

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การถ่ายทอดเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก
ในน้ำทิ้งจากการต้มเส้นขนมจีน

**Technology transfer on the cultivation of probiotic bacteria using
discarded water from noodle-boiling process**

โดย

ผศ. ดร. เสาวนิต ทองพิมพ์

รศ. งามนิจ นนทโส

รศ. เทอดศักดิ์ คำเหม็ง

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๔

กิตติกรรมประกาศ

รายงานวิจัยฉบับนี้เป็นผลการวิจัยในปีที่ ๓ ของโครงการวิจัยต่อเนื่อง ๓ ปี ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัย ประเภทอุดหนุนทั่วไป ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๔ จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น นอกจากนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ อุปกรณ์ สารเคมีบางชนิด และขอขอบคุณ สุพิชญา กาญจนนวโชติ และ รัชฎา เมยคง ที่ได้ช่วยงานด้านห้องปฏิบัติการ ขอขอบคุณนายวันชัย หินทองแห่งบริษัทพีเอ็มเออร์จำกัดที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และสุกร ที่ใช้ในการทดลอง และขอขอบคุณ ไพโร สุคติธร จากสำนักงานกองทุนสงเคราะห์การทำสวนยาง และนายสินธู นนทศิริ ผู้ใหญ่บ้าน บ้านตอประคู้ ตำบลคูนสาต อำเภอกระนวน จังหวัดขอนแก่น ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและประสานงานในการจัดอบรมเกษตรกร

เสาวนิต ทองพิมพ์

งามนิจ นนทโส

เทอดศักดิ์ คำเหม็ง

๑๖ กรกฎาคม ๒๕๕๕

บทคัดย่อ

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการจัดจำแนกระบุชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้จากงานวิจัยในปีที่ผ่านมาได้แก่ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท SK5 ซึ่งเป็นเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อโรคที่ก่อร่างใน สุกกร จากการใช้ conventional methods และ API 50CH test kits พบว่าไอโซเลท SK5 มีคุณสมบัติตรงกับ เชื้อ *Lactobacillus plantarum* มากที่สุด จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ พบว่า *L. plantarum* SK5 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30°C. และที่ pH 6.4 จากนั้นจึงนำเชื้อ *L. plantarum* SK5 ไป เพาะเลี้ยงในน้ำที่ผ่านการต้มเส้นขนมจิ้น แต่เนื่องจาก *L. plantarum* SK5 ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลสที่ จำเป็นต่อการย่อยแป้งในน้ำต้มเส้นขนมจิ้น ดังนั้นจึงเพาะเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกนี้ร่วมกับเชื้อ thermotolerant *Bacillus coagulans* NF17 ที่ทนร้อนและผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ดี โดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *B. coagulans* NF17 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำต้มเส้นขนมจิ้นที่เติมน้ำนมยูเอชที 10% เป็นเวลา 1 วันก่อนการเติมเชื้อ *L. plantarum* SK5 แล้วจึงบ่มต่ออีก 1 วันก่อนนำไปใช้เลี้ยงสุกร พบว่าจากการ เพาะเลี้ยงเชื้อ *B. coagulans* NF17 ในน้ำต้มเส้นขนมจิ้นที่ผสมน้ำนมยูเอชที 10% และบ่มที่อุณหภูมิ 45°C. เป็นเวลา 1 วันแล้วจึงเติมเชื้อโปรไบโอติก *L. plantarum* SK5 แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิ 30°C. อีก 1 วัน ได้ ปริมาณเชื้อ *B. coagulans* NF17 และ *L. plantarum* SK5 ที่ความเข้มข้น 6.0×10^8 และ 1.9×10^9 CFU/ml ตามลำดับ จากนั้นได้ศึกษาหาสภาวะและวิธีการซึ่งสะดวกต่อเกษตรกรที่จะเพาะเลี้ยงเชื้อ โปรไบโอติก *L. plantarum* SK5 พบว่าเกษตรกรสามารถใช้ *B. coagulans* NF17 และ *L. plantarum* SK5 ในรูปผงแห้ง เป็นหัวเชื้อแบคทีเรียเพื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มเส้นขนมจิ้น (ที่เติมน้ำนมยูเอชที 10%) โดยไม่ต้อง autoclave เพื่อฆ่าเชื้อในน้ำต้มเส้นขนมจิ้น แต่ให้นำไปตั้งกลางแดดเป็นเวลาประมาณ 8 ชั่วโมงและบ่มต่อจนครบ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ก่อนเติมหัวเชื้อโปรไบโอติก *L. plantarum* SK แล้วบ่มต่อที่อุณหภูมิห้องอีก 24 ชั่วโมง พบว่าได้ปริมาณเชื้อ *B. coagulans* NF17 และ *L. plantarum* SK5 ที่ความเข้มข้น 3.0×10^3 และ 1.1×10^8 CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งมีความเข้มข้นมากพอที่จะใช้เสริมเป็นโปรไบโอติกในอาหารสุกรซึ่ง ควรมีเชื้อโปรไบโอติกผสมอยู่ไม่น้อยกว่า 10^6 CFU/กรัมของอาหารสัตว์

Abstract

In this research work, we had identify the potential probiotic lactic acid bacteria, the isolate SK5 which was derived from the previous study and recognized as the effective probiotic that inhibited the entero-pathogen *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis. By using conventional methods and API 50CH test kits, the isolate SK5 was mostly consistent to *Lactobacillus plantarum*. This bacterium grew best at 30°C and pH 6.4. Then, *L. plantarum* SK5 was subjected to be cultivated in the discarding water from “khanom-jeen” noodle boiling process (WFKB). It was found that *L. plantarum* SK5 did not produce amylase enzyme which is needed to hydrolyze starch in WFKB. Therefore, the thermotolerant *Bacillus coagulans* NF17 which tolerate well the high temperature and produce amylase was used to co-culture with the *L. plantarum* SK5. *B. coagulans* NF17 was grown in WFKB supplemented with 10% UHT milk at 45°C one day earlier followed by inoculation of *L. plantarum* SK5 and incubation was continued at 30°C for another day. By two-step cultivation we could obtain *B. coagulans* NF17 and *L. plantarum* SK5 at the concentration of 6.0×10^8 and 1.9×10^9 CFU/ml, respectively. Then, we needed to find the easy and convenient way for the farmers to cultivate the probiotic *L. plantarum* SK5 in the WFKB. It was found that the farmers preferred to use the bacterial inocula in lyophilized form. In the cultivation processes, *B. coagulans* NF17 was inoculated into the non-sterilized WFKB (including 10% UHT milk). The container was exposed to the sun during daytime for about 8 h and then the incubation was continued for another 16 h at room temperature. After that, the WFKB was inoculated with *L. plantarum* SK5 and incubation was continued at room temperature for 24 h. These two-day cultivating processes yielded *B. coagulans* NF17 and *L. plantarum* SK5 at the concentration of 3.0×10^3 and 1.1×10^8 CFU/ml, respectively. The amount of probiotic *L. plantarum* SK5 was enough for using as probiotic bacteria to supplement the pig feed which should contain no less than 10^6 CFU/g feedstuff.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
คำอธิบายคำย่อ	ช
บทที่ 1: บทนำ	1
บทที่ 2: ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3: วิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 4: ผลการวิจัยและอภิปรายผล	12
บทที่ 5: สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	23
เอกสารอ้างอิง	24
ภาคผนวก ก: เอกสารที่ใช้ประกอบการจัดอบรมเกษตรกร	27
ภาคผนวก ข: รูปภาพกิจกรรมระหว่างการจัดอบรมเกษตรกร	35

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	9
Treatments ในการทดสอบผลของ pH และอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> NF17 เพื่อให้ทำหน้าที่ในการย่อยสลายแป้งในน้ำต้มเส้นขนมจีน	9
ตารางที่ 2	9
Treatments ในการทดสอบผลของ pH และอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> SK5 เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มเส้นขนมจีนที่ผ่านการย่อยสลายแป้งด้วยเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> NF17 มาแล้ว 1 วัน	9
ตารางที่ 3	12
ความขุ่น (OD600 nm) ของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> SK5 เมื่อเพาะเลี้ยงใน MRS medium ที่อุณหภูมิ 23, 30, 35, 42 และ 45 องศาเซลเซียส	12
ตารางที่ 4	13
ความขุ่นของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> SK5 ใน MRS medium เมื่อเจริญที่ค่า pH แตกต่างกัน	13
ตารางที่ 5	15
ผลการทดสอบคุณลักษณะของเชื้อไอโซเลท SK5	15
ตารางที่ 6	16
ผลการทดสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อไอโซเลท SK5 จากชุดทดสอบ API 50CHL	16
ตารางที่ 7	18
การเจริญของเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> NF17 และ <i>Lactobacillus</i> SK5 เมื่อเลี้ยงในสถานะที่ควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และควบคุมอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ	18
ตารางที่ 8	20
การเจริญของเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> NF17 และ <i>Lactobacillus</i> SK5 เมื่อใช้เชื้อสดบนอาหารวุ้นเอียง (slant) และเชื้อผงแห้ง (lyophilize) เป็นหัวเชื้อ	20
ตารางที่ 9	22
ผลการประเมินการจัดอบรมเกษตรกรในหัวข้อ “การเพาะเลี้ยงและการใช้แบคทีเรียโปรไบโอติกเพื่อเป็นอาหารเสริมสำหรับสุกร	22

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 1 ค่า OD ₆₀₀ ของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> sp. strain SK5 เพาะเลี้ยงใน MRS medium ที่อุณหภูมิ 23, 30, 35, 42 และ 45 องศาเซลเซียส	12
รูปที่ 2 ความขุ่น (OD ₆₀₀) ของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> sp. strain SK5 ใน MRS medium เมื่อเจริญที่ค่า pH แตกต่างกัน	14
รูปที่ 3 ผลการทดสอบคุณสมบัติของเชื้อ ไอโซเลท SK5 โดยใช้ API test kit เมื่อบ่มที่ 30°C. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	17
รูปที่ 4 ผลการจำแนกระบุชนิดของเชื้อ <i>Lactobacillus</i> sp. strain SK5 โดยใช้ API test kit	17
รูปที่ 5 การเจริญของเชื้อ <i>Bacillus coagulans</i> NF17 และ <i>Lactobacillus</i> SK5 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่ควบคุม/ไม่ควบคุม pH และควบคุม/ไม่ควบคุมอุณหภูมิ	19
รูปที่ 6 การเจริญของเชื้อ <i>B. coagulans</i> NF17 และ <i>Lactobacillus</i> SK5 แสดงด้วยค่า viable cells (CFU/ml) เมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำต้มเส้นขนมจีน โดยใช้เชื้อสด (slant) และเชื้อผงแห้งในรูปแบบ lyophilize (lyo) เป็นเวลา 1 วัน	21

คำอธิบายคำย่อ

CFU	หมายถึง Colony forming unit
LAB	หมายถึง Lactic acid bacteria
MRS	หมายถึง de Man, Rogosa and Sharpe medium
NA	หมายถึง Nutrient agar
WDM	หมายถึง Waste water discarded from the noodle-boiling process supplemented with 10% UHT milk