

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

Nutrient Agar

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนเดือดแล้วใส่ขวดรูปชมพู่ นิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที pH สุดท้าย 7.3 ± 0.2 เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มล.

Nutrient Broth

Beef Extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่น 1 ลิตร ให้ความร้อน pH สุดท้าย 7.3 ± 0.2 แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 5 มิลลิลิตร นิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที

Plate Count Agar

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1	ลิตร

ให้ความร้อนจนเดือดเพื่อละลายส่วนผสม แบ่งใส่หลอดหรือขวดรูปชมพู่ นิ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที pH วัดครั้งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ก่อนใช้ให้เติมสารปฏิชีวนะ Chlorotetracycline-HCl บวก Chloramphenicol 2 มล. ต่ออาหาร 100 มล.

Peptone Water Diluent, 0.1%

Peptone	1.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ละลาย peptone ในน้ำกลั่น ปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.1 ถ่ายใส่ขวดหรือหลอดที่จะทำการเจือจาง โดยเมื่อปริมาตรที่จะหายระหว่างการฆ่าเชื้อ ฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 15 นาที

VP test media

Semi-solid VP medium

Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
NaCl	5.0	กรัม
K_2HPO_4	5.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Distilled water	1.0	ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนปรับ pH เป็น 7.0 ± 0.1 ถ่ายใส่หลอดทดลอง ฆ่าเชื้อที่ 115°C นาน 10 นาที

Starch agar

Potato starch	10	กรัม
Distilled water	50	มิลลิลิตร
Nutrient agar	1000	มิลลิลิตร

ละลาย Potato starch ในน้ำให้มีลักษณะเป็นครีม จากนั้นเติม Nutrient agar ฆ่าเชื้อที่ 115°C นาน 10 นาที

Casein agar

Milk, skim	500	มิลลิลิตร
Nutrient agar, double-strength	500	มิลลิลิตร

เตรียม skim milk ฆ่าเชื้อที่ 115°C นาน 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 50°C แล้วเติม Nutrient agar, double-strength

Citrate media

Sodium citrate	3	กรัม
Glucose		0.2 กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
L-cysteine hydrochloride		0.1 กรัม
Ferric ammonium citrate		0.4 กรัม
KH ₂ PO ₄	1	กรัม
NaCl	5	กรัม
Na ₂ S ₂ O ₃		0.08 กรัม
Agar	20	กรัม
Phenol red, 0.2% aq. Soln	6	มิลลิลิตร
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมแล้วให้ความร้อนแล้วกรอง ปรับ pH 6.8-6.9 แล้วเติมอินดิเคเตอร์ ฆ่าเชื้อที่ 115 °C นาน 20 นาที

MYP

MYP agar base	43	กรัม
Distilled water	900	มิลลิลิตร
Egg yolk emulsion	100	มิลลิลิตร
0.1% polymyxin B sulfate solution	10	มิลลิลิตร

ละลาย MYP agar base ในน้ำกลั่น ต้มให้เดือด แบ่งใส่ขวดๆ ละ 225 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที เมื่อจะเท plate เติม 0.1% polymyxin B sulfate solution ขวดละ 2.5 มิลลิลิตร และเติม Egg yolk emulsion 12.5 มิลลิลิตรต่อขวด

Motility media

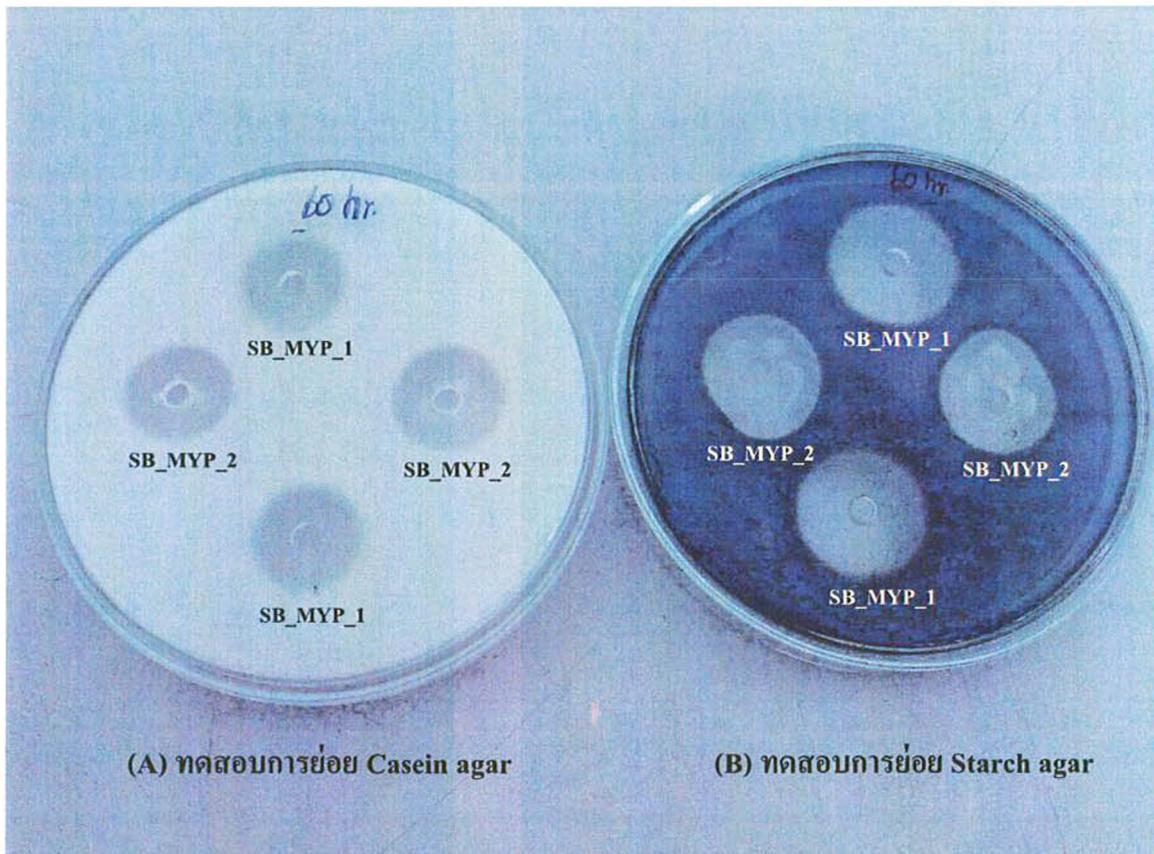
Meat extract	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
Agar	4	กรัม
Gelatin	80	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

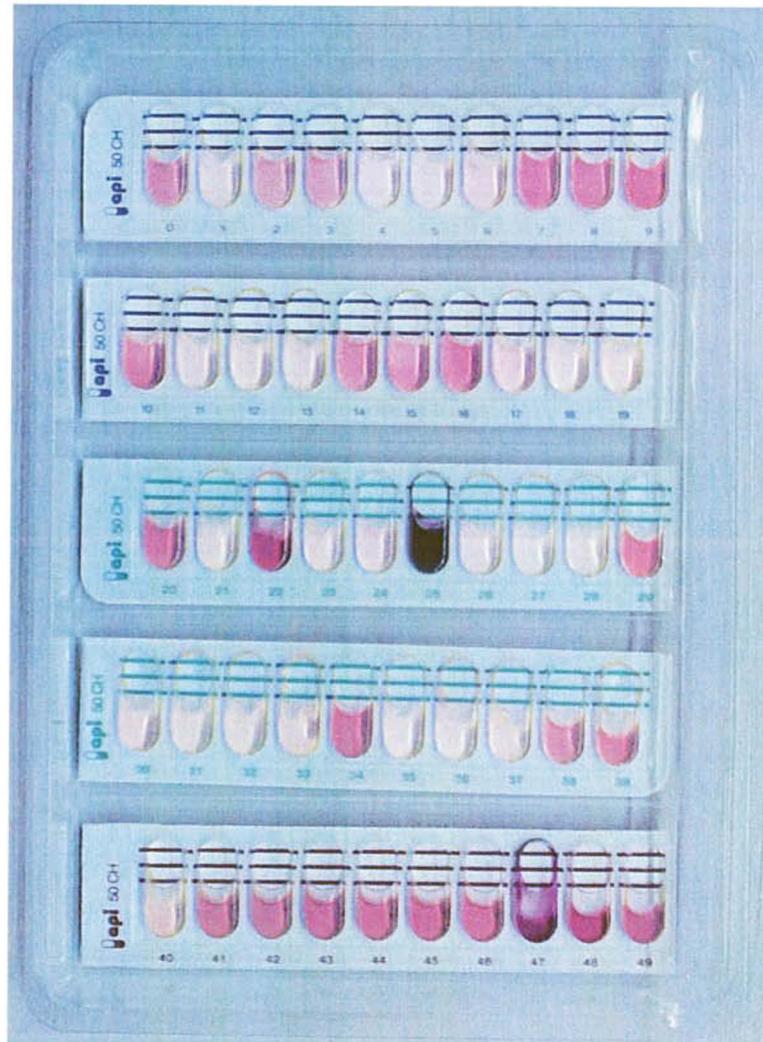
นำเจลาตินละลายในน้ำประมาณ 30 นาที จากนั้นละลายส่วนผสมอื่นๆ แล้วฆ่าเชื้อที่ 115 °C นาน 20 นาที

ภาคผนวก ข
การตัดแยก *bacillus subtilis*

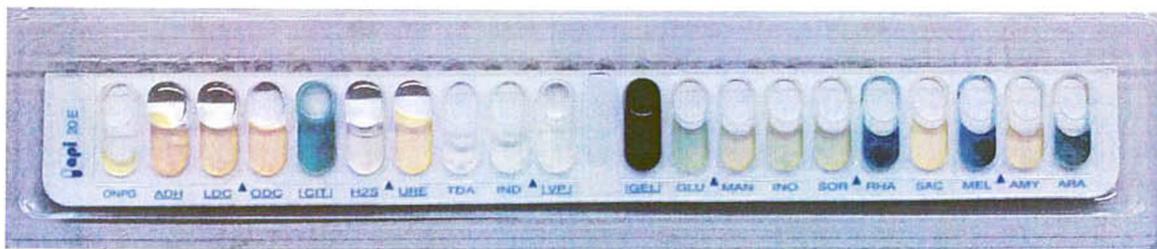
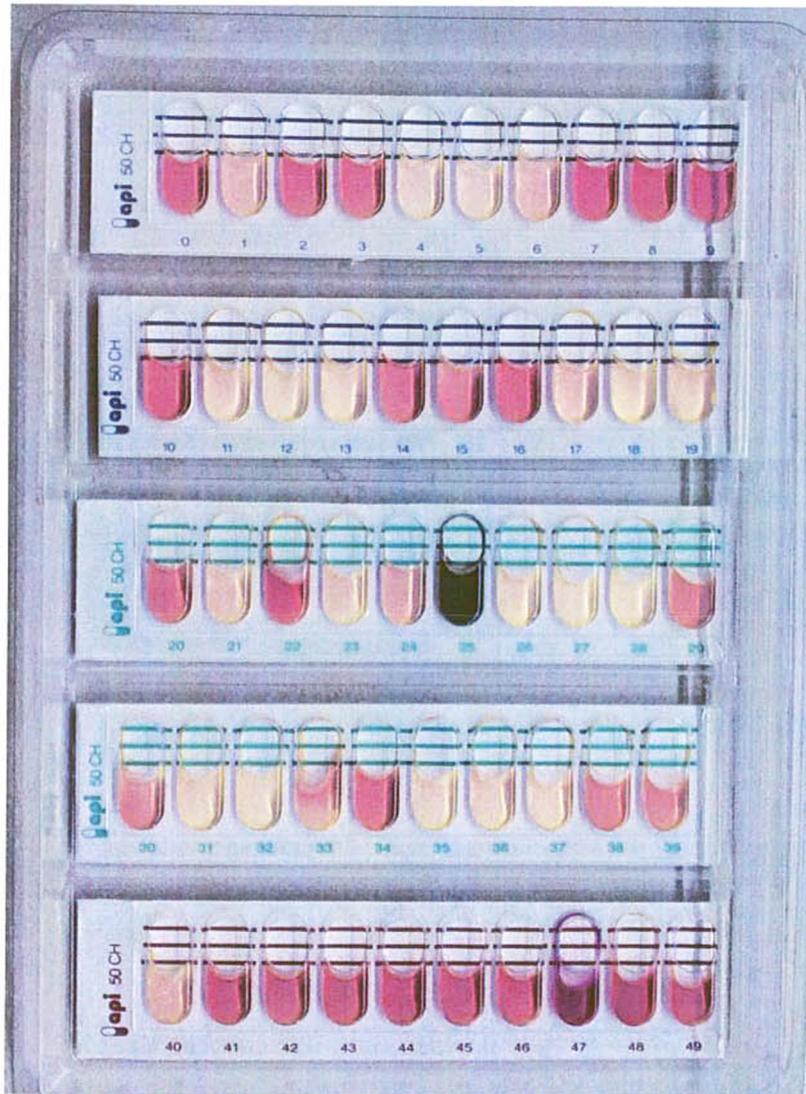
ตารางที่ 14 ผลการคัดเลือกด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E

รหัสตัวอย่าง	Genus ของเชื้อ	คิดเป็นร้อยละ
SB_MYP_1	<i>B.subtilis</i>	98.2
SB_MYP_2	<i>B.subtilis</i>	98.2





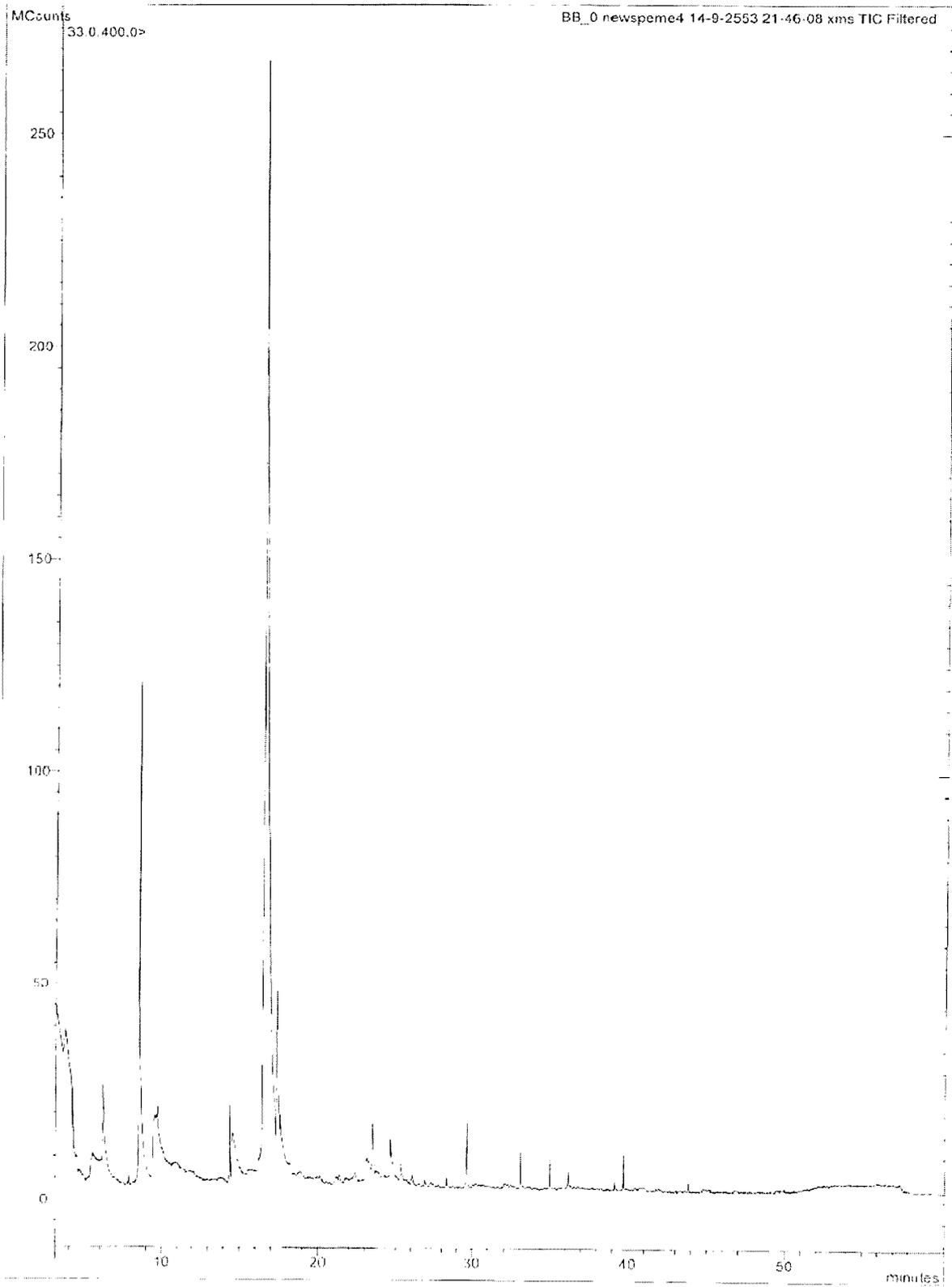
การทดสอบด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E
ของกล้าเชื้อรหัส SB_MYP_1



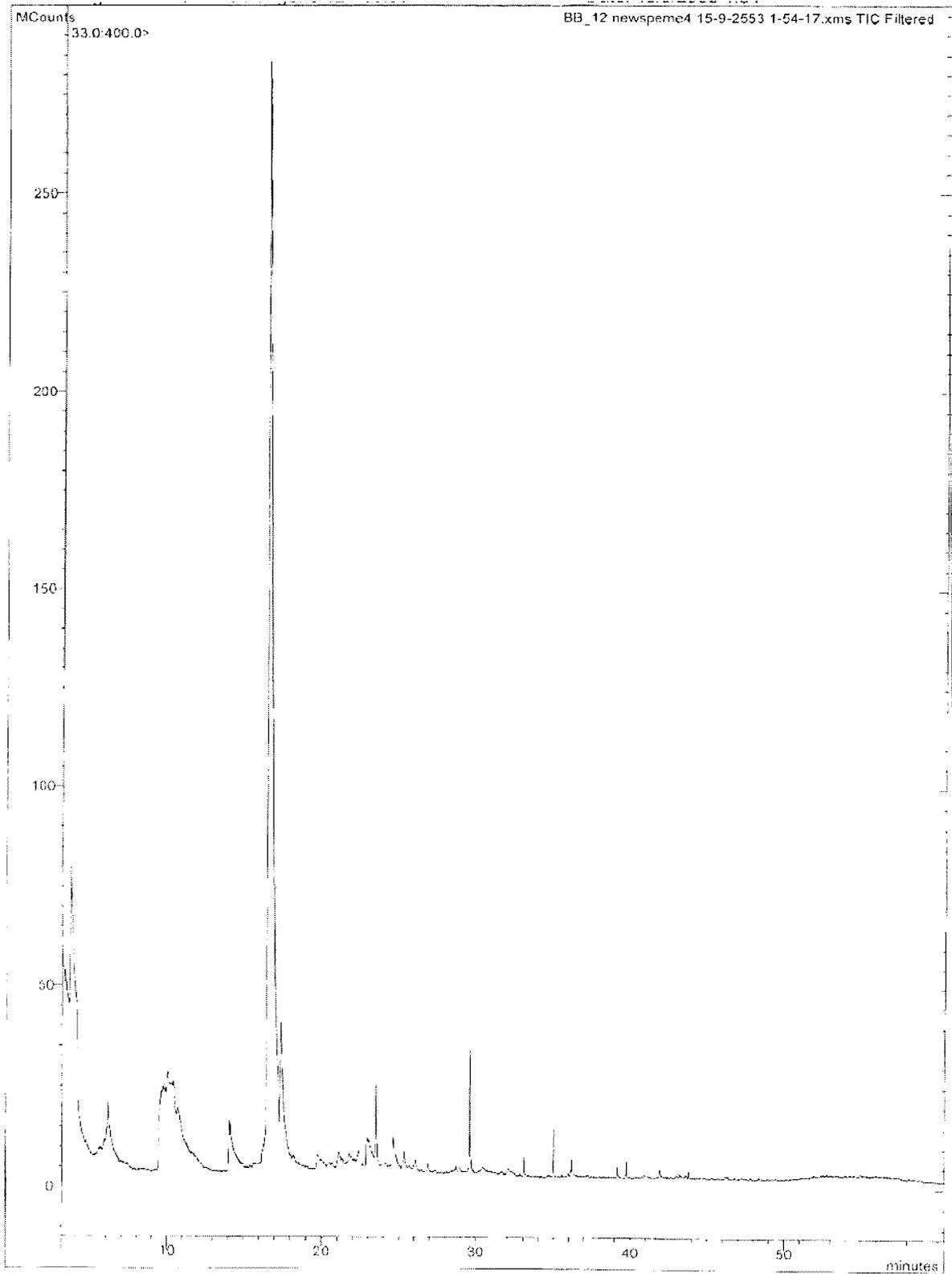
การทดสอบด้วยชุดตรวจสอบสำเร็จรูป API 50 CHB medium และ API 20E
ของกล้าเชื้อรหัส SB_MYP_2

ภาคผนวก ค

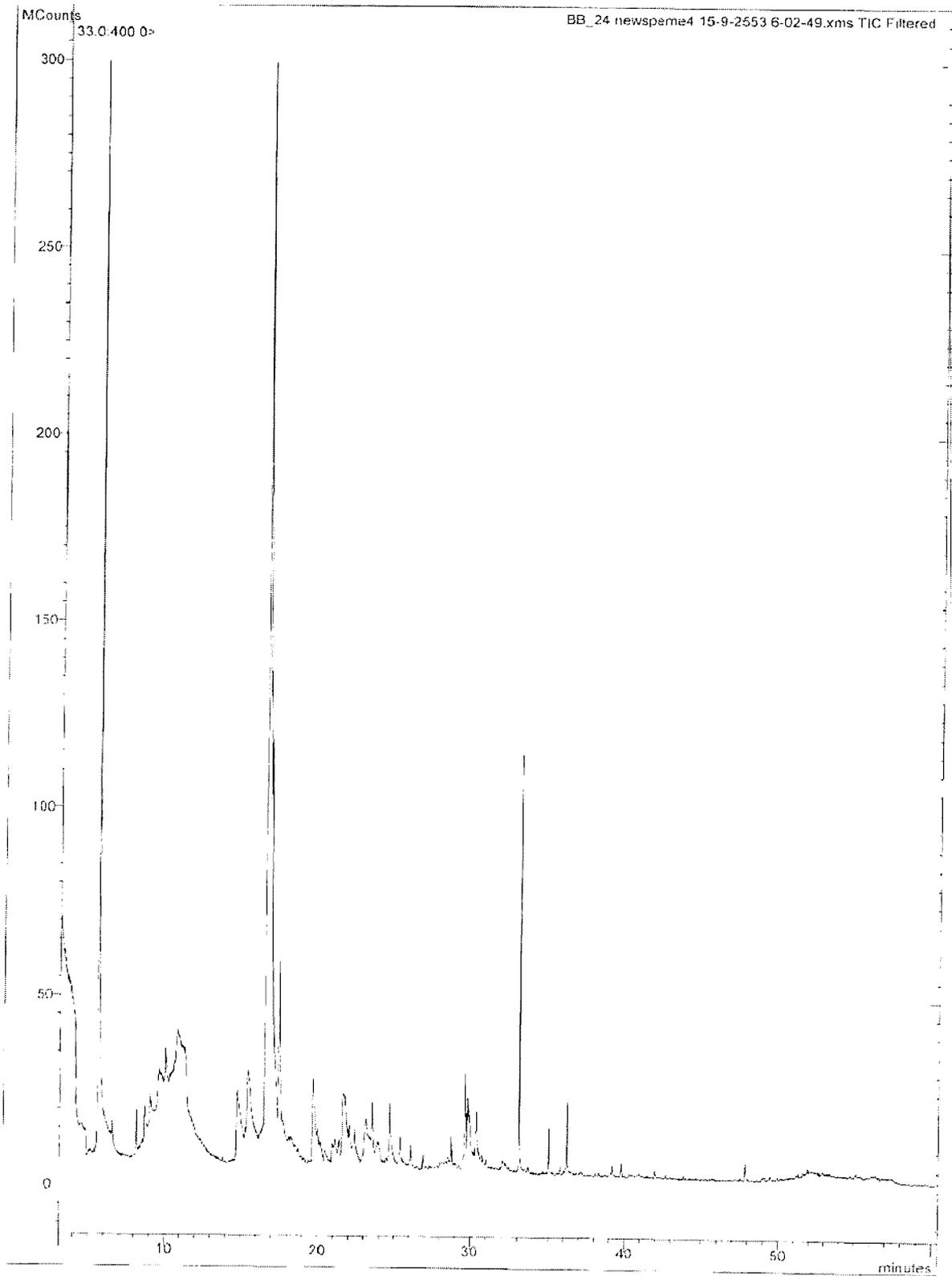
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์กลิ่นด้วย GC-MS



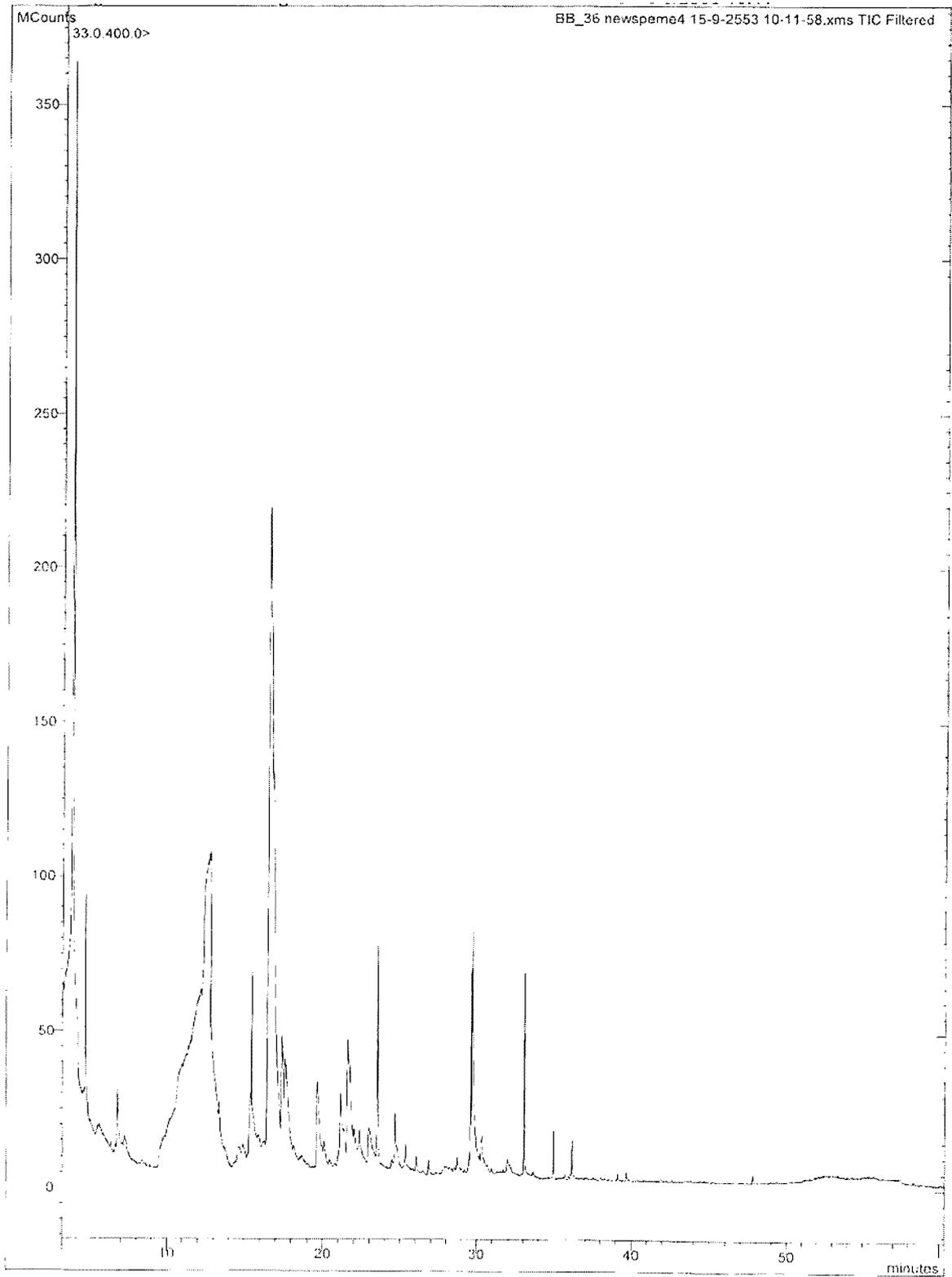
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม และเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 0



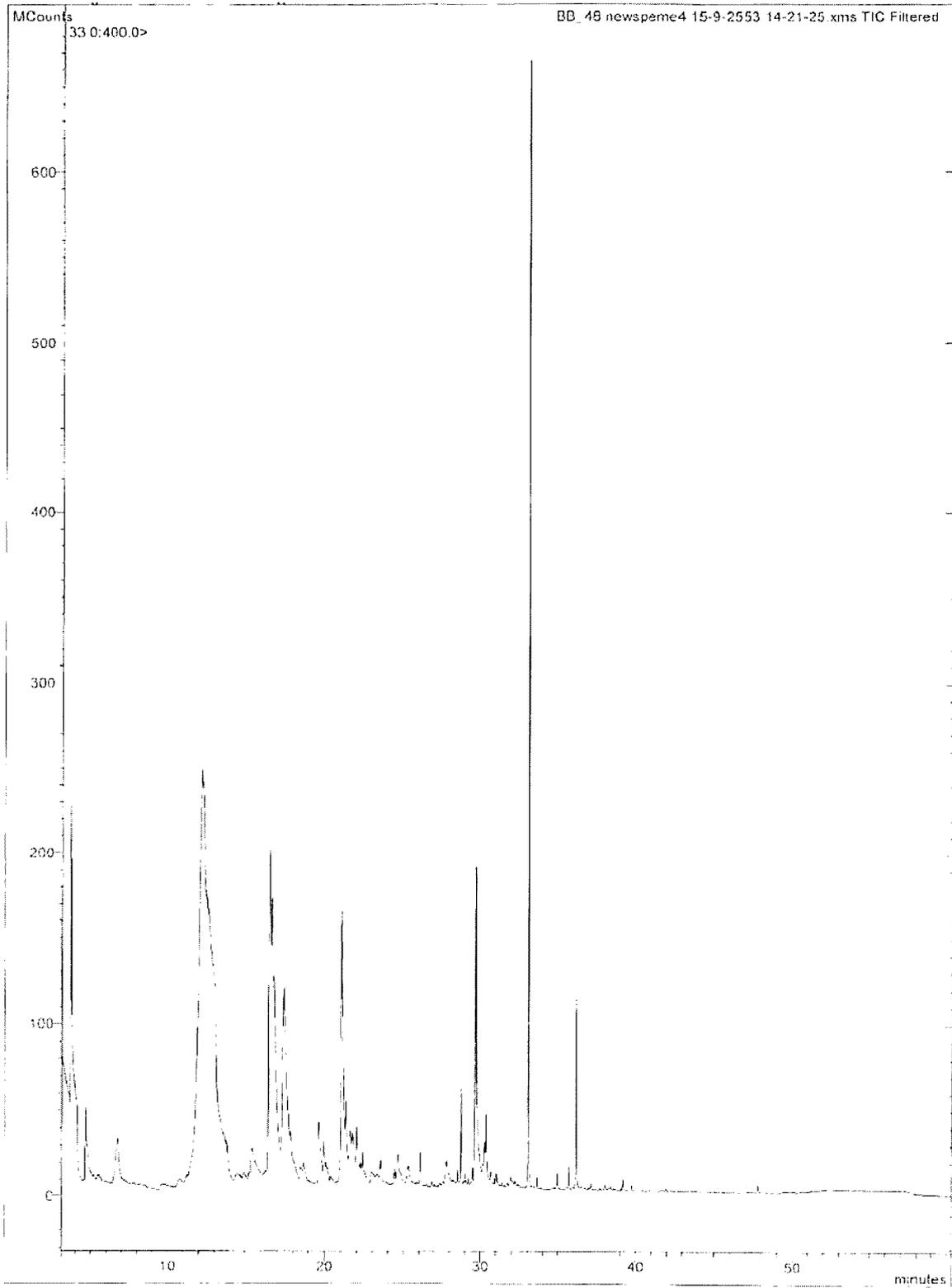
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 12



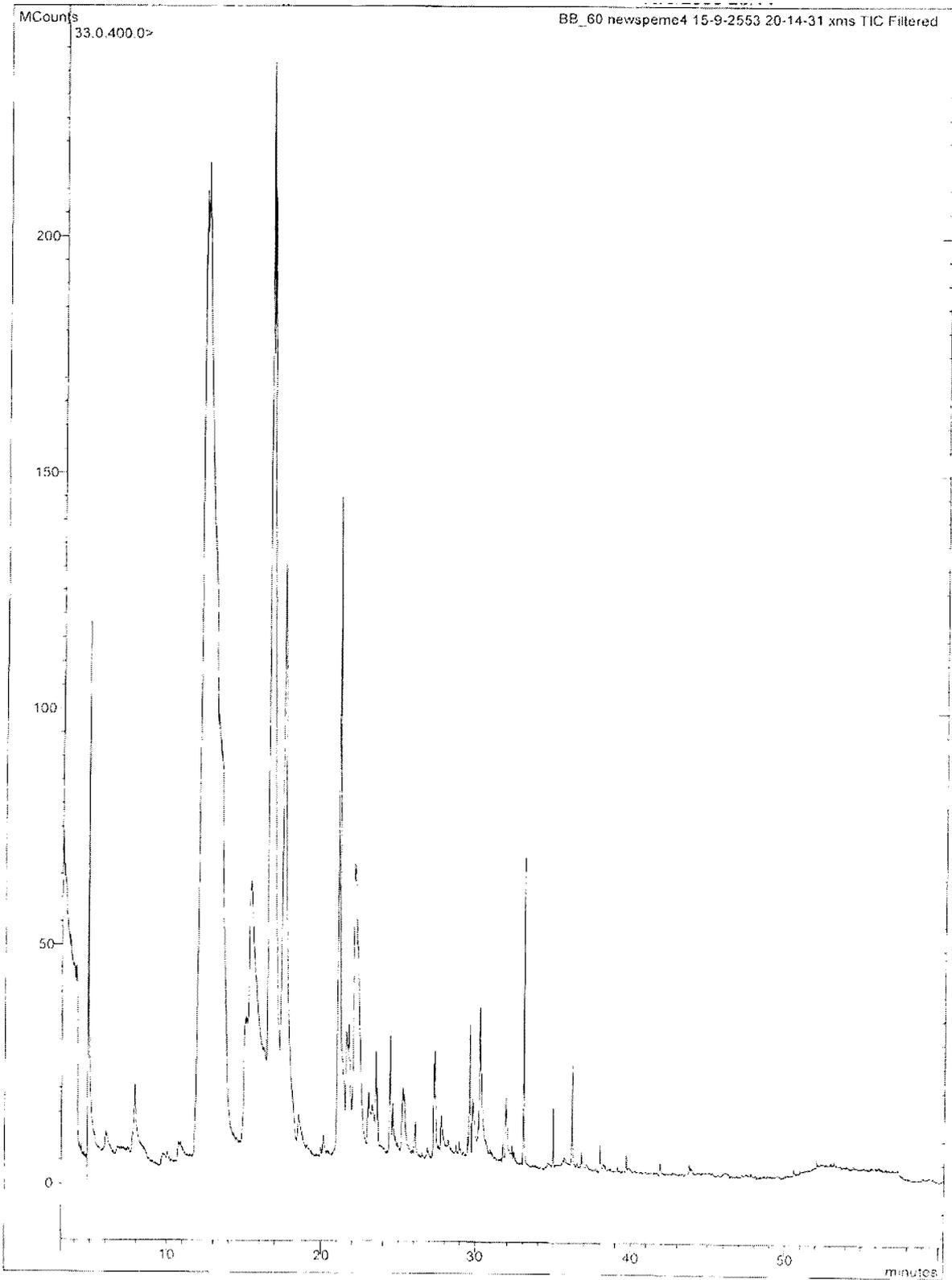
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม และเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 24



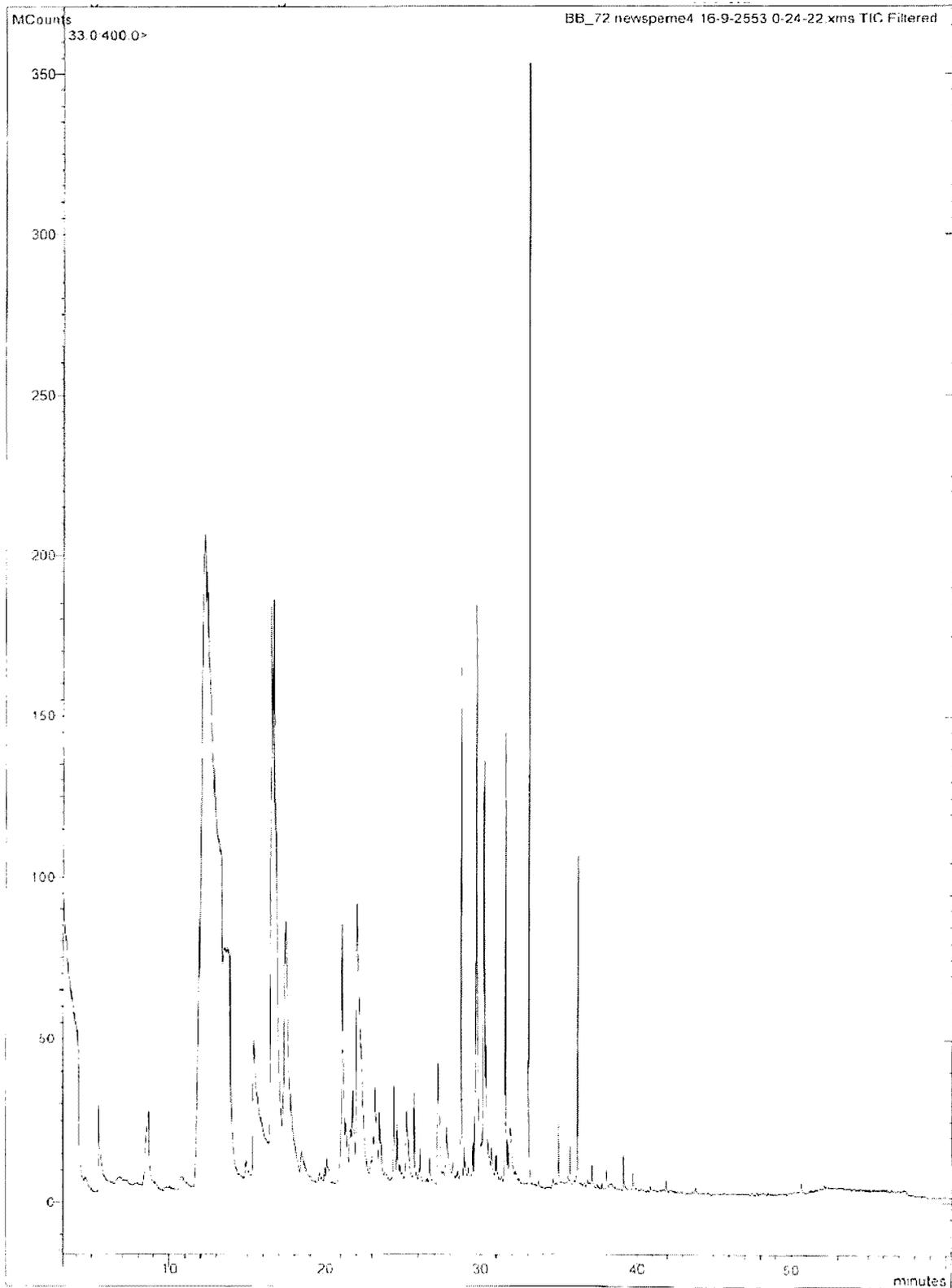
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ไต่กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม และเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 36



ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ไ้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้มและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 48



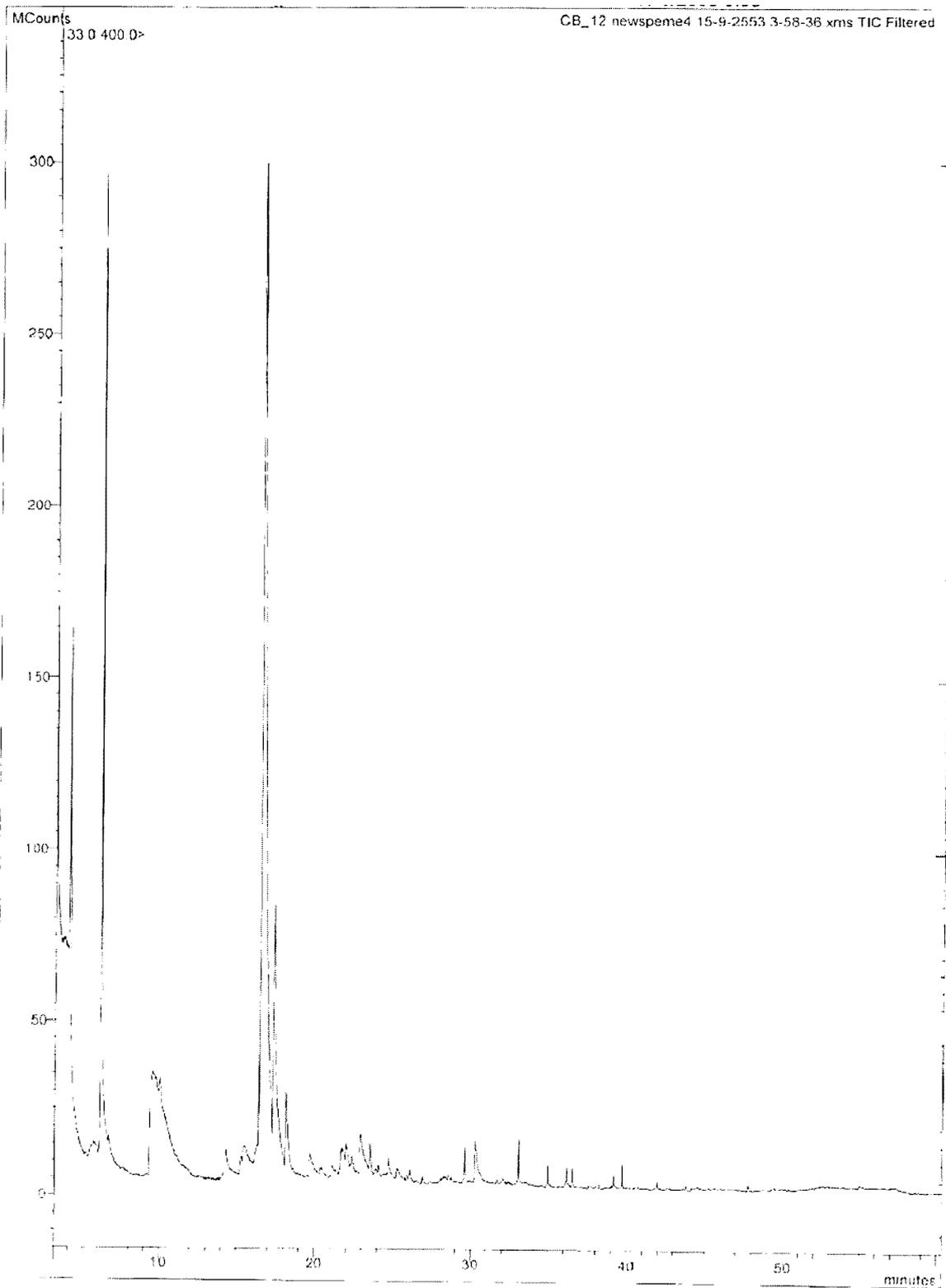
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่หักกลืนในตัวอย่างแก้วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม และเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 60



ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการต้ม และเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (BB) ในชั่วโมงที่ 72



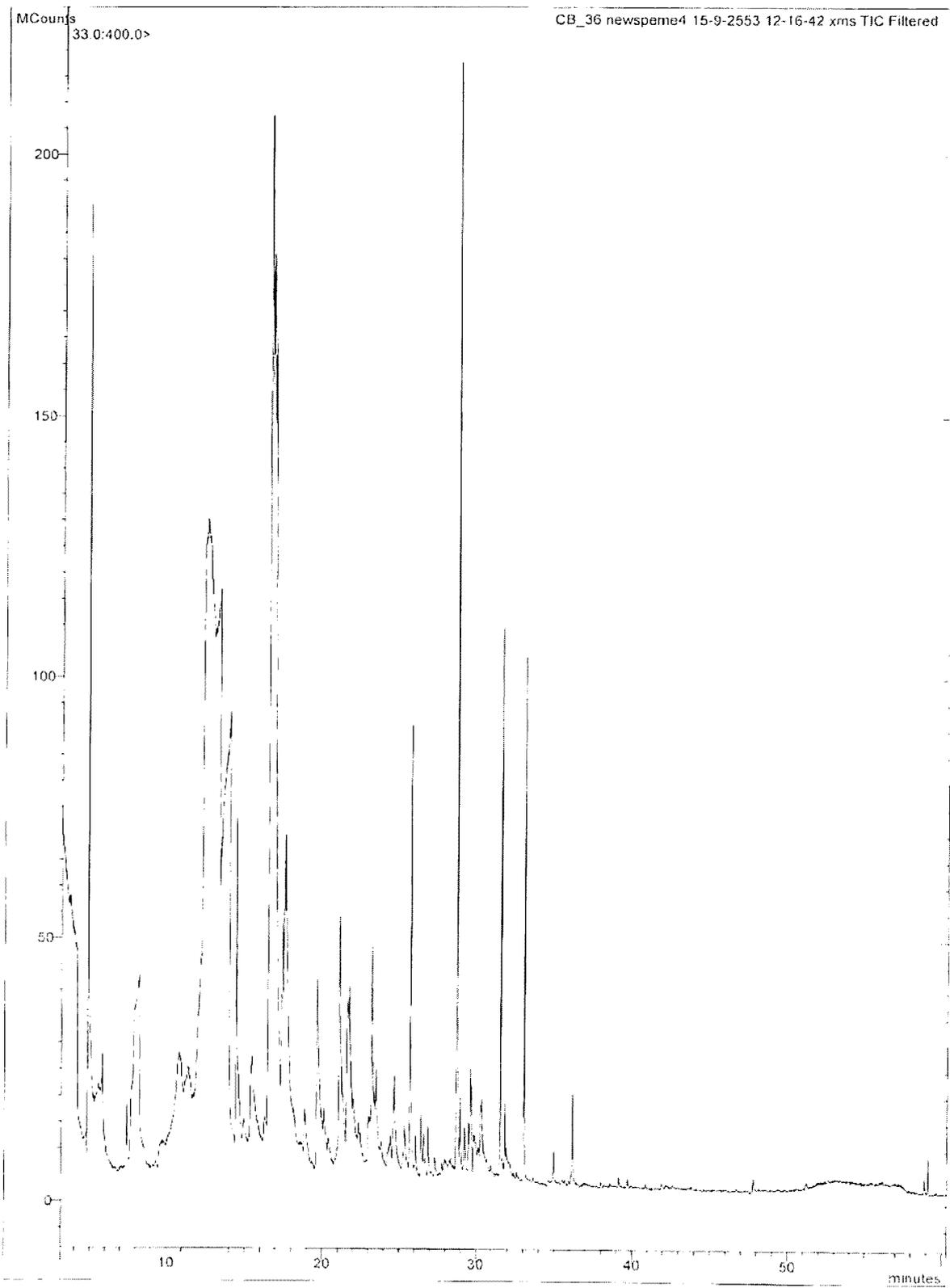
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 0



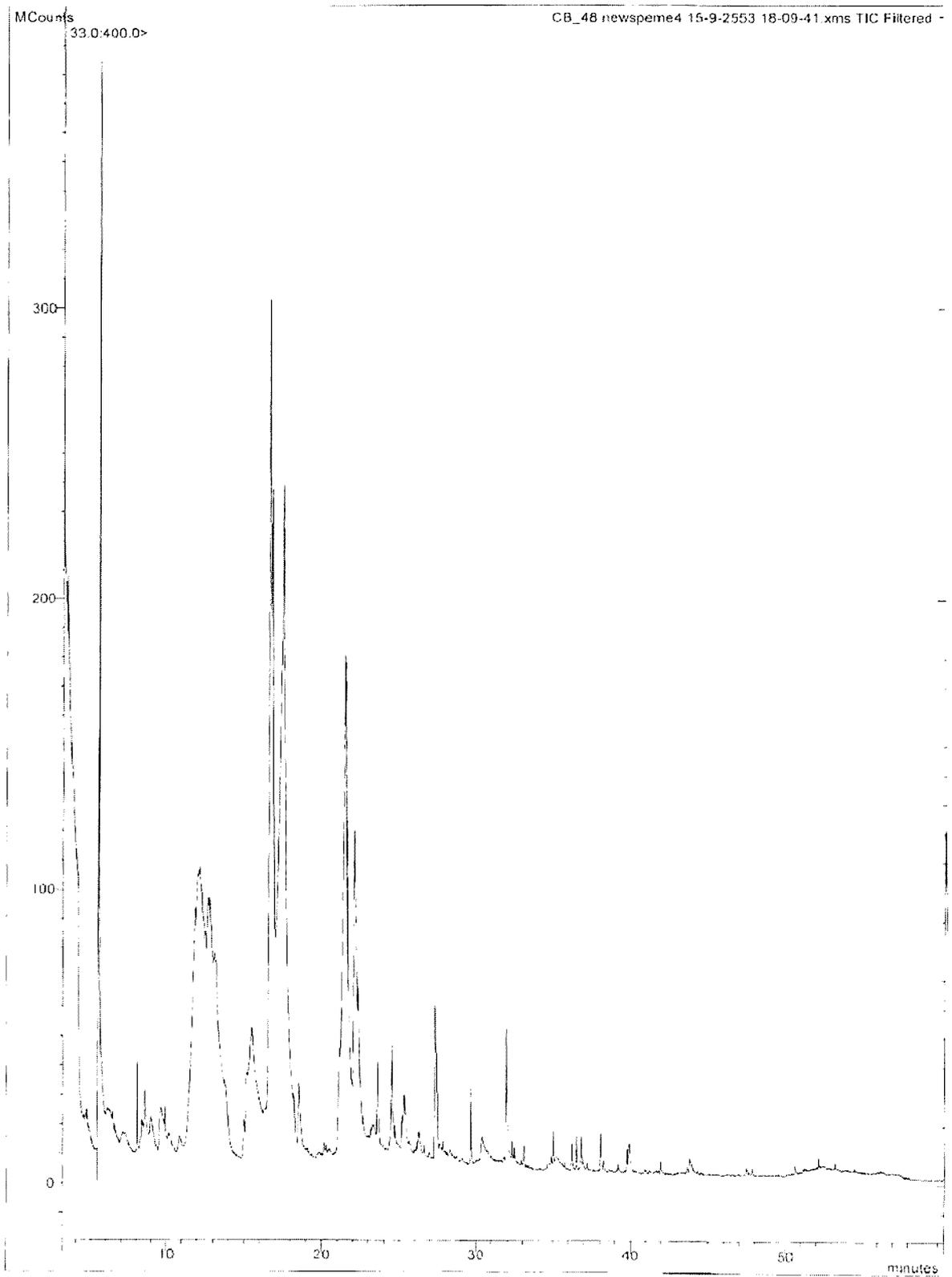
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 12



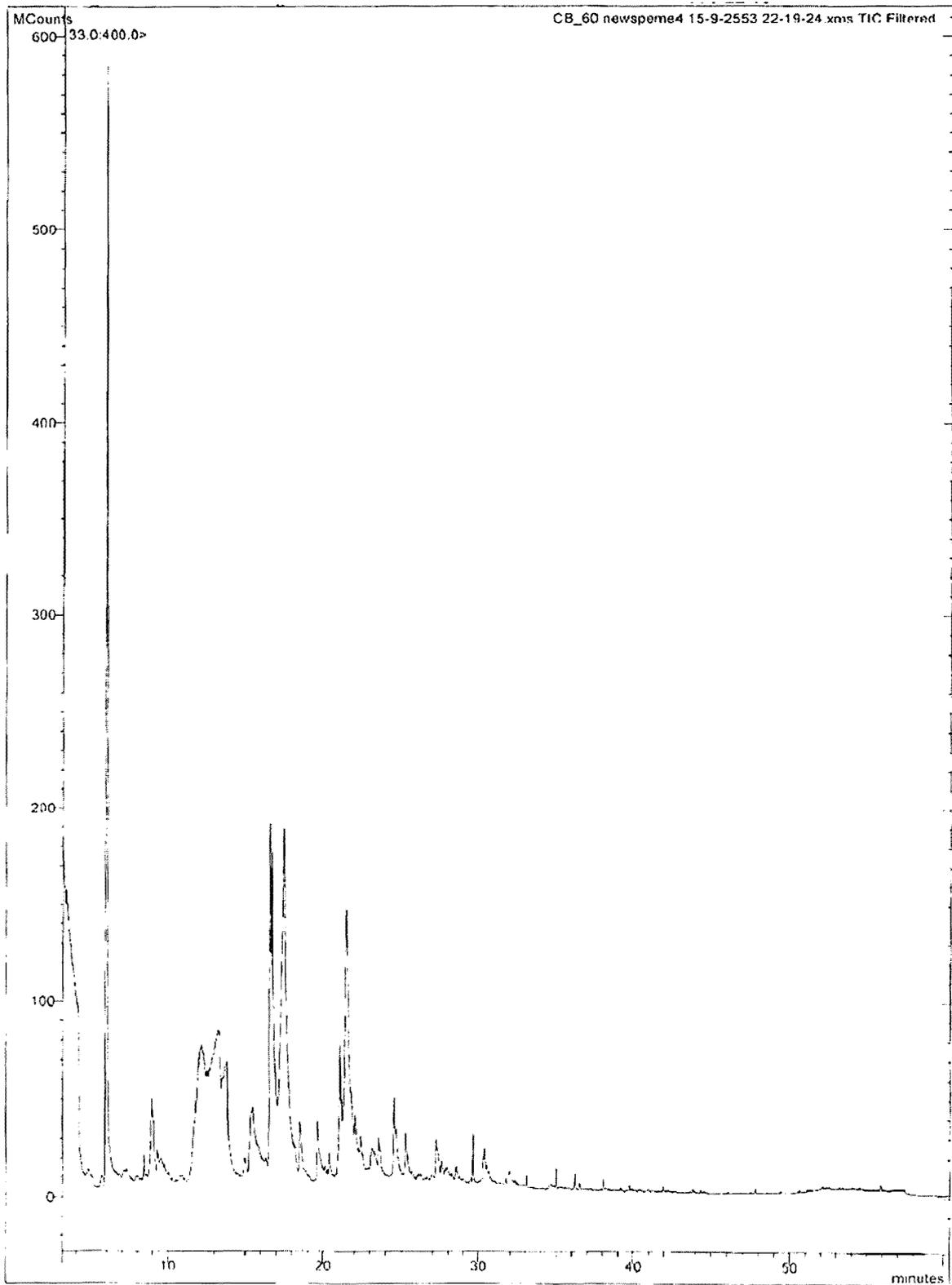
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้อกลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 24



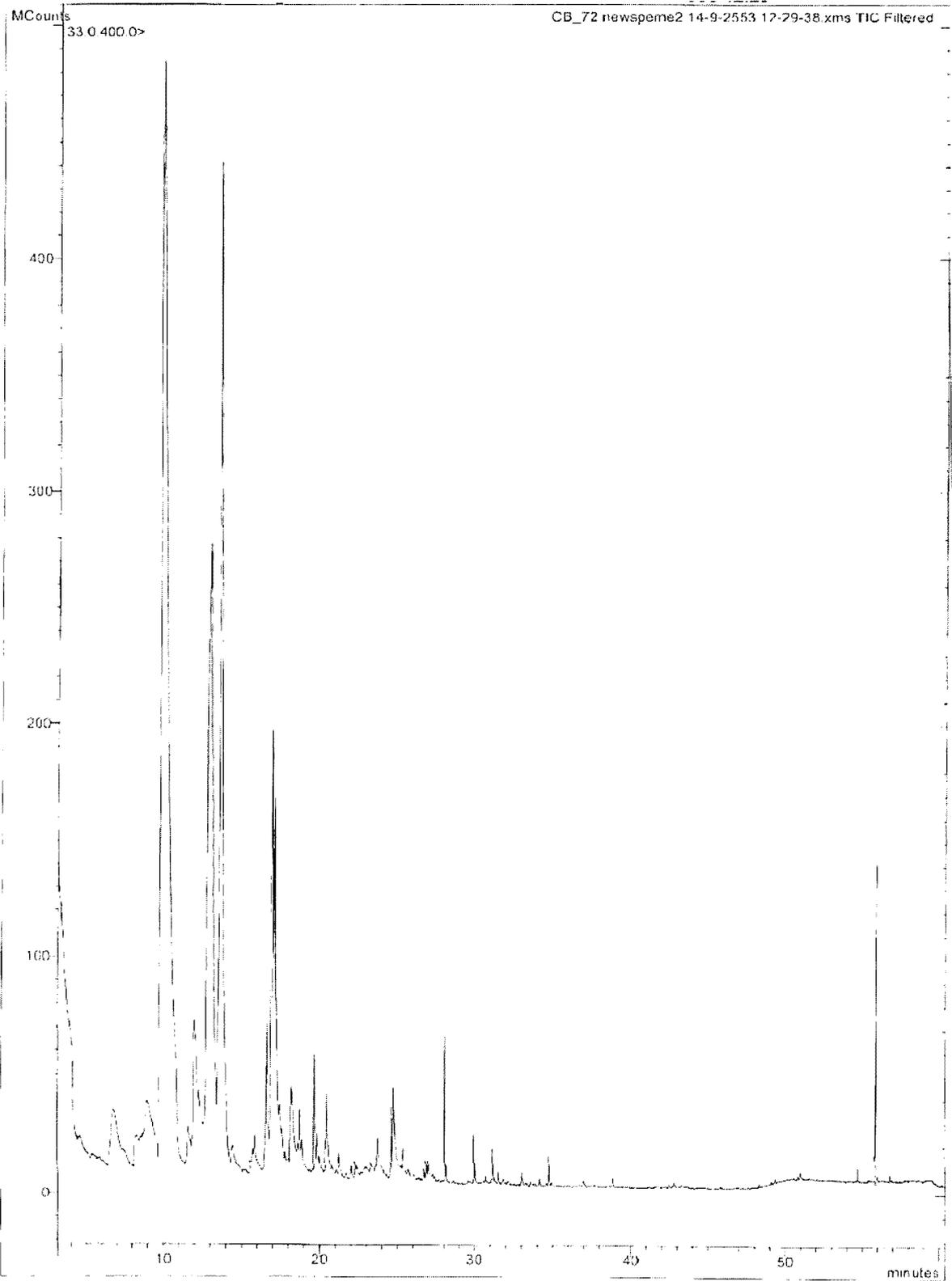
ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 36



ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 48



ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 60



ภาพโครมาโตแกรมการวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นในตัวอย่างถั่วเหลืองหมักที่ให้ความร้อนด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อและเติมกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* (CB) ในชั่วโมงที่ 72

ภาคผนวก ง
การคำนวณ growth rate

ค่า growth rate คำนวณได้จาก

$$\begin{aligned}
 k &= \frac{\log N_t - \log N_0}{0.301 \times t} \\
 &= \frac{\log 8.2 \times 10^6 - \log 1.8 \times 10^3}{0.301 \times 72} \\
 &= \frac{10.09 - 5.63}{21.67} \\
 &= 0.21 \text{ generation/ชั่วโมง} \\
 g &= \frac{1}{0.21 \text{ generation/ชั่วโมง}} \\
 &= 5 \text{ ชั่วโมง/generation}
 \end{aligned}$$

ภาคผนวก จ

การคำนวณค่า antimicrobial activity

การคำนวณค่า antimicrobial activity

เตรียม Nisin 10 mg/ml ละลายใน HCl 0.02 N มีความเข้มข้น 10^4 IU/ml

Nisin 1000 μ l = 10^4 IU

ใช้ Nisin 20 μ l = $\frac{10^4 \text{ IU} \times 20 \mu\text{l}}{1000 \mu\text{l}}$

= 200 IU

Nisin 200 IU ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ 27.12 mm.

27.12 mm. เท่ากับ 200 IU

17.38 mm. เท่ากับ $\frac{200 \text{ IU} \times 17.38 \text{ mm}}{27.12 \text{ mm}}$

= 128.17 IU