

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างอาหารหมักคองจากพืชและสัตว์ เหง้าหมัก ผักและผลไม้ และนมและผลิตภัณฑ์ ที่นำมาแยกแบคทีเรียแลคติกเก็บจากแหล่งต่างๆ ดังนี้
 - 1.1 ร้านค้าในตลาดสุเทพ อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่
 - 1.2 ร้านค้าในตลาดสันป่าสัก อำเภอหางดง จังหวัดเชียงใหม่
 - 1.3 ร้านค้าในตลาดชุมแสง อำเภอชุมแสง จังหวัดนครสวรรค์
 - 1.4 นมและผลิตภัณฑ์จากหน่วยผลิตภัณฑ์เนื้อเชียงใหม่ สำนักปศุสัตว์เขต 5
 - 1.5 เหง้าหมักจากศูนย์วิจัยและบำรุงพันธุ์สัตว์ อำเภอสันป่าตอง จังหวัดเชียงใหม่
2. อาหารที่ใช้สำหรับแยกและเพาะเลี้ยง (ภาคผนวก ก)
 - 2.1 de Man Rogosa Sharpe (MRS)
 - 2.2 M 17 สำหรับแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์นม
 - 2.3 Glucose yeast extract peptone (GYP)
 - 2.4 JP2 (Giraud *et al.*, 1991)
 - 2.5 Modified MRS
3. อาหารที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อ (ภาคผนวก ก)
 - 3.1 Skim milk
 - 3.2 Litmus milk
 - 3.3 20% Glycerol
4. อาหารที่ใช้สำหรับทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี (ภาคผนวก ก)
 - 4.1 Starch hydrolysis
 - 4.2 Homofermentative - heterofermentative (HHD)
 - 4.3 Tryptone broth
 - 4.4 Carbohydrate Media for fermentation test
 - 4.5 Hugh & Leifson O-F medium

- 4.6 อาหารร่วนน้ำมะพร้าวสำหรับทดสอบคุณสมบัติการเป็น homofermentative และ heterofermentative
- 4.7 Gelatine Liquefaction
- 4.8 Nitrate reduction
- 4.9 Citrate test
- 4.10 Motility test
- 4.11 Vogus-Proskauer (VP) test
- 4.12 อาหารทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ
- 4.13 อาหารทดสอบการทนเกลือ
- 4.14 อาหารทดสอบการเจริญที่ pH ต่างๆ
5. สารเคมี (ภาคผนวก ข)
 - 5.1 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดรวมโดยวิธีไตเตรท
 - 5.1.1 สารละลายมาตรฐาน โพตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KHP) 0.1 M
 - 5.1.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน
 - 5.1.3 สารละลายฟีนอล์ฟทาเลอิน (phenolphthalein solution)
 - 5.2 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบทางด้านชีวเคมีเพื่อจำแนกแบคทีเรีย
 - 5.2.1 3% hydrogen peroxide (3% H_2O_2)
 - 5.2.2 Kovac's solution
 - 5.2.3 ชุดย้อมสีกรัม
 - 5.3 สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์
 - 5.3.1 DNS reagent
 - 5.3.2 Sodium-potassium tartrate 40% (Na-K tartrate)
 - 5.4 สารเคมีที่ใช้ในการทำ NTG Mutagenesis
 - 5.4.1 NTG
 - 5.4.2 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5

6. เครื่องมือ

เครื่องมือ	รุ่น (model)	บริษัทผู้ผลิต
Hot plate & stirrer	B-212	Bibby
Vortex	Genie 2	Scientific Industry
Spectrophotometer	UV-120-01	Shimadzu
HPLC	-	Shimadzu
Incubator shaker	J-MPI	Jisico
Incubator shaker	-	Lab-Line
Reciprocal shaker	NR-80	Taitec
Incubator	-	Memmert
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)	-	Memmert
pH meter	F 21	Horiba
หม้อนึ่งอັคไค (autoclave)	SS-325	Tomy
Hot air oven	-	Heraeus
เครื่องชั่ง	BP 3100 S	Satorius
เครื่องชั่งอย่างละเอียด	20S A SCS	Precisa
กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)	-	Olympus
เครื่องเหวี่ยง	EBA 12R	Hettich
ตู้ถ่ายเชื้อ	TL 2448	Hettich

7. อุปกรณ์อื่นๆ

- 7.1 หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 mm
- 7.2 หลอดทดลองฝาเกลียวขนาดเล็ก (vial)
- 7.3 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petridish) ขนาด 90 mm
- 7.4 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250 และ 500 ml
- 7.5 ปิเปต ขนาด 1 และ 10 ml
- 7.6 กระบอกตวง ขนาด 50, 250 และ 500 ml
- 7.7 บีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1,000 ml
- 7.8 Micropipette ปรับปริมาตรได้ ขนาด 2-20 μ l , 40-200 μ l, 200-1,000 μ l และ 1,000-5,000 μ l
- 7.9 Universal bottle ขนาด 30 ml
- 7.10 Duran bottle ขนาด 250, 500 และ 1,000 ml
- 7.11 กระดาษกรอง Whatman No.1 และ 3
- 7.12 แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยม (spreader)
- 7.13 Microtube
- 7.14 หลอดสำหรับเหวี่ยงขนาดกลางและเล็ก

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ชั่งตัวอย่างอาหารที่เป็นของแข็ง 0.5 กรัม ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลวให้ใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1 ml ดูดสารปริมาตร 1 ml ใส่ลงในขวด universal หรือหลอดทดลองฝาเกลียว บรรจุอาหารเหลว MRS หรือ M17 (ผลิตภัณฑ์นม) ที่มี bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ และ MRS ที่มี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ และมี 2% soluble starch (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนแทน glucose ปริมาตร 15 ml บ่มที่อุณหภูมิ 45°C สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นเวลา 1-3 วัน เลือกขวดที่เปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีเหลืองมาทำการ streak plate บนอาหารแข็งชนิดเดียวกับอาหารเหลวที่ใช้ และเติมอินดิเคเตอร์ชนิดเดิม บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 1-3 วัน เลือกโคโลนีที่บริเวณรอบๆ มีการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเขียวเป็นสีเหลืองมาตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีกรัม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เลือกเฉพาะแบคทีเรียกรัมบวก รูปร่างเป็นท่อน ทรงกลมหรือท่อนกึ่งทรงกลม มา streak หลายๆ ครั้งจนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาทดสอบ catalase โดยหยด 3% H₂O₂ solution ลงบนแผ่นสไลด์ แล้วเขียนเชื้อลงไป นำเชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้มา streak และ stab ลงใน MRS agar ที่เติม 2% CaCO₃ และ litmus milk และ skim milk 20% glycerol เป็น stock culture ไว้ศึกษาต่อไป

2. การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติกในการเป็น homofermentative หรือ heterofermentative

นำแบคทีเรียแลคติกแต่ละไอโซเลทมา smear เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 cm ลงบนจานอาหาร homofermentative-heterofermentative differential (HHD) agar เททับด้วยอาหารชนิดเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตสีของโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหาร HHD agar ถ้าโคโลนีเป็นสีฟ้าหรือสีเขียว แสดงว่า เชื้อบริสุทธิ์นั้นเป็นพวก homofermentative ส่วนโคโลนีพวก heterofermentative จะมีสีขาว (McDonald *et al.*, 1987)

3. การทดสอบความสามารถในการใช้แป้งเป็นสับสเตรทของเชื้อ

นำเชื้อบริสุทธิ์แต่ละไอโซเลทที่แยกได้มา smear เป็นวงกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร บนจานอาหาร MRS agar ที่มี 2% soluble starch (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน และ JP2 agar บ่มที่อุณหภูมิ 45°C สังเกตดูว่ามีเชื้อไอโซเลทใดบ้างที่สามารถเจริญขึ้นได้ และมีเชื้อไอโซเลทใดบ้างที่เกิดวงใสล้อมรอบในระยะเวลา 48 ชั่วโมง

4. การคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างกรดแลกติกได้สูงสุดโดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC

นำเชื้อบริสุทธิ์ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหารแข็ง MRS ที่มี 2% soluble starch (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและ JP2 จำนวน 21 ไอโซเลท มาหมักในอาหารเหลว modified MRS ที่มี 0.5% CaCO_3 และ MRS ที่มี glucose เป็นสับสเตรทและมี 0.5% CaCO_3 ปริมาตร 5 ml ในหลอดทดลอง flush ด้วยแก๊สไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด เปิดน้ำหมักมาเหวี่ยงเป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°C 3,000 รอบต่อนาที นำส่วนน้ำหมักที่เหวี่ยงแยก เซลล์แล้วย้ายไปใส่ในหลอดทดลองหลอดใหม่ หยด 1 N HCl 2-3 หยด และเติม diethyl ether จำนวน 2-3 ml คนประมาณ 2-3 นาที นำเฉพาะของเหลวในชั้นของ ether ถ่ายใส่หลอดทดลองหลอดใหม่ เติมน้ำกลั่น 0.5 ml นำไปกรองผ่าน membrane filter ขนาด $0.45\ \mu\text{m}$

นำของเหลวที่กรองได้มาตรวจสอบหาปริมาณกรดแลคติกและแอลแลกติกโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) คอลัมน์ชนิด CHIRALPAK MA(+) โดยมี mobile phase เป็น 50 mM perchloric acid ความดัน 86 กก./ซม. อัตราการไหลของ mobile phase 1.0 ml/นาที โดยมี detector คือ เครื่องมือวัดค่าการดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (UV detector) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 30°C องศาเซลเซียส และฉีดตัวอย่างที่กรองแล้ว dilute 10 เท่า ปริมาตร 5 μl เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐาน 0.1% ของกรดแลคติกและแอลแลกติก

5. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการศึกษาพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท LABc040, LABc072, LABc009, LABc038 และ LABb015

5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

นำเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง มาตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีกรัม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ

5.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ลงบนอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 10°C และ 15°C ตรวจผล 24 - 48 ชั่วโมง และอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 45°C , 50°C , 55°C และ 60°C

ผลบวก-สามารถเจริญได้

5.3 การทดสอบ oxidation-fermentation (O-F test)

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมงลงใน Hugh & Leifson O-F medium ที่มี glucose โดยการ stab 2 หลอด หลอดหนึ่งเททับด้วยพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วหนา 2 เซนติเมตร อีกหลอดหนึ่งไม่เททับ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์

ผลบวก-อินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีเหลืองในหลอดที่เททับด้วย พาราฟินเหลว เป็น fermentation ถ้าเกิดในหลอดที่ไม่ได้เททับเป็น oxidation

5.4 ความสามารถในการเฟอร์เมนต์คาร์โบไฮเดรต

เพาะเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 หลอดลงในอาหาร nutrient broth ที่มี น้ำตาลชนิดต่างๆ และมีหลอดดักก๊าซและ phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลบวก-เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ สีอาหารเปลี่ยนจากแดงเป็นสีเหลือง

5.5 การทดสอบการทนเกลือ

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ในอาหารเหลว MRS ที่มี NaCl 0, 5, 6.5, 7, 10 และ 18% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลบวก มีการเจริญของเชื้อ

5.6 การทดสอบความสามารถในการเจริญที่ pH ต่างๆ

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ในอาหารเหลว MRS ที่มี pH 4.4, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 6.7, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 และ 9.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลบวก มีการเจริญของเชื้อ

5.7 การทดสอบหาเอนไซม์ catalase

หยด 3% H_2O_2 บนแผ่นสไลด์ แล้วเช็ดเชื้อที่มีอายุ 18 ชั่วโมง แต่ละลงบน หยดของ 3% H_2O_2 บนแผ่นสไลด์

ผลบวก-เกิดฟองก๊าซ

5.8 การทดสอบการเป็น homofermentative หรือ heterofermentative

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ลงในอาหารวุ้นกลูโคสน้ำมะพร้าว (coconut juice agar deep) ที่มีน้ำตาล glucose 1% โดย stab เททับผิวอาหารด้วยวุ้น 3% ที่ฆ่าเชื้อ แล้ว หนาประมาณ 3 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 7 วัน

ผลบวก-เกิดก๊าซได้วันที่ปิดทับหรือค้นวันขึ้นมาเป็น heterofermentative
ไม่เกิดก๊าซ เป็น homofermentative

5.9 การทดสอบการเกิดปฏิกิริยาใน Litmus milk

ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกออายุ 18 ชั่วโมง เจริญที่อุณหภูมิ 45°C ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 800 μ l ใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียวที่มี litmus milk ปริมาตร 10 ml ผสมให้เข้ากันโดยหมุนหลอดด้วยฝ่ามือ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงและบันทึกผล

ผลบวก อาหารเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีชมพู เกิดการสร้างกรด
อาหารตกตะกอนและจับเป็นก้อน เกิด acid curd

5.10 การทดสอบการสร้างอินโดล

เลี้ยงเชื้อในอาหาร tryptone broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หยด Kovac's reagent ประมาณ 5 หยด
ผลบวก-เกิดสีแดงลอยอยู่บนผิวอาหาร

5.11 การทดสอบการย่อยแป้งในสภาพที่มีน้ำ (Starch Hydrolysis)

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง บนอาหารแป้ง nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ใช้ Gram's iodine ราคบริเวณที่เชื้อเจริญ
ผลบวก เกิดวงใสรอบโคโลนี
ผลลบ เกิดสีน้ำเงินเข้มบริเวณรอบโคโลนี

5.12 การทดสอบการใช้ citrate

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง บนอาหารวุ้นเลี้ยง simmons' citrate agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
ผลบวก มีการเจริญ อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน
ผลลบ ไม่มีการเจริญ สีของอาหารไม่เปลี่ยน

5.13 Voges-Proskauer (VP) test

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ลงในอาหารที่ใช้ทดสอบ VP บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อมา 1 ml ใส่ในหลอดทดสอบที่สะอาด เติม 5% α -naphthol solution 0.6 ml และเติม 40% KOH 0.2 ml เขย่าให้เข้ากัน

ผลบวก สีแดงภายใน 5 นาที

ผลลบ สีเหลือง

5.14 Motility test

ใช้เข็มเย็บและเชื้ออายุ 18 ชั่วโมงแทงลงในอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบการเคลื่อนที่ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลบวก เชื้อเจริญแผ่ออกจากรอยเข็ม

ผลลบ เชื้อเจริญตามรอยเข็ม

5.15 การทดสอบการย่อยเจลาติน

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมงใน gelatine agar บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการย่อยเจลาตินโดยนำไปแช่ในช่องแช่แข็งของตู้เย็น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ผลบวก อาหารเหลวแสดงว่าเชื้อสามารถย่อยเจลาตินได้

5.16 การรีดิวซ์ไนเตรท (Nitrate reduction)

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ในอาหารเหลว nitrate broth บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลบวก เกิดแก๊สในหลอดคักแก๊ส แสดงว่า เกิด denitrification ถ้าไม่เกิดแก๊สในหลอดคักแก๊ส ต้องหยด sulfanilic acid และ α -naphthylamine 3 - 5 หยดลงในอาหารเหลวที่มีเชื้อเจริญ เกิดสีแดง

5.17 การทดสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 15 นาที

เพาะเชื้ออายุ 18 ชั่วโมง ลงบนอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 55°C ใน water bath เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาลวกบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลบวก-สามารถเจริญได้

6. การศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกโดยไอโซเลท LABc040 และ ไอโซเลท LABc072 (ดัดแปลงจาก นภา และคณะ, 2538, และอัจฉรา, 2541)
 - 6.1 เลี้ยงเชื้อไอโซเลท LABc040 และไอโซเลท LABc072 บนอาหารแข็ง MRS ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
 - 6.2 เชื้อจากข้อ 6.1 ลงในอาหารเหลว MRS pH 5.5 ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ปริมาตร 50 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที
 - 6.3 ใช้ปิเปตที่ฆ่าเชื้อแล้วขนาด 10 ml ดูดเชื้อตั้งต้นของแต่ละเชื้อปริมาณ 12.5 ml (5% inoculum) ใส่ในอาหารเหลวปริมาณ 250 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 ml เชื้อละ 2 ข้าง
 - 6.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที วัดอัตราการเจริญและอัตราการผลิตกรดทุก 2 ชั่วโมง โดยเริ่มจากชั่วโมงที่ 4 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดอัตราการเจริญและอัตราการผลิตกรดชั่วโมงที่ 30, 35, 48 และ 56 โดย
 - 6.4.1 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer รุ่น UV-120-01 ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร
 - 6.4.2 เหวี่ยง 5,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำน้ำหมักไปไตเตรทหาปริมาณกรด
 - 6.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อตามวิธีของMiller (ดัดแปลงจากคณินท์, 2534)

นำน้ำหมักที่ผ่านการเหวี่ยงมา dilute 40 เท่า แล้วปิเปตมาปริมาณ 1 ml เติม DNS reagent ปริมาตร 2 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที โดยปิดปากหลอดด้วยลูกแก้ว เติม 40% sodium potassium tartrate ลงไปหลอดละ 1 ml เขย่าให้เข้ากันและทิ้งให้เย็น แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร เทียบกับหลอดควบคุม (blank) โดยใช้ น้ำกลั่น แทนน้ำหมักที่เหวี่ยงได้ และวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานของสารละลาย glucose

7. การชักนำให้เกิดการกลายโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต (UV mutagenesis)

(ดัดแปลงจากวันชัย, 2534 และ Leathers *et al.*, 1995)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกไว้ คือ ไอโซเลท LABc040 อายุ 18 ชั่วโมง ในอาหารเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C และเขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4°C 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นรินสารละลายใส่ส่วนบนทั้ง ถังเซลล์ 2 ครั้งด้วย 10 mM MgSO₄ ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมาทำให้เจือจางด้วย 10 mM MgSO₄ ให้มีค่า OD 0.2-0.7 นำสารละลายเซลล์ที่เจือจางแล้ว ปริมาตร 7 ml ใส่ในจานอาหารที่ปราศจากเชื้อแล้วเปิดฝาจาน นำไปวางบนเครื่องกวนสนามแม่เหล็ก (magnetic stirrer) ให้มีระยะห่างจากแหล่งกำเนิดแสง UV (20 วัตต์ต่อตารางเซนติเมตร) เป็นระยะทาง 30 เซนติเมตร เปิดเครื่องกวนสนามแม่เหล็ก กวนเบาๆ โดยใช้แท่งแม่เหล็กที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเป็นเวลา 0, 10, 20, 30, 60, 90 และ 120 วินาที จากนั้นนำ suspension ของแบคทีเรียที่เลี้ยงผ่านการอาบแสง UV ในแต่ละช่วงเวลามาใช้ aluminum foil หุ้ม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที แล้วนำมาทำให้เจือจางเป็นลำดับขั้น นำไป spread ลงบนจานอาหารแข็ง GYP (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในที่มืด ทำการนับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏหลังการ treat UV ที่เวลาต่างกันเพื่อหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งหมด (total viable count, TVC) และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด จากสูตร

$$\% \text{ survival rate} = \frac{\text{TVC of UV treated cell} \times 100}{\text{TVC of UV untreated cell}}$$

จากนั้น เลือกระยะเวลาที่ทำให้ได้ประมาณ 3% การอยู่รอด ใช้ระยะเวลาดังกล่าวทำการ treat เซลล์ของเชื้อ ไอโซเลท LABc040

8. การศึกษาอัตราการอยู่รอดและการทำให้เกิดการกลายโดยใช้ NTG

8.1 การศึกษาอัตราการอยู่รอด (survival rate) จากการใช้

N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (NTG) (ดัดแปลงจากชาติชาย, 2535)

8.1.1 การเตรียมเซลล์

เลี้ยงไอโซเลท LABc040 5% (v/v) ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ปิดฝาขวดแล้วมาเก็บเซลล์โดยการเหวี่ยงด้วย

ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ปริมาตร 10 ml ล้างเซลล์ด้วย 0.1M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 จำนวน 2 ครั้ง แล้วทำให้มีปริมาตรเท่าเดิม

8.1.2 การกลายพันธุ์ด้วย NTG เพื่อหาอัตราการอยู่รอด

นำ stock solution ของ NTG ความเข้มข้น 6 mg/ml มาผสมกับ cell suspension และสารละลาย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ในอัตราส่วนตามตาราง 3.1 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ NTG เท่ากับ 0, 100, 500, 1000 และ 2000 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ

ตาราง 3.1 ปริมาณสารต่างๆ ในการ treat ด้วย NTG

ความเข้มข้น NTG ($\mu\text{g/ml}$)	Cell suspension (ml)	0.1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 (ml)	Stock solution ของ NTG (ml)
2000	2	0.00	1.00
1000	2	0.50	0.50
500	2	0.75	0.25
100	2	0.95	0.05
0	2	1.00	0.00

จากนั้นนำทั้งห้าหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 20 นาที เมื่อครบ 20 นาที หยุดปฏิกิริยาของ NTG โดยการเติม 0.1M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 ที่ทำให้เป็นปริมาตร 10 ml นำไปเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 5 นาที จากนั้นล้างเซลล์ด้วยบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง และทำให้มีปริมาตรเป็น 2 ml นำเซลล์ที่ผ่านการ treat ด้วย NTG มาทำ dilution spread plate เพื่อหาจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (Total viable cell, TVC) คำนวณ % การอยู่รอดโดย

$$\% \text{ survival rate} = \frac{\text{TVC of NTG treated cell} \times 100}{\text{TVC of NTG untreated cell}}$$

8.2 การใช้ NTG ในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์

เลี้ยงไอโซเลท LABc040 5% (v/v) ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ปิดฝาขวดแล้วมาเก็บเซลล์โดยการเหวี่ยงด้วยความเร็ว 5,000 รอบ

ต่อมาที่ 4°C เป็นเวลา 5 นาที ปริมาตร 10 ml ล้างเซลล์ด้วย 0.1M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 6.5 จำนวน 2 ครั้ง แล้วทำให้มีปริมาตรเท่าเดิม จากนั้นเลือกระยะเวลาที่ทำให้ได้ประมาณ 3% การยู่รอดมาทำการ treat เซลล์ของเชื้อไอโซเลท LABc040

9. การคัดเลือกเซลล์กลายพันธุ์

9.1 ทดสอบความสามารถในการย่อยแป้ง

โดยนำแบคทีเรียแลคติกแต่ละโคโลนีดังกล่าว มาเพาะบนจานอาหารแข็ง JP2 (ภาคผนวก ก) เทียบกับอาหารแข็ง MRS ที่มีอินดิเคเตอร์ โดยใช้โคโลนีกริด (colony grid) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในที่มีด เลือกละแฉกโคโลนีที่เจริญ โดยมีการย่อยแป้ง คือ เกิดวงใสล้อมรอบเมื่อทดสอบโดยการราดสารละลายไอโอดีน เก็บเป็น stock culture

9.2 ทดสอบความสามารถในการสร้างกรดแลคติก

นำ stock culture จากข้อ 9.1 มาเพาะลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ที่บรรจุอาหารเหลว MRS ที่ไม่มีอินดิเคเตอร์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 50 ml บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นปิเปต 5% inoculum ใส่ลงในอาหารเหลว JP2 ปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml บ่มที่อุณหภูมิ 40°C และเขย่าที่ 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน เก็บน้ำหมักโดยนำไปเหวี่ยงที่ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C นำน้ำหมักที่เหวี่ยงได้ ปริมาตร 10 ml มาวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติกในรูปกรดรวมโดยวิธีไตเตรท เปรียบเทียบการผลิตกรดกับแบคทีเรียแลคติกดั้งเดิม (wild type)

10. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติกในรูปกรดรวมโดยไอโซเลท LABc040 และไอโซเลท LABb015

10.1 การศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเชื้อไอโซเลท LABc040 และไอโซเลท LABb015 ในอาหารวุ้นแข็ง MRS agar pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำแต่ละเชื้อจำนวน 1 loop มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS pH 7.0 ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 45°C ด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ใช้กล้าเชื้อ 5% ใส่ลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดแลคติก โดยไอโซเลท LABc040 ใช้อาหารเหลว

MRS pH 7.0 ส่วนไอโซเลท LABb015 ใช้อาหารเหลว modified MRS pH 7.0 ปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28°C, 30°C, 37°C, 40°C, 45°C, 50°C และ 55°C แต่ละไอโซเลททำอุณหภูมิละ 2 ข้ำ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 170 รอบต่อนาที โดยบ่มไอโซเลท LABc040 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 48 ชั่วโมง และ 72 ชั่วโมง ส่วนไอโซเลท LABb015 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกจากด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นน้ำหมักไปไคเตรทหาปริมาณกรดแลกติกในรูปกรดรวม

10.2 การศึกษาค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

เตรียมกล้าเชื้อโดยเฉพาะเลี้ยงไอโซเลท LABc040 และไอโซเลท LABb015 ในอาหารวุ้นเอียง MRS agar pH 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำแต่ละเชื้อจำนวน 1 loop มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS pH 7.0 ปริมาตร 50 ml ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 45°C ด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำ suspension ของแต่ละเชื้อ 2.5 ml (5%) ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS และ modified MRS ตามลำดับ ปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml pH 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 6.7, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 และ 9.5 ตามลำดับ โดยแต่ละไอโซเลททำ pH ละ 2 ข้ำ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40°C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกจากด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นน้ำหมักไปไคเตรทหาปริมาณกรดแลกติกในรูปกรดรวม

10.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตกรดรวม

เตรียมกล้าเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงไอโซเลท LABc040 และไอโซเลท LABb015 เหมือนข้อ 10.2 นำ suspension ของแต่ละเชื้อ 5% ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดแลกติกคือ MRS, JP2, GYP และ Zhang ปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40°C บนเครื่องเขย่าความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมงและ 24 ชั่วโมงตามลำดับ เก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกจากด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นน้ำหมักไปไคเตรทหาปริมาณกรดแลกติกในรูปกรดรวม

10.4 การศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

เตรียมกล้าเชื้อไฮไลท LABc040 และไฮไลท LABb015 เหมือนข้อ 10.2 นำ suspension ของแต่ละเชื้อ 5% ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดแลคติกปริมาณ 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ซึ่งประกอบด้วย peptone 1% (w/v), beef extract 0.8% (w/v), yeast extract 0.4% (w/v), K_2HPO_4 0.2% (w/v), di-Ammonium hydrogen citrate 0.2% (w/v), sodium acetate 0.5% (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02% (w/v), $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.004% (w/v) และ tween 80 0.1% (v/v) pH 5.5 และ 6.7 ตามลำดับ ที่มีแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 8 ชนิด คือ glucose, fructose, lactose, maltose, sucrose, soluble starch, แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวเหนียว ในปริมาณ 2% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ $40^\circ C$ เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลาแล้ว เก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ $4^\circ C$ เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นน้ำหมักไปไตเตรทหาปริมาณกรดแลคติกในรูปกรดรวม

10.5 การศึกษาปริมาณ glucose ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

เตรียมกล้าเชื้อไฮไลท LABc040 และไฮไลท LABb015 เหมือนข้อ 10.2 นำ suspension ของแต่ละเชื้อ 5% ถ่ายลงในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดแลคติกปริมาณ 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ซึ่งประกอบด้วย peptone 1% (w/v), beef extract 0.8% (w/v), yeast extract 0.4% (w/v), K_2HPO_4 0.2% (w/v), di-Ammonium hydrogen citrate 0.2% (w/v), sodium acetate 0.5% (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02% (w/v), $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.004% (w/v) และ tween 80 0.1% (v/v) pH 5.5 และ 6.7 ตามลำดับ ที่มี glucose ในปริมาณต่างๆ กัน คือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ $40^\circ C$ เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ $4^\circ C$ เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นน้ำหมักไปไตเตรทหาปริมาณกรดแลคติกในรูปกรดรวม

10.6 การศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

เตรียมกล้าเชื้อไฮไลท LABc040 และไฮไลท LABb015 เหมือนข้อ 10.2 นำ suspension ของแต่ละเชื้อ 5% ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดแลคติกปริมาณ 50 ml

ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ซึ่งประกอบด้วย glucose 2% (w/v) และ 4% (w/v) ตามลำดับ K_2HPO_4 0.2% (w/v), sodium acetate 0.5% (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02% (w/v), $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.004% (w/v) และ tween 80 0.1% (v/v) pH 5.5 และ 6.7 ตามลำดับ ที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ peptone, beef extract, yeast extract, di-Ammonium hydrogen citrate และ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 2.4% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ $40^\circ C$ เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ $4^\circ C$ เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นน้ำหมักไปไคเตรทหาปริมาณกรดแลคติกในรูปกรดรวม

10.7 การศึกษาปริมาณ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

เตรียมกล้าเชื้อไอโซเลท LABc040 และไอโซเลท LABb015 เหมือนข้อ 10.2 นำ suspension ของแต่ละเชื้อ 5% ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดแลคติกปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml ซึ่งประกอบด้วย glucose 2% (w/v) และ 4% (w/v) ตามลำดับ K_2HPO_4 0.2% (w/v), sodium acetate 0.5% (w/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02% (w/v), $MnSO_4 \cdot H_2O$ 0.004% (w/v) และ tween 80 0.1% (v/v) pH 5.5 และ 6.7 ตามลำดับ ที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ yeast extract ในปริมาณต่างๆ คือ 0, 0.2, 0.4, 1.4, 2.4, 4.4, 6.4, 8.4, 10.4 และ 15.4% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ $40^\circ C$ เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ $4^\circ C$ เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นน้ำหมักไปไคเตรทหาปริมาณกรดแลคติกในรูปกรดรวม

10.8 การศึกษาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

เตรียมกล้าเชื้อไอโซเลท LABc040 และไอโซเลท LABb015 เหมือนข้อ 10.2 นำ suspension ของแต่ละเชื้อ 0, 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5% (v/v) ถ่ายลงในอาหารสำหรับการผลิตกรดแลคติกปริมาตร 50 ml ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 ml คือ อาหารเหลว MRS pH 5.5 และ 6.7 ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ $40^\circ C$ เขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลาแล้ว เก็บตัวอย่างโดยนำมาเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ออกด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ $4^\circ C$ เป็นเวลา 5 นาที เก็บส่วนใสซึ่งเป็นน้ำหมักไปไคเตรทหาปริมาณกรดแลคติกในรูปกรดรวม