บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Clostridium acetobutylicum*

Clostridium acetobutylicum TISTR 1462 มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย โดยเก็บในอาหาร reinforced clostridial ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และมีการจัดเก็บใน glycerol stock ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

3.1.2 *Clostridium beijerinckii*

Clostridium beijerinckii TISTR 1390 มาจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และทำการถ่ายเชื้อทุก 4 สัปดาห์และเก็บในอาหาร reinforced clostridial ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส

3.2 สารเคมี

เคซีน (Casein)	Cystein-HCl
โซเดียมคลอไรด์	Resazurin
กลีเซอรอล	ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	ไดแอมโมเนียซัลเฟต ($[NH_4]_2SO_4$)
แมกนีเซียมซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)	แคลเซียมคลอไรด์-2-ไฮเดรต ($CaCl_2 . 2H_2O$)
โคบอลต์คลอไรด์ ($CoCl_2$)	สารสกัดจากยีสต์
แบคโตเปปโตน	สารสกัดจากเนื้อ
อีดีทีเอ (EDTA)	เฟอร์รัสซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($FeSO_4 . 7H_2O$)
แมงกานีสคลอไรด์-4-ไฮเดรต ($MnCl_2 . 4H_2O$)	คอปเปอร์คลอไรด์ไดไฮเดรต ($CuCl_2 . 2H_2O$)
บอริคแอซิด (H_3BO_3)	โซเดียมโมลิปเดต-2-ไฮเดรต ($Na_2MoO_4 . 2H_2O$)
นิกเกิลคลอไรด์-2-ไฮเดรต ($NiCl_2 . 2H_2O$)	ซิงซัลเฟต-7-ไฮเดรต ($ZnSO_4 . 7H_2O$)
กรดอะซิติก	กลูโคส

แอมโมเนียมซัลเฟต	ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต
แคลเซียมคลอไรด์	แคลเซียมคาร์บอเนต
กรดไฮโดรคลอริก	โซเดียมโมลิปเดต

3.3 อุปกรณ์

ฟลาก์ส	บีกเกอร์	จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
ขวดเก็บอาหาร (Duran ®)	หลอดทดลอง	หลอดทดลองฝาเกลียว
Anaerobic jar	แท่งแก้วคน	กระบอกตวง
ตะเกียงแอลกอฮอล์	เข็มเขี่ยเชื้อ	หลอดหยด
ปิเปต	จุกยางดูดสาร	จุกสำลี
จุกยางปิดฟลาก์ส	หลอดปั่นเหวี่ยง	ขวดเก็บตัวอย่าง
เครื่องเขย่า	ตู้บ่ม 30, 37 องศาเซลเซียส	เครื่องปั่นเหวี่ยง
ขวดลูกชมพู่	เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์	หม้อนึ่งอัดไอ
ตู้เย็น	ถังแก๊สไนโตรเจน	เครื่องชั่ง
เครื่องเขย่าความเร็วสูง (Vortex)		

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.4.1 อาหารสำหรับเตรียมสปอร์ Reinforced Clostridial

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

เคซีอีน เอนไซมามิค ไฮโดรไลเซต (Casein enzymatic hydrolysate)	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract)	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	3	กรัม
สารละลายเด็กซ์โตส (Dextrose)	5	กรัม
สารละลายโซเดียม คลอไรด์ (Sodium chloride)	5	กรัม
สารละลายโซเดียม อะซีเตต (Sodium acetate)	3	กรัม
สารละลายแป้ง (Starch soluble)	1	กรัม

แอล-ซิสเทอีน ไฮโดรคลอไรด์	0.5	กรัม
(L-Cysteine hydrochloride)		
วุ้น (Agar)	0.5	กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ มาละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ในหม้อนึ่งอัดไอ

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* สูตรที่ 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutylicum* (Andrade และ Vasconcelos, 2003) มีส่วนประกอบเป็นน้ำหนักต่อหนึ่งลิตรดังนี้

โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.5	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	0.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
เฟอริกซัลเฟต ($FeSO_4.7H_2O$)	0.01	กรัม
กรดอะซิติก (acetic acid)	2.2	กรัม
ไบโอติน (biotin)	0.04	กรัม
กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (Þ-aminobenzoic acid)	8.0	มิลลิกรัม

ทำการเติมแหล่งคาร์บอนโดยเลือกใช้กลูโคส (glucose) 50.0 กรัมต่อลิตร หรือกลีเซอรอล (glycerol) 50.0 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปปรับค่าพีเอช (pH) ให้ได้ 6.3 โดยเติมสารละลาย NH_4OH เข้มข้นร้อยละ 30 หรือสารละลาย H_2SO_4 เข้มข้น 5 โมล่าร์

3.4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* สูตรที่ 2

อาหารเลี้ยงเชื้อ *C. acetobutyricum* (Badr, Toledo และ Hamdy, 2000) หรืออาหารกลูโคส-ยีสต์สกัด-เคซีน-ซิสทีน (Glucose-yeast extract-casein-cysteine, GYCC) มีส่วนประกอบเป็นน้ำหนักต่อ 1 ลิตร ดังนี้

กลูโคส (Glucose)	10	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	5	กรัมต่อลิตร
เคซีน (Casein)	15	กรัมต่อลิตร
Cystein-HCl	0.5	กรัมต่อลิตร
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต(K2HPO4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH2PO4)	1.0	กรัมต่อลิตร
โซเดียมคลอไรด์	2.5	กรัมต่อลิตร

Resazurin 0.001 กรัมต่อลิตร

ทำการเติมแหล่งคาร์บอนโดยเลือกใช้กลูโคส (Glucose) 10.0 กรัมต่อลิตรหรือกลีเซอรอล (Glycerol) 10.0 กรัมต่อลิตร

3.4.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*

อาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ที่นำมาเลี้ยงเชื้อ *C. beijerinckii* (Qureshi และ Blaschek, 1999) มีส่วนประกอบดังนี้

ในสารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย

อะซีเตต บัฟเฟอร์ (Acetate buffer)

KH_2PO_4	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
แอมโมเนียมอะซีเตต (Ammonium acetate)	2.2	กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

สารละลายวิตามิน (Vitamin solution)

กรดพารา-อะมิโน-เบนโซอิก (Para-amino-benzoic acid)	0.001	กรัม
ไทอามิน (Thiamine)	0.001	กรัม
ไบโอติน (Biotin)	0.00001	กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆ ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารละลายเกลือแร่ (Minerals solution)

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4H_2O$	0.01	กรัม
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01	กรัม
NaCl	0.01	กรัม

ชั่งส่วนประกอบต่างๆละลายต่อน้ำ 1 ลิตรจากนั้นกรองสารละลายผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร

สารสกัดยีสต์ (Yeast extract)	1	กรัม

ชั่งสารสกัดยีสต์ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

จากนั้นชั่งกลูโคส 20 หรือ 60 กรัม หรือกลีเซอรอล 20 กรัมต่ออาหาร 1 ลิตร ละลายต่อน้ำ 1 ลิตรแล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นำส่วนผสมทั้งห้าสารละลายมารวมกันให้ได้ปริมาตรรวม 1 ลิตร จึงนำไปใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ในการทดลอง

3.5 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium acetobytylicum*

เชื้อ *Clostridium acetobutylicum* TISTR 1462 มีวิธีการเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นจากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutyricum* ดังมีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อตามที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.4.2 แลละ 3.4.3 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เสร็จแล้ว ทำการเขี่ยเชื้อ 1 ลูปจากอาหารแข็ง reinforced clostridial ลงในอาหารเหลวปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปถ่ายลงอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมไนโตรเจน จากนั้นนำไปเลี้ยงที่สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อ *Clostridium beijerinckii*

นำเชื้อ *Clostridium beijerinckii* TISTR 1390 ที่เพาะเลี้ยงไว้ในหลอดอาหาร Reinforced Clostridial และเก็บรักษาโดยแช่เย็นไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลอดละ 6 มิลลิลิตรจำนวน 12 หลอด โดยทำการ heat shock ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเชื้อจุ่มในน้ำเย็นที่มีอุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที (Wilfrid และคณะ, 1991) จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ฟลาก์ส ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร Reinforced Clostridial ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 60 มิลลิลิตร ต่อมา ทำการพ่นก๊าซไนโตรเจนลงไปในฟลาก์สเพื่อไล่ออกซิเจนเป็นเวลา 2 นาที ปิดปากฟลาก์สด้วยจุกยางให้แน่นเพื่อรักษาสภาพไร้ออกซิเจน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจากความขุ่นและฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

3.6 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ

3.6.1 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 1

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบดังที่ได้กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.4.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยใส่กลีเซอรอลเป็น 10 20 30 และ40 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปปรับค่าให้ได้พีเอชประมาณ 6.3 แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นทำการดูดหัวเชื้อที่เตรียมในหัวข้อ 3.5.1 มา 5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ต่อด้วยการเติมก๊าซไนโตรเจน แล้วนำไปเลี้ยงที่ความเร็วรอบของเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 24 48 72 96 120 144 และ168 ชั่วโมง โดยจะนำมาทำการวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดด่างโดยใช้เครื่องพีเอชมิเตอร์ การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 และ 660 นาโนเมตรซึ่งวัดได้จากเครื่องสเปคโตรโฟโต-มิเตอร์ และค่าจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตอยู่โดยวิธีการเขย่าจาน (pour plate) จากนั้น นำตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง แล้วทำการเก็บส่วนใสเพื่อนำไปใช้ในการวิเคราะห์ค่าความเข้มข้นของสารเคมีในขั้นตอนต่อไป

3.6.2 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 2 ในระดับฟลาสก์

ในการทดลองจะทำการหมักในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารปริมาตร 45 มิลลิลิตรในสภาวะนิ่ง โดยทำการลงเชื้อจาก Pre-culture ที่เตรียมไว้ ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงในอาหาร GYCC ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและกลีเซอรอล เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อให้อาหารมีสภาวะไร้อากาศ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 24 48 72 96 120 144 และ 168 ชั่วโมงโดยในแต่ละชั่วโมงจะเก็บตัวอย่างมาชั่วโมงละ 3 ฟลาสก์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum*

3.6.3 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 2 ในถังหมักที่ไม่ใช้ใบพัด

เตรียมอาหาร GYCC 2 สูตร คือสูตรที่มีกลูโคสเป็นแหล่งไนโตรเจนและสูตรที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อ

ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ต่อมานำมาถังหมักที่มีอาหารอยู่ภายในที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาต่อเข้ากับปั๊ม เครื่องทำความเย็น (cooling) ตั้งอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเพื่อทำให้อาหารมีสภาวะ ไร้อากาศ หลังจากนั้นทำการลงเชื้อจาก Pre – culture ที่เตรียมได้ในหัวข้อที่ 3.5.2 ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในถังหมักที่มีอาหาร GYCC ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคสและกลีเซอรอล เป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนอีกครั้งเพื่อให้อาหารมีสภาวะไร้อากาศ ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 0 24 48 72 96 120 และ144 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในแต่ละชั่วโมงทำการเก็บตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

3.6.4 กระบวนการการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในสูตรอาหารที่ 2 ในถังหมักที่ใช้ใบพัด

ทำการเตรียมการอาหารและ Pre-culture รวมถึงสภาวะที่ใช้ในการหมักให้เหมือนกับหัวข้อ 3.6.2 แต่เพิ่มสภาวะการกวนเข้าไป โดยทำการกวนที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างทุกๆ 0 24 48 72 96 120 และ144 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสารอินทรีย์รวมถึงอัตราการเจริญเติบโตที่เหมาะสมของเชื้อ *Clostridium acetobutylicum* ในแต่ละชั่วโมงจะทำการเก็บตัวอย่างซ้ำ 3 ครั้ง

3.6.5 กระบวนการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Clostridium beijerinckii*

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ P2 ที่ใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทความเข้มข้น 20 และ60 กรัมต่อลิตร และใช้กลีเซอรอล เป็นสับสเตรทเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเติมสารละลายวิตามินและสารละลายเกลือแร่ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.2 ไมโครเมตรเรียบร้อยแล้ว แบ่งใส่ฟลาก์ส ขนาด 250 มิลลิลิตรจำนวน 24 ฟลาก์สๆ ละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อที่เตรียมได้ ลงในแต่ละฟลาก์สๆ ละ 5 มิลลิลิตร ต่อมาทำการพ่นก๊าซไนโตรเจนลงไปในฟลาก์สเพื่อไล่ออกซิเจน ปิดปากฟลาก์สด้วยจุกยางให้แน่นเพื่อรักษาสภาพไร้ออกซิเจน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.7 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.7.1 การตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์

ในการตรวจวิเคราะห์จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 สายพันธุ์ เริ่มด้วยการเจือจางเป็นชุด (series dilution) จนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม แล้วนำไปทำการนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการตรวจวิเคราะห์จำนวนโดยวิธีเขย่าจาน (pour plate) เริ่มจากหลอมอาหารเพาะเชื้อให้ละลายแล้วทิ้งให้เย็น

ประมาณ 50 องศาเซลเซียส จากนั้นเตรียมตัวอย่างอาหารให้เจือจางได้ความเข้มข้นช่วงที่เหมาะสม 3 ระดับความเจือจางโดยใช้ปิเปตดูดอาหารแต่ละความเจือจาง เริ่มจากสารละลายเชื้อที่มีความเจือจางมากที่สุดใส่ในจานเพาะเชื้อจานละ 1 มิลลิลิตร ทำอย่างน้อย 3 จาน โดยเรียงจานทั้ง 3 ซ้อนกัน ดูดอาหารใส่จานล่างสุดก่อน แล้วไล่ขึ้นมาจนถึงใบบนสุด เทอาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานประมาณ 15-20 มิลลิลิตร โดยเริ่มจากจานใบล่างสุด เช่นเดียวกัน เขย่าจานที่ซ้อนอยู่ทั้ง 3 ใบพร้อมกันโดยหมุนไปทางขวา 3-4 ครั้ง หมุนไปทางซ้าย 3-4 ครั้ง ตั้งทิ้งไว้จนวุ้นแข็งแล้วนำเชื้อไปบ่มในกระบอกใส่จานเพาะเชื้อปิดกันอากาศเข้า (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วันโดยกลับจานเพาะเชื้อ เมื่อบ่มครบเวลาแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีทั้งบนผิวหน้าและที่ฝังในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ colony counter เลือกเฉพาะความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 30-300 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ นับจำนวนรวมทั้ง 3 จานแล้วหาค่าเฉลี่ย รายงานจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่นับได้ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU ต่อมิลลิลิตร)

3.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Bergmeyer และ Grassel, 1983)

นำส่วนใสของตัวอย่างช่วงเวลาละ 3 ซ้ำที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้นที่เหมาะสมในการวัดค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นนำสารละลายแต่ละความเข้มข้นที่ได้ ดูดใส่หลอดทดลองหลอดละ 1 มิลลิลิตร เติม DNS 3 มิลลิลิตร และนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นโดยผ่านน้ำก๊อกและเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรโดยใช้แบลงค์ (blank) เป็นน้ำกลั่นแทนน้ำตาลกลูโคส จากนั้นคำนวณค่าความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์จากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่เตรียมสารละลายมาตรมาตรฐานอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.1-0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงในรูปที่ ก.2 และ ก.3 ภาคผนวก ก

3.7.3 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณสารอื่นๆ

นำส่วนใสของตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงที่ 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำมาเจือจางให้ได้สารละลายความเข้มข้นที่เหมาะสม ด้วยสารละลายกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 2 เพื่อใช้เป็น internal standard จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของกลีเซอรอล อะซีโตน บิวทานอล เอทานอล กรดอะซิติกและกรดบิวทิริก ด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ Aminex® HPX-87H Ion Exclusion ขนาด particle size 9 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ 7.8 มิลลิเมตร ความยาว 30 เซนติเมตร เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่ใช้คือสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น 0.005 โมล่าร์ ที่มีอัตราการไหล 0.75 มิลลิลิตรต่อนาที ส่วน column oven ทำงานที่ 37 องศาเซลเซียส โดยวัดค่า refractive index ด้วยเครื่องวัดการหักเหของแสง ใช้ run time 40 นาที และฉีดตัวอย่างปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้กราฟของสารที่มี retention time ตามสารมาตรฐานที่ทำการวิเคราะห์ไว้ล่วงหน้า

3.7.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำค่าที่ได้จากความเจือจางที่มีโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อนำมาหาค่าเฉลี่ย แล้วคำนวณจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เป็นจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร (CFU/ml) และสารที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC แล้วนำมาวิเคราะห์เพื่อหาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม SPSS โดยใช้วิธีวิเคราะห์ของ Duncan's