บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. จุลินทรีย์และวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่ใช้ในการศึกษา

1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตแบคเทอริโอซิน

Lactobacillus casei ssp. *rhamnosus* SN.11 ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักประเภทส้มฟัก (ศิรินาถ หนูเอก, 2540)

1.2 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ได้แก่ *Staphylococcus aureus Escherichia coli Listeria monocytogenes* และ *Streptococcus lactis* จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ผลิตผลเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

1.3 การเก็บรักษาเชื้อ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ใช้ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ $10^8 – 10^9$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติม 70% กลีเซอรอลลงไปผสมให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอย นำไปเก็บในตู้เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหาร De Man Rogusa Sharpe (MRS) (บริษัท Difco) และ Medium I สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 (ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543) ประกอบด้วย

Sucrose	10	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Distilled water	500	มิลลิลิตร
น้ำนึ่งปลาทูน่า	500	มิลลิลิตร

2.2 อาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) (บริษัท Difco) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus*

2.3 อาหาร Nutrient Agar (NA) (บริษัท Difco) สำหรับเทรองพื้นจานเพาะเชื้อในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน โดยวิธี Agar well diffusion (ดัดแปลงจากวิธีของ Parente และ Hill, 1992)

3. วัสดุเศษเหลือ

3.1 น้ำนึ่งปลาทูน่าจากบริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

3.2 น้ำมะพร้าว จากตลาดสด อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

อุปกรณ์

1. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi, Ltd
2. เครื่องเขย่า รุ่น GFL 3005 บริษัท Gesellschaft fur Labortechnik mbH
3. เครื่องหมุนเหวี่ยง รุ่น 5145C บริษัท Eppendorf, Ltd
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ รุ่น himac SCR 20B บริษัท Hitachi Koki Co., Ltd
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น Cyber Scan pH 2500 บริษัท Eutech Instruments,Ltd
6. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memmert GmbH CO.KG
7. ตู้อบอากาศร้อน (hot air oven) รุ่น 350 บริษัท Memmert GmbH CO.KG
8. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet) รุ่น Safe/Maxi Safe 2010 บริษัท Scientific Promotion Co., Ltd
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ รุ่น SS-325 บริษัท Tommy, Ltd
10. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง รุ่น BP 2100 S บริษัท S.V. Medico CO., Ltd
11. เครื่อง Shaking incubator รุ่น VS-8480 SR-L บริษัท S.V. Medico CO., Ltd
12. เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์
13. ตู้เก็บเชื้ออุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

14. เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท Lab-line Instruments

15. เครื่องระเหยแบบสูญญากาศ (Evaporator)

16. เครื่องเก็บตัวอย่างอัตโนมัติ (Fraction collector)

17. คอลัมน์สำหรับทำบริสุทธิ์สาร ได้แก่

17.1 Sephadex G-50 column ขนาด 1.5 X 20 cm.

17.2 Hitrap CM FF column ขนาด 1 X 5 cm.

17.3 Lichrosorb RP-18 column

17.4 Resource RPC column

18. Peristaltic pump

19. เครื่อง High Performance Liquid Chromatography รุ่น Agilent 1100

20. เครื่อง Fast Protein Liquid Chromatography รุ่น FPLC system บริษัท Pharmacia biotech

21. เครื่อง Protein sequencer รุ่น Procise 492 HT บริษัท Appiled Biosystems

22. เครื่อง Liquid chromatography – Mass spectrometer LCT

วิธีการทดลอง

1. วิเคราะห์องค์ประกอบเริ่มต้นของน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่า

โดยทำการวิเคราะห์

1.1 ค่าพีเอช วัดค่าพีเอชของสารละลายโดยใช้เครื่องวัดพีเอช

1.2 ปริมาณโปรตีนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของน้ำนึ่งปลาทูน่าตามวิธี Kjeldahl method (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 2000)

1.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำมะพร้าวโดยใช้วิธี Lane eynon and volumetric method (ดัดแปลงจาก A.O.A.C., 2000)

1.4 ปริมาณเกลือในน้ำนึ่งปลาทูน่า (A.O.A.C., 2000)

2. ศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยใช้น้ำตาลในน้ำมะพร้าวและโปรตีนในน้ำนึ่งปลาทูน่าเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11

2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

ถ่ายเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN.11 จากหลอดเก็บเชื้อลงในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารเหลวแต่ละชนิดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีพีเอช 6.5 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

2.2 การเตรียมวัตถุดิบ

2.2.1 การเตรียมน้ำนึ่งปลาทูน่า

นำน้ำนึ่งปลาทูน่ามากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกรองแยกตะกอนขนาดใหญ่ออก ให้ความร้อนน้ำนึ่งปลาทูน่าที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีเพื่อให้ไขมันลอยขึ้นมาบนผิวหน้าแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน ทำการตักไขมันที่ผิวหน้าทิ้งไป ปรับพีเอชของน้ำนึ่งปลาทูน่าให้เท่ากับ 6.5 หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนโปรตีน

โดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองแยกตะกอนออก บรรจุขวด เก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก ชุตินุช สุจริต, 2541 ; ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543)

2.2.2 การเตรียมน้ำมะพร้าว

นำน้ำมะพร้าวมากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกตะกอนขนาดใหญ่ออก ปรับพีเอชของน้ำมะพร้าวให้เท่ากับ 6.5 และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที บรรจุขวด และเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส

2.3 การเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11

ทำการศึกษาโดยการถ่ายหัวเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 ที่เตรียมจากข้อ 2 ปริมาตรร้อยละ 5 ลงในอาหารทั้ง 9 สูตร ดังนี้ คือ MRS Medium I (M I) และสูตรอาหารดัดแปลงจากสูตรอาหาร M I ทั้ง 7 สูตร ได้แก่ Coco 1, Coco 2, Coco 3, Coco 4, Tuna 2, Tuna 3 และ Tuna 4 ที่มีการใช้น้ำมะพร้าวทดแทนน้ำตาลและใช้โปรตีนในน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน โดยมีสัดส่วนของน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวเพิ่มขึ้นและลดลง ดังแสดงในตารางที่ 5

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำเร็จ MRS ควบคู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ใช้ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างวัดการเจริญของเชื้อที่ค่าดูดกลืนแสง (OD) 660 นาโนเมตร ค่าพีเอช และ กิจกรรมการยับยั้งที่เวลา 0 6 12 18 24 36 และ 48 ชั่วโมง

ทำการปรับพีเอชของน้ำหมักให้อยู่ที่ระดับ 6.5 ก่อนการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ทุกชุดการทดลองทำการทดลอง 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ และคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินในสูตรอาหารที่ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด

ตารางที่ 4 สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 ทั้ง 9 สูตร โดยดัดแปลงจากสูตรอาหาร Medium I ให้มีปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวในสัดส่วนที่แตกต่างกัน

Table 4 The 9 different media for cultivated *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 was modified from the formulation of MRS medium and Medium I medium by vary the quanlity of tuna condensate and coconut water in different ratio

The composition in media	**The different media**								
	MRS	M I	Coco 1	Coco 2	Coco 3	Coco 4	Tuna 2	Tuna 3	Tuna 4
Proteose peptone, Beef extract, Yeast extract (%)	25	-	-	-	-	-	-	-	-
N source (from tuna condensate (%))	-	22.70	22.70	15.12	11.35	9.08	27.24	34.05	36.32
C source (from coconut water (%))	20	18.45	18.50	21.33	22.75	23.60	15.10	14.25	13.40
Tween 80 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Ammonium citrate (g)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Sodium acetate (g)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

ตารางที่ 4 (ต่อ)

Table 4 (Continute)

The composition in media	The different media								
	MRS	M I	CW 1	CW 2	CW 3	CW 4	Tuna 2	Tuna 3	Tuna 4
Dipotassium phosphate (g)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Magnesium sulfate (g)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Manganses sulfate (g)	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
Distilled water (ml)	1,000	500	-	-	-	-	-	-	-
Tuna condensate (ml)*	-	500	500	333	250	200	667	750	800
Coconut water (ml)*	-	-	500	667	750	800	333	250	200

* Total volumn of tuna condensate and coconut water that were used for calculate % nitrogen and % carbon in each medium.

2.4 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

ทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี agar well diffusion ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Parente และ Hill (1992) โดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินในส่วนใสของอาหารสูตรต่างๆ ในขั้นตอนการผลิตและในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์และใช้เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 3 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* O157 : H7 สำหรับทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อของแบคเทอริโอซิน โดยมีวิธีการดังนี้

นำน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei ssp. rhamnosus* SN 11 มาปรับพีเอชให้ได้เป็น 6.5 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl นำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้ววัดค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อมิลลิลิตรของส่วนใส ในหน่วยของ Arbitrary Unit (AU/ml) โดยเทอาหาร TSA ที่มีวุ้นร้อยละ 0.75 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ *S. aureus* ประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทับบนอาหารแข็ง NA พักให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในตู้ปลอดเชื้อ แล้วทำการเจาะหลุมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.6 มิลลิเมตร หลังจากนั้นหยดส่วนใสที่ไม่เจือจางและที่ผ่านการเจือจางครั้งละ 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (serial twofold dilution) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สังเกตแต่ละความเจือจางที่ทำให้เกิดวงใสแล้วคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ดังสูตร

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)} = \frac{1000\ \mu l \times A}{B\mu l}$$

A = ค่าเฉลี่ยระหว่างการเจือจางสุดท้ายที่ทำให้เกิดวงใสกับการเจือจางถัดไป

B = ปริมาตรส่วนใสที่หยดลงในหลุม หรือที่หยดบนอาหาร

3. การศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11

3.1 การเตรียมแบคเทอริโอซิน

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีการในข้อที่ 2.1 นำหัวเชื้อที่ได้ร้อยละ 5 ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 4 ลิตร ที่มีพีเอช 6.5 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl (Blom *et. al.,* 2001) นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเอนไซม์โปรตีเอส (Protease enzyme)

3.2 การศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซิน

นำส่วนที่ได้จากการเตรียมแบคเทอริโอซินไปกรองผ่านอัลตร้าฟิวเตชั่นขนาด 100 กิโลดาลตัน เพื่อกำจัดโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า 100 กิโลดาลตันออก นำส่วนที่ผ่านเมมเบรนไปตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว, 2544)

3.3 การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 ระดับ (น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว, 2544) โดยตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 40 ทำการกวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนต่อที่ระดับเกลืออิ่มตัวร้อยละ 80 โดยทำการกวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลาย อะซิเตดบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 ทำการแยกเกลือออกโดยการไดอะไลซิส นำสารละลายแบคเทอริโอซินบรรจุในถุงไดอะไลซิสขนาด 3.5 กิโลดาลตัน ผูกถุงให้แน่นและแช่ในสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 โดยมีสัดส่วนสารละลายในถุง 1 ส่วนต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 50 ส่วน ทิ้งค้าง

คืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยกวนสารละลายบัฟเฟอร์ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนผสม และเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง (Matijasic et. al., 1998) จากนั้นนำสารละลายที่อยู่ในถุงไปทำให้เข้มข้นขึ้น ด้วยสารคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose : CMC)

นำเอาสารละลายที่แยกได้มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's Method และคำนวณปริมาณแบคเทอริโอซินที่แยกได้ โดยกำหนดให้กิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสหลังแยกเซลล์ออกไปเป็นร้อยเปอร์เซนต์

3.4 เจลฟิวเตชั่นโครมาโทกราฟี (Gel-filtration Chromatography)

ทำการปรับสมดุลคอลัมน์ (Sephadex G-50 column ขนาด 1.5 X 20 cm.) ด้วยสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 นำเอาสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้จากข้อ 3.1 ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เติมลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นชะด้วยสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 โดยมีอัตราการไหลของตัวชะ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายแบคเทอริโอซินแต่ละส่วนที่แยกได้ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนอัตโนมัติ (Fraction collector) หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's Method เก็บรวบรวมส่วนที่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินและนำไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้ระบบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ปริมาตรของสารละลายลดลงครึ่งหนึ่ง (ดัดแปลงวิธีของ Muriana and Klaenhammer, 1990)

3.5 Cation-exchange chromatography

ทำการปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์ (Hitrap CM FF ขนาด 1 X 5 cm.) โดยใช้สารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 (start buffer) ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ โดยมีอัตราการไหลของตัวชะ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยสารละลายนำเอาสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นำแบคเทอริโอซินที่ได้จากข้อ 3.2 เติมลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นชะด้วยใช้สารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความ

เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 ที่มีการทำ stepwises gradient ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05 – 0.2 โมลาร์ อัตราการไหลของตัวชะ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที (ดัดแปลงวิธีของ Benoit *et. al.*, 1997)

เก็บสารละลายแบคเทอริโอซินแต่ละส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนสารละลายอัตโนมัติ (fraction collector) หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's Method เก็บรวบรวมส่วนที่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินและนำไปกำจัดเกลือออกโดยวิธีไดอะไลซีสข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้ระบบสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ปริมาตรของสารละลายลดลงครึ่งหนึ่ง

3.6 Reverse-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC)

เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะใช้เป็นตัวชะ 2 ชนิด คือ

- บัฟเฟอร์ A ประกอบด้วย trifluoroacetic acid (TFA) ร้อยละ 1 ในน้ำกลั่น

- บัฟเฟอร์ B ประกอบด้วย TFA ร้อยละ 0.1 ใน acetonitrile ร้อยละ 99.8

ปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์ (Lichrosorb RP18) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ A ร้อยละ 50 นำเอาสารละลายที่เก็บรวบรวมได้จากข้อ 3.3 มาเติมในคอลัมน์ แล้วชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A และบัฟเฟอร์ B ในอัตราส่วนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 7 โดยปรับอัตราการไหลของตัวชะเป็น 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที (ดัดแปลงวิธีของ Benoit *et. al.*, 1997)

เก็บสารละลายแบคเทอริโอซินแต่ละส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนสารละลายอัตโนมัติ (fraction collector) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's Method

ตารางที่ 5 อัตราส่วนของบัฟเฟอร์ A และบัฟเฟอร์ B ที่ใช้ในการชะแบคเทอริโอซินที่เวลาต่างๆ

Table 5 Time table of eluent (buffer A and buffer B) for purify bacteriocin

Time (min)	Buffer A	Buffer B
0 – 2	50	50
2 – 3	20	80
3 – 10	20	80

Buffer A : 0.1% trifluoroacetic acid in water

Buffer B : 0.1% trifluoroacetic acid in 99.8% acetonitrile

4. การศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินโดยการใช้ Amberlite XAD-4 ควบคู่กับการใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี (ดัดแปลงวิธีของ Green *et. al*., 1997)

นำสารละลายแบคเทอริโอซินที่ผ่านการเตรียมตามวิธีการในข้อที่ 2 มากวนผสมกับ Amberlite XAD-4 (Amberlite XAD-4 3 กรัมต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง แล้วนำเอา Amberlite ที่ได้จากการกรองไปบรรจุลงในคอลัมน์ ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์

หลังจากนั้นชะด้วยสารละลายเมทธานอลต่อน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1 : 1 โดยใช้สารละลายปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอลิก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในสารละลายเมทธานอล อัตราส่วน 1 : 9 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ นำเอาสารละลายที่แยกได้ในแต่ละส่วนไประเหยเมทธานอลออกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.5 นำสารละลายที่ได้ไป

ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

นำเอาสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผันกลับ (Reverse phasechromatography) โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวชะ 2 ชนิด คือ

- บัฟเฟอร์ A ประกอบด้วย trifluoroacetic acid (TFA) ร้อยละ 1 ในน้ำกลั่น
- บัฟเฟอร์ B ประกอบด้วย TFA ร้อยละ 0.1 ใน acetonitrile ร้อยละ 99.8

ทำการปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์ (Resource RPC) ด้วยบัฟเฟอร์ A ร้อยละ 50 เติมสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้ลงในคอลัมน์ และเริ่มชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A ร้อยละ 50 (บัฟเฟอร์ B ร้อยละ 50) โดยเพิ่มปริมาณบัฟเฟอร์ ให้เป็นบัฟเฟอร์ B อย่างเดียว ในนาทีที่ 10 ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 6 อัตราส่วนของบัฟเฟอร์ A และบัฟเฟอร์ B ที่ใช้ในการชะแบคเทอริโอซินออกจากคอลัมน์ Resource RPC ที่เวลาต่างๆ

Table 6 Time table of eluent (buffer A and buffer B) for elute bacteriocin from Resource RPC column

Time (min)	Buffer A	Buffer B
0	50	50
10	0	100

Buffer A : 0.1% trifluoroacetic acid in water

Buffer B : 0.1% trifluoroacetic acid in 99.8% acetonitrile

เก็บสารละลายแบคเทอริโอซินแต่ละส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

5. การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์

5.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินโดยวิธี SDS-polyacylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำเอาแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 4 มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี SDS-polyacylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (Rainbow coloured protein molecular weight marker) ซึ่งมีช่วงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน คือ 2.5 ถึง 45 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 7 ชนิด คือ Ovalbumin, Carbonic anhydrase, Trypsin inhibitor, Lysozyme, Aprotinin, Isulin (b) chain และ Isulin (a) chain มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45 30 20.1 14.3 6.5 3.5 และ 2.5 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

แบ่งแผ่นเจลที่ได้เป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซิน โดยนำแผ่นเจลที่ได้แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหารแข็ง NA หลังจากนั้นเททับด้วยอาหารกึ่งแข็ง TSA ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณเชื้อ *S. aureus* 10^5 CFU/ml ลงบนแผ่นเจลที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นซึ่งแสดงถึงผลการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

นำแผ่นเจลส่วนที่สองมาทำการย้อมแถบโปรตีนโดยแช่ในสารละลายสี Coomassie brilliant blue R250 ไว้ข้ามคืน และล้างแผ่นเจลด้วยสารละลายผสม (เมทธานอลร้อยละ 40 และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร) คำนวณหาน้ำหนักโมเลกุลของสารโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน (ภาคผนวก ข)

5.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินโดยวิธี Electrospray mass spectrometry (EMS)

นำตัวอย่างสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้จากข้อ 4 มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Direct mass (Electrospray Positive Ionisation : ESI^+) โดยใช้เครื่อง Liquid chromatography-Mass spectrometer

6. การปรับปรุงเทคนิคที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณผลิตผลของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11

นำสารละลายแบคเทอริโอซินที่ผ่านการเตรียมตามวิธีการในข้อที่ 2 มากวนผสมกับ Amberlite XAD-4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมากรองผ่านกระดาษกรอง แล้วนำไปบรรจุลงในคอลัมน์ ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ และชะด้วยสารละลายต่างๆ ตามวิธีการในข้อที่ 5 จากนั้นนำมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.5 นำสารละลายที่ได้ไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

นำเอาสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตชั่น โดยทำการปรับสมดุลคอลัมน์ (Sephadex G-50 column ขนาด 1.5 X 20 cm.) ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.5 นำเอาสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้จากการดูดซับด้วย Amberlite XAD-4 เติมลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นชะด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.5 โดยมีอัตราการไหลของตัวชะ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายแบคเทอริโอซินแต่ละส่วนที่แยกได้ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนอัตโนมัติ (Fraction collector) หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซินและวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's Method เก็บรวบรวมส่วนที่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินและนำไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้ระบบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ปริมาตรของสารละลายลดลงครึ่งหนึ่ง (ดัดแปลงวิธีของ Muriana and Klaenhammer, 1990)

หลังจากนั้นนำเอาสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผันกลับ (Reverse phasechromatography) ตามวิธีการในข้อที่ 5 โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวชะ 2 ชนิด คือ trifluoroacetic acid (TFA) ร้อยละ 1 ในน้ำกลั่น และ TFA ร้อยละ 0.1 ใน acetonitrile ร้อยละ 99.8

7. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11

นำแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ (ข้อ 4) มาศึกษาคุณสมบัติต่างๆ ดังนี้

7.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคเทอริโอซิน

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus* *Listeria monocytogenes* *Streptococcus lactis* และ *Escherichia coli* O157 : H7 ในอาหารเหลว TSB ให้มีปริมาณเชื้อ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (1.0 มิลลิกรัม เท่ากับ 320 AU/ml) ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

ทำการ pour plate เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละชนิดบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติม แบคเทอริโอซิน (ดัดแปลงวิธีจากนิติเนตร ขำทวี, 2544)

7.2 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซิน

ศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซินโดยดัดแปลงวิธีจาก Pilet *et. al*., 1995 อ้างโดย ศิรินาถ หนูเอก, 2542 โดยนำแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ในปริมาณที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (จากข้อ 7.1) มาผสมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ proteinase K trypsin α-chymotrypsin และ catalase โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำส่วนใสหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนไปทดสอบ

กิจกรรมการยั้บยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด โดยใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ไม่มีสารแบคเทอริโอซิน เป็นชุดควบคุม

7.3 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซิน

ทำการทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิ (ดัดแปลงจาก Mathieu *et al.* , 1993) โดยนำแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ที่ทราบความเข้มข้นจากข้อ 5.1 ละลายในสารละลายฟอตเฟสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.5 แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 นาที และที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นโดยทันที และนำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่เหลืออยู่กับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด

7.4 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซิน

ทำการทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอซินต่อพีเอช (ดัดแปลงจาก Oh *et al.,* 2000) โดยนำแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ที่ทราบความเข้มข้นจากข้อ 5.1 มาปรับพีเอชเป็น 1.0 ถึง 14 ด้วยสารละลาย 6 N NaOH/HCl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นปรับพีเอชให้เป็นกลาง (พีเอช 6.5) แล้วนำส่วนใสที่ได้หลังจากการปรับพีเอชมาทดสอบกิจกรรมการยั้บยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด