

## บทที่ 3

### ระเบียบวิธีวิจัย

#### 1. อุปกรณ์และสารเคมี

##### 1.1 สำหรับเตรียมน้ำหมักชีวภาพและต้นเชื้อสำหรับหมัก วัสดุอุปกรณ์

1. ถังพลาสติก polyethylene ชนิดใส
2. จุกยาง และสายยางสำหรับปิดเพื่อจำกัดอากาศ
3. ผ้าขาวบาง
4. หลอดทดลองและขวดรูปชมพู่
5. Petri dish
6. Pipette 1, 5 และ 10 ml
7. เข็มเขี่ยเชื้อ
8. Hot air oven
9. Incubator
10. UV spectrophotometer
11. Autoclave
12. Laminar flow
13. vortex
14. เครื่องปั่นพีช (chopper)

##### สารเคมีและอื่นๆ

1. Phosphate buffer
2. 0.5 Mc Far land standard
3. Normal saline
4. Bromcresol purple
5. Potassium metabisulphite
6. น้ำตาลอ้อยปั่น
7. น้ำสะอาด

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. de man Rogosa and Shape(MRS) broth
2. de man Rogosa and Shape(MRS) agar
3. Potato dextrose broth
4. Potato dextrose agar

### จุลินทรีย์

1. แบคทีเรีย *Lactobacillus casei*
2. จุลินทรีย์สำหรับทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพ

## 1.2 สำหรับวิเคราะห์

### วัสดุอุปกรณ์

1. ปีกเกอร์
2. กรวยกรอง
3. ทิมเบิลแก้ว (glass thimble)
4. ทิมเบิลกระดาษ (cellulose thimble)
5. กระดาษกรอง
6. เครื่องชั่งน้ำหนัก
7. Laminar air flow
8. Micropipette และ Tip ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
9. Incubator
10. Hot air oven
11. HPLC
12. pH meter
13. UV-Visible Spectrophotometer
14. Freeze-dryer
15. Soxhlet extraction apparatus
16. desiccator
17. Water bath
18. anaerobic jar
19. Bunsen burner

20. Membrane filter ขนาด 0.45 ไมโครเมตร กระบอกลีดยา และ microfilter
21. Slide และ cover slip

#### สารเคมี

1. 0.85% Normal saline
2. ethanol
3. น้ำกลั่น
4. gas pack
5. ชุดทดสอบทางชีวเคมีสำหรับจัดจำแนกจุลินทรีย์
6. Bradford reagent
7. Phosphoric acid
8. Sulfuric acid
9. ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
10. Potassium persulfate
11. Absolute ethanol
12. TPTZ (2,4,6-Tris (2-pyridyl)-s-triazine)
13. Iron (III) chloride
14. Iron (II) sulfate heptahydrate
15. Acetic acid
16. Sodium hydroxide
17. สารมาตรฐาน Genistein/Daidzein

#### อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man, Rogosa and Sharp broth (MRS broth)
2. Sabouraud dextrose agar (SDA)
3. Lauryl tryptose broth
4. Plate count agar (PCA)
5. Potato dextrose agar (PDA)
6. Beef extract
7. Yeast extract

8. Tryptic soy broth (TSB)
9. Nutrient agar (NA)
10. Mannitol salt phenol-red agar
11. Brilliant-green bile lactose broth 2% (BGLB broth 2%)
12. Brain Heart Infusion Broth (BHI)
13. *E. coli* broth (EC broth)
14. Eosin methylene blue agar (EMB agar)
15. Xylose lysine deoxycholate agar (XLD agar)
16. Salmonella-Shigella agar (SS agar)
17. MacConkey agar
18. Bacto agar
19. Fluid thioglycollate medium
20. Mueller Hinton Broth (MHB)
21. Cooked meat medium

#### สารเคมี

1. Bromcresol purple dye solution
2. Kovac's reagent
3. Diethyl ether
4. D(+)-Glucose
5. Sucrose
6. Lactose
7. L-Rhamnose
8. D(+)-Xylose
9. D(+)-Melibiose
10. L(+)-Arabinose
11. D-Mannitol
12. Raffinose
13. Phenolphthalein indicator
14. Bromcresol purple indicator
15. Phenol red indicator
16. Potassium hydrogen phosphate

17. Sodium chloride
18. Ammonium phosphate
19. Absolute ethanol
20. Phosphoric acid
21. API 50CHL
22. Gram stain reagents
23. เครื่องปั่นเหวี่ยง
24. กล้องจุลทรรศน์
25. ตู้แช่ -20 ถึง -80 องศาเซลเซียส
26. เครื่องชั่ง

## 2. วิธีการทดลอง

1. คัดเลือกวัตถุดิบถั่วเหลืองสายพันธุ์ต่างๆ เตรียมจุลินทรีย์เพื่อเป็นต้นเชื้อสำหรับใช้ในการจำลองการผลิตน้ำถั่วเหลืองหมัก และจำลองการผลิตน้ำถั่วเหลืองและน้ำถั่วเหลืองหมัก

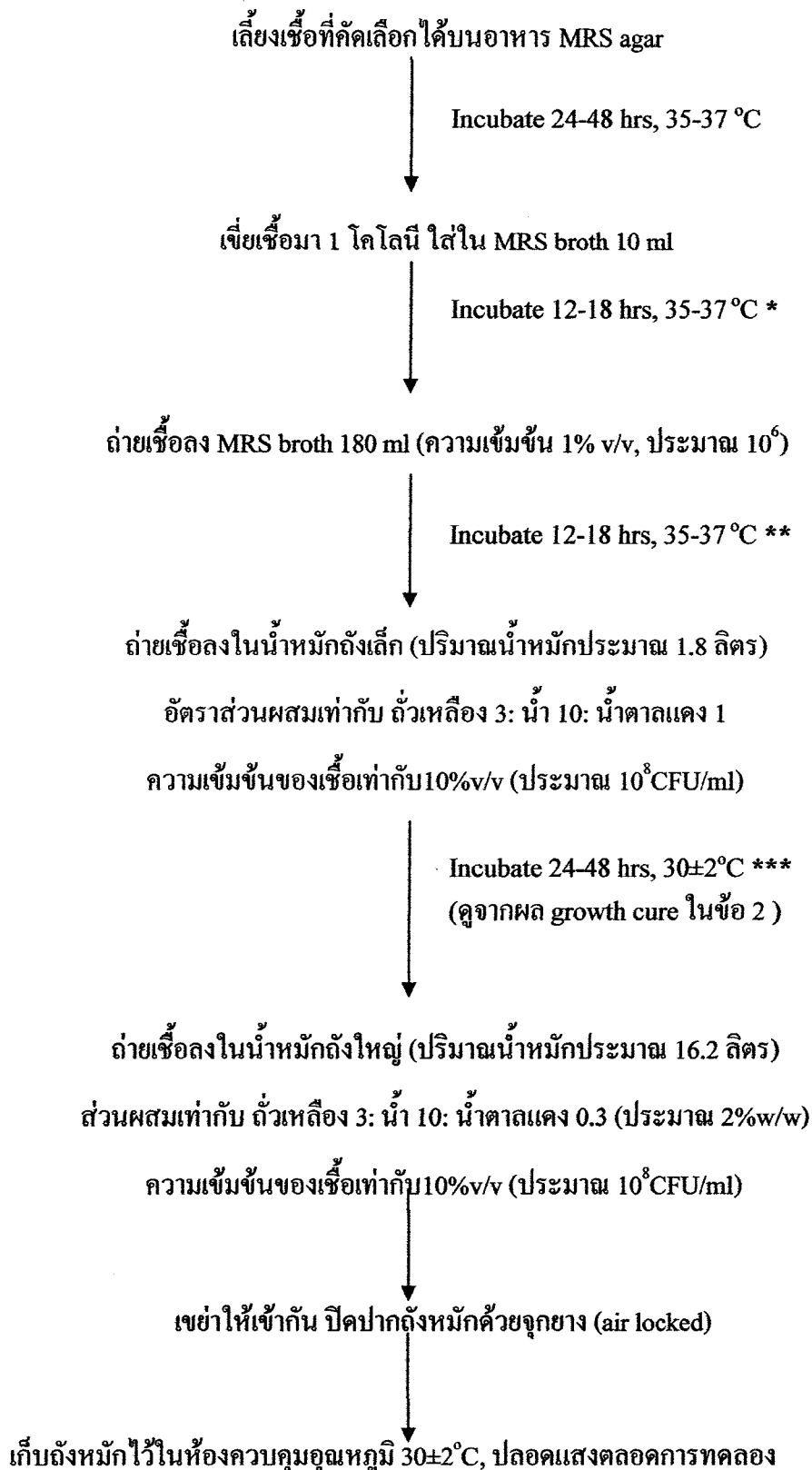
### ขั้นตอนการเตรียมเชื้อเริ่มต้น

#### แยก และคัดเลือกเชื้อ

1. เก็บรวบรวมน้ำหมักพืช ถั่วหมัก รวมทั้งผักดองจากแหล่งผลิตต่างๆ มาแยกเชื้อ และจำแนกเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB)
2. ศึกษาความสามารถในการเจริญเมื่อทดสอบกับสารสกัดพืชสมุนไพร และสารสกัดถั่วเหลือง (สกัดด้วยน้ำ และแอลกอฮอล์) (ซึ่งทดสอบโดยวิธี Agar well plate method) และทดสอบการมีฤทธิ์ต้านจุลชีพ (ทดสอบโดยวิธี Agar well plate method)
3. ศึกษากราฟการเจริญ (growth curve) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS (de Man Rogosa and Sharpe) ในน้ำหมักพืช และในน้ำถั่วเหลืองหมัก โดยหมักเพียง 500 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วน พืช : น้ำ : น้ำตาลแดง เท่ากับอัตราส่วนของน้ำหมักพืชที่จะหมักจริงในถังใหญ่
4. คัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้ในน้ำหมักพืช และทนต่อสารสกัดจากพืช มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ โดยคัดเลือกมาเพียง 1 ไอโซเลต สำหรับเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการหมัก

5. จัดจำแนกชนิดของเชื้อที่คัดเลือกได้ โดยใช้การทดสอบทางชีวเคมี และ API 50 CH strip tests เก็บเชื้อใน 40% glycerol (stock culture) และเก็บเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS semi-solid ไว้สำหรับเตรียมเชื้อเริ่มต้น

## เตรียมเชื้อเริ่มต้น



## หมายเหตุ

\* เชื้อมีปริมาณประมาณ  $10^9$  CFU/ml

\*\* เชื้อมีปริมาณประมาณ  $10^9$  CFU/ml

\*\*\* เชื้อมีปริมาณประมาณ  $10^8$  -  $10^9$  CFU/ml

### ขั้นตอนการหมัก

1. นำถั่วเหลืองที่คัดเลือกได้มาแช่ในน้ำสะอาดเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และนำไปนึ่งด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave)
  2. นำถั่วเหลืองที่ได้มาหมักเป็ยก โดยใช้สูตรการหมัก ถั่วเหลือง : น้ำตาลอ้อย: น้ำ ในอัตราส่วน 3 : 1 : 10 โดยซังถั่วเหลืองที่ผ่านกระบวนการหมักแห้งมา 3.86 กิโลกรัม มาป่นให้ละเอียดจนเป็น paste แล้วเติมน้ำกลั่น 18 ลิตร
  3. กรองกากถั่วเหลืองออกด้วยผ้าขาวบางที่สะอาด จะได้น้ำนมถั่วเหลืองปริมาตรประมาณ 18 ลิตร
  4. หมักถั่วเหลือง (Fermented Soybean Broth; FSB) ด้วยแบคทีเรียต้นเชื้อที่คัดเลือกได้ (*Lactobacillus casei*) โดยใช้ น้ำนมถั่วเหลืองที่กรองกากออกแล้ว ปริมาตร 18 ลิตร เติมน้ำตาลอ้อย 1.8 กิโลกรัม และต้นเชื้อ *L. casei* 10% v/v ส่วนสูตรน้ำถั่วเหลืองที่ไม่ต้องผ่านการหมัก (Soybean Broth; SB) เพื่อเป็นชุดควบคุม ใช้อัตราส่วนผสมเหมือนกัน แต่ไม่เติมเชื้อเริ่มต้น
  5. หมักลงในถังหมักและบ่มไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 21 วัน โดยเก็บตัวอย่างวันที่ 0 ทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นเก็บทุกวันที่ 1, 2, 3, 4, 7, 10, 14, 17 และ 21 ของการหมัก
  6. นำตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์หาค่าต่างๆ
2. ตรวจสอบผลิตภัณฑ์น้ำถั่วเหลืองหมัก และน้ำถั่วเหลืองจากการจำลองการผลิต
- ทำการเก็บตัวอย่างน้ำถั่วเหลืองหมักเพื่อทำการตรวจวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ดังนี้
- 2.1 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณของกรด ณ เวลาชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24 และ วันที่ 2, 3, 4, 7, 10, 14, 17 และ 21 ของการหมัก
- วิเคราะห์สภาพกรดโดยรวมโดยวิธี Titratable Acidity**
1. ปิเปตสารตัวอย่าง 25.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ นำไปต่อกับที่ดูดสูญญากาศ ทำการดูดและแกว่งประมาณ 1 นาที หรืออาจนำไปตั้งบนอ่างอ่างไอน้ำประมาณ 30 วินาที แกว่งและทำให้เย็น

2. เติมน้ำยาทดสอบฟีนอล์ฟทาลีน 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำร้อน 200 มิลลิลิตร ทำให้ใสด้วยกรดเล็กน้อย
3. เติมสารตัวอย่างที่กำลังแก๊ส  $\text{CO}_2$  ลงไป 5 มิลลิลิตร
4. ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน  $\text{NaOH}$  0.1 N จนได้จุดยุติ

2.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ที่ละลายได้ (soluble protein) ณ เวลาชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24 และ วันที่ 2, 3, 4, 7, 10, 14, 17 และ 21 ของการหมัก

**การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ในน้ำอ้วเหลืองหมักและน้ำอ้วเหลือง**

โดยวิธีของ Bradford ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว และได้ผลการวิเคราะห์ใกล้เคียงกับวิธีของ Lowry

**สารเคมีที่ใช้**

1. Bradford reagent
2. 1 M  $\text{NaOH}$

**ขั้นตอนการวิเคราะห์**

1. เจือจางตัวอย่างด้วยบัฟเฟอร์
2. ทำกราฟมาตรฐาน
3. เตรียมตัวอย่างในปริมาตรที่เท่ากับสารละลายมาตรฐาน
4. เติม  $\text{NaOH}$  1 M ลงในตัวอย่าง
5. เติมสารละลายสี และทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา
6. วัดค่าการดูดกลืนแสง

2.3 ตรวจวิเคราะห์ปริมาณไขมัน และ ปริมาณของแข็งโดยรวม ณ เวลาชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24 และวันที่ 2, 3, 4, 7, 10, 14, 17 และ 21 ของการหมัก

**การหาปริมาณไขมัน โดยดัดแปลงจากวิธี AOAC (2000) และวิธีของกรมวิทยาศาสตร์**

**บริการ**

เก็บตัวอย่าง ณ เวลาต่างๆ ของการหมักมาวิเคราะห์ความชื้น (Moisture) โดยดัดแปลงจากวิธี AOAC (2000) และวิธีของกรมวิทยาศาสตร์บริการ แล้วนำมาวิเคราะห์ปริมาณไขมัน ดังนี้

**เครื่องมือ** วิเคราะห์ปริมาณไขมัน โดยใช้เครื่อง Soxhlet System HT (Tecator, Sweden)

## สารเคมี ปิโตรเลียมอีเทอร์ (Petroleum ether)

### วิธีการทดลอง

1. ออบทิมเบิ้ล (thimbles) และถ้วยสกัดไขมัน (extraction cups) ที่อุณหภูมิ 100 – 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นใน โถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก
2. ตั้งอุณหภูมิ Server Unit ซึ่งเป็นเครื่องให้ความร้อนไว้ที่ 110 องศาเซลเซียส เนื่องจากการทดลองนี้ใช้ปิโตรเลียมอีเทอร์เป็นตัวทำละลาย
3. ชั่งตัวอย่างที่หาความชื้นแล้วประมาณ 1 - 3 กรัม ลงบนกระดาษกรองและห่อให้มิดชิดจากนั้นใส่ลงในทิมเบิ้ล และเติมตัวทำละลายลงในถ้วยสกัดไขมันประมาณ 50 มิลลิลิตร
4. นำทิมเบิ้ลและถ้วยสกัดไขมันต่อเข้ากับเครื่อง Soxhlet System HT
5. เลื่อนคันโยกไปที่ตำแหน่ง boiling และสกัดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นย้ายไปที่ตำแหน่ง rinsing 45 นาที หลังจากการสกัด ให้ระเหยตัวทำละลายประมาณ 10 นาที
6. นำทิมเบิ้ลและถ้วยสกัดไขมันออกจากเครื่อง Soxhlet System HT แล้วนำถ้วยสกัดไขมันไปอบที่อุณหภูมิ 100 - 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 ชั่วโมง ทำให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก

### วิธีการคำนวณ

$$\text{ปริมาณไขมัน (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักไขมันที่สกัดได้} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}}$$

### การหาปริมาณของแข็ง โดยวิธี AOAC (1984)

โดยชั่งตัวอย่างประมาณ 2.5 – 3.0 กรัม ใน moisture can แล้วจึงนำไปให้ความร้อนด้วย steam bath เป็นเวลา 10 – 15 นาที แล้วนำไปอบต่อที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง คำนวณปริมาณของแข็งจากสูตร

$$\text{ปริมาณร้อยละของแข็ง} = \left[ \frac{(\text{น้ำหนัก can พร้อมตัวอย่างหลังอบ} - \text{น้ำหนัก canเปล่า})}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง}} \right] \times 100$$

## การหาปริมาณโปรตีนที่ละลายได้ โดยวิธีของ Lowry (1951)

### สารเคมี

- $\text{CuSO}_4$
- Na Tartrate
- $\text{Na}_2\text{CO}_3$  เตรียมด้วย 0.1 M NaOH
- Phenol reagent
- BSA standard (1mg/ml)

### การเตรียมสารเคมี

ผสม  $\text{CuSO}_4$  ความเข้มข้น 1 % (w/v) และ Na Tartrate ความเข้มข้น 2 % (w/v) ด้วย  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ความเข้มข้น 2 % (w/v)

### วิธีการทดลอง

1. กรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรองคottoแยกส่วนกากออก
2. เติม Alkaline copper reagent ลงไป และผสมให้เข้ากันทันที
3. ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา
4. เติม Phenol reagent ลงไป และผสมให้เข้ากันทันที
5. ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา
6. วัดค่าการดูดกลืนแสง เปรียบเทียบกับกราฟความเข้มข้นของ BSA

## 2.4 การตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้

### การวิเคราะห์จุลินทรีย์ในน้ำฉ่ำเหลืองหมัก

#### การตรวจนับปริมาณโดยรวมของจุลินทรีย์ (แบบที่เรียว) โดยวิธี *pour plate technique*

1. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ในขวดสารละลายบัฟเฟอร์ ฟอสเฟต 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง  $10^{-1}$
2. ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างจากข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุสารละลาย บัฟเฟอร์ฟอสเฟต 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่าง ความเจือจาง  $10^{-2}$
3. เจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกันกับข้อ 2 เป็นลำดับ (10-fold dilution) จนได้ ตัวอย่างที่มีความเจือจางตามที่ต้องการ และเขย่าผสมทุกความเจือจางด้วยความ ระมัดระวัง
4. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ถ่ายตัวอย่างที่มีความเจือจางต่างๆ ที่ต้องการรวมทั้ง

ตัวอย่างที่ไม่ได้เจือจางใส่จานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 2 จาน (ทำ 2 ซ้ำ)

5. เทอาหาร PCA ซึ่งกำลังหลอมเหลว อุณหภูมิประมาณ 44 – 46 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง โดยใส่จานละ 15 – 20 มิลลิลิตร
6. ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว
7. บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส  $48 \pm 2$  ชั่วโมง
8. นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณค่า CFU ต่อ มิลลิลิตรของตัวอย่าง

การตรวจนับปริมาณยีสต์และรา โดยวิธี *spread plate technique*

1. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตรใส่ในขวดสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 225 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง  $10^{-1}$
2. ใช้ปิเปตถ่ายตัวอย่างจากข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดบรรจุสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่นผสม จะได้ตัวอย่างความเจือจาง  $10^{-2}$
3. เจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเดียวกันกับข้อ 2 เป็นลำดับ (10-fold dilution) จนได้ตัวอย่างที่มีความเจือจางที่เหมาะสม อย่างน้อย 3 ระดับ
4. ใช้ปิเปตขนาด 1 มิลลิลิตร ถ่ายตัวอย่างที่มีความเจือจางต่างๆ ที่ต้องการรวมทั้งตัวอย่าง ที่ไม่ได้เจือจางใส่จานเพาะเชื้อ จานละ 1 มิลลิลิตร ความเจือจางละ 2 จาน (ทำ 2 ซ้ำ)
5. เทอาหาร PDA ซึ่งกำลังหลอมเหลว อุณหภูมิประมาณ 44 – 46 องศาเซลเซียส ลงในจานเพาะเชื้อที่มีตัวอย่าง โดยใส่จานละ 15 – 20 มิลลิลิตร
6. ผสมตัวอย่างและอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดี วางทิ้งไว้จนอาหารแข็งตัว
7. บ่มจานอาหารโดยไม่ต้องคว่ำจาน ที่อุณหภูมิ 22 – 25 องศาเซลเซียส นาน 5 วัน ถ้าหากโคโลนีมีการเจริญดีให้นับหลังจากบ่มเชื้อไว้ 3 วัน
8. นับจำนวนโคโลนีในจานเพาะเชื้อ หาค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีใน 1 จาน และคำนวณค่า CFU ต่อ มิลลิลิตรของตัวอย่าง

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณ โคลิฟอร์มและ *Escherichia coli* โดยวิธี *Multiple tube fermentation technique*

**การตรวจขั้นต้น (presumptive test)**

1. เขย่าตัวอย่างให้เข้ากันแล้วใช้ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LST (ที่มีหลอดดักก๊าซ) ความเข้มข้น 2 เท่า จำนวน 3 หลอด และปิเปตตัวอย่างลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ LST (ที่มีหลอดดักก๊าซ) ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิลิตร อย่างละ 3 หลอด
2. บ่มหลอดอาหารทั้งหมด (9 หลอดต่อ 1 ตัวอย่าง) ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อ่านผลครั้งแรกหลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซในหลอดอาหารแต่ละหลอด หากหลอดใดไม่เกิดก๊าซ บ่มต่ออีก 24 ชั่วโมง ตรวจผลเช่นเดียวกัน
3. บันทึกจำนวนหลอดที่เกิดก๊าซ อ่านผลเป็นหลอดที่ให้ผลบวก

**การตรวจขั้นยืนยัน (confirmed test)**

1. เขย่าหลอด LST ที่ให้ผลบวกให้เข้ากัน แล้วถ่ายเชื้อจากแต่ละหลอด 1 หลอด ลงในอาหารเหลว 2 % BGLB (ที่มีหลอดดักก๊าซหลอดละ 10 มิลลิลิตร) หลอดต่อหลอด
2. บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส  $48 \pm 3$  ชั่วโมง สังเกตหลอดที่ขุ่นและเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ อ่านผลเป็นหลอดที่ให้ผลบวก
3. บันทึกผลหลอดที่ให้ผลบวกและนำไปเปิดตารางเอ็มพีเอ็นรายงานผลเป็นเอ็มพีเอ็นแบคทีเรียโคลิฟอร์มขั้นยืนยันต่อ 100 มิลลิลิตรของตัวอย่าง

**การตรวจขั้นสมบูรณ์ (completed test)**

ในการตรวจวิเคราะห์โคลิฟอร์มโดยทั่วไปจะตรวจสอบถึงขั้นยืนยันก็พอ ยกเว้นในกรณีสงสัย จึงจะวิเคราะห์ถึงขั้นสมบูรณ์ดังนี้

1. ถ่ายเชื้อจากหลอดที่ให้ผลบวก BGLB ลงบนอาหารแข็ง EMB ให้ได้ โคโลนีเดี่ยว บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส  $24 \pm 2$  ชั่วโมง
2. สังเกตโคโลนีลักษณะเฉพาะ ซึ่งมีจุดเข้มตรงกลางโคโลนีอาจมีเงาโลหะหรือไม่ก็ได้ ใช้ลูปเขี่ยโคโลนีดังกล่าวเพาะเลี้ยงใน LST และ PCA slant บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส  $24 \pm 2$  ชั่วโมง ถึง  $48 \pm 3$  ชั่วโมง หากหลอด LST ให้ผลบวกโดยอาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นและเกิดก๊าซ

ในหลอดคักก๊าซ และเมื่อนำโคโลนีจาก PCA slant มาข้อมสีแกรมและนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบเป็นแบคทีเรียแกรมลบชนิดแท่ง ไม่มีสปอร์ สรุปผลว่าพบโคลิฟอร์ม

#### การตรวจวิเคราะห์ *E. coli*

1. ถ่ายเชื้อจากหลอด LST ที่เกิดก๊าซในขั้นแรก ลงในอาหารเหลว EC หลอดต่อหลอดโดยทำทุกหลอดที่เกิดก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ  $45.5 \pm 0.5$  องศาเซลเซียส นาน  $24 \pm 2$  ชั่วโมง
2. ใช้ ดูปถ่ายเชื้อจากหลอดที่เกิดก๊าซในข้อ 1 ขีดเพาะลงบนอาหารวุ้น EMB บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส  $24 \pm 2$  ชั่วโมง แล้วตรวจดูโคโลนีที่สงสัยว่าจะเป็น *E. coli* ซึ่งตรงกลางของโคโลนีจะมีสีเข้มและสีเลื่อมโลหะ (metallic sheen)
3. ถ่ายเชื้อจากโคโลนีดังกล่าว 2-3 โคโลนีจาก EMB 1 จาน ลงในอาหารเอียงเพลดเคานต์ (PCA slant) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส  $24 \pm 2$  ชั่วโมง
4. นำเชื้อจากอาหาร PCA ข้อมด้วยสีข้อมแกรมและทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีต่างๆ ดังนี้
  - ทดสอบ IMViC (การสร้างอินโดล การทดสอบเอมอาร์วีพี และการใช้ซิเตรต) ซึ่ง *E. coli* จะติดสีแกรมลบ รูปท่อนไม่สร้างสปอร์ ผลการทดสอบ IMViC เป็น ++ -- หรือ - + --
  - อ่านค่าเอ็มพีเอ็นจากตาราง รายงานผลเป็นเอ็มพีเอ็น *E. coli* ต่อ 100 มิลลิลิตรของตัวอย่าง

#### การตรวจวิเคราะห์ *Staphylococcus aureus*

1. ถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางอย่างน้อย 3 ระดับรวมทั้งตัวอย่างที่ไม่ได้เจือจาง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหารวุ้น MS-EY (ทำ 2 ซ้ำ)
2. ไขแท่งแก้วเกลี่ยเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารทิ้งไว้ให้แห้งแล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง
3. นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญบนอาหารแต่ละจาน ที่มีจำนวน 25 - 250 โคโลนีมีการกระจายตัวดี โคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสีเหลืองล้อมรอบด้วยโซนสีขาวขุ่น
4. เลือกโคโลนีสงสัยมาทดสอบ Coagulase ถ้าให้ผล Coagulase เป็นบวก

รายงานเป็นจำนวน *S. aureus* ต่อตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

#### การตรวจวิเคราะห์ *Salmonella*

1. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 25 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดอาหาร TSB ปริมาตร 225 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส 16 - 20 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารซีลไนต์ซีสดีน 10 มิลลิลิตร บ่มเพาะเชื้อที่  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส  $24 \pm 2$  ชั่วโมง
3. จีดแยกเชื้อบนอาหาร 3 ชนิดคือ MAC, XLD และ SS agar ชนิดละ 2 จาน และจีดแยกเชื้อ *Salmonella* อ่างอิง ลงบนอาหารชนิดละ 1 จาน
4. บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ  $37 \pm 1$  องศาเซลเซียส  $24 \pm 2$  ชั่วโมง
5. เลือกโคโลนีที่สงสัย 2-3 โคโลนีจากจานอาหาร และโคโลนีอ่างอิง มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี โดยเพาะเชื้อลงบนอาหารวุ้นเอียง Triple Sugar Iron (TSI) Lysine ion (LI) agar และ urea agar บ่มเพาะเชื้อ รายงานผลว่าพบหรือไม่พบ *Salmonella sp.* ต่อตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร

#### 3. การตรวจสอบฤทธิ์ต้านออกซิเดชัน (antioxidant activity) ของผลิตภัณฑ์

เก็บตัวอย่าง ณ เวลาชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24 และวันที่ 2, 3, 4, 7, 10, 14, 17 และ 21 ของการหมัก แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อเอากากออกแล้วนำไปทดสอบด้วยวิธีต่างๆ ดังนี้

3.1 Reducing power โดยศึกษาความสามารถของสารแอนติออกซิแดนท์ ในการเปลี่ยน  $Fe^{3+}$  เป็น  $Fe^{2+}$  วัดค่าการดูดกลืนแสงของ  $Fe^{2+}$ -TPTZ complex ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร โดยดัดแปลงวิธีของ Benzie (1996)

3.2 Scavenging effect on ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical โดยศึกษาความสามารถในการขจัด ABTS free radical ที่เกิดจากการที่ ABTS ถูกออกซิไดส์โดย oxidizing agent และสารแอนติออกซิแดนท์จะขจัด ABTS free radical ที่เกิดขึ้น แล้วทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 734 นาโนเมตร โดยดัดแปลงวิธีของ Roberta Re et al. (1999)

3.3 Superoxide anion scavenging เป็นการศึกษาถึงฤทธิ์การขจัดอนุมูลอิสระ Superoxide โดยใช้ระบบ Nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) และ Phenazine methosulfate (PMS) เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ Superoxide แล้ววิเคราะห์โดยอาศัยการเกิด Reduction ของ Nitroblue tetrazolium (NBT) ทำให้เกิดเป็นสารละลายสีน้ำเงิน-ดำ แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร โดยดัดแปลงวิธีของ Ewing และ Janero (1995)

3.4 Nitric oxide scavenging เป็นการศึกษาฤทธิ์ขจัดอนุมูลอิสระ Nitric oxide โดยใช้ Sodium nitroprusside เป็นตัวกำเนิดอนุมูลอิสระ Nitric oxide และวิเคราะห์โดยการทำปฏิกิริยากับ Griess reagent แล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (Griess reagent: 1% Sulphanilamide + 0.1% Naphthylethylenediamine dihydrochloride ใน 2% Phosphoric acid) คัดแปลงวิธีของ Miller และ คณะ (1993)

#### 4. การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสาร daidzein/genistein ในผลิตภัณฑ์น้ำอ้วเหลืองหมัก เปรียบเทียบ ในน้ำอ้วเหลือง

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ณ วันที่ 0, 4, 7, 10, 14, 17, 21 แล้วกรองผ่านกระดาษกรองเพื่อเอากากออกแล้วนำไปทดสอบ

##### วิธีการสกัดตัวอย่าง

บดอ้วเหลืองให้เป็นผง แล้วชั่งตัวอย่างผงอ้วเหลืองใน flask เติม methanol แล้วปิด flask ด้วยจุกปิด นำไปแช่ใน water bath เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วางทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงจนถึงอุณหภูมิห้อง เติมน้ำละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในตัวอย่างที่ทำการสกัด จากนั้นปิดขวดไว้เหมือนเดิมแล้วทำการแช่ที่อุณหภูมิห้อง เติม acetic acid ลงไป แช่แล้วทำการเขี่ยด้วยมือเพื่อให้ตัวอย่างตกตะกอน แช่ให้เข้ากัน กรองแยกกากอ้วเหลือง นำสารสกัดที่แยกกากออกไปหมุนเหวี่ยง คูณสารสกัดที่เตรียมได้ใส่ลงใน vial ขนาด 2 มิลลิลิตร วิเคราะห์ด้วย HPLC

##### อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. HPLC กับ multi-channel electrochemical (EC) detection/UV detector
2. LC gradient

##### สารเคมีที่ใช้

1. สารมาตรฐานของ genistein/daidzein
2. สารเคมีที่ใช้ เป็นเกรดวิเคราะห์

##### สภาวะการวิเคราะห์ด้วย HPLC เป็นดังนี้

HPLC: Waters รุ่น 2695 จากประเทศ Ireland

Column: reversed phase C-18 ขนาด 4.6 x 250 mm (Waters จากประเทศ Ireland)

Detector: Photodiode Array Detector (Waters รุ่น 2996 จากประเทศ Ireland)

Flow rate: 1.5 ml/min

Mobile phase: Mobile phase A, H<sub>2</sub>O : Methanol : Acetic acid ( 88 :10 :2)

: Mobile phase B, Methanol: Acetic acid (98 : 2)

: ระบบของ mobile phase เป็นแบบ gradients

### ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วย HPLC

#### 1. การเตรียมตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์

Clean up ตัวอย่างด้วย Solid Phase Extraction กรองตัวอย่างด้วย millipore ขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปฉีดเข้าเครื่อง HPLC

#### 2. ผลการวิเคราะห์

เมื่อเปรียบเทียบระหว่างพื้นที่ของ peak ของสารที่ออกมา ณ เวลาต่างๆ กับกราฟมาตรฐานที่เตรียมจากสารมาตรฐานปฐมภูมิที่มีความเข้มข้นต่างๆ ทำให้สามารถหาความเข้มข้นของสาร genistein/ daidzein ในผลิตภัณฑ์ได้

### 5. การทดสอบความพึงพอใจของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์สุดท้าย

ในการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้จะใช้วิธีทดสอบแบบเชิงพรรณนา (Descriptive test) ซึ่งจะใช้วิธี Ratio Profile Test (RPT) โดยแสดงถึงระดับความเข้มข้นของลักษณะของผลิตภัณฑ์ในสเกลทางประสาทสัมผัส (Sensory scale) ที่ได้กำหนดขึ้นและนำค่าที่ได้จากการวัดระดับสเกลมาทำการวิเคราะห์ผลการทดสอบและแปรผลออกมาเป็นค่าการยอมรับต่อไป โดยในการทดสอบจะใช้ผู้ทดสอบในการชิมผลิตภัณฑ์จำนวน 20 คน ทำการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลืองหมัก 2 สูตร คือผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลืองหมักสูตรหมักแห้งก่อนแล้วจึงมาทำการหมักเปียก และผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลืองหมักเปียกเพียงอย่างเดียว หลังจากนั้นให้ทำการประเมินค่าความพึงพอใจในสเกลที่กำหนดคุณลักษณะต่างๆของผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลืองหมักที่ได้กำหนดขึ้น โดยทำการประเมิน 2 ระดับคือ ค่าความพึงพอใจในอุดมคติ (Ideal score) ของผู้ทดสอบและค่าความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์ของผู้บริโภค (Sample score) จากนั้นนำค่าทั้งสองมาหาค่า Ideal ratio score เพื่อประเมินเป็นค่าความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลืองหมักในคุณลักษณะต่างๆต่อไป โดยในการทดสอบนี้จะใช้วิธีการทดสอบทางสถิติคือ t-test ในการทดสอบการยอมรับของผลิตภัณฑ์ด้วย เมื่อการหมักครบ 21 วัน นำมาทดสอบความพึงพอใจของกลุ่มทดลอง ซึ่งไม่จำกัดเพศและอายุ โดยทดสอบความพึงพอใจในสี กลิ่น รสชาติ และความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์โดยรวม แล้วทำการประเมินความพึงพอใจหลังจากการทดสอบ

### ขั้นตอนการทดสอบ

1. บ้วนปากด้วยน้ำ 3 ครั้ง
2. ทดสอบโดยการสูดดมกลิ่น สังเกตสี ขมิ้นรสชาติของ
3. ประเมินความพึงพอใจของผลิตภัณฑ์ตามแบบประเมินผลิตภัณฑ์

### ตัวอย่างแบบประเมินความพึงพอใจในผลิตภัณฑ์น้ำแก้วเหลืองหมัก

#### 1. เพศ

☐

ชาย

☐

หญิง

#### 2. อายุ

☐

ต่ำกว่า 15 ปี

☐

16 -25 ปี

☐

26 – 40 ปี

☐

มากกว่า 40 ปี

#### 3. การศึกษา

☐

ต่ำกว่าปริญญาตรี

☐

ปริญญาตรี

☐

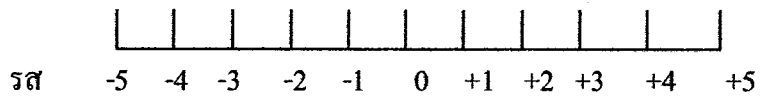
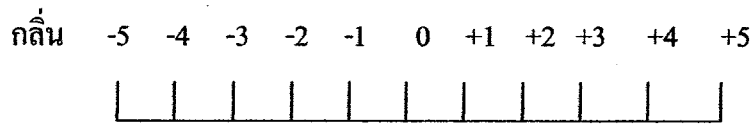
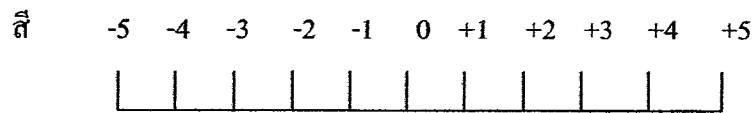
สูงกว่าปริญญาตรี

#### 4. เกณฑ์การให้คะแนน

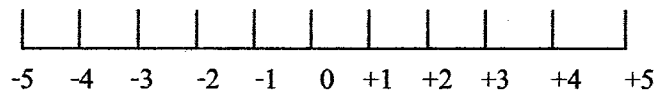
+5 = พึงพอใจมาก

0 = พอใช้

-5 = ไม่พึงพอใจ



ความพึงพอใจโดยรวม



ข้อเสนอแนะเพิ่มเติม

.....

.....

.....

.....

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์น้ำมันถั่วเหลืองหมัก

วันที่.....เวลา.....

รหัสตัวอย่าง.....

ชื่อผู้ทดสอบ.....เพศ.....อายุ.....ปี

กรุณาทำเครื่องหมาย : I = ระดับของคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ในอุดมคติ

X = ระดับของคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ที่เป็นอยู่จริง

|                 |  |
|-----------------|--|
| สี              |  |
| กลิ่น           |  |
| รสเปรี้ยว       |  |
| รสหวาน          |  |
| เนื้อสัมผัส     |  |
| การยอมรับโดยรวม |  |