รหัสโครงการ SUT3-305-59-24-02

รายงานการวิจัย

ความเสถียรของคุณสมบัติของกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ที่มีแป้งถั่วเหลืองเป็นสารปกป้องความเย็นจากเทคนิคการระเหิดแห้ง

(Stability of *Bacillus subtilis* SB-MYP1 characteristics with soybean flour as cryoprotectant by freeze drying technique)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-305-59-24-02

รายงานการวิจัย

ความเสถียรของคุณสมบัติของกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 ที่มีแป้งถั่วเหลืองเป็นสารปกป้องความเย็นจากเทคนิคการระเหิดแห้ง

(Stability of *Bacillus subtilis* SB-MYP1 characteristics with soybean flour as cryoprotectant by freeze drying technique)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2559-2560

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2565

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณผู้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2559-2560 ที่ทำให้โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี รวมทั้งขอบคุณหน่วยงานอาคารศูนย์เครื่องมือ 3 อาคารศูนย์เครื่องมือ 10 อาคารศูนย์เครื่องมือ 11 และอาคารศูนย์เครื่องมือ 14 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา ที่อนุเคราะห์สถานที่ในการวิจัยทดลอง ตลอดจนศูนย์บรรณสารและสื่อการศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งเป็นแหล่งให้ข้อมูลประกอบงานวิจัยและเอกสารอ้างอิงต่างๆ เพื่อจัดทำรายงานการวิจัยเล่มนี้ให้ลุล่วงสำเร็จไปได้ด้วยดี

รศ.ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก

มีนาคม 2565

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

เทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ด้วยการใช้แป้งถั่วเหลือง (Soybean flour เป็นสารปกป้องความเย็นจากกระบวนการทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze drier) กล้าเชื้อที่ได้จากกระบวนนี้เมื่อเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์อะลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิ -25 0 และ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน พบว่ากล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -25^{O}C เมื่อเวลาผ่านไป 180 วัน ยังคงมีปริมาณ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ที่รอดชีวิต ปริมาณความชื้น และค่าปริมาณน้ำอิสระอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของคุณสมบัติของการเป็นกล้าเชื้อผง ในขณะที่สภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อผงที่อุณหภูมิ 0^{O}C และ 25^{O}C มีจำนวนสปอร์ลดลงในวันที่ 30 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้แก่ *B. cereus* Yeast และ Mold รวมทั้งปริมาณสารพิษจากเชื้อรา aflatoxin จากกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ซึ่งอยู่ในระดับความปลอดภัยตามมาตรฐานของกล้าเชื้อ เมื่อนำกล้าเชื้อผงที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ 16s rRNA ด้วยวิธี sequencing เพื่อยืนยันสายพันธุ์และความเสถียรของกล้าเชื้อในการเก็บรักษา พบว่าผลทดสอบความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อสดและกล้าเชื้อผง ซึ่งมีคุณสมบัติความเป็นกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ที่ตรงกัน (อ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ในกระบวนการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่าในกระบวนการหมักด้วยกล้าเชื้อสดและกล้าเชื้อผงไม่ปรากฏการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค ระหว่างกระบวนการหมัก อัตราการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและโปรติเอสของการใช้กล้าเชื้อผงในกระบวนการหมักสูงสุด (ร้อยละ 100) ในชั่วโมงที่ 48 แสดงให้เห็นถึงการผลิตเอ็นไซม์ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาที่สั้นทำให้เกิดกระบวนการหมักรวดเร็วและมีความเสถียรมากขึ้น นอกจากนี้ได้นำผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ พบว่าถั่วเหลืองหมักด้วยกล้าเชื้อผงมีปริมาณแร่ธาตุและวิตามินสูงกว่าการใช้กล้าเชื้อสดในการหมักดังนี้ ปริมาณแคลเซียม 1227.00 mg/kg เหล็ก 24.75 mg/kg ฟอสฟอรัส 2337 mg/kg และวิตามินบี 12 20.82 mg/100g จึงสรุปได้ว่าเทคนิคการเก็บรักษากล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ด้วย soybean flour โดยกระบวนการทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze drier) มีคุณภาพ ประสิทธิภาพ และความปลอดภัยที่สามารถยืนยันความใช้ได้ในทางการค้า จึงทำการฝากเก็บรักษากล้าเชื้อที่แหล่งเก็บเชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) รหัสเชื้อ *Bacillus subtilis* SB MYP1 TISTR No. 2397 เพื่อการเก็บรักษาในสภาวะที่เหมาะสมและสำหรับการเผยแพร่เชื้อจุลินทรีย์ทางการศึกษาวิจัยและประโยชน์ในเชิงพานิชย์ต่อไป

Abstract

The starter culture of freeze-dried *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 (FDBS_SB-MYP-1) was preserved with soybean flour cryoprotectant and kept in aluminum foil packages at -25, 0, and 25 °C for 6 months. The results showed that viability FDBS_SB-MYP-1 preserved at -25 °C for 180 days remained, while its moisture content and water activity meet the standard requirement of powdered starter culture. In contrast, the spore of FDBS_SB-MYP-1 preserved at 0 and 25 °C for 30 days decreased ($P<0.05$). The *B. cereus*, yeasts and molds, and aflatoxin were not found in all treatments, which were relevant to standard safety. Due to analyze the 16s rRNA sequencing for confirming the stability of starter culture, the consequence revealed that the partial sequence was similar to the fresh starter culture SB-MYP-1, which was relative to NCBI (National Center for Biotechnology Information). After that, the potential of FDBS_SB-MYP-1 was tested in soybean fermentation during 72 h. It found that the food borne pathogens were not detected in all samples, and the relative activities of amylase and protease were approximately 100 at 48 h. It indicated that the stability of SB-MYP-1 remained during storage. In addition, the nutritional values of those fermented soybean products were analyzed. The results showed that the mineral and vitamin B of fermented soybean inoculated with FDBS_SB-MYP-1 had higher than that of fresh culture. The calcium, ferric, phosphorus, vitamin B were about 1227.00 mg/kg, 24.75 mg/kg, 2337 mg/kg, 12 20.82 mg/100g, respectively. It noted that the FDBS_SB-MYP-1 is a promising technique for starter culture preservation for confirming the starter culture potential and microbiological safety. Finally, SB-MYP-1 was kept at Thailand Institute of Scientific and Technological Research with the number of TISTR No. 2397 for further development of fermented food industry.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ค

สารบัญ..... ง

สารบัญตาราง..... จ

สารบัญรูปภาพ..... ฉ

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของการวิจัย..... 1

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย..... 4

ขอบเขตของโครงการวิจัย..... 4

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย..... 5

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 6

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

แหล่งที่มาของข้อมูล..... 12

วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล 19

- การผลิตกล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore เพื่อการเก็บรักษา..... 19
- การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore ด้วยแป้งถั่วเหลืองที่ผลิตได้..... 21
- วิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ 16s rRNA ด้วยวิธี sequencing..... 23

วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล..... 25

บทที่ 4 ผลการวิจัย

คุณภาพมาตรฐานกล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore ในระหว่างการเก็บรักษา.... 26

ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore ด้วยแป้งถั่วเหลืองในระหว่างการหมักถั่วเหลือง..... 31

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย..... 36

ข้อเสนอแนะ..... 37

บรรณานุกรม..... 38

ประวัติผู้วิจัย..... 41

ภาคผนวก..... 53

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สภาวะการเก็บรักษาและอายุการเก็บรักษาของกล้าเชื้อ	7
3.1	สัดส่วนของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR	24
3.2	สภาวะ PCR ด้วยไพร์เมอร์ 27F/1492R เพื่อเพิ่มปริมาณยีนช่วง 16s	24
4.1	ปริมาณ freeze-dried spore ที่มีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 180 วัน	27
4.2	ค่าความชื้น (Moisture content) ของ freeze-dried spore ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 180 วัน	28
4.3	ค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity; a_W) ของ freeze-dried spore ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 180 วัน	29
4.4	การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *B. cereus* Yeast Mold และ Aflatoxin ของ freeze-dried spore ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 180 วัน	30
4.5	การทดสอบความคล้ายคลึงของช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อสด *B. subtilis* SB-MYP1 และ กล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1	31
4.6	จำนวน *B.subtilis* SB-MYP1 ที่เจริญในการหมักถั่วเหลืองระยะเวลา 0-72 ชั่วโมง	32
4.7	ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของกระบวนการหมักด้วยกล้าเชื้อ *B.subtilis* SB-MYP1 ในการหมักถั่วเหลืองตั้งแต่ 0-72 ชั่วโมง	33
4.8	กิจกรรมของเอนไซม์ (Relative activity) ของเอนไซม์อะไมเลสในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่หมักด้วยผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1	34
4.9	กิจกรรมของเอนไซม์ (Relative activity) ของเอนไซม์โปรติเอสในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่หมักด้วยผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1	34
4.10	คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ได้จากการใช้กล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1	35

สารบัญรูปภาพ

รูปที่		หน้า
1	กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Aflatoxin B1 ด้วยวิธีการตรวจสอบแบบ ELISA.....	56
2	การตรวจสอบขนาด PCR product ที่ได้จากการใช้ primer 27F/1492R จากการเพิ่มจำนวนยีนตำแหน่ง 16S rRNA.....	56
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อสด *B. subtilis* SB-MYP1.....	57
4	ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อสด *B. subtilis* SB-MYP1 (ต่อ).....	58
5	ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ณ วันที่ 180 ของการเก็บรักษา.....	59
6	ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ณ วันที่ 180 ของการเก็บรักษา (ต่อ).....	60

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1
บทนำ

1.ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เป็นกระบวนการถนอมอาหารทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่น รส และสีมีความเป็นเอกลักษณ์ และมีการถ่อยทอดเทคโนโลยีสืบต่อกันมานับศตวรรษ ทำให้เกิดความหลากหลายของผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านในแต่ละท้องถิ่น ทั้งนี้ขึ้นกับวัตถุดิบ สภาพภูมิอากาศ และวัฒนธรรมการบริโภค เช่น นมเปรี้ยว หรือ โยเกิร์ต เนยแข็ง (cheese) ซาลามิ (salami) ปลาส้ม ไส้กรอกเปรี้ยว กิมจิ (kimji) ซอร์เคราท์ (sauerkraut) นัตโต เทมเป้ ถั่วเน่า (fermented soybean) เป็นต้น จะเห็นได้ว่าการความหลากหลายของวัตถุดิบ เช่น นม เนื้อสัตว์ ผักผลไม้ และธัญพืช สามารถนำมาแปรรูปโดยกระบวนการหมักให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ วิธีการหมักนอกจากจะได้ประโยชน์ทั้งการยืดอายุการเก็บรักษานาน รสชาติ สี และกลิ่น ที่ดี ยังอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการซึ่งเป็นผลจากบทบาทของจุลินทรีย์ที่ส่งผลต่อการปรับปรุงคุณค่าทางอาหาร เช่น เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สะสมไทอามีน กรดนิโคตินิก หรือแบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติก ทำให้ผู้ที่ไม่มีเอนไซม์แลคเทส ได้ประโยชน์จากสารอาหารในนม โดยไม่มีอาการท้องอืดหรือท้องเสียด้วยบริโภคนมเปรี้ยวหรือผลิตภัณฑ์นมหมัก ถั่วเหลืองหมักหรือถั่วเน่าที่นิยมบริโภคในภาคเหนือของไทยซึ่งจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างเอ็นไซม์โปรติเอสและเอ็นไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่ย่อยโปรตีนในถั่วเหลืองเป็น เปปไทด์ และกรดอะมิโน ช่วยในการดูดซึมเพื่อร่างกายจะนำไปใช้ประโยชน์ นอกจากนี้ยังพบว่าถั่วเหลืองเมื่อผ่านกระบวนการหมักจะไม่ทำให้เกิดการสูญเสีย antioxidant activity เมื่อเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก ปริมาณ isoflavones พบมากที่สุดในถั่วเหลืองสามารถแสดงฤทธิ์ทางชีวภาพหลายอย่าง ได้แก่ ต้านอนุมูลอิสระ ป้องกันกระดูกพรุนและต้านมะเร็ง (Chaiyasut และคณะ, 2010) อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักที่อาศัยจุลินทรีย์ในธรรมชาติทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่แน่นอน และไม่สามารถควบคุมประสิทธิภาพการหมักให้ได้มาตรฐาน หรือขยายกำลังการผลิตได้เท่าที่ควร เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อโรคในอาหาร หรือการสะสมสารพิษในอาหาร จากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้นนั้นส่งผลกระทบต่อการผลิตในเชิงการค้า

ดังนั้นการหมักอาหารหลายชนิดได้มีการพัฒนามาใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ ที่มีการศึกษาจนแน่ใจว่าเชื้อเหล่านั้นมีบทบาทอย่างแท้จริงในกระบวนการหมัก ได้ทำการคัดเลือกตลอดจนปรับปรุงพันธ์ให้ดีขึ้น และมีวิธีการผลิตกล้าเชื้อรูปแบบใหม่ ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญของกล้าเชื้อและเทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค จากผลการวิจัยที่ผ่านผู้วิจัยได้ตระหนักถึงการพัฒนาและควบคุมคุณภาพ ความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า (fermented soybean) ซึ่งจัดได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ (functional foods) ที่ปัจจุบันประชาชนส่วนมากหันมาให้ความสนใจกับสุขภาพร่างกายกันมากขึ้น หรือกลุ่มผู้บริโภคอาหารเจ อาหารมังสวิรัติและอาหารชีวจิต ก็เป็นอีกหลายทางเลือกที่ประชาชนให้ความสนใจมาก ทำให้มีการผลิตถั่วเน่าในเชิงการค้ามากขึ้น เหตุผลดังกล่าวจึงทำให้ผู้วิจัยได้คัดเลือกกล้าเชื้อพัฒนาการ

หมักเพื่อทำให้ผลิตภัณฑ์ถั่วหมักเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทางด้านกลิ่น สี และคุณค่าทางโภชนาการของถั่วหมัก ผลจากการคัดแยกกล้าเชื้อจากถั่วเน่าได้เชื้อ *B. subtilis* SB-MYP 1 ที่ให้ลักษณะผลิตภัณฑ์โดยรวมดีกว่าการหมักแบบธรรมชาติ ทั้งในด้านของ กลิ่น สีและคุณค่าทางโภชนาการ โดยการเติมกล้าเชื้อจะส่งผลให้ถั่วหมักมีปริมาณวิตามินบี 12 ฟอสฟอรัส แคลเซียม และธาตุเหล็ก มากกว่าการหมักแบบธรรมชาติ ทั้งนี้ด้วยคุณสมบัติการผลิต amylase และ protease ของกล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP 1 ที่แยกได้มีผลต่อการให้กลิ่น ผลิตภัณฑ์ถั่วหมักแบบธรรมชาติกลิ่นที่ได้ส่วนใหญ่พบ alcohols, aldehydes, esters and acids, pyrazines, aromatic compounds, ketones, และ alkanes เป็นต้น แต่เมื่อหมักด้วยกล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP 1 พบสารประกอบที่ให้กลิ่นหอมฉุนได้แก่ 2-heptanone และ benzaldehyde มากกว่าที่หมักจากธรรมชาติ นอกจากนี้กล้าเชื้อที่คัดแยกได้ช่วยทำให้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR No.118 เชื้อก่อโรคในอาหาร และจากผลการวิจัยดังกล่าวพบว่ากระบวนการให้ความด้วยหม้อหนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C นาน 15 นาที สามารถทำให้ถั่วสุกได้ โดยไม่มีความแตกต่างทางด้านกายภาพเช่นเดียวกับการต้มที่ต้องใช้ระยะเวลานาน ทำให้เป็นหนึ่งในทางเลือกที่ผู้ประกอบการสามารถเลือกนำไปใช้เพื่อลดระยะเวลาการผลิต (ปิยะวรรณ กาสลัก และรัชฎาพร อุ่นศิวิไลย รายงานการวิจัย การลดกลิ่นไม่พึงประสงค์และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก โดยการใช้ *B. subtilis* เป็นกล้าเชื้อในการหมัก 2553) ภายหลังผู้วิจัยมีการนำผลการวิจัยข้างต้นมาต่อยอดในเชิงพัฒนาแปรรูปเป็นกล้าเชื้อผง เพื่อให้สะดวกต่อการนำไปใช้งานเพื่อต่อยอดหรือพัฒนาแปรรูปผลิตภัณฑ์ถั่วหมักเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยวเสริมสุขภาพจากถั่วหมัก และเครื่องดื่มเสริมสุขภาพจากสารเอ็กโซโพลีแซคคาไรด์ เป็นต้น ซึ่งจากผลการวิจัยที่ได้ทำการศึกษาเสร็จสิ้นด้วยสารปกป้องต่างๆ ได้แก่ maltodextrin, skim milk, sucrose และ soybean flour ด้วยวิธีการอบแห้งแบบพ่นฝอย (spray dried) และการทำแห้งโดยการระเหิดแห้ง (freeze dried) ผลการทดลองดังกล่าวได้ข้อสรุปว่า กล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP 1 ด้วย soybean flour 10% w/v เป็นสารปกป้องและใช้กระบวนการทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze drier) เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการผลิตกล้าเชื้อผงและมีความเป็นไปได้ของการใช้กล้าเชื้อในการผลิตถั่วเหลืองหมัก (ปิยะวรรณ กาสลัก และปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ รายงานการวิจัยเทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อ (*Bacillus subtilis*) เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก)

จากที่กล่าวมาในข้างต้น จึงเป็นเหตุให้ผู้วิจัยเห็นประโยชน์และความสำคัญในการต่อยอดงานวิจัยเพื่อให้กล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP 1 ถูกนำไปใช้ประโยชน์สูงสุด โดยต้องมีคุณลักษณะที่ใช้งานง่าย เก็บรักษาได้นาน และที่สำคัญจะต้องมีความปลอดภัย เพื่อให้ผู้ที่สนใจสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการค้าผู้ประกอบการในระดับ SME รวมถึงการเก็บรักษาเชื้อ ณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ที่สะดวกต่อผู้ที่สนใจสามารถติดต่อข้อใช้งานได้โดยตรง พร้อมทั้งเป็นการพัฒนาศักยภาพในการผลิตของผู้ประกอบการให้เกิดความน่าเชื่อถือจากผลิตภัณฑ์ที่ได้มาตรฐาน

ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาและยืนยันความปลอดภัย สภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสมของกล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP 1 ด้วย soybean flour 10% w/v (โดย freeze drier) ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (-20°C ถึง 25°C) เพื่อให้มั่นใจว่าต่อการนำไปใช้งาน หรือเมื่อกล้าเชื้ออยู่ในอุณหภูมิที่สูงกว่า -20°C (เป็น

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษากล้าเชื้อผง) จะคงประสิทธิภาพในการเจริญของเชื้อเมื่อมีการนำไปใช้งาน ต้องสามารถผลิตเอ็นไซม์อะไมเลส โปรติเอส วิตามินบี 12 ฟอสฟอรัส แคลเซียม ธาตุเหล็ก รวมถึงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR No.118 และการลดกลิ่นด้วยกล้าเชื้อดังกล่าวจะยังคงให้สารประกอบที่ให้กลิ่นหอมฉุนได้แก่ 2-heptanone และ benzaldehyde มากกว่าที่หมักจากธรรมชาติ นอกจากประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่ผ่านการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆแล้ว จำเป็นต้องระบุระยะเวลาในการเก็บรักษาเพื่อให้ได้ความแตกต่างของวันที่หรือเวลา ในการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิที่แตกต่างกันแล้ว จำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการติดตามความปลอดภัยในตัวกล้าเชื้อตลอดระยะเวลาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เพื่อให้เกิดความมั่นในต่อการนำไปใช้งานของผู้ที่สนใจ ซึ่งดัชนีความเสี่ยงที่จะส่งผลต่ออายุการเก็บรักษาและประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP 1 ด้วย soybean flour ได้แก่ (1) ความชื้น (% moisture) (2) ค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity; a_w) ที่เป็นพารามิเตอร์และดัชนีความเสี่ยงสำคัญในผลิตภัณฑ์แป้งถั่วเหลือง ซึ่งแป้งถั่วเหลืองได้ถูกนำมาใช้เป็นสารปกป้องในกระบวนการเก็บรักษากล้าเชื้อนี้ จึงมีความจำเป็นต้องทำการติดตามความชื้นที่เปลี่ยนแปลงของกล้าเชื้อ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์แป้งถั่วเหลือง, มผช. 1377/2550) (2) จำนวนยีสต์และรา เช่นเดียวกับความชื้น ซึ่งดัชนีจัดอยู่ในมาตรฐานแป้งถั่วเหลืองเช่นกัน โดยกำหนดให้ยีสต์และราต้องไม่เกิน 500 โคโลนี ต่อตัวอย่าง 1 กรัม (3) สารพิษจากจุลินทรีย์ ได้แก่ aflatoxin B1 ซึ่งเป็นสารพิษที่สร้างมาจากเชื้อราหลัก 2 ชนิดคือ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasitic* พบในอาหารจำพวกแป้ง และผลิตภัณฑ์จากแป้ง รวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ทำจากถั่วลิสง จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องทำการติดตามผลสารพิษชนิดนี้ในผลิตกล้าเชื้อ นอกจากนี้สารพิษที่ผลิตโดยจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งที่จำเป็นที่ติดตามได้แก่ เอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) ที่มาจาก *B. cereus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* spp. เช่นเดียวกับกล้าเชื้อ (4) *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่มีสายพันธ์ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* แต่ *B. cereus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร (food pathogen) ที่สามารถสร้างสปอร์ สารพิษ (toxin) ที่ทนต่อความร้อนได้ เจริญได้ในที่มีอากาศ (aerobic bacteria) เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง และแบคทีเรียดังกล่าวเป็นเชื้อหลักที่พบในธัญชาติ (cereal) หรืออาหารที่มีสตาร์ซ (starch) เป็นส่วนประกอบ ซึ่งรวมถึงแป้งถั่วเหลืองที่นำมาใช้เป็นสารปกป้องกล้าเชื้อในการศึกษาครั้งนี้ จึงจำเป็นจะต้องมีการตรวจติดตามตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา

ผู้วิจัยยังได้เห็นความสำคัญอีกประการของบรรจุภัณฑ์ จะส่งผลต่อประสิทธิภาพของกล้าเชื้อและความปลอดภัยของกล้าเชื้อ ผลการวิจัยที่จะได้ในการศึกษาครั้งนี้นอกจากจะได้เทคนิคการเก็บกล้าที่เหมาะสมมีประสิทธิภาพ และปลอดภัยต่อความเสี่ยงต่างๆ แล้วยังเป็นหนึ่งในทางเลือกของผู้ประกอบเพื่อลดต้นทุนในการผลิตได้อีกด้วย รวมถึงการเก็บรักษากล้าเชื้อที่เก็บรักษาไว้ ณ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เพื่อให้ผู้ที่สนใจสามารถติดต่อนำไปใช้งาน และมั่นใจได้ว่ากล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP 1 ที่ได้รับการยืนยันสายพันธ์มีประสิทธิภาพที่ดีเมื่อนำไปใช้ในการหมัก กล้าเชื้อมีความปลอดภัยจากความเสี่ยงและมีอายุการเก็บรักษาที่ระบุไว้ชัดเจนว่าจะปลอดภัยจากอันตรายต่างๆที่จะเกิดขึ้นได้

2.วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1) ได้เทคนิคการเก็บรักษากล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ด้วย soybean flour ที่เหมาะสมที่สุด
2) ยืนยันความใช้ได้ในทางการค้าและความปลอดภัยของกล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ด้วย soybean flour และทำการฝากเก็บรักษากล้าเชื้อที่แหล่งเก็บเชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการวิจัยต่อยอดที่ให้ความสำคัญเทคนิคการเก็บรักษากล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ด้วย soybean flour โดยกระบวนการทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze drier) กล้าเชื้อที่ได้จากกระบวนการนี้จะต้องมีคุณภาพและประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการใช้กล้าเชื้อสด ที่สามารถยืนยันความใช้ได้ในทางการค้าและความปลอดภัยของกล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ด้วย soybean flour และทำการฝากเก็บรักษากล้าเชื้อที่แหล่งเก็บเชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) โดยการนำกล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP1 เติมลงในสารละลาย soybean flour 10% w/v แล้วทำแห้งโดยใช้เครื่อง freeze Dryer กำหนดค่าอุณหภูมิสุดท้ายเป็น 35 องศาเซลเซียส ความดัน1.0E+3 mbar เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นติดตามคุณภาพและประสิทธิภาพของกล้าเชื้อผง เป็นระยะเวลา 6 เดือน เพื่อให้มั่นใจซึ่งกล้าเชื้อผงที่ได้นี้จะบรรจุแบบปลอดเชื้อถุงอะลูมิเนียมฟอยล์แบบสุญญากาศเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -25 0 25 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์เป็นระยะเวลา วันที่ 0 30 60 90 120 150 และ 180 ซึ่งในการวิเคราะห์นี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ (1) ทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP1 ด้วยแป้งถั่วเหลืองที่ผลิตได้ การวิเคราะห์ส่วนนี้จะต้องนำกล้าเชื้อผงที่ได้ไปหมักในถั่วเหลืองจากนั้นทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12 แคลเซียม ฟอสฟอรัส และธาตุเหล็กของผลิตภัณฑ์ถั่วหมักสุดท้าย ซึ่งการวิเคราะห์นี้ล้วนเป็นคุณสมบัติเด่นเกิดจากกิจกรรมของกล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP1 (2) วิเคราะห์ความปลอดภัยของกล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ด้วย soybean flour ส่วนนี้เป็นการวิเคราะห์เพื่อยืนยันความปลอดภัยจากความเสี่ยงที่เป็นอันตรายที่จะส่งผลต่อคุณภาพโดยรวมของกล้าเชื้อ ได้แก่ การวิเคราะห์ค่าความชื้น ปริมาณน้ำอิสระ ตรวจนับจำนวน *B. subtilis* SB-MYP1 ที่อยู่รอด วิเคราะห์การปนเปื้อนของ *B. cereus* ยีสต์ และรา (FDA-BAM 2001) วิเคราะห์ปริมาณสารพิษอะฟลาทอกซิน (Aflatoxin) ด้วยวิธี Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) (3) วิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ 16s rRNA ด้วยวิธี sequencing เพื่อยืนยันสายพันธุ์และความเสถียรของกล้าเชื้อในการเก็บรักษา

4.ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

ได้กล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ที่มีความเสถียร เก็บรักษาได้นานที่อุณหภูมิต่างๆ และสามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักถั่วเหลืองได้อย่างปลอดภัย

5.ผู้ใช้ประโยชน์จากการวิจัย

1) นักวิชาการที่ทำวิจัยเกี่ยวกับการผลิตกล้าเชื้อในรูปแบบต่างๆ
2) กลุ่มประชากรเป้าหมายที่ผลิตและจำหน่ายอาหารแปรรูปถั่ว กลุ่มผู้ประกอบการระดับ SME
3) เก็บรักษากล้าเชื้อที่แหล่งเก็บเชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)
4) กลุ่มผู้บริโภคได้รับคุณค่าทางโภชนาการจากผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

กล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* มีบทบาทสำคัญในผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มแกรมบวก รูปแท่งตรง มี flagella แบบ peritrichous เจริญได้ดีที่ pH 5.5-8.5 ในสภาวะที่มีอากาศ (aerobes) หรือ มีอากาศเล็กน้อย (facultative anaerobes) สร้าง catalase มี endospore ที่ทำให้มีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่ดีได้ ทนต่อความร้อน ความแห้ง รังสีอุลตราไวโอเลตและตัวทำละลายอินทรีย์ มีคุณสมบัติในการผลิต antibiotic และยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระหว่างการหมัก ไม่ทำให้เกิดโรค สร้าง Hydrolytic enzyme ที่ย่อยสลาย polysaccharide, nucleic acid และ lipid บทบาทสำคัญของเชื้อตัวนี้ในการหมักคือการปล่อยเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสออกมาย่อยโปรตีน ทำให้ช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่าย เป็นประโยชน์มากขึ้น เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งของโปรตีนที่ดีต่อสุขภาพ ดังนั้นการนำมาหมักจะเป็นการช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เช่น ถั่วเหลืองหมักซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของหลายประเทศ มีชื่อเรียกต่างๆ กัน ได้แก่ อินเดีย (Kinema), จีน (douchiba) และถั่วเน่าของประเทศไทย ในระหว่างการหมัก *Bacillus subtilis* สามารถย่อยองค์ประกอบของโปรตีนให้อยู่ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (Free-amino acids, FAA) ทำให้ร่างกายสามารถย่อยได้ง่ายและนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ผลิตภัณฑ์ dawadawa จะประกอบด้วย Leu, Lys, Arg, Pro และ Asp สำหรับผลิตภัณฑ์ Kinema ประกอบด้วย Glu, Phe และ Leu โดยทั่วไปแล้วกรดอะมิโนอิสระจะให้รสชาติและกลิ่นเฉพาะของผลิตภัณฑ์ ซึ่งกรดอะมิโนที่ได้จากถั่วเหลืองนอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงแล้วยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น ลดไขมันในเลือด ลด coronary heart disease และลดโรคอ้วน เป็นต้น (Park, General & Lee, 2012) กรดอะมิโนบางชนิดยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เช่น Tyr, Met, His, Lys และ Trp นอกจากนี้การเติมกรดอะมิโน Asp, Glu, Pro, Gly และ Leu ในผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง จะช่วยยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งได้ (Dajanta, Apichartsrangkoon, Chukeatirote & Frazier, 2011) Petchkongkaew & Gasaluck, 2008 ได้ทำการแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า พบว่าเป็นเชื้อบาซิลลัส 23 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบแอสเปอร์จิลลัส ฟลาวัส สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยเช่นกัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อบาซิลลัส ซี เอ็ม 21 ซึ่งจากการทำการบ่งชี้ลักษณะในภายหลังพบคือ เชื้อบาซิลลัส ไลเคนนิฟอร์มิส มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังพบอีกว่า เชื้อบาซิลลัส ดังกล่าวมีความสามารถในการกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซิน บีวัน และโอคราทอกซิน เอ ที่สร้างขึ้นจากเชื้อราดังกล่าว โดยความสามารถในการกำจัดสารพิษเท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์และ 92.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้เชื้อบาซิลลัส เอ็ม เฮช เอส 13 ซึ่งได้ทำการบ่งชี้ลักษณะในภายหลังโดยวิธี ITS sequencing คือ เชื้อบาซิลลัส ซับทิลิส มีความสามารถดังกล่าวเช่นกัน โดยสามารถกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซิน บีวัน ได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (Ouoba, Diawara, Jespersen & Jakobsen, 2007) ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Bacillus subtilis* และ *Bacillus subtilis* จากผลิตภัณฑ์ Soumbala พบว่า จุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบและเชื้อราได้ดังนี้ *Micrococcus luteus*,

Staphyloccocus aureus, *Bacillus cereus*, *Enterococus facium*, Listeria monocytogenes, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Aspergillus ochraceus* และ *Penicillium roqueforti* Hemalatha & Shanthi (2010) พบว่า *B. subtilis* ที่ทำการคัดแยกจากตัวอย่างนมมีความสามารถในการผลิตยาปฏิชีวนะ (antibiotic) และการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า *Bacillus subtilis* สามารถผลิตยาปฏิชีวนะได้ดังนี้ streptomycin (25 µg/ml), ampicillin (10 µg/ml), penicillin (10 µg/ml), erythromycin (15 µg/ml), amoxicillin (10 µg/ml) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นแบคเทอริโอซิน และยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ได้ เช่น *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp. และ *E. coli* จะเห็นได้ว่ากล้าเชื้อที่คัดแยกได้จะต้องมีคุณสมบัติที่ช่วยพัฒนาหรือทำให้ผลิตภัณฑ์ดีขึ้น มีคุณภาพ ควบคุมกระบวนการผลิต สามารถขยายการผลิตในทางการค้าได้โดยได้ ผลิตที่มีความสำเสมอ

ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการผลิตโดยใช้กล้าเชื้อจะมีลักษณะเฉพาะตัว เช่น ความเป็นกรด (pH) รสชาติ กลิ่นและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังทำให้มีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้นและสามารถย่อยได้ง่าย ส่งผลให้ต้องคำนึงถึงการเก็บรักษากล้าเชื้อ โดยต้องเป็นวิธีการที่จะช่วยให้กล้าเชื้อมีกิจกรรมการหมักเหมือนเดิม เช่น การแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวถึงอุณหภูมิ -160˚C จะช่วยเก็บรักษากล้าเชื้อได้ดี ปัจจุบันนี้มีการนำกล้าเชื้อมาเก็บรักษาในรูปแบบ deep-frozen และ freeze-dried (lyophilised) ซึ่งจะต้องคำนึงถึงอายุในการเก็บรักษากล้าเชื้อด้วย ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สภาวะการเก็บรักษาและอายุการเก็บรักษาของกล้าเชื้อ

ชนิดของกล้าเชื้อ	การเก็บรักษา	อายุการเก็บรักษา (เดือน)
Freez-dried DVS	Freezer below -18˚C	อย่างน้อย 12 เดือน
Deep-frozen DVS	Freezer below -45˚C	อย่างน้อย 12 เดือน
Freez-dried REDI-SET	Freezer below -18˚C	อย่างน้อย 12 เดือน
Deep-frozen REDI-SET	Freezer below -45˚C	อย่างน้อย 12 เดือน
DRI-VAC	Refrigator below +5˚C	อย่างน้อย 12 เดือน

ที่มา : Bylund (1999)

การผลิตกล้าเชื้อโดยวิธีการทำแห้งเป็นวิธีที่ลดการทำงานที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกล้าเชื้อชนิดเหลว สามารถยืดอายุการเก็บรักษาเชื้อได้นานขึ้น โดยปราศจากการสูญเสียกิจกรรมของเชื้อและมีความสะดวกในการขนส่ง การทำแห้งเป็นกระบวนการขจัดน้ำออกจากตัวอย่างเพื่อเปลี่ยนเป็นของแข็งที่อยู่ในสภาพแห้ง กล้าเชื้อชนิดแห้งนี้เป็นกล้าเชื้อชนิดเข้มข้น (concentrate starter) มีเชื้อที่มีชีวิตรอดอยู่ร้อยละ 1-2 การนำมาใช้ต้องมีการต่อเชื้อก่อนที่จะนำมาใช้หลายครั้ง เพื่อให้เชื้อมีกิจกรรมต่างๆ สูงสุด วิธีการทำแห้งมีด้วยกันหลายวิธี ได้แก่ การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งและการทำแห้งแบบพ่นฝอย เป็นต้น (สมบูรณ์, 2539)

การผลิตกล้าเชื้อแบบผง เชื้อจุลินทรีย์จะต้องผ่านกรรมวิธีในการผลิตที่มีอุณหภูมิเข้ามาเกี่ยวข้อง เชื้ออาจถูกทำลายโดยอุณหภูมิที่นำมาใช้ ซึ่งจะมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อลดลง จึงต้องมีการป้องกันไม่ให้เซลล์ได้รับอันตราย โดยมีการเติมสารบางชนิดซึ่งมีผลช่วยให้อัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น (ภัทรียา, 2541) สารปกป้องเซลล์หรือสารที่ใช้เคลือบเซลล์จะป้องกันความร้อนหรือความเย็น (cryoprotectants or protective substances) ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำแห้ง ซึ่งจะช่วยลดการถูกทำลายของเซลล์ และช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์ที่ผ่านการทำแห้ง รวมถึงในการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีจำนวนมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับเซลล์ที่ได้รับความเสียหายบางส่วน (sub-lethal damage) ซึ่งอาจกลายเป็นเซลล์ตาย (lethal form) ในระหว่างการเก็บรักษา กระบวนการขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำ ออกซิเจนและอุณหภูมิ (Simpson et al., 2005) ไม่เพียงแต่เยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้นที่ไวต่อความร้อนในระหว่างการทำแห้ง แต่ผนังเซลล์ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ยังได้รับผลกระทบจากความร้อนซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียกิจกรรม (metabolic activity) ได้ (Meng et al., 2008) สารประกอบที่นิยมใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ นมพร่องไขมัน น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล โซเดียมกลูตาเมตหรือส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสกับซีรั่ม (Hubalek, 2003) มอลโตเดกตริน (Namaldi et al., 2006) alginate starch bentonite (Wu et al., 2012) และ MgSO4 เป็น matrix ร่วมกับ Biocontrol (Yanez-Mendizabal et al., 2012) กิจกรรมของสารปกป้องเซลล์จะสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น โดยทั่วไปสารที่ปกป้องเซลล์ได้ดีต้องมีหมู่ไฮโดรคาร์บอน (hydrogen bond) อยู่ในโมเลกุลสามหมู่หรือมากกว่า และมีหมู่ที่ไอโอโนสได้อยู่ด้วยคือ มีหมู่อะมิโนอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาคาร์บอน มีหมู่คาร์บอกซีอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาและแกมม่า และมีส่วนของโมเลกุลระหว่างหมู่แกมม่า คาร์บอกซีและหมู่ไฮโดรเจนบอนด์ ในสารประกอบจำพวกน้ำตาลและพอลิแอลกอฮอล์ มีหมู่ไฮดรอกซีมากกว่าห้าหมู่ ซึ่งอาจช่วยในการป้องกันเซลล์จากอันตรายได้ นอกจากนี้ขนาดโมเลกุลก็มีส่วนสำคัญ สิ่งที่สำคัญอีกประการคือ สารปกป้องเซลล์ต้องสามารถป้องกันเซลล์จากผลทางกายภาพ ระหว่างที่สภาวะสภาพแวดล้อมของกระบวนการเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือในกระบวนการทำแห้งมีการกำจัดน้ำออกนอกเซลล์ ซึ่งน้ำเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญภายในเซลล์ นอกจากผลของปฏิกิริยาของสารปกป้องเซลล์กับองค์ประกอบของผิวเซลล์หรือสารที่มีอยู่ภายในเซลล์ สารปกป้องเซลล์จะทำให้อิเลคโตรไลท์เป็นกลาง ไม่ทำให้ความสามารถเลือกนำสารเข้าออกเซลล์เมมเบรนเปลี่ยนแปลงหรือสูญไป และยังสามารถป้องกันไม่ให้เชื้อสัมผัสกับอากาศ (Hubalek, 2003) นอกจากสารปกป้องข้างต้นยังมีการใช้สารที่ทำจากวัตถุดิบ ได้แก่ แป้งถั่วเหลือง ที่ถูกนำมาใช้เป็นสารปกป้องกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* แล้วนำไปใช้ในการหมักถั่วเหลือง พบว่ามีความสม่ำเสมอในระหว่างระยะเวลาการหมัก และมีประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตเอนไซม์ที่ดี ไม่ส่งผลต่อกลิ่นและสี (ปิยะวรรณ กาสลัก และปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ รายงานการวิจัยเทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อ (*Bacillus subtilis*) เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก, 2554) นอกจากชนิดของสารปกป้อง วิธีการทำแห้ง ที่มีผลต่อประสิทธิภาพและอายุการเก็บรักษากล้าเชื้อผงแล้ว การผลิตกล้าเชื้อที่ดีต้องคำนึงพารามิเตอร์ที่เลือกใช้มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้ (1) ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (type of organism) ขนาดและองค์ประกอบของเชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อการรอดชีวิต สปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์จะมีความสามารถในการต้านทานความแห้ง จึงมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อผ่านกรรมวิธีการทำแห้ง จุลินทรีย์ชนิดแกรมบวกจะมีอัตราการรอด

ชีวิตสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดแกรมลบ เพราะเนื่องจากไขมันที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์จะช่วยในการคงสภาพของเซลล์ให้คงอยู่ได้ดีกว่า และเซลล์ที่มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเซลล์น้อย (2) อายุของเชื้อจุลินทรีย์ (physiological age) เซลล์จุลินทรีย์ที่มีอายุอยู่ในช่วงระยะการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) จะมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าเชื้อที่อยู่ในช่วงระยะเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ (3) ความเข้มข้นของเซลล์ (cell concentration) ปริมาณเริ่มต้นของเซลล์มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต โดยที่อัตราการรอดชีวิตจะมีสูงขึ้นเมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการแช่แข็งแห้ง และควรมีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และภายหลังจากการผ่านกระบวนการทำแห้งจะต้องมีเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 10^{8} CFU/ml (Morgan et al., 2006)

หลังจากกระบวนการทำแห้งกล้าเชื้อแล้ว สภาวะอุณหภูมิ ชนิดบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการบรรจุกล้าเชื้อเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญ ผลการศึกษาสภาวะอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการเก็บรักษากล้าเชื้อผง *S. thermophilus* และ *B. longum* ด้วยนมถั่วเหลือง โดยใช้วิธีการทำแห้งกล้าเชื้อแบบ freeze-dried จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4˚C และ 25˚C ทำการติดตามการอยู่รอดของเชื้อเพื่อหาอายุการเก็บ พบว่าอัตราการอยู่รอดของ *S. thermophilus* และ *B. longum* ที่ 4˚C มีอัตราการอยู่รอดของเชื้อทั้ง 2 สูงกว่าเก็บที่ 25˚C และพบว่าหลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน 4 เดือน ที่อุณหภูมิ 4˚C พบอัตราการอยู่รอดของ *S. thermophilus* เท่ากับร้อยละ 51.1 และ *B. longum* เท่ากับร้อยละ 68.8 (Yi-Chieh Wang, Roch-Chui Yu และ Cheng-Chun Chou, 2004) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ พบว่ามีการศึกษาอัตราการอยู่รอดของ *Candida sake* ด้วยการใช้ 10% skim milk เป็นสารปกป้อง ที่ดีที่สุดเมื่อทำการเก็บเชื้อผงที่อุณหภูมิ -20˚C มีอัตราการอยู่รอดสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้ Galactose, raffinose และ sodium glutamate 10% เป็นสารปกป้อง (M. Abadias et al., 2001)

นอกจากระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานที่สุดจำเป็นต้องพิจารณาถึงคุณภาพของกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* จะต้องคงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ สาร antimicrobial และเมตาบอไลท์อื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการใช้กล้าสด ดังนั้นกิจกรรมต่างๆที่เกิดจากการนำกล้าเชื้อผงไผใช้งานในกระบวนการหมักควรมีความสำเสมอ คือการปล่อย ผลิต เอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส ออกมาย่อยโปรตีนช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายและเป็นประโยชน์มากขึ้น ซึ่งเมื่อทำการหมักถั่วจะได้สารประกอบจำพวก ester เป็นส่วนมาก เช่น ethyl, isobutyl และ isoamyl ester ของ isobutyric, a-methylbutyric, isovaleric, tiglic acids ซึ่งเกิดจากการสลายตัว และการหมักของโปรตีนกลีเซอร์ไรด์และกรดไขมันในถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมีสารที่ให้กลิ่นหอมฉุน เช่น 2-heptanone pyrazine และ benzadehyde โดยไพราซีนจะเกิดขึ้นจากการต้มถั่วให้สุกก่อนนำไปหมัก ในขณะที่สาร 1-ออกทีน-3-ออล มีปริมาณลดลง (ภานุวรรณ, 2543) พร้อมกันนั้นกล้าเชื้อจะต้องยังคงคุณภาพอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ตลอดระยะเวลาการเก็บ

ความปลอดภัยของกล้าเชื้อเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องควบคุม ติดตามตลอดอายุการเก็บ โดยความเสี่ยงที่จำเป็นจะต้องควบคุมและพิจารณามาจากหลายองค์ประกอบด้วย กัน เช่น เชื้อสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับกล้าเชื้อ เช่น เชื้อแบคทีเรียก่อโรค *Bacillus cereus* เป็นแบคที่เรีย ในกลุ่ม *Bacillus* ที่จัดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ขนาดประมาณ 1.0 -1.2 ไมโครเมตรสร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศในช่วง pH 4.9-9.3 และ a_w มากกว่า 0.92 สามารถเจริญได้ระหว่างอุณหภูมิ 4-48°C อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28-35°C (U.S. FDA, 2012) ส่วนสายพันธุ์ไซโครโทรปสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 °C บางชนิดเจริญช้าๆได้ที่ 4-5 °C และไม่เจริญที่ 43 °C (Van Netten และคณะ, 1990) *Bacillus cereus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในดิน ฝุ่นละออง ทั้งในอาหารดิบ อาหารแห้ง หรืออาหารสำเร็จรูปเช่น ธัญพืช เครื่องเทศและอาหารแห้งชนิดอื่นผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น ข้าว แป้ง ผลิตภัณฑ์จากแป้ง เครื่องเทศ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเครื่องปรุงแต่งรสต่างๆ มักพบเสมอในอาหารที่ผ่านการทำแห้งที่เก็บรักษาไว้นาน (Eric, 1990) นอกจากนี้ยังพบในอุจจาระของคนที่มีสุขภาพปกติได้ประมาณ 15%การปนเปื้อนของ *Bacillus cereus* สามารถพบได้ทั่วไปวนเวียนเป็นวัฏจักรที่เป็นการส่งผ่านทั้งตัวเซลล์และสปอร์ของ *Bacillus cereus* ไปในแมลง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จนมาปนเปื้อนในอาหารและเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ 2 โดยคุณสมบัติที่สำคัญของ *Bacillus cereus* คือสามารถสร้างสารพิษ (toxin) ที่ทนต่อความร้อนได้ ซึ่งการปนเปื้อนมักเกิดจากสปอร์ เมื่อสปอร์เจริญเป็น vegetative cell จะผลิตสารพิษออกมา ซึ่งสารพิษที่สร้างจาก *Bacillus cereus* แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ทำให้ท้องร่วง (diarrhea toxin) และชนิดที่ทำให้อาเจียน (emetic toxin) ซึ่งเป็นสารพิษเอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) โดยสารพิษทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถในการทนทั้งความร้อนและความเป็นกรดได้ เมื่อ *Bacillus cereus* เจริญจนสามารถสร้างสปอร์ได้ จะมีการสร้างสารพิษขึ้นดังนั้นความเป็นพิษจากสารพิษทั้งสองสามารถเกิดขึ้นได้ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์ *Bacillus cereus* จะถูกทำลายไปแล้วก็ตาม (Health Protection Agency, 2009) *Bacillus cereus* นั้นก็จะมีสภาวะการเจริญที่คล้ายคลึงกับ *Bacillus subtilis* และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25˚C ซึ่งเป็นหนึ่งในอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการศึกษาหารอายุการเก็บรักษา หากการควบคุมกระบวนการผลิตไม่ดีหรือเกิดความผิดพลาดในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการผลิต อาจทำให้มีการปนเปื้อน *Bacillus cereus* เข้ามาได้อย่างง่ายดาย นอกจาก *Bacillus cereus* ยังพบว่า *Bacillus pumilus* นี้ปนเปื้อนในขนมปัง และวัตถุดิบสำหรับผลิตขนมปัง ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย (microbial spoilage) โดยจะย่อยสลายขนมปัง ทำให้มีลักษณะเหนียวติดกัน เป็นเส้นยืด มีกลิ่นเหม็น แหล่งที่มาของเชื้อในขนมปังส่วนใหญ่มาจากวัตถุดิบ ประเภทของแห้ง เช่น แป้งสาลี และยีสต์แห้ง สปอร์ของเชื้อจะทนต่อความร้อนสูง ทนต่ออุณหภูมิระหว่างการแปรรูป Frederic Carlin และคณะ (2000) ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียในผัก ได้แก่ บร็อคเคอรี่ แครอท บวบ หอม มันฝรั่ง และถั่วเขียว โดยพบ *B. circulans, B. macerans, B. polymyxa.* และ *B. pumilus* สามารถอยู่รอดในสภาวะอุณหภูมิต่ำ ที่ 4˚C – 10 ˚C และยังพบว่าในผลิตภัณฑ์อาหารประเภท ready-to-eat ที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ และเก็บที่ 7˚C – 10 ˚C พบว่า *B. pumilus* FF128a และ *B. cereus* FF119b (S. Samapundo et al., 2014) จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนอกจากเชื้อแบคทีเรียที่มีความเสี่ยงที่จะปนเปื้อนในกล้าเชื้อแล้ว เชื้อรายังเป็นดังนีคุณภาพมาตรฐานด้าน

จุลินทรีย์ที่ถูกกำหนดในแป้งถั่วเหลือง กำหนดให้ยีสต์และราไม่เกิน 500 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน แป้งถั่วเหลือง มผช.1377/2550) ดังนั้นหากพบการมีอยู่หรือการปนเปื้อนของเชื้อราในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา จะเป็นความเสี่ยงที่อาจจะพบสารพิษที่สร้างจากเชื้อราได้ เช่น เชื้อราสกุล *Aspergillus* (*Aspergillus* spp.) เป็นเชื้อราที่พบได้ทั้งในรูปของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphic) และแบบอาศัยเพศ (teleomorphic) และจัดเป็นราในกลุ่ม *Ascomycetes* เชื้อรา *Aspergillus* มีเส้นใยที่แตกแขนงและมีผนังกั้น เส้นใยของเชื้อราไม่มีสี สามารถเจริญได้ในที่ที่มีออกซิเจนสูง จึงพบในบริเวณที่มีออกซิเจนสูงเกือบทั้งหมดโดยทั่วไปเจริญเป็นเส้นใยราบนผิวของอาหารที่มีคาร์บอนมากเช่น กลูโคส อะไมโลส ราที่ทำให้เกิดโทษได้แก่ราที่ทำให้มนุษย์สัตว์และพืชเกิดโรค หรือทำลายสิ่งของเครื่องใช้และราที่สร้างสารพิษ (mycotoxin) บนธัญพืชและอาหารชนิดต่าง ๆ ซึ่งเชื้อราที่สร้างสารพิษ (mycotoxin) สามารถสร้างสารพิษได้ 5 กลุ่มได้แก่ อะฟลาท็อกซิน (aflatoxin), ออกคราท็อกซิน (ochratoxin), ไตรโคทีซิน (trichothecene), ซีราลีโนน (zeararenone)และพาทูลิน (patiulin) (Benjamart, 2012) ในที่นี้สนใจศึกษาเฉพาะอะฟลาท็อกซินเนื่องจากเป็นสารพิษที่มีความเสี่ยงปนเปื้อนในถั่วเหลืองได้มาก ทนความร้อนได้สูง เป็นสารพิษชนิดที่ก่อให้เกิดอาการแบบเฉียบพลัน (Acute aflatoxicosis) และก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตหลายด้านด้วยกัน ทั้งการก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogenesis), เป็นพิษต่อตับ (hepatotoxicity), ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenic) และก่อให้เกิดโรควิรูป (teratogenic) เป็นอันตรายต่อการพัฒนาตัวอ่อนในครรภ์ และที่สำคัญพบว่าอะฟลาท็อกซิน มีการปนเปื้อนมากที่สุดในผลิตภัณฑ์อาหาร รวมถึงผลิตภัณฑ์ถั่วหมักด้วย (Teniola และคณะ, 2005) จึงต้องให้ความสำคัญในการควบคุมคุณภาพกล้าเชื้อเพื่อให้ปลอดจากการปนเปื้อนที่กล่าวในข้างต้น

งานวิจัยนี้ มีเป้าหมายในการศึกษาเพื่อได้เทคนิคการเก็บกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ด้วย soybean flour ที่เหมาะสมที่สุด และยืนยันความใช้ได้ในทางการค้า ความปลอดภัยของกล้าเชื้อผง ทำการฝากเก็บรักษากล้าเชื้อที่แหล่งเก็บเชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 เป็นการนำเอา soybean flour 10% w/v มาใช้เป็นสารปกป้อง และทำแห้งแบบการระเหิดแห้ง (freeze dried) หรือ Lyophilization เป็นกระบวนการทำแห้งภายใต้สภาวะอุณหภูมิและความดันต่ำ จึงช่วยให้ผลิตภัณฑ์คงคุณค่าทางโภชนาการ เนื้อสัมผัส โครงสร้าง สี กลิ่น และรสชาติ ได้ใกล้เคียงกับของสด ผลิตภัณฑ์ที่นิยมนำมาทำแห้งแบบเยือกแข็ง ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูง เช่น อาหารเครื่องสำอาง ยาและผลิตภัณฑ์ทางการแพทย์ รวมถึงกล้าเชื้อจากจุลินทรีย์ เป็นต้น ซึ่งกล้าเชื้อที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการคุณภาพสูง ดังนั้นการจัดเก็บและบรรจุภัณฑ์จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากผลิตภัณฑ์ทำแห้งแบบเยือกแข็งมีความไวต่อการเสียหาย ในสภาพบรรยากาศปกติ คุณสมบัติการดูดความชื้นกลับ (Hygroscopic) ปฏิกิริยากับออกซิเจน ความเปราะบาง และการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ด้วยเหตุนี้การเลือกบรรจุภัณฑ์สำหรับผลิตภัณฑ์ทำแห้งแบบเยือกแข็งจึงควรมีลักษณะดังนี้ คือ อยู่ภายใต้สภาพบรรยากาศดัดแปลง (Modified Atmosphere) เช่น การบรรจุแบบสุญญากาศ (Vacuum Pack) หรือการบรรจุแบบเติมไนโตรเจน (Nitrogen Pack) และอยู่ในภาชนะบรรจุที่มี

การป้องกัน เช่น ถุงกันกระแทก กระป๋องพลาสติกหรือโลหะ เป็นต้น (ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล, 2547) โครงการวิจัยจึงมุ่งประเด็นเพื่อต่อยอดงานวิจัยในเชิงคุณภาพ ความปลอดภัยและความเสถียรของคุณสมบัติของกล้าเชื้อ ซึ่งมีหลายปัจจัยที่ต้องควบคุม ได้แก่ อายุการเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ที่ดีที่สุด ซึ่งบรรจุภัณฑ์ที่เลือกมาใช้ในการศึกษานี้ ได้แก่ ถุงสุญญากาศ และถุงอะลูมิเนียมฟอยด์ บรรจุภัณฑ์ทั้งสองสามารถนำไปใช้ในเก็บกล้าเชื้อภายใต้สภาพบรรยากาศดัดแปลงได้ เนื่องจากด้วยถุงสุญญากาศ (vacuum bag) มีคุณสมบัติป้องกันการซึมผ่านของอากาศและไอน้ำได้ดี เหมาะกับอาหารแห้งและอาหารแช่แข็ง ถุงชนิดนี้ประด้วยฟิล์ม polyamide (Pa) มีคุณสมบัติที่ดีในการต้านการรั่วซึม ทนต่ออุณหภูมิร้อน – เย็น เหนียว จึงนำฟล์มชนิดนี้มาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์สุญญากาศสำหรับบรรจุอาหารได้ กรณีถุงอะลูมิเนียมฟอยด์ ประกอบด้วยฟิล์ม และมีการเคลือบถุงอีกชั้นด้วยฟอย์อลูมิเนียม ทำให้ถุงมีลักษณะคล้ายกับถุงถุงสุญญากาศ แต่แตกต่างด้วยคุณสมบัติที่สามารถป้องกันได้ทั้งก๊าซต่างๆ กันการซึมผ่านของก๊าซ น้ำ กลิ่น น้ำมัน และแสงได้ดี ทำให้สามารถป้องกันและถนอมผลิตภัณฑ์ที่อยู่ภายในได้ยาวนานกว่าฟิล์มชนิดอื่นๆ จึงนิยมนำมาใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ผลิตภัณฑ์อาหารและยา ทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลว (Plastics Intelligence update สถาบันปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย, 2553) จึงเป็นที่มาของการเลือกใช้บรรจุภัณฑ์ทั้งสองชนิดนี้ในการศึกษาความปลอดภัยและสภาวะการเก็บรักษาที่เหมาะสมของ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ผงด้วย soybean flour นอกจากบรรจุภัณฑ์ที่ช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาแล้ว อุณหูมิที่เก็บเชื้อเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้เชื้อมีประสิทธิภาพและคุณภาพเมื่อนำไปใช้งานแตกต่างกัน โดยทั่วไปอุณหภูมิที่ดีที่สุดสำหรับเก็บรักษากล้าเชื้อผงทั่วไป คือ อุณหภูมิที่ต่ำว่า -100°C (frozen culture) เป็นช่วงอุณหภูมิที่มีการพิสูจน์แล้วว่าสามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานกว่า 6 เดือน อย่างไรก็ตามเชื้อบางชนิดก็ไม่สามารถสามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิระดับนี้ได้ เนื่องจากมีอัตราการตายอย่างรวดเร็วในสภาพแช่แข็ง เช่น *Blakeslea trispora* ซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้ในการผลิต beta-carotene นอกจากนี้มีรายงานการเก็บรักษากล้าเชื้อผง lactic acid bacteria ใช้ในผลิตภัณฑ์นม ทำการเก็บรักษาเชื้อผงที่อุณหภูมิ -20°C สามารถเก็บรักษาได้นานถึง 14 สัปดาห์ โดยกล้าเชื้อยังคงแสดงกิจกรรมเอ็นไซม์ได้สม่ำเสมอตลอดระยะเวลาการเก็บ (F. Fernanda, B. Catherine and C. Georges, 2000) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C นอกจากสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ แล้วที่อุณหภูมิ 4°C และ 25°C ยังเป็นสภาวะที่ง่ายสะดวกต่อการเก็บรักษา ที่ผ่านมาจึงมีคนนิยมศึกษาสภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อผงที่อุณหภูมิ จึงมีคนนิยมศึกษาสภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อผงที่อุณหภูมิดังกล่าว แต่อย่างไรก็ตามเพื่อให้เกิดความมั่นใจในสภาวะการเก็บรักษาที่ดีที่สุดผู้วิจัยจึงเลือกทำการศึกษาการเก็บรักษากล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ผงด้วย soybean flour 10% w/v ทั้งที่อุณหภูมิต่ำไปจนถึงที่อุณหภูมิห้อง คือ -20°C, 4°C และ 25°C นอกจากความสำคัญของอายุการเก็บรักษาแล้ว เพื่อคุณภาพที่ดีที่สุดของกล้าเชื้อที่จะนำไปใช้ในการหมักถั่ว จึงต้องมีการศึกษาและติดตามควบคุมประสิทธิภาพและความปลอดภัยของกล้าเชื้อ กล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่ดีนั้นจะต้องมีบทบาทสำคัญในการทำผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มแกรมบวก รูปแท่งตรง มี flagella แบบ peritrichous เจริญได้ดีที่ pH 5.5-8.5 ในสภาวะที่มีอากาศ (aerobes) หรือ มีอากาศเล็กน้อย (facultative anaerobes) สร้าง catalase มี endospore ที่ทำให้มีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่ดีได้ ไม่ทำให้เกิดโรค สร้าง Hydrolytic enzyme ที่ย่อยสลาย polysaccharide,

nucleic acid และ lipid โดยใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและตัวให้อิเล็กตรอน มีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน บทบาทสำคัญของเชื้อตัวนี้ในการหมักคือการปล่อยเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลส ออกมาย่อยโปรตีน ช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายและเป็นประโยชน์มากขึ้น (Feng et al., 2007; Suppadit,; Inatsu et al., 2006) ซึ่งกล้าเชื้อที่ใช้ในการศึกษานี้ได้ผ่านการศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ข้างต้นในการเป็นกล้าเชื้อเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้พารามิเตอร์ที่สำคัญที่นอกเหนือจากประสิทธิภาพแล้ว กล้าเชื้อจะต้องมีความปลอดภัย ซึ่งการที่จะควบคุมความปลอดภัยของกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ซึ่งมี soybean flour 10%w/v เป็นสารปกป้องในกระบวนการทำแห้งแบบการระเหิดแห้ง (freeze dried) จำเป็นจะต้องพิจารณาดัชนีคุณภาพของสารปกป้องที่นำมาใช้ในการทำแห้งแบบการระเหิดแห้ง พบว่าแป้งถั่วเหลืองมีมาตรฐานกำหนดที่ให้ความสำคัญด้านความชื้นที่ต้องไม่เกินร้อยละ 8 โดยน้ำหนัก คุณภาพด้านจุลินทรีย์กำหนดให้ยีสต์และราไม่เกิน 500 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน แป้งถั่วเหลือง มผช.1377/2550) ซึ่งดัชนีความเสี่ยงการปนเปื้อนของเชื้อรานี้จะทำให้มีโอกาสพบสารพิษที่สร้างโดยเชื้อรา คือ อะฟลาท็อกซิน เป็นสารพิษที่สร้างมาจากเชื้อราหลัก 2 ชนิดคือ *Aspergillus flavus* และ *Aspergillus parasiticus* โดยอะฟลาท็อกซินบี 1 เป็นกลุ่มที่ได้รับความสนใจ เนื่องจากมีความรุนแรงก่อให้เกิดการก่อกลายพันธุ์และมะเร็งได้ และยังพบว่ามีการปนเปื้อนมากที่สุดในผลิตภัณฑ์อาหาร รวมถึงผลิตภัณฑ์ถั่วหมักด้วย นอกจากความเสี่ยงที่จะเกิดจากสารปกป้องที่ต้องทำการตรวจติดตามแล้วเชื้อ *Bacillus cereus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* ที่เป็นกล้าเชื้อให้ประโยชน์ในกระบวนการผลิตและแปรรูปอาหาร แต่ *Bacillus subtilis* เป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารพิษ (toxin) ที่ทนต่อความร้อนได้ ซึ่งการปนเปื้อนมักเกิดจากสปอร์ เมื่อสปอร์เจริญเป็น vegetative cell จะผลิตสารพิษออกมา จึงมีมาตรฐานสากลจาก U.S. Food and Drug Administration (U.S.FDA) กำหนดให้ไม่เกิน 10^6 เซลล์ต่อกรัมอาหาร เป็นสาเหตุให้จะต้องมีการติดตามเชื้อดังกล่าวที่มีสายพันธ์ใกล้เคียงกับกล้าเชื้อแล้วยังเป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 25°C ซึ่งเป็นหนึ่งในสภาวะที่ทำการศึกษาอายุการเก็บรักษา จึงมีความเสี่ยงจะเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา เช่นเดียวกันกับ *Bacillus pumilus* ที่เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ใกล้เคียงกับกล้าเชื้อ แต่เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญหรืออยู่รอดได้ที่อุณหภูมิ 4°C ดังนั้นสมมุติฐานในการศึกษานี้ให้ความสำคัญทั้งการเก็บรักษากล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP 1 ด้วย soybean flour 10% w/v โดยการทำแห้งแบบการระเหิดแห้ง (freeze dried) ที่จะสามารถระบุคุณภาพของกล้าเชื้อได้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1.แหล่งที่มาของข้อมูล

กล้าเชื้อ *B. subtilis* มีบทบาทสำคัญในผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก เป็นจุลินทรีย์ที่จัดอยู่ในกลุ่มแกรมบวก รูปแท่งตรง มี flagella แบบ peritrichous เจริญได้ดีที่ pH 5.5-8.5 ในสภาวะที่มีอากาศ (aerobes) หรือ มีอากาศเล็กน้อย (facultative anaerobes) สร้าง catalase มี endospore ที่ทำให้มีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่ดีได้ ทนต่อความร้อน ความแห้ง รังสีอุลตราไวโอเลตและตัวทำละลายอินทรีย์ มีคุณสมบัติในการผลิต antibiotic และยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในระหว่างการหมัก ไม่ทำให้เกิดโรค สร้าง Hydrolytic enzyme ที่ย่อยสลาย polysaccharide, nucleic acid และ lipid บทบาทสำคัญของเชื้อตัวนี้ในการหมักคือการปล่อยเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสออกมาย่อยโปรตีน ทำให้ช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่าย เป็นประโยชน์มากขึ้น เนื่องจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งของโปรตีนที่ดีต่อสุขภาพ ดังนั้นการนำมาหมักจะเป็นการช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เช่น ถั่วเหลืองหมักเป็นอาหารพื้นเมืองของหลายประเทศ มีชื่อเรียกต่างๆ กัน ได้แก่ อินเดีย (Kinema), จีน (douchiba) และถั่วเน่าของประเทศไทย ในระหว่างการหมัก *B. subtilis* สามารถย่อยองค์ประกอบของโปรตีนให้อยู่ในรูปของกรดอะมิโนอิสระ (Free-amino acids, FAA) ทำให้ร่างกายสามารถย่อยได้ง่ายและนำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น ผลิตภัณฑ์ dawadawa จะประกอบด้วย Leu, Lys, Arg, Pro และ Asp สำหรับผลิตภัณฑ์ Kinema ประกอบด้วย Glu, Phe และ Leu โดยทั่วไปแล้วกรดอะมิโนอิสระจะให้รสชาติและกลิ่นเฉพาะของผลิตภัณฑ์ ซึ่งกรดอะมิโนที่ได้จากถั่วเหลืองนอกจากจะมีคุณค่าทางโภชนาการสูงแล้วยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพ เช่น ลดไขมันในเลือด ลด coronary heart disease และลดโรคอ้วน เป็นต้น กรดอะมิโนบางชนิดยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidants) เช่น Tyr, Met, His, Lys และ Trp นอกจากนี้การเติมกรดอะมิโน Asp, Glu, Pro, Gly และ Leu ในผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง จะช่วยยับยั้งการเกิดโรคมะเร็งได้ (Dajanta, Apichartsrangkoon, Chukeatirote & Frazier, 2011) Gasaluck, 2008 ได้ทำการแยกและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ถั่วเน่า พบว่าเป็นเชื้อบาซิลลัส 23 ไอโซเลท นอกจากนี้ยังพบแอสเปอร์จิลลัส ฟลาวัส สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินด้วยเช่นกัน ผลการทดลองพบว่า เชื้อบาซิลลัส ซี เอ็ม 21 ซึ่งจากการทำการบ่งชี้ลักษณะในภายหลังพบคือ เชื้อบาซิลลัส ไลเคนนิฟอร์มิส มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งสองชนิด นอกจากนี้ยังพบอีกว่า เชื้อบาซิลลัสดังกล่าวมีความสามารถในการกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซิน บีวัน และโอคราทอกซิน เอ ที่สร้างขึ้นจากเชื้อราดังกล่าว โดยความสามารถในการกำจัดสารพิษเท่ากับ 74 เปอร์เซ็นต์และ 92.5 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ นอกจากนี้ *B. subtilis* MHS 13 มีความสามารถดังกล่าวเช่นกัน

โดยสามารถกำจัดสารพิษอะฟลาทอกซิน บีวัน ได้ถึง 85 เปอร์เซ็นต์ (Ouoba, Diawara, Jespersen & Jakobsen (2007) ได้ทำการคัดแยกเชื้อจากผลิตภัณฑ์ Soumbala พบว่า *B. subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก แกรมลบและเชื้อราได้ดังนี้ *Micrococcus luteus*, *Staphyloccocus aureus*, *Bacillus cereus*, *Enterococus facium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Shigella dysenteriae*, *Yersinia enterocolitica*, *Aspergillus ochraceus* และ *Penicillium roqueforti* Hemalatha & Shanthi (2010) พบว่า *B. subtilis* ที่ทำการคัดแยกจากตัวอย่างนมมีความสามารถในการผลิตยาปฏิชีวนะ (antibiotic) และการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ พบว่า *B. subtilis* สามารถผลิตยาปฏิชีวนะได้ดังนี้ streptomycin (25 µg/ml), ampicillin (10 µg/ml), penicillin (10 µg/ml), erythromycin (15 µg/ml), amoxicillin (10 µg/ml) ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นแบคเทอริโอซินและยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในมนุษย์ได้ เช่น *Salmonella* spp. *Streptococcus* spp. *Klebsiella* spp. และ *E. coli* จะเห็นได้ว่ากล้าเชื้อที่คัดแยกได้จะต้องมีคุณสมบัติที่ช่วยพัฒนาหรือทำให้ผลิตภัณฑ์ดีขึ้น มีคุณภาพ ควบคุมกระบวนการผลิต สามารถขยายการผลิตในทางการค้าได้โดยได้ ผลิตที่มีความสำเสมอ

การผลิตกล้าเชื้อแบบผง เชื้อจุลินทรีย์จะต้องผ่านกรรมวิธีในการผลิตที่มีอุณหภูมิเข้ามาเกี่ยวข้อง เชื้ออาจถูกทำลายโดยอุณหภูมิที่นำมาใช้ ซึ่งจะมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อลดลง จึงต้องมีการป้องกันไม่ให้เซลล์ได้รับอันตราย โดยมีการเติมสารบางชนิดซึ่งมีผลช่วยให้อัตราการรอดชีวิตเพิ่มขึ้น (ภัทรียา, 2541) สารปกป้องเซลล์หรือสารที่ใช้เคลือบเซลล์จะป้องกันความร้อนหรือความเย็น (cryoprotectants or protective substances) ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการทำแห้ง ซึ่งจะช่วยลดการถูกทำลายของเซลล์ และช่วยเพิ่มการรอดชีวิตของเซลล์จุลินทรีย์ที่ผ่านการทำแห้ง รวมถึงในการเก็บรักษาที่ระยะเวลาต่างๆ เซลล์ที่มีชีวิตจะมีจำนวนมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับเซลล์ที่ได้รับความเสียหายบางส่วน (sub-lethal damage) ซึ่งอาจกลายเป็นเซลล์ตาย (lethal form) ในระหว่างการเก็บรักษา กระบวนการขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำ ออกซิเจนและอุณหภูมิ (Simpson et al., 2005) ไม่เพียงแต่เยื่อหุ้มเซลล์เท่านั้นที่ไวต่อความร้อนในระหว่างการทำแห้ง แต่ผนังเซลล์ ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอ ยังได้รับผลกระทบจากความร้อนซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียกิจกรรม (metabolic activity) ได้ (Meng et al., 2008) สารประกอบที่นิยมใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ ได้แก่ นมพร่องไขมัน น้ำตาลซูโครส กลีเซอรอล โซเดียมกลูตาเมตหรือส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสกับซีรั่ม (Hubalek, 2003) มอลโตเดกตริน (Namaldi et al., 2006) alginate starch bentonite (Wu et al., 2012) และ MgSO4 เป็น matrix ร่วมกับ Biocontrol (Yanez-Mendizabal et al., 2012) กิจกรรมของสารปกป้องเซลล์จะสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของสารนั้น โดยทั่วไปสารที่ปกป้องเซลล์ได้ดีต้องมีหมู่ไฮโดรคาร์บอน (hydrogen bond) อยู่ในโมเลกุลสามหมู่หรือมากกว่า และมีหมู่ที่ไอโอโนสได้อยู่ด้วยคือ มีหมู่อะมิโนอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาคาร์บอน มีหมู่คาร์บอกซีอยู่ที่ตำแหน่งแอลฟาและแกมม่า และมีส่วนของโมเลกุลระหว่างหมู่แกมม่า คาร์บอกซี

และหมู่ไฮโดรเจนบอนด์ ในสารประกอบจำพวกน้ำตาลและพอลิแอลกอฮอล์ มีหมู่ไฮดรอกซีมากกว่าห้าหมู่ ซึ่งอาจช่วยในการป้องกันเซลล์จากอันตรายได้ นอกจากนี้ขนาดโมเลกุลก็มีส่วนสำคัญ สิ่งที่สำคัญอีกประการคือสารปกป้องเซลล์ต้องสามารถป้องกันเซลล์จากผลทางกายภาพ ระหว่างที่สภาวะสภาพแวดล้อมของกระบวนการเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือในกระบวนการทำแห้งมีการกำจัดน้ำออกนอกเซลล์ ซึ่งน้ำเป็นองค์ประกอบหนึ่งที่สำคัญภายในเซลล์ นอกจากผลของปฏิกิริยาของสารปกป้องเซลล์กับองค์ประกอบของผิวเซลล์หรือสารที่มีอยู่ภายในเซลล์ สารปกป้องเซลล์จะทำให้อิเลคโตรไลท์เป็นกลาง ไม่ทำให้ความสามารถเลือกนำสารเข้าออกเซลล์เมมเบรนเปลี่ยนแปลงหรือสูญไป และยังสามารถป้องกันไม่ให้เชื้อสัมผัสกับอากาศ (Hubalek, 2003) นอกจากสารปกป้องข้างต้นยังมีการใช้สารที่ทำจากวัตถุดิบ ได้แก่ แป้งถั่วเหลือง ที่ถูกนำมาใช้เป็นสารปกป้องกล้าเชื้อ *B. subtilis* แล้วนำไปใช้ในการหมักถั่วเหลือง พบว่ามีความสม่ำเสมอในระหว่างระยะเวลาการหมัก และมีประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตเอนไซม์ที่ดี ไม่ส่งผลต่อกลิ่นและสี (ปิยะวรรณ กาสลัก และปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ รายงานการวิจัยเทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อ (*Bacillus subtilis*) เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก, 2554) นอกจากชนิดของสารปกป้อง วิธีการทำแห้ง ที่มีผลต่อประสิทธิภาพและอายุการเก็บรักษากล้าเชื้อผงแล้ว การผลิตกล้าเชื้อที่ดีต้องคำนึงพารามิเตอร์ที่เลือกใช้มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนี้ (1) ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (type of organism) ขนาดและองค์ประกอบของเชื้อจุลินทรีย์มีผลต่อการรอดชีวิต สปอร์ของเชื้อจุลินทรีย์จะมีความสามารถในการต้านทานความแห้ง จึงมีอัตราการรอดชีวิตสูงเมื่อผ่านกรรมวิธีการทำแห้ง จุลินทรีย์ชนิดแกรมบวกจะมีอัตราการรอดชีวิตสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดแกรมลบ เพราะเนื่องจากไขมันที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์จะช่วยในการคงสภาพของเซลล์ให้คงอยู่ได้ดีกว่า และเซลล์ที่มีอัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเซลล์น้อย (2) อายุของเชื้อจุลินทรีย์ (physiological age) เซลล์จุลินทรีย์ที่มีอายุอยู่ในช่วงระยะการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) จะมีอัตราการมีชีวิตรอดสูงกว่าเชื้อที่อยู่ในช่วงระยะเติบโตแบบทวีคูณ (exponential phase) เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์ (3) ความเข้มข้นของเซลล์ (cell concentration) ปริมาณเริ่มต้นของเซลล์มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต โดยที่อัตราการรอดชีวิตจะมีสูงขึ้นเมื่อปริมาณเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการแช่แข็งแห้ง และควรมีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^{12} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และภายหลังจากการผ่านกระบวนการทำแห้งจะต้องมีเซลล์ที่รอดชีวิตมากกว่า 10^{7} CFU/ml (Morgan et al., 2006)

หลังจากกระบวนการทำแห้งกล้าเชื้อแล้ว สภาวะอุณหภูมิ ชนิดบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการบรรจุกล้าเชื้อเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญ ผลการศึกษาสภาวะอุณหภูมิที่ดีที่สุดในการเก็บรักษากล้าเชื้อผง *S. thermophilus* และ *B. longum* ด้วยนมถั่วเหลือง โดยใช้วิธีการทำแห้งกล้าเชื้อแบบ freeze-dried จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4˚C และ 25˚C ทำการติดตามการอยู่รอดของเชื้อเพื่อหาอายุการเก็บ พบว่าอัตรา

การอยู่รอดของ *S. thermophilus* และ *B. longum* ที่ 4˚C มีอัตราการอยู่รอดของเชื้อทั้ง 2 สูงกว่าเก็บที่ 25˚C และพบว่าหลังการเก็บรักษาเป็นเวลานาน 4 เดือน ที่อุณหภูมิ 4˚C พบอัตราการอยู่รอดของ *S. thermophilus* เท่ากับร้อยละ 51.1 และ *B. longum* เท่ากับร้อยละ 68.8 (Yi-Chieh Wang, Roch-Chui Yu และ Cheng-Chun Chou, 2004) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเก็บรักษาที่สภาวะอุณหภูมิต่ำ พบว่ามีการศึกษาอัตราการอยู่รอดของ *Candida sake* ด้วยการใช้ 10% skim milk เป็นสารปกป้อง ที่ดีที่สุดเมื่อทำการเก็บเชื้อผงที่อุณหภูมิ -20˚C มีอัตราการอยู่รอดสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้ Galactose raffinose และ sodium glutamate 10% เป็นสารปกป้อง (M. Abadias et al., 2001)

นอกจากระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานที่สุดจำเป็นต้องพิจารณาถึงคุณภาพของกล้าเชื้อผง *B. subtilis* จะต้องคงประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ สาร antimicrobial และเมตาบอไลท์อื่นๆ ที่มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการใช้กล้าสด ดังนั้นกิจกรรมต่างๆที่เกิดจากการนำกล้าเชื้อผงไผใช้งานในกระบวนการหมักควรมีความสำเสมอ คือการผลิตเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสออกมาย่อยโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต เพื่อช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายและเป็นประโยชน์มากขึ้น ซึ่งเมื่อทำการหมักถั่วจะได้สารประกอบจำพวก ester เป็นส่วนมาก เช่น ethyl isobutyl และ isoamyl ester ของ isobutyric, a-methylbutyric, isovaleric, tiglic acids ซึ่งเกิดจากการสลายตัว และการหมักของโปรตีนกลีเซอร์ไรด์และกรดไขมันในถั่วเหลือง นอกจากนี้ยังมีสารที่ให้กลิ่นหอมฉุน เช่น 2-heptanone pyrazine และ benzadehyde โดยไพราซีนจะเกิดขึ้นจากการต้มถั่วให้สุกก่อนนำไปหมัก ในขณะที่สาร 1-ออกทีน-3-ออล มีปริมาณลดลง (ภานุวรรณ, 2543) พร้อมกันนั้นกล้าเชื้อจะต้องยังคงคุณภาพอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ตลอดระยะเวลาการเก็บ

ความปลอดภัยของกล้าเชื้อเป็นสิ่งสำคัญที่ต้องควบคุม ติดตามตลอดอายุการเก็บ โดยความเสี่ยงที่จำเป็นจะต้องควบคุมและพิจารณามาจากหลายองค์ประกอบด้วย กัน เช่น เชื้อสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกับกล้าเชื้อ เช่น เชื้อแบคทีเรียก่อโรค *B. cereus* เป็นแบคทีเรีย ในกลุ่ม *Bacillus* ที่จัดเป็นจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogen) ย้อมติดสีแกรมบวก (Gram positive bacteria) รูปร่างเป็นท่อน (rod shape) ขนาดประมาณ 1.0 -1.2 ไมโครเมตรสร้างสปอร์และเคลื่อนที่ได้สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ในช่วง pH 4.9-9.3 และ a_w มากกว่า 0.92 สามารถเจริญได้ระหว่างอุณหภูมิ 4-48°C อุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 28-35°C (U.S. FDA, 2012) ส่วนสายพันธุ์ไซโครโทรปสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 7 °C บางชนิดเจริญช้าๆ ได้ที่ 4-5 °C และไม่เจริญที่ 43 °C (Van Netten และคณะ, 1990) *B. cereus* พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ ในดิน ฝุ่นละออง ทั้งในอาหารดิบ อาหารแห้ง หรืออาหารสำเร็จรูปเช่น ธัญพืช เครื่องเทศและอาหารแห้งชนิดอื่น ผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น ข้าว แป้ง ผลิตภัณฑ์จากแป้ง เครื่องเทศ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ และเครื่องปรุงแต่งรสต่างๆ มักพบเสมอในอาหารที่ผ่านการทำแห้งที่เก็บรักษาไว้นาน (Eric, 1990) นอกจากนี้ยังพบในอุจจาระของคนที่มี

สุขภาพปกติได้ประมาณ 15%การปนเปื้อนของ *B. cereus* สามารถพบได้ทั่วไปวนเวียนเป็นวัฏจักรที่เป็นการส่งผ่านทั้งตัวเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ไปในแมลง สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จนมาปนเปื้อนในอาหารและเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์ 2 โดยคุณสมบัติที่สำคัญของ *B. cereus* คือสามารถสร้างสารพิษ (toxin) ที่ทนต่อความร้อนได้ ซึ่งการปนเปื้อนมักเกิดจากสปอร์ เมื่อสปอร์เจริญเป็น vegetative cell จะผลิตสารพิษออกมา ซึ่งสารพิษที่สร้างจาก *B. cereus* แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ ชนิดที่ทำให้ท้องร่วง (diarrhea toxin) และชนิดที่ทำให้อาเจียน (emetic toxin) ซึ่งเป็นสารพิษเอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) โดยสารพิษทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสามารถในการทนทั้งความร้อนและความเป็นกรดได้ เมื่อ *B. cereus* เจริญจนสามารถสร้างสปอร์ได้ จะมีการสร้างสารพิษขึ้นดังนั้นความเป็นพิษจากสารพิษทั้งสองสามารถเกิดขึ้นได้ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์ *B. cereus* จะถูกทำลายไปแล้วก็ตาม (Health Protection Agency, 2009) *B. cereus* นั้นก็จะมีสภาวะการเจริญที่คล้ายคลึงกับ *B. subtilis* และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 25˚C ซึ่งเป็นหนึ่งในอุณหภูมิที่นิยมใช้ในการศึกษาหารอายุการเก็บรักษา หากการควบคุมกระบวนการผลิตไม่ดีหรือเกิดความผิดพลาดในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการผลิต อาจทำให้มีการปนเปื้อน *B. cereus* เข้ามาได้อย่างง่ายดาย นอกจาก *B. cereus* ยังพบว่า *B. pumilus* นี้ปนเปื้อนในขนมปัง และวัตถุดิบสำหรับผลิตขนมปัง ทำให้เกิดการเสื่อมเสีย (microbial spoilage) โดยจะย่อยสลายขนมปัง ทำให้มีลักษณะเหนียวติดกัน เป็นเส้นยืด มีกลิ่นเหม็น แหล่งที่มาของเชื้อในขนมปังส่วนใหญ่มาจากวัตถุดิบประเภทของแห้ง เช่น แป้งสาลี และยีสต์แห้ง สปอร์ของเชื้อจะทนต่อความร้อนสูง ทนต่ออุณหภูมิระหว่างการแปรรูป Frederic Carlin และคณะ (2000) ได้ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียในผัก ได้แก่ บร็อคเคอรี่ แครอท บวบ หอม มันฝรั่ง และถั่วเขียว โดยพบ *B. circulans B. macerans B. polymyxa.* และ *B. pumilus* สามารถอยู่รอดในสภาวะอุณหภูมิต่ำ ที่ 4˚C – 10 ˚C และยังพบว่าในผลิตภัณฑ์อาหารประเภท ready-to-eat ที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ และเก็บที่ 7˚C – 10 ˚C พบว่า *B. pumilus* FF128a และ *B. cereus* FF119b (S. Samapundo et al., 2014) จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นนอกจากเชื้อแบคทีเรียที่มีความเสี่ยงที่จะปนเปื้อนในกล้าเชื้อแล้ว เชื้อรายังเป็นดังนีคุณภาพมาตรฐานด้านจุลินทรีย์ที่ถูกกำหนดในแป้งถั่วเหลือง กำหนดให้ยีสต์และราไม่เกิน 500 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน แป้งถั่วเหลือง มผช.1377/2550) ดังนั้นหากพบการมีอยู่หรือการปนเปื้อนของเชื้อราในระหว่างกระบวนการเก็บรักษา จะเป็นความเสี่ยงที่อาจจะพบสารพิษที่สร้างจากเชื้อราได้ เช่น เชื้อราสกุล *Aspergillus* (*Aspergillus* spp.) เป็นเชื้อราที่พบได้ทั้งในรูปของการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (anamorphic) และแบบอาศัยเพศ (teleomorphic) และจัดเป็นราในกลุ่ม *Ascomycetes* เชื้อรา *Aspergillus* มีเส้นใยที่แตกแขนงและมีผนังกั้น เส้นใยของเชื้อราไม่มีสี สามารถเจริญได้ในที่ที่มีออกซิเจนสูง จึงพบในบริเวณที่มีออกซิเจนสูงเกือบทั้งหมดโดยทั่วไปเจริญเป็นเส้นใยราบนผิวของอาหารที่มีคาร์บอนมากเช่น กลูโคส อะไมโลส ราที่ทำให้เกิดโทษได้แก่ราที่ทำให้มนุษย์สัตว์และพืชเกิดโรค หรือทำลายสิ่งของเครื่องใช้และ

ราที่สร้างสารพิษ (mycotoxin) บนธัญพืชและอาหารชนิดต่าง ๆ ซึ่งเชื้อราที่สร้างสารพิษ (mycotoxin) สามารถสร้างสารพิษได้ 5 กลุ่มได้แก่ อะฟลาท็อกซิน (aflatoxin), ออกคราท็อกซิน (ochratoxin), ไตรโคทีซิน (trichothecene), ซีราลีโนน (zeararenone)และพาทูลิน (patiulin) (Benjamart, 2012) ในที่นี้สนใจศึกษาเฉพาะอะฟลาท็อกซินเนื่องจากเป็นสารพิษที่มีความเสี่ยงปนเปื้อนในถั่วเหลืองได้มาก ทนความร้อนได้สูง เป็นสารพิษชนิดที่ก่อให้เกิดอาการแบบเฉียบพลัน (Acute aflatoxicosis) และก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตหลายด้านด้วยกัน ทั้งการก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogenesis), เป็นพิษต่อตับ (hepatotoxicity), ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenic) และก่อให้เกิดโรควิรูป (teratogenic) เป็นอันตรายต่อการพัฒนาตัวอ่อนในครรภ์ และที่สำคัญพบว่าอะฟลาท็อกซิน มีการปนเปื้อนมากที่สุดในผลิตภัณฑ์อาหาร รวมถึงผลิตภัณฑ์ถั่วหมักด้วย (Teniola และคณะ, 2005) จึงต้องให้ความสำคัญในการควบคุมคุณภาพกล้าเชื้อเพื่อให้ปลอดจากการปนเปื้อนที่กล่าวในข้างต้น

2.วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

ตอนที่ 1 การผลิตกล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore เพื่อการเก็บรักษา

1. การเตรียมสปอร์ของกล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP1

นำเชื้อจากตู้เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงใน nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm จากนั้นนำเซลล์ไปขีดบนอาหารเลี้ยงสปอร์ (sporulation agar) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-10 วัน จากนั้นนำไปแยกตะกอนสปอร์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000×*g* เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v) จำนวน 2 ครั้ง ทำให้สปอร์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (w/v)

2. การเตรียมสาร cryoprotectant แป้งถั่วเหลืองและการผลิตกล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore

เตรียมแป้งถั่วเหลืองความเข้มข้น 10% (w/v) แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ทิ้งให้อุณหภูมิเย็นลงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นแขวนลอยสปอร์ของ *B. subtilis* SB-MYP1 โดยให้มีจำนวนสปอร์สุดท้ายเท่ากับ 10^8-10^9 CFU/g นำตัวอย่างไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างเข้าเครื่อง freeze dryer โดยมีสภาวะเริ่มต้น -20 องศาเซลเซียส ความดัน1.0E+3 mbar

เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และปรับอุณหภูมิสุดท้ายของเครื่องเท่ากับ 35 องศาเซลเซียสเพื่อทำให้ตัวอย่างแห้ง โดยมีเกณฑ์คุณภาพพิจารณาร่วม ได้แก่ (1) ปริมาณสปอร์ภายหลังการทำแห้งมากกว่า 10^7 CFU/g (2) ปริมาณความชื้นน้อยกว่า 7% (wet basis) และ (3) ค่าปริมาณน้ำอิสระน้อยกว่า 0.6 จากนั้นเก็บรักษากล้าเชื้อผงโดยบรรจุแบบปลอดเชื้อในถุงอะลูมิเนียมฟอยล์แบบสุญญากาศ เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -25 0 25 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์เป็นระยะเวลา วันที่ 0 30 60 90 120 150 และ 180 ตามลำดับ

3. การวิเคราะห์เกณฑ์คุณภาพร่วม ได้แก่ ปริมาณสปอร์ที่รอดชีวิต ปริมาณความชื้น และค่าปริมาณน้ำอิสระ

ทำการเจือจางกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % (w/v) ที่ระดับ 10 เท่า จากนั้นทำการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) เลือกความเจือจางระดับที่เหมาะสม 3 ระดับ ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วงระหว่าง 30-300 โคโลนี นำตัวอย่างเชื้อจากแต่ละระดับความเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงในจานเพาะเชื้อ (spread plate) บน plate count agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์เป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/g) (BAM, 2001) สำหรับปริมาณความชื้นและค่าปริมาณน้ำอิสระใช้วิธีการวิเคราะห์มาตรฐานตามคู่มือ AOAC (2000)

4. การวิเคราะห์การปนเปื้อนของ *B. cereus* Yeast Mold และ Aflatoxin B1 ในกล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore

4.1 การตรวจวิเคราะห์ *B. cereus*

ทำการเจือจางกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % (w/v) ที่ระดับ 10 เท่า จากนั้นทำการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) เลือกความเจือจางระดับที่เหมาะสม 3 ระดับ ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วงระหว่าง 30-300 โคโลนี นำตัวอย่างเชื้อจากแต่ละระดับความเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงในจานเพาะเชื้อ (spread plate) บน MYP agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีสีชมพู รายงานผลจำนวน *B. cereus* เป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/ml or g) (BAM, 2001)

4.2 การตรวจวิเคราะห์ยีสต์รา

ทำการเจือจางกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 % (w/v) ที่ระดับ 10 เท่า จากนั้นทำการเจือจางเป็นลำดับ (serial dilution) เลือกความเจือจางระดับที่เหมาะสม 3 ระดับ ที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วงระหว่าง 30-300 โคโลนี นำตัวอย่างเชื้อจากแต่ละระดับความเจือจางที่เหมาะสม 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยลงในจานเพาะเชื้อ (spread plate) บน Potato dextrose agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 25-30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี รายงานผลจำนวน Yeast Mold เป็นโคโลนีต่อกรัม (CFU/ml or g) (BAM, 2001)

4.3 การตรวจวิเคราะห์ Aflatoxin B1

ปิเปตสารมาตรฐาน aflatoxin B1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในหลุมเพลต (96 well plate) ที่ความเข้มข้น 0 1 5 10 20 50 ppm จากนั้นเติม enzyme conjugate ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลุม ตามด้วย anti-aflatoxin antibody ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเทของเหลวในหลุมลงบน paper towel ออกให้หมด แล้วเติม washing buffer ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเทล้างออกสองครั้งด้วย washing buffer เติม substrate/chromogen ลงในแต่ละหลุมปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มในที่มืดเป็นเวลา 15 นาที สุดท้ายเติม stop solution ปริมาตร 100 ไมโครลิตร และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง ELISA reader ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร การคำนวณปริมาณ aflatoxin B1 ให้เทียบกับกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณค่าการดูดกลืนแสงเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานเมื่อใช้สูตรดังต่อไปนี้

$$\% \text{ Absorbance} = \frac{Absorbance\ standard\ or\ sample\ (B)}{Absorbance\ zero\ standard\ (B_0)} \times 100$$

ตอนที่ 2 การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore ด้วยแป้งถั่วเหลืองที่ผลิตได้

1. การทดสอบกิจกรรมของกล้าเชื้อในระหว่างการหมักถั่วเหลือง

กล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore ที่มีเกณฑ์คุณภาพร่วม ได้แก่ ปริมาณสปอร์ที่รอดชีวิต (มากกว่า 10^7 CFU/g) ปริมาณความชื้น (น้อยกว่า 7% wet basis) และค่าปริมาณ

น้ำอิสระ (น้อยกว่า 0.6) ตามเกณฑ์มาตรฐาน นำมาศึกษาประสิทธิภาพของกล้าเชื้อในระหว่างการหมักถั่วเหลือง โดยเติมลงไป 1 มิลลิลิตรต่อถั่วเหลืองสุก 150 กรัม หมักในจานแก้วที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 15 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดบน plate count agar วัดค่า pH กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส และโปรติเอส (Mahidsanan and Gasaluck, 2011) ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับกิจกรรมของกล้าเชื้อสด (fresh spore)

2. การวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักสุดท้าย

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12

2.1.1 การเตรียม stock solution

ชั่งผลึกของสารประกอบวิตามินบี 12 คือ Cyanocobalamin 5 มิลลิกรัม โดยสารประกอบวิตามินบี 12 จะละลายใน 0.05 M Acetate Buffer pH 5.0 ปริมาณ 50 มิลลิลิตร จะได้สารประกอบวิตามินบี 12 ที่มีความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำไปเก็บไว้ที่มืด อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2 การเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์

นำสารละลายจากการเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงหลอดทดสอบ เติมสารละลายพอแทสเซียมไซยาไนด์ แอซีเตทบัฟเฟอร์ ปริมาตร 9 มิลลิลิตร (พอแทสเซียมไซยาไนด์ 1 กรัม ในแอซิเตทบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 4.6 เขย่าหลอดทดลองด้วยเครื่องผสมทันที แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นและนำ ไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ เพราะระหว่างที่นึ่งฆ่าเชื้ออยู่ cobalamin จะถูกปล่อยออกมาและเปลี่ยนเป็น cyanocobalamin อยู่ในส่วนของส่วนใสด้านบน นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์โดยเจือจางส่วนใสด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้ปริมาณวิตามินบี 12 อยู่ในช่วงที่วิเคราะห์ได้

2.1.3 การไล่อากาศ

นำสารละลายวิตามินบี 12 มาตรฐานและสารละลายตัวอย่างใส่เครื่อง ultrasonic bath เพื่อทำการไล่อากาศ เป็นเวลา 20 นาที

2.1.4 การวิเคราะห์ปริมาณวิตามินบี 12

ใช้ syringe ดูดสารละลายของสารประกอบวิตามินบี 12 และสารละลายตัวอย่างตัวอย่างละ 20 ไมโครลิตร ฉีดเข้าเครื่อง HPLC ตามลำดับ บันทึกโครมาโตแกรม นำพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานวิตามินบี 12 มาพลอตกราฟระหว่างความเข้มข้นกับพื้นที่ใต้พีค (โดยให้แกน Y เป็นค่าพื้นที่ใต้พีค และแกน X เป็นความเข้มข้น) แล้วนำพื้นที่ใต้พีคของสารละลายตัวอย่างมาเทียบกับกราฟมาตรฐาน ก็จะได้ความเข้มข้นหรือปริมาณวิตามินบี 12 ของสารละลายตัวอย่าง โดยทำการฉีดครั้งละ 2 ซ้ำ

2.1.5 สภาวะการวิเคราะห์

คอลัมน์ : Inertsil ODS-3V 5 µm (150×4.6 mm. I.D.)
เฟสเคลื่อนที่ : Acetonitrile/0.05 M Acetate Buffer pH 5.0 (10/90)
อัตราการไหล : 1.0 มิลลิลิตร/ นาที
เครื่องวัด : UV 265 นาโนเมตร

2.2 การวิเคราะห์แคลเซียม ฟอสฟอรัส และธาตุเหล็ก

2.2.1 การเตรียมตัวอย่างโดยใช้เครื่อง microwave

การย่อยตัวอย่างโดยชั่งตัวอย่าง 0.5 กรัม เติม nitric acid ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ย่อยด้วยเครื่อง microwave นาน 30 นาที หลังจากนั้นเติม hydrogen peroxide ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ย่อยต่อด้วยเครื่อง microwave นาน 30 นาที เทสารละลายที่ได้ลงในขวดปรับปริมาตรแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 50 มิลลิลิตร

2.2.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ICP-MS

โดยการวิเคราะห์ธาตุฟอสฟอรัส ใช้ mode no gas ในการวิเคราะห์ ส่วนการวิเคราะห์ธาตุแคลเซียมและธาตุเหล็ก ใช้ mode Hydrogen

ตอนที่ 3 วิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ 16s rRNA ด้วยวิธี sequencing

กล้าเชื้อสด *B. subtilis* และกล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ณ วันที่ 180 ที่อุณหภูมิ -25^{O}C มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการสกัด DNA ด้วยวิธี CTAB (Zhou

et al., 1996) จากนั้นเพิ่มปริมาณยีน (Amplification) ช่วง 16s ด้วยวิธี Polymerase chain reaction (PCR Gene Amp PCR System 9700 - PE Applied Biosystems) ด้วย universal eubacterial primer 27F (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') และ 1492R (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') (Lane, 1991) โดยมีสัดส่วนของสารเคมีและสภาวะการทดลองตามตารางที่ 2 และ 3 ตามลำดับ เมื่อได้ PCR product แล้ว นำมาตรวจสอบขนาด (~1500 bp) ด้วยวิธี electrophoresis 1% agarose gel จากนั้นวิเคราะห์ด้วย DNA sequencing (Model : ABI 3730XL) เพื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากฐานข้อมูล GenBank ใน NCBI ด้วย BLAST (http://www.ncbi. nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi) พิจารณาผลการทดสอบกับความคล้ายคลึงของจุลินทรีย์แต่ละสปีชีส์ในฐานข้อมูลด้วย % similarity

ตารางที่ 3.1 สัดส่วนของสารเคมีที่ใช้ในปฏิกิริยา PCR

Component	**Volume per 20 µl**	**Final concentration**
PCR Qualified Water	20.7 µl	
10X PCR Buffer	3 µl	1X with 1.5 mM MgCl2
2 mM PCR Nucleotide Mix	3 µl	0.2 mM of each dNTP
Primer F 10 µM	1 µl	10 pmol
Primer R 10 µM	1 µl	10 pmol
Taq (5 un/µl)	0.3 µl	1.5 units
DNA (50 ng/ul)	1 µl	50 ng
Total volume	30 µl	

ตารางที่ 3.2 สภาวะ PCR ด้วยไพร์เมอร์ 27F/1492R เพื่อเพิ่มปริมาณยีนช่วง 16s

Step	Tm (°C)	Time	cycle
1. Initial Denaturation	95	3 min	1
2. Denaturation	95	30 sec	
3. Annealing	55	30 sec	35

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Step	Tm (°C)	Time	cycle
4. Extension	72	2 min	
5. Final extension	72	5 min	1
6. Hold	4	α	

3.วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลเชิงปริมาณวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบ CRD วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติเท่ากับ 0.05 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple-Range Test (DMRT)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการวิจัย

1. คุณภาพมาตรฐานกล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore ในระหว่างการเก็บรักษา

เกณฑ์คุณภาพมาตรฐานของกล้าเชื้อผง (combination criteria) ได้แก่ ปริมาณสปอร์ที่รอดชีวิต (มากกว่า 10^7 CFU/g) ปริมาณความชื้น (น้อยกว่า 7% wet basis) และค่าปริมาณน้ำอิสระ (น้อยกว่า 0.6) นำมาพิจารณาร่วมในระหว่างการเก็บรักษากล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore ผงในบรรจุภัณฑ์อะลูมิเนียมฟอยล์สุญญากาศ ที่อุณหภูมิ -25 0 และ 25^{O}C ภายในเวลา 6 เดือน ซึ่งทำการติดตามทุก 30 วัน จากข้อมูลในตารางที่ 4.1 4.2 และ 4.3 พบว่าที่อุณหภูมิ -25^{O}C เก็บรักษากล้าเชื้อผงผ่านไป 180 วัน ยังคงมีสปอร์ที่รอดชีวิต ปริมาณความชื้น และค่าปริมาณน้ำอิสระอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานดังกล่าว แต่ในขณะเดียวกันที่อุณหภูมิ 0^{O}C และ 25^{O}C มีจำนวนสปอร์ลดลงในวันที่ 30 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) สำหรับคุณภาพความปลอดภัยของกล้าเชื้อผงในตารางที่ 4.4 พบว่าไม่มีการเจริญของ *B. cereus* Yeast Mold และปริมาณ aflatoxin ในกล้าเชื้อผง ซึ่งสอดคล้องตามมาตรฐานความปลอดภัย

จากผลการทดลองดังกล่าวได้ข้อสรุปว่า ที่อุณหภูมิ -25^{O}C มีความเหมาะสมสำหรับเก็บรักษากล้าเชื้อผง freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore ได้เป็นเวลานานถึง 180 วัน (6 เดือน) ซึ่งเก็บรักษาได้นานกว่าอุณหภูมิ 0 และ 25^{O}C อีกทั้งยังเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานพิจารณาร่วม โดยเป็นผลมาจากปัจจัยภายนอก (extrinsic factors) ของสภาวะการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (freeze drying) และเก็บรักษาภายในสภาวะแช่เยือกแข็ง (freezing) แบบสุญญากาศ (ดึงอากาศออก 90%) ที่อุณหภูมิต่ำกว่า -20^{O}C สามารถรักษาโครงสร้างจุลินทรีย์ที่มีชีวิต หยุดหรือชะลอกิจกรรมของเอนไซม์และเมตาบอลิกภายในเซลล์ รวมถึงรักษาสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์และยีนร่วมกับกลไกการปกป้องด้วยสาร cryoprotectant แป้งถั่วเหลืองได้อีกด้วย ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Mahidsanan et al., 2017 ได้ทำการพิสูจน์กลไกการยึดเกาะของแป้งถั่วเหลืองกับกล้าเชื้อ *B. subtilis* SB-MYP1 พบว่า โครงสร้างกรดอะมิโนที่เป็นประจุบวกและหมู่ไฮดรอกซิลบนสารโพลิแซคคาไรด์ของแป้งถั่วเหลืองอาจมีแรง electrostatic interaction และ hydrogen bond กับผนังเซลล์ (peptidoglycan) ของ *B. subtilis* SB-MYP1 ซึ่งกลไกดังกล่าวทำให้เกิดความเสถียรภาพและรักษาเซลล์ที่มีชีวิต เอนไซม์ภายในเซลล์ ลดกิจกรรมเมตาบอลิกภายในเซลล์ และรักษาความเสถียรของยีนที่ควบคุมการผลิตสารพอลิแกมมากลูตามิกที่เป็นคุณค่าทางโภชนาการที่ได้จากตัวกล้าเชื้อ ในระหว่างการเก็บรักษาภายหลังจากกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

สำหรับอุณหภูมิมากกว่า -20^{O}C จนถึงระดับอุณหภูมิห้อง (25-30^{O}C) จะทำให้เกิดการกระตุ้นของปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ กระตุ้นให้เกิดการทำลายเซลล์

(microbial cell damage) ส่งผลต่อการลดลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตได้ ซึ่งมีความสอดคล้องกับงานวิจัย ได้แก่ Eratte et al., 2016 ได้รายงานว่าอัตราการรอดชีวิตของ freeze-dried *Lactobacillus casei* จะลดลงเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 และ 5^{O}C โดยเป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของปริมาณความชื้นและค่าปริมาณน้ำอิสระ Zhang, and Chen (2011) ให้ข้อสรุปว่าความเสถียรของกล้าเชื้อในระหว่างการเก็บรักษาจะขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอก (อุณหภูมิ สภาวะสุญญากาศ ระยะเวลาในการเก็บรักษา) และปัจจัยภายใน (ปริมาณความชื้น และค่าปริมาณน้ำอิสระ) ด้วย นอกจากนี้ข้อมูลเบื้องต้นจากการวิจัยที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้นสามารถนำปัจจัยและพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องมาสร้างเป็นสมการทำนาย (predictive microbiological equations) เพื่อควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยของกล้าเชื้อผง freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore ระหว่างการเก็บรักษาในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ตารางที่ 4.1 ปริมาณ freeze-dried spore ที่มีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆเป็นเวลา 180 วัน

Storage time (Days) / Storage temperature	Viability (CFU/g)		
	-25^{O}C	0^{O}C	25^{O}C
0	$5.00\times10^{8}\pm1.41\times10^{8}$ ^{abc}	$5.00\times10^{8}\pm1.41\times10^{8}$ ^{abc}	$5.00\times10^{8}\pm1.41\times10^{8}$ ^{abc}
30	$5.30\times10^{8}\pm1.13\times10^{8}$ ^{abc}	$4.50\times10^{7}\pm1.27\times10^{7}$ ^{d}	ND
60	$7.25\times10^{8}\pm3.54\times10^{8}$ ^{ab}	ND	ND
90	$8.25\times10^{8}\pm3.53\times10^{8}$ ^{a}	ND	ND
120	$3.55\times10^{8}\pm3.61\times10^{8}$ ^{bcd}	ND	ND
150	$3.30\times10^{8}\pm2.55\times10^{8}$ ^{bcd}	ND	ND
180	$2.93\times10^{8}\pm1.66\times10^{8}$ ^{cd}	ND	ND

ตัวอักษร $^{a\,b\,c}$ ที่แตกต่างกันทั้งแนวตั้งและแนวนอน หมายถึง มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

ND หมายถึง not detected คือ ตรวจไม่พบจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษา

ตารางที่ 4.2 ค่าความชื้น (Moisture content) ของ freeze-dried spore ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 180 วัน

Storage time (Days) / Storage temperature	Moisture content (% wet basis)		
	-25°C	0°C	25°C
0	2.65±0.14 ns	2.65±0.14 ns	2.65±0.14 ns
30	2.22±0.55 ns	2.95±0.07 ns	NE
60	2.72±0.02 ns	NE	NE
90	2.59±1.21 ns	NE	NE
120	2.74±0.01 ns	NE	NE
150	2.19±0.51 ns	NE	NE
180	2.65±0.07 ns	NE	NE

ตัวอักษร ns หมายถึง non-significant differences คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติทั้งแนวตั้งและแนวนอนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

NE หมายถึง not examined คือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากไม่พบปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.3 ค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity; a_W) ของ freeze-dried spore ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 180 วัน

Storage time (Days) / Storage temperature	water activity; a_W		
	-25°C	0°C	25°C
0	0.29±0.03 ^{ns}	0.29±0.03 ^{ns}	0.29±0.03 ^{ns}
30	0.27±0.06 ^{ns}	0.31±0.02 ^{ns}	NE
60	0.28±0.02 ^{ns}	NE	NE
90	0.28±0.03 ^{ns}	NE	NE
120	0.25±0.02 ^{ns}	NE	NE
150	0.29±0.01 ^{ns}	NE	NE
180	0.30±0.01 ^{ns}	NE	NE

ตัวอักษร ns หมายถึง non-significant differences คือ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติทั้งแนวตั้งและแนวนอนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

NE หมายถึง not examined คือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากไม่พบปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.4 การตรวจสอบการปนเปื้อนของ *B. cereus* Yeast Mold และ Aflatoxin ของ freeze-dried spore ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 180 วัน

Storage time (Days) / Storage temperature	-25°C			0°C			25°C		
	B. cereus	Yeast & Mold	Aflatoxin	*B. cereus*	Yeast & Mold	Aflatoxin	*B. cereus*	Yeast & Mold	Aflatoxin
0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
30	ND	ND	ND	ND	ND	ND	NE	NE	NE
60	ND	ND	ND	NE	NE	NE	NE	NE	NE
90	ND	ND	ND	NE	NE	NE	NE	NE	NE
120	ND	ND	ND	NE	NE	NE	NE	NE	NE
150	ND	ND	ND	NE	NE	NE	NE	NE	NE
180	ND	ND	ND	NE	NE	NE	NE	NE	NE

ND หมายถึง not detected คือ ตรวจไม่พบ

NE หมายถึง not examined คือ ไม่ได้ทำการตรวจวิเคราะห์เนื่องจากไม่พบปริมาณสปอร์ที่มีชีวิตในระหว่างการเก็บรักษา

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จากตารางที่ 4.5 ได้มีการนำกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 จากกล้าเชื้อผงที่ผลิตได้ในเบื้องต้นมาทดสอบคุณสมบัติความคล้ายคลึงกันของยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) เปรียบเทียบกับกล้าเชื้อสดที่เป็นเชื้อจุลินทรีย์ตั้งต้นที่ผ่านการวิเคราะห์และยืนยันคุณสมบัติของความเป็นกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 แล้ว พบว่ามีลำดับของยีนที่ตรงกันร้อยละ 100 โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) แสดงให้เห็นว่าการใช้เทคนิคการทำให้ด้วยการระเหิดแห้ง (Freeze dried) โดยมีแป้งถั่วเหลืองเป็นสารปกป้องจากความเย็น และสภาวะการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 180 วัน ไม่ทำให้คุณสมบัติของความเป็นกล้าเชื้อเปลี่ยนแปลงไป

ตารางที่ 4.5 การทดสอบความคล้ายคลึงของช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อสด *B. subtilis* SB-MYP1 และ กล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ณ วันที่ 180 ที่อุณหภูมิ -25^{O}C โดยเปรียบเทียบจากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information)

Samples	Identification results	Close sequence	Similarity (%)	NCBI Accession no.
กล้าเชื้อสด *B. subtilis* SB-MYP1	*B. subtilis*	*B. subtilis* SRCM100757	100	CP021499.1
		B. subtilis SRCM101444	100	CP021498.1
		B. subtilis TLO3	100	CP021169.1
กล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ณ วันที่ 180 ที่อุณหภูมิ -25^{O}C	*B. subtilis*	*B. subtilis* SRCM100757	100	CP021499.1
		B. subtilis SRCM101444	100	CP021498.1
		B. subtilis TLO3	100	CP021169.1

2. ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ freeze-dried *B. subtilis* SB-MYP1 spore ด้วยแป้งถั่วเหลืองในระหว่างการหมักถั่วเหลือง

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพและความปลอดภัยของกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ได้นำกล้าเชื้อดังกล่าวที่มีความเหมาะสมสำหรับเก็บรักษากล้าเชื้อที่อุณหภูมิ -25^{O}C เป็นเวลาอย่างน้อย

180 วัน ทดสอบประสิทธิภาพในการหมักถั่วเหลืองพบว่ามีการผลิตเอนไซม์อะไมเลส และโปรติเอส ออกมาย่อยสับสเตรทที่สำคัญในถั่วเหลือง เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต โดย สับสเตรทที่มีปริมาณสูงสุดคือ โปรตีน ทำให้มีปริมาณแอมโมเนียและค่า pH สูงขึ้นในระหว่างการหมักถั่วเหลือง ซึ่งคุณลักษณะทางเคมีที่ดีของถั่วเหลืองหมักจะมีค่า pH จะอยู่ในช่วง 7.5-8.5 ซึ่งจะแปรผันตรงกับปริมาณแอมโมเนียในระหว่างหมักคือ 0.8 -1.0 % (Allagheny et al. 1996, Visessanguan et al. 2005) ค่า pH ดังกล่าวซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญและกระบวนการผลิตสารเมตาบอไลต์ของ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ส่งผลให้จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารไม่สามารถเจริญได้จึงส่งผลให้ในระหว่างกระบวนการหมักจนได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดอื่นๆ แสดงให้เห็นถึงการใช้กล้าเชื้อผงในการหมักทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณลักษณะทางกายภาพเช่นเดียวกันกับการหมักด้วยกล้าเชื้อสดซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัว เช่น ความเป็นกรด (pH) รสชาติ กลิ่นและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความสม่ำเสมอ นอกจากนี้ยังทำให้มีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น ส่งผลให้ต้องคำนึงถึงการเก็บรักษากล้าเชื้อ โดยต้องเป็นวิธีการที่จะช่วยให้กล้าเชื้อมีกิจกรรมการหมักคงที่ไม่เปลี่ยนแปลงไป

ตารางที่ 4.6 จำนวน *B.subtilis* SB-MYP1 ที่เจริญในการหมักถั่วเหลืองระยะเวลา 0-72 ชั่วโมง

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	**จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ log cfu/g**		P-value
	กล้าเชื้อสด *B.subtilis* SB-MYP1	**กล้าเชื้อ** *B.subtilis* SB-MYP1 **ด้วยsoybean flour 10%w/v**	
0	4.08^{h}	5.00^{g}	0.00
12	7.98^{f}	8.60^{e}	
24	8.35^{e}	9.11^{d}	
36	11.99^{a}	9.06^{d}	
48	10.48^{b}	8.45^{e}	
60	9.99^{b}	9.64^{c}	
72	9.42^{d}	11.01^{a}	

หมายเหตุ P-value < 0.01 หมายถึงตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ
P-value < 0.05 หมายถึงตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
P-value > 0.05 หมายถึงตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.7 ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของกระบวนการหมักด้วยกล้าเชื้อ *B.subtilis* SB-MYP1 ในการหมักถั่วเหลืองตั้งแต่ 0-72 ชั่วโมง

ชนิดของกล้าเชื้อ	**ระยะเวลาในการหมัก(ชั่วโมง)**						
	0	**12**	**24**	**36**	**48**	**60**	**72**
กล้าเชื้อสด *B.subtilis* SB-MYP1	6.180 ± 0.001[c]	6.623 ±0.001[b]	7.330 ±0.001[a]	8.067 ± 0.001[b]	7.993 ± 0.003[a]	7.410 ± 0.003[c]	7.920 ± 0.001[c]
กล้าเชื้อผง *B.subtilis* SB-MYP1	6.653 ±0.001[a]	6.760 ±0.001[a]	6.045 ±0.001[c]	8.687 ±0.001[a]	8.614 ±0.001[b]	8.661 ±0.001[a]	8.695 ±0.001[a]
P-value	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

หมายเหตุ P-value < 0.01 หมายถึงตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ
P-value < 0.05 หมายถึงตัวอย่างมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
P-value > 0.05 หมายถึงตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

แต่เมื่อพิจารณาสภาวะการ หมักถั่วเหลืองค่า pH มีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งในระหว่าง การเจริญนั้น *B. subtilis* จะมีการผลิต เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ อะไมเลส โปรติเอส มาย่อยสลายสับสเตรทที่สำคัญในถั่วเหลือง เช่น โปรตีน คาร์โบไฮเดรต โดยสับสเตรทที่มีปริมาณสูงสุดคือ โปรตีน จะส่งผลให้มีปริมาณแอมโมเนียและค่า pH สูงขึ้น ในระหว่างกระบวนการหมักถั่วเหลือง

จากผลการศึกษากิจกรรมของกระบวนการหมักที่มีผลต่อการผลิตเอ็นไซม์โปรติเอส และอะไมเลสของกล้าเชื้อ *B.subtilis* SB-MYP1 โดยนำกล้าเชื้อสด *B.subtilis* SB-MYP1 และกล้าเชื้อผง *B.subtilis* SB-MYP1 ติดตามกระบวนการหมักและการผลิตเอ็นไซม์ ในถั่วเหลืองหมักทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการวิเคราะห์พบว่ามีการผลิตเอ็นไซม์อะไมเลส ที่แตกต่างกัน คือ อัตราการเกิดกิจกรรมของเอ็นไซม์อะไมเลสสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และ60 (100%) ส่วนการผลิตเอ็นไซม์โปรติเอสพบว่ามีอัตราการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์ สูงสุดในชั่วโมงที่ 48 และ 60 (100%) จากการวิเคราะห์จะเห็นได้ว่า อัตราการเกิดกิจกรรมของเอ็นไซม์อะไมเลส และโปรติเอส เมื่อทำการหมักถั่วเหลืองด้วยกล้าเชื้อผง *B.subtilis* SB-MYP1 จะใช้เวลาเพียง 48 ชั่วโมงในการผลิตอะไมเลสได้สูงสุดซึ่งใช้เวลาน้อยกว่าการใช้กล้าเชื้อสดในการหมัก มีการผลิตเอ็นไซม์ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาที่สั้นกว่าการใช้กล้าเชื้อในรูปแบบอื่นๆ ซึ่งมีสาเหตุจากการที่กล้าเชื้อผง *B.subtilis* SB-MYP1 ด้วย soybean flour นั้นมีวัตถุดิบตั้งต้นเป็นถั่วเหลืองเช่นเดียวกันจึงทำให้เกิดการปลดปล่อยกิจกรรมของเอ็นไซม์ได้เร็วและมีปริมาณที่มากกว่า

ตารางที่ 4.8 กิจกรรมของเอนไซม์ (Relative activity) ของเอนไซม์อะไมเลสในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่หมักด้วยผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	**Relative activity(%)**	
	กล้าเชื้อสด *B.subtilis* SB-MYP1	**กล้าเชื้อ** *B.subtilis* SB-MYP1 **ด้วย soybean flour 10%w/v**
0	0.00	0.00
12	30.36	36.35
24	77.43	53.62
36	82.17	77.42
48	75.85	100.00
60	100.00	85.91
72	72.91	66.67

ตารางที่ 4.9 กิจกรรมของเอนไซม์ (Relative activity) ของเอนไซม์โปรติเอสในผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่หมักด้วยผงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	**relative activity (%)**	
	กล้าเชื้อสด *B.subtilis* SB-MYP1	**กล้าเชื้อ** *B.subtilis* SB-MYP1 **ด้วย soybean flour 10%w/v**
0	0.00	0.00
12	20.64	20.47
24	50.43	47.99
36	76.67	76.90
48	100.00	100.00
60	67.35	89.09
72	62.45	71.71

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. คุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลืองที่หมักด้วยกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* Sb-MYP1

เมื่อนำผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ได้จากกระบวนการหมักด้วยการใช้กล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ที่เก็บไว้ที่สภาวะ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 180 วัน วิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการเปรียบเทียบกับถั่วเหลืองหมักด้วยกล้าเชื้อสดพบว่าได้แก่ แคลเซียม (ca) เหล็ก (Fe) ฟอสฟอรัส (p) และวิตามินบี 12 พบว่าในผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการหมักด้วยกล้ากล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 มีปริมาณ แคลเซียม 1227.00 mg/kg เหล็ก 24.75 mg/kg ฟอสฟอรัส 2337.00 mg/kg และวิตามินบี 12 20.82 mg/100 กรัมแห้ง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ถั่วเหลืองหมักที่ผ่านการหมักด้วยกล้าเชื้อสด *Bacillus subtilis* SB-MYP1 มีปริมาณ แคลเซียม 1191.00 mg/kg เหล็ก 23.49 mg/kg ฟอสฟอรัส 2257.50 mg/kg และวิตามินบี 12 2.74 mg/100 กรัมแห้ง จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้กล้าเชื้อผงมีปริมาณของแร่ธาตุและวิตามินเพิ่มสูงขึ้นเมื่อพิจารณากับการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อสดส่วนหนึ่งเป็นผลของการใช้ผงกล้าเชื้อที่มีแป้งถั่วเหลือง (Soybean flour) เป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นชนิดเดียวกันกับวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมัก ส่งผลให้กิจกรรมของ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 เป็นไปอย่างรวดเร็วและมีการใช้สารอาหารสำคัญเพื่อเสริมบทบาทของกล้าเชื้อดังกล่าวมีการปล่อยเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสออกมาย่อยโปรตีนทำให้ช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายเป็นประโยชน์มากขึ้น

ตารางที่ 4.10 คุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักที่ได้จากการใช้กล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1

ปริมาณแร่ธาตุและวิตามิน	**ถั่วเหลืองหมักด้วยกล้าเชื้อสด**	**ถั่วเหลืองที่หมักด้วยผงกล้าเชื้อ** *B.subtilis* SB-MYP1
Ca (mg/kg)	1191.50	1227.00
Fe (mg/kg)	23.49	24.75
P (mg/kg)	2257.50	2337.00
Vitamin B12 (mg/ 100g)	2.74	20.82

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

เทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ด้วยการใช้แป้งถั่วเหลือง (Soybean flour) ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก เป็นสารปกป้องความเย็นจากกระบวนการทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze drier) กล้าเชื้อที่ได้จากกระบวนนี้เมื่อเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์อะลูมิเนียมฟอยล์ที่อุณหภูมิ -25 0 และ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน พบว่ากล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -25^{O}C เมื่อเวลาผ่านไป 180 วัน ยังคงมีปริมาณ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ที่รอดชีวิต ปริมาณความชื้นและปริมาณน้ำอิสระอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของคุณสมบัติของการเป็นกล้าเชื้อผง ในขณะที่สภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อผงที่อุณหภูมิ 0^{O}C และ 25^{O}C มีจำนวนสปอร์ลดลงในวันที่ 30 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้แก่ *Bacillus cereus* ยีสต์และรา รวมทั้งปริมาณสารพิษจากเชื้อรา aflatoxin ในกล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ซึ่งอยู่ในระดับความปลอดภัยตามมาตรฐานของกล้าเชื้อ เมื่อนำกล้าเชื้อผงที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ 16s rRNA ด้วยวิธี sequencing เพื่อยืนยันสายพันธุ์และความเสถียรของกล้าเชื้อในการเก็บรักษา พบว่าผลทดสอบความคล้ายคลึงของยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อสดและกล้าเชื้อผง ซึ่งมีคุณสมบัติความเป็นกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ที่ตรงกัน (อ้างอิงจากฐานข้อมูล NCBI (National Center for Biotechnology Information) แสดงให้เห็นว่ากระบวนการผลิตกล้าเชื้อผงด้วยการใช้แป้งถั่วเหลืองเป็นสารปกป้องจากความเย็นในปริมาณที่เหมาะสม (ร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก) ไม่ทำให้คุณสมบัติของความเป็นกล้าเชื้อเปลี่ยนแปลงไป

จากนั้นนำกล้าเชื้อผงที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ในกระบวนการหมักถั่วเหลืองเป็นเวลา 72 ชั่วโมงพบว่าในกระบวนการหมักด้วยกล้าเชื้อสดและกล้าเชื้อผงไม่ปรากฏการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคระหว่างกระบวนการหมัก อัตราการเกิดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและโปรติเอสของการใช้กล้าเชื้อผงในกระบวนการหมักสูงสุด (ร้อยละ 100) ในชั่วโมงที่ 48 แสดงให้เห็นถึงการผลิตเอนไซม์ได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาที่สั้นทำให้เกิดกระบวนการหมักรวดเร็วและมีความเสถียรมากขึ้น นอกจากนี้ได้นำผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมักไปวิเคราะห์คุณค่าทางโภชนาการ พบว่าถั่วเหลืองหมักด้วยกล้าเชื้อผงมีปริมาณแร่ธาตุและวิตามินสูงกว่าการใช้กล้าเชื้อสดในการหมักดังนี้ ปริมาณแคลเซียม 1227.00 mg/kg เหล็ก 24.75 mg/kg ฟอสฟอรัส 2337 mg/kg และวิตามินบี 12 20.82 mg/100g แสดงให้เห็นว่าผลิตภัณฑ์ที่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้จากการใช้กล้าเชื้อผงมีปริมาณของแร่ธาตุและวิตามินเพิ่มสูงขึ้นเมื่อพิจารณากับการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อสดส่วนหนึ่งเป็นผลของการใช้ผงกล้าเชื้อที่มีแป้งถั่วเหลือง (Soybean flour) เป็นองค์ประกอบซึ่งเป็นชนิดเดียวกันกับวัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมัก ส่งผลให้กิจกรรมของ *Bacillus subtilis* SB-MYP1 เป็นไปอย่างรวดเร็วและมีการใช้สารอาหารสำคัญเพื่อเสริมบทบาทของกล้าเชื้อดังกล่าวมีการปล่อยเอนไซม์โปรติเอสและอะไมเลสออกมาย่อยโปรตีนทำให้ช่วยปรับปรุงองค์ประกอบที่ย่อยได้ยากให้อยู่ในรูปที่ย่อยได้ง่ายเป็นประโยชน์มากขึ้น

จึงสรุปได้ว่าเทคนิคการเก็บรักษากล้าเชื้อผง *Bacillus subtilis* SB-MYP1 ด้วยแป้งถั่วเหลืองเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก โดยกระบวนการทำแห้งด้วยเครื่องระเหิดแห้ง (freeze drier) มีคุณภาพประสิทธิภาพ และความปลอดภัยที่สามารถยืนยันความใช้ได้ในทางการค้า จึงทำการฝากเก็บรักษากล้าเชื้อที่แหล่งเก็บเชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) รหัสเชื้อ *Bacillus subtilis* SB MYP1 TISTR No. 2397 เพื่อการเก็บรักษาในสภาวะที่เหมาะสมและสำหรับการเผยแพร่เชื้อจุลินทรีย์ทางการศึกษาวิจัยและประโยชน์ในเชิงพานิชย์ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บรรณานุกรม

ปัณณธร ภัทรสถาพรกุล. (2547). เทคโนโลยีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (ตอนที่ 1) [ออนไลน์]. ได้จาก : http://www.thairefrig.or.th/download/thairefrig_or_th/lyophilization%20technology1.pdf

ปิยะวรรณ กาสลัก. (2553). รายงานการวิจัย การลดกลิ่นไม่พึงประสงค์และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก โดยการใช้ *Bacillus subtilis*เป็นกล้าเชื้อในการหมัก. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ปิยะวรรณ กาสลัก. (2554). รายงานการวิจัย เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อ (*Bacillus subtilis*) เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ภัทรียา จุฑามาศ. (2541). การใช้น้ำเวย์เพื่อผลิตกล้าเชื้อแลคติคแอซิคแบคทีเรียและผลของสาร ปกป้องเซลล์ต่อการอยู่รอดของเชื้อ [ออนไลน์]. ได้จาก : http://anchan.lib.ku.ac.th/kukr/bitstream/003/16290/1/KC3806010.pdf

ภาณุวรรณ จันทวรรณกูร. (2543). การศึกษาถั่วหมัก.....อาหารพื้นบ้านในภาคเหนือ [ออนไลน์]. ได้จาก :http://www.science.cmu.ac.th/jou7.html

สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารหางชาติ. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ มาตรฐานผลิตภัณฑ์แป้งถั่วเหลือง, มผช. 1377/2550

สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม. สถาบันปิโตรเลียมแห่งประเทศไทย. (2553). Plastics Intelligence Update

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. (2539). เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ

Chaiyasut, C., Kumar, T., Tipduangta, P., and Rungseevijitprapa, W. (2010). Isoflavone content and antioxidant activity of Thai fermented soybean and its capsule formulation. Afri.J. Biotech. 9: 4120-4126.

Dajanta, K., Apichartsrangkoon, A. and Chukeatirote, E. (2011). Volatile profiles of thuanao, a Thai fermented soy product. Food Chemistry. 125 : 464–470.

Feng, J., Liu, X., Xu, Z.R., Lu, Y.P., and Liu, Y.Y. (2007). Effect of fermented soybean meal on intestinal morphology and digestive enzyme activities in weaned piglets. Dig Dis Sci. 52:1845-1850.

Fernanda Fonseca, Catherine Beal and Georges Corrieu. (2000). Method of quantifying the loss of acidification activity of lactic acid starters during freezing and frozen storage. Journal of Dairy Research. Volume 67, page 83-90.

Hemalatha, S. and Shanthi, S. (2010). *In vitro* characterization of bacteriocin producing *Bacillus subtilis* from milk samples. African Journal of Microbiology Research. 4: 2004-2010.

Hubaalek, Z. (2003). Protectants used in the cryopreservation of microorganism. Cryobiology. 46 : 205-229.

Inatsu, Y., Nakamura, N., Yuriko, Y., Fushimi, T., Watanasiritum, L., and Kawamoto, S.(2006). Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. Letters in Applied Microbiology. 43: 237-242.

Namaldi, A., Calik, P. and Uludag, Y. (2006). Effects of Spray Drying Temperature and Additiveson the Stability of Serine Alkaline Protease Powders. Drying Technology. 24: 1495–1500

M. Abadias et al. (2001). Effect of freeze drying and protectants on viability of the biocontrol yeast *Candida sake*. International Journal of Food Microbiology. Volume 65, page 173–182

Morgan, C. A., N. Herman, P. A. White, and G. Vesey. (2006). Preservation of micro-organisms by drying; A review. J. Microbiol. Methods 66:183–193.

Ouoba, L.I.I., Diawara, B., Jespersen, L. and Jakobsen, M. (2007). Antimicrobial activity of Bacillus subtilis and Bacillus pumilus during the fermentation of African locust bean (Parkia biglobosa) for Soumbala production. Journal of Applied Microbiology. 102 : 963–970.

Park, M-J., General, T. and Lee, S-M. (2012). Physicochemical Properties of Roasted Soybean Flour Bioconverted by Solid-State Fermentation Using *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus plantarum.* Prev Nutr Food Sci. 17 : 36-45

Petchkongkaew, A., Taillandier, P., Gasaluck, P., and Lebrihi1, A. (2008). Isolation of *Bacillus* spp. from Thai fermented soybean (Thua-nao): screening for aflatoxin B1 and ochratoxinA detoxification. Journal of Applied Microbiology. 104: 1495-1502.

S. Samapundo, M. Heyndrickx, R. Xhaferi, I. de Baenst, F. Devlieghere (2014). The combined effect of pasteurization intensity, water activity, pH and incubation temperature on the survival and outgrowth of spores of Bacillus cereus and Bacillus pumilus in artificial media and food products. International Journal of Food Microbiology. Volume 181 page 10–18

Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F. and Ross, R.P. (2005). Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. Applied Microbiology. 99 : 493-501.

Van Netten, P., A. van de Moosdijk, P. van Hoensel, D.A.A. Mossel and L. Perales. (1990). Psychrotrophic strains of *Bacillus cereus* producing enterotoxin. J. Appl. Bacteriol. 69:73-79.

Wu, Z., Guo, L., Qin, S. and Li, C. (2012). Encapsulation of R. planticola Rs-2 from alginate-starch-bentonite and its controlled release and swelling behavior under simulated soil conditions. J Ind Microbiol Biotechnol. 39:317–327.

Yanez-Mendizabal, V., Vinas, I., Usall, J., Canamas, T. and Teixido, N. (2012). Endospore production allows using spray-drying as a possible formulation system of the biocontrol agent *Bacillus subtilis* CPA-8. Biotechnol Lett. 34:729–735.

Yi-Chieh Wang, Roch-Chui Yu and Cheng-Chun Chou. (2004). Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. International Journal of Food Microbiology . Volume 93, page 209– 217

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

รองศาสตราจารย์ ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก

เกิดเมื่อวันที่ 12 เดือนมีนาคม พ.ศ.2502 ณ จังหวัดนครราชสีมา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สังกัดสาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (ชีววิทยา)จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เมื่อปี พ.ศ. 2523 จบการศึกษาระดับปริญญาโท (Biotechnology and Biochemistry) จาก Mie University ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2536 และจบการศึกษาระดับปริญญาเอก (Applied Sciences and Biotechnology) จาก Mie University ประเทศญี่ปุ่น เมื่อปี พ.ศ. 2539

อีเมลล์ : piyawan@sut.ac.th , pgasaluck@gmail.com

โทร 044-224270

ความเชี่ยวชาญ :

- Food Microbiology, Food Fermentation and Microbiological Food Safety
- Control of food borne pathogen (food biopreservative; nisin/ bacteriocin/ natural antimicrobials) in food chain
- Preservative packaging and the hygienic aspects
- Microbe-microbe interaction, microbiological challenge testing

ผลงานตีพิมพ์นานาชาติ :

Sittisart, P., and Gasaluck, P. (2022) Biosurfactant production by *Lactobacillus plantarum* MGL-8 from mango waste. *Journal of Applied Microbiology*, 132(4), 2883– 2893.

Mahisanan, T., Gasaluck, P. & Eumkeb, G. (2017). A novel soybean flour as a cryoprotectant in freeze-dried *Bacillus subtilis* SB-MYP-1. LWT - Food Science and Technology, 77, 152-159.

Sittisart, P., Mahisanan, T., & Gasaluck, P. (2016). Decontamination and Quality Safety Control of Chili (*Capsicum annuum* L.) after Post-harvest Using Washing Process with Biosurfactant, Agricultural Science Journal, 47:3 (Suppl.), 43-46.

Mahidsanan, T. and Gasaluck, P. (2014). Improvement of Poly-γ-glutamic acid (PGA) Producing *Bacillus subtilis* SB-MYP-1 by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) Mutagenesis.The 2nd International Conference on Agriculture and Agro-Industry 2014 (ICAAI2014) On November 20-21, 2014 Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

Gasaluck, P., Srithamma, L., Kongmanklang, C. (2012). Microbial and heavy metal contamination monitoring of ready-to eat food in Nakhon Ratchasima province. International Journal of Food, Nutrition and Public Health Vol.5 No. 1/2/3.

Chanprasert, N. and Gasaluck, P. (2011). Bacteriocin production and its crude characterization of lactic acid bacteria isolates from pickled *Garcinia schomburgkiana* Pierre. Asian Journal of Food and Agro-Industry. 4(01), 54-64.

Mahidsanan, T. and Gasaluck, P. (2011). Effect of freeze drying and maltodextrin on Polyglutamic acid production ability of *Bacillus subtilis* starter powder. In Proceeding International Food onference “Life I rove ent through Food Technology” Surabaya, October 28th-29th pp. 80-85.

Chanprasert, N. and Gasaluck, P. (2010). Bacteriocin production and its crude characterization of Lactic acid bacteria isolates from pickled *Garcinia schomburgkiana* Pierre. In Proceeding of 12th Food Innovation Asia Conference on Indigenous Food Research and Development to Global Market). BITEC, Bangkok, Thailand. June 17-18, pp. 640-649.

Chanprasert, N. and Gasaluck, P. (2010). Morphological changes of *Bacillus cereus* TISTR 687 cells induced by crude bacteriocin producing *Lactococcus lactis* ssp. lactis 1. In Proceeding of 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology (TSB): International Conference on Biotechnology for Healthy Living. Prince of Songkla University, Trang Campos, Thailand. October 20-22.

Ningsanond, S., Gasaluck, P., et al. (2008). Microbial Contamination of Pork at Abattoirs, during Transportation, and at Retail Sites. A Final report to the Center for System Research in Food Safety and Nutrition (FSN Center) Knowledge Network Institute of Thailand (KNIT).

Petchkongkaew, A., Taillandier,P., Gasaluck, P., and Lebrihi, A. (2008). Isolation of *Bacillus* spp. from Thai Fermented Soybean (Thua-nao): Screening for Aflatoxin B1 and Ochratoxin A detoxification. Journal of Applied Microbiology Vol.104 (No.5) 1495- 1502 (8).

Thongbai, B., Gasaluck, P., and Waites, W. M. (2006). Morphological changes of temperature and pH-stressed *Salmonella* following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. LWT- Food Science and Technology. (39) 1180-1188.

Thongbai, B., Waites, W. M. and Gasaluck, P. (2005). The susceptibility of Bioluminescent *Salmonella typhimurium* Contaminating Chicken Carcases to Cetylpyridinium Cholide and Nisin. Kasetsart Journal: Natural Science October-December 2005. Vol. 39 No. 4 (622-632).

Gasaluck, P. (1999). The Development of the Curricula of Food Technology of Suranaree University of Technology (SUT). In Proceedings of the International Workshop on University Education, Research and in Asia-Pacific Region, Mie University Press, April 6 and 7.

Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I. (1996). The occurrence of *Bacillus cereus* in Local Thai Traditional Foods. J. Antibact. Antifung. Agents Vol 24. No. 5 (349-356).

Gasaluck, P., Yokoyama, K., Kimura, T. and Sugahara, I. (1996). Some Chemical and Microbiological Properties of Thai Fish Sauce and Paste. J. Antibact. Antifung. Agents Vol 24. No. 6, (385-390).

Chinzei, Y., Gasaluck, P., et al. (1995). “A Study of Three Ende ic Diseases in ural Areas of ortheast Thailand.” International Scientific esearch rogra (Grant o. 04041057) Mie University, School of Medicine.

Gasaluck, P. (1994). “Thai Fer ented Fish Sauce.” In roceedings of the International Seafood Research Meeting of Mie University, Mie Academic Press, September 30.

Hibasami, H., Midorikawa, Y., Gasaluck, P., Tsukada, T., Shirakawa, S., Yoshimura, H., Imai, M., Nakashima, K. (1992). Growth Inhibition of Canida By 15- Deoxyspergualin, an Immunosuppressive Agent Used In Experiment Organ Transplantation. Letters in Applied Microbiology. Vol 14 (81-83).

Hibasami, H., Midorigawa, Y., Gasaluck, P., Yoshimura, H., Masuji, A., Takaji, S., Nakasahima, K., Imai M. (1991). Bactericidal Effect of 15-Deoxyspergualin, on *Staphylococcus aureus*. J. Chemotherapy Vol. 37 (202-205).

Gasaluck, P., Midorigawa, Y., Imai, M. and Yoshimura, H. (1990). Enteropathogenic *E.coli* (ETEC) Isolation in Northeast Thailand and Their Resistance to Antibiotics. Mie Medical Journal Vol 40 (3):379-384.

Thongrajai, P., Chanarat, P., Kulapongs, P., Chanarat, N., Gasaluck, P. and Kaewpila, S. (1988). Epidermiological Assessment of Anti-HIV I Anti-bodies in Thailand, Sounteast Asian J.Trop.Med.Pub.Hith Vol 19. No. 4 Dec.

Thongrajai, P., Chanarat, P., Kulapongs, P., Chanarat, N. and Gasaluck, P. (1988). Seroepidemiology of Anti-HIV I Antibodies. In Thailand, Srinagarind Hospital Medicine Vol 3. No. 4, Oct-Dec.

Thongrajai, P., Gasaluck, P. et al. (1986). Detection of Anti-Rota Virus Secretory IgA by ELISA. The Second Annual Meeting on Faculty of Medicine Khon Kaen University.

Thongrajai, P., Gasaluck, P. et al., (1986). Diarrhoea in Children in Rural Thailand. A Full research report to the USAID Department of Microbiogy Faculty of Medicine Khon Kaen University.

งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ : โครงการเรื่อง“การพัฒนาคุณภาพและประสิทธิภาพผลิตภัณฑ์สารลดแรงตึงผิวชีวภาพในการล้างผัก ผลไม้และพื้นผิววัสดุ”. 2559. รับสนับสนุนจากทุนวช.57 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “โปรไบโอติกและเซอร์รี่เปรี้ยวหมักเสริมสุขภาพ”. 2558. รับสนับสนุนจากทุนวช.57 (สานักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “ผลิตภัณฑ์อาหารเสริมจากถั่วเหลืองหมักผงผสมบุกสำหรับผู้สูงอายุ” 2558. รับสนับสนุนจากทุนวช.55 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าชุดโครงการ: โครงการเรื่อง “บาซิลัส สับทิลิส ฤทธิ์ทางชีวภาพ คุณค่าทางโภชนาการและคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของถั่วหมักเพื่อเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ” 2558 รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “เทคโนโลยีการผลิตหัวเชื้อ (*Bacillus subtilis*) เพื่อการผลิตผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก”. 2558. รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สานักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “สมบัติวิทยากระแสและการประยุกต์ใช้เอ็กโซโพลี-แซคคาไรด์ที่ผลิตได้จากถั่วเหลืองหมักด้วยกล้าเชื้อบาซิลัส สับทิลิสในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ”.2558. รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยวเสริมสุขภาพจากถั่วหมัก”. 2558. รับสนับสนุนจากทุนวช.54 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการ: โครงการเรื่อง “การจัดทำระบบ GMP สาหรับน้าปรุงรสผัดหมี่”.2555. รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย : โครงการเรื่อง “การลดกลิ่นไม่พึงประสงค์และเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์ถั่วหมัก โดยการใช้ *Bacillus subtilis* เป็นกล้าเชื้อในการหมัก”.2553. รับสนับสนุนจากทุนวช.53 (สานักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย : โครงการเรื่อง “การเฝ้าระวังการปนเปื้อนจุลินทรีย์และโลหะ หนักในอาหารสำเร็จรูป เพื่อจำหน่ายในเขตจังหวัดนครราชสีมา”. 2553. รับสนับสนุนจากทุนวช.53 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย : โครงการเรื่อง “สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากการหมักผลเชอร์รี่เปรี้ยว (*Prunus cerasus* L.)”. 2553. รับสนับสนุนจากทุนวช.53 (สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ)

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การศึกษาผลการเติม แคลเซียมเบนโทไนต์ในอาหารสัตว์ต่อการดูดซับสารพิษจากเชื้อรา”. 2553. รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส

นางปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การพัฒนากุนเชียงไขมันต่ำ”. 2553. รับทุนสนับสนุนจากทุนศูนย์ส่งเสริมอุตสาหกรรมเขต 6 จังหวัดนครราชสีมา

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย โครงการเรื่อง “การยืดอายุการเก็บรักษาขนมถั่วกวนอบเทียน” 2553. รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส.

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย: โครงการเรื่อง “การศึกษาอายุการเก็บของขนมถั่วอบเทียน”.2552. รับสนับสนุนจากทุน iTAP มทส.

ปิยะวรรณ กาสลัก ผู้ร่วมโครงการวิจัย: โครงการเรื่อง “ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในโรงฆ่าสุกร การขนส่งจากโรงฆ่าไปยัง จุดจาหน่าย และแหล่งจาหน่ายเนื้อสุกร ในเขตจังหวัดนครราชสีมาและอุบลราชธานี” 2552 รับสนับสนุนจากทุนวิจัยสถาบันคลังสมองแห่งชาติ

ปิยะวรรณ กาสลัก ผู้ร่วมโครงการวิจัยการวิจัย: โครงการเรื่อง “สถานการณ์ความปลอดภัยด้านผักและผลไม้กรณีตลาดนัด-รถเร่ (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่าง)”. 2548. รับสนับสนุนจากทุนวิจัยสถาบันคลังสมองแห่งชาติ

ปิยะวรรณ กาสลัก หัวหน้าโครงการวิจัย: โครงการเรื่อง “การใช้ไนซินในการยับยั้งการงอกของสปอร์ *Clostridium* spp. ที่คัดแยกมาจากชิ้นปลาที่บรรจุในสภาวะการปรับเปลี่ยนบรรยากาศ”. 2544. รับสนับสนุนจากทุนวิจัยอาจารย์ใหม่ มทส.

สิทธิบัตรสิ่งประดิษฐ์

- อนุสิทธิบัตร กรรมวิธีการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากมะม่วงสำหรับฆ่าเชื้อในกระบวนการล้างผัก-ผลไม้สด เลขที่คำขอ 2003002200
- สิทธิบัตร กรรมวิธีการผลิตสารทำความสะอาดจากการหมักผลไม้ไทยรสเปรี้ยว เลขที่คำขอ 1401004175
- สิทธิบัตร เครื่องกรองของเหลวมีกากแบบต่อเนื่อง เลขที่คำขอ 1501005214
- สิทธิบัตร ถังหมักสารลดแรงตึงผิวชีวภาพด้วยวัตถุดิบทางการเกษตรเหลือใช้ เลขที่คำขอ 1501005215
- สิทธิบัตร ผลิตภัณฑ์อาหารขบเคี้ยวเสริมสุขภาพจากถั่วเหลืองที่หมักด้วยกล้าเชื้อ *Bacilus subtilis* SB-MYP-1 เลขที่คำขอ 1601004346

งานบริการวิชาการ :

- Consultants on microbial contamination of fruit in light syrup product, Dole Thailand Co., Ltd. (2015)
- Chair an of the working group for “production of biosurfactant to re lace synthetic chemicals reagent.” Nakhonratchasima (2016)
- Consultants on environmental health for enterprise that are harmful to the health, Regional Health Promotion Center 5, Nakhon Ratchasima (2003)
- Chairman of the working group of establishments of Laboratory Quality System for approval the hallmark of the Thai Industrial Standards Institute, ISO/17025 of the Center for Science and Technology, Suranaree University of Technology (2003)
- Chairman of the working group of establishments of Occupational health and safety System, Thai Industrial Standards Institute, Suranaree University of Technology TIS/18000 (2003)
- Consultant to industry and Co-worker training for employee in Nakhon Ratchasima on subject “The safety standard GM HA” (2001)

วิทยากร :

- Biosurfactants for use as Cleansing Agents. Green Hotel & Resort, Khon Kaen (2014)
- Go green go organic of Biosurfactants. Technopolis, Suranaree University of Technology (2011)
- Biosurfactants for use as cleansing agents. Technopolis, Suranaree University of Technology (2011)
- Food safety management for manufacturers. Nakhon Ratchasima councils School (2009)
- The role of microorganisms in processed mushrooms. Suranaree Agricultural Fair (2008)
- Microbial Monitoring of Thailand's Food Standards. Cooperate with Food Intelligence Center Thailand and National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (2006)
- GMP/HACCP, food hazard, food control and contamination, personal hygiene. Thailand Tapioca Starch Company (2004)

Innovative Research:

- File a patent application in topic “The process of cleaning agent from Thai sour fruit fermentation”
- Prototypes devices for control quality and fermentation process of cleaning agent from agricultural wastes (Fermenter), 2015

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ ปัจจุบันดำรงตำแหน่ง อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพคณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคามมีประวัติการศึกษาดังต่อไปนี้

วุฒิการศึกษา	สาขา	ปีที่จบ	สถาบัน/ประเทศ
ปริญญาเอก	Food Biotechnology	2546	University of Reading/ ประเทศอังกฤษ
ปริญญาโท	เทคโนโลยีการอาหารและโภชนาการ (เกียรตินิยม)	2538	ม.มหาสารคาม/ ประเทศไทย

สถานทีทำงาน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ต. ขามเรียง อ. กันทรวิชัย จ.มหาสารคาม 44150

โทรศัพท์ 043 754333 Ext 1832, 081-2612363 โทรสาร 043 754086

E-mail address : pariyaporn.i@msu.ac.th, olejaa@gmail.com

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

- Lactic Acid Bacteria
- Functional Food
- Food Biotechnology
- Food Microbiology
- Food Safety

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

งานวิจัย

1. ผลของการเติมน้ำผลไม้บางชนิดต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus*
2. การใช้การถั่วเหลืองทดแทนถั่วเหลืองในกระบวนการหมักซีอิ้ว
3. Taxonomic Study of Lactic Acid Bacteria from Marine Sources. ณ Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Japan ภายใต้โครงการ “ความร่วมมือทางวิชาการระหว่างสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและองค์การส่งเสริมความก้าวหน้าทางวิทยาศาสตร์แห่งประเทศญี่ปุ่น (NRCT-JSPS) : Scientific Exchange Program 2000”
4. ผลของสารพรีไบโอติกต่อการเจริญและการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติคในผลิตภัณฑ์นมหมัก
5. การผลิตน้ำนมหมักจากน้ำนมข้าวเม่าโดยเชื้อโพรไบโอติค
6. ผลของเชื้อโพรไบโอติคต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรค (pathogens) และ antagonistic activity ระหว่างเชื้อทั้ง 2 กลุ่ม

7. การจัดทำสถานภาพและพัฒนาโปรแกรมฐานข้อมูลด้านเทคโนโลยีการผลิตของอุตสาหกรรมอาหารในประเทศไทย
8. Survival of probiotic bacteria in commercial dairy products ณ University of Sharjah and Sharjah Food Control and Consultancy, United Arab Emirates ภายใต้โครงการแลกเปลี่ยนบุคลากรของสถาบันอุดมศึกษาไทยกับต่างประเทศ “University Mobility in Asia and the Pacific- UMAP Projects Scholarship 2004”
9. การศึกษาการป้องกันการติดเชื้อ *Campylobacter jejuni* ในไก่เนื้อ และการศึกษา probiotic bacteria เพื่อป้องกันการติดเชื้อในลำไส้ไก่
10. Methods used for isolation and identification of probiotic bacteria isolated from fermented Thai food ณ University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria ภายใต้โครงการแลกเปลี่ยน “The ASEA-UNINET Scientist Exchange Scholarship 2006”
11. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและการใช้ประโยชน์ของพืชบางชนิดในประเทศไทย
12. การทดสอบประสิทธิภาพและความปลอดภัยของสารทำความสะอาดจากสารสกัดผลไม้หมัก
13. การคัดเลือกตัวพาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาแบคทีเรียโพรไบโอติคโดยการทำแห้งแบบพ่นฝอย
14. การผลิตนมถั่วเหลืองผงเสริมแบคทีเรียโพรไบโอติค
15. ผลของสารพรีไบโอติคและโพรไบโอติคต่อการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ
16. การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติคในผักดองไทย
17. องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาของน้ำผึ้งดอกทานตะวันและการใช้สำหรับผลิตภัณฑ์ซินไบโอติค
18. The Inter-species Interaction of Lactic Acid Flora with *Staphylococcus aureus* in Traditional Thai Fermented Foods by Transcriptomic Analysis (ภายใต้โครงการวิจัยร่วมไทย-ฝรั่งเศส : Franco-Thai Cooperation Program in Higher Education and Research Year 2007-2008 ระหว่าง สกอ., มทส., มมส., French Gvt. (MENESR, MAE) , French Institutes (INSA: Toulouse, INSA: Rennes/ 2550-2551)
19. กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านไทยประเภทเนื้อต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus*
20. ผลของสารพรีไบโอติคที่สกัดจากเห็ดและพืชต่อการเจริญ การสร้างกรด และการผลิตสาร Shor Chain Fatty Acid ของเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติค
21. การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นเชื้อโพรไบโอติคจากน้ำนมเหลืองคน
22. Novel strategy development for biocontrol of Staphylococcus aureus by non-antibiotics in food products (ภายใต้โครงการวิจัยร่วมไทย-ฝรั่งเศส : Franco-Thai Cooperation Program in Higher Education and Research Year 2009-2010 ระหว่าง สกอ., มทส., มมส., French Gvt. (MENESR, MAE) , French Institutes (INSA: Toulouse, INSA: Rennes/ 2552-2553)

23. Realisation of a Thai-French Master Degree and Continuing Education in Industrial Biotechnology (แหล่งทุน European Union/2552-2553)
24. การยับยั้งเชื้อราและการลดสารอะฟลาทอกซินโดยแลคติคแอซิดแบคทีเรีย
25. Potential of lactic acid bacteria as biopreservatives and biocontrols for mycotoxin decontamination in food chain production (ภายใต้โครงการวิจัยร่วมไทย-ฝรั่งเศส : Franco-Thai Cooperation Program in Higher Education and Research Year 2011-2012 ระหว่าง สกอ., มมส., มข., French Gvt. (MENESR, MAE) , French Institutes (ENSAT: Toulouse, Université Paul Cézanne-Marseille/ 2554-2555)

ผลงานตีพิมพ์

1. Expert members of the International Dairy Federation (IDF) : Action Team on Inventory of Micro-organisms used in dairy and food products / IDF Action Team "Properties of cultures used in Dairy Products" working with an expert team from France, United Kingdom, Ireland, Finland, Germany, Denmark, Australia and Singapore (2005-present)
2. Scientific Program Committee. The First International Conference on Natural Products for Health and Beauty. ที่โรงแรมตักศิลา มหาสารคาม ระหว่างวันที่ 17 – 21 ตุลาคม 2548
3. Co-chairman. The Symposium on “Cosmetics from Natural Products”, the first International Conference on Natural Products for Health and Beauty. ที่โรงแรมตักศิลา มหาสารคาม ระหว่างวันที่ 17 – 21 ตุลาคม 2548
4. Abstract Reviewer : Joint international conference of 8th International Symposium on Clinical Nutrition, International Union of Nutritional Science (8th ISCN-IUNS) and 5th Asia Pacific Clinical Nutrition Society (5th APCNS), Oct 2006, Hangzhou, China (2006)
5. Organising Committee. The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. ที่โรงแรมตักศิลา มหาสารคาม ระหว่างวันที่ 14 – 17 ตุลาคม 2551
6. Abstract Reviewer: The 20th Annual Meeting and International Conference of the Thai Society for Biotechnology. (2008).
7. Reviewer of the Scientific Journal “Journal of Food Science” : The Society for Food Science and Technology, Institute of Food Technologists, USA. (2008- present).
8. Reviewer of the Scientific Journal “Beneficial Microbs” : Wageningen Academic Publishers, the Netherlands. (2009- present).

9. ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์. (2540) การศึกษาผลของการเติมน้ำผลไม้บางชนิดต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus acidophilus*. *รายงานการวิจัย.* มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.
10. ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์. (2542) การศึกษาการใช้การถั่วเหลืองทดแทนถั่วเหลืองในกระบวนการหมักซีอิ้ว. *รายงานการวิจัย.* มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.
11. ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์. (2547) การผลิตน้ำนมหมักจากน้ำนมข้าวเม่าโดยเชื้อโพรไบโอติค. *รายงานการวิจัย.* มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.
12. ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์. (2548) ผลของสารพรีไบโอติคต่อการเจริญและการรอดชีวิตของเชื้อโพรไบโอติคในผลิตภัณฑ์นมหมัก. *รายงานการวิจัย.* มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, มหาสารคาม.
13. ไมตรี สุทธจิตต์, ศิริธร ศิริอมรพันธ์ และ ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์. (2548) แนวโน้มของการวิจัยและการพัฒนาอาหารไทยเพื่อสุขภาพ. *บรรยายพิเศษ*. การประชุมวิชาการ “เทคโนโลยีอาหารก้าวไกลนำไทยสู่ครัวโลก”, ศูนย์ประชุมไบเทค บางนา,กรุงเทพมหานคร.
14. โศภิษฐ์ เวทยสุภรณ์ และปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์. (2548) จุลินทรีย์ EM (Effective Microorganisms) เพื่อการเกษตรธรรมชาติ. *วารสารแก่นเกษตร*. 3 : 175-178.
15. Itsaranuwat, P. and Yamasato, K. (2000) Taxonomic Study of Lactic Acid Bacteria from Marine Sources. *A report*. Scientific Exchange Program (NRCT – JSPS).
16. Itsaranuwat, P. and Robinson, R.K. (2001) The Growth and Acid Production of Probiotic Bacteria in Soy Yoghurt. *Poster presentation*. The fifth annual Danone Symposium on “International Nutrition Conference to Focus on Fermented Foods and Healthy Digestive Functions”, Mexico City, Mexico.
17. Robinson, R.K. and Itsaranuwat, P. (2002) The Microbiology of concentrated and dried milk. In *“Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products”.* 3rd Edition. Robinson, R.K. (Editor), John Wiley and Sons, Inc., New York. Pp 175-211.
18. Itsaranuwat, P. and Robinson, R.K. (2002) Rheological Properties of Soy Yoghurt. *Abstract*. Foss Prize for Dairy Science.
19. Itsaranuwat, P. (2003) Aspects of the Fermentation of Soy Milk. *PhD. Thesis*, The University of Reading, Reading, United Kingdom. 227 pages.
20. Itsaranuwat, P. and Robinson, R.K. (2003) Production and use of dairy products in Thailand. *International Journal of Dairy Technology*. 56 (1): 6-11.
21. Itsaranuwat, P., Al-Haddad, K. S. H. and Robinson, R.K. (2003) The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: a brief update. *International Journal of Dairy Technology*. 56 (4): 203-210.
22. Itsaranuwat, P. and Robinson, R.K. (2005) The Rheological and sensory properties of some soya yoghurt. *Journal of Food Technology.* 3 (1): 01-09.

23. Itsaranuwat, P. (2005) Growth and survival of *Lactobacillus acidophilus* in milk containing cereal powders*. Poster presentation*. The eighth Symposium on Lactic Acid Bacteria. Egmond aan Zee, The Netherlands.
24. Itsaranuwat, P. (2005) Application of probiotic bacteria in cereal products*. Invited speaker*. The first International Conference on Natural Products for Health and Beauty. Mahasarakham, Thailand.
25. Itsaranuwat. P. (2005) Potential of combination between probiotics and some plants as prebiotics. Expert meeting. CSIRO – ILSI SEA Regional Collaboration Workshop on Gut Health, Singapore. December 10, 2005.
26. Itsaranuwat. P. (2005) Prebiotic in Thai medicinal plants and probiotics. The Meeting on Clinical Nutritions. Ministry of Industry and Fame Pharmaceuticals Co., Ltd., Yangon City, Myanmar. March 27-29, 2006.
27. Robinson, R. K. and Itsaranuwat, P. (2006) Properties of Yoghurt and their Appraisal. In "Fermented Milk". Tamime, A.Y. (Editor). Blackwell Publishing, Oxford, pp 76-94.
28. Itsaranuwat. P. (2007) *Invited Speaker.* Lactic Acid Bacteria : the Promising Cultures for Biobusiness and Better Quality of Life. Thai Society for Biotechnology 19th. Annual Meeting: Biotechnology for Gross National Happiness" 9-12 October. 2007, Thammasat University, Rangsit Center, Pathumthani, Thailand.
29. Itsaranuwat. P., Muadsee, P., Kongbuntud, W. and Kaensakoo, R. (2008) Effect of tuber plant extracts as potential prebiotics on Bifidobacterium lactis BL-04 and human cancer cell line : Hep G2 . *Poster presentation*. The ninth Symposium on Lactic Acid Bacteria. Egmond aan Zee, The Netherlands.
30. Itsaranuwat. P., Duangkhamchan, W. and Suttajit, M. (2008) Viability of Lactobacillus acidophilus LA-5 after spray-drying in different conditions. *Poster presentation*. The ninth Symposium on Lactic Acid Bacteria. Egmond aan Zee, The Netherlands.
31. Itsaranuwat, P. (2008) Recent development in the areas of prebiotics, probiotics and lactic acid bacteria. *Invited speaker*. the 2nd International Conference on Natural Products for Health and Beauty, Payao Thailand.
32. Chaiyawan, N., Taveeteptaikul. P., Wannisson, B., Ruengsomwong, S., Klungsupya, P., Buaban, W., and Itsaranuwat, P. (2009) Characterisation of spore-forming probiotic bacteria isolated from broiler chickens. *Poster presentation*. The 5th Asian Conference on Lactic Acid Bacteria: Microbes in Disease Prevention. Singapore.

33. Chaiyawan, N., Taveeteptaikul. P., Wannisson, B., Ruengsomwong, S., Klungsupya, P., Buaban, W., and Itsaranuwat, P. (2010) Characterization and probiotic properties of *Bacillus* strains isolated from broiler. The Thai Journal of Veterinary Medicine. 40(2); 9-14.

ทุน และรางวัลที่ได้รับ :

1. "The Royal Thai Government Scholarship" for MSc – PhD study (2000-2003).
2. "JSPS Scholarship: Scientific Exchange Program (NRCT-JSPS)" to conduct research at the Department of Fermentation Science, Tokyo University of Agriculture, Japan. (2000).
3. "The Arthur Hosier Award" from the University of Reading, U.K. (2001).
4. "FOSS Prize for Dairy Science" from the Society of Dairy Technology, U.K. (2002).
5. "The President's Fund" from the Society for Applied Microbiology, U.K. (2002).
6. "University Mobility in Asia and the Pacific- UMAP Projects Scholarship" for collaboration and conducting research in the topic : Survival of probiotic bacteria in commercial products at University of Sharjah and Sharjah Food Control and Consultancy, United Arab Emirates. (2004-2005).
7. "The Young Scientists Meeting Grant Award" from Federation of European Microbiological Societies. (2005).
8. " The ASEA-UNINET Scientist Exchange Scholarship 2006" to conduct research in the topic : Methods used for isolation and identification of probiotic bacteria at University of Natural Resources and Applied Life Sciences, Vienna, Austria. (2006)
9. "Franco-Thai Cooperation Program in Higher Education and Research Year 2007-2008" from the Thai Government and French Government.
10. "ASEM-DUO Fellowship Programme 2008" to conduct research in the Institut National Polytechnique, Toulouse, France (2008).
11. "Franco-Thai Cooperation Program in Higher Education and Research Year 2009-2010" from the Thai Government and French Government.
12. "Invited Professor Fellowship 2009" the Institut National Polytechnique, Toulouse, France (2009).
13. "Invited Professor Fellowship 2010" the Institut National Polytechnique, Toulouse, France (2010).
14. "Franco-Thai Cooperation Program in Higher Education and Research Year 2011-2012" from the Thai Government and French Government.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Plate count agar (PCA)

Tryptone	5 กรัม
Yeast extract	2.5 กรัม
Dextrose	1 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ถ่ายใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร

Nutrient agar (NA)

Peptone	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม
Agar	15 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ถ่ายใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร

Nutrient broth (NB)

Peptone	5 กรัม
Yeast extract	3 กรัม

ละลายอาหารสำเร็จรูปต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับ pH ครั้งสุดท้าย 7.0 ± 0.2 ถ่ายใส่ขวด นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

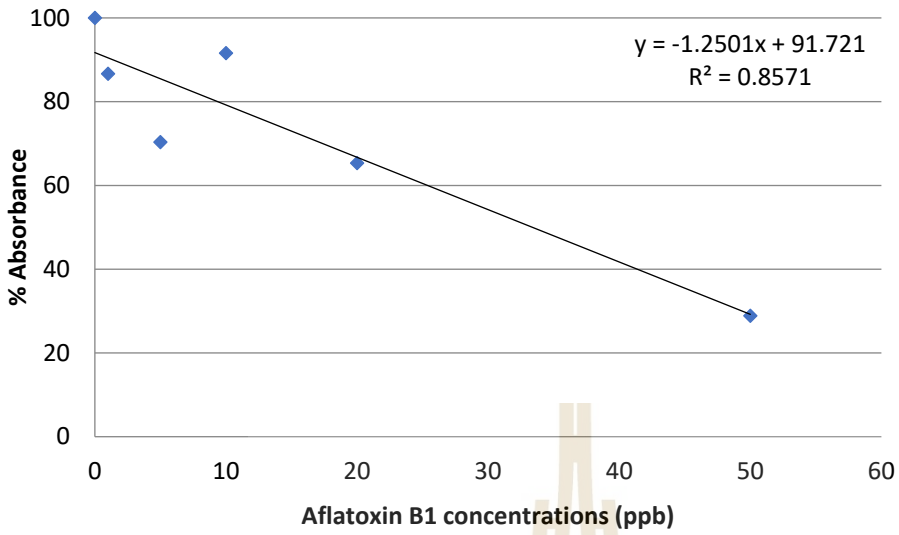
Mannitol egg yolk polymyxin agar (MYP)

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

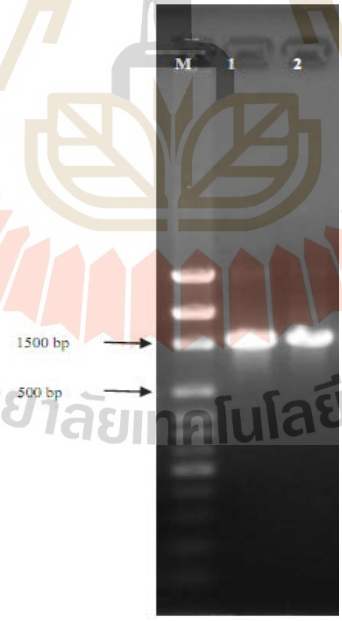
ละลายอาหารสำเร็จรูปต่อน้ำกลั่นต้มให้เดือด แบ่งใส่ขวดๆ ละ 225 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที เมื่อจะเท plate เติม 0.1% polymyxin B sulfate ขวดละ 2.5 มิลลิลิตร และเติม Egg yolk emulsion 12.5 มิลลิลิตรต่อขวด

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข



รูปที่ 1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของ Aflatoxin B1 ด้วยวิธีการตรวจสอบแบบ ELISA



รูปที่ 2 การตรวจสอบขนาด PCR product ที่ได้จากการใช้ primer 27F/1492R จากการเพิ่มจำนวนยีนตำแหน่ง 16S rRNA

หมายเหตุ Lane M คือ Marker ขนาด 100 bp Lane 1 คือกล้าเชื้อสด *B. subtilis* SB-MYP1 Lane 2 คือกล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ณ วันที่ 180 ที่อุณหภูมิ -25^{O}C

```
Query  1     TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGA  60
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  12    TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGA  71

Query  61    GCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG  120
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  72    GCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG  131

Query  121   ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTC  180
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  132   ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTC  191

Query  181   AAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT  240
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  192   AAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT  251

Query  241   GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  300
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  252   GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  311

Query  301   CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA  360
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  312   CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA  371

Query  361   ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAG  420
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  372   ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAG  431

Query  421   CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAA  480
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  432   CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAA  491

Query  481   CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  540
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  492   CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  551

Query  541   GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC  600
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  552   GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC  611

Query  601   CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT  660
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  612   CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT  671

Query  661   GGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC  720
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  672   GGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC  731

Query  721   GACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA  780
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  732   GACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA  791

Query  781   TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTT  840
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  792   TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTT  851

Query  841   AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT  900
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  852   AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT  911

Query  901   CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  960
             ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  912   CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  971
```

รูปที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อสด *B. subtilis* SB-MYP1

```
Query  961   CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTC  1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  972   CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTC  1031

Query  1021  GGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT  1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1032  GGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT  1091

Query  1081  AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAA  1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1092  AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAA  1151

Query  1141  GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT  1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1152  GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT  1211

Query  1201  ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGT  1260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1212  ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGT  1271

Query  1261  TAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA  1320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1272  TAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA  1331

Query  1321  AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  1380
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1332  AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  1391

Query  1381  TACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT  1440
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1392  TACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT  1451

Query  1441  TAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTC  1485
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1452  TAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTGAAGTC  1496
```

รูปที่ 4 ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อสด *B. subtilis* SB-MYP1 (ต่อ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

```
Query  1    TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  12   TGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAGCGGACAGATGGGA  71

Query  61   GCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  72   GCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTGTAAG  131

Query  121  ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  132  ACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTGAACCGCATGGTTC  191

Query  181  AAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  192  AAACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATTAGCTAGTT  251

Query  241  GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  252  GGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCAACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCA  311

Query  301  CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  312  CACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCA  371

Query  361  ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  372  ATGGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAG  431

Query  421  CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  432  CTCTGTTGTTAGGGAAGAACAAGTACCGTTCGAATAGGGCGGTACCTTGACGGTACCTAA  491

Query  481  CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  492  CCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTT  551

Query  541  GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  552  GTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCC  611

Query  601  CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  612  CCCGGCTCAACCGGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGT  671

Query  661  GGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC  720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  672  GGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGC  731

Query  721  GACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA  780
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  732  GACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGA  791

Query  781  TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTT  840
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  792  TACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTT  851

Query  841  AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT  900
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  852  AGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACT  911

Query  901  CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  960
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  912  CAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACG  971
```

รูปที่ 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB- MYP1 ณ วันที่ 180 ของการเก็บรักษา

```
Query  961   CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTC  1020
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  972   CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGTCCCCTTC  1031

Query  1021  GGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT  1080
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1032  GGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTT  1091

Query  1081  AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAA  1140
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1092  AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAA  1151

Query  1141  GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT  1200
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1152  GGTGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTT  1211

Query  1201  ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGT  1260
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1212  ATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGT  1271

Query  1261  TAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA  1320
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1272  TAAGCCAATCCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGA  1331

Query  1321  AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  1380
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1332  AGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTG  1391

Query  1381  TACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT  1440
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1392  TACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTT  1451

Query  1441  TAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTG  1480
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1452  TAGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGATGATTGGGGTG  1491
```

รูปที่ 6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ช่วงยีน 16S rRNA บางส่วน (partial sequence) ของกล้าเชื้อผง *B. subtilis* SB-MYP1 ณ วันที่ 180 ของการเก็บรักษา (ต่อ)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี