บทที่ 3

วิธีการทดลองหรือระเบียบวิธีวิจัย

3.1 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและทำให้เชื้อบริสุทธิ์

3.1.1 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ดำเนินการตามวิธีที่กำหนด (ISO15214,1998)

ทำการเก็บตัวอย่างแบบสุ่ม และกระจายพื้นที่ในอำเภอเมือง อำเภอภูเพียง อำเภอท่าวังผา และอำเภอเวียงสา จังหวัดน่าน โดยเก็บตัวอย่างจากไก่มีชีวิตคละพันธุ์ ตัวอย่างมูลสัตว์ ปลาน้ำจืดคละพันธุ์ อาหารหมักดอง และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ (commercial probiotic) จำนวน 30, 25, 15, 9 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ รวม 80 ตัวอย่าง

ตัวอย่างไก่: จำนวน 30 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ไก่พื้นเมืองชนิดต่างๆ 20 ตัว ไก่เนื้อ 6 ตัว และไก่ไข่ 4 ตัว ตัวอย่างที่ได้จากไก่มีชีวิต จำแนกเป็นตัวอย่างกระเพาะพัก (crop) ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) และลำไส้เล็กส่วนปลาย (ileum)

ตัวอย่างมูลสัตว์: จำนวน 25 ตัวอย่าง เก็บตัวอย่างมูลไก่ สุกร โค และเป็ด จำนวน 17, 5, 2 และ 1 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยเก็บมูลสด ใส่ในถุงพลาสติกที่สะอาด รัดปากถุงให้แน่น แช่ในถังน้ำแข็ง ตัวอย่างเหล่านี้ต้องทำการตรวจไม่เกิน 24 ชั่วโมง

ตัวอย่างปลา: จำนวน 15 ตัวอย่าง ประกอบด้วยปลายี่สกเทศ ปลานิล ปลาช่อน ปลากระสูบ ปลาจุด และปลาดุก จำนวน 1, 2, 2, 4, 4 และ 2 ตัว จำแนกเป็นตัวอย่างจากกระเพาะ (stomach) และลำไส้ทั้งหมด (whole intestine)

ตัวอย่างอาหารหมักดอง: จำนวน 9 ตัวอย่างจากตลาดสด ได้แก่ แหนม ปลาส้ม และข้าวหมาก จำนวน 3, 3 และ 3 ตัวอย่าง ตามลำดับ

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ: จำนวน 1 ตัวอย่าง เป็น commercial probiotic จากต่างประเทศ

รวมตัวอย่างที่ทำการแยกเชื้อทั้งหมด 155 ตัวอย่าง ตัวอย่างทั้งหมดได้นำมาบด เจือจาง และแยกเชื้อโดยวิธีที่กำหนด ดังนี้

การเจือจางตัวอย่าง ใช้วิธี ISO 6887-1 (1999) โดยใช้ตัวอย่างประมาณ 1 กรัมใส่ลงในน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ ที่มีปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางเพื่อให้ปริมาณเชื้อในตัวอย่างลดลงตามลำดับ นำตัวอย่างเชื้อที่ได้ระดับความความเจือจางต่างๆ กันปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ แล้วเทอาหารแข็ง De Man Rogosa Sharpe (MRS) ผสม 0.3 %

$CaCO_3$ (MRS-$CaCO_3$) (De Man et al., 1960) ที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส เขย่าให้เชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ (pour plate technique) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-72 ชั่วโมง

3.1.2 **การทำให้เชื้อบริสุทธิ์ ดำเนินการทดสอบตามวิธีของ Tanasupawat และคณะ (1998)**

เมื่อเชื้อเจริญแล้ว คัดเลือกโคโลนีที่เกิดการสร้างโซนใส (clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อแสดงถึงแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรด neutralize แคลเซียมคาร์บอเนต หรือนำตัวอย่างใส่ลงในอาหารเหลว MRS เพื่อ enrich เชื้อ และนำไป streak เพื่อเลือกเก็บโคโลนีที่แตกต่างกัน หลังจากทำให้บริสุทธิ์ นำเชื้อคัดเลือกที่ได้มาตรวจสอบลักษณะรูปร่าง ขนาด และ การจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การย้อมติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์แคตาเลส รวมทั้งถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.2 ทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก

3.2.1 **การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ** (antibiotic susceptibility)

ด้วยวิธี Disc diffusion (NCCLS, 2004) เพื่อคัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะไว้ทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ทำการคัดเลือกเชื้อที่ได้จากข้อ 3.1.2 นำมาปรับความเข้มข้นของสารละลายเซลล์ให้มีความขุ่นประมาณ 10^8cfu/ml. ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ เปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อให้เท่ากับความขุ่นของสารละลายมาตรฐาน McFarland No. 0.5 จากนั้นใช้ cotton swab ที่ปราศจากเชื้อจุ่มลงในสารละลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ปรับความขุ่นแล้ว ป้ายลงบนผิวหน้าของอาหารแข็ง MRS ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ และวาง antibiotic disc ลงบนผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยสังเกตบริเวณใสรอบ antibiotic disc บันทึกผลการทดลอง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้น ขอบเขตการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แบ่งได้ 3 ลักษณะ คือ Resistant (R) หมายความว่า แบคทีเรียมีความทนทานต่อยาต้านจุลชีพ หรือ ยาต้านจุลชีพไม่สามารถทำลายแบคทีเรียได้ Intermediate (I) หมายความว่า แบคทีเรียทนทานต่อยาต้ายจุลชีพได้บางส่วน หรือยาต้านจุลชีพสามารถทำลายแบคทีเรียได้

บางส่วน และ Susceptible (S) หมายความว่า แบคทีเรียมีความไวต่อยาต้านจุลชีพหรือ ยาต้านจุลชีพสามารถที่ทำลายแบคทีเรียได้ดี

โดยยาปฏิชีวนะ (antibiotic disc) ที่ใช้ในการทดลอง มีจำนวนทั้งสิ้น 12 ชนิด จำแนกตามสูตรโครงสร้างเป็น 9 กลุ่ม คือ 1. ยากลุ่ม penicillins (amoxycycline/clavulanic acid และ ampicillin) 2. ยากลุ่ม cepharosporins (aztreonam) 3. ยากลุ่ม polypeptide (bacitracin และ colistin) 4. ยากลุ่ม lincosamides (clindamycin) 5. ยากลุ่ม tetracycline (doxycycline และ tetracycline) 6. ยากลุ่ม macrolides (erythromycin) 7. ยากลุ่ม quinolones (nalidixic acid) 8. ยากลุ่ม aminoglycosides (streptomycin) และ 9. ยาต้านจุลชีพอื่นๆ (vancomycin)

เชื้อควบคุมมาตรฐาน

ใช้แบคทีเรียควบคุมจาก American Type Culture Collection (ATCC) แบคทีเรียสายพันธุ์อ้างอิงนี้จะมีขอบเขตการยับยั้งที่ได้ระบุไว้เป็นมาตรฐานแล้ว แบคทีเรียควบคุมที่ใช้คือ

- *Escherichia coli (E. coli)* ATCC 25922
- *Staphylococcus aureus (S. aureus)* ATCC 25923
- *Pseudomonas aeruginosa (Ps. aeruginosa)* ATCC 27853

3.2.2 **การทนกรด** (Acid tolerance) **ดัดแปลงจากวิธีการของ** Erkkila **และ** Petaja (2000); Hyronimus **และคณะ** (2000)

นำเชื้อที่ได้ทดสอบในข้อ 3.2.1 คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะนำมาทดสอบขั้นต่อไป โดยนำเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงในอาหารเหลว MRS 10 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 5 มิลลิลิตรของอาหารเหลว MRS (pH 2.5) นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0 และ 3 ของการบ่ม นำไปนับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี pour plate technique ด้วยอาหารแข็ง MRS เขย่าให้เชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อกระจายทั่ว แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-72 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาคำนวณหาอัตราการอยู่รอด (survival rate) ของเชื้อทดสอบ (Hyronimus et al., 2000) โดยแทนค่าในสูตร

$$\text{อัตราการอยู่รอด (\%)} = \frac{\log N}{\log No} \times 100$$

เมื่อ log N คือ อัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบชั่วโมงที่ 3

เมื่อ log No คือ อัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบเริ่มต้น

3.2.3 **การทนน้ำดี** (Bile tolerance) **ดำเนินการทดสอบตามวิธีของ** Gilliland (1984)

นำเชื้ออายุ 24 ชั่วโมงจากข้อ 3.2.1 ในอาหารเหลว MRS 20 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 10 มิลลิลิตรของอาหารเหลว MRS ที่ผสม oxgall bile 0.3, 1 และ 4 เปอร์เซนต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างในชั่วโมงที่ 0, 3 และ 24 ชั่วโมงของการบ่ม นำไปหาปริมาณเซลล์ด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร คัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญและเพิ่มค่า OD ได้ใน 3 และ 24 ชั่วโมง เพื่อนำมาทดสอบขั้นต่อไปในข้อ 3.2.4

3.2.4 **การผลิตสารต่อต้านจุลชีพ** (Antimicrobial activity) **ดัดแปลงจากวิธีของ** Fleming **และคณะ** (1985); Spelhaug **และ** Harlander (1989)

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

3.2.4.1 **การทดสอบโดยวิธี** Agar spot test

นำเชื้อที่ผ่านการทดสอบในข้อ 3.2.2 และ 3.2.3 มาตรวจสอบการผลิตสารต่อต้านจุลชีพโดยนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาเพาะบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS (Modified-MRS agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวมาเพาะเชื้อแบบจุด (spot method) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MMRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง TSAYE (TSB ผสมกับ yeast extract 0.6 เปอร์เซ็นต์ และ agar 0.75 เปอร์เซ็นต์) อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีแบคทีเรียทดสอบ (ดังตารางที่ 4) ผสมอยู่ปริมาณ $1x10^6$ cfu/ml. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จากวงใสรอบรอยเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาทดสอบ บันทึกผล

3.2.4.2 **การทดสอบโดยวิธี** Agar well diffusion

นำเชื้อที่ผ่านการทดสอบในข้อ 3.2.2, 3.2.3 และ 3.2.4.1 มาตรวจสอบการผลิตสารต่อต้านจุลชีพโดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ลงใน 10 มิลลิลิตรของอาหารเหลว MRS ที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซนต์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วแยกเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที นำสารละลายใสที่แยกได้แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกไม่ต้องปรับ pH เพื่อศึกษาผลการยับยั้งทั่วไป ส่วนที่สองปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1 N NaOH เพื่อศึกษาการสร้าง bacteriocin จากนั้นเติม catalase ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 500 ยูนิต/มิลลิลิตร ในสารละลายใสทั้งสองส่วนเพื่อกำจัด H_2O_2 ดูดสารละลายส่วนละ 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลุมที่เจาะบนอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสมที่มีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ปริมาณ $1x10^6$ cfu/ml (ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบหลุม

ตารางที่ 4 แบคทีเรียทดสอบ (indicator strain)

ลำดับ	แบคทีเรีย
1.	*Lactobacillus plantarum* NRIC 1067
2.	*Lactobacillus sakei* ATCC 15521
3.	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435
4.	*Leuconostoc mesenteroides* NRIC 1541
5.	*Enterococcus faecium* NRIC 1145
6.	*Enterococcus faecalis* NRIC 1142
7.	*Listeria monocytogenes* DMST 17303
8.	*Listeria innocua* DMST 9011
9.	*Yersinia enterocolitica* ATCC 27799
10.	*Salmonellla* Typhimurium ATCC 13311
11.	*Salmonella* Cholerasuis ATCC 10708
12.	*Escherichia coli* ATCC 25922
13.	*Bacillus cereus* ATCC 11778
14.	*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

3.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกคัดเลือกที่แยกได้มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ (Hammes et al., 1992; Axelsson, 1998)

3.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี (Tanasupawat et al., 1998)

นำเชื้อคัดเลือกที่ได้มาตรวจสอบลักษณะรูปร่าง ขนาด และ การจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การย้อมติดสีแกรม และการเคลื่อนที่ รวมทั้งลักษณะการเจริญของ

โคโลนีบนอาหารแข็ง การสร้างเอนไซม์แคตาเลส การสร้างแก๊สจากกลูโคส การรีดิวซ์ไนเตรท การย่อยอาร์จีนีน การย่อยเอสคูลิน การย่อยเคซีน ปฏิกิริยาใน litmus milk การศึกษาการเจริญที่ pH อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือต่างๆ กัน โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วตรวจสอบผลการเจริญจากความขุ่นของเชื้อ และการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ หลังจากเพาะเชื้อแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ตรวจผลการสร้างกรดโดยหยด mixed indicator แล้วนำมาไตเตรตด้วย NaOH เข้มข้น 0.1 N เพื่อดูปริมาณการสร้างกรด

3.3.2 **การวิเคราะห์ผนังเซลล์** (Cell wall component) **โดยวิธีของ** Komagata **และ** Suzuki (1987)

นำเชื้อที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Glucose Yeast extract Peptone Beef extract (GYPB) บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วแยกเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอน แล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำการย่อย (hydrolyse) ด้วย 6N HCl 1 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นแล้วนำไปหยดบน TLC Plate (Merck No. 5577) และ Developed ด้วย pyridine-methanol-water-6N HCl (10: 80: 26: 4) ปริมาตร/ปริมาตร แล้วนำไปสเปรย์ด้วย 0.2 เปอร์เซนต์ ของสารละลายนินไฮดริน (ninhydrin solution)

3.3.3 **การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติก** (Okada et al., 1978)

นำเชื้อที่คัดเลือกได้มาศึกษา isomer ของกรดแลคติกที่เชื้อผลิตว่าเป็น D-form หรือ L-form โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน แล้วแยกเซลล์โดยการหมุนเหวี่ยงปรับความเย็นที่ความเร็ว 8,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่สกัดได้ทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ D หรือ L-lactate dehydrogenase (LDH) โดยมี Nicotinamide Adenine Dinucleotide (NAD) เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ซึ่งจะถูกรีดิวส์เป็น NADH และสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร มาทำการวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติก ดังนี้

3.3.3.1 **การสกัดกรดแลคติก**

3.3.3.1.1 เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS (ไม่เติมโซเดียมอะซิเทต) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

3.3.3.1.2 นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็นที่ 7,000 รอบต่อนาที นำส่วนน้ำส่วนใสมาปรับ pH ให้เท่ากับ 2.0 และเติมผงแอคติเวเทตคาร์บอน ลงไปให้มากพอเพื่อกำจัดเอ็นเอดี (NAD)

3.3.3.1.3 นำส่วนผสมที่ได้จากข้อ 3.3.3.1.2 ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วกรองผงแอคติเวเทตคาร์บอนออก

3.3.3.1.4 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 3.3.3.1.3 ไปทำให้แห้งโดยวิธีไลโอฟิลไลส์ แล้วหยด 1 นอร์มอล ของกรดไฮโดรคลอริค 1 หยด และเติมไดเอทิลอีเทอร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ปั่นผสมและเก็บไว้ค้างคืน

3.3.3.1.5 นำชั้นของไดเอทิลอีเทอร์ใส่ลงในหลอดทดลอง และระเหยไดเอทิลอีเทอร์ โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

3.3.3.1.6 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง สารละลายนี้คือ สารละลายกรดแลคติก

3.3.3.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมแลคเทต

3.3.3.2.1 ไทเทรต 1 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดแลคติก (จากข้อ 3.3.3.1.6) ด้วย 0.01 N ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีน เป็นตัวบ่งชี้ คำนวณปริมาณกรดแลคติก

3.3.3.2.2 เจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโซเดียมแลคเทต ที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ดี-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (D-lactate dehydrogenase, D-LDH) และเอนไซม์แอล-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (L-lactate dehydrogenase, L-LDH)

3.3.3.2.3 เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมแลคเทต (DL-lactate) เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น

3.3.3.3 ปฏิกิริยาเอนไซม์

3.3.3.3.1 นำสารตั้งต้น (สารละลายมาตรฐานโซเดียมแลคเทต) คือ สารละลายโซเดียมแลคเทต แบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 3 มิลลิลิตร รวม 3 หลอด

หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเอ็นเอดี (ภาคผนวก ก. หมายเลข 8) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เพื่อเป็นหลอดควบคุม

หลอดที่ 2 เติมทริสบัฟเฟอร์ pH 8.1 (ภาคผนวก ก. หมายเลข 7) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เอ็นเอดีปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ดี-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (100 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

หลอดที่ 3 เติมทริสบัฟเฟอร์ pH 7.5 (ภาคผนวก ก. หมายเลข 7) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร เอ็นเอดีปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์เอนไซม์แอล-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (100 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

3.3.3.3.2 ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงของเอ็นดีเอชที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

3.3.3.3.3 หาค่าอัตราส่วน D/L ของกรดแลคติก โดยคำนวณจากค่าปฏิกิริยาของกรดแลคติกกับเอนไซม์ดี-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และค่าปฏิกิริยาของกรดแลคติกกับเอนไซม์แอล-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส อัตราส่วนระหว่าง D/L ของกรดแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเรียกว่า S_R (sample ratio) และอัตราส่วนระหว่าง D/L ของกรดแลคติกมาตรฐาน เรียกว่า B_R (basic ratio) นำค่าต่างๆ ที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์ มาแทนค่าในสูตร

$$[E] = 1 - S_R/B_R$$

การตัดสินว่ากรดแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเป็นไอโซเมอร์ชนิดไหน ทำตามข้อตกลงดังนี้ (Kozaki, 1992)

+1.00	≥ [E] ≥	+0.92	: L	L	
+0.92	≥ [E] ≥	+0.54	: L + DL		
+0.54	> [E] ≥	+0.05	: DL + L	DL	
+0.05	> [E] ≥	+0.92	: DL		
-0.15	≥ [E] >	+0.92	: DL + D		
-1.00	≥ [E] >	+0.92	: D + DL	D	
-16.00	≥ [E]		: D		

3.3.4 **การแยกและการทำให้ DNA บริสุทธิ์** (Marmur, 1961; Tomaoka, 1994)

3.3.4.1 เพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่เติมไกลซีน (glycine) ปริมาตร 800 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน

3.3.4.2 เก็บเซลล์โดยการแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง ปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) ที่ 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายซาลีนอีดีทีเอ pH 8.0

3.3.4.3 ทำให้เซลล์แตกด้วยเอนไซม์ไลโซซายม์ (lysozyme) 10 มิลลิกรัม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่า 30 นาที จนกว่าสารละลายจะมีลักษณะหนืดข้น

3.3.4.4 เติม 1 มิลลิลิตร ของทริสเอสดีเอส และ 10 มิลลิลิตร ของทริสบัฟเฟอร์ pH 9.0 เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.4.5 เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที นำไปแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.3.4.6 สารละลายจะแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างคือ สารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม ส่วนชั้นบนคือสารละลาย DNA ดูดสารละลายส่วนบนลงหลอดทดลองใหม่ เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม 5-10 มิลลิลิตร ลงไปซ้ำอีกครั้ง เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.3.4.7 ดูดสารละลาย DNA ส่วนบน มาตกตะกอน DNA ด้วยเอธานอล (แช่เย็น) 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และพันสาย DNA ที่ตกตะกอนด้วยแท่งแก้ว

3.3.4.8 ล้างสาย DNA ด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซนต์ และ 95 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ปล่อยให้สาย DNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.3.4.9 ละลาย DNA ด้วยสารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต (0.1xSSC) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3.3.4.10 ทำ DNA ให้บริสุทธิ์จากอาร์เอนเอ (RNA) ด้วยเอนไซม์อาร์เอนเอส ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.3.4.11 เติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต (10xSSC) และ 5 มิลลิลิตร ของสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น ที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.3.4.12 นำสารละลาย DNA ชั้นบนมาตกตะกอนด้วยเอธานอล (แช่เย็น) 95 เปอร์เซนต์ และพันสาย DNA ที่ตกตะกอนด้วยแท่งแก้ว

3.3.4.13 ล้างสาย DNA ด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซนต์ และ 95 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ปล่อยให้สาย DNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลาย DNA ด้วยสารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต (0.1xSSC) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร

3.3.4.14 นำสารละลาย DNA ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณของ DNA หาก DNA ยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำซ้ำ (ข้อ 3.3.4.10 - 3.3.4.13)

3.3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rDNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Felsenstein, 1985; Saitou and Nei, 1987; Kumar et al., 2001)

นำ DNA ที่แยกได้ มาเพิ่มปริมาณ DNA ในช่วง 16S rDNA โดยใช้ Universal primer ทำปฏิกิริยาในเครื่อง DNA Thermal cycler (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems) 16S rDNA ที่เพิ่มปริมาณได้จะถูกทำให้บริสุทธิ์และวิเคราะห์ลำดับเบสโดยใช้ ABI PRISM BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystem) ที่ห้องปฏิบัติการ ดีเอ็นเอเทคโนโลยี ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม และทำการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ (Phylogenetic analysis) จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดย alignment ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับ selected sequences ที่ได้มาจากฐานข้อมูล Genbank / EMBL / DDBJ โดยใช้ alignment software (ในกรณีนี้ใช้ CLUSTAL W program package) จำลองข้อมูลเป็น multi-data set และสร้าง phylogenetic trees ใน MEGA 3 software program version 3.1 และวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้

3.4 เปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างกับผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ

โดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ในการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ การทนกรด การทนน้ำดี การผลิตสารต่อต้านจุลชีพ ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างกับผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ มาเปรียบเทียบกัน

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา เช่น ความถี่ของการกระจายตัว ค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานมาใช้ในการคำนวณตัวแปร