บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan.

ตู้ลามินาโฟลว์ (Laminar flow) รุ่น BV-126 ของบริษัท International Scientific Supply, Thailand.

เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่างรุ่น 43 ของบริษัท Beckman, USA.

เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น SCR 20B ของบริษัท Hitachi, Japan.

กล้องจุลทรรศน์รุ่น CHS ของบริษัท Olympus Optical, Japan.

หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) รุ่น HA-3D ของบริษัท Hirayama, Japan.

ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20°ซ. รุ่น A ของบริษัท Kelvinator, SAUD.

กระดาษกรอง (Filter paper) ชนิด qualitative ของบริษัท Toyo Roshi Kaisha, Japan.

กระดาษกรอง (Micromembrane fitter) รุ่น Supor-200 ของบริษัท Gelman Sciences, USA.

Cellulose TLC plastic sheet Art.5577 ของบริษัท Merck, Germany.

คิวเวท (Cuvet) ชนิด S-10SM ของบริษัท Sigma, USA.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Thelco84 ของบริษัท Precision Scientific, USA.

เครื่องผสมสาร (Vortex mixture) รุ่น K-550-GE ของบริษัท Scientific Industries, USA.

เครื่องวัดความหนืด (Viscometer) รุ่น RD:2:H_2 ของบริษัท Rheology

Shannon, USA.

เครื่องปั่น (Molinex) รุ่น Mx-T201GN บริษัท Matsuta, Japan.

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 5 ตำแหน่ง รุ่น 1062 MP8-1 ของบริษัท Sartorius, Germany.

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น 518 ของบริษัท Sartorius, Germany.

เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BA610 ของบริษัท Sartorius, Germany.

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น Thelco 6 ของบริษัท Precision Scientific, USA.

ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น B-60 และ UM 100 ของบริษัท Memmert, Germany.

หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (UV-light lamp) รุ่น TL-900/U ของบริษัท Lamag, Switzerland.

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) รุ่น INNOVA 4230 และ Giogyrotory Shaker ของบริษัท Brunswick Scientific, USA.

ตู้อบฆ่าเชื้อลมร้อน (Hot air oven) รุ่น T5090E ของบริษัท Haraeus, Germany

1.2 เคมีภัณฑ์

โซเดียมแอซีเทต (Sodium acetate) ของบริษัท Merck, Germany.

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ของบริษัท Carlo, USA.

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ของบริษัท BDH Chemical, England.

บรอมไทมอลบูล (Bromthymol blue) ของบริษัท BDH Chemical, England.

โบรโมคลีซอลเพอร์เพิล (Bromocresol purple) ของบริษัท May and Baker, England.

อีเธอร์ (Ether) ของบริษัท Merck, Germany.

ฟีนอลฟ์ธาลีน (Phenolphthalein) ของบริษัท Merck, Germany.

ไอโอดีนคริสทัล (Iodine crystal) ของบริษัท Carlo Erba, USA.

ซัลฟรานิน (Safranin) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

คริสทัลไวโอเล็ต (Crystal violet) ของบริษัท Merck, Germany.

อิมเมอร์ชั่นออยล์ (Immersion oil) ของบริษัท Merck, Germany.

เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท Clinac, Thailand.

เมทานอล (Methanol) ของบริษัท Merck, Germany.

นิวทรอลเรด (Neutral red) ของบริษัท Merck, Germany.

เอทธิลแอซีเทต (Ethyl acetate) ของบริษัท Merck, Germany.

กรดซัลฟานิลิกโซเดียม (Sulfanilic acid Sodium) ของบริษัท Merck, Germany.

ไดเมทธิลอัลฟาแนฟธาลามิน (Dimethyl-α-napthalamine) ของบริษัท May and Baker, England.

กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) ของบริษัท May and Baker, England.

ผงถ่านกำมันต์ (Activated carbon) ของบริษัท May and Baker, England.

แอมโมเนียมซิ เทรต (Ammonium citrate) ของบริษัท Merck, Germany.

ไพริดีน (Pyridine) ของบริษัท May and Baker, England.

แคลเซียม คาร์บอเนต (Calcium carbonate) ของบริษัท BDH Chemical, England.

ทริส-ไฮโดรคลอริก (Tris-HCl) ของบริษัท Sigma Chemical, USA.

เอนไซม์-ดี-แล็กเทตดีไฮโดรจีเนส (D-Lactate dehydrogenase) ได้จากเชื้อ *L. leichmannii* ของบริษัท Boehringer Mannheim

เอนไซม์-แอล-แล็กเทตดีไฮโดรจีเนส (L-Lactate dehydrogenase) ได้จากกล้ามเนื้อของกระต่าย ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany

ดีแอล-แล็กติกแอสิด (DL-lactic acid) ของบริษัท Fuka, Switzerland

นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide) ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate) ของบริษัท Merck, Germany.

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate) ของบริษัท Merck, Germany.

แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogen phosphate) ของบริษัท May and Baker, England.

แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate) ของบริษัท May and Baker, England.

เฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulphate) ของบริษัท May and Baker, England.

แมงกานีสซัลเฟต (Manganese sulphate) ของบริษัท Merck, Germany.

โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride) ของบริษัท Fluka Garantie, Germany.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของบริษัท Merck, Germany.

ไฮดรอกซีลามีนไฮโดรคลอไรด์ (Hydroxylamine hydrochloride) ของบริษัท Merck. Germany.

แอลฟาแนพทอล (α-naphtol) ของบริษัท Merck, Germany

คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate) ของบริษัท Merck, Germany.

เฟอร์ริคซิเทรต (Ferric citrate) ของบริษัท Merck, Germany.

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) ของบริษัท Oxoid, England.

แบคโทเปปโตน (Bacto peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

โพลีเปปโตน (Polypeptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) ของบริษัท Vidyhasom, Thailand.

แอล-อะราบิโนส (L-arabinose) ของบริษัท Merch, Germany.

ดี-ฟรักโทส (D-fructose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

ดี-กาแล็กโทส (D-galactose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

ดี-แล็กโทส (lactose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

ดี-ซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany.

ดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose)ของบริษัท Sigma, USA.

แป้ง (Starch) ของบริษัท Merck, Germany.

ดี-ไซโลส (D-xylose) ของบริษัท Merck, Germany

มอลโทส (Maltose) ของบริษัท Sigma, USA.

เมลิไบโอส (Melibiose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

แอล-ราฟฟิโนส (L-raffinose) ของบริษัท Fluka, Switzerland.

เอสคูลิน (Esculin) ของบริษัท Sigma, USA.

ดี-ไรโบส (D-ribose) ของบริษัท Sigma, USA.

นมยูเอชทีตราเมะลิ ของบริษัทอุตสาหกรรมนมไทย, ไทย

นมผงขาดมันเนย (Skim milk) ของบริษัท Merck, Germany.

มันฝรั่ง	จากตลาดสามย่าน
มะเขือเทศ	"
ผักกาดเขียวปลี	"
กะหล่ำปลี	"
แครอท	"
ขิง	"
พริก	"
นมเปรี้ยวพร้อมดื่มตราโยโมสต์	ของบริษัทโฟโมสต์ ไทย

3. จุลินทรีย์

เชื้อแล็กติกแอสิดแบคทีเรียได้มาจากการแยกเชื้อจากอาหารชนิดต่างๆของ รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ จำนวน 21 สายพันธุ์ และได้จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วท.) 2 สายพันธุ์

เชื้อที่ใช้ทดสอบ จากภาควิชาจุลชีววิทยา 3 สายพันธุ์ คือ

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633
- *Escherichia coli* ATCC 25922

ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

1. การคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* species จาก 23 สายพันธุ์

1.1 การวิเคราะห์ปริมาณกรดจากการใช้กลูโคสของเชื้อ (Meade and Chen, 1977)

1.1.1 นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว Glucose Yeast Peptone Beef (GYPB) (ภาคผนวก ก หมายเลข 5) ที่มีอายุ 1-2 วัน มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับ O.D. (Optical density) เท่ากับ 0.5 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อเท่ากัน

1.1.2 นำเชื้อ (จากข้อ 1.1.1) 1% ปริมาตร/ปริมาตร มาเลี้ยงในอาหารเหลว GYPB 3 วัน ที่ 30°ซ นำไปปั่นให้เซลล์ตกตะกอนดูดของเหลวส่วนใส (supernatant) มา 4 มล. นำมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติกทั้งหมด (ดำเนินการตามภาคผนวก ค หมายเลข 3.2)

1.1.3 ดูดของเหลวส่วนใส (supernatant) 1 มล. มาทำปฏิกิริยากับรีเอเจนท์ ตามวิธีของ Fehlinglehman schoorl เพื่อหาปริมาณกลูโคสที่เชื้อใช้ไป (consumed glucose) (ดำเนินการตามภาคผนวก ค หมายเลข 3.2) (Tanasupawat and Daengsubha, 1983)

1.2 การทดสอบการสร้างไดอะเซตทิล และการวิเคราะห์ผนังเซลล์

1.2.1 การทดสอบการสร้างไดอะเซตทิล (Phalip *et al.* 1994) นำเชื้อแล็กติกแอสิดแบคทีเรียทั้ง 23 สายพันธุ์มาเพาะใน Modified MRS agar โดยปรับปรุงสูตรให้มีกลูโคส 10 มิลลิโมล มีโซเดียมซิเทรต 50 มิลลิโมล ไม่ใส่ beef extract และใส่ Tween 80 ร้อยละ 1.50 เพื่อช่วยในการกระจายตัว บ่มที่30°ซ เป็นเวลา 1 วัน แล้วนำไปหยดด้วย α-napthol และ creatine ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนเป็นสีแดง แสดงว่าให้ผลเป็นบวก คือ สร้างไดอะเซตทิล

1.2.2 การวิเคราะห์ผนังเซลล์ (Komagata and Suzuki, 1987) โดยนำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว GYPB ที่ปั่นที่ 3000 รอบ เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน นำเซลล์ที่ได้หยดด้วย 6 นอร์มอล HCl 1 มล. นำไปอบที่ 100°ซ 18 ชม. หลังจากนั้นทำให้เย็นแล้วนำ (Freeze drying) นำไปหยดบน TLC Plate No. 5577 และ developed ด้วย pyridine-methanol-water-6 N.HCl (10 : 80 : 26 : 4) แล้วนำไปสเปรย์ด้วย 0.2% ninhydrin solution

1.3 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแล็กติก (Okada and Toyoda, 1978) โดยนำกรดที่สกัดได้ไปทำปฏิกิริยากับ D หรือ L-lactate dehydrogenase รวมทั้ง NAD^+ และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (ดำเนินการตามภาคผนวก ค หมายเลข 4)

1.4 การคัดเลือกแล็กติกแอสิดแบคทีเรียที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ (Samelis *et al*, 1994)

1.4.1 เชื้อทดสอบที่ใช้ คือ *S. aureus* ATCC 25923 ซึ่งเป็นตัวแทนของเชื้อรูปกลมแกรมบวก *B. subtilis* ATCC 6633 เป็นตัวแทนของเชื้อรูปแท่งแกรมบวก *E. coli* ATCC 25922 เป็นตัวแทนของเชื้อรูปแท่งแกรมลบ

1.4.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

- เพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบลงใน Nutrient agar slant (ภาคผนวก ก หมายเลข 7) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
- ใส่เชื้อทดสอบร้อยละ 1 ของปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารวุ้น Mueller Hinton ที่หลอมเหลว ปริมาณ 4-5 มิลลิลิตร แล้วทำให้กระจายทั่ว เพื่อใช้เป็น seed layer
- เทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบ ลงบนอาหารแข็ง Mueller Hinton ที่เทไว้ก่อน
- เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแล้ว จึงวางถ้วยสเตนเลสบนผิวหน้าอาหาร โดยวาง 4 ถ้วย สำหรับใส่น้ำหมัก (fermentation broth) ที่ต้องการทดสอบและอีก 1 ถ้วย สำหรับใส่สารควบคุมต่อ 1 เพลท

1.4.3 การเตรียมน้ำหมัก (fermentation broth)

- เพาะเลี้ยงเชื้อตัวอย่างที่คัดเลือกไว้ลงในอาหารเหลว MRS broth ปรับสูตรโดยเติมกลูโคสร้อยละ 1 (ภาคผนวก ก หมายเลข 6) ที่ใส่ Sodium thioglycolate 0.1 ก./ 100 มล. ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- นำไปปั่นให้เชื้อนอนก้น ที่ความเร็ว 3000-4000 รอบ / นาที (rpm) เป็นเวลา 10-20 นาที
- นำส่วนใสมาปรับความเป็นกรดด่าง ประมาณ 4.5-5.0 NaOH 1 นอร์มอล

- กรองน้ำหมักที่ปรับความเป็นกรดด่างเรียบร้อยแล้วผ่าน Micromembrane filter

1.4.4 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ

- ปิเปตน้ำหมักที่ได้จากข้อ 1.4.3 ลงในดัพ วางทิ้งไว้ 15 นาที เพื่อให้สารซึมลงในวุ้นที่ 4-10°ซ แล้วนำไปบ่มที่ 37°ซ 24 ชั่วโมง

- ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ โดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (Inhibition Zone)

- ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ โดยเปรียบเทียบกับสารไนซิน (Nisin) ที่ความเข้มข้น 1:50, 1:200 และ 1:400

2. การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี

จากผลการทดลอง ข้อ 1. ทำการคัดเลือกเชื้อโดยพิจารณาเชื้อซึ่งสามารถผลิตกรดแอล แล็กติกได้ปริมาณสูง สร้างสารยับยั้งมา 2 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับเชื้อ *L. plantarum* P7-1 อีก 1 สายพันธุ์ โดยนำมาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา การเจริญและชีวเคมี บางประการดังนี้

2.1 การตรวจสอบลักษณะรูปร่างเซลล์และโคโลนี (Albert et al., 1992) เขี่ยเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้และ P7-1 ซึ่งอยู่ในอาหารเหลว GYPB ลงบนสไลด์ ปิดด้วย cover glass แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อดูลักษณะรูปร่างเชื้อ ขนาด สี การจัดเรียงตัวของเซลล์ (ภาคผนวก ข หมายเลข 1) และตรวจสอบลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น GYPB

2.2 การทดสอบแคตาเลส (Gunther and White, 1961) เพาะเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้และ P7-1 ลงในอาหารวุ้น GYPB บ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำมาหยดไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ลงไปที่โคโลนี (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) ถ้ามีแคตาเลสจะเห็นฟองเกิดขึ้น

2.3 การทดสอบไนเทรตรีดักชั่น (Skerman, 1967) เพาะเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้และ P7-1 ลงใน Nitrate broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 8) บ่ม 30°ซ นาน 7 วัน หยดสารละลาย A (ภาคผนวก ข หมายเลข 5) 3 หยด และหยดต่อด้วยสารละลาย B

เขย่าแล้วสังเกตผลถ้ามีการรีดิวส์ไนเทรตสารละลายจะเป็นสีแดง แสดงว่าไนเตรทถูกรีดิวส์เป็นไนไตรท์

2.4 การสลายเจลาติน (Gibbs, 1966) เพาะเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้และ P7-1 ในอาหารเหลวเจลาติน (ภาคผนวก ก หมายเลข 3) บ่ม 30°ซ นาน 7 วัน ตรวจสอบโดยนำมาเลี้ยงที่ 20°ซ ถ้าแบคทีเรียสลายเจลาตินได้ อาหารจะไม่แข็งตัวที่อุณหภูมินี้

2.5 การสลายเอสคิวลิน (aesculin) (Vaughn and Levine, 1942) เพาะเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้และ P7-1 ในอาหารเหลวเอสคิวลิน (ภาคผนวก ก หมายเลข 1)แล้วบ่มไว้ที่ 30°ซ นาน 7 วัน ตรวจผลโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาลดำและการเกิดผลึกคล้ายปะการังขึ้น เนื่องจากการสลายเอสคิวลินเป็นเอสคิวลิทิน(aesculetin) ได้ แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

2.6 การสลายเม็ดเลือดแดง (Albert et al., 1992) เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้และ P7-1 บนอาหาร tryptose blood agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 10) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ นาน 1-3 วัน ถ้าเกิดบริเวณใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างฮีโมไลซินออกมาย่อยเม็ดเลือดแดงได้ บันทึกผลเป็นบวก

2.7 การศึกษาลักษณะการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และเกลือระดับต่างๆ

2.7.1 ผลของอุณหภูมิ เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้และ P7-1 ใน GYPB Broth แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10, 30 , 42°ซ

2.7.2 ความเป็นกรดด่าง เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้และ P7-1 ในอาหารเหลว GYPB แล้วปรับให้มีความเป็นกรด 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 โดยใช้ 1 นอร์มอล HCl และปรับให้เป็นด่างที่ 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 โดยใช้ 1 นอร์มอล NaOH

2.7.3 โซเดียมคลอไรด์เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้และ P7-1 ใน GYPB broth แล้วเติมโซเดียมคลอไรด์ให้มีความเข้มข้นร้อยละ 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0

เมื่อการทดลองครบ 1 สัปดาห์ จึงดูผลการทดลองทั้ง 3 ข้อว่ามีการเจริญของเชื้อหรือไม่จากความขุ่นของเชื้อที่ก้นหลอด ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นแสดงว่าเชื้อสามารถเจริญได้ที่ภาวะนั้นๆ

2.8 การสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต

2.8.1 เพาะเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้และ P7-1 ในอาหารเหลว GYPB ซึ่งไม่เติมกลูโคส แต่เติมน้ำตาลชนิดอื่น คือ ซูโครส แล็กโทส ไซโลส (xylose), เมลิไบโอส (melibiose) มอลโทส ฟรักโทส อะราบิโนส เซลโลไบโอส (cellobiose) แรฟิโนส (raffinose) กาแล็กโทส ไรโบส แป้ง โดยแยกชนิดของคาร์โบไฮเดรตในแต่ละหลอด (ภาคผนวก ก หมายเลข 2)

2.8.2 หลังจากเพาะเชื้อแล้วบ่มไว้ที่ 30°ซ นาน 3วัน

2.8.3 ตรวจผลการสร้างกรดโดยการไทเทรตกับ 0.1 นอร์มอล NaOH โดยใช้ Mixed indicator (ภาคผนวก ข หมายเลข 6) เป็นอินดิเคเตอร์

2.9 การศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อ

2.9.1 นำเชื้อ *Lactobacillus* sp. เชื้อที่คัดเลือกได้ 2 สายพันธุ์และ *L. plantarum* อีก 1 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารเหลว GYPB นาน 1 วัน อุณหภูมิ 30°ซวัดความขุ่นโดยใช้เครื่อง spectrophotometer ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 ที่ 600 นาโนเมตร เพื่อให้ได้ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อเท่ากัน

2.9.2 ปิเปตเชื้อแต่ละชนิดในข้อ 2.9.1 มา 3 มล. ลงในฟลาสต์ที่มีอาหารเหลว GYPB 300 มิลลิลิตร

2.9.3 บ่มไว้ที่ 30°ซ แล้วสุ่มตัวอย่างเชื้อออกมาจำนวน 10 มล. ทุก 2 ชม. เป็นเวลา 24 ชม. แบ่งมา 3 มล. จากทุกตัวอย่างนำมาไทเทรตกับ 0.1 นอร์มอล NaOH จนอินดิเคเตอร์ผสมเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเขียว บันทึกปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปนำมาคำนวณเป็นมิลลิกรัมของกรดแล็กติกที่เชื้อสร้าง และอีก 7 มล. นำมาวัด optical density ที่ 600 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometer และวัดความเป็นกรดด่างโดยใช้พีเอชมิเตอร์ รวบรวมผลทั้งหมดนำมาสร้างกราฟการเปลี่ยนแปลงพีเอช ความขุ่น และปริมาณกรดที่เชื้อสร้างขึ้นต่อระยะเวลาที่เชื้อเจริญเติบโต

3. การเตรียมสตาร์ทเตอร์ในรูปเชื้อเหลวและผงเชื้อ

3.1 เชื้อเหลว นำเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้ 2 สายพันธุ์ และ *L. plantarum* P7-1 มาเลี้ยงในอาหารสูตรดัดแปลง Tamato Potato Glucose (TPG ภาคผนวก ก หมายเลข 9)

3.1.1 ปิเปตเชื้อเหลวแต่ละชนิดจากหลอดอาหารเหลว GYPB ซึ่งได้ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 ที่ 600 นาโนเมตรมา 1 มล. เติมลงในฟลาสก์ที่บรรจุ Tomato Potato Glucose (TPG) 100 มล.

3.1.2 บ่มไว้ 30°ซ เป็นเวลา 3 วัน

3.1.3 นำมาศึกษาอัตราการรอดชีวิตต่อไป

3.2 ผงเชื้อ (freeze dried powder) นำเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้ 2 สายพันธุ์ และ P7-1 รวมทั้งเชื้อที่ใช้เป็นโยเกิร์ตสตาร์ทเตอร์ (*L. bulgaricus* และ *St. thermophilus)*

3.2.1 เขี่ยเชื้อ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้ 2 สายพันธุ์ และ P7-1 จากหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว GYPB เพาะลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว GYPB 500 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชม.นำมาปั่นที่ 4°ซ ด้วยความเร็ว 4000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนเซลล์ไว้ ส่วนน้ำเหนือเซลล์ทิ้งไป

ใส่ผงเชื้อของโยเกิร์ตสตาร์ทเตอร์ร้อยละ 0.01 ลงในนม 500 มล. บ่มไว้ที่ 45°ซ เป็นเวลา 24 ชม. นำไปปั่นที่ 4°ซ ด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และเก็บส่วนเซลล์ไว้

3.2.2 เติมสารละลายแล็กโทส 12 กรัม หางนม 18 กรัม ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 30 มล. ลงในส่วนของเซลล์ (ข้อ 3.2.1) ผสมให้เข้ากันแบ่งใส่ขวดขวดละ 20 มล. ในขวดขนาด 100 มล. และนำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง

3.2.3 เก็บผงเชื้อที่ได้ที่อุณหภูมิต่างๆ ดังต่อไปนี้ -20 , 10 , 30°ซ เพื่อศึกษาอัตราการรอดชีวิตต่อไป

3.3 การศึกษาอัตราการรอดชีวิตของเชื้อในสตาร์ทเตอร์ที่เตรียมได้

3.3.1 สุ่มตัวอย่างสตาร์ทเตอร์แต่ละรายการโดยเชื้อผงสุ่มมาตัวอย่างละ 0.5 กรัม ส่วนเชื้อเหลวสุ่มตัวอย่างมาครั้งละ 0.5 มล.

3.3.2 นำเชื้อที่ได้มาเจือจางดังต่อไปนี้

- ผงเชื้อ ละลายผงที่สุ่มมาในหลอดทดลองบรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 4.5 มล. ผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปตสารละลายมา 0.5 มล. ลงในหลอดทดลองที่ 2 ที่บรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 4.5 มล. ทำเช่นนี้จนได้สารละลายเจือจางความเข้มข้น 1×10^{-20}

- เชื้อเหลว ปิเปตเชื้อเหลวมา 0.5 มล. ในหลอดทดลองบรรจุสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 4.5 มิลลิลิตร และทำต่อไปเช่นเดียวกับเชื้อผง จนได้สารละลายเจือจางความเข้มข้น $1x10^{-17}$

3.3.3 เลือก 5 ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อผงและเชื้อเหลวมานับจำนวนเชื้อโดยปิเปตสารละลายแต่ละหลอด มา 1 มล. ต่อเพลท แล้วเทอาหารวุ้น GYPB-$CaCO_3$ (ภาคผนวก ก หมายเลข 4) ประมาณ 20 มล. ต่อเพลทเขย่าให้เข้ากัน

3.3.4 บ่มที่ 30°ซ นาน 3 วัน อ่านผลและคำนวณจำนวนเชื้อต่อกรัมหรือมิลลิลิตรตามสูตร

$$\text{จำนวนเชื้อต่อกรัม} = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่นับได้ใน 1 เพลท} \times 10^{n}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)}}$$

(สำหรับผลิตภัณฑ์ที่เป็นของแข็ง)

$$\text{จำนวนเชื้อต่อมล.} = \frac{\text{จำนวนเชื้อที่นับได้ใน 1 เพลท} \times 10^{n}}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มล.)}}$$

(สำหรับเชื้อเหลว)

โดย 10^{n} = สารละลายเจือจางของเชื้อในเพลทนั้นๆ

4. การใช้เชื้อในการหมักอาหาร

4.1 การหมักผักดอง เปรียบเทียบผลการหมักโดยใช้เชื้อเหลวของ *Lactobacillus* sp. ที่คัดเลือกได้ และเชื้อ *L. plantarum* P7-1 กับการหมักตามธรรมชาติโดยไม่เติมเชื้อ ในสภาวะต่อไปนี้

- แปรปริมาณเกลือ 2 ระดับ คือ ร้อยละ 1, 2
- แปรปริมาณน้ำตาล 2 ระดับ คือ ร้อยละ 2, 4

4.1.1 วิธีการหมักผักกาดเขียวปลี นำผักกาดเขียวปลี ขิงและพริกหยวกมาตัดส่วนที่เสียทิ้ง แล้วนำไปล้างให้สะอาด ผึ่งแดดประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำผัก

ที่ผึ่งจนเหี่ยวไปลวกน้ำร้อน 10 วินาที แล้วนำมาคลุกเกลือและน้ำตาลตามสัดส่วนข้างต้น นวดผักให้เข้ากันเติมกล้าเชื้อเหลวแต่ละสายพันธุ์ลงในผัก โดยแต่ละสายพันธุ์ใส่เชื้อร้อยละ 2 นวดผักที่เติมเชื้อคลุกเคล้าให้เข้ากัน สำหรับการหมักโดยวิธีธรรมชาตินั้นจะคล้ายกับการหมักโดยใช้สตาร์ทเตอร์เชื้อเหลว เพียงแต่ไม่ต้องเติมเชื้อ นำผักใส่ภาชนะเติมน้ำหมัก (ที่แปรปริมาณเกลือและน้ำตาล)ให้ท่วมผักวางแผ่นพลาสติกเหนือน้ำหมักปิดฝาภาชนะให้สนิท วางไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการประเมินผลคุณภาพผักดองตามข้อ 4.1.3.1 - 4.1.3.4 หลังจากนั้นทำการคัดเลือกสูตรที่มีปริมาณเกลือและน้ำตาลที่ผู้ชิมส่วนใหญ่ชอบมาทำการหมักโดยวิธีธรรมชาติ และวิธีใช้กล้าเชื้อ และทำการประเมินคุณภาพของผักดองตามข้อ 4.1.3.1-4.1.3.3 ในวันที่ 1, 2, 3, 5 และ 7 ของการหมัก

4.1.2 วิธีการหมักผักรวม (กะหล่ำปลีกับแครอท ใส่ขิงและพริกหยวก) วิธีในการหมักทำเช่นเดียวกับการหมักผักกาดเขียวปลี

4.1.3 การประเมินคุณภาพของผักดองที่ได้จากการหมัก

4.1.3.1 นับจำนวนโคโลนีของเชื้อแล็กติกแอสิดแบคทีเรีย โดยนำน้ำดองผัก 1 มล. ใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 มล. (ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2) แต่ละ dilution ที่เจือจางแล้ว นำมา 1 มล. ไปใส่บนจานเพาะเลี้ยง แล้วเทอาหาร GYPB-$CaCO_3$ agar ลงไป แล้วเขย่าให้เชื้อกระจายทั่ว แต่ละความเข้มข้นทำ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่เกิดโซนใส จากการสร้างกรดของแล็กติกแอสิดแบคทีเรีย (Albert et al., 1992)

4.1.3.2 นำน้ำหมักของผักมาวัดค่าความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องพีเอชมิเตอร์ (A.O.A.C, 1990)

4.1.3.3 หาปริมาณกรดแล็กติก โดยนำน้ำหมักผักมาไทเทรตกับ 0.1 นอร์มอล NaOH (ดำเนินการตามภาคผนวก ค หมายเลข 3.2)

เก็บตัวอย่างมาทำการทดสอบข้อ 4.1.3.1 - 4.1.3.3 ในวันที่ 3, 7 และ 14 ของการหมัก

4.1.3.4 ทดสอบลักษณะความชอบและรสชาติเปรี้ยวโดยใช้ผู้ทดสอบ 20 คน ในการทดสอบความชอบใช้ตารางความชอบ 9 จุด (9-Point Hedonic Scale test) ส่วนการทดสอบความเหมาะสมของรสเปรี้ยวใช้ตารางความชอบ 5 จุด (5-Point

Hedonic Scale Test) ทำการทดสอบเมื่อผักดองที่ได้มีค่าความเป็นกรดต่าง 3 ซึ่งมีความเปรี้ยวพอที่จะรับประทานได้

4.1.3.1-4.1.3.3 วางแผนการทดลองแบบ Asymetrical Factorial ขนาด 4 x 2 x 2 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ DMRT (Duncan's Multiple Range test) ส่วนข้อ 4.1.3.4 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ ANOVA (Analysis of Variance) (คงเดช ลีโทชวลิตร, 2540)

4.1.3.5 ศึกษาอายุการเก็บผักดอง เก็บผักดองไว้ที่อุณหภูมิห้อง ทำการทดสอบทางประสาทสัมผัสทุกสัปดาห์โดยการดูว่าผักดองทุกตัวอย่างมีสีเปลี่ยนไปจากเดิมหรือไม่ เช่น สีคล้ำขึ้น หรือมียีสต์หรือราเจริญหรือไม่

4.2 การผลิตโยเกิร์ต เปรียบเทียบผลการหมักโดยใช้เชื้อเหลวที่คัดเลือกได้ 2 สายพันธุ์ และเชื้อมาตรฐานในการผลิตโยเกิร์ต

เติมน้ำตาลซูโครสลงในนมพลาสเจอไรซ์ (pasteurized whole milk) โดยแปรปริมาณร้อยละ 6 8 10 ผสมให้เข้ากัน อุ่นที่ 90°ซ ประมาณ 5 นาที หลังจากนั้นทำให้เย็นที่ 30°ซ เติมเชื้อเหลว (L2-1, 73-1) ปริมาณร้อยละ 5 ปริมาตร/ปริมาตร ตัวอย่างละ 1 สายพันธุ์ลงในน้ำนม นำไปบ่มที่ 37°ซ ส่วนตัวอย่างที่เติมสตาร์ทเตอร์โยเกิร์ต (ผงเชื้อ) ให้ใส่ผงเชื้อร้อยละ 0.01 น้ำหนัก/ปริมาตร ลงในน้ำนม นำไปบ่มที่ 45°ซ แปรเวลาที่บ่มเป็น 24, 48 ชม. นำโยเกิร์ตที่ได้มาทำการประเมินคุณภาพของโยเกิร์ตตามข้อ 4.2.1.1 - 4.2.1.3 แล้วคัดเลือกปริมาณน้ำตาลที่ความเข้มข้นเดียว คัดเลือกเชื้อที่ใช้ในการหมักน้ำนม เปรียบเทียบการหมักกับโยเกิร์ตสตาร์ทเตอร์ หาระยะเวลาที่บ่มที่เหมาะสมเพื่อนำมาผลิตเป็นนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม หลังจากที่คัดเลือกสูตรที่เหมาะสมผลิตเป็นโยเกิร์ต ให้นำโยเกิร์ตมาผสมน้ำในอัตราส่วนโยเกิร์ต : น้ำ = 1 : 0.3 เติมน้ำตาลร้อยละ 5 นำไปปั่นให้เข้ากัน นำนมเปรี้ยวที่ได้ส่วนหนึ่งมาเติมเพคตินปริมาณร้อยละ 0.05 น้ำหนัก/ปริมาตร อีกส่วนไม่ต้องเติมเพคติน แต่งสีและกลิ่น นำไปปั่นให้เข้ากัน หลังจากนั้นนำไปแช่เย็น ก็จะได้นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม ทำการทดสอบตามข้อ 4.2.1.1 และข้อ 4.2.1.4

4.2.1 การประเมินคุณภาพของโยเกิร์ต

4.2.1.1 วิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ วัดความหนืดโดยใช้เครื่อง Viscometer

4.2.1.2 วิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี วัดค่าความเป็นกรดด่าง โดยใช้พีเอชมิเตอร์หาเปอร์เซ็นต์กรดแล็กติก

วิธีการหาเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด

นำตัวอย่างโยเกิร์ตมา 5 มล. ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. ซึ่งมีน้ำกลั่น 25 มล. บรรจุอยู่ หยดฟีนอล์ฟทาลีนลงไป 3-4 หยด ทำการไตเตรทด้วย 0.01 นอร์มอล NaOH (ทำ 3 ซ้ำ) และเทียบกับ Control น้ำกลั่น 25 มล. บันทึกปริมาตร NaOH ที่ใช้ 3 ครั้งแล้วคำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด นำค่าเปอร์เซ็นต์ของกรดทั้งหมดมาหาค่าเฉลี่ยสำหรับสูตรที่ใช้คำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมดใช้สูตรดังนี้

$$\text{gm of lactic acid / 100 ml.} = \frac{\text{ml. NaOH x Normality NaOH x 0.090 x 100}}{\text{ml. of Sample}}$$

4.2.1.3 วิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวภาพ นำนมหมักมานับจำนวนเชื้อ (ทำเช่นเดียวกับข้อ 4.1.3.1)

เก็บตัวอย่างทำการทดสอบข้อ 4.2.1-4.2.3 เมื่อการบ่มเสร็จสิ้น วางแผนการทดลองแบบ Asymetrical Factorial ขนาด 3 x 3 x 1 วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ DMRT

4.2.1.4 ทดสอบลักษณะความชอบ และรสชาติเปรี้ยวโดยใช้ผู้ทดสอบ 20 คน ในการทดสอบความชอบใช้ตารางความชอบ 9 จุด ส่วนความเหมาะสมของรสเปรี้ยวใช้ตารางความชอบ 5 จุด ทำการทดสอบเมื่อการหมักสิ้นสุดลงและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบ ANOVA