

บทที่ 3

การวิจัยและการดำเนินงาน

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างเหนมปลาและเนื้อปลาสด

ตัวอย่างอาหารหมักที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 15 ตัวอย่าง ได้แก่ เหนมปลา 10 ตัวอย่างจากตลาด ก.ม. 8 ตลาดหัวตะเข้ ตลาดสี่มุมเมือง ตลาดมีนบุรี ตลาดบางกะปิ ตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง ตลาดน้ำชัย ตลาดพัฒนาการ ตลาด ก.ม. 2 และตลาดพระโขนง เนื้อปลาสด 5 ตัวอย่างจากตลาดมีนบุรี ตลาดหัวตะเข้ ตลาดก.ม. 8 และตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่าง ได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 และ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ได้จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายที่ใช้ทำเจือจางตัวอย่างและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ de Man Rogosa Sharpe broth/ de Man Rogosa Sharpe Agar/ de Man Rogosa Sharpe Soft Agar (MRS, พีเอช 7.1 ± 0.2 , Difco), Bacteriocin-Screening-Medium Agar (BSM), Tryptic Soy broth/ Tryptic Soy Agar (TSB/TSA, พีเอช 7.1 ± 0.2 , Difco) Tryptic Soy Yeast Extract (TSYE Soft Agar, พีเอช 7.1 ± 0.2) และ Luria-Bertani (LB)

สารละลายที่ใช้ทำเจือจางตัวอย่างและสารเคมี ได้แก่ สารละลายเพปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 สารละลายกรดแลคติก ความเข้มข้นร้อยละ 85 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5 โมลาร์ เกลีนน้ำดี โซเดียมคลอไรด์ และแคลเซียมคาร์บอเนต

สารเคมีสำหรับการสกัดจีโนมดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาถูกโซ่พอลิเมอร์ส ได้แก่ บัฟเฟอร์ PCR บัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0) สารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0) สารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (Tris-EDTA -buffer saturated phenol)

บัฟเฟอร์ TBE (Tris-HCl 0.89 โมลาร์ กรดโบริก (boric acid) 0.89 โมลาร์ และ EDTA 0.02 โมลาร์) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โซเดียมอะซิเตด 3 โมลาร์ สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 99 สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ สารละลายไดออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ไพรเมอร์ FDNA ไพรเมอร์ RDNA เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase อะกาโรส (agarose) เจลสตาร์ (gelstar) และสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye)

สารป้องกันเซลล์ (cryoprotectant) ได้แก่ นมถั่วเหลือง หางนมผง ไข่แดง ซูโครส แลคโตส กลูโคส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยง (บริษัท Harmle, รุ่น Z383K) ตู้บ่มเชื้อ (บริษัท Memmert) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Microplate reader รุ่น iEMS Reader MF, Labsystems) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine, บริษัท Perkin Elmer, รุ่น DNA thermal cycler 480) เครื่องทำแห้งแบบใช้ความเย็น (Freeze-Dry, บริษัท Heto LyoLab, รุ่น 3000)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การวิเคราะห์จำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในหมนมปลาและเนื้อปลาสด

3.2.1.1 การตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกในหมนมปลาและเนื้อปลาสด

การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในหมนมปลาและเนื้อปลาสดด้วยเทคนิค spread plate ทำโดยชั่งหมนมปลาและเนื้อปลาสดตัวอย่างละ 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นใส่ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างหมนมปลาและเนื้อปลาสดจนถึงระดับความเจือจาง $1:10^6$ จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^4 ถึง 10^6 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในอาหารแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 กรัมต่อปริมาตร ระดับความเจือจางละ 3 จาน เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วปลอดปราศจากเชื้อ คว่ำจานแล้วนำไปบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนี 25-250 โคโลนี คำนวณหาจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง (อดิศร เสวตวิวัฒน์, 2542)

3.2.1.2 การแยกแบคทีเรียกรดแลกติก

ทำการแยกเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียกรดแลกติกในข้อ 3.2.1.1 ที่มีวงใส (clear zone) รอบๆโคโลนี สุ่มเลือกจากโคโลนีทั้งหมด 138 โคโลนีโดยใช้เข็มปราศจากเชื้อแตะเชื้อจากโคโลนี ที่เลือกและแทงลงในหลอดอาหารแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 1 กรัมต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป (อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2542)

3.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยแบคทีเรียกรดแลกติกทั้งหมด 138 ไอโซเลต ทำโดยวิธี agar spot test (Fleming และคณะ. 1985) โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกเก็บไว้จากข้อ 3.2.1.2 แต่ละไอโซเลตจำนวน 138 ไอโซเลต ลงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เช็เชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้างต้นมาและบนผิวหน้าอาหาร Bacteriocin Screening Medium (BSM) ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 2 กรัม เนื้อสกัด 2 กรัม ทริปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 4 กรัม tween 80 1 มิลลิลิตร $(\text{NH}_3)_2\text{C}_6\text{H}_6\text{O}_7$ 2 กรัม $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 กรัม $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.05 กรัม $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 8.7 กรัม KH_2PO_4 8 กรัม และผงวุ้น 15 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร (Tichaczek และคณะ. 1992) ที่แบ่งเป็นช่องๆไว้ 8 ช่อง โดยใส่ช่องละ 1 ไอโซเลต ตัวอย่างละ 5 จาน และบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งได้แก่ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ในอาหารเหลว TSB *P. acidilactici* และ *L. bulgaricus* ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อเหล่านี้แต่ละชนิดในปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน de Man Rogosa Sharpe Soft Agar (MRS soft agar) หรือ Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE soft agar) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมเชื้อให้กระจายทั่วอาหาร soft agar ด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) จากนั้นเทเชื้อแต่ละชนิดลงบนจานอาหาร BSM ที่บ่มแล้วข้างต้น โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบ 1 เชื้อต่อ 1 จาน เกลี่ย soft agar ให้ทั่วจาน นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปทำการบ่ม โดยจานเพาะเชื้อที่ใช้เชื้อ *P. acidilactici* และ *L. bulgaricus* บ่มในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* บ่มในสภาวะมีอากาศที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลกติก จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลตที่เกิดโซนใสรอบๆ โคโลนีในอาหารที่มีเชื้อที่ใช้ในการทดสอบชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยเพาะเลี้ยงและเก็บไว้ใช้ในขั้นต่อไป

3.2.3 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

3.2.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จากข้อ 3.2.2 แต่ละไอโซเลตจากอาหารแข็ง MRS 1 ลูบลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้งและล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเพปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยในการล้างแต่ละครั้งจะเปิดสารละลายเพปโตนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลายเพปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตปรับความขุ่นให้เท่ากันโดยใช้ McFarland Standard เบอร์ 3 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7 ถึง 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

3.2.3.2 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเติมสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้จากข้อ 3.2.3.1 แต่ละไอโซเลตปริมาตรร้อยละ 25 ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชด้วยกรดแลคติกจนได้ค่าพีเอชที่ต่างกัน 8 ระดับ ได้แก่ 6.30, 5.30, 4.00, 3.70, 3.35, 3.20, 2.90 และ 2.70 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนบ่มและหลังบ่มด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หาค่าพีเอชต่ำสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้ โดยเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้จนทำให้เกิดความขุ่นที่ค่าพีเอชระดับนี้ (สังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงหลังบ่มมากกว่าก่อนบ่ม)

3.2.3.3 การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.2 ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลาร์ จนได้ค่าพีเอชที่ต่างกัน 8 ระดับ ได้แก่ 6.30, 5.00, 3.70, 3.00, 2.60, 2.20, 2.00 และ 1.90 หาค่าพีเอชต่ำสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตเจริญได้

3.2.3.4 การทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.2 ในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

ร้อยละ 0, 1.50, 3.00, 4.50, 6.00, 7.50, 9.00 และ 10.50 หากค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้

3.2.3.5 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลกติก

ทำการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละไอโซเลต เช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.2 ในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0, 0.75, 1.50, 2.25, 3.00, 3.75, 4.50 และ 5.25 หากค่าความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูงสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้

หลังจากการทดสอบการทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดี ของเชื้อแต่ละไอโซเลต คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถสูงสุดในการทนต่อสารต่างๆเหล่านี้ จำนวน 2 ไอโซเลต

3.2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติก

3.2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลกติก 2 ไอโซเลต ซึ่งได้คัดเลือกจากข้อ 3.2.3 นำมาขย้อมแกรมโดยเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละไอโซเลตลงในหยดน้ำบนสไลด์ ตรึงเชื้อด้วยความร้อน จากนั้นหยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ให้ท่วมเชื้อทิ้งไว้ 1 นาที และล้างสีคริสตัลไวโอเลตด้วยน้ำ จากนั้นหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมเชื้ออีกครั้ง และทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนด้วยน้ำแล้วตามด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 20 วินาที หยดสีซาฟรานีน (safranin) และทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ตรวจสอบรูปร่างและการติดสีของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.4.2 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

ทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 โดยปรับความขุ่นของแบคทีเรียกรดแลกติก 2 ไอโซเลตให้มีความขุ่นเป็น 2 เท่าของ McFarland Standard เบอร์ 4 จากนั้นใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร API 50 CHL medium ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ทำการแบ่ง API 50 CH strips ออกเป็น 5 strips ย่อยคือ strip 0-9, 10-19, 20-29, 30-39, และ 40-49 รวมทั้งหมด 49 หลอด โดยแต่ละหลอดประกอบด้วยสารต่างๆ ดังตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สารที่ใช้ทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลกติกโดยใช้ชุดทดสอบ

API50 CH

Cupule	ชนิดสารที่ใช้ทดสอบ	Cupule	ชนิดสารที่ใช้ทดสอบ
0	Control	25	Esuculin ferric citrate
1	Glycerol	26	Salicin
2	Erythritol	27	D-Celibiose
3	D-Arabinose	28	D-Maltose
4	L-Arabinose	29	D-Lactose
5	D-Ribose	30	D-Melibiose
6	D-Xylose	31	D-Saccharose
7	L-Xylose	32	D-Trehalose
8	D-Adonitol	33	Inulin
9	Methyl- β -D-Xylopyranoside	34	D-Melezitose
10	D-Galactose	35	D-Raffinose
11	D-Glucose	36	Amidon
12	D-Fructose	37	Glycogen
13	D-Mannose	38	Xylitol
14	L-Sorbose	39	Genitiobiose
15	L-Rhamnose	40	D-Turanose
16	Dulcitol	41	D-Lyxose
17	Inositol	42	D-Tagatose
18	D-Mannitol	43	D-Fucose
19	D-Sorbitol	44	L-Fucose
20	Methyl- α -D-Mannopyranoside	45	D-Arabinose
21	Methyl- α -D-Glucopyranoside	46	L-Arabinose
22	N-Acetylglucosamine	47	Potassium Gluconate
23	Amyldalin	48	Potassium 2-Ketogluconate
24	Arbutin	49	Potassium 5-Ketogluconate

จากนั้นเติมสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตที่ได้เตรียมไว้ลงบนชุด API 50 CH strips ที่ได้แบ่งไว้ โดยขณะปล่อยเซลล์จุลินทรีย์ลงในแต่ละหลอดให้เอียง strips เล็กน้อยและแตะปลายปิเปตลงบน cupule ของแต่ละหลอดเพื่อป้องกันการเกิดฟอง จากนั้นทำการเติมเชื้อปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อหลอด เติมจนครบทั้ง 50 หลอดและปิดทับด้วย mineral oil นำ strips ทั้งหมดใส่ลงในภาชนะที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาครอบ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 24 และ 48 ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองแสดงว่าเกิดการหมัก (ให้ผลบวก) ยกเว้นในหลอดที่ 25 ซึ่งเป็นสาร Esuculin ferric citrate ถ้าเกิดการหมัก (ให้ผลบวก) อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำและถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสี (สีม่วง) แสดงว่าไม่เกิดการหมัก (ให้ผลลบ) บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้โดยใช้โปรแกรม API Identification Software (Bio Merieux) จะทราบถึงชนิด (species) ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ทดสอบ

3.2.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

ก) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลกติก

นำแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้จำนวน 2 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลตตากลงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เจริญบนอาหาร LB ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 400 ไมโครลิตร ที่มี Tris-HCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ สารละลาย EDTA ความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ไลโซไซม์ (lysozyme) 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายโซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE 1 เท่า ปริมาตร 420 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสขึ้นบนมาสกัดอีก 2 ครั้ง ด้วยฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE 1 เท่า จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนจากการสกัดครั้งสุดท้าย ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 99 ปริมาตร 440 ไมโครลิตร แฉ่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่มีส่วนใสด้านบนและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทสารละลายทิ้งและตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20

ไมโครลิตร และเติมสารละลาย RNase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จะได้จีโนมิกดีเอ็นเอเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

ข) การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

เตรียมเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยชั่งอะกาโรส 0.64 กรัม เดิมบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ทำให้ละลายในไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุ่น เติมสารละลายเจลสตาร์ (gelstar) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทใส่แม่พิมพ์เจล เมื่อแผ่นเจลแข็งย้ายแผ่นเจลลงอ่าง (gel chamber) เดิมบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดข้างต้น (ก) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมและหยอดลงในหลุมแผ่นเจล ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ค) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอวิธีนี้เป็น การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลองโดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและซ้ำกันหลายๆ รอบเป็นลูกโซ่ โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาณของสารชนิดต่างๆดังนี้

น้ำกลั่น	33.5	ไมโครลิตร
บัฟเฟอร์ PCR 10 เท่า	5.0	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์	3.0	ไมโครลิตร
สารละลายไดออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ความเข้มข้น 10 โมลาร์	1.0	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ FDNA (5'-TCCTACGGAGGCAGCAG-3')	2.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ RDNA (5'-TTGTGCGGGCCCCGTCAAT-3')	2.5	ไมโครลิตร
จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2.4.3 (ก)	2.0	ไมโครลิตร
<i>Taq</i> DNA polymerase	0.5	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดจีโนมิกดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ที่มีสถานะดังแสดงในตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	94	10 นาที
2	94	30 วินาที
	55	30 วินาที 35 รอบ
	72	30 วินาที
3	72	10 นาที

จากนั้นเมื่อครบกำหนดเวลานำหลอด PCR ที่บรรจุดีเอ็นเอไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเช่นเดียวกับข้อ (ข)

ง) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Big dye Terminator Reaction ด้วยเครื่อง ABIPRISM^R 3700 DNA Analyzer นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานในธนาคารยีน โดยใช้โปรแกรม BLAST server ของ National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)

3.2.5 การศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการแช่แข็งแห้ง

3.2.5.1 ผลของสารป้องกันเซลล์ต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกหลังการแช่แข็งแห้ง

ทำการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกจำนวน 2 ไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแต่ละไอโซเลตปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารป้องกันเซลล์ทั้งหมด 8 ชนิดได้แก่ น้ำนมถั่วเหลือง และสารป้องกันเซลล์ชนิดอื่นๆ ความเข้มข้นร้อยละ 9.1 ในน้ำกลั่นได้แก่หางนม ไข่แดง ซูโครส แลคโตส กลูโคส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล ที่มีปริมาณ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเก็บตัวอย่างในแต่ละขวดเพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นโดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar

นำขวดสารละลายที่ผสมกับเชื้อไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และนำเข้าเครื่องแช่แข็งแห้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้ก้ำเชื้อแห้ง ซึ่งหาน้ำหนักของก้ำเชื้อ จากนั้นตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการทำแช่แข็งแห้งในแต่ละตัวอย่างโดยใช้เทคนิค

pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

คัดเลือกสารป้องกันเซลล์ 6 ชนิดที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 2 ไอโซเลตอยู่รอดได้ดีที่สุดหลังการแช่แข็งแห้งของแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 เพื่อนำมาพัฒนาเป็นสูตรผสมของสารป้องกันเซลล์ในขั้นต่อไป

3.2.5.2 ผลของสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติกหลังการแช่แข็งแห้ง

นำสารป้องกันเซลล์ 6 ชนิด ที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 2 ไอโซเลตที่คัดเลือกอยู่รอดได้ดี ภายหลังการทำแช่แข็งแห้งได้แก่ นมถั่วเหลือง หางนม แลคโตส ซูโครส ทรีฮาโลส และซอร์บิทอล มาผสมกันทั้งหมด 9 สูตร โดยมีปริมาณส่วนผสมในสูตรสารป้องกันผสมดังนี้ (ตารางที่ 3.3)

ตารางที่ 3.3 ส่วนผสมของสารป้องกันเซลล์ทั้งหมด 9 สูตร

สูตรอาหารที่	ปริมาณส่วนผสมในสูตรสารป้องกันผสม (กรัมต่อ 100 กรัมของน้ำหนักส่วนผสมทั้งหมด)
1	แลคโตส 0.97 กรัม ซูโครส 0.97 กรัม ทรีฮาโลส 0.97 กรัม และนมถั่วเหลือง 97.10 กรัม
2	แลคโตส 4.35 กรัม ซูโครส 4.35 กรัม ทรีฮาโลส 4.35 กรัม และนมถั่วเหลือง 86.96 กรัม
3	แลคโตส 0.96 กรัม ซูโครส 0.96 กรัม ทรีฮาโลส 0.96 กรัม ซอร์บิทอล 0.96 กรัม และนมถั่วเหลือง 96.15 กรัม
4	หางนมผง 9.65 กรัม แลคโตส 0.88 กรัม ซูโครส 0.88 กรัม ทรีฮาโลส 0.88 กรัม และนมถั่วเหลืองต่อน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:1) 87.72 กรัม
5	หางนมผง 8.73 กรัม แลคโตส 3.97 กรัม ซูโครส 3.97 กรัม ทรีฮาโลส 3.97 กรัม และนมถั่วเหลืองต่อน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:1) 79.40 กรัม
6	หางนมผง 9.57 กรัม แลคโตส 0.87 กรัม ซูโครส 0.87 กรัม ทรีฮาโลส 0.87 กรัม ซอร์บิทอล 0.87 กรัม และนมถั่วเหลืองต่อน้ำกลั่น (อัตราส่วน 1:1) 86.96 กรัม
7	หางนมผง 9.65 กรัม แลคโตส 0.88 กรัม ซูโครส 0.88 กรัม ทรีฮาโลส 0.88 กรัม และน้ำกลั่น 87.72 กรัม
8	หางนมผง 8.73 กรัม แลคโตส 3.97 กรัม ซูโครส 3.97 กรัม ทรีฮาโลส 3.97 กรัม และน้ำกลั่น 79.36 กรัม
9	หางนมผง 9.57 กรัม แลคโตส 0.88 กรัม ซูโครส 0.88 กรัม ทรีฮาโลส 0.88 กรัม ซอร์บิทอล 0.88 กรัม และน้ำกลั่น 86.96 กรัม

เตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 2 ไอโซเลต ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 โดยปรับความขุ่นของเซลล์โดยใช้ McFarland Standard เบอร์ 4 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร จากนั้นปีเปิดสารแขวนลอยเซลล์แต่ละไอโซเลต ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในสารป้องกันเซลล์แต่ละสูตรทั้งหมด 9 สูตรตามตารางที่ 3.3 ที่มี ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันตรวจนับจำนวนเชื้อเริ่มต้นโดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหาร ฐาน MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ใน candle jar จากนั้นนำส่วนผสมของสารป้องกันกับเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลกติกไปแช่แข็ง แข็งและตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแข็งเช่นเดียวกับข้อ 3.2.5.1 บันทึกผลและ คัดเลือกสูตรที่ทำให้การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละไอโซเลตสูงสุด

3.2.6 การศึกษาผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติกและการปรับตัวต่อความดัน ออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดหลังแช่แข็งแข็งและเก็บรักษา

3.2.6.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกที่ไม่ผ่านการปรับตัว

ทำการเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติก 2 ไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 และ ปรับความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 4 จะได้เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัวที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตรเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.6.2 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก

เตรียมแบคทีเรียกรดแลกติก 2 ไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกันกับข้อ 3.2.3.1 และ ปรับความขุ่นด้วย McFarland Standard เบอร์ 4 จากนั้นปีเปิดสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรีย แต่ละไอโซเลตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ที่มีซูโครส ความเข้มข้น 3 โมลาร์ เป็นส่วนประกอบ ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นล้างเซลล์และปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 4 จะได้เซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก

3.2.6.3 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น

ทำการเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 2 ไอโซเลตที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.6.2 จากนั้นปีเปิดสารแขวนลอยของเชื้อแต่ละ ไอโซเลตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสูตรผสมของสารป้องกันเซลล์ที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละไอโซเลตมีการอยู่รอดสูงสุดสูตรละ 9 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันและนำไปทำให้เซลล์ปรับตัวต่อความเย็นโดยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อแรงดันออสโมติกร่วมกับการปรับตัวต่อความเย็นเพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้น โดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS บ่มในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.6.4 การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่ผ่านการปรับตัว ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น

นำสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตที่ไม่ผ่านการปรับตัวจากข้อ 3.2.6.1 สารแขวนลอยเซลล์ที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกจากข้อ 3.2.6.2 แต่ละไอโซเลตปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในสูตรผสมของสารป้องกันเซลล์สูตรที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตมีการอยู่รอดสูงสุดที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ตรวจนับจำนวนเซลล์เริ่มต้นก่อนการแช่แข็งโดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar จากนั้นนำสารแขวนลอยที่ผสมกับเชื้อไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำไปทำให้แห้งด้วยเครื่องแช่แข็งแห้ง เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักแห้งของกล้าเชื้อและตรวจนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตหลังการแช่แข็งแห้งของเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับตัวและเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และเชื้อที่ผ่านการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็น นำกล้าเชื้อไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน ตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในวันที่ 0, 3, 7, 14, 21 และ 28 โดยใช้เทคนิค pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Duncan Multiple Range Test และ Analysis of Variance ด้วยโปรแกรม SPSS Version 12

