2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. แบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ *Lactobacillus* ที่ผลิตสารยับยั้งจำนวน 4 สายพันธุ์ *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐาน 4 สายพันธุ์ และแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารจำนวน 3 สายพันธุ์ และแบคทีเรียไม่ก่อโรค 1 สายพันธุ์ รายละเอียดชื่อสายพันธุ์และแหล่งที่มาของเชื้อ ดังตารางที่ 4

2. อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก)

- APT medium (All Purpose Tween) บริษัท Difco
- BHI medium (Brain Heart Infusion) บริษัท Difco
- CJ medium (Coconut Juice) สายชลและนภา (2517)
- MRS medium (de Man Rosoga and Sharpe) บริษัท Difco
- NA (Nutrient Agar) บริษัท Difco
- TGE medium (Trypticase Glucose Extract) Biswas และคณะ (1991)
- TJ medium (Tomato Juice) บริษัท Difco

3. สารเคมี

- สีย้อมแกรม
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัลและ 5 นอร์มัล
- กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มัล
- ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (ภาคผนวก ก)

4. เอนไซม์

- ∝-amylase จากบริษัท Difco
- catalase จากบริษัท Difco
- ∝-chymotrypsin จากบริษัท Difco

- pepsin จากบริษัท Difco

- protease จากบริษัท Difco

- proteinase-K จากบริษัท Difco

- trypsin จากบริษัท Difco

อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

- เครื่องเขย่า (Vortex Mixer) ของ Sciencefic Industries. Inc. USA.

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-1201V ของ Shimadsu, Japan

- เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น Sorvall RC 5C ของ Dupond Company, USA

- ถังหมัก (fermenter) ขนาด 5 ลิตร รุ่น Bioflo 3000 ของ บริษัท New Brunswick Scientific, U.S.A.

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave) ของ Tomy Seilo Co.Ltd, Japan

- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ของ Eyela Tokla Rikakikai Co. Ltd, Japan

ตารางที่ 4 แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

ชื่อแบคทีเรีย	แหล่งที่มา
1. *Lactobacillus* ที่ใช้ศึกษา	
Lactobacillus sp. A2	แยกได้จากปลาจิ้งจั้งดอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
L. plantarum A49a	แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยว (อรัญญา, 2542)
L. plantarum A61a	แยกได้จากแหนม (อรัญญา, 2542)
Lactobacillus sp. P5	แยกได้จากปลาแป้งแดง (วิลาวัณย์, 2543)
2. แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค	
Escherichia coli 1188	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
Salmonella typhi 3299	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
Staphylococcus aureus ATCC 29213	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัดสงขลา
3. แบคทีเรียไม่ก่อโรค	
M. luteus	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
4. แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน	
L. plantarum TISTR 877	หน่วยบริการพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
L. sake TISTR 912	หน่วยบริการพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
L. fermentum TISTR 914	หน่วยบริการพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
L. curvatis TISTR 938	หน่วยบริการพันธุ์เชื้อจุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

วิธีการวิเคราะห์

1. การเตรียมเชื้อเริ่มต้นของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* ที่ผลิตสารยับยั้ง

นำเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* ที่ต้องการทดสอบความสามารถในการยับยั้งมา sub culture เพื่อให้เชื้อ activeโดย streak เชื้อจาก stock culture ลงบนอาหาร MRS agar แล้วนำไปบ่มโดย *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ *Lactobacillus* sp. A2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ มา 2 loop ใส่ในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS broth 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะได้เชื้อเริ่มต้นที่มีจำนวนประมาณ 4 X 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร สำหรับนำไปใช้ในการเลี้ยงบนอาหารแข็งหรืออาหารเหลวต่อไปตามต้องการ

2. การเตรียมเชื้ออินดิเคเตอร์เพื่อนำมาใช้ในการทดสอบการยับยั้ง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธีการ streak ลงบนอาหารแข็งที่เหมาะสมกับเชื้ออินดิเคเตอร์นำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ โดยไม่มีการเขย่า แล้วใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่เจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ นำมาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ McFarland เบอร์ 0.5 โดยใช้ normal saline ความเข้มข้น 0.85 % ในการปรับ จะได้จำนวนเชื้อประมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร จากนั้นดูดมา 0.1 มิลลิลิตรซึ่งมีเชื้ออยู่ประมาณ 10^7 เซลล์ มาเติมในหลอดทดลองที่มีอาหารกึ่งแข็งซึ่งเหมาะสมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละชนิด โดยมีปริมาตรอาหาร 7 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน สุดท้ายจะได้เชื้ออินดิเคเตอร์ ที่มีความหนาแน่นประมาณ 1.4 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร นำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3. การเตรียม culture broth ที่ใช้ในการทดสอบให้มีความเข้มข้น 10 เท่า

เพื่อให้ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่นำมาใช้ทดสอบมีความเข้มข้นเพียงพอสำหรับการยับยั้งจึงนำ culture broth มาทำให้เข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า โดยนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °ซ ทิ้งตะกอนแยกเอาเฉพาะส่วนใสไประเหยเอาน้ำออกด้วยการวางใน water bath อุณหภูมิ 65 °ซ

เพื่อให้ปริมาตรน้อยลงกว่าเดิม 10 เท่า (ดัดแปลงจาก Sarkar and Banerjee, 1996) นำ culture broth ที่ได้มากรองผ่านกระดาษกรองที่มีขนาด 0.45 ไมโครเมตร culture broth นี้นำไปใช้ทดสอบการยับยั้งต่อไป

4. การทดสอบการยับยั้ง

4.1 Agar spot assay

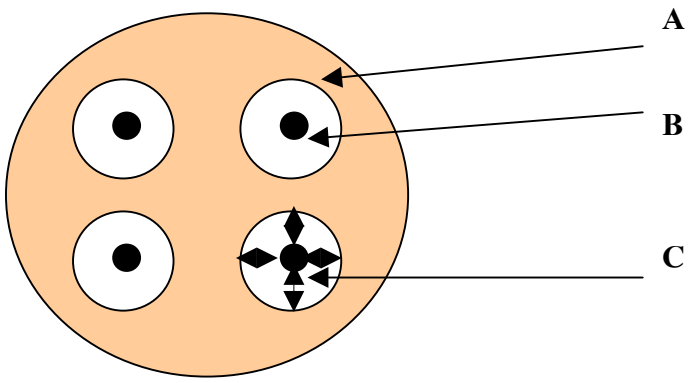
เป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* ต่อเชื้ออินดิเคเตอร์โดยตรง ทำได้โดยการใช้ไมโครปิเปตดูดเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลวจากวิธีการในข้อ 1 มา 5 ไมโครลิตร (มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียประมาณ 2 x 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) หยดลงบนอาหาร MRS agar ห่างกันหยดละ 3 เซนติเมตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิเหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเททับผิวหน้าด้วยอาหารกึ่งแข็งที่เหมาะกับเชื้ออินดิเคเตอร์แต่ละชนิดซึ่งมีจำนวนเชื้ออินดิเคเตอร์ประมาณ 1.4 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 2)วางทิ้งไว้ให้แข็งนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้ออินดิเคเตอร์แต่ละชนิด เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้ววัดผลการยับยั้ง (ดัดแปลงจาก Spelhaug and Harlander, 1989)

4.2 Agar well diffusion assay

เป็นการทดสอบความสามารถในการยับยั้งของ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* ต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ทำได้โดยการนำจานอาหาร Nutrient agar มาเททับด้วยอาหารกึ่งแข็งที่เหมาะสมกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบหรือแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ปริมาตรอาหาร 7 มิลลิลิตร ซึ่งมีเชื้ออินดิเคเตอร์จำนวนประมาณ 1.4 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 2) วางทิ้งไว้ให้แข็ง เจาะหลุมวุ้นด้วย cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.8 มิลลิเมตร ห่างกันประมาณหลุมละ 3 เซนติเมตร เติม culture broth ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 3) ลงไปหลุมละ 80 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมกับเชื้ออินดิเคเตอร์ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วัดผลการยับยั้งที่เกิดขึ้น (ดัดแปลงจาก Schillinger and Lucke, 1989)

4.3 การอ่านผล

ผลการยับยั้งที่ได้จากการทดสอบในข้อ 4.1 และ 4.2 ทำได้โดยการวัดขนาดขอบวงใสการยับยั้งที่เกิดขึ้น (รูปที่ 1) โดยใช้ vernia caliper วัด 4 แนวจากขอบโคโลนีของเชื้อ *Lactobacillus* ที่สร้างสารยับยั้งไปยังริมขอบวงใสที่เชื้ออินดิเคเตอร์เติบโตได้ แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย หน่วยที่ใช้เป็นมิลลิเมตร



รูปที่ 1 การวัดขนาดของขอบวงใสการยับยั้ง

A : บริเวณที่เชื้ออินดิเคเตอร์สามารถเติบโตได้

B : บริเวณที่เชื้อ *Lactobacillus* ซึ่งสร้างสารยับยั้งเติบโต

C : ระยะที่ใช้วัดขนาดของขอบวงใสการยับยั้ง (annular zone)

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดลองทุกครั้งจะทำ 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย ผลที่ได้นำไปหาความแตกต่างทางสถิติ การวางแผนการทดลองทำแบบสุ่มตลอด (completely Randomized Design, CRD) ข้อมูลที่ได้จากการทดลองนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยใช้วิธี Duncan's multiple range test (DMRT) (อภิญญา, 2531)

ขั้นตอนในการศึกษา ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน คือ

1. ศึกษาการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรีย *Lactobacillus* ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านของไทย ในสภาวะต่างๆ

1.1 เปรียบเทียบการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ

นำเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 ที่เตรียมจากวิธีการข้อ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 75 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 3 % บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 40 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงโดยไม่มีการเขย่า จากนั้นนำ culture broth ที่ได้มาทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า (วิธีการวิเคราะห์ข้อ3) แล้วทดสอบผลการยับยั้ง ด้วย วิธี agar well diffusion assay (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 4.2) โดยใช้เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์คือ *S. aureus* ATCC 29213 บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง อ่านผลการยับยั้ง นำผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งไปใช้เลี้ยงเชื้อในการทดลองต่อไป

1.2 เปรียบเทียบการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงโดยมีการเขย่าและไม่มีการเขย่า

เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 เหมือนการทดลองที่ 1.1 แต่แบ่งชุดการทดลองเป็นสองชุดคือเขย่า 150 rpm และไม่มีการเขย่าโดยบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 1.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ culture broth ที่ได้ไปทำให้เข้มข้น (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 3) ทดสอบผลการยับยั้งด้วย วิธี agar well diffusion assay (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 4) เปรียบเทียบการยับยั้งที่เกิดขึ้น นำผลการทดลองไปวิเคราะห์ทางสถิติแล้ว นำผลที่ได้ไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดในการทดลองต่อไป

1.3 เปรียบเทียบการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารต่างๆ

1.3.1 ศึกษาการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงบนอาหารแข็งชนิดต่างๆ

ใช้ไมโครไปเปตดูดเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 ที่เตรียมได้จากวิธีการข้อ 1 มา 5 ไมโครลิตร หยดบนจานอาหารแข็ง 5 ชนิด คือ APT, CJ, MRS, TGE และ TJ บ่มที่

อุณหภูมิเหมาะสมตามผลการทดลอง 1.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเททับผิวหน้าด้วยอาหารกึ่งแข็ง BHI ที่มีเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 จำนวนประมาณ 1.4 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 2) วางไว้ให้แข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เปรียบเทียบการยับยั้งจากขนาดขอบวงใสที่เกิดขึ้น และนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

1.3.2 ศึกษาการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวชนิดต่างๆ

นำเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 ที่เตรียมได้จากวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1 มาเลี้ยง ในอาหารเหลว 5 ชนิด คือ APT, CJ, MRS, TGE และ TJ ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรโดยใช้เชื้อเริ่มต้น 3 % บ่มในสภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลอง 1.1 และ 1.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนำ culture broth มาทำให้ได้ความเข้มข้น 10 เท่า (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 3) แล้วทดสอบผลการยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion assay (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 4.2) นำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

2. ศึกษาลักษณะสารยับยั้งที่สร้างโดย *Lactobacillus* บนอาหารแข็ง

2.1 ศึกษาการสร้างสารยับยั้งบนอาหาร MRS agar ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 2 % ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

ใช้วิธี agar spot assay ตามวิธีการข้อ 4.1 โดยใช้ไมโครไปเปตดูดเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 ที่เตรียมได้จากวิธีการข้อ 1 มา 5 ไมโครลิตร หยดบนอาหารแข็ง MRS (ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 %)โดยทำการทดลอง 2 ชุด ชุดที่ 1 นำไปบ่มในตู้บ่มปกติที่มีออกซิเจน ชุดที่ 2 นำมาบ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน ใน anaerobic jar เพื่อจำกัดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเชื้อ (ดัดแปลงจาก Gonzalez *et al*., 1994) ทั้ง 2 ชุด บ่มโดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมตามผลการทดลอง 1.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเททับผิวหน้าด้วยอาหารกึ่งแข็ง BHI ที่มีเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 จำนวนประมาณ 1.4 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเชื้ออินดิเตอร์ (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 2) วางไว้ให้แข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้ววัดผลการยับยั้ง

2.2 ศึกษาการสร้างสารยับยั้งบนอาหาร MRS agar ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 0.2% ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกเจน

ทำการทดลองเหมือนกับการทดลองที่ 2.1 แต่หยดเชื้อ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 ปริมาณ 5 ไมโครลิตร ลงบนอาหาร MRS agar ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.2 % เพื่อจำกัดการสร้างกรดอินทรีย์ด้วย ทำการทดลอง 2 ชุด ชุดที่ 1 นำไปบ่มในตู้บ่มปกติที่มีออกซิเจน ชุดที่ 2 นำมาบ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจน ใน anaerobic jar เพื่อจำกัดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของเชื้อ (ดัดแปลงจาก Gonzalez *et al*., 1994) ทั้ง 2 ชุด บ่มโดยใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมตามผลการทดลอง 1.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเททับผิวหน้าด้วยอาหารกึ่งแข็ง BHI ที่มีเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 จำนวนประมาณ 1.4 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเชื้ออินดิเตอร์ (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 2) วางไว้ให้แข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แล้ววัดผลการยับยั้ง

3. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

3.1 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรีย *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐานบนอาหารแข็ง

ใช้ไมโครไปเปตดูดเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 ที่เตรียมได้จากวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1 มา 5 ไมโครลิตร หยดบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมตามผลการทดลอง 1.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี agar spot assay โดยใช้อาหารกึ่งแข็งที่เหมาะกับเชื้ออินดิเคเตอร์ต่างๆ คือ BHI soft agar สำหรับ *S. aureus* ATCC 29213, *M. luteus*, *E. coli* 1188, *S. typhi* 3299 และอาหาร MRS soft agar สำหรับ *L. plantarum* TISTR 877, *L. fermentum* TISTR 879, *L. fermentum* TISTR 914 และ *L. curvatus* TISTR 938 อุณหภูมิเหมาะสมที่ใช้สำหรับการบ่มเชื้ออินดิเคเตอร์ *S. aureus* ATCC 29213, *M. luteus*, *E. coli* 1188 *S. typhi* 3299, *L. fermentum* TISTR 914 และ *L. curvatus* TISTR 938 กระทำที่ 35 °ซ ส่วนเชื้อ *L. plantarum* TISTR 877 และ *L. fermentum* TISTR 879 บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 18-24

ชั่วโมง เปรียบเทียบการยับยั้งของเชื้อแต่ละชนิดจากขนาดของขอบวงใสที่เกิดขึ้น และนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

3.2 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรีย *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐาน เมื่อใช้ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

นำเชื้อเริ่มต้นของ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 ที่เตรียมได้จากวิธีการวิเคราะห์ข้อ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 75 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 3 % บ่มในสภาวะที่เหมาะสมตามผลการทดลอง 1.1 และ 1.2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนำ culture broth มาทำให้ได้ความเข้มข้น 10 เท่า (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 3) ทดสอบผลการยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion assay (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 4) โดยใช้เชื้ออินดิเคเตอร์ทุกชนิดและอาหารกึ่งแข็งที่เหมาะกับอินดิเคเตอร์เช่นเดียวกับการทดลอง 3.1 อ่านผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นและนำผลการทดลองที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบการยับยั้งเชื้ออื่นทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวเพื่อเป็นการเปรียบเทียบและยืนยันผลการยับยั้งที่เป็นการทดสอบโดยตรงจากสารยับยั้งของเชื้อ *Lactobacillus* ขณะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและการยับยั้งที่เป็นผลของสารยับยั้งใน culture broth ที่เชื้อสร้างขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว

4. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

4.1 เปรียบเทียบระหว่างการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus*

เลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A49a และ *L. plantarum* A61a ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MRS broth 75 มิลลิลิตร ใช้เชื้อเริ่มต้น 3 % นำไปบ่มโดยใช้อุณหภูมิตามการทดลอง 1.1 การเขย่าตามการทดลอง 1.2 ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 4, 8, 16, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น

600 นาโนเมตร และทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ด้วยใช้วิธี agar well diffusion assay (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 4.2)

4.2 เปรียบเทียบการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อที่ให้ผลการยับยั้งสูงสุดในอาหาร MRS broth และอาหาร CJ broth

ทำการทดสอบเช่นเดียวกับการทดลอง 4.1 โดยเลี้ยงเฉพาะเชื้อที่ให้ผลการยับยั้งสูงสุดจากการทดลองที่ 4.1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MRS broth และอาหาร CJ broth ปริมาตร 75 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อที่เลือกได้ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 4, 8, 12, 16, 20, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง มาวัดค่า pH และวัดการเจริญเติบโตโดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และทดสอบการสร้างสารยับยั้งแต่ละเวลา ด้วยวิธี agar well diffusion assay (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 4.2) โดยใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและความสามารถในการสร้างสารยับยั้งของเชื้อในอาหารทั้ง 2 ชนิด

4.3 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อใช้ culture broth ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในอาหาร MRS broth และอาหาร CJ broth ที่ อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาปริมาณ 1,000 มิลลิลิตร นำมาทำให้เข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า แล้วนำมาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ 0-30, 30-50, 50-70 และ 70-90 % โดยค่อยๆ เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตลงในส่วนใสอย่างช้าๆขณะที่กวนด้วยเครื่องกวน ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เมื่อเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในระดับความอิ่มตัวที่ต้องการละลายหมด นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm นาน 15 นาที เก็บตะกอนไว้ที่ 4 °ซ สำหรับรอทดสอบ แล้วนำ culture broth ที่เหลือมาเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับความอิ่มตัวเป็น 50, 70 และ 90 % ตามลำดับโดยทุกระดับจะปั่นแยกตะกอนก่อนตกตะกอนในความอิ่มตัวต่อไปทุกครั้ง

ตะกอนที่ได้แต่ละระดับความอิ่มตัวนำมาละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 6.0) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC

29213 โดยวิธี agar well diffusion assay (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 4.2) โดยแบ่งชุดการทดลองดังนี้

ชุดควบคุม 1 เป็นผลการยับยั้งของตะกอนที่ได้จาก culture broth ความเข้มข้น 10 เท่าที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆผสมกับบัพเฟอร์ที่ใช้ทำละลาย ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

ชุดควบคุม 2 เป็นผลการยับยั้งของตะกอนที่ได้จาก culture broth ความเข้มข้น 10 เท่าที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ ผสมกับบัพเฟอร์อีก 2 เท่าเพื่อให้ได้ความเจือจางเท่ากับชุดทดสอบ

ชุดทดสอบ เป็นผลการยับยั้งของตะกอนที่ได้จาก culture broth ความเข้มข้น 10 เท่าที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ ผสมกับบัพเฟอร์ 2 เท่า และเอนไซม์ trypsin

ทำการวิเคราะห์ทางสถิติแปรียบเทียบผลการยับยั้งระหว่างชุดควบคุม 2 และชุดทดสอบ ระดับความอิ่มตัวใดที่มีสารยับยั้งที่เป็นสารโปรตีนอยู่จะนำมาศึกษาต่อ

Culture broth ที่เหลือจากการตกตะกอนแยกโปรตีนออกไปแล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 โดยวิธี agar well diffusion assay เช่นเดียวกัน

5. ศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum* A49a

5.1 ศึกษาความไวต่อเอนไซม์ต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อ ในอาหาร MRS broth

นำ culture broth ที่ได้การเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในอาหาร MRS broth จากการทดลองที่ 4.2 ที่เวลา 16 20 24 และ 30 ชั่วโมง มาทำให้มีความเข้มข้น 10 เท่า (วิธีการข้อ 3) เติมเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ catalase, pepsin, trypsin, α-chymotrypsin, protease, proteinase-K และ α-amylase ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ต่อสารละลายเท่ากับ 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำทดสอบการยับยั้งโดยมีชุดควบคุม 2 ชุด คือ

ชุดควบคุม 1 คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ชุดควบคุม 2 คือ culture broth เข้มข้น 10 เท่า ผสมบัฟเฟอร์ เท่าที่ใส่ในชุดทดสอบ

ชุดทดสอบ คือ culture broth เข้มข้น 10 เท่าที่ผ่านการทดสอบกับเอนไซม์ซึ่งมีปริมาณบัฟเฟอร์เท่ากับชุดควบคุม 2

นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 โดยวิธี agar well diffusion assay (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 4) เปรียบเทียบผลระหว่างการทดสอบกับเอนไซม์ และชุดควบคุม ทำการวิเคราะห์ทางสถิติ (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 5)

5.2 ความไวต่อความร้อนของสารยับยั้งใน culture broth

ทำการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในอาหาร MRS broth โดยใช้เวลาที่ทดสอบแล้วว่าให้ผลการยับยั้งดีที่สุดนำ culture broth มาทำให้มีความเข้มข้น 10 เท่า (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 3) แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63 °ซ เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 10, 20, 30 นาที และ อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 15 นาที เป็นชุดทดสอบ โดยมีชุดควบคุม คือ culture broth ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน ทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ด้วยวิธี agar well diffusion assay (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 4.2) วัดขอบวงใสการยับยั้ง เปรียบเทียบกันระหว่างการทดสอบที่ระดับความร้อนต่างๆ กับชุดควบคุม นำมาวิเคราะห์ทางสถิติ (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 5)

5.3 ความไวต่อความร้อนของสารยับยั้งที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำสารละลายของตะกอนที่ได้จาก 4.3 ที่คาดว่าอาจมีสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนอยู่ด้วย มาทดสอบความไวต่อความร้อนเหมือนกับการทดลอง 5.2 วัดขนาดของขอบวงใส เปรียบเทียบการยับยั้งระหว่างสารละลายของตะกอนที่ผ่านการทดสอบกับความร้อนระดับต่างๆ กับชุดควบคุม ทำการวิเคราะห์ทางสถิติ (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 5)

5.4 ศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a

ทำการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในอาหาร MRS broth โดยใช้เวลาที่ทดสอบแล้วว่าเป็นช่วงที่ culture broth ให้ผลการยับยั้งดีที่สุดมาทำให้มีความเข้มข้น 10 เท่า (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 3) มาเติมในอาหารเหลว BHI ซึ่งมีเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ที่ใช้เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ โดยมีปริมาณ *S. aureus* ATCC 29213 เริ่มต้น 1 x 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 2) บ่มที่อุณหภูมิ 35 °ซ โดยแบ่งชุดการทดลองดังนี้

ชุดควบคุม 1 เลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ร่วมกับ culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า อย่างเดียวเพื่อดูการลดลงของเชื้อที่คาดว่าน่าจะเกิดจาก สารยับยั้งทั้งหมด คือ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน

ชุดควบคุม 2 เลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ร่วมกับ culture broth ความเข้มข้น 10 เท่าที่เติมบัฟเฟอร์ปริมาตร 1 เท่าเพื่อให้ความเจือจางของ culture broth เท่ากับของชุดทดสอบทั้ง 2 ชุด

ชุดทดสอบ 1 เลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ร่วมกับ culture broth ความเข้มข้น 10 เท่าที่มีการจำกัดผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการเติมเอนไซม์ catalase (ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ต่อ culture broth เท่ากับ 1 มิลลิกรัม/1 มิลลิลิตร) ทำการนับจำนวนเชื้อโดยวิธีการ spread plate ที่เวลาต่างๆ เพื่อดูการลดลงของเชื้อที่คาดว่าน่าจะเกิดจากผลของกรดอินทรีย์ และ แบคเทอริโอซิน

ชุดทดสอบ 2 เลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ร่วมกับ culture broth ความเข้มข้น 10 เท่าที่มีการจำกัดผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซิน โดยการเติมเอนไซม์ catalase และเอนไซม์ trypsin (ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ต่อ culture broth เท่ากับ 1 มิลลิกรัม/1 มิลลิลิตร) ทำการนับจำนวนเชื้อที่เวลาต่างๆ เพื่อดูการลดลงของเชื้อที่คาดว่าน่าจะเกิดจากผลของกรดอินทรีย์เพียงอย่างเดียว เปรียบเทียบผลการยับยั้งระหว่างชุดควบคุมและชุดทดสอบ

6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการเลี้ยงโดยใช้เชื้อ *L. plantarum* A49a ในอาหาร CJ broth โดยการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นในอาหารเหลว ปริมาตร 175 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ เป็นเวลา 15 ชั่วโมงให้เชื้อเข้าสู่ระยะ log จากนั้นเติมเชื้อเริ่มต้นลงในถังหมักที่มีอาหารเหลวจำนวน 3.5 ลิตร โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3% เก็บตัวอย่างเป็นระยะๆ มาศึกษาการเติบโตของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ภาคผนวก ข) และศึกษาการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 โดยวิธี agar well diffusion assay (วิธีการวิเคราะห์ข้อ 4.2) ส่วนตัวอย่างที่เวลา

12, 15, 18, 22, 26 และ 30 ชั่วโมง นำมาศึกษาความไวต่อเอนไซม์ต่างๆ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 5.1 โดยควบคุมอุณหภูมิทุกการทดลองเท่ากับ 30 °ซ และปัจจัยที่ทำการศึกษามีดังนี้

6.1 ศึกษาผลของ pH

ศึกษาการเติบโตและการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยไม่ควบคุม pH และมีการควบคุม pH เท่ากับ 5.0 และ 6.0 ด้วย 5 M NaOH โดยใช้อุณหภูมิ 30 °ซ อัตราการกวน 150 rpm และให้อากาศ 0.5 vvm.

6.2 ศึกษาปริมาณการให้อากาศ

ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราการให้อากาศที่ 0.5 และ 1.0 vvm และไม่มีการให้อากาศ อัตราการกวน 150 rpm โดยใช้ pH ตามผลการทดลอง 6.1

6.3 ศึกษาผลของอัตราการกวน

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวน ที่ 80, 150 rpm และไม่มีการกวน โดยใช้ pH ตามผลการทดลอง 6.1 และให้อากาศตามผลการทดลอง 6.2