

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์และการเตรียมกล้าเชื้อ

3.1.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองคือ *Lactococcus lactis* IO-1 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก Peter F. Stanbury มหาวิทยาลัย Hertfordshire ประเทศอังกฤษ

3.1.2 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

3.1.2.1 การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อนการเตรียมกล้าเชื้อ

นำจุลินทรีย์ที่เก็บในกลีเซอรอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเลี้ยงในอาหารไฮโอไกลโคเลท ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

3.1.2.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

ปิเปตเซลล์ที่เลี้ยงในข้อ 3.1.2.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในอาหารสูตรพื้นฐาน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ประกอบด้วยยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ เพปโตเน โซเดียมคลอไรด์ อย่างละ 5 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลไซโลส 30 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที นาน 8 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตกรดแลคติก

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อไฮโอไกลโคเลต (thioglycolate medium) ประกอบด้วย

อาหารไฮโอไกลโคเลต 25 กรัมต่อลิตร

เตรียมโดยชั่งอาหารไฮโอไกลโคเลต 25 กรัม เติมน้ำกลั่นประมาณ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายแล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.1.3.2 สูตรอาหารพื้นฐาน ประกอบด้วย

ยีสต์เอ็กซ์แทรกท์	5	กรัมต่อลิตร
-------------------	---	-------------

เพปโตเน	5	กรัมต่อลิตร
---------	---	-------------

โซเดียมคลอไรด์	5	กรัมต่อลิตร
----------------	---	-------------

น้ำตาลไซโลส	30	กรัมต่อลิตร
-------------	----	-------------

เตรียมโดยชั่งสารตามปริมาณข้างต้น จากนั้นเติมน้ำกลั่นปริมาตร 980 มิลลิลิตร คนให้ละลาย นำไปปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้เท่ากับ 6.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที

3.2 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ขานข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ K40 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. ประสิทธิ์ ใจศีล คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2.2 อุปกรณ์

เครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
1. สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer)	UV-1601	Shimadzu, Japan
2. โครมาโตกราฟีแบบของเหลวแรงดันสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)		Shimadzu, Japan
- คอลัมน์ (column)	Aminex HPX-87H	U.S.A
- ปั๊ม (pump)	LC-10AC	Shimadzu, Japan
- ตัวตรวจวัด (detector)	RID-10A	Shimadzu, Japan
3. เครื่องวัดพีเอช (pH meter)	pH/ATC electrode	Sartorius, U.S.A
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	BP3100S	Sartorius, U.S.A
5. เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	BP3100S	Sartorius, U.S.A
6. ถังหมักขนาด 2 ลิตร (fermentor)	Biostat-B	B. Braun, Germany
7. หม้อนึ่งไอน้ำ (autoclave)	UM-65 L	สหช่าง, ประเทศไทย
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)	DENVILLE 260D	Denville,U.S.A
9. ตู้บ่มแบบเขย่า (incubator shaker)	G25-KC	New Brunswick, U.S.A
10. อิเล็กโทรดวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH electrode)	Hamilton CH-7402	Hamilton, Switzerland
11. คิวเวต (cuvette)	Hellma quartz glass	Hellma, Australia
12. เข็มฉีดยาสำหรับ HPLC (syringe for HPLC)	SGE	SGE, Australia

3.2.3 สารเคมี

สารเคมี	ยี่ห้อ/บริษัทผู้ผลิต
1. โซเดียมแลคเตท (sodium lactate sodium salt)	Sigma, U.S.A
2. 2,3-บิวเทนไดออล (2,3 butanediol)	Aldrich, Australia
3. ดี(+)-ไซโลส (D(+)-xylose)	Fluka, Switzerland
4. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)	Univar, England
5. อาหารไรโอไกลโคเลต (thioglycolate medium)	Difco, Germany
6. แอล(+)-อะราบินอส (L(+)-arabinose)	Fluka, Switzerland
7. เพปโตน (peptone)	Himedia, India
8. ยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ (yeast extract)	BBL, England
9. โซเดียมฟอร์มेट (sodium formate sodium salt)	Sigma, U.S.A
10. โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate)	Carlo Erba, France
11. เอทานอล (ethanol)	Hipersolv TM BDH, England
12. ฟอลินฟีนอล (folin phenol reagent)	Carlo Erba, France
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide)	Univar, Australia
14. กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid)	BDH, England

3.3 วิเคราะห์องค์ประกอบหลักทางเคมีที่สำคัญในยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ กากเซลล์ยีสต์แห้ง และรำข้าว

วิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญในยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ กากเซลล์ยีสต์แห้ง และรำข้าว ซึ่งได้แก่ คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน เยื่อใย เถ้า และความชื้น

3.4 การหมักกรดแลคติกแบบกะจากไฮโดรไลสฟางข้าวที่ไม่เติมสารอาหารเสริม

นำไฮโดรไลสฟางข้าว (จากรายงานการวิจัยครั้งที่ 1) มาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ 10 โมลาร์ (Garde et al., 2001) และปรับน้ำตาลไซโลสให้เป็น 30 กรัมต่อลิตร (Laopaiboon และคณะ 2010) จากนั้นเติมลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร (Biostat-B, B. Braun, Germany) โดยมีปริมาตรน้ำหมัก (working volume) เท่ากับ 1 ลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 25 นาที จากนั้นนำไปศึกษาการผลิตกรดแลคติกภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ โดยถ่ายยาล้างเชื้อจากข้อ 3.1.2 (5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในระหว่างการหมักเพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นน้ำตาล (กลูโคส ไซโลส และ อะราบินอส) กรด (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) และเอทานอล โดยใช้ HPLC (ใช้สารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 โมลาร์ เป็นวัฏภาคไหล ที่อัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้คอลัมน์ Aminex HPX-87H เป็นวัฏภาคนิ่ง ควบคุมอุณหภูมิของคอลัมน์ที่ 45 องศาเซลเซียส และใช้ตัวตรวจวัดแบบ refractive index detector) (Laopaiboon และคณะ 2010)

3.5 การหมักกรดแลคติกแบบกะจากไฮโดรไลเสทของข้าวฟ่างหวานที่เติมยีสต์เอ็กซ์แทรกท์เป็นแหล่งอาหารเสริม

เติมยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 7 กรัมต่อลิตร ลงในไฮโดรไลเสทของข้าวฟ่างหวาน (จากรายงานการวิจัยครั้งที่ 1) นำไฮโดรไลเสทของข้าวฟ่างหวานมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปศึกษาการผลิตกรดแลคติกภายใต้สภาวะการเลี้ยงแบบกะ โดยถ่ายกล้ำเชื้อจากข้อ 3.1.2 (5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 และอัตราการกวน 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างในระหว่างการหมักเพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์ น้ำตาล (กลูโคส โซโลส และ อะราบิโนส) กรด (กรดแลคติก กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติก) เอทานอล ดังข้อ 3.3

3.6 การหมักกรดแลคติกแบบกะจากไฮโดรไลเสทของข้าวฟ่างหวานที่เติมกากเซลล์ยีสต์แห้งเป็นแหล่งอาหารเสริม

เติมกากเซลล์ยีสต์แห้งที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับปริมาณไนโตรเจนในยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 7, 14 และ 21 กรัมต่อลิตร ลงในไฮโดรไลเสทของข้าวฟ่างหวาน นำไฮโดรไลเสทของข้าวฟ่างหวานมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปหมักกรดแลคติกและเก็บตัวอย่างในระหว่างการหมักเพื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ ดังข้อ 3.3

3.7 การหมักกรดแลคติกแบบกะจากไฮโดรไลเสทของข้าวฟ่างหวานที่เติมรำข้าวเป็นแหล่งอาหารเสริม

เติมรำข้าวที่มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับปริมาณไนโตรเจนในยีสต์เอ็กซ์แทรกท์ 7, 14 และ 21 กรัมต่อลิตร ลงในไฮโดรไลเสทของข้าวฟ่างหวาน นำไฮโดรไลเสทของข้าวฟ่างหวานมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.0 ก่อนนำไปฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปหมักกรดแลคติกและเก็บตัวอย่างในระหว่างการหมักเพื่อวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ดังข้อ 3.3