

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกรเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

1.1 ตัวอย่างอาหารหมักคองจากพืช สัตว์และผลิตภัณฑ์นมที่เก็บจากตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ลำพูนและลำปาง ถ้าเป็นอาหารแข็งไม่มีน้ำใช้ตัวอย่างอาหารประมาณ 5 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกใหม่ขนาด $3\frac{1}{2} \times 5$ นิ้ว เติม Phosphate buffer saline (PBS) 20 มล. (ภาคผนวก ข) เขย่าให้อาหารกระจายตัว ค่อยเอาส่วนผสมของอาหารกับ buffer 1 มล. และกรณีที่เป็นอาหารเหลวดูดตัวอย่างอาหาร 1 มล. ใส่ในขวด universal ที่บรรจุอาหารเหลว de Man Rogossa Sharpe (MRS:MERK, ภาคผนวก ก) ปริมาตร 20 มล. โดยมี Bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.2 เลือกขวดที่เปลี่ยนสีอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีเขียวเป็นเหลืองไป streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มี Bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปบ่มที่ 45°C 24-48 ชั่วโมงในสถานะที่มี 5-10% CO_2 โดยใช้ candle jar (อดิสร, 2541)

candle jar คือภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิดและอากาศไม่สามารถผ่านเข้าออกได้ง่าย ใส่จานอาหาร MRS ลงไปในภาชนะ จุกเทียนไขทิ้งไว้ประมาณ 2-5 นาทีโดยไม่ต้องปิดฝา เมื่อเห็นควันลอยอยู่ในภาชนะให้ปิดฝาภาชนะให้มิดชิด ทิ้งไว้ให้เทียนไขดับเองจะทำให้ภายในภาชนะเกิดสถานะที่มี CO_2 ประมาณ 5-10%

1.3 เลือกโคโลนีที่เปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลืองไปย้อมสีแกรม (Gram stain) (ภาคผนวก ข) ทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase โดยนำโคโลนีไปแตะบนสไลด์ หยด 3% H_2O_2 solution ลงไปถ้าไม่เกิดฟองอากาศแสดงว่าเชื้อนั้นไม่สร้างเอนไซม์ catalase ทดสอบการเจริญได้ที่อุณหภูมิห้อง ($25-30^{\circ}\text{C}$) ถ้าเป็นโคโลนี ดิคส์แกรมบวก รูปกลม แท่งหรือกึ่งแท่ง ไม่สร้างเอนไซม์ catalase และเจริญได้ที่อุณหภูมิห้อง นำไป restreak ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์เพื่อเก็บไว้เป็น stock culture ไว้ศึกษาต่อไป

1.4 การเก็บเชื้อ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ไว้เป็น stock culture

1.4.1 การเก็บในอาหารแข็ง MRS agar ที่เติม 2% CaCO_3 ในหลอดทดลองขนาด 3×100 มม. ที่เตรียมในลักษณะที่เป็น slant และ deep (ภาคผนวก ก)

1.4.2 เก็บใน Litmus milk (ภาคผนวก ก)

1.4.3 เก็บใน 20% glycerol triptose broth

2. การคัดเลือก แลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

2.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 029, *Escherichia coli* TISTR 780, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5104, *Aspergillus flavus* TISTR 3366 จากหน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

เชื้อทดสอบอ้างอิงได้แก่ *Bacillus cereus*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio parahaemolyticus* จากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ เชียงใหม่ (อัจฉรา, 2541) *Lactobacillus lactis* TISTR 452, *Streptococcus lactis* TISTR 457

สำหรับแบคทีเรียทดสอบข้างต้นทั้งหมด เตรียมให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 10^7 - 10^8 เซลล์ ใน 1% peptone broth โดยใช้วิธีเทียบความขุ่นกัน McFarland No. 0.5 (ภาคผนวก ข) ส่วนยีสต์และรา เตรียมให้ได้จำนวนเซลล์ประมาณ 2×10^8 ใน Malt extract Yeast extract Glucose (MYG) สำหรับเพาะเลี้ยง *Sacch. cerevisiae* และ Potato dextrose broth (PDB) (ภาคผนวก ก) สำหรับเพาะเลี้ยง *A. flavus* นับสปอร์ด้วย haemocytometer (ภาคผนวก ง)

2.2 การเตรียมเชื้อ แลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เพาะเลี้ยงแลคติกแอซิดแบคทีเรีย แต่ละไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 117 ไอโซเลทใน MRS broth ที่ไม่มีการเติมอินดิเคเตอร์ปริมาตร 20 มล. ในขวด universal ขนาด 30 มล. บ่มที่ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปปั่นแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที 4°C 15 นาที ส่วนใสที่ได้นำไปปรับ pH ด้วย 2 N NaOH ให้ได้ pH 6.5-7.0 แล้วนำมากรองผ่าน cellulose acetate (Whatman) ขนาดรูกรอง $0.2 \mu\text{m}$ จะได้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการปรับ pH (cell-free culture filtrate) ส่วนที่ 2 เป็นส่วนของน้ำเลี้ยงที่มีตัวเซลล์และไม่มีการปรับ pH

2.3 ทดสอบการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อทดสอบโดยวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม (Paper disc diffusion method)

2.3.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้แก่ *S. aureus*, *E. coli*, *B. cereus*, *S. enteritidis* และ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 18-24 ชั่วโมง สำหรับ *Sacch. cerevisiae* เลี้ยงในอาหาร MYG agar slant บ่มที่ 37°C 18-24 ชั่วโมง *A. flavus* เลี้ยงในอาหาร PDA slant บ่มที่ 25°C 48-72 ชั่วโมง แล้วนำมาเตรียมเป็นเชื้อทดสอบตามข้อ 2.1

2.3.2 นำเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ในข้อ 2.3.1 มาทำการป้ายลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (swab technique) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับเชื้อทดสอบได้แก่ *S. aureus* ใช้อาหาร Mueller Hinton agar (MH: Diffco) *B. cereus* ใช้อาหาร Nutrient agar (NA: Diffco) *S. enteritidis*, *V. parahaemolyticus*, *E. coli* ใช้อาหาร Tryptic soy agar (TSA: Diffco) *A. flavus* ใช้อาหาร Potato dextrose agar (PDA: Diffco) *Sacch. cerevisiae* ใช้อาหาร MYG

2.3.3 นำแผ่นกระดาษกลมที่มีความสามารถในการดูดซับได้ดี ประมาณ 20-30 μ l และผ่านการฆ่าเชื้อโดยใช้ autoclave ที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ในการทดสอบนี้ใช้กระดาษซับที่มีความหนา 2.5 มม. ตัดด้วยเครื่องเจาะกระดาษวงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. ชุบน้ำเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ในข้อ 2.2 วางทับบนจานอาหารที่ป้ายเชื้อทดสอบแล้ว (ตามข้อ 2.3.2) โดยมีกรดแลคติก 2% pH 2.6 เป็น positive control สำหรับเชื้อแบคทีเรีย ส่วนยีสต์และราใช้กรดแลคติก 50% เป็น positive control และใช้อาหาร MRS pH 7 เป็น negative control นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งของสารโดยวัดขนาดของวงใส (clear zone) รวมกับขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของกระดาษ

2.4 เปรียบเทียบผลการยับยั้งโดยวิธีเจาะหลุม (well diffusion) และแบบใช้ถ้วยทรงกระบอก stainless steel cup (cup diffusion)

นำกรดแลคติกแอซิติกแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบตั้งแต่ 3 ชนิดขึ้นไปจากการทดลองโดยวิธี Paper disc diffusion method ซึ่งมีจำนวน 5 ไอโซเลท เปรียบเทียบผลการยับยั้งด้วยวิธี well diffusion method และ cup diffusion method โดยดูจากวงใสที่เกิดขึ้น (clear zone)

2.4.1 การทดสอบแบบเจาะหลุม (well diffusion method)

ใช้ micropipette ขนาด 500 μ l ดูดเชื้อทดสอบที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.1 จำนวน 300 μ l ผสมลงในอาหารแต่ละชนิดของเชื้อทดสอบตามที่เตรียมไว้ในข้อ 2.2.2 โดยใส่ในอาหารจำนวน 10 มล. ที่บรรจุในขวด universal ผสมให้เข้ากันแล้วเททับบนอาหารแข็งชนิดเดิมที่เตรียมไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จะได้ลักษณะอาหารที่เป็น 2 ชั้น (double layer) ใช้ที่เจาะจุกคอร์กขนาด 9 มม. เจาะหลุมจำนวน 5 หลุมต่อ 1 จาน ใช้ micropipette ขนาด 200 μ l ดูด culture filtrate ที่เตรียมตามวิธีข้อ 2.2 ใส่ลงไปในหลุมจำนวน 150 μ l ต่อหลุมโดยทำ positive และ negative control ควบคู่ไปด้วย นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งโดยวัดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

2.4.2 การทดสอบแบบใช้ stainless steel cup

เตรียมจานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบเช่นเดียวกับการทดสอบแบบเจาะหลุม ใช้ปากคีบคีบ stainless steel cup ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 7 มม. สูง 10 มม. ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว วางลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ก่อนวาง cup นำ cup ผ่านเปลวไฟให้เกิดความร้อนแล้วนำไปวางบนอาหารจะทำให้ cup ยึดติดแน่นกับอาหารมากขึ้น) ใช้ micropipette ขนาด 200 μ l ดูด culture filtrate ที่เตรียมตามวิธีข้อ 2.2 ปริมาตร 200 μ l ใส่ลงไปใน cup และทำ positive และ negative control ควบคู่ไปด้วยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งโดยวัดวงใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

3. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้ง

3.1 ศึกษาถึงอิทธิพลของกรดที่ได้จากการหมักน้ำตาลและอิทธิพลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ไม่ต่ำกว่า 3 ชนิด ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท CT10, CT16, CT33, CT62 และ CT109 นำมาเลี้ยงในขวด universal ที่บรรจุ 0.2% glucose MRS broth 20 มล. (ภาคผนวก ก) เพื่อลดอิทธิพลของกรดที่ได้จากการหมักน้ำตาลและ 2% glucose MRS broth 20 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศโดยใช้ anaerobic incubator (Airayama รุ่น FA 5148) เพื่อลดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ น้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้นำไปปั่นแยกเซลล์ออกที่ 6,000 รอบต่อนาที 4°C 15 นาที ดูดเอาส่วนใส (supernatant) มาปรับ pH ด้วย 2 N NaOH ให้ได้ pH 6.5-7 กรองด้วย cellulose acetate ขนาด 0.2 μ m จะได้น้ำกรองเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีตัวเซลล์ (cell-free culture filtrate) แล้วแบ่งไปทดสอบการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งโดยวัดวงใสที่เกิดขึ้น ส่วนที่เหลือแบ่งเก็บไว้ในขวดฝาเกลียวขนาด 2 มล. เก็บไว้ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น 4°C เพื่อใช้ศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ต่อไป

3.2 ศึกษาคุณสมบัติการทนความร้อนของสารยับยั้ง

นำ cell-free culture filtrate ของ ไอโซเลท CT16 และ CT62 ไปต้มน้ำเดือดที่เวลา 5, 10, 15 และ 20 นาที แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม ตรวจสอบผลการยับยั้งโดยวัดวงใสที่เกิดขึ้น

3.3 ศึกษาคุณสมบัติการถูกทำลายสารยับยั้งโดยเอนไซม์โปรติเอส (protease)

cell-free culture filtrate ของ ไอโซเลทที่ให่วงใสในการยับยั้งเชื้อทดสอบข้อ 3.1 และ 3.2 ซึ่งได้แก่ ไอโซเลท CT16 และ CT62 ซึ่งคาดว่าสารยับยั้งน่าจะเป็นสารประเภทโปรตีนที่ทนความร้อนได้นาน 10 นาที นำไปทดสอบโดยการเติมเอนไซม์โปรติเอส (Sigma) 20 มก.ต่อ culture

filtrate 1 มล. ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-4 ชั่วโมง (Lee, 1999) แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการที่โปรตีนถูกทำลายโดยเชื้อทดสอบไม่ถูกยับยั้งการเจริญหรือไม่มีวงใสเกิดขึ้นเปรียบเทียบกับ cell-free culture filtrate ที่ไม่เติมเอนไซม์โปรติเอสเป็น negative control ซึ่งจะเกิดวงใส

3.4 ศึกษาการยับยั้งต่อเชื้ออ้างอิง (แลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน)

นำ cell-free culture filtrate ไอโซเลท CT16 และ CT62 ไปทดสอบการยับยั้งต่อเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus lactis* TISTR 452, *Streptococcus lactis* TISTR 457, *Pediococcus* sp. A7 และ A67/2 (อัจฉรา, 2541) ทดสอบการยับยั้งโดยวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม ตรวจสอบผลการยับยั้งโดยวัดวงใสที่เกิดขึ้น

4. การทำให้โปรตีนบริสุทธิ์บางส่วน

เตรียมเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยเลี้ยงเชื้อใน MRS agar slant ในหลอดทดลองขนาด 16x100 มล. บ่มที่ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 3-4 โคโลนี (อาจเพิ่มหรือลดจำนวนโคโลนี) ลงใน 1% peptone ที่บรรจุในหลอดทดลองขนาด 13x100 มม. ปริมาตร 3 มล. จำนวน 4 หลอด แล้วปรับความขุ่นให้เท่ากับ McFarland No. 0.5 เพื่อเตรียมเซลล์ให้มีเชื้อตั้งต้นในปริมาตร 10^7 - 10^8 CFU

เตรียมอาหารเหลว MRS (MRS broth) จำนวน 500 มล. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มล. เติมน้ำตั้งต้น แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เตรียมไว้จำนวน 10 มล. หรือ 2% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 45°C 24 ชั่วโมง นำเลี้ยงเชื้อที่ได้นำไปปั่นแยกเซลล์ออกที่ 6,000 รอบต่อนาที 4°C 15 นาที ดูดเอาส่วนใส (supernatant) มาปรับ pH ด้วย 2 N NaOH ให้ได้ pH 6.5-7 กรองด้วย cellulose acetate ขนาด 0.2 μ m เก็บส่วนใสไว้ในตู้เย็น 4°C เพื่อไว้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยผงถ่าน (activated charcoal)

เตรียมเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ตามวิธีในข้อ 4 จำนวน 250 มล. supernatant ที่ได้นำไปตกตะกอนโปรตีนด้วยผงถ่านดังนี้

4.1.1 ใช้บีกเกอร์ขนาด 100 มล. ใส่ supernatant 50 มล. ชั่งผงถ่านตามจำนวนที่ต้องการทดสอบคือ 0.25 กรัม 0.5 กรัม 1 กรัม และ 1.5 กรัม คิดเป็น 0.5, 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

4.1.2 ทำการตกตะกอนโปรตีน โดยค่อย ๆ เติมน้ำผงถ่านลงไปช้า ๆ ในบีกเกอร์ที่ตั้งบนภาคน้ำแข็งและวางบน magnetic stirrer กวนสารละลายเบา ๆ ด้วย magnetic bar ประมาณ 2-3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำเข้าตู้เย็น 4°C ข้ามคืน

4.1.3 นำสารละลายไปปั่นแยกเอาตะกอนที่ 6,000 รอบต่อนาที 4°C 20 นาที แยกเอา ส่วนใส (supernatant) และตะกอนไปทำการทดสอบผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยวิธีแพร่จาก แผ่นกระดาษกลม บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งโดยดูจากวงใสที่เกิดขึ้น

4.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

4.2.1 บดแอมโมเนียมซัลเฟตให้เป็นผงละเอียดในโถรงบคเพื่อให้ละลายได้ง่าย ชั่งผง แอมโมเนียมซัลเฟตให้น้ำหนักตามเปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวที่ต้องการทดสอบ (ภาคผนวก ค) ที่ ความเข้มข้น 20, 30, 40, 50, 60, 70 และ 80% ตามลำดับ เพื่อทดลองหาเปอร์เซ็นต์ความอิ่มตัวของ แอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีน

4.2.2 เติมผงแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปช้า ๆ ใน supernatant ที่เตรียมไว้ข้างต้น ปริมาตร 20 มล. ในหลอดเซนตริฟิวส์ (centrifuge tube) ขนาด 50 มล. ในแต่ละเปอร์เซ็นต์การอิ่มตัว ของแอมโมเนียมซัลเฟตร่วมกับเขย่าโดยใช้ mixer จนแอมโมเนียมซัลเฟตละลายหมด แล้วนำไป เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C ช้าคืนหรือประมาณ 12 ชั่วโมง เพื่อให้โปรตีนตกตะกอนได้สมบูรณ์

4.2.3 นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที 4°C เป็นเวลา 15 นาที ตะกอนที่ ได้ในแต่ละเปอร์เซ็นต์นำไปละลายตะกอนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มล.

4.2.4 นำทั้งส่วนของ supernatant และตะกอนที่ละลายในบัฟเฟอร์ไปทดสอบผลการ ยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม (Paper disc diffusion method) บ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 20% ทำเป็น negative control ตรวจสอบผลการยับยั้งโดยวัดวงใสที่เกิดขึ้น

4.2.5 เลือกเปอร์เซ็นต์การอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟตในส่วนของตะกอนที่ให้ผล การยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดเป็นเปอร์เซ็นต์ที่เหมาะสมต่อการตกตะกอนโปรตีน ในการศึกษา ครั้งนี้จะตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวโดยใช้ supernatant ปริมาตร 200 มล. มา ทำการตกตะกอน ตะกอนที่ได้แบ่งเก็บไว้ในหลอดเซนตริฟิวส์โดยไม่ต้องละลายตะกอน และอีก ส่วนหนึ่งนำไปละลายตะกอนด้วยโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7 เพื่อนำไปทำโคอะไลซิส และทดสอบผลการยับยั้งอีกครั้งตามวิธีในข้อ 4.2.4 โดยแบ่งตะกอนออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่ หนึ่งตะกอนที่ไม่ต้ม ส่วนที่สองตะกอนที่นำไปต้มในน้ำเดือด นาน 10 นาที ส่วนที่สามตะกอนที่ เติมนอนาไมลโปรติเอส 20 มก. ต่อตะกอนที่ละลายแล้ว 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-4 ชั่วโมง หรือถ้าต้องการเก็บตะกอนไว้นานควรละลายตะกอนรวมกันด้วย buffer ในปริมาณที่น้อยที่สุดแล้ว จึงแบ่งตะกอนไปทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ

4.3 การทำไคอะไลซิส (dialysis)

4.3.1 อุปกรณ์สารเคมีและวิธีการเตรียม (ภาคผนวก ข)

4.3.2 การเตรียมถุงไคอะไลซิส

ตัดถุงไคอะไลซิสให้ได้ความยาวตามความเหมาะสมที่ต้องการใช้ ทำความสะอาดถุงโดยนำไปผ่านน้ำก๊อกไหลผ่านถุงประมาณ 5 นาที นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นสะอาด 2-3 ครั้งและนำไปต้มในน้ำกลั่นประมาณ 5-10 นาทีเพื่อกำจัดเอาสารพวก glycerol หรือ hydrolytic enzyme ที่มักจะติดมากับการผลิต สุดท้ายล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2-3 ครั้ง และไม่ควรใช้มือจับถุงที่ทำความสะอาดแล้ว ควรใส่ถุงมือในขั้นตอนการทำทุกครั้ง มัดปลายข้างหนึ่งของถุงด้วยเชือกให้แน่นนำไปแช่ใน KPB ที่เย็นจัดก่อนจะทำการเติมสารละลายที่จะทำการไคอะไลซิส

วิธีการทำไคอะไลซิส

1. ละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70% ด้วย KPB pH 7 ที่เย็นจัด นำถุงไคอะไลซิสแช่ใน KPB โดยผูกปลายข้างหนึ่งไว้กับ magnetic bar เพื่อไม่ให้ถุงไคอะไลซิสลอยตัว และถูกระทบกับ magnetic bar ส่วนปลายอีกข้างหนึ่งผูกติดไว้กับแท่งแก้วพาดไว้กับปากบีกเกอร์

2. นำบีกเกอร์ไปวางไว้บน control magnetic stirrer ในระหว่างการไคอะไลซิสจะต้องกวนสารละลายตลอดเวลาเบา ๆ เพื่อช่วยให้โมเลกุลเล็กกระจายตัวออกจากถุงได้เร็วขึ้น และเปลี่ยน KPB ที่เย็นจัดทุก ๆ 30 นาที ทำการไคอะไลซิสประมาณ 6-8 ชั่วโมง จึงย้ายถุงไคอะไลซิสแช่ใน KPB ในบีกเกอร์ 500 มล. ตั้งทิ้งไว้ในตู้เย็น 4°C ค้างคืน

3. นำสารละลายในถุงไคอะไลซิสมาปั่นแยกตะกอนที่ 6,000 รอบต่อนาที 4°C 20 นาที นำทั้ง supernatant และตะกอนไปทดสอบผลการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยใช้ MRS broth เป็น negative control และใช้ตะกอนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น positive control ตรวจสอบผลการยับยั้งจากวงใสที่เกิดขึ้น ตะกอนส่วนที่เหลือนำไปต้ม 10 นาทีเพื่อศึกษาคุณสมบัติการทนความร้อนของสารยับยั้ง และอีกส่วนหนึ่งนำไปเติมเอนไซม์โปรติเอสโดยใช้ทริปซิน 20 มก.ต่อ 1 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 3-4 ชั่วโมงเพื่อศึกษาการถูกทำลายโดยเอนไซม์โปรติเอส แล้วนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธีแพร่จากแผ่นกระดาษกลม บ่มที่ 37°C 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทนความร้อนของสารยับยั้งโดยวัดวงใสที่เกิดขึ้นและตรวจสอบผลการถูกทำลายด้วยเอนไซม์โปรติเอสซึ่งจะไม่เกิดวงใสแสดงว่าสารยับยั้งถูกทำลายด้วยเอนไซม์โปรติเอส

4.4 การแยก การวิเคราะห์และการหามวลโมเลกุลของสารยับยั้งโดยวิธี เอส ดี เอส – พอลิอะคริลาไมด์ เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส (SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis :SDS-PAGE) (ดัดแปลงจาก Bio-RAD Laboratories)

4.4.1 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีเตรียม (ภาคผนวก ข)

4.4.2 วิธีทดลอง

1. ประกอบชุดเครื่องมืออิเล็กโตรโฟรีซิส ตามที่บริษัทแนะนำ
2. ผสมสารละลาย separating gel เทลงในชุดเครื่องมือตรงช่องว่างระหว่างกระจกด้าน chamber บน จนมีความสูงจากขอบล่างประมาณ 10 เซนติเมตร เติมน้ำกลั่นลงไปบนหน้าเจลเพื่อให้หน้าเจลเรียบ ทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาโพลิเมอร์ไรเซชันประมาณ 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จนได้เจลที่แข็งตัวสมบูรณ์แล้วจึงเทน้ำออกจากหน้าเจลและใช้กระดาษทิชชูช่วยซับน้ำออกให้หมด
3. ผสมสารละลายของ stacking gel แล้วใช้ปิเปตดูดใส่ลงในช่องว่างระหว่างกระจกต่อจากส่วนของ separating gel และเรียบแผ่นหิวตามทันที เพื่อให้เกิดช่องว่างสำหรับหยดสารตัวอย่าง ทิ้งไว้ให้เจลแข็งตัวประมาณ 30 นาที
4. เติมน้ำ electrode buffer ลงใน chamber บนและล่างให้เต็ม ค่อย ๆ ดึงแผ่นหิวออก
5. เติมน้ำสารละลายตัวอย่าง สารละลายโปรตีนมาตรฐาน ลงในแต่ละช่อง ช่องละ 10 μ l ต่อหัวไฟฟ้าลบและบวกจาก power supply เข้ากับหัวไฟฟ้าของ chamber บนและล่าง ผ่านกระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวก โดยใช้กระแสไฟฟ้า 110 โวลต์ จนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของ bromophenol blue เคลื่อนที่ไปจนถึงปลายด้านล่างของ separating gel ซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2 ชั่วโมง
6. หยดผ่านกระแสไฟฟ้า ถอดชุดเครื่องมือและลอกแผ่นเจลออก ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปย้อมสีด้วย staining solution ประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วล้างสีย้อมออกด้วย destaining solution โดยเปลี่ยนสาร destaining solution บ่อย ๆ จนมองเห็นแผ่นเจลใส เปรียบเทียบแถบโปรตีนของตัวอย่างกับแถบโปรตีนมาตรฐานที่ทราบค่ามวลโมเลกุล

5. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาและการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของไอโซเลต CT16 และ CT62

5.1 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

นำเชื้ออายุ 18-24 ชั่วโมงมาตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

5.2 ทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เพาะเชื้อ CT16 และ CT62 ใน MRS broth ในขวดฝาเกลียวขนาด 20 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 10°C, 25°C, 37°C, 45°C และ 55°C แล้วนำไป streak บน MRS agar บ่มที่ 10°C, 25°C, 37°C, 45°C และ 55°C

ผลบวก-สามารถเจริญได้ ผลลบ-เชื้อไม่เจริญ

5.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase

เพาะเชื้อบน MRS agar บ่มที่ 45°C 18-24 ชั่วโมง เชื้อเชื้อและบนแผ่นสไลด์ หยด 3% H₂O₂ 1-2 หยด

ผลบวกจะเห็นฟองก๊าซเล็ก ๆ เกิดขึ้น ผลลบ - ไม่เกิดฟองก๊าซ

5.4 การเกิด acid curd ใน Litmus milk

เชื้อเชื้อที่เลี้ยงบน MRS agar บ่มที่ 45°C 18-24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว litmus milk นำไปบ่มที่ 37°C อ่านผล 18-24 ชั่วโมง

ผลบวกอาหารเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีชมพู แสดงว่าเกิดการสร้างกรด และอาหารตกตะกอนและจับกันเป็นก้อน แสดงว่าเกิด acid curd ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี

5.5 การทดสอบ oxidation-fermentation (O-F test)

ทดสอบจากการสร้างก๊าซ โดยเชื้อเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ที่ใส่หลอดดักก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 48-72 ชั่วโมง แบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative bacteria จะพบก๊าซในหลอดดักก๊าซ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม Homofermentative bacteria จะไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซเพาะเชื้อ 18-24 ชั่วโมงลงใน Hugh & Leifson O-F medium ที่มี glucose โดยการ stab 2 หลอด หลอดหนึ่งเททับด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วหนาประมาณ 2 เซนติเมตร อีกหลอดหนึ่งไม่เททับ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ในอาหาร

ผลบวก-อินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองในหลอดที่เททับด้วยพาราฟินเหลว เป็น fermentation ถ้าเกิดในหลอดที่ไม่ได้เททับเป็น oxidation

5.6 การทดสอบการเป็น homofermentative และ heterofermentative

ทดสอบจากการสร้างก๊าซ โดยเชื้อเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ที่ใส่หลอดดักก๊าซ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 48-72 ชั่วโมง แบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative bacteria จะพบก๊าซในหลอดดักก๊าซ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม homofermentative bacteria จะไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซ

5.7 ทดสอบการสร้างอินโดลและการเคลื่อนที่

เพาะเชื้อบน MRS agar 18-24 ชั่วโมง ใช้เข็มเชื้อแทง (stab) ลงในอาหาร MIL (Motility Indole Lysin : diffco) 37°C 18-24 ชั่วโมง

ผลบวก motility เชื้อเจริญแผ่ออกจากรอย stab อาหารพุ่ง

ผลลบ เชื้อเจริญเฉพาะรอย stab อาหารใส

ผลบวกอินโดล เมื่อหยด Kovac's reagent ประมาณ 5 หยด บนผิวหน้าอาหาร จะเกิดวงแหวนสีแดงลอยอยู่ผิวหน้าอาหาร

5.8 การทดสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 15 นาที

เลี้ยงเชื้อใน MRS broth บ่มที่ 45°C 18-24 ชั่วโมง นำไปตั้งไว้ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 55°C นาน 15 นาที นำขึ้นมา streak ลงบน MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24 ชั่วโมง

ผลบวก เชื้อสามารถเจริญได้ ผลลบ เชื้อไม่เจริญ

5.9 การทดสอบความทนเกลือ

เจียเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 2, 4, 6.5% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยดูจากความขุ่น

ผลบวก อาหารขุ่นเชื้อเจริญได้

ผลลบ อาหารไม่ขุ่น เชื้อไม่เจริญ

5.10 การทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ

เตรียม 1% น้ำตาลที่ต้องการทดสอบใน MRS broth ที่ไม่เติม glucose และ beef extract โดยมี bromocresal green เป็นอินดิเคเตอร์ น้ำตาลที่ใช้ทดสอบได้แก่ glucose, lactose, galactose, maltose, raffinose, arabinose, sucrose, fructose, D-manitol, D-sorbitol ใส่ในหลอดฝาเกลียวขนาด 100 มม. นำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยการ autoclave ที่ความดัน 110 ปอนด์ 110°C 10 นาที

เจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในน้ำตาลแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิ 37°C 24-48 ชั่วโมง

ผลบวก อาหารเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลือง

ผลลบ อาหารไม่เปลี่ยนสี