บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการศึกษา

วัตถุดิบ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1 วัตถุดิบ

- ข้าวกล้องหอมมะลิ ตราเบอร์ 5 จากโลตัส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
- นมผงขาดมันเนยที่ผ่านการทำให้แห้งโดยกระบวนการ Spray drying ตรามิชชั่น (Mission, New Zealand)
- คาราจีแนน (carrageenan type K-100) (Copenhagen Pectin A/S, Denmark)
- น้ำตาลทรายขาว ตรามิตรผล จากโลตัส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
- น้ำผึ้งลำไย จากฟาร์มผึ้งสุภา อ.แม่ริม จ.เชียงใหม่
- เชื้อโยเกิร์ต *Lactobacillus bulgaricus* และ *Streptococcus thermophilus* YC-380 (Chr. Hansen, Denmark)
- เชื้อโพรไบโอติค *Bifidobacterium longum* Bb-46 (Chr. Hansen, Denmark)

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตโยเกิร์ต

- เตาแก๊สที่ใช้ในครัวเรือน
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส (Gallenkamp, England)
- หม้อนึ่งความดัน (Gallenkamp, England)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert, USA)
- บีกเกอร์แก้ว (Pyrex, USA)
- ขวดแก้วฝาเกลียว (Schott Duran, Germany)
- ปิเปตแบบ Measuring pipettes (HBG, Germany)
- อะลูมิเนี่ยมฟอยด์ (Diamond, USA)
- หม้ออะลูมิเนียม
- เครื่องปั่นผสม (Otto, Thailand)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตไอศกรีม

- เครื่องปั่นไอศกรีม (Simac gelataio, England)
- ตู้แช่ (Sharp, Thailand)
- เครื่องวัดอุณหภูมิ (Digicaon, Thailand)

3.2.3 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางกายภาพ

- เครื่องวัดสี ColorQuest II (Hunter Laboratory Inc., USA)
- เครื่องวัดความข้นหนืด Brookfield Rotary Viscometer (USA)
- เครื่องวัดความแน่นเนื้อ Instron Model 5565 (USA)

3.2.4 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี

- เครื่องวัดค่า pH (Hanna Instrument, Italy)
- บิวเรตขนาด 25 และ 50 มิลลิลิตร (HBG, Germany)
- ปีเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (HBG, Germany)
- ตู้อบลมร้อน (Hot air oven, Memmert, USA)

3.2.5 อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

- ปีเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร (HBG, Germany)
- จานเลี้ยงเชื้อ
- หม้อนึ่งความดัน (Gallenkamp, England)
- ขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 100, 250 และ 500 มิลลิลิตร (Schott Duran, Germany)
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37$\pm$ 1 องศาเซลเซียส (Gallenkamp, England)
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี
- ตู้เย็น (Sharp, Thailand)
- เครื่องเหวี่ยง Centrifuge (Hermle, Germany)
- Vortex (Heidolph, Germany)

3.3 สารเคมี

- น้ำกลั่น
- Sodium hydroxide (Merck, Germany)
- HCl (Merck, Germany)
- Methylene blue (Fluka, Switzerland)
- Phenolphthalein (Merck, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- MRS broth (Himedia, India)
- Agar (โอ.วี. เคมิคอล ประเทศไทย)
- Yeast extract (Merck, Germany)
- Tryptone (Merck, Germany)
- Casamino acids (Difco, USA)
- Potassium dihydrogen phosphate (M&B, USA)
- Fructose (Fluka, Switzerland)
- Pepsin 600 units/ mg protein (Sigma, Germany)
- Oxgall (Bile bovin, B3883, Sigma, USA)
- Potassium dihydrogen phosphate (Merck, Germany)

3.4 เครื่องประมวลผลข้อมูล

- โปรแกรมประมวลผลสำเร็จรูป SPSS V.10.0

3.5 วิธีการศึกษา

ตอนที่ 1 การผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้อง โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง และไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum*

1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Starter culture propagation)

เชื้อโยเกิร์ต และเชื้อโพรไบโอติคเริ่มต้น เป็นเชื้อแบบแห้งที่ถูกทำให้แห้งโดยวิธีการแช่แข็ง (Freeze dried) โดยเชื้อโพรไบโอติคที่ใช้ในการศึกษาคือ *B. longum* มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 1.0×10^8 CFU/g และเชื้อโยเกิร์ตเป็นเชื้อในกลุ่มเทอร์โมฟิลิคแลคติค ได้แก่ *Streptococcus thermophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* มีเชื้อเริ่มต้นประมาณ 1.0×10^{10} CFU/g (ณัติพร, 2548)

1.1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้นขั้นแรก (Stock culture)

เตรียมสารละลายลิตมัส (Litmus solution) ซึ่งมีส่วนประกอบคือ นมผงขาดมันเนย ปริมาณร้อยละ 16 ลิตมัสที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาณร้อยละ 2 ยีสต์เอกสแตรกท์ ปริมาณร้อยละ 0.3 และใช้แคลเซียมคาร์บอเนตประมาณ 0.2 กรัมใส่ที่ก้นหลอดทดลองขนาด 15x160 มิลลิลิตร แล้วตวงสารละลายลิตมัสใส่ให้มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแช่หลอดทดลองที่บรรจุสารละลายลิตมัสในน้ำที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

B. longum และ เชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* ที่เตรียมจากข้อ 1.1 มาเพาะในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายลิตมัสดังกล่าว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำหลอดทดลองที่เพาะเชื้อ *B. longum* และ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคต่อไป โดยนำมาใช้ภายใน 2 สัปดาห์ (ณัติพร, 2548)

1.1.2 การทำ Mother culture

Mother culture มีส่วนประกอบคือ นมผงขาดมันเนย ปริมาณร้อยละ 16 และยีสต์เอกสแตรกท์ ปริมาณร้อยละ 0.1 เตรียมในปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในขวดฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงโดยแช่น้ำที่อุณหภูมิห้องจนอุณหภูมิเป็น 37 องศาเซลเซียส นำเชื้อ *B. longum* และเชื้อโยเกิร์ต ที่เตรียมจากขั้นแรก (1.1.1) มาเพาะใน Mother culture ที่เตรียมไว้ โดยเติมเชื้อ *B. longum* และเชื้อโยเกิร์ต ปริมาณร้อยละ 2 โดยปริมาตร (ในแต่ละขวดแยกชนิดกัน) นำเข้าบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 36ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการผลิต โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคต่อไป โดยนำมาใช้ภายใน 7 วัน (ณัติพร, 2548)

1.1.3 การทำ Intermediate starter

Intermediate starter มีส่วนประกอบคือ นมผงขาดมันเนย ร้อยละ 16 ปริมาณ 400 มิลลิลิตร ในขวดแก้วฝาเกลียวขนาด 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแช่น้ำที่อุณหภูมิห้อง นำเชื้อ *B. longum* และโยเกิร์ตจาก Mother culture มาเพาะปริมาณร้อยละ 2 โดยปริมาตร และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง หรือจนมีค่า pH 3.8 – 4.0 นำไปเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นำมาใช้ภายใน 2 วัน เชื้อที่เพาะได้จาก Intermediate starter นี้จะใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำโยเกิร์ตข้าวกล้อง โดยมีการตรวจสอบความบริสุทธิ์โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหาร HHD agar โดยวิธี spread plate บ่มในสภาพไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง และย้อมสีแกรมดูลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ณัติพร, 2548)

1.2 การผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้อง

1.2.1 สูตรของโยเกิร์ตข้าวกล้อง

สูตรโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum* แสดงในตารางที่ 4

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 4 สูตรโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติค หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

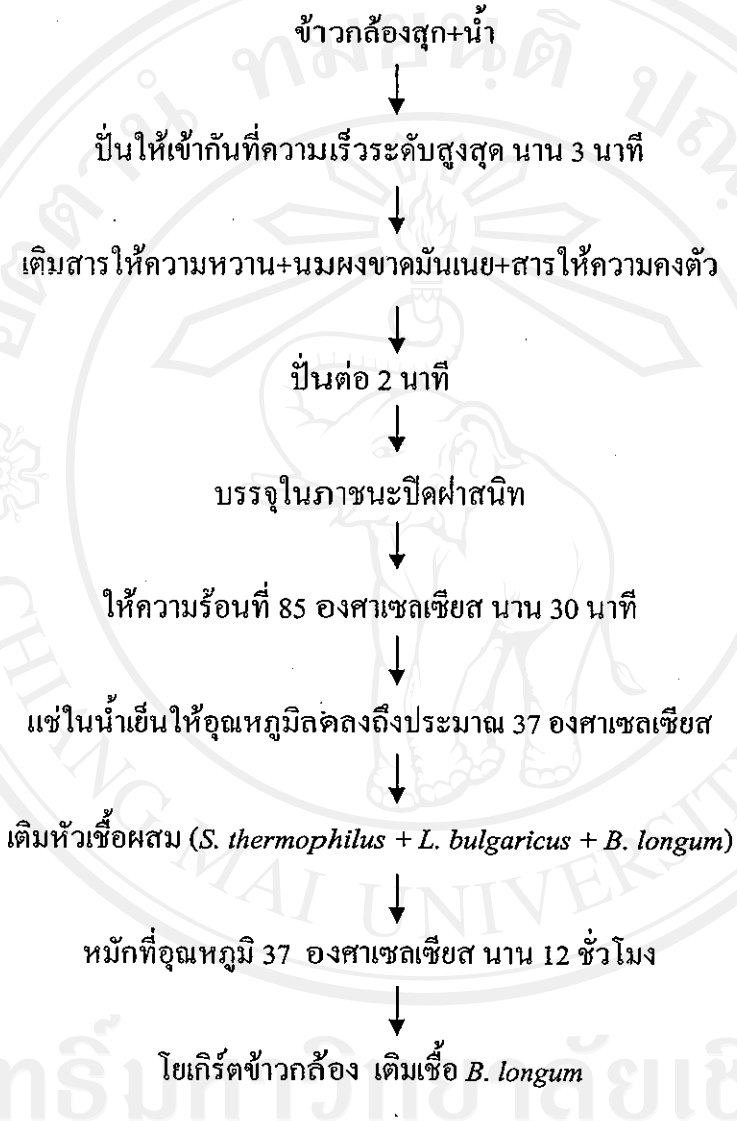
ส่วนประกอบ	ปริมาณ (ร้อยละ)	
	คำนวณตามส่วนประกอบหลัก	คำนวณตามส่วนประกอบรวมทั้งหมด
หลัก		
น้ำ	85.71	69.56
ข้าวกล้องสุก	14.29	11.60
อื่น ๆ		
นมผงขาดมันเนย	10.15	6.13
น้ำผึ้ง	10.00	8.24
คาราจีแนน	0.078	0.063
หัวเชื้อ *B. longum*	2	1.62
หัวเชื้อโยเกิร์ต (*S. thermophilus* + *L. bulgaricus.*)	1	0.81

ที่มา : ณัติพร (2548)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.2 กรรมวิธีการผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้อง เติมเชื้อ *B. longum*

การผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum* มีกรรมวิธีการผลิตเป็นขั้นตอนดังนี้ (ณัติพร, 2548)



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

1.2.3 กรรมวิธีการผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่ม เติมเชื้อ *B. longum*

การผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มเติมเชื้อ *B. longum* มีกรรมวิธีการผลิตเป็นขั้นตอน ดังนี้ (ดัดแปลงจากรัชนีกร, 2528)

ปั่นโยเกิร์ตข้าวกล้องด้วยเครื่องปั่น 10 วินาที

↓

เติมน้ำเชื่อม หรือน้ำผึ้งที่มีความหวาน 35 องศาบริกซ์ ลงไปในโยเกิร์ตข้าวกล้องจากข้อ 1.2.2 ในอัตราส่วน 1 : 1

↓

ปั่นด้วยเครื่องปั่นนาน 20 วินาที

↓

โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล หรือ โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง

1.2.4 กรรมวิธีการผลิตไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง เติมเชื้อ *B. longum*

การผลิตไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum* มีกรรมวิธีการผลิตเป็นขั้นตอน ดังนี้ (ณัติพร, 2548)

โยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum* จากข้อ 1.2.2

↓

นำโยเกิร์ตใส่ลงในเครื่องผลิตไอศกรีมที่เปิดเครื่องทิ้งไว้ 15 นาที ปิดฝา แล้วเปิดใบกวนเป็นเวลา 20 นาที

↓

บรรจุไอศกรีมโยเกิร์ตลงถ้วยพลาสติกแล้วปิดฝา

↓

ไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 2 การวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ของโยเกิร์ตข้าวกล้อง โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง และไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง เติมเชื้อ *B. longum*

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากตอนที่ 1.2 ได้แก่ โยเกิร์ตข้าวกล้อง โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง ที่เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส และไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง ที่เก็บที่ -12 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1 วัน มาทำการวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์

2.1 คุณภาพทางด้านกายภาพ (physical qualities)

- ค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสีในหน่วย Hunter (L* a* b*) (ภาคผนวก ค-1)
- ค่าความข้นหนืด (Viscosity) ใช้หน่วยการวัดเป็นเซนติพอยส์ (Centipoise) (ภาคผนวก ค-2) (สำหรับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต)
- ค่าการตีฟู (ภาคผนวค ค-3) (สำหรับผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตที่จะนำมาปั่นเป็นไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง)
- ค่าการละลาย (ภาคผนวค ค-4) (สำหรับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง)
- ค่าความแน่นเนื้อ หรือเนื้อสัมผัส (Firmness) โดยเครื่อง TAXTplus Texture Analyser (ภาคผนวค ค-5) (สำหรับผลิตภัณฑ์ไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง)

2.2 คุณภาพทางด้านเคมี (chemical qualities)

- ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ (ภาคผนวก ข-1)
- ค่า pH โดยใช้เครื่องวัด pH (Hanna Instrument, Italy) (ภาคผนวก ข-2)
- ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (ภาคผนวก ข-3)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Refractometer, ATAGO, Japan)

2.3 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์ (microbiological qualities)

- นับจำนวนเริ่มต้นทั้งหมดของ *S. thermophilus L. bulgaricus* และ *B. longum* โดยใช้วิธีเพลทเคาน์ (Viable plate count) แบบ pour plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (IDF Standard, 1997) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาพไร้ออกซิเจน (ภาคผนวก ก-1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- นับจำนวนของเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ HHD agar (ภาคผนวก ก-2)
- นับจำนวนของเชื้อ *B. longum* โดยใช้วิธี Subtraction method (Dave and Shah, 1996) (ภาคผนวก ก-2)

ตอนที่ 3 การศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และจุลินทรีย์ ของโยเกิร์ตข้าวกล้อง โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง และไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง เติมเชื้อ *B. longum* ที่เก็บเป็นระยะเวลา 35 วัน

เก็บอาหารทั้ง 4 ชนิด ที่ผลิตได้จากขั้นตอน 1.2 ได้แก่ โยเกิร์ตข้าวกล้อง โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง ที่อุณหภูมิ -12 องศาเซลเซียส แล้วทำการวิเคราะห์คุณภาพทางด้านกายภาพ เคมี และวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *B. longum* ที่เหลือรอดในอาหาร ที่เวลา 1 (ขั้นตอนที่ 2), 7, 14, 21, 28 และ 35 วัน

3.1 คุณภาพทางด้านกายภาพ

- วัดค่าสีโดยใช้เครื่องวัดสีในหน่วย Hunter (L* a* b*) (ภาคผนวก ค-1)
- วัดค่าความหนืด (Viscosity) ใช้หน่วยการวัดเป็นเซนติพอยส์ (Centipoise) (ภาคผนวก ค-2)
- วัดค่าการตีฟู (ภาคผนวค ค-3)
- วัดค่าการละลาย (ภาคผนวค ค-4)
- วัดค่าความแน่นเนื้อ หรือเนื้อสัมผัส (Firmness) โดยเครื่อง TAXTplus Texture Analyser (ภาคผนวค ค-5)

3.2 คุณภาพทางด้านเคมี

- หาปริมาณกรดทั้งหมดที่ไตเตรทได้ (ภาคผนวก ข-1)
- วัดค่า pH โดยใช้เครื่องวัด pH (Hanna Instrument, Italy) (ภาคผนวก ข-2)
- หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (AOAC, 1998) (ภาคผนวก ข-3)
- ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Refractometer, ATAGO, Japan)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.2 คุณภาพทางด้านจุลินทรีย์

- นับจำนวนเริ่มต้นทั้งหมดของ *S. thermophilus L. bulgaricus* และ *B. longum* โดยใช้วิธีเพลทเคาน์ (Viable plate count) แบบ pour plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (IDF Standard, 1997) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาพไร้ออกซิเจน (ภาคผนวก ก-1)

- นับจำนวนของเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ HHD agar (ภาคผนวก ก-2)

- นับจำนวนของเชื้อ *B. longum* โดยใช้วิธี Subtraction method (Dave and shah, 1996) (ภาคผนวก ก-2)

ตอนที่ 4 การศึกษาปริมาณของเชื้อ *B. longum* ที่เหลือรอดในน้ำย่อยเทียม ในโยเกิร์ตข้าวกล้อง โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง และไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง เติมเชื้อ *B. longum*

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอน 1.2 ได้แก่ โยเกิร์ตข้าวกล้อง โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง และไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง มาย่อยในน้ำย่อยเทียมที่ pH 2.0 และ 3.0 แล้ววิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *B. longum* ที่เหลือรอดในผลิตภัณฑ์ ที่เวลา 0.33 (20 วินาที), 15, 30, 60 และ 120 นาที

4.1 การเหลือรอดของเชื้อ *B. longum* ในน้ำย่อยเทียม ที่มี pH 2.0 และ 3.0

4.1.1 การเตรียมน้ำย่อยเทียม

ขั้นตอนนี้ใช้วิธีการของ Lian et al. (2003) ซึ่งมีการเตรียม ดังนี้

เตรียมสารละลาย pepsin ความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำเกลือ (saline) ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ปริมาตรต่อปริมาตร เป็นตัวทำละลาย ปรับ pH เป็น 2.0 และ 3.0 ด้วย 12 นอร์มัล สารละลายกรดไฮโดรคลอริก นำสารละลายที่ได้ไปสเตอร์ไรซ์ โดยฉีดผ่านเมมเบรนขนาด 0.45 ไมครอน

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

4.1.2 การย่อยผลิตภัณฑ์ในน้ำย่อยเทียม

ขั้นตอนนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lian et al. (2003) ซึ่งมีขั้นตอน ดังนี้

นำผลิตภัณฑ์จากโยเกิร์ต เติมเชื้อ *B. longum* ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ โยเกิร์ตข้าวกล้อง โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง และไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง ปริมาณอย่างละ 1.0 กรัม ใส่ลงในน้ำย่อยเทียม (simulated gastric juice) ที่มีอยู่ในหลอดทดลอง หลอดละ 9.0 มิลลิลิตร โดยนำสารละลายในหลอดทดลองไปอุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเติมผลิตภัณฑ์ นำไปเขย่าเพื่อให้อาหารกระจายตัวได้ดีในสารละลาย เป็นเวลา 20 วินาทีด้วย vortex จากนั้นเก็บตัวอย่างทั้ง 4 หลอดทดลอง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0.33 (20 วินาที), 15, 30, 60 และ 120 นาที เพื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณ *B. longum* ที่หลงเหลือหลังจากผ่านการย่อยด้วยน้ำย่อยเทียม โดยสุ่มตัวอย่างตามเวลาข้างต้นมา 1.0 มิลลิลิตร นำมาผสมกับฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PB) 10.0 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง จากนั้นนำไป centrifuge (6,000 x g) ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วล้าง 2 ครั้งด้วยน้ำเกลือ (saline) 10.0 มิลลิลิตร เจือจางด้วย PB และนำไปหาปริมาณเชื้อ *B. longum*

4.1.3 การหาปริมาณเชื้อ *B. longum* ที่เหลือรอดจากขั้นตอน 4.1.2

- นับจำนวนเริ่มต้นทั้งหมดของ *S. thermophilus L. bulgaricus* และ *B. longum* โดยใช้วิธีเพลทเคาน์ (Viable plate count) แบบ pour plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (IDF Standard, 1997) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาพไร้ออกซิเจน (ภาคผนวก ก-1)

- นับจำนวนของเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ HHD agar (ภาคผนวก ก-2)

- นับจำนวนของเชื้อ *B. longum* โดยใช้วิธี Subtraction method (Dave and Shah, 1996) (ภาคผนวก ก-2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตอนที่ 5 การศึกษาปริมาณของเชื้อ *B. longum* ที่เหลือรอดในสารละลายน้ำดีเทียม ในโยเกิร์ตข้าวกล้อง โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง และไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง เติมเชื้อ *B. longum*

นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอน 1.2 ได้แก่ โยเกิร์ตข้าวกล้อง โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำตาล โยเกิร์ตข้าวกล้องพร้อมดื่มสูตรน้ำผึ้ง และไอศกรีมโยเกิร์ตข้าวกล้อง มาย่อยในน้ำดี ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 แล้ววิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *B. longum* ที่เหลือรอดในผลิตภัณฑ์ ที่เวลา 0.33 (20 วินาที), 15, 30, 60 และ 120 นาที

5.1 การเหลือรอดของเชื้อ *B. longum* ในน้ำดีเทียม ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0

5.1.1 การเตรียมสารละลายน้ำดีเทียม

การเตรียมสารละลายน้ำดีเทียม ดัดแปลงจากวิธีของ Lian et al. (2003) ซึ่งมีการเตรียมดังนี้

ละลาย bovine powder (มีส่วนประกอบ คือ chenodeoxycholic acid 100 มิลลิกรัม, cholic acid 25 กรัม, cholic acid methyl ester 1 กรัม, dehydrocholic acid 25 กรัม, Sodiun salt 25 กรัม, deoxycholic acid 10 กรัม และ Lithocholic acid 1 กรัม) ปริมาณ 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมให้มีความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0 แล้วนำสารละลายที่ได้ไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5.1.2 การย่อยผลิตภัณฑ์ในสารละลายน้ำดีเทียม

ขั้นตอนนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Lian et al. (2003) ซึ่งมีขั้นตอนเช่นเดียวกับข้อ 4.1.2 โดยทำการทดสอบในสารละลายน้ำดีเทียม ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 2.0

5.1.3 การหาปริมาณเชื้อ *B. longum* ที่เหลือรอดจากขั้นตอน 5.1.2

- นับจำนวนเริ่มต้นทั้งหมดของ *S. thermophilus L. bulgaricus* และ *B. longum* โดยใช้วิธีเพลทเคาน์ (Viable plate count) แบบ pour plate ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (IDF Standard, 1997) นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาพไร้ออกซิเจน (ภาคผนวก ก-1)

- นับจำนวนของเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ HHD agar (ภาคผนวก ก-2)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- นับจำนวนของเชื้อ *B. longum* โดยใช้วิธี Subtraction method (Dave and Shah, 1996) (ภาคผนวก ก-2)

ตอนที่ 6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (Cochran and Cox, 1957)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved