

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การคัดเลือกอัตราส่วนน้ำหมักเชอร์รี่ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์

การเก็บตัวอย่างและการเตรียมตัวอย่าง

งานวิจัยนี้ได้เลือกผลไม้รสเปรี้ยว ซึ่งได้แก่ เชอร์รี่สุก ชื่อวิทยาศาสตร์ *Prunus cerasus L.* เป็นตัวแทนในการศึกษา แบ่งหมักเชอร์รี่กับน้ำเป็นสี่อัตราส่วนดังนี้คือ 1:1 1:2 1:3 และ 1:4 ตามลำดับ โดยทุกอัตราส่วนจะเติมน้ำตาลความเข้มข้น 2 % (w/v) ซึ่งการเตรียมน้ำหมักในแต่ละอัตราส่วนจะเตรียมในปริมาณ 6 ลิตร (ตารางที่ 1) แล้วหมักในสภาวะปิดและไม่มีการเขย่า (standing close system fermentation)

ตารางที่ 1 สัดส่วนการทำน้ำหมักเชอร์รี่ต่อปริมาตรสุทธิ 6 ลิตร

อัตราส่วน	น้ำหมักเชอร์รี่ (กิโลกรัม)	น้ำหมักน้ำ (ลิตร)
1:1	3.0	3.0
1:2	2.0	4.0
1:3	1.5	4.5
1:4	1.2	4.8

การเก็บตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักสำหรับการวิเคราะห์จะเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลา 3 วัน (0, 12, 24, 36, 48, 60, 72) หลังจากนั้นจะเก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 3 สัปดาห์

การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำหมักเชอร์รี่ทางกายภาพ มีดังนี้

1. การวิเคราะห์ค่าสี ด้วยวิธี Minolta Colorimeter

เก็บตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักแต่ละอัตราส่วนตามระยะเวลาที่กำหนดใส่ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร 4 flask ตามแต่ละอัตราส่วน หลังจากนั้นนำไปวัดค่าสี ด้วยระบบ Hunter L, a, b โดยบรรจุน้ำหมักเชอร์รี่ตัวอย่างปริมาตร 3-5 มิลลิลิตรลงในถ้วย (Cup) แล้ววัดค่าสีด้วยระบบ Hunter L, a, b โดยค่า L (Lightness) เป็นค่าแสดงความสว่าง คือมีค่าตั้งแต่ 0 แสดงความเป็นสีดำ ถึง 100 แสดงความเป็นสีขาว ค่า a ที่มีค่าเป็นบวก (+) แสดงความเป็นสีเขียวหรือมีค่าเป็นลบ (-) แสดงความเป็นสีแดง และค่า b ที่มีค่าเป็นบวก (+) แสดงความเป็นสีเหลืองหรือมีค่าเป็นลบ (-) แสดงความเป็นสีน้ำเงิน

การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำหมักเซอร์รีทางเคมี มีดังนี้

1. การวิเคราะห์หาปริมาณ Total Phenolics Content (TPC) ตามวิธีของ Folin and Ciocalteu (Howard, L. R et al., 2000)

เก็บตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักแต่ละอัตราส่วนตามระยะเวลาที่กำหนดใส่ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร 4 flask ตามแต่ละอัตราส่วน แล้วทำการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 10 เท่าในหลอดทดลอง ดูดสารที่ได้จากการเจือจาง 20 μ l ผสมกับน้ำกลั่น 1.58 ml และ Folin reagent 100 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) เป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม Na_2CO_3 300 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยควบคุมไม่ให้สัมผัสแสง หลังจากนั้นนำไปวัดค่า absorbance ที่ 765 nm ปริมาณฟีนอลสามารถวัดเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม (mg GAE/g sample; GAE = Gallic acid Equivalent)

1.1 วิธีการเตรียมกราฟสารมาตรฐาน gallic acid

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน (Stock 5 mg/ml) gallic acid ปริมาตร 10 20 30 40 50 μ l ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ 990 980 970 960 950 μ l ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นปิเปตสารละลายที่เตรียมได้ในแต่ละความเข้มข้นใส่หลอดทดลอง 20 μ l เติม folin reagent 100 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1-8 นาที (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) เติม Na_2CO_3 300 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยไม่สัมผัสแสง จากนั้นนำไปวัดค่า absorbance ที่ 765 nm

2. การวิเคราะห์หาปริมาณ Total Flavonoids (TF) ตามวิธีของ Folin and Ciocalteu (Howard, L. R et al., 2000)

เก็บตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักแต่ละอัตราส่วนตามระยะเวลาที่กำหนดใส่ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิเปตตัวอย่าง 250 μ l เติมน้ำกลั่น 1.25 ml และเติม 5% NaNO_2 75 μ l ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) 5 นาที หลังจากนั้นเติม 10% (AlCl_3) 150 μ l 1 M NaOH 0.5 ml และเติมน้ำกลั่น 275 μ l ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที แล้วนำไปวัดค่า absorbance ที่ 510 nm ปริมาณ Flavonoids สามารถวัดเทียบกับสารมาตรฐาน โดยใช้ Catechin เป็นสารมาตรฐาน มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม (mg CIC/g sample; CIC = Catechin)

2.1 วิธีการเตรียมกราฟมาตรฐาน Flavonoids

ปิเปตสารละลายมาตรฐาน catechin (Stock 5 mg/ml) ปริมาตร 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 ml ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอด เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 5 ml ส่วนหลอดควบคุมใช้น้ำกลั่น 5 ml แทนแล้วเติมสารละลาย 5% NaNO_2 ปริมาตร 0.3 ml ลงไป เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาทีจากนั้นเติมสารละลาย 10% AlCl_3 0.3 ml เขย่าแล้วตั้งทิ้งไว้อีก 6 นาที

นำมาเติมสารละลาย 1 M NaOH 2 ml เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 510 นาโนเมตร

3. การวิเคราะห์หาปริมาณ Total antioxidant capacity (TAC) ด้วยวิธี Free radical 2,2-dipheynl- 1- picrylhydrazyl (DPPH) (Burda, S., and Oleszek, W. 2001)

เก็บตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักแต่ละอัตราส่วนตามระยะเวลาที่กำหนดใส่ flask ปิดตัวอย่าง 0.1 ml ใส่หลอดทดลอง เติม DPPH 1.90 ml ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ป้องกันไม่ให้สัมผัสแสง) 15 นาที ใช้ methanol เป็น blank โดยเติม methanol 0.1 ml ผสมกับ DPPH 1.90 ml สำหรับ blank ของตัวอย่าง ใช้ตัวอย่าง 0.1 ml ผสมกับ methanol 1.90 ml นำไปวัดค่า absorbance ที่ 515 nm ปริมาณ Total antioxidant capacity สามารถวัดเทียบได้กับสารมาตรฐาน โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน มีหน่วยวัดเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อตัวอย่างหนึ่งกรัม (mg GAE/g sample; GAE= gallic acid) ตามข้อ 2.1

3.1 วิธีการเตรียมกราฟสารมาตรฐาน gallic acid ปิดสารละลายมาตรฐาน (Stock 5 mg/ml) gallic acid ปริมาตร 10 20 30 40 50 μ l ตามลำดับ ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำ 990 980 970 960 950 μ l ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันหลังจากนั้น ปิดสารละลายที่เตรียมได้ในแต่ละความเข้มข้นใส่หลอดทดลอง 20 μ l เติม folin reagent 100 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ 1-8 นาที (ห้ามโดนแสง) เติม Na_2CO_3 300 μ l ผสมให้เข้ากันแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (ห้ามโดนแสง) เป็นเวลา 2 ชั่วโมงหลังจากนั้นนำไปวัดค่า absorbance ที่ 765 nm

4. การวิเคราะห์ค่า pH และ °Brix

เก็บตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักแต่ละอัตราส่วนตามระยะเวลาที่กำหนดใส่ flask จากนั้นนำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH meter และวัดค่า °Brix ด้วยเครื่อง Hand refractometer 0-32 °

5. การวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนัก (As, Cd, Hg, Pb) ในตัวอย่างส่วนใสของน้ำหมักในเดือนที่ 3 โดยวิธี inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) ดัดแปลงจาก Kuria Ndung u. et al, (2004) โดยใช้สภาวะดังนี้

RF Power (W)	1250
Plasma gas flow (1 min^{-1})	13
Auxiliary gas flow (1 min^{-1})	0.75
Nebulizer gas flow (1 min^{-1})	0.85-0.95
Sample flow rate ($\mu\text{l min}^{-1}$)	60

6. การวิเคราะห์สารระเหยที่ให้กลิ่นโดยใช้ Gas chromatography - mass spectrometry

นำน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ใส่ใน Headspace vial ขนาด 20 มิลลิลิตร ให้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อให้เกิดดุลยภาพของการระเหย แล้วทำการสกัดสารระเหยที่ให้กลิ่นด้วย Solid Phase Micro Extraction (SPME) ไฟเบอร์ชนิด 100 μm Polydimethylsiloxane โดยใช้ อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที จากนั้นสารระเหยที่อยู่บนไฟเบอร์จะถูกฉีกเข้าเครื่อง GC-MS โดยมีสภาวะการทดลองดังนี้

Column	DB-wax
Injection Mode	GC SPME
Read Bar Codes	Never
Required syringe	SPME Fiber
Agitator Temperature	70 °C
Sample Pre-Incubation Time	20 min. 0 sec.
Pre-Incubation Agitator Speed	500 rpm
Pre-Incubation Agitation Cycle	2 sec On, 4 sec Off
Fiber Depth From Bottom	25 mm
Extraction Time	20 min. 0 sec.
Injector	Front
Desorb Time	3 min. 0 sec.
Use Bakeout Station	No
GC Cycle Time	1 hr. 10 min. 0 sec.

7. การวิเคราะห์ประเภทของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักเซอร์รี่

นำหมักเซอร์รี่อัตราส่วนที่เหมาะสมมาวิเคราะห์ประเภทของสารลดแรงตึงผิวโดยวิธีตามมาตรฐานของ มอก. 414-2542 (อ้างอิง มอก. 2201-2547)

การทดสอบหาปริมาณสารลดแรงตึงผิวประเภทนอนไอออนิกและ/หรือแอมโฟเทริก

ชั่งตัวอย่างประมาณ 10 กรัม ให้ทราบมวลแน่นอนถึง 0.1 มิลลิกรัม ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. เติมน้ำบริสุทธิ์ 10 มล. และสารละลายโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ 5 มล. แล้วนำไปประเหยจนแห้งบนเครื่องอังน้ำเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น และเติมเอทานอล (ร้อยละ 95 โดยปริมาตร) 25 มล. นำไปทำให้ร้อน เป็นเวลา 5 นาที กรองส่วนที่ละลายในเอทานอลผ่านกระดาษกรองวัดแมนเบอร์ 42 หรือเทียบเท่า ลงในคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเรซินผสมระหว่างแอนไอออนิกและแคตไอออนิกในอัตราส่วน 1:1 ปริมาณ 15 กรัม ล้างกระดาษกรองด้วยเอทานอล (ร้อยละ 95 โดยปริมาตร) 25 มล. จากนั้นเปิดจุกด้านล่างของคอลัมน์ปล่อยให้เอทานอลไหลลงมา ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มล.

ที่ทราบมวลแล้ว เติมเอทานอล (ร้อยละ 95 โดยปริมาตร) 25 มล. 100 มล. ลงในคอลัมน์และปล่อยให้ไหลออกจนหมด นำสารละลายเอทานอลที่ได้ไประเหยให้แห้งบนเครื่องอังไอน้ำ แล้วนำส่วนที่ไม่ระเหยไปอบให้แห้งในตู้อบที่ควบคุมอุณหภูมิได้ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ชั่งหามวลของส่วนที่เหลือจากการอบแห้ง อบซ้ำจนได้มวลคงที่

ปริมาณสารลดแรงตึงผิวประเภทนอนไอออนิกหรือแอมโฟเทริก (ร้อยละโดยน้ำหนัก)

$$= (\text{มวลที่เหลือจากการอบแห้ง} \times 100) / \text{มวลของตัวอย่าง}$$

การทดสอบหาปริมาณสารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออนิก

ชั่งตัวอย่างประมาณ 1 กรัม ให้ทราบมวลแน่นอนถึง 0.1 มก. ใส่ลงในขวดแก้วรูปกรวยขนาด 250 มล. เติมน้ำบริสุทธิ์ 50 มล. และสารละลายโซเดียมเมตาโบซัลไฟด์ 5 มล. แล้วนำไปต้มให้เดือดเป็นเวลา 2 นาที ด้วยความระมัดระวัง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติมไดคลอโรมีเทน 15 มล. และสารละลายอินดิเคเตอร์ผสม 10 มล. นำไปไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานเบนซีโทเนียมคลอไรด์ พร้อมเขย่าแรงๆ จนถึงจุดยุติเมื่อชั้นของไดคลอโรมีเทนมีสีฟ้าอ่อน บันทึกปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเบนซีโทเนียมคลอไรด์ที่ใช้

ปริมาณสารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออนิก (ร้อยละโดยน้ำหนัก) = $(c_3 \times V_5 \times M_1) / (m_4 \times 10)$

เมื่อ c_3 = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเบนซีโทเนียมคลอไรด์ เป็นโมลต่อลูกบาศก์เดซิเมตร

V_5 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานเบนซีโทเนียมคลอไรด์ที่ใช้ไทเทรต เป็นมิลลิลิตร

M_1 = น้ำหนักโมเลกุลเฉลี่ยของสารลดแรงตึงผิวประเภทแอนไอออนิกในรูปของเกลือโซเดียมที่มีกลุ่มแอลคิลระหว่าง C8 – C18 เช่น โซเดียมแอลคิลซัลเฟต $M_1 = 302$, โซเดียมแอลคิลเบนซีนซัลโฟเนต $M_1 = 362$, โซเดียมแอลคิลอีเทอร์ซัลเฟต $M_1 = 412$

m_4 คือมวลของตัวอย่าง เป็นกรัม

การวิเคราะห์คุณสมบัติของน้ำหมักเซอร์รี่ทางจุลชีววิทยา มีดังนี้

1. วิธีการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด (BAM, 2001)

1.1 ใช้ Pour plate technique โดยการเปิดตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ กับปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ค่อย ๆ รินอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar ลงไปให้มีปริมาตรประมาณ 18-20 มิลลิลิตร ค่อย ๆ เขย่าให้ตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อผสมกัน ทำซ้ำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ คำนวณเพาะเชื้อนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

1.2 คัดเลือกงานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี นับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏ

1.3 หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ในแต่ละระดับความเจือจางคูณด้วยค่า dilution factor ของระดับความเจือจางที่นับได้ คำนวณเป็นจำนวนโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (cfu/ml)

2. วิธีการตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแล็กติก (BAM, 2001)

2.1 ใช้วิธี Pour plate technique โดยการเปิดตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่างๆ กัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเชื้อแล้วค่อย ๆ รินอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ทำการเจือจางระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียครั้งละ 10 เท่า คั่วงานเพาะเชื้อนำไปบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

2.2 นับจำนวนโคโลนีเฉพาะที่สามารถสร้างบริเวณใส (clear zone) และอาหารเลี้ยงเชื้อรอบโคโลนีเปลี่ยนเป็นสีเหลือง

2.3 หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่นับได้ในแต่ละระดับความเจือจางคูณด้วยค่า dilution factor ของระดับเจือจางที่นับได้ คำนวณเป็นจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียแล็กติกต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร (cfu/ml)

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ของน้ำหมักเซอร์รี่เปรี้ยว

วิธีการทดสอบประสิทธิภาพของน้ำหมักเซอร์รี่ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคโดย วิธี Broth Dilution Method

การเตรียมแบคทีเรีย 4 ชนิดที่ใช้ในการทดสอบ

1. เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. ชีตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton agar (MHA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 - 24 ชม.

2. เชื้อโคโลนีของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Muller Hinton broth (MHB) โดยเลือก single colony บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เหย้าที่ 180 rpm เป็นเวลา 18 - 24 ชม.

3. นำมาตกตะกอนเซลล์ โดย centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที

4. ดูดส่วนใสทิ้ง แล้วทำ suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่ทดสอบด้วย 0.85% NaCl เจือจางเทียบความขุ่นเท่ากับ McFarland No.4 (จำนวนเซลล์ประมาณ 3×10^8 cfu/ml) แล้วเจือจางต่อด้วย 0.85% NaCl จนได้จำนวนแบคทีเรียประมาณ 10^5 - 10^7 cfu/ml

5. นำ suspension ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้จาก 3.4 มาตรวจนับจำนวนโคโลนี โดยเกลี่ยบนอาหาร Plate Count agar (PCA) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 - 24 ชม. แล้วคำนวณจำนวนโคโลนีเป็น cfu/ml

การเตรียมน้ำหมักเซอร์ อัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อใช้ทดสอบ

ดูดส่วนใสของน้ำหมักเซอร์อัตราส่วนที่เหมาะสมมา Centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 °C ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนและเก็บส่วนใสไว้ทดสอบ โดยนำ ส่วนใสมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton Broth (MHB) แบ่งหลอดทดลองออกเป็น 12 หลอด โดยหลอดที่ 1 เป็นอาหาร MHB (Positive Control) หลอดที่ 2 เป็นน้ำหมักเซอร์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 100 (Negative Control) ส่วนหลอดที่ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 เป็นอาหาร MHB ผสมน้ำหมักเซอร์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39, 0.19 และ 0.08 ตามลำดับ

ปิเปตเชื้อจุลินทรีย์ 1 มิลลิลิตรแต่ละชนิดลงในชุดการทดลองที่ 1-12 บ่มเชื้อ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชม. สังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้น หากชุดการทดลองใดไม่พบความขุ่นแสดงว่า หลอดทดลองนั้นที่ไม่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จะเป็นความเข้มข้นที่สารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักเซอร์ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Minimal Inhibitory Concentration; MIC) จากนั้นนำหลอดทดลองที่ไม่พบความขุ่นไปนับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spread plate บนอาหาร Mueller Hinton Agar (MHA) หากหลอดทดลองใดที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ จะพบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เกิน 20 โคโลนี จะเป็นความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำหมักเซอร์ที่มีความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ร้อยละ 99 (Minimal Bactericidal Concentration; MBC)