

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. จุลินทรีย์

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) สายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. I11 ที่คัดเลือกโดย วิชา พรหมเทพและสุภา ยศตะโคตร (2553)

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ

- 3.1 ตู้ปลอดเชื้อ
- 3.2 วอร์เท็กซ์มิกซ์เซอร์
- 3.3 หม้อนึ่งความดัน
- 3.4 ตู้บ่มเชื้อ
- 3.5 เครื่องเซนตริฟิวจ์

4. วิธีการทดลอง

4.1 ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหุ้มเซลล์ *Lactobacillus* sp. I11 ด้วยอัลจิเนตโดยการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนต

4.1.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการหุ้มเซลล์

ถ่ายแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus* sp. I11 จำนวน 1 โคโลนี ลงเลี้ยงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 5 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม ถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 500 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดียวกัน หลังจากนั้นทำการเก็บเซลล์โดยการเหวี่ยงแยกด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ 2 ครั้ง เพื่อกำจัดอาหารและสิ่งสกปรกที่หลงเหลืออยู่ ออกและแขวนลอยเซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก)

4.1.2. วิธีการหุ้มเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกด้วยโซเดียมอัลจิเนต

ผสมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 1 % ปริมาตร 40 มิลลิลิตรกับสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมไว้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำในน้ำมันปาล์มปริมาตร 250 มิลลิลิตร ซึ่งเติม Tween 80 ในอัตราส่วน 0.2 % ทำให้เป็นอิมัลชันด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็ว 400 รอบ/นาทีนาน 10 นาที หยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ทำเช่นเดียวกันนี้ โดยเปลี่ยนความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเป็น 2.0 และ

3.0 % และเก็บรวบรวมเม็ดแบคทีเรียแคลเซียมอัลจีเนต เพื่อวิเคราะห์ปริมาณการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกหุ้ม

4.1.3. การนับจำนวนเซลล์เพื่อวิเคราะห์ปริมาณการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ถูกหุ้ม

ซึ่งเม็ดแบคทีเรียน้ำหนัก 1 กรัม ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่านาน 30 นาที ทำการเจือจางก่อนถ่ายสารแขวนลอยของแบคทีเรียลงบนอาหารแข็ง MRS ซึ่งมีบรอมครีซอลเพอเฟลเป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียบนจานอาหารแข็งและคำนวณหาค่า CFU/g (ภาคผนวก ข)

4.2. เปรียบเทียบชนิดของแป้งที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นสื่อผสมการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze drying) และศึกษาอายุการเก็บรักษากล้าเชื้อผงหลังกระบวนการทำแห้ง

4.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการทำแห้งแบบแช่แข็ง

ถ่ายแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus* sp. I11 ที่ผ่านการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหุ้มเซลล์ด้วยอัลจีเนต คือ ใช้สารละลายโซเดียมอัลจีเนตความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ โดยทำตามหัวข้อ 4.1.1 จากนั้นนำมาผสมสารละลายโซเดียมอัลจีเนตเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 40 มิลลิลิตร แล้วเติมลงในน้ำมันปาล์มปริมาตร 250 มิลลิลิตรซึ่งเติม Tween 80 ในอัตราส่วน 0.2 % ทำให้เป็นอิมัลชันด้วยเครื่องปั่นผสมความเร็ว 400 รอบ/นาทีนาน 10 นาที หยดสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 500 มิลลิลิตรและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ซึ่งจะทำให้ได้ เม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus* sp. I11

4.2.2 วิธีการศึกษาการเปรียบเทียบการใช้สื่อผสมการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze drying) และการเก็บรักษากล้าเชื้อผงหลังกระบวนการทำแห้ง

ผสมเม็ดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus* sp. I11 กับแป้งที่เป็นสื่อผสม 3 ชนิดคือ แป้งข้าวเจ้า แป้งข้าวโพด แป้งมันสำปะหลังด้วยอัตราส่วนแป้งต่อเม็ดแบคทีเรีย 1 : 1 (w/w) ก่อนผ่านเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็ง โดยการอบแห้งนั้นจะสิ้นสุดลงเมื่อความดันของเครื่องทำแห้งแบบแช่แข็งคงที่เป็นเวลานาน 2 ชั่วโมงซึ่งจะใช้เวลาการอบแห้งอยู่ในช่วง 22 - 28 ชั่วโมง โดยใช้ Glycerol เป็น control จากนั้นบรรจุเม็ดเชื้อแห้งใส่ถุงอะลูมิเนียมฟอยล์ปิดผนึกปากถุงด้วยระบบสุญญากาศ แบ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างที่เก็บไว้ในวันที่ 0 7 15 30 45 60 และ 90

4.2.3 การวิเคราะห์การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก

ซึ่งเม็ดแบคทีเรีย 1 กรัมละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7 ปริมาตร 9 มิลลิลิตรเขย่านาน 30 นาที ที่ผ่านการใช้สื่อผสมและการทำแห้งแบบแช่แข็ง ดังข้อ 4.2.2 จากนั้นนำมาตรวจสอบการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยวิธี dilution plate count บนอาหารแข็ง MRS ที่มีบรอมครีซอลเพอเฟลเป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่รอดชีวิตบนจานอาหารแข็งและคำนวณหาค่า CFU/g (ภาคผนวก ข)