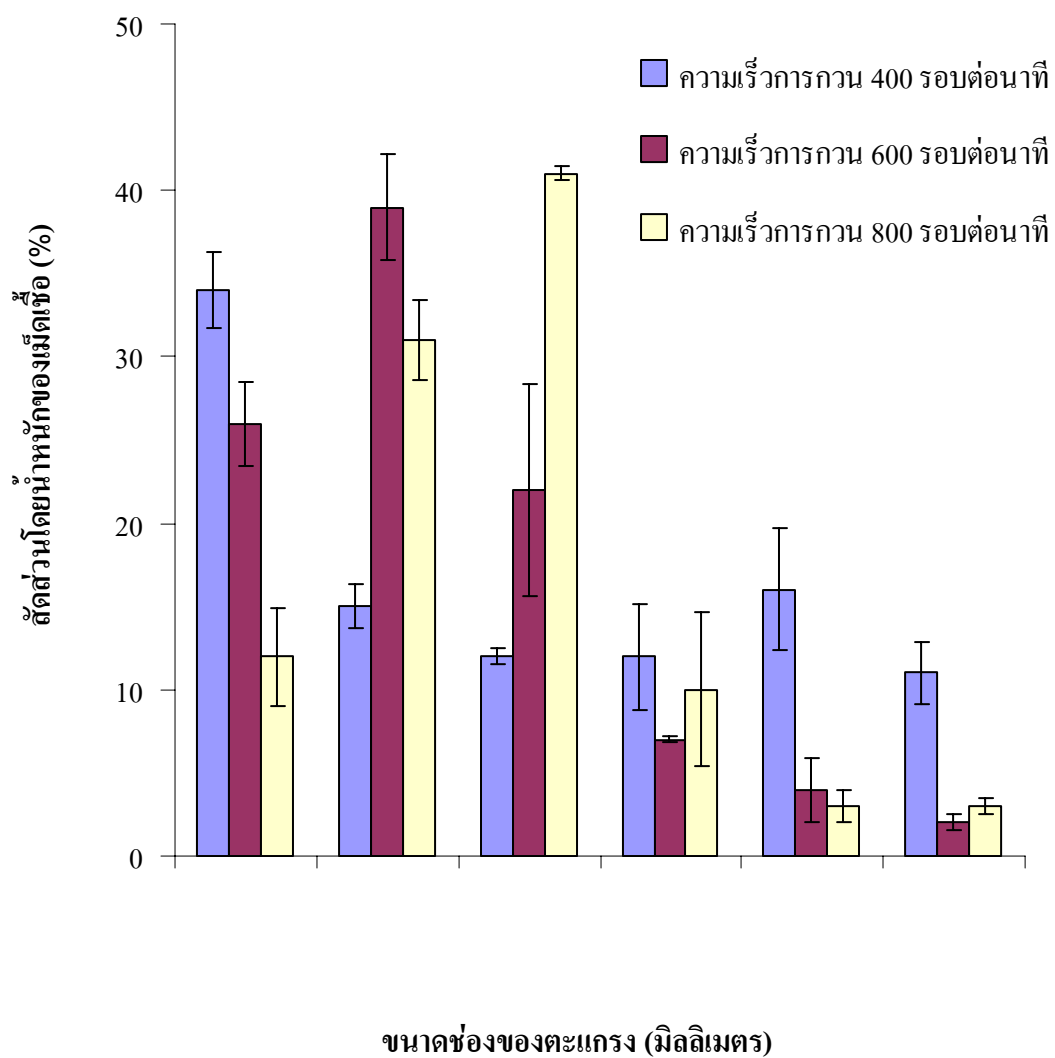


ภาพที่ 16 การกระจายตัวของเม็ดเชื้อบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 1 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 2

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเตเป็น 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักรวมของเม็ดเชื้อที่ได้มีปริมาณมากกว่าการดักจับด้วยโซเดียมอัลจินเต 1 เปอร์เซ็นต์ 1.78 เท่า โดยที่ความเร็วการกวน 400 รอบต่อนาที จะให้เม็ดเชื้อที่มีขนาดใหญ่ที่สุด เนื่องจากเม็ดเชื้อส่วนใหญ่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.400 มิลลิเมตร คิดเป็นสัดส่วน 34 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ซึ่งมากกว่าเม็ดเชื้อที่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.000, 0.710, 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร ที่มีสัดส่วน 15, 12, 12, 16 และ 11 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

ที่ความเร็วการกวน 600 รอบต่อนาที จะให้เม็ดเชื้อที่มีขนาดใหญ่รองลงมาจากที่ความเร็ว 400 รอบต่อนาที เพราะเม็ดเชื้อที่ได้ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.000 มิลลิเมตร มากที่สุดคิดเป็นสัดส่วน 39 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเม็ดเชื้อที่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.400, 0.710, 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร มีสัดส่วนโดยน้ำหนัก 26, 22, 7, 4 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

เมื่อเพิ่มความเร็วการกวนเป็น 800 รอบต่อนาทีจะให้เม็ดเชื้อที่มีขนาดเล็กที่สุด เพราะเม็ดเชื้อส่วนใหญ่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 0.710 มิลลิเมตร คิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนัก 41 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เม็ดเชื้อที่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.000, 1.400, 0.425, 0.250, 0.125 มิลลิเมตร ซึ่งคิดเป็นสัดส่วน 31, 12, 10, 3 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การกระจายของเม็ดเชื้อบนตะแกรงร่อนจะแสดงผลดังภาพที่ 17

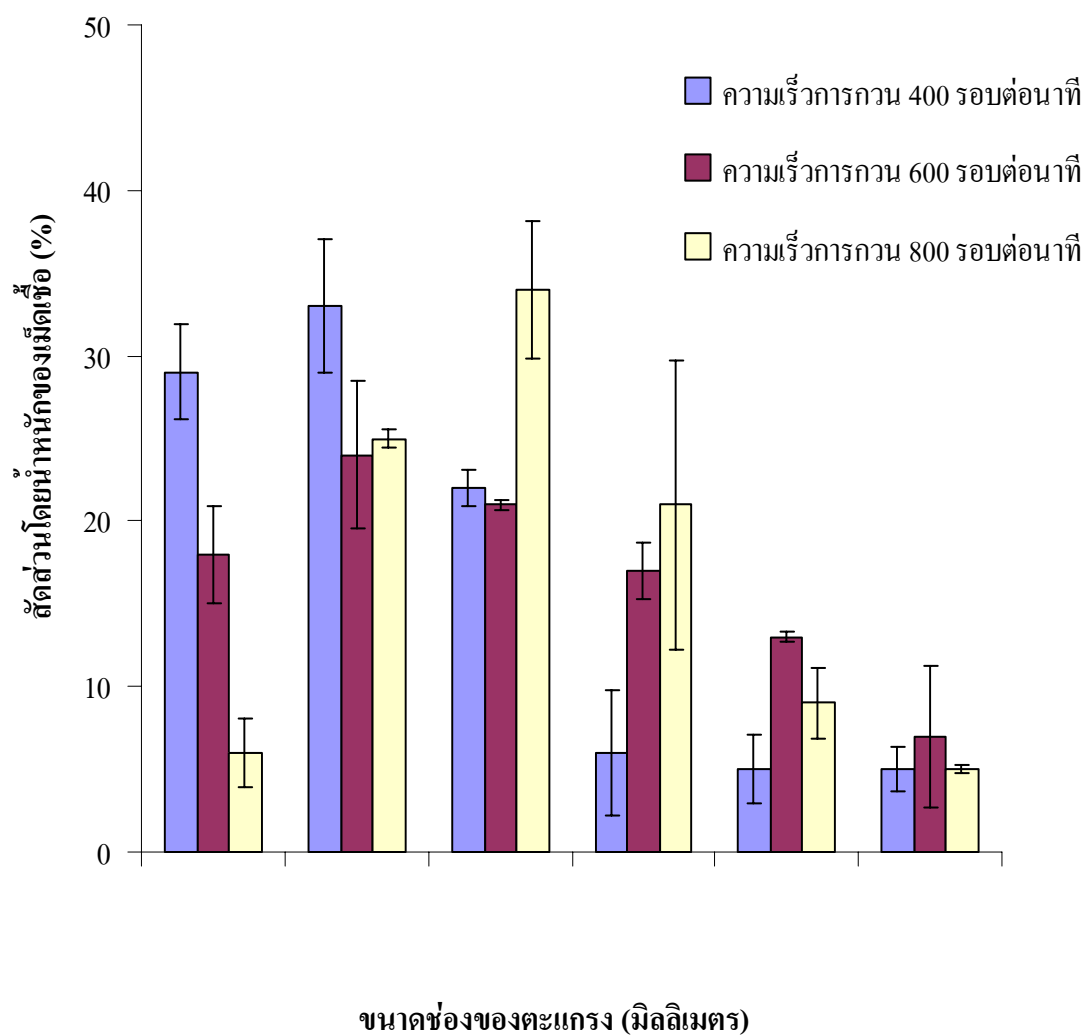


ภาพที่ 17 การกระจายตัวของเมล็ดเชื้อบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 2

เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินเตเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำหนักเปียกรวมของเม็ดเชื้อที่ได้เพิ่มขึ้นจากการใช้สารละลายโซเดียมอัลจินเต 1 เปอร์เซ็นต์ 2.05 เท่า โดยที่ความเร็วการกวน 400 และ 600 รอบต่อนาที จะได้เม็ดเชื้อขนาดใหญ่กว่าที่ความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาที โดยเม็ดเชื้อที่ความเร็วการกวน 400 และ 600 รอบต่อนาที จะตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.000 มิลลิเมตร มากที่สุด คิดเป็นสัดส่วน 33 และ 24 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ที่ความเร็วการกวน 600 รอบต่อนาที มีเม็ดเชื้อตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดเล็ก คือ 0.710, 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร คิดเป็นสัดส่วนโดยรวม 58 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าที่ความเร็วการกวน 400 รอบต่อนาที เพราะมีสัดส่วนโดยน้ำหนักรวมทั้ง 4 ตะแกรงเพียง 38 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น แสดงว่าเม็ดเชื้อที่ความเร็วในการกวน 600 รอบต่อนาที มีขนาดเล็กกว่าเม็ดเชื้อที่ความเร็วการกวน 400 รอบต่อนาที

ส่วนที่ความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาที เม็ดเชื้อตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 0.710 มิลลิเมตร มากที่สุด คิดเป็นสัดส่วนโดยน้ำหนักเป็น 34 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา คือ เม็ดเชื้อที่ตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาด 1.000, 0.425, 0.250, 1.400 และ 0.125 มิลลิเมตร ซึ่งคิดเป็นสัดส่วน 25, 21, 9, 6 และ 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนของเม็ดเชื้อที่ตกค้างบนตะแกรงขนาดเล็ก 4 ขนาด คือ 0.710, 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร ที่ความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาที พบว่าสัดส่วนโดยรวมเป็น 69 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าที่ความเร็ว 600 และ 400 รอบต่อนาที ดังนั้นที่ความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาที จึงให้เม็ดเชื้อที่มีขนาดเล็กที่สุด การกระจายของเม็ดเชื้อบนตะแกรงทั้ง 6 ขนาดแสดงผลดังภาพที่ 18



ภาพที่ 18 การกระจายตัวของเมล็ดเชื้อบนตะแกรงร้อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจินेट 3 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะการทดลองที่ 2

2.2 ศึกษาประสิทธิภาพในการดักจับของโซเดียมอัลจิเนตทั้ง 2 สถานะการทดลอง

เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพในการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติก ด้วยโซเดียมอัลจิเนตของการทดลองทั้ง 2 สถานะ พบว่าแบคทีเรียที่หลุดออกจากเม็ดเชื้อมีปริมาณสูง และมีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 2 สถานะ สารแขวนลอยของเซลล์ตอนเริ่มต้นก่อนการดักจับจะมีปริมาณเซลล์ 10^{10} CFU/g เมื่อผ่านการดักจับปริมาณเซลล์ที่อยู่ภายในซึ่งสามารถหลุดออกจากเม็ดเชื้อได้มีปริมาณ 10^{10} CFU/g เช่นกัน แสดงว่าการดักจับเซลล์ด้วยโซเดียมอัลจิเนตมีประสิทธิภาพสูง สามารถดักจับเซลล์ไว้ในได้มากและเซลล์ก็หลุดออกมาจากเม็ดเชื้อได้ง่าย

สถานะการทดลองที่ 1 ซึ่งใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วการกวน 400, 600 และ 800 รอบต่อนาที เซลล์ที่ถูกปล่อยออกมามีปริมาณ 1.96×10^{10} , 1.99×10^{10} และ 2.45×10^{10} CFU/g ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเซลล์ที่ถูกปล่อยออกมามี 1.69×10^{10} , 1.29×10^{10} CFU/g และ 1.59×10^{10} CFU/g ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าปริมาณเซลล์ที่ถูกปล่อยออกมามีค่าใกล้เคียงกันกับที่ความเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเซลล์ที่ถูกปล่อยออกมามีปริมาณ 1.31×10^{10} , 1.44×10^{10} และ 1.37×10^{10} CFU/g ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LP64 ในสภาวะ
การทดลองที่ 1

ความเข้มข้น ของอัลจินต (เปอร์เซ็นต์)	ความเร็ว การกวน (รอบต่อนาที)	เวลาหยุด CaCl_2 (นาที)	น้ำหนักเปียก ของเม็ดเชื้อ (กรัม)	cfu / กรัม น้ำหนักเปียก ของเม็ดเชื้อ (CFU/g)
1	400	30.24	17.51	1.96×10^{10}
	600	29.48	16.70	1.99×10^{10}
	800	30.31	15.49	2.45×10^{10}
2	400	30.24	25.35	1.69×10^{10}
	600	30.29	24.32	1.29×10^{10}
	800	30.05	26.62	1.59×10^{10}
3	400	29.53	30.56	1.31×10^{10}
	600	30.45	29.74	1.44×10^{10}
	800	29.58	32.54	1.37×10^{10}

สภาวะการทดลองที่ 2 เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจินต 1 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วการกวน 400, 600 และ 800 รอบต่อนาที เซลล์ที่ถูกปล่อยออกมาปริมาณ 1.97×10^{10} , 1.83×10^{10} และ 2.13×10^{10} CFU/g ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินต 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเซลล์ที่ถูกปล่อยออกมาเท่ากับ 1.09×10^{10} , 1.41×10^{10} และ 1.37×10^{10} CFU/g ตามลำดับ

เมื่อเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินตเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเซลล์ที่ถูกปล่อยออกมาปริมาณ 1.17×10^{10} , 1.20×10^{10} และ 1.28×10^{10} CFU/g ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 5 จะเห็นได้ว่าทั้งที่สภาวะการทดลองที่ 1 และ 2 ปริมาณเซลล์ต่อน้ำหนักเปียกรวมของเม็ดยาในกลุ่มที่ใช้สารละลายโซเดียมอัลจินต 1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ใช้สารละลายโซเดียมอัลจินต 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เนื่องจากเมื่อสารละลายโซเดียมอัลจินตมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ความหนืดก็เพิ่มขึ้น โอกาสที่เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจะแทรกเข้าไปอยู่ในอัลจินตจึงทำได้ยากขึ้น แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่างสภาวะ 1 และสภาวะที่ 2 พบว่าปริมาณเซลล์ที่หลุดออกมาจากเม็ดยามีค่าใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 5 ประสิทธิภาพการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LP64 ในสภาวะการทดลองที่ 2

ความเข้มข้น ของอัลจินต (เปอร์เซ็นต์)	ความเร็ว การกวน (รอบต่อนาที)	เวลาหยุด CaCl_2 (นาทีก)	น้ำหนักเปียก ของเม็ดเชื้อ (กรัม)	cfu / กรัม น้ำหนัก เปียก หลังดักจับ (CFU/g)
1	400	19.45	16.20	1.97×10^{10}
	600	20.05	19.52	1.83×10^{10}
	800	20.01	16.31	2.13×10^{10}
2	400	20.25	28.08	1.09×10^{10}
	600	19.37	33.21	1.41×10^{10}
	800	20.55	31.08	1.37×10^{10}
3	400	20.53	35.69	1.17×10^{10}
	600	19.41	36.20	1.20×10^{10}
	800	20.16	34.81	1.28×10^{10}

เมื่อเปรียบเทียบการทดลองทั้ง 2 สภาวะพบว่า เม็ดเชื้อที่ได้จากสภาวะที่ 2 มีน้ำหนักเปียกรวมเฉลี่ยมากกว่าสภาวะที่ 1 เมื่อความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินเตเท่ากัน โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินเต 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ในสภาวะการทดลองที่ 1 น้ำหนักเปียกรวมเฉลี่ยของเม็ดเชื้อที่ได้เป็น 16.56, 25.34 และ 30.95 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองของสภาวะที่ 2 ให้น้ำหนักเปียกรวมเฉลี่ยของเม็ดเชื้อเป็น 17.34, 30.79 และ 35.57 กรัม ตามลำดับ เนื่องจากสภาวะการทดลองที่ 2 ใช้สารละลายโซเดียมอัลจินเตและสารละลายแวนิลอยของเซลล์มากกว่าที่สภาวะการทดลองที่ 1 เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเม็ดเชื้อที่ได้จึงสูงกว่า โดยที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเต 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเม็ดเชื้อของสภาวะที่ 2 เพิ่มขึ้นจากสภาวะที่ 1 คิดเป็น 4, 21 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

แต่ในสภาวะการทดลองที่ 2 ใช้ปริมาณน้ำมัน และสารละลายแคลเซียมคลอไรด์น้อยกว่า สภาวะการทดลองที่ 1 ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกสภาวะที่ 2 เพื่อคัดจับ *L. plantarum* LP64 ซึ่งใช้อัตราส่วนระหว่างสารละลายแวนิลอยของเซลล์ : สารละลายโซเดียมอัลจินเต : น้ำมัน : สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เป็น 12 มิลลิลิตร : 48 มิลลิลิตร : 150 มิลลิลิตร : 300 มิลลิลิตร เนื่องจากปริมาณเม็ดเชื้อที่ได้สูงกว่า และสิ้นเปลืองสารและค่าใช้จ่ายน้อยกว่า

เมื่อทำการศึกษาเปรียบเทียบความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินเต และความเร็วรอบการกวนในสภาวะการทดลองที่ 2 พบว่า เมื่อใช้ความเร็วรอบการกวนที่สูงขึ้น เม็ดเชื้อที่ได้จะมีขนาดเล็กลง สังเกตได้จากเมื่อใช้ความเร็วรอบในการกวนที่สูงขึ้นจะมีเม็ดเชื้อตกค้างบนตะแกรงร่อนที่มีขนาดเล็ก คือ 0.710, 0.425, 0.250 และ 0.125 มิลลิเมตร ในสัดส่วนที่มากขึ้น ดังนั้นเม็ดเชื้อที่ความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาทีจึงมีขนาดเล็กที่สุด รองลงมาคือเม็ดเชื้อที่ความเร็วการกวน 600 รอบต่อนาที ส่วนเม็ดเชื้อที่ความเร็วการกวน 400 รอบต่อนาที จะมีขนาดใหญ่ที่สุด

เนื่องจากการอาหารกึ่งกลูตาต้าก่อนข้างจะมีขนาดเล็ก การเลือกใช้เม็ดเชื้อจึงต้องเลือกเม็ดเชื้อที่มีขนาดเล็กเพื่อความสะดวกในการผสมและให้กึ่งสามารถหิบบินได้ เพราะกึ่งจะเลือกกินอาหารที่หาสามารถหิบบินได้เท่านั้น ดังนั้นความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมในการผลิตเม็ดเชื้อจึงควรเป็น 800 รอบต่อนาที นอกจากนี้เม็ดเชื้อที่มีขนาดเล็กมีข้อได้เปรียบมากกว่าเม็ดเชื้อขนาดใหญ่ คือ การส่งผ่านของอาหารและออกซิเจนดีกว่า (Chicheportiche et al., 1988) การแพร่กระจาย

ของอาหารทั่วถึง ทนทานต่อการบีบอัดด้วยเครื่องจักรได้ และนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ได้ดี (Leblond, 1999)

เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินตที่ใช้ในการทดลองซึ่งแปรผันเป็น 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินต 3 % เม็ดเชื้อที่ได้จะมีขนาดใหญ่กว่าเม็ดเชื้อที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินต 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์เล็กน้อย และปริมาณเซลล์ต่อน้ำหนักเปียกของเม็ดเชื้อก็ต่ำกว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินต 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ที่ความเข้มข้นของโซเดียมอัลจินต 3 เปอร์เซ็นต์ จะให้เม็ดเชื้อในปริมาณมากและมีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอกได้ดีกว่า Chandramouli et al. (2004) กล่าวว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินตที่เพิ่มสูงขึ้น ก็ย่อมจะปกป้องเซลล์แบคทีเรียได้ดีขึ้น เนื่องจากต้องมีการนำเม็ดเชื้อที่ได้ไปผสมอาหารกึ่งสำเร็จรูปแล้วเข้าเครื่องอัดเม็ดที่มีอุณหภูมิสูง การเลือกใช้สารละลายโซเดียมอัลจินตที่ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ น่าจะช่วยเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LP64 หลังผ่านเครื่องอัดเม็ดได้มากกว่าการใช้สารละลายโซเดียมอัลจินตเข้มข้น 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์

สรุปว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LP64 ควรใช้อัตราส่วนระหว่างสารละลายแขวนลอยของเซลล์ : สารละลายโซเดียมอัลจินต : น้ำมันพืช : สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ เป็น 12 มิลลิลิตร : 48 มิลลิลิตร : 150 มิลลิลิตร : 300 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจินตที่เหมาะสมคือ 3 เปอร์เซ็นต์ และความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาที

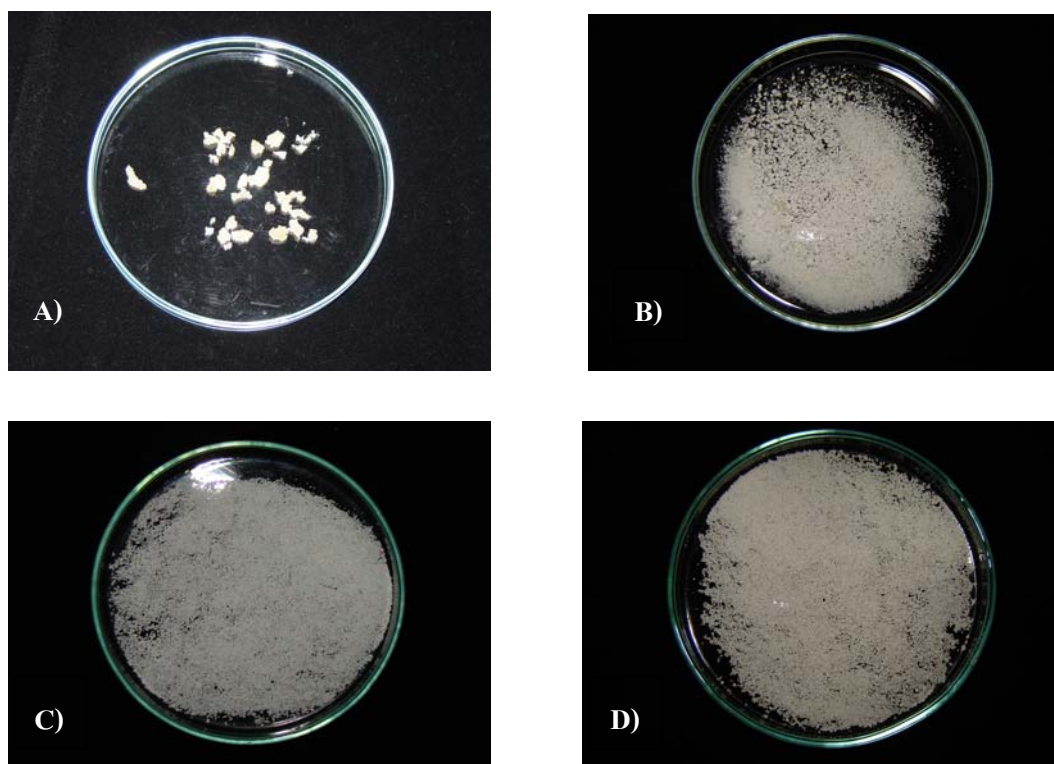
3. ศึกษาอายุการเก็บรักษาของเม็ดเชื้อแบคทีเรียหลังการทำแห้งด้วยเครื่องฟลูอิดไซ์เบด (fluidized bed)

การทำแห้งโดยทั่วไปมีจุดประสงค์หลักเพื่อลดปริมาณน้ำในวัสดุ ซึ่งช่วยป้องกันการปนเปื้อนที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ และยังสะดวกในการขนส่งด้วย (สมบัติ, 2527) ในการทดลองยืดอายุการเก็บรักษาของเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก โดยการทำแห้งด้วยเครื่องฟลูอิดไซ์เบด มีการใช้แป้ง 3 ชนิด คือ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลังผสมกับเม็ดเชื้อเพื่อทำหน้าที่เป็นสื่อผสมก่อนผ่านเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไซ์เบด อัตราส่วนระหว่างแป้งต่อเม็ดเชื้อแบคทีเรียเป็น 1:1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก) ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เหมาะสมที่สุดในการทำแห้ง (อุไรลักษณ์, 2548) เนื่องจากสามารถลดปริมาณความชื้นได้มากที่สุด ทำให้เซลล์อยู่ในระยะพักตัว

สาเหตุที่เลือกแป้งมาเป็นสื่อผสม เนื่องจากโดยปกติแล้วแป้งจะถูกใช้เป็นสารเหนียวในอาหารกึ่ง (นิรนาม, 2545) จึงไม่เป็นอันตรายต่อกึ่งกลาดำ แป้งที่ผสมในอาหารสัตว์มักจะเป็นแป้งข้าวโพดแต่เนื่องจากมีราคาแพง จึงนำแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวเจ้าที่มีราคาถูกกว่ามาใช้ทดสอบเปรียบเทียบกัน แป้งข้าวเจ้ามีอนุภาคของเม็ดแป้งเล็กที่สุด รองลงมาคือแป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง โดยมีขนาดของเม็ดแป้งอยู่ระหว่าง 1.5 – 5.8, 3.6 – 14.3 และ 7.1 – 25.0 ไมครอน ตามลำดับ (Misha and Rai, 2006 ; Singh et al., 2006) การที่อนุภาคของเม็ดแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดมีขนาดเล็ก การเข้าไปเกาะติดกับเม็ดเชื้อจะเกิดได้ดีและสามารถเคลือบเม็ดเชื้อได้สม่ำเสมอ แต่แป้งมันสำปะหลังมีความชื้นต่ำประมาณ 7.54 % ทำให้สามารถดูความชื้นได้ดีกว่าแป้งข้าวโพด โดยความสามารถในการดูความชื้นของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 9.54 g H₂O/ 100g dry solid ในขณะที่แป้งข้าวโพดมีความสามารถในการดูความชื้นเท่ากับ 8.57 g H₂O/ 100g dry solid เนื่องจากแป้งแต่ละชนิดมีข้อดีแตกต่างกัน จึงเลือกแป้งทั้ง 3 ชนิด มาเป็นสื่อผสม

เนื่องจากการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติก มีการใช้น้ำมันเป็นเฟสที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic phase) เมื่อแยกเม็ดเชื้อออกมา เม็ดเชื้อที่ได้จึงมีน้ำมันเกาะอยู่ทั้งที่ผิวและภายใน ซึ่งเมื่อผ่านเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไซ์เบด เม็ดเชื้อจะเกาะติดกันเป็นก้อนดังภาพที่ 19A และมีความชื้นสูงโดยที่เวลาในการเป่า 15, 30 และ 45 นาที ความชื้นของเม็ดเชื้อเท่ากับ 85.29, 78.79 และ 55.29 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเก็บรักษาเม็ดเชื้อไว้ระยะหนึ่งจะเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราและแบคทีเรียชนิดอื่นขึ้น จึงไม่เหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์

เมื่อนำเม็ดเชื้อมาผสมกับแป้งทั้ง 3 ชนิด และทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์เบด พบว่าเม็ดเชื้อจะมีลักษณะแห้ง ร่วน เป็นผง และมีความชื้นลดลง โดยเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผสมแป้งข้าวเจ้าและแป้งข้าวโพดจะมีสีขาว และสีครีม ลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน เม็ดละเอียดและสม่ำเสมอมากกว่าแป้งมันสำปะหลังเม็ดซึ่งมีเม็ดเชื้อสีขาว บางส่วนจับกันเป็นก้อนขนาดเล็ก ขนาดเม็ดเชื้อไม่สม่ำเสมอ ดังภาพที่ 19B – 19D



ภาพที่ 19 ลักษณะของเม็ดเชื้อหลังผ่านเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์เบด

- A) เม็ดเชื้อแห้ง
- B) เม็ดเชื้อที่ผสมแป้งข้าวเจ้า
- C) เม็ดเชื้อที่ผสมแป้งมันสำปะหลัง
- D) เม็ดเชื้อที่ผสมแป้งข้าวโพด

ค่าความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งหลังการทำแห้งจะลดลงตามระยะเวลาการเป่าลมร้อน โดยเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าก่อนทำแห้งมีความชื้น 52.14 เปอร์เซ็นต์ หลังทำแห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที ค่าความชื้นลดลงเหลือ 18.66, 9.90 และ 8.70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เช่นเดียวกับเม็ดเชื้อที่ผสมแป้งมันสำปะหลังความชื้นลดลงจาก 50 เปอร์เซ็นต์ เหลือ 17.08, 9.42 และ 8.74 ตามลำดับ และเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพดที่มีความชื้นก่อนทำแห้ง 47.05 เปอร์เซ็นต์ หลังการทำแห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที ความชื้นลดลงเหลือ 17.98, 9.77 และ 8.14 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า เมื่อเม็ดเชื้อที่ผสมแป้งทั้ง 3 ชนิด ใช้เวลาการทำแห้งนานขึ้น ความชื้นที่เหลืออยู่ในเม็ดเชื้อจะลดลงตามลำดับ ดังนั้นเม็ดเชื้อที่ทำแห้งนาน 15 นาที จึงมีความชื้นสูงที่สุด รองลงมาคือเม็ดเชื้อที่ทำแห้งนาน 30 และ 45 นาที ตามลำดับ

จากการทดลองพบว่า ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกภายในเม็ดเชื้อหลังการทำแห้งจะมีจำนวนลดลง 1 log cycle จากปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเม็ดเชื้อที่ผสมแป้งข้าวเจ้ามีจำนวน 5.94×10^{10} CFU/g หลังทำแห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที ปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 5.17×10^9 , 6.52×10^9 และ 4.50×10^9 CFU/g ตามลำดับ เช่นเดียวกับเม็ดเชื้อที่ผสมแป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพด เม็ดเชื้อที่ผสมแป้งมันสำปะหลังมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 4.31×10^{10} CFU/g หลังทำแห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที ปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 5.84×10^9 , 6.02×10^9 และ 6.57×10^9 CFU/g ตามลำดับ และเม็ดเชื้อที่ผสมแป้งข้าวโพดมีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 4.23×10^{10} CFU/g เมื่อผ่านการทำแห้ง ปริมาณเชื้อลดลงเหลือ 5.79×10^9 , 5.46×10^9 , 4.81×10^9 CFU/g ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 6 สังกัดได้ว่าเวลาที่ใช้ในการเป่าลมร้อนให้กับเม็ดเชื้อในเครื่องทำแห้งฟลูอิดไชน์เบดมีผลต่อความชื้นของเม็ดเชื้อ และจะทำให้ปริมาณเซลล์หลังการทำแห้งลดลง 1 log cycle แต่เวลาทำแห้งที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการลดลงของปริมาณเซลล์ เนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ในการทำแห้งต่ำเพียง 30 องศาเซลเซียส สาเหตุที่ปริมาณเซลล์หลังผ่านเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไชน์เบดมีปริมาณลดลง เนื่องจากเซลล์บางส่วนมีการสูญเสียปริมาณน้ำอิสระภายในเซลล์ซึ่งมีผลต่อกิจกรรมการดำรงชีวิตของเซลล์และทำให้เซลล์ตาย

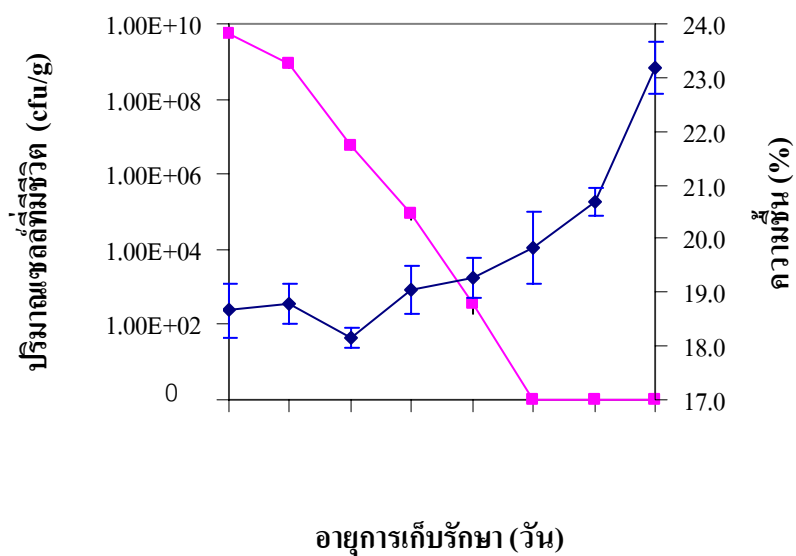
ตารางที่ 6 ความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งทั้ง 3 ชนิด และปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกหลังผ่าน
เครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไรเซชัน

เวลาทำแห้ง (นาทิจ)	ชนิดของแป้ง					
	แป้งข้าวเจ้า		แป้งมันสำปะหลัง		แป้งข้าวโพด	
	ความชื้น (%)	ปริมาณเซลล์ (cfu/g)	ความชื้น (%)	ปริมาณเซลล์ (cfu/g)	ความชื้น (%)	ปริมาณเซลล์ (cfu/g)
0	52.14	5.94×10^{10}	50.00	4.31×10^{10}	47.05	4.23×10^{10}
15	18.66	5.17×10^9	17.08	5.84×10^9	17.98	5.79×10^9
30	9.90	6.52×10^9	9.42	6.02×10^9	9.77	5.46×10^9
45	8.70	4.50×10^9	8.74	6.57×10^9	8.14	4.81×10^9

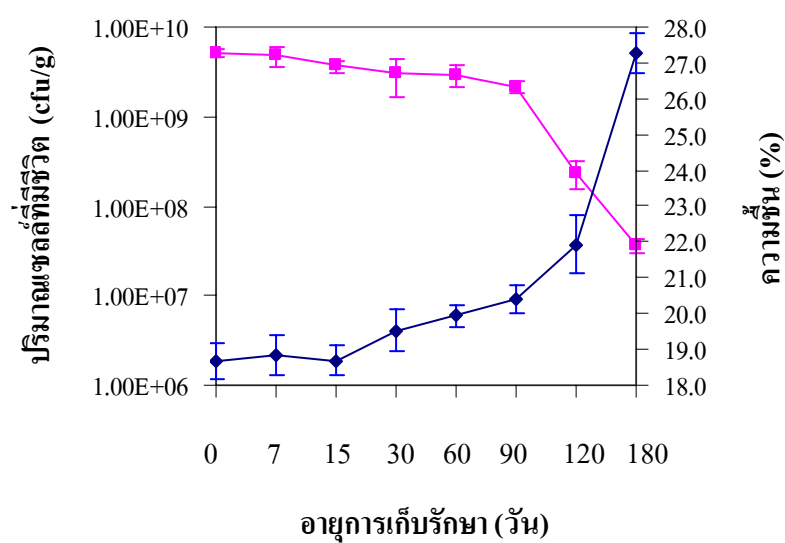
เม็ดเชื้อที่ผสมแป้งทั้ง 3 ชนิด หลังผ่านการทำแห้งจะถูกนำไปเก็บในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ ปิดปากถุงด้วยระบบสุญญากาศ แบ่งเก็บที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และกลุ่มที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้อง พบว่าจากการเก็บรักษาเม็ดเชื้อที่ผสมแป้งข้าวเจ้า ซึ่งทำแห้งนาน 15 นาติ และเก็บ ไว้ที่อุณหภูมิห้องปริมาณเชื้อที่ตรวจพบจะค่อยๆ ลดลงอย่างรวดเร็ว จากเริ่มต้นที่มีเชื้อ 5.17×10^9 CFU/g เมื่อผ่านไป 7 วัน ปริมาณเชื้อลดลงไป 1 log cycle เหลือเซลล์ทั้งหมด 8.47×10^8 CFU/g ที่เวลา 15, 30 และ 60 วัน ปริมาณเชื้อลดลงไปช่วงละ 2 log cycle เหลือ 5.84×10^6 , 8.90×10^4 และ 3.40×10^2 CFU/g ตามลำดับ และตรวจไม่พบแบคทีเรียกรดแลคติกที่เวลา 90, 120 และ 180 วัน ดังภาพที่ 20

เมื่อพิจารณากิจกรรมการผลิตกรดของเม็ดเชื้อในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเม็ดเชื้อที่เก็บตั้งแต่ เริ่มแรกถึงวันที่ 30 สามารถผลิตกรดทำให้ค่ากรด-ด่างของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ 4 ชั่วโมง แรกและคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 28 ค่ากรด-ด่างสุดท้ายของอาหาร คือ 4.09, 4.11 และ 4.16 สำหรับเม็ดเชื้อ ที่เก็บเป็นเวลา 7, 15 และ 30 วัน ตามลำดับ เนื่องจากเม็ดเชื้อที่เก็บไว้เป็นเวลา 30 วัน ปริมาณเชื้อ เหลือรอดยังมีสูงจึงมีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกได้สูงด้วย ค่ากรด-ด่างของอาหารจึง ลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเข้าสู่วันที่ 60 ค่ากรด-ด่างของอาหารเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงช้าลงโดยจะลดลง อย่างชัดเจนเมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 และค่ากรด-ด่างสุดท้ายของอาหารที่เวลา 48 ชั่วโมง คือ 4.21

A)



B)



—■— ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต
—◆— ความชื้น

ภาพที่ 20 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเมล็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้า ที่ผ่านการทำแห้งเป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

A) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

B) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ส่วนของเมล็ดเชื้อที่เก็บไว้ที่เวลา 90, 120 และ 180 วัน ค่ากรด-ด่างจะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก เมื่อป่มเลี้ยงตัวอย่าง 48 ชั่วโมง ค่ากรด-ด่างสุดท้ายของอาหารเท่ากับ 4.96, 5.30 และ 5.85 ตามลำดับ สาเหตุที่ค่ากรด-ด่างของอาหารลดลงน้อยเนื่องจากปริมาณเชื้อที่เหลือรอดเมื่อเวลา 90, 120 และ 180 วัน มีน้อยมากจนไม่สามารถตรวจพบได้ ความสามารถในการผลิตกรดจึงลดลงตามไปด้วย อาบชัย (2542) ทำการทดลองตรึงเซลล์แบคทีเรียโพรฟิโอนิกและเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตกรดระหว่างเซลล์อิสระและเมล็ดเชื้อ พบว่าเมล็ดเชื้อสามารถผลิตกรดโพรฟิโอนิกได้สูงกว่าเซลล์อิสระ เนื่องจากอาหารบางส่วนนำไปใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์ และปริมาณกรดที่ผลิตขึ้นจะสะสมในอาหารซึ่งมีโอกาสสัมผัสกับเซลล์อิสระโดยตรง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญและการผลิตกรด (Paik and Glatz, 1994) แต่เซลล์อิสระสามารถใช้เวลาในการผลิตกรดจนกระทั่งการผลิตกรดคงที่เร็วกว่า เนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงใช้กลูโคสได้ช้ากว่าเพราะต้องลำเลียงอาหารผ่านเจล ดังนั้นการผลิตกรดโพรฟิโอนิกจึงช้ากว่าเซลล์อิสระ

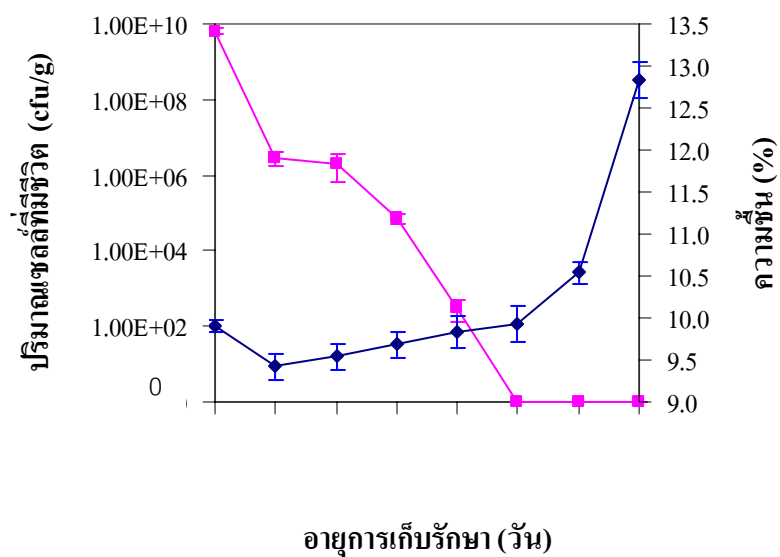
ปริมาณความชื้นในระหว่างการเก็บรักษาเมล็ดเชื้อ 180 วัน จะมีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา โดยที่เวลา 0, 7, 15, 30, 60, 90, 120 และ 180 วัน ปริมาณความชื้นของเมล็ดเชื้อเท่ากับ 18.66, 18.80, 18.14, 18.05, 19.08, 20.33, 20.70 และ 23.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าถุงที่ใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ไม่สามารถป้องกันความชื้นจากภายนอกได้ เนื่องจากปริมาณความชื้นเพิ่มสูงกว่าตอนเริ่มต้นมาก

ส่วนเมล็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณเซลล์แบคทีเรียลดลงจากเริ่มต้นมีปริมาณเชื้อ 5.17×10^9 CFU/g เมื่อผ่านไป 7, 15, 30, 60, 90, 120 และ 180 วัน ปริมาณเชื้อที่เหลือรอดเท่ากับ 4.83×10^9 , 3.68×10^9 , 3.03×10^9 , 2.94×10^9 , 2.18×10^9 , 2.38×10^8 และ 3.65×10^7 CFU/g ความสามารถในการผลิตกรดของเมล็ดเชื้อมีประสิทธิภาพสูง เพราะค่ากรด-ด่างของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วตลอดระยะเวลาเก็บรักษา 6 เดือน เนื่องจากปริมาณเชื้อที่เหลือรอดมีสูง ความชื้นของเมล็ดเชื้อซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สูงกว่าเมล็ดเชื้อที่เก็บไว้ที่ อุณหภูมิห้อง ความชื้นสุดท้ายของตัวอย่างที่เก็บรักษา 6 เดือน เท่ากับ 27.28 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากเมล็ดเชื้อซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้องใส่ไว้ในโถดูดความชื้น ปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นจึงต่ำกว่า

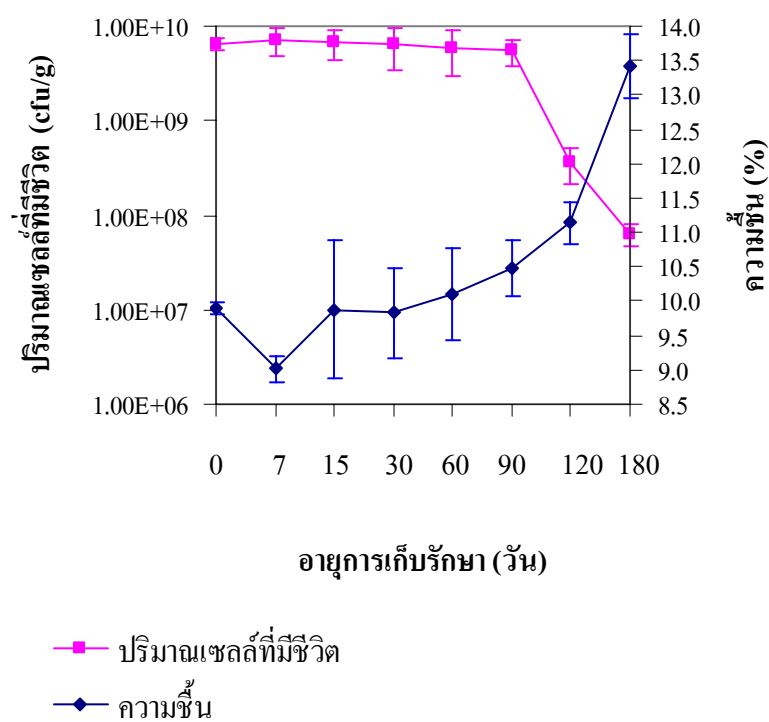
เม็ดยีสผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งทำแห้งนาน 30 และ 45 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบว่า ปริมาณเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว ที่ระยะเวลา 15 วัน ปริมาณเชื้อลดลง 3 log cycle เหลือ 10^6 CFU/g และเมื่อเก็บเม็ดยีสเป็นเวลา 30 และ 60 วัน ปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดเป็น 10^4 CFU/g และ 10^2 CFU/g ตามลำดับ และตรวจไม่พบเชื้อที่เวลา 90, 120 และ 180 วัน แสดงดังภาพที่ 21-22 เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรดช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา 60 วัน ค่ากรด-ด่างของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 แต่เม็ดยีสที่เก็บรักษา 90, 120 และ 180 วัน ค่ากรด-ด่างของอาหารลดลงช้ามาก โดยที่ 48 ชั่วโมง ค่ากรด-ด่างต่ำสุดของเม็ดยีสที่ผ่านการทำแห้งนาน 30 นาที เท่ากับ 5.10, 5.33 และ 5.41 และ เม็ดยีสที่ผ่านการทำแห้งแบบฟลูอิดไรซ์เบด 45 นาที เท่ากับ 5.29, 5.71 และ 6.04 ตามลำดับ ความชื้นของเม็ดยีสเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา โดยที่ระยะเวลา 180 วัน ความชื้นของเม็ดยีสที่ผ่านเครื่องฟลูอิดไรซ์เบด 30 และ 45 นาที เท่ากับ 12.84 และ 12.08 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ในขณะที่เม็ดยีสซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อลดลงเมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน โดยลดลง 2 log cycle เหลือ 10^7 CFU/g ความสามารถในการผลิตกรดตลอด 6 เดือนของการเก็บรักษาก็มีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากค่ากรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็ว ความชื้นของเม็ดยีสซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สูงกว่าเม็ดยีสซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้อง โดยความชื้นสุดท้ายของเม็ดยีสที่ผ่านการทำแห้งนาน 30 และ 45 นาที เป็น 13.41 และ 12.28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยปกติแล้วในตู้เย็นปริมาณความชื้นจะต่ำกว่าที่อุณหภูมิห้อง แต่ในการทดลองครั้งนี้เม็ดยีสซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้องจะได้โอกาสความชื้นเอาไว้ จึงทำให้ปริมาณความชื้นที่เพิ่มขึ้นน้อยกว่าเม็ดยีสซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความสามารถในการผลิตกรดของเม็ดยีสผสมแป้งข้าวเจ้าที่เก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน ณ อุณหภูมิต่างๆแสดงดังภาพที่ 23-29

A)



B)

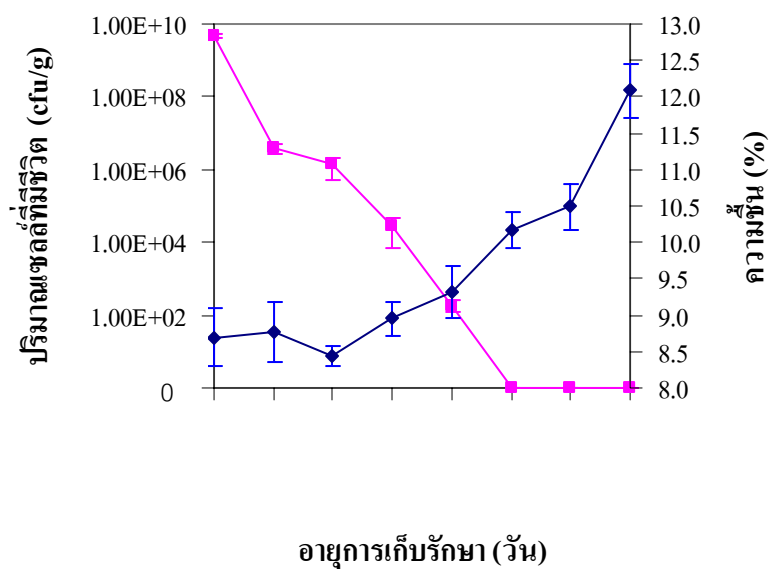


ภาพที่ 21 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเมล็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้า ที่ผ่านการทำแห้งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

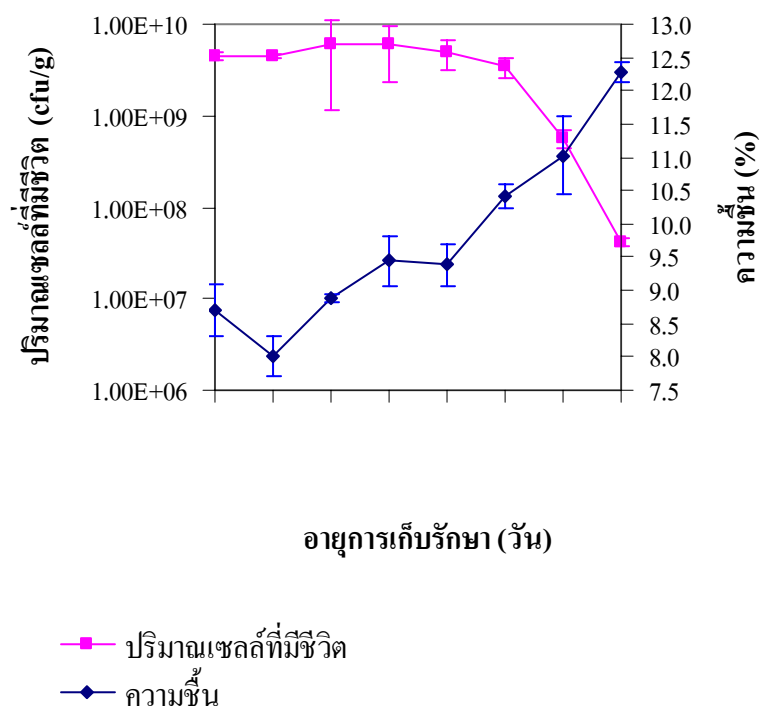
A) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

B) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

A)



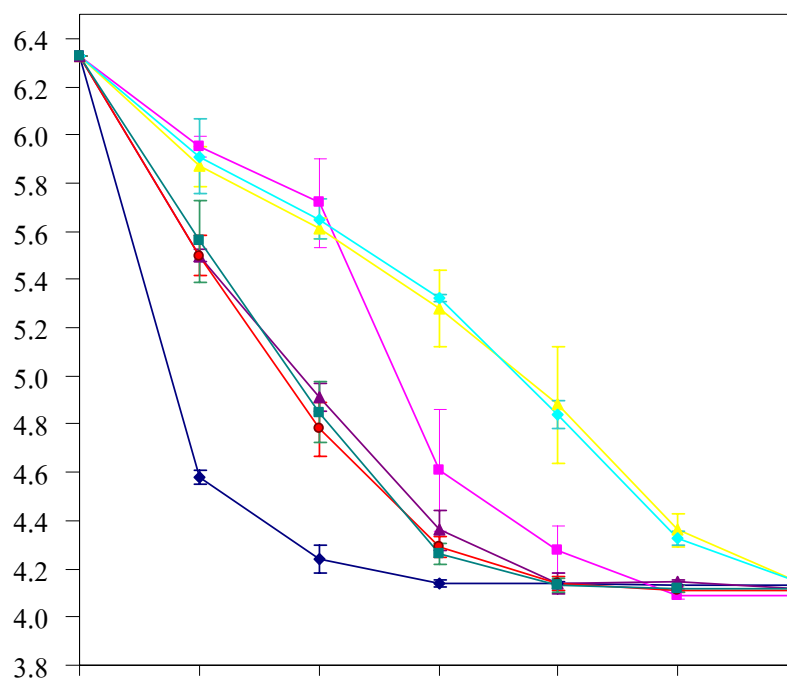
B)



ภาพที่ 22 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเมล็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้า ที่ผ่านการทำแห้งเป็นเวลา 45 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

A) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

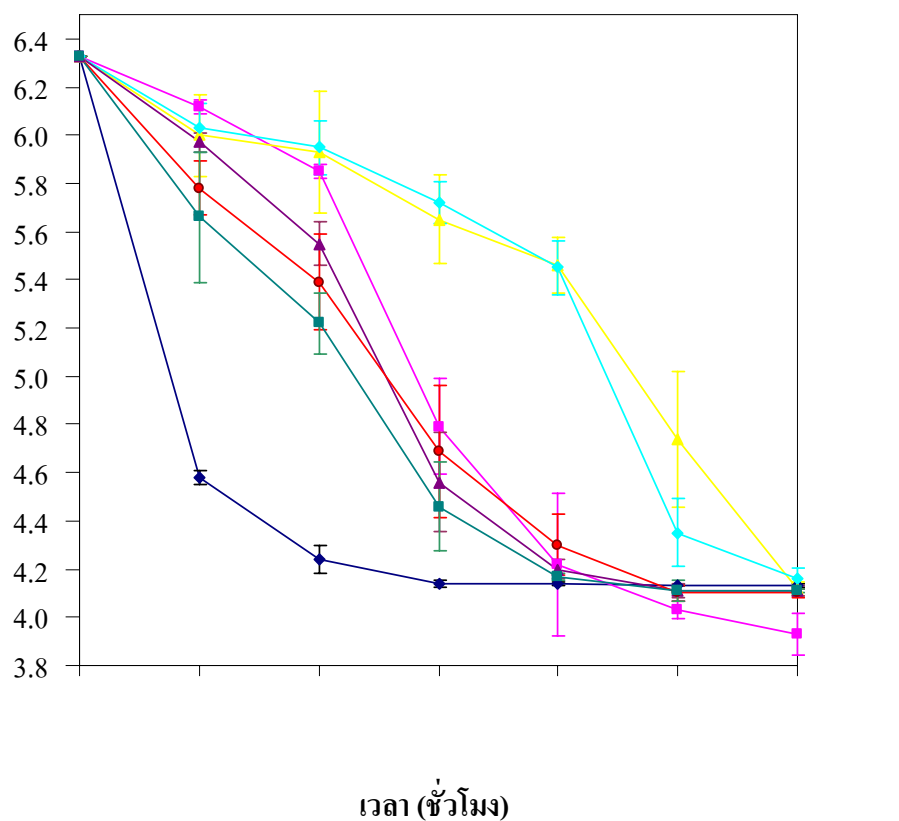
B) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



เวลา (สัปดาห์)

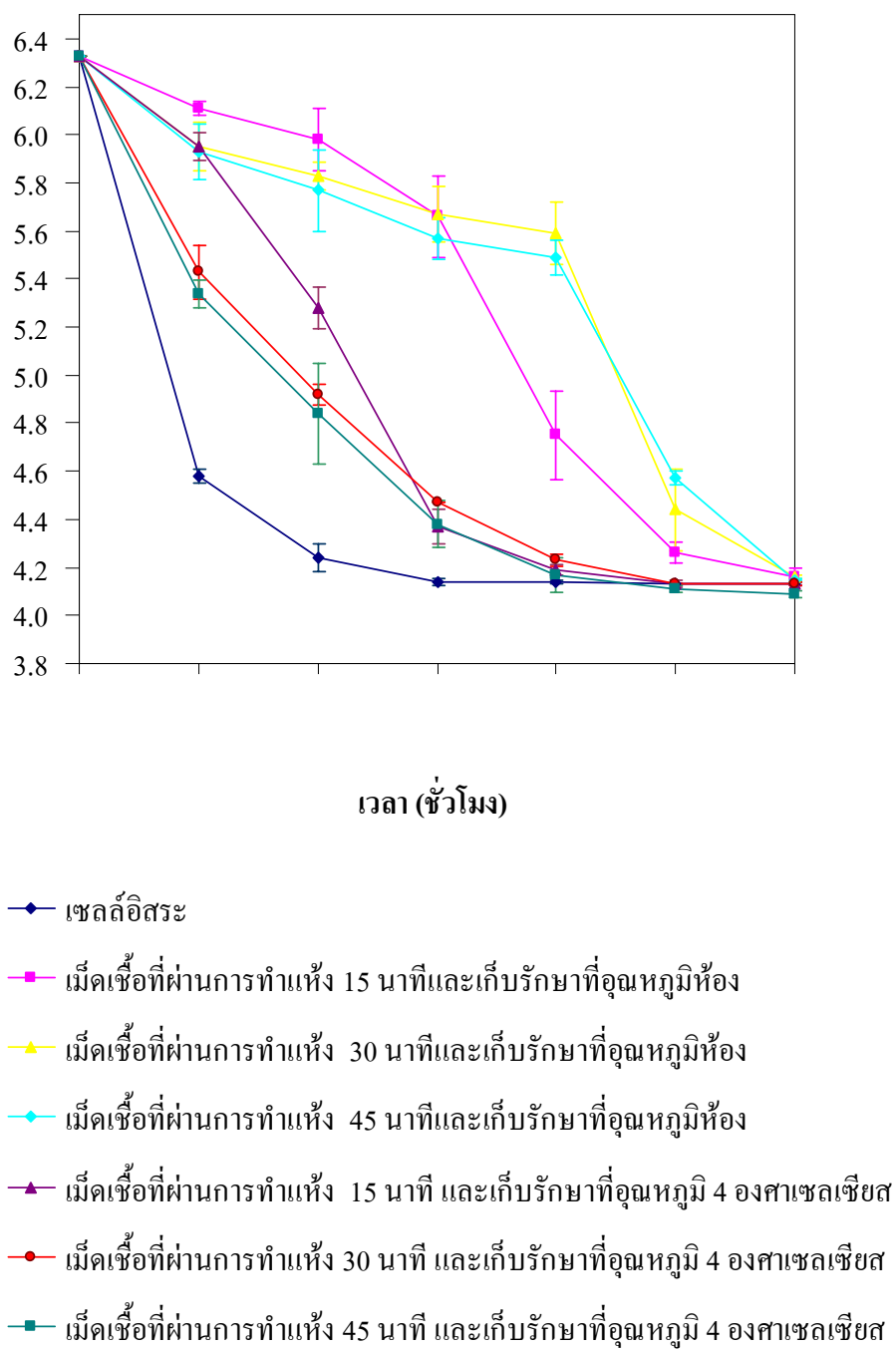
- ◆ เซลล์อิสระ
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ◆ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 23 การผลิตรายของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน

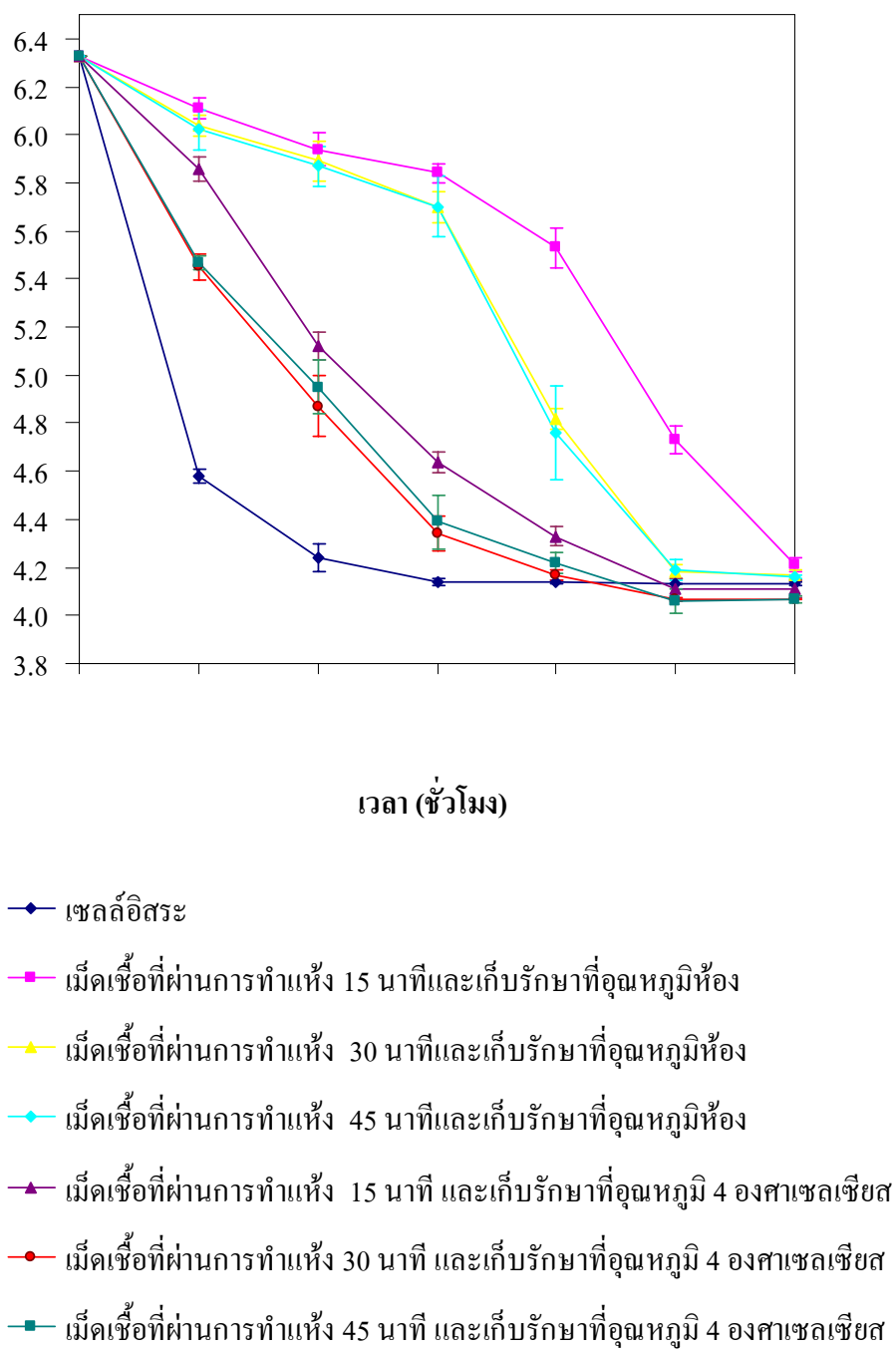


- ◆— เซลล์อิสระ
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲— เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ◆— เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲— เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

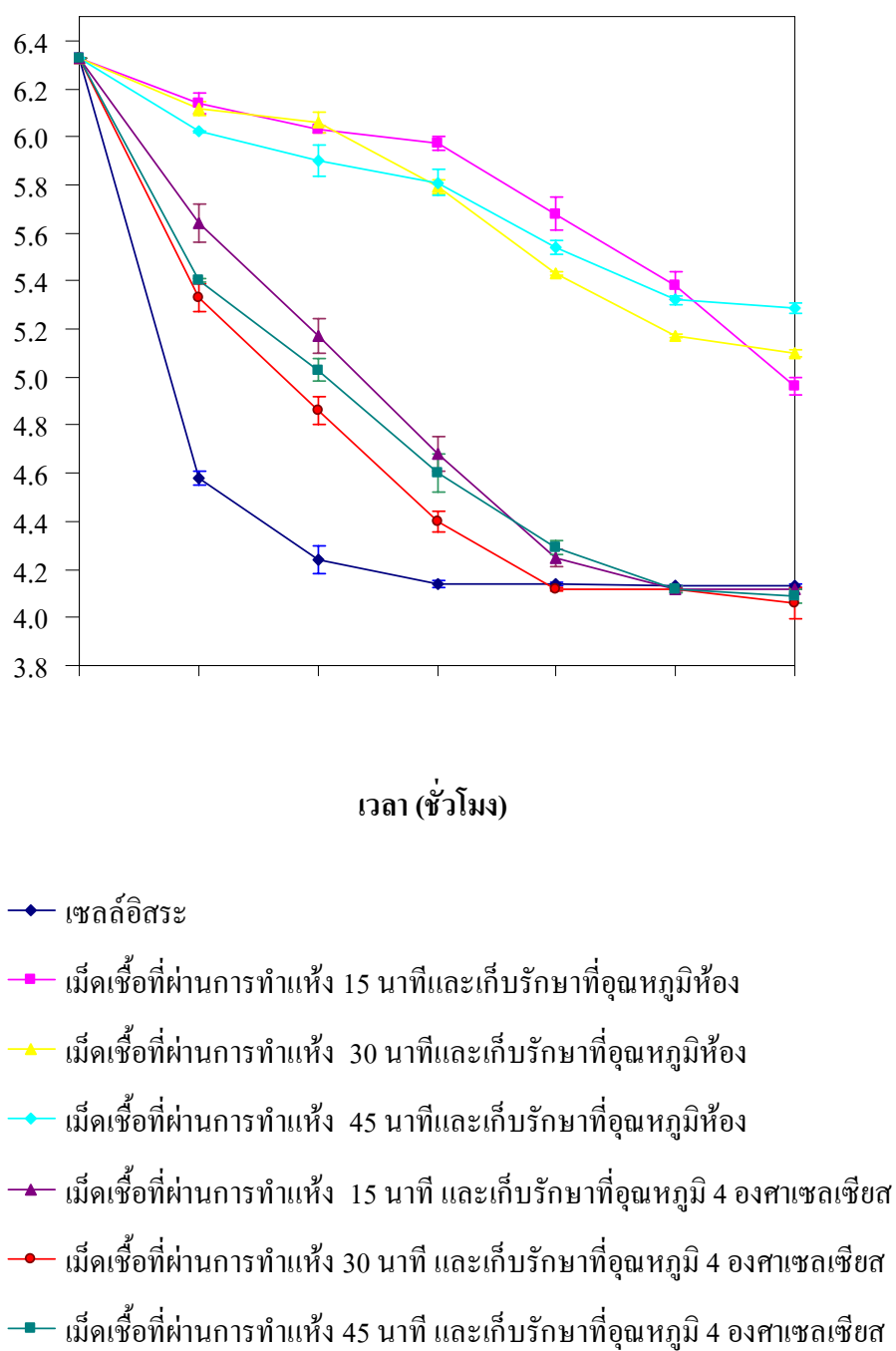
ภาพที่ 24 การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน



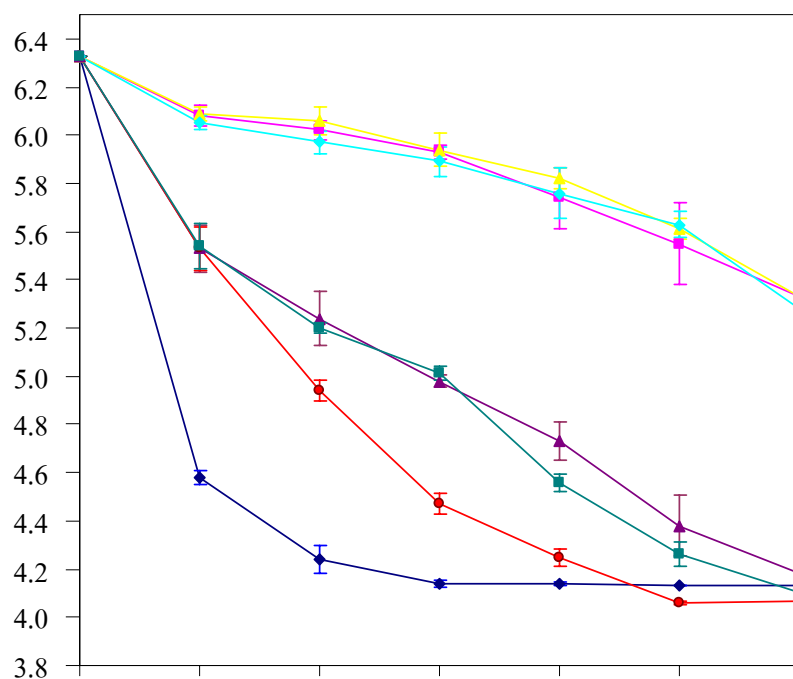
ภาพที่ 25 การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน



ภาพที่ 26 การผลิตกรดของเมล็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน



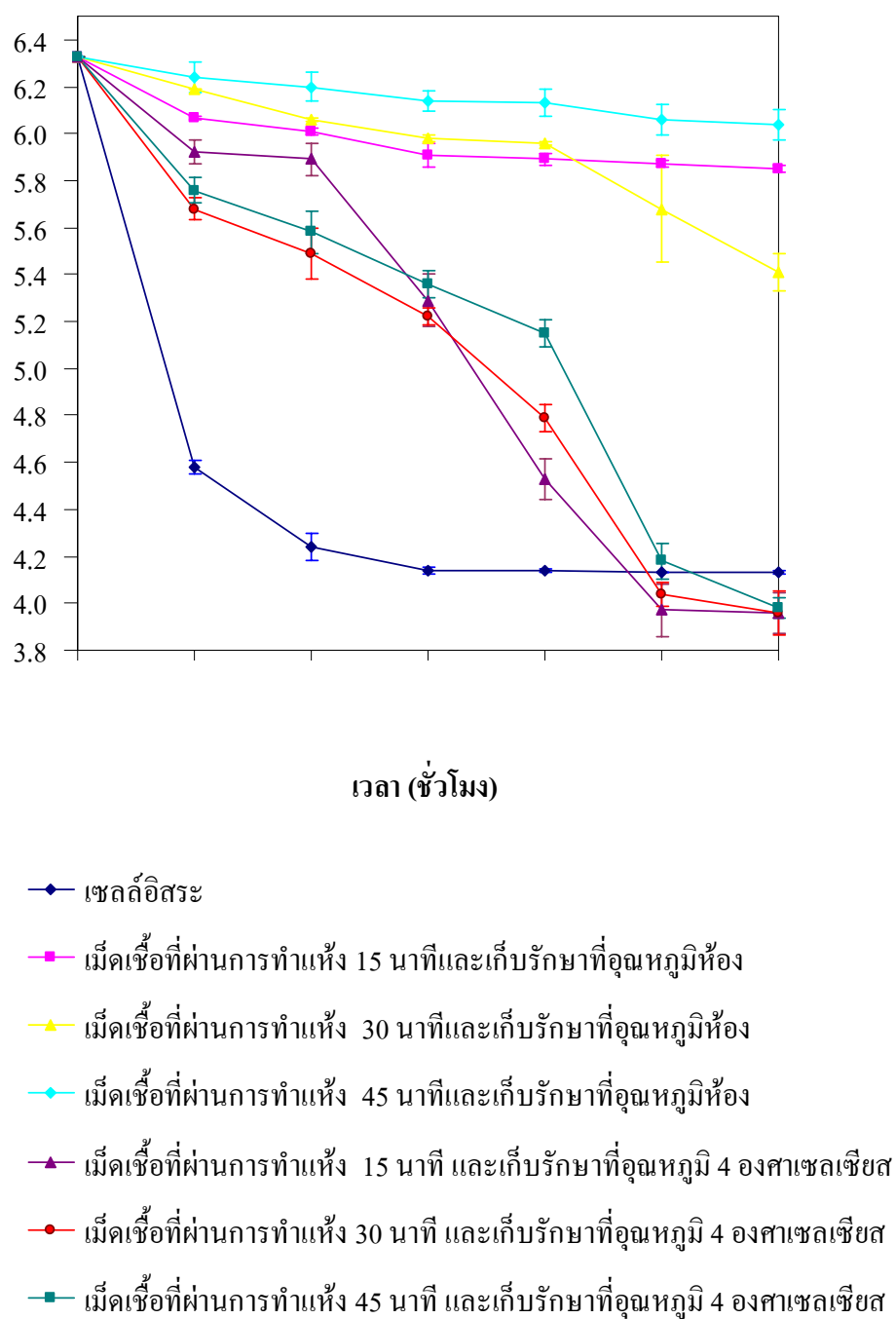
ภาพที่ 27 การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน



เวลา (ชั่วโมง)

- ◆— เซลล์อิสระ
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲— เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ◆— เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲— เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 28 การผลิทดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 120 วัน

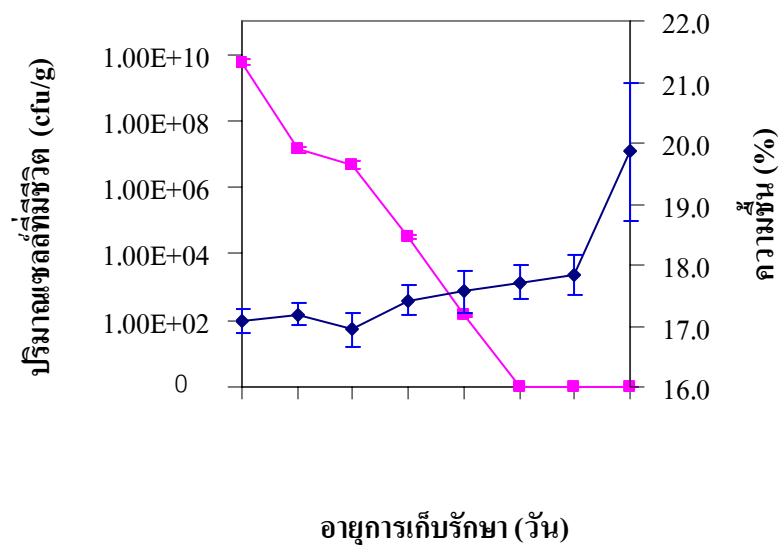


ภาพที่ 29 การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้าซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

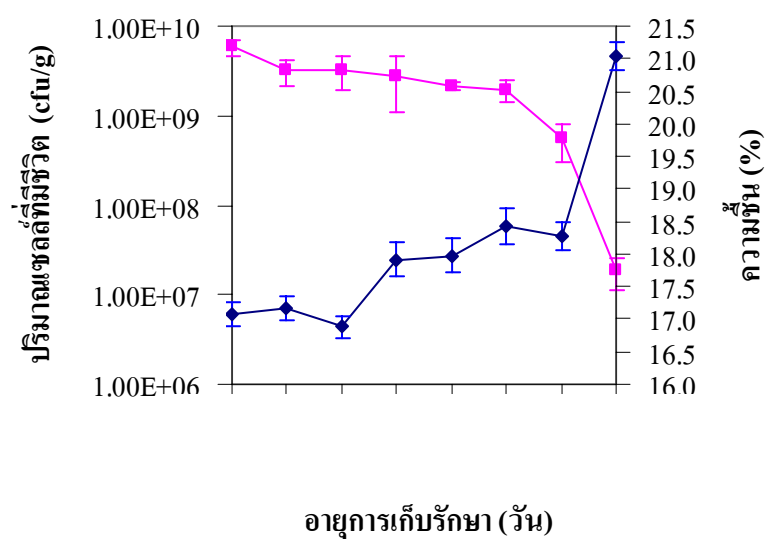
สำหรับเม็ดยีสผสมแป้งมันสำปะหลังและทำเห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้อง พบว่าปริมาณเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน ปริมาณเชื้อลดลง 2 log cycle เหลือเชื้อ 10^7 CFU/g และค่อยๆลดลงเหลือ 10^6 , 10^4 และ 10^2 CFU/g เมื่อเวลาผ่านไป 15, 30 และ 60 วัน ตามลำดับ ที่เวลา 60 วัน ซึ่งตรวจพบเชื้อเป็นวันสุดท้าย ปริมาณเชื้อที่ผ่านการทำเห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที เหลือรอดเท่ากับ 1.40×10^2 , 4.70×10^2 และ 3.90×10^2 CFU/g ตามลำดับ ส่วนในวันที่ 90, 120 และ 180 ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 30-32 ความสามารถในการผลิตกรดของเม็ดยีสที่เก็บไว้ 60 วันแรก ยังคงมีประสิทธิภาพสูง เนื่องจากค่ากรด-ด่างของอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว แต่ในช่วง 90, 120 และ 180 วัน ของการเก็บรักษา ค่ากรด-ด่างของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ค่าต่ำสุดของเม็ดยีสซึ่งทำเห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที และเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน เท่ากับ 6.07, 4.96 และ 4.93 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 33-39 ความชื้นของเม็ดยีสจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา ความชื้นของเม็ดยีสผสมแป้งมันสำปะหลังที่ทำเห้ง 15, 30 และ 45 นาที และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 180 วัน เท่ากับ 19.86, 11.24 และ 10.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ขณะที่เม็ดยีสซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ปริมาณเชื้อลดลงเล็กน้อย ในช่วง 90 วัน ปริมาณเชื้อยังคงอยู่ที่ 10^9 CFU/g ทุกกลุ่มการทดลอง แต่เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน ปริมาณเชื้อของทุกกลุ่มการทดลองมีจำนวนลดลง 2 log cycle โดยเม็ดยีสที่ทำเห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที มีปริมาณเชื้อซึ่งตรวจพบที่ 180 วัน เป็น 1.27×10^7 , 3.50×10^7 และ 1.85×10^7 CFU/g ตามลำดับ ความสามารถในการผลิตกรดของเม็ดยีสที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพสูง ค่ากรด-ด่างของอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว และคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 28 ค่ากรด-ด่างสุดท้ายของเม็ดยีสที่ผ่านการทำเห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที และเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน เท่ากับ 4.18, 4.01 และ 3.97 ตามลำดับ ความชื้นของเม็ดยีสซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สูงกว่าเม็ดยีสซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากเม็ดยีสซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้องจะใส่โถดูดความชื้นไว้ ความชื้นสุดท้ายของเม็ดยีสที่ผ่านการทำเห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที และเก็บเป็นเวลา 180 วัน คือ 21.04, 13.01 และ 11.63 ตามลำดับ

A)



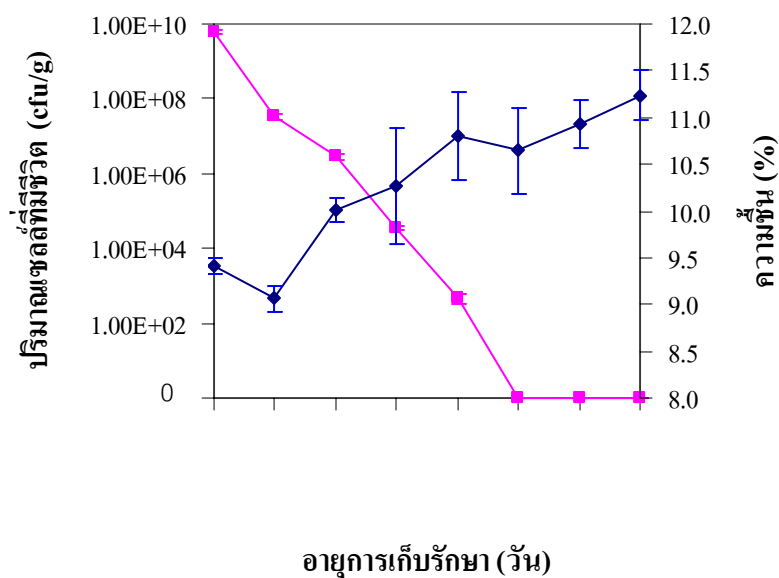
B)



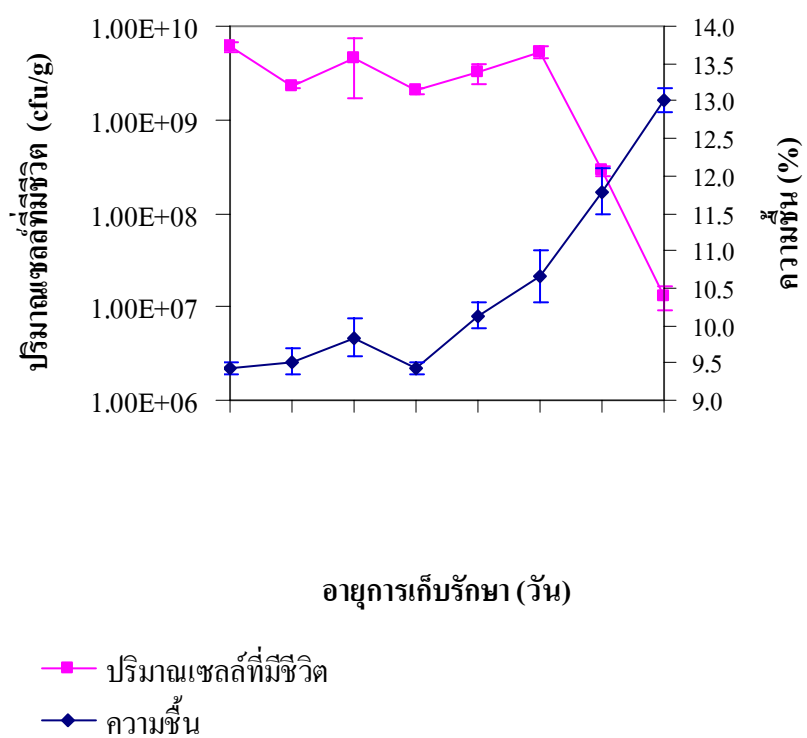
—■— ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต
—◆— ความชื้น

ภาพที่ 30 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเมล็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลัง ที่ผ่านการทำแห้งเป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน
A) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง B) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

A)



B)

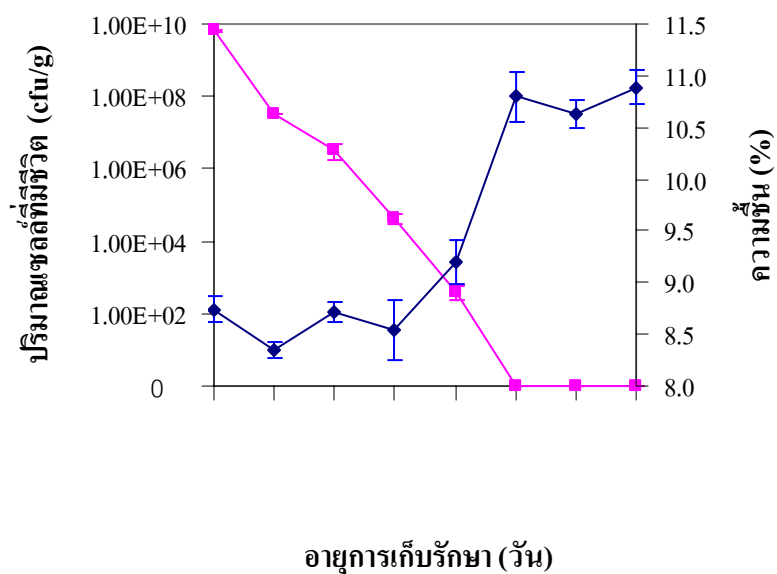


ภาพที่ 31 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลัง ที่ผ่านการทำแห้งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

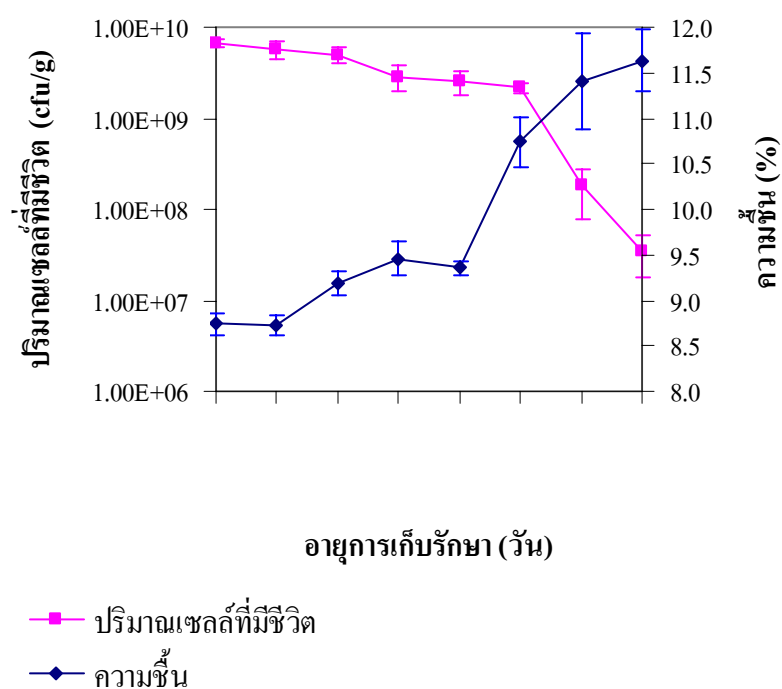
A) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

B) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

A)

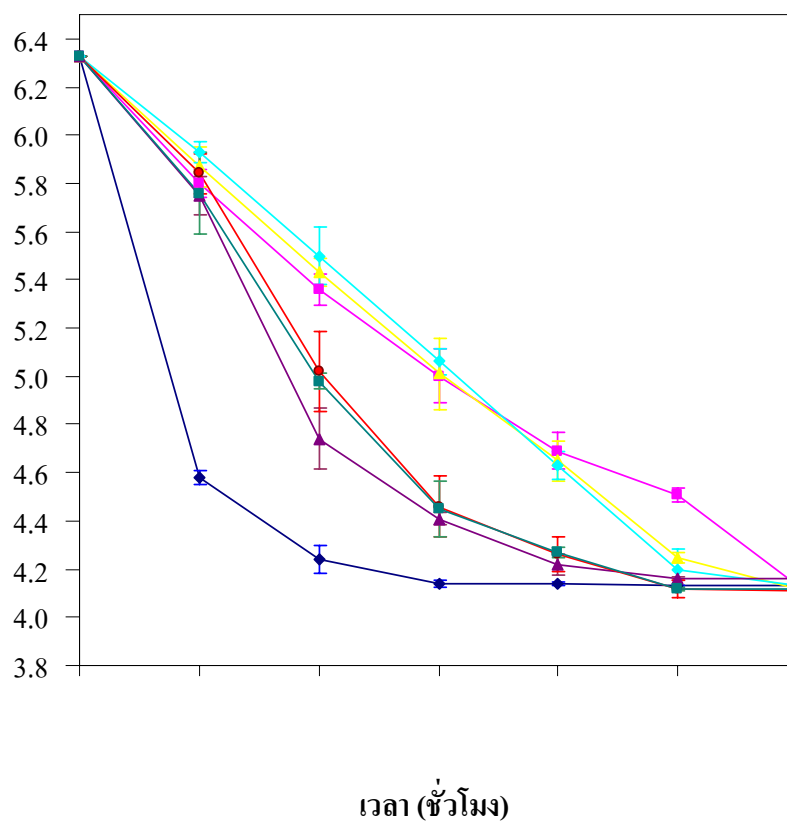


B)



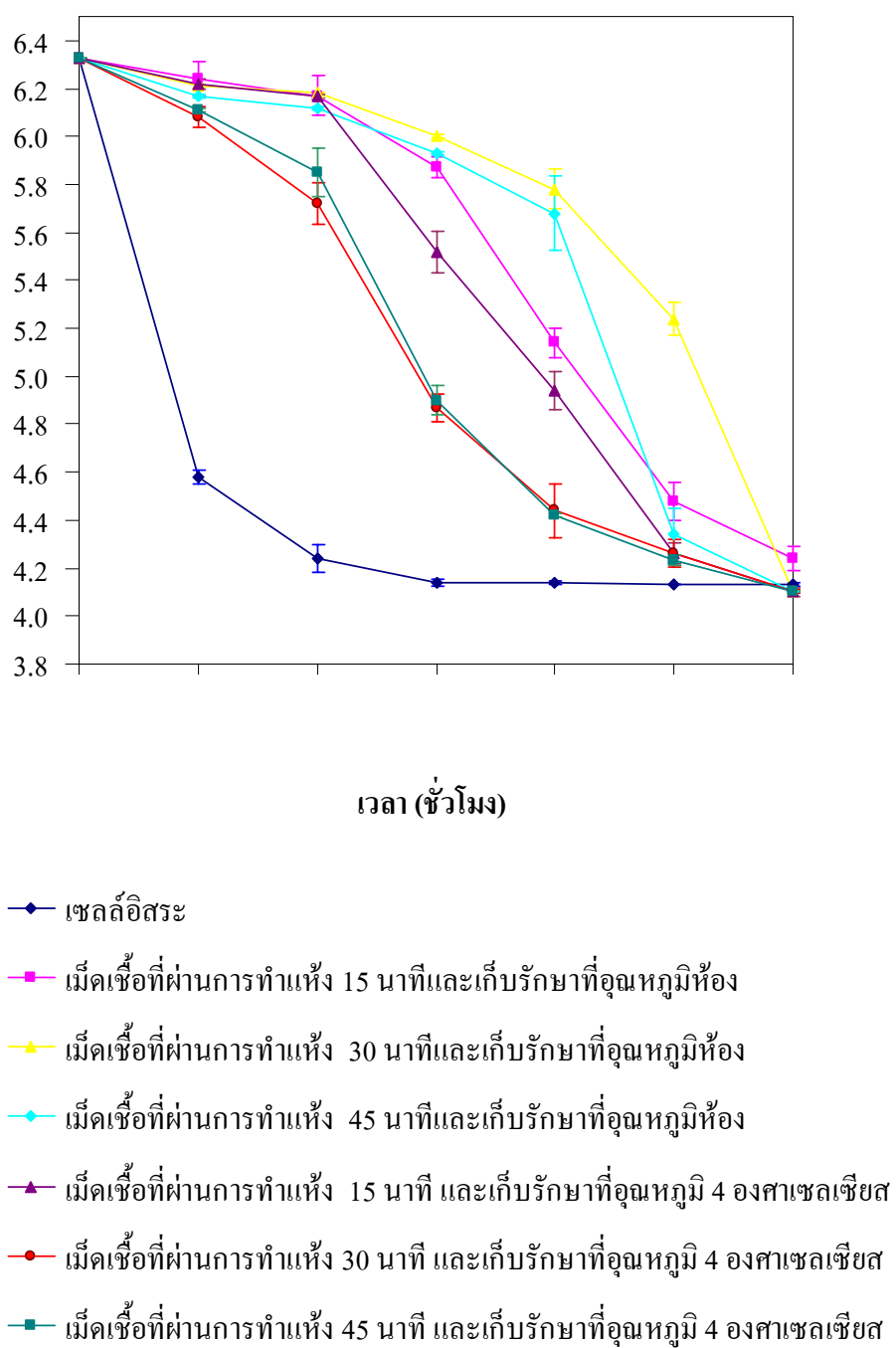
ภาพที่ 32 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดยีสหมักแป้งมันสำปะหลัง ที่ผ่านการทำแห้งเป็นเวลา 45 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

A) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง B) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

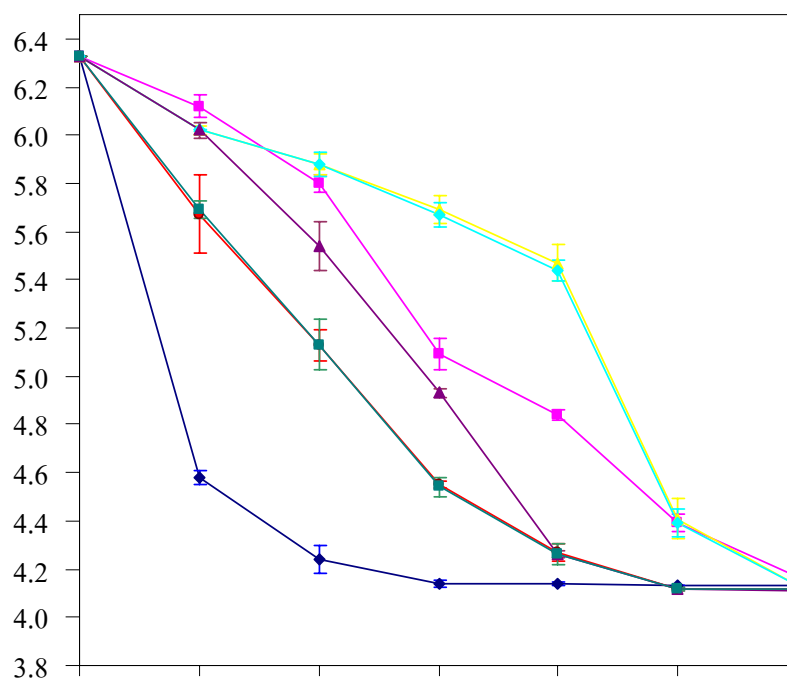


- เซลล์อิสระ
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲— เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ◆— เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲— เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 33 การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน



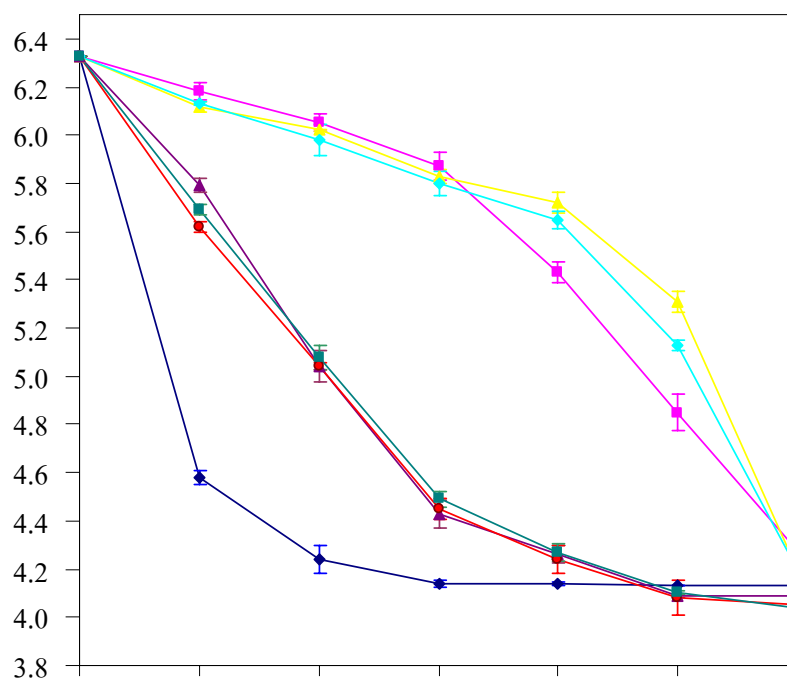
ภาพที่ 34 การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน



เวลา (ชั่วโมง)

- ◆ เซลล์อิสระ
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ◆ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

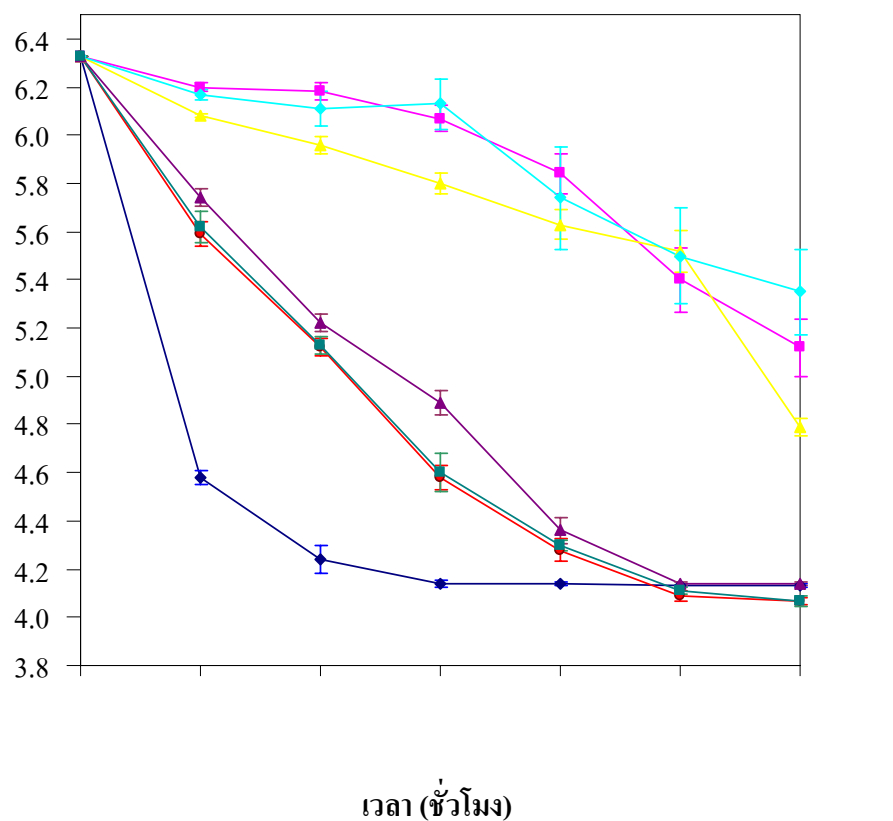
ภาพที่ 35 การผลิตรคของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน



เวลา (สัปดาห์)

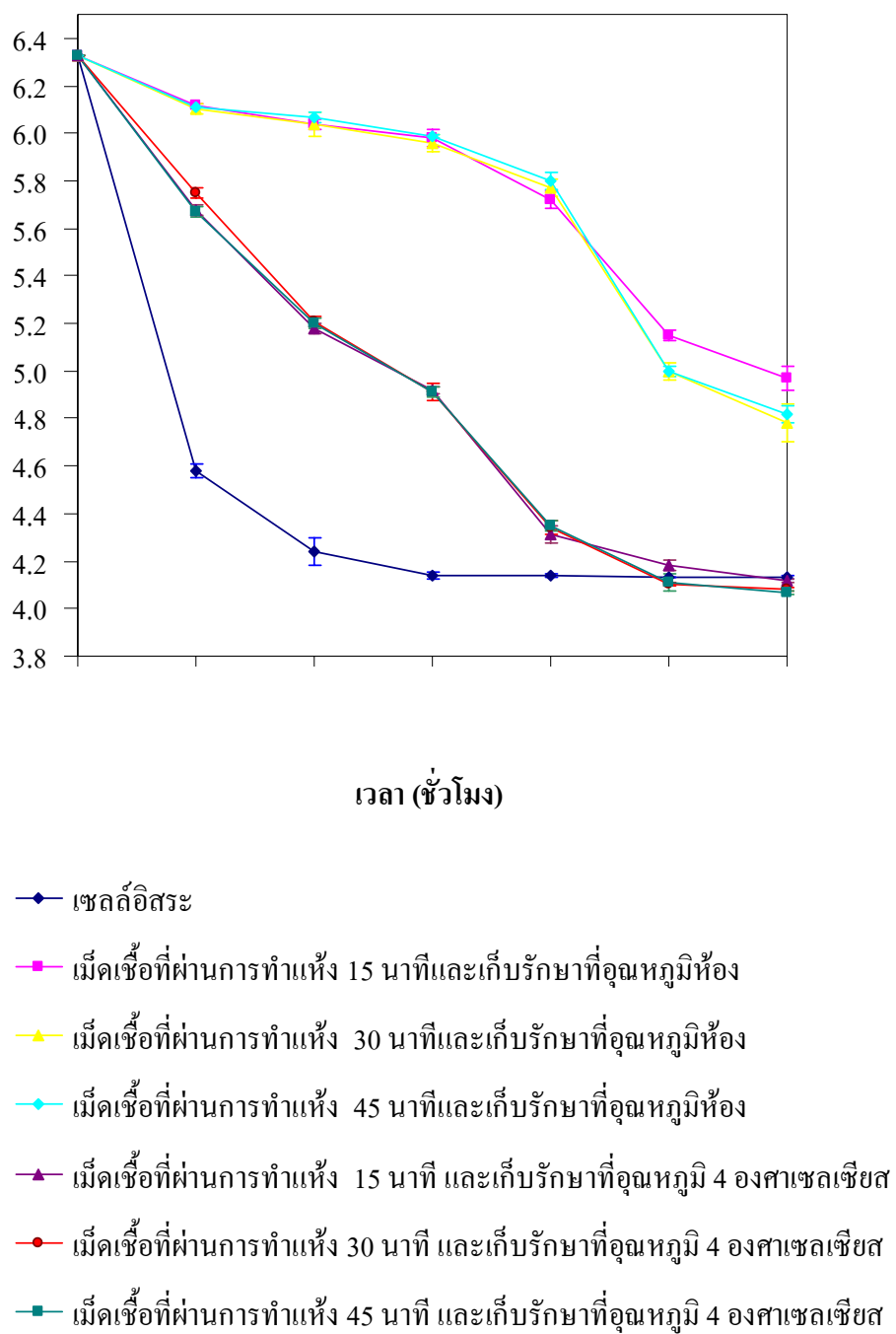
- ◆ เซลล์อิสระ
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ◆ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 36 การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน

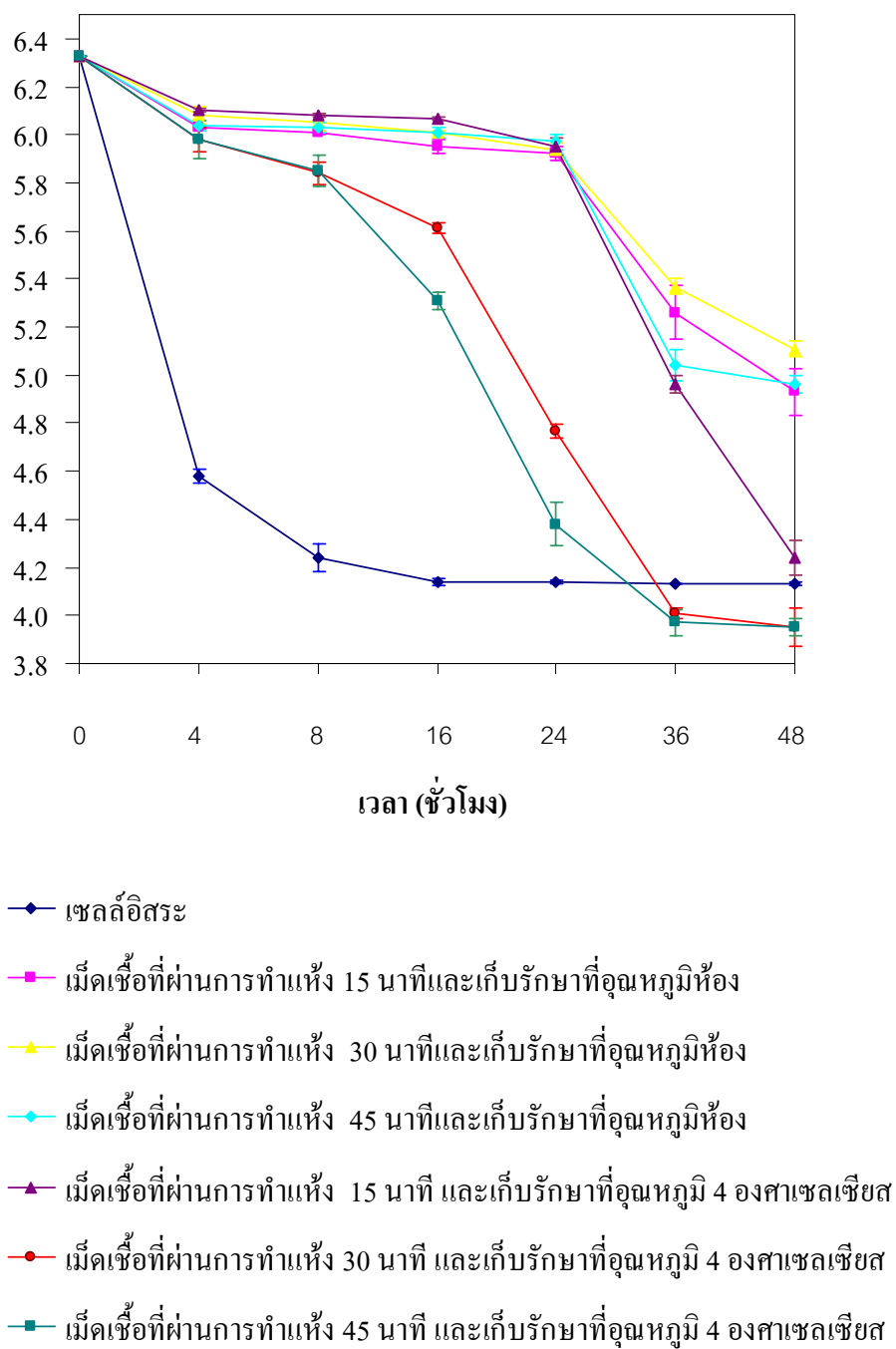


- ◆ เซลล์อิสระ
- ◆ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ◆ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ◆ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ◆ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ◆ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- ◆ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 37 การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน



ภาพที่ 38 การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 120 วัน



ภาพที่ 39 การผลิตกรดของเม็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในเม็ดยีสต์ผสมแป้งข้าวโพดที่ผ่านการทำแห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที เมื่อเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง จะลดลงอย่างรวดเร็วตามระยะเวลาการเก็บรักษา ในช่วง 7 วันแรกของการเก็บรักษา ปริมาณเชื้อลดลง 3 log cycle เหลือ 3.14×10^6 , 4.27×10^6 และ 3.42×10^6 CFU/g ตามลำดับ และเมื่อวันที่ 15 ปริมาณเชื้อลดลงจากเดิมเล็กน้อย แต่ก็ยังอยู่ที่ 10^6 CFU/g จนกระทั่งเมื่อเวลาผ่านไป 30 และ 60 วัน ปริมาณเชื้อจะลดลงเหลือ 10^4 CFU/g และ 10^2 CFU/g ตามลำดับ ปริมาณเชื้อที่สามารถตรวจพบได้ในวันที่ 60 เท่ากับ 1.80×10^2 , 2.50×10^2 และ 3.10×10^2 CFU/g ตามลำดับ ส่วนวันที่ 90, 120 และ 180 ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก อาจเนื่องมาจากเชื้อที่เหลือรอดมีปริมาณน้อยมากจนไม่สามารถตรวจวัดได้

เมื่อศึกษาความสามารถการผลิตกรดแลคติกของเม็ดยีสต์ พบว่าในระยะการเก็บรักษา 60 วัน ประสิทธิภาพในการผลิตกรดยังสูง เนื่องจากค่ากรด-ด่างของอาหารลดลงเร็ว แต่ช่วงวันที่ 90, 120 และ 180 ของการเก็บรักษา ค่ากรด-ด่างของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงน้อยลง ค่ากรด-ด่างจะลดลงอย่างช้าๆ ค่ากรด-ด่างที่เวลาในการเก็บรักษา 120 วัน ของเม็ดยีสต์ที่ทำแห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที เท่ากับ 6.00, 5.99 และ 5.95 ตามลำดับ ความชื้นสุดท้ายของเม็ดยีสต์ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 180 วัน เท่ากับ 23.59, 12.99 และ 10.64 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความชื้นของเม็ดยีสต์ที่ผ่านการทำแห้งนาน 45 นาที มีค่าน้อยที่สุด รองลงมาคือเม็ดยีสต์ที่ทำแห้งนาน 30 และ 15 นาที ตามลำดับ ทั้งนี้เพราะความชื้นตอนเริ่มต้นของเม็ดยีสต์ที่ทำแห้งนาน 45 นาที มีค่าน้อยที่สุด เนื่องจากใช้เวลาในการเป่าลมร้อนไล่ความชื้นจากเม็ดยีสต์นานที่สุด

ส่วนเม็ดยีสต์ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับเม็ดยีสต์ที่ผสมแป้งข้าวเจ้าและแป้งมันสำปะหลัง คือ ปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในเม็ดยีสต์ช่วง 90 วันแรก ลดลงเล็กน้อย โดยมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^9 CFU/g แต่ปริมาณเชื้อจะลดลง 1 log cycle เมื่อเก็บรักษาเม็ดยีสต์เป็นเวลา 120 วัน และลดลงอีก 1 log cycle เหลือ 10^7 CFU/g เมื่อเวลาผ่านไป 180 วัน ปริมาณเชื้อที่พบหลังผ่านการทำแห้งนาน 15, 30 และ 45 นาที ในวันสุดท้ายของการทดลอง เท่ากับ 3.11×10^7 , 2.35×10^7 และ 5.48×10^7 CFU/g ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 40-42

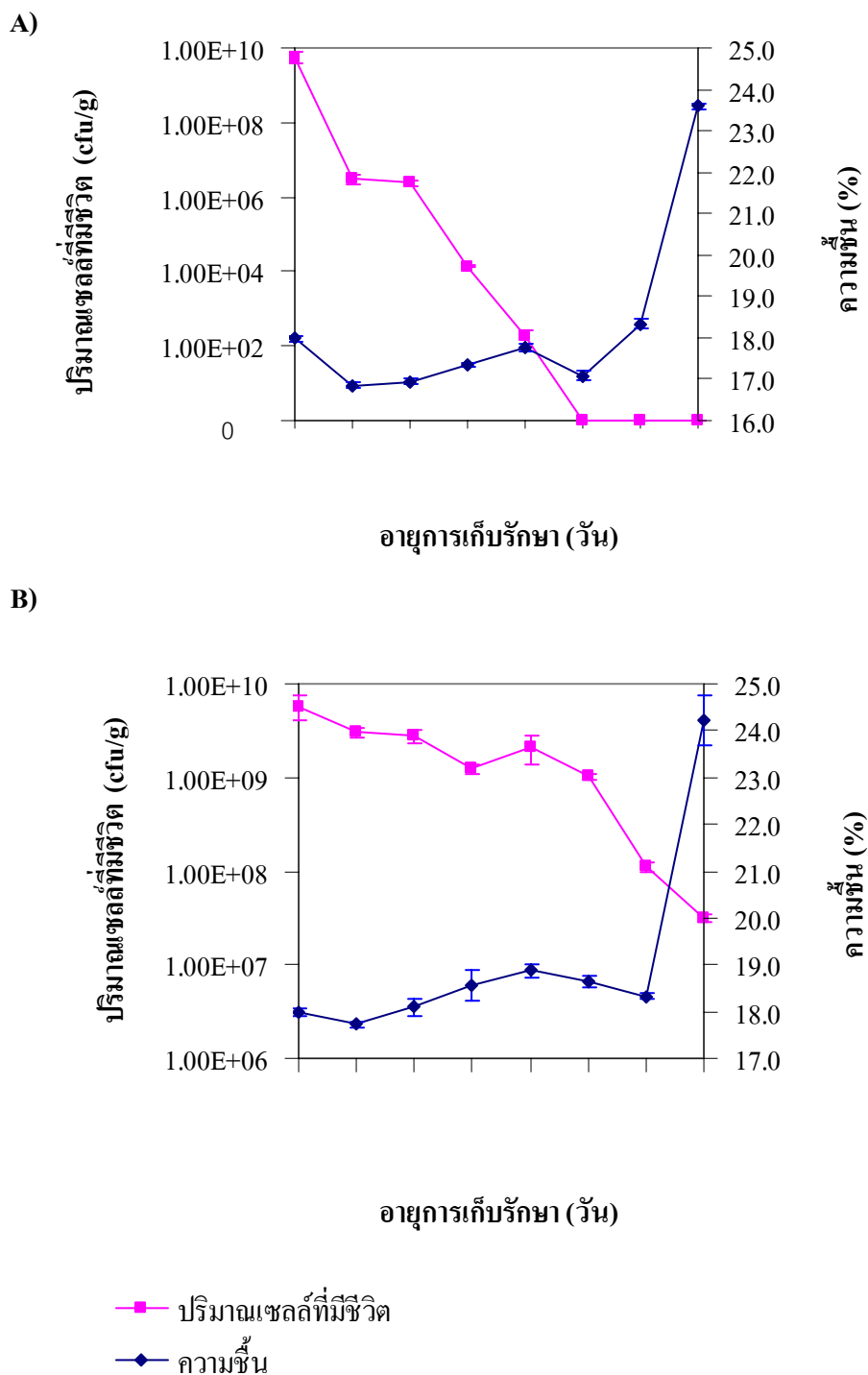
เนื่องจากปริมาณเซลล์ที่เหลือรอดมีมากจึงทำให้ความสามารถในการผลิตกรดของเม็ดยีสต์มีประสิทธิภาพสูงตามไปด้วย เนื่องจากตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาค่ากรด-ด่างของอาหารที่

ทดสอบเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ซึ่งเป็นชั่วโมงที่เก็บตัวอย่างเป็นครั้งแรก ค่ากรด-ด่างของอาหารเริ่มคงที่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 28 ค่ากรด-ด่างสุดท้ายของเม็ดยูที่ทำการหั่นนาน 15, 30 และ 45 นาที ซึ่งเก็บเป็นเวลา 180 วัน เท่ากับ 4.00, 3.99 และ 3.98 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 43-49 ความชื้นของเม็ดยูเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเก็บรักษา โดยวันสุดท้ายของการเก็บเม็ดยู ค่าความชื้นที่วัดได้เท่ากับ 24.22, 13.52 และ 11.22 สำหรับเม็ดยูที่ทำการหั่นนาน 15, 30 และ 45 นาที ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบการยืดอายุการเก็บรักษาเม็ดยูที่ผ่านเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไรเซชัน และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส กับอุณหภูมิห้อง พบว่าอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเม็ดยูมากกว่าที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากเมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 180 วัน จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของเม็ดยูซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณสูงกว่าเม็ดยูซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้องอย่างชัดเจน ปริมาณเซลล์ที่พบในวันสุดท้ายของการทดลองอยู่ที่ 10^7 CFU/ g ในขณะที่เม็ดยูที่เก็บที่อุณหภูมิห้องจะตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกตั้งแต่วันที่ 90 สาเหตุที่ปริมาณเซลล์ของเม็ดยูที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลดลงเพียงเล็กน้อย เนื่องจากความเย็นจะช่วยชะลอเมตาบอลิซึมของเซลล์ให้ช้าลง ประกอบกับความชื้นในอาหารต่ำ มีผลทำให้อายุการเก็บรักษาเซลล์นานขึ้น นอกจากนี้กิจกรรมการผลิกรดแลกติกของเม็ดยูซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ก็มีประสิทธิภาพสูงตลอดการทดลอง

ในการทดลองครั้งนี้สังเกตได้ว่าบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ไม่สามารถกันความชื้นได้ เนื่องจากปริมาณความชื้นที่เวลา 180 วัน ของเม็ดยูที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สูงกว่าความชื้นตอนเริ่มต้นมาก

เมื่อเปรียบเทียบแป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง ที่มีผลต่อการยืดอายุการเก็บรักษาของเม็ดยู พบว่าทั้งอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ ความสามารถในการผลิกรดของเม็ดยู และความชื้นจากแป้งทั้ง 3 ชนิด ไม่แตกต่างกัน การเก็บเม็ดยูโดยการผสมแป้งและผ่านเครื่องทำแห้งแบบฟลูอิดไรเซชัน และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจะสามารถยืดอายุการเก็บรักษาเม็ดยูได้เป็นระยะเวลานาน วิธีการนี้จะช่วยให้อาหารกึ่งที่ผสมแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถเก็บรักษาได้นานโดยเชื้อแบคทีเรียยังคงมีชีวิตอยู่ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้เลี้ยงและผู้บริโภค

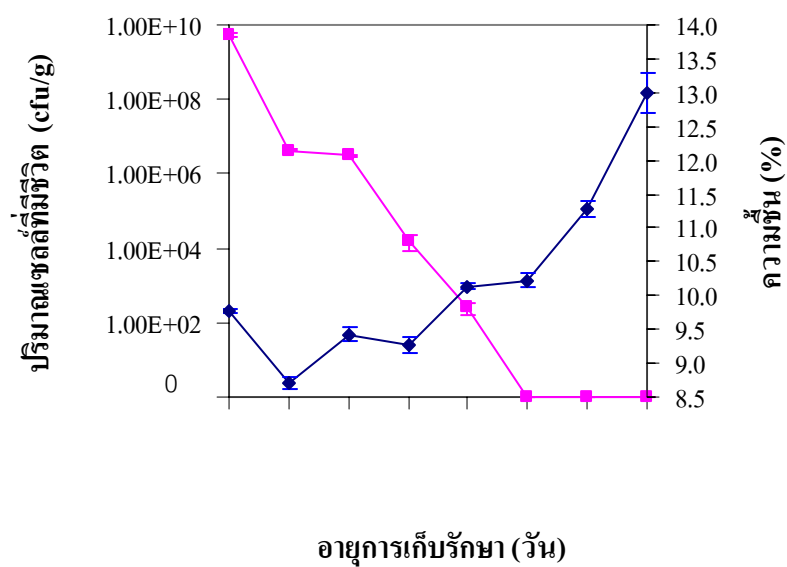


ภาพที่ 40 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด
ที่ผ่านการทำแห้งเป็นเวลา 15 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

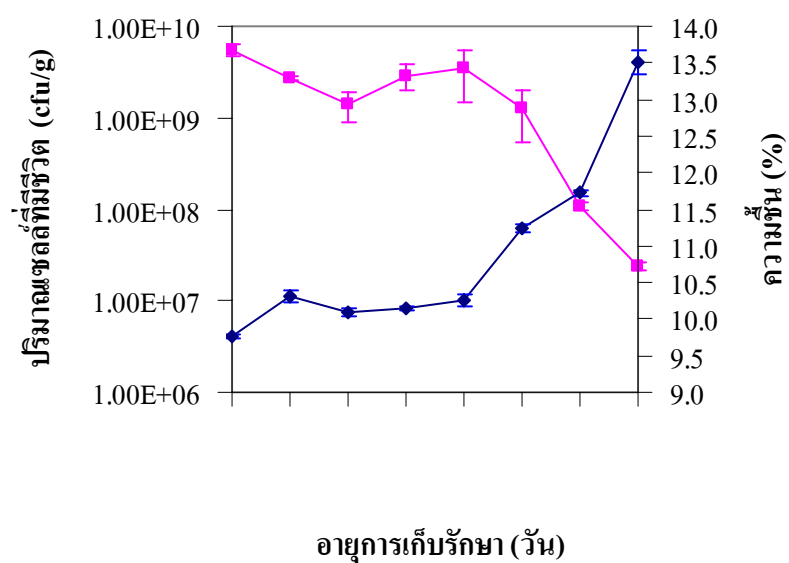
A) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

B) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

A)



B)

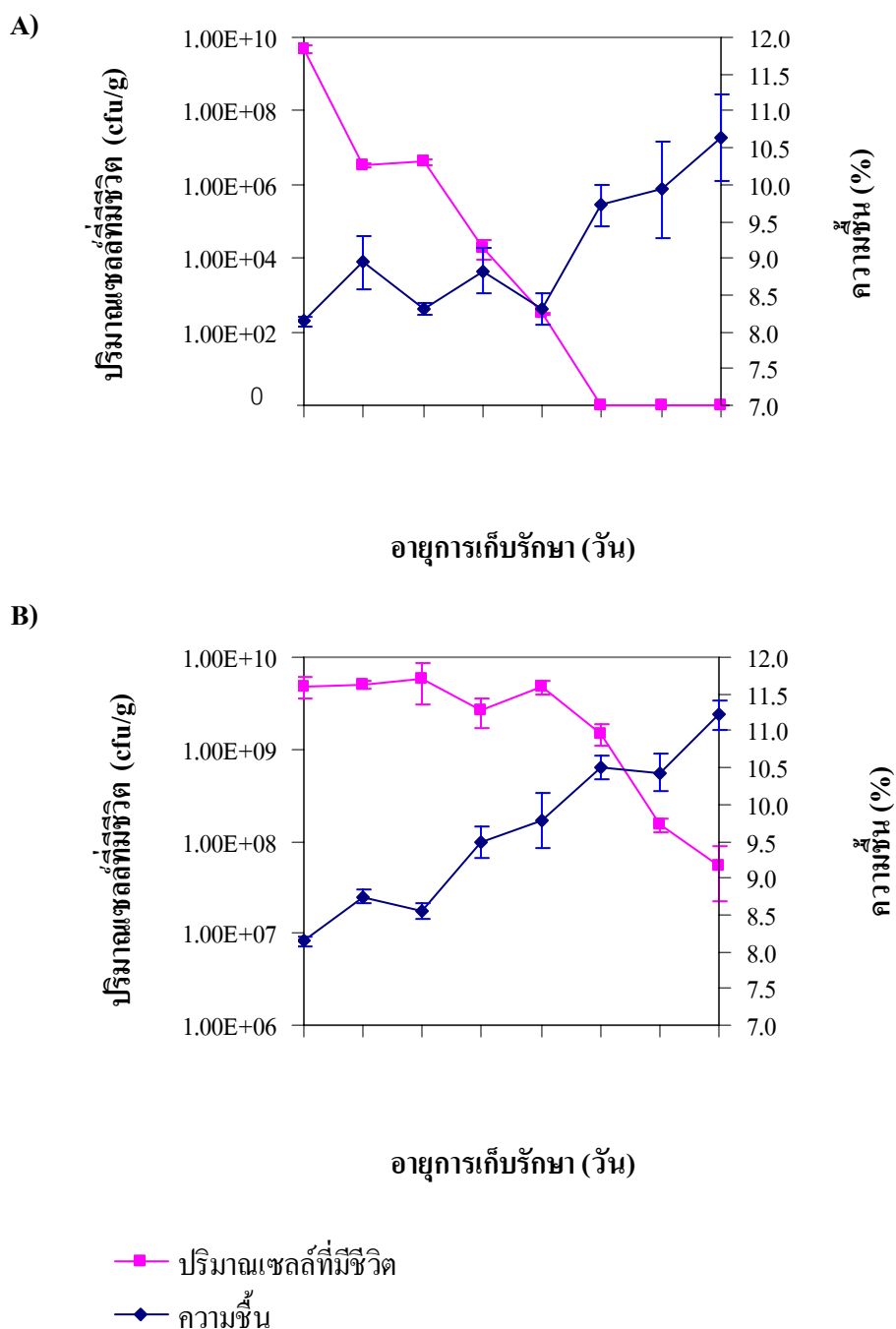


■ ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต
◆ ความชื้น

ภาพที่ 41 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเมล็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ที่ผ่านการทำแห้งเป็นเวลา 30 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

A) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

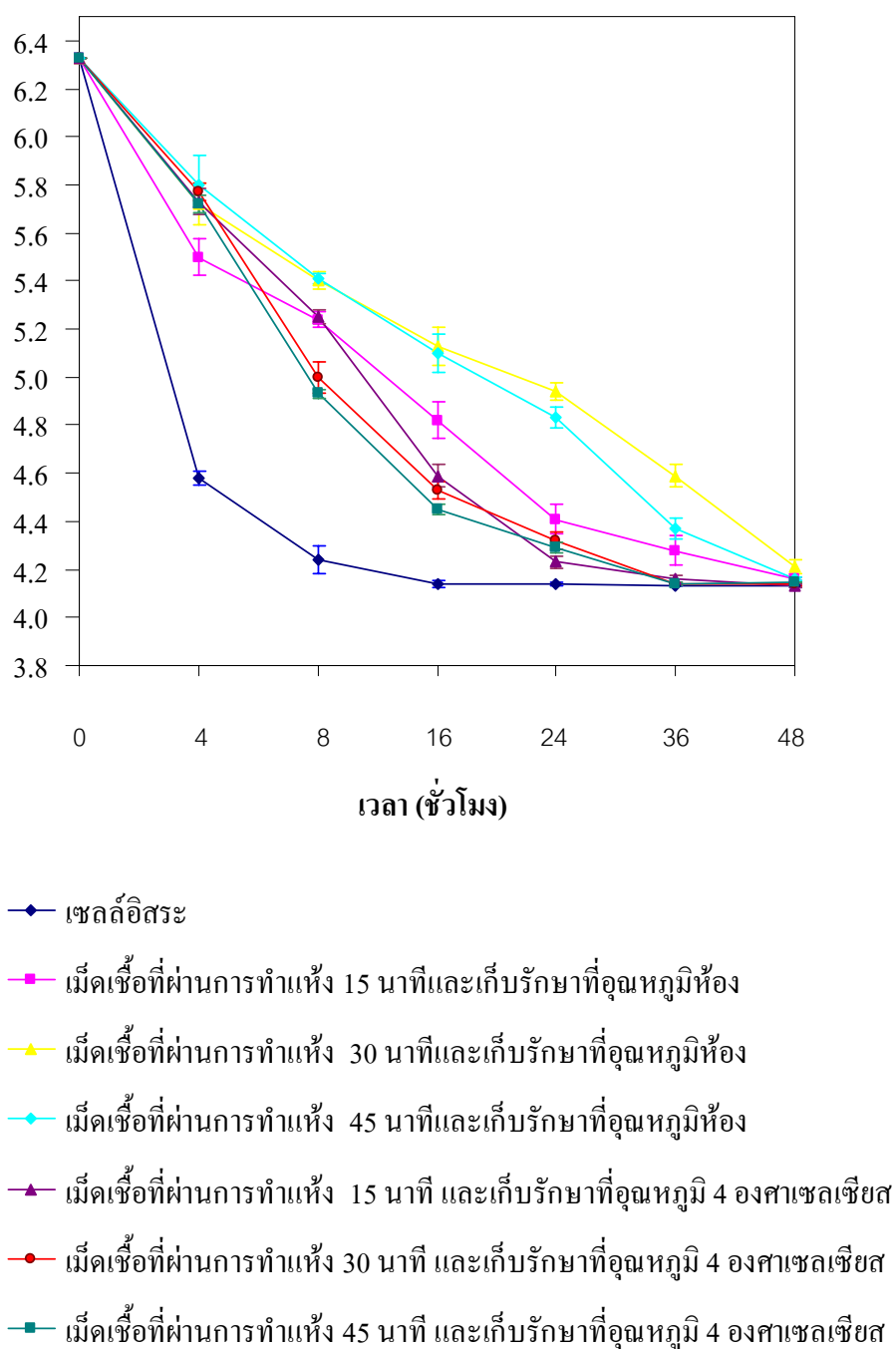
B) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



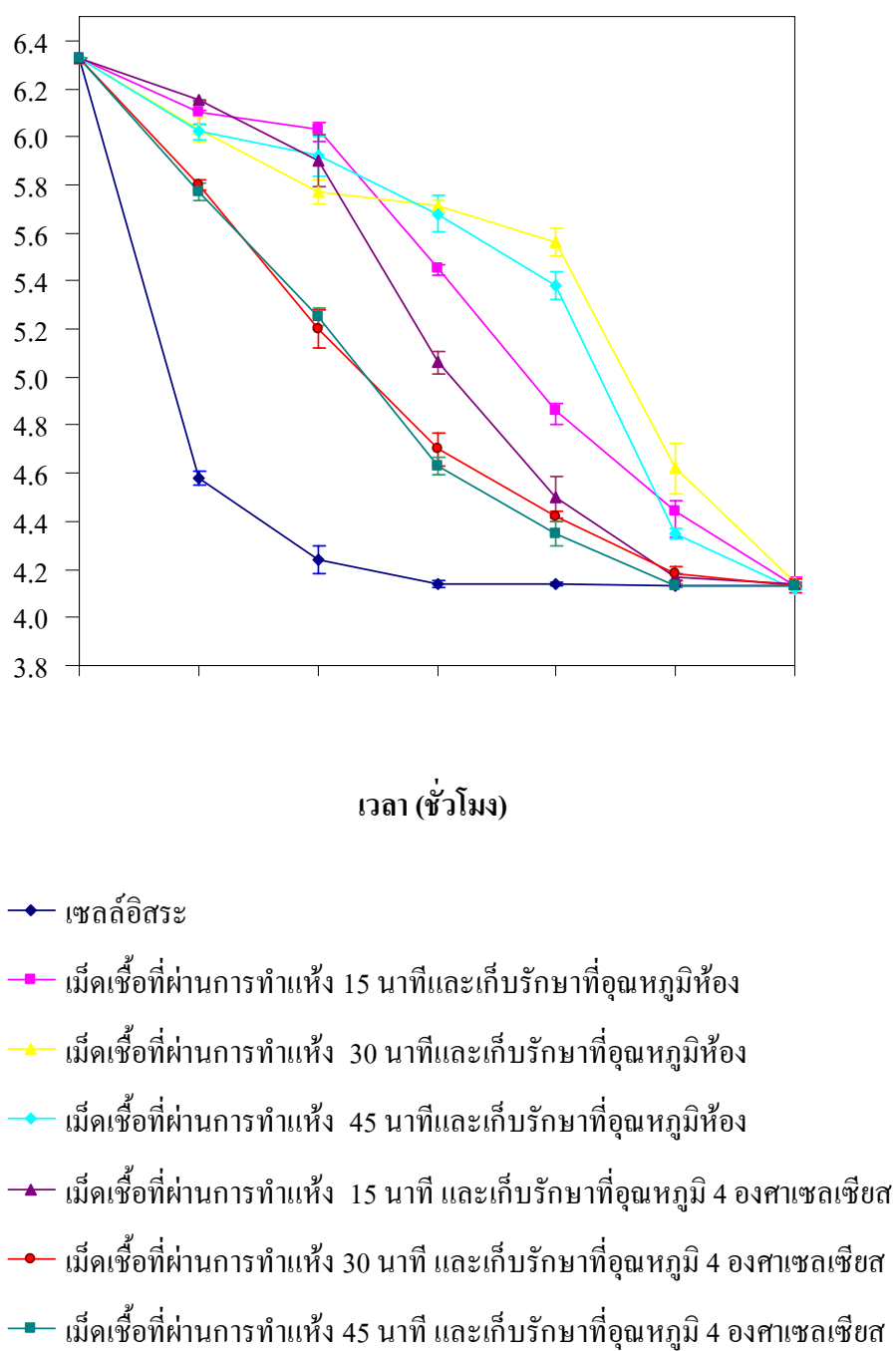
ภาพที่ 42 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและความชื้นของเนื้อเชื่อมแบ่งข้าวโพด ที่ผ่านการทำแห้งเป็นเวลา 45 นาที เมื่อทำการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

A) เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง

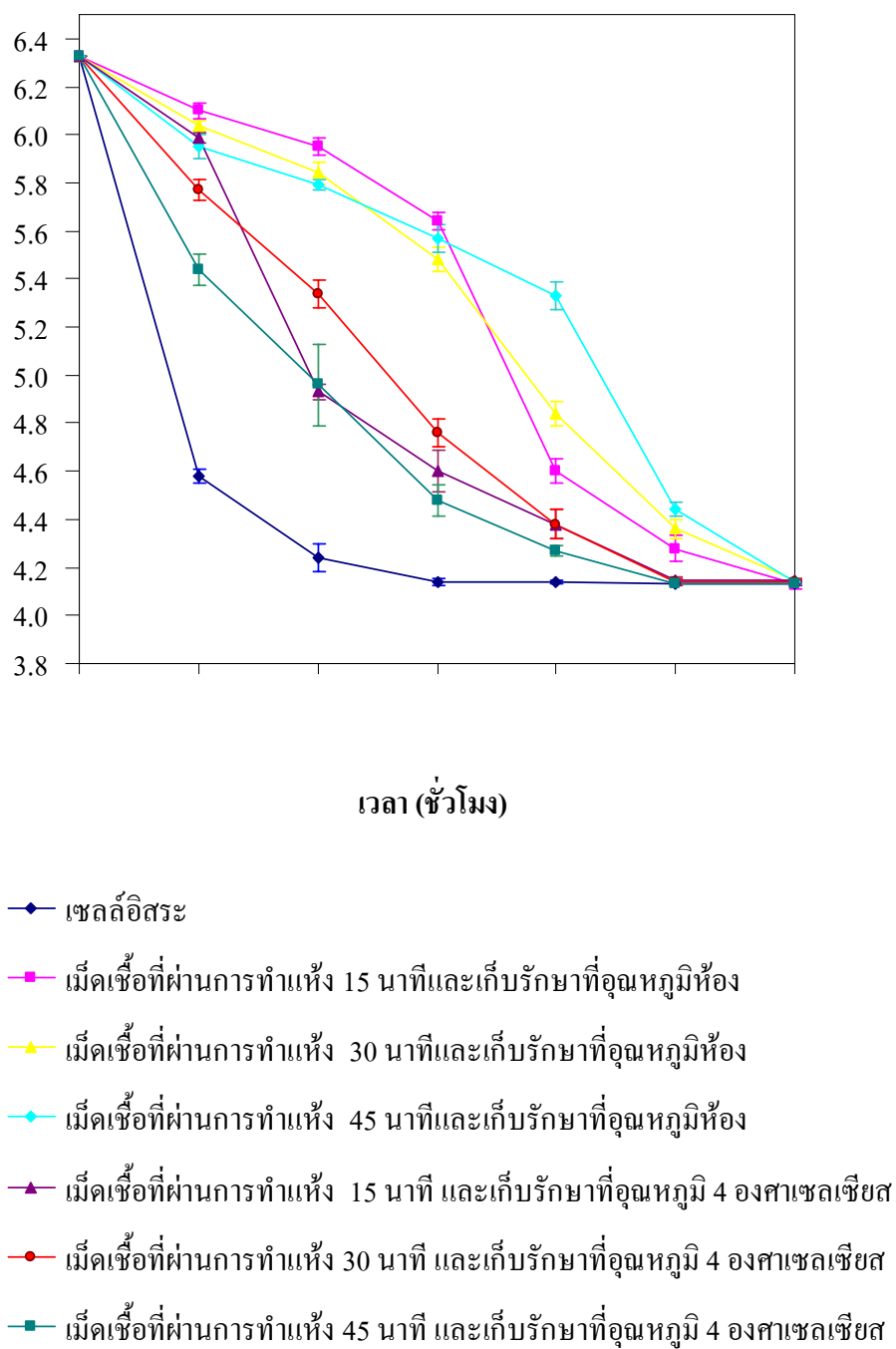
B) เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส



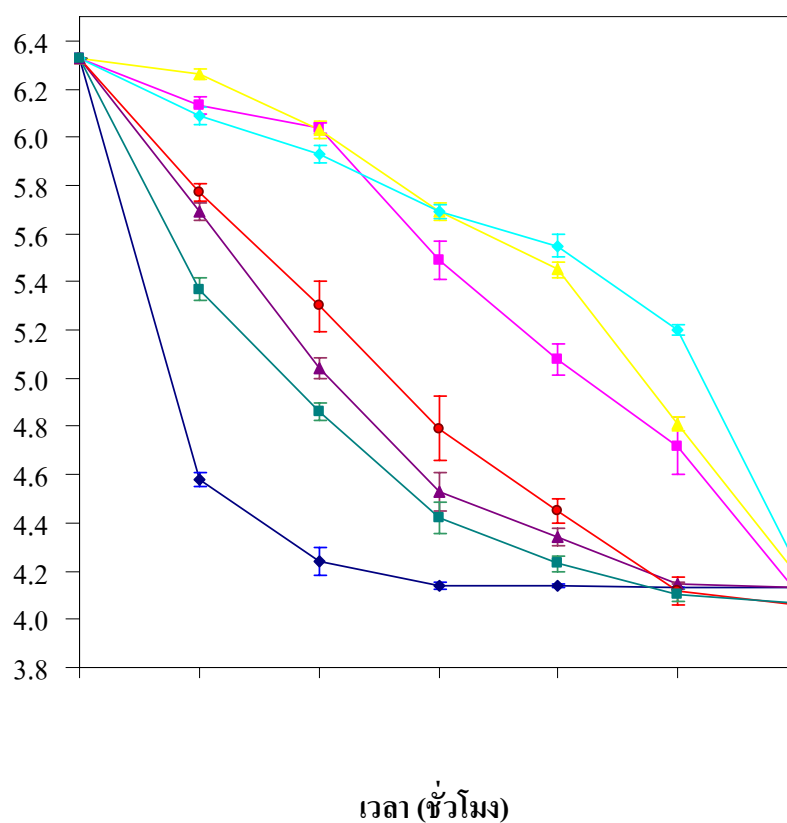
ภาพที่ 43 การผลิตรวดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 7 วัน



ภาพที่ 44 การผลิทดของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 15 วัน

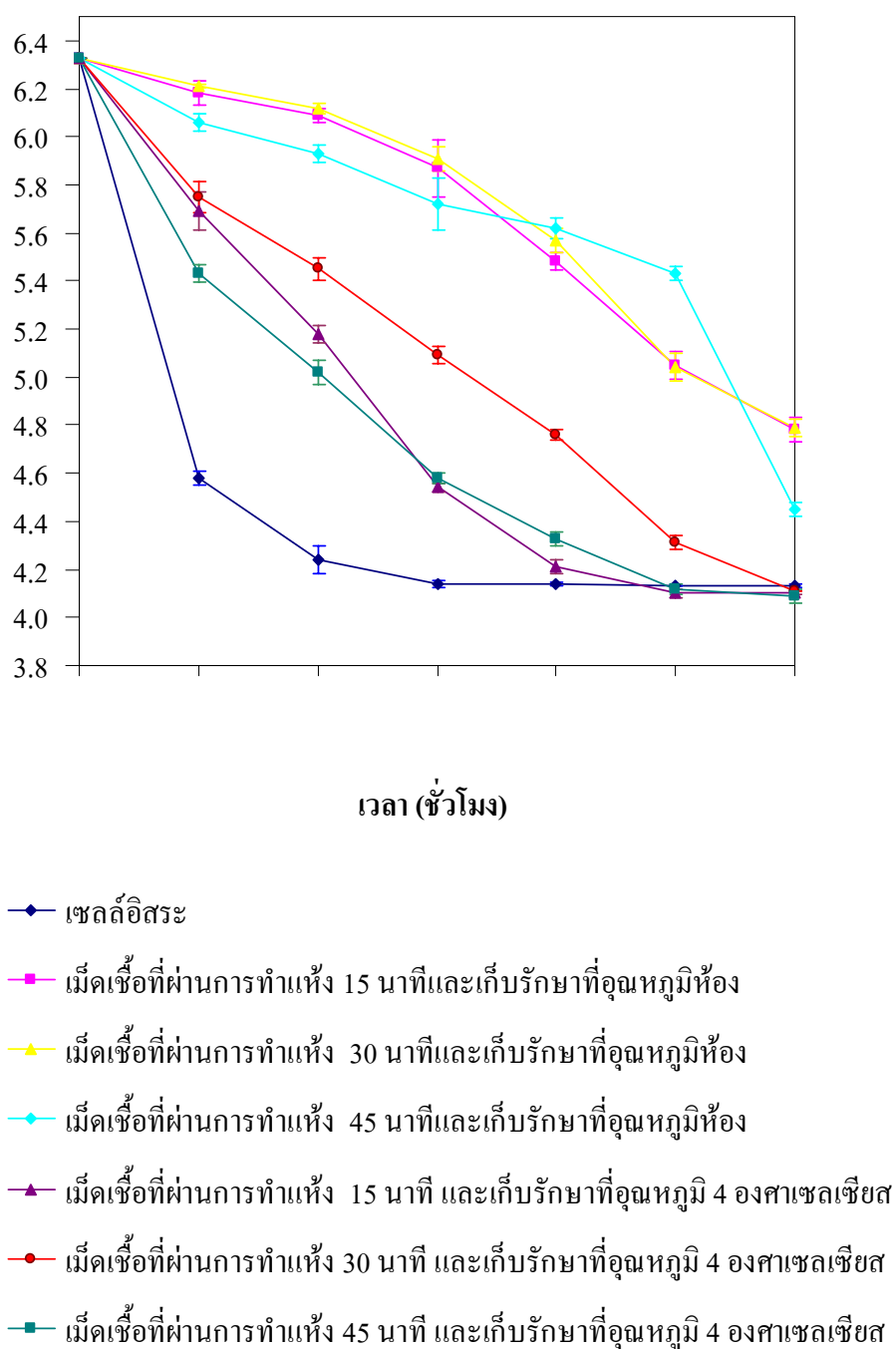


ภาพที่ 45 การผลิทดกรของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 30 วัน

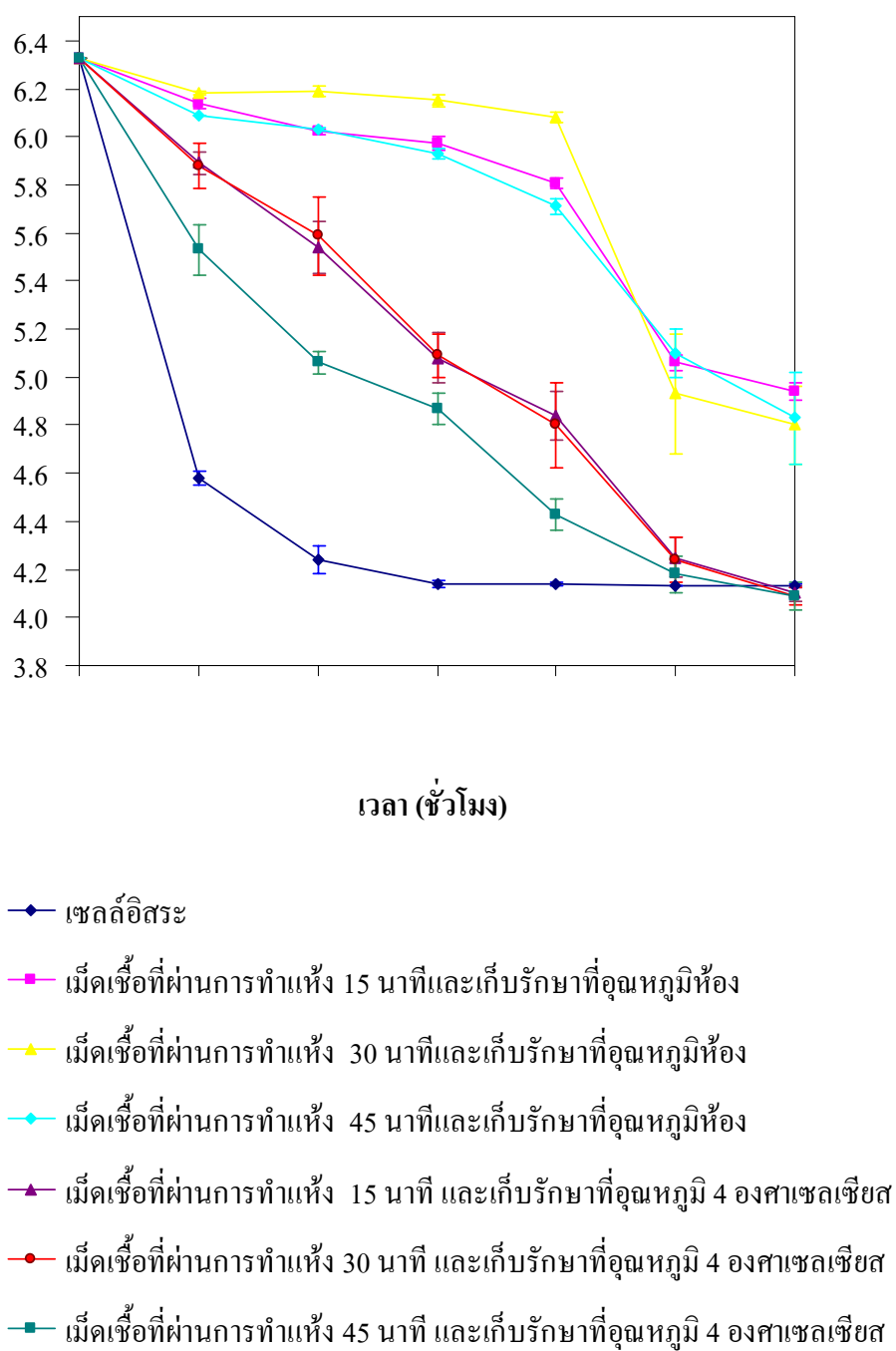


- ◆ เซลล์อิสระ
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ◆ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง
- ▲ เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 15 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 30 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- เม็ดเชื้อที่ผ่านการทำแห้ง 45 นาที และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

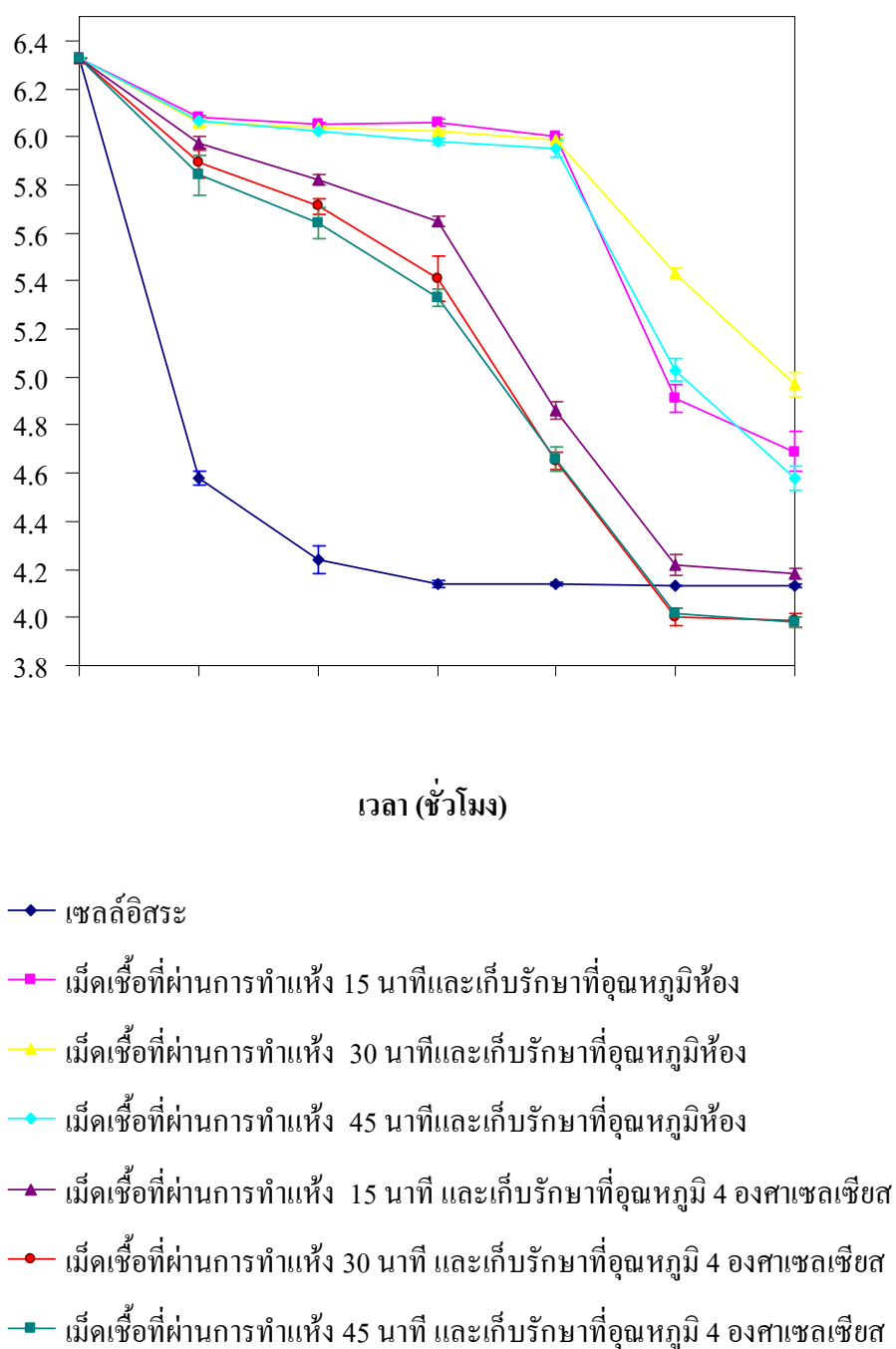
ภาพที่ 46 การผลิตรายของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 60 วัน



ภาพที่ 47 การผลิตรายของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 90 วัน



ภาพที่ 48 การผลิทดกรของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 120 วัน



ภาพที่ 49 การผลิตรายของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด ซึ่งเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

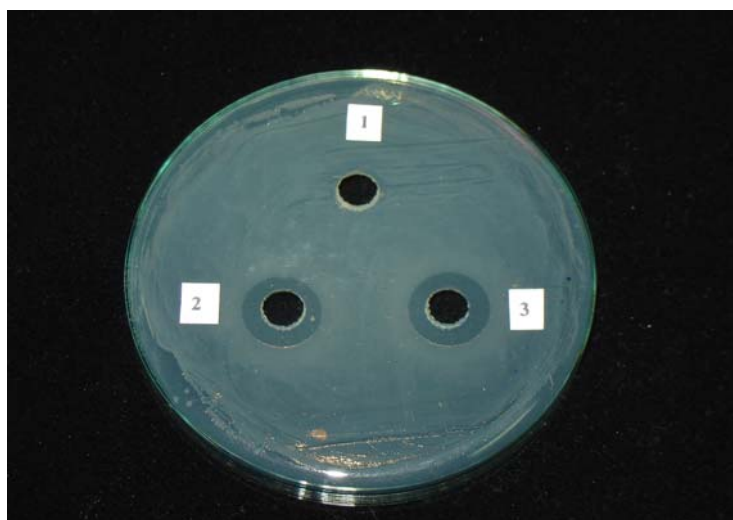
4. ศึกษาประสิทธิภาพของเม็ดเชื้อที่ผ่านการดักจับด้วยโซเดียมอัลจินเตในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ

การทดสอบความสามารถของเม็ดเชื้อที่ถูกดักจับด้วยสารละลายโซเดียมอัลจินเตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และใช้ความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาที ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในกุ้งกุลาดำ 3 ชนิด ได้แก่ *V.alginolyticus* , *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* พบว่าส่วนใสที่ได้จากเม็ดเชื้อ และเซลล์อิสระสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด ได้ โดยสังเกตเห็นบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดรอบหลุมที่หยดส่วนใสลงไป แสดงดังภาพที่ 50 - 52 ในขณะที่อาหารเหลว MRS ไม่มีบริเวณใสเกิดขึ้นรอบหลุมที่หยดของเหลวลงไป แสดงว่าเม็ดเชื้อและเซลล์อิสระสร้างสารบางอย่างที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสได้

การทดลองของวลัยพร (2544) พบว่า *L. plantarum* LP64 ที่นำมาทดลองสามารถผลิตกรดแลคติกและแบคทีเรียโอซินซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในกุ้งก้ามกราม คือ *E.coli*, *A.sorbia* และ *A. hydrophila* ได้ แต่ส่วนใสที่ได้จากเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมีประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิด ต่ำกว่าส่วนใสที่ได้จากเซลล์อิสระ เพราะขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากเม็ดเชื้อมีขนาดเล็กกว่าจากเซลล์อิสระ Sonomoto และคณะ (2000) ได้ทดลองตรึงเซลล์ *Lactococcus lactis* IO-1 ที่ผลิต nisin Z เปรียบเทียบกับการใช้เซลล์อิสระพบว่าความสามารถการผลิต nisin Z ของเม็ดเชื้อต่ำกว่าเซลล์อิสระ เนื่องจากเม็ดเชื้อจะมีข้อจำกัดในการแพร่ผ่านของสารอาหารเข้าสู่เซลล์และการส่งผลิตภัณฑ์ออกไปข้างนอก ดังนั้นเซลล์ที่อยู่ในเม็ดเชื้อจึงมีอัตราการเจริญต่ำ และทำให้ความสามารถในการผลิตสารต่างๆต่ำไปด้วย บริเวณใสที่เกิดจากเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งเชื้อ *V.alginolyticus*, *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* มีขนาด 1.8, 1.5 และ 1.2 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนบริเวณใสที่เกิดจากเซลล์อิสระมีขนาด 2.0, 1.7 และ 1.3 เซนติเมตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 7

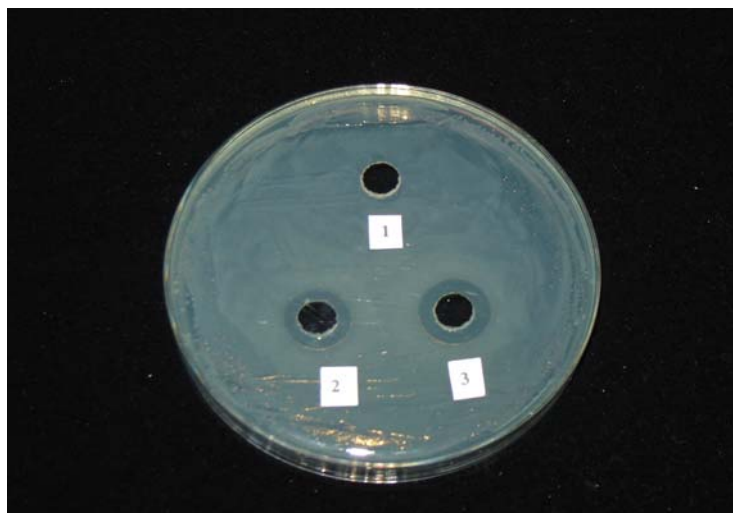
ตารางที่ 7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสบนอาหาร NA + 1.5% NaCl

เชื้อก่อโรค	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (เซนติเมตร)	
	เซลล์อิสระ	เซลล์ที่ถูกดักจับ
<i>V.alginolyticus</i>	2.00 ± 0.28	1.80 ± 0.14
<i>V. harveyi</i>	1.70 ± 0.07	1.50 ± 0.07
<i>V. parahaemolyticus</i>	1.60 ± 0.00	1.30 ± 0.07



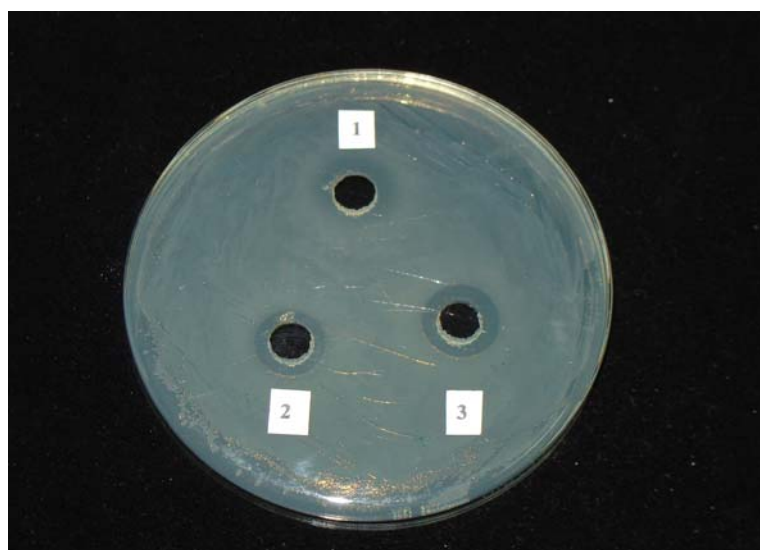
ภาพที่ 50 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *V.alginolyticus* ของแบคทีเรีย *L.plantarum* LP64

1. อาหารเหลว MRS
2. ส่วนใสของเซลล์ที่ถูกดักจับ
3. ส่วนใสของเซลล์อิสระ



ภาพที่ 51 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *V.harveyi* ของแบคทีเรีย *L.plantarum* LP64

1. อาหารเหลว MRS
2. ส่วนใสของเซลล์ที่ถูกดักจับ
3. ส่วนใสของเซลล์อิสระ



ภาพที่ 52 การยับยั้งเชื้อก่อโรค *V.parahaemolyticus* ของแบคทีเรีย *L.plantarum* LP64

1. อาหารเหลว MRS
2. ส่วนใสของเซลล์ที่ถูกดักจับ
3. ส่วนใสของเซลล์อิสระ

5. ศึกษาอิทธิพลของจุลินทรีย์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

5.1 ผลของจุลินทรีย์ที่มีต่อการเจริญเติบโตและผลผลิตของกุ้งกุลาดำ

5.1.1 อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำ

อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำเมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง พบว่าจะให้ผลที่แตกต่างกัน โดยกุ้งในกลุ่มควบคุมจะมีอัตราการรอดร้อยละ 68 ในขณะที่กลุ่มทดลองซึ่งให้เชื้อ *L. plantarum* LP 64 2×10^7 , 4×10^7 , 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g มีอัตราการรอดร้อยละ 67, 68, 76 และ 84 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS for Windows วิเคราะห์โดยใช้ LSD พบว่าอัตราการรอดของกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียวและกลุ่มทดลองที่ให้เชื้อ *L. plantarum* LP 64 ปริมาณ 2×10^7 , 4×10^7 CFU/g ผสมกับอาหารไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p > 0.05$) แสดงว่าการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาณ 2×10^7 , 4×10^7 CFU/g หรือไม่เติมแบคทีเรียแลคติกไม่มีผลต่ออัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองที่เติมเชื้อ *L. plantarum* LP 64 ปริมาณ 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g พบว่าอัตราการรอดของทั้ง 2 กลุ่มทดลองจะแตกต่างกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เติมเชื้อ *L. plantarum* LP 64 ปริมาณ 2×10^7 , 4×10^7 CFU/g อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่เดียวกันกลุ่มที่เติม LP 64 ปริมาณ 1×10^8 CFU/g ก็มีอัตราการรอดแตกต่างกับกลุ่มที่เติมเชื้อ *L. plantarum* LP 64 ปริมาณ 2×10^8 CFU/g อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกัน

เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกุ้ง ในแต่ละกลุ่มการทดลอง พบว่ากุ้งในกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารสำเร็จรูปอย่างเดียว มีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.0620 ในขณะที่กุ้งในกลุ่มทดลองจะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเพิ่มขึ้นตามปริมาณ *L. plantarum* LP 64 ที่เติมลงไป โดยกลุ่มทดลองที่เติมแบคทีเรียกรดแลคติก 2×10^7 CFU/g มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ 0.0576 และมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.0589 และ 0.0671 สำหรับกลุ่มทดลองที่เติมแบคทีเรียกรดแลคติก 4×10^7 และ 1×10^8 CFU/g ตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในกลุ่มที่เติมแบคทีเรียกรดแลคติก 2×10^8 CFU/g มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.0685 เมื่อทำการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม

SPSS for Windows วิเคราะห์โดยใช้ LSD พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 8

จะเห็นได้ว่ากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่เติม *L. plantarum* LP 64 ปริมาณ 2×10^7 และ 4×10^7 CFU/g จะมีอัตราการรอดของกิ้งกูดาค่าที่ไม่แตกต่าง แต่จะแตกต่างกับกลุ่มทดลองที่เติม *L. plantarum* LP 64 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกในปริมาณที่เหมาะสมจะมีผลต่ออัตราการรอดของกิ้งกูดาค่า แต่จะไม่มีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะ เมื่อเพิ่มปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกให้มากขึ้นพบว่า อัตราการรอดสูงขึ้น และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน แต่อัตราการเจริญจำเพาะของแต่ละกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน แสดงว่าปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่เติมลงไปมีผลต่ออัตราการรอดของกิ้งกูดาค่าเพียงอย่างเดียว

ตารางที่ 8 ร้อยละของอัตราการรอด และอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของกิ้งกูดาค่าที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปร่วมกับเชื้อ *L. plantarum* LP 64 ที่ปริมาณต่างๆกัน

กลุ่มทดลอง	ร้อยละของอัตราการรอด	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ
อาหารสำเร็จ	68 ^c	0.0620 ^{NS}
อาหารสำเร็จ + 2×10^7 LP 64	67 ^c	0.0576 ^{NS}
อาหารสำเร็จ + 4×10^7 LP 64	68 ^c	0.0589 ^{NS}
อาหารสำเร็จ + 1×10^8 LP 64	76 ^b	0.0671 ^{NS}
อาหารสำเร็จ + 2×10^8 LP 64	84 ^a	0.0685 ^{NS}

หมายเหตุ ตัวเลขที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

5.1.2 ผลการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด

จากการเก็บตัวอย่างน้ำในตู้เลี้ยงกุ้งมาตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร NA แบคทีเรียกรดแลกติกบนอาหาร MRS และเชื้อไวรัสโอบนอาหาร TCBS เริ่มต้น พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นทั้งหมด 5.24×10^3 CFU/ml แต่ไม่พบเชื้อแบคทีเรียแลกติกและไวรัสโอบเมื่อทำการทดลองเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง พบว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มที่มีการให้เชื้อ *L. plantarum* LP 64 2×10^7 , 4×10^7 , 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 4.48×10^4 , 1.04×10^5 , 6.03×10^4 , 9.00×10^4 และ 4.13×10^4 CFU/ml ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 1 และเพิ่มขึ้นเป็น 10^5 CFU/ml ในสัปดาห์ที่ 2 หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียจะคงที่ จนถึงสิ้นสุดการทดลอง การที่แบคทีเรียในน้ำมีปริมาณเพิ่มมากขึ้น อาจเนื่องจากในตู้มีสารอินทรีย์เพิ่มมากขึ้น ทั้งที่มาจากเศษอาหารที่เหลือ และสิ่งขับถ่ายของกุ้ง ซึ่งสารอินทรีย์เหล่านี้จัดเป็นอาหารอย่างดีของจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ที่มีอยู่เพิ่มจำนวนมากขึ้น ในสัปดาห์ที่ 2 แต่ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียมีค่าคงที่ที่ 10^5 CFU/ml ไม่มีการเพิ่มจำนวนขึ้น เนื่องมาจากในระหว่างการทดลองจะมีการเปลี่ยนน้ำทุกสัปดาห์และมีการดูแลตะกอนก้นตู้เพื่อทำความสะอาด ทำให้ปริมาณแบคทีเรียในตู้ทดลองมีปริมาณคงที่

กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองซึ่งเดิม *L. plantarum* LP 64 2×10^7 และ 4×10^7 CFU/g ตรวจไม่พบแบคทีเรียกรดแลกติกตลอดการทดลอง กลุ่มทดลองซึ่งเดิม *L. plantarum* LP 64 ปริมาณ 2×10^8 CFU/g ตรวจพบแบคทีเรียกรดแลกติกตั้งแต่สัปดาห์แรก เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2 จะตรวจพบแบคทีเรียกรดแลกติกเพิ่มขึ้นในกลุ่มทดลองที่เดิม LP 64 1×10^8 CFU/g ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกที่ตรวจพบเมื่อสิ้นสุดการทดลอง สำหรับกลุ่มทดลองที่เดิม *L. plantarum* LP 64 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g เท่ากับ 1.80×10^2 และ 3.00×10^2 CFU/ml ตามลำดับ สาเหตุที่กลุ่มซึ่งเดิม *L. plantarum* LP 64 2×10^7 และ 4×10^7 CFU/g ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียแลกติกอาจเนื่องมาจากเชื้อที่เดิมลงไปมีปริมาณน้อย โอกาสที่จะตรวจพบเชื้อในน้ำซึ่งมีอาหารของจุลินทรีย์อยู่น้อยจึงต่ำกว่าเมื่อทำการตรวจสอบจำนวนไวรัสโอบ ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งกุลาดำจากตัวอย่างน้ำของทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ปรากฏว่าไม่พบเชื้อไวรัสโอบทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลการตรวจแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในน้ำ

สัปดาห์	กลุ่มทดลอง	NA (cfu/ml)	MRS (cfu/ml)	TCBS (cfu/ml)
0	ตัวอย่างน้ำ	5.24×10^3	-	-
1	อาหารสำเร็จ	4.48×10^4	-	-
	อาหารสำเร็จ + 2×10^7 LP 64	1.04×10^5	-	-
	อาหารสำเร็จ + 4×10^7 LP 64	6.03×10^4	-	-
	อาหารสำเร็จ + 1×10^8 LP 64	9.00×10^4	-	-
	อาหารสำเร็จ + 2×10^8 LP 64	4.13×10^4	2.20×10^2	-
2	อาหารสำเร็จ	2.21×10^5	-	-
	อาหารสำเร็จ + 2×10^7 LP 64	1.06×10^5	-	-
	อาหารสำเร็จ + 4×10^7 LP 64	3.91×10^5	-	-
	อาหารสำเร็จ + 1×10^8 LP 64	1.65×10^5	1.10×10^2	-
	อาหารสำเร็จ + 2×10^8 LP 64	1.84×10^5	1.80×10^2	-
3	อาหารสำเร็จ	3.42×10^5	-	-
	อาหารสำเร็จ + 2×10^7 LP 64	2.12×10^5	-	-
	อาหารสำเร็จ + 4×10^7 LP 64	3.05×10^5	-	-
	อาหารสำเร็จ + 1×10^8 LP 64	6.10×10^5	2.10×10^2	-
	อาหารสำเร็จ + 2×10^8 LP 64	5.73×10^5	3.20×10^2	-
4	อาหารสำเร็จ	2.72×10^5	-	-
	อาหารสำเร็จ + 2×10^7 LP 64	2.33×10^5	-	-
	อาหารสำเร็จ + 4×10^7 LP 64	2.25×10^5	-	-
	อาหารสำเร็จ + 1×10^8 LP 64	4.47×10^5	1.80×10^2	-
	อาหารสำเร็จ + 2×10^8 LP 64	7.10×10^5	3.00×10^2	-

จากการตรวจสอบตัวอย่างตะกอนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ซึ่งแสดงผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 พบว่า ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ตรวจพบบนอาหาร NA เริ่มต้นในสัปดาห์ที่ 1 มีประมาณ 10^8 CFU/g ในสัปดาห์ที่ 2 ปริมาณเชื้อของทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองจะเพิ่มจำนวนเป็น 10^9 CFU/g และคงที่จนสิ้นสุดการทดลอง สาเหตุที่ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ของทุกกลุ่มการทดลองเพิ่มขึ้นในสัปดาห์ที่ 2 และคงที่ เนื่องมาจากเหตุผลเดียวกับการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์ในน้ำ และสาเหตุที่ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่พบในตะกอนจะสูงกว่าที่พบในน้ำ เนื่องจากตะกอนเป็นแหล่งรวมของสารอินทรีย์ซึ่งเป็นอาหารอย่างดีของจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่าอินทรีย์สารที่ละลายในน้ำ แบคทีเรียจึงใช้สารอินทรีย์ในตะกอนในการเจริญได้ดีกว่า ปริมาณแบคทีเรียในตะกอนจึงสูงกว่าในน้ำ

ตะกอนของกลุ่มควบคุมตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกตลอดการทดลอง แต่ในกลุ่มที่มีการเติม *L. plantarum* LP64 จะตรวจพบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกตั้งแต่สัปดาห์แรกของการทดลอง ปริมาณที่ตรวจพบอยู่ในช่วง 10^3 ถึง 10^4 CFU/g และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นในแต่ละสัปดาห์โดยในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองกลุ่มที่มีการให้เชื้อ *L. plantarum* LP 64 2×10^7 , 4×10^7 , 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g ตรวจพบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 7.53×10^3 , 2.03×10^4 , 1.08×10^5 และ 3.07×10^5 CFU/g ตามลำดับ เชื้อไวรัสที่ตรวจพบในตะกอนของกลุ่มควบคุมมีค่าเท่ากับ 10^5 CFU/g สูงกว่ากลุ่มทดลองที่มีการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกลงไปซึ่งตรวจพบไวรัสโออยู่ในช่วง 10^3 ถึง 10^4 CFU/g ไวรัสส่วนใหญ่ที่ตรวจพบมีโคโลนีสีเหลือง เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณไวรัสโอของกลุ่มที่เสริมแบคทีเรียกรดแลคติกจะมีปริมาณลดลง อาจเนื่องจาก *L. plantarum* LP 64 ที่เติมลงไปเป็นแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างกรดแลคติก และแบคทีเรียโอซิน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อไวรัสโอได้ (วลัยพร, 2544)

ตารางที่ 10 ผลการตรวจแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในตะกอน

สัปดาห์	กลุ่มทดลอง	NA (cfu/g)	MRS (cfu/g)	TCBS (cfu/g)
0	ตัวอย่างตะกอน	ไม่มีตะกอน	ไม่มีตะกอน	ไม่มีตะกอน
1	อาหารสำเร็จ	2.14×10^8	-	1.78×10^5
	อาหารสำเร็จ + 2×10^7 LP 64	2.42×10^8	1.05×10^3	5.30×10^4
	อาหารสำเร็จ + 4×10^7 LP 64	2.84×10^8	6.38×10^3	1.42×10^4
	อาหารสำเร็จ + 1×10^8 LP 64	4.54×10^8	1.75×10^4	1.02×10^4
	อาหารสำเร็จ + 2×10^8 LP 64	6.89×10^8	5.12×10^4	5.95×10^3
2	อาหารสำเร็จ	7.87×10^8	-	2.07×10^5
	อาหารสำเร็จ + 2×10^7 LP 64	1.68×10^9	5.52×10^3	2.13×10^4
	อาหารสำเร็จ + 4×10^7 LP 64	1.85×10^9	1.52×10^4	9.02×10^3
	อาหารสำเร็จ + 1×10^8 LP 64	1.30×10^9	1.60×10^4	2.62×10^3
	อาหารสำเร็จ + 2×10^8 LP 64	2.06×10^9	6.39×10^4	1.81×10^3
3	อาหารสำเร็จ	1.27×10^9	-	2.77×10^5
	อาหารสำเร็จ + 2×10^7 LP 64	1.63×10^9	2.58×10^3	1.56×10^4
	อาหารสำเร็จ + 4×10^7 LP 64	1.38×10^9	6.29×10^3	8.07×10^3
	อาหารสำเร็จ + 1×10^8 LP 64	1.93×10^9	5.78×10^4	3.80×10^3
	อาหารสำเร็จ + 2×10^8 LP 64	1.25×10^9	1.13×10^5	1.20×10^3
4	อาหารสำเร็จ	3.39×10^9	-	3.14×10^5
	อาหารสำเร็จ + 2×10^7 LP 64	2.32×10^9	7.53×10^3	9.80×10^3
	อาหารสำเร็จ + 4×10^7 LP 64	3.97×10^9	2.03×10^4	2.20×10^3
	อาหารสำเร็จ + 1×10^8 LP 64	2.71×10^9	1.08×10^5	1.82×10^3
	อาหารสำเร็จ + 2×10^8 LP 64	3.12×10^9	3.07×10^5	4.80×10^2

จากการตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ที่พบในตัวอย่างกึ่งกลาดำก่อนการทดลอง พบเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหาร NA ทั้งหมด 4.63×10^6 CFU/g และเชื้อไวรัสบนอาหาร TCBS 5.75×10^3 CFU/g แต่ไม่พบแบคทีเรียกรดแลคติก บนอาหาร MRS เมื่อสิ้นสุดการทดลองและมีการนำกึ่งกลาดำมาตรวจหาแบคทีเรียทั้งหมดพบว่าในกลุ่มควบคุมมีจำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 6.25×10^7 CFU/g และพบเชื้อไวรัส 6.67×10^3 CFU/g แต่ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ในขณะที่กลุ่มทดลองพบแบคทีเรียในสัปดาห์สุดท้ายของการทดลองเท่ากับ 10^8 CFU/g และตรวจพบแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 1.14×10^5 และ 5.02×10^5 CFU/g สำหรับกลุ่มที่มีการให้เชื้อ *L. plantarum* LP 64 2×10^7 และ 4×10^7 CFU/g และเพิ่มขึ้นเป็น 1.25×10^6 และ 3.18×10^6 CFU/g สำหรับกลุ่มที่มีการให้เชื้อ *L. plantarum* LP 64 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g ตามลำดับ กลุ่มทดลองทุกกลุ่มตรวจไม่พบเชื้อไวรัสในตัวอย่าง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 ผลการตรวจแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดในกึ่งกลาดำ

สัปดาห์	กลุ่มทดลอง	NA (cfu/g)	MRS (cfu/g)	TCBS (cfu/g)
0	ตัวอย่างกึ่ง	4.63×10^6	-	5.75×10^3
4	อาหารสำเร็จ	6.25×10^7	-	6.67×10^3
	อาหารสำเร็จ + 2×10^7 LP 64	1.33×10^8	1.14×10^5	-
	อาหารสำเร็จ + 4×10^7 LP 64	1.78×10^8	5.02×10^5	-
	อาหารสำเร็จ + 1×10^8 LP 64	4.65×10^8	1.25×10^6	-
	อาหารสำเร็จ + 2×10^8 LP 64	3.95×10^8	3.18×10^6	-

5.1.3 คุณภาพน้ำในตู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ

อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญต่อขบวนการเมแทบอลิซึมของสิ่งมีชีวิตที่เกี่ยวข้อง โดยตรงกับการเจริญเติบโต (Chen, 1985) จากการตรวจสอบคุณภาพน้ำในระหว่างการทดลองเลี้ยงกุ้งเป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ ซึ่งแสดงผลดังตารางที่ 15 พบว่าอุณหภูมิของน้ำกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ผสม *L. plantarum* LP 64 ปริมาณ 2×10^7 , 4×10^7 , 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g มีค่าใกล้เคียงกันในแต่ละสัปดาห์ โดยมีค่าอยู่ในช่วง 25.0 – 29.5 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่เป็นอันตรายต่อลูกกุ้งกุลาดำ โดยปกติอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำจะอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียส ในช่วงอุณหภูมินี้กุ้งจะลอกคราบและโตเร็วเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส จะทำให้ลูกกุ้งตาย (Hsieh และคณะ, 1989) อุณหภูมิที่ต่ำกว่า 24 องศาเซลเซียส จะทำให้ลูกกุ้งเจริญเติบโตช้าและพัฒนาเป็นกุ้งกว่าช้า แต่ถ้าอุณหภูมิของน้ำต่ำกว่า 12 องศาเซลเซียส กุ้งจะหนาวและตายได้ (กลุ่มบัณฑิตเกษตรก้าวหน้า, 2531)

กลุ่มควบคุมมีค่ากรด-ด่างเฉลี่ยตลอดการทดลองอยู่ในช่วง 8.39 – 8.43 ซึ่งใกล้เคียงกับกลุ่มทดลองที่ได้รับอาหารผสม *L. plantarum* LP 64 ปริมาณ 2×10^7 , 4×10^7 , 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g ซึ่งมีค่ากรด-ด่างเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 8.39 – 8.41, 8.37 – 8.42, 8.39 – 8.42 และ 8.36 – 8.41 ตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไป 4 สัปดาห์ จากการทดลองพบว่ากลุ่มที่มีการให้อาหารสำเร็จรูปผสมเชื้อ *L. plantarum* LP 64 มีค่ากรด-ด่างต่ำกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย เนื่องจาก *L. plantarum* LP 64 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตกรดแลคติกออกมาในน้ำ ทำให้ค่ากรด-ด่างของน้ำลดลง (วลัยพร, 2544) ค่ากรด-ด่างของทุกกลุ่มการทดลองอยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของกุ้งกุลาดำ ชะลอ (2535) กล่าวว่าค่ากรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำควรอยู่ระหว่าง 7.5 - 8.5 แต่การเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำจะดีที่สุดในช่วงที่มีค่ากรด-ด่างของน้ำระหว่าง 8.0-8.5

ปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้ในน้ำ ซึ่งเกิดมาจากการย่อยสลายของอินทรีย์สาร ได้แก่ อาหาร และสิ่งที่ยังขับถ่าย โดยปริมาณแอมโมเนียในน้ำตอนเริ่มต้นของทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีค่าระหว่าง 0.70 – 0.90 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่สูงกว่าปริมาณแอมโมเนียที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ Chin และ Chen(1988) ทำการทดลองหาความเข้มข้นของแอมโมเนียที่ปลอดภัยในระยะอนุเพนีส และโพสต์ลาร์ว่า พบว่ามีค่า 0.01 และ 0.1 มิลลิกรัม/ลิตร ถ้าในน้ำ 1 ลิตร มีแอมโมเนียสูงกว่า 0.45 มิลลิกรัม อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งจะลดลงประมาณ

ร้อยละ 50 (Wickins, 1976) ในช่วง 2 สัปดาห์แรกของทั้งกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมปริมาณแอมโมเนียจะค่อยๆสูงขึ้น เนื่องจากมีการสะสมของเศษอาหารและสิ่งขับถ่ายของกิ้งมามากขึ้น (Boyd, 1982) จากนั้นปริมาณแอมโมเนียจะเริ่มลดลงจนสิ้นสุดการทดลอง ยกเว้นกลุ่มทดลองที่เสริมเชื้อ *L. plantarum* LP 64 2×10^7 CFU/g ปริมาณแอมโมเนียจะสูงขึ้นถึงสัปดาห์ที่ 3 และลดลงในสัปดาห์สุดท้าย สาเหตุที่แอมโมเนียในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองมีปริมาณลดลง เนื่องจากในน้ำมีจุลินทรีย์บางกลุ่มสามารถเปลี่ยนแอมโมเนียให้กลายเป็นไนไตรต์ได้ ทำให้ปริมาณแอมโมเนียในตู้เลี้ยงกิ้งลดลง

ปริมาณแอมโมเนียสูงสุดของกลุ่มควบคุม คือ 1.47 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนกลุ่มทดลองที่ได้รับเชื้อ *L. plantarum* LP 64 2×10^7 , 4×10^7 , 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g มีปริมาณแอมโมเนียสูงสุดเท่ากับ 1.46, 1.41, 1.40 และ 1.44 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ปริมาณแอมโมเนียในกลุ่มควบคุมจะสูงกว่ากลุ่มทดลองเล็กน้อย เนื่องจากค่ากรด-ด่างจะมีผลต่อปริมาณแอมโมเนียในน้ำ ถ้าค่ากรด-ด่างสูงปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้ก็จะมีค่าสูงไปด้วย เนื่องจากค่ากรด-ด่างของกลุ่มควบคุมมีค่าสูงกว่ากลุ่มทดลอง จึงทำให้ปริมาณแอมโมเนียที่วัดได้จากกลุ่มควบคุมจึงสูงกว่ากลุ่มทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของจากรูรณ (2525) ที่ว่าความเป็นพิษของแอมโมเนียขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ ความเค็ม และค่าความเป็นกรด-ด่าง

ปริมาณไนไตรต์ที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงกิ้งกุลาดำ มีสาเหตุมาจากแบคทีเรียในน้ำเปลี่ยนแอมโมเนียกลายเป็นไนไตรต์ หรือเกิดจากการสะสมของกระบวนการไนตริฟิเคชัน ในการเปลี่ยนไนไตรต์กลายเป็นไนเตรท หรืออาจเกิดจากการกระบวนการดีไนตริฟิเคชันที่เปลี่ยนไนเตรทกลับมาเป็นไนไตรต์ทำให้เกิดการสะสมไนไตรต์ขึ้น Chen และ Chin(1988) ทำการทดลองหาค่าความเข้มข้นของไนไตรต์ที่มีต่ออัตราการตายของกิ้งกุลาดำ 50 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของไนไตรต์ที่ปลอดภัยต่อกุ้งระยะโพสลาร์วาคือ 1.36 มิลลิกรัม/ลิตร

จากผลการทดลองพบว่าในสัปดาห์แรกของทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ปริมาณไนไตรต์ในน้ำมีค่า 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร เมื่อเข้าสู่สัปดาห์ที่ 2, 3 และ 4 ปริมาณไนไตรต์ของทุกกลุ่มการทดลองจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการทดลอง โดยกลุ่มควบคุมมีปริมาณไนไตรต์สูงสุด 2.50 มิลลิกรัม/ลิตร กลุ่มทดลองที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสมเชื้อ LP 64 2×10^7 CFU/g มีปริมาณไนไตรต์ในสัปดาห์สุดท้าย 2.00 มิลลิกรัม/ลิตร ในขณะที่กลุ่มที่ให้อาหารสำเร็จรูปผสม

เชื้อ *L. plantarum* LP 64 4×10^7 , 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g มีปริมาณไนไตรต์ในสัปดาห์สุดท้าย 3.00 มิลลิกรัม/ลิตร เท่ากัน การที่มีไนไตรต์มากเกินไปจะส่งผลเช่นเดียวกับแอมโมเนีย คือ กุ้งจะเครียด การกินอาหารสะดุด ผอม กรอบแกรบ จนอาจมีการตายได้ แต่พุทธ (2545) กล่าวว่าไนไตรต์เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีความเป็นพิษต่อกุ้งน้อยกว่าแอมโมเนีย การพบไนไตรต์ในระดับ 0.5–1.0 มิลลิกรัม/ลิตร ในบ่อเลี้ยงกุ้งพบว่ากุ้งกินอาหารน้อยลง แต่ถ้าบ่อเลี้ยงมีการหมุนเวียนออกซิเจนในระดับที่พอเพียงต่อการเจริญเติบโตของกุ้ง ก็สามารถเลี้ยงกุ้งได้โดยไม่มีปัญหา

จากผลการทดลองดังแสดงตามตารางที่ 12 จะเห็นได้ว่าคุณภาพของน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ ได้แก่ ค่ากรด-ด่าง และอุณหภูมิ อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมไม่เป็นอันตรายต่อกุ้งกุลาดำ แต่ปริมาณของแอมโมเนียและไนไตรต์ในตู้มีค่าค่อนข้างสูง ซึ่งมีสาเหตุมาจากอาหารที่ใช้เลี้ยงกุ้งมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 38 เปอร์เซ็นต์ และในการทดลองมีการเปลี่ยนน้ำเพียงสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ทำให้มีการสะสมของอาหารมากขึ้น ตลอดทั้งกุ้งก็ขับของเสียออกมาทุกวัน การย่อยสลายสารเหล่านี้เป็นแอมโมเนียจึงมีสูงและการเปลี่ยนแอมโมเนียไปเป็นไนไตรต์จึงสูงตามไปด้วย จึงมีผลทำให้อัตราการเจริญเติบโตของกุ้งกุลาดำลดลง โดยที่สภาวะดังกล่าวจุลินทรีย์ที่เติมลงไปสามารถเจริญและทำงานได้ การเติมจุลินทรีย์แบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่มีผลต่อคุณภาพของน้ำ แต่มีผลต่อค่ากรด-ด่างของน้ำเล็กน้อย โดยกลุ่มที่มีการเติมจุลินทรีย์ลงไปน้ำจะมีค่ากรด-ด่างที่ต่ำซึ่งจะมีผลทำให้ปริมาณแอมโมเนียในน้ำที่วัดได้มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มีการเติมจุลินทรีย์ด้วย

ตารางที่ 12 คุณภาพน้ำในตู้เลี้ยงกุ้งกุลาดำ

กลุ่มทดลอง	สัปดาห์	อุณหภูมิ (°C)	pH	NH ₃ (mg/l)	NO ₂ (mg/l)
อาหารสำเร็จ	0	25.0 – 28.0	8.39	0.76	-
	1	25.0 – 28.0	8.41	1.36	0.25
	2	25.0 – 29.0	8.43	1.47	0.50
	3	26.5 – 28.5	8.42	1.40	1.00
	4	25.0 – 29.5	8.40	1.31	2.50
อาหารสำเร็จผสม LP64 2×10^7 CFU/g	0	25.0 – 28.5	8.39	0.90	-
	1	25.0 – 28.5	8.41	1.38	0.25
	2	26.0 – 29.0	8.41	1.41	0.50
	3	25.0 – 29.0	8.39	1.46	1.00
	4	25.0 – 29.0	8.40	1.39	2.00
อาหารสำเร็จผสม LP64 4×10^7 CFU/g	0	25.0 – 29.0	8.37	0.90	-
	1	25.0 – 29.0	8.40	1.34	0.25
	2	26.5 – 29.0	8.42	1.41	0.50
	3	25.0 – 29.5	8.41	1.39	1.50
	4	25.0 – 29.0	8.40	1.17	3.00
อาหารสำเร็จผสม LP64 1×10^8 CFU/g	0	25.0 – 29.0	8.39	0.78	-
	1	25.0 – 29.0	8.40	1.32	0.25
	2	27.0 – 29.0	8.42	1.40	0.50
	3	25.0 – 29.5	8.39	1.29	2.00
	4	25.0 – 29.0	8.40	1.08	3.00

ตารางที่ 12 (ต่อ)

กลุ่มทดลอง	สัปดาห์	อุณหภูมิ (°C)	pH	NH ₃ (mg/l)	NO ₂ (mg/l)
อาหารสำเร็จผสม LP64 2×10^8 CFU/g	0	25.0 – 29.5	8.40	0.78	-
	1	25.0 – 29.5	8.41	1.38	0.25
	2	26.0 – 28.5	8.40	1.44	0.50
	3	25.0 – 28.5	8.39	1.32	1.50
	4	25.0 – 29.0	8.36	1.08	3.00

สรุปผลการทดลอง

การคัดเลือกสารพาหะซึ่งมีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดในการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LP64 โดยพิจารณาคัดเลือกจากประสิทธิภาพในการดักจับ ขนาดของเม็ดเชื้อ และความสามารถในการหลุดออกของแบคทีเรียกรดแลคติกจากเม็ดเชื้อ เมื่ออยู่ในระบบทางเดินอาหารจำลองของกิ้งกูดดำ จากสารพาหะ 4 ชนิด ได้แก่ โซเดียมอัลจิเนต ไคโทซาน คาร์ราจีแนน และ เซลลูโลส แอซีเตต พบว่าโซเดียมอัลจิเนตเป็นสารพาหะที่มีความเหมาะสมที่สุดในการดักจับแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LP64 เนื่องจากประสิทธิภาพในการดักจับเซลล์สูงสุด ปริมาณเชื้อที่ถูกดักจับด้วยโซเดียมอัลจิเนต คือ 3.22×10^{10} CFU/g ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเชื้อ 0.896 มิลลิเมตร นอกจากนี้เซลล์ยังสามารถหลุดออกจากเม็ดเชื้อได้ ตั้งแต่ 5 นาทีแรก เมื่อเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารจำลองของกิ้งกูดดำ

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการดักจับแบคทีเรีย *L. plantarum* LP64 โดยแปรผันความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ความเร็วในการกวนผสม อัตราส่วนระหว่างสารละลายแขวนลอยของเซลล์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจิเนต ปริมาณน้ำมันและปริมาณสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ พบว่าที่ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ ความเร็วการกวน 800 รอบต่อนาที น้ำมัน 150 มิลลิลิตร สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ 300 มิลลิลิตร อัตราส่วนระหว่างสารแขวนลอยของเซลล์ต่อสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 12 มิลลิลิตร : 48 มิลลิลิตร เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการดักจับ

การศึกษาอายุการเก็บรักษาของเม็ดเชื้อ โดยผสมแป้งข้าวเจ้า แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวโพดกับเม็ดเชื้อ ก่อนทำแห้งด้วยเครื่องฟลูอิดไรเซอร์ แปรผันเวลาในการทำแห้ง 15, 30 และ 45 นาที จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเม็ดเชื้อทั้ง 3 ชนิด ได้นานกว่า 180 วัน และยังคงความสามารถการผลิตกรดสูง ส่วนเม็ดเชื้อที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง สามารถเก็บรักษาเม็ดเชื้อได้นาน 60 วัน แต่ความสามารถการผลิตกรดลดลงตามระยะเวลาเก็บ นอกจากนี้เม็ดเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีปริมาณความชื้นสูงกว่าเม็ดเชื้อที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้องเล็กน้อย เนื่องจากเม็ดเชื้อที่เก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้อง ไล่ในโถดูดความชื้น

การศึกษาความสามารถของเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ในการยับยั้งเชื้อก่อโรค 3 ชนิด คือ *V.alginolyticus*, *V.harveyi* และ *V.parahaemolyticus* โดยการนำส่วนใสของเม็ดเชื้อมาทดสอบ การยับยั้งเปรียบเทียบกับส่วนใสของเซลล์อิสระ พบว่าส่วนใสของเม็ดเชื้อและเซลล์อิสระสามารถ ยับยั้งเชื้อไวรัสทั้ง 3 ชนิดได้ แต่เซลล์อิสระจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ได้สูงกว่าเม็ดเชื้อเล็กน้อย

การศึกษาอิทธิพลของจุลินทรีย์ที่มีต่ออัตราการเจริญและอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก *L.plantarum* LP64 ที่เติมลงไปไม่มีผลต่อคุณภาพของน้ำ ปริมาณแบคทีเรีย ทั้งหมดที่พบในน้ำ ตะกอน และกุ้ง แต่มีผลต่อปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในตู้ การเสริม แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารจะไม่มีผลต่ออัตราการเจริญจำเพาะของกุ้งกุลาดำ เนื่องจากอัตราการ เจริญจำเพาะของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมที่ไม่เสริมแบคทีเรียกรดแลคติกไม่มีความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) แต่การเสริมแบคทีเรียกรดแลคติก LP64 ในปริมาณ 1×10^8 และ 2×10^8 CFU/g ของอาหารกุ้ง จะทำให้อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริม แบคทีเรียกรดแลคติก LP64 ในปริมาณ 2×10^7 และ 4×10^7 CFU/g ของอาหารกุ้ง อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แสดงว่าปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมจะส่งผลให้อัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ สูงขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาหาวิธีการลดขนาดของเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LP64 เพื่อให้ได้เม็ดเชื้อที่มีขนาดเล็กและสามารถผสมอาหารกึ่งได้ โดยอาจเปลี่ยนโซเดียมอัลจิเนตที่ใช้ให้มีความหนืดน้อยลง
2. ควรศึกษาความสามารถในการนำไปใช้ประโยชน์ได้จริงของเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LP64 โดยการนำเม็ดเชื้อผสมกับอาหารแล้วเข้าสู่กระบวนการอัดเม็ด จากนั้นหาอัตราการรอดของจุลินทรีย์ในเม็ดเชื้อเมื่อผ่านกระบวนการอัดเม็ดและศึกษาอายุการเก็บรักษาของ เม็ดเชื้อผสมอาหารกึ่ง
3. ควรศึกษาประสิทธิภาพของเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LP64 ที่ผสมกับอาหารในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ
4. ควรใส่ *V. harveyi* ลงในตู้เลี้ยงกุ้งเมื่อให้ *L. plantarum* LP 64 ไประยะหนึ่งเพื่อดูความสามารถของ *L. plantarum* LP 64 ในการทำหน้าที่เป็นโปรไบโอติก

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กนกพรรณ ศรีมนโนภาส. 2536. การตรวจวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะตกค้าง (oxytetracycline) โดยวิธีทางจุลชีววิทยา ในกุ้งกุลาดำแช่เยือกแข็ง. ฝ่ายตรวจรับรองคุณภาพผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ, กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. 11 น.
- กลุ่มบัณฑิตเกษตรก้าวหน้า. 2531. การเพาะเลี้ยงและเพิ่มผลผลิตกุ้งกุลาดำ. รุ่งเรืองการพิมพ์, กรุงเทพฯ. 263 น.
- กลุ่มบัณฑิตเกษตรอาสา. 2539. รวมเรื่องกุ้งก้ามกรามและกุ้งกุลาดำ. พิมพ์ครั้งที่ 2. สถาบันพัฒนาสาธิตสวนสุขาภิบาล, นครปฐม. 96 น.
- เกรียงศักดิ์ พูนสุข. 2546. จุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้ง. แหล่งที่มา : <http://www.nicaonline.com>, 4 กุมภาพันธ์ 2546.
- จารุวรรณ วิระวงษ์นุสร. 2525. พืชเลี้ยงปลาน้ำจืดของแอมโมเนียที่มีต่อกุ้งก้ามกรามวัยอ่อนระยะต่างๆกัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ชลอ ลิ้มสุวรรณ. 2535. คัมภีร์การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ฐานเศรษฐกิจ, กรุงเทพฯ. 202 น.
- ชุตินันท์ รัตนไพฑูรย์สวัสดิ์. 2547. การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- ชูศักดิ์ แสงธรรม. 2541. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. พิมพ์ครั้งที่ 3. ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ. 86 น.
- โชติ สหกิจรุ่งเรือง. 2533. ผลของการใช้อาหารชนิดต่างๆที่มีต่อคุณสมบัติบางประการของน้ำและอัตราการรอดของกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon fabricius*). วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ไตรรัตน์ สุนทรประภัสสร. 2541. ปัญหากุ้งกุลาดำที่ต้องเร่งแก้ไข. หนังสือพิมพ์เดลินิวส์ วันอาทิตย์ที่ 27 ธันวาคม พ.ศ. 2541 น.11.

ชรณัณชัย สว่างวรรณ. 2546. การผลิตอาหารกุ้งกุลาดำวัยอ่อนจากของเหลือทิ้งปลาทูน่า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ธารารัตน์ ศุภศิริ. 2542. PROBIOTIC : แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์. 53(6): 357 – 360.

นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ฟีนี พับลิชชิ่ง, กรุงเทพฯ. 159 น.

นิรนาม. 2545. วัตถุดิบที่ใช้ในอาหารสัตว์สำเร็จรูป. แหล่งที่มา: <http://www.thaiformzone.com>, 22 มีนาคม 2545.

นิราศ กิ่งวาที. 2546. การใช้สารดูดความชื้นในการปรับปรุงคุณภาพลัมปะรดเชื่อมอบแห้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

บรรจง เทียนส่งรัมย์. 2529. การเพาะเลี้ยงกุ้งทะเล. อักษรเจริญทัศน์, กรุงเทพฯ. 101 น.

เบญจมาศ จันทะภา. 2539. อัตราส่วนระหว่างโปรตีนและพลังงานที่เหมาะสมในอาหารกุ้งกุลาดำ *Penaeus monodon* วัยรุ่น. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

เบญจมินทร์ ทองเปิง. 2547. การเลี้ยงกุ้งกุลาดำแบบยั่งยืน. ฐานเกษตรกรรม, กรุงเทพฯ. 126 น.

ประจวบ หล้าอุบล และ สุนันท์ ภักธจินดา. 2531. การเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 143 น.

พุทธ ส่องแสงจินดา. 2545. การจัดการสารประกอบไนโตรเจนในฟาร์มเลี้ยงกุ้งระบบปิด. กลุ่มวิจัย
วิศวกรรมเพาะเลี้ยงและสิ่งแวดล้อม, ศูนย์วิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงกุ้งทะเลฝั่งอ่าว
ไทย, กรมประมง. แหล่งที่มา :
http://www.kungthai.com/KungThai/con_detail.php?id=32, 12 ธันวาคม 2546.

ภาวิณี คณาสวัสดิ์. 2531. การตรึงไนโตรเจน. ภาควิชาเคมี. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัย
เชียงใหม่, เชียงใหม่. 211 น.

มะลิ บุญรัตน์ผลิน. 2531. อาหารและการให้อาหารกุ้งกุลาดำ. สำนักพิมพ์ขอนแก่น, กรุงเทพฯ.
65 น.

วลัยพร ทิมบุญธรรม. 2544. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในการเลี้ยงกุ้ง
ก้ามกราม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศุภชัย ประพัศพร. 2538. แบคทีเรียในดินบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำและการดื้อยาของเชื้อ *Vibrio* spp. ต่อยา
ต้านจุลชีพ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 174 น.

ศุภมาส พนิชศักดิ์พัฒนา. 2539. ภาวะมลพิษของดินจากการใช้สารเคมี. คณะเกษตร.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 327 น.

ศรัณย์ รักษาพรหมณ์. 2539. การศึกษาโรคของกุ้งกุลาดำ คุณสมบัติของน้ำและชนิดของแพลงก์
ตอนในบ่อเลี้ยงเลี้ยงด้วยน้ำความเค็มต่ำ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตร
ศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สมใจ ศิริโชค. 2545. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ภาควิชาชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์.
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ. 339 น.

สมบัติ ขอทวีวัฒนา. 2527. กรรมวิธีการอบแห้ง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 65 น.

สุกิจ รัตนวิญญู, สรรเสริญ ช่อเจียง และ พูนสิน พานิชสุข. 2537 . การเลี้ยงกุ้งกุลาดำด้วยน้ำที่
ปรับปรุงสภาพ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 22/2537, สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรม
ประมง, นครศรีธรรมราช. 14 น.

สุริยรัตน์ เงินดวง. 2545. การศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมัก.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อาบชัย ชาญอุตร. 2542. การผลิตโปรปิโอนิกโดยระบบการตรึงเซลล์จาก **PROPIONI
BACTERIUM JENSENII KU 0001** ที่แยกจากอาหารหมักไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญา
โท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อุไรลักษณ์ พงษ์เกษ. 2548. การพัฒนาผลิตภัณฑ์จุลินทรีย์โปรไบโอติกเพื่อการเลี้ยงกุ้ง.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Adachi, O., K. Okamoto, K. Matsushita, E. Shinakawa and M. Ameyama. 1990. An Enzyme
Catalyzing Liberation of Pyrroloquinoline Quinone (PQQ) from PQQ-Adducts.
Agri. Biol. Chem. 54 : 2481 – 2483.

AlHendy, A., G.Hortelano, G.S. Tannenbeum and P.L. Chang. 1996. Growth retardation-an
unexpected outcome from growth hormone gene therapy in normal mice with
microencapsulation myoblasts. **Hum.Gene.Ther.** 7: 61-70.

Ameyama, M., E. Shinakawa, K. Matsushita and O. Adachi. 1985. Growth Stimulating
Activity for Microorganism in Naturally Occurring Substance and Partial
Characterization of the Activity as Pyrroloquinoline Quinone(PQQ). **Agr. Biol. Chem.**
49(3) : 699 – 709.

Aral, C. and J. Akbuğa. 1998. Alternative approach to the preparation of chitosan beads. **Int. J.
Pharm.** 168: 9-15.

- Ariga, O., H. Toyofuka, I. Minegishi, T. Hattori, Y. Sano and M. Nagura. 1997. Efficient production of recombinant enzymes using PVA-encapsulated bacteria . **J. Ferment Bioengg.** 84: 553-557.
- Audet, P., C. Paquin and C. Lacroix. 1988. Immobilized growing lactic acid bacteria with K-carrageenan – locust bean gum gel. **Appl. Microbial. Biotechnol.** 29: 11-18.
- Bekers, M., J. Laukevics, A. Karsakevich, E. Ventina, E. Kaminasaka, D. Upite, I. Vina, R. Linda and R. Scherbaka. 2001. Levan-ethanol biosynthesis using *Zymomonas mobilis* cells immobilized by attachment and entrapment . **Proc. Biochemis.** 36:979-986.
- Boyd, C.E. 1982. **Water quality management for brackishwater ponds with emphasis on shrimp farming in Thailand (manual prepared for the Asian Development Bank).** Auburn, Alabama. 60 p.
- Bučko, M., A. Vikartovská, I. Lacík, G. Kollarikova, P. Gemeiner, V. Patoprsty and M. Brygin. 2005. Immobilization of a whole-cell epoxide-hydrolyzing biocatalyst in sodium alginate-cellulose sulfate-poly(methylene-co-guanidine) capsules using a controlled encapsulation process. **Enz. Microbial. Technol.** 36: 118-126.
- Canizares, R.O., L. Rivas, C. Montes, A.R. Dominguez, L. Travieso and F. Benitez. 2003. Aerated swine-wastewater treatment with K-carrageenan immobilized *Spirulina maxima*. **Biosource Technol.** 51: 111-116.
- Chan, L.W., H.Y. Lee and P.W.S. Heng. 2002. Production of alginate microsphere by internal gelation using and emulsification method. **J. Non-crystalline Solids.** 350: 290-298.
- Chandramouli, V., K. Kailasapathy, P. Peiris and M. Jones. 2004. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. In simulated gastric condition. **J. Microbiol. Method.** 56:27-35.

Chaplin, M. 2005. Alginate. **Water structure and behavior**. Available Source:

<http://www.Isbu.ac.uk/water/hycar.htm>, February 3, 2006.

_____. 2005. Carrageenan. **Water structure and behavior**. Available Source:

<http://www.Isbu.ac.uk/water/hycar.htm>, February 5, 2006.

Chen, H.C. 1985. Water quality criteria for farming the giant shrimp, *Penaeus monodon*, p165. In Y. Taki, J.H. Primavera and J.A. Llobvera(eds.). **Proceeding of the First International Conference on the Culture of Penaeid Prawns/Shrimps**. Aquaculture Department, SEAFDEC, Iloilo, Philippines.

Chen, J.C. and T.S. Chin. 1988. Acute toxicity of nitrite to tiger prawn *Penaeus monodon*, larvae. **J. Aqua**. 69: 253-262.

Chiang, L.C., H.Y. Hsiao, M.C. Flickinger, L.F. Chen and G.T. Tsao. 1982. Ethanol production from pentoses by immobilized microorganisms. **Enz. Microbial. Technol.** 4: 93-95.

Chicheportiche, D. and G. Reach. 1988. In vitro kinetics to insulin release by microencapsulated rat islet: effect of size of the microencapsules. **Diabetologia**. 31: 54-57.

Chin, T.S. and J.C. Chen. 1988. Acute toxicity of ammonia to tiger prawn *Penaeus monodon*, larvae. **J. Aqua**. 66: 247-253.

Cirone, P., J.M. Bourgeois and P.L. Chang. 2003. Antiangiogenic cancer therapy with microencapsulated cells. **Hum. Gene. Ther.** 14: 1065-1077.

Cui, L.Y., A.D. Qi, W.G. Liu, X.H. Wang, H. Wang, D.M. MA and K. De Yao. 2003. Biomimetic surface modification of poly(L-lactic acid) with chitosan and its effects on articular chondrocytes in vitro. **J. Biomat**. 24: 3859-3868.

- Genta, I., P. Perugini, B. Conti and F. Pavanetto. 1997. A multiple emulsion method to entrap a lipophilic compound into chitosan microspheres. **Int. J. Pharm.** 152 : 237 – 246.
- Groboillot, A.F., C.P. Champagne, G.D. Darling and D. Poncelet. 1993. Membrane Formation by Interfacial Cross-Linking of Chitosan for Microencapsulation of *Lactobacillus lactis*. **Biotech. Bioeng.** 42 : 1157 - 1163
- Hahn-Hagerdel, B. and B. Mattiasson. 1982. Azide sterilization of fermentation media. **Eur. J. Appl. Microbial. Biotechnol.** 14: 140-143.
- Hattori, T. and C. Furusaka. 1959. Chemical activity of *Escherichia coli* adsorbed on resin. **Biochem. Biophys. Acta.** 31(2) : 581 – 582.
- Hino, T., Y. Kawashima and S. Shimabayashi. 2000. Basic study for stabilization of w/o/w emulsion and its application to transcatheter arterial embolization therapy. **Adv. Drug. Deliver.** 45 : 27 – 45.
- Hsieh, C.H., N.H. Chao, D. Oliviala, L.A. Gomes and I.C. Liao. 1989. **Culture practices and status of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii*, in Taiwan.** Paper presented at the third Brazilian shrimp farming congress. Joao Pessoa-PB. Brazil. (15-20 October) : 25 p. (Unpublished Manuscript). Quoting New, M.B. 1990. Freshwater prawn culture : A review. *Aquaculture* 88 : 99-144.
- Jumaa Muhannad and Bernd W. Muller. 1999. Physicochemical properties of chitosan-lipid emulsion and their stability during the autoclaving process. **Int. J. Pharm.** 183 : 175 – 184.

- Jumaa Muhannad, Franz H. Furkert and Bernd W. Muller. 2001. A new lipid emulsion formation with high antimicrobial efficacy using chitosan. **Eu. J. Pharm. Biopharm.** 53 : 115 – 123.
- Kaya, M.V. and G. Picard. 1999. Stability of chitosan gel as entrapment matrix of viable *Scenedesmus bicellularis* cell immobilized on screens for tertiary treatment of wastewater. **Biores. Technol.** 56: 147-155.
- Ket, E.P.W., E.A. Galinski and J.A.M. De Bont .1994. Carnitine a novel compatible solute in *Lactobacillus plantarum*. **Archives in Microbiol.** 162: 243-248.
- Ket, E.P.W. and J.A.M. De Bont .1994. Protective effect of betain on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying. **FEMS. Microbiol. Lett.** 116: 251-256.
- Kolot, F.B. 1981. Microbial carriers strategy for selection. **Process Biochem.** 16: 2 – 9.
- Koyama, K. and M. Seki. 2004. Cultivation of yeast and plant cells entrapped in the low-viscous liquid-core of an alginate membrane capsule prepared using polyethylene glycol. **Biosc. Bioeng.** 97: 111-118.
- Krasaekoopt, W., B. Bhandari and H. Deeth. 2002. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **Int. Dairy. J.** 13: 3 – 13.
- _____. 2004. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **Int. Dairy. J.** 14 : 737 – 743.
- Kurazatkowski, W., W. Kurylowicz and A. Paszkiewicz. 1982. Penicillin G production by immobilized fungal vesicles. **Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.** 15: 211-213.

- Langrene, S., S. Sicsic and F. Le Goffic. 2002. Entrapment of L-tryptophan producing *Escherichia coli* in different materials: activity of immobilized cell. **J. Enz. Microbial. Technol.** 6: 81-84.
- Larisch, B.C., D. Poncelet and C.P.Champagne. 1994. Microencapsulation of *Lactobacillus lactis* ssp. Cremoris. **J. Microencap.** 11: 189-195.
- Laugel, C.,P. Chaminade, A. Baillet, M. Seiller and D. Ferrier. 1996. Moisturizing substances entrapped in w/o/w emulsions : analytical methodology for formulation stability and release studied. **J. Control . Release.** 38 : 59 – 67.
- Leblond, F.A., G. Simard, N. Henley, B. Rocheleau, P.M. Huet and J.P. Halle. 1999. Studies on smaller microencapsules: IV Feasibility and safety of intrahepatic implantation of small alginate poly-l-lysine microencapsules. **Cell transplant.** 8: 327-337.
- Linder, L.T.M., G. Meerdink and K. Van't Riet. 1997. Effect of growth parameters on the residual activity of *Lactobacillus plantarum* after drying. **J. Appl. Microbiol.** 82: 683-688.
- Lieverse, L.C., M.A.M. Verbeek, G. Meerdink and K. Van't Riet. 1990b. Inactivation of *Lactobacillus plantarum* during drying.I Measurement and modeling of drying process. **Biosepar.** 1: 149-159.
- Lopez, A., N. Lazaro and M. Marques. 1997. The interphase technique: a simple method of cell immobilization in gel bead. **J. Microbiol.** 30 : 231-234.
- Macquarrie, D.J. 2004. Chitosan. **Materials Chemistry.** Available Source: <http://www.york.ac.uk/depts/chem/staff/djm.htm>, March 1, 2006.

- Malm, C. J., J. Emerson and G.D. Hiatt. 1951. Cellulose acetate phthalate as an enteric-coating material. **J. Amer. Pharm. Assoc. Sci.** 10: 520 – 525.
- Milne, M.D., B.H. Scribner and M.A. Crawford. 1988. Non-ionic diffusion and the excretion of weak acid and bases. **Amer. J. Med.** 24 : 709 – 729.
- Misha, S. and T. Rai. 2006. Morphology and functional properties of corn, potato and tapioca starches. **Food hydrocolloids.** 20 : 557 – 566.
- Miyazaki, Y., K. Ogihara, S. Yakou, T. Nagai and K. Takayama. 2003. In vitro and in vivo evaluation of mucoadhesive microspheres consisting of dextran derivatives and cellulose acetate butyrate. **Int. J. Pharm.** 258 : 21 – 29.
- Orive, G., R.M. Hernandez, A.R. Gascon, R. Calafiore, T.M.S. Chang and P. De Vos. 2003. Cell encapsulation : promise and progress. **Nat. Med.** 9: 104-107.
- Para, G. and J. Baratti. 2002. Synthesis of L-Dopa by *Escherichia intermedia* cell immobilized in a carrageenan gel. **Enz. Microbial. Technol.** 20: 446-452.
- Paik, H.D. and B.A. Glatz. 1994. Propionic acid production by immobilized cells of a propionate-tolerant strain of *Propionibacterium acidopropionici*. **Appl. Biochem.** 47: 65-69.
- Prescott, S.C. and C.G. Dunn. 1959. **Industry Microbiology**. 3rd ed., Kogakushi Co., Ltd., Tokyo. 78 p.
- Rao, A.V., N. Shiwnarain and I. Maharaj. 1989. Survival of Microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in Simulated Gastric and Intestinal Juices. **J. Inst. Food. Sci. Technol.** 22 : 345 – 349.

- Read, T.A., D.R. Sorensen, R. Mahesparan, P.Q. Enger, R. Timpl, B.R. Olsen, M.H.B. Hjelstuen, O. Haraldseth and R. Bjerkvig. 2001. Local endostatin treatment of gliomass administered by microencapsulated producer cells. **Nat. Biotechnol.** 19: 29-34.
- Rengpipat, S., S. Rukpratanporn, S. Piyathitivorakul and P. Menaswet. 2000. Immunity Enhancement in Black Tiger Shrimp (*P. monodon*) by a Probiotic bacterium (*Bacillus S-11*). **Aquaculture.** 191 : 271 – 288.
- Rodriguez, M.S., L.A. Albertengo and E. Agullo. 2002. Emulsification capacity of chitosan. **Carbohydrate polymer.** 48 : 271 – 276.
- Sheu, T.S. and R.T. Marshall. 1993. Microentrapment of Lactobacilli in Calcium Alginate Gels. **J. Food. Sci.** 54 : 557 – 561.
- Shiguene, K.. 1975. **Shrimp culture in Japan**. Association for International Technical Promotion, Tokyo, Japan. 153 p.
- Singh, N., L. Kaur, K.S. Sandhu, J. Kaur and K. Nishinari. 2006. Relationships between physicochemical, morphological, thermal, rheological properties of rice starches. **Food hydrocolloids.** 20: 532-542.
- Sinha, V.R., A.K. Singla, S. Wachawan, R. Kaushik, R. Kumria, K. Bansal and S. Dhawan. 2004. Chitosan microspheres as a potential carrier for drug. **Int. J. Pharm.** 274: 1-33.
- Smith, C.E. and W.G. Williams. 1974. Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. **Trans. Amer. Fish. Soc.** 103 : 389 – 390.
- Sonomoto, K., N. Chinachoti, N. Endo and A. Ishizaki. 2000. Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. **J. Molec. Catalysis B: Enzymatic.** 10:325-334.

- Stanley, V.G., R. Ojo, S. Woldeesenbet and D.H. Hutchisson. 1993. The Use of *Saccharomyces cerevisiae* to Suppress the Effects of Aflatoxicosis in Broiler Chicks. **Poultry. Sci.** 72 : 1867 – 1872.
- Stenroos, S.L., Y.Y. Linko and P. Linko. 1982. Production of L-lactic acid with immobilized *Lactobacillus delbrueckii*. **Biotechnol. Lett.** 4: 159-164.
- Stiles, M.E. and W.H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy : a review. **Int. J. Food Microbiol.** 36: 1-29.
- Stromo, K.E. and R.L. Crawford. 1992. Preparation of encapsulated microbial cells for environmental applications. **Appl. Environment. Microbiol.** 58: 727-730.
- Sugura, S., T. Oda, Y. Izumida, Y. Aoyagi, M. Satake, A. Ochiai, N. Ohkohchi and M. Nakajima. 2005. Size control of calcium alginate bead containing living cells using micro nozzle array. **Biomaterial.** 26: 3327-3331.
- Takata, I., T. Tosa and I. Chibata. 1977. Immobilized-cell carrageenan bead production and brewing process utilizing carrageenan bead immobilized yeast cells. **J. Solid – Phase Biochem.** 2: 225-236.
- Tittsler, R.P. , C.S. Pederson, E.E. Snell, D. Handlin and C.F. Niver, Jr. 1952. Symposium on the lactic acid bacteria . **Bact. Rev.** 16: 227-260.
- Tsen, J.H., Y.P. Lin and V. An-Erl King. 2003. Fermentation of banana media by using K-carrageenan immobilized *Lactobacillus acidophilus*. **Int. J. Food Microbiol.** 91: 215-220.
- Vorlop, K.D. and J. Klein. 1987. Entrapment of microbial cells in chitosan. **Meth. Enz.** 135 : 259 – 268.

- Veliky, I.A. and R.E. Williams. 1981. The production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized in polycation stabilized calcium alginate gels. **Biotechnol. Lett.** 33: 275-280.
- Wickins, J.F.. 1976. Prawn culture biology and culture. **Oceangr. Mar. Biol. Ann. Rev.** 14 : 435 – 507.
- Yalkowsky, S.H. 1981. Cellulose acetate phthalate. **Solubility II**. Available Source: [http://www.pharmacy.wsu.edu/solubility% 2011.3.htm](http://www.pharmacy.wsu.edu/solubility%2011.3.htm), March 1, 2006.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ทดลอง

1. อาหารเหลวแลคโตบาซิลลัส เอ็ม อาร์ เอส (Lactobacillus MRS broth)

peptone	10.0	กรัม
beef extract	10.0	กรัม
yeast extract	5.0	กรัม
dextrose	20.0	กรัม
tween 80	1.0	มิลลิลิตร
ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
di-potassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Bromcresolpurple	0.004%	

ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ค่ากรด-ด่างของอาหารอยู่ในช่วง 6.2 – 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ถ้าต้องการอาหารแข็งเติมวุ้นผง 15 กรัม ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1,000 มิลลิลิตร

2. อาหารนิวเทรียน (Nutrient broth)

peptone	5.0	กรัม
beef extract	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ถ้าต้องการอาหารแข็งเติมวุ้นผง 15 กรัม ต่ออาหาร 1,000 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อไวรัส (TCBS agar)

yeast extract	5.0	กรัม
tripteine	5.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
sodium citrate	10.0	กรัม
sodium thiosulphate	10.0	กรัม
oxgall	8.0	กรัม
sucrose	20.0	กรัม
sodium chloride	10.0	กรัม
ferric citrate	1.0	กรัม
thymolblue	0.04	กรัม
bromothymoblue	0.04	กรัม
agar	15.0	กรัม

นำมาละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และนำไปฆ่าเชื้อโดยการต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 – 15 นาที

การเตรียมสารเคมี

1. การเตรียมสารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์

ซังโซเดียมอัลจิเนต 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการกวนเบาๆ นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

2. การเตรียมสารละลายไคโตซาน 1 เปอร์เซ็นต์

ละลายไคโตซาน 1 กรัม ในสารละลายกรดแอซิดิกเข้มข้น 0.5 โมลาร์ ปริมาตร 85 มิลลิลิตร กวนสารละลายให้ผสมกันที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมแอซิดิกเข้มข้น 0.9 นอร์มอล ลงไป 10 มิลลิลิตร เพื่อทำน้ำที่เป็นบัฟเฟอร์ ต่อมาทำการปรับค่ากรด-ด่างของสารละลายไคโตซานให้ได้ 5.6 – 6 เพื่อป้องกันการตกตะกอนของไคโตซานโดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร และกรองไคโตซานที่ไม่ละลายออกด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แล้วทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

3. การเตรียมสารละลายคาร์ราจีแนน 2 เปอร์เซ็นต์

ในการทดลองใช้คาร์ราจีแนนเกรดระดับอุตสาหกรรมอาหาร 2 กรัม ละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส จนกระทั่งคาร์ราจีแนนละลายหมด จึงนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

4. การเตรียมสารละลายเซลลูโลส แอซีเตต พทาเลต 10 %

เซลลูโลส แอซีเตต พทาเลต 10 กรัม จะถูกนำมาละลายในสารละลายผสมระหว่างสารละลายอะซิโตนเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และสารละลายเอทานอลเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนการผสม 9 : 1 ตามลำดับ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจนกว่าเซลลูโลส แอซีเตต

พทาเลต จะละลายหมด นำไปนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง

5. การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0

1. เตรียมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมฟอสเฟต 27.8 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

2. เตรียมสารละลายไคโซเดียมฟอสเฟตความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่งไคโซเดียมฟอสเฟต 53.56 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร

3. นำสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อที่ 1 ปริมาตร 39 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 2 ปริมาตร 61 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 200 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 ที่ได้ไปนั่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์

1. การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก โดยใช้เทคนิค serial ten fold dilution

ดูดหรือชั่งตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรหรือ 1 กรัม เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำการเจือจางตัวอย่างลงลำดับละ 10 เท่า โดยใช้ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่าง 1:10 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายเจือจาง 9 มิลลิลิตร ความเจือจางที่ได้เท่ากับ 1:100 เตรียมสารละลายตัวอย่างให้ได้ตามระดับความเจือจางที่ต้องการโดยวิธีการเดียวกัน ในการทดลองควรเปลี่ยนปิเปตใหม่ทุกครั้งเมื่อเปลี่ยนระดับการเจือจาง จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างที่ต้องการ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS ที่เติมบรอมครีซอลเพอเฟิลเป็นอินดิเคเตอร์ ใช้แท่งแก้วอเกลี่ยให้ทั่วจนผิวหน้าอาหารแห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกโดยดูจากโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง 1 โคโลนีคือ แบคทีเรียกรดแลกติก 1 เซลล์ นำจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกที่ตรวจพบคูณกับค่า Dilution factor รายงานผลที่ได้เป็นเซลล์ต่อมิลลิลิตร (colony forming unit) หรือเซลล์ต่อกรัมของตัวอย่าง

2. การหาปริมาณความชื้นโดยวิธีการอบแห้งวิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC (1990)

2.1 การเตรียมภาชนะอะลูมิเนียม

2.1.1 เตรียมตู้อบไฟฟ้า โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 105 องศาเซลเซียส

2.1.2 นำภาชนะอะลูมิเนียม พร้อมฝาปิด อบให้แห้งในตู้อบไฟฟ้าที่เตรียมเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ในระหว่างการอบแง้ฝาเล็กน้อย)

2.1.3 นำภาชนะอะลูมิเนียมมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในเดสิเคเตอร์ที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้คีมคีบ จากนั้นนำไปชั่งน้ำหนัก จดน้ำหนักที่ได้

2.1.4 ทำการทดลองซ้ำจากข้อ 1-3 จนผลต่างของน้ำหนักที่ชั่งได้ 2 ครั้งติดกันไม่มากกว่า 1 มิลลิกรัม

2.1.5 จดน้ำหนักที่แน่นอนครั้งสุดท้ายของภาชนะอะลูมิเนียม ด้วยเครื่องชั่ง
ละเอียด 4 ตำแหน่ง

2.2 การหาปริมาณความชื้นตัวอย่าง

2.2.1 ชั่งน้ำหนักตัวอย่างประมาณ 2-5 กรัม ให้ทราบน้ำหนักที่แน่นอนใส่ลงใน
ภาชนะอะลูมิเนียมพร้อมฝาปิด

2.2.2 จากนั้นดำเนินการทดลองเหมือนหัวข้อ 2.1 ในข้อ 2 ถึงข้อ 5 น้ำหนักที่จดได้
ครั้งสุดท้าย

2.3 การคำนวณ

$$\text{ปริมาณความชื้น(เปอร์เซ็นต์)} = \frac{[W_1 - W_2] \times 100}{W_1 - W}$$

เมื่อ W คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียม

W_1 คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมรวมกับน้ำหนักของตัวอย่างก่อนอบ เป็นกรัม

W_2 คือ น้ำหนักของถ้วยอะลูมิเนียมรวมกับน้ำหนักของตัวอย่างอบแห้ง เป็นกรัม

ภาคผนวก ค
ข้อมูลจากการทดลอง

ตารางผนวกที่ ค1 น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อที่ติดอยู่ที่ตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ ของสารพาหะทั้ง 3 ชนิด

สารพาหะ	Mesh no.	เส้นผ่าศูนย์กลาง รูตะแกรง (มิลลิเมตร)	น้ำหนักเฉลี่ย ของเม็ดเชื้อ (กรัม)	สัดส่วน น้ำหนักเม็ดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักเปียกรวม ของเม็ดเชื้อ (กรัม)	ปริมาณเซลล์ที่ถูกปล่อย (cfu /g wet weight)
โซเดียมอัลจิเนต	14	1.400	3.33	15.00 ± 1.30	22.76	3.22×10^{10}
	18	1.000	5.21	23.00 ± 8.82		
	25	0.710	8.42	37.00 ± 4.53		
	40	0.425	2.56	11.00 ± 4.22		
	80	0.180	2.20	9.00 ± 3.79		
	120	0.125	1.04	5.00 ± 2.67		
ไคโตซาน	14	1.400	0.76	6.00 ± 1.96	12.98	7.25×10^5
	18	1.000	0.92	7.00 ± 2.17		
	25	0.710	1.76	14.00 ± 0.76		
	40	0.425	1.98	15.00 ± 1.85		
	80	0.180	4.81	37.00 ± 8.93		
	120	0.125	2.75	21.00 ± 8.12		

ตารางผนวกที่ ๑1 (ต่อ)

สารพาหะ	Mesh no.	เส้นผ่าศูนย์กลาง รูตะแกรง (มิลลิเมตร)	น้ำหนักเฉลี่ย ของเม็ดเชื้อ (กรัม)	สัดส่วน น้ำหนักเม็ดเชื้อ (เปอร์เซ็นต์)	น้ำหนักเปียกรวม ของเม็ดเชื้อ (กรัม)	ปริมาณเซลล์ที่ถูกปล่อย (cfu /g wet weight)
คาร์ราจีแนน	14	1.400	21.64	63.00 ± 10.03	34.11	8.61×10^8
	18	1.000	10.46	30.00 ± 2.28		
	25	0.710	1.60	5.00 ± 1.20		
	40	0.425	0.41	2.00 ± 0.91		
	80	0.180	-	-		
	120	0.125	-	-		

ตารางผนวกที่ ค2 น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจินต 1 เปอร์เซ็นต์ สภาพการทดลองที่ 1

Mesh no	เส้นผ่าศูนย์กลางของ รูตะแกรง (มิลลิเมตร)	สารละลายโซเดียมอัลจินต 1.0 เปอร์เซ็นต์					
		ความเร็ว 400 รอบต่อนาที		ความเร็ว 600 รอบต่อนาที		ความเร็ว 800 รอบต่อนาที	
		น้ำหนักเฉลี่ยของ	สัดส่วนโดย	น้ำหนักเฉลี่ยของ	สัดส่วนโดย	น้ำหนักเฉลี่ยของ	สัดส่วนโดย
		เม็ดเชื้อ	น้ำหนัก	เม็ดเชื้อ	น้ำหนัก	เม็ดเชื้อ	น้ำหนัก
		(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)	(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)	(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)
14	1.400	1.19	7.00 ± 1.45	2.00	12.00 ± 0.76	1.53	10.00 ± 8.22
18	1.000	7.79	44.00 ± 25.04	7.95	48.00 ± 0.59	6.34	41.00 ± 8.82
25	0.710	4.25	24.00 ± 8.88	3.55	21.00 ± 8.13	4.27	27.00 ± 9.13
40	0.425	2.61	15.00 ± 6.78	1.77	10.00 ± 2.88	1.49	10.00 ± 2.10
60	0.250	1.14	7.00 ± 2.91	0.78	5.00 ± 1.35	1.17	8.00 ± 0.27
120	0.125	0.53	3.00 ± 1.08	0.65	4.00 ± 0.34	0.69	4.00 ± 1.46
รวม	-	17.51	100	16.70	100	15.49	100

ตารางผนวกที่ ค3 น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจินต 2 เปอร์เซ็นต์ สภาวะการทดลองที่ 1

Mesh no	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของรูตะแกรง (มิลลิเมตร)	สารละลายโซเดียมอัลจินต 2.0 เปอร์เซ็นต์					
		ความเร็ว 400 รอบต่อนาที		ความเร็ว 600 รอบต่อนาที		ความเร็ว 800 รอบต่อนาที	
		น้ำหนักเฉลี่ยของ	สัดส่วนโดย	น้ำหนักเฉลี่ยของ	สัดส่วนโดย	น้ำหนักเฉลี่ยของ	สัดส่วนโดย
		เม็ดเชื้อ (กรัม)	น้ำหนัก (เปอร์เซ็นต์)	เม็ดเชื้อ (กรัม)	น้ำหนัก (เปอร์เซ็นต์)	เม็ดเชื้อ (กรัม)	น้ำหนัก (เปอร์เซ็นต์)
14	1.400	7.38	29.00 ± 4.19	4.12	17.00 ± 3.49	2.14	8.00 ± 5.98
18	1.000	5.44	21.00 ± 8.53	9.14	38.00 ± 1.34	7.35	28.00 ± 9.20
25	0.710	2.77	11.00 ± 6.19	4.73	19.00 ± 6.69	9.98	38.00 ± 1.50
40	0.425	3.83	15.00 ± 7.75	3.28	14.00 ± 4.19	3.81	14.00 ± 3.77
60	0.250	2.78	11.00 ± 1.28	1.72	7.00 ± 3.02	1.77	7.00 ± 2.37
120	0.125	3.15	13.00 ± 1.73	1.33	5.00 ± 2.14	1.21	5.00 ± 2.26
รวม	-	25.35	100	24.32	100	26.26	100

ตารางผนวกที่ ค4 น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ สภาพการทดลองที่ 1

Mesh no	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของรูตะแกรง (มิลลิเมตร)	สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3.0 เปอร์เซ็นต์					
		ความเร็ว 400 รอบต่อนาที		ความเร็ว 600 รอบต่อนาที		ความเร็ว 800 รอบต่อนาที	
		น้ำหนักเฉลี่ยของ เม็ดเชื้อ	สัดส่วนโดย น้ำหนัก	น้ำหนักเฉลี่ยของ เม็ดเชื้อ	สัดส่วนโดย น้ำหนัก	น้ำหนักเฉลี่ยของ เม็ดเชื้อ	สัดส่วนโดย น้ำหนัก
		(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)	(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)	(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)
14	1.400	9.43	31.00 ± 7.26	4.49	15.00 ± 3.85	2.06	6.00 ± 1.95
18	1.000	6.90	23.00 ± 8.79	10.11	34.00 ± 4.76	11.20	34.00 ± 1.48
25	0.710	5.34	18.00 ± 3.05	6.40	21.00 ± 4.75	10.34	32.00 ± 2.31
40	0.425	3.15	10.00 ± 2.17	3.62	12.00 ± 1.24	5.54	17.00 ± 1.12
60	0.250	2.90	9.00 ± 1.67	2.88	10.00 ± 3.05	1.96	6.00 ± 3.09
120	0.125	2.84	9.00 ± 0.60	2.24	8.00 ± 3.33	1.44	5.00 ± 2.13
รวม	-	30.56	100	29.74	100	32.54	100

ตารางผนวกที่ ค5 น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 1 เปอร์เซ็นต์ สภาวะการทดลองที่ 2

Mesh no	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของรูตะแกรง (มิลลิเมตร)	สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 1.0 เปอร์เซ็นต์					
		ความเร็ว 400 รอบต่อนาที		ความเร็ว 600 รอบต่อนาที		ความเร็ว 800 รอบต่อนาที	
		น้ำหนักเฉลี่ยของ เม็ดเชื้อ	สัดส่วนโดย น้ำหนัก	น้ำหนักเฉลี่ยของ เม็ดเชื้อ	สัดส่วนโดย น้ำหนัก	น้ำหนักเฉลี่ยของ เม็ดเชื้อ	สัดส่วนโดย น้ำหนัก
		(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)	(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)	(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)
14	1.400	4.35	27.00 ± 5.67	7.19	37.00 ± 3.40	1.54	9.00 ± 7.89
18	1.000	4.88	30.00 ± 8.46	7.71	40.00 ± 2.03	6.95	43.00 ± 3.21
25	0.710	2.34	14.00 ± 5.93	1.90	10.00 ± 0.50	5.50	34.00 ± 0.17
40	0.425	1.89	12.00 ± 4.80	1.44	7.00 ± 1.37	1.51	9.00 ± 2.43
60	0.250	1.73	11.00 ± 1.57	0.74	3.00 ± 1.30	0.48	3.00 ± 2.16
120	0.125	1.01	6.00 ± 1.44	0.54	3.00 ± 0.36	0.33	2.00 ± 0.26
รวม	-	16.20	100	19.52	100	16.31	100

ตารางผนวกที่ ๑๖ น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2 เปอร์เซ็นต์ สภาพการทดลองที่ 2

Mesh no	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของรูตะแกรง (มิลลิเมตร)	สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2.0 เปอร์เซ็นต์					
		ความเร็ว 400 รอบต่อนาที		ความเร็ว 600 รอบต่อนาที		ความเร็ว 800 รอบต่อนาที	
		น้ำหนักเฉลี่ยของ เม็ดเชื้อ	สัดส่วนโดย น้ำหนัก	น้ำหนักเฉลี่ยของ เม็ดเชื้อ	สัดส่วนโดย น้ำหนัก	น้ำหนักเฉลี่ยของ เม็ดเชื้อ	สัดส่วนโดย น้ำหนัก
		(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)	(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)	(กรัม)	(เปอร์เซ็นต์)
14	1.400	9.54	34.00 ± 2.31	8.59	26.00 ± 2.51	3.76	12.00 ± 2.96
18	1.000	4.33	15.00 ± 1.36	12.82	39.00 ± 3.24	9.59	31.00 ± 2.41
25	0.710	3.49	12.00 ± 0.45	7.39	22.00 ± 6.42	12.83	41.00 ± 0.41
40	0.425	3.37	12.00 ± 3.17	2.35	7.00 ± 0.17	3.19	10.00 ± 4.65
60	0.250	4.38	16.00 ± 3.67	1.27	4.00 ± 1.92	0.84	3.00 ± 0.91
120	0.125	2.97	11.00 ± 1.82	0.79	2.00 ± 0.47	0.87	3.00 ± 0.49
รวม	-	28.08	100	33.21	100	31.08	100

ตารางผนวกที่ ๗7 น้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดเชื้อซึ่งตกค้างบนตะแกรงร่อนขนาดต่างๆ เมื่อใช้สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 3 เปอร์เซ็นต์ สภาวะการทดลองที่ 2

Mesh no	เส้นผ่าศูนย์กลาง ของรูตะแกรง (มิลลิเมตร)	สารละลายโซเดียมอัลจิเนต 2.0 เปอร์เซ็นต์					
		ความเร็ว 400 รอบต่อนาที		ความเร็ว 600 รอบต่อนาที		ความเร็ว 800 รอบต่อนาที	
		น้ำหนักเฉลี่ยของ	สัดส่วนโดย	น้ำหนักเฉลี่ยของ	สัดส่วนโดย	น้ำหนักเฉลี่ยของ	สัดส่วนโดย
		เม็ดเชื้อ (กรัม)	น้ำหนัก (เปอร์เซ็นต์)	เม็ดเชื้อ (กรัม)	น้ำหนัก (เปอร์เซ็นต์)	เม็ดเชื้อ (กรัม)	น้ำหนัก (เปอร์เซ็นต์)
14	1.400	10.53	29.00 ± 2.85	6.57	18.00 ± 2.93	2.27	6.00 ± 2.04
18	1.000	11.71	33.00 ± 4.08	8.78	24.00 ± 4.45	8.63	25.00 ± 0.53
25	0.710	7.71	22.00 ± 1.15	7.48	21.00 ± 0.31	11.84	34.00 ± 4.19
40	0.425	2.25	6.00 ± 3.80	6.15	17.00 ± 1.75	7.19	21.00 ± 8.76
60	0.250	1.87	5.00 ± 2.06	4.57	13.00 ± 0.35	3.20	9.00 ± 2.16
120	0.125	1.62	5.00 ± 1.39	2.65	7.00 ± 4.30	1.68	5.00 ± 0.21
รวม	-	35.69	100	36.20	100	34.81	100

ตารางผนวกที่ ค8 ปริมาณแบคทีเรีย *L. plantarum* LP64 และความชื้นของเมล็ดเชื้อผสมแป้งข้าวเจ้า เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

เวลาการทำแห้ง (นาทีก)	อายุการเก็บ (วัน)	อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)		อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
		ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/g)	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/g)	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)
15	0	5.17×10^9	18.66 ± 0.48	5.17×10^9	18.66 ± 0.48
	7	8.47×10^8	18.80 ± 0.38	4.83×10^9	18.84 ± 0.58
	15	5.84×10^6	18.14 ± 0.18	3.68×10^9	18.69 ± 0.44
	30	8.90×10^4	19.05 ± 0.45	3.03×10^9	19.52 ± 0.58
	60	3.40×10^2	19.28 ± 0.37	2.94×10^9	19.93 ± 0.30
	90	-	19.83 ± 0.68	2.18×10^9	20.41 ± 0.39
	120	-	20.70 ± 0.26	2.38×10^8	21.92 ± 0.81
	180	-	23.18 ± 0.48	3.65×10^7	27.28 ± 0.57
30	0	6.52×10^9	9.90 ± 0.08	6.52×10^9	9.90 ± 0.08
	7	2.78×10^6	9.42 ± 0.15	7.19×10^9	9.01 ± 0.19
	15	2.06×10^6	9.54 ± 0.16	6.80×10^9	9.88 ± 1.01
	30	7.46×10^4	9.68 ± 0.15	6.54×10^9	9.83 ± 0.66
	60	3.20×10^2	9.83 ± 0.19	5.99×10^9	10.10 ± 0.67

ตารางผนวกที่ ค8 (ต่อ)

เวลาการทำแห้ง (นาท)	อายุการเก็บ (วัน)	อุณหภูมิต้อง (30 องศาเซลเซียส)		อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
		ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/g)	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/g)	ความชื้น (เปอร์เซ็นต์)
45	90	-	9.93 ± 0.21	5.49×10^9	10.48 ± 0.42
	120	-	10.54 ± 0.13	3.60×10^8	11.14 ± 0.30
	180	-	12.84 ± 0.22	6.34×10^7	13.41 ± 0.46
	0	4.50×10^9	8.70 ± 0.39	4.50×10^9	8.70 ± 0.39
	7	3.79×10^6	8.78 ± 0.41	4.45×10^9	8.02 ± 0.30
	15	1.38×10^6	8.44 ± 0.13	6.10×10^9	8.89 ± 0.06
	30	2.78×10^4	8.96 ± 0.23	5.95×10^9	9.44 ± 0.39
	60	1.90×10^2	9.32 ± 0.35	4.87×10^9	9.39 ± 0.32
	90	-	10.16 ± 0.25	3.40×10^9	10.41 ± 0.18
	120	-	10.49 ± 0.31	5.78×10^8	11.02 ± 0.59
	180	-	12.08 ± 0.38	4.12×10^7	12.28 ± 0.16

ตารางผนวกที่ ค9 ปริมาณแบคทีเรีย *L. plantarum* LP64 และความชื้นของเมล็ดเชื้อผสมแป้งมันสำปะหลัง เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

เวลาการทำแห้ง (นาท)	อายุการเก็บ (วัน)	อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)		อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
		ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต	ความชื้น	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต	ความชื้น
		(CFU/g)	(เปอร์เซ็นต์)	(CFU/g)	(เปอร์เซ็นต์)
15	0	5.84×10^9	17.08 ± 0.19	5.84×10^9	17.08 ± 0.19
	7	1.35×10^7	17.19 ± 0.18	3.19×10^9	17.18 ± 0.18
	15	4.73×10^6	16.94 ± 0.28	3.30×10^9	16.88 ± 0.18
	30	3.28×10^4	17.42 ± 0.24	2.81×10^9	17.92 ± 0.27
	60	1.40×10^2	17.56 ± 0.35	2.14×10^9	17.98 ± 0.27
	90	-	17.72 ± 0.27	1.97×10^9	18.43 ± 0.27
	120	-	17.84 ± 0.33	5.49×10^8	18.27 ± 0.23
	180	-	19.86 ± 1.14	1.85×10^7	21.04 ± 0.21
30	0	6.02×10^9	9.42 ± 0.09	6.02×10^9	9.42 ± 0.09
	7	3.38×10^7	9.06 ± 0.15	2.31×10^9	9.52 ± 0.17
	15	2.92×10^6	10.02 ± 0.13	4.64×10^9	9.83 ± 0.26
	30	3.41×10^4	10.27 ± 0.62	2.03×10^9	9.42 ± 0.08
	60	4.70×10^2	10.80 ± 0.47	3.17×10^9	10.13 ± 0.18

ตารางผนวกที่ ค9 (ต่อ)

เวลาการทำแห้ง (นาท)	อายุการเก็บ (วัน)	อุณหภูมิต้อง (30 องศาเซลเซียส)		อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
		ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต	ความชื้น	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต	ความชื้น
		(CFU/g)	(เปอร์เซ็นต์)	(CFU/g)	(เปอร์เซ็นต์)
45	90	-	10.65 ± 0.46	5.35×10^9	10.66 ± 0.35
	120	-	10.93 ± 0.25	2.48×10^8	11.79 ± 0.30
	180	-	11.24 ± 0.27	1.27×10^7	13.01 ± 0.17
	0	6.57×10^9	8.74 ± 0.13	6.57×10^9	8.74 ± 0.13
	7	3.24×10^7	8.35 ± 0.09	5.75×10^9	8.73 ± 0.11
	15	3.30×10^6	8.72 ± 0.10	5.04×10^9	9.19 ± 0.13
	30	4.27×10^4	8.54 ± 0.30	2.88×10^9	9.46 ± 0.18
	60	3.90×10^2	9.20 ± 0.21	2.56×10^9	9.36 ± 0.08
	90	-	10.80 ± 0.24	2.15×10^9	10.74 ± 0.28
	120	-	10.63 ± 0.13	1.79×10^8	11.41 ± 0.52
	180	-	10.89 ± 0.16	3.50×10^7	11.63 ± 0.34

ตารางผนวกที่ ค10 ปริมาณแบคทีเรีย *L. plantarum* LP64 และความชื้นของเม็ดเชื้อผสมแป้งข้าวโพด เมื่อศึกษาอายุการเก็บรักษาเป็นเวลา 180 วัน

เวลาการทำแห้ง (นาที่)	อายุการเก็บ (วัน)	อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)		อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
		ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต	ความชื้น	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต	ความชื้น
		(CFU/g)	(เปอร์เซ็นต์)	(CFU/g)	(เปอร์เซ็นต์)
15	0	5.79×10^9	17.98 ± 0.07	5.79×10^9	17.98 ± 0.07
	7	3.14×10^6	16.85 ± 0.06	3.01×10^9	17.73 ± 0.06
	15	2.38×10^6	16.95 ± 0.09	2.73×10^9	18.09 ± 0.18
	30	1.35×10^4	17.35 ± 0.04	1.24×10^9	18.56 ± 0.33
	60	1.80×10^2	17.76 ± 0.08	2.08×10^9	18.87 ± 0.16
	90	-	17.09 ± 0.13	1.02×10^9	18.65 ± 0.11
	120	-	18.34 ± 0.11	1.11×10^8	18.32 ± 0.06
	180	-	23.59 ± 0.09	3.11×10^7	24.22 ± 0.54
30	0	5.46×10^9	9.77 ± 0.02	5.46×10^9	9.77 ± 0.02
	7	4.27×10^6	8.71 ± 0.10	2.68×10^9	10.32 ± 0.09
	15	3.05×10^6	9.43 ± 0.11	1.39×10^9	10.09 ± 0.06
	30	1.54×10^4	9.27 ± 0.13	2.90×10^9	10.15 ± 0.04
	60	2.50×10^2	10.14 ± 0.05	3.41×10^9	10.26 ± 0.08

ตารางผนวกที่ ค10 (ต่อ)

เวลาการทำแห้ง (นาท)	อายุการเก็บ (วัน)	อุณหภูมิต้อง (30 องศาเซลเซียส)		อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส	
		ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต	ความชื้น	ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต	ความชื้น
		(CFU/g)	(เปอร์เซ็นต์)	(CFU/g)	(เปอร์เซ็นต์)
45	90	-	10.22 ± 0.10	1.25×10^9	11.24 ± 0.05
	120	-	11.29 ± 0.12	1.09×10^8	11.72 ± 0.04
	180	-	12.99 ± 0.30	2.35×10^7	13.52 ± 0.16
	0	4.81×10^9	8.14 ± 0.06	4.81×10^9	8.14 ± 0.06
	7	3.42×10^6	8.94 ± 0.35	5.07×10^9	8.74 ± 0.09
	15	4.13×10^6	8.31 ± 0.09	5.74×10^9	8.55 ± 0.10
	30	1.92×10^4	8.83 ± 0.30	2.64×10^9	9.49 ± 0.21
	60	3.10×10^2	8.32 ± 0.21	4.71×10^9	9.78 ± 0.38
	90	-	9.72 ± 0.26	1.48×10^9	10.50 ± 0.17
	120	-	9.93 ± 0.66	1.49×10^8	10.43 ± 0.26
	180	-	10.64 ± 0.60	5.48×10^7	11.22 ± 0.20

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล

ปจรรย์ เรืองกลับ

วัน เดือน ปี ที่เกิด

13 กรกฎาคม 2523

สถานที่เกิด

อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช

ประวัติการศึกษา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์