บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดของวัสดุเหลือทิ้ง

นำวัสดุเหลือทิ้งได้แก่ น้ำต้มกากถั่วเหลือง เวย์จากโรงงานผลิตชีส น้ำนึ่งปลาทูน่า กากน้ำตาล และของเสียจากโรงงานแป้งข้าวเจ้า มาวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ปริมาณโปรตีนโดยใช้วิธี Kjeldahl (AOAC, 1995) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี phenol-sulfuric acid (Dubois et al., 1956)

2.2 การทดสอบการผลิตสารยับยั้งจากเชื้อ Bacillus sp. BK9

เลี้ยงเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ที่ผลิตสารยับยั้งในอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB) ปริมตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 7 ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อมาปั่นตกตะกอนเซลล์ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที แล้วนำส่วนใสด้านบนมากรองผ่าน syringe filter ขนาด 0.2 ไมโครเมตร จากนั้นนำสารยับยั้งมาทดสอบการผลิตสารยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion (Barefoot and Klaenhammer, 1984)

2.3 การคัดเลือกชนิดของวัสดุเหลือทิ้งที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งของเชื้อ Bacillus sp. BK9

บ่มเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ในอาหารเหลว TSB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 -18 ชั่วโมง และนำมาปรับหัวเชื้อเริ่มต้นให้มีค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 ถ่ายเชื้อปริมาณ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากวัสดุเหลือทิ้ง ได้แก่ อาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง น้ำนึ่งปลาทูน่า เวย์ กากน้ำตาล น้ำล้างข้าวจากโรงงานผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยว (รอบที่ 1 และรอบที่ 2) และอาหาร TSB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 7.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาศึกษาการเจริญด้วยวิธีการ spread plate บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนี และวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร วัดค่า pH และวิเคราะห์หากิจกรรมของสารยับยั้ง หน่วยเป็น Arbitrary Unit (AU)/ml ด้วยวิธี critical dilution (Parente et al., 1995) โดยทำการเจือจาง

แบบ two fold dilution แล้วทำการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test โดยใช้โปรแกรม SPSS

2.4 การคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้ง

เตรียมหัวเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 เช่นเดียวกับข้อ 2.3 ถ่ายหัวเชื้อปริมาณ 1% ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปรับสูตรอาหารจากวัสดุเหลือทิ้งที่เลือกได้จากการทดลองข้อ 2.3 ให้มีปริมาณโปรตีนและน้ำตาลที่เหมาะสมเทียบเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมการเจริญและผลิตสารยับยั้งได้ดีที่สุด ได้แก่ อาหารสูตรน้ำนึ่งปลาทูน่าผสมเวย์ และอาหารสูตรน้ำนึ่งปลาทูน่าผสมกากน้ำตาล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 7.0 ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 , 24 , 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาศึกษาการเจริญด้วยวิธีการ spread plate บนอาหาร TSA วิเคราะห์หากิจกรรมของสารยับยั้งหน่วยเป็น Arbitrary Unit และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

2.5 การศึกษาปริมาณกากถั่วเหลืองและเวลาที่ใช้ในการต้มที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อ 1% ลงในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลืองที่เตรียมจากกากถั่วเหลืองน้ำหนักต่างกัน 3 ระดับ ได้แก่ 30, 50 และ 80 กรัมต่อลิตร และต้มที่เวลาต่างกัน 3 ระดับคือ 3, 5 และ 10 นาที โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ ทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24 และ 48 ชั่วโมง นำมาศึกษาการเจริญและกิจกรรมการยับยั้ง และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

2.6 ศึกษาการสร้างสารยับยั้งในอาหารกากถั่วเหลืองเปรียบเทียบกับอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง

ถ่ายหัวเชื้อ 1 % ลงในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลืองที่ใช้ความเข้มข้นและเวลาต้มที่เหมาะสมจากข้อ 2.5 และในอาหารกากถั่วเหลืองความเข้มข้นเท่ากันแต่ไม่แยกกากออก โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำมาหากิจกรรมการยับยั้ง

2.7 การศึกษา pH และ อุณหภูมิ ที่เหมาะสมเบื้องต้น

นำแหล่งอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งที่สุดจากการทดลองข้อ 2.5 มาแปรผันค่า pH 5.0, 7.0 และ 9.0 และอุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส โดยทำการทดลองซ้ำ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลโดยศึกษาการเจริญ การสร้างสารยับยั้ง และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

2.8 ศึกษาค่า pH อุณหภูมิ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นและอัตราการเขย่าที่เหมาะสมระดับฟลาสก์

จากผลการทดลองเบื้องต้นที่ได้ในข้อ 2.7 นำมาออกแบบการทดลองเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้ง โดยการออกแบบการทดลองแบบ Central Composite Design (CCD) และวิเคราะห์ผลกระทบของตัวแปรต่อค่าตอบสนองทางสถิติด้วยวิธีพื้นผิวตอบสนอง (Response surface Methodology (RSM) และการทำ contour plot โดยใช้โปรแกรม Design Expert® software (Version7.1.5) โดยกำหนดให้การเจริญและการสร้างสารยับยั้งเป็นค่าตอบสนอง (response value) และตัวแปรอิสระ (Independent factor; variable, x) มี 4 ปัจจัย และกำหนดค่าของทั้ง 4 ปัจจัยเป็น 3 ระดับ คือ -1, 0, +1 ในการทดลองครั้งแรกได้กำหนดค่าปัจจัย 3 ระดับคือ อุณหภูมิ ที่ 23, 30, 37 องศาเซลเซียส, อัตราการเขย่าที่ 150, 200, 250 รอบต่อนาที, pH เริ่มต้นของอาหาร 6, 7, 8 และปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 1, 2, 3 %v/v จากการออกแบบการทดลองจะได้จำนวนการทดลองทั้งหมด 29 run รวมทำซ้ำจุดกลาง 5 ซ้ำ (ตารางผลการทดลองที่ 7) และจากผลการทดลองพบว่ายังไม่ได้สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างสารยับยั้ง จึงได้ทำการทดลองซ้ำโดยเปลี่ยนระดับของตัวแปรที่วิเคราะห์แล้วว่ามีผลต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งได้แก่ อุณหภูมิและอัตราการเขย่า เป็น 3 ระดับ ได้แก่ คือ อุณหภูมิ 15,23,31 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่าเพื่อให้อากาศ 200, 250, 300 รอบต่อนาที ทำให้ได้จำนวนการทดลองทั้งหมด 13 run (ตารางผลการทดลองที่12) จากผลการทดลองทำการสร้างสมการแสดงความสัมพันธ์ของค่าตัวแปรและค่าตอบสนอง (quadratic polynomial regression equation) ที่ fit กับข้อมูลที่ได้จากการทดลอง

$$Y = b_0 + \sum_{i=1}^{k} b_i X_i + \sum_{i=1}^{k} b_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^{k} b_{ij} X_i X_j$$

โดยที่ Y คือค่าการคาดการณ์

k คือจำนวนปัจจัย (ในที่นี้คือ 4)

b_0 คือค่าสัมประสิทธิ์หรือค่าคงที่ (intercept)

b_i คือค่า linear coefficient

b_{ii} คือค่า quadratic หรือ squared coefficient

b_{ij} คือค่า interaction coefficient

Xi คือปัจจัยแต่ละปัจจัย ซึ่งสามารถหาได้จากสมการ

2.9 การศึกษาการเจริญและการสร้างสารยับยั้งในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อ *Bacillus* sp. BK9 ในอาหารเหลว TSB นาน 16 – 18 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่นแสงที่ 600 นาโนเมตรได้ค่าประมาณ 0.5 เติมหัวเชื้อ 1% ใส่ในอาหารน้ำต้มกากถั่วเหลือง (50 กรัมต่อลิตร ต้มนาน 10 นาที) ปริมาตร 1.5 ลิตร ในถังหมักขนาด 2 ลิตร (B. Braun รุ่น Biostat.B.) ดยปรับค่า pH และ ควบคุมอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองในข้อ 2.8 ควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 1 vvm และความเร็วรอบในการกวน 250 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญ และกิจกรรมการยับยั้ง (Au/ml) ด้วยวิธี critical dilution method (Parente et al., 1995)

2.10 การศึกษาการเจริญและการสร้างสารยับยั้งในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 2.9 แต่ทำการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้อาหารน้ำต้มกากถั่วเหลืองปริมาตร 3 ลิตร เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง นำมาวัดค่าการเจริญ จำนวนสปอร์ กิจกรรมการยับยั้ง (Au/ml) ปริมาณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้วิธี phenol-sulfuric acid (Dubois et al., 1956) และปริมาณโปรตีนโดยวิธี Kjeldahl (AOAC, 1995) การนับจำนวนสปอร์โดยนำตัวอย่างมาให้ความร้อนในอ่างน้ำอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จากนั้นทำการเจือจางให้เหมาะสมด้วย 0.85% NaCl แล้วนำมานับเชื้อโดยเทคนิค spread plate บนอาหาร TSA