บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.1 น้ำตาลโตนด

ซื้อน้ำตาลโตนด จากชาวบ้าน หมู่ที่ 3 ตำบลบาราโหม อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี โดยน้ำตาลโตนดที่นำมาศึกษาไม่ใส่ไม้เคี่ยมหรือเปลือกไม้สำหรับฆ่าเชื้อตามวิธีพื้นบ้าน จากนั้นนำน้ำตาลโตนดมากรองเพื่อแยกสิ่งแปลกปลอมออกก่อนฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิทันทีให้ได้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บรรจุใส่แกลลอนพลาสติก เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3.1.2 น้ำตาลทราย

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- Yeast extract (Himedia)
- Malt extract (Himedia)
- Peptone, Bacterilogical (Himedia)
- D-glucose (Ajax)
- Agar (Himedia)
- Sodium chloride (NaCl, Lab-Scan)
- Acetic acid (Lab-Scan)
- 99% Ethanol (C_2H_5OH, Merck)
- Butan-1-ol (Lab-Scan)
- Methanol (Merck)
- Sodium hydroxide (NaOH, Merck)
- Phenolphtalein (Carlo ERGA)
- Potassium hydrogen phthalate ($KHC_8H_4O_4$)
- Calcium carbonate ($CaCO_3$, Ajax)
- Mannitol (Univar)
- Skim milk (Himedia)
- Mono-sodiumglutamate (Aldrich)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- Ammonium sulfate (Lab-Scan)
- Sodium sulphite (Ajax)
- 3,5-Dinitrosalicyic acid (Aldrich)
- Phenol crystallized (Panreac)
- Potassium sodium tartrate (Ajax)
- Mono-sodium phosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$)
- Di-sodium phosphate ($Na_2HPO_4.2H_2O$)

3.1.3 วัสดุ

- ตัวกรองปลอดเชื้อ (syringe filter) ชนิด CA (cellulose acetate) ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (Minisart, Sartorius stidim biotech)
- หลอดฉีดยา ขนาด 5 มิลลิลิตร
- ซองพลาสติกใส (ฟิล์มไนลอนและโพลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำเชิงเส้นตรง, NY/LLDPE) ขนาด 90x75 มิลลิเมตร
- ซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนต (อะลูมิเนียมและโพลิเอทิลีนความหนาแน่นต่ำเชิงเส้นตรง, ALU/LLDPE) ขนาด 90x75 มิลลิเมตร

3.2 เครื่องมือ

- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge, Hettich Zencrifuhen รุ่น ROTINA 420R)
- ตู้อบ (Oven, Memmert รุ่น 600)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave, HIRAYAMA)
- เตาไมโครเวฟ (Microwave, Sharp รุ่น Corousel)
- ตู้เย็น (Refrigerator, Sanyo)
- ตู้อบลมร้อน (Memmert, รุ่น UNB 500)
- โถดูดความชื้น (Desiccators)
- เครื่องเขย่า (Shaker, Chil Tern scientific รุ่น Orbital Shaker SS70)
- เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (Water activity meter, Aqua Lab, รุ่น 4TE)
- เครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dryer, Flexi-dry)
- เครื่องวัดพีเอช (pH meter, Mettler Toledo, รุ่น SevenEasy S-20K)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Callcnkamp Serial Number SG98/07/452)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- ตู้ปลอดเชื้อลมเป่า (Laminar flow, Merit รุ่น 0192)
- เครื่องผสม (Vortex mixer, Scientific Industries รุ่น Vortex Genie 2)
- ไมโครปิเปต (Micropipet, Rainin)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (Hand refractometer, Atago รุ่น N1)
- เทอร์โมมิเตอร์ (Thermometer, TEL-TRU)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, biochom รุ่น LibraS22)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Thermo Scientifi รุ่น Spectronic15)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น TG 5002-S)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น ED2245)
- เครื่อง Gas chromathography (GC, Agilent รุ่น 6890N series)

3.3 การเตรียมกล้าเชื้อ และวัตถุดิบ

3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5049

เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR5049 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่เลี้ยงบนอาหาร YM agar slant (ประกอบ ด้วย ยีสต์สกัด 3.0 กรัม, มอลต์สกัด 5.0 กรัม, เปปโตน 5.0 กรัม, กลูโคส 10.0 กรัม และผงวุ้น 20.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษา และถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ 1 เดือน

3.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อ *Acetobacter aceti*

เชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ที่เลี้ยงบนอาหาร GYE agar (ประกอบด้วย กลูโคส 100.0 กรัม, ยีสต์สกัด 10.0 กรัม และผงวุ้น 20.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษา และถ่ายเชื้อใหม่ทุกๆ 1 เดือน จำนวน 1 ลูป มาเลี้ยงในอาหาร GYE broth (ประกอบด้วย กลูโคส 100.0 กรัม และยีสต์สกัด 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร) ปริมาตร 150 มิลลิลิตร และเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.3 การเตรียมน้ำตาลโตนด

นำน้ำตาลโตนดที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำมาฆ่าเชื้อโดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิทันทีให้ได้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สำหรับใช้ในการศึกษาต่อไป

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5049 และเชื้อ *Acetobacter aceti* ในน้ำตาลโตนด

3.4.1.1 ศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5049 ในน้ำตาลโตนด

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ *S. cerevisiae* TISTR 5049 จำนวน 1 ลูป ลงในน้ำตาลโตนดที่ปราศจากเชื้อ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีการปรับความหวานด้วยน้ำตาลทรายเป็น 20 องศาบริกซ์ บรรจุในฟลาส์ก ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (Horiuchi *et al.,* 2000) จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5049 ปริมาณร้อยละ 5 (v/v) ลงใน น้ำตาลโตนด ปริมาตร 4 ลิตร ที่ปรับปริมาณความหวานด้วยน้ำตาลทรายเป็น 20 องศาบริกซ์ บรรจุในภาชนะหมัก ขนาด 6 ลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยใช้สภาวะในการหมักที่แตกต่างกัน ได้แก่ สภาวะการหมักแบบมีอากาศ ปิดฝาภาชนะหมักด้วยจุกสำลี และสภาวะการหมักแบบไม่มีอากาศ ปิดฝาภาชนะหมักแบบปิดสนิทโดยมีสายยางต่อเพื่อถ่ายเทแก๊สที่เกิดขึ้นออกนอกถังหมัก จากนั้นหมักจนได้ไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอลในช่วงร้อยละ 6-8 โดยสุ่มตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 7 วัน เพื่อวัดการเจริญเติบโตของยีสต์โดยใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *S. cerevisiae* โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM agar วัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก (AOAC., 2000) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี dinitrosalicylic colorimetric method (DNS method) (Miller, 1959) และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่อง gas chromatography (GC)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.4.1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Acetobacter aceti* ในน้ำตาลโตนด

3.4.1.2.1 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกล้าเชื้อบริสุทธิ์ *A. aceti* สายพันธุ์ต่างๆ

เตรียมไวน์น้ำตาลโตนดตามข้อ 3.4.1 ที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 6 และ 8 โดยใช้ปริมาตร 200 มิลลิลิตร มาทำให้ปราศจากเชื้อโดยต้มด้วยความร้อน โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิทันทีให้ได้อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บรรจุในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อแบคทีเรีย *A. aceti* TISTR 102, *A. aceti* TISTR 103, *A. aceti* TISTR 522 และ *A. aceti* TISTR 1074 ที่เลี้ยงในอาหาร GYE broth (ประกอบด้วย กลูโคส 100.0 กรัม, ยีสต์สกัด 10.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1.0 ลิตร) ที่มีปริมาณเซลล์ OD_{600} เท่ากับ 0.5 ปริมาณ ร้อยละ 5 (v/v) แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อวินาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar วัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter วิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก (AOAC., 2000) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี dinitrosalicylic colorimetric method (DNS method) (Miller, 1959) และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง gas chromatography (GC)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.4.1.2.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนด

นำเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ซึ่งมีความสามารถในการเจริญเติบโตและผลิตกรดอะซิติกในน้ำตาลโตนดได้ดีที่สุด ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ซึ่งมีปัจจัยต่างๆ ดังนี้

1) ปริมาณน้ำตาลกลูโคส

เตรียมน้ำตาลโตนดที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร และปรับปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ ร้อยละ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 (w/v) เพื่อศึกษาผลของปริมาณน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 จากนั้นถ่ายเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ที่เลี้ยงในอาหาร GYE broth ปริมาณ ร้อยละ 5 (v/v) หลังจากนั้นนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยสุ่มตัวอย่างทุกวัน เพื่อวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งเพื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโต วัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก (AOAC., 2000)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

2) ชนิดและปริมาณไนโตรเจน

เตรียมน้ำตาลโตนดที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสม เพื่อศึกษาผลของชนิดและปริมาณไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ได้แก่ ยีสต์สกัด และแอมโมเนียมซัลเฟต ปริมาณร้อยละ 0.2, 0.4, 0.6 และ 0.8 (w/v) โดยมีวิธีการทดลองและการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

Prince of Songkla University Pattani Campus

3) ค่าพีเอช

เตรียมน้ำตาลโตนดที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส และชนิดและปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสม เพื่อศึกษาผลของปริมาณค่าพีเอชต่างๆ ได้แก่ 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 โดยปรับค่าพีเอชด้วยกรดอะซิติก โดยมีวิธีการทดลองและการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

4) อัตราการให้อากาศต่อการหมัก

เตรียมน้ำตาลโตนดที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ชนิดและปริมาณไนโตรเจน และค่าพีเอชที่เหมาะสม เพื่อศึกษาผลของอัตราการให้อากาศต่อการหมักโดยการเขย่าที่ความเร็วรอบต่างๆ ได้แก่ 100, 130 และ180 รอบต่อนาที ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 โดยมีวิธีการทดลองและการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1)

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

3.4.1.2.3 การเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในสภาวะการหมักที่เหมาะสม

เลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่ปราศจากเชื้อ 400 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด ร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นด้วยกรดอะซิติก เท่ากับ 6.0 และอัตราการให้อากาศต่อการหมักโดยการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในสภาวะที่เหมาะสม โดยสุ่มตัวอย่างทุกวัน เพื่อวัดการเจริญของแบคทีเรียโดยใช้วิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar วัดค่าพีเอชด้วยเครื่อง pH meter และวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก (AOAC., 2000)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.4.2 ศึกษาผลของสารปกป้องเซลล์ อุณหภูมิ และตัวพยุงต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 โดยการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ

3.4.2.1 สารปกป้องเซลล์และอุณหภูมิในการทำแห้ง

เลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่ปราศจากเชื้อ 400 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด ร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นด้วยกรดอะซิติก เท่ากับ 6.0 และอัตราการให้อากาศต่อการหมักโดยการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ซึ่งเป็นระยะการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) จากนั้นนำมาเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 9,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ และนำไปเซนติ-ฟิวส์ด้วยความเร็ว 9,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ซ้ำ 2 ครั้ง ก่อนนำตะกอนเซลล์ที่ได้ศึกษาผลของสารปกป้องเซลล์ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ โดยปรับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ประมาณ 10^{13} CFU/ml ก่อนนำมาเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 9,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำตะกอนเซลล์เติมลงในสารปกป้องเซลล์ 4 ชนิด ได้แก่ แมนนิทอล เปปโตน นมพร่องไขมัน และโมโนโซเดียมกลูตาเมต ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0, 10 และ 20 (w/v) ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำมาเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 9,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำเซลล์ไปทำแห้งแบบความความร้อนอุณหภูมิต่ำ ได้แก่ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่าความชื้น และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 โดยนำกล้าเชื้อผง 1 กรัม ละลายในสารละลายเปปโตน และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที และนำมาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Complete Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

3.4.2.2 ตัวพยุง

เลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่ปราศจากเชื้อ 400 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด ร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นด้วยกรดอะซิติก เท่ากับ 6.0 และอัตราการให้อากาศต่อการหมักโดยการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำมาเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 9,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ และนำไปเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 9,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ซ้ำ 2 ครั้ง ก่อนนำตะกอนเซลล์เติมลงในสารละลายแมนนิทอลความเข้มข้นร้อยละ 20 (w/v) ซึ่งใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นผสมกับตัวพยุง ได้แก่ รำละเอียด และแป้งข้าวเจ้า ที่ปราศจากเชื้อด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet rays; UV) เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งตัวพยุงผ่านการกรองด้วยตะแกรงร่อน 100 mesh ใช้ตัวพยุง 10 กรัม ผสมกับเชื้อในสารปกป้องเซลล์ ปริมาตร 1, 2, 3, 4 และ 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปทำแห้งในตู้อบลมร้อน โดยการใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ค่าความชื้น (moisture content) วัดปริมาณน้ำอิสระ (water activity; a_w) ด้วยเครื่อง water activity meter และวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 โดยนำกล้าเชื้อผง 1 กรัม ละลายในสารละลายเปปโตน และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที และนำมาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Complete Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

3.4.3 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำกับวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อแบบผงที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่ปราศจากเชื้อ 400 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด ร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นด้วยกรดอะซิติก เท่ากับ 6.0 และอัตราการให้อากาศต่อการหมักโดยการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำมาเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 9,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศา-

Prince of Songkla University Pattani Campus

เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ และนำไปเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 9,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ซ้ำ 2 ครั้ง ก่อนนำตะกอนเซลล์เติมลงในสารละลายแมนนิทอล ความเข้มข้นร้อยละ 20 (w/v) ซึ่งใช้เป็นสารปกป้องเซลล์ ในอัตราส่วน 1:1 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นผสมเซลล์ในสารปกป้องเซลล์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร กับรำละเอียดที่ปราศจากเชื้อ ซึ่งเป็นตัวพยุง ปริมาณ 10 กรัม ทำแห้งด้วยความร้อนอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกล้าเชื้อแบบผงที่ผ่านการทำแห้งด้วยการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (ดัดแปลงจาก Ndoye *et al*., 2007) โดยเลี้ยงเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 ในน้ำตาลโตนดที่ปราศจากเชื้อ 400 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 5 (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์สกัด ร้อยละ 0.4 (w/v) เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับค่าพีเอชเริ่มต้นด้วยกรดอะซิติก เท่ากับ 6.0 และอัตราการให้อากาศต่อการหมักโดยการเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นนำมาเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 9,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟสบัฟเฟอร์ และนำไปเซนติฟิวส์ด้วยความเร็ว 9,600 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ทำการล้างเซลล์ซ้ำ 2 ครั้ง จากนั้นเคลือบเซลล์ด้วยสารละลายแมนนิทอล ความเข้มข้นร้อยละ 20 (w/v) และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เปรียบเทียบประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชูของกล้าเชื้อแบบผง ได้แก่ เซลล์เปียก (wet cell) กล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งแบบความร้อนอุณหภูมิต่ำ และกล้าเชื้อแบบผงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยสุ่มกล้าเชื้อแบบผงที่ได้ เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 โดยนำเซลล์เปียกและกล้าเชื้อแบบผง 1 กรัม ละลายในสารละลายเปปโตน และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที และนำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar และนำเซลล์เปียกและกล้าเชื้อแบบผง 1 กรัม ละลายในสารละลายเปปโตน และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อที่ละลายในสารละลายเปปโตน ปริมาตรร้อยละ 5 (v/v) ลงในไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอล ร้อยละ 6 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก (AOAC., 2000) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชู

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.4.4 ศึกษาสภาวะการเก็บรักษากล้าเชื้อแบบผงต่อความสามารถในรอดชีวิตและประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชู

นำกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผงที่ใช้เซลล์ในสารปกป้องเซลล์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ผสมกับรำละเอียด ซึ่งเป็นตัวพยุง ปริมาณ 10 กรัม ทำแห้งด้วยความร้อนอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาณ 10 กรัม บรรจุลงในซองพลาสติกใส และซองอะลูมิเนียมฟอยล์ลามิเนต เก็บรักษาภายใต้ 2 สภาวะ ได้แก่ สภาวะสุญญากาศ และสภาวะบรรยากาศ จากนั้นนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (28±1 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาสภาวะในการเก็บรักษา โดยสุ่มตัวอย่าง กล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผง ทุกๆ 1 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 โดยนำกล้าเชื้อแบบผง ปริมาณ 5 กรัม ละลายในสารละลายเปปโตน และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที และนำมาวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อ *A. aceti* โดยวิธี spread plate technique บนอาหารเลี้ยงเชื้อ GYE agar และนำกล้าเชื้อ *A. aceti* TISTR 102 แบบผง ปริมาณ 5 กรัม ละลายในสารละลายเปปโตน และเขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อที่ละลายในสารละลายเปปโตน ปริมาตรร้อยละ 5 (v/v) ลงในไวน์น้ำตาลโตนดที่มีปริมาณเอทานอล ร้อยละ 6 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณกรดอะซิติก (AOAC., 2000) เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการหมักน้ำส้มสายชู

วางแผนการทดลองแบบแฟคทอเรียลในแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Complete Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ และนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ความเชื่อมั่น 95%

Prince of Songkla University Pattani Campus