

การพัฒนาสิ่งทดแทนอาหารเพาะเชื้อที่มีนมเป็นองค์ประกอบและการหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับ
การผลิต *Bifidobacterium animalis*

นายบัณณธร ทวีเทพไทกุล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2555
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

DEVELOPMENT OF SUBSTITUTE FOR MILK-BASE MEDIUM AND OPTIMIZATION FOR
PRODUCTION OF *Bifidobacterium animalis*

Mr. Punnathorn Thaveetheptaikul

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2012

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การพัฒนาสิ่งทดแทนอาหารเพาะเชื้อที่มีนม
เป็นองค์ประกอบและการหาภาวะที่เหมาะสม
สำหรับการผลิต *Bifidobacterium animalis*

โดย

นายปณณธร ทวีเทพไทกุล

สาขาวิชา

เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณิชฎฐา ทองจุล

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

ดร. บัณฑิต ผึ้งสินธุ์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ณิชฎฐา ทองจุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. บัณฑิต ผึ้งสินธุ์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสุทธิ)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ ดร. สุวัฒนา พุกชะศรี)

527 24169 23 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEY WORDS : *Bifidobacterium animalis* / SUGARCANE MOLASSES / OPTIMIZATION

PUNNATHORN THAVEETHEPTAIKUL : DEVELOPMENT OF SUBSTITUTE FOR MILK-BASE MEDIUM AND OPTIMIZATION FOR PRODUCTION OF *Bifidobacterium animalis*. ADVISOR : ASST. PROF. NUTTHA THONGCHUL, Ph.D., CO-ADVISOR : BUNDIT FUNGSIN, Ph.D., 87 pp.

This study was carried out for development of substitute for milk based medium for production of *B. animalis* TISTR 1925. An initial screening using a 2^3 full factorial design was used to identify the impact on cultures of the various components of the medium which were molasses, yeast extract and urea. Statistical analysis suggested that yeast extract and interaction of molasses and yeast extract had a significant positive effect on growth whereas urea variable and another interaction terms had negative effect. The regression equation indicates that increasing of yeast extract concentration would increase of bacterial growth, whereas increasing of molasses concentration would decrease of bacterial growth. Therefore, steepest ascent is used to investigate the ration of molasses and yeast extract. The results indicated that the highest viable cell count was obtained at molasses and yeast extract concentration 46.4 g/L and 10 g/L, respectively. The medium optimization by using a central composite circumscribed (CCC) design, indicated the optimum points of 46.5 g/L molasses and 8 g/L yeast extract. The repeated experiments were performed to verify the predicted optimum, viable cell count of $9.2495 \log_{10}$ cfu/mL. The calculated cost of the raw materials used in the substituted medium developed could reduce cost effectively by 20.36 % and 69.51 % comparing to the milk based medium and MRS broth, respectively. The condition to improve the cultivation in a substituted medium developed the growth performance in a 15 L fermenter. The growth performance was improved when the culture condition at agitation speed 200 rpm and pH 6.0, specific growth rate of 0.9835 h^{-1} and maximum viable cell count of $9.3116 \log_{10}$ cfu/mL.

Field of Study : Biotechnology

Student's Signature :

Academic Year : 2012

Advisor's Signature :

Co-advisor's Signature :

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ญัฐฐา ทองจุล อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ดร. บัณฑิต ผึ้งสินธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม โดยให้คำแนะนำ และข้อคิดเห็นตลอดระยะเวลาการวิจัยจนถึงการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. อมร เพชรสม ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสุสิทธิ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ และอาจารย์ ดร. สุวัฒนา พุกษะศรี กรรมการการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ช่วยตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี และสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่สนับสนุนทุนการศึกษาและทุนวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณ คณะผู้บริหารและบุคลากรทุกท่านในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ ฝ่ายเทคโนโลยีอาหาร สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่ให้ความช่วยเหลือในด้านการศึกษาและการดำเนินการวิจัยให้สำเร็จได้ด้วยดี

ขอขอบคุณน้องๆ ในหลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ ที่ช่วยเหลือ แนะนำ และคอยเป็นกำลังใจตลอดการศึกษาและทำงานวิจัยให้แล้วเสร็จด้วยดี

ขอขอบคุณ ภรรยาและบุตรทั้งสอง ที่คอยเป็นกำลังใจขณะที่เรียนโดยตลอดและสุดท้ายนี้ ต้องขอขอบพระคุณบิดามารดาที่คอยสอบถามและให้กำลังใจตั้งแต่เรียนและทำงานวิจัยมาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฐ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฒ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 จุลินทรีย์ <i>Bifidobacteria</i>	5
2.2 ประโยชน์ของจุลินทรีย์ <i>Bifidobacteria</i>	8
2.2.1 ลดความรุนแรงของอาการโรคท้องร่วง.....	8
2.2.2 บรรเทาอาการแพ้แล็กโตส.....	9
2.2.3 ด้านการติดเชื้อ.....	9
2.2.4 บทบาทการป้องกันมะเร็งในลำไส้.....	10
2.2.5 ประสิทธิภาพการรักษาอาการโรคลำไส้อักเสบ.....	10
2.2.6 บรรเทาอาการท้องผูก.....	10
2.2.7 กระตุ้นภูมิคุ้มกัน.....	10
2.2.8 ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด.....	11
2.3 การพัฒนากระบวนการผลิตจุลินทรีย์ <i>Bifidobacteria</i>	11
2.4 จลนพลศาสตร์ของการหมัก.....	13

บทที่	หน้า
2.5 การออกแบบการทดลองโดยใช้หลักทางสถิติ.....	14
2.5.1 การคัดเลือกตัวแปรที่ผลต่อการทดลองด้วยวิธีการแบบ 2^k full factorial design.....	14
2.5.2 การหาค่าที่เหมาะสมของตัวแปรด้วยวิธีการแบบ Response Surface Methodology.....	17
3. อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย.....	21
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	21
3.1.1 วัสดุอุปกรณ์.....	21
3.1.2 สารเคมี.....	23
3.2 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ.....	24
3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย.....	24
3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	24
3.2.3 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์.....	27
3.2.4 การเตรียมกล้าเชื้อ.....	27
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	27
3.3.1 การคัดเลือกชนิดแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดแทนอาหาร MRS.....	27
3.3.1.1 ทดสอบการเจริญเชื้อ <i>B. animalis</i> TISTR 1925.....	28
3.3.2 การหาช่วงความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ เบื้องต้น.....	28
3.3.2.1 การหาปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ เบื้องต้น.....	28
3.3.2.2 การหาปริมาณความเข้มข้นของยูเรียเบื้องต้น.....	29
3.3.2.3 การหาปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลเบื้องต้น.....	29
3.3.3 การคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการ 2^k full factorial design.....	30
3.3.4 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหาร ด้วยวิธีการ Steepest ascent.....	31

บทที่	หน้า
3.3.5 การหาปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหาร ที่เหมาะสมด้วยวิธีการ Central composite Design (CCD).....	33
3.3.6 การทบทวนค่าประมาณการความเข้มข้นขององค์ประกอบใน สูตรอาหาร.....	34
3.3.7 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบบแบตช์.....	35
3.3.7.1 การศึกษาความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมต่อการเจริญ.....	35
3.3.7.2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ.....	36
3.4 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	36
3.4.1 การหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค Drop plate.....	36
3.4.2 การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric.....	37
3.4.3 การหาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Dumas combustion.....	38
4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	40
4.1 การคัดเลือกชนิดแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อ ทดแทนอาหาร MRS.....	40
4.2 การหาช่วงความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเบื้องต้น.....	42
4.2.1 การหาปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เบื้องต้น.....	42
4.2.2 การหาปริมาณความเข้มข้นของยูเรียเบื้องต้น.....	42
4.2.3 การหาปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลเบื้องต้น.....	44
4.3 การคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการ 2 ^k full factorial design.....	46
4.4 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหาร ด้วยวิธีการ Steepest ascent.....	49
4.5 การหาปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารที่ เหมาะสมด้วยวิธีการ Central composite Design (CCD).....	50
4.6 การทดสอบค่าประมาณการความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบ ในสูตรอาหาร.....	53
4.7 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบบแบตช์.....	54
4.7.1 การศึกษาความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมต่อการเจริญ.....	54

บทที่	หน้า
4.7.2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ.....	56
5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	59
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	77
ภาคผนวก ก.....	78
ภาคผนวก ข.....	84
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	87

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงการออกแบบการทดลอง 2^k full factorial design.....	15
2.2	แม่พิมพ์ค่าสัญลักษณ์ของผลการทดลองของตัวแปรหลักและตัวแปร เกิดปฏิสัมพันธ์.....	16
2.3	หลักเกณฑ์ในการยอมรับค่า R^2 และ Q^2	17
2.4	แสดงการออกแบบการทดลอง central composite design.....	18
2.5	แสดงค่าของจุด axial ที่แปรผันตามจำนวนของตัวแปร.....	18
3.1	การออกแบบการทดลองคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารด้วยวิธีการ 2^k full factorial design.....	30
3.2	การออกแบบการทดลองตามวิธีการของ steepest ascent.....	32
3.3	การออกแบบการทดลองตามวิธีการ Central Composite Design (CCD).....	34
3.4	ค่าประมาณการความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบในสูตรอาหาร.....	35
4.1	ความเข้มข้นของเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบชนิดต่าง.....	41
4.2	ชนิดของอาหารที่ให้การเจริญของเชื้อที่ดี.....	41
4.3	ความเข้มข้นของเชื้อในอาหารที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์แตกต่างกัน.....	42
4.4	ความเข้มข้นของเชื้อในอาหารที่มีปริมาณยูเรียซดเซยสารสกัดจากยีสต์ ในระดับที่แตกต่างกัน.....	43
4.5	ความเข้มข้นของเชื้อในอาหารที่มีปริมาณกากน้ำตาลที่แตกต่างกัน.....	44
4.6	ตารางแสดงการวิเคราะห์ค่าเสื่อมถอยจากการออกแบบการทดลองแบบ 2^k full factorial design.....	47
4.7	ความสัมพันธ์ระหว่างกากน้ำตาลและสารสกัดจากยีสต์ที่มีผลต่อ ความเข้มข้นของเซลล์.....	48
4.8	แสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของเซลล์ในอาหารที่มีกากน้ำตาลและ สารสกัดจากยีสต์จากการออกแบบการทดลองแบบ Steepest ascent.....	50
4.9	ตารางแสดงการวิเคราะห์ค่าเสื่อมถอยจากการออกแบบการทดลอง แบบ Central Composite Circumscribed (CCC).....	52
4.10	การทดสอบค่าประมาณการความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารทดแทน....	53

ตารางที่	หน้า
4.11 การเปรียบเทียบผลการเจริญของเชื้อระหว่างอาหารทดแทน (Modified MY) กับอาหาร MRS และอาหาร Milk based.....	54
4.12 แสดงค่าจลนพลศาสตร์แบบแบตชีในภาวะค่าความเร็วรอบในการกวนที่แตกต่างกัน.....	56
4.13 แสดงค่าจลนพลศาสตร์แบบแบตชีในภาวะค่า pH ที่แตกต่างกัน.....	56
ก. 1 การคำนวณต้นทุนอาหาร MRS ที่เติม 0.05 % L-cysteine– HCl.H ₂ O.....	82
ก. 2 การคำนวณต้นทุนอาหาร Milk based.....	83
ก. 3 การคำนวณต้นทุนอาหาร Modified MY.....	83
ข. 1 การปริมาณความเข้มข้นของเซลล์และสารอาหารสำหรับการเจริญของเซลล์.....	84
ข. 2 ค่าความขุ่นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน.....	85
ข. 3 แสดงค่าความขุ่นและปริมาณทั้งหมด.....	86

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 จุลินทรีย์ <i>Bifidobacteria sp.</i>	5
2.2 วิธี Fructose-6-phosphate shunt (bifidus shunt).....	6
2.3 กราฟเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์ประจำถิ่นจากอุจจาระทารกที่นมแม่กับนมขวด...	7
2.4 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการเลี้ยงแบบแบคทีเรีย.....	13
2.5 แบบภาพจำลองของการออกแบบของ 2 และ 3 ตัวแปร ของการออกแบบ การทดลอง ^{2^k} full factorial design.....	15
2.6 แบบภาพจำลองของการออกแบบของ 2 และ 3 ตัวแปร ของการออกแบบ การทดลอง Central composite design.....	19
4.1 กราฟสัดส่วนความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์กับยูเรียที่มีผลต่อความเข้มข้นของเชื้อ...	45
4.2 กราฟแสดงความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่มีผลต่อความเข้มข้นของเชื้อ.....	45
4.3 กราฟพื้นผิวตอบรับแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (ก.) กากน้ำตาลกับสาร สกัดจากยีสต์ (ข.) สารสกัดจากยีสต์กับยูเรีย และ (ค.) กากน้ำตาลกับยูเรีย.....	48
4.4 กราฟแสดงสัดส่วนความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อสารสกัดจากยีสต์ จากการออกแบบการทดลองแบบ Steepest ascent.....	50
4.5 กราฟพื้นผิวตอบรับแสดงปริมาณของกากน้ำตาลและสารสกัดจากยีสต์ที่ เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	52
4.6 ผลการเจริญของเชื้อ <i>B. animalis</i> TISTR 1925 ในภาวะความเร็วในกวน ผสมที่ 100 200 และ 300 รอบต่อนาที ต่อ (ก.) ปริมาณการใช้น้ำตาล และ (ข.) ปริมาณการใช้สารอาหารกลุ่มไนโตรเจน.....	55
4.7 ผลการเจริญและปริมาณการใช้น้ำตาลของเชื้อ <i>B. animalis</i> TISTR 1925 ในอาหารที่ควบคุมความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที (ก.) ค่า pH 6.0 (ข.) pH 6.5 และ (ค.) pH 7.0.....	57
4.8 ผลการเจริญและปริมาณการใช้น้ำตาลของเชื้อ <i>B. animalis</i> TISTR 1925 ในอาหารที่ควบคุมความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที (ก.) ค่า pH 6.0 (ข.) pH 6.5 และ (ค.) pH 7.0.....	58

ภาพที่		หน้า
ข. 1	กราฟการเจริญของเชื้อ <i>B. animalis</i> TISTR 1925 ในอาหารทดแทน ที่ควบคุมค่าความเร็รรอบในกวน 200 รอบต่อนาที pH 6.0.....	85
ข. 2	กราฟแสดงเส้นตรงของสารมาตรฐานกลูโคส.....	86

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	เปอร์เซ็นต์
mL	มิลลิลิตร
L	ลิตร
mg	มิลลิกรัม
g	กรัม
g/L	กรัมต่อลิตร
w/v	น้ำหนักต่อปริมาตร
h	ชั่วโมง
M	โมลาร์
rpm	รอบต่อนาที
log cfu/mL	log โคลิฟอร์มต่อมิลลิลิตร

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในช่วงเวลา 20 ปี ที่ผ่านมาจุลินทรีย์สายพันธุ์ *Bifidobacteria* ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากทั้งในด้านการนำมาใช้ประโยชน์ทางการค้าและการศึกษาค้นคว้าวิจัยในด้านวิทยาศาสตร์ โดย *Bifidobacteria* เป็นหนึ่งในกลุ่มจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีผลต่อสุขภาพจึงเป็นที่ยอมรับและมีความต้องการของตลาดผู้บริโภคสูงขึ้น (Granato และคณะ, 2010) *Bifidobacteria* ถูกค้นพบในอุจจาระเด็กทารกที่ดื่มนมแม่โดย Tissier และให้ชื่อว่า “*Bacillus bifidus*” เป็นจุลินทรีย์กลุ่มไม่ต้องการอากาศ (anaerobic) แกรมบวก ที่มีลักษณะเป็นตัววาย (Y shape) (Tissier, 1899; Tissier, 1900) อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่นที่อยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัยกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ทำให้ *Bifidobacteria* มีลักษณะเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ช่วยรักษาสมดุลในระบบทางเดินอาหารที่ก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ และบทบาทที่สำคัญของ *Bifidobacteria* ต่อสุขภาพของมนุษย์คือสามารถช่วยลดปัญหาโรคท้องร่วงที่เป็นปัญหาหลักของการเสียชีวิตในเด็กทั่วโลกได้ (WHO, 2003; FAO/WHO, 2002) มีรายงานว่า *Bifidobacteria* สามารถต้านทานจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร (food borne pathogen) รวมถึงสามารถกระตุ้นให้ร่างกายสร้าง cytokine ชนิดต่างๆที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ โดย *Bifidobacteria longum* สามารถยับยั้งสารก่อมะเร็งจำพวก Azoxymethan (AOM) ที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างเซลล์ผิดปกติที่บริเวณลำไส้ได้ นอกจากนี้แล้ว ยังพบว่า *Bifidobacteria* สามารถบรรเทาอาการแพ้แลคโทส เนื่องจากร่างกายขาดความสามารถในการผลิตเอนไซม์ lactase ซึ่งมักพบในผู้ใหญ่มากถึง 75 เปอร์เซ็นต์ของประชากรทั่วโลก โดยส่วนใหญ่จะพบในประเทศแถบทวีปแอฟริกา และเอเชีย สำหรับในประเทศไทยที่แม้ว่าในปัจจุบันจะมีการบริโภคผลิตภัณฑ์จากนมอย่างแพร่หลายก็ตาม แต่ปัญหาการแพ้แลคโทสก็ยังคงมีปรากฏอยู่บ้าง (Biavati และ Mattarelli, 2006; Bulhões และคณะ, 2007; Densupsontorn และคณะ, 2004; Fukushima และคณะ, 1998; Hosono และคณะ, 1997; Leahy และคณะ, 2005; Lee และคณะ, 2003; Marin และคณะ, 1997; Pribila และคณะ, 2000; Singh และคณะ, 1997; Ventura และคณะ, 2001)

ลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ต้องคำนึงถึง คือเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น Abe และคณะ (2009) ศึกษา *Bifidobacteria* 3 สายพันธุ์ได้แก่ *B. longum* BB536, *B. breve* M-16V และ *B. infantis* M-63 มีลักษณะไม่ย่อยเยื่อเมือก และไม่ก่อให้เกิดการติดเชื้อบริเวณผนังของลำไส้ ประกอบกับมีรายงานว่าพบ *B. animalis* - subsp. *lactis* และ *B. bifidum* ที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายในแม่ที่ตั้งครรภ์ช่วงท้ายและในเด็กทารกเกิดใหม่ในช่วง 6 เดือนแรก (Allen และคณะ, 2010) และลักษณะที่สำคัญอีกประการหนึ่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติก คือความสามารถในการอยู่รอดเมื่อผ่านเข้าสู่กระเพาะอาหาร ระบบการย่อยอาหาร และการฝังตัวที่ผนังของระบบทางเดินอาหาร (Kailasapathy และ Chin, 2000) ซึ่ง Gopal และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาการอยู่รอดของเชื้อ *B. animalis* subsp. *lactis* NH019 ในระบบทางเดินอาหาร (GIT) พบว่าเชื้อรอดชีวิตได้ในปริมาณที่สูงถึง 12.5×10^8 CFU/g ของอุจจาระเปียก ทำให้เห็นได้ว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถมีชีวิตในลำไส้ใหญ่และแสดงคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลที่พบว่าประเทศในทวีปยุโรปมักนิยมใช้ *B. animalis* เป็นผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก (Gueimonde และคณะ, 2004) และยังมีรายงานสนับสนุนเพิ่มเติมว่า *B. animalis* เป็นจุลินทรีย์ที่ถูกขึ้นทะเบียนอยู่กลุ่มจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย (GRAS : Generally Recognized As Safe) (Picard และคณะ, 2005)

จากสมบัติทางสรีรวิทยาของ *Bifidobacteria* จุลินทรีย์กลุ่มนี้มีเมแทบอลิซึมในการย่อยสลายทั้งโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ เช่นกลูโคส กาแลกโทส ซูโครส ฟรักโทสและแลคโทส ผ่านวิถี Hexose metabolic pathway ที่มี fructose-6-phosphate phosphoketolase (F6PPK) เป็นเอนไซม์ที่สำคัญและมีความจำเพาะกับจุลินทรีย์ *Bifidobacteria* โดยจะทำหน้าที่เปลี่ยน fructose-6-phosphate ที่ได้จากวิถี Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP) เป็น acetyl phosphate ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแอซิติค 3 โมเลกุล และในขณะเดียวกันเอนไซม์ F6PPK จะทำหน้าที่เปลี่ยน fructose-6-phosphate เป็น erythrose-4-phosphate เพื่อสร้าง glyceraldehydes-3-phosphate ร่วมกับวิถี EMP ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแล็กติก 2 โมเลกุล วิถีที่มีความจำเพาะนี้จึงมีชื่อเรียกว่า “bifidus pathway” (Scardovi, 1986; Vuyst , 2000)

ปัจจัยสำหรับการเจริญเติบโต (growth factor) หรือที่เรียกว่า bifidus factor (BF) ที่ค้นพบโดย Petuely และ Kristen (1953) โดยพบว่า *Bifidobacteria* ต้องการสารประกอบโปรตีนสายสั้น (peptide) และสารประกอบโพลิโกแซ็กคาไรด์พวกฟรักโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS) และกาแล็กโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (GOS) และนอกจากนี้ *Bifidobacteria* ยังมีความสามารถสร้าง

เอ็นไซม์ได้หลากหลายตามแต่ชนิดของคาร์โบไฮเดรต และภาวะแวดล้อมต่อการนำสารอาหารไปใช้ มีรายงานว่า *B. animalis* subsp. *lactis* เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ที่สร้างเอ็นไซม์ β -fructofuranosidases ได้ดีโดยใช้ซูโครสเข้าสู่กระบวนการ transfructosylation ได้เป็นสารประกอบฟรักโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ (FOS) ที่ถูกนำไปใช้ช่วงต้นสำหรับการเจริญของเชื้อ (Biavati และ Mattarelli, 2006; Janer และคณะ, 2004; Perrin และคณะ, 2001; Ehrmann และคณะ, 2003; Van den Broek และคณะ, 2008)

โดยทั่วไปกระบวนการเพาะเลี้ยงเซลล์ *Bifidobacteria* ในระดับอุตสาหกรรม มักนิยมใช้อาหารทดแทนที่มีส่วนประกอบของนม (Milk base medium) เนื่องจากนมเป็นแหล่งของโปรตีน ไขมัน ไวตามิน แร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญนอกเหนือไปจากแลคโทสที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (Gilliland และคณะ, 1985; Marshall และ Tamime, 1997) โดยมีการศึกษาการใช้อาหารทดแทนที่มีส่วนประกอบเป็นนมสำหรับกระบวนการผลิตเซลล์ *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 โดยให้ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ $9.129 \log_{10}$ cfu/mL สูงขึ้นจากเซลล์ตั้งต้น $3.329 \log$ cycles (Wong และคณะ, 2007) แต่สำหรับประเทศไทยนํ้านมเป็นผลิตผลทางการเกษตรที่มีปริมาณไม่เพียงพอต่อการบริโภคทำให้นํ้านมมีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งวัตถุดิบชนิดอื่นๆ จึงไม่เหมาะที่จะนำมาเป็นอาหารทดแทนสำหรับกระบวนการผลิตเซลล์ *Bifidobacteria* ในระดับอุตสาหกรรม

ในประเทศไทยมีการเพาะปลูกอ้อยเป็นพืชไร่จำนวนมาก โดยพบว่าปี 2554/55 สามารถเพาะปลูกอ้อยที่เป็นวัตถุดิบป้อนเข้าสู่กระบวนการผลิตทรายได้สูงถึง 97.9 ล้านตัน (รายงานการผลิตอ้อยและทรายฉบับปิดหีบ ปีการผลิต 2554/55) ทำให้ได้กากน้ำตาล (molasses) ที่เป็นผลพลอยได้ (by product) จากกระบวนการผลิตทรายประมาณ 4.3 ล้านตัน ซึ่งกากน้ำตาลจะอุดมไปด้วย แร่ธาตุ วิตามินบี ไบโอดีนและคาร์บอน 6 โมเลกุลที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมัก โดยพบการนำกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิต เอทานอล กรดอินทรีย์จากยีสต์ แบคทีเรีย และเชื้อรา และการผลิตเซลล์ของยีสต์เพื่อนำไปเป็นแหล่งสารอาหารโปรตีนทดแทน (Olbrich, 2006) และพบว่ามีการนำกากน้ำตาล เป็นตัวช่วยส่งเสริมการเจริญ (bifidus factor) ในการเลี้ยง *Bifidobacteria bifidum* no.1,791 ในอาหารทดแทนที่มีส่วนประกอบเป็นนม (Reyed และคณะ, 2008) จะเห็นได้ว่ากากน้ำตาลมีประสิทธิภาพและสมบัติที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบสำหรับกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมชีวภาพได้เป็นอย่างดี

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งพัฒนาสูตรอาหารชนิดใหม่ที่มีองค์ประกอบเป็นวัตถุดิบจากธรรมชาติ ราคาถูก สามารถหาใช้ได้ง่ายภายในประเทศ ซึ่งในที่นี้คือกากน้ำตาลมาเป็น

ส่วนประกอบหลักสำหรับกระบวนการผลิตเซลล์ *Bifidobacterium animalis* TISTR 1925 โดยอาศัยเทคนิคทางสถิติ (Response surface methodology) พร้อมทั้งศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการหมักแบบแบคทีเรียในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ เพื่อนำไปสู่กระบวนการผลิตเซลล์ สำหรับใช้เป็นผลิตภัณฑ์นม (dairy product) หรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับคนไทยในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

พัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทดแทนสูตรอาหารที่มีนมเป็นองค์ประกอบและหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ *B. animalis* TISTR 1925

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

คัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทดแทนสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 เมื่อได้สูตรอาหารทดแทนเบื้องต้นจะนำไปพัฒนาต่อ โดยการศึกษาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบแต่ละชนิด สำหรับนำไปใช้ในการทดสอบการคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารทดแทนที่มีผลต่อค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด โดยใช้การออกแบบการทดลองเป็นแบบ 2^k full factorial design แล้วทำการหาปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบที่เหมาะสม โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) เพื่อให้ได้สูตรอาหารทดแทนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ จากนั้นจึงทำการหาภาวะที่เหมาะสมของความเร็วในการกวนและค่า pH สำหรับการผลิตแบบแบคทีเรียในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้สูตรอาหารที่พัฒนาขึ้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อทดแทนสูตรอาหารที่มีนมเป็นองค์ประกอบและภาวะที่เหมาะสมเพื่อการผลิตเซลล์ *B. animalis* TISTR 1925

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 จุลินทรีย์ *Bifidobacteria*

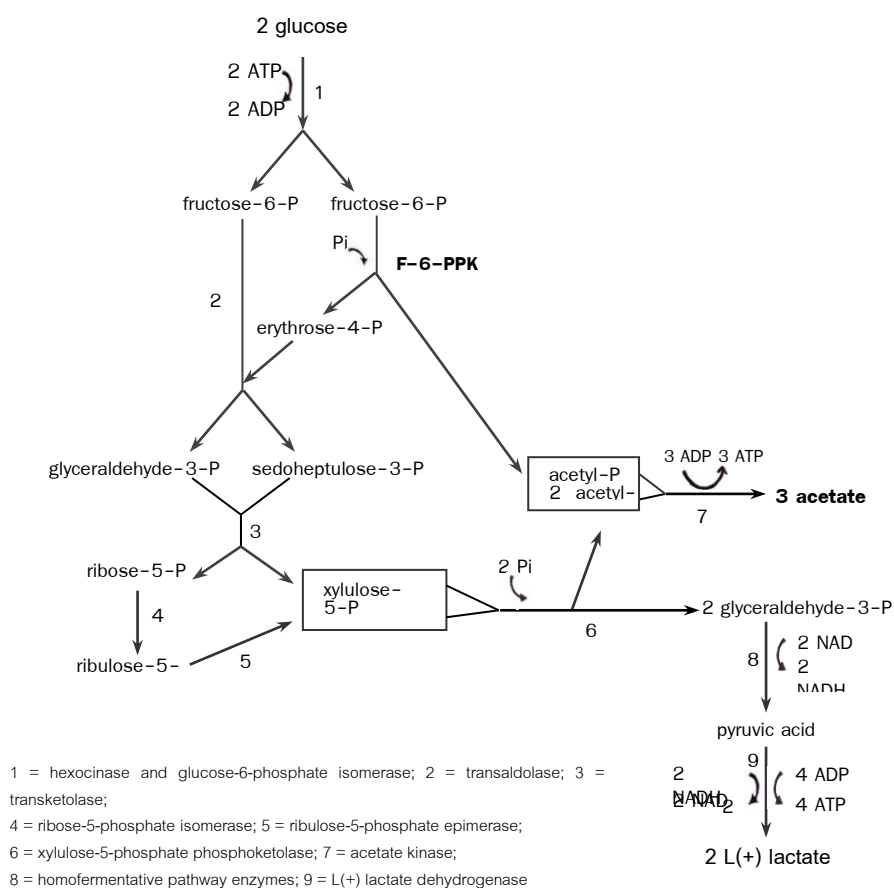
Bifidobacteria ถูกค้นพบครั้งแรกในอุจจาระเด็กโดย Tissier และถูกตั้งชื่อว่า “*Bacillus bifidus*” ต่อมา Winslow และคณะ (1917) ได้จัดจุลินทรีย์ชนิดนี้อยู่ในครอบครัว *Lactobacillaceae* ซึ่งต่อมาอีก 3 ปี Holland (1920) ได้ตั้งชื่อจุลินทรีย์ชนิดนี้ว่า *Lactobacillus bifidus* ซึ่งต่อมาในปี 1924 Orla-Jensen ได้จัดจุลินทรีย์ชนิดนี้เป็นตระกูล *Bifidobacterium* เนื่องจากมีลักษณะ (Taxonomy) ที่แตกต่างจากตระกูล *Lactobacillus* แต่หนังสือ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* พิมพ์ครั้งที่ 7 ก็ยังคงรวม *Bifidobacteria* อยู่ในตระกูล *Lactobacillus* เช่นเดิม ต่อมาในหนังสือ *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* พิมพ์ครั้งที่ 8 จุลินทรีย์ *Bifidobacteria* ได้ถูกจัดจำแนกอยู่ในตระกูล *Bifidobacterium* โดยใช้ชื่อของ Orla-Jensen ที่ได้ตั้งไว้ ต่อมาปี 1986 มีรายงานในหนังสือ *Bergey's Manual Systematic Bacteriology* พิมพ์ครั้งที่ 1 มีจำนวนสายพันธุ์ของ *Bifidobacterium* 24 สายพันธุ์ และในปี 2000 มีรายงานการค้นพบจุลินทรีย์ในตระกูล *Bifidobacterium* จำนวนทั้งสิ้น 32 สายพันธุ์ โดยมีลักษณะของเซลล์ที่มีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก มีรูปร่างเป็นท่อนที่มีลักษณะเป็นตัววาย ไม่ต้องการอากาศ (Anaerobic) (Tissier, 1899; Tissier, 1900 และ Biavati และ Mattarelli, 2006)



ภาพที่ 2.1 จุลินทรีย์ *Bifidobacteria* sp.

ที่มา : <http://optibacprobiotics.co.uk/shop/for-daily-immunity.html>

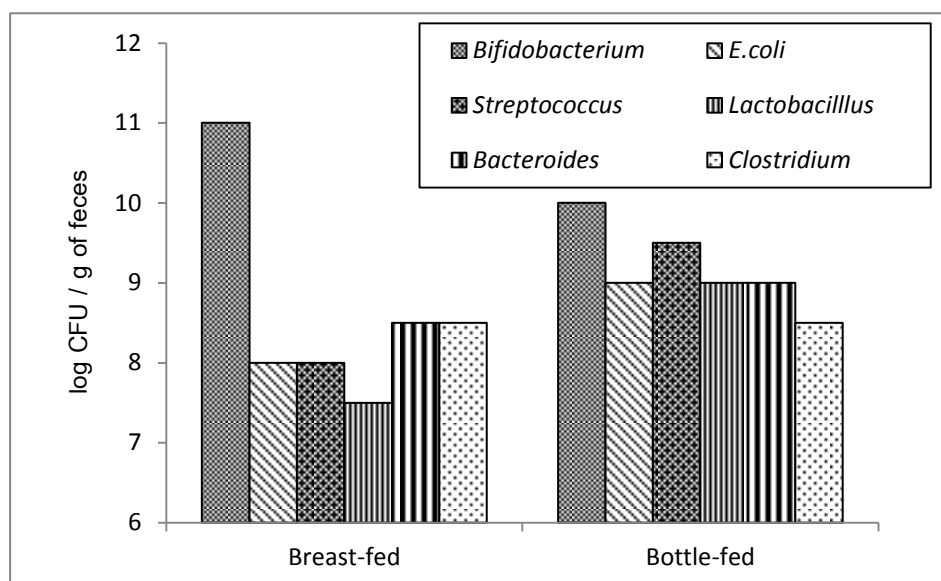
ลักษณะที่จำเพาะของ *Bifidobacteria* ที่ใช้สำหรับเป็นตัวบ่งชี้จุลินทรีย์กลุ่มนี้คือเอนไซม์ และวิถีการย่อยสลายแหล่งคาร์บอน โดย Scardovi และ Trovatelli (1965) และ De Vries และคณะ (1967) พบว่า *Bifidobacteria* มีเมแทบอลิซึมของการย่อยสลายที่ใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะที่เรียกว่า Fructose-6-phosphate phosphoketolase (F-6-PPK) ผ่านวิถี Hexose metabolic pathway ที่ถูกเรียกให้มีความจำเพาะว่า "Fructose-6-phosphate shunt หรือ bifidus shunt" โดยเอนไซม์จะเปลี่ยน fructose-6-phosphate ที่ได้จากวิถี Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP) เป็น acetyl phosphate ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดอะซิติก 3 โมเลกุล และในขณะเดียวกันก็จะทำหน้าที่เปลี่ยน fructose-6-phosphate เป็น erythrose-4-phosphate เพื่อสร้าง glyceraldehydes-3-phosphate ร่วมกับวิถี EMP ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก 2 โมเลกุล ทำให้ได้สัดส่วนการสร้างกรดแลคติกต่อกรดอะซิติกเป็น 1:1.5 ดังแสดงในรูป 2.2



ภาพที่ 2.2 วิถี Fructose-6-phosphate shunt (bifidus shunt)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Biavati และ Mattarelli, 2006

Bifidobacteria เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่มีปริมาณสูงสุดในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์เมื่อเทียบกับจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่นๆ โดยพบตั้งแต่เป็นเด็กทารกซึ่งมีปริมาณสูงสุดถึง 10^{11} cfu ต่อกรัมอุจจาระในเด็กทารกที่ดื่มนมมารดา ส่วนทารกที่ไม่ได้ดื่มนมมารดาก็ยังมีปริมาณของ *Bifidobacteria* ที่สูงกว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่นๆ เช่นกัน แม้ว่าจะมีปริมาณที่ต่ำกว่าเด็กที่ดื่มนมมารดาก็ตาม (Mitsuoka และ Keneuchi, 1977; Kleessen, 1995 และ Harmsen และคณะ, 2000) ดังแสดงในรูป 2.3



ภาพที่ 2.3 กราฟเปรียบเทียบปริมาณจุลินทรีย์ประจำถิ่นจากทารกที่ดื่มนมแม่กับนมขวด
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Biavati และ Mattarelli, 2006

การยึดเกาะผนังของทางเดินอาหารในเด็กทารกของจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bifidobacteria* พบว่าจะเริ่มยึดเกาะทันทีหลังจากคลอดมาได้ 1-2 วัน (Isolauri และคณะ, 2004) โดยพบว่า มีภายหลังการยึดเกาะปริมาณของ *Bifidobacteria* จะมีการเปลี่ยนแปลงตลอดเวลา อันเนื่องมาจากปัจจัยในการดำรงชีวิตของมนุษย์ตั้งแต่วัยเด็กถึงผู้ใหญ่ โดยมีรายงานว่าปัจจัยภายในร่างกาย เช่น ลักษณะทางสรีรวิทยาของมนุษย์ ชนิด จำนวน และคุณสมบัติของจุลินทรีย์ประจำถิ่น และปัจจัยที่เป็นสิ่งแวดล้อมภายนอกเช่น อาหาร พฤติกรรมของการบริโภค ความเครียด ซึ่งทั้งหมดจะส่งผลต่อการยึดเกาะผนังของทางเดินอาหารของจุลินทรีย์ประจำถิ่นทั้งสิ้น (Biavati และ

Mattarelli, 2006) นอกจากนี้มีรายงานว่าการใช้ยาปฏิชีวนะเช่นการใช้ยาตัวร่วมกันระหว่างแอมม็อกซิซิลินกับกรดคาร์วูลาริกจะส่งผลกระทบต่อปริมาณของ *Bifidobacteria* ลดลง (Mangin, 1999)

2.2 ประโยชน์ของจุลินทรีย์ *Bifidobacteria*

มีรายงานการวิจัย พบว่ามีปริมาณ *Bifidobacteria* สูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในลำไส้ในทารกแรกเกิด (Harmsen และคณะ, 2000 และ Favier และคณะ, 2002) และปริมาณจะลดลงเมื่อโตเป็นผู้ใหญ่และเหลืออยู่ประมาณ 3 ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอุจจาระ จนกระทั่งผู้สูงอายุจะปริมาณต่ำสุด (Hopkin และคณะ, 2001 และ Satokari และคณะ, 2003) จากที่กล่าวมาข้างต้นความเชื่อมโยงระหว่าง *Bifidobacteria* กับสุขภาพของมนุษย์มีส่วนเกี่ยวข้องกัน โดย Leahy และคณะ, 2005 ได้สรุปไว้ดังนี้

2.2.1 ลดความรุนแรงของอาการโรคท้องร่วง

โรคท้องร่วงที่เป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิตในเด็กทั่วโลก โดยเฉพาะกลุ่มประเทศที่กำลังพัฒนาที่มีสุขอนามัยในการบริโภคที่ไม่ดี (WHO, 2003) จากผลการวิจัย พบว่าจุลินทรีย์ *Bifidobacteria* และกลุ่มแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะมีส่วนช่วยลดปัญหาการเกิดโรคท้องร่วงได้เป็นอย่างดี โดยมีรายงานการวิจัยที่พบว่ามีการนำ *B. bifidum* ร่วมกับ *Streptococcus thermophilus* ผสมในสูตรนมสำหรับเด็กเพื่อลดการติดเชื้อโรคท้องร่วงจากเชื้อในกลุ่มโรต้าไวรัสในเด็กก่อน (Saavedra และคณะ, 1994) และมีรายงานว่ามีการใช้ *B. breve* ในการยับยั้งการติดเชื้อกลุ่มโรต้าไวรัสที่จะนำไปสู่โรคท้องร่วงในเด็กทารกและเด็กเล็กได้สำเร็จ (Bae และคณะ, 2002) และเมื่อเร็วนี้มีรายงานว่า *B. lactis* ที่สามารถป้องกันการติดเชื้อโรคท้องร่วงแบบเฉียบพลันในเด็กสุขภาพดีได้ (Chouraqui และคณะ, 2004)

การติดเชื้อโรคท้องร่วงส่วนใหญ่พบว่าผู้ป่วย 39 เปอร์เซ็นต์ มักใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษาซึ่งจะส่งผลให้จุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารถูกทำลายไปด้วยซึ่งส่งผลกระทบต่อปริมาณของเชื้อที่จะส่งผลกระทบต่อเนื่องกับอาการของโรคที่สัมพันธ์กับความเป็นพิษที่ถูกสร้างขึ้น (Surawicz, 2003) แต่มีรายงานที่เกี่ยวข้องกับเรื่องนี้ว่า *B. bifidum* มีบทบาทช่วยลดความเป็นพิษที่เกิดขึ้น และส่งผลให้ลดอัตราการเกิดผลของยาปฏิชีวนะต่อภาวะการติดเชื้อโรคท้องร่วง (Plummer และคณะ, 2004) บทบาทสำคัญอีกประการของจุลินทรีย์โพรไบโอติกคือช่วยลดการสูญเสียจากการติดเชื้อโรคท้องร่วง (Leahy และคณะ, 2005)

2.2.2 บรรเทาอาการแพ้แล็กโตส

ประชากรที่เป็นผู้ใหญ่ประมาณการ 2 ใน 3 ทั่วโลกต้องประสบปัญหาร่างกายไม่สามารถย่อยแล็กโตสได้ (Vesa และคณะ, 2000) โดยปัญหาดังกล่าว พบมากในการดื่มผลิตภัณฑ์นม แต่กลับไม่พบปัญหาการย่อยแล็กโตสกับการดื่มผลิตภัณฑ์นมเบรียว (Marteau และคณะ, 1990) ซึ่งพบว่าปริมาณของเอนไซม์แลคเตสที่สูงขึ้นมาจากจุลินทรีย์นมเบรียว โดยเมื่อถูกย่อยด้วยกรดเกลือในระบบทางเดินอาหารจะทำให้ปริมาณแลคเตสสูงขึ้น จึงทำให้บรรเทาอาการไม่ย่อยแล็กโตสได้ โดย Jiang และคณะ (1996) รายงานว่า *B. longum* เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีศักยภาพที่สามารถลดภาวะการเกิดอาการแพ้แล็กโตสได้

2.2.3 ด้านทานการติดเชื้อ

ผลของการป้องกันการติดเชื้อในลำไส้ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคท้องร่วงดังกล่าวมาแล้ว โดยพบว่าจุลินทรีย์ *Bifidobacteria* จะมีกิจกรรมที่เป็นประโยชน์กับจุลินทรีย์ก่อโรค (Servin, 2004) ซึ่งกลไกของการป้องกันไม่ได้มีความจำเพาะอย่างใดอย่างหนึ่ง แต่จะประกอบด้วยกลไกการป้องกันหลายรูปแบบคือ การสร้างกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือสารยับยั้งแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังเกิดกลไกการแก่งแย่งอาหาร การขัดขวางการยึดเกาะที่ผนังลำไส้ การลดความเป็นพิษที่เกิดขึ้น และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Steer และคณะ, 2000; Fooks และ Gibson, 2002 และ Rakoff-Nahoum และคณะ, 2004) จากข้อมูลเบื้องต้นที่กล่าวถึงความเชื่อมโยงระหว่างปริมาณ *Bifidobacteria* กับสุขภาพของมนุษย์พบว่ามีงานวิจัยของ Benno และคณะ (1989) ที่สอดคล้องกับแนวทางดังนี้ โดยมีการเปรียบเทียบในเด็กและผู้ใหญ่พบว่าในผู้ใหญ่วัยชราที่มีปริมาณ *Bifidobacteria* ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติต่ำมากในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจะส่งผลให้มีปริมาณของ *Clostridium perfringens* สูงขึ้น แต่ก็มีรายงานการวิจัยว่าถ้ามีการบริโภค *Bifidobacteria* ในปริมาณสูงจะส่งผลต่อปริมาณของเชื้อในกลุ่ม *Clostridium* ลดลง (Tanaka และคณะ, 1983) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Bifidobacteria* ยังมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่มอื่นๆ ดังนี้ มีประสิทธิภาพต้านทานเชื้อ *Salmonella typhimurium* (Silva และคณะ, 1999) ป้องกันการติดเชื้อ *Listeria monocytogenes* (Tourel และคณะ, 2003) เชื้อ *Campylobacter jejuni* (Fooks และ Gibson, 2003) และเชื้อ *Bacteroides vulgatus* (Shiba และคณะ, 2003)

2.2.4 บทบาทการป้องกันมะเร็งในลำไส้

มีข้อมูลการวิจัยที่พบว่า การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ประจำถิ่น ที่เป็นผลมาจากการบริโภคอาหารที่มีแต่เนื้อสัตว์และไขมันมีเส้นใยต่ำ จะส่งผลจุลินทรีย์ถูกทำลายมากขึ้นและส่งผลให้ปริมาณของ *Bifidobacteria* ลดลง (Benno และคณะ, 1991) จากการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นจะมีผลกระทบต่อกิจกรรมการสร้างเอนไซม์ในระบบขับถ่ายให้สูงขึ้นเช่น เอนไซม์ เบต้า กลูคูโรนิเดส อะซิไรด์คัสเตส ยูริเอส และไนโตรรีคัสเตส ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถเปลี่ยนไปเป็นสารกระตุ้นการเกิดโรคมะเร็งในลำไส้ได้ (Hirayama และ Rafter, 2000)

2.2.5 ประสิทธิภาพการรักษาอาการโรคลำไส้อักเสบ

จากข้อมูลพบว่าผู้ที่ป่วยเป็นโรคลำไส้อักเสบทั่วโลกมีประมาณ 2 ล้านคน และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในคนที่อยู่ในแถบยุโรปและอเมริกา โดยจะมีอาการไปขัดขวางการทำงานของลำไส้และทำให้เยื่อเมือกของผนังลำไส้อักเสบ (Chadwick และ Anderson, 1995) ซึ่งที่ผ่านมาได้มีการนำ *Bifidobacteria* ร่วมกันจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Lactobacillus* และกลุ่ม *Streptococcus* มาใช้ในการบรรเทาอาการและป้องกันโรค (Gionchetti และคณะ, 2000) ซึ่งกลไกการทำงานที่แท้จริงของจุลินทรีย์โพรไบโอติกกับการบรรเทาอาการโรคลำไส้อักเสบนั้นยังไม่มีข้อสรุปได้ชัดเจน แต่ถึงอย่างไรก็ตามจะพบว่าในระบบภูมิคุ้มกันจะมีการสร้างสาร cytokine ที่บริเวณเยื่อเมือกที่ผนังลำไส้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากจุลินทรีย์ และสารดังกล่าวจะทำงานร่วมกับ T cells ที่ทำหน้าที่หลักในการช่วยรักษาอาการอักเสบ

2.2.6 บรรเทาอาการท้องผูก

อาการท้องผูกเป็นปัญหาที่สำคัญของหลายคน โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้สูงอายุ (Wanitschke และคณะ, 2003) ความสามารถของจุลินทรีย์โพรไบโอติกต่อการบรรเทาอาการท้องผูกนั้นยังไม่ชัดเจน แต่ก็พบว่าจุลินทรีย์ในตระกูล *Bifidobacteria* มีส่วนเกี่ยวข้องกับการบรรเทาอาการท้องผูกได้ โดย Kleessen และคณะ (1997) และ Kumemura และคณะ (1992) ได้ศึกษาการใช้ โพรไบโอติกที่มีผลต่อการเจริญของ *Bifidobacteria* ในลำไส้ใหญ่ โดยส่งผลที่ชัดเจนในการขับถ่ายที่ดีขึ้น

2.2.7 กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

จุลินทรีย์ประจำถิ่นตามธรรมชาติในลำไส้จะมีหน้าที่สำคัญในการป้องกันแอนติเจนที่เกิดจากจุลินทรีย์และอาหาร (Guarner และ Malagelada, 2003) ดังนั้นจึงพอที่จะ

สรุปได้ว่าจุลินทรีย์โพรไบโอติกมีผลโดยตรงหรือโดยอ้อมต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Tlaskalova-Hogenova และคณะ, 2004) โดยเมื่อไม่นานมานี้ได้พบว่าเมื่อบริโภค *B. lactis* ในรูปแบบของอาหารสามารถทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันดีขึ้น (Arunachalam และคณะ, 2000 และ Chiang และคณะ, 2000) และพบว่า *B. infantis* สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันให้สร้าง Th2 cytokines เมื่อระบบภูมิคุ้มกันพบแอนติเจน (Lee และคณะ, 2004)

2.2.8 ลดปริมาณคอเลสเตอรอลในเลือด

เบื้องต้นพบว่ามีหลักฐานการใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกโดยเฉพาะ *Bifidobacteria* ในการลดคอเลสเตอรอลในเลือด (Dambekodi และ Gilliland, 1998 และ Xiao และคณะ, 2003) และพบว่าเมื่อบริโภคจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะทำให้มีการสร้างเอนไซม์ Bile salt hydrolase (BSHs) ที่มีส่วนช่วยลดคอเลสเตอรอลในเลือดได้ (De smet และคณะ, 1998 และ St-Onge และคณะ, 2000)

2.3 การพัฒนากระบวนการผลิตจุลินทรีย์ *Bifidobacteria*

จากการที่ *Bifidobacteria* มีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทั้งในรูปแบบผลิตภัณฑ์นมและอาหารเสริมสุขภาพ การผลิตเซลล์จึงมีความสำคัญเป็นอย่างมากเพื่อที่จะให้เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค จากคุณสมบัติที่จุลินทรีย์ *Bifidobacteria* มีเมแทบอลิซึมของการย่อยสลายทั้งโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่ จึงนำไปสู่การวิจัยเพื่อการพัฒนากระบวนการผลิตเซลล์ดังนี้

Trojanova และคณะ (2006) ได้ศึกษาความแตกต่างการนำไปใช้ของกลูโคสและราฟฟิโนสของ *B. breve* และ *B. animalis* เพื่อที่จะนำข้อมูลไปพัฒนาสูตรอาหารชนิดใหม่สำหรับการเลี้ยง *Bifidobacteria*

Kim และคณะ (2003) เปรียบเทียบปริมาณการนำไปใช้แลคโตสและกลูโคสของ *B. longum* ในกระบวนการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ซึ่งพบว่าแลคโตสมีประสิทธิภาพการสร้างเซลล์สูงสุด ($Y_{x/s}^{max}$) มากกว่ากลูโคส ซึ่งเหมาะสมกับการนำไปใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงกว่ากลูโคส แต่ก็พบว่าอัตราการนำไปใช้จำเพาะ (q_s) ของกลูโคสจะสูงกว่าแลคโตส

Hyun และคณะ (1995) เปรียบเทียบการใช้ในกระบวนการผลิตเซลล์ *B. longum* สามารถใช้กลูโคสสำหรับการเจริญได้ดี ส่วน *B. breve* สามารถใช้แลคโตสสำหรับการเจริญได้ดี

Amaretti และคณะ (2007) ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์และเมแทบอลิซึมของการย่อยสลายกลูโคส กาแลคโตส แลคโตส และกาแล็คโตโอลิโกแซ็กคาไรด์ สำหรับการเจริญของเชื้อ *B.*

adolescentis MB 239 โดยพบว่ากาแล็กโตสให้ผลอัตราการเจริญและประสิทธิภาพการสร้างเซลล์สูงที่สุด รองลงมาคือแล็กโตส กาแล็กโตโอลิโกแซ็กคาไรด์และต่ำสุดคือกลูโคส

Mahalakshmi และ Murthy (2000) พัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อจากเวย์ที่เป็นของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็ง เพื่อใช้สำหรับการเลี้ยง *B. bifidum* โดยพบว่าเวย์ที่มีองค์ประกอบเป็นแล็กโตส สามารถนำมาเป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงสูตรทดแทนได้

Wong และคณะ (2007) พัฒนาสูตรอาหารที่ใช้นม (milk-based medium) ที่มีแล็กโตสเป็นองค์ประกอบหลักในการเลี้ยง *B. pseudocatenulatum* G4 โดยสามารถพัฒนาสูตรอาหารทดแทนแล้วให้ปริมาณการเจริญสูงสุดถึง $9.129 \log_{10}$ cfu/ml

นอกจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นปัจจัยหลักต่อการเจริญของเชื้อแล้ว ยังมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยสำหรับการเจริญ (bifidus factors) ที่มีความสำคัญอย่างมากเช่นกัน

Van der Meulen และคณะ (2004) ศึกษาการเลี้ยง *B. animalis* DN-173 010 ในอาหารที่มีแหล่งของพลังงานแตกต่างกันคือ กลูโคส ฟรักโทส กาแล็กโตส แล็กโตส และซูโครส พบว่าการเจริญของเชื้อต้องมี bifidus factors ที่เป็นสารประกอบสายสั้นของโอลิโกแซ็กคาไรด์

Janer และคณะ (2004) พบว่า whey protein concentrate มีองค์ประกอบเป็น α -lactalbumin และ β -lactoglobulin ที่มีสมบัติเป็น bifidus factors ทำให้การเจริญของ *B. lactis* ในนมสูงถึง $9.1 \log_{10}$ cfu/ml

และยังมีงานวิจัยของ Liew และคณะ (2005) และ Wong และคณะ (2007) ที่ใช้สารสกัดจากยีสต์เป็น bifidus factors ในการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเลี้ยง *Lactobacillus rhamnosus* และ *B. pseudocatenulatum* G4 ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Reyed และ El-Diwany (2008) พบว่ากากน้ำตาลน้ำตาลที่มีน้ำตาลเป็นสารตั้งต้นสำหรับการเปลี่ยนเป็นสารประกอบโอลิโกแซ็กคาไรด์ ที่มีคุณสมบัติเป็น bifidus factors การเลี้ยง *Bifidobacteria* และ *Lactobacillus* ในนม

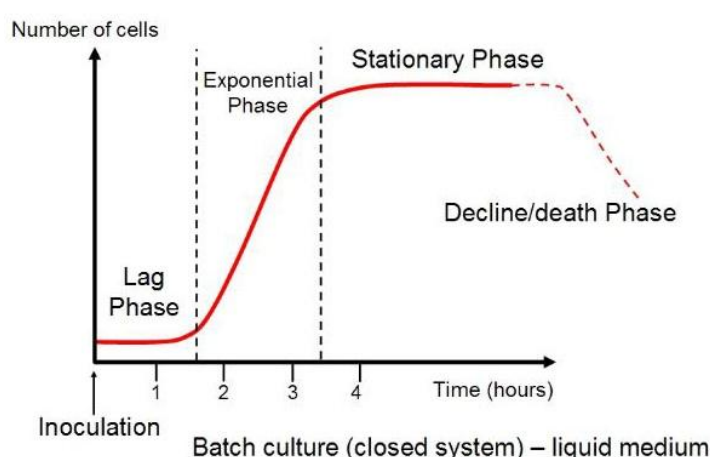
ส่วนปัจจัยด้านกายภาพโดยพบว่าผลกระทบจากการกวนผสมมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เนื่องจากการกระจายตัวของสารอาหาร ความร้อนที่เกิดขึ้นจากการเลี้ยง และการกวนผสมที่ดีจะส่งผลต่อการควบคุมค่า pH (Hsu และ Wu, 2002) และพบว่าขณะที่ *Bifidobacteria* กำลังเจริญเติบโตค่า pH ในการเลี้ยงจะลดลงอย่างรุนแรงจากการสะสมของกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้น จึงทำให้ต้องมีการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อเลี้ยง (Wong และคณะ, 2007) โดยมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ดังนี้

Wong และคณะ (2007) ได้ศึกษาค่า pH และความเร็วที่ปลายไมทอนในการเลี้ยง *B. pseudocatenulatum* G4 ในอาหาร milk-based medium โดยพบว่าค่าความเร็วที่ปลายไมทอนที่ 0.56 เมตรต่อวินาที ค่า pH ที่ 6.5 ให้ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ 1.687×10^9 cfu/mL

Rasic และ Kurmann (1983) รายงานว่าค่า pH ที่เหมาะสมกับการเจริญของ *B. bifidum* จะอยู่ในช่วง 6.0-7.0 และเชื้อจะไม่เจริญเมื่อค่า pH มีค่าตั้งแต่ 5.5 ลงมา โดยพบว่ามีการใช้ค่า pH ที่ 6.2 ในระหว่างการศึกษากระบวนการผลิตที่เหมาะสมของเชื้อ *B. longum* (Kiviharju และคณะ, 2005)

2.4 จลนพลศาสตร์ของการหมัก

จลนพลศาสตร์ของการหมัก เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เช่น การเปลี่ยนแปลงค่า pH การใช้สารอาหาร และการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก โดยการเติบโตของจุลินทรีย์ในการเลี้ยงแบบแบตช์ในอาหารเหลวจะแบ่งออกได้เป็นระยะต่างๆ ดังนี้ ระยะการปรับตัว (lag phase) เป็นระยะการปรับตัวของจุลินทรีย์เมื่อเริ่มต้นกระบวนการ และเข้าสู่ระยะการเติบโต (exponential phase) ซึ่งเป็นระยะที่มีอัตราการเจริญสูงสุด เมื่อถึงจุดหนึ่งอัตราการเจริญจะเริ่มคง (stationary phase) และหลังจากระยะนี้ภาวะต่างๆ ในการเลี้ยงเริ่มสะสมไปด้วยของเสียจากการเจริญประกอบกับอาหารเริ่มหมดลงและตัวเซลล์จุลินทรีย์มีอายุมากขึ้นเซลล์เริ่มตาย (death phase) ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.4 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในการเลี้ยงแบบแบตช์
ที่มา : http://cronodon.com/BioTech/Bacteria_Growth.html

ในระยะเวลาเติบโตจะเป็นระยะที่เซลล์มีการแบ่งตัวแบบพหุคูณ สมการการแสดงอัตราการเติบโตของจุลินทรีย์ได้สมการที่ (1)

$$dCx / dt = \mu Cx \dots\dots\dots (1)$$

เมื่อ Cx = ความเข้มข้นของเซลล์

t = เวลา (ชั่วโมง)

μ = อัตราการเติบโตจำเพาะของจุลินทรีย์ (ต่อชั่วโมง)

เมื่อใส่ค่าลอการิทึมในสมการที่ (1) จะได้

$$\ln X_1 = \ln X_0 + \mu t \dots\dots\dots (2)$$

เมื่อเขียนกราฟระหว่างค่าลอการิทึมของความเข้มข้นของเซลล์กับเวลา ในช่วงเวลาที่เซลล์เติบโต (exponential phase) จะได้ค่าความลาดชันเท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ (μ)

2.5 การออกแบบการทดลองโดยใช้หลักทางสถิติ

การออกแบบการทดลองทางสถิติเป็นการออกแบบที่ประกอบไปด้วย เทคนิคการสร้างแบบจำลองเชิงถดถอย และการหาค่าที่เหมาะสม (optimization) ซึ่งสามารถใช้เป็นเครื่องมือในการพัฒนากระบวนการผลิตได้ โดยการออกแบบการทดลอง โดย Lundstedt และคณะ (1998) และ Gabrielsson และคณะ (2002) ได้สรุปไว้ดังนี้

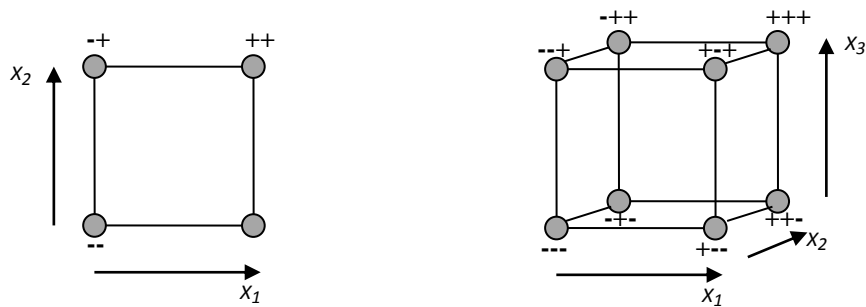
2.5.1 การคัดเลือกตัวแปรที่มีผลต่อการทดลองด้วยวิธีการ 2^k full factorial design

เป็นการออกแบบการทดลองเพื่อหาตัวแปรที่มีผลต่อการทดลองและศึกษาผลกระทบของการเกิดปฏิสัมพันธ์กันของตัวแปรที่มีผลต่อค่าในการทดลอง โดยการกำหนดระดับของปริมาณค่าสูง (+) ค่าต่ำ (-) และค่ากึ่งกลางของตัวแปร (0) ซึ่งการออกแบบแต่ละครั้งควรมีค่ากึ่งกลางควรมีการกำหนดซ้ำประมาณ 3 ถึง 4 ซ้ำ เพื่อลดความเสี่ยงโดยที่เราไม่ทราบของการเกิดความโค้ง (non-linear) ในการออกแบบการทดลอง ซึ่งกำหนดให้จำนวนของตัวแปรที่มีค่าเท่ากับ k และจำนวนของการทดลองมีค่าเท่ากับ 2^k การทดลอง ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และแบบภาพจำลองของการออกแบบ ตามภาพที่ 2.4 ดังนี้

ตารางที่ 2.1 แสดงการออกแบบการทดลอง 2^k full factorial design

Two variables			Three variables			
Exp. no	Variables		Exp. no	Variables		
	X_1	X_2		X_1	X_2	X_3
1	-	-	1	-	-	-
2	+	-	2	+	-	-
3	-	+	3	-	+	-
4	+	+	4	+	+	-
5	0	0	5	-	-	+
6	0	0	6	+	-	+
7	0	0	7	-	+	+
8	0	0	8	+	+	+
			9	0	0	0
			10	0	0	0
			11	0	0	0
			12	0	0	0

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Lundstedt และคณะ, 1998



ภาพที่ 2.5 แบบภาพจำลองของการออกแบบของ 2 และ 3 ตัวแปรของการออกแบบการทดลอง 2^k full factorial design ตามลำดับ

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Lundstedt และคณะ, 1998

จากผลการออกแบบจะมีการประเมินผลการคัดเลือกตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการทดลองโดยการใช้สมการหลายจำนวน (polynomial model) โดยใช้ผลจากการทดลองคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์ (β) ที่ต้องใช้สัญลักษณ์ระบุค่าผลการทดลองตามตารางที่ 2.2 ดังนี้

ตารางที่ 2.2 แม่พิมพ์ค่าสัญลักษณ์ของผลการทดลองของตัวแปรหลักและตัวแปรเกิดปฏิสัมพันธ์

I	X_1	X_2	X_3	X_1X_2	X_1X_3	X_2X_3	$X_1X_2X_3$
+	-	-	-	+	+	+	-
+	+	-	-	-	-	+	+
+	-	+	-	-	+	-	+
+	+	+	-	+	-	-	-
+	-	-	+	+	-	-	+
+	+	-	+	-	+	-	-
+	-	+	+	-	-	+	-
+	+	+	+	+	+	+	+

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Lundstedt และคณะ, 1998

$$y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{123}X_1X_2X_3$$

เมื่อ β_0 คือค่าเฉลี่ยของค่าในการทดลองทั้งหมด

$\beta_{1,3}$ คือค่าเฉลี่ยของค่าในการทดลองตามสัญลักษณ์ของแต่ละตัวแปรหลัก

$\beta_{12, 13, 23, 123}$ คือค่าเฉลี่ยของค่าในการทดลองตามสัญลักษณ์ของแต่ละตัวแปรหลักที่เกิดปฏิสัมพันธ์กัน

โดยค่า β จะเป็นบ่งบอกอิทธิพลของตัวแปรในด้านบวกที่ส่งผลให้ค่าจากการทดลองสูงขึ้นหรือในด้านลบที่ส่งผลให้ค่าจากการทดลองลดต่ำลง และภายหลังจากการวิเคราะห์ผลด้วยสมการหลายตัวแปรแล้วจะทำการวิเคราะห์การถดถอย (regression analysis) ของ 2^k full factorial design เพื่อตรวจสอบการออกแบบ ค่าของตัวแปรหลัก ค่าตัวแปรหลักที่เกิดปฏิสัมพันธ์กัน ว่าให้ผลความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ (significant) พร้อมกับการตรวจสอบค่า R^2

(variation) และ Q^2 หรือ predicted R^2 (predicted variation) โดยมีหลักเกณฑ์ในการยอมรับดังตารางที่ 2.3 ดังนี้

ตารางที่ 2.3 หลักเกณฑ์ในการยอมรับค่า R^2 และ Q^2

Nature of data	R^2	Q^2
Chemical	Acceptable ≥ 0.8	Acceptable ≥ 0.5 Excellent > 0.8
Biological	Acceptable ≥ 0.7	Acceptable ≥ 0.4

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Lundstedt และคณะ, 1998

2.5.2 การหาค่าที่เหมาะสมของตัวแปรด้วยวิธีการแบบ Response Surface

Methodology (RSM)

ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่แตกต่างกัน กับค่าหรือผลการทดลองที่เรายอมรับ (response) ได้ชัดเจนและดีที่สุด ในรูปแบบสมการหลายตัวแปรที่ประกอบด้วยค่ายกกำลังสอง (quadratic term) ดังสมการที่ (1) ดังนี้

$$y = \beta_0 + \sum_1^k \beta_i x_i + \sum_1^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i < j} \sum \beta_{ij} x_i x_j + \epsilon \dots\dots\dots (1)$$

โดยชนิดของการออกแบบที่นิยมใช้กันคือ Central composite design (CCD) ซึ่งมีการออกแบบที่ประกอบด้วยส่วนที่เป็น Full factorial หรือ Fractional factorial design จุดกึ่งกลางของตัวแปรและจุดที่ตั้งอยู่บนแกนกลางของการออกแบบแต่มีระยะห่างจากจุดกึ่งกลางที่มีความจำเพาะกับการออกแบบเรียกว่า จุด axial ($\pm\alpha$) โดยมีแบบภาพจำลองของการออกแบบของ 2 และ 3 ตัวแปรดังแสดงในตารางที่ 2.4 และ ตารางที่ 2.5 แสดงค่าของจุด axial ที่แปรผันตามจำนวนของตัวแปรพร้อมกับภาพที่ 2.5 ที่แสดงแบบภาพจำลองของการออกแบบการทดลอง Central composite design ดังนี้

ตารางที่ 2.4 แสดงการออกแบบการทดลอง central composite design

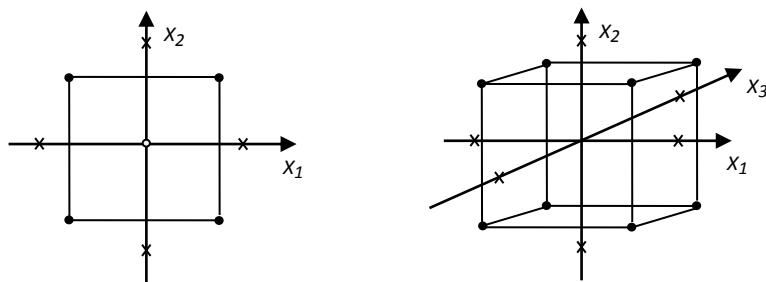
Two variables			Three variable			
X_1	X_2		X_1	X_2	X_3	
-1	-1	Factorial design	-1	-1	-1	Factorial design
1	-1		1	-1	-1	
-1	1		-1	1	-1	
1	1		1	1	-1	
0	0	Central points	-1	-1	1	
$-\alpha$	0	Axial points	1	-1	1	
α	0		-1	1	1	
0	$-\alpha$		1	1	1	
0	α		0	0	0	Central points
			$-\alpha$	0	0	Axial points
			α	0	0	
			0	$-\alpha$	0	
			0	α	0	
			0	0	$-\alpha$	
			0	0	α	

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Lundstedt และคณะ, 1998

ตารางที่ 2.5 แสดงค่าของจุด axial ที่แปรผันตามจำนวนของตัวแปร

Number of variable	2	3	4	5	5	6	6
				2^{5-1}			2^{6-1}
Number of experiments in the factorial design	4	8	16	32	16	64	32
Number of axial points (α)	4	6	8	10	10	12	12
Value of axial points (α)	1.414	1.682	2.000	2.378	2.000	2.828	2.378

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Lundstedt และคณะ, 1998



ภาพที่ 2.6 แบบภาพจำลองของการออกแบบของ 2 และ 3 ตัวแปรของการออกแบบการทดลอง Central composite design โดย (●) เป็นจุดของ factorial design (o) เป็นจุดกึ่งกลางของค่าตัวแปร และ (x) เป็นจุด Axial
ที่มา : ดัดแปลงมาจาก Lundstedt และคณะ, 1998

ซึ่งการออกแบบการทดลองทางสถิติเพื่อหาตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการทดลองและนำไปสู่การหาค่าที่เหมาะสมสำหรับพัฒนากระบวนการผลิตนั้น ในสาขาด้านเทคโนโลยีชีวภาพเริ่มมีการนำมาใช้เพิ่มขึ้น ดังมีรายงานการวิจัยต่อไปนี้

Liew และคณะ (2005) ศึกษาองค์ประกอบ ปริมาณและภาวะที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต *L. rhamnosus* โดยใช้การออกแบบการทดลองแบบ response surface methodology พบว่าปริมาณที่เหมาะสมของวิตามินอยู่ที่ 1.28 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 5.01 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ 6.0 เปอร์เซ็นต์ และค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ที่ 6.9

Kong และคณะ (2004) พัฒนาองค์ประกอบและหาปริมาณที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium butyricum* ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ response surface methodology ซึ่งหาปริมาณองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมได้สำเร็จ โดยสามารถเลี้ยงเชื้อ *C. butyricum* ได้สูงถึง 10^9 cfu/mL และสูงกว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นถึง 100 เท่า

Kiviharju และคณะ (2005) ศึกษาหาปริมาณที่เหมาะสมของกระบวนการผลิตเชื้อ *B. longum* ของกระบวนการหมัก โดยพบว่าองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อคือ สารสกัดจากยีสต์และกลูโคส มีปริมาณที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตที่ 35 กรัมต่อลิตร และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงอยู่ที่ 40 องศาเซลเซียส

Wong และคณะ (2007) ศึกษาหาปริมาณขององค์ประกอบที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรนม (milk medium) โดยใช้วิธีการออกแบบการทดลองแบบ response surface methodology เพื่อเลี้ยงเชื้อ *B. pseudocatenulatum* G4 พบว่าได้ปริมาณที่เหมาะสมของหางนม

และสารสกัดจากยีสต์ที่ 2.8 เปอร์เซ็นต์ และ 2.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยให้ค่าปริมาณความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ $9.129 \log_{10}$ cfu/mL ซึ่งสามารถประหยัดต้นทุนของหางนมลงได้ถึง 71.8 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์

อุปกรณ์	รุ่น	บริษัท	ประเทศ
เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic balance)	A200S	Sartorius AG	เยอรมัน
เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic balance)	BA310S	Sartorius AG	เยอรมัน
เครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave)	HV-25, HV-85	HIRAYAMA	ญี่ปุ่น
เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer)	VSM-3 Mixer	Shelton Scientific	อเมริกา
ตู้เขี่ยเชื้อและบ่มเชื้อแบบไร้อากาศ (Anaerobic workstation)	Bactron I-2	Sheldon	อเมริกา
โปรแกรมการออกแบบการทดลอง (Design Expert)	Design-Expert Version 8.0.7.1	Stat-Ease, Inc	อเมริกา

เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ ขนาด 12 ลิตร (Bioreactor)	Biostat C	Sartorius AG	เยอรมัน
เครื่องผสมก๊าซ (Gas mixer)	Biostat C	Sartorius AG	เยอรมัน
มาตรฐานวัดความเป็นกรด-เบส (pH combination electrode)	405-DPAS- SC-K8S/120	Mettler-Toledo	อเมริกา
มาตรฐานวัดออกซิเจนที่ละลาย (Dissolved oxygen electrode)	InPro 6900 /12/120	Mettler-Toledo	อเมริกา
ตัวกรองอากาศ (0.20µm PTFE)	Minisart® 2000	Sartorius AG	เยอรมัน
เครื่องวิเคราะห์การดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	UVIKON XS	ECOMAM-ALES	ฝรั่งเศส
เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge)	Suprema 25	TOMY SEIKO	ญี่ปุ่น
เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge)	SIGMA 1-14	SIGMA GmbH	เยอรมัน
เครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (Dumas combustion)	FP528	LECO Corporation	อเมริกา
Tin capsule	Leco	LECO Corporation	อเมริกา
Tin foil cub	Leco	LECO Corporation	อเมริกา

ก๊าซฮีเลียม	Thai Japan Gas	ไทย
-------------	----------------	-----

ก๊าซออกซิเจน	Thai Japan Gas	ไทย
--------------	----------------	-----

3.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัท	ประเทศ
Agar	Merck	เยอรมัน
Ammonium sulfate ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck	เยอรมัน
Di-potassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	Ajax	นิวซีแลนด์
EDTA	Leco	อเมริกา
Fructose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Ajax	นิวซีแลนด์
Glucose (C ₆ H ₁₂ O ₆)	Ajax	นิวซีแลนด์
Glycerol (C ₃ H ₈ O ₃)	Merck	เยอรมัน
L-cysteine– HCl.H ₂ O	Merck	เยอรมัน
Molasses	โรงงานราชบุรี	ไทย
MRS broth	Difco	อเมริกา
Sodium hydroxide (NaOH)	Ajax	นิวซีแลนด์

Phenol (C ₆ H ₆ O)	Merck	เยอรมัน
Sucrose (C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁)	Ajax	นิวซีแลนด์
Sulfuric acid (H ₂ SO ₄)	QReC	นิวซีแลนด์
Urea ((NH ₂) ₂ CO)	Ajax	นิวซีแลนด์
Yeast extract	Bio springer	ฝรั่งเศส

3.2 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

3.2.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา คือ *Bifidobacterium animalis* TISTR 1925 จาก ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (ภูษิตา และคณะ, 2548)

3.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

De Man,Rogosa, Sharpe (MRS) เดิม 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

L-cysteine– HCl.H₂O

Proteose peptone	10.0	กรัมต่อลิตร
Beef extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.0	กรัมต่อลิตร
Dextrose	20.0	กรัมต่อลิตร
Polysorbate 80	1.0	กรัมต่อลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5.0	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulfate	0.1	กรัมต่อลิตร
Manganese sulfate	0.05	กรัมต่อลิตร
Di-potassium phosphate	2.0	กรัมต่อลิตร

L-cysteine– HCl.H₂O 0.5 กรัมต่อลิตร
 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

อาหาร GYS

Glucose	20	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.33	กรัมต่อลิตร
Ammonium sulfate	13.36	กรัมต่อลิตร
Di-potassium phosphate	2.0	กรัมต่อลิตร
L-cysteine– HCl.H ₂ O	0.5	กรัมต่อลิตร

อาหาร FYS

Fructose	20	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.33	กรัมต่อลิตร
Ammonium sulfate	13.36	กรัมต่อลิตร
Di-potassium phosphate	2.0	กรัมต่อลิตร
L-cysteine– HCl.H ₂ O	0.5	กรัมต่อลิตร

อาหาร SYS

Sucrose	19	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.33	กรัมต่อลิตร
Ammonium sulfate	13.36	กรัมต่อลิตร
Di-potassium phosphate	2.0	กรัมต่อลิตร
L-cysteine– HCl.H ₂ O	0.5	กรัมต่อลิตร

อาหาร MYS

Molasses	20	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.33	กรัมต่อลิตร
Ammonium sulfate	13.36	กรัมต่อลิตร

Di-potassium phosphate	2.0	กรัมต่อลิตร
L-cysteine– HCl.H ₂ O	0.5	กรัมต่อลิตร

อาหาร MYU

Molasses	20	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.33	กรัมต่อลิตร
Urea	6.07	กรัมต่อลิตร
Di-potassium phosphate	2.0	กรัมต่อลิตร
L-cysteine– HCl.H ₂ O	0.5	กรัมต่อลิตร

อาหาร MY

Molasses	20	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.33	กรัมต่อลิตร
Di-potassium phosphate	2.0	กรัมต่อลิตร
L-cysteine– HCl.H ₂ O	0.5	กรัมต่อลิตร

อาหาร Modified MY

Molasses	46.5	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	8.0	กรัมต่อลิตร
Di-potassium phosphate	2.0	กรัมต่อลิตร
L-cysteine– HCl.H ₂ O	0.5	กรัมต่อลิตร

อาหาร Milk based medium

Skim milk	28	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	22	กรัมต่อลิตร

โดยส่วนประกอบแต่ละตัวทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้น สารสกัดจากยีสต์ใช้อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.2.3 วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์

เคาะเชื้อจากหลอด Lyophilize ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) L-cysteine-HCl.H₂O บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนที่ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง และทำการถ่ายเชื้ออีกครั้งในอาหารชนิดเดิมและนำไปบ่มที่ภาวะเดิมเพื่อกระตุ้นการเจริญของเชื้อ ปั่นแยกและล้างเซลล์ก่อนนำไป ละลายกับน้ำกลั่นฆ่าเชื้อในปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วเก็บสารละลายเซลล์ที่ได้ในกลีเซอรอลเข้มข้น 80 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 จะได้สารละลายเซลล์ในกลีเซอรอลความเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ที่มีปริมาณ 30 มิลลิลิตร ถ่ายใส่หลอด cryogenic vials ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นสารละลายเชื้อสำหรับนำมาใช้ในแต่ละการทดลอง

3.2.4 การเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ *B. animalis* TISTR 1925 จากหลอดสารละลายเซลล์ในกลีเซอรอล 40 เปอร์เซ็นต์ 150 ไมโครลิตร ในอาหาร MRS broth ที่เติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) L-cysteine-HCl.H₂O 15 มิลลิลิตร บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนที่ 37 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 9,000 rpm 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ส่องรอบจากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้ละลายในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปปรับค่าความขุ่นด้วย McFarland Standard No.1 ให้ได้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10⁷ cfu/ml (McFarland Turbidity Standards) เพื่อใช้เป็นสารละลายหัวเชื้อเริ่มต้นต่อไป

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การคัดเลือกชนิดแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดแทนอาหาร MRS

ชนิดของแหล่งคาร์บอนที่ศึกษา ได้แก่ ซูโครส, กลูโคส, ฟรักโทสและ กากน้ำตาล

ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ศึกษา ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และ สารสกัดจากยีสต์

ปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่ใช้ คำนวณโดยเทียบจากปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ได้เป็นสูตรอาหารทดแทนที่ศึกษา ได้แก่ อาหาร GYS FYS SYS MYS MYU และ MY

3.3.1.1 ทดสอบการเจริญของเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925

ทดสอบการเจริญในอาหารสูตรทดแทนเปรียบเทียบกับ MRS broth ที่เติม 0.05 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) L-cysteine-HCl.H₂O โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 20 ชั่วโมง หาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค drop dilution technique (drop plate method) (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007; Miles และ Misra, 1938) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์ผลค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด (log₁₀ โคโลนีต่อมิลลิลิตร) เพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด โดยเปรียบเทียบผลความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่เลี้ยงในสูตรอาหารทดแทนกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth เพื่อคัดเลือกชนิดขององค์ประกอบในสูตรอาหารสำหรับนำไปหาปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบที่เหมาะสมต่อไป

3.3.2 การหาช่วงความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเบื้องต้น

จากการทดลองหาองค์ประกอบในสูตรอาหารทดแทนพบว่า สูตรอาหารทดแทน MYS MYU และ MY ให้ผลค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดใกล้เคียงอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth แต่อาหาร MY มีองค์ประกอบที่น้อยกว่าจึงมีมูลค่าต้นทุนขององค์ประกอบที่มีราคาถูก จึงนำมาหาปริมาณที่เหมาะสมขององค์ประกอบแต่ละตัวดังนี้

3.3.2.1 การหาปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เบื้องต้น

โดยปรับค่าปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เป็น 6 8 10 12 และ 14 กรัมต่อลิตร และใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเทียบเท่ากับปริมาณกลูโคสในอาหาร MRS broth คือ 20 กรัมต่อลิตร แล้วทำการทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ *B. animalis* TISTR 1925 กับสูตรอาหารดังกล่าว โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 20 ชั่วโมง หาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค drop dilution technique (drop plate method) (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007; Miles และ Misra, 1938) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ และวิเคราะห์ผลเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด

3.3.2.2 การหาปริมาณความเข้มข้นของยูเรียเบื้องต้น

เพื่อชดเชยปริมาณ สารสกัดจากยีสต์ ที่ 8 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นปริมาณที่ให้ผลการเจริญสูงสุดจากการทดลองข้อ 3.3.2.1 โดยคำนวณปริมาณของยูเรียเทียบกับปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนของสารสกัดจากยีสต์ ที่ 8 6 4 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้สัดส่วนของการชดเชยดังนี้

ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0 กรัมต่อลิตรกับปริมาณยูเรีย 1.84 กรัมต่อลิตร

ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 2 กรัมต่อลิตรกับปริมาณยูเรีย 1.38 กรัมต่อลิตร

ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตรกับปริมาณยูเรีย 0.92 กรัมต่อลิตร

ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 6 กรัมต่อลิตรกับปริมาณยูเรีย 0.46 กรัมต่อลิตร

ซึ่งใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเทียบเท่ากับปริมาณกลูโคสในอาหาร MRS broth คือ 20 กรัมต่อลิตร แล้วทำการทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ *B. animalis* TISTR 1925 กับสูตรอาหารดังกล่าว โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 20 ชั่วโมง หาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค drop dilution technique (drop plate method) (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007; Miles และ Misra, 1938) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ และวิเคราะห์ผลเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด

3.3.2.3 การหาปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลเบื้องต้น

โดยปรับค่าปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลเป็น 30 40 50 60 70 และ 80 กรัมต่อลิตร โดยเลือกความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตรและยูเรีย 0.92 กรัมต่อลิตร ซึ่งให้ผลการเจริญสูงสุดจากการทดลองข้อ 3.3.2.2 แล้วทำการทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ *B. animalis* TISTR 1925 กับสูตรอาหารดังกล่าว โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 20 ชั่วโมง หาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค drop dilution technique (drop plate method) (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007; Miles และ Misra, 1938) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ และวิเคราะห์ผลเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด

3.3.3 การคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารด้วยวิธีการ 2^k full factorial design

ออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม Design-Expert version 8.0.7.1 ที่มีค่าปัจจัย (k) เป็นจำนวนขององค์ประกอบในสูตรอาหารทดแทน มีช่วงของค่าความเข้มข้นที่ได้จากการวิเคราะห์ผลในข้อ 3.3.2.1 ถึง 3.3.2.3 เป็น 2 ระดับคือ ต่ำและสูง (-1,+1) ดังนี้
 ความเข้มข้นระดับต่ำของกากน้ำตาลคือ 40 กรัมต่อลิตร และระดับสูงคือ 60 กรัมต่อลิตร
 ความเข้มข้นระดับต่ำของสารสกัดจากยีสต์คือ 4 กรัมต่อลิตร และระดับสูงคือ 8 กรัมต่อลิตร
 ความเข้มข้นระดับต่ำของยูเรียคือ 0 กรัมต่อลิตร และระดับสูงคือ 0.92 กรัมต่อลิตร

จากการออกแบบการทดลองจะทำการกำหนดค่ากลาง (0) ของค่าความเข้มข้นของแต่ละองค์ประกอบเพื่อป้องกันความโค้งของสมการและค่า lack of fit ที่มีความสัมพันธ์กับค่า pure error โดยให้รูปแบบของการออกแบบการทดลองดังนี้

ตารางที่ 3.1 การออกแบบการทดลองคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารด้วยวิธีการ 2^k full factorial design

ลำดับ	ค่าความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
	กากน้ำตาล	สารสกัดจากยีสต์	ยูเรีย
1	40	4	0
2	40	4	0
3	60	4	0
4	60	4	0
5	40	8	0
6	40	8	0
7	60	8	0
8	60	8	0
9	40	4	0.92
10	40	4	0.92
11	60	4	0.92
12	60	4	0.92
13	40	8	0.92

ตารางที่ 3.1(ต่อ) การออกแบบการทดลองคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารด้วยวิธีการ 2^k full factorial design

ลำดับ	ค่าความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)		
	กากน้ำตาล	สารสกัดจากยีสต์	ยูเรีย
14	40	8	0.92
15	60	8	0.92
16	60	8	0.92
17	50	6	0.46
18	50	6	0.46
19	50	6	0.46
20	50	6	0.46

ทำการทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ *B. animalis* TISTR 1925 กับสูตรอาหารดังกล่าว โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 20 ชั่วโมง หาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค drop dilution technique (drop plate method) (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007; Miles และ Misra, 1938) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์และวิเคราะห์ผลตามหลักสถิติด้วยโปรแกรม Design-Expert version 8.0.7.1 เพื่อทำการคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารทดแทนที่มีผลต่อค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด

3.3.4 การหาอัตราส่วนความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารด้วยวิธีการ Steepest ascent

จากผลการคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารทดแทนที่มีผลต่อค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด จากการทดลองในข้อ 3.3.2.2 สามารถระบุองค์ประกอบที่สำคัญของอาหารทดแทนได้คือสารสกัดจากยีสต์ และความสัมพันธ์ระหว่างกากน้ำตาลกับสารสกัดจากยีสต์ โดยมีผลของสมการเส้นตรงลำดับที่หนึ่งเป็นดังนี้ $Y = 8.98 + 0.15X_2 + 0.06X_1X_2$ (X_1 คือกากน้ำตาล และ X_2 คือสารสกัดจากยีสต์) และสมการเส้นตรงลำดับที่หนึ่งขององค์ประกอบหลักที่ส่งผลต่อค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดคือ $Y = 8.98 - 0.027 X_1 + 0.15X_2$ ซึ่งแสดงให้เห็นผลของปริมาณ

กากน้ำตาลต้องมีค่าที่ลดลง และปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ต้องมีค่าที่เพิ่มขึ้นถึงจะส่งผลให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด จึงจำเป็นต้องหาแนวโน้มของปริมาณขององค์ประกอบที่ส่งผลต่อค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ใกล้เคียงความเป็นจริงมากที่สุด โดยการประยุกต์การออกแบบการทดลอง steepest ascent มาใช้ (Myers และคณะ, 2009; Kong และคณะ, 2004) ดังนี้

	X_1	X_2
(a) ค่ากลางของความเข้มข้นที่ใช้ใน 2^k full factorial design	50	6
(b) ค่าการเปลี่ยนแปลงหน่วย	10	2
(c) ค่าสัมประสิทธิ์ จากสมการเส้นตรงลำดับที่หนึ่ง	-0.027	0.15
(d) ค่าการเปลี่ยนแปลงของ steepest ascent (coded value)	-0.18	1
(e) ค่าการเปลี่ยนแปลงของ steepest ascent (actual value)	-1.8	2

จากการคำนวณตามหลักการ steepest ascent พบว่า ต้องทำการลดปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลจากค่ากลางของความเข้มข้นลงทุกๆ 1.8 กรัมต่อลิตร และเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์จากค่ากลางของความเข้มข้นขึ้นทุกๆ 2 กรัมต่อลิตร ตามตารางการออกแบบการทดลองดังนี้

ตารางที่ 3.2 การออกแบบการทดลองตามวิธีการ steepest ascent

ลำดับที่	ความเข้มข้นขององค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)	
	กากน้ำตาล (X_1)	สารสกัดจากยีสต์ (X_2)
1	50	6
2	48.2	8
3	46.4	10
4	44.6	12
5	42.8	14
6	41	16

ทำการทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ *B. animalis* TISTR 1925 กับสูตรอาหารดังกล่าว โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนที่ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่ 20 ชั่วโมง หาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค drop dilution

technique (drop plate method) (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007; Miles และ Misra, 1938) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ และวิเคราะห์ผลเพื่อคัดเลือกสูตรอาหารที่ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด

3.3.5 การหาปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารที่เหมาะสมด้วยวิธีการ Central Composite Design (CCD)

จากผลการทดลองหาปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญเบื้องต้น จากการทดลองในข้อ 3.3.4 พบว่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ 46.4 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ที่ 10 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณความเข้มข้นที่ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด จึงนำค่าความเข้มข้นดังกล่าวมาออกแบบการทดลองเพื่อหาปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยการออกแบบการทดลองเป็นแบบ Central Composite Circumscribed (CCC) ด้วยโปรแกรม Design-Expert version 8.0.7.1 ที่ให้สามารถให้ระดับความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารสำหรับการทดลองได้ 5 ระดับ ดังนี้

ระดับที่น้อยกว่าค่าต่ำ ($-\alpha$)

ระดับต่ำ (-1)

ระดับกลาง (0)

ระดับสูง (1)

ระดับที่มากกว่าค่าสูง (α)

โดยค่าระดับความเข้มข้น $-\alpha = -2^{K/4}$ และ ค่าระดับความเข้มข้น $\alpha = 2^{K/4}$ ค่า K คือ จำนวนขององค์ประกอบของสูตรอาหารทดแทนที่ผ่านการคัดเลือกจากการทดลองในข้อ 3.3.2.2 ได้รูปแบบของการออกแบบการทดลองดังนี้

ค่า $K = 2$

$-\alpha = -2^{2/4} = -1.414$

$\alpha = 2^{2/4} = 1.414$

ตารางที่ 3.3 การออกแบบการทดลองตามวิธีการของ Central Composite Design (CCD)

ลำดับที่	ความเข้มข้นขององค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)			
	กากน้ำตาล (X_1)		สารสกัดจากยีสต์ (X_2)	
	Coded value	Actual value	Coded value	Actual value
1	-1	44.6	-1	8
2	1	48.2	-1	8
3	-1	44.6	1	12
4	1	48.2	1	12
5	$-\alpha$	43.85	0	10
6	α	48.95	0	10
7	0	46.4	$-\alpha$	7.17
8	0	46.4	α	12.83
9	0	46.4	0	10
10	0	46.4	0	10
11	0	46.4	0	10
12	0	46.4	0	10
13	0	46.4	0	10

ทำการทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ *B. animalis* TISTR 1925 กับสูตรอาหารดังกล่าว โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มในภาชนะไม่มีออกซิเจนที่ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 20 ชั่วโมง หาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค drop dilution technique (drop plate method) (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007; Miles และ Misra, 1938) บ่มในภาชนะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์และวิเคราะห์ผลตามหลักสถิติด้วยโปรแกรม Design-Expert version 8.0.7.1 เพื่อทำนายค่าปริมาณที่เหมาะสมขององค์ประกอบในสูตรอาหารทดแทนที่มีผลต่อค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด

3.3.6 การทบทวนค่าประมาณการความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหาร

จากผลการทดลองข้อ 3.3.5 ได้ค่าประมาณการความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบในสูตรอาหารทดแทนที่มีผลต่อค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด จึงนำค่าที่ได้มาทบทวนโดยการทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ *B. animalis* TISTR 1925 กับสูตรอาหารดังกล่าว

โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนที่ 37 องศาเซลเซียส การเก็บตัวอย่างที่ 20 ชั่วโมง หาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค drop dilution technique (drop plate method) (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007; Miles และ Misra, 1938) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์เปรียบเทียบกับสูตรอาหาร MRS broth และ Milk based โดยมีรูปแบบของการออกแบบการทดลองดังนี้

ตารางที่ 3.4 ค่าประมาณการความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบในสูตรอาหาร

ลำดับที่	การประมาณค่าความเข้มข้นขององค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณความเข้มข้นสูงสุดที่ทำนาย (log โคลิฟอร์มิคัลลิตร)
	กากน้ำตาล	สารสกัดจากยีสต์	
1	45.23	8	9.1753
2	46.5	8	9.1944
3	47.03	8	9.1911

3.3.7 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบบแบดซ์

ทำการเตรียมเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบถังกวนขนาด 15 ลิตร (Biostat C, B.Braun, Germany) โดยฆ่าเชื้อส่วนประกอบและอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 30 นาที ภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ส่วน สารสกัดจากยีสต์แยกฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส 10 นาที ก่อนนำมาผสมกันแบบปลอดเชื้อ ที่เครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ รวมมีปริมาตรสุทธิในการปฏิบัติงาน 8 ลิตร โดยมีการทดลอง 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.3.7.1 การศึกษาความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมต่อการเจริญ

กำหนดค่าความเร็วรอบในการกวนที่ 100 200 และ 300 รอบต่อนาที โดยไม่ควบคุมค่า pH (Wong และคณะ, 2007) ทำการทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ *B. animalis* TISTR 1925 ในสูตรอาหารที่พัฒนาขึ้น โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มโดยอยู่ภายใต้ภาวะไม่มีออกซิเจนที่ควบคุมด้วยก๊าซไนโตรเจน ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค drop dilution technique (drop plate method) (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007;

Miles และ Misra, 1938) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง คำนวณและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในแต่ละค่าความเร็วรอบในการกวน และเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธี Phenol sulfuric (Dubois, 1956) และปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Dumas combustion (Dumas, 1826 อ้างโดย Buckee, 1994) โดยนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปวิเคราะห์ เพื่อดูแนวโน้มของการใช้สารอาหารและคัดเลือกค่าความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อไป

3.3.7.2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ค่า pH ที่ใช้ทำการศึกษาคือ 6.0 6.5 และ 7.0 โดยเป็นค่าที่อยู่ในช่วงที่ *Bifidobacteria* สามารถเจริญได้ (Biavati และ Mattarelli, 2006; Wong และคณะ, 2007) โดยเลือกความเร็วรอบในการกวนที่ให้การเจริญของเชื้อที่ให้ผลการเจริญที่ดีจากการทดลองที่ 3.3.7.1 ทำการทดสอบการเจริญของจุลินทรีย์ *B. animalis* TISTR 1925 ในสูตรอาหารที่พัฒนาขึ้น โดยใช้หัวเชื้อที่เตรียมไว้ 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มโดยอยู่ภายใต้ภาวะไม่มีออกซิเจนที่ควบคุมด้วยก๊าซไนโตรเจน ที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ควบคุมค่า pH ด้วย 8 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค drop dilution technique (drop plate method) (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007; Miles และ Misra, 1938) บ่มในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation (Shell lab) ที่ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง คำนวณและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อในแต่ละค่าความเร็วรอบในการกวน และเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ทั้งหมด (total sugar) ด้วยวิธี Phenol sulfuric (Dubois, 1956) และปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Dumas combustion (Dumas, 1826 อ้างโดย Buckee, 1994) โดยนำตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที เวลา 5 นาที เพื่อแยกส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อนำไปวิเคราะห์เพื่อดูแนวโน้มของการใช้สารอาหารและคัดเลือกค่า pH ที่เหมาะสม

3.4 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

3.4.1 การหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ด้วยเทคนิค Drop plate (Munsch-Alatossava และคณะ, 2007; Miles และ Misra, 1938)

ทำการเจือจางตัวอย่างตามลำดับทุกๆ 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นฆ่าเชื้อแล้วนำสารละลายที่เจือจาง 20 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวอาหาร MRS agar ที่เติม 0.05 เปอร์เซ็นต์

(น้ำหนักต่อปริมาตร) L-cysteine-HCl.H₂O บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic workstation 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่ขึ้นโดยเลือกนับค่าในค่าการเจือจางที่ให้จำนวน โคโลนีอยู่ในช่วง 3-30 โคโลนี ทำการคำนวณค่าปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ ดังนี้

ค่าปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (โคโลนีต่อมิลลิลิตร)

= จำนวนโคโลนี X 50 X ค่าการเจือจาง

(50 = ค่าคงที่คูณกลับเพื่อมีปริมาตรเป็น 1,000 ไมโครลิตร)

3.4.2 การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol sulfuric (Dubois, 1956)

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้ สามารถตรวจวัดปริมาณช่วง 1-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และเป็นวิธีการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจงเพราะไม่ว่ามันจะอยู่ในรูปรีดิวซ์ นอนรีดิวซ์ หรือในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์ได้ด้วยวิธีนี้

หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998) mono-, di-, tri-, oligo- และ polysaccharide ทำปฏิกิริยากับฟีนอลและกรดซัลฟิวริกเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสารที่มีสี สามารถดูดซับแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 480-490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยา เชื่อว่า ในกรณี oligo- และ polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเทอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้นก็เกิดปฏิกิริยาขจัดน้ำออกที่แทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (furfural derivatives) ที่จะเกิดการรวมตัวกับฟีนอลกลายเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (triarylmethane dyes)

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมโดยละลายผลึกของฟีนอล 25 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
2. ใช้ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง ขณะเดียวกันทำสารไว้ตัวอย่าง (blank) ด้วยโดยการใช้ น้ำกลั่น ปริมาตรเท่ากันแทนตัวอย่าง
3. เติมน้ำกลั่นฟีนอล 1 มิลลิลิตร ในตัวอย่างผสมให้เข้ากัน
4. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงในสารผสมข้อ 2. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำจะร้อนเดือด) ตั้งทิ้งไว้อีกประมาณ 20 นาที

5. นำชุดทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร เทียบกับกราฟมาตรฐาน (standard curve) ระหว่างความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานและค่าการดูดกลืนแสง

การคำนวณ

คำนวณปริมาณรีดิวซ์ที่วัดได้จากสูตรการคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณทั้งหมด (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{ค่า OD}_{480} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ค่าความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

3.4.3 การหาปริมาณไนโตรเจนด้วยวิธี Dumas combustion (Dumas, 1826 อ้างโดย Buckee, 1994)

การวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนด้วยเทคนิคการเผาไหม้ให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันภายใต้บรรยากาศที่อุณหภูมิ 850 ถึง 950 องศาเซลเซียส และเกิดปฏิกิริยาคายความร้อนอย่างรวดเร็วจากธาตุดีบุกที่เป็นองค์ประกอบของแคปซูลบรรจุตัวอย่างทำให้เกิดการเผาไหม้อย่างสมบูรณ์ที่อุณหภูมิ 1,800 องศาเซลเซียส จนได้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ออกไซด์ของไนโตรเจน ไอน้ำและก๊าซไนโตรเจน โดยมีก๊าซฮีเลียมเป็นตัวพาออกไซด์ของไนโตรเจนและก๊าซไนโตรเจนไปวิเคราะห์โดยตรวจวัดค่า Thermal conductivity

วิธีวิเคราะห์

1. เปิดเครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน (Dumas combustion) ก่อนการวิเคราะห์ 2 ชั่วโมง
2. ตรวจสอบค่า Ambient ให้ทุกค่าอยู่ระหว่างค่าสูงสุดและต่ำสุด
3. ตรวจสอบการรั่วของก๊าซฮีเลียมและออกซิเจน
4. กำหนดค่าภาวะของเครื่องตามคู่มือกำหนด
5. เลือกวิธีการทดสอบในโปรแกรม
6. ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างเปล่า (อากาศ) เพื่อสร้างค่า base line ให้กับตัวอย่างโดยทำจนกว่าค่าคงที่

7. วิเคราะห์สารมาตรฐานโดยซิงสาร EDTA ลงใน Tin foil cub แล้วห่อให้แน่นก่อนนำเข้าเครื่องเพื่อวิเคราะห์สารมาตรฐาน โดยค่าเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนที่ควรได้คือ 9.58 ± 0.02 แล้วทำการ Calibration เครื่อง
8. วิเคราะห์ตัวอย่างโดยซิงน้ำหนักเปล่าของ Tin capsule แล้วตั้งค่าน้ำหนักให้เป็นศูนย์ก่อนนำไปบรรจุตัวอย่างส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วซิงน้ำหนักของตัวอย่างอีกครั้งเพื่อบันทึกน้ำหนักตัวอย่างในโปรแกรม และปิดปาก Tin capsule ให้สนิทก่อนนำเข้าเครื่องวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจน โดยเครื่องจะแสดงค่าการวิเคราะห์ที่ได้เป็นค่าเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้ เป็นการศึกษาเพื่อหาอาหารเลี้ยงเชื้อทดแทนสูตรอาหารที่มีนมเป็นองค์ประกอบและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงจุลินทรีย์ *Bifidobacterium animalis* TISTR 1925 ซึ่งจะมีวิธีการตามลำดับขั้นตอนต่อไปนี้ ขั้นตอนแรกเป็นการคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน สำหรับอาหารเลี้ยง โดยคำนึงถึงความเป็นไปได้สำหรับการนำมาใช้และต้นทุนของการผลิต และหาช่วงความเข้มข้นขององค์ประกอบแต่ละตัวเบื้องต้นเพื่อนำไปใช้สำหรับการคัดเลือกองค์ประกอบที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ 2^k full factorial design จากนั้นทำการพัฒนาสูตรอาหารให้เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อโดยการหาแนวโน้มความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหาร ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Steepest ascent ก่อนที่จะมาหาปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารที่เหมาะสม ด้วยวิธีการออกแบบการทดลองแบบ Central composite design ซึ่งจะได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีชนิดและปริมาณที่เหมาะสมกับการเจริญเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด และทำการศึกษาภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมแบบแบตช์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยปัจจัยที่เลือกศึกษา ได้แก่ ความเร็วรอบในการกวนและค่า pH

4.1 การคัดเลือกชนิดของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทดแทนอาหาร MRS

โดยใช้แหล่งคาร์บอนที่ใช้ ซูโครส, กลูโคส, ฟรักโทสและกากน้ำตาล แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ เป็นเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ยูเรีย และ สารสกัดจากยีสต์ ทำการคำนวณหาปริมาณขององค์ประกอบแต่ละชนิดเทียบกับปริมาณองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ De Man, Rogosa, Sharpe (MRS) ได้เป็นสูตรอาหารทดแทนทั้งหมด 4 สูตร ได้แก่ MYS GYS SYS และ FYS บ่มในภาวะ anaerobic ที่ 37 องศาเซลเซียส 20 ชั่วโมง พบว่าสูตรอาหาร MYS ที่มีองค์ประกอบเป็นกากน้ำตาล สารสกัดจากยีสต์และเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ให้ผลปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ $9.0227 \log_{10}$ โคโลนีต่อมิลลิเมตร ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกัน MRS broth ที่มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ $9.1463 \log_{10}$ โคโลนีต่อมิลลิเมตร ส่วนอาหาร GYS SYS และ FYS พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อในระดับที่ต่ำ (ตามตารางที่ 4.1) เมื่อเปลี่ยนสูตรอาหารจาก MYS เป็น MYU โดยใช้

ยูเรียแทนเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากมีราคาถูกกว่า พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อที่ $8.7848 \log_{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่ำกว่าอาหาร MYS เล็กน้อยแต่เมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร MY ที่มีองค์ประกอบเฉพาะกากน้ำตาลน้ำตาลและสารสกัดจากยีสต์ก็ให้ผลปริมาณความเข้มข้นของเชื้อไม่ต่างจากสูตรอาหาร MYU คือ $8.7075 \log_{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ถึงแม้ว่าสูตรอาหาร MY ให้ผลการเจริญที่ต่ำกว่า MYS แต่ก็ป็นสูตรที่เหมาะสมกับการนำไปพัฒนาเป็นสูตรอาหารทดแทนต่อเนื่องจากมีจำนวนขององค์ประกอบที่น้อยกว่า (ตามตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.1 ความเข้มข้นของเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบชนิดต่างๆ

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (\log_{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร)
MRS	9.1463 ± 0.0693
MYS	9.0227 ± 0.0565
GYS	8.0494 ± 0.0387
SYS	6.3498 ± 0.0485
FYS	7.8174 ± 0.0577

ตารางที่ 4.2 ชนิดของอาหารที่ให้การเจริญของเชื้อที่ดี

ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ	ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (\log_{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร)
MYS	9.0227 ± 0.0565
MYU	8.7848 ± 0.0445
MY	8.7075 ± 0.1054

4.2 การหาช่วงความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเบื้องต้น

4.2.1 การหาปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เบื้องต้น

จากการปรับค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์เป็น 2 4 6 8 10 12 และ 14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเป็น 20 กรัมต่อลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 8 และ 10 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยความเข้มข้นที่ 8 กรัมต่อลิตร เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากใช้ปริมาณที่น้อยกว่า (ตามตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ความเข้มข้นของเชื้อในอาหารที่มีปริมาณสารสกัดจากยีสต์แตกต่างกัน

ความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (log ₁₀ โคโลนีต่อมิลลิลิตร)
2	7.7942 ± 0.0451 ^d
4	7.9942 ± 0.0209 ^c
6	8.1550 ± 0.1077 ^b
8	8.5326 ± 0.1163 ^a
10	8.4543 ± 0.0705 ^a
12	8.1374 ± 0.0774 ^b
14	8.1076 ± 0.1276 ^{bc}

^{a,b,c,d} แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.2.2 การหาปริมาณความเข้มข้นของยูเรียเบื้องต้น

เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนของสารสกัดจากยีสต์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนและ Growth factors พบว่ามีราคาสูง การเลือกใช้วัตถุดิบอื่นๆ เพื่อชดเชยปริมาณการใช้สารสกัดจากยีสต์จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ โดยจากการทดลองที่ผ่านมาพบแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิด คือเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียม่าจะสามารถชดเชยปริมาณการใช้สารสกัดจากยีสต์ได้ เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนและปริมาณการใช้ขององค์ประกอบในสูตรอาหารพบว่ายูเรียมีปริมาณการใช้ที่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องมาจากน้ำหนักโมเลกุลของยูเรียมีค่าต่ำกว่า เมื่อทำการคำนวณเพื่อให้ได้ไนโตรเจนสุทธิที่เท่ากันระหว่างยูเรียกับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งสอดคล้องกับต้นทุน

การผลิตสำหรับระดับอุตสาหกรรมในอนาคต ที่พบว่าเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่อยู่ในรูปปุ๋ยมีราคาถูกกว่าปุ๋ยยูเรียไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ แต่มีปริมาณไนโตรเจนเพียง 21 เปอร์เซ็นต์ (สูตรปุ๋ย 21-0-0) ส่วนปุ๋ยยูเรียมีปริมาณไนโตรเจน 46 เปอร์เซ็นต์ (สูตรปุ๋ย 46-0-0) ปุ๋ยยูเรียจึงมีปริมาณการใช้น้อยกว่า ดังนั้นจึงเลือกยูเรียสำหรับการชดเชยสารสกัดจากยีสต์ทุกๆ 2 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณสุทธิของไนโตรเจนในสูตรอาหารเท่ากับปริมาณไนโตรเจนของสารสกัดจากยีสต์ที่ 8 กรัมต่อลิตร ทำให้ได้สัดส่วนของการชดเชยดังนี้

ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0 กรัมต่อลิตรกับปริมาณยูเรีย 1.84 กรัมต่อลิตร
 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 2 กรัมต่อลิตรกับปริมาณยูเรีย 1.38 กรัมต่อลิตร
 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตรกับปริมาณยูเรีย 0.92 กรัมต่อลิตร
 ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 6 กรัมต่อลิตรกับปริมาณยูเรีย 0.46 กรัมต่อลิตร

และกำหนดความเข้มข้นของกากน้ำตาลเป็น 20 กรัมต่อลิตร จากการทดลองพบว่าสัดส่วนสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร กับยูเรีย 0.92 กรัมต่อลิตร และสัดส่วนสารสกัดจากยีสต์ 6 กรัมต่อลิตร กับยูเรีย 0.46 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยเป็นช่วงที่ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดใกล้เคียงกับสัดส่วนสารสกัดจากยีสต์ 8 กรัมต่อลิตร กับยูเรีย 0 กรัมต่อลิตร เป็นตัวควบคุม (ตามตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ความเข้มข้นของเชื้อในอาหารที่มีปริมาณยูเรียชดเชยสารสกัดจากยีสต์ในระดับที่แตกต่างกัน

สารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	ยูเรีย (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (log ₁₀ โคโลนีต่อมิลลิลิตร)
0	1.84	7.6236 ± 0.1393 ^c
2	1.38	8.4005 ± 0.1419 ^b
4	0.92	8.6495 ± 0.0652 ^a
6	0.46	8.6101 ± 0.0784 ^a
8	0	8.5326 ± 0.1163 ^{ab}

^{a,b,c} แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.2.3 การหาปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลเบื้องต้น

จากการปรับค่าปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลเป็น 20 30 40 50 60 70 และ 80 กรัมต่อลิตร โดยใช้ค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 0.92 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการทดลองที่ 4.2.2 พบว่ากากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณที่ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตามตารางที่ 4.5)

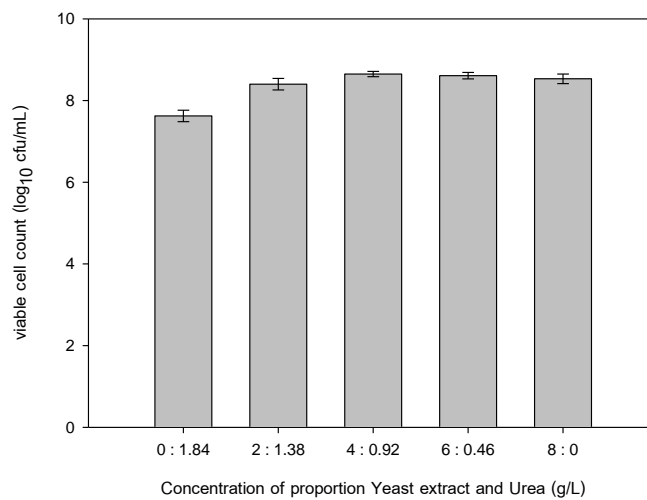
ตารางที่ 4.5 ความเข้มข้นของเชื้อในอาหารที่มีปริมาณกากน้ำตาลที่ต่างกัน

ความเข้มข้นของกากน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (log ₁₀ โคลิฟอร์มต่อมิลลิลิตร)
20	8.6979 ± 0.0356 ^c
30	8.8017 ± 0.0572 ^c
40	8.9458 ± 0.0517 ^b
50	8.9338 ± 0.0963 ^b
60	9.1260 ± 0.1524 ^a
70	8.9466 ± 0.0964 ^b
80	8.9811 ± 0.0529 ^b

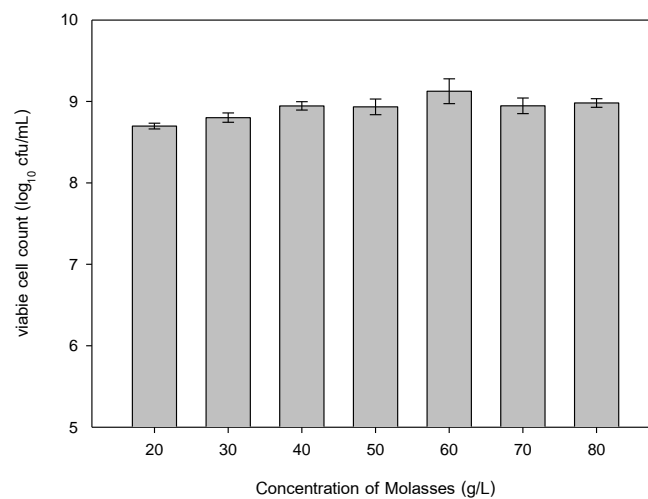
^{a,b,c} แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเบื้องต้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารแต่ละตัว พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ที่ 8 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อสูงสุด และเมื่อทำการชดเชยปริมาณของสารสกัดจากยีสต์ด้วยยูเรียเพื่อลดปริมาณการใช้สารสกัดจากยีสต์ พบว่าสามารถชดเชยการใช้สารสกัดจากยีสต์ให้มีปริมาณลดลงเหลือ 4 กรัมต่อลิตร ด้วยยูเรีย 0.92 กรัมต่อลิตร โดยมีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อสูงสุดใกล้เคียงกับสารสกัดจากยีสต์ที่ 8 กรัมต่อลิตรที่เป็นตัวควบคุม เมื่อดูแนวโน้มสัดส่วนความเข้มข้นที่เหมาะสมเบื้องต้นของสารสกัดจากยีสต์กับยูเรียที่ส่งผลต่อปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจะอยู่ในช่วง 4 ถึง 8 กรัมต่อลิตร และ 0 ถึง 0.92 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นของเชื้อสูงสุดตั้งแต่ 8.6525 ถึง 8.7363log₁₀ โคลิฟอร์มต่อมิลลิลิตร (ตามภาพที่ 4.1)

ส่วนแนวโน้มความเข้มข้นที่เหมาะสมเบื้องต้นของกากน้ำตาลที่ส่งผลต่อปริมาณความเข้มข้นของเชื้อจะอยู่ในช่วง 40 ถึง 60 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะได้ค่าความเข้มข้นของเชื้อสูงสุดตั้งแต่ 8.9458 ถึง 9.1260 \log_{10} โคโลนีต่อมิลลิเมตร (ตามภาพที่ 4.3) ซึ่งจะมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองของ Reyed (2008) ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 กรัมต่อลิตร สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. bifidum* no.1791



ภาพที่ 4.1 กราฟสัดส่วนความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์กับยูเรียที่มีผลต่อความเข้มข้นของเชื้อ



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่มีผลต่อความเข้มข้นของเชื้อ

4.3 การคัดเลือกองค์ประกอบของสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี 2^k full factorial design

จากการออกแบบการทดลองด้วยโปรแกรม Design-Expert version 8.0.7.1 ที่มีค่าตัวแปร (k) เป็นจำนวนขององค์ประกอบในสูตรอาหาร ที่มีช่วงของค่าความเข้มข้นที่ได้จากการทดลองในข้อ 4.2 และเมื่อนำข้อมูลผลการวิเคราะห์ผลจากค่าเสื่อมถอย (ANOVA) พบว่าความเหมาะสมของการออกแบบการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.0001$) ซึ่งสอดคล้องกับค่ากึ่งกลางในการทดลอง (center point) ที่เป็นตัวบ่งบอกถึงค่าความโค้งแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์ และการขาดความสอดคล้องกับการออกแบบ (lack of fit) ก็มีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญที่ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยผลการออกแบบการทดลองให้ค่า $R^2 = 0.8538$ และค่า predicted $R^2 = 0.7035$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามที่ Lundstedt และคณะ (1998) ที่ได้สรุปไว้ ส่วนผลการคัดเลือกองค์ประกอบที่สำคัญพบว่าสารสกัดจากยีสต์ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อจึงถือได้ว่าเป็นองค์ประกอบที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อ ($P < 0.0001$) และพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างกากน้ำตาลมีกับสารสกัดจากยีสต์ที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ ($P = 0.0085$) (ตามตารางที่ 4.6) เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์เขียนสมการหลายตัวแปร โดยค่า y เท่ากับปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ (\log_{10} โคโลนีต่อมิลลิเมตร) ได้สมการที่ 1 ดังนี้

$$Y = 8.98 - 0.027X_1 + 0.15X_2 - 0.012X_3 + 0.06X_1X_2 - 0.029X_1X_3 - 0.000077X_2X_3 \dots\dots\dots (1)$$

จึงสรุปได้ว่ากากน้ำตาลมีผลต่อการเจริญของเชื้อ โดยทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคล้ายกับการทดลองของ Wong และคณะ (2007) ที่พบว่าหางนมที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร Milk based เมื่อทำการทดลองจากการออกแบบการทดลอง 2^k full factorial design ผลวิเคราะห์สรุปว่าหางนมไม่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญ แต่ยังคงใช้หางนมในการพัฒนาสูตรอาหารต่อเพราะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในสูตรอาหาร

เมื่อพิจารณาสมการที่ 1 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์ของสารสกัดจากยีสต์ (X_2) มีค่าเป็นบวก แสดงให้เห็นถึงผลในเชิงบวกเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์จะส่งผลต่อค่า Y ที่สูงขึ้น แต่สำหรับค่าสัมประสิทธิ์ของกากน้ำตาล (X_1) มีค่าติดลบ แสดงให้เห็นถึงผลในเชิงลบเมื่อเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของกากน้ำตาลจะส่งผลต่อค่า Y ที่ต่ำลง เพราะฉะนั้นการใช้กากน้ำตาลในสูตรอาหารควรจะมีในปริมาณไม่สูงมากนัก

ส่วนค่าสัมประสิทธิ์ของความสัมพันธ์ระหว่างกากน้ำตาลกับสารสกัดจากยีสต์มีค่าเป็นบวก แสดงให้เห็นว่าความสัมพันธ์ขององค์ประกอบทั้ง 2 ชนิดมีผลต่อค่า Y ที่เพิ่มขึ้น เมื่อวิเคราะห์

ผลการทดลอง พบว่าค่าความเข้มข้นของกากน้ำตาล 60 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 8 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อสูงสุด โดยมีสัดส่วนของกากน้ำตาลต่อสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 7.5 เมื่อทำการทดลองโดยปรับค่าความเข้มข้นขององค์ประกอบทั้งคู่ให้มีสัดส่วนเท่าเดิม พบว่าค่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลตั้งแต่ 60 ถึง 80 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ตั้งแต่ 8 ถึง 10.37 กรัมต่อลิตร สามารถให้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อสูงสุด แสดงว่าทั้งกากน้ำตาลและสารสกัดจากยีสต์มีความสัมพันธ์กันและมีผลกับการเจริญของเชื้อ (ตามตารางที่ 4.7)

สำหรับยูเรียที่นำมาชดเชยการใช้สารสกัดจากยีสต์ จากผลการวิเคราะห์ผลจากค่าเสื่อมถอย (ANOVA) พบว่ายูเรียไม่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ ($P = 0.5640$) ประกอบกับการวิเคราะห์ผลจากสมการที่ 1 พบว่าค่าสัมประสิทธิ์มีค่าติดลบแสดงให้เห็นถึงผลในเชิงลบต่อค่าความเข้มข้นของเซลล์ และเมื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างองค์ประกอบแต่ละตัวยังสามารถดูได้จากกราฟพื้นผิวผลตอบ (Response surface plot) ซึ่งพบว่าความสัมพันธ์กากน้ำตาลกับสารสกัดจากยีสต์ส่งผลต่อค่าความเข้มข้นของเชื้อ ส่วนสารสกัดจากยีสต์กับยูเรียก็พบว่าสารสกัดจากยีสต์ส่งผลต่อค่าความเข้มข้นของเชื้อเพียงชนิดเดียว และความสัมพันธ์ระหว่างกากน้ำตาลกับยูเรียไม่ส่งผลต่อค่าความเข้มข้นของเชื้อเช่นกัน แสดงให้เห็นว่ายูเรียไม่ใช่องค์ประกอบที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ตามภาพที่ 4.4 (ก.) (ข.) และ (ค.)) ตามลำดับ

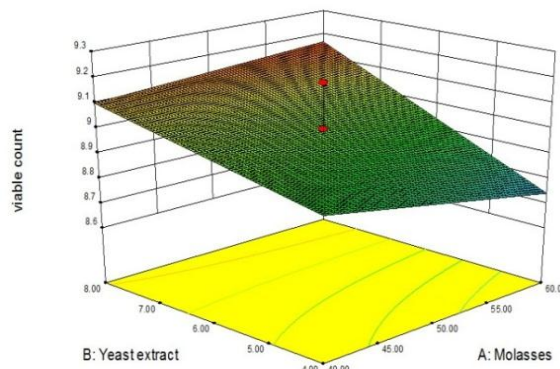
ตารางที่ 4.6 ตารางแสดงการวิเคราะห์ค่าเสื่อมถอยจากการทดลองแบบ 2^k full factorial design

ตัวแปร	สัมประสิทธิ์	P-value
Intercept	8.98	
กากน้ำตาล (X_1)	-0.027	0.1859
สารสกัดจากยีสต์ (X_2)	0.15	<0.0001*
ยูเรีย (X_3)	-0.012	0.5604
X_1X_2	0.06	0.0085*
X_1X_3	-0.029	0.1613
X_2X_3	-0.000077	0.9969
Model		<0.0001*
Curvature		0.1918
Lack of fit		0.7719
$R^2 = 0.8538$	Predicted $R^2 = 0.7035$	

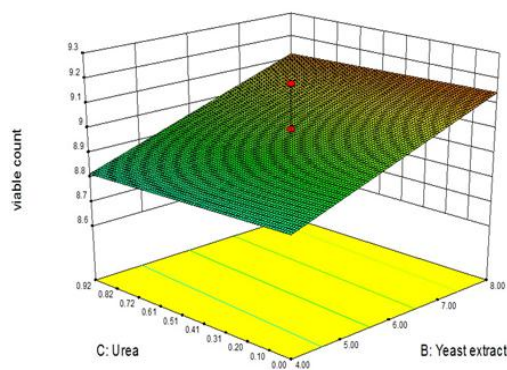
*แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4.7 ความสัมพันธ์ของกากน้ำตาลและสารสกัดจากยีสต์ที่มีผลต่อความเข้มข้นของเซลล์

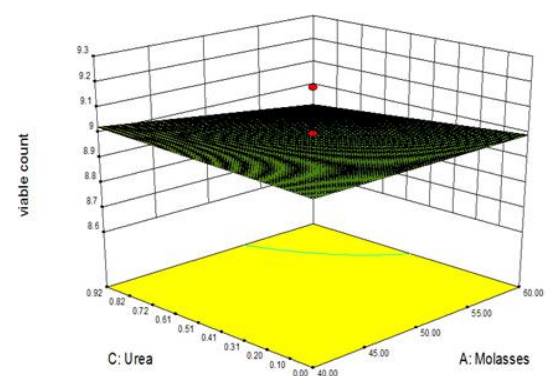
กากน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	สารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (\log_{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร)
20	2.67	8.0553 ± 0.0239
30	4	8.6611 ± 0.0590
40	5.33	8.9163 ± 0.0132
50	6.67	9.0880 ± 0.0089
60	8	9.2106 ± 0.0280
70	9.33	9.2530 ± 0.0992
80	10.37	9.2386 ± 0.0625



(ก.)



(ข.)



(ค.)

ภาพที่ 4.3 กราฟพื้นผิวผลตอบแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง (ก.) กากน้ำตาลกับสารสกัดจากยีสต์

(ข.) สารสกัดจากยีสต์กับยูเรียและ(ค.) กากน้ำตาลกับยูเรีย ตามลำดับ

4.4 การหาแนวโน้มอัตราส่วนความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารด้วยวิธีการด้วยวิธีการ Steepest ascent

จากผลการทดลองในข้อ 4.3 จะพบว่าองค์ประกอบที่สำคัญในอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยกากน้ำตาลที่เป็นแหล่งคาร์บอนและสารสกัดจากยีสต์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนและ growth factors หรือเรียกว่า bifidus factors แต่เนื่องจากสมการหลายตัวแปรจากการดังกล่าวระบุทิศทางของปริมาณการใช้ขององค์ประกอบว่า กากน้ำตาล (X_1) มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นลบและสารสกัดจากยีสต์ (X_2) มีค่าสัมประสิทธิ์เป็นบวก ดังสมการหลายตัวแปรที่ (2) ดังนี้

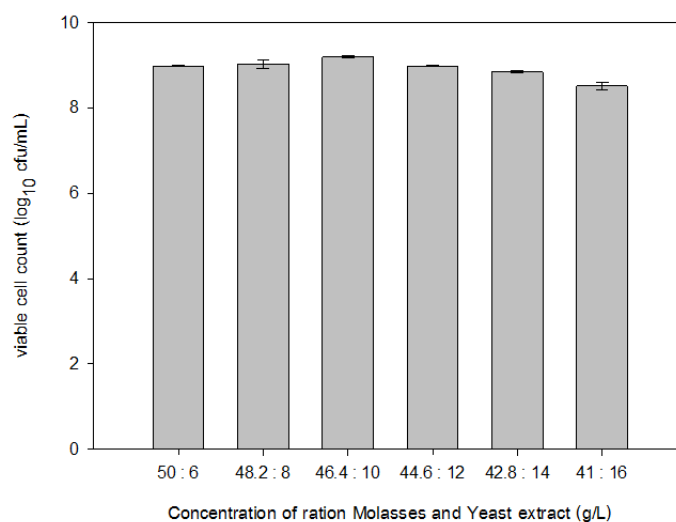
$$Y = 8.98 - 0.027X_1 + 0.15X_2 \dots \dots \dots (2)$$

ซึ่งบ่งบอกถึงการประมาณค่าของตัวแปรคือปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบแต่ละตัวอยู่นอกเหนือจากทิศทางที่กำหนดไว้ในการทดลอง จึงจำเป็นต้องหาแนวโน้มของความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารเพื่อให้การหาปริมาณที่เหมาะสมเดินมาในแนวทางที่ถูกต้อง ด้วยวิธีการการออกแบบการทดลองแบบ Steepest ascent ที่เป็นวิธีการที่สำคัญที่ดูแนวทางของผลกระทบเป็นเส้นตรงที่มีทิศทางไปสู่ค่าประมาณการที่ให้ผลของการยอมรับสูงสุด โดยมีวิธีการเริ่มต้นจากค่ากึ่งกลางจากการทดลองแล้วขยายออกไปในทิศทางที่คำนวณไว้ (Mayers และคณะ, 2009) โดยพบว่า Yang และคณะ (2012) ได้นำวิธีการแบบ Steepest ascent มาช่วยกับการหาปริมาณสารป้องกันเซลล์เหมาะสมสำหรับทำแห้งแบบเยือกแข็งของเชื้อ *B. longum* BIOMA 5920 นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้วิธีการนี้กับการหาปริมาณที่เหมาะสมขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium butyricum* (Kong และคณะ, 2004) โดยผลคำนวณพบว่าทิศทางของกากน้ำตาลจะลดลงจากค่ากึ่งกลางทุกๆ 1.8 กรัมต่อลิตร ส่วนสารสกัดจากยีสต์จะเพิ่มขึ้นจากค่ากึ่งกลางทุกๆ 2 กรัมต่อลิตร โดยได้ผลของการหาค่าแนวโน้มความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารและปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ที่ 20 ชั่วโมง (ตามตารางที่ 4.8)

จากผลการทดลองพบว่าอัตราส่วนของค่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ทำให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดอยู่ที่ 46.4 กรัมต่อลิตร และของสารสกัดจากยีสต์อยู่ที่ 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นค่าที่จะนำไปหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อไป (ตามภาพที่ 4.5)

ตารางที่ 4.8 แสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของเซลล์ในอาหารที่มีกากน้ำตาลและสารสกัดจากยีสต์จากการออกแบบการทดลองแบบ Steepest ascent

กากน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	สารสกัดจากยีสต์ (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (log ₁₀ โคโลนีต่อมิลลิลิตร)
50	6	8.9889 ± 0.0111
48.2	8	9.0321 ± 0.0901
46.4	10	9.2025 ± 0.0264
44.6	12	8.9942 ± 0.0165
42.8	14	8.8522 ± 0.0229
41	16	8.5207 ± 0.0814



ภาพที่ 4.4 กราฟแสดงอัตราส่วนความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อสารสกัดจากยีสต์จากการออกแบบการทดลองแบบ Steepest ascent

4.5 การหาปริมาณความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารที่เหมาะสมด้วยวิธีการ Central Composite Design (CCD)

จากการหาแนวโน้มความเข้มข้นขององค์ประกอบในอาหารในการทดลองข้อ 4.4 ทำการหาค่าปริมาณความเข้มข้นโดยละเอียด โดยใช้วิธีการทางออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) แบบ Central Composite circumscribed (CCC) ที่กำหนดระดับของ

ปริมาณความเข้มข้น 5 ระดับ จากผลการทดลอง (ตามตารางที่ 4.9) พบว่าการออกแบบการทดลองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.0071$) และค่า $R^2 = 0.8576$ และค่า predicted $R^2 = 0.6734$ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์การยอมรับตามที่ Lundstedt และคณะ, 1998 ที่ได้สรุปไว้ โดยพบว่าสารสกัดจากยีสต์และกากน้ำตาลค่ายกกำลังสอง (quadratic term) ให้ผลการเจริญของเชื้อแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.0021$, $P < 0.0046$ ตามลำดับ) เมื่อนำค่าสัมประสิทธิ์มาเขียนสมการขั้นที่สองในเทอมขององค์ประกอบที่ให้ผลการเจริญที่แตกต่างทำให้ได้สมการที่ 3 ดังนี้

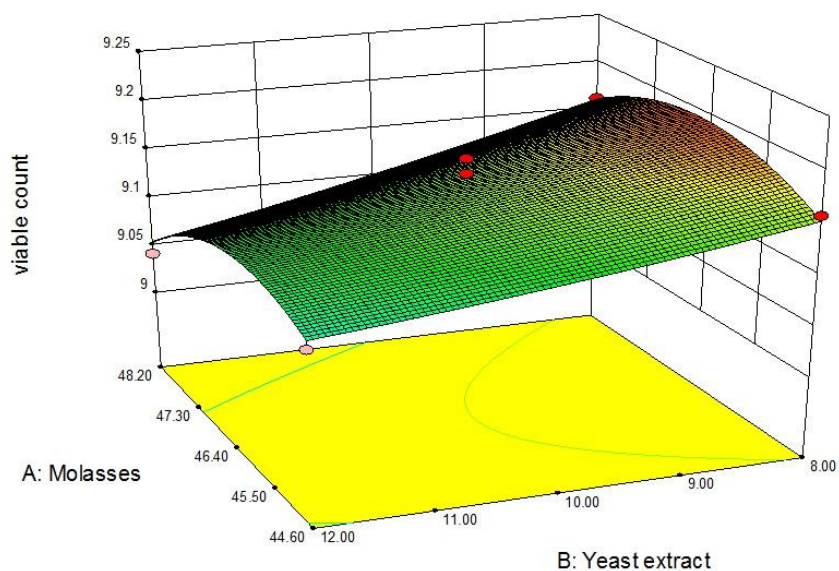
$$Y = 9.15 - 0.041X_2 - 0.038X_1^2 \dots\dots\dots (3)$$

การวิเคราะห์ผลการทดลองจากกราฟพื้นผิวผลตอบ (Response surface plot) แสดงค่าการเจริญของเชื้อจากการหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบแต่ละตัว พบว่าค่าความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อที่ชัดเจนที่ 8 กรัมต่อลิตร ส่วนกากน้ำตาลมีแนวโน้มของค่าความเข้มข้นที่มีผลต่อการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วง 45.5 ถึง 47.3 กรัมต่อลิตรซึ่งสอดคล้องกับค่าวิเคราะห์ค่าเสื่อมถอยของสารสกัดจากยีสต์และกากน้ำตาลค่ายกกำลังสองที่ให้ผลการเจริญของเชื้อแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ลักษณะดังกล่าวทำให้ได้รูปกราฟเป็นแบบโค้งหลังคา (Station ridge system) ที่มีค่าการยอมรับเป็นช่วงไม่ใช่เป็นจุด (Mayers และคณะ, 2009) (ตามภาพที่ 4.6) จากผลการทดลองจะกำหนดให้ช่วงความเข้มข้นขององค์ประกอบทั้งสองชนิดอยู่ในช่วงของการทดลองและค่าความเข้มข้นของเซลล์กำหนดให้ได้ค่าสูงสุด พบว่าจะได้ค่าประมาณการความเข้มข้นที่เหมาะสมของกากน้ำตาลจะอยู่ในช่วงประมาณ 45.23 ถึง 47.03 กรัมต่อลิตร ส่วนสารสกัดจากยีสต์ได้ค่าประมาณการความเข้มข้นที่ 8 กรัมต่อลิตร โดยจะได้ค่าประมาณการของปริมาณความเข้มข้นของเซลล์(predicted value) ในช่วงประมาณ 9.1753 ถึง 9.1944 \log_{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 4.9 ตารางแสดงการวิเคราะห์หาค่าเสื่อมถอยจากการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Circumscribed (CCC)

ตัวแปร	Coefficient	P-value
กากน้ำตาล (X_1)	- 0.0085	0.0042*
สารสกัดจากยีสต์ (X_2)	- 0.014	0.4692
X_1X_2	- 0.013	0.3288
X_1^2	- 0.038	0.0046*
X_2^2	0.0038	0.6912
Model		0.0071*
Lack of fit		0.8899
$R^2 = 0.8576$		Predicted $R^2 = 0.6734$

*แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.5 กราฟพื้นผิวผลตอบแสดงปริมาณของกากน้ำตาลและสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.6 การทดสอบค่าประมาณการความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบในสูตรอาหาร

จากการค่าประมาณการความเข้มข้นที่เหมาะสมขององค์ประกอบ (predicted value) ของความเข้มข้นของกากน้ำตาล และสารสกัดจากยีสต์มี 3 ลำดับที่ให้ผลการเจริญของเชื้อสูงสุด จึงทำการทดสอบการเจริญจริงกับเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ที่ 20 ชั่วโมง (ตามตารางที่ 4.10)

พบว่าค่าประมาณการความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ 46.5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์ 8 กรัมต่อลิตร (Modified MY) เป็นค่าเหมาะสมที่สุดให้ผลการประมาณการค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ $9.1944 \log_{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบการเจริญจริงสามารถให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์สูงถึง $9.2495 \log_{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อกับอาหาร MRS broth และอาหาร Milk based (Wong และคณะ, 2007) ผลการทดลองพบว่าอาหาร Modified MY ให้ผลการเจริญของเชื้อใกล้เคียงกับอาหาร MRS broth แต่สูงกว่าอาหาร Milk based (ตามตารางที่ 4.11) และเมื่อนำมาคิดค่าใช้จ่ายของต้นทุนการผลิตโดยใช้ราคาของวัตถุดิบจากข้อมูลในปัจจุบันพบว่าอาหาร Modified MY มีต้นทุน 49.49 บาทต่อลิตร อาหาร Milk based มีต้นทุน 62.14 บาทต่อลิตร และอาหาร MRS มีต้นทุน 162.34 บาทต่อลิตร ซึ่งพบว่าอาหาร Modified MY มีราคาต้นทุนถูกกว่า 20.36 เปอร์เซ็นต์ ของอาหาร Milk based และถูกกว่า 69.51 เปอร์เซ็นต์ ของอาหาร MRS broth ดังนั้นสรุปได้ว่าอาหาร Modified MY ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมีศักยภาพในการเลี้ยงเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 ได้เป็นอย่างดี เนื่องจากให้ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์สูง ราคาต้นทุนการผลิตต่ำประกอบกับมีองค์ประกอบเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรภายในประเทศ จึงเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ตารางที่ 4.10 การทดสอบค่าประมาณการความเข้มข้นขององค์ประกอบในสูตรอาหารทดแทน

ลำดับ ที่	การประมาณค่าความเข้มข้นขององค์ประกอบ (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (\log_{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	
	กากน้ำตาล	สารสกัดจากยีสต์	ค่าประมาณการ	ค่าจริง
1	45.23	8	9.1753	9.2073 ± 0.0312
2	46.50	8	9.1944	9.2495 ± 0.0771
3	47.03	8	9.1911	9.0969 ± 0.0000

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบผลการเจริญของเชื้อระหว่างอาหารทดแทน (Modified MY) กับอาหาร MRS และ Milk based

อาหาร	ความเข้มข้นของเซลล์ (log ₁₀ โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	จุลินทรีย์	อ้างอิง
Modified MY	9.2495 ± 0.0771	<i>B. animalis</i> TISTR 1925	ศึกษา
MRS broth	9.2386 ± 0.0625	<i>B. animalis</i> TISTR 1925	ศึกษา
Milk based	9.129	<i>B. pseudocatenutum</i> G4	Wong และคณะ (2007)

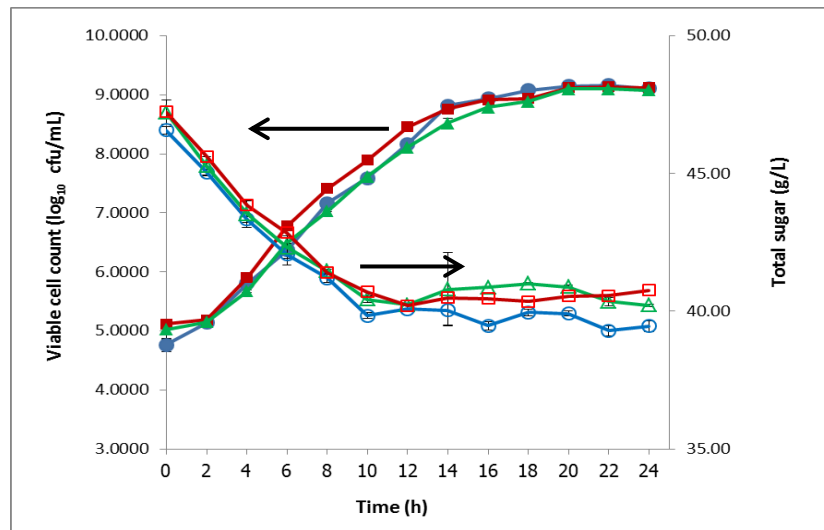
4.7 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในผลิตแบบแบคทีเรีย

โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified MY ที่ได้รับการพัฒนาขึ้น ซึ่งทำการศึกษาค่าความเร็วยุโรปในการกวนและค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 15 ลิตร

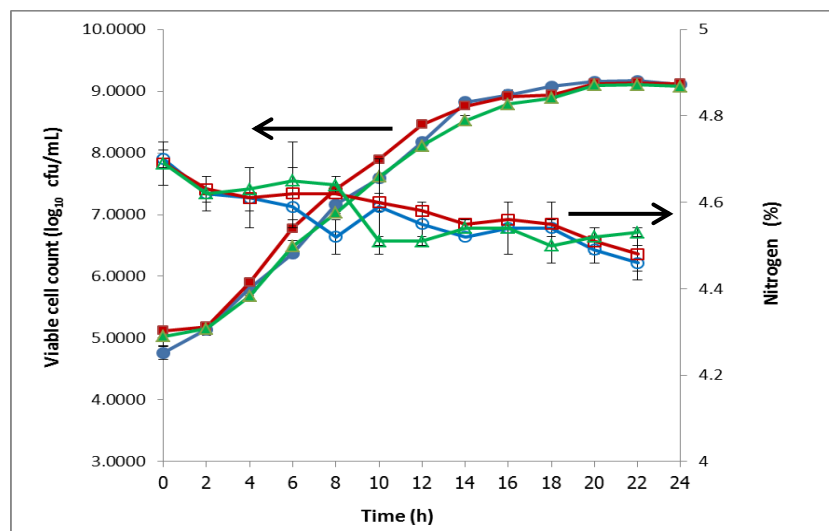
4.7.1 การศึกษาค่าความเร็วยุโรปในการกวนที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ได้ทำการศึกษาค่าความเร็วยุโรปในการกวนที่ 100 200 และ 300 รอบต่อนาที โดยไม่ควบคุมค่า pH พบว่าการใช้น้ำตาลและสารสกัดจากยีสต์มีปริมาณการนำใช้ที่ต่ำ โดยพบว่าน้ำตาลถูกนำไปใช้ในช่วง 10 ชั่วโมงแรก แต่เมื่อเวลาผ่านไปปริมาณการนำใช้เริ่มคงที่จนถึงสิ้นสุดการเลี้ยง ส่วนสารสกัดจากยีสต์จะมีปริมาณการนำใช้ต่ำมาก สาเหตุที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากการเลี้ยงภายใต้ภาวะไม่ควบคุมค่า pH ซึ่งพบว่าขณะเริ่มต้นของการเลี้ยงมีค่า pH ประมาณ 5.0 และเริ่มลดลงจนถึง 4.0 ซึ่งภาวะดังกล่าวจะส่งผลโดยตรงกับการเจริญของเชื้อ (ตามภาพที่ 4.7 ก. และ ข.)

จากความแตกต่างของค่าความเร็วยุโรปในการกวน พบว่าที่ความเร็วยุโรปในการกวน 200 รอบต่อนาที เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุด โดยให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ 0.8705 ต่อชั่วโมง (ตามตารางที่ 4.12) เนื่องจากความเร็วยุโรปในการกวน 300 รอบต่อนาที เกิดแรงเฉยที่ก่อให้เกิดขึ้นขณะการเลี้ยงซึ่งสามารถทำให้เซลล์ถูกทำลายได้ ส่วนความเร็วยุโรปในการกวนที่ 100 รอบต่อนาที เกิดการกระจายของสารอาหารและเซลล์ได้ไม่ทั่วถึงเพราะอาหารทดแทนมีความเข้มข้นของกากน้ำตาล จึงทำให้ได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ต่ำกว่า สอดคล้องกับผลการทดลองของ Wong และคณะ (2007) ที่ทำการศึกษาค่าความเร็วยุโรปในการกวนที่เหมาะสมของการผลิตเชื้อ *B. pseudocatenulatum* G4 ในอาหาร Milk based พบว่าค่าความเร็วยุโรปในการกวนที่เหมาะสมคือ 200 รอบต่อนาที โดยให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าความเร็วยุโรปในการกวนที่ 100 และ 300 รอบต่อนาที



ภาพที่ 4.6 ก ผลการเจริญและปริมาณการใช้ของเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 ในภาวะความเร็วในกวนผสมที่ 100 รอบต่อนาที (● ○) 200 รอบต่อนาที (■ □) และ 300 รอบต่อนาที (▲ △) สัญลักษณ์ที่บคือปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ และสัญลักษณ์โปร่งคืออัตราการใช้ทั้งหมด



ภาพที่ 4.6 ข. ผลการเจริญและปริมาณการใช้สารอาหารกลุ่มไนโตรเจนของเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 ในภาวะความเร็วในกวนผสมที่ 100 รอบต่อนาที (●, ○) 200 รอบต่อนาที (■, □) และ 300 รอบต่อนาที (▲, △) สัญลักษณ์ที่บคือปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ และสัญลักษณ์โปร่งคืออัตรา

ตารางที่ 4.12 แสดงค่าจลนพลศาสตร์แบบแบตซ์จากค่าความเร็วรอบในการกวนที่แตกต่างกัน

ความเร็วรอบในการกวน (รอบต่อนาที)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
100	0.7641
200	0.8705
300	0.7418

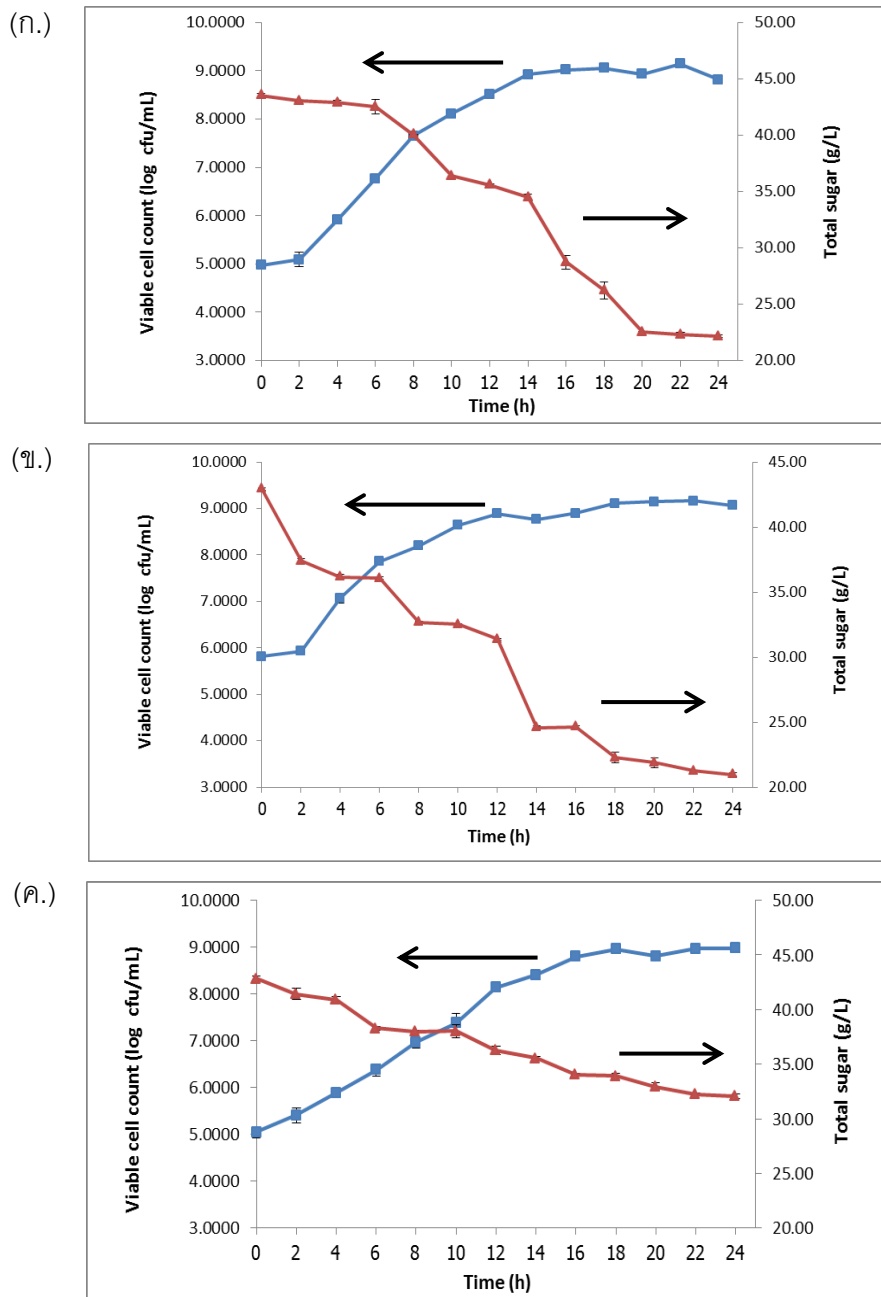
4.7.2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ

ทำการศึกษาค่า pH สำหรับการเลี้ยงเชื้อที่ 6.0 6.5 และ 7.0 โดยควบคุมความเร็วในการกวนที่ 200 รอบต่อนาที แสดงการเจริญของเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 ในภาวะที่ควบคุมค่า pH พบว่า pH ที่ 6.0 และ 6.5 มีปริมาณการใช้น้ำตาลสำหรับการเจริญสูงกว่า pH 7.0 (ตามภาพที่ 4.7) สำหรับการใส่สารสกัดจากยีสต์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนพบว่ามีการใช้เพียงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาล ซึ่งมีรายงานพบว่ากากน้ำตาลมีปริมาณของสารประกอบที่เป็นกลุ่มไนโตรเจนประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (Olbrich, 2006) ซึ่งอาจไปรบกวนผลการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทำให้เห็นค่าแนวโน้มการใช้ไม่ชัดเจน (ตามภาพที่ 4.8)

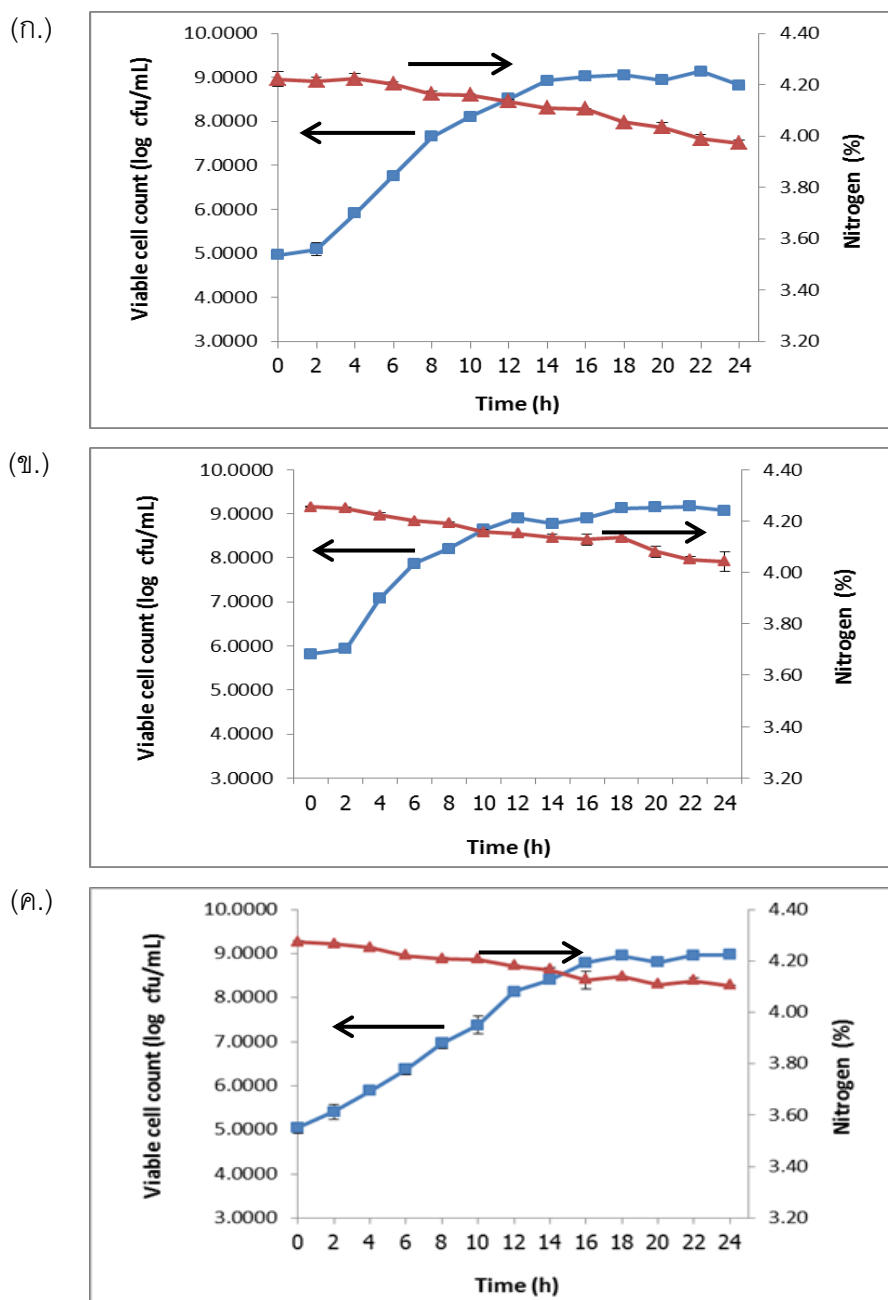
โดยผลการเจริญของเชื้อพบว่า pH 6.0 และ 6.5 มีค่าความเข้มข้นของเซลล์พบว่าใกล้เคียงกันที่ $9.3116 \log_{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และ $9.1650 \log_{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ pH 6.0 มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่ 0.9835 ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าค่า pH 6.5 (ตามตารางที่ 4.13) โดยมีรายงานพบว่า *Bifidobacteria* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารที่สามารถเจริญได้ในช่วง pH 6.0 ถึง 7.0 (Biavati และ Mattarelli, 2006) และ Wong และคณะ (2007) พบว่าค่า pH 6.0 ถึง 6.5 เป็นค่าที่เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อ *B. pseudocatenulatum* G4 ในอาหาร Milk based และ *B. lactis* และ *B. animalis* สามารถเจริญเติบโตได้ในภาวะค่า pH 3.5 (Matsumoto และคณะ, 2004) ดังนั้นสรุปได้ว่าภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 ที่ความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที ที่ pH 6.0

ตารางที่ 4.13 แสดงค่าจลนพลศาสตร์ของการผลิตแบบแบตซ์ในภาวะค่า pH ที่แตกต่างกัน

ค่า pH	ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด (\log_{10} โคโลนีต่อมิลลิลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)
6.0	9.3116 ± 0.0132	0.9835
6.5	9.1650 ± 0.0111	0.8755
7.0	8.9750 ± 0.0857	0.6143



ภาพที่ 4.7 ผลการเจริญและปริมาณการใช้น้ำตาลของเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 ในอาหารที่ควบคุมความเร็วรอบในการรวน 200 รอบต่อนาที (ก.) pH 6.0 (ข.) pH 6.5 และ (ค.) pH 7.0 (▲) แสดงค่าปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ และ (■) แสดงค่าปริมาณความเข้มข้น



ภาพที่ 4.8 ผลการเจริญและปริมาณการใช้ไนโตรเจนของเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925

ในอาหารที่ควบคุมความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที (ก.) pH 6.0 (ข.) pH 6.5 และ (ค.) pH 7.0 (▲) แสดงค่าปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ และ (■) แสดงค่าปริมาณความเข้มข้นของไนโตรเจน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้ เป็นการพัฒนาสูตรอาหารใหม่เพื่อใช้ทดแทนสูตรอาหารที่มีนมเป็นองค์ประกอบสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตเชื้อ *Bifidobacterium animalis* TISTR 1925 พร้อมทั้งศึกษาภาวะที่ส่งผลต่อการผลิตเบื้องต้นเมื่อนำอาหารสูตรดังกล่าวมาใช้เลี้ยงในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพแบบแบตช์ ซึ่งพบว่าสูตรอาหารชนิดใหม่สามารถใช้เป็นอาหารทดแทนได้ดี ให้ผลการเจริญของเชื้อที่สูงใกล้เคียงกับอาหารในระดับการค้า (commercial grade) มีต้นทุนต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่มีนมเป็นองค์ประกอบเพราะวัตถุดิบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนภายในประเทศมีจำนวนมากและราคาไม่แพง จึงทำให้ได้สูตรอาหารที่สามารถนำไปใช้ศึกษาความเร็วยุบของไบโกลวนและค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงแบบแบตช์เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

การพัฒนาอาหารทดแทนสูตรอาหารที่มีนมเป็นองค์ประกอบ

จากการวิจัยและพัฒนาเบื้องต้นทำการคัดเลือกองค์ประกอบของอาหารโดยคำนึงถึงความเป็นไปได้สำหรับการนำมาใช้และต้นทุนของการผลิต ประกอบกับการใช้เทคนิคการออกแบบการทดลองแบบ 2^k full factorial design พบว่าองค์ประกอบในสูตรอาหารได้แก่กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มาจากวัตถุดิบภายในประเทศและสารสกัดจากยีสต์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนและ bifidus factor เมื่อนำมาหาปริมาณที่เหมาะสมโดยประยุกต์การออกแบบการทดลองแบบ Steepest ascent เพื่อให้ได้แนวโน้มของปริมาณของแต่ละองค์ประกอบพบว่าค่าความเข้มข้นของกากน้ำตาลอยู่ที่ประมาณ 46.4 กรัมต่อลิตร สารสกัดจากยีสต์ประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ค่าประมาณที่ได้จะนำไปหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมโดยใช้การออกแบบการทดลองเป็นแบบ Central Composite Circumscribed (CCC) ซึ่งจากการทดลองได้ค่าประมาณการความเข้มข้นที่เหมาะสม (predicted value) ของกากน้ำตาลอยู่ที่ 46.5 กรัมต่อลิตร และสารสกัดจากยีสต์อยู่ที่ 8 กรัมต่อลิตร และเมื่อทำการทดสอบจริงเพื่อยืนยันผลของการทดลองพบว่าสูตรอาหารที่พัฒนาขึ้นมา (Modified MY) สามารถให้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อสูงถึง $9.2495 \log_{10}$ โคลินี่ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกับอาหาร MRS ที่มีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ $9.2386 \log_{10}$ โคลินี่ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร Milk based ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

Bifidobacteria พบว่ามีปริมาณความเข้มข้นของเชื้อใกล้เคียงกัน เช่นการเพาะเลี้ยง *B. pseudocatenulatum* G4 ในอาหาร Milk based ที่ให้ปริมาณความเข้มข้นของเชื้อ $9.129 \log_{10}$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสูตรอาหาร Modified MY ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นสามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับกระบวนการผลิตเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 ในระดับอุตสาหกรรมได้

การศึกษาภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมแบบเบดซ์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพ

เป็นการศึกษาเพื่อหาค่าภาวะที่เหมาะสมเบื้องต้นเพื่อที่จะนำไปสู่การพัฒนาต่อยอด

สำหรับกระบวนการผลิตเซลล์ในอนาคต โดยใช้สูตรอาหาร Modified MY ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นเลี้ยงเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 15 ลิตร ทำการปรับเปลี่ยนค่าความเร็วรอบในการกวนที่ 100 200 และ 300 รอบต่อนาที โดยไม่ควบคุม pH พบว่าที่ 200 รอบต่อนาที ให้ผลการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุดมีอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ที่ 0.8705 ต่อชั่วโมง ส่วนความเร็วรอบในการกวนที่ 100 และ 300 รอบต่อนาที มีอัตราการเจริญจำเพาะที่ต่ำกว่า เนื่องจากที่อาหารมีความข้นหนืดจากกากน้ำตาลจึงทำให้การกระจายตัวของเซลล์ สารอาหารและการถ่ายโอนความร้อนที่ 100 รอบต่อนาที ไม่ดีพอ ส่วนที่ 300 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นความเร็วที่ทำให้เกิดแรงเฉยไปทำลายเซลล์ขณะเลี้ยงได้ ดังนั้นค่าความเร็วรอบในการกวนที่เหมาะสมจึงเป็นที่ 200 รอบต่อนาที หลังจากนั้นทำการศึกษาค่า pH สำหรับการเลี้ยงเชื้อที่ 6.0 6.5 และ 7.0 โดยควบคุมค่าความเร็วรอบในการกวนที่ 200 รอบต่อนาที พบว่าที่ pH 6.0 ให้ผลการเจริญของเชื้อได้ดีที่สุด โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงถึง 0.9835 ต่อชั่วโมง ดังนั้นค่าความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที และค่า pH ที่ 6.0 เป็นค่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบบเบดซ์ของเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 15 ลิตร สำหรับนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาระบวนการผลิตในขั้นที่สูงขึ้นต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองเพื่อพัฒนาอาหารทดแทนสูตรอาหารที่มีนมเป็นองค์ประกอบ จะพบว่าสารสกัดจากยีสต์ที่เป็นแหล่งไนโตรเจนและ bifidus factor ในอาหารเลี้ยงเชื้อยังมีต้นทุนของวัตถุดิบที่สูงอยู่ ซึ่งถ้าหาแหล่งของวัตถุดิบที่มีราคาถูกกว่ามาทดแทนเช่น กลุ่มโพลิโกแซ็กคาไรด์ ส่วนแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากสารสกัดจากยีสต์ก็พบว่าในกากน้ำตาลมีกลุ่มของสารประกอบของไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein) ที่เป็นแหล่งของสารประกอบไนโตรเจนชนิดต่างๆ และ

ยังสามารถเพิ่มเติมองค์ประกอบของแหล่งไนโตรเจนเป็นประเภทเกลือแอมโมเนียประเภทต่างๆ ได้อีก

2. การใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนซึ่งถือว่าสามารถช่วยลดต้นทุนของการผลิตได้เป็นอย่างดี แต่ในการศึกษาพบว่าการวิเคราะห์ปริมาณการใช้กากน้ำตาลเพื่อการตรวจติดตามการเจริญของเชื้อทำได้ยาก เนื่องจากในกากน้ำตาลมีชนิดของและแหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย เชื้อ *Bifidobacteria* ก็มีสมบัติในการใช้กากน้ำตาลสำหรับการเจริญได้หลายชนิด ทำให้ไม่สามารถจะวิเคราะห์ผลด้านจุลนพลศาสตร์ได้ชัดเจน เช่นเดียวกับการวัดปริมาณของไนโตรเจนให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ถูกรบกวนด้วยสารประกอบของไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน (non-protein) ประกอบอยู่ การวิเคราะห์หาค่าปริมาณไนโตรเจนจึงไม่ชัดเจน อีกทั้งกากน้ำตาลมีกากตะกอนของแข็งที่ได้มาจากระบวนการผลิตน้ำตาลทรายซึ่งส่งผลกระทบต่อกระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อในช่วงเก็บเกี่ยวเซลล์ที่มีการปะปนของกากน้ำตาลตะกอนของแข็งในผลิตภัณฑ์ได้ สำหรับการเตรียมกากน้ำตาลก่อนนำมาใช้ด้วยวิธีปั่นเหวี่ยงแยกกากตะกอนก่อนนำมาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นทางเลือกหนึ่ง แต่ในระดับอุตสาหกรรมก็เป็นต้นทุนที่เพิ่มขึ้นเช่นกัน

3. การเปรียบเทียบราคาต้นทุนของอาหารพบว่าองค์ประกอบของอาหาร MRS ที่นำมาคำนวณหาต้นทุนต้นเป็นระดับห้องปฏิบัติการทั้งหมดซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง เนื่องจากองค์ประกอบส่วนใหญ่ไม่มีระดับอุตสาหกรรม จึงทำให้ผลการเปรียบเทียบราคาอยู่กับคนละฐานกับอาหาร Milk based และ Modified MY ที่มีองค์ประกอบทั้งระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ภูษิตา วรรณนิสสร, จารุวรรณ สิทธิพล, ชนิษฐา นิวาตะบุตร, ปิยะมาศ ศรีภูมิ และสุภาพ อัจฉริยศรี-
พงษ์. การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพจากจุลินทรีย์.

ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2548

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและทราย กระทรวงอุตสาหกรรม. รายงานการผลิตอ้อยและ
ทรายฉบับปิดหีบปีการผลิต 2553/54. (online). แหล่งที่มา:[http://](http://ocsb.go.th/upload/production/fileupload/1757-8156.pdf)

ocsb.go.th/upload/production/fileupload/1757-8156.pdf (18 เมษายน 2556)

ภาษาอังกฤษ

Abe, F., Muto, M., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., Aihara, H., Ohashi, Y., Fujisawa, T. Safety
evaluation of probiotic bifidobacteria by analysis of mucin degradation activity
and ranslocation ability. Anaerobe. 16 (2009) : 131–136.

Allan, S. J., Jordan, S., Storey, M., Thornton, C. A., Gravenor, I., Plummer, S. F.,
Wang, D. L., Morgan, G. Dietary supplementation with lactobacilli and
bifidobacteria is well tolerated and not associated with adverse events during late
pregnancy and early infancy. Journal of Nutrition. 140 (2010) : 483-488.

Amaretti, A., Bernadi, T., Tamburini, E., Zononi, S., Lomma, M., Matteuzzi, D. and Rossi,
M. Kinetics and metabolism of *Bifidobacterium adolescentis* MB 239 growing on
glucose, galactose, lactose and galactooligosaccharides. Applied and
Environmental Microbiology. (2007) : 3637-3644.

- Arunachalam, K., Gill, H.S. and Chandra, R.X. Enhancement of natural immune function by dietary consumption of *Bifidobacterium lactis* (HN019). European Journal of Clinical Nutrition. 54 (2000) : 263–267.
- Bae, E.A., Han, M.J., Song, M. and Kim, D.H. Purification of rotavirus infection-inhibitory protein from *Bifidobacteria breve* K-110. Journal of Microbiology and Biotechnology. 12 (2002) : 553–556.
- Benno, Y., Endo, K., Mizutani, T., Namba, Y., Komori, T. and Mitsuoka, T. Comparison of fecal microflora of elderly persons in rural and urban areas of Japan. Applied and Environmental Microbiology. 55 (1989) : 1100–1105.
- Benno, Y., Mitsuoka, T. and Kanazawa, K. Human fecal flora in health and colon cancer. Acta Chirurgica Scandinavica. S562 (1991) : 15–23.
- Biavati, B. and Mattarelli, P. The Family Bifidobacteriaceae. Prokaryotes. 3 (2006) : 322-382.
- Buckee, G.K. Determination of total nitrogen in barley, malt and beer by Kjeldahl procedures and the Dumas Combustion Method. Journal of the institute of brewing. 100 (1994) : 57-64.
- Bulhões, A. C., Goldani, H. A. S., Oliveira, F. S., Matte, U. S., Mazzuca, R. B., Silveira, T. R. Correlation between lactose absorption and the C/T-13910 and G/A-22018 mutations of the lactase-phlorizin hydrolase (LCT) gene in adult-type hypolactasia. Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 40 (2007) : 1441–1446.

- Chadwick, V.S. and Anderson, R.P. The role of intestinal bacteria in etiology and maintenance of inflammatory bowel disease. In Human Colonic Bacteria: Role in Nutrition, pp227–256. Physiology and Pathology. ed. Gibson, G.R. and Macfarlane, G.T. Boca Raton, FL: CRC Press. 1995.
- Chiang, B.L., Sheih, Y.H., Wang, L.H., Liao, C.K. and Gill, H.S. Enhancing immunity by dietary consumption of a probiotic lactic acid bacterium (*Bifidobacterium lactis* HN019): optimization and definition of cellular immune responses. European Journal of Clinical Nutrition. 54 (2000) : 849–855.
- Chouraqui, J.P., Van Egroo, L.D. and Fichot, M.C. Acidified milk formula supplemented with *Bifidobacterium lactis*: impact on infant diarrhea in residential care settings. Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition. 38 (2004) : 288–292.
- Dambekodi, P.C. and Gilliland, S.E. Incorporation of cholesterol into the cellular membrane of *Bifidobacterium longum*. Journal of Dairy Science. 81 (1998) : 1818–1824.
- Densupsoontorn, N., Jirapinyo, P., Thamonsiri, N., Chantaratin, S., Wongarn, R. Lactose Intolerance in Thai Adults. Journal of Medical Association Thai. 87(12) (2004) : 1501-5.
- De Smet, I., De Boever, P. and Versteaete, W. Cholesterol lowering in pigs through enhanced bacterial bile salt hydrolase activity. British Journal of Nutrition. 79 (1998) : 185–194.
- De Vries, W., S. J. Gerbrandy, and A. H. Stouthamer. Carbohydrate metabolism in *Bifidobacterium bifidum*. Biochimica et Biophysica Acta. 136 (1967) : 415–425.

Dubois, M., Gilles, K. A., Rebers, P. A., Smith, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical chemistry. 28(3) (1956) : 350-356.

Ehrmann, M. A., Korakli, M. and Vogel, R. F. Identification of the gene for β -fructofuranosidase of *Bifidobacterium lactis* DSM10140^T and characterization of the enzyme expressed in *Escherichia coli*, Current Microbiology. 46 (2003) : 391–397.

FAO/WHO. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for The evaluation of probiotics in food [online]. 2002. Available from <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. [2012 Sept. 30]

Favier, C. F., Vaughan, E. E., De Vos, W. M. and Akkermans, A. D. Molecular monitoring Of succession of bacterial communities in human neonates. Applied and Environmental Microbiology. 68 (2002) : 219–226.

Fooks, L.J. and Gibson, G.R. Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. Anaerobe. 9 (2003) : 231–242.

Fooks, L.J. and Gibson, G.R. Probiotics as modulators of the gut flora. British Journal of Nutrition. 88(S1) (2002) : S39–S49.

Fukushima, Y., Kawata, Y., Hara, H., Terada, A. and Mitsuoka, T. Effect of the probiotic formula on intestinal immunoglobulin A production in healthy children. International Journal of Food Microbiology. 42 (1998) : 39-44.

Gabrielsson, J., Lindberg, N.-O. and Lundstedt, T. Multivariate methods in pharmaceutical applications. Journal of Chemometrics. 16 (2002) : 141-160.

- Gionchetti, P., Rizzellom, F., Venturi, A. and Campieri, A. Probiotics in infective diarrhea and inflammatory bowel disease. Journal of Gastroenterology and Hepatology. 15 (2000) : 489–493.
- Granato, D., Brenco, G. F., Cruz, A. G., Faria, J. A. F. and Shah, N. P. Probiotic dairy products as Functional Foods. Comprehensive Reviews in Food Science and Food safety. 9 (2010) : 455-470.
- Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C Maxwell. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. Applied of Environment and Microbiology. 40 (1985) : 377-381.
- Gopal, P.K., Prasad, J., Smart, J., Gill, H.S., In vitro adherence properties of *Lactobacillus rhamnosus* DR20 and *Bifidobacterium lactis* DR10 strains and their antagonistic activity against an enterotoxigenic *Escherichia coli*. International Journal of Food Microbiology. 67 (2001) : 207–216.
- Guarner, F. and Malagelada, J.R. Gut flora in health and disease. The Lancet. 361 (2003) : 512–519.
- Gueimonde, M., Tolkkio, S., Korpimaki, T., Salminen, S. New real-time quantitative PCR procedure for quantification of bifidobacteria in human fecal samples. Applied and Environmental Microbiology. 70 (2004) : 4165–4169.
- Harmsen, H. J. M., Wildeboer-Veloo, G. C. Raangs, A. A. Wagendorp, N. Klijn, J. B. Bindels, and G. W. Welling. Analysis of intestinal flora development in breast-fed and formula-fed infants by using molecular identification methods. Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition. 30 (2000) : 61–67.

- Hirayama, K. and Rafter, J. The role of probiotic bacteria in cancer prevention. *Microbes And Infection*, 2 (2000) : 681–686.
- Holland, D. F. Generic index of the commoner forms of bacteria. *Journal of Bacteriology*. 5 (1920) :191–229.
- Hopkins, M. J., Sharp, R. and Macfarlane, G. T. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture, 16S rRNA abundance, and community cellular fatty acid profiles. *Gut*. 48 (2001) : 198–205.
- Hosono, A., Lee, J., Ametani, A., Natsume, M., Hirayama M., Adachi, T. and Kaminogawa, S. Characterization of a water-soluble polysaccharide fraction with immunopotentiating activity from *Bifidobacterium adolescentis* M101–4. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 61 (1997) : 312-316.
- Hsu, Y.-L. and Wu, W.-T. A novel approach for scaling-up a fermentation system. *Biochemical Engineering Journal*. 11 (2002) : 123-130.
- Hyung-Hwan, H., Lee, H. H., Park, K., Lee, J. H., Yeo, I. H. and Kim, T. S. Fermentation conditions for the production of cell mass and comparison of saccharide utilization in *Bifidobacterium longum* and *B. breve*. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 5 (1995) : 285-291.
- Janer, C., Rohr, L. M., Pelaez, C. and Laloi, M. Hydrolysis of oligofructose by the recombinant β -fructofuranosidase from *Bifidobacteria lactis*. *Systematic and Applied Microbiology*. 27 (2004) : 279–283.

- Janer, C., Pelaez, C. and Requena, T. Caseinomacropptide and whey protein concentrate enhance *Bifidobacterium lactis* growth in milk. Food Chemistry, 86 (2004) : 263-267.
- Jiang, T., Mustapha, A. and Savaiano, D.A. Improvement of lactose digestion in humans by ingestion of unfermented milk containing *Bifidobacterium longum*. Journal of Dairy Science. 79 (1996) : 750–757.
- Kailasapathy, K., Chin, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* Immunology and Cell Biology. 78 (2000) : 80–88.
- Kim, T. B., Song, S. H., Kang, S. C., Oh, D. K. Quantitative comparison of lactose and Glucose utilization in *Bifidobacterium longum* cultures. Biotechnology Progress. 19 (2003) : 672-675.
- Kiviharju, K., Leisola, M. and Eerikainen, T. Optimization of a *Bifidobacterium longum* Production process. Journal of Biotechnology. 117 (2005) : 299-308.
- Kleessen, B., H. Bunke, K. Tovar, J. Noack, and G. Sawatzki. Influence of two infant Formulas and human milk on the development of the faecal flora in newborn infants. Acta Paediatrica. 84 (1995) : 1347–1356.
- Kleessen, B., Sykura, B., Zunft, H.J. and Blaut, M. Effects of inulin and lactose of fecal microflora, microbial activity, and bowel habit in elderly constipated persons. American Journal of Clinical Nutrition. 65 (1997) : 1397–1402.

- Kong, Q., He, G., Chen, Q. and Chen, F. Optimizatio of medium composition for Cultivating *Clostridium butyricum* with response surface methodology. Journal of Food Microbiology. 69 (2004) : 164-168.
- Kumemura, M., Hashimoto, F., Fujii, C., Matsuo, K., Kimura, H., Miyazoe, R., Okamatsu, H., Inokuchi, T. et al. Effects of administration of 4G-beta-D-galactosylsucrose on fecal microflora, putrefactive products, short chain fatty acids, weight, moisture and pH, and subjective sensation of defecation in the elderly with constipation. Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition. 13 (1992) : 199–210.
- Leahy, S.C., Higgins, D.G., Fitzgerald, G.F. and Sinderen, D. van Getting better with bifidobacteria. Journal of Applied Microbiology. 98 (2005) : 1303-1315.
- Lee, H.Y., Park, J.H., Seik, S.H., Cho, S.A., Baek, M.W., Kim, D.J., Lee, Y.H. and Park, J.H. Dietary intake of various lactic acid bacteria suppresses type 2 helper T cell production in antigen-primed mice splenocyte. Journal of Microbiology and Biotechnology. 14 (2004) : 167–170.
- Lee, Y. J., Yu, W. K. and Heo, T. R. Identification and screening for antimicrobial activity against *Clostridium difficile* of *Bifidibacterium* and *Lactobacillus* species isolated from healthy infant faeces. International Journal of Antimicrobial Agents. 21 (2003) : 340-346.
- Liew, S. L., Ariff, A. B., Raha, A. R. and Ho, Y. W. Optimization of medium composition for the production probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. International Journal of Food Microbiology. 102 (2005) : 137-142.

- Lundstedt, T., Seifert, E., Abramo, L., Thelin, B., Nystrom, A., Pettersen, J. and Bergman, R. Experimental design and optimization. Chemometrics and intelligent laboratory systems. 42 (1998) : 3-40.
- Mahalakshmi, R. and Murthy, VVPS. Growth of *Bifidobacterium bifidum* in whey-based media. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology. 25 (2000) : 177-179.
- Mangin, I., Y. Bouhnik, N. Bisetti, and B. Decaris. Molecular monitoring of human intestinal *Bifidobacteria* strain diversity. Research Microbiology. 150 (1999) : 343–350.
- Marin, M. L., Lee, J. H., Murtha, J., Ustunol, Z. and Pestka, J. J. Differential cytokine production in clonal macrophage and T-cell lines cultured with bifidobacteria. Journal of Dairy Science. 80 (1997) : 2713-2720.
- Marshall, V. M. and Tamime, A. Y. Starter cultures employed in the manufacture of biofermented milks. International of Journal Dairy Technology. 50 (1997) : 35-41.
- Marteau, P., Flourie, B., Pochart, P., Chastang, C., Desjeux, J.F. and Rambaud, J.C. Role of microbial lactase (EC 3.2.123) activity from yogurt on the intestinal absorption of lactose: an in vivo study in lactase deficient humans. British Journal of Nutrition. 64 (1990) : 71–79.
- Matsumoto, M., Ohishi, H. and Benno, Y. H⁺ - ATPase activity in *Bifidobacteria* with Special reference to acid tolerance. International of Journal Food and Microbiology. 93 (2004) : 109–113.

- Miles, A. A. and Misra, S. S. The estimation of bactericidal power of the blood. Journal of Hygiene. 38 (1938) : 732-749.
- Mitsuoka, T., and C. Kaneuchi. Ecology of bifidobacteria. America Journal of Clinical Nutrition. 30 (1977) : 1799–1810.
- Munsch-Alatossava, P., Rita, H. and Alatossava, T. A fast and more economical alternative to the standard plate count (SPC) method for microbiological analyses of raw milks. Commuunicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology. (2007) : 495-499.
- Myers, R. H., D. C. Montgomery. and Anderson-cook, C. M. Response Surface Methodology. Process and Product Optimization Using Designed Experiments. 3rd ed. New York: John Wiley and Sons; 2009.
- Olbrich, H. The Molasses, Biotechnologie-Kempe GmbH, Berlin. 2006.
- Perrin, S., Warchol, M., Grill, J. P. and Schneider, F. Fermentations of fructo-Oligosaccharides and their components by *Bifidobacterium infantis* ATCC 15697 on batch culture in semi-synthetic medium. Journal of Applied Microbiology. 90 (2001) : 859 – 865.
- Petuely, F., and G. Kristen. Investigation of the bifidus factor. III: The bifidus factor, an Essential active material for the infant. Osterr. Z. Kinderheilk. Kinderfursorge. 6 (1953) : 173–190.
- Picard, C., Fioramonti, J., Robinson, T., Neant, F. and Matuchansky, C. Bifidobacteria as probiotic agents – physiological effects and clinical benefits. Aliment Pharmacology. 22 (2005) : 495-512.

- Plummer, S., Weaver, M.A., Harris, J.C., Dee, P. and Hunter, J. *Clostridium difficile* pilot study: effect of probiotic supplementation on the incidence of *C. difficile* diarrhoea. International Microbiology. 7 (2004) : 59–62.
- Pribila, B. A., Hertzler, S. R., Martin, B. R., Weaver, C. M., Savaiano, D. Improved lactose digestion and intolerance among African-American adolescent girls fed a dairy-rich diet. Journal of the American Dietetic Association. 100(5) (2000) : 524-528.
- Rakoff-Nahoum, S., Paglino, J., Eslami-Varzaneh, F., Edberg, S., Medzhitov, R. Recognition of commensal microflora by toll-like receptors is required for intestinal homeostasis. Cell. 118 (2004) : 229–241.
- Rasic, J. L. and Kurmann, J. A. Bifidobacteria and Their Role. Birkhauser Verlag, Basel. (1983) : 11-12.
- Reyed, R. M. and El-Diwany A. I. Molasses as Bifidus Promoter on Bifidobacteria and Lactic acid Bacteria growing in skim milk . The Internet Journal of Microbiology. 5(1) (2008)
- Satokari, R.M., Vaughan, E.E., Smidt, H., Saarela, M., Matto, J. and de Vos, W.M. Molecular approaches for the detection and identification of bifidobacteria and lactobacilli in the human gastrointestinal tract. Systematic and Applied Microbiology. 26 (2003) : 572–584.
- Scardovi, V. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. 1st ed. Genus Bifidobacteria. Orla-Jensen 1924, 472^{al}. In . Sneath, P. H. A., Mair, N S., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. (Eds.), pp.1418-1434. Williams and Wilkins, Baltimore. MD. 2,1986.

- Scardovi, V., and L. D. Trovatelli. The fructose-6-phosphate shunt as peculiar pattern of hexose degradation in the genus *Bifidobacteria*. Annali di Microbiologia ed Enzimologia. 15 (1965) : 19–29.
- Servin, A.L. Antagonistic activities of lactobacilli and bifidobacteria against microbial pathogens. FEMS Microbiology. 28 (2004) : 405–440.
- Shiba, T., Aiba, Y., Ishikawa, H., Ushiyama, A., Takagi, A., Mine, T. and Koga, Y. The suppressive effect of bifidobacteria on *Bacteroides vulgatus*, a putative pathogenic microbe in inflammatory bowel disease. Microbiology and Immunology. 47 (2003) : 371–378.
- Silva, A.M., Bambirra, E.A., Oliveira, A.L., Souza, P.P., Gomes, D.A., Vieira, E.C. and Nicoli, J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. Journal of Applied Microbiology. 86 (1999) : 331–336.
- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N. and Bandaru, S. R. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid-producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. Carcinogenesis. 18 (1997) : 833–841.
- St-Onge, M.P., Farnworth, E.R. and Jones, P.J.H. Consumption of fermented and nonfermented dairy products: effects on cholesterol concentrations and metabolism. American Journal of Clinical Nutrition. 71 (2000) : 674–681.
- Steer, T., Carpenter, H., Tuohy, K. and Gibson, G. R. Perspectives on the role of the human gut microbiota and its modulation by pro- and prebiotics. Nutrition Research Reviews. 13 (2000) : 229–254.

- Surawicz, C.M. Probiotics, antibiotic-associated diarrhoea and *Clostridium difficile* diarrhoea in humans. Best Practice and Research Clinical Gastroenterology. 17 (2003) : 775–783.
- Tanaka, R., Takayama, H., Morotomi, M., Kuroshima, T., Ueyama, T., Matsumoto, K., Kuroda, A. and Mutai, M. Effects of administration of TOS and *Bifidobacterium breve* 4006 on the human faecal flora. Bifidobacteria Microflora. 2 (1983) : 17–24.
- Toure', R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O. and Fliss, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. Journal of Applied Microbiology. 95 (2003) : 1058–1069.
- Tissier, M. H. La réaction chromophile d'Escherich et Bacterium Coli. Comptes Rendus Society Biology. 51 (1899) : 943–945.
- Traskalova-Hogenova, H., Stepankova, R., Hudcovic, T., Tuckova, L., Cukrowska, B., Lodinova-Zadnikova, R., Kozakova, H., Rossmann, P. et al. Commensal bacteria (normal microflora), mucosal immunity and chronic inflammatory and autoimmune diseases. Immunology Letters. 93 (2004) : 97–108.
- Trojanova, E., Vlkova, V., Rada, M. Marounek. Different utilization of glucose and raffinose in *Bifidobacteria breve* and *Bifidobacterium animalis*. Folia Microbiologica. 51(4) (2006) : 320-324.
- Winslow, C. E. A., J. Broadhurst, R. E. Buchanan, C. Krum-wiede, L. A. Rogers, and G. H. Smith. The families and genera of the bacteria: reliminary report of the Committee of the Society of American Bacteriologistson Characterization and Classification of Bacterial Types. Journal of Bacteriology. 2 (1917) : 505–566.

- Wong, S, Kabeir, B. M., Shuhaimi, M., Rosfarizan, M. and Yazid, A. M. Growth optimization of a probiotic candidate, *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4, in milk medium using response surface methodology. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 12 (2007) : 106-113.
- Wong, S., Kabeir, B. M., Shuhaimi M., Rosfarizan, M. and Yazid, A. M. Influence of pH and Impeller Tip Speed on the Cultivation of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4, in a Milk-Base Medium. Biotechnology and Bioprocess Engineering. 12 (2007) : 475-483.
- Van der Meulen, R., Avonts, L. and L. De Vuyst. Short fractions of oligofructose are preferentially metabolized by *Bifidobacterium animalis* DN-1473 010. Applied and Environmental Microbiology. (2004) : 1923-1930.
- Van den Broek, L. A. M., Hinz, S. W. A., Beldman, G., Vincken, J. P. and Voragen, A. G. J. *Bifidobacteria* carbohydrases-their role in breakdown and synthesis of (potential) prebiotics. Molecular Nutrition and Food Research. 52 (2008) : 146-163.
- Ventura, M., Elli, M., Reniero, R. and Zink, R. Molecular microbial analysis of *Bifidobacteria* isolates from different environments by the species-specific amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). FEMS Microbiology Ecology. 36 (2001) : 113-121.
- Vesa, T.H., Marteau, P. and Korpela, R. Lactose intolerance. Journal of the American College of Nutrition. 19 (2000) : 165S–175S.
- Vuyst L. De. Technology Aspects Related to the Application of Functional Starter Cultures. Food Technology and Biotechnology. 38(2) (2000) : 105-112.

Xiao, J.Z., Kondo, S., Takahashi, N., Miyaji, K., Oshida, K., Hiramoto, A., Iwatsuki, K., Kokubo, S. et al. Effects of milk products fermented by *Bifidobacterium longum* on blood lipids in rats and healthy adult male volunteers. Journal of Dairy Science. 86 (2003) : 2452–2461.

Yang, C., Zhu, X., Fan, D., Mi, Y., Luo, Y., Hui, J. and Su, R. Optimizing the chemical compositions of protective agents for freeze-drying *Bifidobacterium longum* BIOMA 5920. Biotechnology and Bioengineering. 20(5) (2012) : 930-936.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

1. การคำนวณหาปริมาณองค์ประกอบของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนและ bifidus factor

1.1 ปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหาร MRS broth

ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

น้ำหนักกลูโคส 180 กรัม มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 72 กรัม

ถ้ามีกลูโคส 20 กรัม จะมีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ $(72 \times 20)/180 = 8$ กรัม

เพราะฉะนั้นอาหาร MRS broth 1 ลิตร จะมีปริมาณคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ 8 กรัม

จากปริมาณคาร์บอนที่ได้จะใช้ในการเปรียบเทียบหาปริมาณที่ต้องเตรียมชนิด อื่นๆ ดังนี้

ซูโครส

ปริมาณคาร์บอน 144 กรัม ได้มาจากซูโครส 342 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณคาร์บอน 8 กรัม ต้องเตรียมซูโครส $(8 \times 342)/144 = 19$ กรัม

เพราะฉะนั้นอาหาร 1 ลิตร จะมีปริมาณซูโครส เป็นองค์ประกอบ 19 กรัม

ฟรักโทส

เตรียมในปริมาณเท่ากับกลูโคสคือ 20 กรัมต่อลิตร

กากน้ำตาล

เตรียมในปริมาณเท่ากับกลูโคสคือ 20 กรัมต่อลิตร โดยใช้ปริมาณทั้งหมด (Total sugar) ที่ได้จากการวิเคราะห์แบบ Phenol sulfuric เป็นตัวตั้งต้นในการคำนวณ ดังนี้

ปริมาณความเข้มข้นทั้งหมดของกากน้ำตาลเท่ากับ 641.74 กรัมต่อลิตร (C_1)

ปริมาณความเข้มข้นที่ต้องการเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (C_2)

ปริมาตรที่ต้องการเตรียมทั้งหมด (V_2)

เพราะฉะนั้นปริมาตรของกากน้ำตาลที่ต้องใช้ (V_1) = $(C_2 V_2)/C_1$

คำนวณหาน้ำหนักของกากน้ำตาลที่ต้องชั่ง เมื่อค่าความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 1.27 กรัมต่อมิลลิลิตร

เพราะฉะนั้นน้ำหนักของกากน้ำตาลที่ต้องชั่ง = $1.27 \times$ ปริมาตรกากน้ำตาลที่ต้องการเตรียม (V_1)

1.2 ปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MRS broth

ประกอบด้วย

Proteose Peptone

Proteose Peptone 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณไนโตรเจน 13.40 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น Proteose Peptone ที่ 100 กรัม มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 13.40 กรัม

ถ้ามี Proteose Peptone 10 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจนเป็น

$$(10 \times 13.40)/100 = 1.34 \text{ กรัม}$$

Beef extract

Beef extract 10 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณไนโตรเจน 12.40 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น Beef extract ที่ 100 กรัม มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 12.40 กรัม

ถ้ามี Beef extract 10 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจนเป็น $(10 \times 12.40)/100 = 1.24$ กรัม

เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7)$

เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณไนโตรเจน 28 กรัม

ดังนั้น เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ 226.19 กรัม มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 28 กรัม

ถ้ามี เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจนเป็น

$$(2 \times 28)/226.19 = 0.25 \text{ กรัม}$$

ดังนั้นในอาหาร MRS broth 1 ลิตร มีปริมาณ จะมีปริมาณไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบทั้งหมดเป็น $1.34 + 1.24 + 0.25 = 2.83$ กรัม

จากปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดที่ได้จะใช้ในการเปรียบเทียบหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนจากเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ปริมาณไนโตรเจน 28 กรัม ได้มาจากการเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 132.14 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 2.83 กรัม ต้องใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

$$(2.83 \times 132.14)/28 = 13.36 \text{ กรัม}$$

เพราะฉะนั้นอาหาร 1 ลิตร มีปริมาณเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 13.36 กรัม

ยูเรีย

ปริมาณไนโตรเจน 28 กรัม ได้มาจากการยูเรีย 60.06 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 2.83 กรัม ต้องใช้ยูเรีย $(2.83 \times 60.06)/28 = 6.07$ กรัม

เพราะฉะนั้นอาหาร 1 ลิตร จะมีปริมาณยูเรียเป็นองค์ประกอบ 6.07 กรัม

1.3 ปริมาณ bifidus factor ในอาหาร MRS broth

ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาณไนโตรเจน 11.40 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น สารสกัดจากยีสต์ ที่ 100 กรัม มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ 11.40 กรัม

ถ้ามี สารสกัดจากยีสต์ 5 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจนเป็น

$$(5 \times 11.40)/100 = 0.57 \text{ กรัม}$$

เพราะฉะนั้นอาหาร MRS broth 1 ลิตร จะมีปริมาณไนโตรเจนของ bifidus factor เป็นองค์ประกอบ 0.57 กรัม

จากปริมาณไนโตรเจนของ bifidus factor ที่ได้จะใช้ในการเปรียบเทียบหาปริมาณ สารสกัดจากยีสต์ยี่ห้อ Bio springer ได้ดังนี้

สารสกัดจากยีสต์ ยี่ห้อ Bio springer มีปริมาณไนโตรเจน 10.70 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้น ปริมาณไนโตรเจน 10.70 กรัม ได้จากสารสกัดจากยีสต์ 100 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 0.57 กรัม จะใช้สารสกัดจากยีสต์ $(0.57 \times 100)/10.70 = 5.33$ กรัม

เพราะฉะนั้นอาหาร 1 ลิตร จะมีสกัดจากยีสต์ยี่ห้อ Bio springer เป็นองค์ประกอบ 5.33 กรัม

1.4 การหาปริมาณความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมเบื้องต้น

เพื่อชดเชยการใช้สารสกัดจากยีสต์ที่ 8 กรัมต่อลิตร ในการทดลองข้อ 3.3.2.2 โดยคำนวณปริมาณของยูเรียเทียบกับปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนของสารสกัดจากยีสต์ที่ 8 6 4 และ 2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งได้สัดส่วนของการชดเชยดังนี้

ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 0 กรัมต่อลิตร

ใช้ปริมาณของยูเรียที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับสารสกัดจากยีสต์ที่ 8 กรัมต่อลิตรดังนี้

สารสกัดจากยีสต์ที่ 100 กรัม มีปริมาณไนโตรเจน 10.70 กรัม

ถ้าสารสกัดจากยีสต์ 8 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจน

$$(10.70 \times 8)/100 = 0.856 \text{ กรัม}$$

ปริมาณไนโตรเจน 28 กรัม มาจากยูเรีย 60.06 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 0.856 กรัม ต้องใช้ยูเรีย

$$(60.06 \times 0.856)/28 = 1.84 \text{ กรัม}$$

เพราะฉะนั้นอาหาร 1 ลิตร จะต้องใช้ยูเรียซดเชยสารสกัดจากยีสต์ 1.84 กรัม

ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 2 กรัมต่อลิตร

ใช้ปริมาณของยูเรียที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับสารสกัดจากยีสต์ที่ 6 กรัมต่อลิตรดังนี้

สารสกัดจากยีสต์ที่ 100 กรัม มีปริมาณไนโตรเจน 10.70 กรัม

ถ้าสารสกัดจากยีสต์ 6 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจน

$$(10.70 \times 6)/100 = 0.642 \text{ กรัม}$$

ปริมาณไนโตรเจน 28 กรัม มาจากยูเรีย 60.06 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 0.642 กรัม ต้องใช้ยูเรีย

$$(60.06 \times 0.642)/28 = 1.38 \text{ กรัม}$$

เพราะฉะนั้นอาหาร 1 ลิตร จะต้องใช้ยูเรียซดเชยสารสกัดจากยีสต์ 1.38 กรัม

ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร

ใช้ปริมาณของยูเรียที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับสารสกัดจากยีสต์ที่ 4 กรัมต่อลิตรดังนี้

สารสกัดจากยีสต์ที่ 100 กรัม มีปริมาณไนโตรเจน 10.70 กรัม

ถ้าสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจน

$$(10.70 \times 4)/100 = 0.428 \text{ กรัม}$$

ปริมาณไนโตรเจน 28 กรัม มาจากยูเรีย 60.06 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 0.428 กรัม ต้องใช้ยูเรีย

$$(60.06 \times 0.428)/28 = 0.92 \text{ กรัม}$$

เพราะฉะนั้นอาหาร 1 ลิตร จะต้องใช้ยูเรียซดเชยสารสกัดจากยีสต์ 0.92 กรัม

ปริมาณสารสกัดจากยีสต์ 6 กรัมต่อลิตร

ใช้ปริมาณของยูเรียที่มีปริมาณเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนเท่ากับสารสกัดจากยีสต์ที่ 2 กรัมต่อลิตรดังนี้

สารสกัดจากยีสต์ที่ 100 กรัม มีปริมาณไนโตรเจน 10.70 กรัม

ถ้าสารสกัดจากยีสต์ 2 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจน

$$(10.70 \times 2)/100 = 0.214 \text{ กรัม}$$

ปริมาณไนโตรเจน 28 กรัม มาจากยูเรีย 60.06 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจน 0.214 กรัม ต้องใช้ยูเรีย

$$(60.06 \times 0.214)/28 = 0.46 \text{ กรัม}$$

เพราะฉะนั้นอาหาร 1 ลิตร จะต้องใช้ยูเรียซดเซยสารสกัดจากยีสต์ 0.46 กรัม

2. การคำนวณหาราคาต้นทุนวัตถุดิบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ ก.1 การคำนวณต้นทุนอาหาร MRS เติม 0.05 % L-Cysteine- HCl.H₂O

ชนิดองค์ประกอบ	ยี่ห้อ	ปริมาณ กรัมต่อลิตร	ราคาต่อหน่วย* บาทต่อกรัม	ราคาต่อปริมาณ บาทต่อกรัมที่ใช้
Proteose peptone	Himedia	10	5.64	56.40
Beef extract	Himedia	10	3.14	31.40
Yeast extract	Himedia	5	2.64	13.20
Dextrose	Himedia	20	1.08	21.60
Polysorbate 80	Ajax	1	1.88	1.88
Ammonium citrate	Ajax	2	2.94	5.88
Sodium acetate	Ajax	5	0.76	3.80
Magnesium sulfate	Ajax	0.1	0.74	0.07
Manganese sulfate	Ajax	0.05	1.32	0.07
Di-potassium phosphate	Ajax	2	1.02	2.04
L-cysteine- HCl.H ₂ O	Merck	0.5	52	26
รวม				162.34

*ราคาอ้างอิงตามราคาซื้อขายผ่านบริษัทผู้แทนขายในประเทศไทย

ตารางที่ ก.2 การคำนวณต้นทุนอาหาร Milk based

ชนิดองค์ประกอบ	ยี่ห้อ	ปริมาณ กรัมต่อลิตร	ราคาต่อหน่วย*	ราคาต่อปริมาณ
			บาทต่อกรัม	บาทต่อกรัมที่ใช้
Skim milk	NZ	28	0.14	4.06
Yeast extract	Himedia	22	2.64	58.08
รวม				62.14

*ราคาอ้างอิงตามราคาซื้อขายผ่านบริษัทผู้แทนขายในประเทศไทย

ตารางที่ ก.3 การคำนวณต้นทุนอาหาร Modified MY

ชนิดองค์ประกอบ	ยี่ห้อ	ปริมาณ กรัมต่อลิตร	ราคาต่อหน่วย*	ราคาต่อปริมาณ
			บาทต่อกรัม	บาทต่อกรัมที่ใช้
Molasses	-	46.5	0.007	0.32
Yeast extract	Himedia	8	2.64	21.12
Di-potassium phosphate	Ajax	2	1.02	2.04
L-cysteine- HCl.H ₂ O	Merck	0.5	52	26
รวม				49.49

*ราคาอ้างอิงตามราคาซื้อขายผ่านบริษัทผู้แทนขายในประเทศไทย

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

ตัวอย่าง การเลี้ยงผลิตเซลล์แบบแบตช์ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ควบคุม pH ที่ 6.0

1. การเจริญของเซลล์ *B. animalis* TISTR 1925

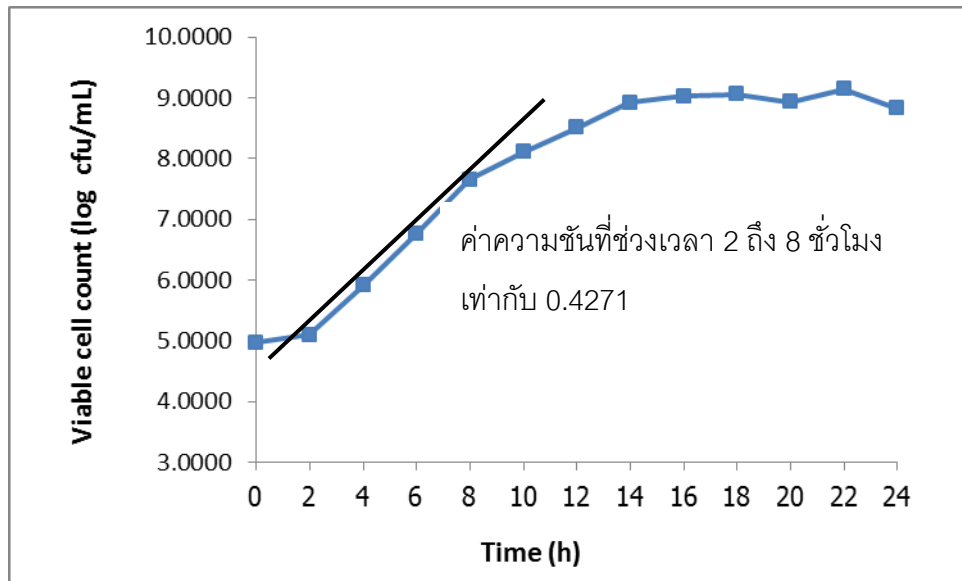
ตารางที่ ข.1 การปริมาณความเข้มข้นของเซลล์และสารอาหารสำหรับการเจริญของเซลล์

เวลา	ปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (\log_{10} โคลินี่ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของสารอาหาร	
		ทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	กลุ่มไนโตรเจน (เปอร์เซ็นต์)
0	4.9710 ± 0.0290	43.53 ± 0.1352	4.22 ± 0.0288
2	5.0910 ± 0.1490	43.03 ± 0.0520	4.21 ± 0.0168
4	5.9085 ± 0.0335	42.89 ± 0.2079	4.22 ± 0.0195
6	6.7665 ± 0.0464	42.52 ± 0.6238	4.20 ± 0.0065
8	7.6525 ± 0.0242	40.06 ± 0.0312	4.16 ± 0.0125
10	8.1109 ± 0.0795	36.38 ± 0.0104	4.16 ± 0.0030
12	8.5119 ± 0.0000	35.60 ± 0.0832	4.14 ± 0.0088
14	8.9225 ± 0.0195	34.49 ± 0.2495	4.11 ± 0.0018
16	9.0217 ± 0.0923	28.72 ± 0.6134	4.11 ± 0.0017
18	9.0538 ± 0.0431	26.23 ± 0.7381	4.05 ± 0.0013
20	8.9320 ± 0.0570	22.51 ± 0.0936	4.03 ± 0.0197
22	9.1399 ± 0.0177	22.30 ± 0.2391	3.99 ± 0.0178
24	8.8205 ± 0.0246	22.14 ± 0.1248	3.97 ± 0.0098

ค่าปริมาณความเข้มข้นของเซลล์ (โคลินี่ต่อมิลลิลิตร) = จำนวนโคลินี่ X 50 X ค่าการเจือจาง

(50 = ค่าคงที่คูณกลับเพื่อมีปริมาตรเป็น 1000 ไมโครลิตร)

2. ค่าจลพลศาสตร์ของการเจริญแบบแบดซ์



ภาพที่ ข.1 กราฟการเจริญของเชื้อ *B. animalis* TISTR 1925 ในอาหารทดแทนที่ควบคุมค่าความเร็วรอบในกวน 200 รอบต่อนาที pH 6.0

สูตรการคำนวณหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate; μ)

$$\mu = 2.303(\log X_t - \log X_0)/dt$$

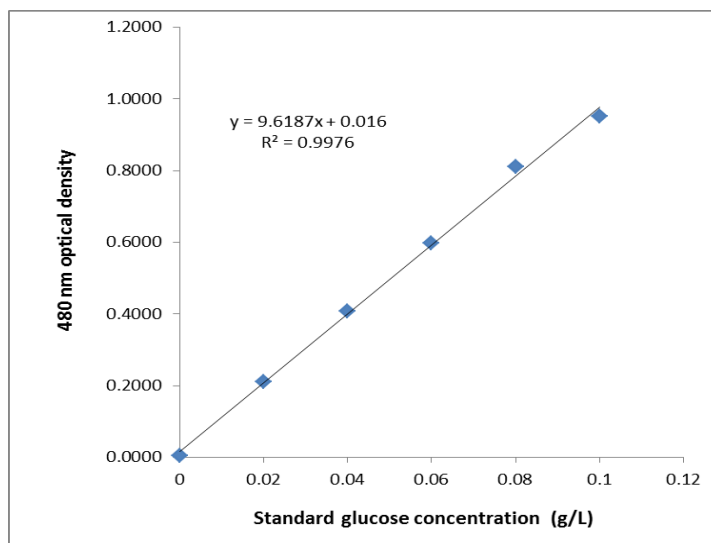
เพราะฉะนั้น $\mu = 2.303 \times 0.4271$

$$\mu = 0.9836 \text{ ต่อชั่วโมง}$$

3. การหาปริมาณทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอลซัลฟูริก

ตารางที่ ข.2 ค่าความขุ่นของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ปริมาณความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าความขุ่น
0	0.0037 ± 0.0019
0.02	0.2100 ± 0.0042
0.04	0.4073 ± 0.0036
0.06	0.5979 ± 0.0035
0.08	0.8113 ± 0.0306
0.1	0.9514 ± 0.0043



ภาพที่ ข.2 กราฟแสดงเส้นตรงของสารมาตรฐานกลูโคส

สมการเส้นตรงจากกราฟ

$$Y = 9.6187X + 0.0016$$

$$\text{ดังนั้น } X = (Y - 0.0016) / 9.6187$$

เมื่อ X คือ ปริมาณความเข้มข้นของทั้งหมด

Y คือ ค่าความขุ่นที่วัดได้

ตารางที่ ข.3 แสดงค่าความขุ่นและปริมาณทั้งหมด

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่น		ปริมาณทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	0.2087	0.2100	43.53 ± 0.1352
2	0.2067	0.2072	43.03 ± 0.0520
4	0.2073	0.2053	42.89 ± 0.2079
6	0.2015	0.2075	42.52 ± 0.6238
8	0.1925	0.1928	40.06 ± 0.0312
10	0.1750	0.1749	36.38 ± 0.0104
12	0.1708	0.1716	35.60 ± 0.0832
14	0.1647	0.1671	34.49 ± 0.2495
16	0.1352	0.1411	28.72 ± 0.6134
18	0.1297	0.1226	26.23 ± 0.7381
20	0.1078	0.1087	22.51 ± 0.0936
22	0.1061	0.1084	22.30 ± 0.2391
24	0.1071	0.1059	22.14 ± 0.1248

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายปณณธร ทวีเทพไทกุล เกิดวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2516 ที่จังหวัดสิงห์บุรี สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2539 ต่อมาได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตร มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

การเสนอผลงานวิจัย

Thaveetheptaikul, P., Thongchul, N. and Fungsin, B. DEVELOPMENT OF MILK-BASED MEDIUM SUBSTITUTE FOR PRODUCTION OF *Bifidobacteria animalis*. The 24rd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “International Conference on Green Biotechnology : Renewable Energy and Global Care” November 29-30, 2012, Ubon Ratchathani University, Thailand.