บทที่ 3
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 ตัวอย่างอาหารหมักดอง

ตารางที่ 6 ชนิด และแหล่งที่มาของตัวอย่างอาหารหมักดองจากพืช

ตัวอย่างผักดอง	แหล่งที่มา
1.ผักเสี้ยนดอง	อำเภอ เมือง จังหวัดปัตตานี
2. ผักเสี้ยนดอง	อำเภอ เมือง จังหวัดนราธิวาส
3. สะตอดอง	อำเภอ ระแงะ จังหวัดนราธิวาส
4. สะตอดอง	อำเภอ ศรีสาคร จังหวัดนราธิวาส
5. หน่อไม้ดอง	อำเภอ เมือง จังหวัดปัตตานี
6. หน่อไม้ดอง	อำเภอ โคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี
7. หน่อไม้ดอง	อำเภอ โคกโพธิ์ จังหวัดปัตตานี
8. กะหล่ำปลีดอง	อำเภอ เมือง จังหวัดปัตตานี
9. กะหล่ำปลีดอง	อำเภอ เมือง จังหวัด ปัตตานี

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- Yeast extract (Himedia)
- Peptone, Bacterilogical (Himedia)
- D-glucose (Himedia)
- Nutrient agar (NA, Himedia)
- Nutrient broth (NB, Himedia)
- Peptone from casein (Himedia)
- Agar (Himedia)
- Sodium chloride (NaCl, Lab-Scan)
- Hydrochoric acid (HCl)

Prince of Songkla University Pattani Campus

- 95% Ethanol (C_2H_5OH, Merck)
- Methylene blue
- Bovine Serum Albumin (BSA, Fluka)
- Sodium hydroxide (NaOH, Lab-Scan)
- Sodium carbonate ($NaCO_3$, Univar)
- Potassium Sodium tartrate ($Na_3C_6H_5O_7 . 2H_2O$)
- Copper sulfate ($CuSO_4$. 5H2O, Univar)
- Folin-Ciocalteu phenol reagent (Merck)
- Sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4, Univar)

3.1.3 วัสดุ

- ตัวกรองปลอดเชื้อขนาดรูพรุน 0.45 µm (Minisart, Satorius stidim biotech)
- ชุดจำแนกยีสต์สำเร็จรูป API ID 32C (Biomerieux)
- 10 kDa cut-off membrane (Millipore, Amicon ultra-4)

3.2 เครื่องมือ

- เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge, Hettich Zencrifuhen รุ่น MIRRO 120)
- ตู้อบ (Oven, Memmert รุ่น 600)
- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave, Astell)
- เตาไมโครเวฟ (Microwave, Sharp รุ่น Corousel)
- ตู้เย็น (Refrigerator, Sanyo)
- เครื่องเขย่า (Shaker, Chil Tern scientific รุ่น Orbital Shaker SS70)
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter, Denver Instrumnt รุ่น 215)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator, Callcnkamp Serial Number SG98/07/452)
- ตู้ปลอดเชื้อลมเป่า (Laminar flow, Merit รุ่น 0192)
- เครื่องผสม (Vortex mixer, Scientific Industries รุ่น Vortex Genie 2)
- ไมโครปิเปต (Micropipet, Rainin)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Jen Way รุ่น 6405 UV/VIS)
- เครื่องวัดเปอร์เซ็นต์เกลือ (Refractometer, Atago รุ่น SL-1000)
- เครื่องชั่งน้ำหนัก 3 ตำแหน่ง (Mettler Toledo รุ่น TG 5002-S)
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscope, Olympus)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การเก็บตัวอย่างอาหารหมักพื้นบ้านจากพืช

ทำการเก็บตัวอย่างผักดองพื้นบ้านที่นิยมบริโภคกันในภาคใต้จากพืช 4 ชนิด ได้แก่ สะตอดอง หน่อไม้ดอง ผักเสี้ยนดอง และกะหล่ำปลีดอง โดยได้ทำการเก็บตัวอย่างจากตลาดสด หรือจากการหมักดองของชาวบ้านชนิดละ 2-3 ตัวอย่าง ทั้งหมด 9 ตัวอย่าง พร้อมวัดพีเอชและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ของน้ำหมักของตัวอย่างอาหารโดยใช้ Salinity Refractometer

3.3.2 การคัดแยกยีสต์และทำให้บริสุทธิ์

การคัดแยกยีสต์ให้บริสุทธิ์

นำน้ำหมักตัวอย่างผักดองพื้นบ้านจากพืชมาทำการลาก (streak) บนอาหารแข็ง YPD (yeast extract ร้อยละ 1, peptone ร้อยละ 2, glucose ร้อยละ 2 และ agar ร้อยละ2) (Petering *et al*., 1991) พีเอช 5.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ จำนวน 10 โคโลนีต่อตัวอย่าง นำมาลากบนอาหารแข็ง YPD อีกครั้งเพื่อให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้น และเก็บรักษาบนอาหารเอียง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบคุณสมบัติการเป็นคิลเลอร์ยีสต์ต่อไป

3.3.3 การทดสอบการเป็นคิลเลอร์ยีสต์ต่อยีสต์ที่มีความว่องไว

3.3.3.1 การเตรียมยีสต์ที่มีความว่องไว

นำสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความว่องไวจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida tropicalis* TISTR 5045, *Hansenula anomala* TISTR 5113, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055, *Torulopsis glabrata* TISTR 5241 เริ่มต้น 1 ลูป เลี้ยงในอาหาร เหลว YPD ที่ปรับ พีเอชเป็น 5.0 ด้วย 1 N กรดไฮโดรคลอริค ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3.2 การทดสอบการเป็นคิลเลอร์ต่อยีสต์ที่มีความว่องไว

นำยีสต์ที่มีความว่องไวที่เลี้ยงในอาหาร YPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง swab บนอาหารแข็ง YPD ที่เติม methylene blue ร้อยละ 0.0003 และเกลือร้อยละ 3 จากนั้นนำยีสต์ที่คัดแยกได้มาลากหรือขีดเป็นเส้นลงบนผิวอาหารในจานเพาะเชื้อเดียวกันและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (Walker *et al*., 1995) เพื่อคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ให้บริเวณใส (clear zone) และเก็บไว้เพื่อทดสอบในขั้นตอนต่อไป

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.4 การทดสอบยีสต์ที่เป็นคิลเลอร์ยีสต์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

3.3.4.1 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

นำแบคทีเรียก่อโรคแกรมลบชนิด *Escherichia coli* TISTR887 และ *Salmonella typhimurium* TISTR292 แบคทีเรียแกรมบวกชนิด *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* TISTR 867 มา 1 ลูปเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเจือจางให้มีความเข้มข้น 10^6 CFU/ml (Santos *et al.,* 2004) และนำไปทดสอบการถูกยับยั้งด้วยคิลเลอร์ยีสต์สายพันธุ์ที่คัดแยกได้

3.3.4.2 การเตรียมสารละลายคิลเลอร์ยีสต์

นำคิลเลอร์ยีสต์ที่ได้จากการทดสอบในข้อ 3.3.3.2 จำนวน 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่มีพีเอช 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายหลังการเลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ 10 มิลลิลิตรไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 g อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากสารละลายใส (supernatant) และนำสารละลายใสที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร จะได้สารละลายคิลเลอร์อย่างหยาบเพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

3.3.4.3 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยสารละลายคิลเลอร์ยีสต์

นำแบคทีเรียก่อโรคที่ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่ 10^6 CFU/ml มา swab บนผิวหน้าอาหาร nutrient agar และทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารโดยใช้วิธี disc diffusion test โดยการใช้กระดาษกรองเบอร์ 1 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิลิตร ที่ฆ่าเชื้อแล้วหยดด้วยสารละลายคิลเลอร์ที่ได้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร และวางบนจานอาหารที่ได้เลี้ยงแบคทีเรียทดสอบไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกผลการยับยั้งโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางที่เกิดบริเวณวงใส (clear zone) บนอาหาร (Santos and Marquina, 2004) ในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ

3.3.5 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซิน

เลือกคิลเลอร์ยีสต์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้ดีที่สุดจากข้อ 3.3.4.3 เพื่อนำมาศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินโดยจะทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.5.1 ชนิดของอาหาร

เลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ อาหารเหลว YPD และ Modified Sabouraud Broth ที่มีพีเอชเท่ากับ 5.0 โดยถ่ายคิลเลอร์ยีสต์ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด จากนั้นเขย่าด้วยความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายคิลเลอร์ยีสต์หมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากสารละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.3

3.3.5.2 พีเอช

เลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.1 ต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินเพื่อศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่างๆ ได้แก่ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ7.0 จากนั้นถ่ายเชื้อ คิลเลอร์ยีสต์ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากสารละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับข้อ 3.3.4.3

3.3.5.3 อุณหภูมิ

เลี้ยงคิลเลอร์ยีสต์ในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.1 ปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.2 ต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินเพื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 25, 30, 35 และ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายเชื้อคิลเลอร์ยีสต์ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเขย่าด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากสารละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3.4.3

3.3.5.4 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

เลี้ยงคิลเลอร์ในอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.1 ปรับพีเอชที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.2 เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 3 และ 6 เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซิน จากนั้นถ่ายเชื้อคิลเลอร์ยีสต์1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเขย่าที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.3 ด้วยความเร็ว 110 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากสารละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 4 สายพันธุ์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3.4.3

Prince of Songkla University Pattani Campus

3.3.5.5 ระยะเวลาที่เหมาะสม

เลือกคิลเลอร์ยีสต์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุด เลี้ยงในอาหารเหลวที่เหมาะสมต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินและปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเหลวที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.4 จากนั้นถ่ายเชื้อคิลเลอย์ยีสต์ 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เขย่าด้วยความเร็วรอบ 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3.3.5.3 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อเลือกระยะเวลาที่คิลเลอร์ยีสต์สามารถผลิตคิลเลอร์ท็อกซินได้ดีที่สุด นำสารละลายที่เก็บในแต่ละช่วงเวลาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 g เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากสารละลาย จากนั้นนำสารละลายที่ได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารทั้ง 4 ชนิด

3.3.6 การจัดจำแนกสายพันธุ์

คิลเลอร์ยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุดจากข้อ 3.3.5.4 นำมาทำการศึกษารูปร่างลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ่ายภาพโคโลนี และรูปร่างของเซลล์ และจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยชุดจำแนกยีสต์สำเร็จรูปของ API ID 32 C ทำการเก็บรักษาสายพันธุ์ยีสต์บนอาหารเอียง YPD ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

3.3.7 ผลของคิลเลอร์ท็อกซินต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

การเตรียมคิลเลอร์ท็อกซินให้บริสุทธิ์บางส่วน

เลือกคิลเลอร์ยีสต์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้หลายชนิดจากข้อ 3.3.5.4 มาเลี้ยงในสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสม จากนั้นนำสารละลายคิลเลอร์ยีสต์ได้ภายหลังการเลี้ยงไปหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 4,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสออกจากเซลล์และทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนโดยกรองด้วย 10 kDa cut-off membrane จำนวน 10 หลอด โดยในแต่ละหลอดมีปริมาตร 4 มิลิลิตร นำสารละลายที่แยกได้ทั้งสองส่วน (น้อยกว่าและมากกว่า 10 kDa) มาตกตะกอนด้วยเอทานอลร้อยละ 70 ในอัตราส่วนของปริมาตรตัวอย่างต่อเอทานอลร้อยละ 70 เท่ากับ 1:2 วางไว้ให้โปรตีนตกตะกอนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกโปรตีนออกจากสารละลายใส นำตะกอนโปรตีนที่ได้ทั้งหมดละลายกับ 0.1 M citrate phosphate buffer (CPB) พีเอช 4.0 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ได้สารละลายคิลเลอร์ท็อกซินและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบความสามารถในการเกิดกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคต่อไป (Santos *et al*., 2004) รวมทั้งวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนก่อนและหลังการทำให้บริสุทธิ์โดย

Prince of Songkla University Pattani Campus

วิธีการของ Lowry *et al*. (1959) นำคิลเลอร์ท็อกซินที่ได้ศึกษาความคงตัวของโปรตีนที่สภาวะต่างๆ ดังนี้

3.3.7.1 อุณหภูมิ

นำคิลเลอร์ท็อกซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นำมาบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารโดยวัดบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่นทดสอบ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3.4.3

3.3.7.2 พีเอช

นำคิลเลอร์ท็อกซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ปรับพีเอชด้วย 0.1 M citrate phosphate buffer ที่มีพีเอชต่างๆ ได้แก่ 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 บ่มเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารโดยวัดบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่นทดสอบ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3.4.3

3.3.8 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

นำคิลเลอร์ท็อกซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารบนอาหาร NA ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0, 3 และ 6 โดยวัดบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ แผ่นทดสอบ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3.3.4.3

Prince of Songkla University Pattani Campus