บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการศึกษา

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

- ข้าวกล้องหอมมะลิ ตราเบอร์ 5 จากห้างเทสโก้โลตัส อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
- นมผงขาดมันเนยที่ผ่านการทำให้แห้งโดยกระบวนการ spray drying ตรา มิชชั่น (Mission, New Zealand)
- คาราจีแนน (carragenan type K-100) (Copenhagen pectin A/S, Denmark)
- 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)

3.1.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.1.2.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิตและวิเคราะห์คุณภาพโยเกิร์ต

- ตู้อบลมร้อน (hot air oven, Memmert, USA)
- หม้อนึ่งความดัน (Gallenkamp, England)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (Hunna Instrument, Italy)
- เครื่องปั่นผสม (Otto, Thailand)
- เครื่องมือวิเคราะห์เคมีคลินิก Liasys (AMS Srl, Italy)
- ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37±1 องศาเซลเซียส (Gallenkamp, England)
- เครื่องนับจำนวนโคโลนี
- Anaerobic jar (Merck, Germany)
- Anaerocult (Merck, Germany)
- เครื่อง stomacher

3.1.2.2 อุปกรณ์สำหรับเลี้ยงสัตว์ทดลอง

- กรงอะลูมิเนียม
- ขวดให้น้ำสำหรับสัตว์ทดลอง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

- เครื่องชั่งน้ำหนัก (Tanita, Japan)
- วัสดุรองนอน (สำนักสัตว์ทดลอง, ประเทศไทย)
- โถสลบ
- เข็มฉีดยาเบอร์ 20 (Nipro, Japan)
- กระบอกฉีดยา ขนาด 5 มิลลิลิตร (Nipro, Japan)
- มีดผ่าตัด (Mira, U.S.A)
- กรรไกรผ่าตัด (Mira, USA)
- ปากคีบ (Mira, USA)
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuges, HerMLF, Germany)
- หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2, 15 มิลลิลิตร
- หลอดดูดซีรั่ม

3.1.3 สารเคมี

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Merck, Germany)
- MacConkey agar (Merck, Germany)
- กรดไฮโดรคลอริค (Merck, Germany)
- Yeast extract (Merck, Germany)
- เมธิลออเร้นจ์ (Fluka, Switzerland)
- MRS broth (Himedia, India)
- Lauryl Tryptose broth (Himedia, India)
- ฟีนอล์ฟธาลีน
- ผงวุ้น (โอ.วี.เคมิคอล, ประเทศไทย)
- Yeast extract glucose chloramphenical agar (Difco, USA)
- Lithium choride (Fisher scientific, England)
- Brilliant green lactose bile broth (Merck, Germany)
- Propionic acid (Fluka, Germany)
- Peptone (Merck, Germany)
- คลอโรฟอร์ม (Lab-scan, Thailand)
- แคลเซียมคาร์บอเนต
- ชุดน้ำยาวิเคราะห์ไตรกลีเซอไรด์ (Humandiagnostics, Germany)
- ชุดน้ำยาวิเคราะห์คอเลสเตอรอล (Humandiagnostics, Germany)
- ชุดน้ำยาวิเคราะห์เอชดีแอลคอเลสเตอรอล (Humandiagnostics, Germany)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3.1.4 ระบบประมวลผลข้อมูล

– โปรแกรมประมวลผลสำเร็จรูป SPSS V.12.0 (SPSS Inc, USA)

3.2 วิธีการศึกษา

ตอนที่ 1 การผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องผสมเชื้อ *B. longum* สำหรับใช้เลี้ยงหนู

1.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (starter culture propagation)

1) การเตรียมเชื้อเริ่มต้นขั้นแรก (stock culture)

เตรียมสารละลายลิตมัส (Litmus solution) โดยใช้ นมผงขาดมันเนยร้อยละ 16 ลิตมัสร้อยละ 2 ยีสต์เอกสแตรกท์ร้อยละ 0.3 ใส่ในลงในหลอดทดลองขนาด 15×160 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตร10 มิลลิลิตร โดยใช้แคลเซียมคาร์บอเนตประมาณ 0.2 กรัม ใส่ที่ก้นหลอดทดลอง แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นนำมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสโดยแช่หลอดทดลองที่บรรจุสารละลายลิสมัตในน้ำที่อุณหภูมิห้องนำเชื้อ *B. longum* และเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* มาเพาะในหลอดทดลองที่บรรจุสารละลายลิตมัส จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำหลอดทดลองที่เพาะเชื้อ *B. longum* และเชื้อ *S. thermophilus* และ *L. bulgaricus* แล้ว มาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคต่อไป โดยมีอายุการเก็บรักษา 2 สัปดาห์ (ฉัตพร, 2548)

2) การเตรียม Mother culture

Mother culture มีส่วนประกอบคือ นมผงขาดมันเนย ร้อยละ 16 และยีสเอกสแตรกท์ร้อยละ 0.1 เตรียมในปริมาณ 100 มิลลิลิตร ในขวดฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นนำมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้อง โดยเติมเชื้อ *B. longum* และโยเกิร์ตจากสารละลายลิตมัสที่ได้รับการเพาะเชื้อในขั้นตอนการเตรียมเชื้อเริ่มต้น ปริมาณร้อยละ 2 โดยปริมาตร (ในแต่ละขวดแยกชนิดกัน) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อโพรไบโอติคต่อไป โดยมีอายุการเก็บรักษา 1 สัปดาห์ (ฉัตพร, 2548)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3) การเตรียม Intermediate starter

Intermediate starter มีส่วนประกอบคือนมผงขาดมันเนยร้อยละ 16 ปริมาณ 400 มิลลิลิตรในขวดฝาเกลียวขนาด 1 ลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นนำมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยแช่ในน้ำที่อุณหภูมิห้องโดยเติมเชื้อ *B. longum* และโยเกิร์ตจาก Mother cultur ที่ได้รับการเพาะเชื้อปริมาณร้อยละ 2 โดยปริมาตร (ในแต่ละขวดแยกชนิดกัน) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส โดยเชื้อที่เพาะได้จาก Intermediate starter นี้จะใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องต่อไป (ณัติพร, 2548)

1.2 การผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้อง

1) สูตรของโยเกิร์ตข้าวกล้องผสมน้ำผึ้งเติมเชื้อ *B. longum*

สูตรของโยเกิร์ตข้าวกล้องผสมน้ำผึ้งเติมเชื้อ *B. longum* แสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สูตรโยเกิร์ตข้าวกล้องผสมน้ำผึ้ง เติมเชื้อ *B. longum*

	ปริมาณ (ร้อยละ)	
	คำนวณตามส่วนประกอบหลัก	คำนวณตามส่วนประกอบรวมทั้งหมด
ส่วนประกอบหลัก		
น้ำ	85.71	69.56
ข้าวกล้องสุก	14.29	11.6
ส่วนประกอบอื่น ๆ		
นมผงขาดมันเนย	10.15	6.13
น้ำผึ้ง	10	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

2) กรรมวิธีการผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องผสมน้ำผึ้ง เติมเชื้อ *B. longum*

การผลิตโยเกิร์ตข้าวกล้องผสมน้ำผึ้ง เติมเชื้อ *B. longum* มีกรรมวิธีการผลิตเป็นขั้นตอนดังนี้ (ณัติพร, 2548)

1. หุงข้าวกล้อง ในอัตราส่วนข้าวกล้อง 100 กรัม ต่อน้ำ 200 มิลลิลิตร
2. ผสมข้าวกล้องสุก 74 กรัมเติมน้ำให้ครบ 500 มิลลิลิตร นำไปปั่นให้เข้ากันในเครื่องปั่นผสมความเร็วระดับที่ 2 เป็นเวลา 3 นาที
3. เติมน้ำผึ้ง 50 กรัม นมผงขาดมันเนย 50.75 กรัม คาราจีแนน 0.39 กรัม ปั่นให้เข้ากันในเครื่องปั่นผสมความเร็วระดับที่ 2 เป็นเวลา 3 นาที
4. บรรจุน้ำนมข้าวกล้องที่ได้ลงในขวดแก้วฝาเกลียวให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปให้ความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
5. นำขวดบรรจุน้ำนมข้าวกล้องแช่ในน้ำเย็นจนอุณหภูมิลดลงถึง 37 องศาเซลเซียส
6. เติม Intermediate starter ที่ได้รับการเพาะเชื้อ *B. longum* 7.4 กรัม และ Intermediate starter ที่ได้รับการเพาะเชื้อ *S. Thermophilus* กับ *L. bulgaricus* 14.8 กรัม ลงในน้ำนมข้าวกล้องที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
7. นำขวดบรรจุน้ำนมข้าวกล้องไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง
8. นำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส แล้ววิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมี และจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3) การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีและทางจุลินทรีย์ของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum*

การวิเคราะห์ทางด้านเคมี

– ค่าความเป็นกรดเป็นด่างโดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (Hanna Instrument, Italy)

– ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (AOAC, 1998)

การวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์

– ปริมาณเชื้อเริ่มต้น *B. longum* โดยใช้วิธีเพลทเคาท์ (viable plate count) แบบ spread plate โดยใช้ LP-MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาพไร้ออกซิเจน (ภาคผนวก ค-3)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

– ปริมาณเชื้อเริ่มต้น *L. bulgaricus+S. thermophilus* โดยใช้วิธีเพลทเคาท์ (viable plate count) แบบ spread plate โดยใช้ MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ภาคผนวก ค- 4)

– จำนวนยีสต์และรา โดยใช้ yeast extract glucose chloramphenical agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ค-8)

– จำนวนเชื้อโคลิฟอร์มแบคทีเรียโดยวิธี Most probable number ใช้ Lauryl tryptose broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ค-7)

ตอนที่ 2 การศึกษาผลของโยเกิร์ตข้าวกล้องผสมน้ำผึ้งเติมเชื้อ *B. longum* ที่มีต่อหนู

ในการทดลองเลือกใช้หนูแรทสายพันธุ์วิสตาร์ (Wistar stain) เพศผู้ อายุ 4 สัปดาห์ ทำการปรับสภาพร่างกายของหนูโดยการให้อาหารและน้ำเต็มที่ตลอดวัน (ad libitum) เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์จำนวนทั้งหมด 18 ตัว หลังจากนั้นทำการสุ่มเลือกหนูเพื่อทำการให้อาหารและโยเกิร์ตเป็นเวลาทั้งหมด 42 วัน โดยแบ่งหนูเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังนี้

– กลุ่มทดลอง (experiment group) ให้อาหารไขมันสูงและน้ำ เต็มที่ตลอดวัน (ad libitum) และให้โยเกิร์ตข้าวกล้องผสมน้ำผึ้งเติมเชื้อ *B. longum* วันละ 20 มิลลิลิตร

– กลุ่มควบคุมลบ (negative control group) ให้อาหารปกติและน้ำเต็มที่ตลอดวัน (ad libitum) และให้โยเกิร์ตข้าวกล้องผสมน้ำผึ้งเติมเชื้อ *B. longum* ที่ได้รับการ พาสเจอไรซ์ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วันละ 20 มิลลิลิตร

– กลุ่มควบคุมบวก (positive control group) ให้อาหารไขมันสูง(ภาคผนวก) และน้ำ เต็มที่ตลอดวัน (ad libitum) และให้โยเกิร์ตข้าวกล้องผสมน้ำผึ้งเติมเชื้อ *B. longum* ที่ได้รับการ พาสเจอไรซ์ ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที วันละ 20 มิลลิลิตร

สถานที่เลี้ยงภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

2.1 การศึกษาผลของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum* ต่อน้ำหนักตัวของหนู

ทำการบันทึกน้ำหนักของหนูทั้ง 3 กลุ่มทดลอง โดยชั่งด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักในวันแรกก่อนทำการให้อาหารและโยเกิร์ตในการทดลอง แล้วชั่งในวันที่ 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 หลังการให้อาหารและโยเกิร์ต

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

2.2 การศึกษาผลของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum* ต่อน้ำหนักอวัยวะของหนู

ทำการชั่งน้ำหนัก ตับ ไต หัวใจ และ ม้ามของหนูโดยทำการผ่าเปิดช่องอกหลังการเจาะเลือดและแยกลำไส้ออกแล้ว (ภาคผนวก ก-2)

2.3 การศึกษาผลของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum* ต่อปริมาณของเชื้อ *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. และ เชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ในมูลของหนู

ทำการเก็บมูลหนูในทั้ง 3 กลุ่ม (ภาคผนวก ก-3) โดยทำการเก็บในวันแรกก่อนทำการให้อาหารและโยเกิร์ตและ วันที่ 14, 28 และ 42 หลังการให้อาหารและโยเกิร์ต โดยทำการหาปริมาณเชื้อต่าง ๆ ดังนี้

– หาปริมาณเชื้อ *Bifidobacterium* spp. โดยใช้วิธีเพลทเคาท์ (viable plate count) แบบ spread plate โดยใช้อาหารแข็ง LP-MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาพไร้ออกซิเจน (ภาคผนวก ค-3)

– หาปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* spp. โดยใช้วิธีเพลทเคาท์ (viable plate count) แบบ spread plate โดยใช้อาหารแข็ง MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ภาคผนวก ค-4)

– หาปริมาณเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยใช้วิธีเพลทเคาท์ (viable plate count) แบบ spread plate โดยใช้อาหารแข็ง MacConkey บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ภาคผนวก ค-5)

2.4 การศึกษาผลของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum* ต่อปริมาณของเชื้อ *Bifidobacterium* spp., *Lactobacillus* spp. และ เชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae ในลำไส้เล็ก

ทำการแยกลำไส้เล็กหนูทั้ง 3 กลุ่มที่ผ่านการให้อาหารและโยเกิร์ตเป็นเวลา 42 วัน ลงในถุงพลาสติคที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั่นทำการชั่งน้ำหนักเติมสารละลายเปปโตนลงไปในอัตราส่วน 1:100 น้ำหนักต่อปริมาตร ตีผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Stomacher เป็นเวลา 5 นาทีนำไปทำการเจือจางด้วยแล้วทำการหาปริมาณเชื้อ ต่าง ๆ ดังนี้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

– หาปริมาณเชื้อ *Bifidobacterium* spp. โดยใช้วิธีเพลทเคาท์ แบบ spread plate โดยใช้อาหารแข็ง LP-MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงในสภาพไร้ออกซิเจน (ภาคผนวก ค-3)

– หาปริมาณเชื้อ *Lactobacillus* sppโดยใช้วิธีเพลทเคาท์ แบบ spread plate โดยใช้อาหารแข็ง MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ภาคผนวก ค-4)

– หาปริมาณเชื้อในกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยใช้วิธีเพลทเคาท์ แบบ spread plate โดยใช้อาหารแข็ง MacConkey บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (ภาคผนวก ค-5)

2.5 ศึกษาผลของโยเกิร์ตข้าวกล้องเติมเชื้อ *B. longum* ต่อระดับคอเลสเตอรอลรวม ไตรกลีเซอไรด์ เอชดีแอลคอเลสเตอรอล และแอลดีแอลคอเลสเตอรอล

ทำการเจาะเลือดจากหัวใจของหนูด้วยวิธีเปิดช่องอก (ภาคผนวก ก-7) นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกเม็ดเลือดแดงกับซีรั่ม (serum) ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงนำซีรั่มไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์เคมีคลินิคโดยทำการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

– คอเลสเตอรอลรวม (total cholesterol) (ภาคผนวก ข-1)

– เอชดีแอลคอเลสเตอรอล (HDL cholesterol) (ภาคผนวก ข-2)

– ไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) (ภาคผนวก ข-3)

– คำนวณหาปริมาณแอลดีแอลคอเลสเตอรอล (LDL cholesterol) ด้วยสมการมาตรฐานของ Friedewald (Standard friedewald equation) (Friedewald, 1972) (ภาคผนวก ข-4)

ตอนที่ 3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการทดลอง 3 ซ้ำโดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Randomize Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนโดยใช้ ANOVA เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมประมวลผลสำเร็จรูป SPSS V.12.0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved