

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุและอุปกรณ์

1. ขวดแก้วพร้อมฝาปริมาตร 200 ml
2. เครื่องเขย่า
3. นมยูเอชทีชนิดจืด
4. เครื่องวัดพีเอช
5. เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง
6. ตู้บ่มเชื้อ(incubator)
7. หม้อนึ่งความดัน(Autoclave)
8. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)
9. ขวดแก้วฝาเกลียว (Schott Duran)
10. ปิเปตแบบอัตโนมัติขนาด 100 μ l, 1000 μ l พร้อม Tip
11. จานเพาะเชื้อ
12. เครื่องนับโคโลนี
13. เครื่อง Freeze dryer ; lyophilizer
14. เม็ดคีเฟอร์ (ได้รับความอนุเคราะห์จาก อ.มาลัยพร ดวงบาล)
15. เครื่อง Freezer ควมคุมอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Rose bengal agar
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ M-17
4. สารป้องกันความเย็น ได้แก่ 10% ซูโครส, 10 % หางนมผง, 1% กลีเซอรอล
5. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน
6. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 N

วิธีการทดลอง

1. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเมดคิเฟอร์

การศึกษานี้จะศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเมดคิเฟอร์จะศึกษาผลของความเร็วยรอบในการเขย่าและผลของการเขย่า ไม่เขย่า การเลี้ยงในสถานะที่มี O_2 และไม่มี O_2

1.1 ผลของความเร็วยรอบในการเขย่าต่อการเจริญของเมดคิเฟอร์

ทำการแปรความเร็วยรอบในการเขย่าโดยแบ่งเป็น 40, 80, 120, 160, 200 rpm โดยใช้สัดส่วนของเมดคิเฟอร์ 1 g ต่อน้ำนมยูเอชที 100 ml ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองโดยนำขวดที่หมักมากรองแยกเมดคิเฟอร์ออกมาแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้สะเด็ดน้ำ นำไปชั่งด้วยเครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง บันทึกผลการทดลอง

1.2 ผลของการเขย่า ไม่เขย่า การเลี้ยงในสถานะที่มี O_2 และไม่มี O_2

ทำการทดลองโดยใช้น้ำนมยูเอชทีเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้เมดคิเฟอร์ปริมาณ 1 กรัมต่อน้ำนมยูเอชที 100 ml โดยบรรจุในขวดขนาด 250 ml จำนวน 8 ใบ (2ซ้ำ) ซึ่ง 4 ใบ คลุมด้วยผ้าขาวบาง และอีก 4 ใบ ปิดฝาสนิท จากนั้นนำขวดที่ปิดฝาและเปิดฝาลงละ 2 ขวดไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm และนำขวดอีก 4 ใบ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองโดยนำภาชนะทั้ง 8 ขวดมากรองแยกเอาเมดคิเฟอร์ออกมาแล้วล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งไว้ให้แห้ง และบันทึกผลการทดลอง

2. การศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตคิเฟอร์ผงด้วยกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็งมีขั้นตอนดังนี้

ในการทดลองจะใช้น้ำนมยูเอชทีชนิดจืดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและใช้เมดคิเฟอร์ปริมาณ 10 % (w/v) ต่อน้ำนมยูเอชที 100 ml ใส่ลงในภาชนะขวดแก้วปิดฝาปริมาตร 200 ml จากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 200 rpm ที่อุณหภูมิห้องจำนวน 6 ใบ ซึ่งเขย่าเป็นเวลา 12 ชั่วโมง จำนวน 3 ใบ และ 24 ชั่วโมง จำนวน 3 ใบ ตามลำดับ ตรวจสอบผลการทดลองโดยนำภาชนะทุกใบมาทำการกรองแยกเอาเมดคิเฟอร์ออกด้วยตะแกรงพลาสติกจากนั้นนำส่วนที่กรองได้มาวิเคราะห์ผลดังต่อไปนี้ (วิเคราะห์หน่วยทดลองละ 3 ซ้ำ)

คุณภาพทางกายภาพ (Physical qualities) :

- ค่าความชื้นหนืด โดยใช้เครื่องวัดความชื้นหนืด

คุณภาพทางเคมี (Chemical qualities) :

- ปริมาณกรดทั้งหมดที่สามารถไตเตรตได้ (Total titratable) เทียบเป็นกรดแลกติก

ตามวิธีของAOAC (1995)

- ค่าพีเอชโดยใช้พีเอชมิเตอร์(pH-meter)

คุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา (Microbiological qualities) :

- ใช้วิธีเพลทเคานท์แบบ Spread plate นับจำนวนเชื้อ *Lactobacilli* ทั้งหมด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง
- ใช้วิธีเพลทเคานท์แบบ Spread plate นับจำนวนเชื้อ *Lactococci* ทั้งหมด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ M-17 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง
- ใช้วิธีเพลทเคานท์แบบ Spread plate นับจำนวนเชื้อ Yeasts ทั้งหมด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Rose bengal agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง

3. ศึกษาประสิทธิภาพสารป้องกันความเย็น แต่ละชนิดต่ออัตราการรอดชีวิตของแลคติกแอซิดแบคทีเรียและยีสต์ จากคีเฟอร์ผงที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

3.1 นำนมหมักที่ได้จากการหมัก 12 และ 24 ชั่วโมง แบ่งออกเป็น 4 ส่วนจำแนกตามชนิดของสารป้องกันความเย็น ได้แก่ 10% หางนมผง, 10% ซูโครส, 1% กลีเซอรอล และชุดควบคุม โดยชั่งนมหมัก 1 กรัมต่อสารป้องกันความเย็น 4 กรัม บรรจุในภาชนะสำหรับเข้าเครื่อง Freeze dryer

3.2 นำนมหมักคีเฟอร์ที่ผสมสารป้องกันความเย็น แต่ละชนิดเข้าเครื่อง Freezer ที่ -30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 นำนมหมักคีเฟอร์ที่แช่เยือกแข็งมาทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze dryer

3.4 นำคีเฟอร์ผงที่ได้เก็บไว้ในภาชนะที่ป้องกันการซึมผ่านของอากาศเพื่อเตรียมทำการทดลองต่อไป

3.5 นำคีเฟอร์ผงที่ได้มาทำการทดสอบประสิทธิภาพโดยชั่งคีเฟอร์ผง 1 กรัม เติมน้ำนม 100 มิลลิลิตร หมักทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลการทดลองดังต่อไปนี้ (วิเคราะห์หน่วยทดลองละ 3 ซ้ำ)

คุณภาพทางกายภาพ (Physical qualities) :

- ค่าความชื้นหนืด โดยใช้เครื่องวัดความชื้นหนืด

คุณภาพทางเคมี (Chemical qualities) :

- ปริมาณกรดทั้งหมดที่สามารถไตเตรตได้ (Total titratable) เทียบเป็นกรดแลคติกตามวิธีของ AOAC (1995)

- ค่าพีเอชโดยใช้พีเอชมิเตอร์ (pH-meter)

คุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา (Microbiological qualities) :

- ใช้วิธีเพลทเคานท์แบบ Spread plate นับจำนวนเชื้อ *Lactobacilli* ทั้งหมด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง

- ใช้วิธีเพลทเคานท์แบบ Spread plate นับจำนวนเชื้อ *Lactococci* ทั้งหมด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ M-17 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง
- ใช้วิธีเพลทเคานท์แบบ Spread plate นับจำนวนเชื้อ Yeasts ทั้งหมด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Rose bengal agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง

3.6 คำนวณเปอร์เซ็นต์อัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์

4. เปรียบเทียบความสามารถในการผลิตนมหมักคีเฟอร์ระหว่างเมดคีเฟอร์กับคีเฟอร์ผงที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

- 4.1 ชั่งเมดคีเฟอร์ 10 กรัม ต่อน้ำนมยูเอชทีรสจืด 100 มิลลิลิตร ลงในภาชนะขวดแก้ว ปริมาตร 200 ml
- 4.2 ชั่งเมดคีเฟอร์ 10 กรัม ใส่ในภาชนะสำหรับนำเข้าเครื่อง freeze dryer
- 4.3 นำตัวอย่างข้อ 3.2 เข้าเครื่อง Freezer ที่ -30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 4.4 นำตัวอย่างข้อ 3.3 เข้าเครื่อง Freeze dryer
- 4.5 นำตัวอย่างที่ได้จากการทำแห้งเยือกแข็งมาเติมน้ำนมยูเอชทีรสจืด 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะขวดแก้วปริมาตร 200 ml
- 4.6 นำผลที่ได้จากข้อ 3.1 และ 3.5 มาวิเคราะห์ผลดังต่อไปนี้ (วิเคราะห์หน่วยทดลองละ 3 ซ้ำ)

คุณภาพทางกายภาพ (Physical qualities) :

- ค่าความชื้นหนืด โดยใช้เครื่องวัดความชื้นหนืด

คุณภาพทางเคมี (Chemical qualities) :

- ปริมาณกรดทั้งหมดที่สามารถไตเตรตได้ (Total titratable) เทียบเป็นกรดแลกติกตามวิธีของ AOAC (1995)

- ค่าพีเอชโดยใช้พีเอชมิเตอร์ (pH-meter)

คุณภาพทางด้านจุลชีววิทยา (Microbiological qualities) :

- ใช้วิธีเพลทเคานท์แบบ Spread plate นับจำนวนเชื้อ *Lactobacilli* ทั้งหมด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง
- ใช้วิธีเพลทเคานท์แบบ Spread plate นับจำนวนเชื้อ *Lactococci* ทั้งหมด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ M-17 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง
- ใช้วิธีเพลทเคานท์แบบ Spread plate นับจำนวนเชื้อ Yeasts ทั้งหมด โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Rose bengal agar บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 72 ชั่วโมง

การคำนวณหาระยะปรับตัวและอัตราการเจริญจำเพาะ

การคำนวณหาระยะปรับตัวและอัตราการเจริญจำเพาะ โดยใช้โปรแกรม DMFIT Toolbox ([http:// www.combase.cc](http://www.combase.cc))

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางด้านกายภาพ เคมีและจุลชีววิทยา ของนมหมักทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำผลมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยใช้แผนการทดสอบแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป เปรียบเทียบค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95