บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ใช้จุลินทรีย์จาก 2 แหล่งคือ

1. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อควบคุม ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473 ซึ่งได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์จุลินทรีย์ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จ.ปทุมธานี

2. จุลินทรีย์ทดสอบ ได้แก่ จุลินทรีย์ในกลุ่ม DPLAB ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำอ้อยจากกระบวนการผลิตน้ำตาลของโรงงานน้ำตาลแห่งหนึ่งในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์แล้วเก็บรักษาไว้ในอาหารระบุชื่อและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้ ทำการถ่ายเชื้อทุก 15 วัน

สารเคมี

1. Acetic acid (CH_3COOH; Merck, Germany)
2. Acetonitrile (CH_3CN; HPLC grade, RCI LABSCAN LIMITED, Thai)
3. Agar (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India)
4. Hexamethylenetetramine (โรงงานน้ำตาลแห่งหนึ่ง, ประเทศไทย)
5. Calcium chloride ($CaCl_2$; SIGMA – ALDRICH, USA)
6. D-Fructose ($C_6H_{12}O_6$; HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India)
7. D-glucose ($C_6H_{12}O_6$; HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India)
8. Methanal (HCHO; HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India)
9. MRS Broth (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India)
10. PCA (Plate Count Agar; HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India)
11. Peptone (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India)
12. Pyridine (C_5H_5N; Merck, Germany)
13. Rose Bengal Agar Base (HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India)
14. Sodium acetate ($C_2H_3NaO_2$; *Riedel*-de Haen; Germany)
15. Sodium azide (NaN_3; SIGMA – ALDRICH, USA)

16. Sucrose ($C_{12}H_{22}O_6$; HiMedia Laboratories Pvt.Ltd., India)
17. Vancomycin (แคสป้า ฟาร์มาซูติคอล; ประเทศไทย)
18. Water for HPLC (Fisher Scientific UK Limited; UK)

เครื่องมือและอุปกรณ์

1. หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (KT 30L, ALP, Tokyo Japan)
2. เครื่องชั่งแบบละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (ARC 2140, Ohaus, USA)
3. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (Cyber Scan, Eutecn instruments, Singapore)
4. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (205Q, N-Biotek)
5. ตู้อบควบคุมอุณหภูมิ (Shellab, USA)
6. ตู้อบลมร้อน (UM-Oven 120L, UMCA, USA)
7. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Genensys 20, Themo, USA)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (WB-710, Otima, Thailand)
9. เครื่องปั่นเหวี่ยงหนีศูนย์กลาง (Mikro 120, Hettich, Germany)
10. กล้องจุลทรรศน์ (Leica, Singapore)
11. ตู้ดูดควัน (SAFELAB, USA)
12. High Performance Liquid Chromatography (HPLC; SHIMAZU, Japan)
13. เครื่องกรองความดัน (Eyela, USA)
14. กระดาษกรองเบอร์ 1 และ 4 (Whatman paper No. 1, 4, ประเทศไทย)
15. โถดูดความชื้น (Duran, Thailand)
16. ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิต่ำ (Shellab, USA)
17. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer, Thailand)
18. เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micropipette, CAPP, Germany)
19. ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Sanyo, Thailand)
20. ตู้เก็บตัวอย่าง (Sanyo, Thailand)

วิธีการวิจัย

1. ศึกษาชนิดและปริมาณของแบคทีเรียแลคติกที่มีผลต่อการสูญเสียซูโครสในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

1.1 จุลินทรีย์ควบคุมและการเก็บรักษา ในงานวิจัยนี้ใช้ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR473 เป็นเชื้อจุลินทรีย์ควบคุม (Control) โดยได้รับการอนุเคราะห์จากศูนย์จุลินทรีย์ฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย จ.ปทุมธานี ทำการเก็บรักษาในอาหารแข็ง MRS (Merck, Germany) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 15 วัน

1.2 การเก็บตัวอย่าง ทำการเก็บตัวอย่างน้ำอ้อยจากโรงงานน้ำตาลแห่งหนึ่งในเขตภาคเหนือตอนล่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำอ้อยตั้งแต่จุดรับวัตถุดิบจนถึงหม้อต้มเคี่ยว จากจุดต่างๆ 3 จุด ได้แก่

จุดที่ 1 คือ น้ำอ้อยที่ผ่านการหีบจากลูกหีบชุดที่ 1 (First mill; FM)

จุดที่ 2 คือ น้ำอ้อยในถังรวม (Mixed juice; MJ)

จุดที่ 3 คือ น้ำอ้อยที่ผ่านถังดักทราย (Filtered juice; FJ)

1.3 การศึกษาชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย โดยนำน้ำอ้อยจากทั้งสามจุด มาวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี (ค่าพีเอชและปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด) และคุณสมบัติทางจุลชีววิทยา ได้แก่ ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (Milintawisamai, et al., 2009, p. 197; Nickelson and Finne, 1992) ปริมาณยีสต์และราทั้งหมด (Biotest Pharmaceuticals Corporation, 2006, p. 1) ปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด (Eom, et al., 2007, p. 62) และปริมาณ *Leuconostoc* spp. ทั้งหมด (Kelly, et al., 1995, pp. 346-347) รายงานผลเป็น cfu/ml (ภาคผนวก ก)

1.4 การคัดเลือกและทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกลุ่ม *Leuconostoc* spp.โดยทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะเฉพาะของ *Leuconostoc* spp. (สัณห์ พณิชยกุล, 2543, p. 11) ได้แก่ ความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีซูโครสสูง และความสามารถในการทนต่อแวนโคมัยซิน 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS ที่มีการเติมซูโครสร้อยละ 20 และแวนโคมัยซิน 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีลักษณะลักษณะดังกล่าวเฉพาะจากแต่ละจุดเก็บตัวอย่างจุดละ 7 โคโลนี รวมทั้งหมดเป็น 21 โคโลนี จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ตามหลักการของ Bergey's Manual (1994, p. 592) ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เรียงเป็นคู่ (diplococci) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) (ภาคผนวก ข) สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ข) ต้านทานต่อ

แวนโคมัยซิน (Vancomycin) และสร้างโพลีแซคคาไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสเป็นส่วนประกอบ (Holt, et al., 1994, p. 592) โดยหากเชื้อจุลินทรีย์มีการสร้างโพลีแซคคาไรด์สามารถสังเกตุได้จากบริเวณรอบๆโคโลนีจะมีเมือกเกิดขึ้น จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตและผลิตสารเอกซ์โซโพลีแซคคาไรด์ (Exopolysaccharide; EPS) ที่อุณหภูมิ 30 35 40 45 50 และ 55 องศาเซลเซียส (ภาคผนวก ข) แล้วทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะคล้ายจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Leuconostoc* spp. และสามารถสร้างเอกซ์โซโพลีแซคคาไรด์ได้ดี ส่งไประบุสายพันธุ์โดยใช้เทคนิค 16S ribosomal RNA gene sequencing ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ จังหวัดปทุมธานี ประเทศไทย และเก็บรักษาโคโลนีที่แยกได้บนอาหารแข็ง MRS ที่มีซูโครสร้อยละ 20 และแวนโคมัยซิน 150 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 15 วัน เพื่อทำการศึกษาระดับกิจกรรมเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส ในขั้นตอนต่อไป

2. ศึกษาระดับกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครสของจุลินทรีย์ที่แยกได้

โดยทำการศึกษาระดับกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครสตามวิธีของ Eom Seo and Han (2007, p. 62) โดยทำการเขี่ยเชื้อที่แยกได้จากขั้นตอนที่ 1.4 จากอาหารแข็งที่เก็บรักษาไว้จำนวน 3 ลูป ลงในน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อตั้งต้น จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ 0.2 มิลลิลิตร ลงในน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ 5.00 – 6.00 $\log_{10}$cfu/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 xg เป็นเวลา 10 นาที นำเอาส่วนใสมาทำการวิเคราะห์หาระดับกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส (ภาคผนวก ข) โดย 1 หน่วยเด็กซ์แทรนซูเครส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่สามารถก่อให้เกิดฟรุกโตส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีระดับกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครสสูงเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. ศึกษาผลของอุณหภูมิและสารชีวฆาตต่ออัตราการเติบโต อัตราการผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส อัตราการใช้ซูโครส อัตราการเกิดเด็กซ์แทรนและอัตราการเกิดฟรุกโตสในน้ำอ้อย

น้ำอ้อยที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ถูกปรับพีเอชให้อยู่ในช่วง 5.0 – 5.5 วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียล (factorial design) โดยศึกษาผลของอุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 20 30 และ 40 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของสารชีวฆาต 3 ระดับคือ 0 5 และ 10 ppm โดยสารชีวฆาตที่ใช้ในการศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนจากโรงงานน้ำตาล มีชื่อเรียกทางการค้าคือ Hexamine และมีชื่อ

เรียกทางเคมีคือ Hexamethylenetetramine ($C_6H_{12}N_4$) ทำการปลูกถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาจากขั้นตอนที่ 2 ลงในน้ำอ้อยที่ทำการปรับสภาพตามที่ระบุในแผนการทดลองที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ให้ได้ปริมาณเชื้อตั้งต้นประมาณ 5.0 – 6.0 $\log_{10}$cfu/ml เพาะเลี้ยงในตู้บ่มเขย่า (shaker - incubator) ตามอุณหภูมิที่กำหนด ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมงหรือจนเชื้อเจริญเข้าสู่ stationary phase ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด พีเอช ระดับกิจกรรมของเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส ปริมาณเด็กซ์แทรน ปริมาณฟรุกโตส กลูโคสและซูโครส (ภาคผนวก ข) ทำการทดลองอย่างน้อย 2 ซ้ำ

4. แบบจำลองทางคณิตศาสตร์

4.1 การพัฒนาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

ทำการตั้งสมมติฐานของแบบจำลองจากปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับการสูญเสียซูโครสจากแบคทีเรียแลคติก โดยพิจารณาจากผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตของแบคทีเรีย การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส การใช้ซูโครส การผลิตเด็กซ์แทรนและฟรุกโตส ได้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเติบโต การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส การใช้ซูโครส การผลิตเด็กซ์แทรนและการผลิตฟรุกโตสของแบคทีเรียแลคติกที่จำแนกได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายและ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 473

4.2 การประมาณค่าพารามิเตอร์

ทำการประมาณค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเติบโต การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส การใช้ซูโครส การผลิตเด็กซ์แทรนและการผลิตฟรุกโตสโดยการหาค่าความแตกต่างที่น้อยที่สุดระหว่างค่าที่วัดได้จากผลการทดลองกับค่าที่คำนวณได้จากแบบจำลองทางคณิตศาสตร์โดยใช้วิธีการเปรียบเทียบเส้นโค้งที่เหมาะสมระหว่างแบบจำลองและค่าที่วัดได้จากการทดลอง (Curve fitting) โดยอาศัยโปรแกรมสำเร็จรูป Berkeley Madonna (http://www.berkeleymadonna.com) จะทำให้ได้ค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเติบโต การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส การใช้ซูโครส การผลิตเด็กซ์แทรนและการผลิตฟรุกโตสที่อุณหภูมิต่างๆ

ผลรวมของความคลาดเคลื่อนกำลังสองแบบมีน้ำหนัก (Weighted sum of squared errors) ถูกนำมาใช้เนื่องจากความแตกต่างของค่าเชิงตัวเลขของตัวแปรตาม อาจมีลำดับของขนาดต่างกัน ด้วยวิธีการนี้ขนาดของปริมาณที่วัดได้จะถูกทำให้เป็นค่าบรรทัดฐานด้วยค่าสัมประสิทธิ์ที่มีน้ำหนักเหมาะสม (โดยมักใช้ค่ากำลังสองของเศษหนึ่งส่วนค่าสูงสุดที่วัดได้ของตัวแปรตาม) ผลรวมของค่าคลาดเคลื่อนทั้งหมดได้จากค่าคลาดเคลื่อนของทุกชุดข้อมูลที่วัดได้จาก

การทดลองและจำนวนตัวแปรตามที่ทำการวัด จากการหาค่าเฉลี่ยจะได้ค่าที่ได้สามารถนำไปเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากการทดลองอื่นที่มีจำนวนของชุดข้อมูลแตกต่างกันได้

$$WSSE = \frac{1}{W}\sum_{j=1}^{M} W_j \sum_{i=1}^{N}\left(y_{ij} - \hat{y}_{ij}\right)^2$$

เมื่อ

y_{ij}	คือ ข้อมูลจากการทดลอง
$\hat{y}_{ij}$	คือ ข้อมูลจากการทำนาย
M	คือ จำนวนตัวแปรตามที่ทำการวัด
N	คือ จำนวนข้อมูลที่วัดได้จากการทดลอง
W_j	คือ ค่าสัมประสิทธิ์ของน้ำหนัก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

4.3 การหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ของแบบจำลองกับอุณหภูมิ

นำค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการเติบโต การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส การใช้ซูโครส การผลิตเด็กซ์แทรนและการผลิตฟรุกโตสที่อุณหภูมิต่างๆ มาทำการหาความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ที่ได้กับอุณหภูมิ โดยใช้สมการทางคณิตศาสตร์ที่เหมาะสมทำการเปรียบเทียบเส้นโค้งที่เหมาะสมระหว่างสมการทางคณิตศาสตร์ที่นำมาใช้ในการอธิบายการเปลี่ยนแปลงของค่าพารามิเตอร์กับอุณหภูมิในโปรแกรมสำเร็จรูป Berkeley Madonna จะได้สมการความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์กับอุณหภูมิ

4.4 การทวนสอบความถูกต้องของแบบจำลองทางคณิตศาสตร์

ทำการทดสอบความถูกต้องของแบบจำลองของการเติบโต การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส การใช้ซูโครส การผลิตเด็กซ์แทรนและการผลิตฟรุกโตส โดยทำการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการทำนายด้วยแบบจำลองกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

4.5 การนำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ที่ได้ไปใช้

นำแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของการเติบโต การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส การใช้ซูโครส การผลิตเด็กซ์แทรนและการผลิตฟรุกโตสที่สัมพันธ์กับอุณหภูมิของแบคทีเรียแลคติกที่ได้จากตอนที่ 4.3 มาทำการทำนายการเปลี่ยนแปลงของการเติบโต การผลิตเอนไซม์เด็กซ์แทรนซูเครส การใช้ซูโครส การผลิตเด็กซ์แทรนและการผลิตฟรุกโตสที่อุณหภูมิ 20 25 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ประมวลผลจากเครื่องคอมพิวเตอร์ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS version 11.5 จากบริษัท SPSS Thailand

สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย

1. สถานที่ทำการวิจัย ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ (AG 4204) ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และห้องปฏิบัติการกลาง คณะเกษตรศาสตร์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร
2. ระย์ะเวลาทำการวิจัยเริ่มตั้งแต่เดือนกันยายน พ.ศ. 2553 ถึงเดือนมีนาคม 2555