บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ตัวอย่างอาหารหมักดอง

ตัวอย่างอาหารหมักดองที่ได้ทำการเก็บมาจากตลาดสด และจากการผลิตของชาวบ้านในจังหวัดปัตตานี และนราธิวาส จำนวน 9 ตัวอย่าง โดยได้จากพืช 4 ชนิด คือ ผักเสี้ยนดอง สะตอดอง หน่อไม้ดอง และกะหล่ำปลีดอง แล้วทำการวัดพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ พบว่าอาหารหมักดองในแต่ละพื้นที่จะมีค่าพีเอชและค่าร้อยละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่แตกต่างกัน (ตารางที่ 6) โดยมีค่าพีเอชและความเค็มในช่วง 3.33-3.96 และ 2.4-8.2 ตามลำดับ ซึ่งตัวอย่างผักเสี้ยนดองจากอำเภอ เมือง จังหวัดนราธิวาสมีค่าพีเอชสูงสุด เท่ากับ 3.96 และตัวอย่างสะตอดองจากอำเภอ ศรีสาคร จังหวัดนราธิวาส มีค่าความเค็มสูงสุดเท่ากับ 8.2 ในขณะที่ตัวอย่างผักเสี้ยนดอง สะตอดอง และกะหล่ำปลีดองมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.3-3.9, 3.4-3.9 และ 3.6-3.7 ตามลำดับ ซึ่งพีเอชมีค่าใกล้เคียงกับตัวอย่างผักเสี้ยนดอง สะตอดอง และกะหล่ำปลีดองโดยมีพีเอชเท่ากับ 3.9, 3.72-3.79 และ 4.03-4.06 ตามลำดับ และค่าร้อยละความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 2.15, 3.7 และ 3.4 ตามลำดับ (ศิรินาถ, 2539) ยกเว้นของสะตอดอง พบว่า มีค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่สูงกว่า ส่วนตัวอย่างหน่อไม้ดอง ซึ่งเป็นตัวอย่างจากจังหวัดปัตตานีมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.4-3.6 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับผลการวิจัยโดย Maneesri and Masniyom (2007) ซึ่งมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.4-4.4 เมื่อเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช, 2549) ของผักเสี้ยนดอง สะตอดอง หน่อไม้ดองและกะหล่ำปลีดองพบว่ามีค่าพีเอชน้อยกว่า 4.0 ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน

4.2 การคัดแยกคิลเลอร์ยีสต์และทำให้บริสุทธิ์

การคัดแยกยีสต์ให้บริสุทธิ์

น้ำหมักของตัวอย่างอาหารหมักดองจากพืชในข้อ 3.1 เมื่อนำมาคัดแยกเชื้อยีสต์ โดยทำการลากบนอาหารแข็ง YPD ที่ปรับพีเอชเป็น 5.0 และสุ่มเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ 8-10 โคโลนีต่อตัวอย่าง ได้เชื้อยีสต์ทั้งหมด 82 โอโซเลต โดยกำหนดรหัสของเชื้อที่คัดแยกได้ดังนี้ คือ W แทนโคโลนีของตัวอย่างผักเสี้ยนดอง, S แสดงตัวอย่างของสะตอดอง, B แทนโคโลนีของตัวอย่างหน่อไม้ดอง และ C แทนตัวอย่างของโคโลนีของกะหล่ำปลีดอง โดยแสดงทั้งหมดได้ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ชนิดของตัวอย่าง แหล่งที่มา พีเอช และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของน้ำหมักอาหารหมักดองจากพืช

ชนิดของตัวอย่าง	แหล่งที่มา	pH	ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (%)
ผักเสี้ยนดอง	อำเภอ เมือง จังหวัดปัตตานี	3.33	2.4
ผักเสี้ยนดอง	อำเภอ เมือง จังหวัดนราธิวาส	3.96	2.6
สะตอดอง	อำเภอ ระแงะ จังหวัดนราธิวาส	3.92	7.8
สะตอดอง	อำเภอ ศรีสาคร จังหวัดนราธิวาส	3.49	8.2
หน่อไม้ดอง	อำเภอ เมือง จังหวัดปัตตานี	3.81	3.8
หน่อไม้ดอง	อำเภอ โคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี	3.69	3.8
หน่อไม้ดอง	อำเภอ โคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี	3.41	6.0
กะหล่ำปลีดอง	อำเภอ เมือง จังหวัดปัตตานี	3.66	4.2
กะหล่ำปลีดอง	อำเภอ เมือง จังหวัด ปัตตานี	3.70	4.0

ตารางที่ 8 กำหนดรหัสของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำหมักอาหารหมักดองจากพืช

ชนิดของตัวอย่าง	รหัส
ผักเสี้ยนดอง	W01, W02, W03, W04, W05, W06, W07, W08, W09, W10
ผักเสี้ยนดอง	W11, W12, W13, W14, W15,W16, W17, W18, W19, W20
สะตอดอง	S01, S02, S03, S04, S05, S06, S07, S08, S09, S10
สะตอดอง	S11, S12, S13, S14, S15, S16, S17 , S18
หน่อไม้ดอง	B01, B02, B03, B04, B05, B06, B07, B08
หน่อไม้ดอง	B09 B10, B11, B12, B13, B14, B15, B16
หน่อไม้ดอง	B17, B18, B19, B20, B21, B22, B23, B24
กะหล่ำปลีดอง	C01, C02, C03, C04, C05, C06, C07, C08, C09 , C10, C11, C12
กะหล่ำปลีดอง	C13, C14, C15, C16, C17, C18, C19, C20

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.3 ผลการทดสอบการเป็นคิลเลอร์ยีสต์ต่อยีสต์ที่มีความว่องไว

นำยีสต์ที่คัดแยกได้จำนวน 82 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวต่อการถูกทำลายได้แก่ *Candida tropicalis* TISTR 5045**,** *Hansenula anomala* TISTR 5113**,** *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020**,** *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 และ*Torulopsis glabrata* TISTR 5241 โดยตรวจสอบบริเวณรอบๆ โคโลนีของเชื้อที่คัดแยกได้ ซึ่งเกิดเป็นลักษณะสีฟ้ารอบๆ (Vadkertiova and Slavikova, 2007) เนื่องจากเซลล์ยีสต์ที่มีความว่องไวต่อการถูกทำลายตายทำให้องค์ประกอบภายในหลั่งออกมาภายนอกเซลล์และดูดซับสี methylene blue จึงทำให้เกิดสีฟ้า (รูปที่ 9) แสดงว่าเชื้อที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไว จากการทดลองพบว่า ยีสต์ที่คัดแยกได้สามารถยับยั้งเชื้อที่ใช้ในการทดสอบได้แตกต่างกัน โดยมีสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไว 4-5 สายพันธุ์ จำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ W02, W03, W06, W07, W09, W10, C07, C09, C10, C12, B17, B18 และ B19 (ตารางที่ 9) ส่วนยีสต์ที่คัดแยกได้จำนวน 69 ไอโซเลตมีความสามารถยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวได้น้อยกว่า 3 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับผลการทดสอบการเป็นคิลเลอร์ยีสต์ของ *Hansanula* sp.*, Kloeckera* sp. และ *Trichosporon* sp. ต่อการยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวชนิด *T. glabrata* (ปราโมทย์ และ จิราภรณ์, 2533) ความสามารถในการยับยั้งเชื้อที่มีความว่องไวของคิลเลอร์ยีสต์ *C. tropicalis* ที่คัดแยกจากอุตสาหกรรมขนมปังของประเทศตุรกีต่อการยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไว *S. cerevisiae* โดยมีลักษณะสีฟ้ารอบๆ คิลเลอร์ยีสต์ (Izgu *et al*., 1997) เช่นเดียวกับรายงานของ Hernandez *et al*. (2008) คิลเลอร์ยีสต์ที่คัดแยกได้จากมะกอกดองได้แก่ *Candida, Debaryomyces, Kluyveromyces, Pichia* และ *Saccharomyces* มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. cerevisiae* ซึ่งคิลเลอร์ยีสต์เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการแสดงคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้โดยมีการปลดปล่อยสารที่เรียกว่า คิลเลอร์ท็อกซินออกมาภายนอกเซลล์แล้วสามารถยับยั้งสายพันธุ์ที่มีความว่องไวต่อการถูกทำลาย ในขณะที่เชื้อนี้มีความคงทนต่อท็อกซินที่ตัวเองสร้างขึ้น (Marquina *et al.,* 2002)

Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 9 ลักษณะการเกิดการยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวของคิลเลอร์ยีสต์

Prince of Songkla University
Pattani Campus

ตารางที่ 9 การยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืชในอาหาร YPD ที่ไม่เติมและเติมโซเดียมคลอไรด์

Isolate yeast	Killer activity against									
	***S. cerevisiae* TISTR 5020**		***C. tropicalis* TISTR 5045**		***H. anomala* TISTR 5113**		***T. glabrata* TISTR 5241**		***S. cerevisiae* TISTR 5055**	
	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %
W 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
W 03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
W 04	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
W 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 06	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
W 07	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
W 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 09	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
W 10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ : + = เกิดการยับยั้ง

- = ไม่เกิดการยับยั้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 9 การยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืชในอาหาร YPD ที่ไม่เติมและเติมโซเดียมคลอไรด์ (ต่อ)

Isolate yeast	Killer activity against									
	***S. cerevisiae* TISTR 5020**		***C. tropicalis* TISTR 5045**		***H. anomala* TISTR 5113**		***T. glabrata* TISTR 5241**		***S. cerevisiae* TISTR 5055**	
	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %
W 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
W 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = เกิดการยับยั้ง

- = ไม่เกิดการยับยั้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 9 การยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืชในอาหาร YPD ที่ไม่เติมและเติมโซเดียมคลอไรด์(ต่อ)

Isolate yeast	Killer activity against									
	***S. cerevisiae* TISTR 5020**		***C. tropicalis* TISTR 5045**		***H. anomala* TISTR 5113**		***T. glabrata* TISTR 5241**		***S. cerevisiae* TISTR 5055**	
	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %
C 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 02	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
C 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 07	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
C 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 09	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
C 10	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+

หมายเหตุ : + = เกิดการยับยั้ง

- = ไม่เกิดการยับยั้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 9 การยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืชในอาหาร YPD ที่ไม่เติมและเติมโซเดียมคลอไรด์(ต่อ)

Isolate yeast	Killer activity against									
	S. cerevisiae TISTR 5020		*C. tropicalis* TISTR 5045		*H. anomala* TISTR 5113		*T. glabrata* TISTR 5241		*S. cerevisiae* TISTR 5055	
	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %
C 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 12	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
C 13	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
C 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 17	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
C 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = เกิดการยับยั้ง

- = ไม่เกิดการยับยั้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 9 การยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืชในอาหาร YPD ที่ไม่เติมและเติมโซเดียมคลอไรด์(ต่อ)

Isolate yeast	Killer activity against									
	***S. cerevisiae* TISTR 5020**		***C. tropicalis* TISTR 5045**		***H. anomala* TISTR 5113**		***T. glabrata* TISTR 5241**		***S. cerevisiae* TISTR 5055**	
	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %
B 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 04	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-
B 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = เกิดการยับยั้ง

- = ไม่เกิดการยับยั้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 9 การยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืชในอาหาร YPD ที่ไม่เติมและเติมโซเดียมคลอไรด์ (ต่อ)

Isolate yeast	Killer activity against									
	***S. cerevisiae* TISTR 5020**		***C. tropicalis* TISTR 5045**		***H. anomala* TISTR 5113**		***T. glabrata* TISTR 5241**		***S. cerevisiae* TISTR 5055**	
	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %
B 11	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-
B 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
B 14	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
B 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 17	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
B 18	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
B 19	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
B 20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = เกิดการยับยั้ง

- = ไม่เกิดการยับยั้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 9 การยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืชในอาหาร YPD ที่ไม่เติมและเติมโซเดียมคลอไรด์ (ต่อ)

Isolate yeast	Killer activity against									
	***S. cerevisiae* TISTR 5020**		***C. tropicalis* TISTR 5045**		***H. anomala* TISTR 5113**		***T. glabrata* TISTR 5241**		***S. cerevisiae* TISTR 5055**	
	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %
B 22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 01	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 04	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 06	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 07	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 08	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = เกิดการยับยั้ง

- = ไม่เกิดการยับยั้ง

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 9 การยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืชในอาหาร YPD ที่ไม่เติมและเติมโซเดียมคลอไรด์ (ต่อ)

Isolate yeast	Killer activity against									
	***S. cerevisiae* TISTR 5020**		***C. tropicalis* TISTR 5045**		***H. anomala* TISTR 5113**		***T. glabrata* TISTR 5241**		***S. cerevisiae* TISTR 5055**	
	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %	NaCl 0 %	NaCl 3 %
S 09	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S 18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

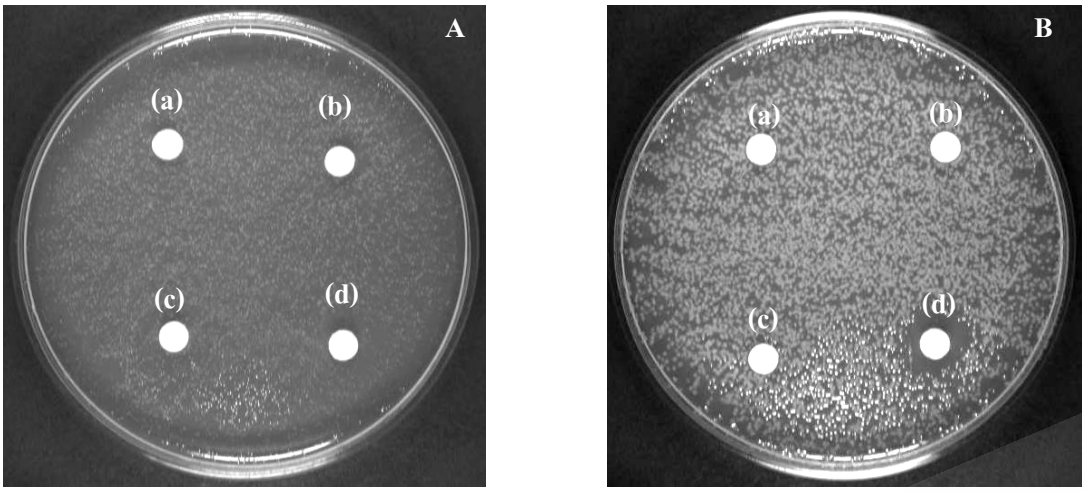
หมายเหตุ : + = เกิดการยับยั้ง

- = ไม่เกิดการยับยั้ง

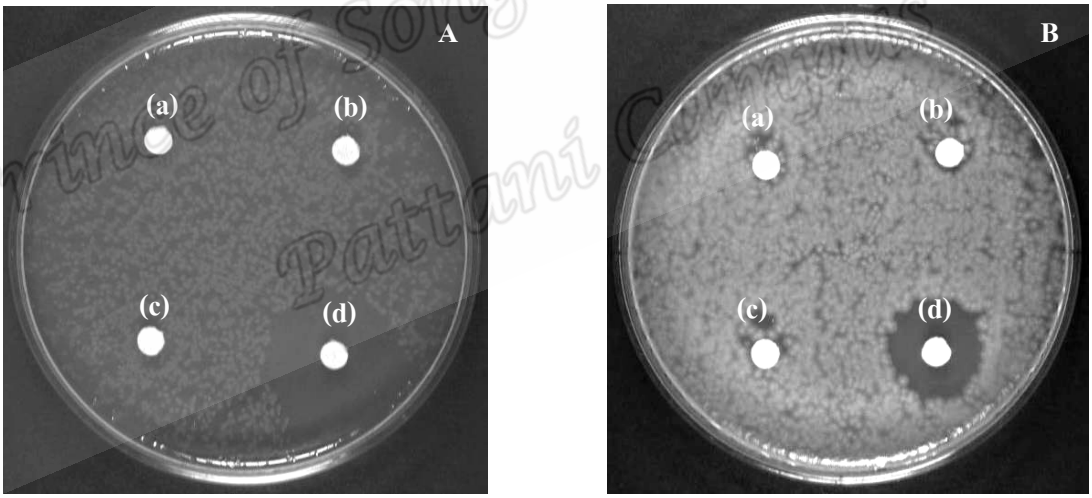
Prince of Songkla University Pattani Campus

4.4 ผลการทดสอบยีสต์ที่เป็นคิลเลอร์ยีสต์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

คัดเลือกยีสต์จากตัวอย่างผักดองที่สามารถยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวทั้ง 13 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 868 โดยใช้เอทานอลร้อยละ 70 เป็นชุดควบคุม พบว่า ยีสต์ที่สามารถคัดแยกได้จำนวน 6 ไอโซเลต จากผักเสี้ยนดอง ได้แก่ W02, W03, W06, W07, W09 และ W10 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 868 ได้สูงสุด คือ W02, W09, W03 และ W09 หรือ W10 ตามลำดับ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งเท่ากับ 9.2, 11.0, 6.7 และ 9.0 มิลลิเมตรตามลำดับ (รูปที่ 10 และ 11) ซึ่งคิดเป็นร้อยละการยับยั้งได้เท่ากับ 56.4, 63.5, 38.4 และ 48.8 ดังตารางที่ 10 ในขณะที่ชุดควบคุม (เอทานอลร้อยละ 70) มีค่าการยับยั้งมากกว่า (รูปที่ 12) โดยสามารถยับยั้งและมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 16.3, 17.3, 17.4 และ 18.4 มิลลิเมตรตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสารละลายคิลเลอร์ที่ใช้ในการทดสอบเป็นชนิดอย่างหยาบซึ่งมีปริมาณของโปรตีนท็อกซินที่ไม่เข้มข้นจึงทำให้เกิดการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้น้อย แต่อย่างไรก็ตามผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคพบว่า บริเวณใสที่เกิดขึ้นยังคงมีโคโลนีเล็กๆ กระจายอยู่ด้วยแต่มีปริมาณที่น้อยกว่าบริเวณที่ไม่เกิดการยับยั้ง ซึ่งผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่ได้นี้สอดคล้องกับการศึกษาความสามารถของคิลเลอร์ยีสต์สายพันธุ์ *Hansenula, Pichia, Candida* และ *Saccharomyces* ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้แก่ *S. aureua* และ *E. coli* (Polonelli and Morace, 1986) คิลเลอร์ยีสต์ ได้แก่ *Hansenula anamola, Hansenula mrakii, Candida tropicalis, Kluyveromyces drosphilarum* และ *Kluyveromyces lactis* สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิดแกรมลบและแกรมบวก (Izgu *et al,* 1997) นอกจากนี้จากการทดลองสารละลายคิลเลอร์ที่ได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่า เนื่องจากผลของหลายปัจจัยร่วมกัน ได้แก่ สารละลายคิลเลอร์ซึ่งเป็นสารละลายที่ได้ภายหลังการเลี้ยงเชื้อ ความเป็นกรดของสารละลายคิลเลอร์ (4.45-4.83) และสารอื่นๆ ที่ปนอยู่ทำให้ไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัด จึงควรมีการทำสารละลายคิลเลอร์ให้บริสุทธิ์ในการศึกษาต่อไป



รูปที่ 10 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิด *E. coli* TISTR 887 (A) และ *S. aureus* TISTR 118 (B) ด้วยคิลเลอร์ท็อกซินจากยีสต์ (a) W 02 (b) W 03 (c) W 06 และ (d) เอทานอลร้อยละ 70



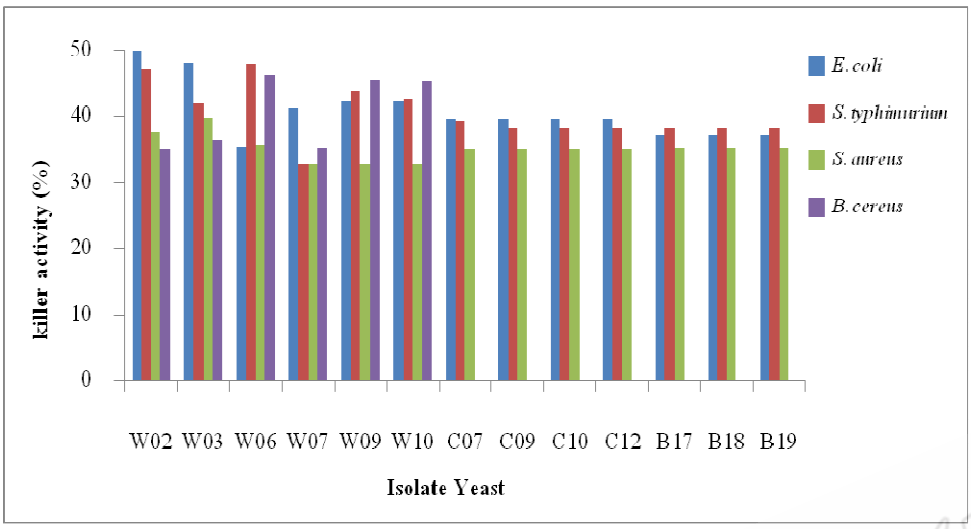
รูปที่ 11 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิด *S. typhimurium* TISTR 292 (A) และ *B. cereus* TISTR 867 (B) ด้วยคิลเลอร์ท็อกซินจากยีสต์ (a) W 07 (b) W 09 (c) W 10 และ (d) เอทานอลร้อยละ 70

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 10 ความสามารถในการเกิดกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยคิลเลอร์ท็อกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ

killer yeast	*E. coli* TISTR 887		*S. typhimurium* TISTR 292		*S. aureus* TISTR 118		*B. cereus* TISTR 867	
	clear zone (mm)	killer activity (%)	clear zone (mm)	killer activity (%)	clear zone (mm)	killer activity (%)	clear zone (mm)	killer activity (%)
W02	9.2 ± 0.79	56.4 ± 5.82	9.3 ± 0.76	53.8 ± 4.41	6.3 ± 0.58	36.4 ± 3.35	6.6 ± 0.52	35.7 ± 3.82
W03	8.8 ± 0.29	54.3 ± 0.72	8.3 ± 0.58	48.1 ± 3.55	6.7 ± 0.58	38.4 ± 7.33	6.8 ± 0.72	37.1 ± 3.60
W06	6.5 ± 0.00	40.0 ± 1.50	9.5 ± 0.87	54.8 ± 5.11	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	8.7 ± 0.58	47.1 ± 5.88
W07	6.3 ± 0.29	39.0 ± 2.37	8.2 ± 1.44	47.1 ± 6.29	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	7.0 ± 1.00	38.0 ± 3.32
W09	6.5 ± 0.00	40.0 ± 0.81	11.0 ± 0.87	63.5 ± 2.77	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	9.0 ± 1.32	48.8 ± 7.91
W10	6.5 ± 0.00	40.0 ± 0.81	10.7 ± 0.29	61.7 ± 1.42	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	9.0 ± 1.00	48.8 ± 5.10
C07	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	6.5 ± 0.50	37.5 ± 1.58	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
C09	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	6.3 ± 0.29	36.5 ± 0.27	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
C10	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	6.3 ± 0.29	36.5 ± 0.27	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
C12	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	6.3 ± 0.29	36.5 ± 0.27	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
B17	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
B18	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
B19	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00	0.0 ± 0.00
Control	16.3 ± 0.75	100.0 ± 0.00	17.3 ± 0.29	100.0 ± 0.00	17.4 ± 2.00	100.0 ± 0.00	18.4 ± 1.15	100.0 ± 0.00

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 12 การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอลร้อยละ 70

4.5 ผลการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินจากสายพันธุ์ที่แยกได้

4.5.1 ชนิดของอาหาร

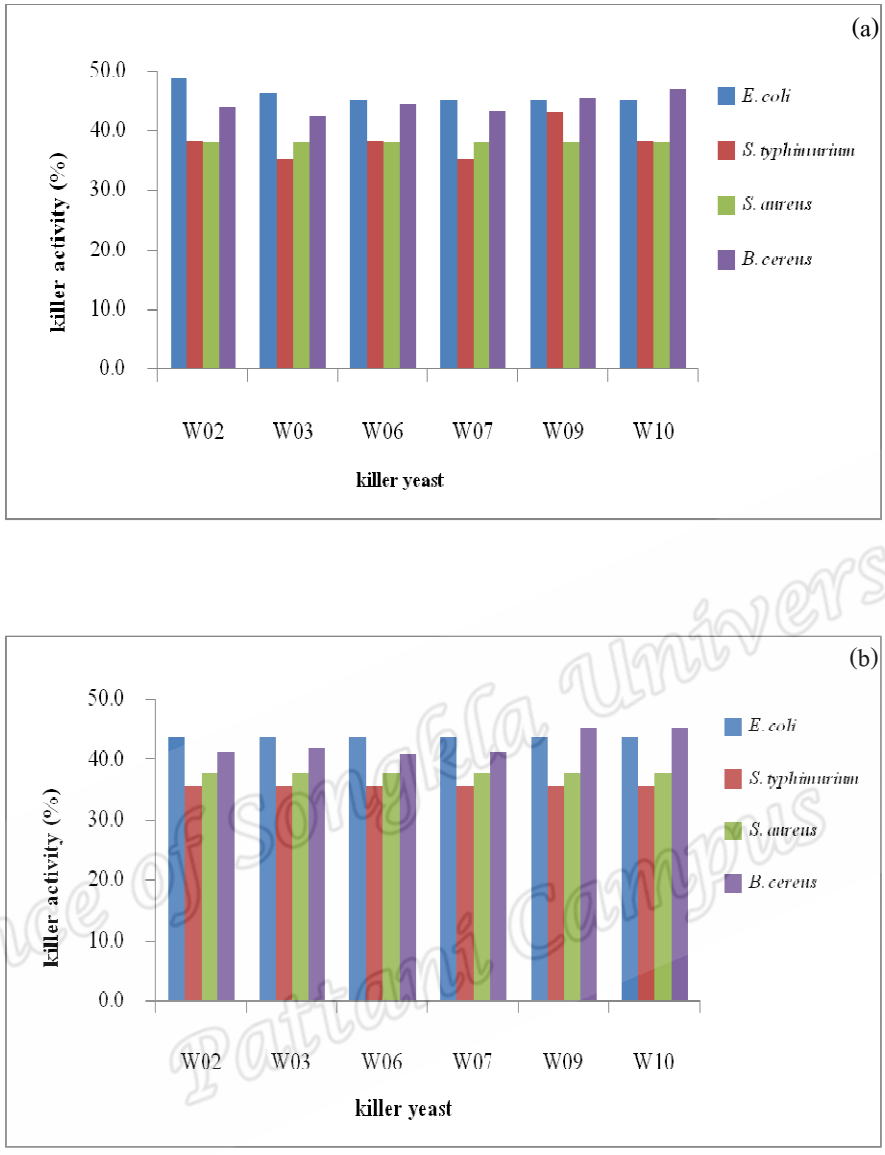
ผลของการเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W02, W03, W06, W07, W09 และ W10 ในอาหารเหลว 2 ชนิด ได้แก่ YPD และ Modified Sabouraud ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 และเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาสเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตคิลเลอร์ท็อกซิน และทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 867 พบว่าคิลเลอร์ยีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลต สามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้ทุกสายพันธุ์โดยอาหารทั้งสองชนิดให้ความสามารถในการเกิดกิจกรรมการยับยั้งที่ไม่แตกต่างกัน แต่ในอาหาร YPD ให้กิจกรรมการยับยั้งได้ดีกว่าอาหาร Modified Sabouraud (รูปที่ 13) คิลเลอร์ยีสต์ที่สามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้ง *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 867 ได้ดี คือ W 02, W 09, W 10 และ ทุกไอโซเลตให้ผลการยับยั้ง *S. aureus* TISTR 118 ได้เท่ากัน โดยให้ร้อยละการยับยั้งเท่ากับ 48.8, 43.1, 47.0 และ 38.10 ตามลำดับ ส่วนกิจกรรมการยับยั้งของคิลเลอร์ท็อกซินที่เลี้ยงในอาหาร Modified Sabouraud Broth เท่ากับร้อยละ 43.9, 35.6, 45.5 และ 37.9 ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากรายงานของ Criseo *et al*. (1999) ซึ่งรายงานว่ากิจกรรมการยับยั้ง *Cryptococcus neoformans* var. ชนิด A ของคิลเลอร์ยีสต์สายพันธุ์ *C. parapsilosis, C. famata, C. albicans, C. guilliermondii, Rhodotorula rubra, Cr. Laurentii, Cr. Uniguttulatus, P. carsonii* และ *Cryptococcus* spp. บนอาหาร Modified

Prince of Songkla University Pattani Campus

Sabouraud glucose agar (MSDA) และ yeast extract-peptone-glucose-agar (YEPDA) ที่พีเอช 4.6 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MSDA จะให้ผลการเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ดีกว่าในอาหาร YEPDA เนื่องจากคิลเลอร์ยีสต์ที่ศึกษาความเหมาะสมต่ออาหารชนิด MSDA

ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD จึงมีความเหมาะสมต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซิน เนื่องจากอาหาร YPD (glucose ร้อยละ 2, peptone ร้อยละ 2 และ yeast extract ร้อยละ 1) มีสัดส่วนขององค์ประกอบของอาหารมากกว่าอาหาร Modified Sabouraud Broth (peptone from meat ร้อยละ0.5, peptone from casein ร้อยละ 0.5 และ glucose ร้อยละ 2) จากองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจะเห็นว่าแหล่งไนโตรเจนในอาหาร YPD มีปริมาณมากกว่าอาหาร Modified Sabouraud Broth ซึ่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่ยีสต์ใช้ในการเจริญเติบโตและผลิตโปรตีน ส่วนองค์ประกอบอื่นๆ เป็นแหล่งที่ยีสต์ใช้ในการเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณเซลล์ให้มากขึ้น เช่นเดียวกับการเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ *Zygosaccharomyces bailii* ชนิด cymocin ที่มีผลต่อการยับยั้งยีสต์และราก่อโรคในอาหาร YEPC (yeast extract peptone glucose) เติมกรด citric ลงในอาหาร (Weiler and Schmitt, 2003) และการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินด้วยยีสต์ *C. nodaensis* ในอาหารเหลว YPD (glucose ร้อยละ 2, bacto peptone ร้อยละ 1 และ yeast extract ร้อยละ 2) ที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 (Da Silva *et al*., 2008) รวมทั้งการเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ในการหมักน้ำองุ่นโดยเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์เริ่มต้นในอาหารเหลว YPD ซึ่งประกอบด้วย glucose ร้อยละ 2, peptone ร้อยละ 2 และ yeast extract ร้อยละ 1 ในการผลิตคิลเลอร์ท็อกซิน (Petering *et al*., 1991)

Prince of Songkla University Pattani Campus



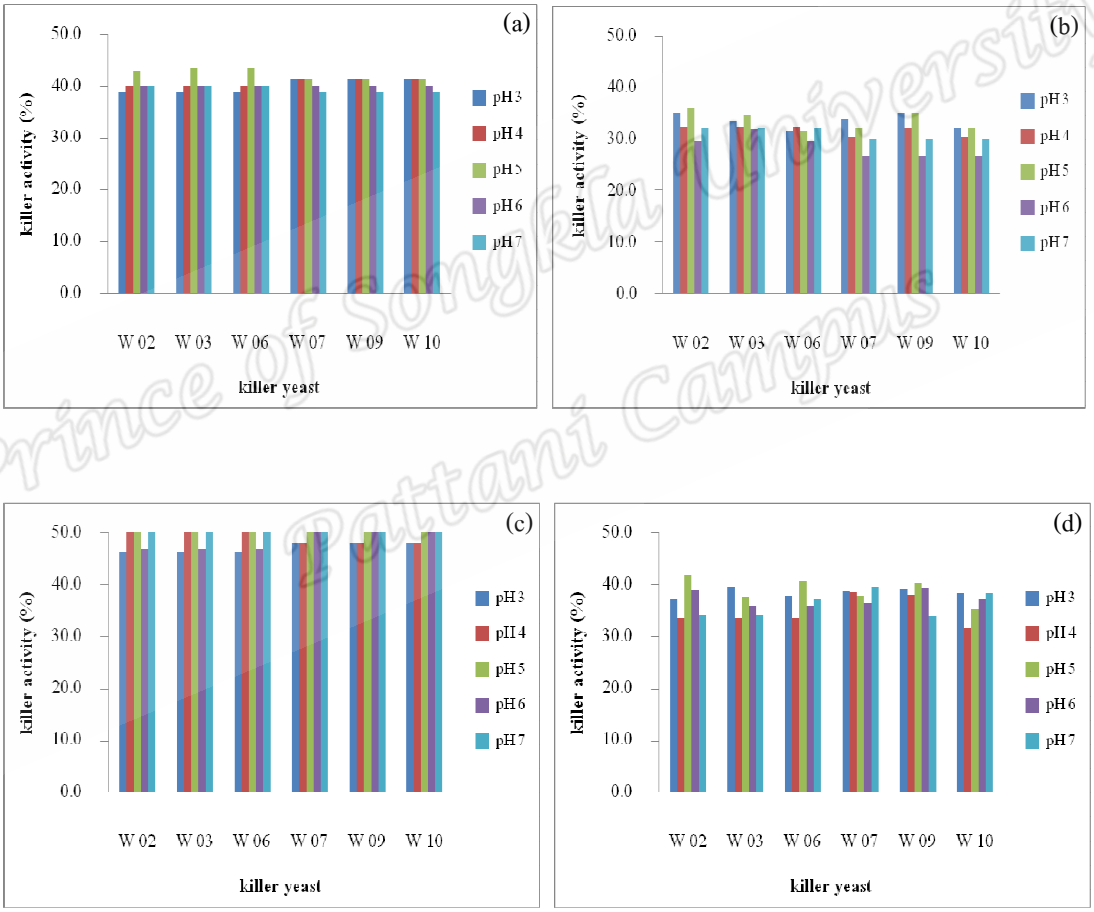
Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 13 ความสามารถของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยคิลเลอร์ท็อกซินไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YPD (a) และ Modified Sabuuraud (b)

4.5.2 พีเอช

ผลของการเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W02, W03, W06, W07, W09 และ W10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ปรับพีเอชเป็น 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริค (HCl) 1 N เขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินที่พีเอชต่างๆ และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 867 (รูปที่ 14) พบว่า คิลเลอร์ยีสต์สามารถผลิตคิลเลอร์ท็อกซินได้ดีที่พีเอชเท่ากับ 5.0 เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการเกิดกิจกรรมการยับยั้งพบว่า ไอโซเลตของคิลเลอร์ยีสต์ที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิด *E. coli* TISTR 887 ได้สูงที่สุดได้แก่ W03 และ W06 มีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 43.5 ในขณะที่ไอโซเลต W02, W07, W09 และ W10 สามารถยับยั้งได้ใกล้เคียงโดยมีค่าการยับยั้งอยู่ในช่วงร้อยละ 41.4-42.9 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* TISTR 292 ได้สูงที่สุดได้แก่ W02 มีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 36.0 และไอโซเลต W03 และ W09 มีค่าการยับยั้งที่ใกล้เคียงกับ W02 มีค่าการยับยั้งอยู่ในช่วงร้อยละ 34.6-35.3 ส่วนไอโซเลตที่มีการยับยั้งน้อยที่สุด ได้แก่ W06, W07 และ W10 มีค่าการยับยั้งอยู่ในช่วง 31.6-32.1 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* TISTR 118 ได้สูงที่สุดได้แก่ W 02, W03 และ W06 มีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 53.7 ส่วน W07, W09 และW10 มีค่าการยับยั้งที่ใกล้เคียงกัน (ร้อยละ 52.9) ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *B. cereus* TISTR 867 ได้สูงที่สุดได้แก่ W02 มีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 41.8 และไอโซเลตที่มีการยับยั้งที่ใกล้เคียงได้แก่ W02, W06, W07 และ W09 มีค่าการยับยั้งอยู่ในช่วงร้อยละ 37.8-40.8 ส่วนไอโซเลต W10 มีค่าการยับยั้งที่น้อยที่สุด (ร้อยละ 35.2) ส่วนที่ระดับพีเอช 3.0, 4.0, 6.0 และ 7.0 เกิดกิจกรรมการยับยั้งได้น้อยกว่าที่ระดับพีเอช 5.0 เนื่องจากค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันโดยส่วนใหญ่ยีสต์เจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่มีความเป็นกรดเท่ากับ 3.5-5.0 ดังเช่นรายงานของ Chen *et al.* (2000) ได้ศึกษาการคัดแยก การทำให้บริสุทธิ์ และคุณสมบัติของคิลเลอร์โปรตีนจาก *Schwanniomyces occidentalis* โดยเลี้ยงในอาหาร YEPD พีเอชเริ่มต้นเป็น 4.6 และมีกิจกรรมยับยั้ง *S. cerevisiae* ในช่วงพีเอชเท่ากับ 2.0-5.5 พบว่าคิลเลอร์ท็อกซินสามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ดีที่สุดในช่วงพีเอช 4.2-4.8 การเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ในอาหารต่างๆ ต้องคำนึงถึงค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารโดยจะต้องให้อยู่ในช่วงค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญซึ่งนำไปสู่ความสามารถในการผลิตสารต่างๆ ของคิลเลอร์ยีสต์ด้วย (ธีรพร, 2546) ในทำนองเดียวกับการเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ *Kluyveromyces phaffii* ในอาหาร YPD พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ให้ผลการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินที่สามารถยับยั้ง apiculate wine yeast (Ciani and Fatichenti, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับการเลี้ยง *Pichia anomala* NCYC 434 ใน

อาหาร YPD ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ด้วย 100 mM citrate-phosphate buffer สามารถผลิตคิลเลอร์ท็อกซินที่สามารถยับยั้งยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ (Izgu *et al*., 2005) เช่นเดียวกับรายงานของ Buzzini *et al.* (2004) เลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 ในอาหาร KM (yeast extract ร้อยละ 1, peptone ร้อยละ 2 และ glucose ร้อยละ 2) ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และรายงานของ Izgu *et al.* (1997) ได้เลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ *C. tropicalis* ในอาหาร YEPD ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 พบว่าให้ผลการยับยั้ง *S. cerevisiae* ได้ แต่อย่างไรก็ตาม นอกจากค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตแล้วค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคก็มีผลต่อการส่งเสริมให้เกิดการยับยั้งดีขึ้นด้วยเช่นกัน



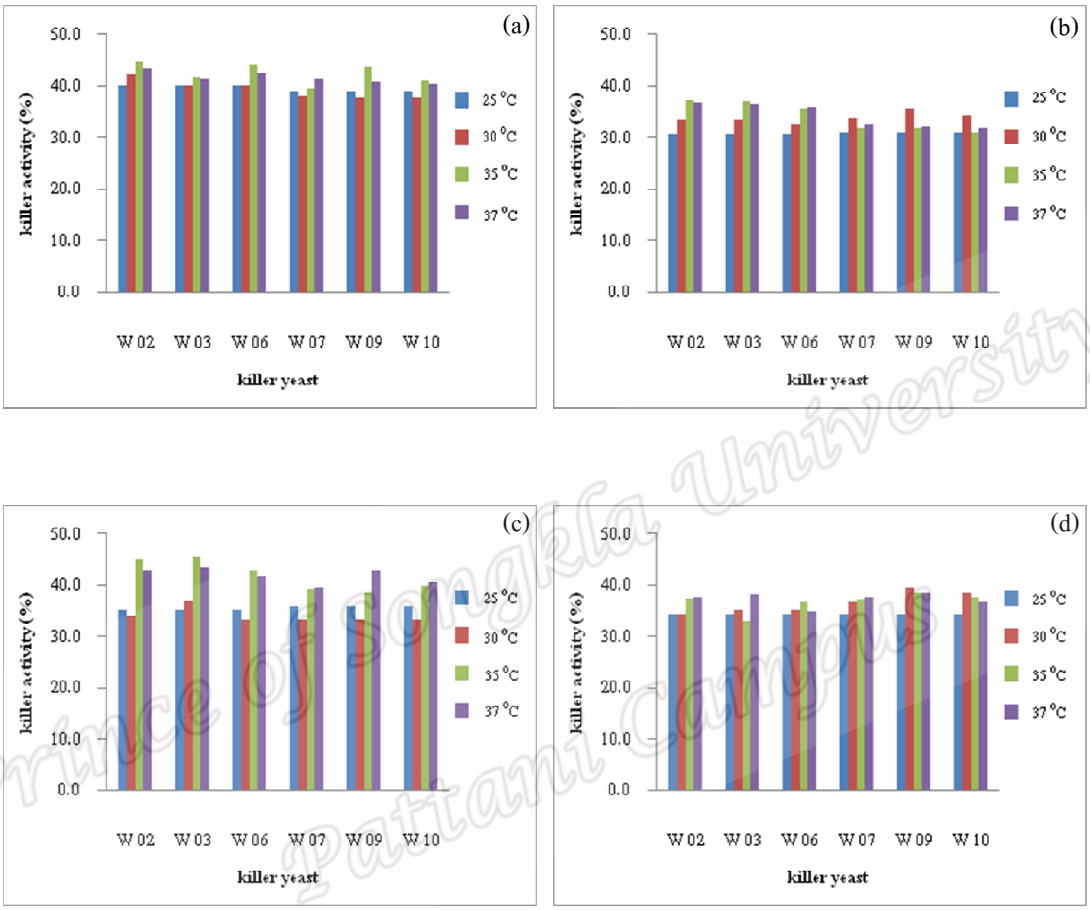
รูปที่ 14 ความสามารถของกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิด *E. coli* TISTR 887 (a), *S. typhimurium* TISTR 292 (b), *S. aureus* TISTR 118 (c) และ *B. cereus* TISTR 867 (d) ด้วยคิลเลอร์ท็อกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่าง ๆ ที่เลี้ยงในอาหาร YPD พีเอชต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.5.3 อุณหภูมิ

ผลของการเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W02, W03, W06, W07, W09 และ W10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ปรับพีเอชเป็น 5.0 แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารบนอาหารแข็ง NA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตคิลเลอร์ท็อกซิน (รูปที่ 15) พบว่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีความเหมาะสมต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซิน โดยคิลเลอร์ท็อกซินที่สามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิด *E. coli* TISTR 887 สูงที่สุดได้แก่ W02 โดยเกิดกิจกรรมการยับยั้งร้อยละ 44.7 นอกจากนี้ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งได้ใกล้เคียงกับ W02 มี 2 ไอโซเลตได้แก่ W06, และ W09 โดยมีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 43.7-44.2 ส่วนไอโซเลต W03, W07 และ W10 มีค่าการยับยั้งที่น้อยกว่า (ร้อยละ 39.5-41.6) ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* TISTR 292 ได้สูงที่สุดได้แก่ W02 มีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 37.3 และไอโซเลตที่มีค่าการยับยั้งที่ใกล้เคียงได้แก่ W03 และ W06 มีค่าอยู่ในช่วงร้อยละ 35.8-36.9 ส่วน W07, W09 และ W10 มีค่าการยับยั้งที่น้อยกว่า อยู่ในช่วงร้อยละ 31.1-31.9 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* TISTR 118 ได้สูงที่สุดได้แก่ W03 และไอโซเลตที่มีค่าการยับยั้งใกล้เคียงกับ W03 ได้แก่ W02 และ W06 มีค่าการยับยั้งอยู่ในช่วงร้อยละ 43.0-45.2 ส่วนไอโซเลต W07, W09 และ W10 มีค่าการยับยั้งที่น้อยกว่าโดยอยู่ในช่วง 38.5-39.9 และไอโซเลตที่สามารถยับยั้ง *B. cereus* TISTR 867 ได้สูงที่สุด ได้แก่ W09 มีค่าการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 38.7 ไอโซเลตที่มีค่าการยับยั้งใกล้เคียงกับ W09 ได้แก่ W02, W06, W07 และ W10 มีค่าการยับยั้งอยู่ในช่วงร้อยละ 36.6-37.7 ส่วน W03 มีค่าการยับยั้งที่น้อยที่สุด (ร้อยละ 33.2) จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินของคิลเลอร์ยีสต์ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่ทำการเก็บตัวอย่างและคัดแยกเชื้อเริ่มต้น และเนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีอากาศร้อนตลอด คิลเลอร์ยีสต์ที่คัดแยกได้จึงสอดคล้องและเหมาะสมที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ดังนั้นความสามารถในการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินในแต่ละพื้นที่จึงมีความแตกต่างกัน เช่นเดียวกับการเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่าคิลเลอร์ท็อกซินที่ได้สามารถเกิดการยับยั้ง *Candida tropicalis* ที่ปนเปื้อนในการผลิตกล้าเชื้อได้ (Izgu *et al.*, 1997) เช่นเดียวกับการเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลว YEPD ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พบว่า คิลเลอร์ท็อกซินเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ (Soares and Sato, 2000) และการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ *C. nodaeensis* ในอาหาร YPD เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันสามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้ง *S. cerevisiae* และ *P. guilliermondii* (Da Silva *et al*., 2008) นอกจากนี้แล้วที่อุณหภูมิที่มากกว่าหรือน้อยกว่า 25 องศาเซลเซียส ก็สามารถผลิตคิลเลอร์

ท็อกซินได้เช่นเดียวกัน ดังรายงานของ Redler *et al.* (1993) *Zygosaccharomyces bailii* โดยเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ในอาหาร YEP ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้เช่นเดียวกัน

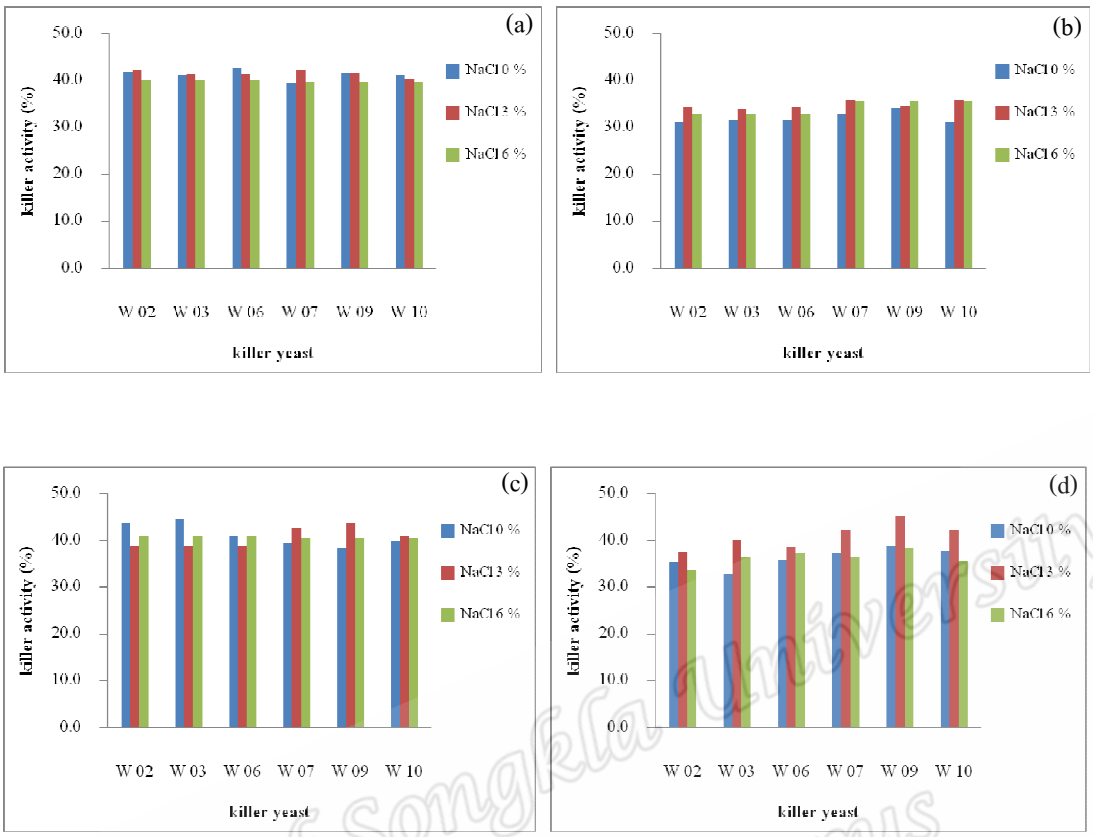


รูปที่ 15 ความสามารถของกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิด *E. coli* TISTR 887 (a), *S. typhimurium* TISTR 292 (b), *S. aureus* TISTR 118 (c) และ *B. cereus* TISTR 867 (d) ด้วยคิลเลอร์ท็อกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหาร YPD พีเอช 5.0 และเขย่าที่อุณหภูมิต่างๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.5.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์

ผลของการเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W02, W03, W06, W07, W09 และ W10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ร้อยละ 0, 3 และ 6 ปรับพีเอชเป็น 5.0 และเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำคิลเลอร์ท็อกซินมาทดสอบความสามารถในการเกิดกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 867 โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าคิลเลอร์ยีสต์ที่สามารถผลิตคิลเลอร์ท็อกซินได้ดีในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 โดยคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตที่สามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้งได้ดีที่สุด คือ W02, W07, W09 และ W09 จะเกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเท่ากับร้อยละ 42.3, 35.7, 43.8 และ 45.0 ตามลำดับ (รูปที่ 16) ในขณะที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0 และ 6 เกิดกิจกรรมการยับยั้งได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 จากผลการทดลองพบว่าความสามารถในการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินของคิลเลอร์ยีสต์จะสอดคล้องกับแหล่งที่นำมาคัดแยกเชื้อเริ่มต้นโดยจะเห็นว่าตัวอย่างผักเสี้ยนดองจะมีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เริ่มต้นร้อยละ 2.4-2.6 ซึ่งมีความใกล้เคียงกับร้อยละของโซเดียมคลอไรด์ที่นำมาศึกษาการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินผลการทดลองที่ได้และเป็นไปในแนวทางเดียวกับการทดลองของ El-Samragy and Zall (1987) ที่ทำการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อกิจกรรมของยีสต์ในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ พบว่ายีสต์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้นเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ความสามารถในการเจริญจะลดน้อยลง การเติมโซเดียมคลอไรด์ลงในอาหารแข็งเป็นอีกแนวทางที่ทำให้กิจกรรมการยับยั้งเพิ่มมากขึ้น ดังรายงานของ Llorente *et al.* (1997) ที่ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 3 และ 6 พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 สามารถเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งได้มากขึ้นที่สุด เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์จะทำให้เชื้ออ่อนแอ เจริญเติบโตได้น้อย จึงทำให้คิลเลอร์ท็อกซินสามารถเข้าไปทำลายให้เซลล์เกิดความเสียหายและตายในที่สุด แต่อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงในอาหารจะต้องอยู่ในปริมาณที่เหมาะสม ซึ่งจะเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นและนำไปสู่การผลิตคิลเลอร์ท็อกซินเพิ่มขึ้นด้วย ถ้าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์มากเกินพอจะทำให้เชื้อที่ใช้ในการทดสอบไม่สามารถเจริญเติบโตได้



รูปที่ 16 ความสามารถของกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิด *E. coli* TISTR 887 (a), *S. typhimurium* TISTR 292 (b), *S. aureus* TISTR 118 (c) และ *B. cereus* TISTR 867 (d) ด้วยคิลเลอร์ท็อกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหาร YPD พีเอช 5.0 เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละต่างๆ และเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

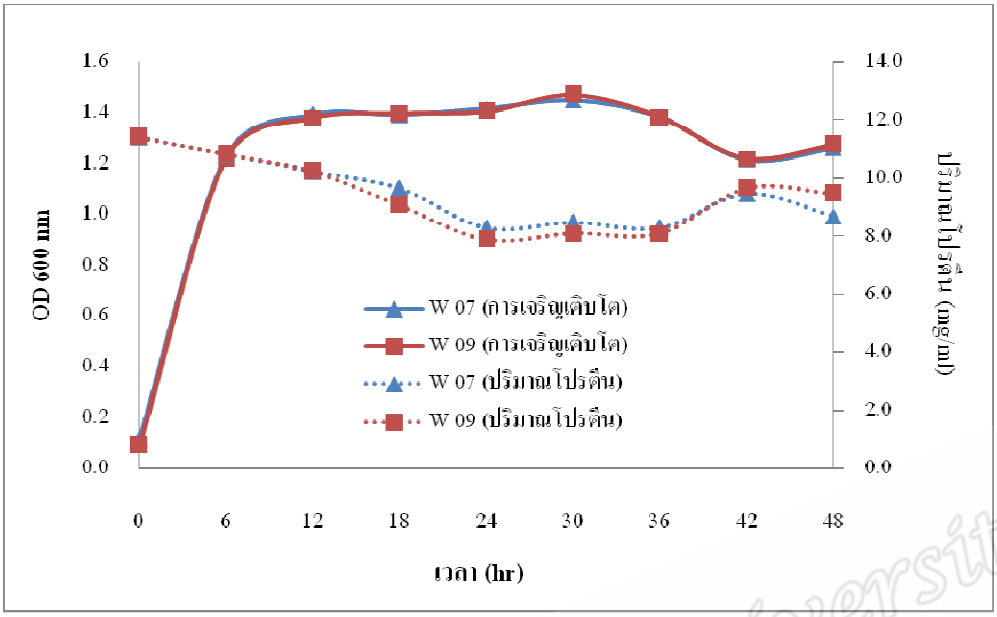
Prince of Songkla University Pattani Campus

4.5.5 ระยะเวลาที่เหมาะสม

จากการเลือกคิลเลอร์ยีสต์ที่สามารถเกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้หลายสายพันธุ์ พบว่าไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายสายพันธุ์ คือ W 07 สามารถยับยั้ง *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 867 และ W 09 สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 867 เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหาร YPD เติมเกลือร้อยละ 3 พีเอช 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญเติบโตจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน พบว่า คิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และW09 มีระยะการเจริญเติบโตที่เหมือนกัน โดยยีสต์มีการเติบโตอย่างรวดเร็ว (log phase) ในช่วงระยะเวลา 0 - 6 ชั่วโมง มีการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) ในช่วง 6-36 ชั่วโมง และหลังจาก

นั้นปริมาณเชื้อจะเริ่มลดลง (death phase) จากกราฟการเจริญเติบโตไม่สามารถปรากฏระยะการปรับตัวของเชื้อ (lag phase) ได้ เนื่องจากเชื้อเริ่มต้นที่ใช้มีการเตรียมโดยเลี้ยงในอาหารเอียง YPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำให้ไอโซเลต W07 และ W09 มีการปรับตัวและเจริญเติบโต ซึ่งอาจเป็นช่วง lag phase ที่โดยทั่วไปจะมีช่วงเวลาสั้นๆ เท่านั้น แล้วจึงนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลองต่อไป ส่วนปริมาณโปรตีนพบว่าในช่วงแรกของการเจริญเติบโตปริมาณโปรตีนของคิลเลอร์ยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลต จะมีปริมาณใกล้เคียงกัน โดยเวลา 0 ชั่วโมง จะมีปริมาณโปรตีนมากเท่ากับ 11,429.41 µg/ml และจะค่อยๆ ลดลง (รูปที่ 17) ปริมาณโปรตีนจะเริ่มลดลงเมื่อเวลามากขึ้น เนื่องมาจากช่วงแรกของการเจริญเติบโตคิลเลอร์ยีสต์มีการใช้โปรตีนในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณที่น้อยจึงทำให้ปริมาณโปรตีนที่ได้มีปริมาณมาก เมื่อคิลเลอร์ยีสต์มีการเจริญเติบโตมากขึ้นจึงมีการใช้แหล่งโปรตีนมากขึ้นจึงทำให้โปรตีนมีปริมาณลดลง ซึ่งคิลเลอร์ยีสต์มีการใช้โปรตีนในอาหารเพื่อใช้ในการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินแต่ปริมาณคิลเลอร์โปรตีนที่ได้อาจไม่เท่ากับปริมาณโปรตีนในตอนเริ่มต้น ซึ่งระยะการเจริญช่วง stationary phase จะเป็นช่วงที่มีสร้างคิลเลอร์ท็อกซินและเมื่อนำคิลเลอร์ท็อกซินมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารพบว่า ช่วง stationary phase (6-36 ชั่วโมง) มีกิจกรรมการยับยั้งที่ใกล้เคียงกัน โดยที่เวลา 24 ชั่วโมงมีกิจกรรมการยับยั้งมากที่สุด ดังตารางที่ 11

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 17 การเจริญเติบโตและปริมาณโปรตีนของคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และ W09 ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร YPD พีเอช 5.0 เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Prince of Songkla University Pattani Campus

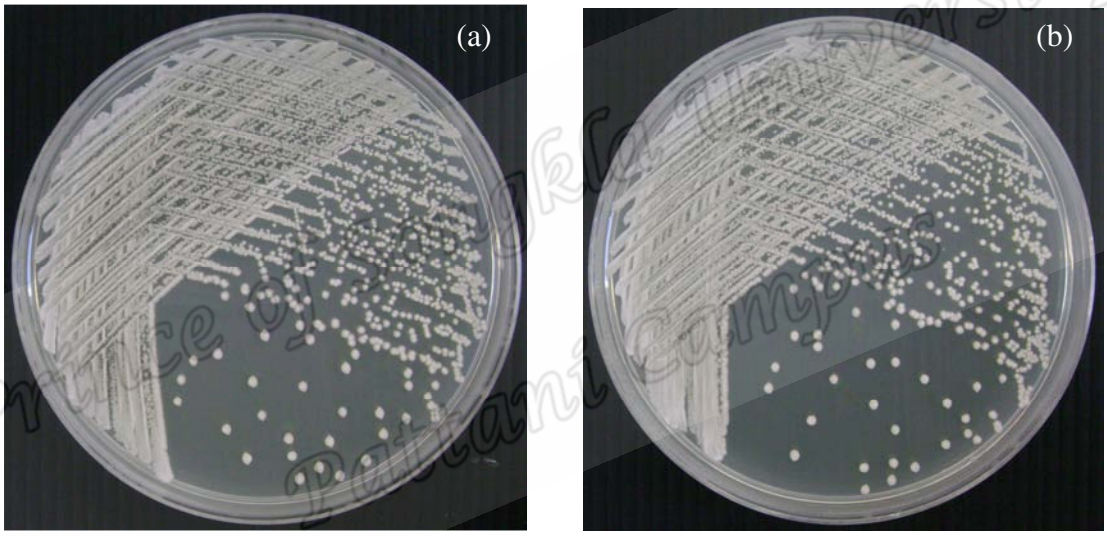
ตารางที่ 11 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยคิลเลอร์ท็อกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และ W09 ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร YPD พีเอช 5.0 เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 ที่เวลาต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับเอทานอลร้อยละ 70

killer yeast	Pathogenic Bacteria	killer activity (%) ที่เวลาต่าง ๆ (ชั่วโมง)								
		0	6	12	18	24	30	36	42	48
	E. coli TISTR 887	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	44.0 ± 1.0	46.0 ± 1.8	45.0 ± 1.8	45.0 ± 1.0	41.0 ± 1.9	44.0 ± 0.0
	S. typhimurium									
W07	TISTR 292	0.0 ± 0.0	36.8 ± 0.0	35.0 ± 0.0	39.0 ± 2.7	44.8 ± 5.9	38.9 ± 3.1	42.7 ± 3.4	38.7 ± 5.6	42.5 ± 2.7
	S. aureus TISTR118	0.0 ± 0.0	46.0 ± 2.2	45.0 ± 3.1	49.0 ± 3.7	48.0 ± 9.0	48.0 ± 3.7	47.0 ± 3.6	40.0 ± 0.0	44.0 ± 0.0
	B. cereus TISTR 867	0.0 ± 0.0	41.0 ± 0.0	40.0 ± 0.0	44.0 ± 1.0	45.0 ± 1.0	42.0 ± 1.9	42.0 ± 1.0	41.0 ± 1.9	42.0 ± 1.7
	E. coli TISTR 887	0.0 ± 0.0	40.0 ± 0.0	45.0 ± 1.8	44.0 ± 1.7	44.0 ± 0.0	43.0 ± 0.0	43.0 ± 0.0	42.0 ± 2.5	42.0 ± 0.0
	S. typhimurium									
W09	TISTR 292	0.0 ± 0.0	36.8 ± 0.0	38.8 ± 1.8	41.2 ± 1.5	44.8 ± 5.9	38.9 ± 1.5	42.7 ± 1.7	39.2 ± 1.9	42.5 ± 0.0
	S. aureus TISTR118	0.0 ± 0.0	46.0 ± 2.2	46.0 ± 2.7	46.0 ± 3.7	48.0 ± 4.8	47.0 ± 2.7	48.0 ± 2.8	42.0 ± 1.9	46.0 ± 4.2
	B. cereus TISTR 867	0.0 ± 0.0	41.0 ± 0.0	42.0 ± 1.7	43.0 ± 1.7	47.0 ± 2.7	42.0 ± 1.9	40.0 ± 0.0	42.0 ± 2.5	40.0 ± 0.0

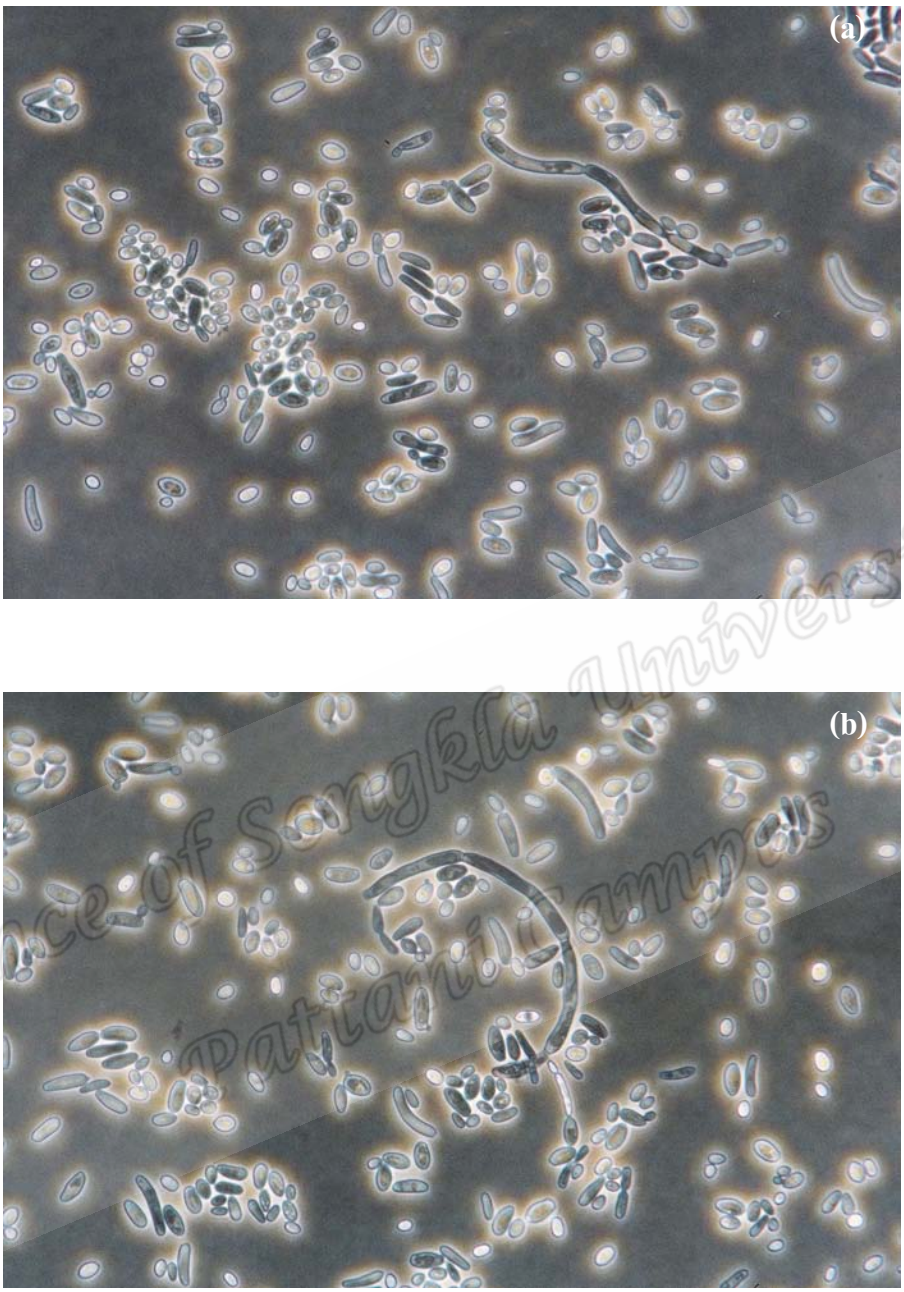
Prince of Songkla University Pattani Campus

4.6 การจำแนกสายพันธุ์

เมื่อนำคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และ W09 มาทำการศึกษาลักษณะโคโลนี และรูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า คิลเลอร์ยีสต์มีลักษณะโคโลนี สีขาวนวล ขอบเรียบ ดังรูปที่ 18 การศึกษา รูปร่างของเซลล์ของยีสต์มีลักษณะกลม เป็นท่อน และท่อนยาวต่อกัน ดังรูปที่ 19 เมื่อนำมาจำแนกสายพันธุ์ด้วยชุดจำแนกยีสต์สำเร็จรูป API ID 32C โดยพิจารณาจากความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ของคิลเลอร์ยีสต์ พบว่า คิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และW09 เป็นยีสต์ชนิด *Candida krusei* โดยคิลเลอร์ยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตมีความสามารถในการใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารที่เหมือนกัน ได้แก่ N-acetyl-glucosamine, Lactic acid, Glycerol, Lenulenic acid, D-glucose และ L-sorbose แสดงดังตารางที่ 12



รูปที่ 18 ลักษณะโคโลนีของคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 (a) และ W09 (b) ที่เวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 19 ลักษณะรูปร่างเซลล์ของคิลเลอร์ยีสต์ *C. krusei* W07 (a) และ W09 (b) ที่เวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 12 การใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารชนิดต่างๆ ของคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และ W09

Assimilation	Reaction	
	W07	W09
D-galactose	-	-
Cycloheximide (actiduone)	-	-
D-saccharose (sucrose)	-	-
N-Acetyl-glucosamine	+	+
Lactic acid	+	+
L-arabinose	-	-
Lcellobiose	-	-
D-raffinose	-	-
D-moltose	-	-
D-trehalose	-	-
Potessium 2-ketogluconate	-	-
Methyl- -D-glucopyranoside	-	-
D-sorbitol	-	-
D-xylose	-	-
D-ribose	-	-
Glycerol	+	+
L-rhamnose	-	-
Palatinose	-	-
Erythritol	-	-
D-melibiose	-	-
Sodium glucuronate	-	-
D-melezitose	-	-
Potassium gluconate	-	-
Lenulinic acid (lenulenate)	+	+
D-mannitol	-	-

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 12 การใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารชนิดต่างๆ ของคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และ W09 (ต่อ)

Assimilation	Reaction	
	W07	W09
D-lactose (bovine origin)	-	-
Inositol	-	-
D-glucose	+	+
L-sorbose	+	+
Glucosamine	-	-
Esculin ferric citrate	-	-

4.7 ผลของคิลเลอร์ท็อกซินต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

เมื่อคัดเลือกคิลเลอร์ยีสต์ *C. krusei* W07 ซึ่งมีความสามารถผลิตคิลเลอร์ท็อกซินและสามารถเกิดการยับยั้งได้หลายสายพันธุ์ ได้แก่ *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 867 ไปทำการเลี้ยงในอาหาร YPD เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 พีเอช 5.0 เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนโดยกรองด้วย 10 kDa cut-off membrane จำนวน 10 หลอด แต่ละหลอดมีปริมาตร 4 มิลลิลิตร ได้สารละลายที่แยกได้ทั้งสองส่วน คือ มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa ปริมาตร 1 มิลลิลิตรและมากกว่า 10 kDa ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ที่เย็น (อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส) ในอัตราส่วนปริมาตรตัวอย่างต่อเอทานอล (1:2) ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 - 60 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนที่เป็นเอทานอลทิ้งและระเหยจนหมด นำตะกอนที่ได้ทั้ง 10 หลอด มาละลายกับ 0.1 M citrate phosphate buffer (CPB) pH 4.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ได้สารละลายคิลเลอร์ท็อกซิน พบว่า คิลเลอร์ท็อกซินอย่างหยาบมีปริมาณโปรตีน 12,017.65 µg/ml โปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa มีปริมาณโปรตีน 219.88 µg/ml และโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10 kDa มีปริมาณโปรตีน 277.53 µg/ml (ตารางที่ 13) จากผลการทดลองพบว่า ก่อนทำให้บริสุทธิ์ปริมาณโปรตีนมากกว่าหลังจากทำให้บริสุทธิ์ เนื่องจากสารละลายคิลเลอร์ท็อกซินอย่างหยาบก่อนการทำให้บริสุทธิ์จะมีโปรตีนจากอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย จึงทำให้มีปริมาณโปรตีนมากกว่าหลังจากทำให้บริสุทธิ์ เช่นเดียวกับ

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 13 ปริมาณโปรตีนที่ผลิตจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W 07

ชนิดของโปรตีน	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (µg/ml)
คิลเลอร์ท็อกซินอย่างหยาบ	40	12,017.65
ขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa	5	219.88
ขนาดโมเลกุลมากกว่า 10 kDa	5	277.53

การตกตะกอนโปรตีนจากคิลเลอร์ยีสต์ *Williopsis saturnus* DBVPG 4561 ที่สารละลายคิลเลอร์ท็อกซินมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 29,106.5 µg/ml และเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนและตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 70 และจะมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 346.9 µg/ml (Buzzini *et al*., 2004) รวมทั้งการทำให้คิลเลอร์ท็อกซินมี ความบริสุทธิ์ด้วยวิธีการอื่น เช่น การทำคิลเลอร์ท็อกซินที่ได้จาก *S. cerevisiae* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี gel filtration ในคอลัมน์ด้วย Sepharose 6B (Soares and Sato, 2000) เมื่อนำคิลเลอร์ท็อกซินที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และมากกว่า 10 kDa ไปใช้ในการทดสอบความคงตัวในสภาวะต่างๆ ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคดังนี้

4.7.1 อุณหภูมิ

นำคิลเลอร์ท็อกซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกัน (น้อยกว่าและมากกว่า 10 kDa) มาทดสอบความคงตัวที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ได้แก่ *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 867 (ตารางที่ 14 และ 15) พบว่า โปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และมากกว่า 10 kDa มีความคงตัวได้ที่อุณหภูมิ 30 - 50 องศาเซลเซียส และสามารถเกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 2 ชนิด ได้แก่ *E. coli* TISTR 887 และ *B. cereus* TISTR 867 โดยโปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa จะสามารถเกิดการยับยั้งได้ดีกว่าโปรตีนที่มากกว่า 10 kDa แต่อย่างไรก็ตามผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ได้ของโปรตีนทั้งสองก็มีความสามารถในการยับยั้งที่ใกล้เคียงกันโดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติ โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* TISTR 887ได้เพียงเล็กน้อย ส่วน *S. typhimurium* TISTR 292 และ *S. aureus* TISTR 118 ไม่สามารถยับยั้งได้ อาจเนื่องจากการนำคิลเลอร์ท็อกซินอย่างหยาบมาทำให้บริสุทธิ์ทำให้โปรตีนท็อกซินที่มีความจำเพาะในการยับยั้ง *S. typhimurium* TISTR 292 และ *S. aureus* TISTR 118 มีการสูญเสียกิจกรรมไปด้วย ในขณะที่กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus*

Prince of Songkla University Pattani Campus

TISTR 867 สามารถเกิดขึ้นได้ดีที่สุด โดยส่วนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และมากกว่า 10 kDa มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 8.8 และ 11.1 µg/40 µl มีผลการยับยั้งของเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสอยู่ในช่วง 9.0-11.0 มิลลิเมตร และ 9.0-10.0 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งเห็นว่า คิลเลอร์ท็อกซินที่มีโปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลทั้งน้อยกว่าและมากกว่า 10 kDa จะมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* TISTR 867 (รูปที่ 20) อย่างไรก็ตาม ขนาดวงใสที่ปรากฏยังคงมีเชื้อเพียงบางๆ ซึ่งจะแตกต่างจากบริเวณรอบๆ ที่มีปริมาณเชื้ออย่างหนาแน่น และ คิลเลอร์ท็อกซินสามารถมีความคงตัวได้ดีที่อุณหภูมิที่สูง เนื่องจากคิลเลอร์ยีสต์ที่ได้ทำการคัดแยกจากแหล่งที่มีสภาพอากาศร้อน เช่นเดียวกับความคงตัวของคิลเลอร์ท็อกซินจาก *P. anomala* YF07b ต่อการยับยั้งยีสต์ก่อโรคมีความคงตัวได้จนถึงอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส และความคงตัวของโปรตีนจะลดลงเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากที่อุณหภูมิสูงๆ โปรตีนจะถูกทำลายและเสียสภาพจึงทำให้กิจกรรมการยับยั้งลดลง (Wang *et al*., 2007) และแตกต่างจากคิลเลอร์ท็อกซินที่ได้จากการผลิตของ *S. cerevisiae* จะมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 8 และ 25 องศาเซลเซียส โดยความคงตัวจะลดลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง ความสามารถในการยับยั้งจะลดลงร้อยละ 50 และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าคิลเลอร์ท็อกซินจะไม่สามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้ง (Soare and Sato, 2000) ความคงตัวของคิลเลอร์ท็อกซินที่ผลิตจาก *S. occidentalis* บ่มที่อุณหภูมิ 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่า คิลเลอร์ท็อกซินที่ผลิตได้จะมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส (Chen *et al*., 2000) และความคงตัวของคิลเลอร์ท็อกซิน จาก *P. membranifacials* ที่อุณหภูมิ 5-20, 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส พบว่า คิลเลอร์ท็อกซินจะมีความคงตัวได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (Santos และ Maquina, 2004)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 14 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยคิลเลอร์ท็อกซินที่มีขนาดโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

	clear zone (mm)			
	E. coli	*S. typhimurium*	*S. aureus*	*B. cereus*
Temperature (°C)	TISTR 887	TISTR 292	TISTR 118	TISTR 867
30	6.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.5 ± 0.7
35	6.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	11.0 ± 0.0
40	6.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
45	6.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
50	6.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0
control	12.5 ± 0.7	19.0 ± 0.0	13.0 ± 0.0	18.5 ± 0.7

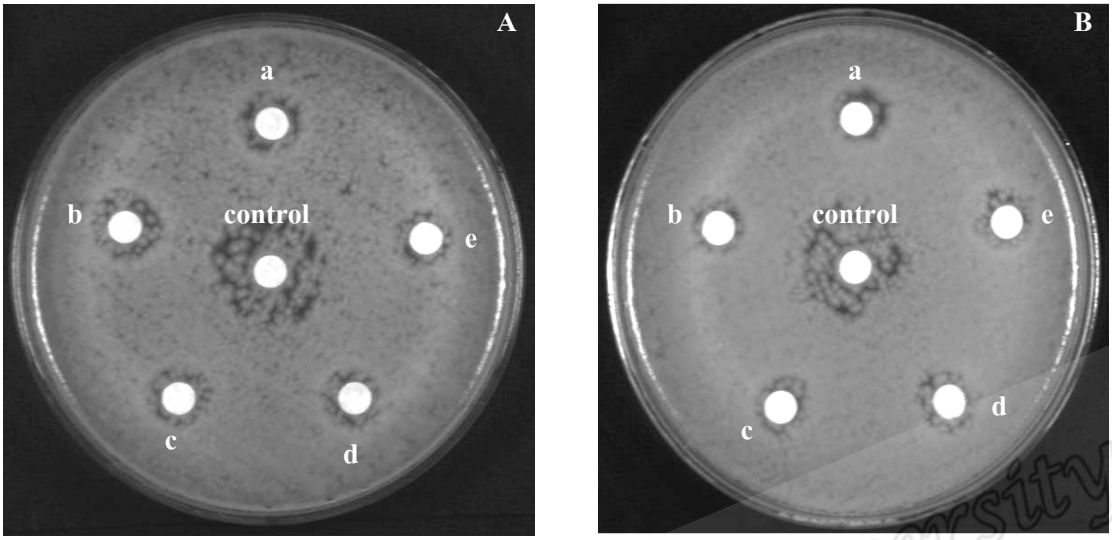
control = เอทานอลร้อยละ 70

ตารางที่ 15 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยคิลเลอร์ท็อกซินที่มีขนาดโมเลกุลมากกว่า 10 kDa และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

	clear zone (mm)			
	E. coli	*S. typhimurium*	*S. aureus*	*B. cereus*
Temperature (°C)	TISTR 887	TISTR 292	TISTR 118	TISTR 867
30	6.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
35	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.5 ± 0.0
40	6.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0
45	6.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
50	6.5 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.5 ± 0.0
control	10.5 ± 0.7	18.5 ± 0.7	12.5 ± 0.7	18.5 ± 0.7

control = เอทานอลร้อยละ 70

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 20 บริเวณที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิด *B. cereus* TISTR 867 ของคิลเลอร์ท็อกซินแช่ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 30 °C (a), 35 °C (b), 40 °C (c), 45 °C (d) และ 50 °C (e) เปรียบเทียบกับเอทานอลร้อยละ 70 (control) โดยรูป A คือ ขนาดน้ำหนักโปรตีนน้อยกว่า 10 kDa และ B คือ ขนาดน้ำหนักโปรตีนมากกว่า 10 kDa

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.7.2 พีเอช

นำคิลเลอร์ท็อกซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์แล้วทั้งขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และมากกว่า 10 kDa ละลายตะกอนด้วย 0.1 M citrate phosphate buffer ที่พีเอช 4.0 เพื่อให้ปริมาณโปรตีนเริ่มต้นเท่ากันจากนั้นนำมาสารละลายคิลเลอร์ท็อกซินปรับพีเอชต่างๆ โดยในการปรับพีเอชใช้สารละลายคิลเลอร์ท็อกซินปริมาตร 20 µl และบัฟเฟอร์ที่พีเอชต่างๆ คือ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 ปริมาตร 20 µl ได้สารละลายคิลเลอร์ท็อกซินที่มีพีเอช 3.33, 4.02, 4.32, 4.89, 5.45, และ 6.03 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาศึกษาความคงตัวของโปรตีนในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้แก่ *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 867 (ตารางที่ 16 และ 17) พบว่า คิลเลอร์ท็อกซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 3 ชนิดได้แก่ *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, และ *B. cereus* TISTR 867 โดยส่วนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลทั้งน้อยกว่าและมากกว่า 10 kDa ที่มีพีเอช 3.33 และ 4.02 ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียใกล้เคียงกัน ที่พีเอช 3.33 โปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa จะมีขนาดวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* TISTR 887,

S. typhimurium TISTR 292 และ *B. cereus* TISTR 867 เท่ากับ 6.5, 7.0 และ 7.5 มิลลิเมตร โปรตีนขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10 kDa จะมีขนาดวงใสเท่ากับ 6.5, 8.0 และ 8.0 มิลลิเมตร ตามลำดับที่พีเอช 4.02 โปรตีนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa จะมีขนาดวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *E. coli* TISTR 887*, S. typhimurium* TISTR 292 และ *B. cereus* TISTR 867 เท่ากับ 6.5, 7.0 และ 7.0 มิลลิเมตร และโปรตีนขนาดโมเลกุลมากกว่า 10 kDa มีขนาดวงใสเท่ากับ 6.5, 7.0, และ 8.5 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนที่พีเอชอื่นๆ สามารถเกิดกิจกรรมการยับยั้งลดลง โดยเมื่อพีเอชเพิ่มขึ้นทำให้โปรตีนที่มีความจำเพาะในการเกิดกิจกรรมเสียสภาพ จึงทำให้ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ ส่วนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนน้อยกว่าและมากกว่า 10 kDa มีปริมาณโปรตีนของทุกค่าพีเอชเท่ากับ 4.4 และ 5.55 µg/20 µl เนื่องจาก การปรับให้ได้ตามระดับพีเอชต่างๆ ทำให้มีปริมาณโปรตีนลดลงครึ่งหนึ่ง ในอัตราส่วนตัวอย่างคิลเลอร์ท็อกซินต่อบัฟเฟอร์พีเอชต่าง ๆ เท่ากับ 1:1 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าคิลเลอร์ท็อกซินมีความคงตัวที่มีพีเอช 3.33 และ 4.02 และค่าพีเอชของบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการละลายจะไม่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร ดังนั้นบริเวณวงใสที่เกิดการยับยั้งจะเกิดจากคิลเลอร์ท็อกซินเท่านั้น ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับความคงตัวของคิลเลอร์ท็อกซินจาก *Pichia anomala* YF07b ที่มีความคงตัวได้สูงที่ระดับพีเอช 3.0-4.8 และพีเอชมากกว่า 5.0 ความคงตัวของโปรตีนจะลดลง (Wang *et al*., 2007) คิลเลอร์ท็อกซินจาก *S. cerevisiae* มีความคงตัวได้ดีที่สุดที่พีเอช 3.8-4.5 โดยที่พีเอช 2.0-3.5 โปรตีนจะมีความคงตัวประมาณร้อยละ 80 และที่พีเอช 6.0-8.0 โปรตีนจะเกิดการเสียสภาพจากเดิมและไม่สามารถเกิดการยับยั้ง (Soares and Sato, 2002) คิลเลอร์ท็อกซินจาก *Pichia membranifacians* จะมีความคงตัวได้ดีที่พีเอช 3.0-5.0 (Santos and Marquina, 2004) และจากการศึกษาของ Chen *et al*. (2000) ได้รายงานว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อความคงตัวของคิลเลอร์ท็อกซินจาก *S. occidentalis* คือ ช่วงพีเอช 2.0-5.0 และคิลเลอร์ท็อกซินจาก *Candida nodaeensis* จะมีความคงตัวที่พีเอช 2.6-7.6 (Da silva *et al*., 2008)

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 16 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยคิลเลอร์ท็อกซินที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และมีพีเอชต่างๆ

	clear zone (mm)			
	E. coli	*S. typhimurium*	*S. aureus*	*B. cereus*
pH	TISTR 887	TISTR 292	TISTR 118	TISTR 867
3.33	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	7.5 ± 0.7
4.02	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	7.0 ± 0.0
4.32	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.5 ± 0.0
4.93	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.5 ± 0.0
5.45	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.5 ± 0.0
6.03	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.5 ± 0.0
control	13.0 ± 0.0	18.0 ± 1.4	13.5 ± 0.7	18.0 ± 1.4

control = เอทานอลร้อยละ 70

ตารางที่ 17 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยคิลเลอร์ท็อกซินที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และมีพีเอชต่างๆ

	clear zone (mm)			
	E. coli	*S. typhimurium*	*S. aureus*	*B. cereus*
pH	TISTR 887	TISTR 292	TISTR 118	TISTR 867
3.33	6.5 ± 0.0	8.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.0 ± 0.0
4.02	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	8.5 ± 0.7
4.32	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.5 ± 0.0
4.93	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.5 ± 0.0
5.45	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	6.5± 0.0
6.03	6.5 ± 0.0	7.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
control	12.5 ± 0.7	17.5 ± 0.7	13.5 ± 0.7	18.0 ± 0.0

control = เอทานอลร้อยละ 70

Prince of Songkla University Pattani Campus

4.8 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเกิดกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

เมื่อนำคิลเลอร์ท็อกซินที่ได้ละลายตะกอนโปรตีนด้วย 0.1 M citrate phosphate buffer ที่พีเอช 4.0 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารบนอาหาร NA ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0, 3 และ 6 (ตารางที่ 18-20) พบว่า คิลเลอร์ท็อกซินที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนน้อยกว่า 10 kDa และมากกว่า 10 kDa จะสามารถเกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้ดีเมื่ออาหาร NA มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 โดยจะสามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* TISTR 867 ได้ดีที่สุดให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 14.5 มิลลิเมตรเท่ากัน มีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 64.4 แต่ในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 พบว่า *B. cereus* TISTR 867 ไม่สามารถเจริญเติบโต ส่วน *S. aureus* TISTR 118 จะสามารถเกิดการยับยั้งได้ดีในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 11.5 และ 10.0 มิลลิเมตร และมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 52.6 และ 60.5 ตามลำดับ โดยรอบๆ วงใสที่เกิดขึ้นจะยังคงมีเชื้ออยู่ แต่มีเพียงเล็กน้อยและขนาดโคโลนีจะเล็กกว่าบริเวณอื่นๆ โดยรอบ (รูปที่ 21 และ 22) ส่วน *E. coli* TISTR 887 และ *S. typhimurium* TISTR 292 ไม่สามารถเกิดการยับยั้งได้ทั้งในอาหารที่มีการเติมและไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ แต่ความสามารถในการเจริญเติบโตของเชื้อจะลดลง โดยพบว่าในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 แบคทีเรียก่อโรคชนิด *S. typhimurium* TISTR 292 ไม่สามารถเจริญเติบโต เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือที่มากเกินจึงทำให้แบคทีเรียอ่อนแอและตายได้

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมเป็นตัวช่วยส่งเสริมให้คิลเลอร์ท็อกซินเกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีมากขึ้น เนื่องจากโซเดียมคลอไรด์จะเป็นตัวควบคุมทางชีวภาพชนิดหนึ่งเมื่ออาหารมีการเติมโซเดียมคลอไรด์จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียอ่อนแอและเกิดความเสียหายกว่าอาหารที่ไม่เติมเกลือ จึงทำให้คิลเลอร์ท็อกซินสามารถเข้าไปทำลายเชื้อได้ง่ายและตายในที่สุด (Marquina *et al*., 2002) เช่นเดียวกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 8 สามารถเกิดการยับยั้งยีสต์ *S. cerevisiae* ได้ดี โดยจะให้ขนาดของวงใสที่กว้างมากขึ้นเมื่อมีการเติมโซเดียมคลอไรด์เพิ่มขึ้น (Hernandez *et al*., 2008) และความคงตัวของคิลเลอร์ท็อกซินจาก *C. nodaensis* ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ในอาหาร 0, 0.5 และ 1 M พบว่าความคงตัวของโปรตีนจะมีประสิทธิภาพดีในอาหารที่มีการเติมเกลือ 1 M โดยเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะเห็นว่าคิลเลอร์ท็อกซินชนิด CnKT จะมีกิจกรรมการยับยั้งที่ดีขึ้น (Da Silva *et al*., 2008)

ตารางที่ 18 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยคิลเลอร์ท็อกซินที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa ในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

	clear zone (mm)			
	E. coli	*S. typhimurium*	*S. aureus*	*B. cereus*
NaCl (%)	TISTR 887	TISTR 292	TISTR 118	TISTR 867
0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	9.0 ± 0.0
Control	13.5 ± 0.7	17.0 ± 1.4	13.5 ± 0.7	16.5 ± 0.7
3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.5 ± 0.7
Control	16.0 ± 0.0	20.0 ± 1.4	16.5 ± 0.7	22.5 ± 0.7
6	0.0 ± 0.0	-	10.0 ± 0.0	-
Control	20.0 ± 1.4	-	19.0 ± 1.4	-

control = เอทานอลร้อยละ 70

- = เชื้อไม่เจริญเติบโต

-

ตารางที่ 19 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยคิลเลอร์ท็อกซินที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10 kDa ในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

	Clear zone (mm)			
	E. coli	*S. typhimurium*	*S. aureus*	*B. cereus*
NaCl (%)	TISTR 887	TISTR 292	TISTR 118	TISTR 867
0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	10.0 ± 0.0
Control	13.5 ± 0.7	17.0 ± 1.4	13.5 ± 0.7	16.5 ± 0.7
3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	14.5 ± 0.7
Control	16.0 ± 0.0	20.0 ± 1.4	16.5 ± 0.7	22.5 ± 0.7
6	0.0 ± 0.0	-	11.5 ± 0.7	-
Control	20.0 ± 1.4	-	19.0 ± 1.4	-

control = เอทานอลร้อยละ 70

- = เชื้อไม่เจริญเติบโต

Prince of Songkla University Pattani Campus

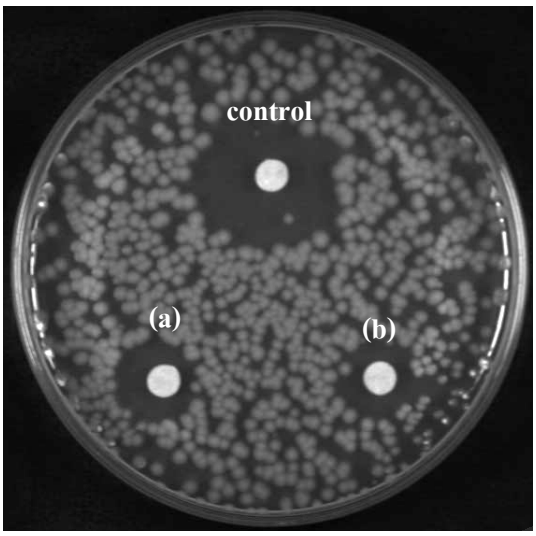
ตารางที่ 20 ความคงตัวของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0, 3 และ 6

	killer activity (%)			
	E. coli	*S. typhimurium*	*S. aureus*	*B. cereus*
NaCl (%)	TISTR 887	TISTR 292	TISTR 118	TISTR 867
น้อยกว่า 10 kDa				
0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	54.6 ± 2.3
3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	64.4 ± 1.1
6	0.0 ± 0.0	-	52.6 ± 3.9	-
มากกว่า 10 kDa				
0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	60.6 ± 2.6
3	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	64.4 ± 5.2
6	0.0 ± 0.0	-	60.5 ± 0.8	-

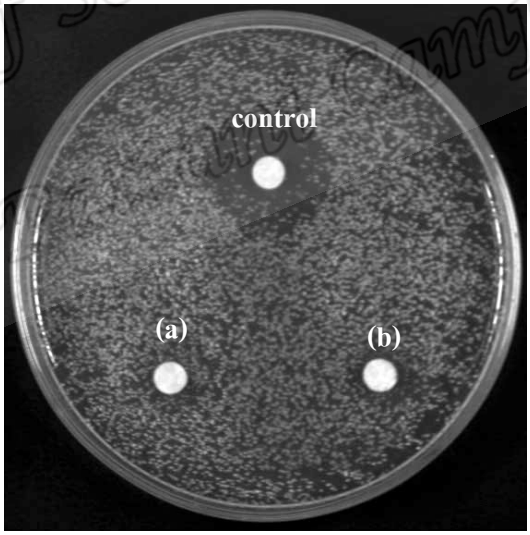
control = เอทานอลร้อยละ 70

- = เชื้อไม่เจริญเติบโต

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 21 บริเวณวงใสที่เกิดการยับยั้ง *B.cereus* TISTR 867 ของคิลเลอร์ท็อกซินในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 โดยยับยั้งด้วยขนาดโปรตีนน้อยกว่า 10 kDa (a) ขนาดโปรตีนมากกว่า 10 kDa (b) และเปรียบเทียบกับเอทานอลร้อยละ 70 (control)



รูปที่ 22 บริเวณวงใสที่เกิดการยับยั้ง *S. aureus* TISTR 867 ของคิลเลอร์ท็อกซินในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยยับยั้งด้วยขนาดโปรตีนน้อยกว่า 10 kDa (a) ขนาดโปรตีนมากกว่า 10 kDa (b) และเปรียบเทียบกับเอทานอลร้อยละ 70 (control)

Prince of Songkla University Pattani Campus

Prince of Songkla University
Pattani Campus