บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)	บริษัทผู้ผลิต
Bile salt	Difco
Corn starch agar	
De Man Rogosa and Sharp (MRS)	Difco
Gelatin agar	Difco
Glucose	Univar
Mac Conkey agar (MCA)	Difco
Mannitol salt agar (MSA)	Difco
Mannitol egg-yolk polymyxin agar (MYP)	Difco
Nutrient agar	Difco
Oxford agar	Merck
Phenol-red broth base	Merck
Skim milk agar	Difco
Tryptic soy agar (TSA)	Difco
Tryptic soy broth (TSB)	Difco
Yeast extract	Difco

2. สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Alpha-amylase	Sigma
Ammonium sulphate	Merck
Bromocresol purple	Lab-chem
Catalase	Fluka
Gelatin	BDH
Hydrochloric acid	BDH
Hydrogenperoxide (ร้อยละ 3 H_2O_2)	BDH
Lipase	Fluka
Pepsin	Fluka
Proteinase K	Fluka
Sodium acetate	Lab-chem
Sodium azide	Lab-chem
Sodium chloride	Merck
Sodium hydroxide	BDH
Sodium hydrogen phosphate	Merck
Typsin	Fluka

3. อุปกรณ์	ยี่ห้อ
Autoclave	Tomy ES-315, SS320
Centrifuge	รุ่น Harrier 18/80
Electronic balance	Vortex-2 genie
Gas chromatography	HP5890 GC-HP5972 MSD
Hot plate	Fisher sciencetific, USA
Incubator	MMM medcenter
Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP)	Lachat Quick Them 8000
Laminar air flow cabinet	Micro flow advanced bio safety cabinet
Microscope	Olympus Optical Co., Ltd. รุ่น 2 Genie.
Microwave	Sanyo
pH meter	Mettler Toledo seven easy
Pipette & Autopipette	Eppendorf
Scaning electron microscope	JSM-5800LV JEOL
Ultrasonic cleaner	Branson
Vortex mixer	Mettler Toledo PB602-L
Water bath	TW20 Julabo

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้

เก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้ประมาณ 200 กรัม จากตุ่มหมักเดียวกันของโรงงานเต้าหู้ยี้ อ.เมือง จ.สงขลา โดยเก็บตัวอย่างทุกเดือนตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก เดือน 1-9 (9 ตัวอย่าง) (FSF1- FSF9) (รูปที่ 4) และตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในถังหมักอื่น จำนวน 9 ตัวอย่าง (FSF10-FSF18) พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปอีก 9 ตัวอย่าง (CSF1-CSF9) (รูปที่ 5) ที่วางขายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าใน อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา รวมทั้งหมด 27 ตัวอย่าง โดยมีรหัสตัวอย่างเต้าหู้ยี้ดังนี้

เต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก เขียนชื่อย่อว่า FSF (Fermenting Sufu)

FSF1 = เต้าหู้ยี้อายุ 1 เดือน
FSF2 = เต้าหู้ยี้อายุ 2 เดือน
FSF3 = เต้าหู้ยี้อายุ 3 เดือน
FSF4 = เต้าหู้ยี้อายุ 4 เดือน
FSF5 = เต้าหู้ยี้อายุ 5 เดือน
FSF6 = เต้าหู้ยี้อายุ 6 เดือน
FSF7 = เต้าหู้ยี้อายุ 7 เดือน
FSF8 = เต้าหู้ยี้อายุ 8 เดือน
FSF9 = เต้าหู้ยี้อายุ 9 เดือน

เต้าหู้ยี้ในถังหมักอื่นๆ เพื่อเปรียบเทียบปริมาณแบคทีเรียแลกติก

FSF10 = เต้าหู้ยี้อายุ 1 เดือน
FSF11 = เต้าหู้ยี้อายุ 2 เดือน
FSF12 = เต้าหู้ยี้อายุ 3 เดือน
FSF13 = เต้าหู้ยี้อายุ 4 เดือน
FSF14 = เต้าหู้ยี้อายุ 5 เดือน
FSF15 = เต้าหู้ยี้อายุ 6 เดือน
FSF16 = เต้าหู้ยี้อายุ 7 เดือน
FSF17 = เต้าหู้ยี้อายุ 8 เดือน
FSF18 = เต้าหู้ยี้อายุ 9 เดือน

เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป เขียนชื่อย่อว่า CSF (Commecial Sufu)

CSF1 = เต้าหู้ยี้เหลือง อ. เมือง จ. สงขลา

CSF2 = เต้าหู้ยี้แดง ตราเด็กขี่กิเลน ผลิตโดยบริษัท วิสุอุตสาหกรรม จำกัด อ. เมือง จ. สมุทรสาคร

CSF3 = เต้าหู้ยี้แดง บริษัทปันยุไทฟงฟู้ดสตัฟลิมีเต็ด ประเทศจีน ผู้แทนจำหน่าย โดยบริษัท ที.ซี. วาย. อินเตอร์เทรด จำกัด

CSF4 = เต้าหู้ยี้แดง ตรา อ๊วงโหว ผู้จัดจำหน่าย ห้างหุ้นส่วนจำกัด สมวรณี แขวง บางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพมหานคร

CSF5 = เต้าหู้ยี้เหลือง บริษัท Huang Dah Mu Food Co., Ltd. ไต้หวัน

CSF6 = เต้าหู้ยี้เหลือง บริษัท Hong Kong Long Food Co., Ltd. จีน

CSF7 = เต้าหู้ยี้แดง จีน

CSF8 = เต้าหู้ยี้เหลือง ตรา New sun จีน

CSF9 = เต้าหู้ยี้เหลือง ไต้หวัน

รูปที่ 4 เต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักจากโรงงานเต้าหู้ยี้ใน อ.เมือง จ.สงขลา

รูปที่ 5 เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปจำนวน 9 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

2. การแยกแบคทีเรียแลกติกในตัวอย่างเต้าหู้ยี้

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติก โดยชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ บีบให้เต้าหู้ยี้ละเอียดแล้วเติมอาหาร MRS broth ที่มีเกลือ (NaCl) 5% จำนวน 225 มล. แล้วเจือจาง 10 เท่าเป็นลำดับใน MRS broth ที่เติมเกลือ 5% จากนั้นดูดมา 0.1 มล. กระจายเชื้อบน MRS agar ที่เติม 0.04% bromocersal purple, 5 mg% sodium azide และเกลือความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจดูผลทุกวัน คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน (สีและขนาด) และไม่ผลิตเอนไซม์คาตาเลส ทำเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร MRS agar ที่เติมเกลือความเข้มข้นเหมาะสม แล้วเก็บรักษาเชื้อไว้ใน stab MRS agar ที่ 4°C นอกจากนี้วัด pH (ความเป็นกรดด่าง) ของตัวอย่างเต้าหู้ยี้โดยใช้ pH meter และในทุกการทดลองได้ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3. การตรวจหาแบคทีเรียที่อาจก่อโรค

การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้ช้อนปราศจากเชื้อชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 25 กรัม ใส่ในถุงปราศจากเชื้อ บีบให้เต้าหู้ยี้ละเอียดแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (Tryptic soy broth) จำนวน 225 มล. แล้วเจือจาง 10 เท่าเป็นลำดับ โดยใช้ TSB แล้วดูด 0.1 มล. กระจายเชื้อบน MacConkey agar, MYP (Mannitol-egg yolk-polymyxin agar), MSA (Mannitol salt agar) และ Oxford agar เพื่อตรวจหา *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. ตรวจนับปริมาณเชื้อแล้วทดสอบทางชีวเคมีบางชนิดเพื่อบ่งชี้สายพันธุ์ในเบื้องต้น นอกจากนี้ยังตรวจหา *E. coli* โดยวิธี MPN methods

4. คัดแยกชนิดโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก (du Toit *et al.*, 1998)

4.1 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี โดย streak เชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร MRS agar ที่มีเกลือน้ำดี 0.15% และ 0.30% จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูผลการทนเกลือน้ำดี

4.2 ทดสอบการทนกรดโดยถ่ายเชื้อใส่ MRS broth ที่มี pH 2, 3 และ 4 ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นตรวจสอบการทนกรดโดยดูความขุ่นเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เติมเชื้อ

4.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน

4.3.1 การทดสอบการย่อยโปรตีน

การทดสอบการย่อยโปรตีน ทำได้โดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน Nutrient agar (NA) + 1% skim milk และ NA+ 1% gelatin และเติม supplements (ภาคผนวก ก9 และ ก2) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48-72 ชม. ตรวจดูการเจริญโดยเชื้อที่สามารถย่อยโปรตีนได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนี วัดความสามารถในการย่อยสลายเป็นดีกรีของการย่อยสลายซึ่งเท่ากับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มม.) หารด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)

4.3.2 การทดสอบการย่อยแป้ง

การทดสอบการย่อยแป้งทำได้โดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบ ลงบน NA + 1% corn starch ที่การเติม supplements (ภาคผนวก ก10) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48-72 ชม. ตรวจดูการเจริญโดยหยด Lugol's iodine ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อที่สามารถย่อยแป้งได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนี วัดความสามารถในการย่อยสลายเป็นดีกรีของการย่อยสลายซึ่งเท่ากับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มม.) หารด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (มม.)

4.3.3 การทดสอบการย่อยไขมัน

การทดสอบการย่อยไขมันทำได้โดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบ ลงบน NA + 1% tributyrin ที่มีการเติม supplements (ภาคผนวก ก11) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48-72 ชม. โดยเชื้อที่สามารถย่อยไขมันได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนี วัดความสามารถในการย่อยสลายเป็นดีกรีของการย่อยสลายซึ่งเท่ากับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มม.) หารด้วยเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี (มม.)

4.4 การทดสอบความสามารถในการเติบโตในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดย streak เชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร MRS agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนโดยใช้ anaerobic jar

5. คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

5.1 การเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (indicator bacteria)

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์สายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้เพื่อการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อได้แก่ *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylocuccus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* TISTR687, และ *Listeria monocytogenes* DMST4553 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ที่เก็บอยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ นำเชื้อมา ลากลงบน TSA นำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ แล้วเขี่ยเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ นำมาปรับความขุ่นให้

ได้เท่ากับ 0.5 McFarland โดยใช้น้ำเกลือ (normal saline) ความเข้มข้น 0.85% ในการปรับความขุ่น จะได้จำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ดูดเชื้อ 0.1 มล. (10^7 CFU/ml) มาเติมในอาหาร TSB soft agar (0.7% วุ้น) ปริมาตร 7 มล. ผสมให้เข้ากันสุดท้าย จะได้เชื้ออินดิเคเตอร์ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^6 CFU/ml นำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

5.2 การทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Agar spot assay (de Carvalho *et al*., 2006)

การทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Agar spot assay ทำได้โดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่เพาะเลี้ยงใหม่ๆ (fresh culture) ใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. นำมาปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland (10^8 CFU/ml) จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยใช้ไมโครปิเปตดูดแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นในอาหารเหลว 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร MRS agar ห่างกันหยดละ 3 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำมาเททับผิวหน้าด้วยอาหาร TSB soft agar (0.7% วุ้น) ซึ่งมีจำนวนเชื้ออินดิเคเตอร์ประมาณ 10^6 CFU/ml วางทิ้งไว้ให้แข็งนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับอินดิเคเตอร์แต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชม. วัดผลการยับยั้งโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของขอบวงใส (มม)

5.3 การทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Agar well diffusion assay (Ammor *et al*, 2006)

การทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Agar well diffusion assay โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลกติก sub culture ลงบนอาหาร MRS agar แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ มา 2 loop เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งของส่วนใส (cell-free supernatant) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยการนำจานอาหาร TSA มาเททับด้วย TSB soft agar (0.7% วุ้น) ปริมาณอาหาร 7 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์จำนวนประมาณ 10^6 CFU/ml วางทิ้งไว้ให้แข็ง เจาะหลุมวุ้นด้วย tip ปราศจากเชื้อ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.9 มม.) ห่างกันประมาณหลุมละ 3 เซนติเมตร เติมส่วนใสที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วลงไปหลุมละ 80 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. วัดผลการยับยั้งโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของขอบวงใส (มม.)

6. การบ่งชี้ชนิดของสารยับยั้ง

การบ่งชี้ชนิดของสารยับยั้งโดยคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการทดลอง 5.3 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชม. ปั่นแยกเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C นำส่วนใส มาปรับ pH 7 และกรองด้วยกระดาษกรอง (millipore) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และอีกส่วนไม่ต้องปรับ pH แบ่งส่วนใสใส่หลอดนำไปชั่งน้ำหนัก เพิ่มความเข้มข้น

โดยแช่แข็งแล้วทำให้แห้ง (lyophilisation) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่เหลือ ปรับความเข้มข้นให้ได้เป็น 10 เท่า โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อจากนั้นนำมาทำสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกโดยการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ด้วยวิธี agar well diffusion assay (ข้อ 6.3) (de Carvalho *et al*., 2006)

6.1 การทดสอบสารยับยั้งที่เป็นกรด

การทดสอบสารยับยั้งที่เป็นกรดทำได้โดยเติมส่วนใสที่ปรับและไม่ปรับ pH ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในหลุม TSA plate ที่ราดด้วย TSB soft agar ซึ่งมีเชื้อ *L. monocytogenes* ผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจสารยับยั้งที่เป็นกรดโดยดูจากการหายไปของวงใสของส่วนใสที่ปรับ pH เปรียบเทียบกับวงใสที่เกิดจากกรด

6.2 การทดสอบสารยับยั้งที่เป็น bacteriocin และ H_2O_2

การทดสอบหา bacteriocin โดยการนำส่วนใส ที่ปรับ pH 7 และไม่ปรับ pH มาบ่มร่วมกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ (1 mg/ml) เนื่องจากได้มีรายงานว่ามีแบคเทอริโอซินบางชนิดทำงานได้ดีในสภาพ pH ต่ำ เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ pepsin, trypsin, proteinase K, lipase, α - amylase และ catalase โดยดูด ส่วนใส 60 ไมโครลิตร และเอนไซม์ 20 ไมโครลิตร ใส่ใน eppendofe บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. (Millette *et al.,* 2007) ทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดย agar well diffusion assay โดยใช้เอนไซม์และส่วนใสที่ไม่ได้ทดสอบร่วมกับเอนไซม์เป็น control อ่านผลการทดสอบโดยดูวงใสที่หายไปหรือลดขนาดลงหรือวงใสคงเดิม

7. ตรวจหาปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์)

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคมาตรวจหากรดแลกติกและกรดอะซิติก โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกใน MRS broth ปริมาตร 50 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 และ 48 ชม.จากนั้นทำการเก็บเชื้อปริมาตร 10 มล. แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C นำส่วนใสที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครลิตร แล้วเติม acetone และ methanol เพื่อเปลี่ยนกรดแลกติกเป็น methylester แล้วฉีดเข้า เครื่อง Gas Chromatography HP 6850 โดยใช้ column HP 6850, inlet temperature 250°C, oven initial temperature 70°C และ detector temperature 300°C, hydrogen flow 30.0 ml./min และ air flow 300 ml./min และใช้ flame ionization detector

8. บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติก โดยนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มาย้อมสีกรัม การสร้างเอนไซม์คาตาเลส ส่วนการจำแนกแบคทีเรียแลกติกในระดับจีนัส (Axelsson, 1993) โดยอาศัยลักษณะของเซลล์ ได้แก่ รูปร่าง การเรียงตัว และการทดสอบดังต่อไปนี้

8.1 การทดสอบการเติบโตที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C

การทดสอบการเติบโตที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงใน MRS broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C เป็นเวลา 24-48 ชม. สังเกตการเติบโตโดยดูความขุ่นของอาหาร เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

8.2 การทดสอบการเติบโตในอาหารที่เติมเกลือ (NaCl) 6.5 และ 18 %

การทดสอบการเติบโตในอาหารที่เติมเกลือ โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงใน MRS broth ที่มี เกลือ 6.5% และ 18% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. สังเกตการเติบโตโดยดูความขุ่นของอาหาร เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

8.3 การทดสอบการเติบโตที่ pH 4.4 และ 9.6

การทดสอบการเติบโตในอาหารที่เป็นกรดและด่าง โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงใน MRS broth ที่มีการปรับ pH เป็น 4.4 ด้วย 1N HCl และ 9.6 ด้วย 1N NaOH บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. สังเกตการเติบโตโดยดูความขุ่นของอาหาร เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

8.4 การตรวจสอบการจัดเรียงตัวของเซลล์ (tetrad formation)

การตรวจสอบการจัดเรียงตัวโดยสังเกตการณ์เรียงตัวของแบคทีเรียแลกติกที่มี 4 เซลล์เรียงติดกันโดยการย้อมสีกรัม

8.5 การทดสอบ salt tolerant

การทดสอบการเติบโตของแบคทีเรียแลกติกในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ โดยป้ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกบนอาหาร MRS agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 0, 5 และ 10% บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. ตรวจดูผลการเติบโต

8.6 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส

การตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการใช้น้ำตาล (phenol red broth base) ที่มีการเติมกลูโคส 1% บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชม. สังเกตการสร้างกรดโดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ และดูการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใน

Durham tube ถ้ามีก๊าซจัดเป็น heterofermentative lactic acid bacteria ถ้าไม่มีก๊าซหรือมีก๊าซเล็กน้อย จัดเป็น homofermentative lactic acid bacteria โดยมีแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์มาตรฐานดังนี้ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR451, *Lactobacillus plantarum* TISTR862, *Lactobacillus lactis* TISTR452 และ *Pediococcus halophilus* TISTR334 เพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้

8.7 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ identification kit (Lactobacillus API 50 CHL 50300, บริษัท Bio Me'rieux, France) ซึ่งประกอบด้วย API 50 CHL เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ร่วมกับชุดทดสอบ API 50 CH strip ในการศึกษากระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้ ทำการทดสอบได้โดยการเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง MRS agar ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 2 มล. โดยปรับให้มีความขุ่นมากกว่า 2 McFarland จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 5 มล. ปรับให้ได้ 2 McFarland บันทึกปริมาตรของเชื้อที่ใช้ จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดปริมาตร 2 มล. ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CHL ปริมาตร 10 มล. โดยถ่ายเชื้อปริมาตรเป็น 2 ของหลอด 5 มล. ซึ่งจะได้เชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland ในอาหาร API 50 CHL ถ่ายเชื้อที่เตรียมประมาณ 120 ไมโครลิตร ลงใน API 50 CH strip บ่มที่อุณหภูมิ 37°C อ่านผลหลังการบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชม. โดยใช้ *L. plantarum* TISTR 862 เป็นตัวเปรียบเทียบ หลุมแรกจะเป็น negative control ส่วนผลบวกจะเกิดเนื่องจากเชื้อมีการใช้น้ำตาลและผลิตกรดออกมามีผลทำให้ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง สังเกตการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารจากม่วงเป็นสีเหลือง นำผลที่ได้มาเทียบเคียงชนิดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ API Web Stand Alone V. 1.1.0

8.8 การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกโดยใช้วิธี 16S rRNA gene วิเคราะห์โดยหน่วย MU-OU : CRC คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเริ่มจากการสกัด genomic DNA จากแบคทีเรียแลกติก แล้วเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เฉพาะส่วนที่ต้องการ (ในที่นี้หมายถึงเฉพาะส่วน 16S rDNA) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดได้เป็นแม่แบบ และใช้ primer 20F (forward primer) และ 563R (reverse primer) แล้วทำการ Sequencing Reaction ด้วยเทคนิค PCR อ่านลำดับเบสของ DNA โดยนำ DNA product ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencing จากนั้นนำลำดับเบสของ DNA ที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในอินเทอร์เนต โดยเข้าไปที่เวปไซต์ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, April 23/2007) จากนั้นเลือกที่ BLAST แล้วเลือก Nucleotide-nucleotide BLAST (blast) จะขึ้นหน้าต่างใหม่ให้เราใส่ข้อมูลลำดับเบสลงไป copy ลำดับเบสของตัวอย่างใส่ลงไปในช่อง Search แล้วกดปุ่ม BLAST จะมีหน้าต่างใหม่เปิดขึ้นมา รอสักครู่จนข้อมูลโหลดเสร็จเรียบร้อยดูผลการ Blast ซึ่งลำดับ

ของเชื้อที่ขึ้นในบรรทัดแรกจะมีความใกล้เคียงกับเชื้อที่เรานำมาเทียบที่สุด ความเหมือนกันจะลดลงจากบรรทัดบนลงไปบรรทัดล่างตามลำดับ

9. การตรวจหาปริมาณเกลือในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักและเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (AOAC, 1990)

ตรวจหาปริมาณเกลือในตัวอย่างเต้าหู้ยี้โดยชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 0.5 กรัม ใส่ในฟลาส์กขนาด 250 มล. เติม 0.1 N $AgNO_3$ ลงไป 30 มล. ให้ปริมาตรเกินพอในการทำปฏิกิริยากับ NaCl เกิดเป็นตะกอน $AgCl_3$ ได้หมด เขย่าให้เข้ากัน เติม 6 N HNO_3 ลงไป 20 มล. นำไปต้มจนเดือดประมาณ 15 นาที เพื่อให้ตะกอนที่ไม่ใช่ $AgCl_3$ ละลายหมด ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 50 มล. และสารละลาย Ferric alum ลงไป 5 มล. เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นไตเตรตด้วย 0.1 N NH_4SCN ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ $AgNO_3$ ส่วนที่เหลือจนถึงจุดยุติซึ่งจะมีสีแดงอิฐเกิดขึ้นบันทึกปริมาตร NH_4SCN ที่ใช้ แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เกลือ (%NaCl) โดยมีสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20% เป็นตัวควบคุม

10. การตรวจหาชนิดและปริมาณแร่ธาตุ (หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์)

การตรวจหาชนิดและปริมาณแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบในเต้าหู้ยี้ โดยชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป 4 กรัม ใส่ใน Vycor วางบน hot plate ไฟอ่อนๆในตู้ควันจนน้ำระเหยหมดไป เพิ่มความร้อนขึ้นจนตัวอย่างไม่มีควัน (ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 5 ชม.) นำ Vycor ไปเข้า Muffle ที่อุณหภูมิ 750°C เวลา 180 นาที (3 ชม.) จนกระทั่งตัวอย่างเปลี่ยนจากสีดำเป็นไม่มีสี หรือสีเทาอ่อน ทิ้งให้เย็นนำมาละลายด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 10% กรองด้วยกระดาษกรองแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มล. ด้วยน้ำ (deionized water) สารละลายกรดเจือจางที่มีโลหะและแร่ธาตุจะถูกดูดเข้าเครื่อง Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry เพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของโลหะ

11. การศึกษาโครงสร้างพื้นผิวของเต้าหู้ยี้ (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์)

การศึกษาโครงสร้างพื้นผิวโดยนำก้อนเต้าหู้ก่อนหมัก เต้าหู้ยี้เหลือง (CSF1) และเต้าหู้ยี้แดง (CSF3) ตัวอย่างละ 1 ก้อน มา fix ด้วยสารเคมี ซึ่งประกอบด้วย 25% Glutaraldehyde ($C_5H_8O_2$) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 4% Formaldehyde $(CH_2O)_n$ เป็นเวลา 1-2 ชม. จากนั้นนำตัวอย่างมาล้างด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง แล้วนำมา fix ครั้งที่ 2 ด้วย 1% OsO_4 เป็นเวลา 1-2 ชม. ขึ้นอยู่

กับลักษณะตัวอย่าง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วขจัดน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้ alcohol series หรือ acetone series จากความเข้มข้นต่ำๆ ไปจนถึง absolute คือ 50% Ethanol 15-30 นาที 2 ครั้ง, 70% Ethanol 15-30 นาที 2 ครั้ง, 80% Ethanol 15-30 นาที 2 ครั้ง, 90% Ethanol 15-30 นาที 2 ครั้ง และ100% Ethanol 30 นาที 2 ครั้ง นำตัวอย่างไปทำให้แห้งด้วยวิธี Critical Point Drying ตามวิธีการปฏิบัติงานใช้เครื่อง CPD (WI-RES-CPD-001) แล้วนำมาติดบน Stub โดยใช้เทปกาว 2 หน้า carbon tape น้ำยาทาเล็บ และ carbon paint หรือ silver paint เป็นตัวยึด จากนั้นจึงนำไปฉาบทอง ตามวิธีปฏิบัติงานการใช้เครื่อง Sputter Coater (WI-RES-Coater-001) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพื้นผิวด้วย scaning electron microscope