บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ของบริษัท HACH รุ่น DR/4000

เครื่องHigh Performance Liquid Chromatography (HPLC) ของบริษัท SHIMADZU

รุ่น C-R7Ae plus

ถังหมักขนาด 2 ลิตร

ตู้เย็นอุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO รุ่น MDF-U 4086S

ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท SANYO

ตู้บ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Phytotron climate simulator

เครื่องเขย่าเลี้ยงเชื้อที่สามารควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ของบริษัท Gallenkamp

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)รุ่น Falcon 6/300

เครื่องนึ่งความดันไอ (autoclave) ของบริษัท Hirayama รุ่น HA-300 HIV

เครื่องอบลมร้อน ของบริษัท Binder

เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง ของบริษัท SHIMADZU รุ่นLIBROR EB-40000 H

เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ของบริษัท Sartorius analytic รุ่น A 200 S

เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ของบริษัท Denver Instrument รุ่น Model 215

ตู้เขี่ยเชื้อ (Larmina flow) ของบริษัท ISSCO รุ่น BVT 123

โถดูดความชื้น

ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)

เข็มเขี่ยเชื้อ (niddle)

ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX^{R}

หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX^{R}

กระบอกตวง (cylinder)ของบริษัท PYREX^{R}

บีกเกอร์ (beaker)ของบริษัท PYREX^{R}

ปิเปตต์ (pipette)

คิวเวต (แก้ว)

3.2 สารเคมี

สารสกัดยีสต์ (yeast extract)

เปปโตน (peptone)

ยูเรีย (urea)

แลคโตส (lactose)

ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 .4 H_2O$)

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 . 7H_2O$)

แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

ไฮโดรคลอริก (HCl)

องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์กับเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) การหาน้ำตาลแลคโตส ดูในภาคผนวก ข.

3.3 วัตถุดิบ

เวย์ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท Minor Cheese Limited 9/1 หมู่ 6 ซอยทรัพย์จำปา ถนนมิตรภาพ ตำบลกลางดง อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา 30320

3.3.1 การเก็บวัตถุดิบ

เวย์ที่นำมาใช้ในงานวิจัยจะเก็บที่อุณหภูมิ – 70 องศาเซลเซียส

3.3.2 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

ก่อนใช้นำออกมาทำละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำไปให้ความร้อนที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเป็นการแยกโปรตีนออกจากเวย์ ทิ้งไว้ให้เย็น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที (ดัดแปลง จาก Kessler.1981) แยกไขมันโดยการกรองด้วยกระดาษกรอง Glass fiber (GC-50)

3.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.4.1 การเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการวิจัย

เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 ใช้เข็มเขี่ยเชื้อแล้ว streak ลงในอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก.) แล้วนำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน

จากนั้นใช้พาราฟิล์มพันปิดปากหลอดทดลองให้แน่น เก็บหลอดทดลอง ดังกล่าวไว้ในถุงพลาสติก แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ (subculture) ทุกๆ 2 สัปดาห์

3.4.2 การเตรียมกล้าเชื้อเริ่มต้น

เชื้อจุลินทรีย์ *Lactobacillus casei* TISTR 1341ถ่ายเชื้อจำนวน 2 ลูปลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก.) ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ที่อยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บน้ำหมักไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร (ปรับความขุ่นของน้ำหมักให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ด้วยอาหารเหลวชนิดเดิมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)

3.5 การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก

การศึกษาเปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารสูตรต่างๆ มีสูตรอาหารทั้งหมด 9 สูตรดังนี้

สูตรอาหาร	เวย์	สารสกัดยีสต์	เปปโตน	น้ำตาลแลกโตส	แร่ธาตุ
สูตรที่ 1	-	+	+	+	+
สูตรที่ 2	+	+	-	+	+
สูตรที่ 3	+	-	+	+	+
สูตรที่ 4	+	+	+	-	+
สูตรที่ 5	+	+	+	+	-
สูตรที่ 6	+	-	-	+	+
สูตรที่ 7	+	-	-	-	+
สูตรที่ 8	+	-	-	+	-
สูตรที่ 9	+	-	-	-	-

ที่มา : ดัดแปลงจาก Roukas and Kotzekidou (1998), Fu and Mathew (1999), Fitzpatrick *et al.* (2001) , Nancib *et al.* (2005) และ Idris and Suzana (2006)

หมายเหตุ + หมายถึง เติม

- หมายถึง ไม่เติม

ปริมาณสารอาหารที่ใช้ในอาหารทั้ง 9 สูตร มีดังนี้

สารสกัดยีสต์	5	กรัมต่อลิตร
เปปโตน	10	กรัมต่อลิตร
น้ำตาลแลคโตส	50	กรัมต่อลิตร
แหล่งแร่ธาตุ ประกอบด้วย		
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.25	กรัมต่อลิตร
แมงกานีสซัลเฟต	0.03	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.1	กรัมต่อลิตร

สูตรที่ 1 ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ใช้เป็นชุดควบคุม
สูตรที่ 2 – 9 ใช้เวย์เป็นตัวทำละลายเพื่อปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร

สูตรอาหารทั้ง 9 สูตรนี้เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรสูตรอาหารร้อยละ 70 (350 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 ($\pm$ 1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลกโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อจากข้อ 3.4.2 ร้อยละ 5 ลงในอาหารทั้ง 9 สูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักที่สภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีของ A.O.A.C 2000 (ภาคผนวก ข) ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.6 การศึกษาสภาวะต่างๆที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแลกติก

3.6.1 การศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

เลือกสูตรอาหารที่ทำให้เชื้อเจริญและผลิตกรดแลกติกที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 โดยผันแปรชนิดแหล่งไนโตรเจน ดังนี้

สูตรอาหาร	สารสกัดยีสต์ (ร้อยละ)	เปปโตน (ร้อยละ)	ยูเรีย (ร้อยละ)
สูตรที่ 1	0.5	-	-
สูตรที่ 2	-	0.5	-
สูตรที่ 3	0.5	1	-
สูตรที่ 4	0.5	-	0.5
สูตรที่ 5	-	1	0.5
สูตรที่ 6	0.5	-	1
สูตรที่ 7	-	1	1
สูตรที่ 8	0.5	1	0.5
สูตรที่ 9	0.5	1	1

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เติม

สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรสูตรอาหารร้อยละ 70 (350 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารที่เตรียม 9 สูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการหมักที่สภาวะนิ่ง เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีของ A.O.A.C 2000 (ภาคผนวก ข) ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.6.2 การศึกษาความเร็วรอบที่เหมาะสม

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 และข้อ 3.6.1 โดยผันแปรความเร็วรอบ ดังนี้

สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 และข้อ 3.6.1เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรสูตรอาหารร้อยละ 70 (350 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่สภาวะนิ่งและที่ความเร็วรอบ 50 70 100 และ 150 รอบต่อนาที เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีของ A.O.A.C 2000 (ภาคผนวกข) ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของ ตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.6.3 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 และข้อ 3.6.1โดยผันแปรอุณหภูมิดังนี้

สูตรอาหารที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 และข้อ 3.6.1เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรสูตรอาหารร้อยละ 70 (350 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลคโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหาร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง 35 37 38 40และ 42 องศาเซลเซียสทำการหมักสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2 เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งด้วยวิธีของ A.O.A.C 2000 (ภาคผนวก ข) ปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.6.4 การศึกษาปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนตที่เหมาะสม

โดยเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.1 โดยผันแปรปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต ดังนี้

สูตรอาหาร	ปริมาณแคลเซียมคาร์บอเนต (ร้อยละ)
สูตรที่ 1	0
สูตรที่ 2	1
สูตรที่ 3	2
สูตรที่ 4	3
สูตรที่ 5	4
สูตรที่ 6	5

สูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.1 เตรียมในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรสูตรอาหารร้อยละ 70 (350 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 (± 1) ปิดจุกด้วยสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับน้ำตาลแลกโตสแยกนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารที่เตรียม 6 สูตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.3 ในสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2 เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วัดค่าพีเอชตลอดการทดลอง วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely randomized design (CRD) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Duncans New Multiple Range Test (DMRT)

3.7 ศึกษาการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* TISTR 1341 โดยการหมักระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตรและการหมักระดับถังหมักขนาด 2 ลิตร

3.7.1 การผลิตกรดแลกติกระดับฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5 3.6.1 และ 3.6.4 มาทำการผลิตกรดแลกติก โดยใช้การหมักระดับฟลาสก์สภาพการหมักแบบกะโดยใช้ ฟลาสก์ขนาดใหญ่ 2 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรร้อยละ 70 (1330 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นเติมหัวเชื้อร้อยละ 5 (70 มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.3 ในสภาวะที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2 เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956

(ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี T - test

3.7.2 การผลิตกรดแลกติกโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร

เลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมจากที่ได้ศึกษาในข้อ 3.5 3.6.1 และ 3.6.4 มาทำการผลิตกรดแลกติกโดยใช้การหมักในถังหมักสภาพการหมักแบบกะโดยใช้ถังหมักขนาด 2 ลิตร ใส่อาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร ร้อยละ 70 (1330 มิลลิลิตร) ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 (70 มิลลิลิตร) ควบคุมอุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.3 กวนด้วยใบพัดในอัตรา 100 รอบต่อนาที (Gao *et al*. 2006) ไม่ต้องพ่นอากาศ เก็บน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง วิเคราะห์หาปริมาณกรดแลกติกโดยเครื่อง HPLC (ภาคผนวก ข) และปริมาณน้ำตาลแลคโตสตามวิธีของ Dobois.1956 (ภาคผนวก ข) วิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ SPSS เวอร์ชัน 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี T-test