บทที่ 2
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ อุปกรณ์

2.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อ

ตัวอย่างสัตว์ทะเลสด (ปลา กุ้ง หอย ปู) จากตลาดสดพลาซ่าในอำเภอหาดใหญ่และจากแพปลาจังหวัดสงขลา

2.2 ตัวอย่างพืชที่นำมาสกัดสารที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

2.2.1 มันแกว (*Pachyrhizus erosus* Linn. Urb.)

2.2.2 มันเทศ (*Ipomoea batatas* Linn. Lamk)

2.2.3 ผักกาดหัว (*Raphanus sativus L. var. longipinnatus*)

2.2.4 แครอท (*Daucus carota* L. subsp. *Sativus* Thell)

2.2.5 แห้ว (*Cyperus esculentus* Linn.)

2.2.6 เผือก (*Colocacia esculenta* (Linn.) Schott)

2.2.7 มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* Linn.)

2.2.8 มันขี้หนู (*Plectranthus rotundifolius*)

2.2.9 หัวบีท (*Beta vulgaris*)

2.3 จุลินทรีย์

2.3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของการยับยั้ง

2.3.1.1 *Salmonella* sp.

2.3.1.2 *Listeria monocytogenes*

2.3.1.3 *Escherichia coli*

2.3.1.4 *Staphylococcus aureus*

แบคทีเรียจากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งทางห้องปฏิบัติการได้รับความอนุเคราะห์จากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์ จังหวัดสงขลา จากการแยกเชื้อจากคนไข้

2.3.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการเสริมการเจริญ

2.3.3.1 *Lactobacillus acidophilus* TISTR 875

2.3.3.2 *Bifidobacteria bifidum* DSM 20456

2.3.3.3 *Lactobacillus plantarum* TISTR 450

Lactobacillus plantarum และ *Lactobacillus acidophilus* ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (MIRCEN) และ *Bifidobacteria bifidum* ได้รับมาจากสถาบัน Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ประเทศเยอรมัน

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	**บริษัทผู้ผลิต / เกรด/ประเทศ**
1. H_2SO_4	Merck/Analytical/Germany
2. HCL	Lab scan/ Analytical/Thailand
3. NaOH	Merck / Analytical/Germany
4. Nutrient Agar (NA)	Labscan / Analytical/ Thailand
5. Nutrient Broth (NB)	Labscan / Analytical/Thailand
6. Mueller Hinton Agar (MHA)	Himedia / Analytical/India
7. Mueller Hinton Broth (MHB)	Himedia / Analytical/India
8. De Man Rogosa Sharpe (MRS)	Himedia / Analytical/India
9. Tween 80	Ajex Finechem/ analytical/Australia
10. Chloramphanical	Sigma / analytical/Germany
11. Nitrogen gas	Com.Grade 98 เปอร์เซ็นต์
12. NaCl	Merck/ analytical/Germany
13. KCl	Ajex Finechem/ analytical/Australia
14. Na_2HPO_4 $2H_2O$	Ajex Finechem/ analytical/Australia
15. NaH_2PO_4	Ajex Finechem/ analytical /Australia
16. $CaCl_2 2H_2O$	Ajex Finechem/ analytical/Australia
17. $MgCl_2$ $6H_2O$	Ajex Finechem/ analytical /Australia
18. Na_2SO_3	Merck/Analytical/Germany
19. Sodium potassium tratrat	Merck/Analytical/Germany
20. 3,5-Dinitrosalicylic acid	Fruka/Germany
21. Phenol	Fisher Scientific/analytical/England

2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชื่อสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	**บริษัทผู้ผลิต / เกรด/ประเทศ**
22. peptone water	Merck/Germany
23. yeast extract	Himedia / Analytical/India
24. K_2HPO_4	Ajex Finechem/ analytical/Australia
25. KH_2PO_4	Ajex Finechem/ analytical/Australia
26. $CaCl_2.6H_2O$	Ajex Finechem/ analytical/Australia
27. $MgSO_4.7H_20$	Ajex Finechem/ analytical/Australia
28. $NaHCO_3$	Ajex Finechem/ analytical /Australia
29. Tween 80	Ajex Finechem/ laboratory/Australia
30. cysteine–HC1	Flucka/Germany
31. Bile salt	Himedia/India
32. Catalase	Sigma/ Germany
33. Resazurin	Sigma/Germany
34. α-amylase	Sigma/Germany
35. D-Glucose	Ajex Finechem/ analytical/Australia
36. Bromocresol purple	Ajex Finechem/ analytical/Australia

2.6 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง

อุปกรณ์	**บริษัทผู้ผลิต/ประเทศ**
2.6.1 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BP2100S	Satorius, USA
2.6.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BP221S	Satorius, USA
2.6.3 เครื่องระเหยสุญญากาศ (Rotary evaporation)	Büchi Rotavapor® R-200/205, Switzerland
2.6.4 เครื่อง GC-FID	HEWLETTE PACKARD รุ่น HP 6850, USA
2.6.5 Haematocytometer	Diamond, Taiwan
2.6.6 Vortex Mixer	Labnet, USA
2.6.7 กล้องจุลทรรศน์	Nikon, US

2.6 อุปกรณ์ที่ใช้สำหรับการทดลอง (ต่อ)

อุปกรณ์	**บริษัทผู้ผลิต/ประเทศ**
2.6.8 Vial ขนาด 20 มิลลิลิตร	-
2.6.9 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ยี่ห้อ Memmert รุ่น BE 500	Schwabach, Germany
2.6.10 ตู้ถ่ายเชื้อ (Biological Safety Cabinet) ยี่ห้อ Hotpack (รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)	Scientific promotion, Philadelphia
2.6.11 ตู้อบแรงดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น SS-325	Tomy, Japan
2.6.12 ถาดบ่มเชื้อ 96 หลุม (Microtiter plat 96 flat bottom WI)	NUNC™, Denmark
2.6.13 Microplate reader รุ่น Powerwave X	Biotek, UK
2.6.14 พีเอชมิเตอร์ (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettier Toledo, Thailand
2.6.15 ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร)	LabMate USA
2.6.17 ไมโครปิเปต (ขนาด 1000ไมโครลิตร)	Gilson, France
2.6.18 Multichanels pipet 20-200 ไมโครลิตร)	Transferpette® -8,
2.6.19 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น WB 14	Memmert, USA

วิธีการทดลอง

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากทางเดินอาหารสัตว์ทะเล

เก็บตัวอย่างสัตว์ทะเลโดยไปซื้อจากตลาดสดพลาซ่า อำเภอหาดใหญ่ และไปที่แพปลา อำเภอเมือง จังหวัดสงขลา โดยตัวอย่างที่เก็บจะนำไปใส่ไว้ในกระติกที่มีน้ำแข็ง ก่อนนำมาแยกแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ การเตรียมเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ (*E. coli*) เขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเชื้อในระยะนี้มาทดสอบการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกเพื่อจะคัดเลือกแบคทีเรียเหล่านั้นไปศึกษาต่อไป โดยเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อให้ได้เชื้อ 10^6-10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร

แยกเครื่องในจากตัวอย่างโดยตัวอย่างที่เป็นหอยจะใช้ทั้งตัวมาบดแยกเชื้อ แต่ในกรณีที่แยกเชื้อจากปลา ปู และกุ้งทำโดยล้างภายนอกให้สะอาดและเช็ดภายนอกปลาด้วยเอทานอล (ร้อยละ 70) เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่ผิวแล้วใช้มีดที่ผ่านการเผาไฟเพื่อทำให้ปลอดเชื้อมาผ่าท้องปลาและนำทางเดินอาหารออกมาตัดให้ละเอียด ชั่งตัวอย่างมา 25 กรัม ผสมกับน้ำทะเลปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่น

ด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 4 นาที นำตัวอย่างที่ได้มาเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}, 10^{-2},10^{-3} และ10^{-4} ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar ที่เตรียมด้วยน้ำทะเล โดยวิธี pour plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วยอาหาร NA soft agar (วุ้น 0.75 เปอร์เซ็นต์) ที่มีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*E. coli*) ประมาณ 10^{5}-10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเขี่ยเชื้อที่เกิดวงใสรอบโคโลนีไปทำให้บริสุทธิ์โดยนำไป Steak plate บนอาหาร MRS agar นำเชื้อที่ได้ไปดูรูปร่าง การจัดเรียงตัว ย้อมสีแกรม ซึ่งแบคทีเรียแลกติกจะติดสีแกรมบวก และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยแบคทีเรียแลกติกจะไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Axelsson,1993) และเก็บในกลีเซอรอล 35 เปอร์เซ็นต์ ที่ -80 องศาเซลเซียส

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

2.2.1 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 มาทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีโดย ถ่ายเชื้อที่คัดเลือกได้ลงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดียวกัน นำเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร มา pour plate ด้วยอาหาร MRS Agar ที่เติมเกลือน้ำดี (Bile salt powder) ความเข้มข้น 2000, 3000 และ 4000 พีพีเอ็ม และชุดควบคุมไม่เติมเกลือน้ำดี บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ถ้ามีเชื้อขึ้นแสดงว่าสามารถทนต่อเกลือน้ำดี (ดัดแปลงจาก Arihara *et al*.,1998; Pennacchia *et al*., 2004) คัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น 4000 พีพีเอ็ม เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.2.2 การทดสอบการทนต่อกรดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียแลกติกที่สามารถทนเกลือน้ำดีความความเข้มข้น 4000 พีพีเอ็ม ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2.1 มาทดสอบการทนต่อกรดโดยถ่ายเชื้อที่คัดเลือกได้ลงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดียวกัน ดูด 1 มิลลิลิตรเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ล้างเซลล์ด้วย phosphate-buffered saline (PBS) 2 ครั้ง เตรียมเซลล์ซัสเพนชั่น ด้วย phosphate-buffered saline ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ผ่านการปรับพีเอชเป็น 1, 2, 2.5 และ 3 ด้วย 5 M HCl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วหาจำนวนแบคทีเรียที่รอดชีวิตโดยวิธี pour plate บนอาหาร MRS

Agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เหลือรอด (ดัดแปลงจาก Erkkila และ Petaja, 2000) แล้วคำนวณการรอดชีวิตของเชื้อที่ชั่วโมงและพีเอชต่างๆ

2.2.3 การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ เขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง นำเชื้อในระยะนี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในข้อ 2.2.2 โดยเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อให้ได้เชื้อ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*E. coli*, *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus*) ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกโดยวิธี agar well diffusion โดยเทอาหาร MHA ที่มีวุ้นร้อยละ 0.75 ซึ่งมีปริมาณเชื้ออินดิเคเตอร์แต่ละชนิดประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ทับบนอาหารแข็ง NA พักไว้ให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในตู้ปลอดเชื้อแล้วจึงเจาะหลุมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5.8 มิลลิลิตร หลังจากนั้นหยดส่วนใสที่มีการเตรียมโดยนำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2.2 มา 1 ลูปเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำมาปรับให้มีพีเอชเป็น 6.5-7.0 ด้วย 5 M NaOH และส่วนที่สองนำมาปรับให้มีพีเอชเป็น 6.5-7.0 ด้วย 5 M NaOH พร้อมกับการเติมเอนไซม์คะตะเลส 200 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของส่วนใสที่ไม่ปรับพีเอช และไม่เติมเอนไซม์คะตะเลส จากนั้นนำส่วนใสปริมาตร 80 ไมโครลิตรหยดลงในหลุมแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) จากขอบวงใสจนสุดขอบวงใส (เส้นผ่านศูนย์กลางทั้งหมด) รายงานหน่วยเป็นมิลลิเมตร (ดัดแปลงจาก Aslim *et al*., 2005)

2.2.4 การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้

จัดจำแนกสายพันธุ์โดยวิเคราะห์ 16S rDNA โดยส่งวิเคราะห์ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และMacrogen Incorporation ประเทศเกาหลี นำลำดับเบสของ 16S rDNA ที่ได้ไปเทียบลำดับเบสที่มีอยู่ใน nr database ที่มีฐานข้อมูลในอินเตอร์เน็ตโดยใช้เวปไซต์ของ http://www.ncbi.nlm.nih.gov ด้วยโปรแกรม BLAST

2.3 การคัดเลือกสารสกัดจากพืชหัวที่มีคุณสมบัติเป็นพรีไบโอติก

2.3.1 การเตรียมตัวอย่างพืช

นำตัวอย่างพืชหัว คือ มันเทศ (*Ipomoea batatas* (Linn.) Lamk), มันแกว (*Pachyrhizus erosus* (Linn.) Urb.), มันขี้หนู (*Plectranthus rotundifolius*), ผักกาดหัว (*Raphanus sativus L. var. longipinnatus*), แครอท (*Daucus carota* L. subsp. *Sativus* Thell), แห้ว (*Cyperus esculentus* Linn.), เผือก (*Colocacia esculenta* (Linn.) Schott), มันฝรั่ง (*Solanum tuberosum* Linn.) และหัวบีท (*Beta vulgaris*) มาล้างทำความสะอาด ปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งการนำมาอบเพื่อสะดวกในการเก็บรักษา สามารถเก็บตัวอย่างมาได้ครั้งละมากๆ ในครั้งเดียว และเก็บไว้ใช้ได้ตลอดการทดลอง ซึ่งเมื่ออบแห้งแล้วนำมาหาความชื้นในพืชแต่ละชนิดโดยใช้เครื่องวัดความชื้น (moisture analyzer) จากนั้นนำมาเก็บใส่ถุงปิดผนึกเพื่อเก็บไว้ทดลองต่อไป

2.3.2 การสกัดตัวอย่างพืชหัว

นำตัวอย่างพืชที่อบเตรียมไว้มาสกัดด้วย 50 เปอร์เซ็นต์เอทานอลในอัตราส่วน 1:10 แช่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 12 ชั่วโมง จากนั้นนำมาบดผสมกันให้ละเอียดด้วยเครื่องปั่นเป็นเวลา 5 นาที และนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองและนำไปหมุนเหวี่ยงที่ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกเอาของแข็งออก นำสารสกัดที่ได้มาระเหยเอทานอลออกด้วยเครื่อง Rotary Vacuum Evaporator จากนั้นนำไปทำเป็นผงด้วยวิธีการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (Freeze dry) และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในกล่องที่มีสารดูดความชื้นเพื่อไว้ใช้ในการทดลองต่อไป (ดัดแปลงจาก Hedley, 2001)

นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีการ Dinitrosalicylic acid ของ Miller (1959) (Robertson *et al*., 2001) และ หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (total carbohydrate) ด้วยวิธี phenol-sulfuric acid (Dubois *et al*., 1956) ตามวิธีวิเคราะห์ภาคผนวก ค

2.3.3 การทดสอบความสามารถในการทนต่อการย่อยในสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร

เตรียมสารสกัดที่ได้จากข้อ 3.2 ให้มีความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ในน้ำกลั่น จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ด้วย HCl buffer ความเข้มข้น 0.14 M ที่พีเอช 1, 2, และ 3 ด้วย 5 M กรดไฮโดรคลอริก (ดัดแปลงจาก Korakli *et al*., 2002) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชต่างๆ ปริมาตร 250 ไมโครลิตรลงในไมโครไตเตอร์เพลท บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่า เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

ปริมาตร 50 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารสกัดที่ผ่านการย่อยไปวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์ ตามวิธีการ Modified dinitrosalicylic acid method ของ Miller (1959) (Robertson *et al*., 2001) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ hydrolysis โดย

$$\text{Hydrolysis (\%)} = \frac{\text{Reducing sugar release (Final – Initial sugar)} \times 100}{\text{Total sugar content - initial reducing sugar}}$$

คัดเลือกสารสกัดที่มีเปอร์เซ็นต์การย่อย (Hydrolysis) ต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองข้อ 2.3.4 ต่อไป เนื่องจากสารที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจะต้องสามารถเหลือผ่านไปในลำไส้ใหญ่ได้มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ จึงคัดเลือกจากกรดที่มีเปอร์เซ็นต์การย่อยต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ และคัดเลือกการย่อยด้วยเอนไซม์ 20 เปอร์เซ็นต์

2.3.4 การทดสอบความสามารถในการทนเอนไซม์ human pancreatic α-amylase

เตรียมสารสกัดให้มีความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ผ่านการย่อยกรดที่พีเอช 1 เป็นเวลา 4 ชั่วโมงและปรับพีเอชเป็น 6.9 จากนั้นดูดสารละลายสกัดปริมาตร 25 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครไตเตอร์เพลท เติมเอนไซม์ human pancreatic α-amylase ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 25 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 6 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในสารละลายตัวอย่างเริ่มต้นและที่ 6 ชั่วโมง ดัดแปลงจาก Doyle และคณะ (1999 อ้างโดย Wichienchot, 2005) ตามวิธีการ Modified dinitrosalicylic acid method ของ Miller (1959) (Robertson *et al*., 2001) คำนวณค่าเปอร์เซ็นต์ hydrolysis เช่นเดียวกับข้อ 2.3.3

คัดเลือกสารสกัดที่มีเปอร์เซ็นต์ Hydrolysis ต่ำ เพื่อใช้ในการทดลองข้อ 4 ต่อไป

2.4 ผลของสารสกัดจากพืชหัวที่คัดเลือกได้ต่อการเจริญของโปรไบโอติก

2.4.1 การทดสอบความสามารถในการส่งเสริมการเจริญของโพรไบโอติก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3 คือ *Entercoccus faecium* รวมทั้ง *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum* และ *Bifidobacterium bifidum* มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 10^6-10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหาร minimal medium (ภาคผนวก ก) ที่มีการเติมสารสกัดจากพืชหัว 4 ชนิดที่คัดเลือกได้มีปริมาณของน้ำตาลทั้งหมด 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนโดยจะศึกษาผลของ

สารสกัดจากพืชชนิดต่างๆ ที่ได้ ต่อการเจริญของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์ โดยมีชุดควบคุม คือ ใช้น้ำตาลกลูโคสแทนสารสกัด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ (เพาะเลี้ยงโดยใช้ขวดยาฉีดที่มีการปิดด้วยฝาอลูมิเนียม มีการพ่นก๊าซไนโตรเจนเพื่อไล่อากาศที่อยู่ภายในขวด เติม cysteine-HCl 0.5 กรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มสับสเตรทรีดิวซ์ซิ่ง โดยมี rezasurin เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ) เก็บตัวอย่างที่เวลาต่างๆ คือ 0, 6, 12, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญของแบคทีเรียโปรไบโอติกโดยหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต โดยการ spread plate บนอาหาร MRS วัดการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก และวัดปริมาณการใช้สารสกัดหลังจากการหมักโดยการหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Fook and Gibson, 2003; Olano-Martin *et al*., 2000) แล้วรายผลเป็นร้อยละของการนำสารสกัดไปใช้โดยเปรียบเทียบที่เวลาเริ่มต้นและสิ้นสุดการเจริญ โดยคำนวณปริมาณสารสกัดที่ถูกใช้ไปดังนี้

$$\text{ร้อยละของการใช้สารสกัด} = \frac{(\text{สารสกัดเริ่มต้น} - \text{สารสกัดสุดท้าย})}{\text{สารสกัดเริ่มต้น}} \times 100$$

คัดเลือกสารสกัดจากพืชหัวที่ส่งเสริมการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดมาทำการศึกษาต่อไปตามข้อ 2.4.2

2.4.2 ผลของสารสกัดจากพืชหัวที่คัดเลือกได้ต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ในการทดสอบกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Salmonella* sp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* และ *Staphyloccus aureus* ของส่วนใสจากการเลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร minimal medium ที่เติมสารสกัดซึ่งมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ โดยทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 8500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ จากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB จำนวน 10 มิลลิลิตร แล้วบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB เพื่อให้ได้เชื้อ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร

ทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี broth microdilution assay ในไมโครเพลท 96 หลุม โดยแต่ละหลุมประกอบด้วยแบคทีเรียก่อโรค 10^6CFU ต่อมิลลิลิตรจำนวน 160 ไมโครลิตร

ส่วนใสที่แยกเซลล์ออกปริมาตร 40 และ 80 ไมโครลิตร โดยมีชุดควบคุมเป็นสารสกัดที่ไม่ผ่านการเลี้ยงเชื้อความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์+แบคทีเรียก่อโรค, Negative control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB น้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกกับสารสกัด และ Positive control คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MHB + เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ ตรวจดูกิจกรรมการยับยั้งโดยคัดเลือกจากหลุมที่ไม่เกิดความขุ่น แสดงว่าสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้

คัดเลือกสารสกัดที่ไปส่งเสริมกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียไปใช้ในการทดลองในข้อ 2.4.3 และ 2.4.4 ต่อไป

2.4.3 ผลของสารสกัดจากพืชหัวที่คัดเลือกได้ต่อการผลิตกรดไขมันสายสั้นของโปรไบโอติก

การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์ นำน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกที่คัดเลือกได้ใน ข้อ 4.2 มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อนำตัวเซลล์ออก หลังจากนั้นนำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ไปสกัดด้วย diethyl ether โดยนำส่วนใสปริมาตร 0.9 มิลลิลิตร มาเติมกรดฟอสโฟริก (phosphoric acid) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และเติม diethyl either ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งไว้ให้แยกชั้น และดูดสารละลายชั้นของสารสกัดเก็บไว้ นำส่วนใสชั้นล่างซึ่งเป็นชั้นของน้ำหมักมาสกัดด้วย diethyl ether ซ้ำอีก 2 ครั้ง และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณของกรดไขมันสายสั้นด้วย GC-FID (Gas Chromatograph-Flame Ionization Detector) analyzer (HEWLETTE PACKARD รุ่น HP 6850, USA)โดยใช้คอลัมน์ HP-INNOWax capillary ซึ่งทำจาก polyethylene glycol ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มิลลิเมตร ความยาว 30 เมตร กำหนดให้มีสภาวะการทำงานดังนี้ อุณหภูมิของ injector เท่ากับ 230 องศาเซลเซียส และมีการนำตัวอย่างเข้าแบบ splitless อุณหภูมิของคอลัมน์เริ่มจาก 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จะเพิ่มขึ้นด้วยอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนกระทั่งอุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 210 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ detector เท่ากับ 250 องศาเซลเซียส ภายใต้ที่มีการไหลของก๊าซฮีเลียม 30 มิลลิลิตรต่อนาที และก๊าซไนโตรเจนเป็นตัวส่งตัวอย่างจากปลาย column เข้าสู่ detector เมื่อ GC-FID analyzer พร้อมสำหรับการวิเคราะห์ฉีดตัวอย่าง ที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ด้วยเครื่อง autoinjector (HEWLETTE PACKARD, USA) ที่ injector port และสแกนด้วยเครื่องสแกนอัตโนมัติซึ่งจะคำนวณปริมาณของกรดไขมันสายสั้นแต่ละชนิดจากพื้นที่ใต้พีค (peak) เปรียบเทียบกับพีคทั้งหมดโดยใช้โปรแกรม chemstation ในการวิเคราะห์ ซึ่งใช้กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวเทอริก ที่ความเข้มข้น 25, 50, 75 และ 100 มิลลิโมลาร์ เป็นสารมาตรฐาน (Laurentin and Edwards., 2004)

ในการเลือกวิเคราะห์ปริมาณกรดไขมันสายสั้น จะนำน้ำหมักที่ชั่วโมง 24 และ 48 มาวิเคราะห์ เนื่องจากระยะเวลาที่อาหารอยู่ในส่วนต่างๆ ของทางเดินอาหารแต่ละส่วนนั้นไม่เท่ากัน พบว่าอาหารจะพักอยู่บริเวณทางเดินอาหารส่วนบนประมาณ 10-12 ชั่วโมง และส่วนที่ไม่ถูกย่อยและไม่ถูกดูดซึมจะเคลื่อนที่ไปพักบริเวณลำไส้ใหญ่ประมาณ 20 ชั่วโมง รวมแล้วระยะเวลาที่อาหารจะถูกย่อยหลังจากการกลืนอาหารเข้าไปจนถึงการขับถ่ายจะใช้เวลาประมาณ 30-32 ชั่วโมง

2.4.4 ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกร่วมกับแบคทีเรียก่อโรค ในอาหารที่มีสารสกัดจากพืชหัว (Co-cultivation)

การทดสอบการเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรค โดยใช้สารสกัดที่คัดเลือกได้เป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เช่นเดียวกับข้อ 2.4.2 แล้วเจือจางเพื่อให้ได้จำนวน 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร

ทำการเลี้ยงเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรีย (*L. plantarum*) ใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 10 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดียวกัน ทำการเจือจางเชื้อเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเพื่อให้ได้เชื้อ 10^7 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียและเชื้อแบคทีเรียก่อโรคมาเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ minimal medium เช่นเดียวกับที่ใช้ในข้อ 2.4.1 ปรับจำนวนเชื้อแต่ละชนิดให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร โดยมีชุดควบคุมที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนแทนสารสกัดที่คัดเลือกจากข้อ 2.4.2 ชุดควบคุมการเจริญของแบคทีเรียอินเคเตอร์กับสารสกัดแต่ไม่มีโปรไบโอติก และชุดควบคุมการเจริญของโปรไบโอติกกับสารสกัดแต่ไม่มีแบคทีเรียอินเคเตอร์เป็นชุดควบคุม บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลาต่าง ๆ ทุก 0, 12, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และนำไปวัดจำนวนของโปรไบโอติกแบคทีเรียและแบคทีเรียก่อโรคตามวิธีการวิเคราะห์ภาคผนวก ค โดยการ spread plate บนอาหารที่เหมาะสมกับเชื้อแต่ละชนิด โดยอาหาร MRS agar ที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียโปรไบโอติกมีการเติมอินดิเคเตอร์ bromocresol purple 0.04 กรัมต่อลิตร และรายงานผลการส่งเสริมหรือยับยั้งการเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียและแบคทีเรียก่อโรคที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน โดยเปรียบเทียบระหว่างการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกและแบคทีเรียก่อโรคกับชุดควบคุมการทดลอง (ดัดแปลงจาก Drago *et al*., 1997)

2.5. การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของสารสกัดคัดเลือกได้จากพืชหัว

2.5.1 ศึกษาขนาดน้ำหนักโมเลกุลของสารสกัดที่คัดเลือกได้ โดยใช้ GPC

ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์เทคโนโลยีโลหะและวัสดุแห่งชาติ กรุงเทพมหานคร

ศึกษาน้ำหนักโมเลกุลโดย GPC ทำได้โดยนำสารสกัดมาละลายใน 0.1 M $NaNO_3$ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร แล้วนำมากรองด้วยกระดาษกรองที่ทำด้วยไนลอนก่อนฉีดเข้าเครื่อง GPC (Polymer laboratories, England) ซึ่งใช้คอลัมน์ Ultrahydrogel linear (Water, USA) โดยฉีดเข้าปริมาณ 20 ไมโครลิตร ซึ่งตั้งอุณหภูมิของคอลัมน์เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราเร็วในการไหล (Flow rat) เท่ากับ 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที ใช้เครื่อง Detector เป็น RI detector ใช้ pullulans เป็นสารมาตรฐานในการเทียบหาน้ำหนักโมเลกุล โดยวิเคราะห์ผลโดยใช้ PL Logical GPC software (England)

2.5.2 การวิเคราะห์ชนิดน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบ

ทำการวิเคราะห์หาชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบโดยวิธี Thin layer chromatography (TLC) โดยนำสารสกัดมาละลายน้ำให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 1 เติม Trifluoroacetic acid (TFA) ความเข้มข้น 2 M ในอัตราส่วนระหว่าง สารละลายสารสกัดและสารสะลาย TFA เป็น 4:1 ย่อยโดยใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง แล้วนำมาหยดบนแผ่นทินเลเยอร์โครมาโตกราฟีอะลูมิเนียม (Thin layer chromatography aluminium sheet) ชนิด silica gel 60 F_{254} ขนาด 20x20 เซ็นติเมตร หนา 0.2 มิลลิเมตร (MERCK, Germany) ชนิด normal phase ปริมาณ 0.05 ไมโครลิตร โดยเทียบกับน้ำตาลมาตรฐาน ได้แก่ กลูโคส กาแลคโตส ฟลุคโตส และ แรมโนสในปริมาตรที่เท่ากัน นำแผ่น TLC แช่ใน TLC chamber ซึ่งมีระบบของตัวทำละลายเป็นอัตราส่วนของ เอทิลอะซิเตต :ไอโซโพรพานอล : น้ำ เป็น 3: 3 : 1 ตามลำดับซึ่งมีตัวเคลื่อนที่ รอจนตัวทำละลายเคลื่อนที่ถึงขีดที่กำหนดไว้นำมาเป่าให้แห้ง หลังจากนั้นนำไปจุ่มด้วยสารผสมระหว่าง กรดซัลฟิวริก: เมทานอล อัตราส่วน 1: 3 วางไว้จนแห้งและนำมาตรวจสอบการเกิดสีด้วยความร้อนโดยนำมาวางบน hot plate จนเห็นจุดสีของน้ำตาลบนแผ่น TLC วัดระยะที่น้ำตาลและตัวทำละลายเคลื่อนที่ได้แล้วคำนวณหาค่า R_f เพื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลมาตรฐานที่นำมาเปรียบเทียบ (ดัดแปลงจาก Yang และคณะ, 2004)