

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น FX-200i (A&D Company Limited ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.1.2 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น AG 204 (Mettler Toledo ประเทศไทย)
- 3.1.3 อ่างน้ำร้อน (Water Bath) (Memmert ประเทศเยอรมัน)
- 3.1.4 ตู้อบร้อน (Hot Air Oven) รุ่น Catering (Memmert ประเทศอังกฤษ)
- 3.1.5 ตู้อบลมร้อน (Tray Drying) (BIMDER)
- 3.1.6 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) รุ่น Vortex-2 Genie (Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.1.7 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น High Pressure Steam Sterilizer SX-700 (TOMY Seiko ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge) รุ่น MX-301 (TOMY Kogyo ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.1.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง รุ่น Soprema 21 (TOMY ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.1.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง รุ่น Spectrafuge 16M (National Labnet ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- 3.1.11 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow Cabinet) รุ่น Air Tech (Yamato Scientific ประเทศญี่ปุ่น)
- 3.1.12 เครื่องให้ความร้อน (Hot Plate) รุ่น Yellow MAG HS7 (IKA Laboratory Equipment ประเทศมาเลเซีย)
- 3.1.13 เครื่องเขย่าเชื้อ (Shacker Incubator) รุ่น LS1-3016R (Daihan Lab tech ประเทศเกาหลี)
- 3.1.14 พีเอชมิเตอร์ (pH Meter) รุ่น pH 510 (Eutech Inatrumemts ประเทศมาเลเซีย)
- 3.1.15 ตู้บ่มเพาะเลี้ยงเชื้อ (Incubator)
- 3.1.16 กล้องจุลทรรศน์ บริษัท Leica DMLS ต่อกับคอมพิวเตอร์
- 3.1.17 เครื่องซีลถุงอลูมิเนียมฟอยล์
- 3.1.18 ไมโครเวฟ (Microwave) รุ่น Triple Distribution System (Samsung ประเทศไทย)
- 3.1.19 ตู้เย็น (Refrigerator) รุ่น GR-RG66KDA (GB) (Toshiba ประเทศไทย)

- 3.1.20 ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20-200, 100-1000 ไมโครลิตร และ 1-10 มิลลิลิตร
- 3.1.21 ทิป (Tip) ขนาด 200 ไมโครลิตร, 1 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร
- 3.1.22 หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร
- 3.1.23 กระบอกควง (Cylinder) ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 3.1.24 แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)
- 3.1.25 ชุดกรองแบคทีเรีย
- 3.1.26 กระดาษเซลลูโลส (Cellulose Sheet)
- 3.1.27 ถ้วยอบความชื้น (Moisture Can)
- 3.1.28 โถดูดความชื้น (Dessicator)
- 3.1.29 ลูปเขี่ยเชื้อ (Loop)
- 3.1.30 หลอดหยด (Dropper)
- 3.1.31 บีกเกอร์ (Breaker)
- 3.1.32 ตะเกียงแอลกอฮอล์ สเตนเลส (Alcohol Burner)
- 3.1.33 จานเพาะเชื้อและกระบอก
- 3.1.34 หลอดทดลอง (Test Tube)
- 3.1.35 หลอดปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Centrifuge Tube) ขนาด 50 และ 500 มิลลิลิตร
- 3.1.36 แท่งแก้วสามเหลี่ยมปาดเชื้อ (Spreader)
- 3.1.37 คิวเวทท์ (Cuvette)
- 3.1.38 ถูงอลูมิเนียมฟอยล์ขนาดบรรจุ 3 กรัม

3.2 สารเคมีและวัสดุคืบ

- | | | |
|--------|--|---------------------------|
| 3.2.1 | ไอโอดีน (Iodine) | Fluka Chemika |
| 3.2.2 | โพแทสเซียมไอโอไดด์ (Potassium Iodide : KI) | Fluka Chemika |
| 3.2.3 | แอมโมเนียมออกซาเลท (Ammonium Oxalate) | Fluka Chemika |
| 3.2.4 | ซาฟรานิน-โอ (Safranin O) | MS |
| 3.2.5 | คริสตอลไวโอเลต (Crystal Violet) | Microscopic Dye |
| 3.2.6 | เอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ | |
| 3.2.7 | โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide : NaOH) | QREC™ |
| 3.2.8 | แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium Sulfate : (NH ₄) ₂ SO ₄) | QREC™ |
| 3.2.9 | โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride : NaCl) | QREC™ |
| 3.2.10 | Tributyrin | Flukachemic AG-9470 Buchs |

3.2.11 Difo™ Skim Milk	Decton, Dickinson and Company
3.2.12 Nutrient Broth	HIMEDIA Laboratories
3.2.13 Nutrient Agar	HIMEDIA Laboratories
3.2.14 Congo Red	Ajax Finechem
3.2.15 กลูโคส (Glucose: C ₆ H ₁₂ O ₆)	Ajax Finechem
3.2.16 ซูโครส (Sucrose: C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Ajax Finechem
3.2.17 BBL™ Mannitol Salt Agar	BD, BD logo and BBL
3.2.18 นํ้านมวัว (รสจืด)	ไทยเดนมาร์ค
3.2.19 นมถั่วเหลือง (Hi Calcium Less Sugar) สูตรเจ	Lactasoy Soy Milk
3.2.20 ข้าวโพดผง (เดลิคัท)	KU Food
3.2.21 แป้งข้าวเจ้า	บริษัท บางกอกอินดอร์ฟู้ด จำกัด
3.2.22 แป้งมันสำปะหลัง	ถั่วยแดง
3.2.23 นํ้าเต้าหู้	ตลาดวงศ์สว่าง
3.2.24 Molasses	ร้าน Lemon Farm
3.2.25 นํ้ามะพร้าวกะทิ	ตลาดนนทบุรี
3.2.26 นํ้าบีบสับปะรด	ของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม
3.2.27 Monosodium Glutamate (MSG)	บริษัท อายิโนะโมะโต๊ะ จำกัด

3.3 เชื้อจุลินทรีย์

3.3.1 จุลินทรีย์โปรไบโอติก *Bacillus* spp. ที่คัดแยกได้จากลำไส้ไก่ จากตลาดสะพานใหม่ และตลาดลำลูกกา

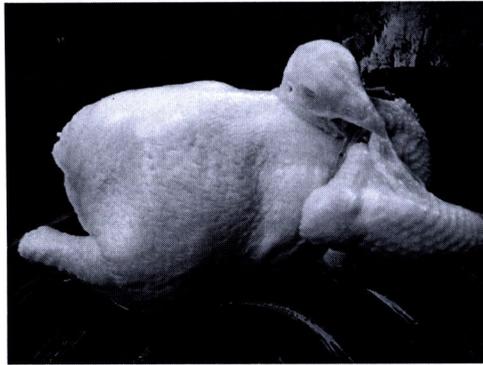
3.3.2 จุลินทรีย์ก่อโรค *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* จากภาควิชาเทคโนโลยี อุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

3.4 แผนการดำเนินงาน

3.4.1 การคัดแยก *Bacillus* spp. จากลำไส้ไก่เนื้อ

เก็บตัวอย่างลำไส้ไก่จากตลาดสะพานใหม่และตลาดลำลูกกา จำนวน 40 ตัวอย่าง ภาพที่ 3-1 และ 3-2 แสดงลักษณะซากไก่ และส่วนของลำไส้ไก่ที่นำมาคัดแยกเชื้อ จากนั้นตัดลำไส้ไก่เป็นชิ้นยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ชูดเชื้อบริเวณผนังลำไส้ด้านในด้วยแท่งแก้วปลอดเชื้อ ชะด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (Normal Saline) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำน้ำเกลือที่มีเชื้อจากลำไส้ผสมอยู่ไปวางในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

20 นาที เพื่อคัดแยกจุลินทรีย์ที่สามารถทนความร้อนได้ นำตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มา Spread Plate บนอาหาร Nutrient Agar เพื่อแยกเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะของ *Bacillus* spp. ที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 3-1 ลักษณะซากไก่เนื้อที่ใช้ในการคัดเลือก *Bacillus* spp.



ภาพที่ 3-2 ตัวอย่างลำไส้ไก่เนื้อที่ได้จากไก่เนื้อที่มีสุขภาพดี

3.4.2 การคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ยับยั้ง *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Agar Well Diffusion

3.4.2.1 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp.

นำ *Bacillus* spp. 85 สายพันธุ์ จากข้อ 3.4.1 มาเพาะเลี้ยงบน Nutrient Agar ด้วยวิธี Cross Streak Plate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบลักษณะโคโลนีอีกครั้ง แล้วจึงทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp. ใน Nutrient Broth บ่มด้วยเครื่องบ่มแบบเขย่า (Incubate Shaker) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางเพื่อแยกเซลล์ที่ 4 องศาเซลเซียส 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (สาร Metabolite) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.2.2 การทดสอบความสามารถของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเติบโตของ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Agar Well Diffusion

นำเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาผสมใน Nutrient Agar ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^6 cfu/ml เทลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ที่งี้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง หลังจากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิลิตร นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางเพื่อแยกเชื้อ *Bacillus* spp. จำนวน 85 สายพันธุ์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร หยอดลงในหลุม บนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น เวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition Zone)

3.4.3 การคัดเลือก *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส ด้วยวิธี Agar Well Diffusion

3.4.3.1 การเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp.

นำ *Bacillus* spp. 85 สายพันธุ์ จากข้อ 3.4.1 มาเพาะเลี้ยงบน Nutrient Agar ด้วยวิธี Cross Streak Plate บนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบลักษณะโคโลนีอีกครั้ง แล้วจึงทำการเพาะเลี้ยง *Bacillus* spp. ใน Nutrient Broth บนแบบเขยาก็อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางเพื่อแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.4.3.2 การทดสอบความสามารถของ *Bacillus* spp. ในการสร้างเอนไซม์ ด้วยวิธี Agar Well Diffusion

เตรียมอาหาร Nutrient Agar 20 มิลลิลิตร ผสมแป้ง 2 เปอร์เซ็นต์, หางนม (Skim Milk) 2 เปอร์เซ็นต์, Carboxymethyl Cellulose 2 เปอร์เซ็นต์ และ Tributyrin 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เทอาหารลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และทิ้งให้แห้ง จากนั้นเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร สำหรับการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส โดยนำส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางเพื่อแยกเชื้อ *Bacillus* spp. หมายเลข 02, 04 และ 26 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุม บนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจสอบผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Clear Zone)

3.4.4 การตรวจลักษณะของ *Bacillus* B04 และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น

ตรวจคุณลักษณะของโคโลนี และรูปร่างของ *Bacillus* B04 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทดสอบการเคลื่อนที่ในอาหาร Motility Test Medium และทดสอบการเจริญบนอาหาร Mannitol Salt Agar (การใช้น้ำตาล และการสร้างกรด)

3.4.5 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04

3.4.5.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหาร Nutrient Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลง Nutrient Broth ปริมาตร 95 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อของ *Bacillus subtilis* B04 ในการทดลองต่อไป

3.4.5.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04

ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงใน Nutrient Broth ปริมาตร 95 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจวัดปริมาณเซลล์มีชีวิตด้วยวิธี Spread Plate

3.4.6 การทดสอบความทนต่อสภาวะกรดของ *Bacillus subtilis* B04

3.4.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหาร Nutrient Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลง Nutrient Broth ปริมาตร 95 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อของ *Bacillus subtilis* B04 ในการทดลองต่อไป

3.4.6.2 การทดสอบความทนต่อสภาวะกรดของ *Bacillus subtilis* B04

นำเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางเพื่อแยกเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ปิเปิดใส่หลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร จำนวน 6 หลอด ปรับค่าความเป็นกรดด้วย 0.1 M HCl ให้มีค่า 2, 3, 4, 5, 6 และ 6.5 (ไม่ปรับ) ตั้งทิ้งไว้ 60 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 20 มิลลิลิตร เพื่อให้สารละลายมีค่ากรดต่างเป็นกลาง เก็บตัวอย่างหาปริมาณเซลล์มีชีวิตที่ค่ากรดต่างต่าง ๆ

3.4.7 การผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารอย่างง่ายและราคาถูก

3.4.7.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหาร Nutrient Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลง Nutrient Broth ปริมาตร 95 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วย

ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อของ *Bacillus subtilis* B04 ในการทดลองต่อไป

3.4.7.2 การผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในอาหารอย่างง่ายและราคาถูก

ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารชนิดต่าง ๆ ปริมาตร 95 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาการเติบโตของเชื้อโดยวัดปริมาณเซลล์มีชีวิต โดยวิธีการเตรียมดั่งวิธีภาคผนวก ข แล้วฆ่าเชื้ออาหารทุกสูตรก่อนนำไปใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ อาหารอย่างง่ายและราคาถูกที่ใช้ในการทดลองนี้แบ่งเป็น 3 ประเภทได้แก่

ก) อาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย ได้แก่ อาหารที่เตรียมจาก

น้ำนม (ไทย-เดนมาร์ก) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

น้ำแป้งข้าวเจ้าความเข้มข้น 10 g/l

นมถั่วเหลือง (แลคตาซอยไฮแคลเซียม สูตรเจ) ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

น้ำเต้าหู้ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

ข้าวโพดผงความเข้มข้น 10 g/l

อาหารไก่ความเข้มข้น 10 g/l

ข) อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ได้แก่ อาหารที่เตรียมจาก

น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 10 g/l ผสม Monosodium Glutamate ความเข้มข้น 1 g/l

น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 10 g/l ผสม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 1 g/l

น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 g/l ผสม Monosodium Glutamate ความเข้มข้น 1 g/l

น้ำตาลซูโครสความเข้มข้น 10 g/l ผสม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ความเข้มข้น 1 g/l

ค) อาหารที่เตรียมจากผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่
อาหารที่เตรียมจาก

Molasses ความเข้มข้น 10 g/l

น้ำมะพร้าวความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

น้ำบีบสับปะรด ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์

3.4.8 การหาสภาวะที่เหมาะสมของอาหาร Molasses สำหรับการเจริญ การสร้างสารยับยั้ง เชื้อก่อโรค และการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ของ *Bacillus subtilis* B04

การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหาร Nutrient Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลง Nutrient Broth ปริมาตร 95 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วย

ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อของ *Bacillus subtilis* B04 ในการทดลองต่อไป

3.4.8.1 การศึกษาอัตราส่วนระหว่าง Molasses กับ Monosodium Glutamate ต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04 ในอาหาร Molasses

ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่เตรียมจาก Molasses ปริมาตร 95 มิลลิลิตร ได้แก่ Molasses 10 g/l, Molasses 10 g/l ผสม Monosodium Glutamate 2 g/l (5 : 1), Molasses 10 g/l ผสม Monosodium Glutamate 4 g/l (5 : 2), Molasses 10 g/l ผสม Monosodium Glutamate 6 g/l (5 : 3) บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาการเติบโตของเชื้อ โดยวัดปริมาณเซลล์มีชีวิต จากนั้นทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* และทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ โปรติเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไลเปส

3.4.8.2 การศึกษาความเข้มข้นของ Molasses กับ Monosodium Glutamate ต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04 ในอาหาร Molasses ที่อัตราส่วน C : N เท่ากับ 5 : 1

ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่เตรียมจาก Molasses ปริมาตร 95 มิลลิลิตร ได้แก่ Molasses 10 g/l ผสม Monosodium Glutamate 2 g/l, Molasses 20 g/l ผสม Monosodium Glutamate 4 g/l, Molasses 30 g/l ผสม Monosodium Glutamate 6 g/l, Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาการเติบโตของเชื้อ โดยวัดปริมาณเซลล์มีชีวิต จากนั้นทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* และทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไลเปส

3.4.8.3 การศึกษาค่าความเป็นกรดต่างของอาหาร Molasses ต่อการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04

ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่เตรียมจาก Molasses ปริมาตร 95 มิลลิลิตร ที่เตรียมจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l โดยปรับค่ากรดต่างในอาหารให้มีค่า 5.54 (ไม่ปรับ), 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาการเติบโตของเชื้อ โดยวัดปริมาณเซลล์มีชีวิต และวัดค่าความเป็นกรดต่างก่อนและหลังการบ่ม จากนั้นเลือกการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีค่ากรดต่างที่ทำให้ได้ปริมาณเซลล์สูงที่สุดไปทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* และทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส เซลลูเลส และไลเปส เปรียบเทียบกับไม่ปรับค่าความเป็นกรดต่างในอาหาร

3.4.9 การศึกษาการเจริญของ *Bacillus subtilis* B04 ในอาหาร Molasses

3.4.9.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหาร Nutrient Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลง Nutrient Broth ปริมาตร 95 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อของ *Bacillus subtilis* B04 ในการทดลองต่อไป

3.4.9.2 การศึกษาหาการเจริญ *Bacillus subtilis* B04 ใน Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l

ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่เตรียมจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่มีค่ากรดต่าง 6.5 ปริมาตร 95 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงแบบเขย่าด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 ชั่วโมง ศึกษาการเติบโตของเชื้อโดยวัดปริมาณเซลล์มีชีวิต โดยวิธี Spread Plate หาปริมาณสปอร์โดยแช่ *Bacillus subtilis* B04 ที่เพาะเลี้ยงที่เวลาต่างๆ ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที วัดปริมาณสปอร์โดยทำ Spread Plate จากนั้นพลอตกราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ ปริมาณสปอร์ต่อเวลาและวัดค่ากรดต่างที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 2, 4, 8, 12, 16, 20, 24 และ 28 ชั่วโมง

3.4.10 การผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในรูปเม็ดและผงโดยวิธีการอบแห้งด้วยวิธี Tray Drying

3.4.10.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหาร Nutrient Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลง Nutrient Broth ปริมาตร 95 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อของ *Bacillus subtilis* B04 ในการทดลองต่อไป

3.4.10.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ในอาหาร Molasses

ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่เตรียมจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่มีค่ากรดต่าง 6.5 ปริมาตร 95 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ในการผลิต *Bacillus subtilis* B04 รูปแบบแห้ง

3.4.10.3 การผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในรูปเม็ด

นำ *Bacillus subtilis* B04 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงใน Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่มีค่ากรดต่าง 6.5 จากนั้นปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางเพื่อแยกเซลล์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย โซเดียม คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ผสมแป้งมันข้าวเจ้าใน อัตราส่วนแป้ง 5 กรัมต่อ *Bacillus subtilis* B04 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง 30 มิลลิลิตร (ปริมาตรก่อน การปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง) ผสมให้เข้ากัน โดยเติมน้ำ 4 มิลลิลิตร อัดเม็ดผ่านหลอดชนิดขนาด 1 มิลลิลิตร ตัดให้เป็นเม็ดมีขนาดยาว 0.2 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว อบที่ อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที เก็บตัวอย่างใส่โถดูความชื้น วิเคราะห์หา ความชื้น และหาปริมาณเซลล์ มีชีวิตหลังการอบแห้ง โดยใช้ 1 เม็ดแห้งของ *Bacillus subtilis* B04 (น้ำหนักเฉลี่ย 0.064 กรัม) ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.4.10.4 การผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในรูปผงแห้ง

นำ *Bacillus subtilis* B04 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงใน Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่มีค่ากรดต่าง 6.5 จากนั้นปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางเพื่อแยกเซลล์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย โซเดียม คลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ผสมแป้งในอัตราส่วนแป้ง มันสำปะหลัง 5 กรัมต่อ *Bacillus subtilis* B04 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง 30 มิลลิลิตร (ปริมาตรก่อน การปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง) ผสมให้เข้ากัน โดยเติมน้ำ 5 มิลลิลิตร นำไปเทลงกระดาษฟอยล์ที่ผ่าน การฆ่าเชื้อแล้ว อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20, 40 และ 60 นาที เก็บตัวอย่างใส่ โถดูความชื้น วิเคราะห์หาความชื้น และปริมาณเซลล์มีชีวิตหลังการอบแห้ง โดยใช้ผงแห้ง *Bacillus subtilis* B04 จำนวน 0.064 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

3.4.11 การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อ *Bacillus subtilis* B04 ในรูปผงแห้ง

3.4.11.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04

ถ่ายเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 จำนวน 1 โคโลนี ลงในอาหาร Nutrient Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลง Nutrient Broth ปริมาตร 95 มิลลิลิตร บ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อของ *Bacillus subtilis* B04 ในการทดลองต่อไป

3.4.11.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* B04

ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* B04 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่เตรียมจาก Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่มีค่ากรดต่าง 6.5 ปริมาตร 95 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยง

แบบเขย่า ด้วยความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ในการผลิต *Bacillus subtilis* B04 รูปแบบแห้ง

3.4.11.3 การผลิต *Bacillus subtilis* B04 ในรูปผงแห้ง

นำ *Bacillus subtilis* B04 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงใน Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l ที่มีค่ากรดต่าง 6.5 จำนวน 6 ฟลasks จากนั้นปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลางเพื่อแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 11,000 รอบต่อนาที ล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 1 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ผสมแป้งในอัตราส่วนแป้ง 5 กรัมต่อ *Bacillus subtilis* B04 ที่ผ่านการเพาะเลี้ยง 30 มิลลิลิตร (ปริมาตรก่อนการปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง) นำไปเทลงกระดาษฟอยล์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เก็บตัวอย่างใส่โถดูดความชื้น บรรจุผงแห้ง *Bacillus subtilis* B04 ลงในถุงออลูมิเนียมฟอยล์ ปริมาณถุงละประมาณ 3 กรัม เก็บตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 3 เดือน วิเคราะห์หาความชื้น ปริมาณเซลล์มีชีวิต ปริมาณเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงผงแห้ง *Bacillus subtilis* B04 จำนวน 1 กรัม ด้วย Molasses 40 g/l ผสม Monosodium Glutamate 8 g/l มีค่ากรดต่าง 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำส่วนใสทดสอบการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* และทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ อะไมเลส โปรติเอส เซลลูเลส และไลเปส หลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

