โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การผลิตเซลล์จุลินทรีย์ที่สร้างรงควัตถุด้วยน้ำทิ้งในอุตสาหกรรมอาหาร ที่มีส่วนประกอบของเกลือ เพื่อใช้ในการผลิตสารสีจากธรรมชาติ
(Production of microbial pigment from food wastewater containing salt for use as natural coloring agent in food)

ชื่อนิสิต นางสาว กัญญภา กิจสิริรัตนกุล
นางสาว ณัฏฐนิตา เผ่าศรีเจริญ
นาย ยุทธพงศ์ อีมเอิบ

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
ปีการศึกษา 2563

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตเซลล์จุลินทรีย์ที่สร้างรงควัตถุด้วยน้ำทิ้งในอุตสาหกรรมอาหาร ที่มีส่วนประกอบของเกลือ เพื่อใช้ในการผลิตสารสีจากธรรมชาติ

โดย

นางสาว กัญญภา กิจสิริรัตนกุล

นางสาว ณัฏฐนิตา เผ่าศรีเจริญ

นาย ยุทธพงศ์ อิ่มเอิบ

อาจารย์ที่ปรึกษา

รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ประจำปีการศึกษา 2563

Production of microbial pigment from food wastewater containing salt for use as natural coloring agent in food

Kanyapa Kitsiriratthanakul
Natthanita Phaosricharoen
Yuttapong Imerb

Project Advisor

Assoc. Prof. Cheunjit Prakitchaiwattana , Ph.D.

A Report Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
For the Degree of Bachelor of Science Program in Food Technology
Department of Food Technology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2020

หัวข้องานวิจัย การผลิตเซลล์จุลินทรีย์ที่สร้างรงควัตถุด้วยน้ำทิ้งในอุตสาหกรรมอาหาร
ที่มีส่วนประกอบของเกลือ เพื่อใช้ในการผลิตสารสีจากธรรมชาติ

โดย นางสาวณัฏฐนิตา เผ่าศรีเจริญ
นางสาวกัญญภา กิจสิริรัตนกุล
นายยุทธพงศ์ อิ่มเอิบ

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

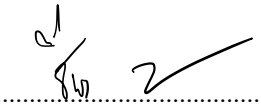
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา

ปีการศึกษา 2563

ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
อนุมัติให้รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
ประจำปีการศึกษา 2563

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา ธนานุวงศ์)
หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร



.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

หัวข้องานวิจัย การผลิตเซลล์จุลินทรีย์ที่สร้างรงควัตถุด้วยน้ำทิ้งในอุตสาหกรรมอาหารที่มีส่วนประกอบของเกลือเพื่อใช้ในการผลิตสารสีจากธรรมชาติ

โดย นางสาว ณัฏฐนิตา เผ่าศรีเจริญ
นางสาว กัญญภา กิจสิริรัตนกุล
นาย ยุทธพงศ์ อิ่มเอิบ
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา
ปีการศึกษา 2563

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ที่ผลิตรงควัตถุสีชมพู โดยประเมินปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญและการสร้างรงควัตถุ ได้แก่ ค่า pH และความเข้มข้นเกลือ เพื่อใช้ในการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ เพาะเลี้ยง *Salinicoccus* sp. ในอาหารเหลวโดยการเขย่าด้วย Orbital Shaker 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ติดตามการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุสีชมพู ในระหว่างการเพาะเลี้ยงที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี UV-visible spectrophotometric ที่ OD_{600} และ OD_{509} ตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียใน NB ที่ปรับ pH เป็น 6, 7, 8 และ 9 พบว่า OD_{600} และ OD_{509} มีค่าสูงสุดที่ pH 8 ($p<0.05$) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อใน NB ที่ pH 8 และแปรระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 3, 5 และ 10% (w/v) พบว่า OD_{600} และ OD_{509} มีค่าสูงสุดที่ความเข้มข้น 10% (w/v) ($p<0.05$) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหาร ได้แก่ สูตรที่ 1; 1% peptone water และปรับความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจนให้เป็น 0.4% ด้วยน้ำปลา, สูตรที่ 2; 1% peptone water และปรับความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจนให้เป็น 0.4% ด้วยซีอิ๊ว, สูตรที่ 3; น้ำปลาเจือจาง 0.4% ไนโตรเจน และสูตรที่ 4; ซีอิ๊วเจือจาง 0.4% ไนโตรเจน โดยทั้ง 4 สูตรแปรการเติมกลูโคส 1% และไม่เติมกลูโคส และทุกสูตรปรับ pH เท่ากับ 8 และปรับค่าความเข้มข้นเกลือสุดท้ายให้เป็น 10% (w/v) พบว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรที่ 2 ที่ไม่เติมกลูโคส *Salinicoccus* sp. สามารถเพิ่มจำนวนและผลิตรงควัตถุสีชมพูได้เท่ากับสูตรควบคุม (NB, pH8 และ NaCl 10% (w/v)) ($p<0.05$) และพบว่าการเพาะเลี้ยง *Salinicoccus* sp. ในอาหารทุกสูตรที่เติมกลูโคส *Salinicoccus* sp. จะเพิ่มจำนวนเซลล์และสร้างปริมาณรงควัตถุต่ำกว่าสูตรที่ไม่ได้เติมกลูโคส 1% (w/v) อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

Project Title	Production of microbial pigment from food wastewater containing salt for use as natural coloring agent in food
Student	Kanyapa Kitsiriratthanakul Natthanita Phaosricharoen Yuttapong Imerb
Student Program	Bachelor of Science in Food Technology
Advisor	Assoc. Prof. Cheunjit Prakitchaiwattana , Ph.D.
Academic Year	2020

ABSTRACT

The objective of this research was to develop a cultural medium for cultivation of *Salinicoccus* sp. to produce pink pigment. Factors associated to growth and pigmentation rates including pH and salt concentration were investigated for development of the cost-effective cultivation medium. *Salinicoccus* sp. was cultivated in standard medium (NB), orbitally shaken 150 rpm at room temperature 30 ± 2 ° C, for 72 hours. Cell population and pink pigment content were determined at 0, 24, 48, and 72 hours by conduction of Total Plate Count (TPC) and UV-visible spectrophotometric methods at OD_{600} and OD_{509}, respectively. When cultivated in NB with pH 6, 7, 8 and 9, the OD_{600} and OD_{509} of *Salinicoccus* sp. were highest at pH 8 ($p<0.05$). In NB with pH 8, supplemented with NaCl at 3, 5, and 10% (w/v), the OD_{600} and OD_{509} of *Salinicoccus* sp. were highest at the 10%. *Salinicoccus* sp. was cultivated in four cost-effective cultivation medium formulated from 1% peptone water and adjust the final nitrogen concentration to 0.4% with fish sauce as Formula 1; 1% peptone water and adjust the final nitrogen concentration to 0.4% with soy sauce as Formula 2, Fish sauce, diluted 0.4% nitrogen as Formula 3 and Soy sauce, diluted 0.4% nitrogen as Formula 4. All formulas were adjusted pH at 8, supplemented with 10% salt (w/v) and 1% glucose and no glucose. Formula 2 which was not added glucose, *Salinicoccus* sp., was able to grow and produce of pink pigment content similar to the control formula (NB, pH8 and NaCl 10% (w /v)) ($p<0.05$). All formulas which were added glucose, *Salinicoccus* sp. has growth and pigmentation rates significantly lower than all formulas which were not added glucose ($p<0.05$).

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากรองศาสตราจารย์ ดร. ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัยที่ได้ให้คำเสนอแนะ แนวคิด ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ มาโดยตลอด จนงานวิจัยนี้เสร็จสมบูรณ์ ผู้ทำงานวิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และผู้ปกครอง ที่ให้คำปรึกษาและความช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ รวมทั้งเป็นกำลังใจที่ดีเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และข้อเสนอแนะต่างๆ มาโดยตลอด

ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือตลอดเวลา รวมทั้งสละเวลาสอนใช้เครื่องมือปฏิบัติการต่างๆ

ขอบคุณพี่ปริญญาโทที่สละเวลาให้คำแนะนำ และความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยเป็นที่ปรึกษา และให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ เกี่ยวกับงานวิจัยนี้

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

หน้า

บทที่ 1 บทนำ **1**

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา 1

1.2 วัตถุประสงค์ 1

1.3 ขอบเขต/กรอบแนวคิดของการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง **3**

2.1 สีธรรมชาติในการผลิตอาหาร 3

2.2 สีธรรมชาติที่ผลิตจากจุลินทรีย์ 3

2.3 การผลิตรงควัตถุจากจุลินทรีย์ 3

2.4 แคโรทีนอยด์ 4

2.5 *Salinicoccus* sp. 4

2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. 5

2.6.1 ปัจจัยทางกายภาพและเคมี 5

2.6.1.1 ออกซิเจน 5

2.6.1.2 อุณหภูมิ 5

2.6.1.3 ความเป็นกรด-เบส 5

2.6.1.4 สารอาหาร 5

2.6.1.5 ความเข้มข้นเกลือ 6

2.7 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับของเสียจากโรงงานน้ำปลาและซีอิ๊ว 6

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย **7**

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี 7

3.1.1 วัสดุ 7

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ 7

3.1.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย 7

3.1.4 จุลินทรีย์ 8

3.2 วิธีการทดลอง 8

3.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและค่าความขุ่น 8

3.2.2 การประเมินปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญและการสร้างรงควัตถุ 8
3.2.2.1 ประเมินผลของ pH 8
3.2.2.2 ประเมินผลของความเข้มข้นเกลือ 8
3.2.2.3 ประเมินผลของสูตรอาหาร 9
3.2.2.4 ประเมินผลของน้ำตาลกลูโคส 9
3.2.2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ 10
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง **11**
4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและค่าความขุ่นของ Salinicoccus sp. 11
4.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญและการสร้างรงควัตถุ 13
4.2.1 การประเมินสภาวะ pH ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ 13
4.2.2 การประเมินความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ 16
4.2.3 การประเมินสูตรอาหารต้นทุนต่ำที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ 18
4.2.4 ผลของน้ำตาลกลูโคส 1% ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ 22
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย **25**
5.1 การประเมินปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญและการสร้างรงควัตถุ 25
5.2 ข้อเสนอแนะ 25
บรรณานุกรม **26**
ภาคผนวก **28**
ประวัติผู้วิจัย **38**

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบสูตรอาหารต้นทุนต่ำ 19
ตารางที่ 4.2 ส่วนประกอบโดยประมาณ 19
ตารางที่ 4.3 ปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นในซี๊วและน้ำปลา 22

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 4.1 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน pH 6 เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Total plate count) 11

รูปที่ 4.2 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน pH 6 เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{600}) 12

รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log CFU/ml กับ Log OD_{600} ของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน pH 6 เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง 12

รูปที่ 4.4 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน ที่แปรระดับ pH 6, 7, 8 และ 9 ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Total plate count) 14

รูปที่ 4.5 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน ที่แปรระดับ pH 6, 7, 8 และ 9 ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{600}) 15

รูปที่ 4.6 การสร้างรงควัตถุของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน ที่แปรระดับ pH 6, 7, 8 และ 9 โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (OD_{509}) 15

รูปที่ 4.7 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน โดยแปรระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3%, 5%, 10% (w/v) และตัวอย่างควบคุม เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Total plate count) 17

รูปที่ 4.8 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน โดยแปรระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3%, 5%, 10% (w/v) และตัวอย่างควบคุม เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{600}) 17

รูปที่ 4.9 การสร้างรงควัตถุของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน โดยแปรระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3%, 5%, 10% (w/v) และตัวอย่างควบคุม เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{509}) 18

รูปที่ 4.10 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารต้นทุนต่ำและตัวอย่างควบคุม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) pH 8 เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Total plate count) 21

รูปที่ 4.11 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารต้นทุนต่ำและตัวอย่างควบคุม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) pH 8 เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{600}) 21

รูปที่ 4.12 การสร้างรงควัตถุของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารต้นทุนต่ำและตัวอย่างควบคุม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) pH 8 เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{509}) 22

รูปที่ 4.13 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารต้นทุนต่ำและตัวอย่างควบคุม ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% และไม่เติม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) pH 8 เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{600}) 23

รูปที่ 4.14 การสร้างรงควัตถุของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารต้นทุนต่ำและตัวควบคุมที่เติม น้ำตาลกลูโคส 1% และไม่เติม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) pH 8 เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{509}) 24

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

สีผสมอาหารเป็นวัตถุเจือปนในผลิตภัณฑ์อาหาร มีบทบาทสำคัญในการรับรู้ทางประสาทสัมผัสและการยอมรับผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค ในปัจจุบันตลาดระดับนานาชาติมีการผลิตสีผสมอาหารเพิ่มขึ้นทุกปี โดยแบ่งสีผสมอาหารได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ สีสังเคราะห์และสีตามธรรมชาติ

ในการผลิตสีผสมอาหารผู้ผลิตต้องคำนึงถึงความปลอดภัยของผู้บริโภคและบรรจุภัณฑ์ ไม่ก่อให้เกิดอันตราย ไม่ส่งผลกระทบต่อคุณค่าทางอาหารและบรรจุภัณฑ์ มีความคงตัวในอาหาร เติมในผลิตภัณฑ์อาหารได้ง่ายและมีราคาที่เหมาะสม ซึ่งสารสีที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีอาจเป็นอันตรายและส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นผู้บริโภคจึงให้ความสำคัญกับการเลือกสีผสมอาหารที่มาจากธรรมชาติมากยิ่งขึ้น

สีผสมอาหารจากธรรมชาติสามารถช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลิตภัณฑ์อาหาร มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เนื่องจากสารสีที่มาจากธรรมชาติไม่เป็นพิษ ไม่มีสารก่อมะเร็ง สามารถย่อยสลายได้ในธรรมชาติ อีกทั้งยังมีคุณสมบัติด้านการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการเจริญของจุลินทรีย์ เป็นต้น สีธรรมชาติมีแหล่งที่มาจากพืช สัตว์และจุลินทรีย์ ซึ่งสีผสมอาหารที่ได้จากจุลินทรีย์มีข้อดีหลายประการ เนื่องจากจุลินทรีย์มีความหลากหลายทางสายพันธุ์ สร้างรงควัตถุและเฉดสีได้หลากหลายชนิด เพาะเลี้ยงได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อย ใช้ช่วงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้น สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงได้ ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ผลิตสารสี เช่น *Salinicoccus* sp. แบคทีเรียแกรมบวกที่ชอบเกลือระดับปานกลาง ต้องการอากาศอย่างเพียงพอในการเจริญเติบโต ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีระยะการสร้างสปอร์ และผลิตรงควัตถุสีชมพูที่มีส่วนประกอบของแคโรทีนอยด์เป็นหลัก ที่สำคัญคือสามารถใช้น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมที่มีเกลือเป็นส่วนประกอบ เช่น น้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมน้ำปลาและซีอิ๊วมาเป็นแหล่งอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียได้ ทำให้มีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำ ถือเป็นทางเลือกในการเพิ่มมูลค่าให้กับของเสียที่เหลือทิ้งเหล่านั้นด้วย ดังนั้น การผลิตสารสีจากจุลินทรีย์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp.
2. เพื่อพัฒนาสูตรอาหารต้นทุนต่ำจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมน้ำปลาและซีอิ๊วที่มีส่วนประกอบของเกลือใช้สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้สี

1.3 ขอบเขต/กรอบแนวคิดของการวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาตามวัตถุประสงค์ข้างต้น แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ตอน ได้แก่ ตอนที่ 1 ศึกษาอัตราการเจริญของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน ระยะเวลา 72 ชั่วโมง ติดตามการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometric และ Total Plate Count เพื่อสร้าง Growth curve ของ *Salinicoccus* sp. ตอนที่ 2 พัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Salinicoccus* sp. จากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมน้ำปลาและซีอิ๊ว โดยกำหนดตัวแปรต้นคือ ค่ากรด-เบส ความเข้มข้นเกลือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและกลูโคส ตัวแปรควบคุมคือความเร็วการเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker อุณหภูมิและระยะเวลาการเพาะเลี้ยงเชื้อ ติดตามการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometric และ Total Plate Count จากนั้นนำไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรียให้สีในระดับปริมาณสูง
2. ได้สูตรอาหารต้นทุนต่ำที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ให้สีที่สามารถสร้างรงควัตถุในปริมาณสูง
3. สามารถเข้าใจขั้นตอนวิเคราะห์ปริมาณของรงควัตถุด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometric เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อในระดับอุตสาหกรรมอาหาร

บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สีธรรมชาติในการผลิตอาหาร

สีธรรมชาติ คือสีจากวัตถุดิบจากแหล่งธรรมชาติ เช่น พืช สัตว์และแร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น ซึ่งมาจากกระบวนการทางธรรมชาติ โดยมนุษย์ได้นำสีจากวัสดุธรรมชาติมาประยุกต์ใช้ในกิจกรรมต่างๆตามวิถีการดำรงชีวิตและมีการพัฒนาเพื่อใช้เป็นสีในการประกอบอาหารและขนมมาจนถึงปัจจุบัน (เมืองแมน และคณะ, 2558)

สารสีธรรมชาติส่วนมากจะสังเคราะห์ได้จากพืชและจุลินทรีย์ แต่สารสีในพืชมีข้อจำกัดหลายๆด้านจึงทำให้สารสีจากจุลินทรีย์เป็นแหล่งที่มีความน่าสนใจกว่า เพราะสารสีจากจุลินทรีย์เป็นสารสีที่สกัดง่ายและให้ปริมาณสารสีที่สูง รวมทั้งยังมีความคงตัวของสารสีที่อุณหภูมิสูงได้ดี โดยพบว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มของแบคทีเรียและเชื้อราสามารถผลิตสารสีได้ (กันทาสุวรรณ์, 2555)

2.2 สีธรรมชาติที่ผลิตจากจุลินทรีย์

จุลินทรีย์หลายชนิดสามารถสร้างรงควัตถุที่มีความปลอดภัยและนำมาประยุกต์ใช้เป็นสีผสมอาหารได้ ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดสามารถสร้างรงควัตถุที่มีประโยชน์ต่อร่างกายหรือเซลล์ของจุลินทรีย์ เช่น สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว ขยายพันธุ์ได้ดี มีอัตราการผลิตรงควัตถุได้สูง ได้ผลผลิตที่มีความสม่ำเสมอและไม่ให้ผลพลอยได้ที่ไม่ต้องการในกระบวนการผลิต จุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารสีคือ จุลินทรีย์ที่สามารถใช้วัตถุดิบหาง่าย มีราคาถูกในการเพาะเลี้ยง มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี สามารถหาช่วงของ pH และอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญเติบโตได้ง่าย มีลักษณะทางด้านพันธุกรรมที่คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงง่าย ควรเป็นเชื้อที่เลี้ยงง่าย ตายยาก สามารถเก็บได้นาน ไม่ก่อโรคในคนและไม่สร้างสารพิษให้กับผลิตภัณฑ์หรือรงควัตถุที่ต้องการเป็นต้น(เอียดมุสิก และคณะ, 2557)

2.3 การผลิตรงควัตถุจากจุลินทรีย์

การผลิตรงควัตถุจากจุลินทรีย์มักประยุกต์ใช้วิธีการทางเทคโนโลยีชีวภาพ เช่น การหมัก เป็นต้น ซึ่งต้องพิจารณาถึงการยอมรับในท้องตลาด ความปลอดภัยของผู้บริโภค การอนุมัติตามกฎระเบียบและต้นทุนการผลิต รงควัตถุหรือสารสีที่ผลิตโดยจุลินทรีย์มีศักยภาพในการใช้งาน การใช้จุลินทรีย์และเทคโนโลยีชีวภาพสามารถช่วยแก้ปัญหาในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะอุตสาหกรรมสีผสมอาหาร การผลิตสารแต่งสีโดยการหมักมีประโยชน์หลายประการ ได้แก่ ต้นทุนการผลิตที่ต่ำกว่า วัตถุดิบที่หาได้ง่าย ได้ผลผลิตสูงและไม่มีการเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล ในส่วนของการผลิตรงควัตถุจากจุลินทรีย์เริ่มจากการคัดเลือกและการพัฒนาสายพันธุ์ที่นำมาใช้ การพัฒนาสายพันธุ์ทำได้โดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบสุ่มและคัดเลือกหลายรอบ เนื่องจากปริมาณรงควัตถุที่เกิดจากสายพันธุ์ธรรมชาติมีปริมาณรงควัตถุต่ำเกินไปและใช้ระยะเวลาในการหมักนานจึงต้องแยกสายพันธุ์ที่ผลิตรงควัตถุได้ปริมาณสูงและมีระยะเวลาการหมักสั้นลง โดยทำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น รังสี

Ultraviolet (UV), Ethyl methane sulfonate (EMS) และ 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine (NTG) เป็นต้น นอกจากนั้นยังมีการใช้วิธี X-ray and fast neutron of irradiations ในการพัฒนาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ จากนั้นเข้าสู่กระบวนการหมัก ซึ่งเป็นกระบวนการที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรด ก๊าซ หรือแอลกอฮอล์ มักเกิดขึ้นในยีสต์และแบคทีเรียและสุดท้ายนำไปสู่การแยกและการสกัดสีรงควัตถุ การผลิตรงควัตถุจากจุลินทรีย์โดยการหมักยังคงต้องคำนึงถึง Low-cost substrates ผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมเกษตรหรือของเสียที่มักสร้างปัญหาสิ่งแวดล้อมเป็นสารก่อมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมและการบำบัดนั้นมีค่าใช้จ่ายสูง จึงสามารถเปลี่ยนของเสียเหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่ม โดยประยุกต์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ไม่แพงสำหรับการหมักของจุลินทรีย์และมีศักยภาพในการผลิตรงควัตถุที่แตกต่างกันโดยจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ เช่น การสังเคราะห์เบต้าแคโรทีนโดยผลิตภัณฑ์จากส้ม การผลิตแคโรทีนอยด์โดยใช้เวย์อัลตราฟิลเทรต เป็นต้น (Tarangini, 2014)

2.4 แคโรทีนอยด์

แคโรทีนอยด์พบได้ตามธรรมชาติในแบคทีเรีย เชื้อรา และสาหร่ายขนาดเล็ก โดยมีช่วงสีธรรมชาติตั้งแต่แต่สีเหลืองจนถึงสีแดง (Perez-Fons et al., 2011) เป็นกลุ่มของสารสีประเภท tetraterpenoids ในธรรมชาติมีบทบาทในระบบดูดกลืนพลังงานแสงในคลอโรพลาสต์ (Koley et al., 2018) และส่งผ่านพลังงานแสงให้คลอโรฟิลล์สำหรับใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ด้วยแสง (Taiz et al., 2015) และการป้องกันอันตรายจากแสงแดด (Sun et al., 2018) จึงได้เรียกแคโรทีนอยด์ว่าเป็น “สารสีเสริม”(Taiz et al., 2015) รวมทั้งเป็นสารตั้งต้นสำหรับชีวสังเคราะห์ฮอร์โมนพืชทั้งกรดแอบไซซิกและสไตรโกแลคโตนทำหน้าที่เป็นโมเลกุลส่งสัญญาณเพื่อเป็นสื่อกลางการเจริญของพืชและตอบสนองต่อปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม (Sun et al., 2018) สามารถพบแคโรทีนอยด์ตามส่วนต่างๆของพืช ได้แก่ ใบ ลำต้น ดอก และผล โดยปรากฏเป็นสีที่แตกต่างกัน ซึ่งแคโรทีนอยด์จัดแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือ แคโรทีน ได้แก่ เบต้าแคโรทีน (β-carotene) แอลฟาแคโรทีน (α-carotene) และไลโคปีน (lycopene) และอีกกลุ่มหนึ่งคือ แซนโทฟิลล์ (xanthophylls) ได้แก่ นีโอแซนทิน (neoxanthin) ไวโอลาแซนทิน (violaxanthin) ฟลาโวแซนทิน (flavoxanthin) เบต้าและแอลฟาคริปโทแซนทิน (β-and α-cryptoxanthin) (Koley et al., 2018)

2.5 *Salinicoccus* sp.

แบคทีเรียมีเซลล์รูปร่างกลม ย้อมติดสีแกรมบวก ขนาดของเซลล์ประมาณ 0.6-0.8 µm ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ โคโลนีเจริญบนอาหารวุ้นมีลักษณะกลม มีสีส้ม ขอบเรียบ ยกสูง เจริญได้ในอาหารที่มี NaCl 10% (Moderate Halophillic Bacteria) เจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียส และ pH 6-9 (ธนาศุภวัฒน์, 2550)

2.6 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp.

2.6.1 ปัจจัยทางกายภาพและเคมี

2.6.1.1 ออกซิเจน

แบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. เป็นแบคทีเรียประเภท Obligate aerobes ใช้ O_2 ในการเจริญเติบโตและการสร้างรงควัตถุ รวมทั้งสารสำคัญอื่นๆในเซลล์ โดยใช้ O_2 เป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในการหายใจแบบแอโรบิค การเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นที่จะต้องทำให้เกิดการเขย่า เพื่อให้ O_2 สามารถเข้าถึงเซลล์ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างทั่วถึง (ภัทรกุลวณิชย์, 2562)

2.6.1.2 อุณหภูมิ

แบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. เจริญได้ที่อุณหภูมิ 15-45 องศาเซลเซียสและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส การเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นที่จะต้องปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ตลอดการวิจัย เพื่อลดความเคลื่อนที่อาจจะเกิดขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการ (ธนาศุภวัฒน์, 2550)

2.6.1.3 ความเป็นกรด-เบส

แบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. เจริญได้ที่ pH 6-9 การเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นที่จะต้องปรับ pH ให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากค่า pH อาจมีผลต่อกระบวนการต่างๆที่สำคัญในเซลล์ เช่น การทำงานของเอนไซม์ การส่งผ่านสารที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น ซึ่งก่อให้เกิดการสูญเสียสภาพของโปรตีนและเอนไซม์ (ธนาศุภวัฒน์, 2550)

2.6.1.4 สารอาหาร

สารอาหารอย่างเช่น แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรีย เพื่อนำมาสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบของเซลล์และใช้เป็นแหล่งพลังงาน โดยแหล่งคาร์บอนอาจได้มาจาก CO_2 และสารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำตาลกลูโคส เป็นต้น ส่วนแหล่งไนโตรเจนอาจมาจากไนโตรเจนที่อยู่ในรูปออกซิไดซ์หรือรีดิวซ์ นอกจากนั้น Growth factor ยังเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตในแบคทีเรียบางชนิด เช่น

Amino acid ใช้สังเคราะห์โปรตีน Nitrogenous base ใช้สังเคราะห์ Nucleic acid และ Vitamin ทำหน้าที่เป็น Active center ของเอนไซม์บางชนิด เป็นต้น (ธนาศุภวัฒน์, 2550)

2.6.1.5 ความเข้มข้นเกลือ

แบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. เป็น Moderate Halophillic Bacteria สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ 3-15% การเพาะเลี้ยงในระดับห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นที่จะต้องปรับความเข้มเกลือให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย (ธนาศุภวัฒน์, 2550)

2.7 การประยุกต์ใช้จุลินทรีย์เพื่อเพิ่มมูลค่าให้กับของเสียจากโรงงานน้ำปลาและซีอิ๊ว

ปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพการหมักสำหรับการผลิตสีผสมอาหารจากแหล่งธรรมชาติ เช่น จุลินทรีย์ เป็นต้น ในโรงงานอุตสาหกรรมน้ำปลาและซีอิ๊ว เมื่อกระบวนการผลิตได้เสร็จสิ้นลงและได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการมักมีการปล่อยน้ำทิ้งเพื่อรอการบำบัดก่อนปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมดังกล่าวมักประกอบไปด้วยผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตและสารอาหารที่ยังคงเหลืออยู่ เช่น แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน เกลือ เป็นต้น ซึ่งเหมาะแก่การเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางประเภท ในการเพาะเลี้ยง *Salinicoccus* sp. (82-1) พบว่าการจำลองน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมน้ำปลาและซีอิ๊วโดยสูตรอาหารเปปโตน 1% (w/v) ผสมกับซีอิ๊ว 1% (v/v) แล้วปรับความเข้มข้นเกลือสุดท้ายเป็น 3% (w/v) ช่วยเพิ่มปริมาณการสร้างรงควัตถุและพบว่าปริมาณไลโคปีนและลูทีน เพิ่มขึ้น 6 เท่าเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรมาตรฐาน (วิจิตรา, 2561) การประยุกต์ใช้ของเสียหรือน้ำทิ้งจากโรงงานน้ำปลาและซีอิ๊วเพื่อเป็นอาหารต้นทุนต่ำให้กับแบคทีเรียทนเค็มมีกระบวนการผลิตที่ไม่ยุ่งยากและใช้ระยะเวลาในการผลิตไม่นาน จึงเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับของเสียจากโรงงานน้ำปลาและซีอิ๊ว เนื่องจากเป็นการนำของเสียที่ผ่านกระบวนการผลิตแล้วกลับนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์ (Siswa, 2013)

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

3.1.1 วัสดุ

3.1.1.1 น้ำปลาแท้ ตราหอยนางรม (ฉลากทอง)

3.1.1.2 ซีอิ๊วขาว ตราเด็กสมบูรณ์ (สูตร 1)

3.1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.1.2.1 Autoclave (SS-320 TOMY, Japan)

3.1.2.2 Colony counter (Suntex 560, China)

3.1.2.3 Hot air oven (Memmert, USA และ WTC binder 78532 Tuttlingen, Germany)

3.1.2.4 pH meter (Mettler Toledo, 204)

3.1.2.5 Micropipette P200 และ P1000 (Gilson, France)

3.1.2.6 Weight balance (Sartorius BP 310, Germany)

3.1.2.7 Shaker (New Brunswick Scientific, USA)

3.1.2.8 Spectophotometer (Spectronic 20 Genesys, USA และ V-350 PCY Jasco,Korea)

3.1.2.9 Vortex mixer (CTL, CTL-107, Germany)

3.1.1.10 Water bath (Memmert, USA)

3.1.1.11 Kjeldahl Nitrogen Analyzer (Foss, Denmark)

3.1.3 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในงานวิจัย

3.1.3.1 Absolute ethanol (C_2H_5OH) (Mallinckrodt, Mexico)	AR grade
3.1.3.2 D-glucose ($C_6H_{12}O_6$) (Merck, Germany)	AR grade
3.1.3.3 Sodium chloride (NaCl) (Merck, Germany)	AR grade
3.1.3.4 Sodium hydroxide (NaCl) (Merck, Germany)	AR grade
3.1.3.5 Peptone (Merck, Germany)	AR grade
3.1.3.6 Nutrient broth (Merck, Germany)	AR grade
3.1.3.7 Nutrient agar (Merck, Germany)	AR grade
3.1.3.8 Silver Nitrate ($AgNO_3$) (Merck, Germany)	AR grade
3.1.3.9 Sulfuric acid (H_2SO_4) (Merck, Germany)	AR grade

3.1.3.10 Potassium sulfate (K2SO4) (Merck, Germany) AR grade

3.1.3.11 Copper sulfate (CuSO4) (Merck, Germany) AR grade

3.1.4 จุลินทรีย์

3.1.4.1 *Salinicoccus* sp. (82-1)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและค่าความขุ่น

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp.ใน Erlenmeyer Flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (NB) ปริมาตร 150 ml. ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง สังเกตการการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (NA) ด้วยการเกลี่ยเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ด้วย UV-visible spectrophotometric ที่ OD_{600} ดังแสดงในภาคผนวก ก.1 โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.2.2 การประเมินปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญและการสร้างรงควัตถุ

3.2.2.1 ประเมินผลของ pH

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ใน Erlenmeyer Flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (NB) ปรับ pH 6, 7, 8 และ 9 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.2% (w/v) ปริมาตร 150 ml. เลี้ยงแบบเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker 150 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง ติดตามการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (NA) ด้วยการเกลี่ยเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ด้วย UV-visible spectrophotometric ที่ OD_{600} และ OD_{509} ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวก ก.1-2 โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.2.2.2 ประเมินผลของความเข้มข้นเกลือ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp.ใน Erlenmeyer Flask ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (NB) ปริมาตร 150 ml. ที่ปรับ pH ที่เลือกจากข้อ 3.2.2.1 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.2% (w/v) และแปรระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 3, 5 และ 10% (w/v) เลี้ยงแบบเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker 150 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง ติดตามการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (NA) ด้วยการเกลี่ยเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ด้วย UV-visible spectrophotometric ที่ OD_{600} และ OD_{509} ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวก ก.1-2 โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.2.2.3 ประเมินผลของสูตรอาหาร

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp.ใน Erlenmeyer Flask ที่มีสูตรอาหารต้นทุนต่ำที่ถูกออกแบบขึ้น ปริมาตร 150 ml. ดังภาคผนวก ก.4

สูตรที่ 1 1% peptone water และปรับความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจนให้เป็น 0.4% ด้วยน้ำปลา

สูตรที่ 2 1% peptone water และปรับความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจนให้เป็น 0.4% ด้วยซีอิ๊ว

สูตรที่ 3 น้ำปลาเจือจาง 0.4% ไนโตรเจน

สูตรที่ 4 ซีอิ๊วเจือจาง 0.4% ไนโตรเจน

โดยทุกสูตรปรับ pH เป็น 8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.2% (w/v) และปรับค่าความเข้มข้นเกลือสุดท้ายให้เป็น 10% (w/v) ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เลี้ยงแบบเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker 150 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง สังเกตการการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (NA) ด้วยการเกลี่ยเพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ด้วย UV-visible spectrophotometric ที่ OD_{600} และ OD_{509} ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวก ก.1-2 โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.2.2.4 ประเมินผลของน้ำตาลกลูโคส

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp.ใน Erlenmeyer Flask ที่มีสูตรอาหารต้นทุนต่ำดังแสดงในภาคผนวก ก.3 ปริมาตร 150 ml. โดยทั้ง 4 สูตรแปรการเติมกลูโคส 1% และไม่เติมกลูโคส และทุกสูตรปรับ pH เป็น 8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และปรับค่าความเข้มข้นเกลือสุดท้ายให้เป็น 10% (w/v) ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เลี้ยงแบบเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker 150 รอบต่อนาที ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง สังเกตการการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (NA) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ด้วย UV-visible spectrophotometric ที่ OD_{600} และ OD_{509} ตามลำดับ ดังแสดงในภาคผนวก ก.1-2 โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.2.2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics version 22

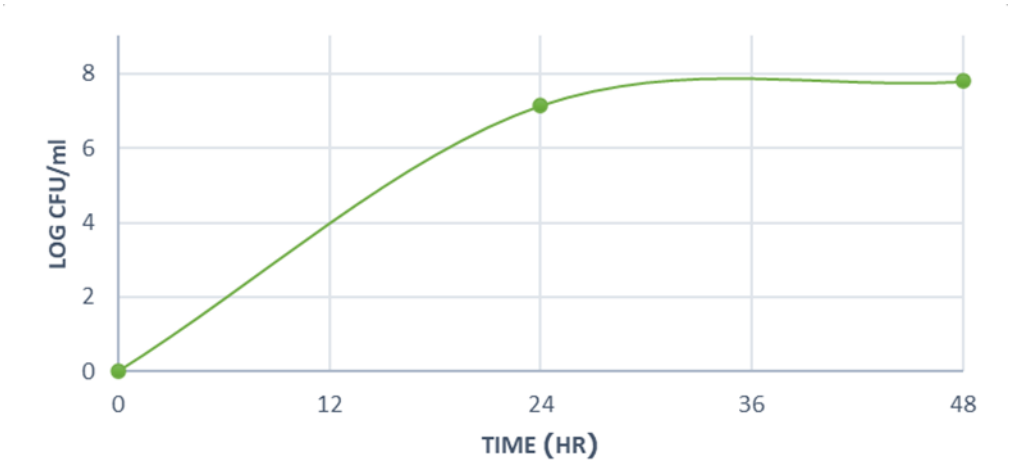
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ประเมินอัตราการเจริญของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานและพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยง *Salinicoccus* sp. ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่จำลองจากน้ำทิ้งอุตสาหกรรมน้ำปลาและซีอิ๊ว และประเมินผลของค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นเกลือและกลูโคสต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ

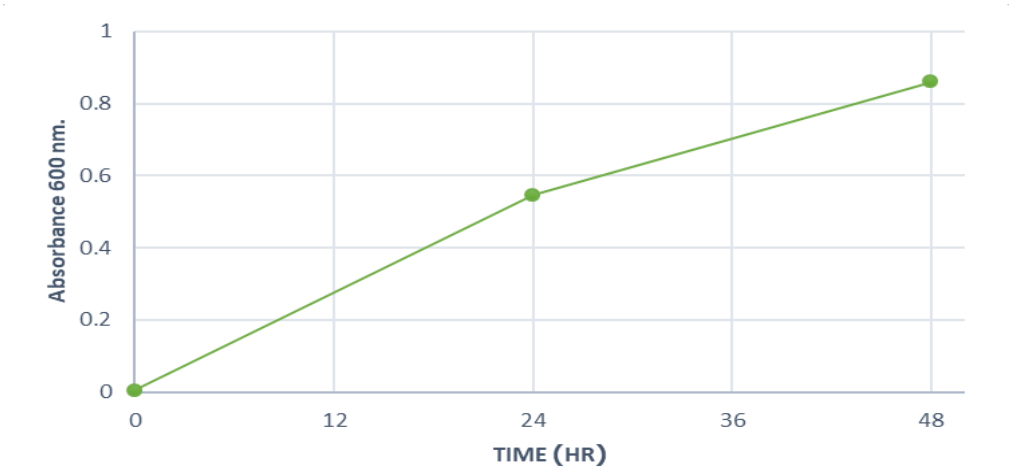
4.1 การสร้างกราฟมาตรฐานของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและค่าความขุ่นของ *Salinicoccus* sp.

การหาเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ใช้เทคนิค Total Plate Count และเทคนิค UV-visible spectrophotometric จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm ติดตามการเจริญเติบโตและสร้างกราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย สังเกตช่วงเวลาที่ใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ และสร้างกราฟมาตรฐาน log CFU/ml กับ log OD_{600} เพื่อกำหนดปริมาณเชื้อเริ่มต้นให้มีปริมาณใกล้เคียงกันและมีความแม่นยำมากที่สุด

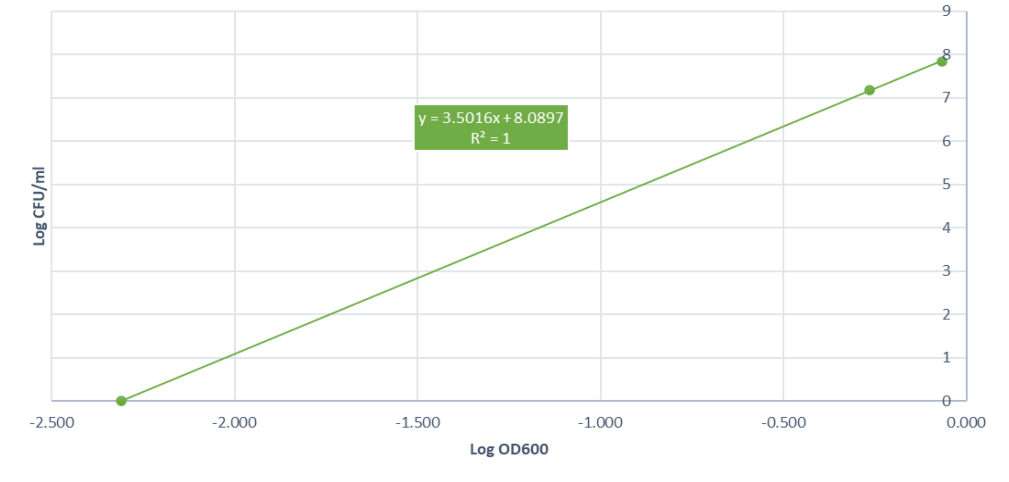
จากรูปที่ 4.1 และ 4.2 แสดงการเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน pH 6 เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียเริ่มเข้าสู่ช่วง stationary phase ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 7.84 ± 0.08 log CFU/ml และมีค่า OD_{600} เท่ากับ 0.860 ± 0.080 จากนั้นนำค่า log CFU/ml กับ log OD_{600} ในช่วงเวลา 48 ชั่วโมง นำมาสร้างกราฟมาตรฐานดังรูปที่ 4.3 และหาสมการแสดงความสัมพันธ์ ดังนี้ log CFU/ml = 3.50log OD_{600} + 8.0897 มีค่าสหสัมพันธ์ เท่ากับ 1 เพื่อใช้ในประมาณค่าความเข้มข้นสำหรับใช้กำหนดจำนวนเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงและการตรวจวัดจำนวนเซลล์ของ *Salinicoccus* sp.



รูปที่ 4.1 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน pH 6 เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Total plate count)



รูปที่ 4.2 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน pH 6 เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{600})



รูปที่ 4.3 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า Log CFU/ml กับ Log OD_{600} ของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน pH 6 เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง

4.2 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญและการสร้างรงควัตถุ

ในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญและการสร้างรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ได้แก่ pH ความเข้มข้นเกลือ สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำตาลกลูโคส ติดตามการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี Total Plate Count และเทคนิค UV-visible spectrophotometric (OD_{600}) และติดตามการสร้างรงควัตถุจากการดูดกลืนแสง (OD_{509}) ที่ช่วงเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

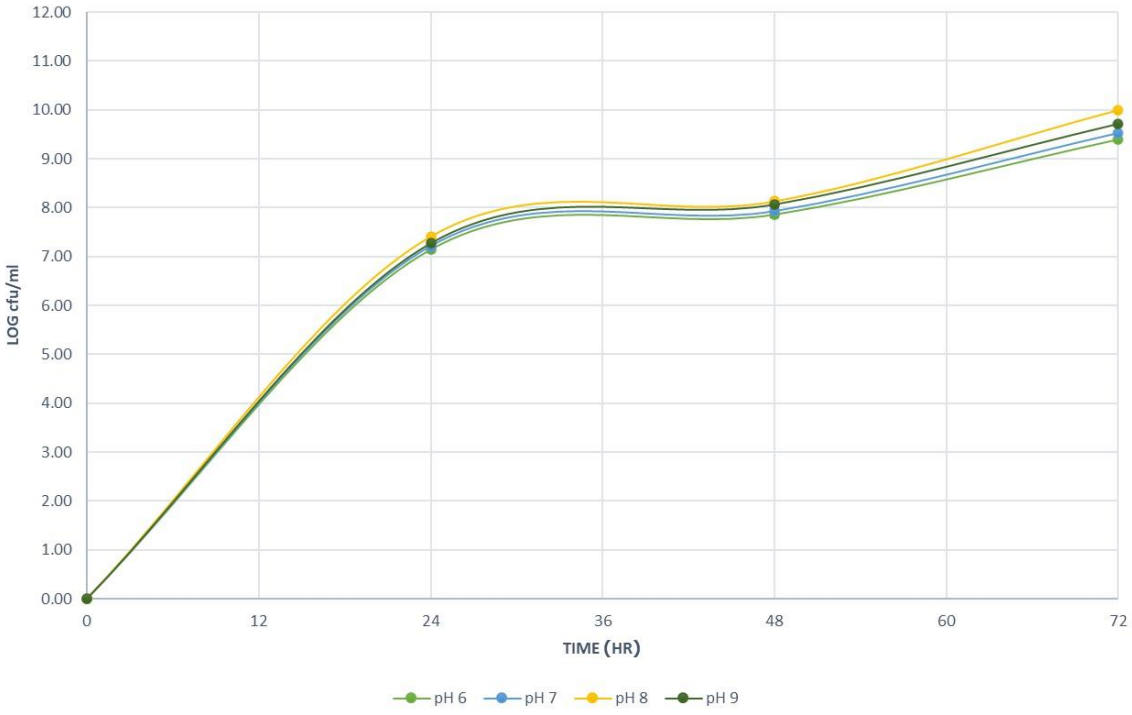
4.2.1 การประเมินสภาวะ pH ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ

pH เป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลในระยะ Log phase ที่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ การเพิ่มปริมาณรงควัตถุ และ pH ยังส่งผลในระยะเวลาที่อยู่ในช่วงของ Lag phase, Stationary phase และ Death phase ของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ดังนั้น จึงศึกษาหา pH ที่เหมาะสม โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (NB) ที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส บนเครื่อง Orbital shaker 150 รอบต่อนาที โดยแปรระดับ pH 6, 7, 8 และ 9 พบว่าแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. เจริญในระยะ log phase ที่เวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่แบคทีเรียมีการแบ่งตัวอย่างรวดเร็วคงที่ ระยะนี้อัตราการเจริญมากที่สุด การแบ่งเซลล์และการเพิ่มปริมาณรงควัตถุได้สูงสุด จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า โดยแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. มีปริมาณเซลล์สูงสุดที่ pH 8 เท่ากับ 8.14 ± 0.06 Log CFU/ml ดังรูปที่ 4.4 และมีปริมาณเซลล์สูงสุดรองลงมา ที่ pH 9, 7 และ 6 เท่ากับ 8.07 ± 0.03, 7.92 ± 0.07 และ 7.86 ± 0.05 Log CFU/ml ตามลำดับ ซึ่งการเพิ่มจำนวนเซลล์สอดคล้องกับการติดตามผลด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometric ดังรูปที่ 4.5 จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด ที่ pH 8, 9, 7 และ 6 เท่ากับ 1.148 ± 0.002, 1.082 ± 0.010, 0.908 ± 0.019 และ 0.803 ± 0.009 ตามลำดับ และพบว่าที่ pH 8 มีอัตราการเพิ่มจำนวนรวดเร็วที่สุด เนื่องจากมีค่าความชันกราฟมากที่สุด

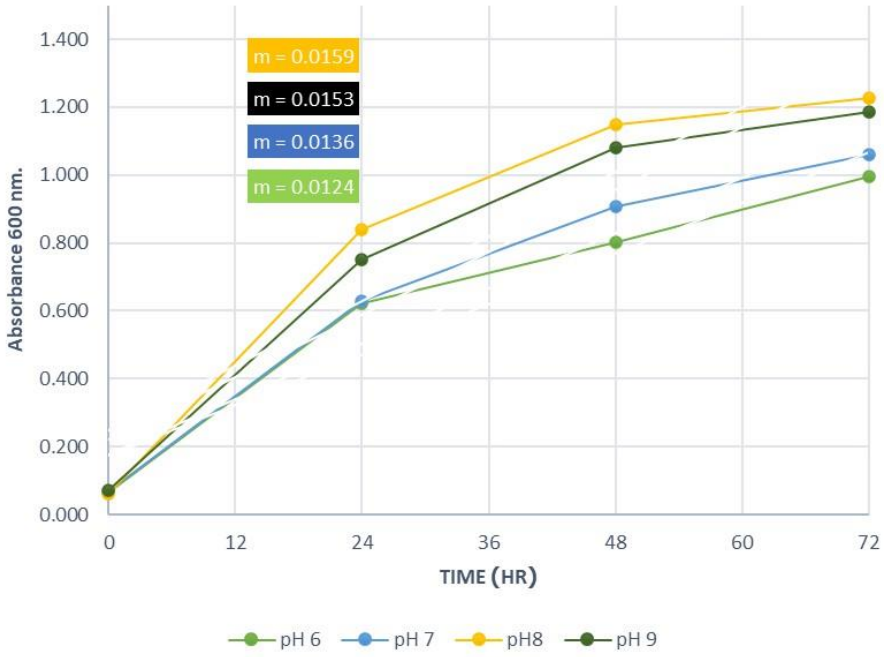
นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. สร้างปริมาณรงควัตถุสูงสุดในระยะ Stationary phase ที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งช่วงการเจริญดังกล่าวมีจำนวนเซลล์สูงสุดและเพิ่มจำนวนเซลล์อีกที่ระยะนี้อัตราการเพิ่มจำนวนจะเท่ากับอัตราการตาย เนื่องจากสารอาหารถูกใช้ไปเกือบหมดและในระยะนี้เป็นระยะที่พบสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ ซึ่งรงควัตถุที่แบคทีเรียสร้างเป็นสารแคโรทีนอยด์ที่เป็นสารเมทาบอไลท์ทุติยภูมิ โดยแบคทีเรียมีปริมาณรงควัตถุสูงสุด ติดตามจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 509 nm ดังรูปที่ 4.6 ที่ pH 8, 9, 7 และ 6 เท่ากับ 1.206 ± 0.017, 0.954 ± 0.001, 0.707 ± 0.012 และ 0.687 ± 0.016 ตามลำดับ

จากการประเมิน pH ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. พบว่าแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยง

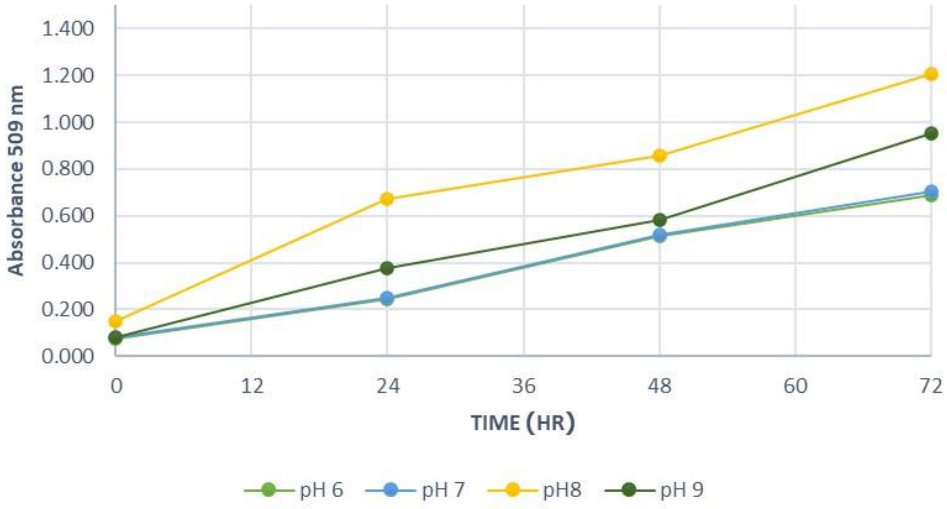
เชื้อ NB ที่ pH 8 ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Pakdeeto et al. (2007) และ Sonika et. (2016) กล่าวว่า pH ส่งผลต่อประสิทธิภาพของ Intracellular enzyme system และสารเมทาบอไลท์ต่างๆที่ส่งผลต่อการเจริญและสร้างรงควัตถุของจุลินทรีย์ จึงเลือกสภาวะ pH 8 มาใช้ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของความเข้มข้นเกลือ



รูปที่ 4.4 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน ที่แปรระดับ pH 6, 7, 8 และ 9 ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Total plate count)



รูปที่ 4.5 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน ที่แปรระดับ pH 6, 7, 8 และ 9 ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{600})



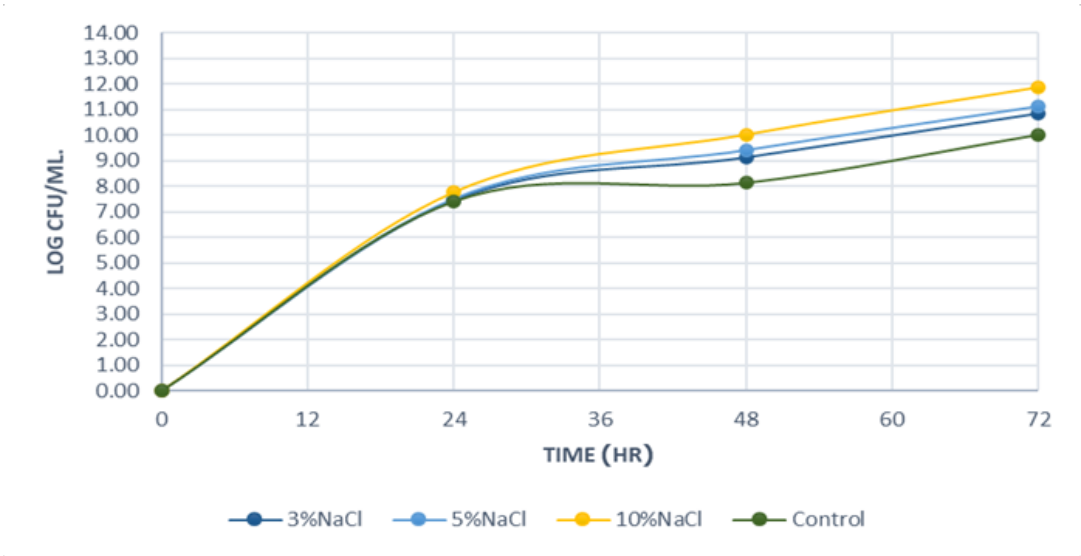
รูปที่ 4.6 การสร้างรงควัตถุของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน ที่แปรระดับ pH 6, 7, 8 และ 9 โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ ที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (OD_{509})

4.2.2 การประเมินความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ

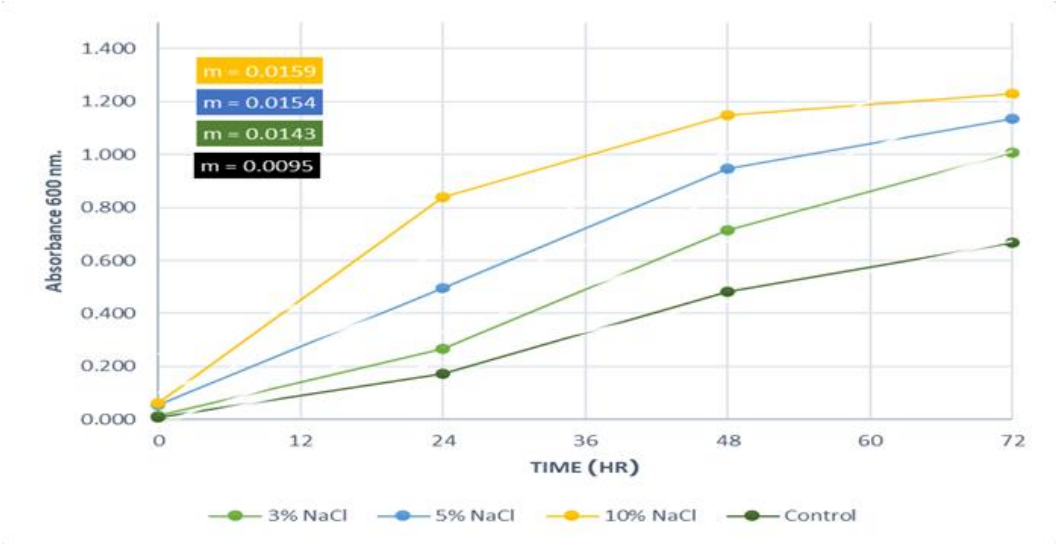
แบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. เป็น Moderate halophilic bacteria เจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นเกลือ 1.5 - 25% ซึ่งความเข้มข้นเกลือมีความสัมพันธ์ต่อการทำงานของเซลล์ โดยที่แบคทีเรียชอบเค็มปานกลางจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีเกลือและเซลล์จะหดสั้นหรือเล็กลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือต่ำ (ธนาศุภวัฒน์, 2550) ดังนั้นจึงศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุของแบคทีเรีย จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (NB) ที่ปรับ pH เป็น 8 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 0.2% (w/v) โดยแปรระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 3%, 5% และ 10% (w/v) และมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์เป็นตัวควบคุม ภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าด้วยเครื่อง Orbital Shaker ที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง 30±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 24, 48, 72 ชั่วโมง ติดตามการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. โดยวิธี Total Plate Count และ UV-visible spectrophotometric ที่ OD_{600} และ OD_{509} พบว่าแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. เจริญในระยะ log phase ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุสูงสุด เมื่อแปรระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10%, 5% และ 3% (w/v) จากรูปที่ 4.7 เท่ากับ 10.02 ± 0.04, 9.41 ± 0.04 และ 9.13 ± 0.06 Log CFU/ml ตามลำดับ และในตัวอย่างควบคุม มีปริมาณเซลล์น้อยที่สุด ซึ่งการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดสอดคล้องกับการติดตามผลด้วยเทคนิค UV-visible spectrophotometric จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 nm โดยมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุด จากรูปที่ 4.8 ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10%, 5% และ 3% (w/v) เท่ากับ 1.143 ± 0.005, 0.948 ± 0.003 และ 0.713 ± 0.005 ตามลำดับ และพบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10% มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์รวดเร็วที่สุด เนื่องจากมีค่าความชันกราฟมากที่สุด

นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. สร้างปริมาณรงควัตถุสูงสุดในระยะ Stationary phase ที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยแบคทีเรียมีปริมาณรงควัตถุสูงสุด ติดตามจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 509 nm ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 10%, 5% และ 3% (w/v) รูปที่ 4.9 เท่ากับ 1.167 ± 0.026, 0.904 ± 0.013 และ 0.648 ± 0.005 ตามลำดับ

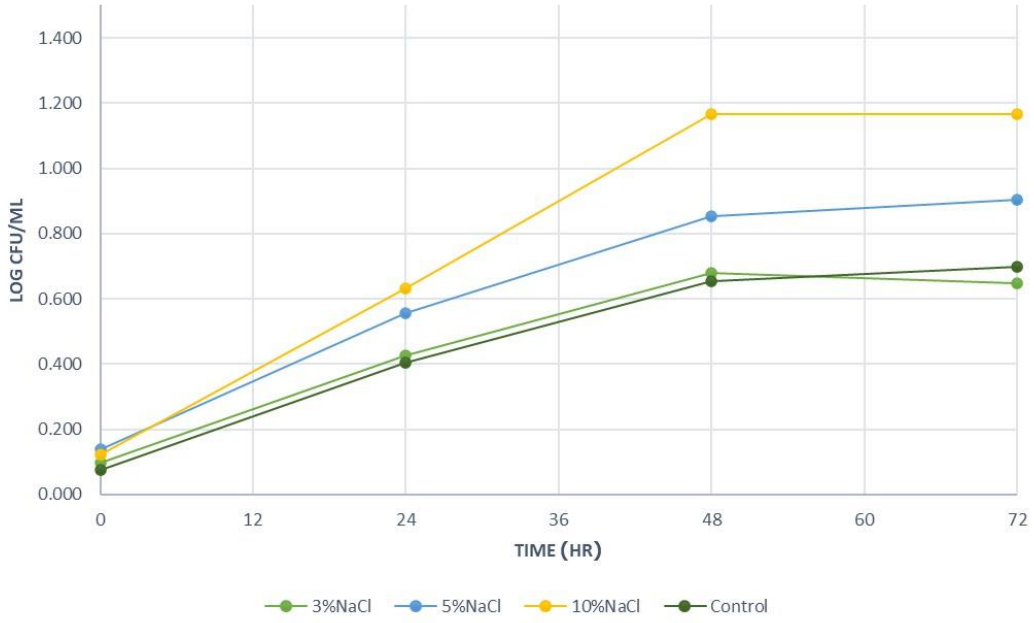
จากการประเมินสภาวะความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. พบว่าแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่ pH 8 และความเข้มข้นเกลือ 10% (w/v) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของธนาศุภวัฒน์ (2550) จึงเลือกการปรับสภาวะ ที่ pH 8 และความเข้มข้นเกลือ 10% (w/v) มาใช้ในการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุได้สูงที่สุด



รูปที่ 4.7 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน โดยแปรระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3%, 5%, 10% (w/v) และตัวอย่างควบคุม เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Total plate count)



รูปที่ 4.8 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน โดยแปรระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3%, 5%, 10% (w/v) และตัวอย่างควบคุม เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{600})



รูปที่ 4.9 การสร้างรงควัตถุของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารมาตรฐาน โดยแปรระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3%, 5%, 10% (w/v) และตัวอย่างควบคุม เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{509})

4.2.3 การประเมินสูตรอาหารต้นทุนต่ำที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ

จากการประเมินค่า pH และความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุของแบคทีเรีย พบว่าแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. เพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุได้ดีที่สุดที่ pH 8 และความเข้มข้นเกลือ 10% (w/v) ดังนั้น ในการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อการเจริญและสร้างรงควัตถุ จึงต้องเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารที่มีความใกล้เคียงกับสารอาหารคุ้นเคย ทั้งปัจจัยทางกายภาพและเคมี รวมถึงสภาวะอาหารเหล่านั้น ทำให้เมื่อพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำแล้วแบคทีเรียจะสามารถปรับตัวให้เจริญและสร้างรงควัตถุได้ โดยมีการพัฒนาสูตรอาหารจากการจำลององค์ประกอบของของเสียจากโรงงานน้ำปลาและซีอิ๊ว โดยใช้น้ำเปปโตน 1% base medium เติมน้ำกลั่น น้ำปลาและซีอิ๊ว ซึ่งมีองค์ประกอบแสดงดังตาราง 4.1 และ 4.2

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบสูตรอาหารต้นทุนต่ำ

สูตรอาหาร	ส่วนประกอบ
สูตร 1	1% peptone water และปรับความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจนให้เป็น 0.4% ด้วยน้ำปลา
สูตร 2	1% peptone water และปรับความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจนให้เป็น 0.4% ด้วยซีอิ๊ว
สูตร 3	น้ำปลาเจือจาง 0.4% ไนโตรเจน
สูตร 4	ซีอิ๊วเจือจาง 0.2% ไนโตรเจน
สูตรควบคุม	อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (NB)

*หมายเหตุ : ทุกสูตรอาหารต้นทุนต่ำปรับ pH 8 และความเข้มข้นเกลือสุดท้าย 10% (w/v)

ตารางที่ 4.2 ส่วนประกอบโดยประมาณ

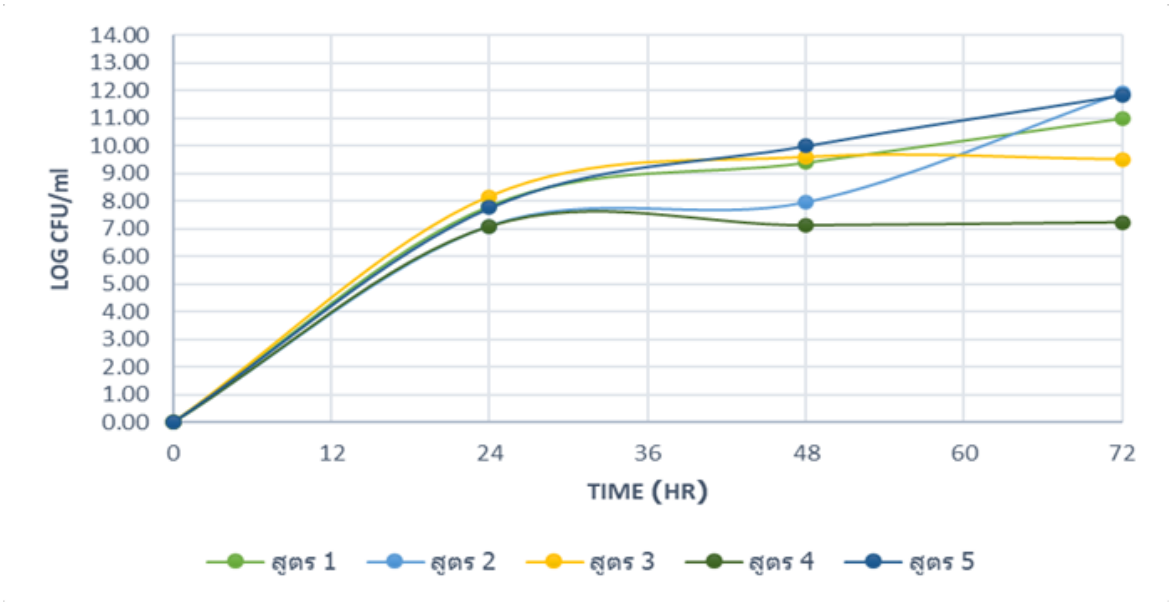
วัตถุดิบ	ส่วนประกอบ	
น้ำปลา	ปลาไส้ตัน	75.0%
	เกลือ	24.0%
	น้ำตาล	1.0%
	ไอโอดีน	3.0 มก./ลิตร
ซีอิ๊ว	ถั่วเหลือง	62.0%
	แป้งสาลี	22.0%
	น้ำเกลือ	11.0%
	น้ำตาล	4.9%
Peptone	Total Nitrogen	13.50%
	Amino Nitrogen	3.00%

	Sodium chloride	5.00%

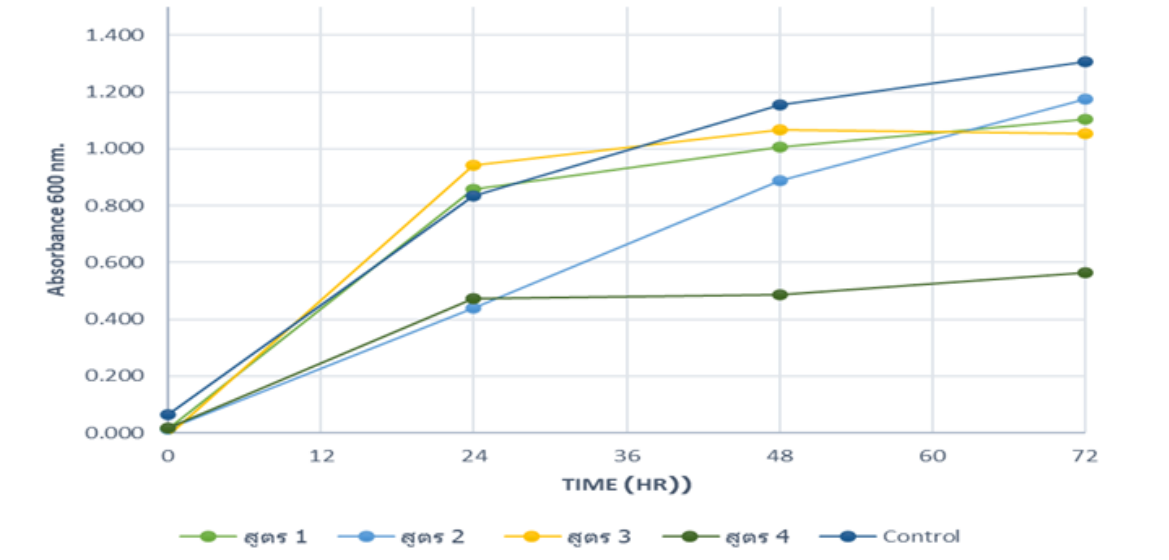
*หมายเหตุ: น้ำปลาตราหอยนางรม ขนาด 700 ml
ซีอิ๊วขาวตราเด็กสมบูรณ์ สูตร 1 ขนาด 700 ml
Himedia PEPTONE, MYCOLOGICAL (Animal and Plant Peptone) 500 กรัม

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำ พบว่าแบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดในอาหารสูตร 3; น้ำปลาเจือจาง 0.4% ไนโตรเจน แต่การเพิ่มจำนวนเซลล์น้อยกว่าสูตรควบคุม ในช่วงปลาย log phase โดยมีปริมาณเซลล์เท่ากับ 9.59 ± 0.06 Log cfu/ml ดังรูปที่ 4.10 และที่ OD_{600} มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.066 ± 0.004 ดังรูปที่ 4.11 และในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2; 1% peptone water ปรับความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจนให้เป็น 0.4% ด้วยซีอิ๊ว สามารถสร้างปริมาณรงควัตถุได้มากสุด โดยติดตามจากค่าการดูดกลืนแสง ที่ OD_{509} มีค่าเท่ากับ 0.993 ± 0.108 ในช่วง stationary phase ดังรูปที่ 4.12

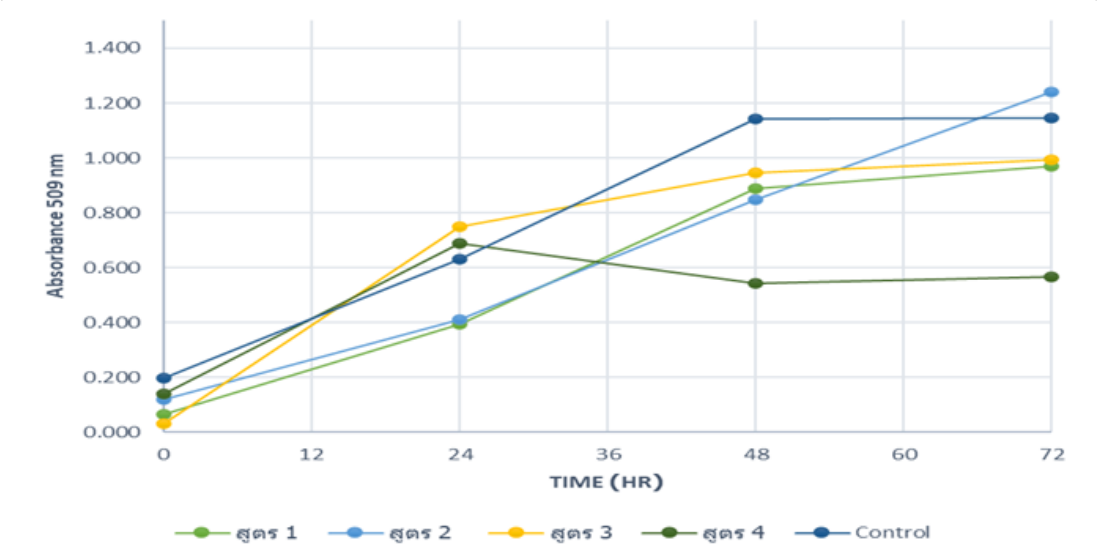
จากรูปที่ 4.10 และ 4.11 พบว่าแบคทีเรียในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำสูตรที่ 2; 1% peptone water และปรับความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจนให้เป็น 0.4% ด้วยซีอิ๊ว มีการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุสูงสุด เนื่องจากในซีอิ๊วมีปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นมากกว่าในน้ำปลาดังตารางที่ 4.3 โดยเฉพาะกรดกลูตามิกและธีรโอนีน ซึ่งกรดทั้ง 2 ชนิด มีผลต่อการสังเคราะห์แคโรทีนอยด์ในแบคทีเรีย (Voaides, 2012)



รูปที่ 4.10 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารต้นทุนต่ำและตัวอย่างควบคุม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) pH 8 เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (Total plate count)



รูปที่ 4.11 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารต้นทุนต่ำและตัวอย่างควบคุม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) pH 8 เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{600})



รูปที่ 4.12 การสร้างรงควัตถุของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารต้นทุนต่ำและตัวอย่างควบคุม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) pH 8 เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{509})

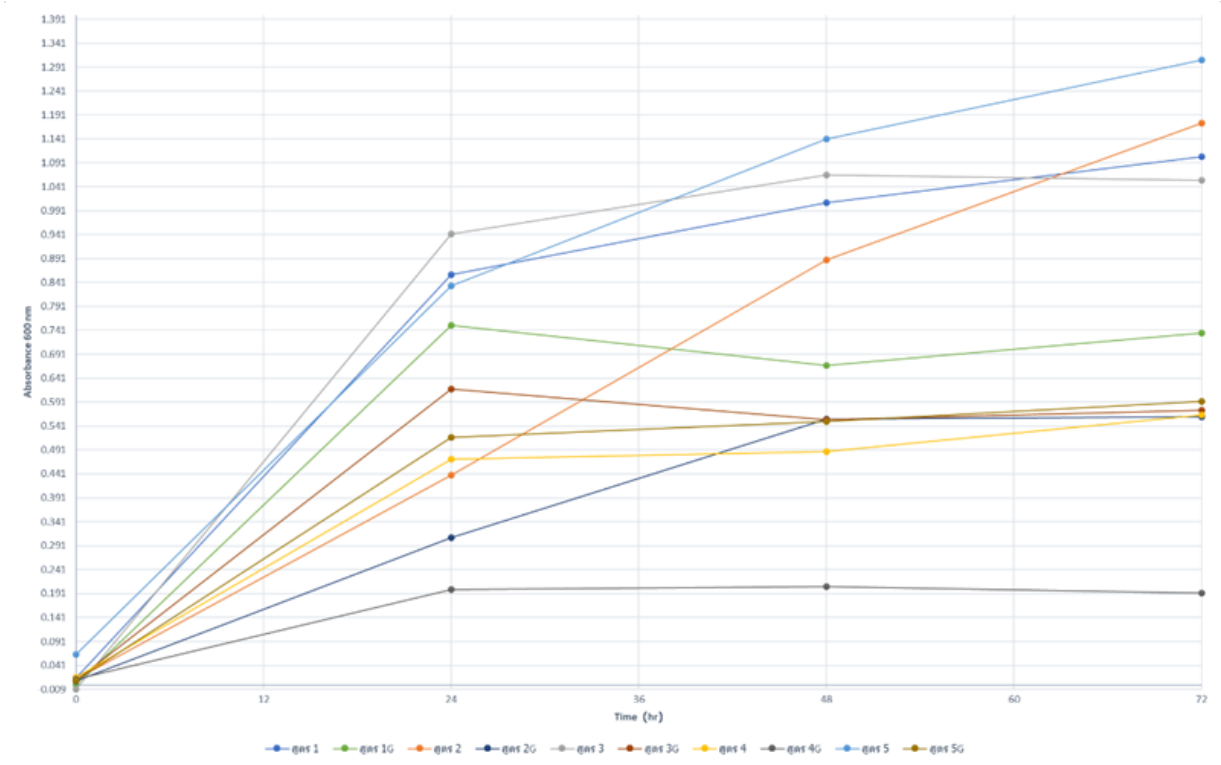
ตารางที่ 4.3 แสดงปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อซีอิ๊วและน้ำปลา 100 กรัม (กองโภชนาการ กรมอนามัย)

กรดอะมิโน / วัตถุดิบ	Thr มก.	Trp มก.	Val มก.	Arg มก.	His มก.	Ala มก.	Asp มก.	Glu มก.	Gly มก.	Pro มก.	Ser มก.
น้ำปลา	503	68	669	0	378	796	662	2,345	356	339	283
ซีอิ๊ว	648	121	937	1339	402	1,032	2,218	3,637	833	1,193	907

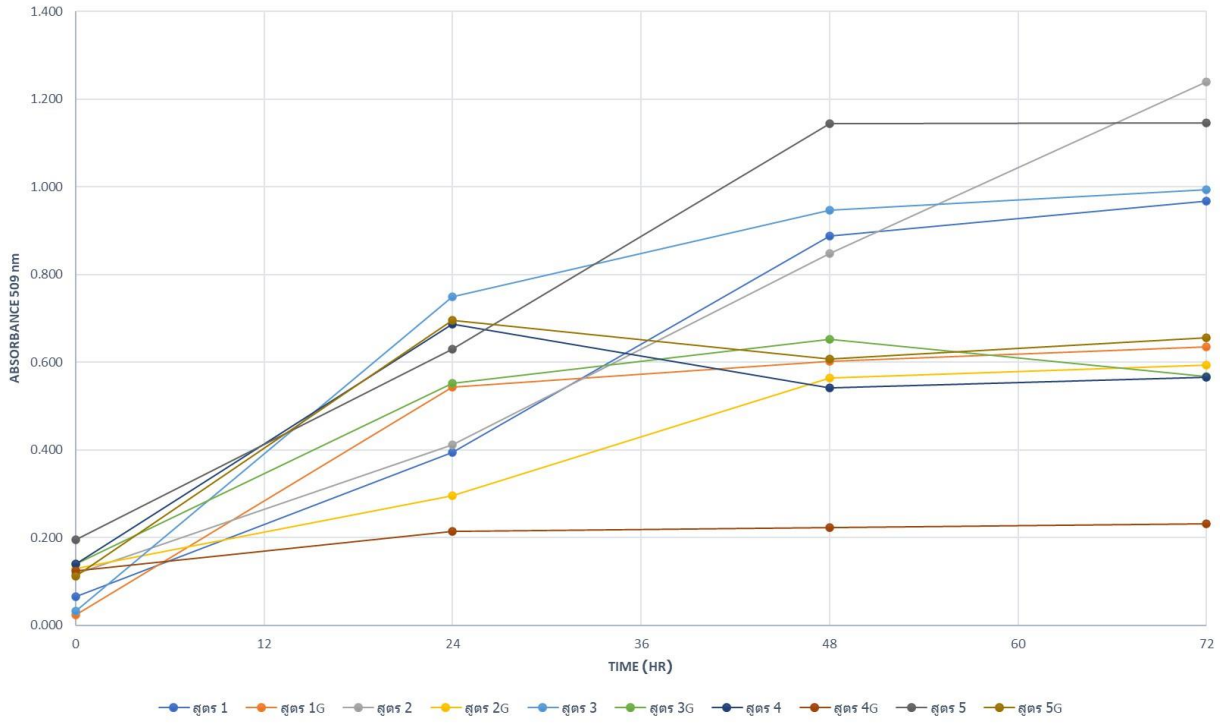
4.2.4 ผลของน้ำตาลกลูโคส 1% ต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ

จากรูปที่ 4.13 และ 4.14 พบว่าในทุกสูตรอาหารที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% (w/v) แบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. เพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุได้น้อยกว่าในสูตรอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคสอย่างมีนัยสำคัญ ถึงแม้ว่าน้ำตาลกลูโคสจะเป็นแหล่งคาร์บอนที่ส่งผลดีต่อการเจริญเติบโต แต่เมื่อเติมน้ำตาลกลูโคส 1% (w/v) ร่วมกับมีความเข้มข้นเกลือ 10% (w/v) ส่งผลให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย เนื่องจากทำให้ค่า aw ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง โดยที่ aw เป็นปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำเพื่อดูดซึมแร่ธาตุ และค่า aw ในอาหารมีความสัมพันธ์กับสารที่เติมลงไปในอาหารด้วย เช่น การเติมเกลือ น้ำตาลและกรดอะมิโน ถ้าเชื้อจุลินทรีย์เจริญในช่วง aw ที่ไม่เหมาะสม

จะทำให้เกิดความผิดปกติในการแบ่งตัว เยื่อหุ้มเซลล์ เอนไซม์ใน membranes และ cytoplasm ถูกทำลาย (Chirife et al., 1994)



รูปที่ 4.13 การเจริญของแบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. ในอาหารต้นทุนต่ำและตัวอย่างควบคุม ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% และไม่เติม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) pH 8 เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{600})



รูปที่ 4.14 การสร้างรงควัตถุของ *Salinicoccus* sp. ในอาหารต้นทุนต่ำและตัวควบคุม ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% และไม่เติม ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10% (w/v) pH 8 เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยการตรวจวัดค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{509})

บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย

5.1 การประเมินปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเจริญและการสร้างรงควัตถุ

จากผลการวิจัยพบว่า แบคทีเรีย *Salinicoccus* sp. สามารถเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อต้นทุนต่ำสูตร 2; 1% peptone water และปรับความเข้มข้นสุดท้ายของไนโตรเจนให้เป็น 0.4% ด้วยซีอิ๊ว ที่สภาวะความเป็นด่าง pH 8 ความเข้มข้นเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 % (w/v) การเติมน้ำตาลกลูโคสในสูตรอาหารดังกล่าว ส่งผลให้การเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุน้อยกว่าสูตรอาหารที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส 1% (w/v)

5.2 ข้อเสนอแนะ

นอกเหนือจากสภาวะที่ทำการวิจัย ยังมีปัจจัยอื่นๆที่ส่งผลในการเจริญและสร้างรงควัตถุของแบคทีเรีย เช่น อุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนและปริมานคาร์บอน จึงควรวิจัยเพิ่มเติมเพื่อประสิทธิภาพในการเลี้ยงเชื้อ และจากการแปรระดับน้ำตาลกลูโคส 1% (w/v) ส่งผลให้ไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ จึงควรแปรระดับน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นน้อยกว่า 1% (w/v) แบคทีเรียอาจจะเจริญเติบโตได้ดีขึ้น และเพื่อตรวจสอบความเป็นแคโรทีนอยด์ของรงควัตุ ต้องวิเคราะห์เชิงปริมาณสารสีด้วยเทคนิค TLC และ HPLC เพิ่มเติม ทั้งนี้การประเมินเพื่อขยายขนาดในการผลิตและการประยุกต์ใช้สารสีนี้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

บรรณานุกรม

Chaikulsareewath, A., Chooprom, C., & Mana, A. (2015). Screening of Protease Producing Halophilic Bacteria from Fermented Fish (Pla-ra). Journal of Food Technology, Siam University, 10(1).

Malik, K., Tokkas, J., & Goyal, S. (2012). Microbial Pigments: A review. International Journal of Microbial Resource Technology, 1(4), 361-365.

Mantzouridou F., Roukas T., & Kotzekidou P. (2002). Optimization of β-carotene production from synthetic medium by Blakeslea trispora in a stirred tank reactor and relationship between morphological changes and pigment formation. Food Biotechnol 16:167-187.

Marova I., Carnecka M., & Halienova A. (2012). Use of several waste substrates for carotenoid-rich yeast biomass production. J Environ Manage 95 Suppl:S338-342.

Orozco SFB, & Kilikian BV (2007). Effect of pH on citrinin and red pigments production by Monascus purpureus CCT3802. World Journal of Microbiology and Biotechnology,

Park P., Cho D., & Kim E. (2005). Optimization of carotenoid production by Rhodotorula glutinis using statistical experimental design. World J Microbiol Biotechnol 21:429-434.

Perez-Fons L., Steiger S., Khaneja R. (2011). Identification and the developmental formation of carotenoid pigments in the yellow/orange Bacillus spore-formers.

Venil CK, Zakaria ZA, & Ahmad WA (2013). Bacterial pigments and their applications. Process Biochemistry 48:1065-1079.

Zollinger H. (2003). Color chemistry: syntheses, properties, and applications of organic dyes and pigments: 3rd edition, Helvetica Chimica Acta, Zurich.

กันทิมา สิทธิเหล่าถาวร. (2562). การหา N/Protein ด้วยเทคนิค Kjeldahl method. ค้นเมื่อ 15 ธันวาคม 2563, จาก https://www.scispec.co.th/learning/index.php/blog/elemental/44-n-proteinkjeldahl-method-vs-dumas-method-2

วิจิตรา ศรีเจริญ. (2561). การคัดแยกจำแนกและหาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรียชอบเกลือที่สร้างรงควัตถุสำหรับใช้เป็นสารให้สีทางเลือกในอาหาร. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. (2550). อนุกรมวิธานและเอนไซม์โปรทีเอสของแบคทีเรียชอบเค็มจากอาหารหมัก. ทุนวิจัยกองทุนรัชดาภิเษกสมโภช, จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ. (2560). อาหารบำรุงสายตา. ค้นเมื่อ 2 เมษายน 2563,จาก https://www.thaihealth.or.th/sook/info-body-detail.php?id=141.

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ. (ม.ป.ป.). ไลโคปีนคืออะไร ?. ค้นเมื่อ 4 เมษายน 2563, จาก https://www.nstda.or.th/th/vdo-nstda/science-day-techno/4076-lycopene.

เพียง อุดมเกียรติกูล. (2534). การเตรียมสีผสมอาหารชนิดผงจากธรรมชาติโดยวิธีสเปรย์ดราย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. เทคนิคการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์โดย Total plate count

เก็บตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลาที่กำหนดมาทำการเจือจางตัวอย่างด้วยวิธี Serial dilution โดยใช้สารละลาย NaCl 0.85% (w/v) เนื่องจากเชื้อเริ่มต้นมีความเข้มข้นสูงมากจึงจำเป็นต้องเจือจางจนมีความเข้มข้น 10^{-9} เพื่อให้สามารถนับจำนวนเชื้อในจานเพาะเชื้อได้ จากนั้นเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (NA) และปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิตรที่ผ่านการเจือจางไปบนพื้นผิวของอาหารวุ้นที่แข็งตัวแล้วใช้แท่งแก้วงอรูปตัว L ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยการจุ่มใน 95% Ethanol ลนไฟและทำให้เย็นแล้วเกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (NA) ที่ได้เตรียมไว้ให้ทั่วผิวอาหารวุ้น กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารอยู่ด้านบนแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้องแน่นอนในแต่ละความเข้มข้นจะเพาะเชื้อบนจานเพาะเชื้อ 2 ซ้ำ นับจำนวนโคโลนีหลังจากบ่มตัวอย่างเป็นเวลา 7 วัน หาค่าเฉลี่ยและคูณกลับด้วย Dilution factor เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่างและรายงานผลให้อยู่ในหน่วยของ cfu/ml ดังสูตร

สูตรคำนวณปริมาณเชื้อจุลินทรีย์

CFU/ml (or g) Original sample = CFU / plate x (1 / ml aliquot plated) x Dilution factor

CFU = Colony - forming unit

Aliquot plated = ปริมาตรตัวอย่างที่ปิเปตใส่ในจานเพาะเชื้อ (ml)

$$\text{Dilution factor} = \frac{1}{\text{Dilution}} = \frac{\text{Volume of dilution blank + volume of sample}}{\text{Volume of sample}}$$

2. การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของ *Salinicoccus* sp.

การคำนวณหาค่า absorbance

จากสูตร $\log y = 3.5016 (\log x) + 8.0897$

เมื่อ y = จำนวนเซลล์/มิลลิลิตร

x = ค่า absorbance ที่ 600 นาโนเมตร

R^2= ค่าสหสัมพันธ์

ให้ค่า $\log y = 7.84$

แทนค่า $7.84 = 3.5016 (\log x) + 8.0897$

$x = 0.848$

ดังนั้น ค่า absorbance ที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.848

3. **สูตรอาหารต้นทุนต่ำ**

สูตร	**NB**	**Peptone (g)**	**Fish Sauce (FS) / Soy Sauce (SS) (ml)**	**NaCl (g)**	**Water (ml)**	**Glucose* (g)**
1	X	1.5	11.25	15	138.75	1.5
2	X	1.5	21.83	15	128.17	1.5
3	X	X	22.54	9.59	127.46	1.5
4	X	X	25.73	X	106.34	1.5
5	1.95	X	X	15	150	1.5

*Glucose ในการทดลองประเมินอิทธิพลของกลูโคส

มีการเติมและไม่เติมกลูโคสในสูตรอาหารต้นทุกต่ำที่ควบคุมส่วนประกอบ ดังตารางข้างต้น

ภาคผนวก ข.

ข้อมูลทางสถิติ

1. การประเมินสภาวะ pH ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ

1.1 <u>การคำนวณ ANOVA</u>: การเพิ่มจำนวนเซลล์

Absorbance		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Abs600	Between Groups	.150	3	.050	327.621	.000
	Within Groups	.001	4	.000		
	Total	.151	7			

1.2 <u>Duncan's Multiple range test</u>: การเพิ่มจำนวนเซลล์

Absorbance 600 nm						
pH		N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan[a]	6	2	.80250			
	7	2		.90750		
	9	2			1.08200	
	8	2				1.14750
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

1.3 <u>การคำนวณ ANOVA</u>: การเพิ่มปริมาณรงควัตถุ

Absorbance		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Abs509	Between Groups	.070	3	.023	74.777	.001
	Within Groups	.001	4	.000		
	Total	.071	7			

1.4 <u>Duncan's Multiple range test</u>: การเพิ่มปริมาณรงควัตถุ

Absorbance 509 nm					
pH		N	Subset for alpha = 0.05		
			1	2	3
Duncan[a]	6	2	.68700		
	7	2	.70650		
	9	2		.95450	
	8	2			1.20600
	Sig.		.208	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

2. การประเมินสภาวะความเข้มข้นเกลือที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ

2.1 <u>การคำนวณ ANOVA</u>: การเพิ่มจำนวนเซลล์

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Abs600	Between Groups	.491	3	.164	4705.391	.000
	Within Groups	.000	4	.000		
	Total	.491	7			

2.2 <u>Duncan's Multiple range test</u>: การเพิ่มจำนวนเซลล์

เกลือ		N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan[a]	0	2	.48200			
	3	2		.71350		
	5	2			.94650	
	10	2				1.14200
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

2.3 <u>การคำนวณ ANOVA:</u> การเพิ่มปริมาณรงควัตถุ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Abs509	Between Groups	.335	3	.112	387.184	.000
	Within Groups	.001	4	.000		
	Total	.336	7			

2.4 <u>Duncan's Multiple range test</u>: การเพิ่มปริมาณรงควัตถุ

เกลือ		N	Subset for alpha = 0.05			
			1	2	3	4
Duncan[a]	3	2	.64750			
	0	2		.69650		
	5	2			.90350	
	10	2				1.16650
	Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 2.000.

3. การประเมินอิทธิพลสูตรอาหารและน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และปริมาณรงควัตถุ

1.1 <u>การคำนวณ ANOVA</u>: การเพิ่มจำนวนเซลล์

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Abs600	Between Groups	1.733	9	.193	99.631	.000
	Within Groups	.058	30	.002		
	Total	1.791	39			

1.2 <u>Duncan's Multiple range test</u>: การเพิ่มจำนวนเซลล์

		Subset for alpha = 0.05						
TRT	N	1	2	3	4	5	6	7
P4	4	.48725						
P4G	4	.52650						
P5G	4		.68175					
P3G	4		.71525	.71525				
P2G	4			.75600	.75600			
P1G	4				.81150			
P2	4					.88800		
P1	4						1.00800	
P3	4						1.06600	
P5	4							1.14100
Sig.		.216	.290	.200	.084	1.000	.072	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

1.3 <u>การคำนวณ ANOVA:</u> การเพิ่มปริมาณรงควัตถุ

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Abs509	Between Groups	3.535	9	.393	47.654	.000
	Within Groups	.247	30	.008		
	Total	3.783	39			

3.4 <u>Duncan's Multiple range test</u>: การเพิ่มปริมาณรงควัตถุ

		Subset for alpha = 0.05			
TRT	N	1	2	3	4
P4G	4	.23225			
P4	4		.56500		
P3G	4		.56725		
P2G	4		.59300		
P1G	4		.63475		
P5G	4		.65625		
P1	4			.96800	
P3	4			.99275	
P5	4				1.14500
P2	4				1.23975
Sig.		1.000	.214	.703	.150

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 4.000.

ภาคผนวก ค.

ข้อควรปฏิบัติในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา

1. สวมเสื้อคลุมทุกครั้ง
2. ไม่รับประทานอาหาร ดื่ม หรือสูบบุหรี่ ภายในห้องปฏิบัติการ
3. ดูแลห้องปฏิบัติการให้สะอาดไม่ให้เป็นแหล่งสะสมของเชื้อจุลินทรีย์
4. ปฏิบัติการด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
5. ก่อนและหลังปฏิบัติการต้องล้างมือให้สะอาด และฆ่าเชื้อด้วย 70% Ethanol
6. เช็ดพื้นโต๊ะบริเวณปฏิบัติงานด้วย 70% Ethanol เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อนและหลังปฏิบัติการทุกครั้ง
7. กรณีถ่ายเชื้อในตู้ Larminal air flow ให้เปิดหลอดไฟ UV เพื่อฆ่าเชื้อภายในตู้ก่อนปฏิบัติงาน 30 นาที
8. ควรวางหลอดเลี้ยงเชื้อใน Tube rack เสมอ ไม่ควรวางบนพื้น
9. การถ่ายเชื้อหรือการทำการทดลองที่ต้องใช้ปิเปตให้ใช้ลูกยางทุกครั้ง ห้ามใช้ปากดูดโดยตรง เพราะจะทำให้ดูดเชื้อเข้าร่างกาย
10. ปิเปตที่ใช้แล้วให้วางลงในภาชนะที่ใส่น้ำยาฆ่าเชื้อ ห้ามวางปิเปตที่ใช้แล้วบนโต๊ะปฏิบัติการ
11. ระวังการติดเชื้อเนื่องจากการพูดคุยในขณะปฏิบัติการ
12. ในกรณีที่ห้องปฏิบัติการไม่มีเครื่องปรับอากาศในขณะถ่ายเชื้อ ต้องปิดพัดลมและควรปิดหน้าต่างในจุดที่กระแสลม จะทำให้เกิดการปนเปื้อนได้
13. เตรียมถาดใส่น้ำยาฆ่าเชื้อ ไว้บนโต๊ะปฏิบัติการตลอดเวลา เพื่อรองรับปิเปตที่ใช้งานแล้ว โดยวางปิเปตในแนวนอน ให้น้ำยาฆ่าเชื้อท่วมปิเปต
14. การบ่มจานเพาะเชื้อ วางจานเพาะเชื้อซ้อนกันในถุงพลาสติกขนาดพอเหมาะ ได้แก่ 8x12 นิ้ว มัดปากถุงเพื่อป้องกันมดและแมลงเข้าไปในจานเพาะเชื้อ และง่ายต่อการแยกจานเพาะเชื้อให้เป็นกลุ่มไม่ปะปนกัน ซึ่งสะดวกต่อการอ่านผล
15. ก่อนการล้างทำความสะอาดหลอดและจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อ ต้องฆ่าเชื้อก่อน โดยการ Autoclave ทุกครั้ง
16. เมื่อทำภาชนะบรรจุเชื้อแตกหรือหก ต้องราดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อและนึ่งฆ่าเชื้อ นึ่งฆ่าผ้าที่เช็ดบริเวณดังกล่าวก่อนทำความสะอาด และห้ามทิ้งเศษแก้วที่เปื้อนเชื้อในถังขยะก่อน Autoclave
17. กรณีการใช้ Autoclave หรือการหลอมอาหารวุ้นด้วยเครื่อง Microwave ให้คลายเกลียวขวดไม่ให้แน่นเกินไป เนื่องจากอาจเกิดแรงดันสูงภายในภาชนะที่ปิดสนิท ทำให้ภาชนะเกิดการแตกและระเบิดกระจายไปทั่วบริเวณโดยรอบเครื่องได้

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาว ณัฏฐนิตา เผ่าศรีเจริญ

ตำแหน่ง หัวหน้าโครงการ

วุฒิการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่สำเร็จการศึกษา 2563

โทรศัพท์ 099-459-5331

Email 6032517123@student.chula.ac.th

ชื่อ-สกุล นางสาว กัญญภา กิจสิริรัตนกุล

ตำแหน่ง ผู้ร่วมวิจัย

วุฒิการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่สำเร็จการศึกษา 2563

โทรศัพท์ 082-964-6492

Email 6032501023@student.chula.ac.th

ชื่อ-สกุล นาย ยุทธพงศ์ อิ่มเอิบ

ตำแหน่ง ผู้ร่วมวิจัย

วุฒิการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

คณะ วิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีที่สำเร็จการศึกษา 2563

โทรศัพท์ 091-862-3949

Email 6032555023@student.chula.ac.th