บทที่ 3

การทดลอง

ตัวอย่างในการทดลอง

1. เนื้อไก่ตัดแต่งแช่เย็นจากแหล่งจำหน่ายต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร โดยเป็นเนื้อส่วนอก ติดกับปีกบน (Boneless Breast meat ; BB) และเนื้อส่วนน่อง (Drumstick)
2. เชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ
   Pseudomonas aeruginosa ATCC 27853
   จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมี

1. สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความไวของเครื่องมือต่อคะตะเลสจากเชื้อบริสุทธิ์ และในการตรวจสอบ pH และ temperature profile catalase activity
   - Boric acid (A.R.)
   - Citric acid monohydrate (A.R.)
   - Di – Sodium hydrogen phosphate dodecahydrate (A.R.)
   - Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (A.R.)
   - Hydrogen peroxide (A.R.)
   - Sodium dihydrogen phosphate monohydrate (A.R.)
   - Sodium phosphate tribasic (A.R.)

2. สารเคมีที่ใช้ในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรีย
   - Absolute ethanol (A.R.)
   - Crystal violet (A.R.)
   - Iodine (A.R.)
   - Safranin O (A.R.)
   - Tetramethyl – p – phenylenediamine dihydrochloride (A.R.)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ และ dilution fluid
   - Nutrient broth (Merck, Germany)
   - Plate count agar (Oxoid, England)
   - Peptone (Difco, USA)
   - Sodium chloride (A.R.)

<u>อุปกรณ์</u>

1. อุปกรณ์ในการสร้างเครื่องมือ Catalasemeter
   1.1 ชุด Sensor และ วงจร Control
   1.2 ชุด Regulator
   1.3 วงจรนับ และ แสดงผล (Counter and Display)
   1.4 วงจรกำเนิดความถี่สัญญาณนาฬิกา (Clock Generator)
   1.5 อุปกรณ์อื่น ๆ
      - กล่องสำหรับประกอบเครื่องมือ
      - หลอดทดลองขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 16 มิลลิเมตรขึ้นไป
   1.6 แผ่น paper disc ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 13 มิลลิเมตร หนาประมาณ 1 มิลลิเมตร มีน้ำหนักประมาณ 0.04 กรัมต่อแผ่น ใช้ sterile absorbant pad ของ Millipore® ทำจาก cellulose
   1.7 Adaptor แปลงกระแสไฟฟ้า AC 220 V เป็น DC 12 V

2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลส
   - Blender (Waring USA, Model 32 BL 79 (8010))
   - pH meter (SCHOTT, CG 840)
   - Refrigerated centrifuge (Hettich Zentrifugen, EBA 12)
   - Water bath (Heto Lab Equipment, DT-1)
   - เครื่องชั่งละเอียด ทศนิยม 4 ตำแหน่ง พิกัดการชั่ง 202 กรัม (Sartorius, A 200S)
   - เครื่องชั่งหยาบ ทศนิยม 2 ตำแหน่ง พิกัดการชั่ง 3100 กรัม (Sartorius, BP 3100S)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบด้านจุลชีววิทยา

- Autoclave (Sanyo, MLS-2400)
- Colony counter (Darkfield Quebec, 14G108)
- Hot air oven (WTB binder, typ.15115300002020)
- Incubator (Memmert, B 30)
- กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, 471148)
- ตู้เขี่ยเชื้อที่มีหลอด ultraviolet
- เตาไมโครเวฟ (Litton, H 15610 – A)

<u>ขั้นตอนและวิธีทำการทดลอง</u>

1. การออกแบบและประดิษฐ์เครื่อง Catalasemeter เพื่อใช้ในการทดลอง

รายละเอียดของเครื่อง และรายการอุปกรณ์ แสดงในภาคผนวก ก 1 วิธีการใช้เครื่องแสดงในภาคผนวก ก 2

2. การทดสอบ sensitivity ของเครื่อง Catalasemeter ต่อเอนไซม์คะตะเลสจากเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์

นำเชื้อแบคทีเรีย *Micrococcus luteus* ATCC 9341 และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ค 3) เจือจางด้วย nutrient broth ให้มีจำนวนเซลล์อยู่ในช่วงต่าง ๆ นำมาวัดแอคติวิตีของคะตะเลสด้วย Catalasemeter และนำตัวอย่างชุดเดียวกันไปหาจำนวนเซลล์โดยการทำ total plate count (วิธีการแสดงในภาคผนวก ง 3 ข้อ 2)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี Regression analysis

3. ศึกษาชนิดและปริมาณของ predominant bacteria ที่พบเป็นส่วนใหญ่ในเนื้อไก่

เก็บตัวอย่างเนื้อไก่แช่เย็นที่จำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ต แยกแบคทีเรียจากตัวอย่าง (วิธีการแสดงในภาคผนวก ง 3 ข้อ 1) แล้วนำ suspension ของแบคทีเรียที่แยกได้มาเพาะเชื้อ สุ่มตัวอย่าง

โคโลนี ทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (วิธีการแสดงในภาคผนวก จ 1) จัดกลุ่มของแบคทีเรียโดยการทำ Gram's stain (วิธีการแสดงในภาคผนวก จ 2) และทดสอบสมบัติทางชีวเคมี (วิธีการแสดงในภาคผนวก จ 3) แล้วตรวจสอบระดับการสร้างคะตะเลสของแบคทีเรียโดยวิธี Capillary tube catalase test (Fung และ Petrishko, 1973) (วิธีการแสดงในภาคผนวก ฉ)

4. ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการใช้ยับยั้งคะตะเลสรบกวนจากเนื้อเยื่อไก่ และ เลือดไก่

4.1 ศึกษาแอคติวิตีของคะตะเลสที่pH ต่าง ๆ

ผสมคะตะเลสที่เตรียมได้จากเนื้อเยื่อไก่ (วิธีเตรียม แสดงในภาคผนวก ค 1) คะตะเลสที่เตรียมได้จากเลือดไก่ (วิธีเตรียม แสดงในภาคผนวก ค 2) คะตะเลสที่เตรียมได้จาก predominant bacteria (วิธีเตรียม แสดงในภาคผนวก ค 3) กับสารละลายบัฟเฟอร์ที่ pH 2.0 ถึง 12.0 (วิธีเตรียม แสดงในภาคผนวก ข 1 ข้อ 1) ในอัตราส่วนคะตะเลส 1 มิลลิลิตร ต่อ บัฟเฟอร์ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง (28 $\pm$ 2 องศาเซลเซียส) ซึ่งสารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 25 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลสด้วย Catalasemeter

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ

4.2 ศึกษาแอคติวิตีของคะตะเลสที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ผสมคะตะเลสที่เตรียมได้จากแหล่งต่างๆ (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ค 1 ค 2 และค3) กับสารละลายบัฟเฟอร์ pH 7.0 (วิธีเตรียมแสดงในภาคผนวก ข 1 ข้อ 2) ในอัตราส่วนคะตะเลส 1 มิลลิลิตร ต่อ บัฟเฟอร์ 4 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ใน water bath ให้มีอุณหภูมิภายในตัวอย่าง 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และ 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง ทิ้งให้ตัวอย่างมีอุณหภูมิเท่ากับ control โดย control เป็นตัวอย่างที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน มีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง ตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลสด้วย Catalasemeter

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ

จากการทดลองข้อ 4.1 และ 4.2 พิจารณาผลการทดลอง เลือกภาวะ pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสม ซึ่งสามารถยับยั้งแอคติวิตีของคะตะเลสจากเนื้อไก่ และเลือดไก่ได้ โดยในขณะเดียวกันก็ไม่ทำให้แอคติวิตีของคะตะเลสจาก predominant bacteria สูญเสียไปด้วย

5. ศึกษาการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อไก่

เก็บตัวอย่างเนื้อไก่แช่เย็น (อุณหภูมิประมาณ 7 – 10 องศาเซลเซียส) จากแหล่งจำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ตต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานครโดยเลือกตัวอย่างเป็นเนื้อไก่ชนิดตัดแต่งแล้ว (cut-up) ส่วนอกติดกับปีกบน (Boneless Breast meat ; BB) และส่วนน่อง (Drumstick) แยกแบคทีเรียจากตัวอย่าง (วิธีการแสดงในภาคผนวก ง 3 ข้อ 1) นำ suspension ของแบคทีเรียที่แยกได้มาให้ภาวะที่สามารถยับยั้งคะตะเลสรบกวนจากเนื้อเยื่อไก่ได้ ตามที่ศึกษาไว้ในข้อ 4 ตรวจสอบแอคติวิตีของคะตะเลสจากแบคทีเรียในตัวอย่างด้วยCatalsemeter นำตัวอย่างชุดเดียวกันมาหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และ total psychrotroph count (วิธีการแสดงในภาคผนวก ง 3 ข้อ 2 และข้อ 3)

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ผลการทดลองโดยวิธี Regression analysis

6. ศึกษาการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อไก่แปรรูป

6.1 ศึกษาชนิดและปริมาณของ predominant bacteria ที่พบเป็นส่วนใหญ่ในเนื้อไก่แปรรูป

เก็บตัวอย่างเนื้อไก่แปรรูปจากแหล่งจำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ตต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร แล้วทำการทดลองตามวิธีการเช่นเดียวกันกับ ข้อ 3

6.2 ศึกษาการประมาณจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดในเนื้อไก่แปรรูป

เก็บตัวอย่างเนื้อไก่แปรรูปจากแหล่งจำหน่ายในซูเปอร์มาร์เก็ตต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร แล้วทำการทดลองตามวิธีการเช่นเดียวกันกับ ข้อ 5