บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.1.1 แป้งข้าวเจ้าสด

แป้งข้าวเจ้าสด เตรียมโดยวิธีการโม่เปียก จากข้าวพันธุ์ชัยนาท ยี่ห้อ ไทไท

3.1.2 น้ำตาลโตนดเข้มข้น

น้ำตาลโตนดเข้มข้น จากตำบลบาราโหม อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี ที่ผ่านกระบวนการผ่านความร้อนโดยการเคี่ยว จากนั้นนำมาพาสเจอร์ไรส์ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และเก็บตู้เย็น เพื่อใช้ในการทดลอง

3.1.3 ลูกแป้งข้าวหมาก

ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอต่าง ๆ ในจังหวัดปัตตานี ได้แก่ อำเภอโคกโพธิ์ อำเภอยะหริ่ง และอำเภอสายบุรี โดยลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์ และอำเภอยะหริ่งไปรับซื้อจากผู้ผลิตเอง ส่วนลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอสายบุรี รับซื้อจากพ่อค้าคนกลาง

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- อาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count Agar (PCA, Himedia)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose Agar (PDA, Himedia)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS, Himedia)
- อาหารเลี้ยงเชื้อ Solution starch agar (Ajax)
- Yeast extract powder (Himedia)
- Peptone (Himedia)
- Agar powder (Himedia)
- D-glucose (Ajax)
- Malt extract powder (Himedia)
- Calcium carbonate ($CaCO_3$, Ajax)
- Sodium hydroxide (NaOH, Merck)
- Sodium chloride (NaCl, Lab-Scan)
- 99 % Ethanol (C_2H_5OH, Merck)
- Phenolphtalein (Carlo ERGA)
- Chloramphenicol (LAB-scan)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- Sulfuric acid (H_2SO_4)
- Catalyst mixture (Copper sulfate + Potassium sulfate)
- Catalyst mixture ($CuSO_4$ + $NaSO_4$ + Conc. H_2SO_4)
- Hydrochloric acid (HCl)
- Boric acid (H_3BO_3)
- Petroleum ether
- Iodine

3.2 เครื่องมือ

- ตู้อบ (Oven, Memmert รุ่น 600)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge, Hettich Zencrifuhen รุ่น ROTINA 420R)
- เตาไมโครเวฟ (Microwave, Sharp รุ่น Corousel)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดัน (Autoclave, HIRAYAMA)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Thermo Scientifi รุ่น Spectronic15)
- เครื่องเขย่า (Shaker, Chil Tern scientific รุ่น Orbital Shaker SS70)
- เครื่องวัดพีเอช (pH meter, Mettler Toledo, รุ่น SevenEasy S-20K)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Callcnkamp Serial Number SG98/07/452)
- ตู้ปลอดเชื้อลมเป่า (Laminar flow, Merit รุ่น 0192)
- ไมโครปิเปต (Micropipet, Rainin)
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) (Model CH30, Olympus, Japan)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น TG 5002-S)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 4 ตำแหน่ง (Sartorius รุ่น ED2245)
- เครื่องเขย่า (Vortex mixer, Scientific Industries รุ่น Vortex Genie 2)
- เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ (Hand refractometer, Atago รุ่น N1)
- ชุดอุปกรณ์ย่อยโปรตีน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น TR
- ชุดกลั่นโปรตีน ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น VAP1
- Hotplate stirrer ยี่ห้อ Fisher scientific รุ่น 002278
- Soxhlet distillator ยี่ห้อ Gerhardt รุ่น 306 M
- เตาเผา
- เครื่องโม่แป้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องแก้ว

- ปิเปต ขนาด 1 และ 10 มิลลิลิตร
- บิกเกอร์ ขนาด 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
- กระบอกตวง ขนาด 50 และ 1000 มิลลิลิตร
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate)
- ลูป (loop) เขี่ยเชื้อ
- แท่งเกลี่ยเชื้อ (spreader)
- หลอดเซนติฟิวจ์
- ขวดแก้วอาหารเลี้ยงเชื้อ (Duran bottle) ปริมาตร 250 และ 600 มิลลิลิตร
- ถ้วยวัดความชื้น
- ถ้วยเผา
- หลอดย่อยโปรตีน
- บีกเกอร์ไขมัน
- หลอดบิวเรตท์ ขนาด 50 มิลลิลิตร
- เวอร์เนียคาลิปเปอร์
- ขวด McCartrey
- กระบอกเก็บก๊าซ (gas syringe)
- ชุดจำแนกเชื้อสำเร็จรูป API 32 (Biomerieux, France)
- ชุดจำแนกเชื้อสำเร็จรูป API 50 CHL (Biomerieux, France)

3.4 วิธีการทดลอง

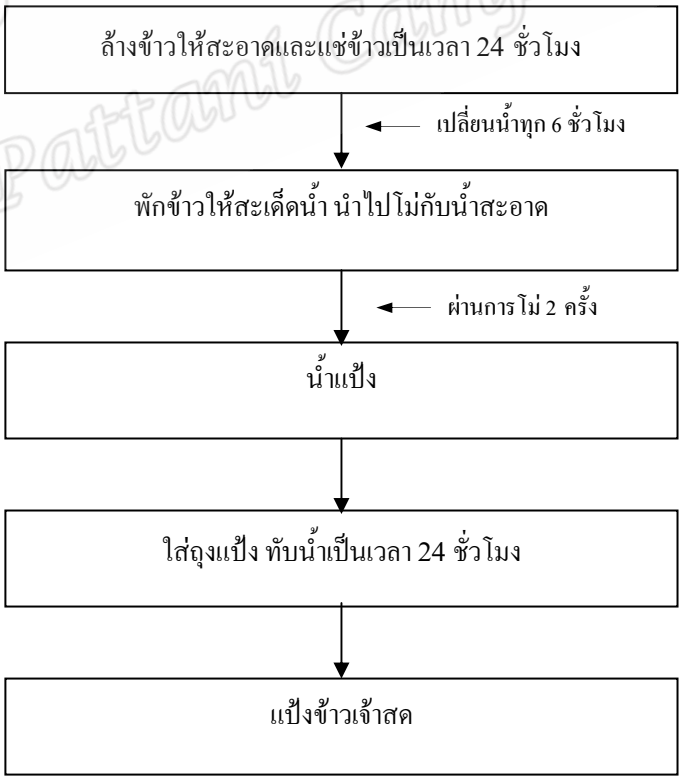
3.4.1 ศึกษาสมบัติด้านจุลชีววิทยาและเคมีของวัตถุดิบในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

3.4.1.1 ลูกแป้งข้าวหมาก เก็บรวบรวมจากชาวบ้าน จำนวน 3 ตัวอย่างในจังหวัดปัตตานี ได้แก่ ลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอโคกโพธิ์ ยะหริ่ง และสายบุรี นำมาตรวจสอบปริมาณจุลินทรีย์ ได้แก่ ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา โดยนำตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก บดเป็นผงละเอียด ซึ่งใช้โกร่งที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณ 10 กรัม ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 90 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลาย จนถึงระดับ 10^{-8} ปิเปตสารละลายความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS agar), Plate count Agar (PCA) และ Potato dextrose Agar (PDA) โดยเทคนิค pour plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อ

Prince of Songkla University Pattani Campus

วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก ตามวิธีของ Gul *et al*. (2005) ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด และปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีการของ BAM (1998) ตามลำดับ

3.4.1.2 แป้งข้าวเจ้าสด เตรียมโดยนำข้าวเจ้าพันธุ์ชัยนาท อายุ 6 เดือน ถึง 1 ปี โดยวิธีการเตรียมแป้งสด (รูปที่ 3) เริ่มจาก นำข้าวมาทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาด เพื่อกำจัดฝุ่นหรือสิ่งปนเปื้อนในเบื้องต้นออก จากนั้นนำข้าวมาแช่น้ำให้ท่วม โดยใช้น้ำต่อข้าวในอัตราส่วน 2:1 (โดยน้ำหนัก) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ระหว่างการแช่ข้าวควรเปลี่ยนน้ำ ทุก 6 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาพักข้าวให้สะเด็ดน้ำ และนำไปโม่กับเครื่องโม่แป้ง ซึ่งการโม่แป้งควรโม่ 2 รอบเพื่อให้เนื้อแป้งละเอียดมากขึ้น จึงได้น้ำแป้งที่มีลักษณะขาว ข้น นำน้ำแป้งที่ได้ใส่ถุงผ้าด้ายดิบมัดปากถุงให้เรียบร้อย จากนั้นจึงกดทับแป้งโดยการนำภาชนะน้ำหนักมากมาวางทับบนถุงแป้งที่เตรียมไว้ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อไล่น้ำแป้งออกให้หมด จึงได้เป็นแป้งข้าวเจ้าสด นำเนื้อแป้งที่ได้ไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและจุลชีววิทยา การวิเคราะห์สมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช (pH) ปริมาณกรดแลกติกทั้งหมด (Total Tritratable acidity; TTA) และองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (Proximate analysis) ประกอบด้วย ปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เถ้า ใยอาหาร และคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีการของ AOAC (2000) การวิเคราะห์สมบัติทางจุลชีววิทยา ได้แก่ ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 3.4.1.1



รูปที่ 3 วิธีการเตรียมแป้งข้าวเจ้าสด

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.4.1.3 น้ำตาลโตนดเข้มข้น นำน้ำตาลโตนดที่ผ่านการต้มและเคี่ยว จนมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาล ซึ่งจัดซื้อจากท้องตลาดในจังหวัดปัตตานีเพื่อเป็นวัตถุดิบในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน และนำมาตรวจสอบคุณภาพก่อนนำไปใช้ โดยนำไปวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและจุลชีววิทยา การตรวจสอบสมบัติทางเคมี ได้แก่ ปริมาณน้ำตาล (บริกซ์) โดยใช้เครื่องวัดการหักเหของแสง (Hand refractometer) และปริมาณความชื้น สมบัติทางจุลชีววิทยา ได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1.1 และปริมาณ ออสโมฟิลิก ยีสต์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งประกอบด้วย Yeast extract และ Glucose ในอัตราส่วน (ร้อยละ) 1 : 40 ด้วยเทคนิค spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (Lin *et al*., 2001) จากนั้นนำน้ำตาลโตนดไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.2 การคัดเลือกกล้าเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมากในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

3.4.2.1 การเตรียมตัวอย่างกล้าเชื้อ นำลูกแป้งข้าวหมากทั้ง 3 แหล่งมาผลิตเป็นกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน โดยใช้แป้งข้าวเจ้าสด ลูกแป้งข้าวหมาก น้ำตาลโตนดเข้มข้น และน้ำ ในอัตราส่วน (โดยน้ำหนัก) 42 : 5 : 25 : 25 กรัม ผสมรวมกันและหมักที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รุ่งรัตน์, 2544) นำกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูที่ได้มาตรวจสอบสมบัติทางเคมีและทางจุลชีววิทยา โดยสมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1.2 คุณภาพทางจุลชีววิทยาได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1.1 และปริมาณยีสต์ ตามวิธีการของ Lacerda *et al*. (2005) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Malt Extract Agar (YM agar) โดยเติมคลอแรมเฟนนิคอล (Chloramphenicol) ปริมาณ 100 มิลลิกรัม ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการเจริญของรา และใช้เทคนิค spread plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.4.2.2 การผลิตขนมถ้วยฟู เตรียมส่วนผสมของขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน ประกอบด้วย แป้งข้าวเจ้าสด น้ำตาลโตนดเข้มข้น น้ำ และกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูพื้นบ้านที่เตรียมไว้ ในอัตราส่วน 50 : 30 : 10 : 10 โดยดัดแปลงจากวิธีของรุ่งรัตน์ (2544) ผสมรวมกันและนำไปหมักไว้ที่อุณหภูมิ 2 ระดับ ได้แก่ ที่อุณหภูมิห้อง และ 35 องศาเซลเซียส โดยเก็บตัวอย่างแป้งหมักที่เวลาต่าง ๆ ได้แก่ 0, 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ศึกษาสมบัติทางเคมี จุลชีววิทยา กายภาพ และทางประสาทสัมผัส เพื่อคัดเลือกกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน โดยสมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณกรดแลกติก สมบัติทางจุลชีววิทยาได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก และปริมาณยีสต์ สมบัติทางกายภาพ ได้แก่ การวัดปริมาตรการขึ้นฟูโดยวิธีการ Rapeseed displacement โดยใช้เมล็ดงาในการแทนที่ (กนก, 2521)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.4.3 การคัดแยกและศึกษาสมบัติของยีสต์จากกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

3.4.3.1 คัดแยกยีสต์ เตรียมกล้าเชื้อใหม่ โดยใช้แหล่งกล้าเชื้อที่ให้ผลดีสุดในการผลิตขนมถ้วยฟูมาผลิตเป็นแป้งหมักขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน จากนั้นมาทำการคัดแยกยีสต์ โดยใช้แป้งหมักปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จนถึงระดับ 10^{-5} ปิเปตสารละลายแป้งหมักมา 0.1 มิลลิลิตร เลี้ยงบนอาหารแข็ง อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt Extract Agar (YM agar)โดยเติมสารคลอแรมเฟนนิคอล ปริมาณ 100 มิลลิกรัมในน้ำ 1000 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิค spread plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นคัดเลือกยีสต์จากโคโลนี ที่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว จากระดับความเจือจาง ที่ 10^{-3} เพื่อให้ได้โคโลนียีสต์ที่ให้ลักษณะเด่น โดยคัดเลือกยีสต์ให้ได้จำนวน 20 โคโลนี จึงนำมาขีดลาก (streak) บนอาหารแข็ง YM เพื่อให้ได้เซลล์ยีสต์บริสุทธิ์ และเก็บรักษายีสต์บริสุทธิ์ในอาหารแข็งเอียง YM ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.3.2 ความสามารถในการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ โดยนำยีสต์จากอาหารแข็งเอียง YM ที่แยกได้จากข้อ 3.4.3.1 จำนวน 1 ลูป เลี้ยงด้วยอาหาร YPD (ประกอบด้วย อาหาร YPD 5 มิลลิลิตร และเติมกลูโคส ร้อยละ 18) ในขวด McCartney ที่ปิดด้วยฝาพลาสติก เจาะช่องสำหรับต่อสายยางกว้าง 0.5 เซนติเมตร ยาว 5 เซนติเมตร เสียบต่อกับกระบอกเก็บแก๊ส (gas syringe) ขนาด 100 มิลลิลิตร และใช้พาราฟิล์ม พันปิดบริเวณช่องต่อทั้งสองด้าน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Martorell *et al.*, 2007) โดยค่าที่ได้เป็นปริมาตรจากยีสต์ที่มีสมบัติการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

3.4.3.2 การผลิตเอนไซม์อะมัยเลส โดยนำยีสต์จากอาหารแข็งเอียง YM ที่แยกได้ จากข้อ 3.4.3.1 จำนวน 1 ลูป มาแตะบนผิวหน้าอาหาร Solution starch agar (ประกอบด้วย solution starch, yeast extract และ agarในอัตราส่วน (โดยน้ำหนัก) 4 : 5 : 1.5) โดยแตะในลักษณะ 4 จุดต่อจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นใช้สารละลาย Lugd's iodine เทบนหน้าอาหาร ตั้งไว้ 1 นาที จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และวงใสรอบรอบโคโลนี (Limtong *et al.*, 2002) ค่าที่ได้คำนวณเป็นสัดส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี และวงใสรอบโคโลนี เพื่อแสดงถึงลักษณะของกิจกรรมของยีสต์ที่มีสมบัติการผลิตเอนไซม์อะมัยเลส

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.4.3.3 ความสามารถในการทนกรดของยีสต์ โดยนำยีสต์จากอาหารแข็งเอียง YM ที่แยกได้ จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 3 ระดับ ได้แก่ 4, 4.5 และ 5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างเก็บตัวอย่างมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยเทคนิค spread plate บนอาหาร YM agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

3.4.4 การคัดแยกและศึกษาสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติก จากกล้าเชื้อขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

3.4.4.1 แบคทีเรียกรดแลกติก ทำการเตรียมสารละลายแป้งหมัก เช่นเดียวกับการคัดแยกยีสต์ จากนั้นปิเปตสารละลายแป้งหมักมา 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารแข็ง MRS (เติม $CaCO_3$ 0.3 กรัม / 100 มิลลิลิตร) ด้วยเทคนิค pour plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติก ที่มีบริเวณใสล้อมรอบโคโลนี (Clear zone) จากระดับความเจือจางที่ 10^{-6} เพื่อให้ได้โคโลนียีสต์ที่ให้ลักษณะเด่นโดยคัดเลือกให้ได้จำนวน 20 โคโลนี จากนั้นนำมาขีดลากบนอาหารแข็ง MRS เพื่อให้ได้เซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกบริสุทธิ์ นำเซลล์แบคทีเรียกรดแลกติกที่ได้ไปตรวจสอบรูปร่าง ได้แก่ การย้อมแกรม และการทดสอบเอนไซม์คะตาเลส คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และเก็บรักษาในอาหารแข็งเอียง MRS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.4.4.2 การผลิตกรด โดยนำแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารแข็งเอียง MRS ที่แยกได้ จำนวน 1 ลูป มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช และปริมาณกรดทั้งหมด ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.4.1.2 โดยค่าที่ได้เป็นปริมาณกรด และค่าพีเอชจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีสมบัติการผลิตกรด

3.4.4.3 ความสามารถในการทนเอทานอล โดยนำแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารแข็งเอียง MRS จำนวน 1 ลูป มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ปรับให้มีความเข้มข้นของเอทานอล 3 ระดับ ได้แก่ 5, 10 และ 15 (ปริมาตรต่อปริมาตร) โดยใช้เอทานอล จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมานับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยเทคนิค Pour plate บนอาหาร MRS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

3.4.5 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลกติก

สายพันธุ์ยีสต์ที่มีสมบัติการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้สูง มีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส และทนกรดได้สูง นำมาจำแนกสายพันธุ์โดยใช้ APL 32 (Bio-merieux, France) และ

Prince of Songkla University Pattani Campus

สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีสมบัติการผลิตกรด และทนต่อเอทานอลได้สูง นำมาจำแนกสายพันธุ์ โดยใช้ APL 50 CHL (Biomerieux, France)

3.4.6 การประยุกต์ใช้ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลกติกเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์

3.4.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อบริสุทธิ์

เตรียมจากยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกบริสุทธิ์ที่ทราบสายพันธุ์แล้ว ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็งเอียง YM และ MRS ตามลำดับ นำยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลกติกบริสุทธิ์ จำนวน 1 ลูปมาเลี้ยงในอาหารเหลว YM และMRS ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์เลี้ยงด้วยการนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติก ทุก 3 ชั่วโมงใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง ทุกวันเป็นระยะเวลา 7 วัน โดยใช้วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คำนวณหาอัตราการเจริญเติบโต จากค่าความชันของกราฟระหว่าง log X และเวลา (t) ตามวิธีการของ Paramithiotis *et al.,* (2007) และวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกบริสุทธิ์โดยวิธี Spread plate และ Pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM และ MRS ตามลำดับ จากนั้นเลือกใช้เซลล์ในช่วงการเจริญดีที่สุด (Log phase) นำไปหมุนเหวี่ยงที่ 9,000 g เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น นำเซลล์ที่ได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น เป็นสารละลายแขวนลอย โดยให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับขนมถ้วยฟูที่ผลิตจากลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอยะหริ่ง คือ 10^6 CFU/g นำไปใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการทดสอบการทำขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน

3.4.6.2 การผลิตขนมถ้วยฟูพื้นบ้านด้วยกล้าเชื้อยีสต์และแบคทีเรียกรดแลกติกบริสุทธิ์

การเตรียมผลิตขนมถ้วยฟูพื้นบ้าน มีส่วนประกอบ ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า น้ำตาลโตนด น้ำ และกล้าเชื้อบริสุทธิ์ ในอัตราส่วน 50 : 30 : 10 : 10 โดยดัดแปลงตามวิธีของรุ่งรัตน์ (2544) นำมาผสมกัน และหมักไว้ที่อุณหภูมิ 2 ระดับ ได้แก่ อุณหภูมิห้อง และ 35 องศาเซลเซียส โดยหมักเป็นระยะเวลา 3 - 5 ชั่วโมง มาศึกษาสมบัติทางเคมี จุลชีววิทยา กายภาพ และทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยสมบัติทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด และองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (Proximate analysis) ประกอบด้วย ปริมาณความชื้น ไขมัน โปรตีน เถ้า ใยอาหาร และคาร์โบไฮเดรต สมบัติทางจุลชีววิทยาได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด ปริมาณยีสต์และรา ปริมาณแบคทีเรียกรดแลกติก และปริมาณยีสต์ สมบัติทางกายภาพ ได้แก่ วัดปริมาตรการขึ้นฟู และทดสอบทางประสาทสัมผัส

Prince of Songkla University Pattani Campus