บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

เนื้อหมูสด หนังหมู เกลือ กระเทียม

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ได้แก่ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ได้จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ *Lactobacillus plantarum* LS0602 แยกได้จากแหนม และ *Lactobacillus brevis* LT0904 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกอีสาน (Charoenrak และ Nanasombat, 2011)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แก่ de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS, พีเอช 7.2 ± 0.2, Difco) Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE soft Agar, 7.1 ± 0.2), Tryptic Soy Broth/Agar (TSB/TSA พีเอช 7.1 ± 0.2, Difco), Nutrient Agar (NA), PALCAM Listeria Selective Agar (PALCAM พีเอช 7.2 ± 0.2, Difco) ที่เติม selective agents

3.1.4 สารเคมีและชุดทดสอบ

สารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่างได้แก่ สารละลายเปปโทนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต กรดไตรคลอโรแอซิติก

เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เอนไซม์คะตะเลส (catalase, จาก bovine liver, Fluka) เอนไซม์α-chymotrypsin (จาก bovine pancreas, Merck) เอนไซม์ trypsin (จาก porcine pancreas, Fluka) เอนไซม์ pepsin (จาก porcine gastric mucosa, Fluka) เอนไซม์ α-amylase (จาก *Aspergillus oryzae*, Fluka) เอนไซม์ papain (จาก carica papaya, Merck)

ชุดทดสอบที่ใช้ได้แก่ชุด Quick start Bradford (Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารแบคเทอริโอซินตามวิธีการของ Bradford

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เครื่องตีปั่นอาหาร (stomacher masticator, บริษัท IUL instrument ประเทศอังกฤษ) เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (AquaLAB, รุ่น Series 3 TE ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องวัดพีเอช (pH meter, รุ่น 510 บริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์) เครื่องวัดพีเอชสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (รุ่นTesto 205 ประเทศเยอรมนี) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV 1601 บริษัท Shimadzu ประเทศออสเตรเลีย) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (รุ่น SS-325 บริษัท Tommy ประเทศญี่ปุ่น) เครื่องหมุนเหวี่ยง (รุ่น Z383K บริษัท Harmle ประเทศเยอรมนี) ตู้ถ่ายเชื้อ (รุ่น ABS 1200 บริษัท Astec Microflow ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องนับจำนวนโคโลนี (บริษัท Reichert ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate reader/Washer, รุ่น iEM Reader MF บริษัท Labsystems ประเทศสหรัฐอเมริกา) ถุงไดอะไลซิสเบอร์ 6 ซึ่งมี MWCO ขนาด 1000 ดาลตัน (Spectrapor, บริษัท Spectrum ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องแก้วต่างๆได้แก่ บีกเกอร์ หลอดทดลอง กระบอกตวงและอุปกรณ์ที่จำเป็นเช่น ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อใช้สำหรับตีปั่น ลูปเขี่ยเชื้อ จานเพาะเชื้อ ปิเปต ลูกยาง

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดลองนี้ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้ออาหารหมักซึ่งสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ จำนวน 2 ชนิดได้แก่ *Lactobacillus plantarum* LS0602 ซึ่งแยกได้จากแหนม และ *Lactobacillus brevis* LT0904 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกอีสาน (Charoenrak และ Nanasombat, 2011) นำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินตลอดจนศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของแบคเทอริโอซิน และความคงทนของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ รวมทั้งทดลองนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคชนิดที่แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งได้ตามการทดลองในขั้นตอนต่อไปนี้ดังนี้

3.2.1.1 การเตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

วิธีการทดสอบนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Cuozzo และคณะ (2001) ; Schillinger และ Lücke. (1989) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จนส่วนใสมีพีเอชเท่ากับ 6.5 และนำไปกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วเติม

เอนไซม์คะตะเลส (จากbovine liver บริษัท Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.2 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยการใช้สารแบคเทอริโอซิน

การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion (Cuozzo และคณะ. 2001; Schillinger และ Lücke. 1989) โดยเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ ได้แก่ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้ง เพื่อเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบและปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหาร TSYE Soft Agar ซึ่งมี agar ร้อยละ 0.7 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วเทเชื้อแต่ละชนิดลงบนอาหารแข็ง TSYE ซึ่งมี agar ร้อยละ 1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลง ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง แล้วเจาะให้ได้หลุมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำส่วนใสที่เตรียมไว้มาจากข้อ 3.2.1.1 มาทำการเจือจาง โดยทำการเจือจางแบบ 2 เท่า (two-fold serial dilutions) จนได้หลาย ๆ ระดับความเจือจาง ก่อนหยดตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจางลงหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตรหลุมละ 40 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่ออีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งการเจริญ โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดรอบ ๆ หลุม

3.2.1.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ก) การหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ทำการศึกษาเพื่อหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมส่งผลให้มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดซึ่งทำตามวิธีการของ Altuntas และคณะ (2010) โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 37, 39 และ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.1.1) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion ตามวิธีการข้อ 3.2.1.2 โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดและคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซินตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

ข) การหาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ทำการศึกษาเพื่อหาระดับพีเอชที่เหมาะสมส่งผลให้มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดซึ่งทำตามวิธีการของ Altuntas และคณะ (2010) โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มีพีเอช 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับจากจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.1.1) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 3.2.1.2 โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดและคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซินตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

ค) การศึกษาผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ทำการเปรียบเทียบผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งให้กิจกรรมของสาร แบคเทอริโอซินสูงสุดตามวิธีการ Todorov และคณะ (2011) ทำได้ดังนี้ โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 60 มิลลิลิตรที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหารต่าง ๆ กัน จำนวน 31 สูตรได้แก่ สูตรที่1) อาหารเหลว MRS สูตรปกติตามสูตรของ Difco ซึ่งประกอบด้วย Proteose peptone no 3 ปริมาณ 10 กรัม beef extract 10 กรัม yeast extract 5 กรัม glucose 20 กรัม sodium acetate 5 กรัม Tween 80 ปริมาณ 1 กรัม Dipotassium hydrogen phosphate 2 กรัม Ammonium citrate 2 กรัม Magnesium sulfate 0.1 กรัม Manganese sulfate 0.05 กรัม (ชุดควบคุม) สูตรที่2-6) อาหาร MRS ปกติที่เติมฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส มอลโตส และซูโครส จำนวน 20 กรัมแทนน้ำตาลกลูโคสตามลำดับ สูตรที่7-9) อาหาร MRS ปกติที่เติมกลูโคสเพิ่มเป็น 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่10-11) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 ตามลำดับ สูตรที่12-13) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมยีสต์สกัดเพิ่มเป็น 10 และ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่14) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 12.5 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 7.5 กรัมต่อลิตร สูตรที่15) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 20 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 10 กรัมต่อลิตร สูตรที่16) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 10 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 20 กรัมต่อลิตร สูตรที่17-19) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเพิ่มเป็น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่20-23) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 , 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทนไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต สูตรที่24) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตรแทนสูตรปกติที่ไม่เติมวิตามินบี 1

สูตรที่25) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมวิตามินบี 12 ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตรแทนสูตรปกติที่ไม่เติมวิตามินบี 12 สูตรที่26-28) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเพิ่มเป็น 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่29-31) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมแมงกานีสซัลเฟต 2 , 5 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.1.1) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion ตามข้อ 3.2.1.2 โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดและคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซินตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

3.2.1.4 การศึกษาการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ การหาระดับอุณหภูมิ ระดับพีเอช และส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุดและนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งทำการทดลองโดยทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดในอาหารเหลว MRS ที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสมปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและทำการทดลองในขั้นต่อไปจนกระทั่งได้ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3.2.1.1 จากนั้นทำให้สารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป ได้แก่ การนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำส่วนใสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมาทำไดอะไลซิส ตลอดจนนำส่วนใสที่ผ่านการไดอะไลซิสมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกและทำการตรวจหากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยใช้สารที่ทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนได้แก่ 1) ส่วนใสก่อนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 2) สารตัวอย่างที่ได้จากการตกตะกอนส่วนใสหลังนำมาทำไดอะไลซิส 3) สารตัวอย่างที่ได้จากการตกตะกอนส่วนใสผ่านการทำไดอะไลซิสแล้วตกตะกอนอีกครั้งด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก เพื่อหาวิธีการทำให้สารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ที่จะให้กิจกรรมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด ตามวิธีการต่อไปนี้

ก) การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตทำตามวิธีที่ได้ดัดแปลงมาจาก Ogunbanwo และคณะ. (2003) และ Doonan.(2004) โดยทำการแบ่งส่วนใสที่ปราศจากเซลล์(bacteriocin-containing supernatant) ซึ่งผ่านการปรับพีเอชและเติมคะตะเลสแล้วออกเป็น 3 ส่วนดังนี้ ส่วนใสส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปทดสอบตามการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.5.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ตามวิธีการในภาคผนวก ข และส่วนที่ 3 นำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม

ซัลเฟตร้อยละ 60 (ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 36.1 กรัม) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยค่อย ๆ ละลายแอมโมเนียมซัลเฟสทีละน้อยและคนช้า ๆ เพื่อป้องกันการเกิดฟอง (ทิ้งไว้นานหลายนาทีเพื่อให้แน่ใจว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงไปนั้นละลายแล้วก่อนเติมเข้าไปอีก) จากนั้นให้ทิ้งไว้นาน 10 นาทีเพื่อให้แน่ใจว่าเกิดตะกอนของโปรตีนอย่างสมบูรณ์ และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำตะกอนโปรตีนให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอยโดยนำไปละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วแบ่งสารละลายโปรตีนเป็น 3 ส่วนดังนี้สารละลายโปรตีนส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตรให้ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.1.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำไปหาปริมาตรโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ในภาคผนวก ข และส่วนที่ 3 นำไปทำไดอะไลซิสในขั้นตอนต่อไป

ข) การทำไดอะไลซีส (Dialysis)

เมื่อทำการตกตะตอนโปรตีนของส่วนใสโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีการข้างต้นแล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยการใช้วิธีการทำไดอะไลซีส (Doonan. 2004) โดยใช้ถุงไดอะไลซีสเบอร์ 6 ซึ่งมี MWCO ขนาด 1000 ดาลตัน (Spectrapor, บริษัท Spectrum ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตัดถุงไดอะไลซิสตามความยาวที่ต้องการ (สารละลายโปรตีน 4.6 มิลลิลิตรต่อถุงไดอะไลซิส ความยาว 1 เซนติเมตร) โดยให้มีความยาวเพิ่มขึ้นอีกเพื่อให้มีช่องว่าง (head space) เหนือสารลายโปรตีนเล็กน้อย (เพิ่มพื้นที่ว่างอีกประมาณร้อยละ 10 ของปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด) จากนั้นแช่เมมเบรนลงในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อล้างสารกันเสียเช่น กลีเซอรีนหรือโซเดียมแอไซด์ (sodium azide) จากนั้นล้างเมมเบรนอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น เปิดที่หนีบถุงไดอะไลซิสซึ่งเป็นตัวล็อคออกแล้วสอดถุงไดอะไลซิสเข้าไปในตัวหนีบที่เปิดไว้ และกดตัวหนีบเข้าด้วยกันยึดถุงไดอะไลซิสไว้โดยให้ปลายถุงยื่นออกมาจากตัวหนีบ 3-5 เซนติเมตร ทดสอบด้วยการเติมน้ำกลั่นลงไปในถุงเพื่อให้มั่นใจว่าตัวหนีบปิดสนิทดีแล้วก่อนเติมสารละลายโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว ปรับความยาวของถุงเพื่อให้มีที่ว่างเหนือสารละลายโปรตีนตามต้องการแล้วใช้ตัวหนีบปิดด้านปลายของถุงไดอะไลซิส นำไปวางลงในบีกเกอร์หรือภาชนะที่มีฝาปิดที่มีฟอสเฟสบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 เท่าของปริมาตรสารละลายโปรตีน (หากตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรต้องใช้บัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร) นำแท่งแม่เหล็กที่สะอาดใส่ลงในบีกเกอร์หรือภาชนะสำหรับทำไดอะไลซิสที่ตั้งบนเครื่องกวน (stirrer) ควรแน่ใจว่าแท่งแม่เหล็กใหญ่พอที่จะกวนสารละลายทั้งหมดได้แต่ไม่ควรจะใหญ่เกินไปจนหมุนอย่างอิสระไม่ได้ ก่อนปรับความเร็วของเครื่องกวนให้สูงพอที่จะไม่ทำให้เกิดการดึงถุงลงไปด้านล่าง โดยทำไดอะไลซิสที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 12 ให้เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทำไดอะไลซิส (บัฟเฟอร์) เป็นสารละลายใหม่ (fresh dialysis solution) ได้ (ในกรณีที่มีการปนเปื้อนมาก อาจทำไดอะไลซิสเป็นเวลานานและเปลี่ยนบัฟเฟอร์บ่อย ๆ ซึ่งควรให้มีการเกิดไดอะไลซิส อย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 2-4 ชั่วโมง

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

หลังจากที่เปลี่ยนบัฟเฟอร์ครั้งสุดท้าย) สารละลายโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์หรือเข้มข้นขึ้นที่ได้จากการทำไดอะไลซิสจะถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนดังนี้สารละลายโปรตีนส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.1.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำไปหาปริมาตรโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ในภาคผนวก ข และส่วนที่ 3 นำไปตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกในขั้นตอนต่อไป

ค) การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Tricloroacetic acid)

การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกตามวิธีของ Ogunbanwo และ คณะ (2003) โดยนำสารละลายโปรตีนที่ผ่านการทำไดอะไลซีสแล้วมาตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (สารละลายโปรตีน 100 มิลลิลิตรต่อไตรคลอโรแอซิติก 5 กรัม) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนมาทำสารแขวนลอยตะกอนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารแขวนลอยโปรตีนออกเป็น 2 ส่วนดังนี้สารละลายโปรตีนส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.1.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาตรโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ในภาคผนวก ข

3.2.1.5 การศึกษาอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารแบคเทอริโอซิน

จากการทดสอบการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ข้างต้นแล้วจึงเลือกขั้นตอนซึ่งให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุดเพื่อนำมาทดสอบความคงตัวต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ดังต่อไปนี้

ก) ความคงตัวของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิ

การทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคเทอริโอซินดัดแปลงจาก Ogunbanwo และคณะ (2003) และ Castro และคณะ (2011) นำสารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 6.5 (เพื่อกำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรด) จากนั้นกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (เพื่อกำจัดจุลินทรีย์) แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37, 63, 72 และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100 และ 121 เป็นเวลา 15 นาที (ทั้งหมด 8 ชุดการทดลอง) ในอ่างน้ำร้อน (water bath) และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.1.2

ข) การทดสอบผลของพีเอชที่มีต่อสารแบคเทอริโอซิน

การทดสอบผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคเทอริโอซินดัดแปลงจาก Ogunbanwo และคณะ (2003) และ Castro และคณะ (2011) นำสารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปรับพีเอชเป็น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ด้วยสารละลายกรด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 27 มิ.ย. 2555
เลขทะเบียน 250198
เลขเรียกหนังสือ

ไฮโดรคลอริก หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.1.2

ค) การทดสอบผลของเอนไซม์ที่มีต่อสารแบคเทอริโอซิน

การทดสอบผลของเอนไซม์ที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคเทอริโอซิน ดัดแปลงจาก Lee และคณะ (1999) นำสารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ trypsin (จาก porcine pancreas บริษัท Fluka), pepsin (จาก porcine gastric mucosa บริษัท Fluka), α-amylase (จาก *Aspergillus oryzae* บริษัท Fluka), lipase (จาก porcine pancreas บริษัท Fluka) และ เอนไซม์ papain (จาก carica papaya บริษัท Merck) ที่ละลายในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเอนไซม์ pepsin ให้ละลายในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล และให้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ยกเว้น trypsin , α-amylase บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.1.2

3.2.2 การทดลองนำสารแบคเทอริโอซินมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว

การทดลองนี้ได้เปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการที่เหมาะสม (2 ระดับความเข้มข้นคือ ร้อยละ 16.7 และ ร้อยละ 23.1) ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหารเหลวโดยทำการทดลองตามวิธีของ Pinto และคณะ (2009) ดังนี้ ทำการเติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้นระดับหนึ่ง (ร้อยละ 16.7 และ ร้อยละ 23.1) ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเจริญอยู่ซึ่งผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบ 4 ชั่วโมง (การเจริญเติบโตของเซลล์อยู่ในระยะ exponential phase ช่วงต้น) นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสุ่มตัวอย่างไปวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในระหว่างการบ่มทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง

3.2.3 การควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อโดยใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

3.2.3.1 การศึกษาผลของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็น

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 2 และร้อยละ 4) ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ในหมูบดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อการอยู่รอดหรือการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคซึ่งทำการทดลองตามวิธีการดังนี้

ก) การเตรียมแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

นำ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 มาผลิตแบคเทอริโอซิน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมได้แก่ อุณหภูมิของการบ่ม ค่าพีเอชและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด (ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2.1.3 ค) จากนั้นนำแบคเทอริโอซินมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการที่เหมาะสมซึ่งจะทำให้กิจกรรมการยับยั้งสูงสุด (ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2.1.4) ก่อนนำมาเติมในหมูบด

ข) การเตรียมเชื้อ *L. monocytogenes*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเหลว TSB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งไปและทำซ้ำเช่นเดิมจนครบ 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมให้เข้ากันและปรับความขุ่นของเซลล์แต่ละสายพันธุ์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 เพื่อให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^9 CFUต่อมิลลิลิตร

ค) การใช้แบคเทอริโอซินในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในหมูบดแช่เย็น

ทำการเตรียมหมูบดซึ่งประกอบด้วยเนื้อหมูบดร้อยละ 80 และมันหมูร้อยละ 20 ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ นำเนื้อหมูและมันหมูมาล้างให้สะอาดก่อนจึงนำมาหั่นและบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (KitchenAid model 5k5SS) ที่อัตราความเร็ว 2 เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นแบ่งส่วนผสมทั้งหมดออกเป็น 6 ส่วนเพื่อนำมาเติมแบคเทอริโอซินทั้งหมด 6 ทรีตเมนต์ ดังนี้ ส่วนที่ 1) หมูชุดควบคุม (ไม่เติมแบคเทอริโอซิน) ส่วนที่ 2) หมูบดที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมแบคเทอริโอซิน) ส่วนที่ 3) หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ร้อยละ 2 ส่วนที่ 4) หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิต

จากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ร้อยละ 4 ส่วนที่ 5) หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ร้อยละ 2 ส่วนที่ 6) หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ร้อยละ 4 หลังจากเติมแบคเทอริโอซินและผสมให้เข้ากันดีแล้วใส่ลงในถุงปลอดเชื้อก่อนเติมสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่ได้เตรียมไว้แล้วข้างต้นซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 10^9 CFUต่อมิลลิลิตรลงในหมูบด (ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อหมูบด 25 กรัม) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^5 CFUต่อกรัม นำเนื้อหมูบดทั้งหมดไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 7 และ 10 วันของการเก็บรักษา เพื่อนำมาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมด และทำการวัดค่าพีเอช

ง) การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดทำตามวิธีการของ Maturin และ Peeler. 2001 และจำนวน *L. monocytogenes* ทั้งหมดทำตามวิธีการของ Hitchins และ Jinneman. 2011 โดยนำตัวอย่างหมูบด จำนวน 25 กรัม ใส่ถุงตีปั่นที่ปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลายเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นอาหารเป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางให้ได้ระดับที่เหมาะสม ในการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดให้ทำการเจือจางถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-5} และจำนวน *L. monocytogenes* ทั้งหมด ทำการเจือจางถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-4} โดยใช้เทคนิค spread plate ซึ่งปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 3 ระดับสุดท้าย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรในแต่ละระดับความเจือจางลงบนอาหารแข็ง PCA สำหรับการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และอาหาร selective media (PALCAM ที่เติม antimicrobic supplement) สำหรับเชื้อ *L. monocytogenes* แล้วใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับอาหารแข็ง PCA ส่วนจานอาหาร selective media นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ *L. monocytogenes* ทั้งหมด (CFU ต่อกรัมตัวอย่างของหมูบด)

จ) การวัดค่าพีเอช

การวัดหาค่าพีเอชของเนื้อหมูบดโดยใช้เครื่องวัดพีเอชในอาหาร (Testo 205)

ฉ) การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี analysis variance (ANOVA) และ Duncan 's multiple range test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0