บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์ที่สำคัญและเคมีภัณฑ์

2.1.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Refrigirated centrifuge) รุ่น J2-21 ของบริษัท Beckman Instrument Inc., USA.

เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น RC-58 ของบริษัท Sorvall Instrument

เครื่องวัดค่าพี-เอช (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 21 ของบริษัท Bausch & Lomb, USA.

เครื่องวัดการดูดกลืนแสงยูวี (UV-Visible Spectrophotometer) รุ่น UV-160 ของบริษัท Shimadzu Corporation, Japan.

เครื่องทำแห้งในภาวะเยือกแข็ง (Freeze Dryer หรือ Lyophilizer) รุ่น FD-1 ของบริษัท Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan.

เครื่องเก็บสารลำดับส่วน (Fraction Collector) รุ่น Frac. 200 ของบริษัทPharmacia Fine Chemical, Japan.

เครื่องผสมสาร (Vortex Mixer) รุ่น G 560E ของบริษัท Scientific Industries, Inc., USA.

หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama Manufacturing Corporation, Tokyo, Japan.

กระดาษกรอง (Millipore Membrane) รุ่น GS ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Millipore Corporation, USA.

2.1.2 เคมีภัณฑ์

แบคโตเปปโตน (Bacto-Peptone) ของบริษัท Difco Laboratories,USA.

แบคโตโปรตีโอส เปปโตน เบอร์ 3 (Bacto-Proteose Peptone No.3) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract) ของบริษัท Difco Laboratories,USA.

สารสกัดจากเนื้อ (Beef Extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.

กลูโคส (Glucose) ของบริษัท E. Merck, Darmstadt, Germany.

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ของบริษัท Fluka Chemical, Switzerland

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E.Merck,Darmstadt, Germany.

กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท E. Merck, Darmstadt, Germany.

ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 (DEAE-Sephadex A-50) ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden.

เซฟาเดกซ์ จี-75 (Sephadex G-75) ของบริษัท Pharmacia Fine Chemicals AB, Sweden.

เคมีภัณฑ์ชนิดอื่นๆเป็นเคมีภัณฑ์ระดับวิเคราะห์ (Analytical Reagent Grade) จากบริษัทต่างๆ ซึ่งนำมาใช้โดยไม่ต้องผ่านการทำให้บริสุทธิ์อีก

2.2 จุลินทรีย์

1. *Lactobacillus* spp. จำนวน 50 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารประเภทผัก ผลไม้ดอง แหนม ไส้กรอกเปรี้ยวจากตลาดสดในกรุงเทพมหานคร และจังหวัดใกล้เคียง

2. *Escherichia coli* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. *Bacillus subtilis* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. *Staphylococcus aureus* จากห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การแยกแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมัก

2.3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

นำตัวอย่างอาหารประเภทผัก ผลไม้ดอง แหนม ไส้กรอกเปรี้ยวจากตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง มาเจือจางในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 (Phosphate Buffer pH 7.0 ภาคผนวกหมายเลข 2.1) โดยเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งแลคโตบาซิไลเอ็มอาร์เอส (Lactobacilli MRS Agar Medium ภาคผนวกหมายเลข 1.1), อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งน้ำมะเขือเทศ (Tomato Juice Agar Medium ภาคผนวกหมายเลข 1.2) และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอพีที (APT Agar Medium ภาคผนวกหมายเลข 1.3) ที่ประกอบด้วยบรอมครีซอล เพอร์เพิล (Brom cresol Purple) 0.004% และแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) 0.8% บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 24-48 ชม.

นำเชื้อที่แยกได้จากข้างต้น โดยคัดเลือกโคโลนีที่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีและเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ มาเขี่ยลงบนอาหารแข็งแลคโตบาซิไลเอ็มอาร์เอสใหม่ บ่มที่อุณหภูมิเดิม จนเกิดโคโลนีเดี่ยวแล้วนำไปทำซ้ำอีกครั้ง

2.3.2 การศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีบางประการ

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาศึกษาลักษณะการเจริญ และ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยยึดแนวจัดจำแนกแบคทีเรียตามหนังสือ Bergeys' Mannual of Systematic Bateriology (Kandler และ Weiss,1986)

2.3.2.1 ลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

สังเกตลักษณะขอบ รูปร่าง และลักษณะการสร้างสารมีสี (Pigment) ของโคโลนีของเชื้อบนอาหารแข็งทั้งรูปร่าง

<u>การติดสีแกรม (Gram Stain)</u>

ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) อายุ 48 ชม. นำไปย้อมแกรม (ภาคผนวกหมายเลข 2.3-2.6) ดูรูปร่าง วัดขนาด และการจัดเรียงตัวของเซลล์

<u>การย้อมสีเอ็นโดสปอร์</u>

ใช้แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) อายุ 48 ชม. นำมาย้อมสีเอ็นโดสปอร์ (ภาคผนวกหมายเลข 2.6-2.7) นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ สปอร์จะติดสีเขียวส่วนเซลล์แบคทีเรียจะติดสีแดง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

การสร้างเอนไซม์คะตะเลส

ใช้แบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) อายุ 48 ชม. มากระจายลงบนสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3% (ภาคผนวกหมายเลข 2.8) ลงบนโคโลนีถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นบวก เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นลบเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ในที่นี้ใช้ *Bacillus subtilis* เป็นตัวเปรียบเทียบในการให้ผลเป็นบวก

การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรท

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว แลคโตบาซิไลเอ็มอาร์เอสพื้นฐาน (ไม่เติมสารสกัดจากเนื้อและน้ำตาลกลูโคส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ) คาร์โบไฮเดรทที่ใช้ทดสอบมี 22 ชนิดได้แก่ อะมิดาลิน, อะราบิโนส, เซลโลไบโอส, เอสคูลิน, ฟรุคโตส, กาแลคโตส, กลูโคส, กลูโคเนท, แลคโตส, มอลโตส, แมนนิทอล, แมนโนส, เมลิไซโตส, เมลิไบโอส, รอฟิโนส, แรมโนส, ไรโบส, ซาลิซิน, ซอร์บิตอล, ซูโคส, ทีฮาโลส และ ไซโลส โดยเติมลงไป 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้บรอมคลีซอลเพอร์เพิล 0.05 % (น้ำหนักต่อน้ำหนัก) เป็นตัวบ่งสี (Indicator) บ่มที่ 37 °ซ บันทึกผลภายใน 7 วัน สังเกตุการสร้างกรดถ้าแบคทีเรียใช้คาร์โบไฮเดรทได้จะสร้างกรดขึ้นมาทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีบรอมครีซอลเพอร์เพิลเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.3 การตกตะกอนก้อนลิ่มในน้ำนมพร่องมันเนย

ถ่ายแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากอาหารเหลวที่มีอายุ 18 ชม. ลงในน้ำนมพร่องมันเนย (Skim Milk ภาคผนวกหมายเลข 1.5) บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ จนกระทั่งนมตกตะกอนก้อนลิ่ม และถ่ายเชื้อลงในนมพร่องมันเนยหลอดใหม่ไปเรื่อยๆ

2.4 <u>การคัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ</u>

นำ *Lactobacillus* sp. มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข1.1) บ่มอุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 36 ชม. นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้มาผ่านแผ่นกรอง (Millipore Membran Filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทำสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus, subtilis*, *Staphylococcus aureus*.

2.4.1 การทดสอบ ล.อ.บ. ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารแข็ง

นำเชื้อทดสอบแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวนิวเตรียนท์ (Nutrient Broth ภาคผนวกหมายเลข 1.4) ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. ปริมาตร 50 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชม. จากนั้นเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 (ภาคผนวกหมายเลข 2.1) หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ 0.1 มล. ใช้สำลีพันปลายไม้ swab บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้ที่เจาะวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มม. เจาะลงบนวุ้นเพาะเชื้อจำนวน 4 หลุม/จานเลี้ยงเชื้อ โดยให้แต่ละหลุมห่างกันพอสมควร หยดส่วนน้ำใสที่ได้จาก *Lactobacillus* sp. แต่ละสายพันธุ์ที่เตรียมไว้ 80 ไมโครลิตร

ลงในแต่ละหลุม บ่มที่ 4 °ซ เป็นเวลา 2 ชม. แล้วจึงนำไปบ่มที่ 37 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition Zone) ที่เกิดขึ้นหาค่าเฉลี่ย การเลี้ยงบนอาหารแข็งนิวเตรียนท์อาจจะมีการเติมบรอมครีซอล เพอร์เพิล 0.004% เป็นตัวบ่งชี้ระดับความเป็นกรดด่าง

นอกจากนี้ยังนำกรดแลคติค กรดไฮโดรครอลิกและกรดอะซิติค ที่ความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิโมลาร์ มาทดสอบบนอาหารแข็งที่กระจายด้วยเชื้อทดสอบ *E. coli*, *B. subtilis* และ *S. aureus* วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง

2.4.2 การทดสอบ ล.อ.บ. ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารเหลว

นำเชื้อทดสอบแต่ละชนิดมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.4) ที่บรรจุในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. ปริมาตร 50 มล. บ่มบนเครื่องเข่ยาที่อุณหภูมิห้อง ด้วยอัตราเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 18 ชม. ทำการเจือจางฟอสเฟตบัฟเฟอร์ค่าความเป็นกรดด่าง 7.0 (ภาคผนวกหมายเลข 2.1) ให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเท่ากับ 1.0 จากนั้นเตรียม 1.0 มล. ของส่วนน้ำใสที่ได้จากการเลี้ยง *Lactobacillus* sp. ที่ปั่นแยกเซลล์ออกมา เติม 2.0 มล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อทดสอบ ทำซ้ำ 3 ครั้งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ° ซ วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรที่ระยะเวลาต่างๆจนถึง 36 ชั่วโมง และหาเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (Doubling Time) ของเซลล์จุลชีพในน้ำเลี้ยง ล.อ.บ. แต่ละสายพันธุ์

2.5 <u>การคัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพ</u>

นำ *Lactobacillus* sp. มาเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 36 ชม. นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที

นำส่วนน้ำใสที่ได้มาปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1.0 นอร์มอล แล้วจึงกรองด้วยแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ทั้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (หัวข้อ 2.4.1) และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (หัวข้อ 2.4.2)

2.6 ติดตามการเจริญของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

โดยการเลี้ยง *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่ทำการคัดเลือกได้จากข้อ 2.3.3 และ 2.5 ในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) ในขวดแก้วทรงกรวยที่มีขนาด 250 มล. ปริมาตร 75 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ ติดตามการเจริญของเชื้อทดสอบที่เวลาต่างๆ โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

2.7 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแลคติคแอสิดแบคทีเรียเพื่อให้สร้างสารต่อต้านจุลชีพ

ทำการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารจุลชีพจากแลคติคแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์ BL และ AE โดยตรวจสอบในอาหารเหลว (ข้อ 2.4.3) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) ภาวะต่างๆ ที่ทำการศึกษาได้แก่

2.7.1 ศึกษาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต่อต้านจุลชีพ

ทำการศึกษาหาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างสารต่อต้านจุลชีพ โดยการแปรค่าระยะเวลาที่ทำการเลี้ยงแลคติคแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์ BL และ AE ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) ตั้งแต่ 12, 24 และ 36 ชม.

2.8 การเลี้ยงแลคติคแอลิดแบคทีเรียที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพ

เตรียมหัวเชื้อ (Starter) ของ *Lactobacillus* sp. โดยเขี่ยจากหลอดอาหารเอียง (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) ลงในอาหารเหลว (ภาคผนวกหมายเลข 1.1) ปริมาตร 50 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 18 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อ 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลวและสภาวะเดิมอีกครั้ง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรได้เท่ากับ 0.6 จากนั้นถ่ายเชื้อ 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) ของหัวเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม ปริมาตร 125 มล. ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 36 ชม. นำมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนน้ำใสมาปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ด้วย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ ผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จึงนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบในอาหารเหลว (ตามวิธีการในข้อ 2.4.2)

2.9 การทำให้สารต่อต้านจุลชีพเข้มข้นขึ้น

ทำการทดสอบความสามารถของสารต่อต้านจุลชีพเมื่อทำให้เข้มข้นขึ้น ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวิธีการตรวจสอบในอาหารเหลว (ตามวิธีการในข้อ 2.4.2)

2.9.1 การทำไดอะไลซิส (Dialysis)

นำส่วนน้ำใสจากการเลี้ยง *Lactobacillus* sp. ตามวิธีการในข้อ 2.8 ใส่ในถุงไดอะไลซิสที่มีค่า MW cut off 10,000-14,000 แช่ในน้ำตาลไอซิ่ง (Icing Sugar) จนปริมาตรลดลงตามต้องการ นำส่วนน้ำใสภายในถุงไดอะไลซิสผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ และ หาค่าปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) (ภาคผนวกหมายเลข 3)

2.9.2 การทำแห้งในสภาวะเยือกแข็ง (Lyophilization)

นำส่วนน้ำใสจากการเลี้ยง *Lactobacillus* sp. ตามวิธีการในข้อ 2.8 ปริมาตร 25 มล. ใส่ในขวดแก้วทรงกรวยขนาด 250 มล.ที่ชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปทำไลโอฟิไลซ์จนแห้ง หาน้ำหนักแห้งของส่วนน้ำใส นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ และหาค่าปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ,1951) (ภาคผนวกหมายเลข 3)

2.10 การทำสารต่อต้านจุลชีพกึ่งบริสุทธิ์

2.10.1 การแยกเซลล์ *Lactobacillus* sp. ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ

หลังจากการเลี้ยง *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL เพื่อผลิตสารต่อต้านจุลชีพได้ตามต้องการแล้ว จึงนำมาแยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ 15 นาที แยกน้ำใสส่วนบนมาปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6.5 โดย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์ นำไปสกัดต่อในขั้นตอนต่อไป

2.10.2 การแยกสารต่อต้านจุลชีพโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

หลังจากแยกเซลล์ *Lactobacillus* sp. ออกจากน้ำหมักในข้อ 2.10.1 แล้วทำการศึกษาหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของแอมโมเนียมซัลเฟตในการตกตะกอน สารต่อต้านจุลชีพออกจากน้ำหมัก โดยใช้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40, 70 และ 90 % ตามลำดับ และแยกตะกอนสารต่อต้านจุลชีพแต่ละช่วงโดยปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เป็นเวลา 30 นาที ละลายตะกอนใน 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ปริมาตร 20 มล. นำไปไดอะไลส์ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 50 มิลลิโมลาร์ มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 เพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลือ

ออก นำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยการตรวจสอบในอาหารเหลว (ตามวิธีในข้อ 2.4.2) หาปริมาณโปรตีน (Lowry และคณะ, 1951) (ภาคผนวกหมายเลข 3)

2.10.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

ชั่งดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 ประมาณ 1.5 กรัม ในสารละลาย 500 มล. 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 6.5 ต้มให้เดือด 2 ชม. เพื่อให้เม็ดเจลพองเต็มที่ เทส่วนน้ำใสทิ้งพร้อมกับเจลละเอียด ทำเช่นนี้หลายๆ ครั้ง จากนั้นนำเจลบรรจุลงในคอลัมน์หลอดฉีดยาขนาดปริมาตร 20 มล. ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 6.5 ลงในคอลัมน์ข้ามคืนจนเจลอยู่ในภาวะสมดุล มีอัตราการไหล 20 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง ค่อยๆใส่สารละลายของสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตช่วง 40-70 % 1 มล. จากข้อ 2.10.2 ลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับด้วยเม็ดเจลออกให้หมดด้วย 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 6.5 ติดตามโปรตีนใกล้ศูนย์ จากนั้นชะโปรตีนที่จับกับเจลออกด้วย 0-1.0 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์เกรเดียนท์ ใน 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 6.5 เก็บลำดับส่วนละ 3 มล. ติดตามโปรตีนโดยนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตรจากนั้นนำหลอดที่มีโปรตีนในยอด (Peak) ไปผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 µm นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ตามวิธีการในข้อ 2.4.2 โดยใช้ 0.5 มล. ของส่วนน้ำใสที่มีโปรตีนในยอดกับ 2.5 มล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อทดสอบที่ทำการเจือสารให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 2.0 และหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ, 1951 (ภาคผนวกหมายเลข 3)

2.10.4 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

ชั่งเซฟาเด็กซ์ จี-75 ประมาณ 3 กรัม ในสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 6.5 ต้มให้เดือดเป็นเวลา 3 ชม. ปล่อยให้เย็นและนำไปไล่อากาศออกจากรูเจลโดยใช้เครื่องปั๊มพ์ บรรจุเจลที่ได้ลงในคอลัมน์แก้วขนาด 1x30 ซม. ให้ได้เจลสูงประมาณ 25 ซม. ผ่านสารละลาย 50 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 6.5 ลงในคอลัมน์ประมาณ 2-3 เท่าของปริมาณเจลด้วยอัตราการไหล 10 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารละลายของสารต่อต้านจุลชีพที่ได้จากการผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50 1 มล. จากข้อ 2.10.3 หยดลงบนผิวหน้าเจลเบาๆ เก็บลำดับส่วนละ 3 มล. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นนำหลอดที่มีโปรตีนในยอด ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบตามวิธีการและของปริมาณโปรตีนในข้อ 2.4.2 โดยใช้ 0.5 มล. ของส่วนน้ำใสที่ออกมากับโปรตีนในยอด กับ 2.5 มล. ของน้ำเลี้ยงเชื้อทดสอบที่ทำการเจือจางให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 2.0 แล้วหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และคณะ (1951) (ภาคผนวกหมายเลข 3)

2.10.5 การทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น (SDS Gel Electrophoresis) ตามวิธีของ Laemmli (1970)

โดยใช้เซพาเรตติงเจล (Separating Gel) ที่มีเจลความเข้มข้น 12 % (ภาคผนวกหมายเลข 4.2) และใช้สแตกกิงเจล (Stacking Gel) ที่มีเจลความเข้มข้น 3.5 % (ภาคผนวกหมายเลข 4.3) นำโปรตีนมาตรฐาน โปรตีนที่ผ่านขั้นตอนต่างๆ และโปรตีนที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส หยอดลงในช่องใส่ตัวอย่างบนแผ่นเจล ทำอิเลคโตรโฟริซิสที่ 35 มิลลิแอมแปร์ในส่วนของสแตกกิงเจล และ 20 มิลลิแอมแปร์ในส่วนของเซพาเรตติงเจล

สรุปแผนภาพขั้นตอนการทำสารต่อต้านจุลชีพกึ่งบริสุทธิ์

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เลี้ยงเชื้อ BL

37 °ซ 36 ชม.

↓ 10,000 รอบต่อนาที, 20 นาที, 4 °ซ

ส่วนน้ำใส

↓ ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ด้วย 1 N โซเดียมไฮดรอกไซด์

ส่วนน้ำใส

↓ ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตใช้ความเข้มข้น 0-40, 40-70,70-9 % ตามลำดับ, ปั่นเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาที 20 นาที 4 °ซ

ตะกอน

↓ ละลายตะกอนแต่ละส่วนใน 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 6.5, กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 µm.

เก็บส่วนที่ให้ผลในการหน่วงเหนี่ยวเชื้อทดสอบ

↓

ผ่านลงบนคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเด็กซ์ เอ-50

ชะโปรตีนส่วนที่ไม่ถูกจับกับเม็ดเจลออกด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 6.5

ชะโปรตีนส่วนที่จับกับเม็ดเจลออกด้วย 0-1.0 M โซเดียมไฮดรอกไซด์เกรเดียนท์

↓

เก็บส่วนที่ให้ผลในการหน่วงเหนี่ยวเชื้อทดสอบ

↓

ผ่านลงบนคอลัมน์เซฟาเด็กซ์ จี-75

ชะโปรตีนในคอลัมน์ออกด้วย 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเป็นกรดด่าง 6.5

↓

เก็บส่วนที่ให้ผลในการหน่วงเหนี่ยวเชื้อทดสอบ

↓

การทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลโพลีอะคริลาไมด์เจล

2.12 การเตรียมผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต

นำน้ำนมสดเติมน้ำตาล 5 % นมพร่องมันเนย 5 % นำส่วนผสมที่ได้มาปั่นให้เข้ากัน แล้วอุ่นในหม้อน้ำเดือดจนนมมีอุณหภูมิประมาณ 70-80 °ซ ยกลงทิ้งให้นมเย็นประมาณ 42 °ซ เติมหัวเชื้อโยเกิร์ต 3 % จากนั้นเทใส่ภาชนะปิดให้สนิท ตั้งทิ้งไว้จนได้โยเกิร์ตที่มีเนื้อข้นแข็งคล้ายเต้าฮวยสีขาว รสเปรี้ยว พร้อมรับประทานได้ทันที

2.13 การทดสอบด้วยประสาทสัมผัส (Sensory Test)

ทดสอบโยเกิร์ตโดยใช้ผู้ทดสอบที่เคยรับประทานโยเกิร์ตจำนวน 20 คน โยเกิร์ตควบคุมคือโยเกิร์ตที่ผลิตในระดับอุตสาหกรรมจำหน่ายในท้องตลาดทั่วไป เปรียบเทียบกับโยเกิร์ตที่ผลิตจากหัวเชื้อโยเกิร์ตจากเกาหลี และหัวเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์ BL ในห้องปฏิบัติการ โดยเปรียบเทียบระดับความแตกต่างมากน้อยตามลำดับ (การให้คะแนนศึกษาจากภาคผนวก ค.) แบ่งเป็นลักษณะการทดสอบดังนี้

1. สี (Color) ทดสอบโดยใช้สายตาเปรียบเทียบสีของโยเกิร์ตควบคุม และโยเกิร์ตทดสอบแต่ละชนิด ให้คะแนนความแตกต่างมากน้อยตามความรู้สึก

2. กลิ่น (Odor) ทดสอบโดยดมกลิ่นเปรียบเทียบระหว่างโยเกิร์ตควบคุม และโยเกิร์ตทดสอบแต่ละชนิด ให้คะแนนความแตกต่างมากน้อยตามความรู้สึก

3. เนื้อสัมผัส (Texture) ทดสอบโดยใช้นิ้วที่สะอาดบีบโยเกิร์ตควบคุม และโยเกิร์ตทดสอบแต่ละชนิด ให้คะแนนความแตกต่างมากน้อยตามความรู้สึก

4. รสชาติ (Taste) ทดสอบโดยล้างปากให้สะอาดชิมโยเกิร์ตควบคุม โดยให้รสกระจายทั่วปากให้ต่อมรับรสได้สัมผัสโยเกิร์ตอย่างทั่วถึง อาจกลืนหรือคายทิ้งก็ได้ ล้างปากพักสักครู่ชิมโยเกิร์ตทดสอบแต่ละชนิดจบครบ ให้คะแนนความแตกต่างมากน้อยตามความรู้สึก

5. การยอมรับรวม (Acceptability) โดยพิจารณาให้คะแนนโยเกิร์ตที่จำหน่ายอยู่ในท้องตลาดเป็น 10 คะแนนเต็ม จะตัดสินให้คะแนนยอมรับโยเกิร์ตแต่ละชนิดตามความรู้สึก