

วิธีการดำเนินงานวิจัย

วัตถุดิบ เครื่องมือและอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

- โยเกิร์ตชนิดธรรมดา (Plain Yoghurt) ที่ผลิตขายในทางการค้า 4 ตรา ได้แก่ A, B, C และ D
- เชื้อแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ได้แก่ Lactobacillus bulgaricus TISTR 451 และ Streptococcus thermophilus TISTR 458 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ และ เทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN)
- นมสดพาสเจอร์ไรซ์ (Pasteurized Milk) กำหนดใช้เฉพาะเพียง 1 ตรา

2. เครื่องมือและอุปกรณ์

- ตู้แช่เชื้อ
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) MEMMERT Type B30
- ตู้อบความดัน (Autoclave) SANYO Type MLS-2400
- ตู้อบร้อน (Hot Air Oven) BINDER Type E53
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) SHIMADZU PR-1, UV-240
- เครื่องวัด pH (pH Meter) CORNING pH Meter 220
- เครื่องวัดความหนืด (Brookfield Viscometer) RVT Model DV-1
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง SATORIUS Model B310S
- เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง SATORIUS Model A200S
- เครื่องวัดสี Lovibond[®]
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath)

- เครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย (Spray Dryer) NIRO แบบ Counter Current และใช้หัวพ่นชนิดใช้แรงเหวี่ยง
- เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Dryer) VIRTIS Model 25 SRC

ขั้นตอนการวิจัย (รายละเอียดวิธีการทดลอง แสดงในภาคผนวก ก)

1. คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตภัณฑ์แลคติก เพื่อนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต

โยเกิร์ต

1.1 คัดแยกแบคทีเรียผลิตภัณฑ์จากโยเกิร์ตในทางการค้า นำตัวอย่างโยเกิร์ตในทางการค้าชนิดธรรมดา 4 ตรา ได้แก่ A, B, C และ D มา Cross Streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชนิด ได้แก่ Lactic Agar และ M17 Medium (Oxoid Limited) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24-48 ชั่วโมง แยกให้ได้โคโลนีเดี่ยว บนอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรด โดยคัดเลือกเชื้อบนอาหาร M17 Medium ที่มีการเติมบรอมครีซอลเพอร์เฟิลเป็นอินดิเคเตอร์

1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และ ชีวเคมี นำแบคทีเรียที่แยกได้จากข้อ 1.1 มาศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

1.2.1 การย้อมสีแกรม (Gram Staining)

1.2.2 การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (Catalase Test)

1.3 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียผลิตภัณฑ์แลคติกจากข้อ 1.2 ที่สามารถรอดชีวิตและไม่สูญเสียแอกติวิตี เมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานาน 1 เดือน ในอาหารเหลว Lactic Broth

1.4 เตรียมหัวเชื้อโยเกิร์ต จากแบคทีเรียผลิตภัณฑ์แลคติกจากข้อ 1.3 ดังนี้

1.4.1 หัวเชื้อเดี่ยว ของ Lactobacillus sp.

1.4.2 หัวเชื้อเดี่ยวของ Streptococcus sp.

1.4.3 หัวเชื้อผสม Lactobacillus sp. ต่อ Streptococcus sp.

เท่ากับ 1 ต่อ 1 จากแบคทีเรียแหล่งเดียวกัน

1.5 คัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกจากข้อ 1.4 และเชื้อ Wild Type 2 สายพันธุ์ คือ L. bulgaricus TISTR 451 และ S. thermophilus TISTR 458 ที่สามารถผลิตกรดแลคติกในโยเกิร์ตได้ร้อยละ 1.0 ภายในระยะเวลาอันสั้น โดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 3 โดยปริมาตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 44-45 °C และติดตามการเปลี่ยนแปลง ความเป็นกรดต่าง ร้อยละของกรดแลคติก ตลอดระยะเวลาการหมักนาน 10 ชั่วโมง ออกแบบการทดลองแบบ Factorial Design ทดลอง 3 ซ้ำ ตัวแปรที่ศึกษา 2 ตัวแปร ได้แก่ แหล่งที่มาของแบคทีเรีย และชนิดของหัวเชื้อที่ใช้ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Rang Test

1.6 ประเมินผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสทางด้าน กลิ่นรส ความเปรี้ยว และการยอมรับรวม ของโยเกิร์ตที่ผลิตได้จากหัวเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 1.5 โดยใช้ Trained Panelist จำนวน 6 คน เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่เหมาะสมที่สุดที่จะนำมาใช้เป็นหัวเชื้อต่อไป วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้แบบ Randomized Completely Block Design โดยให้คนชิมเป็น Block ทดลอง 3 ซ้ำ และทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test

1.7 วิเคราะห์คุณภาพทางด้าน กายภาพ เคมี และ จุลินทรีย์ ของ โยเกิร์ต ที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่ผ่านการคัดเลือกจากข้อ 1.6 โดยการวัดค่าต่าง ๆ ดังนี้

1.7.1 วัดค่าความเป็นกรด ต่าง โดยใช้ pH Meter

1.7.2 ความหนืดที่อุณหภูมิ 20 °C โดยใช้ Brookfield Viscometer หัวเข็มเบอร์ 4 ความเร็วรอบ 100 rpm.

1.7.3 จำนวน Lactic Acid Bacteria โดยการ Pour Plate ด้วย M17 Medium

2. การชักนำแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกให้มีอัตราเร็วในการสร้างกรดสูงขึ้น

2.1 นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงต่อนาน 24 ชั่วโมงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เตรียมจากนํ้านมผ่านการฆ่าเชื้อ 1 ครั้ง เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิตโยเกิร์ตต่อไป

2.2 หมักโยเกิร์ตด้วยหัวเชื้อ 3 ชนิด คือ โยเกิร์ตทางการค้า หัวเชื้อจากแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อ 1 และหัวเชื้อจากแบคทีเรียที่คัดเลือกจากข้อ 1 ที่ผ่านการชักนำ โดยใช้หัวเชื้อร้อยละ 3 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 45 °C เป็นเวลา 5 ชั่วโมง

2.3 วัดความเป็นกรดต่าง และปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้น ในระหว่างการหมักทุกๆ 1 ชั่วโมง วางแผนและวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้แบบ Completely Randomized Design เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 5 ของการหมักของโยเกิร์ตที่ผลิตจากหัวเชื้อ 3 ชนิด จากข้อ 2.2 ด้วยวิธี F-Test

3. ศึกษาคุณภาพของโยเกิร์ตที่ผ่านการทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบเยือกแข็ง

3.1 นำโยเกิร์ต ที่เตรียมจากหัวเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่ผ่านการชักนำจากข้อ 2 ร้อยละ 3 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 45 °C จนได้กรดแลคติกร้อยละ 1 โดยปริมาตร มาวิเคราะห์ ค่าความเป็นกรดต่าง และปริมาณแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกทั้งหมด จากนั้นนำมาผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยเปรียบกับการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยใช้ F-Test โยเกิร์ตผงที่ได้นำมาวิเคราะห์คุณภาพดังต่อไปนี้

3.1.1 สี วัดด้วยเครื่อง Lovibond[®]

3.1.2 ความชื้น

3.1.3 การรอดชีวิตของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก

3.1.4 การทดสอบประสาทสัมผัสด้าน สี กลิ่นรส ความเปรี้ยว ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส การยอมรับรวม โดยใช้ Trained Panelist จำนวน 6 คน

3.2 การทำแห้งแบบพ่นฝอย วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 2 ชั่วโมง ตัวแปรที่ศึกษาได้แก่ อุณหภูมิลมออก (Outlet Air Temperature) 4 ระดับ ที่ 60, 70, 80 และ 90 °C โดยให้ Atomizing Air Pressure, Feed Temperature, Feed Rate คงที่ ที่ 3 Kg/Cm³, 35 องศาเซลเซียส และ 10 Ml./Min. ตามลำดับ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี F-Test

3.3 การทำแห้งแบบเยือกแข็ง วางแผนการทดลองแบบ Symmetric Factorial Design ทดลอง 3 ชั่วโมง ตัวแปรที่ศึกษามี 2 ตัวแปร ๆ ละ 2 ระดับ ได้แก่

3.3.1 อุณหภูมิในการแช่แข็ง ที่ (-40) และ (-10) °C

3.3.2 อุณหภูมิของอากาศที่ให้ความร้อน ที่ 20 และ 30 °C

ระยะเวลาในการทำแห้งนาน 30 ชั่วโมง

3.4 เลือกสภาวะที่เหมาะสมในการทำแห้งในแต่ละวิธีข้างต้น โดยใช้เกณฑ์ในการคัดเลือกดังนี้

3.4.1 ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกที่เหลืออยู่

3.4.2 การทดสอบทางประสาทสัมผัส ด้าน กลิ่น รส

โดยให้ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรดที่เหลืออยู่เป็นเกณฑ์หลัก และการทดสอบทางประสาทสัมผัส ด้าน กลิ่น รส เป็นเกณฑ์รอง

4. ติดตามการเปลี่ยนแปลงระหว่างการศึกษาของโยเกิร์ตผงที่ผ่านการทำแห้งที่เลือกจากข้อ 3.4

4.1 บรรจุโยเกิร์ตผงในถุงลามิเนตของ Polyethylene Tetrachloride / Aluminium / Polypropylene แบบสุญญากาศ

4.2 เก็บโยเกิร์ตผงในถุงลามิเนตที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 8 และ 10 สัปดาห์ และที่อุณหภูมิ 37 °C (สภาวะเร่ง) เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์

4.3 ประเมินผล วิเคราะห์ตัวอย่างในด้านต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

4.3.1 ทางเคมี วัดค่าความเป็นกรด

4.3.2 ทางกายภาพ วัดสีของโยเกิร์ตผง และความชื้น

4.3.3 ทางจุลชีววิทยา ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียผลิตกรดแลคติก ยีสต์และรา

4.3.4 การทดสอบทางประสาทสัมผัสหลังการคืนรูปด้าน สี กลิ่นรส ความเปรี้ยว ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส และการยอมรับรวม

4.5 วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design ทดลอง 3 ซ้ำ เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี F-Test