

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์ :

1. กระดาษขาว
2. กระดาษกรอง Whatman No.1
3. กระดาษทิชชู
4. กระบอกตวงขนาด 10, 25, 100, 250, 1000 ml
5. กรรไกร
6. กรวยแก้ว
7. กล่องพลาสติกสำหรับล้างเจล
8. กล่องโฟมใส่น้ำแข็ง
9. ขวดแก้วเก็บสาร (ISOLAB, SCHOTT DURAN)
10. ขวดน้ำกลั่น
11. เครื่องชั่งสี่ตำแหน่ง (SCIENTIFIC PROMOTION)
12. เครื่องชั่งสองตำแหน่ง (METTLER TOLEDO)
13. เครื่อง Autoclave (ALP)
14. เครื่อง Centrifuge (CENTURION SCIENTIFIC LTD.)
15. เครื่อง Centrifuge (HITACHI)
16. เครื่อง Laminar flow
17. เครื่อง pH meter
18. เครื่อง Power supply (BIO-RAD)
19. เครื่อง Shaker
20. เครื่อง Spectrophotometer
21. เครื่อง Vortex
22. ชุดอุปกรณ์ทำ SDS-PAGE (ATTO CORPORATION)
23. ซ้อนตักสาร
24. ตะกร้า
25. ตู้อบ GRIEVE-HENDRY
26. ถุงร้อนและยางรัด
27. ถุงมือ
28. ถุงพลาสติกแบบเลื่อนปิด
29. แท่งแก้วคนสาร

30. นาฬิกาจับเวลา
31. บีกเกอร์ขนาด 10, 50, 100, 250, 600, 1000, 3000, 5000 ml
(PYREX^R, SHCOTT DURAN, BOMEX, BGIF)
32. ปิเปตแก้ว
33. หม้อต้มน้ำ
34. หลอดทดลอง
35. Aluminium foil
36. Autopipette ขนาดต่างๆ
37. Cuvette
38. Forceps
39. Hood
40. Hot air oven
41. Hot plate
42. Loop เขี่ยเชื้อ
43. Magnetic bar
44. Magnetic stirrer
45. Mask
46. Microcentrifuge tube
47. Paper chromatography
48. Petridisc
49. Parafilm
50. Pipette
51. Rack
52. Spreader
53. Tip ขนาดต่างๆ
54. Wrap

สารเคมี :

1. Ammonium persulphate
2. Arylamide (BIO-RAD)
3. β -mercaptoethanol
4. Bovine serum albumin (BSA)
5. Bromophenol blue (BPB)
6. Coomassie brilliant blue R 250
7. Coomassie brilliant blue G 250

8. Distilled water
9. Double distilled water
10. EDTA
11. Ethanol
12. Gelatin
13. Glacial acetic acid
14. Glycerol
15. Glycine
16. Hydrochloric acid
17. Iodine
18. Iso propanol
19. Methanol
20. n-Butanol
21. Ninhydrin
22. N, N, N', N'-tetramethylethylenediamine (TEMED)
23. N,N-bis-methylene-acrylamide (SIGMA CHEMICAL)
24. Nutrient Agar
25. Nutrient Broth
26. Phosphoric acid
27. Protein marker (LMW protein marker, BioRad)
28. Ribonucleic acid (RNA)
29. Sodium dodecyl sulphate (SDS) (SERVA)
30. Starch Rice Sigma
31. Triton X-100
32. Tris (Fisher Scientific)
33. Tolidine blue O
34. Distilled water
35. Double distilled water
36. Zinc chloride

2. วิธีการวิจัย

ข้อควรปฏิบัติสำหรับการทำการวิจัย

1. ขณะทำการทดลองจะต้องสวมถุงมือที่ทำมาจากยางหรือแอลกอฮอล์ หรือ detergent
2. สวม mask ในกรณีที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อน
3. อุปกรณ์ทุกอย่างที่ใช้สำหรับการทดลองจะต้องผ่านกระบวนการอบฆ่าเชื้อที่ 121°C 20 นาที

4. ตัวอย่างที่นำมาทดลองทุกสภาพจะต้องทำในอ่างน้ำแข็ง เพื่อรักษาสภาพโปรตีน

2.1 หมักน้ำหมักผักผลไม้

1. นำผักและผลไม้ทั้ง 8 ชนิด ได้แก่ สับปะรด มะละกอ แตงโม กัลยัญ พักทอง มะเขือเทศ ผักกาดขาว และแตงกวา มาล้างทำความสะอาด และหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆใส่ลงในถังหมักที่มีฝาปิด โดยใช้ผักและผลไม้ชนิดละ 0.75 กิโลกรัม
2. เติมหากน้ำตาลปริมาณ 2 กิโลกรัม หรือ 1:3 ของน้ำหนักผักผลไม้
3. ใช้ผ้าขาวบางปิดปากถัง และปิดฝาดังโดยอย่าปิดสนิทเพื่อไม่ให้มีแรงดันแก๊สภายใน
4. หมักทิ้งไว้ 50 วัน

2.2 การเก็บตัวอย่างน้ำหมักผักผลไม้

เก็บตัวอย่างน้ำหมักผักและผลไม้ทุกๆ10วัน ใส่ขวดพลาสติกเก็บไว้ที่ -20°C โดยเก็บส่วนที่เป็นน้ำของน้ำหมักผักผลไม้ และสังเกตลักษณะของสี กลิ่น แก๊ส และวัดค่า pH ของน้ำหมักผักผลไม้

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส

1. นำน้ำหมักผักผลไม้ทุกๆ10วัน มาปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
2. เจือจาง supernatant 200 เท่า ปริมาตร 2 ml เติมน้ำ DNS solution (3,5-Dinitrosalicylic Acid in 2N NaOH) 1 ml
3. นำไปต้มในน้ำเดือด 100°C เป็นเวลา 10 นาที
4. นำไปวัดค่า Absorbance ที่ 540 nm และเปรียบเทียบกับ Glucose standard curve

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

1. นำน้ำหมักผักผลไม้ทุกๆ10วัน มาปั่นเหวี่ยง 12,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที
2. ปิเปตส่วน supernatant 5 μl ลงในBradford dye 1 ml
3. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที
4. นำไปวัดค่า Absorbance ที่ 595 nm และเปรียบเทียบกับ Bovine serum albumin (BSA) standard curve

2.5 การวิเคราะห์กรดอะมิโนในน้ำหมักผักผลไม้ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีแบบกระดาษ (Paperchromatography)

1. เตรียมระบบตัวทำละลายของ mobile phase เตรียมโดยผสม Iso-propanol : 30%Ammonium hydroxide : water เป็น 15:3:2 ปริมาตร 40 ml ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร ปิดด้วยกระดาษ Aluminium foil ให้สนิทเขย่าตัวทำละลายให้ผสมกันในบีกเกอร์อีกครั้ง จากนั้นตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที เพื่อให้ภายในบีกเกอร์อิ่มตัวด้วยไอของตัวทำละลาย

2. นำกระดาษโครมาโตกราฟี (กระดาษกรอง Whatman No.1 ขนาด 23x11.5 ซม.) มาใช้ดินสอลากแนวสำหรับหยด(spot)สาร สูงจากขอบล่าง 1.5 ซม. และแนวกำหนดระยะตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้เป็นระยะทาง 10 ซม. (ในการสัมผัสกระดาษโครมาโตกราฟีควรใส่ถุงมือเพื่อป้องกันการปนเปื้อนบริเวณที่ใช้วิเคราะห์)
3. หยดสารละลายกรดอะมิโนมาตรฐาน และสารตัวอย่างคือตัวอย่างน้ำหมักผักผลไม้ที่เก็บทุกๆ 10 วัน ลงบนกระดาษโครมาโตกราฟี โดยหยดสารแต่ละจุดปริมาตร 2 μl โดยเขียนชื่อของสารละลายที่หยดไว้ใต้เส้นแนวหยดสารด้วยดินสอ
4. วางกระดาษให้ปลายโค้งเข้าหากัน แต่ห้ามมิให้ปลายกระดาษชนหรือซ้อนทับกัน (เพราะจะทำให้แนวการเคลื่อนที่ของสารละลายไม่เป็นเส้นตรง) เย็บกระดาษด้วยที่เย็บ วางไว้สักครู่จนสารแต่ละจุดแห้งสนิท
5. วางกระดาษโครมาโตกราฟีลงในบีกเกอร์ที่เตรียมระบบตัวทำละลายไว้แล้ว โดยวางลงไปตรงๆ ระวังไม่ให้ส่วนใดส่วนหนึ่งของกระดาษสัมผัสกับผนังบีกเกอร์ ทำอย่างรวดเร็วและรีบปิดบีกเกอร์ด้วยกระดาษ Aluminium foil ตามเดิม ตรวจสอบอย่าให้มีรอยรั่ว
6. วางบีกเกอร์ไว้นิ่งๆ ปลอ่ยให้ระบบตัวทำละลายค่อยๆเคลื่อนที่ไปตามแผ่นกระดาษ ห้ามเคลื่อนย้ายบีกเกอร์ รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงแนวที่กำหนดไว้ จึงยกกระดาษออก นำไปอบให้แห้งที่ 85°C ในตู้อบ โดยยังไม่ต้องเอาที่เย็บกระดาษออก
7. นำกระดาษโครมาโตกราฟีมาทำให้เกิดสี โดยการฉีดพ่นด้วยสารละลาย Ninhydrin (สารละลาย Ninhydrin ที่ทำละลายด้วย n-Butanol) ฉีดพ่นแต่พอให้ชุ่ม (ระวังอย่าให้ถูกมือ) นำไปอบให้แห้งในตู้อบ 85°C นานอย่างน้อย 5 นาที จากนั้นนำแผ่นโครมาโตกราฟีที่ได้มาสังเกตสีและตำแหน่งของกรดอะมิโนแต่ละชนิด วงตำแหน่งตามรูปร่างโครมาโตแกรมที่ปรากฏด้วยดินสอ วัดระยะจากแนวหยดสารถึงจุดกึ่งกลางโครมาโตแกรมเป็นการเคลื่อนที่ของสารแต่ละชนิด
8. คำนวณค่า R_f ของแต่ละโครมาโตแกรม
9. วิเคราะห์ว่ากรดอะมิโนในน้ำหมักผักผลไม้ น่าจะเป็นกรดอะมิโนชนิดใด

2.6 การทำความสะอาดตัวอย่างด้วย 2D-clean up kit

1. ปิเปิดตัวอย่างลงในหลอดทดลอง โดยให้มีปริมาตรระหว่าง 1-100 μl
2. เติม 3x precipitant, mix นำไป incubate on ice 15 นาที
3. เติม 3 volume co-precipitant, mix
4. นำไปปั่นเหวี่ยง 8000g เป็นเวลา 15 นาที
5. Remove supernatant แล้วนำไป spin 1-2 นาที
6. เติม co-precipitant 3-4 เท่าของ pellet
7. นำไปปั่นเหวี่ยง 8000g เป็นเวลา 8 นาที
8. Remove supernatant แล้วเติมน้ำ 10 μl
9. Vortex
10. เติม wash buffer 1 ml และ wash additive 5 μl , vortex

11. Incubate ที่ -20°C เป็นเวลา 30 นาที นำออกมา mix ทุกๆ 10 นาที
12. นำไปปั่นเหวี่ยง 8000g เป็นเวลา 15 นาที, remove supernatant
13. Air dry 5 นาทีแล้วนำ pellet มาทำ re-suspend ใน rehydration buffer 600 μl

2.7 การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

เตรียม Separating gel และ stacking gel ตามปริมาตรดังตาราง

ตารางที่ 3 การเตรียม Separating gel และ stacking gel

Gel components	15% Separating gel (ml)	3% stacking gel (ml)
Solution A (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)	1.5	-
Solution B (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)	-	0.75
30%T acrylamide	3.0	0.3
Water	1.5	1.95
TEMED	0.003 (3 μl)	0.003 (2 μl)
10%APS	0.040 (40 μl)	0.030 (30 μl)
Total volume	6.043	3.032

การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในสถานะที่ปราศจาก β -mercaptoethanol

1. เตรียม 15% separating gel ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. เตรียม สารละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยเตรียม super natant ของน้ำหมักผสมกับ solubilizing solution ที่ปราศจาก β -mercaptoethanol
3. เตรียม 4% stacking gel ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
4. ทำการ load สารละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15 mA ใน 20 นาที จากนั้นจึงปรับเป็น 20 mA จนกระทั่งสีผ่านกระจกด้านล่าง
5. นำ gel มาย้อมด้วยสี 0.1% Coomassie brilliant blue R250 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงล้างสีออกจาก gel โดยให้เหลือแต่เพียงส่วนที่ติดโปรตีนด้วย destaining solution

การศึกษารูปแบบของโปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE ในสถานะที่มี β -mercaptoethanol

1. เตรียม 15% separating gel ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. เตรียม สารละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยเตรียม super natant ของน้ำหมักผสมกับ solubilizing solution ที่มี β -mercaptoethanol แล้วต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปใช้
3. เตรียม 4% stacking gel ทิ้งไว้ให้แข็งตัว

4. ทำการ load สารละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษา โดยใช้กระแสไฟฟ้า 15 mA ใน 20 นาที จากนั้นจึงปรับเป็น 20 mA จนกระทั่งสีผ่านกระจกด้านล่าง
5. นำ gel มาย้อมด้วยสี 0.1% Coomassie brilliant blue R250 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นจึงล้างสีออกจาก gel โดยให้เหลือแต่เพียงส่วนที่ติดโปรตีนด้วย destaining solution

2.8 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Protease จากน้ำหมักผักผลไม้

เตรียม Separating gel และ stacking gel ตามปริมาตรดังตาราง

ตารางที่ 4 การเตรียม separating gel และ stacking gel

Gel components	15% Separating gel (ml)	3% stacking gel (ml)
Solution A (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)	1.5	-
Solution B (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)	-	0.75
30% T acrylamide	3.0	0.3
Gelatin (1mg/ml)	0.6	-
Water	0.9	1.95
TEMED	0.003 (3 μ l)	0.003 (2 μ l)
10% APS	0.040 (40 μ l)	0.030 (30 μ l)
Total volume	6.043	3.032

1. เตรียม 15% separating gel ที่มี 0.1mg/ml Gelatin ผสมอยู่ ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. เตรียม 4% stacking gel ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
3. เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยผสมสารตัวอย่างกับ solubilizing ที่ปราศจาก β -mercaptoethanol ในอัตราส่วน 1:1
4. ทำการ load สารละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษาลงในเจล และใช้กระแสไฟฟ้าในการ run gel 15 mA ใน 20 นาที จากนั้นจึงปรับเป็น 20 mA จนกระทั่งสีผ่านกระจกด้านล่าง
5. นำ separating gel มาล้างด้วย 25% iso-propanol 10 นาที 2 ครั้ง
6. ล้างเจลด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0 10 นาที 2 ครั้ง
7. บ่มเจลด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0 เป็นเวลา 3 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง
8. ล้างเจลด้วย 0.01 M Tris-HCl, pH 7.0 10 นาที
9. ย้อมเจลด้วย 0.2% Coomassie brilliant blue R250 เป็นเวลา 1 ชม.
10. ล้างสีย้อมด้วย Destaining solution

2.9 การตรวจสอบชนิดของเอนไซม์ Protease

เตรียม Separating gel และ stacking gel ตามปริมาตรดังตาราง

ตารางที่ 5 ตารางการเตรียม separating gel และ stacking gel

Gel components	15% Separating gel (ml)	3%stacking gel (ml)
Solution A (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)	1.5	-
Solution B (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)	-	0.75
30%T acrylamide	3.0	0.3
Gelatin (1mg/ml)	0.6	-
Water	0.9	1.95
TEMED	0.003 (3 μ l)	0.003 (2 μ l)
10%APS	0.040 (40 μ l)	0.030 (30 μ l)
Total volume	6.043	3.032

1. เตรียม 15%separating gel ที่มี 0.1mg/ml Gelatin ผสมอยู่จำนวน 2 gel ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. เตรียม 4% stacking gel ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
3. เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยผสมสารตัวอย่างกับ solubilizing ที่ปราศจาก β -mercaptoethanol ในอัตราส่วน 1:1
4. ทำการ load สารละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษาลงในเจล และใช้กระแสไฟฟ้าในการ run gel 15 mA ใน 20 นาที จากนั้นจึงปรับเป็น 20 mA จนกระทั่งสีผ่านกระจกด้านล่าง
5. นำ separating gel ทั้งสองแผ่นมาล้างด้วย 25% iso-propanol 10 นาที 2 ครั้ง
6. นำ gel แผ่นแรกมาล้างด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0 10 นาที 2 ครั้ง
นำ gel แผ่นที่สองมาล้างด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0 ที่มี 2mM EDTA ผสมอยู่ 10 นาที 2 ครั้ง
7. บ่มเจลแผ่นแรกด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0 และเจลแผ่นที่สองด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH 7.0 ที่มี 2mM EDTA ผสมอยู่ เป็นเวลา 3 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง
8. ล้างเจลแผ่นแรกด้วย 0.01 M Tris-HCl, pH 7.0 และเจลแผ่นที่สองด้วย 0.01 M Tris-HCl, pH 7.0 ที่มี 2mM EDTA ผสมอยู่ 10 นาที
9. ย้อมเจลด้วย 0.2% Coomassie brilliant blue R250 เป็นเวลา 1 ชม.
10. ล้างสีย้อมด้วย Destaining solution

2.10 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ RNase จากน้ำหมักผักผลไม้

เตรียม separating gel และ stacking gel ตามปริมาณดังตาราง

ตารางที่ 6 ตารางการเตรียม separating gel และ stacking gel

Gel components	15% Separating gel (ml)	3%stacking gel (ml)
Solution A (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)	1.5	-
Solution B (0.5 M Tris-HCl, pH 6.8)	-	0.75
30%T acrylamide	3.0	0.3
RNA solution (25-30mg/ml)	0.5	-
Water	1.0	1.95
TEMED	0.003 (3 μ l)	0.003 (2 μ l)
10%APS	0.040 (40 μ l)	0.030 (30 μ l)
Total volume	6.043	3.032

1. เตรียม 15%separating gel ที่มี RNA ผสมอยู่ ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. เตรียม 4% stacking gel ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
3. เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยผสมสารตัวอย่างกับ solubilizing ที่ปราศจาก β -mercaptoethanol ในอัตราส่วน 1:1
4. ทำการ load สารละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษาลงในเจล และใช้กระแสไฟฟ้าในการ run gel 15 mA ใน 20 นาที จากนั้นจึงปรับเป็น 20 mA จนกระทั่งสีผ่านกระจกด้านล่าง
5. นำ separating gel มาล้างด้วย 25% iso-propanol/0.1M Tris-HCl 10 นาที 2 ครั้ง
6. ล้างเจลด้วย 2mM ZnCl₂/0.01 M Tris-HCl, pH7.0 10 นาที 2 ครั้ง
7. บ่มเจลด้วย 0.1 M Tris-HCl, pH7.0 อุณหภูมิ 50 °C 50 นาที
8. ล้างเจลด้วย 0.01M Tris-HCl, pH7.0 10 นาที และย้อมเจลด้วย 0.2% Toluidine blue O 10 นาที
9. ล้างสีย้อมด้วย 0.01 M Tris-HCl, pH7.0 20 นาที 3 ครั้ง

2.11 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Amylase ในน้ำหมักผักผลไม้

เตรียม Separating gel และ stacking gel ตามปริมาณดังตาราง

ตารางที่ 7 ตารางการเตรียม separating gel และ stacking gel

Gel components	15% Separating gel (ml)	3%stacking gel (ml)
Solution A (1.5 M Tris-HCl, pH 8.8)	1.5	-
Solution B (0.5 M Tris-HCl,	-	0.75

pH 6.8)		
30%T acrylamide	3.0	0.3
1% starch solution	0.6	-
Water	0.9	1.95
TEMED	0.003 (3 μ l)	0.003 (2 μ l)
10%APS	0.040 (40 μ l)	0.030 (30 μ l)
Total volume	6.043	3.032

1. เตรียม 15% separating gel ที่มี RNA ผสมอยู่ ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
2. เตรียม 4% stacking gel ทิ้งไว้ให้แข็งตัว
3. เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยผสมสารตัวอย่างกับ solubilizing ที่ปราศจาก β -mercaptoethanol ในอัตราส่วน 1:1
4. ทำการ load สารละลายตัวอย่างที่ต้องการศึกษาลงในเจล และใช้กระแสไฟฟ้าในการ run gel 15 mA ใน 20 นาที จากนั้นจึงปรับเป็น 20 mA จนกระทั่งสีผ่านกระจกด้านล่าง
5. นำ Activity gel ล้างด้วย 1% Triton X-100 เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นล้าง 1% Triton X-100 ออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง แล้วเติม Activity solution (100 mM Sodium acetate buffer pH 4.8 containing 0.2% soluble starch) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที
6. ล้าง Activity solution (100 mM Sodium acetate buffer pH 4.8 containing 0.2% soluble starch) ออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
7. เติม staining solution (1% acetic acid containing 10 mM I₂ and 14 mM KI) ส่วนของ Native gel นำ gel มาล้างด้วย 1% Triton X-100 เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นล้าง 1% Triton X-100 ออกด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง นำ gel มาย้อมด้วยสี Coomassie blue R250 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างสีออกจาก gel โดยให้เหลือแต่เพียงส่วนที่ติดโปรตีนด้วย Destaining solution

2.12 การทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี Disc diffusion assay การเตรียมอาหาร

1. Nutient Agar

- เตรียมในอัตราส่วน 28 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร
- ต้มให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- บรรจุอาหารปริมาตร 3 มล. ลงในหลอดอาหารขนาด 1x15 ซม.
- นำไปclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient Broth

- เตรียมอาหารในอัตราส่วน 13 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร
- ต้มให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
- บรรจุอาหารปริมาตร 5 มล. ลงในหลอดอาหารขนาด 1x15 ซม.
- นำไปclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที

การเตรียม Stock culture

- เตรียมอาหาร Nutrient Agar ตามข้อ 1
- เอียงอาหารในแต่ละหลอดในระดับที่เหมาะสม คือ ให้น้ำอาหารเป็นรูปสามเหลี่ยมมุมฉาก แล้วทิ้งไว้ให้แข็งตัว (ทำ Agar slant)
- ทำการเชยเชื้อจาก Stock culture เติมลงใน Agar slant
- บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 15-18 ชม.
- หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C (เก็บไว้ได้นานประมาณ 1 เดือน)

การทำ Start culture

- ทำการเชยเชื้อจาก Stock ลงใน Nutrient Broth ที่เตรียมได้จากข้อ 2
- บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชม.

ตรวจสอบความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรียโดยวิธี Disc diffusion assay

- เตรียม stock เชื้อ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus megaterium* และ *Staphylococcus aureus* ATCC25923
- ทำ Starter culture เชื้อทั้ง 4 ตัว
- นำ Cotton swab จุ่มเชื้อแล้วกดสัมผัสกับข้างหลอดบรรจุเชื้อเพื่อไม่ให้ชุ่มเกินไป ป้ายเชื้อลงบนผิวหน้าอาหารเป็น 3 ระบาย
- ทิ้งไว้ให้แห้ง 5 นาที เพื่อให้ผิวหน้าที่ป้ายเชื้อชนิดต่างๆแห้ง
- ใช้ปากคีบจุ่มแอลกอฮอล์ แล้วผ่านไฟเพื่อฆ่าเชื้อ ทิ้งไว้ให้เย็น คีบแผ่น disc วางบนผิวหน้าอาหารให้ตรงกับตำแหน่งที่เขียนไว้ ใช้ปากคีบกดเบาๆให้แนบกับผิวหน้าอาหาร
- หยดสารละลายที่ต้องการทดสอบ (ตัวอย่างน้ำหมักผักผลไม้ที่เก็บทุกๆ 10 วัน และตัวอย่างน้ำหมักชีวภาพชนิดต่างๆที่หาซื้อได้ในท้องตลาด และแหล่งผลิต หรือเกษตรกรที่ใช้ระบบการผลิตแบบเกษตรอินทรีย์) ลงบน disc ปริมาตร 30 μ l
- ทดสอบ Positive control คือ streptomycin และ Negative control คือ น้ำกลั่นร่วมด้วย
- บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชม.
- วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของ Inhibition zone

