บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย ผู้วิจัยได้ดำเนินการตามหัวข้อต่อไปนี้

3.1 วัตถุดิบ เชื้อจุลินทรีย์ วัสดุอุปกรณ์

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย

3.3 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัย

3.1 วัตถุดิบ เชื้อจุลินทรีย์ วัสดุอุปกรณ์ในการวิจัย

3.1.1 วัตถุดิบที่ใช้ในงานวิจัย

เห็ดที่ใช้ในการวิจัย จำนวน 8 ชนิด ประกอบด้วย เห็ดหอม (*Lentinula edodes*) เห็ดนางรม (*Pleurotus ostreatus*) เห็ดขอนขาว (*Lentinus squarrosulus*) เห็ดฟาง (*Volvariella volvace*) เห็ดนางฟ้า (*Pleurotus sajor-caju*) เห็ดเข็มทอง (*Flamulina velutipes*) เห็ดบด (*Lentinus polychrous*) เห็ดนางรมหลวง (*Pleurotus eringii*) ตัวอย่งเห็ดทั้งหมดได้จากตลาดสดเทศบาล และซุปเปอร์มาเกต เมืองมหาสารคาม

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

ตัวอย่างแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาประกอบด้วย และเชื้อโพรไบโอติคแบคทีเรีย (Lactic Acid Bacteria; LAB) จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus acidophilus* La-5 และ *Bifidobacterium lactis* BL-04) เชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร กลุ่ม Enterobacteriaceae คือ *Escherichia coli* ได้จากห้องปฏิบัติการของ ผศ.ดร.ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.1.3 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.3.1 เครื่องวิเคราะห์โครมาโทกราฟีเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) HPLC- PDA รุ่น 20A Series ของบริษัท Shimadsu

3.1.3.2 เครื่องวิเคราะห์ Truspec CHNO/S ของบริษัท Leco, Thailand

3.1.3.3 เครื่องวิเคราะห์ LECO-Dry รุ่น TFE-2000 ของบริษัท Leco, Thailand

3.1.3.4 เครื่องวิเคราะห์ความชื้นอินฟาเรด รุ่น HB43-S Halogen ของบริษัท Mettler Toledo

3.1.3.5 เครื่องกลั่นระเหยสุญญากาศ (Rotary vacuum evaporator) รุ่น Buchi ของบริษัท Syncore

3.1.3.6 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Japan

3.1.3.7 ตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) Telstar/AV-30/70 ของบริษัท Lab Focus, Spain

3.1.3.8 ตู้บ่มเชื้อ (CO_2 Incubator) ของบริษัท Contherm Scientific

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.2.1 สารมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมด 15 ชนิด ประกอบด้วย เบต้า-กลูแคน (β-glucan) ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructo-oligosaccharide, FOS) สตาชีโอส (Stachyose)ราฟีโนส (D(-)Raffinose) ไซโลส (D(-)xylose) ซูโครส (D(-)Sucrose) มอลโทส (D(-)Maltose) แลคโทส (D(-)Lactose) กลูโคส (D(-)Glucose) ทรีฮาโลส (Trehalose) กาแลคโตส (D(-)galactose) แรมโนส (D(-)Rhamnose) แมนโนส (Mannose) ฟรุกโตส (Fructose) อะราบิโนส (D(-)Arabinose) ไมโอ-ไอนอซิทอล (myo-inositol) แมนนิทอล (D(-)manitol) ซอบิทอล (D(-)Sorbitol) ของบริษัท Sigma-Aldrich

3.1.2.2 สารมาตรฐานกรดทั้งหมด 7 ชนิด ประกอบด้วย กรดอะซิติค (Acetic acid) 99% กรดแลคติค (Lactic acid) 99% กรดโพรพิโอนิค (propionic) acid 99% กรดเอน-วาเลริค (n-valeric acid) 99% กรดไอโซ-วาเลริค (Iso-valeric acid) 99% กรดบิวทีริค (Butyric acid) 99% กรดไอโซ-บิวทีริค (Iso-butyric acid) 99% ของบริษัท Sigma-Aldrich

3.1.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วย Broth MRS, Agar MRS, Nutrient broth (NB) และ Nutrient agar (NA) (Criterion, USA)

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1 การเตรียมตัวอย่าง

3.2.1.1 เตรียมตัวอย่างวัตถุดิบ โดยนำตัวอย่างเห็ดทั้งหมดมาทำความสะอาดโดยการล้างและผึ่งลมให้สะเด็ดน้ำ ฉีกตัวอย่างเห็ดเป็นชิ้นๆ ก่อนนำไปอบแห้งด้วยตู้อบ Hot air oven ที่อุณหภูมิ 60 ^{o}C (จนเหลือปริมาณความชื้นต่ำกว่า 5%) จากนั้นนำไปปั่นให้ละเอียดโดยเครื่อง Waring Blender ร่อนผ่านตะแกรงอะลูมิเนียมขนาด (sieve) 200 mesh

3.2.1.2 การสกัดสารสกัดที่ละลายน้ำจากเห็ด ดัดแปลงจากวิธีการของ Hu *et al*. (2008) ชั่งผงเห็ด 25 g เติมน้ำกลั่นปริมาณ 500 ml นำไปให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 ^{o}C นาน 2 ชั่วโมง นำสารสกัดที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 rpm นาน 15 min กรองโดยผ่านกระดาษกรอง Whatman No. 4 นำสารที่กรองได้ไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่อง Evaporator ที่อุณหภูมิ 40 ^{o}C จากนั้นนำไปทำให้

แห้งที่อุณหภูมิ 50 °C ในตู้อบ Hot Air Oven เก็บตัวอย่างสารสกัดในภาชนะกันความชื้น เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นและองค์ประกอบทางเคมีของเห็ด

3.2.2.1 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของเห็ด

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น (moisture content) ของตัวอย่างเห็ด ตามวิธี AOAC (2000) โดยนำเห็ดสด ที่ทราบน้ำหนักที่แน่นอนไปอบที่อุณหภูมิ 105 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักหลังอบ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ จากนั้นคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์ความชื้น โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักเห็ดที่หายไปหลังอบ}}{\text{น้ำหนักเห็ดสดก่อนอบ}} \times 100$$

3.2.2.2 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนหยาบ (crude protein) เป็นการวิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนจากตัวอย่างผงเห็ด วิเคราะห์อัตโนมัติด้วยเครื่อง Truspec CHN ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ แล้วคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยคำนวณจาก

$$\text{crude protein} = \%\ N \times 6.25$$

หมายเหตุ % N หมายถึง ร้อยละของไนโตรเจนทั้งหมด

6.25 หมายถึง ค่าคงที่ขององค์ประกอบโปรตีน

3.2.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณเถ้า (ash) ตามวิธี AOAC (2000) โดยนำเห็ดสดไปชั่งน้ำหนักตัวอย่างทั้งก่อนอบและหลังอบเพื่อหาน้ำหนักที่แน่น จากนั้นทำการเผาให้เป็นเถ้าที่อุณหภูมิ 550 °C คำนวณหาค่าปริมาณเถ้า ทำการทดลอง 3 ซ้ำโดยคำนวณจาก

$$\text{ปริมาณเถ้า (\%)} = \frac{\text{น้ำหนักเถ้า}}{\text{น้ำหนักเห็ดก่อนอบ}} \times 100$$

3.2.2.4 การวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ด้วยเทคนิค supercritical fluid extraction (SFE) คือการใช้สารในสภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันเหนือจุดวิกฤต ซึ่งมีคุณสมบัติในการซึมผ่านของแข็งได้เหมือนแก๊ส และสามารถละลายสารได้เหมือนของเหลว ทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LECO-Dry ใช้

เวลา 20-45 min/ sample (Winkler and Rennick, 2007) เพื่อตรวจสอบปริมาณไขมัน โดยเครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (Total Carbohydrate) ตามวิธีของ Heleno *et al.*, (2009) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยคำนวณจาก

ปริมาณคาร์โบไฮเดรต = 100 – (%ความชื้น+%โปรตีน+%ไขมัน+%เถ้า)

3.2.2.6 การวิเคราะห์ปริมาณความชื้นของเห็ด

วิเคราะห์ปริมาณความชื้น (moisture analyzer) ของตัวอย่างผงเห็ด วิเคราะห์อัตโนมัติด้วยเครื่องวัดความชื้นอินฟาเรด ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.2.7 การวิเคราะห์ค่าพลังงาน Energy (Kcal) ตามวิธีของ Heleno *et al.,* (2009) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยคำนวณจาก

พลังงาน Energy (Kcal) = 4 x (%โปรตีน + %คาร์โบไฮเดรต) + 9 x (%ไขมัน)

3.2.3 วิเคราะห์องค์ประกอบธาตุของเห็ด

องค์ประกอบธาตุของเห็ด ได้แก่ คาร์บอน (carbon) ไฮโดรเจน (hydrogen) ไนโตรเจน (nitrogen) และซัลเฟอร์ (sulfur) วิเคราะห์องค์ประกอบธาตุของเห็ด จากตัวอย่างผงเห็ด วิเคราะห์อัตโนมัติด้วยเครื่อง Truspec CHNO/S ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.4 การหาปริมาณ Yeid ของสกัดเห็ด

ปริมาณผลผลิตสุทธิที่ได้จากกระบวนการสกัดเห็ด คำนวณอยู่ในรูปของร้อยละโดยคิดจากน้ำหนักสารที่สกัดได้หลังจากการทำแห้งต่อน้ำหนักแห้งเริ่มต้นของผงเห็ด (Yim *et al*., 2009) คำนวณจากสูตร

$$\text{Extract Yeid (\%)} = \frac{\text{Weight}_{\text{dry weight of mushroom extracted}}}{\text{Weight}_{\text{dry weight before mushroom extracted}}} \times 100\%$$

โดย $\text{Weight}_{\text{dry weight of mushroom extracted}}$ = น้ำหนักสารที่สกัดได้หลังจากการทำแห้ง

$\text{Weight}_{\text{dry weight before mushroom extracted}}$ = น้ำหนักแห้งเริ่มต้นของผงเห็ด

3.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและสารพรีไบโอติคของสารสกัดจากเห็ด

3.2.5.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total soluble sugar) โดยวิธี Total sugar assay (พันธ์ระวี หมวดศรี, 2551)

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของสารสกัดจากเห็ด คือ องค์ประกอบทั้งหมดที่เป็นคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ โมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด มีวิธีการดังนี้ นำสารสกัดเห็ดแต่ละชนิด จากข้อ 3.2.2 ชนิดละ 1 g ละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml ในหลอดทดลอง ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C ดูดสารละลายมา 200 µl ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วเติม Orcinal-sulphuric acid (ภาคผนวก ค) ปริมาตร 800 µl เขย่าให้เข้ากัน นำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 ^{o}C เป็นเวลา 15 min และทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว นำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 nm โดยใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.5.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) โดยวิธี Somogyi-Nelson (Somogyi and Nelson, 1952)

มีวิธีการวิเคราะห์ดังนี้ เตรียมสารสกัดเห็ดแต่ละชนิด จากข้อ 3.2.2 ให้มีความเข้มข้น 0.05% w/v แล้วดูดสารละลายปริมาตร 0.5 ml ในหลอดทดลอง เติมสารผสมระหว่าง Somogyi I (ภาคผนวก ง) และ Somogyi II (ภาคผนวก ง) ในอัตรา 4:1 ปริมาตร 1 ml เขย่าให้สารละลายผสมกัน จากนั้นนำไปให้ความร้อนด้วยอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 ^{o}C เป็นเวลา 10 min ทำให้เย็นแล้วเติม Nelson 1 ml (ภาคผนวก ง) ผสมให้เข้ากัน เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm เปรียบเทียบกับ Blank ซึ่งใช้น้ำกลั่น และใช้สารละลายกลูโคสเป็นสารละลายมาตรฐาน ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.5.3 การคำนวณปริมาณสารพรีไบโอติคของสารสกัดจากเห็ด

วิธีการหาปริมาณของสารพรีไบโอติคอย่างหยาบ (crude prebiotic) โดยการคำนวณนี้เป็นการหาปริมาณพรีไบโอติคที่ถือว่าเป็นปริมาณน้ำตาลที่ไม่ถูกรีดิวซ์ (non-reducing sugar) ซึ่งหมายถึง น้ำตาลที่มีโมเลกุลใหญ่ เช่น กลุ่มโอลิโกแซคคาไรด์ ปริมาณสารพรีไบโอติคอย่างหยาบ (crude prebiotic) คำนวณจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total soluble sugar) ลบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) (พันธ์ระวี หมวดศรี, 2551) ดังสมการ

สารพรีไบโอติคอย่างหยาบ = ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด – ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

3.2.5.4 การวิเคราะห์ชนิดและปริมาณน้ำตาลของสารสกัดจากเห็ด ด้วยเครื่อง HPLC

เตรียมตัวอย่างสารสกัดเห็ดแต่ละชนิด จากข้อ 3.2.2 ให้มีความเข้มข้น 2% (w/v) ผสมบน vortex mixer ให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วกรองตัวอย่างผ่านตัวกรอง ขนาด 0.2 μm เติมลงในขวดตัวอย่าง (vial) ปริมาตร 2 ml นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของน้ำตาลในสารสกัดจากเห็ด โดยใช้เครื่อง HPLC ดัดแปลงจากวิธีของ Guide to Aminex HPLC Columns (BIO-RAD, USA) (2011) ใช้เครื่อง HPLC (Shimadzu Cooperation Analysis & Measuring Instruments Division Kyoto, Japan) ระบบ Pumping system ; LC-20AD Series และ Auto injector system; SIL-20A series ใช้ Refractive Index Detector; RID-10A Series Column; Bio-Rad (Richmond, CA) HPX-87P, 300 mm x 7.8 mm with Bio-Rad micro-guard cartridges (30 x 4.6 mm) ที่อุณหภูมิ 85 ^{o}C ปริมาตรที่ฉีด 20 μl ใช้เฟสเคลื่อนที่เป็นน้ำ ที่อัตราการไหล 0.6 ml/min วิเคราะห์ชนิดและคำนวณปริมาณน้ำตาลของสารสกัดที่ได้ โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานน้ำตาล ดังนี้ β-glucan, FOS, stachyose, raffinose, sucrose, maltose, lactose, glucose, xylose, galactose, arabinose, fructose, myo-inositol, manitol และ sorbitol ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.5 การทดสอบประสิทธิภาพของสารสกัดต่อการเป็นพรีไบโอติค

3.2.5.1 การเตรียมเชื้อทดลอง

เตรียมเชื้อโพรไบโอติคทดสอบ 2 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *L. acidophilus* La-5 และ *B. lactis* BL-04 โดยถ่ายเชื้อทดสอบที่เก็บไว้ใน Glycerol เข้มข้น 20 % (v/v) ที่อุณหภูมิ -40 ^{o}C ในปริมาณ 1 % (v/v) ลงในอาหาร สำหรับ *L. acidophilus* La-5 ใช้อาหาร MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ออกซิเจน (5% CO_2) ส่วน *B. lactis* BL-04 เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มใน Anarobic jar ใช้ Gaspack (Merch, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อในระบบทางเดินอาหารที่ใช้ทดสอบคือ *E. coli* เลี้ยงในอาหาร NB บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 18–24 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้ออย่างน้อย 2 ครั้ง ก่อนนำไปทดลอง

3.2.5.2 การศึกษาการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติคและการลดลงของค่า pH

การศึกษาการส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติค ดัดแปลงวิธีจาก Synytsya *et al*., 2009 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth สูตรดัดแปลงโดยเติมสารสกัดจากเห็ด 2% แทนน้ำตาลกลูโครส ในสูตรพื้นฐาน (ใช้อาหาร MRS สูตรพื้นฐานเป็นตัวอย่างควบคุม, ดังภาคผนวก. ก) เติมเชื้อโพรไบโอติคทั้ง 2 สายพันธุ์ ปริมาณเชื้อ 2 % (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามสภาวะที่เหมาะสม ดังข้อ 3.2.5.1 เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ตามลำดับ ตรวจวัดการเจริญของแบคทีเรีย โดยการวัดค่าดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 620 nm และวัดการลดลงของค่าพีเอช ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.5.3 การทดสอบค่าดัชนีการเป็นพรีไบโอติค (Prebiotic Index, PI)

การทดสอบดัชนีการเป็นพรีไบโอติค เป็นการศึกษาความสามารถของสารสกัดจากเห็ดต่อการส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติคแบคทีเรีย และยับยั้งเชื้อก่อโรคในลำไส้ ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Huebner *et al*. (2008)

การศึกษาการเจริญของเชื้อโพรไบโอติค ทั้ง 2 สายพันธุ์ ทำตามข้อ 3.2.5.2 สำหรับเชื้อ *E. coli* ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับการส่งเสริมการเจริญของเชื้อโพรไบโอติค โดยเลี้ยงในอาหาร NB ที่เติมสารสกัดจากเห็ด 2% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NB สูตรดัดแปลง (ใช้อาหาร NB สูตรพื้นฐาน + 2% glucose เป็นตัวอย่างควบคุม, ดังภาคผนวก ก) วัดค่า OD ที่ชั่วโมงที่ 0 และ 24 ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ นำผลที่ได้มาคำนวณค่า PI ตามสูตร

$$\text{Prebiotic Index} = \left[\frac{\text{(probiotic log OD on the prebiotic at 24 h- probiotic log OD on the prebiotic at 0 h)}}{\text{(probiotic log OD on glucose at 24 h- probiotic log OD on glucose at 0 h)}}\right] - \left[\frac{\text{(enteric log OD on the prebiotic at 24 h- enteric log OD on the prebiotic at 0 h)}}{\text{(enteric log OD on glucose at 24 h- enteric log OD on glucose at 0 h)}}\right]$$

3.2.5.4 การวิเคราะห์การผลิตกรดไขมันสายสั้น

เตรียมตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเติมเชื้อโพรไบโอติค ทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการทดลองที่ 3.2.5.2 นำมาปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 min กรองตัวอย่างผ่านตัวกรอง (nylon membrane filter) ขนาด 0.2 µm ใส่ในขวด vial นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณ SCFA ตามวิธีของ ปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์ (2551) โดยใช้ HPLC ยี่ห้อ Shimazu, Instument Divition Kyoto, Japan ระบบ Pumping system; SIL-10AD Series พร้อมเครื่องตรวจวัด SPD-M20A Diode Array Detector, Auto injector system, คอลัมน์ C18 ขนาด 2.5 x 150 mm, ใช้ 0.05% Sulfuric acid (HPLC grade) เป็นเฟสเคลื่อนที่ ความยาวคลื่น 210 nm อัตราการไหล 1.0 ml/ min ปริมาณตัวอย่างที่ฉีด 20 µl คำนวณปริมาณกรดไขมันสายสั้น โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานกรดดังนี้ acetic acid, lactic acid, propionic acid, n-valeric acid, iso-valeric acid, butyric acid และ iso-butyric acid ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.5.5 การศึกษาใช้น้ำตาลของสารสกัดจากเห็ดโดยเชื้อโพรไบโอติคแบคทีเรีย

เตรียมตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเติมเชื้อโพรไบโอติค ทั้ง 2 สายพันธุ์ จากการทดลองที่ 3.2.5.2 นำมาปั่นเหวี่ยงที่ ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 min กรองตัวอย่างผ่านตัวกรอง (nylon membrane filter) ขนาด 0.2 µm ใส่ในขวด vial นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลหลังการเจริญของเชื้อโพรไบโอติคแบคทีเรีย โดยใช้เครื่อง HPLC ดัดแปลงจากวิธีของ Guide

to Aminex HPLC Columns (BIO-RAD, USA) (2011) ใช้เครื่อง HPLC (Shimadzu Cooperation Analysis & Measuring Instruments Division Kyoto, Japan) ระบบ Pumping system ; LC-20AD Series และ Auto injector system; SIL-20A series ใช้ Refractive Index Detector; RID-10A Series Column; Bio-Rad (Richmond, CA) HPX-87C, 300 mm x 7.8 mm with Bio-Rad micro-guard cartridges (30 x 4.6 mm), Water (HPLC grade) ที่อุณหภูมิ 85 ^{o}C ปริมาตรที่ฉีด 20 µl ที่อัตราการไหล 0.6 ml/ min วิเคราะห์ชนิดและคำนวณปริมาณน้ำตาลของสารสกัดที่ได้ โดยการเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานน้ำตาล ทั้งนี้น้ำตาลมาตรฐานที่ใช้วิเคราะห์หาในขั้นตอนนี้ ได้จากการผลทดลองข้อ 3.2.5.4 ซึ่งมีการตรวจพบในสารสกัดจากเห็ด และน้ำตาล trehalose และน้ำตาล mannose ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีรายงานการตรวจพบในเห็ด (Heleno *et al.,* 2009) ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3 สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูลในงานวิจัย

ในการวิจัยเชิงทดลอง (Experimental Research) โดยใช้หลักสถิติวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว One-way Analysis of Variance) โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.5 และเปรียบเทียบความแตกต่างข้อมูลโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test (DMRT) แต่ละการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ