บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเตรียมนมเปรี้ยวถั่วเหลืองและต้นเชื้อสำหรับหมัก

วัสดุอุปกรณ์

1. ภาชนะบรรจุชนิดใสและสามารถฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนสูงได้
2. ผ้าขาวบาง
3. หลอดทดลองและขวดรูปชมพู่
4. จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
5. Pipette 1, 5 และ 10 ml
6. เข็มเขี่ยเชื้อ
7. Hot air oven
8. Incubator
9. UV spectrophotometer
10. Autoclave
11. Laminar flow
12. Vortex
13. เครื่องปั่น (chopper)
14. เครื่องกรองแยกกาก

สารเคมีและอื่นๆ

1. Phosphate buffer
2. 0.5 Mc Far land standard
3. Normal saline
4. Bromcresol purple
5. Potassium metabisulphite
6. ถั่วเหลืองพันธุ์เชียงใหม่ 60 จากศูนย์วิจัยพืชไร่ จังหวัดเชียงใหม่

7. น้ำตาลทรายขาว
8. เกลือแกง
9. น้ำสะอาด

2. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงและทดสอบจุลินทรีย์

<u>วัสดุอุปกรณ์</u>

1. บีกเกอร์
2. กรวยกรอง
3. ทิมเบิลแก้ว (glass thimble)
4. ทิมเบิลกระดาษ (cellulose thimble)
5. กระดาษกรอง
6. เครื่องชั่งน้ำหนัก
7. Laminar air flow
8. Micropipette และ Tip ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
9. Incubator
10. Hot air oven
11. HPLC
12. pH meter
13. UV-Visible Spectrophotometer
14. Freeze-dryer
15. Soxhlet extraction apparatus
16. desiccator
17. Water bath
18. anaerobic jar
19. Bunsen burner
20. Membrane filter ขนาด 0.45 และ 0.22 ไมโครเมตร กระบอกฉีดยา และ microfilter
21. Slide และ cover slip

สารเคมี

1. 0.85% Normal saline
2. ethanol
3. น้ำกลั่น
4. gas pack
5. ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำหรับจัดจำแนกจุลินทรีย์
6. Lowry's reagent
7. Phosphoric acid
8. Sulfuric acid
9. Potassium persulfate
10. Absolute ethanol
11. Acetic acid
12. Sodium hydroxide

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man, Rogosa and Sharp broth (MRS broth)
2. Sabouraud dextrose agar (SDA)
3. Lauryl tryptose broth
4. Plate count agar (PCA)
5. Potato dextrose agar (PDA)
6. Beef extract
7. Yeast extract
8. Tryptic soy broth (TSB)
9. Nutrient agar (NA)
10. Mannitol salt phenol-red agar
11. Brilliant-green bile lactose broth 2% (BGLB broth 2%)
12. Brain Heart Infusion Broth (BHI)
13. *E. coli* broth (EC broth)
14. Eosin methylene blue agar (EMB agar)
15. Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar)
16. Salmonella-Shigella agar (SS agar)
17. MacConkey agar

18. Bacto agar
19. Fluid thioglycollate medium
20. Mueller Hinton Broth (MHB)
21. Cooked meat medium

สารเคมี

1. Bromcresol purple dye solution
2. Kovac's reagent
3. Diethyl ether
4. D(+)-Glucose
5. Sucrose
6. Lactose
7. L-Rhamnose
8. D(+)-Xylose
9. D(+)-Melibiose
10. L(+)-Arabinose
11. D-Mannitol
12. Raffinose
13. Phenolphthalein indicator
14. Bromcresol purple indicator
15. Phenol red indicator
16. Potassium hydrogen phosphate
17. Sodium chloride
18. Ammonium phosphate
19. Absolute ethanol
20. Phosphoric acid
21. API 50CHL
22. Gram strain reagents
23. เครื่องปั่นเหวี่ยง
24. กล้องจุลทรรศน์ชนิดธรรมดา
25. ตู้แช่ -20 ถึง -80 องศาเซลเซียส
26. เครื่องชั่ง

3. อุปกรณ์และสารเคมีสำหรับเพาะเลี้ยงและทดสอบกับเซลล์ Caco-2 (Enterocyte-like Caco-2 cells)

1. Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM) จำหน่ายโดย Gibco Laboratory
2. Mycoplasma-free FCS (Fecal Calf Serum) จำหน่ายโดย Gibco Laboratory
3. Penicillin/Streptomycin mixture (Stock 10,000 units/ml จำหน่ายโดย Gibco Laboratory
4. HEPES buffer
5. Pasture pipette
6. Serological pipette
7. Haemocytometer
8. 25 หรือ 75 cm^3 T-culture flask จำหน่ายโดย Nunclon, Denmark
9. Microculture plate ขนาด 6 หลุม, 24 หลุม และ 96 หลุม จำหน่ายโดย Nunclon, Denmark
10. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow biological cabinet)
11. ตู้อบคาร์บอนไดออกไซม์สำหรับบ่มเพาะเชื้อ (CO_2 incubator)
12. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (Inverted microscope)
13. เครื่องอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ใช้กับ microculture plate (microplate reader)
14. ชุดทดสอบ Quantikine สำหรับทดสอบ Human cytokines (IL-6 และ IL-10), R&D Systems
15. อุปกรณ์และสารเคมีอื่นๆสำหรับการดูแลรักษาสภาพ และทดสอบกับเซลล์เพาะเลี้ยง

4. ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

ตัวอย่างอาหารหมักจากพืช ประกอบด้วย น้ำหมักชีวภาพ ได้แก่ น้ำหมักมะเฟือง, น้ำหมักมะละกอ, น้ำหมักมะขามป้อม, น้ำหมักสมอไทย, น้ำหมักกล้วย, น้ำหมักลูกยอ, น้ำหมักพลูคาว, น้ำหมักกระชายดำ, น้ำหมักตะไคร้หอม, น้ำหมักมะกรูด, น้ำหมักผลไม่ป่า, พืชหมัก, ผักดอง, ผลไม้ดอง, เช่น ถั่วหมัก, ถั่วเน่า, ชาเมี่ยง, กระเทียมดอง, ผักกาดดอง, ผักกาดเขียวดอง, มะนาวดอง, ท้อดอง, ผักเสี้ยนดอง, หอมดอง, กะหล่ำปลีดอง, หัวไชเท้าดอง, หน่อไม้ดอง และผักพื้นบ้านอื่นๆ

5. จุลินทรีย์สายพันธุ์มาตรฐาน

ขอรับบริการสายพันธุ์จากคณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ดังนี้

- แบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922,
- แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* ATCC 25923,
- แบคทีเรีย *Bacillus cereus*,
- แบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853,
- แบคทีเรีย *Salmonella typhi,*
- แบคทีเรีย *Shigella sonnei* และ
- ยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028

6. เซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2

ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

วิธีทำการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างอาหารหมัก เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria)

การเก็บและแยกแบคทีเรียแลกติกจากตัวอย่าง ได้รวบรวมตัวอย่างอาหารหมักจากพืช ประกอบด้วย น้ำหมักชีวภาพ ได้แก่ น้ำหมักมะเฟือง น้ำหมักมะละกอ น้ำหมักมะขามป้อม น้ำหมักสมอไทย น้ำหมักกล้วย น้ำหมักลูกยอ น้ำหมักพลูคาว น้ำหมักกระชายดำ น้ำหมักตะไคร้หอม น้ำหมักมะกรูด น้ำหมักผลไม่ป่า พืชหมัก ผักดอง ผลไม้ดอง เช่น ถั่วหมัก ถั่วเน่า ชาเมี่ยง กระเทียมดอง ผักกาดดอง ผักกาดเขียวดอง มะนาวดอง ท้อดอง ผักเสี้ยนดอง หอมดอง กะหล่ำปลีดอง หัวไชเท้าดอง หน่อไม้ดอง และผักพื้นบ้านอื่นๆ โดยเก็บตัวอย่างต่างๆตามแหล่งผลิตตัวอย่าง พร้อมทั้งส่งมาจากทั่วทุกภาคของประเทศไทย

2. คัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างอาหารหมัก

โดยชั่งตัวอย่างอาหารหมัก 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ บีบให้ละเอียดแล้วเติมอาหาร MRS broth ที่มีเกลือแกง (NaCl) 5% (มวลโดยปริมาตร) จำนวน 225 มล. แล้วเจือจาง 10 เท่าเป็นลำดับในสารละลายบัฟเฟอร์ และดูดตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางมาผสมกับอาหาร MRS agar หลอมเหลว ที่ผสม bromocresal purple เป็นอินดิเคเตอร์ เทลงจานเพาะเชื้อ (petri dish) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจดูผลทุกวัน คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน (สีและขนาด) แยกเก็บเฉพาะโคโลนีที่สร้างกรดซึ่งเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลืองในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อ 30-300 โคโลนี และไม่ผลิตเอนไซม์คาตาเลส บันทึกสัณฐานวิทยาของเซลล์ด้วยการย้อมสีเซลล์แบบแกรม (Gram stain) โดยนำเชื้อที่เก็บไว้ มาเลี้ยงให้เจริญบนอาหาร MRS agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมา smear บนแผ่นแก้วสไลด์ที่สะอาด ตรึงเซลล์ให้ติดแผ่นแก้วสไลด์ด้วยความร้อน และย้อมด้วยสี crystal violet และ gram's iodine จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ให้แกรมบวกมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสไว้ใน stab MRS agar ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในห้องปฏิบัติการต่อไป รวมทั้งเก็บแบคทีเรียเป็น stock culture ใน 15% glycerol MRS broth ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3. ศึกษาคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก เพื่อคัดเลือกเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในกระบวนผลิตนมเปรี้ยวถั่วเหลือง โดยการทดสอบคุณสมบัติ ดังต่อไปนี้

3.1 ทดสอบการทนกรด (ดัดแปลงจากวิธีของ Conway และคณะ, 1987)

โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกมา ลงใน MRS broth ซึ่งปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ pH 3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง

3.2 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี (ดัดแปลงจากวิธีของ Conway และคณะ, 1987)

โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกมา ลงใน MRS broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียล เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อ

3.3 ทดสอบคุณสมบัติการมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (ดัดแปลงจากวิธีของ Jacobsen และคณะ, 1999)

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากการทดสอบการทนกรดและทนต่อเกลือน้ำดี มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อินดิเคเตอร์ โดยเลี้ยงแบคทีเรียที่คัดแยกได้ในอาหาร MRS broth และเลี้ยง จุลินทรีย์อินดิเคเตอร์หรือจุลินทรีย์ก่อโรค (*E. coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Salmonella typhi, Shigella sonnei* และยีสต์ *Candida albicans* ATCC 90028) ในอาหาร TSB (Tryptic soy broth) สำหรับแบคทีเรีย และอาหาร SDB (Sabouraud dextrose broth) สำหรับยีสต์ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง (Optical Density: OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ 0.500 A ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยใช้เทคนิค Agar disc diffusion โดยป้าย (Swab) แบคทีเรียและยีสต์อินดิเคเตอร์ลงบนอาหาร TSA (Tryptic soy agar) และ SDA (Sabouraud dextrose agar) ตามลำดับ จากนั้นนำเปเปอร์ดิสก์ที่หยดด้วยแบคทีเรียกรดแลกติกที่ต้องการทดสอบมาวางบนอาหารที่ป้ายด้วยเชื้อก่อโรคแล้ว บ่ม 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางรอบเปเปอร์ดิสก์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร

3.4 ทดสอบการเกาะติดของโปรไบโอติกกับเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 (ดัดแปลงจากวิธีของ Morita และคณะ, 2002)

- เตรียม Caco-2 monolayer ในฟลาสก์ขนาด 25 cm^2 subculture โดยบ่มที่ 37°C 5% CO_2 เปลี่ยนอาหารทุกๆ 2 วัน จนกว่าเซลล์จะมีการเจริญเป็น monolayer ถึง 80% confluence ย้อมเซลล์ด้วย tryphan blue และนับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และปรับปริมาณเซลล์ให้ได้ตามสภาวะที่ต้องการทดสอบ

- เตรียมเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกที่ผ่านคุณสมบัติข้างต้น มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth จนมีอายุ 18 ชั่วโมง แล้วแยกเซลล์แบคทีเรียโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ phosphate buffer saline (PBS) pH 7.2 จำนวน 3 ครั้ง และแขวนลอยตะกอนแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติมยาปฏิชีวนะในปริมาตรที่เท่ากัน และปรับปริมาณเซลล์ให้ได้ตามสภาวะที่ต้องการทดสอบ

- เพาะเลี้ยงร่วมกัน (co-culture) ของเซลล์ Caco-2 ที่เจริญเป็น monolayer และแบคทีเรียกรดแลกติกทดสอบ โดย co-culture ใน culture plate ก้นแบน ขนาด 24 หลุม โดยใช้ปริมาณของเซลล์ Caco-2 ประมาณ $1x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ 2 ระดับ คือ

ประมาณ 10^8 cfu ต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นระดับสูง) และ 10^6 cfu ต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นระดับต่ำ) เพาะเลี้ยงร่วมกันในสภาวะที่ 37°C 5% CO_2 และทดสอบหาปริมาณแบคทีเรียเกาะติด

- ทดสอบหาปริมาณแบคทีเรียเกาะติดโดยการเก็บตัวอย่างของ co-culture ณ เวลาเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0; Hr0) และชั่วโมงที่ 2 (Hr2) มาทดสอบ โดยการล้างเซลล์ในหลุมด้วย PBS และทำให้เป็นเซลล์แขวนลอยด้วยสารละลาย Triton X-100 แล้วนำสารละลายที่ได้ไปตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียที่ยังเหลืออยู่หรือเกาะติดกับเซลล์โดยการเลี้ยงในอาหาร MRS agar ด้วยการ pour plate

4. ศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกต่อการต้านการอักเสบ โดยการเหนี่ยวนำให้เกิด Cytokines ของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกทดสอบ (ดัดแปลงจากวิธีของ Morita และคณะ, 2002; Botes และคณะ, 2008)

มีขั้นตอนการเตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ให้เป็น monolayer และเตรียมแบคทีเรียทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบการเกาะติด และเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน (co-culture) ของเซลล์ Caco-2 ที่เจริญเป็น monolayer และแบคทีเรียกรดแลกติกทดสอบ โดย co-culture ใน culture plate ก้นแบน ขนาด 24 หลุม โดยใช้ปริมาณของเซลล์ Caco-2 ประมาณ $1x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก ประมาณ 10^8 cfu ต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นระดับสูง) และประมาณ 10^6 cfu ต่อมิลลิลิตร (ความเข้มข้นระดับต่ำ) และเพาะเลี้ยงร่วมกันในสภาวะที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเก็บส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงร่วมกันคุณสมบัติของโปรไบโอติกต่อการสร้างของ Cytokines ได้แก่ IL-6 ซึ่งจัดเป็น pro-inflammatory cytokines หรือ cytokines ที่ทำให้เกิดการอักเสบ และผลการสร้าง IL-10 ซึ่งจัดเป็น anti-inflammatory cytokines หรือ cytokines ที่ต้านการอักเสบ ด้วยวิธี ELISA (โดยใช้ชุดทดสอบ Quantikine ของ R&D Systems, USA) ซึ่งอาจทดสอบในทันที หรือเก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาวิเคราะห์ Cytokines

5. เทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้

เทียบเคียงชนิดแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้โดยวิธีทางชีวเคมี โดยอ้างอิงตามการเทียบเคียงแบคทีเรียกรดแลกติกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology Volume 2 (2001)

6. เตรียมต้นเชื้อโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้เพื่อนำมาผลิตนมเปรี้ยวถั่วเหลือง และทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง

- ***เตรียมน้ำนมถั่วเหลือง*** (ดัดแปลงจากวิธีของ บุษบา, 2520; Sankonkit, 2007)

1. นำถั่วเหลืองสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาคัดเมล็ดที่สมบูรณ์ และแช่ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
2. ปั่นถั่วเหลืองรวมกับน้ำสะอาดด้วยอัตราส่วนของถั่วเหลืองต่อน้ำเป็น 1 ต่อ 10 (โดยน้ำหนัก)
3. กรองแยกกากถั่วเหลืองออกด้วยเครื่องแยกกาก จะได้น้ำนมถั่วเหลือง
4. เติมนมถั่วเหลืองลงในขวดบรรจุที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำไปผ่านการลดเชื้อปนเปื้อนโดยการพาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 69±3°C เป็นเวลา 30 นาที
5. รอให้เย็นลงจึงเติมต้นเชื้อให้มีความเข้มข้นเป็น 1% (โดยปริมาตร) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบ และวิเคราะห์หาค่าต่างๆ ต่อไป

- ***เตรียมต้นเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลกติก***

เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้บนอาหาร MRS agar

↓ Incubate 24-48 hrs, 35-37 องศาเซลเซียส

เขี่ยเชื้อมา 1 โคโลนี ใส่ใน MRS broth 10 ml

↓ Incubate 12-18 hrs, 35-37 องศาเซลเซียส *

ถ่ายเชื้อลง MRS broth ความเข้มข้น 1% v/v, ประมาณ 10^7 เซลล์

↓ Incubate 12-18 hrs, 35-37 องศาเซลเซียส **

ถ่ายต้นเชื้อลงในนมถั่วเหลืองให้มีความเข้มข้นของเชื้อ 1% (v/v) ประมาณ 10^7 เซลล์

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส และเก็บตัวอย่าง ณ เวลาต่างๆเพื่อทดสอบคุณสมบัติ

หมายเหตุ

* มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^9 CFU/ml

** มีปริมาณแบคทีเรียประมาณ 10^9 CFU/ml

6.1 การตรวจปริมาณกรดแลกติกโดยเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ ณ วันที่ 0 และ 30 ของการหมัก

โดยเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ ณ วันที่ 0 และ 30 ของการหมัก โดยใช้วิธีโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) นอกจากนี้ยังศึกษาความเป็นกรด-ด่างโดยการวัด pH ร่วมด้วย

6.2 ตรวจสอบชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนเพื่อให้ทราบถึงความปลอดภัยต่อการบริโภคโดยเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย

เพื่อให้ทราบถึงความปลอดภัยต่อการบริโภคนมเปรี้ยวถั่วเหลือง จึงตรวจหาปริมาณของจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ โดยเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยตรวจนับปริมาณจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้

1. การตรวจนับปริมาณโดยรวมของจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย) โดยวิธี Pour Plate Technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar (PCA)

2. การตรวจนับปริมาณยีสต์และราโดยวิธี โดยวิธี Pour Plate Technique ในอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

3. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์ม และแบคทีเรีย *Escherichia coli* โดยวิธี Multiple Tube Fermentation Technique

4. การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย *Bacillus cereus* โดยวิธี Spread Plate Technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Phenol Red Egg-Yolk Kanamycin Agar (PREYK)

5. การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Spread Plate Technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Manitol Salt Phenol Red Egg-Yolk Agar (MSEY)

6. การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย *Salmonella* โดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MacConkey Agar (MAC), *Salmonella-Shigella* Agar (SS)

7. การตรวจวิเคราะห์แบคทีเรีย *Clostridium perfringens* โดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Cooked Meat Medium

6.3 ทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพของต้นเชื้อเมื่ออยู่ในผลิตภัณฑ์ และความสามารถในการเจริญของเชื้อเมื่ออยู่ในผลิตภัณฑ์

เพื่อให้ทราบถึงความสามารถในการรอดชีวิตเมื่ออยู่ในนมเปรี้ยวถั่วเหลือง และคุณภาพของการเป็นต้นเชื้อโปรไบโอติกในนมเปรี้ยวถั่วเหลือง โดยเก็บตัวอย่างวิเคราะห์ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายทำการตรวจวิเคราะห์ โดยตรวจการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียโปรไบโอติก โดยวิธี Pour Plate Technique ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar

6.4 ทดสอบคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองต่อการสร้าง cytokines

โดยทดสอบกับผลิตภัณฑ์สุดท้ายของนมเปรี้ยวถั่วเหลือง (อายุหมัก 30 วัน) โดยศึกษาผลของนมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ได้มาปรับสภาพให้มีค่าพีเอชเป็นกลาง และปรับให้มีปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกตามความเหมาะสมตามผลที่ได้จากการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิด Cytokines ของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกทดสอบ และนำไปเลี้ยงร่วมกับเซลล์ Caco-2 ที่เป็น monolayer และทดสอบโดยหาปริมาณ IL-6 และ IL-10 เช่นเดียวกับวิธีการทดสอบการเหนี่ยวนำให้เกิด Cytokines ของเซลล์เพาะเลี้ยง Caco-2 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกทดสอบ

6.5 ทดสอบคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation) ต่อผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยใช้โปรไบโอติกเป็นต้นเชื้อ ซึ่งทดสอบโดยใช้ Ratio Profile Test (RPT) (ดัดแปลงอ้างอิงจากปราณี, 2547)

การทดสอบความพึงพอใจของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์สุดท้าย เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการนำไปปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ให้ได้ผลิตภัณฑ์ซึ่งนอกจากจะมีคุณภาพในการส่งเสริมสุขภาพแล้ว ยังมีกลิ่น รส ที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคอีกด้วย ในการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้จะใช้วิธีทดสอบแบบเชิงพรรณนา (Descriptive test) ซึ่งจะใช้วิธี Ratio Profile Test (RPT) โดยแสดงถึงระดับความเข้มข้นของลักษณะของผลิตภัณฑ์ในสเกลทางประสาทสัมผัส (Sensory scale) ที่ได้กำหนดขึ้นและนำค่าที่ได้จากการวัดระดับสเกล มาทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบและแปรผลออกมาเป็นค่าการยอมรับต่อไป โดยในการทดสอบจะใช้ผู้ทดสอบในการชิมผลิตภัณฑ์จำนวน 20 คน ทำการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ผลิตโดยใช้ต้นเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ และหลังจากนั้นให้ทำการประเมินค่าความพึงพอใจในสเกลที่กำหนดคุณลักษณะต่างๆ ของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ได้กำหนดขึ้นโดยทำการประเมิน 2 ระดับคือ ค่าความพึงพอใจในอุดมคติ (Ideal score) ของผู้ทดสอบและค่าความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค (Sample score) จากนั้นนำค่าทั้งสองมาหาค่า Ideal ratio score เพื่อประเมินเป็นค่าความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์น้ำนมถั่วเหลืองหมักในคุณลักษณะต่างๆต่อไป โดยในการทดสอบนี้จะใช้วิธีการทดสอบทางสถิติคือ t-test ในการทดสอบการ

ยอมรับของผลิตภัณฑ์ด้วย เมื่อการหมักครบ 30 วัน นำมาทดสอบความพึงพอใจของกลุ่มทดลอง ซึ่งไม่จำกัดเพศและอายุ โดยทดสอบความพึงพอใจในสี กลิ่น รสชาติ และความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์โดยรวม แล้วทำการประเมินความพึงพอใจหลังจากการทดสอบ (ตารางที่ 6)

ทดสอบคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส (sensory evaluation)

ตารางที่ 6 แสดงคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลืองที่ทำการทดสอบ

ลำดับที่	คุณลักษณะ
1	สี
2	กลิ่น
3	รสเปรี้ยว
4	รสหวาน
5	เนื้อสัมผัส
6	การยอมรับโดยรวม

I = ระดับของคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ในอุดมคติ (ideal score)

S = ระดับของคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เป็นอยู่จริง (sample score)

ขั้นตอนการทดสอบ

1. บ้วนปากด้วยน้ำ 3 ครั้ง
2. ทดสอบโดยการสูดดมกลิ่น สังเกตสี ชิมรสชาติของผลิตภัณฑ์
3. ประเมินความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์ตามแบบประเมินผลิตภัณฑ์

ตัวอย่างแบบประเมินความพึงพอใจในผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง

1. เพศ

☐ ชาย ☐ หญิง

2. อายุ

☐ ต่ำกว่า 15 ปี ☐ 16 -25 ปี

☐ 26 – 40 ปี ☐ มากกว่า 40 ปี

3. การศึกษา

☐ ต่ำกว่าปริญญาตรี

☐ ปริญญาตรี

☐ สูงกว่าปริญญาตรี

4. เกณฑ์การให้คะแนน

+5 = พึงพอใจมาก 0 = พอใช้ -5 = ไม่พึงพอใจมาก

สี -5 -4 -3 -2 -1 0 +1 +2 +3 +4 +5

กลิ่น -5 -4 -3 -2 -1 0 +1 +2 +3 +4 +5

รส -5 -4 -3 -2 -1 0 +1 +2 +3 +4 +5

ความพึงพอใจโดยรวม

-5 -4 -3 -2 -1 0 +1 +2 +3 +4 +5

ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

.....

.....

.....

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวถั่วเหลือง

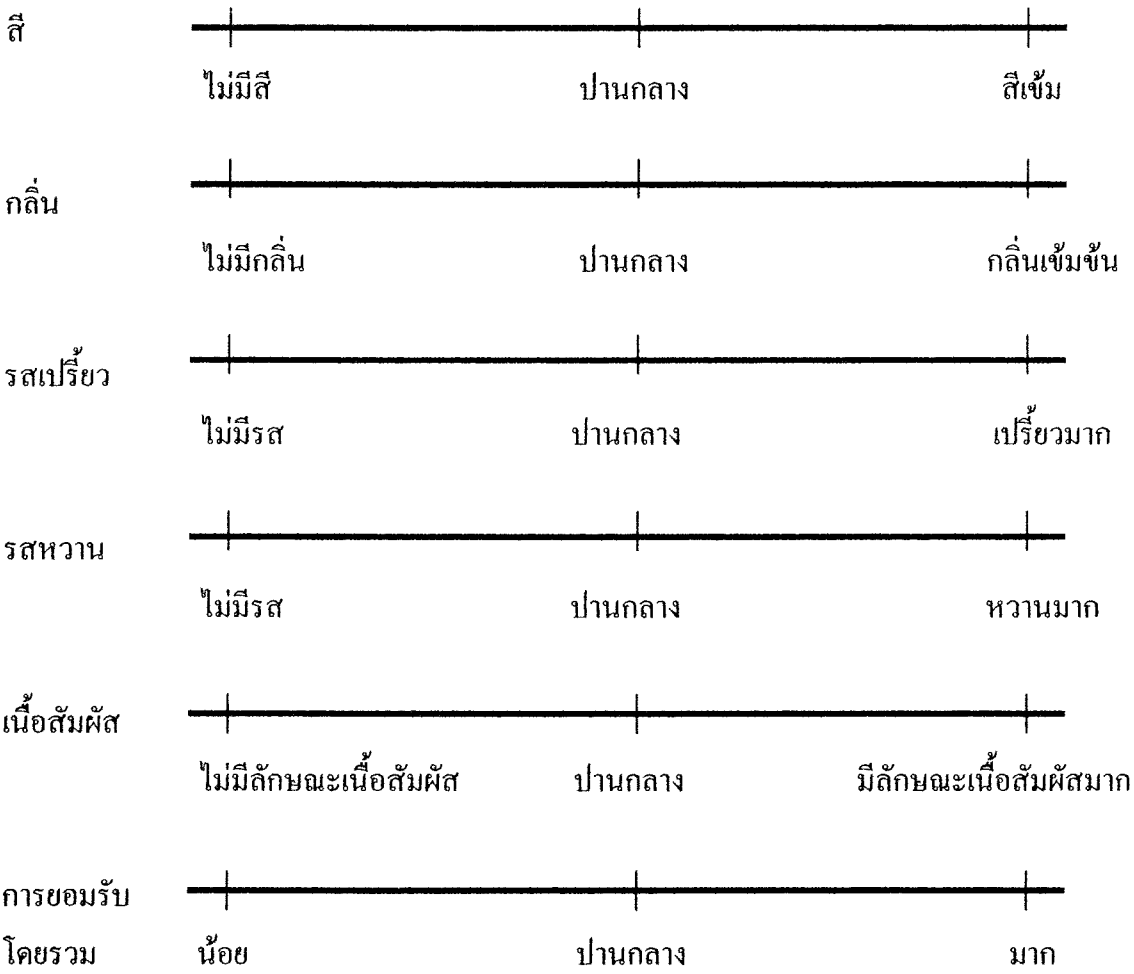
วันที่.....เวลา.....

รหัสตัวอย่าง.....

ชื่อผู้ทดสอบ.....เพศ.....อายุ.....ปี

กรุณาทำเครื่องหมาย : I = ระดับของคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ในอุดมคติ

X = ระดับของคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เป็นอยู่จริง



7. ทดสอบคุณสมบัติการคงสภาพ (Stability)

โดยนำผลิตภัณฑ์ที่ได้ไปบรรจุในภาชนะบรรจุที่มีความเหมาะสมแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง สลับกันเป็นจำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 วันในแต่ละอุณหภูมิ (60 วัน) และนำผลิตภัณฑ์สุดท้ายเมื่อผ่านการทดสอบความคงสภาพมาทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

1. การยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยวิธี Ratio Profile Test (RPT)
2. คุณสมบัติความอยู่รอดของแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์

8. ประมวลและสรุปข้อมูลผลการทดลองทางห้องปฏิบัติการ

9. รายงาน วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล

9.1 วิเคราะห์ข้อมูลและแปรผลโดยการวิเคราะห์ทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple's Range Test (DMRT)

9.2 วิธีการผลิตที่เหมาะสมและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค