

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 ขอบเขตงานวิจัย

วัตถุประสงค์	กิจกรรม
การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากที่สร้างสารแบคทีริโอซินจากอาหารหมักเนื้อ	1.1 คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักเนื้อและการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีริโอซิน 1.2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 1.3 การทดสอบคุณสมบัติของสารแบคทีริโอซิน
การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารแบคทีริโอซิน กรดแลคติก และสารแบคทีริโอซินร่วมกับกรดแลคติกในการยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella</i> sp., <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> (ในหลอดทดลอง)	2.1 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดแลคติก สารแบคทีริโอซิน ในการยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella</i> sp., <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i> 2.2 นำข้อมูลความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดแลคติก และสารยับยั้งจุลินทรีย์ (crude bacteriocin) จากการทดลองที่ 2.1 ใช้ร่วมกับสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ <i>Salmonella</i> sp., <i>E. coli</i> และ <i>S. aureus</i>
การทดลองที่ 3 ศึกษาการใช้สารแบคทีริโอซิน กรดแลคติก และสารแบคทีริโอซินร่วมกับกรดแลคติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัส ของไส้กรอกอีสานภายใต้กระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสุญญากาศ	3.1 ศึกษาการใช้สารแบคทีริโอซิน กรดแลคติก และสารแบคทีริโอซินร่วมกับกรดแลคติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัส ของไส้กรอกอีสานภายใต้กระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสุญญากาศ เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน โดยศึกษาคุณสมบัติดังนี้ 3.1.1 คุณสมบัติทางด้านกายภาพ 3.1.1.1 ค่าความเป็นกรดต่าง 3.1.1.2 ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) 3.1.1.3 สี (CIE L*a*b*) ด้วยเครื่อง Hunterlab Mini Scan EZ 3.1.1.4 ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วย

	รูปแบบ Texture Profile Analysis โดยใช้หัววัดแบบ Compression ด้วยเครื่อง Instron (model 1011, USA) 3.1.2 คุณสมบัติทางด้านเคมี 3.1.2.1 ค่าแอกติวิตี (Water activity measurement) ด้วยเครื่อง เครื่องตรวจวัดค่า A_w (Novasina, Switzerland) 3.1.2.2 ค่าความชื้น (Moisture content) ด้วย เครื่องตรวจวัดค่าความชื้น (Analyzer, Hobart, USA) 3.1.3 คุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์ 3.1.3.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 3.1.3.2 จำนวนยีสต์และรา 3.1.4 วิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคด้วยการ ประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส (chewiness and hardness) กลิ่น รสชาติ และการยอมรับโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 7-Point hedonic scale 3.2 ศึกษาการใช้สารแบคทีเรียโอซินและกรดแลกติก ร่วมกับวิธีการเก็บระหว่างเกิดกระบวนการหมัก ในการยับยั้งเชื้อ <i>S. aureus</i> ในไส้กรอกอีสาน โดยศึกษาการใช้สารแบคทีเรียโอซิน กรดแลกติก และสารแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้ง เชื้อ <i>S. aureus</i> ในไส้กรอกอีสาน เมื่อแขวนไว้ใน อุณหภูมิห้องและเมื่อบรรจุในถุงสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 °C
--	--

3.2 เชื้อแบคทีเรียทดสอบ

ตารางที่ 3.1 แบคทีเรียทดสอบ อาหารที่ใช้เลี้ยงและอุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย

แบคทีเรียทดสอบ	อาหาร	อุณหภูมิ (°C)
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	MRS	30
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS	30
<i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890	MRS	37
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TISTR 1344	MRS	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	MRS	30
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> TISTR 942	MRS	30
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	MRS	37
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888	MRS	37
<i>Streptococcus</i> sp. TISTR 1030	MRS	30
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T	TSB-YE	37
<i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1447	TSB-YE	37
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	TSB-YE	37
<i>Brochotrix campestris</i> NBRC 11547 ^T	TSB-YE	26
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118	TSB-YE	37
<i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM 5963 ^T	TSB-YE	26
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TISTR 358	TSB-YE	26
<i>Aeromonas hydrophila</i> TISTR 1321	NB	30

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Md

JCM = Japanese Culture of Microorganism , Wako, Japan

NBRC = National Institute of Technology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center, Japan

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Thailand

MRS = de Man, Rogosa and Sharpe (Merck, Germany)

TSB-YE = Tryptic soy broth (Merck, Germany) + 0.6%Yeast extract (BIO BASIC INC, Canada)

NB = Nutrient broth (Merck, Germany)

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

- 1) เครื่องบดเนื้อรูปคylinder ผ่านศูนย์กลาง 9 มิลลิเมตร
- 2) ตู้อบลมร้อน (Binder, USA)
- 3) เครื่องชั่งชนิดหยาบ (Tanita model 1144, Tanita Corporation, Japan)
- 4) เครื่องชั่งชนิดละเอียด (Sartorius, Basic, Germany)
- 5) ตู้เจียเชื้อ Laminar Flow (Dwyer model merk II, USA)
- 6) ตู้บ่มเพาะเชื้อจุลินทรีย์ (WTB Binder model BD, Germany)
- 7) ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot-air oven, Memmert model CM500, Germany)
- 8) หม้อนึ่งความดันสำหรับฆ่าเชื้อ (Auto clave, Hirayama model HVE 50, Japan)
- 9) อ่างน้ำร้อนควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath, Memmert, Germany)
- 10) เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer KMC-1300V, Korea)
- 11) เครื่องตีปั่นไฟฟ้า (Stomacher Bag Mixer 400 model VW, France)
- 12) ไมโครเวฟ (Toshiba)
- 13) เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่น ๆ ที่จำเป็น
- 14) ไมโครปีเปต ขนาด 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- 15) เครื่องตรวจวัดค่าความชื้น (Analyzer, Hobart, USA)
- 16) เครื่องวิเคราะห์ค่า Water activity (Novasina, Switzerland)
- 17) เครื่องวัดค่าแรงตัดผ่านเนื้อ (Warner-Bratzler, Instron Model 1011)
- 18) เครื่องวัดค่าสีของเนื้อ (Hunterlab Mini Scan EZ, USA)
- 19) เครื่อง Homogenizer (Ultra tarrax, Germany)
- 20) เครื่องบรรจุสุญญากาศ (Ramon, Germany)
- 21) ถุงสุญญากาศชนิด K-Nylon/LLDPE

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- 1) Agar (Criterion, USA)
- 2) Baird-Parker agar (Merck, Germany)
- 3) Malt extract (Merck, Germany)
- 4) MRS broth (Merck, Germany)
- 5) Tryptic Soy Broth (TSB) (Merck, Germany)
- 6) Nutrient broth (Merck, Germany)
- 7) Yeast extract granulated (Merck, Germany)

8) Potassium tellurite-hydrate	(Merck, Germany)
9) Peptone from meat	(Merck, Germany)
10) Calcium carbonate	(Scharlau Chemie S.A., Spain)
11) Sodium Chloride	(Ajax Finechem, Australia)

3.5 ระเบียบวิธีวิจัย การศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมักเนื้อ แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 1.1 คัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักเนื้อและการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซิน

นำตัวอย่างอาหารหมักเนื้อชนิดต่างๆ ได้แก่แหนมจำนวน 5 ตัวอย่าง ไส้กรอกอีสาน จำนวน 5 ตัวอย่าง และอาหารเนื้อหมักของประเทศเวียดนามเรียกว่า เนมชัว (nem chua) จำนวน 5 ตัวอย่าง คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างดังกล่าว โดยการนำเอาตัวอย่างอาหารหมักแต่ละตัวอย่างน้ำหนัก 25 กรัมเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน ความเข้มข้น 0.1% เพอร์เซ็นต์ ให้ได้ระดับความเจือจาง 1: 10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 และ 1:1000000 จากนั้นนำไป spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ดัดแปลงจาก Itoi *et al.* 2008) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใน candle jar (ดัดแปลงจาก Pilasombut. 2006) จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น stock culture โดยใส่กลีเซอรอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร รวมกับเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับในการทำการศึกษารั้งต่อไป

ทำการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวิธี spot-on-lawn ที่ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.* (1999) เทอาหารเลี้ยงเชื้อ (จากตารางที่ 3.1) ที่มีวุ้น (agar) 1.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว จากนั้นถ่ายเชื้อทดสอบ (จากตารางที่ 3.1) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ ปล่อยให้เย็นประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกจากอาหารหมักเนื้อหมัก เลี้ยงในอาหาร MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำเฉพาะส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6.5-7 จากนั้นทำให้ปลอดเชื้อ

โดยกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Pall, U.S.A) แล้วดูดส่วนใสมาทำให้เจือจางลงครึ่งละ 2 เท่าอย่างต่อเนื่องกันด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ (จากตารางที่ 3.1) ที่เตรียมไว้ รอนจนกระทั่งหยดน้ำส่วนใสที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตามความเหมาะสมของเชื้อทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในแต่ละความเจือจางลงไป ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมของแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำส่วนใสต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดเป็น arbitrary unit (AU/ml) โดยค่ากิจกรรมของแบคทีเรียของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (cell free supernatant) เท่ากับค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใสซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใส ที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยคำนวณได้จาก (1000/10)D เมื่อ D เท่ากับค่าความเจือจางสูงสุดของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (Parente *et al.* 1995)

การทดลองที่ 1.2 การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1.2.1 การจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

1.2.1.1 การศึกษาพื้นฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ (ดัดแปลงจาก Kandler *et al.* 1986)

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำเชื้อที่ได้โคโลนีเดี่ยวๆ มาทดสอบดังนี้

1) การตรวจการติดสีแกรม

หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนกระจกสไลด์ เขียนเชื้อบริสุทธิ์ให้กระจายบนหยดน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำมาผ่านความร้อน (heat fixed) ย้อมด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ พอทำให้สีของ crystal violet หลุดออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นหยดสารละลาย safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจสอบการติดสีแกรม ลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2) ทดสอบคะตะเลส

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ จากนั้นเขียนเชื้อบริสุทธิ์ลงบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดฟองอากาศ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ส่วนโคโลนีที่ไม่เกิดฟองจะให้ผลลบ

3) การตรวจสอบการสร้างก๊าซ

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้หลอดดักก๊าซ (durham tube) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หากพบก๊าซในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentative หากไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม homofermentative

4) ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 10, 30, 37, 42, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

5) ทดสอบความทนเกลือ

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 และ 18 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

6) ทดสอบความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรดและด่าง

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4.5 และ 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.2.1.2 การศึกษาทางชีวเคมี

ศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป API 50 CH (BioMerieux, France) โดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ที่ปลอดเชื้อ เจียโคโลนีจำนวน 3-5 โคโลนีลงในหลอดอาหารของ API 50 CH medium เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมชุดทดสอบ โดยเรียงชุดทดสอบลงบนถาด คูด API 50 CH medium ที่มีเชื้ออยู่ ใส่สารลงไปในทุกช่อง ทิ้งไว้ อย่าให้เกิดฟองอากาศและอย่าให้ปลายทิวสัมผัสกับขอบช่อง เมื่อคูดอาหารใส่ในช่องทุกช่องแล้ว ให้เททับด้วยน้ำมันพาราฟิน จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส อ่านผลหลังจากบ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม apiweb™ stand alone V 1.2.1 (BioMerieux, France) โดยอ่านผลบวกจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงน้ำเงินเป็นเหลือง ยกเว้นช่องที่ 25 ซึ่งเปลี่ยนสีจากม่วงน้ำเงินเป็นสีดำ แสดงว่าเป็นผลบวก ถ้าอาหารเป็นสีม่วงน้ำเงิน แสดงว่าเป็นผลลบ หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียว หรืออ่านผลไม่ชัดเจน ให้ใส่เครื่องหมายคำถาม

1.2.1.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA มีขั้นตอนดังนี้

1) การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้ โดยดัดแปลงจากวิธีของ Carolissen-Mackay *et al.* (1997) โดยนำเชื้อตัวอย่าง 1 โคโลนี มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อจำนวน 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร MRS หลอดใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 4 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทำการเก็บซ้ำประมาณ 2-3 รอบ โดยสังเกตปริมาณตะกอนเซลล์ที่ได้ เติมสารละลาย A (TE buffer, 6.7% sucrose) 500 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเติมเอนไซม์ lysozyme ความเข้มข้น 70 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที แล้วเติม SDS ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมเอนไซม์ RNase ปริมาตร 4 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติมสารละลาย phenol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ทำการดูดส่วนใสลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ จากนั้นเติม phenol : chloroform (1 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนเพื่อแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนใสลงในหลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ แล้วเติม chloroform : isoamylalcohol (24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงตกตะกอนแยกส่วนใสด้วยความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และดูดส่วนใสใส่หลอดไมโครเซนติฟิวส์หลอดใหม่ แล้วเติม isopropanol ปริมาตร 2 เท่าของปริมาตรสารละลาย ดีเอ็นเอ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ประมาณ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงตกตะกอนดีเอ็นเอ ที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที และทำการล้างตะกอนดีเอ็นเอ 2 ครั้ง ด้วยเอทานอล ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 500 ไมโครลิตร พลิกหลอดกลับขึ้นมา แล้วดูดสารละลายเอทานอลทิ้ง จากนั้นทำให้แห้งโดยการตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

2) การตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยด้วยเทคนิคอะกาโรส เจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.1) วิธีการเตรียมอะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์

ชั่งอะกาโรสเจนน้ำหนัก 2 กรัม ใส่ลงขวดรูปชมพู่ จากนั้นเติม 1X TBE buffer ให้ครบ 200 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนด้วยเครื่องไมโครเวฟจนกว่าอะกาโรสเจลจะละลาย จากนั้นเทใส่ชุดถาดพลาสติกต้นแบบสำหรับเตรียมเจล รอกันเจลแข็งตัว ถอดซีหัวออกจากนั้นนำไปใส่ในเครื่องอิเล็กโตรโฟรีซิส

2.2) การวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอด้วยเครื่องเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

วางแผนอะกาโรสเจลความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ลงบนแท่นรองในเครื่อง อิเล็กโตรโฟรีซิส เทสารผสม 1X TBE buffer ให้ท่วมแผ่นอะกาโรสเจล จากนั้นผสม gel loading dye ปริมาตร 1 ไมโครลิตรกับ ดีเอ็นเอ ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นทำการดูดสารละลายทั้งหมดลงในหลุมที่อยู่ด้านบนของอะกาโรสเจล และใช้ 1 Kb ladder ซึ่งเป็น marker เป็นตัวเปรียบเทียบ จากนั้นทำการรันเจลโดยใช้กระแสไฟ 50 โวลต์ นาน 90 นาที ย้อมแผ่นอะกาโรสเจลในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 2 นาที ล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 10 นาที ทำการวิเคราะห์คุณภาพดีเอ็นเอที่ปรากฏภายใต้เครื่องถ่ายภาพเจล

3) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่หรือเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

เพิ่มปริมาณชิ้นส่วน 16S rDNA จากดีเอ็นเอที่สกัดแยกได้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์โดยใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย BSF8/20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTC AG - 3') และ REVB (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Kanokratana *et al.* 2004) ซึ่งเป็น universal primer ของแบคทีเรีย โดยส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสารละลายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x PCR buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5	1x
25 mM MgCl_2	2.0	2 mM
10 mM dNTP	1	400 μM
10 μM Primer BSF8/20	1	0.4 μM
10 μM Primer REVB	1	0.4 μM
5U/ μl Taq DNA polymerase	0.25	0.05 μM
100 ng/ μl DNA template	1	
น้ำกลั่น	16.25	
รวม	25	

การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler™ thermal cycler) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเตรียม ดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 35 รอบ โดยแต่ละรอบจะมีอุณหภูมิต่างๆ ดังนี้คือ อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 50 องศา

เซลล์เชื้อ เป็นเวลา 1 นาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์อย่างเหมาะสม และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 45 วินาที ขั้นตอนนี้เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์ และดีเอ็นเอต้นแบบ เมื่อปฏิกิริยา พีซีอาร์ทำงานครบ 35 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีจำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เก็บดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (PCR product) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลผลิต พีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 1 Kb DNA Ladder เป็น marker

4) การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์

สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit โดยการตัดชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่อยู่ในเจล (น้ำหนักแห้งเกิน 0.4 กรัม) ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์ จากนั้นใส่บัฟเฟอร์ QG 3 เท่าของน้ำหนักเจล แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หรือจนกว่าเจลจะละลายหมด เมื่อเห็นว่าสารละลายเป็นสีเหลือง ใส่ isopropanol 1 เท่าของน้ำหนักเจล จากนั้นให้เทใส่ลงในคอลัมน์ ระวังอย่าให้ล้น นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที แล้วเทส่วนล่างทิ้ง เติมน้ำบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เทส่วนล่างทิ้ง นำคอลัมน์ใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์อันใหม่ พักคอลัมน์ให้แห้งโดยใช้เวลาประมาณ 20 นาที ทำการ elute ดีเอ็นเอโดยเติมน้ำบัฟเฟอร์ EB ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที ตรวจสอบความเข้มข้นของดีเอ็นเอที่สกัดได้จากผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 2) โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker

5) การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (ligation)

นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากข้อ 4) มาเชื่อมต่อกับพลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T (Fermentas) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นเป็นโมลาร์ของผลผลิต พีซีอาร์ต่อพลาสมิดเวกเตอร์เท่ากับ 3:1 ปฏิกิริยาการเชื่อมต่อ 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 1X Ligation buffer [40 mM Tris-HCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 0.5 mM ATP (pH 7.8 อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส)] พลาสมิดเวกเตอร์ pTZ57R/T ความเข้มข้น 55 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร T4 DNA Ligase ความเข้มข้น 5 ยูนิต ผลผลิตพีซีอาร์และน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารละลายทั้งหมดผสมให้เข้ากัน และบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 12 ชั่วโมง

6) การเตรียมเชื้อ *E.coli* DH5 α ให้เป็น competent cell

เพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *E.coli* DH5 α บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง LB (Luria-Bertani) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง จากนั้นเจือโคโลนีที่ได้มา 1 โคโลนี ใส่ในฟลาस्कขนาด 300 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร LB ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลาประมาณ 20 ชั่วโมง นำไปวัดค่าดูดกลืน

แสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าประมาณ 0.6 (Sambrook *et al.* 2001) จากนั้นถ่ายเชื้อลงหลอดไมโครเซนติฟิวส์ขนาด 50 มิลลิลิตรแล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 15 นาที ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น (ปริมาตร 40 มิลลิลิตร) จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที ทิ้งส่วนใส ละลายตะกอนด้วยสารละลาย TB ที่แช่เย็น 10 มิลลิลิตร แล้วค่อยๆ เติม DMSO 0.7 มิลลิลิตร แล้วตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 10 นาที แบ่ง competent cell ที่ได้ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์แล้วเก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

7) การทรานส์ฟอร์มดิเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ competent cell *E.coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock

คัดแปลงตามวิธีของ Sambrook *et al.* (2001) โดยนำ competent cell ปริมาตร 100 ไมโครลิตร มาตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที ต่อจากนั้นดูดสารละลายที่ทำการเชื่อมชิ้นส่วนดิเอ็นเอเป้าหมายเข้ากับพลาสติกเวกเตอร์ในข้อที่ 6) ปริมาตร 20 ไมโครลิตรใส่ใน competent cell ผสมให้เข้ากันเบาๆ แล้วแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วโดยแช่ทิ้งไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 2-3 นาที ต่อมาเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ LB ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นแบ่งสารละลายไป spread บนจานเพาะเชื้ออาหารแข็ง LB ที่มี ampicillin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Isopropyl-B-D thiogalactoside (IPTG) ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ และ 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-B-D-galactoside (x-gal) ความเข้มข้น 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง

8) การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์ม

คัดเลือกโคโลนีสีขาวบนอาหารแข็ง LB ที่มียาปฏิชีวนะ ampicillin, x-gal และ IPTG เนื่องจาก pTZ57R/T มีบริเวณอื่น *lacZ* ที่ทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ β -galactosidase โดยจะทำการย่อย x-gal ให้ได้ตะกอนสีฟ้า แต่พลาสติกเวกเตอร์ที่ถูกแทรกด้วย 16S rDNA ที่บริเวณอื่น *lacZ* จะทำให้ไม่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้และได้ตะกอนสีขาวแทน

9) การสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดแยกพลาสมิดสำเร็จรูป QIAprep Spin Miniprep Kit

นำโคโลนีที่มีสีขาวไปเลี้ยงในอาหารเหลว LB จากนั้นนำไปบ่มในตู้ที่มีการเขย่า (incubate shaker) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 14 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง รอให้แห้ง เติมนัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วทำการ vortex จากนั้นเติมนัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร แล้วทำการพลิกกลับไปกลับมาเบาๆ 4-6 ครั้ง เติมนัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร แล้วทำการพลิกกลับไปกลับมา

เบาๆ 4-6 ครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูส่วนใสใส่งคอลลัมน์ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที ทิ้งส่วนเหลวด้านล่างหลอดทิ้ง ล้างคอลลัมน์ด้วย บัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที แล้วเทส่วนล่างทิ้ง ทำการล้าง 2 ครั้ง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที รอให้คอลลัมน์แห้ง ย้ายคอลลัมน์ไปใส่ในหลอดไมโครเซนติฟิวส์อันใหม่ ทำการ elute ดีเอ็นเอโดยการเติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 10-15 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 2 นาที ตรวจสอบ พลาสมิดที่ได้โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 2) โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker

10) การตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกแทรกด้วย

16S rDNA

ทำการตรวจสอบชิ้น 16S rDNA ซึ่งถูกแทรกสู่พลาสมิดเวกเตอร์ ด้วยการวิเคราะห์การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* (vivantis) และ *BamHI* (vivantis) โดยเอนไซม์ทั้งสองชนิดทำปฏิกิริยาร่วมกันโดยในปฏิกิริยา 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย 10x Buffer ปริมาตร 1 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *XbaI* (ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร เอนไซม์ตัดจำเพาะ *BamHI* (ความเข้มข้น 20 ยูนิตต่อไมโครลิตร) ปริมาตร 0.3 ไมโครลิตร พลาสมิดเวกเตอร์ที่แทรกด้วย 16S rDNA ที่ได้จากข้อ 9) ปริมาตร 6 ไมโครลิตร และปรับด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อจนมีปริมาตรสุดท้าย 10 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบขนาดชิ้นดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ตามวิธีในข้อ 2) โดยใช้ 1 Kb DNA Ladder เป็น marker

11) วิเคราะห์ลำดับเบส

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่ได้ว่ามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% Identity) และรายละเอียดต่างๆ ของแบคทีเรียที่ปรากฏในผลของการ BLASTN

1.2.2 การทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลกติก

ทดสอบอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียโดยแบคทีเรียกรดแลกติก ดัดแปลงจาก Pilasombut (2006) นำเชื้อตัวอย่างจาก stock culture เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิตร ถ่ายเชื้อตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 300 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิตร ทำการวัด

ค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทดสอบหาค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่เป็นส่วนใส (cell free supernatant) และหาปริมาณเชื้อตัวอย่างโดยการ spread plate (Log CFU/ml) ทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การทดลองที่ 1.3 การทดสอบคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซิน

1.3.1 การทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน คัดแปลงจาก Ennahar *et al.* (1999) นำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที 20 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเอาเฉพาะส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว ปรับค่าความเป็นกรดและด่างให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ α -chymotrypsin, trypsin และ proteinase K แล้วปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 7.0 ทุกตัวอย่าง จากนั้นนำส่วนใสดังกล่าวย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนดให้กรองโดยใช้แผ่นกรองปลอดเชื้อ แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไปวัดค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่เหลืออยู่

1.3.2 การทดสอบความเสถียรของสารแบคทีเรียโอซินต่ออุณหภูมิสูงและอุณหภูมิต่ำ

ทดสอบความเสถียรของสารแบคทีเรียโอซินต่ออุณหภูมิสูง คัดแปลงจาก Campos *et al.* (2006) โดยนำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อเอาเฉพาะส่วนใสมาปรับค่า pH เท่ากับ 6 โดยส่วนหนึ่งนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที และอีกส่วนหนึ่งนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน

ทดสอบความคงทนของสารแบคทีเรียโอซินต่ออุณหภูมิต่ำ คัดแปลงจาก Campos *et al.* (2006) นำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อเอาเฉพาะส่วนใสมาปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6 กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยวัดค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินทุกวัน

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซิน กรดแลกติก และสารแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus* แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 2.1 ทดสอบความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดแลกติก ในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus*

การทดลองที่ 2.2 นำข้อมูลความเข้มข้นที่เหมาะสมของกรดแลกติกจากการทดลองที่ 2.1 ใช้ร่วมกับสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus*

ทำการศึกษาประสิทธิภาพการลดปริมาณจุลินทรีย์ก่อโรคของสารทดสอบ ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารแต่ละชนิดที่มีผลในการยับยั้งการเจริญเชื้อ *Salmonella* sp., *E. coli* และ *S. aureus* ที่ระยะเวลาที่สารสัมผัสแบคทีเรีย ได้แก่ 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง โดยทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียที่เหลืออยู่ภายหลังสัมผัสสารที่ระยะเวลาต่างๆ รายงานผลในค่า log cfu/ml

การทดลองที่ 3 ศึกษาการใช้สารแบคทีเรียโอซิน กรดแลกติก และสารแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัส ของไส้กรอกอีสานภายใต้กระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสุญญากาศ แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

การทดลองที่ 3.1 ศึกษาการใช้สารแบคทีเรียโอซิน กรดแลกติก และสารแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อคุณสมบัติทางด้านกายภาพ เคมี จุลินทรีย์และทางประสาทสัมผัส ของไส้กรอกอีสานภายใต้กระบวนการหมักโดยการแขวนในอุณหภูมิห้องและบรรจุถุงสุญญากาศ เป็นระยะเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 วัน โดยศึกษาคุณสมบัติดังนี้

3.1.1 คุณสมบัติทางด้านกายภาพ

3.1.1.1 ค่าความเป็นกรดต่าง

3.1.1.2 ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity)

3.1.1.3 สี (CIE L*a*b*) ด้วยเครื่อง Hunterlab Mini Scan EZ

3.1.1.4 ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis

โดยใช้หัววัดแบบ Compression ด้วยเครื่อง Instron (model 1011, USA)

3.1.2 คุณสมบัติทางด้านเคมี

3.1.2.1 ค่าแอกติวิตี (Water activity measurement) ด้วยเครื่อง เครื่องตรวจวัดค่า A_w (Novasina, Switzerland)

3.1.2.2 ค่าความชื้น (Moisture content) ด้วยเครื่องตรวจวัดค่าความชื้น (Analyzer, Hobart, USA)

3.1.3 คุณสมบัติทางค่านิจลินทรีย์

3.1.3.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

3.1.3.2 จำนวนยีสต์และรา

3.1.4 วิเคราะห์คุณภาพทางประสาทสัมผัส

ศึกษาการยอมรับของผู้บริโภคด้วยการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้านลักษณะปรากฏเนื้อสัมผัส (chewiness and hardness) กลิ่น รสชาติ และการยอมรับโดยรวม ด้วยวิธีการให้คะแนนความชอบแบบ 7-Point hedonic scale

การทดลองที่ 3.2 ศึกษาการใช้สารแบคทีเรียโอซินและกรดแลกติก ร่วมกับวิธีการเก็บระหว่างเกิดกระบวนการหมัก ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสาน

ศึกษาการใช้สารแบคทีเรียโอซิน กรดแลกติก และสารแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ในไส้กรอกอีสาน เมื่อแขวนไว้ในอุณหภูมิห้องและเมื่อบรรจุในถุงสุญญากาศที่อุณหภูมิ 30 °C

3.6 ขั้นตอนการศึกษาและการเก็บข้อมูล

3.6.1 การวิเคราะห์ด้านกายภาพ

3.6.1.1 การวัดค่าความเป็นกรดต่าง

วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้หัวโพรบที่ลงบนตัวอย่างโดยตรง จากนั้นบันทึกผล กลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ

3.6.1.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity)

วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด คัดแปลงจาก Friedrich *et al.* (2001) โดยชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่อง homogenizer จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 4000 g อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 15 นาที กรองเอาแต่ส่วนใส หยอดด้วยฟีนอล์ฟทาไลน์ 2-3 หยด นำไปไตเตรตด้วย 0.1 NaOH จนเป็นสีชมพูอ่อน โดยทดลองกลุ่มการทดลองละ 3 ซ้ำ กำหนดหาปริมาณกรดจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดทั้งหมด} = \frac{N \times V \times 90.01 \times 100}{1000 \times \text{น้ำหนักของตัวอย่าง}}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน 0.1 N NaOH

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน 0.1 NaOH ที่ใช้

3.6.1.3 การวัดค่าสี (CIE L*a*b*)

สุ่มตัวอย่างกลุ่มทดลองละ 3 ซีน มาวัดค่าสีด้วยระบบ CIE (L*a*b*) ขึ้นละ 3 จุด ด้วยเครื่องวัดสี HunterLab Mini Scan EZ 4000L (Hunter Lab Inc., Reston, USA) เมื่อ L* คือ ค่าความสว่าง a* คือ ค่าสีแดง และ b* คือ ค่าสีเหลือง

3.6.1.5 ลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis

การวัดลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ ด้วยรูปแบบ Texture Profile Analysis โดยใช้หัววัด Compression ด้วยเครื่อง Instron (model 1011, USA) ตัดตัวอย่างเป็นชิ้น ขนาด 2 x 4 เซนติเมตร ตัวอย่างละ 10 ซ้ำ

3.6.2 คุณสมบัติทางด้านเคมี

3.6.2.1 ค่าวอเตอร์แอคทิวิตี (Water activity measurement)

ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็ก ๆ ปริมาณ 3 กรัม ใส่ลงในภาชนะสำหรับใช้วิเคราะห์ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.6.2.2 ค่าความชื้น (Moisture content)

ตัดตัวอย่างเป็นชิ้นเล็กๆ ปริมาณ 3 กรัม วัดด้วยเครื่องตรวจวัดค่าความชื้น (Analyzer, Hobart, USA) จำนวน 3 ซ้ำ

3.6.3 คุณสมบัติทางด้านจุลินทรีย์

3.6.3.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก โดยวิธีการที่อ้างอิงจาก AOAC (2006) โดยนำตัวอย่างจำนวน 25 กรัม ในสารละลายเปปโทน 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร MRS agar ที่เติม CaCO_3 (0.5%) ปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ แล้วใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนั้น spread ที่ผิวหน้าอาหารแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ จากนั้นนับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบๆ โคโลนี รายงานผลจำนวนเชื้อ Lactic acid bacteria เฉพาะจานเพาะเชื้อ ที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

3.6.3.2 จำนวนยีสต์และรา

ตรวจวิเคราะห์หายีสต์และราโดยวิธีการที่อ้างอิงจาก AOAC (2005) โดยนำตัวอย่างจำนวน 25 กรัม ในสารละลายเปปโทน 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความ

เข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร Malt agar ที่เติมกรดแลกติก 80% ปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำรอจนอาหารแข็งแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 26 °C เป็นเวลา 7 วัน นับจำนวนยีสต์ และรายงานผลจำนวนยีสต์ และรา เฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g

3.6.3.3 จำนวนเชื้อ *S. aureus*

ตรวจวิเคราะห์หาเชื้อ *S. aureus* โดยวิธีการที่อ้างอิงจาก BAM (2001) นำตัวอย่างจำนวน 25 กรัม ในสารละลายเปปโทน 0.1% ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้น 1:10 จากนั้นเจือจางตัวอย่าง จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม (1:100, 1:1000, 1:10000 และ 1:100000 เป็นต้น) จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร และถ่ายลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร Baird Parker ที่เติม Potassium tellurite 1% และไข่แดง ปริมาตรจานละ 15 – 20 มิลลิลิตร ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ แล้วใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วนั้น spread ที่ผิวหน้าอาหารแล้วคว่ำจานเพาะเชื้อ นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเชื้อ *S. aureus* รายงานผลจำนวนเชื้อ *S. aureus* เฉพาะจานเพาะเชื้อ ที่มีจำนวนระหว่าง 30 – 300 โคโลนี หน่วยเป็น log cfu/g การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของ *S. aureus* โดย Subculture เชื้อลงใน Brain heart infusion broth (BHI broth) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 0.30 มิลลิลิตร เชื้อโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *S. aureus* เพาะเชื้อในหลอดที่มี BHI broth และหลอดอาหาร TSA slant (สำหรับการทดสอบซ้ำ) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ดู Coagulase plasma ปริมาตร 0.30 มิลลิลิตร ลงในหลอดเพาะเชื้อที่มี BHI broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 4 - 6 ชั่วโมง อ่านผลโดยดูการแข็งตัวของ plasma อันเนื่องมาจากเอนไซม์ Coagulase (Coagulase positive) ที่เชื้อ *S. aureus* สร้างขึ้น ซึ่งอาจจะมีลักษณะต่าง ๆ กัน สำหรับเชื้อที่ให้ Coagulase ไม่เท่ากัน

3.6.4 วิเคราะห์ทางประสาทสัมผัส

โดยการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสตาม โดยทดสอบ 7 ลักษณะ ได้แก่ สี ลักษณะปรากฏ เนื้อสัมผัส กลิ่นรส ความเปรี้ยว และลักษณะโดยรวม ประเมินโดยวิธี Consumer test โดยใช้ผู้ทดสอบชิมซึ่งเป็นกลุ่มนักศึกษา อาจารย์ และผู้บริโภคร่วมไปจำนวน 30 คนขึ้นไป โดยมีช่วงการให้คะแนนความพึงพอใจ 7 ระดับ (7 – Point Hedonic Scale) ตั้งแต่ 1 – 7 ดังต่อไปนี้

- 1 หมายถึง ไม่ชอบมากที่สุด
- 2 หมายถึง ไม่ชอบมาก
- 3 หมายถึง ไม่ชอบ
- 4 หมายถึง เฉยๆ
- 5 หมายถึง ชอบ

6 หมายถึง ชอบมาก

7 หมายถึง ชอบมากที่สุด

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Complete Randomized Design, CRD) ยกเว้นการวิเคราะห์ทางด้านประสาทสัมผัส ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มไม่สมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์หาความแปรปรวน (Analysis of Variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป (SPSS for windows version 11.5 : SPSS Inc.)