บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 อุปกรณ์

เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb , USA.

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV/vis Spectrophotometer) รุ่น PR-1 ของบริษัท Shimudzu , Japan.

เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (Microcentrifuge) รุ่น H-103N ของบริษัท Kokusan, Japan.

เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated Centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman, USA.

ตู้ลามินาโฟลว์ (Laminar flow) รุ่น NU-440-400E ของบริษัท Nuaire, USA.

กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CH-2 ของบริษัท Olympus Optical , Japan.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น Tomy SS 325 ของบริษัท Tomy, Japan.

ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิต่ำ (Deep Freeze) อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Ravco, USA.

ชุดเครื่องมือสำหรับทำเจลอิเลคโตรโฟริซิสแบบแผ่น (Slab Gel Electrophoresis Equipment) รุ่น Mini Protein Dual Slab Cell ของบริษัท Biorad, USA.

กระดาษกรอง (Millipore Membrane) รุ่น GS pore size 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Gelman Science , USA.

หัวกรอง (Supor Membrane) ของบริษัท Gelman Sciences, USA.

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ของบริษัท Memmert , USA.

เครื่องผสมสาร (Vortex Mixture) ของบริษัท Scientific Industries, USA.

ถุงไดอะไลซิส (Dialysis Bag) ของบริษัท Spectrum Medical Industries, USA.

1.2 เคมีภัณฑ์

ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (DiPotassium Hydrogen Phosphate) ของบริษัท Carlo, USA.

ไดแอมโมเนียมซิเตรท (DiAmmonium Citrate) ของบริษัท Merck, Germany

ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท Merck, Germany

โซเดียมอะซิเตท (Sodium Acetate) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium Sulfate) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แมงกานีสซัลเฟต (Manganese Sulfate) ของบริษัท Carlo, USA.

โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Sodium DiHydrogen Phosphate) ของบริษัท Merck, Germany

ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (DiSodium Hydrogen Phosphate) ของบริษัท Carlo, USA.

คริสตัลไวโอเล็ต (Crystal Violet) ของบริษัท Carlo, USA.

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) ของบริษัท T.J.Baker, USA.

ไอโอดีนคริสตัล (Iodine Crystal) ของบริษัท Ajax Chemical, USA.

โปแตสเซียมไอโอไดด์ (Potassium Iodide) ของบริษัท Carlo, USA.

เอธานอล (Ethanol) ของบริษัท T.J.Baker, USA.

เมธานอล (Methanol) ของบริษัท T.J.Baker, USA.

ซัลฟานิน (Safranin) ของบริษัท Carlo, USA.

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ (3% Hydrogen peroxide Solution) ของบริษัท Merck, Germany

ทริส - ไฮโดรคลอไรด์ (Tris - HCl) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

ทริส - เบส (Tris - base) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

โคมาสซี่บิลเลียนท์ บลู (Coomassie brillient Blue) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

กรดอะซิติก (Acetic Acid) ของบริษัท Merck, Germany

อะคริลาไมด์ (Acrylamide) ของบริษัท Merck, Germany ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

เมธิลีน บิสอะคริลาไมด์ (N,N,N,N,-Methylene bis acrylamide) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (Sodium Dodecyl Sulfate) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

ทีเมด (TEMED) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (Ammonium persulfate) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric Acid) ของบริษัท Ajax Chemical, USA.

โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

โบรโมฟีนอล บลู (Bromophenol Blue) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

กลีเซอรอล (Glycerol) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

ไดไธโอทรีไอทอล (Dithiothreitol) ของบริษัท Merck, Germany

ฟีนิล เมธิล ซัลโฟนิล ฟลูโอไรด์ (Phenyl Methyl Sulphonyl Fluoride) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

2. เอนไซม์

ไลโซไซม์ (Lysozyme) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

มิวทาโนไลซิน (Mutanolysin) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

โปรติเนสเค (Proteinase K) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

แบคโตอาการ์ (Bacto Agar) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

โปรติโอสเปปโตน (Proteose Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

เนื้อวัวสกัด (Beef Extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แบคโตเปปโตน (Bacto Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

เด็กซ์โตรส (Dextrose) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

แลคโตส (Lactose) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

มอลโตส (Maltose) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

ไซโลส (Xylose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

ชูโครส (Sucrose) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
อะราบิโนส (Arabinose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
ซอร์บิทอล (Sorbitol) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
ฟรุคโตส (Fructose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
เมลิซิโทส (Melizitose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
ราฟฟิโนส (Raffinose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
ไรโบส (Ribose) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
กลีเซอรอล (Glycerol) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.
แมนนิทอล (Mannitol) ของบริษัท Sigma Chemical Company, USA.

4. จุลินทรีย์

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยนี้มาจาก 2 แหล่ง คือ

- ได้รับจากรศ.ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
- เชื้อที่แยกใหม่จากอาหารหมักดองพื้นเมือง

จุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรีย ได้จาก American Type Culture Collection (ATCC) ได้แก่

แบคทีเรียแกรมบวก

Staphylococcus aureus ATCC 25923
Bacillus subtilis ATCC 6633
Micococcus varians ATCC 15306
Pediococcus pentosaceus ATCC 33316
Lactobacillus pentosus ATCC 8041

แบคทีเรียแกรมลบ

Escherichia coli ATCC 25922

ยีสต์

Candida albicans ATCC 10231

จุลินทรีย์ type strain ได้จาก Deutsche sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM) ได้แก่

Lactobacillus plantarum DSM 20174^{T}

L. pentosus DSM 20314^{T}

L.sake DSM 15521^{T}

Pediococcus pentosaceus DSM 20336^{T}

P.acidilactici DSM 20284^{T}

จุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรียก่อโรค ได้รับความอนุเคราะห์จาก กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข นนทบุรี ได้แก่

Salmonella derby

S. chloleraesuis

S. enteritidis

S. typhimurium

Shigella flexneri type 2a

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

i 17191981

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

1. การแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จากอาหารหมักดองพื้นเมือง และทำเชื้อที่ได้ให้บริสุทธิ์

ทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากอาหารหมักดองประเภทต่างๆ ดังต่อไปนี้ คือ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาร้า ข้าวหมาก เป็นต้น โดยนำตัวอย่างอาหารมาทำให้เจือจางด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ เพื่อให้ปริมาณเชื้อในตัวอย่างลดลงเป็นลำดับ ดูดตัวอย่างที่ได้ 1 มิลลิลิตร มาใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เทอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก. ข้อ 1.1) ที่หลอมเหลว และมีอุณหภูมิประมาณ 42-45 องศาเซลเซียสลงไป โดยวิธีการ pour plate technique เขย่าให้เชื้อกระจายทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน เมื่อเชื้อเจริญแล้ว เลือกเก็บโคโลนีในวุ้น นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก. ข้อ 1.1) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน ตรวจดูลักษณะเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลวด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยทำการเวทเมาท์ (wet mount) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียรูปกลม แท่ง และต่อกันเป็นโซ่ ซึ่งเป็นลักษณะของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus* , *Lactobacillus* และ *Leuconostoc* ตามลำดับ และนำไปทำให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบนอาหารแข็ง MRS เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

2. การศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ลักษณะทางชีวเคมีบางประการ และ protein profiles

นำแบคทีเรียที่แยกได้ มาศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ลักษณะทางชีวเคมีบางประการ เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรีย โดยยึดแนวจัดจำแนกแบคทีเรียตามหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 8th edition (Kandler และ Wiess, 1986)

2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

- การติดสีแกรม (Gram Stain)

ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก. ข้อ 1.1) อายุ 36-48 ชั่วโมง นำไปย้อมแกรม (ภาคผนวก ก. ข้อ 3) ดูรูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซล

2.2 การศึกษาลักษณะการเจริญ

- การเจริญบนอาหารแข็ง

เลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง MRS ตรวจสอบ และบันทึกลักษณะของโคโลนีเชื้อ โดยสังเกตุลักษณะขอบ รูปร่าง และลักษณะการสร้างสารมีสี (pigment) ของโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็ง ที่บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน

- ความสามารถเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว GYP (ภาคผนวก ก. ข้อ 1.3) ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลวันที่ 3, 5 หรือ 7 หลังจากบ่มไว้

- ความสามารถเจริญที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว GYP (ภาคผนวก ก. ข้อ 1.3) บ่มที่อุณหภูมิ 15, 30 และ 45 องศาเซลเซียส ตรวจผลวันที่ 3, 5 หรือ 7 หลังจากบ่มไว้

- Motility

ตรวจสอบความสามารถในการเคลื่อนที่โดยวิธี stab เชื้อลงในอาหาร GYP กึ่งเหลว บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 2-3 วัน ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะเห็นการเจริญของเชื้อแผ่ขยายออกจากบริเวณรอย stab

2.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมี

- การไฮโดรไลซ์เอสคูลิน (Esculin Hydrolysis)

เลี้ยงเชื้อในอาหาร (ภาคผนวก ก. ข้อ 1.4) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส นาน 7-14 วัน ตรวจผลโดยสังเกตุดูการเกิดผลึกคล้ายปะการังขึ้น เนื่องจากเชื้อไฮโดรไลซ์เอสคูลิน (Esculin) เป็น เอสคูเลติน (Esculetin) ได้ แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

- การสร้างเอนไซม์คะตะเลส

ใช้แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS อายุ 36-48 ชั่วโมง มากระจายบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก. ข้อ 2.1) ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองก๊าซ เกิดขึ้นแสดงว่าเป็นผลบวก เชื้อนั้นๆ สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่าผลเป็นลบ เชื้อนั้นไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

- การทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวพื้นฐาน ที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก. ข้อ 1.5) แหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบมี 14 ชนิด ได้แก่ กลูโคส มอลโตส แลคโตส ไรโบส ไซโลส ซูโครส อะราบิโนส ซอบิทอล ฟรุคโตส เมลิซิโทส เมลิไบโอส ราฟฟิโนส กลีเซอรอล และแมนนิทอล โดยเติมลงไป 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้เชื้ออายุ 36-48 ชั่วโมง ความขุ่นของเชื้อเมื่อวัดที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเท่ากับ 0.5 ปั่นแยกเซลที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที จากนั้น ล้างเซลด้วย 0.85 เปอร์เซ็นต์ normal saline 1 ครั้ง ใส่เชื้อลงในหลอดอาหารที่มีปริมาตร 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลวันที่ 7 ด้วยการไตไตรตกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล โดยใช้ mixed indicator (ภาคผนวก ก.ข้อ 2.3) ดูการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีแดงไปเป็นสีเขียว จดปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ ผลบวกคือใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการไตเตรทมากกว่า 0.5 มิลลิลิตร ส่วนผลลบ คือใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ในการไตเตรทน้อยกว่า 0.5 มิลลิลิตร

2.4 การศึกษา Protein profile

ขั้นตอนนี้เป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีการศึกษารูปแบบของโปรตีน เพื่อยืนยันผลทางชีวเคมี โดยขั้นแรกเป็นการนำเซลแบคทีเรียมาทำให้ผนังเซลแตก และปลดปล่อยโปรตีนออกมา ขั้นที่ 2 เป็นการวัดปริมาณโปรตีนของเชื้อเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน และขั้นตอนสุดท้าย เป็นการศึกษารูปแบบโปรตีนของเชื้อโดยใช้วิธีโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟลิซิส เชื้อที่ใช้ในการทดสอบเพื่อยืนยันผลทางชีวเคมี จะใช้เชื้อ *L. plantarum* จำนวน 17 เชื้อ *L. pentosus* จำนวน 22 เชื้อ *Pediococcus Pentosaceus* จำนวน 23 เชื้อ และ *P. acidilactici* จำนวน 20 เชื้อ

2.4.1 การ Lyse cell

นำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ในสภาพไม่มีอากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนมีปริมาณเซลเมื่อวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรมีค่าเท่ากับ 4.0 นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นล้างเซลด้วย 50 มิลลิโมลาร์ TS Buffer (ภาคผนวก ก. ข้อ 4.13) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และปั่นแยกเซลที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่เป็นเซลมาเติม 50 มิลลิโมลาร์ TS Buffer 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร, ไลโซไซม์ (lysozyme) ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร10 ไมโครลิตร และ มิวทาโนไลซิน (mutanolysin) ความเข้มข้น 10 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง จากนั้นเก็บ cell lysate ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยตัวควบคุมในการทดลองคือ หลอดที่บรรจุสารละลายที่ประกอบด้วย TS Buffer, ไลโซไซม์ และ มิวทาโนไลซิน

2.4.2 การหาปริมาณโปรตีนของ cell lysate

ใช้วิธี Bradford Protein Assay (Bradford, 1976) ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนทั้งโปรตีนมาตรฐาน และโปรตีนของ cell lysate

2.4.2.1 การทำ Standard Curve ของโปรตีนมาตรฐาน

โปรตีนมาตรฐานที่ใช้ คือ โบวีนซีรั่ม อัลบูมิน (BSA) ทำการเตรียมโปรตีน BSA ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ 0, 1, 3, 6, 9, 12, 15, 18 และ 21 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อจนมีปริมาตร ถึง 800 ไมโครลิตร จากนั้นเติม *dye reagent* (Bio-Rad protein assay) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องนาน 5-10 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร คำนวณปริมาณโปรตีนของเชื้อจาก กราฟโปรตีนมาตรฐาน จากขั้นตอน 2.4.2.1 และคำนวณปริมาณโปรตีนของเชื้อให้อยู่ในรูปไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ตัวอย่างการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค.

2.4.3 การทำ protein profileโดยวิธีอิเลคโตรโฟลิซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์เจลแบบแผ่น (SDS-PAGE)

ประกบแผ่นแก้วขนาด 8 x 10 ซม. 2 แผ่นเข้าด้วยกัน สอดแผ่นพลาสติก (spacer) ที่ขอบด้านข้างทั้งสอง แล้วเทสารละลายผสมของเซพาเรตติงเจล (seperating gel) ที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก.ข้อ 4.9) ลงไปในแผ่นแก้วให้มีความสูง 5 ซม. ทั้ง 2 ด้าน หยดน้ำลงบนผิวหน้าเจลเล็กน้อยเพื่อเป็นการปรับระดับเจล ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที จนกระทั่งเจลแข็งตัวดี เทน้ำออก แล้วใส่แผ่นพลาสติกสำหรับเตรียมช่องใส่ตัวอย่าง (slot former) ลงระหว่างแผ่นแก้วทั้งสอง เทสารละลายผสมของสแตกกิงเจล (stacking gel) ที่มีความเข้มข้นของอะคริลาไมด์ 4.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก. ข้อ 4.10) เมื่อเจลแข็งตัวดีแล้ว ค่อยๆ ดึงแผ่นพลาสติกออก ล้างช่องใส่ตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น แล้วเติมน้ำกลั่นลงในช่องใส่ตัวอย่างจนเต็ม นำโปรตีนของตัวอย่างเชื้อที่จะนำมาศึกษา และโปรตีนของเชื้อ type strain มาละลายใน sampling buffer (ภาคผนวก ก.ข้อ 4.6) ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นหยอดโปรตีนของเชื้อแต่ละตัวในปริมาณที่เท่ากัน ลงในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล โดยในเลนที่ 1 และ 8 เป็น molecular weight marker ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66,000, 45,000 และ 36,000 ดาลตัน ในช่องที่เหลือเป็นโปรตีนของเชื้อแต่ละตัว ทำการอิเลคโตรโฟลิซิสด้วยเครื่อง Bio-Rad ที่บรรจุ tank buffer (ภาคผนวก ก. ข้อ 4.2) ใช้กระแสไฟฟ้า 30 มิลลิแอมแปร์รอจนกระทั่งสีของโคมาซซี่ บิลเลียนท์ บลู (coomassie brilliant blue) เคลื่อนที่มาจนเกือบปลายสุดแผ่นเจล จากนั้นแกะแผ่นเจลมาแช่ในน้ำยาย้อมสีโปรตีน (ภาคผนวก ก. ข้อ 4.11) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ชะล้างสีด้วยสารละลายชะล้างสี (destaining solution) (ภาคผนวก ก. ข้อ 4.12) จนเห็นแถบสีของโปรตีนชัดเจน

3. การคัดเลือกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมือง

3.1 การคัดเลือกปฐมภูมิ (Primary Screening)

นำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากขั้นตอนการดำเนินการวิจัยในข้อที่ 1 และจำแนกออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ ตามขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยในข้อ 2 มาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ โดยใช้เชื้อทดสอบในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ แบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* ATCC 25922

3.1.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

นำเชื้อทดสอบทั้งหมดที่เลี้ยงบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์ (ภาคผนวก ก. ข้อ 1.2) มาเลี้ยงในอาหาร tryptic soy broth (ภาคผนวก ก. ข้อ 1.6) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{8} เซลต่อมิลลิลิตร ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์พีเอช 7.0 (ภาคผนวก ก. ข้อ 2.1) นำเชื้อทดสอบ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อ ปริมาตร) ผสมในอาหาร tryptic soy agar ที่หลอมเหลวแล้วซึ่งมีอุณหภูมิประมาณ 42-45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน แล้วเทในจานอาหาร 10 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แข็งตัว แล้วนำไปใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ในข้อ 3.1.2 ต่อไป

3.1.2 วิธีการทดสอบแอคติวิตีของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

นำแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ในสภาพไม่มีอากาศใน anaerobic jar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมาปรับให้มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ด้วย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ แล้วกรองผ่านแผ่นกรอง (millipore membrane filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนน้ำใส 10 มิลลิลิตร ไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) และ นำมาละลายกลับโดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จะได้สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีความเข้มข้นขึ้น 10 เท่า นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง tryptic soy agar ในข้อ 3.1.1 โดยวิธี agar diffusion (Barry, 1976) โดยใช้ปริมาตรของส่วนน้ำใส 100 ไมโครลิตร หยอดใน stainless cup ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร โดยมี 4 cup ต่อ 1 จานเลี้ยงเชื้อ และให้แต่ละ cup ห่างกันพอสมควร นำไปบ่มที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และบ่มต่อที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ทั้งหมด และนำค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของ stainless cup มาหักลบออก จะได้ค่า inhibition zone ที่แท้จริง

3.2 การศึกษาลักษณะการเจริญของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ และการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

นำแลคติกแอซิดแบคทีเรียในจีนัส *Lactobacillus pentosus* รหัส 940 และ *Pediococcus pentosaceus* รหัส N111 ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (broad spectrum) มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ในสภาพไม่มีอากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสทำการเก็บตัวอย่าง ทุก ๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อดูรูปแบบการเจริญของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย และทุกช่วงของการเก็บตัวอย่างเชื้อจะมีการทดสอบแอคติวิตีของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้ด้วย โดยทำตามขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยข้อ 2.2 เพื่อหาระยะเวลาของการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จะสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีแอคติวิตีสูงที่สุด

3.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ

เนื่องจากเชื้อ *E. coli* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ ดังนั้นต้องการที่จะศึกษาดูว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้ง *E. coli* ได้นั้น สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ ได้อีกหรือไม่ โดยใช้เชื้อทดสอบแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Salmonella derby, S. chloleraesuis, S. enteritidis , S. typhimurium* และ *Shigella flexneri* type 2a ทำการทดลองเหมือนข้อ 3.1.1 และ 3.1.2

3.4 การคัดเลือกทุติยภูมิ (Secondary Screening)

นำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทุกสายพันธุ์จากขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยข้อ 3.1 มาทำการทดสอบเหมือนขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 แต่เพิ่มเชื้อทดสอบมากชนิดขึ้น เพื่อที่จะดูว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้ เป็น broad spectrum หรือไม่ โดยทำการเพิ่มเชื้อทดสอบจุลินทรีย์แกรมบวก คือ *P. pentosaceus* ATCC 33316 , *L. pentosus* ATCC 8041 , *Micrococcus varians* ATCC 15306 และ ยีสต์คือ *Candida albicans* ATCC 10231

3.5 การศึกษาการอยู่รอดชีวิตของเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041

จากการศึกษาเบื้องต้น พบว่า การทดสอบแบบ Agar Diffusion จะเห็นผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ไม่ชัดเจนนัก จึงศึกษาลักษณะการยับยั้งจุลินทรีย์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยทำการเลี้ยงเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 20 ชั่วโมง นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างเซลด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 + 0.1 ล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์อีก 2 ครั้ง และทำการแช่เซลในบัฟเฟอร์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงในน้ำแข็ง เพื่อให้เซลอยู่ในสภาพ resting cell ปรับปริมาณเชื้อให้ได้ 1×10^4 เซลต่อมิลลิลิตร ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 + 0.1 จากนั้นเติมสารยับยั้งของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041 ได้จากขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยข้อ 3.4 ลงไปปริมาตร 10 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อทดสอบในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ภายหลัง 30 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างทุก 1/ 2 ชั่วโมง นำมาทำ viable cell count โดยใช้อาหารแข็ง MRS ที่หลอมเหลวแล้วที่มีอุณหภูมิประมาณ 42-45 องศาเซลเซียส บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนับจำนวนเชื้อทดสอบที่รอดชีวิต และหาเปอร์เซ็นต์เชื้อทดสอบที่ตาย (% cell death) ตัวควบคุมคือ หลอดที่ ไม่มีการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ลงไป

4. การศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้

4.1 การทำให้สารยับยั้งจุลินทรีย์กึ่งบริสุทธิ์

นำสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.4 แล้วว่าสามารถฆ่าเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041 ได้มาก มาศึกษาหาน้ำหนักโมเลกุล โดยนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ในสภาพไม่มีอากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำมาปั่นแยกเซลด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสมาปรับให้มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 แล้วจึงกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนใสปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาไดอะไลซ์ โดยใช้ถุงไดอะไลซ์ที่มี molecular wight cut off 1,000 และ 10,000 ใน 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง

7.0 + 0.1 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ทำการไดอะไลซ์ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเปลี่ยนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ทุก 3-4 ชม. นำส่วนใสภายในถุงไดอะไลซ์ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 บนอาหารแข็ง MRS โดยวิธี agar diffusion (Barry, 1976) โดยใช้ปริมาตรของส่วนใส 100 ไมโครลิตร หยอดใน stainless cup และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ตัวควบคุม คือสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ไม่ได้ไดอะไลซ์

4.2 <u>การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรตีนของสารที่ได้</u>

นำสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยในข้อ 3.4 แล้วว่าสามารถฆ่าเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041 ได้มาก มาศึกษาว่าเป็นสารประเภทโปรตีนหรือไม่ โดยนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ในสภาพไม่มีอากาศ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำมาปั่นแยกเซลด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที นำส่วนใสมาปรับให้มีความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 กรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนใสมาทดสอบกับเอนไซม์โปรติเนส เค (Daba และคณะ , 1991) ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 16 ชั่วโมง และหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย PMSF ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ จากนั้นนำส่วนที่ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 โดยทำตามขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยในข้อ 4.1 ตัวควบคุม คือสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ไม่มีการเติมเอนไซม์โปรติเนส เค

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย