รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นภา โล่ห์ทอง. 2522. เอกสารประกอบการบรรยายวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. อาหารจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในประเทศไทย. แลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารของไทย. ครั้งที่ 1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Banks, J.G., Broad, R.G., and Sparks, N.H.C. 1986. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. Biotech. Appl. Biochem. 8 : 103-147.

Barefoot, S.E. 1984. Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophillus* bacteriocin, lactocin B. Antimicrob. Agents Chemother. 26 : 328-334.

Barefoot , S.E., and Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophillus*. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 1808-1815.

Barreau, C, and Wagener, A. 1990. Characterization of *Leuconostoc lactis* strains from human sources. J. Clin. Microbiol. 28 : 1728-1733.

Boehringer Mannheim. 1995. Nucleic acid labeling and detection. Boehringer 1995 Biochemical Catalog. Inchcape House, 450-452 Alesandra road, Singapore 0511. 42-75 pp.

Branen, A.L., Go, H.C., and Genske, R.P. 1975. Purification and properties of antimicrobial substances produced by *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*. J. Food. Sci. 40 : 446-450.

Bridge, P.D., and Sneath, P.H.A. 1982. *Streptococcus gallinarum* sp. Nov. and *Streptococcus oralis* sp. Nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 32 : 410-415.

Collins, M.D., and Jones, D. 1981. The distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implication. Microbiol. Rev. 45 : 316-354.

Collins, M.D., Williams, A.M., and Wallbank, S . 1990. The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16s rRNA sequence analysis : description of *Tetragenococcus* gen. nov. FEMS Microbiol. Lett. 70 : 255-262.

Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips, B.A., and Kandler, O. 1983b. *Streptococcus garvieae* sp. nov. and *Streptococcus plantarum* sp. nov. J. Gen. Microbiol. 129 : 3427-3431.

Daly, C., Chance, M.L., Sandine, W.E., and Elliker, P.R. 1973. Control of *Staphylococcus aureus* in sausage by starter culture and chemical acidulation. J. Food. Sci. 38 : 426-430.

Daeschel, M.A., McKenny, M.C., and McDonald, L.C. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 7 : 91-98.

Davey, G.P. 1981. Mode of action of diplococcin, a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. N. Zeal. J. Dairy Sci. Technol. 16 : 187-190.

Deibel, R.H. 1974. Technology of Fermented, Semi-Dried and Dried Sausages. In Proc. Meat Ind. Research Conf. Am. Meat Inst. Found., Washington, DC.

Deklerk, H.C. 1967. Bacteriocinogeny in *Lactobacillus fermenti*. Nature. (London) 214 : 609.

Deklerk, H.C., and Smith, J.A. 1967. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. J. Gen. Microbiol. 48 : 309-316.

Dellaglio, F., and Torriani, S. 1986. DNA : DNA, physiological characteristics and distribution of lactic acid bacteria isolated from maize silage. J. Appl. Bacteriol. 60 : 83-92.

Dellaglio, F., Trovatelli, L.D., and Sara, P.G. 1981 . Deoxyribonucleic acid homology anatomy representative strains of the genus *Pediococcus*. Hyg.1 Abst. : 140-150.

Dicks, L. M. T., and Van Vuuren, H. J. J. 1987. Relatedness of heterofermentative *Lactobacillus* species revealed by numerical analysis of total soluble cell protein patterns. Int. J. Syst. bacteriol. 37 : 437-440.

Eklund, T. 1984. The effect of carbondioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. Int. J. Food Microbiol. 1 : 179-185.

Fleming, H. P., Mc Feeter, R. F., and Daeschel, M.A. 1986. The Lactobacilli, Pediococci, and Leuconostoc : vegetable products. In Bacterial starter cultures for foods, ed. Gilliland, S.E. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida. pp. 97-118.

Food and Drug Administration. 1988. Nisin Preparation : Affirmation of Gras Status as a Direct Human Food Ingredient. Fed. Regist. 53 : 11247.

Frazier, W.C., and Westhoff, D.E. 1979. Food Microbiology. 3d.ed., Tata Mc Graw-Hill Publ. Co., Ltd., New-Delhi. 540pp.

Fujisawa, T., Benno, Y., Yaeshima, T., and Mitsuoka, T. 1992. Taxonomy study of *Lactobacillus acidophilus* group, with recognition of *Lactobacillus gallinarum* sp. nov. and *Lactobacillus johnsonii* sp. nov. and synonymy of *Lactobaciilus acidophilus* group A3 (Johnson et al., 1980) with the type strain of *Lactobacillus amylovorus* (nakamura, 1981). Int. J. Syst. Bacteriol. 42 : 487-491.

Garvie, E.I. 1976. Hybridization between deoxyribonucleic acid of some strains of heterofermentative lactic acid bacteria. Int. J. Syst. Bacteriol. 26 : 116-122.

Garvie, E.I. 1984. The seperation of species of the genus *Leuconostoc* and the differentiation of the leuconostocs from other lactic acid bacteria. Meth. Microbiol. 16 : 147-178.

Garvie, E.I., and Farrow, J.A.E. 1981. Sub-divisions within the genus *Streptococcus* using deoxyribonucleic acid/ ribosomal ribonucleic acid hybridization. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. Orig. C2 : 299-310.

Gilliland, S.E., and Speck, M.L. 1977. Use of the minitek system for chacterizing Lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. 33(6) : 1289-1292.

Gotz, F., Sedewitz, B., and Elster, E.F. 1980. Oxygen utilization by *Lactobacillus plantarum* 1. oxygen consuming reactions . Arch. Microbiol. 125-209.

Hamdan, I.Y., and Mikolajcik, E.M. 1974. Acidolin : an antibiotic produced by *Lactobacillus acidophilus*. J. Antibiot. 27 : 631-636.

Hammers, W.P., Weiss, N., and Holzapfel, W.P. 1991. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria Ecophysiology, Isolation Identification, Applications. A, Balows, H.G. Truper, M.D. Workin, W. Harder, and K.H. Schlifer (eds.). Spinger, New York, pp. 1535-1594.

Hensel, R., Mayr, U., Stetter, K. O., and Kandler, O. 1977. Comparative studies of lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria 1. Purification and kinetics of the alosteric L-lactic acid dehydrogenase from *Lactobacillus casei* subsp. *casei* and *Lactobacillus curvatus*. Arch. Microbiol. 112 : 81-93.

Hertel, C., Ludwig, W., Pot, B., Kersters, K., and Schleifer, K. H. 1993. Differentiation of Lactobacilli occuring in fermented milk products by using oligonucleotide probes and electrophoretic protein profiles. Syst. Appl. Microbiol. 16 : 463-467.

Ingram, M., Ottowan, F.J.H., and Coppock, J.M.B. 1956. The preservative action of acid substances in food. Chem. Ind. 42 : 1154-1165.

Inove , Y.M., Takano, M., and Shibasaki, I. 1980. Antagonistic action of lacic acid bacteria from Nham toward food-deteriorating bacteria. Microbial Utilization of Renewable Resources. 1 : 108-115.

Jarris, A. W., and Wolff, J.M. 1979. Grouping of lactic Streptococci by gel electrophoresis of soluble cell extracts. Appl. Environ. Microbiol. 37 : 391-398.

Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Environ. microbiol. 44 : 525-632.

Jensen, L.B. 1942. Microbiology of Meat. Champaign, Illinois : Garrard Press, 252 p.

Jensen, L.B., and Paddock, L.S. 1940. Sausage Treatment. US. Patent. 2,225,783.

Kandler, O., and Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus Beijerinck* 1901, 212AL. In Bergey 's Manual of systematic bacteriology. vol 2. P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.). The Williams and Wilkins Co., Baltimore. pp. 1209-1234.

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocin production by lactic acid bacteria. Biochemie. 70 : 337-349.

Lancefield, R.C. 1933. A serological differentiation of human and other groups of hemolytic streptococci. J. Exp. Med. 59 : 571-595.

Lawrence, R.C., and Terence, T.D. 1979. The fermentation of milk by lactic acid bacteria. In A.T. Bull (ed.) Microbial Technology : Current State Future Prospect. Cambridge University Press. pp. 187- 219.

Lindgren, S.E., and Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev. 87 : 149-164.

Liu, W., and Hanson, J.N. 1990. Some Chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 2551-2558.

Lubis, D. 1983a. The antimicrobial activity of yogurt cultures towards *Salmonella typhimurium*1. inhibition of *S. typhimurium* by supernatant from *Streptococcus thermophillus* culture. Dairy Sci. Abstr. 45(7) : 523-524.

Lubis, D. 1983b. The antimicrobial activity of yogurt cultures towards *Salmonella typhimurium* 2 inhibition of *S. typhimurium* by supernatant from *Lactobacillus bulgaricus* culture. Dairy Sci. Abstr. 45(7) : 523-524.

Mather, D.W., and Babel. F. J. 1959. Inhibition of certain types of bacterial spoilage in creamed cottage cheese by the use of a creaming mixture prepared with *Streptococcus citrovorum*. J. Dairy Sci. 42 : 1917-1926.

Mckay, L.L. 1983. Functional propeties of plasmids in lactic streptococci. Antonie van Leewenhoek. 19 : 259-274.

Orla-Jensen, S. 1942. The lactic acid bacteria. Ed. E. Munksgaurd. 2nd. ed. Copenhagen. pp. 106-107.

Piard, J. C., and Desazeaud, M. 1991. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria.1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. Lait. 71 : 525-541.

Pot, B., Hertel, C., Ludwig, W., Descheemaeker, P., Kersters, K., and Schleifer, K.H. 1993a. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus, L.gasseri* and *L.johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleoyides probe hybridization. J. Gen. Microbiol. 139 : 513-517.

Prescott, S.C., and Dunn, C.G. 1959. Industrial Microbiology. 3d ed., Kogagushi Co., Ltd., Tokyo. 1000 p.

Reddy, G.V., and Ranganathan, B. 1983a. Preliminary studied on antimicrobial activity of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*. J. Food. prot. 46 : 222-225.

Reddy, G.V., and Ranganathan, B. 1983b. Nutritional factors affecting growth and production of antimicrobial activity of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* S1-67/C. J. Food. prot. 54 : 748.

Roger, L.A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16 : 311-316.

Rogosa, M., and Sharpe, M.E. 1959. An approach to the classification of the *Lactobacilli*. J. Appl. Bacteriol. 22 : 329-340.

Rubin, H.E., Vaughan, F., and Nerad, T. 1982. Lactic acid inhibition of *Salmonella typhimurium* in yogurt. J. Dairy Sci. 65(2) : 197-203.

Sadine, W.E. 1988. New nomenclature of non-rod shaped lactic acid bacteria. Biochemie. 70 : 519-522.

Schillinger, U. 1990. Bacteriocins of lactic acid bacteria . In Biotechnology and Food Safety, ed. D.D. Bills and S.D. Kung. Butterworth-Heinemann, Boston. pp. 55-74.

Schillinger, U., and Luck, F.K. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ Microbiol. 55 : 1901-1908.

Schleifer, K.H. 1986. Gram positive cocci. In Sneath, P.A. (ed.). Bergeys' Manaul of Systematic Bacteriology. vol 2. Baltimore London : Williums & Wilkins.

Schleifer, K.H., and Kandler, O. 1972. Peptidoglycans of bacterial cell walls and their taxonomic implication. Bacteriol. Rev. 36 : 407-477.

Shahani, K.M., Vaki, J.R., and Kilara, A. 1977. Natural antibiotic activity of *Lactobacillus acidophillus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Dairy Sci. Abstr. 39(5) : 295-296.

Sherman, J.M. 1937. The *Streptococci*. Bacteriol. Rev. 1 : 3-97.

Silva, M., Jacobus, N.V., Deueke, C., and Eorbach, S.L. 1987. Antimicrobial substances from a human *Lactobacillus* strain. Antimicrob.Agents Chemother. 31(8) : 1231-1233.

Simond, J., Hansenn,P.A., and Lukshmanan, S. 1971. Deoxyribonucleic acid hybridization among strains of lactobacilli. J. bacteriol. 107 : 382-384.

Sorrels, K.M., and Speck, M.L. 1970. Inhibition of *Salmonella gallinarum* by culture filtrate of *Leuconostoc citrovorum*. J. dairy Sci. 53: 239-240.

Stackebrandt, E., Fowler, V.J., and Woese, C.R. 1983. A phylogenetic analysis of lactobacilli, *Pediococcus pentosaceus* and *Leuconostoc mesenteroides*. Syst. Appl. Microbiol. 4 : 326-327.

Steven, K.A., Schldon, B.W., Klapes, N.A., and Klaenhammer, T.R. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* Species and other gram negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 3613-3615.

Tagg, J.R., Dajanii, A.S., and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40 : 722-756.

Tamine, A.Y. 1981. Microbiology of starter culture. In R.K. Robinson (ed.) Dairy Microbiology. Vol. 2 : The Microbiology of Milk Product. London. Applied Science Publisher. pp. 133-156

Tissier, H. 1900. Researche sur la flore intestinate des nourissons (etat normal et pathologique). these, Paris.

Tittsler, R.P., Pederson, C.S., Snell, E.E., Handlin, D., and Nivin, C.F., Jr. 1952. Symposium on the lactic Acid Bacteria. Bact. Rev. 16 : 227-260.

Upreti, G.C., and Hinsdill, R.D. 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrob. Agents Chemother. 4 : 487-494.

Vescovo,M., Dellaglio, F., Botazzi, V., and Sarra, P.G. 1979. Deoxyribonucleic acid homology among *Lactobacillus* species of the subgenus *Betabacterium* Orla-Jensen. Microbiologica. 2 : 317-336.

Visser, R., Holzapfel, W.H., Bezuidenhout, J.J., and Kotze, J.M. 1986. Antagonism of lactic acid bacteria phytopathogenic bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 52 : 552-555.

Vuyst, L.D., and Vandamme, E.J. 1994. Bacteriocin of lactic acid bacteria Microbiology, Genetics and Application. Blackie academic & professional. UK. : 539 PP.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. <u>สูตร และวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ</u>

1.1 อาหารเอ็มอาร์เอส (MRS media)

โปรติโอสเปปโตน	10.0	กรัม
เนื้อวัวสกัด	10.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์	5.0	กรัม
กลูโคส	20.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)	2.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมซิเตรต	2.0	กรัม
ทวีน 80	1.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตรท	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	.58	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H_2O$)	0.28	กรัม
น้ำ	1000	มล.

ปรับให้มีความเป็นกรดด่าง 7.0 ด้วย 1 นอร์มอล โซเดียมไฮดรอกไซด์

ถ้าต้องการอาหารแข็งให้เติมผงวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว , 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

1.2 อาหารแข็งนิวเตรียนท์ (NA ; Nutrient Agar)

แบคโตเปปโตน	5.0	กรัม
เนื้อวัวสกัด	3.0	กรัม
ผงวุ้น	15.0	กรัม
น้ำ	1000	มล.
ความเป็นกรด-ด่าง	7.0	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารเหลว GYP (GYP Broth)

กลูโคส		1.0	กรัม
ผงสกัดยีสต์		1.0	กรัม
เปปโตน		1.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตท (Na Acetate)		1.0	กรัม
ซอลท์ โซลูชั่น (Salt Solution)		0.5	กรัม
น้ำกลั่น		100	มล.
	ความเป็นกรดด่าง	6.8	
Salt Solution :	แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H2O$)	4.0	กรัม
	แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H2O$)	0.2	กรัม
	เฟอร์รัสซัลเฟต ($FeSO_4.7H2O$)	0.2	กรัม
	โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	0.2	กรัม
	น้ำกลั่น	100	มล.

สำหรับการทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อในโซเดียมคลอไรด์ ให้เติมสารดังกล่าวลงในอาหารเหลว GYP ตามปริมาณที่ต้องการ ส่วนการทดสอบการเจริญที่ระดับความเป็นกรดด่างต่าง ๆ ให้เตรียมอาหารเหลว GYP เข้มข้น 2 เท่า และเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นต่าง ๆ หลังจากฆ่าเชื้อแล้ว เทอาหารเหลว GYP ผสมกับสารละลายดังกล่าวด้วยอัตราส่วน 1 : 1 แล้วตรวจสอบความเป็นกรดด่างด้วย pH Meter

1.4 อาหารทดสอบเอสคูลิน (Aesculin Hydrolysis)

เอสคูลิน (Aesculin)	1.0	กรัม
กลูโคส	0.25	กรัม
เฟอร์ริกซิเตรท (Ferric Citrate)	0.05	กรัม
เนื้อวัวสกัด	0.5	กรัม
ผงสกัดยีสต์	0.5	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4.4H2O$)	0.01	กรัม
ทวีน 80	0.1	มล.
ผงวุ้น	0.15	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

1.5 Fermentable Carbohydrate Test

คาร์โบไฮเดรต	0.5	กรัม
ผงสกัดยีสต์	0.4	กรัม
เปปโตน	0.5	กรัม
ซอลท์โซลูชั่น	0.5	มล.
น้ำกลั่น	100	มล.
ความเป็นกรดด่าง	6.8	

นึ่งฆ่าเชื้ออาหารที่ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

2. <u>การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง</u>

2.1 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 % (Hydrogen peroxide Solution)

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 30 %	10.0	มล.
น้ำกลั่น	90.0	มล.

2.2 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดด่าง 7.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์

0.2 M สารละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	39.0	มล.
0.2 M สารละลายไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	61.0	มล.
ปรับให้มีความเป็นกรดด่าง 7.0		
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร	200.0	มล.

2.3 สารละลายมิกซ์อินดิเคตอร์ (Mixed Indicator)

บรอมไทมอล บลู (Bromthymol Blue)	0.2	กรัม
ฟีนอล เรด (Phenol Red)	0.1	กรัม
95 % เอธิลอัลกอฮอล์	300	มล.

ผสมให้เข้ากันและเก็บในขวดสีชา

3. การเตรียมสีย้อมและสารเคมีที่ใช้ในการย้อมแกรม

3.1 สีสำหรับการย้อมแกรม (Gram Stain)

3.1.1 แกรมคริสตอลไวโอเล็ต (Gram Crystal Violet)

แบคโตแกรมคริสตอลไวโอเล็ต	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มล.

3.1.2 แกรมไอโอดีน (Gram Iodine)

ไอโอดีนคริสตอล	1	กรัม
โปแตสเซียมไอโอไดด์	1	กรัม
น้ำกลั่น	300	มล.

3.1.3 ดีคัลเลอร์ไรซ์เซอร์ (Decolorizer)

95 % แอลกอฮอล์

3.1.4 ซาฟรานิน โอ (Safranin O)

ซาฟรานิน โอ พาวเดอร์	8	กรัม
แอนไฮดรัสแอลกอฮอล์	200	มล.
ผสมส่วนผสมทั้ง 2 ให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1000	มล.

วิธีย้อม

- กระจายเชื้อบนสไลด์ ทำให้แห้งในอากาศแล้วผ่านเปลวไฟเพื่อฟิก (fix) เซล
- ย้อมด้วยสีแกรมคริสตอลไวโอเลต 1 นาที
- ล้างด้วยน้ำกลั่น
- ย้อมด้วยแกรมไอโอดีน 1 นาที
- ล้างสีออกโดยใช้ 95 % แอลกอฮอล์ สังเกตสีแกรมคริสตอลไวโอเล็ตที่ถูกชะออกมาพอเริ่มจางหยุดปฏิกิริยาโดยการจุ่มลงในน้ำ
- ย้อมด้วยสีซาฟรานิน โอ 30 วินาที ล้างน้ำแล้วซับให้แห้ง
- ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์หัว x 100

4. <u>การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการทำโพลีอะคริลาไมด์เจลชนิดแผ่น</u> (Slab Gel Electrophoresis)

4.1 10 x สารละลายทริส - ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์
(0.25 โมลาร์ ทริส 1.92 โมลาร์ไกลซีน)

ทริส	30	กรัม
ไกลซีน	144	กรัม

ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1000 มล.

4.2 1 x สารละลายทริส-ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์
(0.025 โมลาร์ทริส 0.192 โมลาร์ไกลซีน)

10 % สารละลายทริส - ไกลซีนอิเลคโตรดบัฟเฟอร์	100	มล.
20 % โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	5	มล.
เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร	1000	มล.

4.3 20 % โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (SDS)

โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	100	มล.
เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร	500	มล.

4.4 4 x สารละลายทริส - โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 6.8 (0.5 โมลาร์ทริส)

ทริส	30.275	กรัม
20 % โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10	มล.
TEMED	1	มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 6.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

4.5 4 x สารละลายทริส - โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 8.8 (0.5 โมลาร์ทริส)

ทริส	30.275	กรัม
20 % โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10	มล.
TEMED	1	มล.

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8.8 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

4.6 2 x บัฟเฟอร์ที่จะใช้กับโปรตีนที่จะวิเคราะห์ (Sample Buffer)

กลีเซอรอล	10	มล.
2 - เมอแคปโตเอธานอล	5	มล.
20 % โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต	10	มล.
0.5 โมลาร์ ทริส - ไฮโดรคลอไรด์ pH 6.8	12.5	มล.
สารละลาย 1 % บลอมฟีนอล บลู	0.1	มล.
น้ำกลั่น	2.5	มล.

4.7 สารละลายอะคริลาไมด์ (Acrylamide Stock)

อะคริลาไมด์	30	กรัม
BIS	0.8	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 มล.

4.8 1 % สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต (เตรียมก่อนใช้)

แอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.1	กรัม

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มล.

4.9 สารละลายผสมของเซพาเรติงเจล(Seperating Gel Solution)

สารละลายอะคริลาไมด์	1	กรัม
4 x สารละลาย ทริส - โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 6.8	5	มล.
1 % สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.25	มล.
น้ำกลั่น	0.50	มล.

4.10 สารละลายผสมของสแตกกิงเจล (Stacking Gel Solution)

สารละลายอะคริลาไมด์	1	กรัม
4 x สารละลาย ทริส - โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต pH 6.8	2.5	มล.
1 % สารละลายแอมโมเนียมเปอร์ซัลเฟต	0.25	มล.
น้ำกลั่น	6.25	มล.

4.11 สารละลายสำหรับการย้อมสี (Staining Solution)

โคมาซซี่บิลเลียนท์ บลู จี - 250	2.0	มล.
เมธานอล	500	มล.
กรดอะซิติก	100	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

4.12 สารละลายสำหรับล้างสี (Destaining Solution)

เมธานอล	400	มล.
กรดอะซิติก	70	มล.

เติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1000 มล.

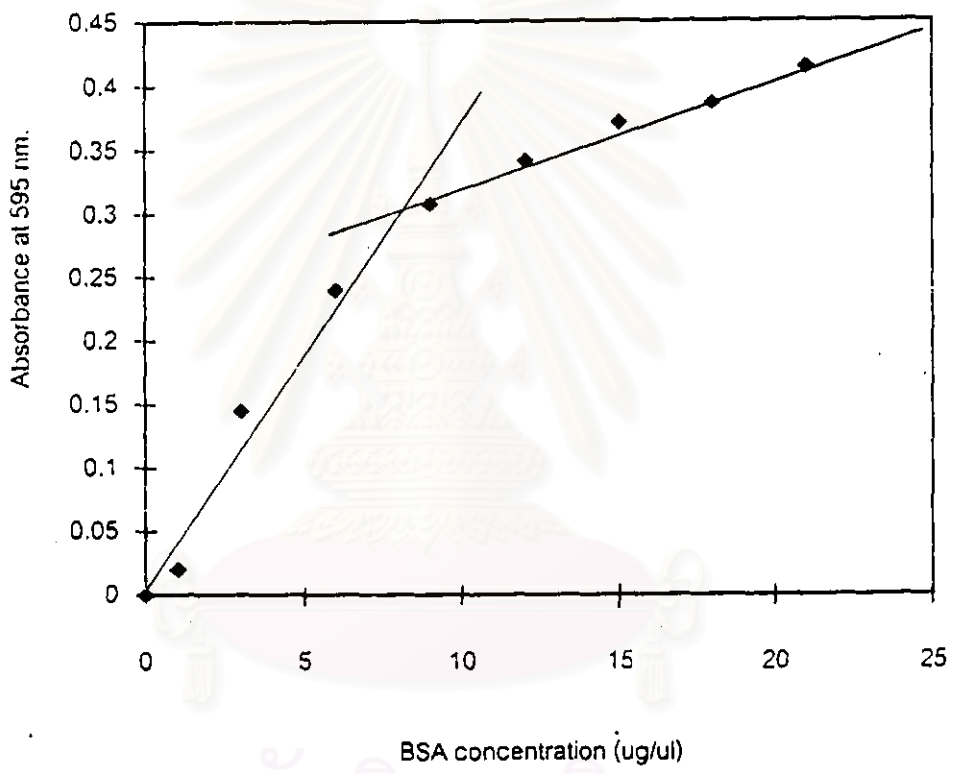
4.13 TS - buffer

ทริส	10	มิลลิโมลาร์
โซเดียมคลอไรด์	50	มิลลิโมลาร์

ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 8.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข



รูปที่ 28 กราฟมาตรฐานบีเอสเอ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค.

<u>ตัวอย่างการคำนวณปริมาณโปรตีนของเชื้อ</u>

เชื้อ	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 นาโนเมตร (Y)
control	0.09686
L. plantarum DSM 20174^T	0.14140

จากกราฟโปรตีนมาตรฐานในภาคผนวก ข. เมื่อนำมาหาค่า slope ของเส้นกราฟ จะได้ค่า slope 2 ค่า คือ

กราฟเส้นที่ 1 $Y = 0.0411X$

$R^2 = 0.9748$

กราฟเส้นที่ 2 $Y = 0.0086X + 0.2349$

$R^2 = 0.9848$

ปริมาตรทั้งหมดของโปรตีน = 60 ไมโครลิตร แต่นำมาวัดแค่ 10 ไมโครลิตร
แทนค่า Y ลงในสมการ จะได้ค่า X ซึ่งเป็นค่า ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร ของโปรตีน
พบว่า control จะมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.09686/0.0411
= 2.357 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร

L. plantarum DSM 20174^T จะมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 0.14140/0.0411
= 3.44 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร

แต่ค่าที่ได้นี้เป็นค่าที่ได้จากการทำ dilution 1 : 10 ก่อนที่จะนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสง ดังนั้นจึงต้องมีการคำนวณกลับเพื่อให้ได้ค่าที่แท้จริง พบว่า

<u>control</u>

control dilution 1 : 10 มีปริมาณโปรตีน 2.357 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร
ดังนั้น control เริ่มต้น จะมีปริมาณโปรตีน 2.357x10
= 23.57 ไมโครกรัมต่อ10 ไมโครลิตร

control 10 ไมโครลิตร มีปริมาณโปรตีน 23.57 ไมโครกรัม
ดังนั้น control 60 ไมโครลิตร จะมีปริมาณโปรตีน $\frac{23.57 \times 60}{10}$ ไมโครกรัม
= 126 ไมโครกรัม

L. plantarum DSM 20174^{T}

L. plantarum dilution1 : 10 มีปริมาณโปรตีน 3.44 ไมโครกรัมต่อ 10 ไมโครลิตร
ดังนั้นโปรตีน *L. plantarum* เริ่มต้น จะมีปริมาณโปรตีน 3.44x10
= 34.4 ไมโครกรัมต่อ10 ไมโครลิตร

L. plantarum 10 ไมโครลิตร มีปริมาณโปรตีน 34.4 ไมโครกรัม
ดังนั้น *L. plantarum* 60 ไมโครลิตร จะมีปริมาณโปรตีน $\frac{34.4 \times 60}{10}$ ไมโครกรัม
= 206.4 ไมโครกรัม

จากค่าที่ได้ต้องนำค่าโปรตีนของ control มาหักออก จะได้ปริมาณโปรตีนของเชื้อที่แท้จริง
จากสูตร total protein - control = lyse protein
แทนค่า 206.4 - 126 = 80.4 ไมโครกรัมต่อ 60 ไมโครลิตร
= 1.34 ไมโครกรัมต่อ 1 ไมโครลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวกิตติมา จริยพฤติ เกิดเมื่อวันที่ 27 กันยายน 2514 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ในปีการศึกษา 2535 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตร วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2536

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย