1. ผู้ปฏิบัติ พนักงานแผนกควบคุมคุณภาพ
2. คำนิยาม Slant หัวเชื้อ หมายถึง S –yeast / Acetobactor ที่เจริญแล้วบนอาหารวุ้นเอียง เพื่อใช้นำไปเพาะ เลี้ยงทำเป็น Starter yeast / Starter Vinegar ต่อไป
3. เครื่องมือและอุปกรณ์
   3.1 หัวเชื้อยีสต์บริสุทธิ์(Pure Culture)จากประเทศญี่ปุ่น
   3.2 หัวเชื้อ Acetobactor บริสุทธิ์(Pure Culture)จาก BIOTECH
   3.3 หลอดอาหารวุ้นเอียง (Slant)
   3.4 loop เขี่ยเชื้อ
   3.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ Teihen
   3.6 Measuring pipette และ Petri dish ที่ฆ่าเชื้อแล้ว
   3.7 ชุดอุปกรณ์สำหรับทำ Dilution
   3.8 ชุดอุปกรณ์การเตรียมพื้นที่ก่อนการตรวจสอบ

4. ขั้นตอน
   4.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
      4.1.1 อาหารวุ้นเอียง (Slant) ชนิด YM
         1) สูตรส่วนประกอบ (สำหรับการเตรียม 250 ml)

รายการ	หมายเลขสารเคมี	น้ำหนัก
Peptone	33	1.3 g.
Yeast extract	68	0.8 g.
Malt extract	67	0.8 g.
D-Glucose	36	7.5 g.
Agar powder	31	6 g.
เกลือ(99% Vac. Salt)		20 g.
น้ำกลั่น		250 มล.
KH_2PO_4	30	0.25 g.

2) ขั้นตอนการเตรียม

1) ชั่งส่วนผสมตามสูตรใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 ml

2) คนให้เข้ากัน

3) นำไปปรับ PH ให้ได้ 5.1 – 5.2 ด้วย 30% NaOH หรือ Conc. H_2SO_4

4) อุ่นให้ละลายในน้ำเดือดประมาณ 15 – 20 นาที

5) เทอาหารใส่หลอดทดลอง หลอดละประมาณ 5ml ปิดจุกและหุ้มทับด้วยกระดาษฟลอยด์

6) นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่ 121 ^{O}C 20 นาที

7)นำออกมาวางให้นอนกับพื้น แล้วเอียงให้ด้านจุกเอียงขึ้นจากพื้น โดยระยะของอาหารในหลอดทดลองด้านก้นมีช่วงความหนา ประมาณ 0.5 – 1 cm

8) ทิ้งให้แข็งตัว 1 คืน ได้เป็น Slant

9)บันทึกในรายงานการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (FM-QC-56)

4.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Teihen

1) สูตรส่วนประกอบ (สำหรับการเตรียม 250 ml)

รายการ	หมายเลขสารเคมี	น้ำหนัก
Yeast extract	68	0.75 g.
Malt extract	67	0.75 g.
D-Glucose	36	2.5 g.
Peptone	33	1.25 g.
เกลือ(99% Vac. Salt)		25 g.
ซีอิ๊ว 16.8% – 17.2		25 มล.
Agar powder	31	4.5 g.
Chloramphenicol	1	0.025 g.
น้ำกลั่น		225 มล

2) วิธีเตรียม

1) ชั่งส่วนผสม ข้อ 1) ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 ml

2) คนให้เข้ากัน

3) ปรับ pH ให้ได้ 5.1 – 5.2 ด้วย 30% NaoH หรือ Conc. H_2SO_4

4) อุ่นให้ละลายในน้ำเดือดประมาณ 15 – 20 นาที

5) เทลงใน T. flask ขนาด 300 ml ปิดจุกแล้วหุ้มกระดาษฟลอยด์ทับ

6) นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่ 121 ^{O}C เป็นเวลา 20 นาที

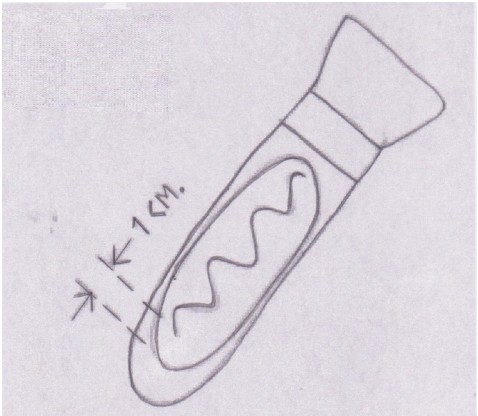
4.1.3 ขั้นตอนการเตรียม

1. เตรียม Measuring และ petri dish ตามวิธีการเตรียมอุปกรณ์ก่อนการตรวจสอบ ใน WI-QC-73 การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์
2. เตรียมน้ำเกลือ 9% สำหรับทำ Dilution ตาม"วิธีการเตรียมน้ำสำหรับทำ Ditution" ใน WI-QC-73 การตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์
3. เตรียมพื้นที่ก่อนการตรวจสอบตาม " วิธีการเตรียมพื้นที่ก่อนการตรวจสอบ" (WI-QC-21) มี
4. นำหัวเชื้อยีสต์บริสุทธิ์มาทำ Dilution โดย
   เชื้อ S – yeast ใช้ความเข้มข้น 10^{-1} ถึง 10^{-9}
5. เลือกสารละลายที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ มาใส่ลงใน petri dish จำนวน 3 ซ้ำ
   เชื้อ S – yeast ใช้ความเข้มข้น 10^{-7} และ 10^{-9}
6. เทอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Teihen ลงไปใน Petri dish ตาม "วิธีการใส่อาหารเลี้ยงเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อ" (WI-QC-22)
7. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 °C เป็นเวลา 4 วัน

8. ตรวจสอบลักษณะ Colony
   S – yeast จะมีสีขาวและตรงกลาง Colony จะมีสีเข้ม กว่ารอบนอกเมื่อมองจากด้านบน และเมื่อมองจากด้านข้างจะมีลักษณะดังรูป

9. เขี่ย Colony ของเชื้อยีสต์ดังกล่าวจาก petri dish ลงใน Slant ที่เตรียมไว้ด้วยวิธีดังนี้ โดยควรเลือก Colony ที่มีลักษณะใหญ่ และสมบูรณ์
   1) ลนไฟฆ่าเชื้อ Loop เขี่ยเชื้อแล้วทิ้งให้เย็น
   2) เขี่ย Colony จาก petri dish

3)นำมาลากบนผิว Slant โดยลากซีกแซกไปมาจากด้านก้นหลอดทอลองออกมาถึงปากหลอดและเว้นระยะจากก้นหลอดถึงจุดเริ่มลาก ประมาณ 1 ซม. ดังรูป



4) บันทึกวันที่ทำการเขี่ยและชนิดของเชื้อลงข้างหลอด slant

5) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 ± 2 °C เป็นเวลา 4 วัน

6) นำไปเก็บในตู้เย็น ควบคุมอุณหภูมิ ไม่เกิน 20 องศาเซลเซียส และบันทึกอุณหภูมิในตู้เย็น ทุก 4 ชั่วโมง (Data logger บันทึกอุณหภูมิแบบอัตโนมัติ ตาม SP-QC-64 No.35) โดยก่อนเก็บให้ใช้กระดาษและพลาสติกแร็ปหุ้ม ส่วนจุกและ รอยต่อของจุกกับหลอดทดลองให้มิดชิด

10.Slant ที่มีเชื้อยีสต์นี้ สามารถเก็บไว้ใช้ได้นาน 3 เดือน จากนั้นจะต้องทำการต่อเชื้อ จาก Slant ไปสู่ Slant ใหม่ โดยวิธีเขี่ยเชื้อจาก Slant ที่เก็บไว้ ไปสู่ Slant ใหม่ด้วยวิธีปลอดเชื้อและก่อนเขี่ยเชื้อต้องวาง Slant ทิ้งไว้สักพักเพื่อปรับอุณหภูมิให้อยู่ในระดับเดียวกับอุณหภูมิห้อง

ข้อควรระวัง :หัวเชื้อจากประเทศญี่ปุ่นมีอายุการเก็บ 2 ปี

4.1.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP เลี้ยงเชื้อ Acetobactor aceti สำหรับ Vinegar

1) สูตรส่วนประกอบ (สำหรับการเตรียม 500ml)

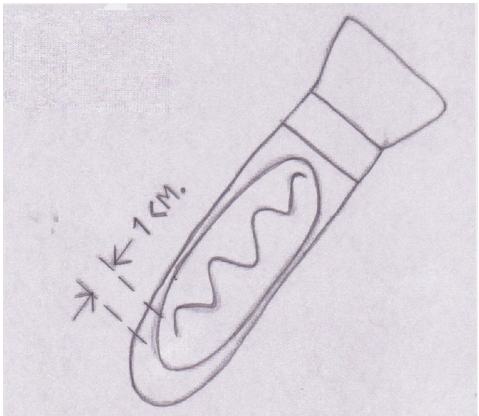
รายการ	หมายเลขสารเคมี	น้ำหนัก
Glucose	36	12.5 g
Yeast Extract	68	1.50 g
Peptone	33	2.50 g
Agar Powder	31	6.0 g
Distilled Vinegar		500 ml

2) วิธีเตรียม

1) ชั่งส่วนผสมตามสูตรใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 ml
2) คนให้เข้ากัน
3) อุ่นให้ละลายในน้ำเดือดประมาณ 15 – 20 นาที
4) เทอาหารใส่หลอดทดลอง หลอดละประมาณ 5ml ปิดจุกและหุ้มทับด้วยกระดาษฟลอยด์
5) นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave ที่ 121 ^{O}C 20 นาที
6)นำออกมาวางให้นอนกับพื้น แล้วเอียงให้ด้านจุกเอียงขึ้นจากพื้น โดยระยะของอาหารในหลอดทดลองด้านก้นมีช่วงความหนา ประมาณ 0.5 – 1 cm
7) ทิ้งให้แข็งตัว 1 คืน ได้เป็น Slant
8) บันทึกในรายงานการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (FM-QC-56)

3.)เขี่ย Colony ของเชื้อ Acetobactor ดังกล่าวจาก petri dish/ Slant ลงใน Slant ที่เตรียมไว้ด้วยวิธีดังนี้

1)ลนไฟฆ่าเชื้อ Loop เขี่ยเชื้อแล้วทิ้งให้เย็น
2) เขี่ย Colony จาก petri dish/ Slant
3)นำมาลากบนผิว Slant โดยลากซีกแซกไปมาจากด้านก้นหลอดทอลองออกมาถึงปากหลอดและเว้นระยะจากกันหลอดถึงจุดเริ่มลาก ประมาณ 1 ซม. ดังรูป



4) บันทึกวันที่ทำการเขี่ยและชนิดของเชื้อลงข้างหลอด slant
5) นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 $\pm$ 2 ^{o}C เป็นเวลา 4 -7 วัน โคโลนีขึ้นสีขาวขุ่น
6) นำไปเก็บในตู้เย็น ควบคุมอุณหภูมิ ไม่เกิน 20 องศาเซลเซียส และบันทึกอุณหภูมิในตู้เย็น ทุก 4 ชั่วโมง (Data logger บันทึกอุณหภูมิแบบอัตโนมัติ ตาม SP-QC-64 No.35) โดยก่อนเก็บให้ใช้กระดาษและพลาสติกแร็ปหุ้ม ส่วนจุกและ รอยต่อของจุกกับหลอดทดลองให้มิดชิด

5.เอกสารที่เกี่ยวข้อง

รายงานการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (FM-QC-56)