

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

จุลินทรีย์ สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในอุตสาหกรรม
การผลิตนมเปรี้ยวและโยเกิร์ต ซึ่งได้มาจากศูนย์จุลินทรีย์ของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และ
เทคโนโลยีแห่งประเทศไทยมีดังนี้

- 1.1 *Lactobacillus acidophilus* TISTR450
- 1.2 *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR892
- 1.3 *Streptococcus lactis* TISTR457
- 1.4 *Streptococcus thermophilus* TISTR458

2. สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิจัยมี 2 ชนิดและบัฟเฟอร์ 1 ชนิด ซึ่งส่วนประกอบของอาหาร
เลี้ยงเชื้อและบัฟเฟอร์ทั้งหมดได้แสดงไว้ในภาคผนวก ก

อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

1. Spectrophotometer ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Lambda 2
2. Incubator Shaker ยี่ห้อ Innova™ รุ่น 4320
3. Incubator ยี่ห้อ Termaks รุ่น B8000
4. Hot air oven ยี่ห้อ Termaks รุ่น TS8000
5. Laminar air flow ยี่ห้อ Holten รุ่น HB 2472
6. Water Bath ยี่ห้อ Poly Science รุ่น 8306
7. Centrifuge ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น 5417C
8. Blender ยี่ห้อ Paloma
9. pH meter ยี่ห้อ Metrohm รุ่น 744
10. Deep freezer (-70°C) ยี่ห้อ Harris รุ่น SLT-13R-85R35

11. Freezer (-20°C) ยี่ห้อ Sunyo รุ่น MRP-1410-R

12. Mini Shaker ยี่ห้อ Vortex รุ่น MS-1

วิธีการวิจัย และขั้นตอนการวิจัย

1. วิธีการวิจัย

1.1 การเก็บเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ

แบคทีเรียกรดแลกติกทั้งหมดทำการเก็บไว้ที่ -70°C จากเชื้อตั้งต้นชนิดแช่แข็งแห้ง (lyophilized culture) เลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นผสมเชื้อที่เลี้ยงได้กับ glycerol 30 % ใส่ในหลอดทนความเย็น จากนั้นนำไปเก็บที่ -70°C เมื่อจะใช้งานดูดเชื้อจากหลอดทนความเย็นลงในอาหารแข็ง MRS ผิวน้ำเอียง บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อที่ 4°C เพื่อใช้เป็นสต็อกเชื้อสำหรับการวิจัย

1.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อเตรียมเชื้อตั้งต้น

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 200 ม.ล. ที่บรรจุในฟลasks ขนาด 500 ม.ล. เลี้ยงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 37°C ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ประมาณปริมาณเชื้อโดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อในอาหารที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600})

1.3 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวปริมาณ 200 ม.ล. ในฟลasks ขนาด 500 ม.ล. เลี้ยงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 37°C ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเชื้อทุก 2 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24

1.4 การวัดค่าการดูดกลืนแสง

เลี้ยงเชื้อในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิและเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 24 นำตัวอย่างที่เก็บได้วัดค่าการดูดกลืนแสงของจุลินทรีย์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

1.5 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง

ทำการเจือจางเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกใน phosphate buffer solution ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7.2 ที่ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-6} จุดเชื้อที่เจือจางแต่ละระดับหาค่าเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้อาหารแข็ง GYP โดยใช้ 2 วิธีการดังนี้

1.5.1 วิธี drop plate : ใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อที่เจือจางมา 10 ไมโครลิตร แล้วหยดลงบนอาหารแข็ง GYP ที่มีผิวหน้าอาหารแห้ง ทำตัวอย่างละ 2 ซ้ำในแต่ละความเจือจาง บ่มเชื้อที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.5.2 วิธี pour plate : ใช้ปิเปตดูดเชื้อที่เจือจางมา 1 ม.ล. เทอาหาร GYP ที่ยังไม่แข็งตัวอุณหภูมิประมาณ 50°C ลงในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้ออยู่ จากนั้นผสมเชื้อกับอาหารแข็ง GYP ที่ยังไม่แข็งตัวให้เข้ากัน รอจนอาหารแข็งตัวจึงคว่ำจานเพาะเชื้อแล้วบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

2. ขั้นตอนการวิจัย

2.1 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์จากการถ่ายเชื้อโดยใช้เชื้อตั้งต้น 2 % (v/v)

เตรียมเชื้อตามวิธีการวิจัยในข้อ 1.2 ในอาหารเหลว MRS เลี้ยงจนได้ OD_{600} ประมาณ 0.5 จากนั้นถ่ายเชื้อจากเชื้อตั้งต้น 2 % (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS และ GYP ปริมาตร 200 ม.ล. ในฟลasks ขนาด 500 ม.ล. บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการวัดค่า OD_{600} และค่า log ของเซลล์ที่มีชีวิต (log cfu/ml) กับเวลาทุก 4 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 48 นำผลการทดลองที่ได้มาสร้างกราฟระหว่างค่า OD_{600} และค่า log ของเซลล์ที่มีชีวิตกับเวลาเพื่อหาความสัมพันธ์ของค่า OD_{600} กับค่าเซลล์ที่มีชีวิตเทียบกับเวลา ข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้ในการพิจารณาเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื่อมีอัตราการเจริญที่ดีที่สุดเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับผสมกับน้ำที่ได้จากวัตถุดิบ

2.2 ศึกษาการเจริญของจุลินทรีย์จากการถ่ายเชื้อโดยใช้ห้วงถ่ายเชื้อ

ถ่ายเชื้อจากสต็อกเชื้อที่เก็บที่ -70°C มา 100 ไมโครลิตร มายังผิวหน้าอาหารแข็ง MRS แบบเอียง และใช้ห้วงถ่ายเชื้อขีดเชืบบนผิวอาหาร บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อที่ 4°C นำเชื้อที่เตรียมไว้ถ่ายเชื้อโดยใช้ห้วงถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว GYP และ MRS ปริมาตร 200 ม.ล. ซึ่งบรรจุในฟลasks ขนาด 500 ม.ล. เลี้ยงเชื้อและทำการวิเคราะห์ค่า OD_{600} และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตตามวิธีการในข้อ 1.3, 1.4 และ 1.5 ตามลำดับ นำผลที่ได้จากการดำเนินการวิจัยสร้างกราฟระหว่างค่า OD_{600} และค่า log ของเซลล์ที่มีชีวิตที่สัมพันธ์กับเวลาเพื่อหาความสัมพันธ์ของค่า OD_{600} กับค่าเซลล์

ที่มีชีวิตเทียบกับเวลา ข้อมูลที่ได้จะนำมาใช้ในการพิจารณาเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่เชื่อมีอัตราการเจริญสูงสุดเพื่อใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานสำหรับผสมกับน้ำที่ได้จากวัตถุดิบต่อไป

2.3 การศึกษาเปรียบเทียบผลการเจริญของจุลินทรีย์โดยวิธี drop plate และ pour plate

ดำเนินการทดลองโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว GYP และ MRS เลี้ยงเชื้อตามวิธีการวิจัยข้อ

1.3 และวัดการเจริญของเชื้อตามวิธีการวิจัยในข้อ 1.5.1 และ 1.5.2

2.4 การศึกษาสัดส่วนของน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4.1 การเตรียมน้ำวัตถุดิบ

2.4.1.1 น้ำเวย์

น้ำเวย์ที่ได้รับจากหน่วยผลิตภัณฑ์สัตว์ห้วยแก้วนำมาเก็บที่ -20°C เมื่อจะนำมาใช้ตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิ 4°C (ใช้เวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง) จะเห็นลักษณะเป็นของเหลวแยกจากตะกอน เอาเฉพาะเวย์ที่มีลักษณะใสมาใช้โดยใส่ในขวดปิดฝาหลวมให้ความร้อนวัดจากอุณหภูมิใจกลาง 70°C เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แยกตะกอนที่ได้จากการให้ความร้อนกรองผ่านชั้นผ้าหลวมๆ ประมาณ 1 เซนติเมตร และผ้าขาวบางทาบ 3-4 ชั้น นำของเหลวที่ได้ผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เหมาะสมกับแต่ละเชื้อ ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCl นำเชื้อที่ 110°C เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นเป็นเวลา 8-12 ชั่วโมง จากนั้นทำการฆ่าเชื้อซ้ำที่สภาวะเดิมอีกครั้งหนึ่ง

2.4.1.2 น้ามะพร้าว

น้ามะพร้าวได้รับจากโรงงานผลิตมะพร้าวผ่าซีกเพื่อส่งไปยังโรงงานผลิตกะทิเป็นน้ามะพร้าวแก่ที่รวบรวมจากมะพร้าวแต่ละผล ใช้ผ้าขาวบางทาบ 3-4 ชั้น กรองแยกกากที่มีขนาดใหญ่ออกเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวเก็บที่ -20°C เมื่อจะนำมาตั้งทิ้งไว้ให้ละลายที่อุณหภูมิ 4°C จนตกตะกอนออกมาจากส่วนใสที่ 4°C นำส่วนน้ำให้ความร้อนวัดจากอุณหภูมิใจกลาง 70°C 15 นาที โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ แยกตะกอนที่ได้จากการให้ความร้อนกรองผ่านชั้นผ้าหลวมๆ ประมาณ 1 เซนติเมตร และผ้าขาวบางทาบ 3-4 ชั้น นำเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวใสผสมอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เหมาะสมกับแต่ละเชื้อ ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCl

2.4.1.3 น้ำจากมะเขือเทศ

น้ำจากมะเขือเทศได้ทำการเตรียมเองในห้องปฏิบัติการจากมะเขือเทศสุกพันธุ์คาสเซอ ซึ่งวัดค่าของแข็งทั้งหมด ($^{\circ}\text{Brix}$) เท่ากับ 5 น้ำจากมะเขือเทศที่ได้จากการสกัดแยกกากออกจากน้ามะเขือเทศ ก่อนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บจากมะเขือเทศที่ 4°C เตรียมโดยการบดและ

ปั่นให้ละเอียดโดยใช้เครื่องปั่นที่ความเร็วรอบสูงสุด จากนั้นเติมมะเขือเทศที่ปั่นละเอียดลงในบีกเกอร์ ให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 90°C เป็นเวลา 1-2 นาที กรองแยกกากออกจากน้ำมะเขือเทศด้วยตะแกรงขนาด 35 เมช ซึ่งมีช่องว่างระหว่างช่องตะแกรง 0.005 เซนติเมตร จากนั้นชั่งค่าที่ได้ และผสมน้ำในอัตราส่วน 1:2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ให้ความร้อนวัดจากอุณหภูมิใจกลาง 80°C เป็นเวลา 5 นาที ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ และกรองผ่านชั้นผ้าสีหาวมๆ หน้าประมาณ 1 เซนติเมตร และผ้าขาวบางทาบ 3-4 ชั้น เก็บเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวใสที่ 4°C เมื่อจะใช้น้ำส่วนใสผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับแต่ละเชื้อ ปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1 N NaOH และ 1 N HCl

นำจากวัตถุดิบธรรมชาติทั้ง 3 ชนิด ได้นำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่เหมาะสมสำหรับแต่ละเชื้อโดยปรับสัดส่วนตามข้อ 2.4.2 แต่ละทริตเมนต์บรรจุ 200 ม.ล. ในฟลasks ขนาด 500 ม.ล. นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อ

2.4.2 การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติ

ถ่ายเชื้อที่เตรียมตามวิธีการวิจัยข้อ 1.2 ซึ่งวัดค่า OD_{600} ได้ประมาณ 1-1.5 ลงใน ฟลasks ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อในสัดส่วนต่างๆ (ตาราง 5) ทั้ง 7 ทริตเมนต์ โดยให้ความเข้มข้นของเชื้อ 10 % (v/v) เลี้ยงในเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ 37°C ที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที พร้อมกันทั้ง 7 ทริตเมนต์ เก็บตัวอย่างเชื้อทุก 2 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 และวัดการเจริญของเชื้อตามวิธีการวิจัยในข้อ 1.5.1

ตาราง 5 อัตราส่วนระหว่างน้ำวัตถุดิบ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทริตเมนต์	น้ำวัตถุดิบ (%)	อาหารเลี้ยงเชื้อ (%)
1	0	100
2	20	80
3	40	60
4	60	40
5	80	20
6	100	0
7	100+กลูโคส	0

หมายเหตุ : นำจากวัตถุดิบ 100%+กลูโคส โดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เข้าร่วมกับวัตถุดิบคือ 0.5 % สำหรับ GYP และ 2 % สำหรับ MRS

2.5 การวิเคราะห์ผลและกราฟแสดงผลการทดลอง

2.5.1 การวิเคราะห์ผลและกราฟแสดงผลจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่เลี้ยงในอาหารเหลว GYP และ MRS คำนวณผลการนับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (cfu/ml) และแปลงค่าเป็น log ของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่นับได้ (log cfu/ml) แสดงผลโดยใช้กราฟที่พล็อตข้อมูลระหว่างค่า log cfu/ml กับเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 24

2.5.2 การวิเคราะห์ผลและกราฟแสดงผลจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อผสมน้ำจากวัตถุดิบธรรมชาติ คำนวณผลการนับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและแปลงค่าเป็น log ในการแสดงผลแสดงโดยพล็อตกราฟระหว่างจำนวนแบคทีเรียที่เวลาต่างๆ เทียบกับจำนวนที่เวลาเริ่มต้นกับเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง ชั่วโมงที่ 24

$$\begin{aligned} \text{จำนวนแบคทีเรียที่เวลาหนึ่งๆ} &= \log N - N_0 \\ \text{เทียบกับจำนวนที่เวลาเริ่มต้น} &= \log [N/N_0] \end{aligned}$$

โดย N_0 คือจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในชั่วโมงที่ 0
 N คือจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่ชั่วโมงต่างๆ

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ.เชียงใหม่
2. ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ.เชียงใหม่