รายงานผลการวิจัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

เรื่อง

การคัดเลือกสายพันธุ์คลอร์ยีสต์ที่มีศักยภาพสูง สำหรับการหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง

สพ
589.2
จ371
2533

โดย

จิราภรณ์ ธนียวัน
ปราโมทย์ ธรรมวัตน์

2533

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช

รายงานผลการวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์คิลเลอร์ยีสต์ที่มีศักยภาพสูง สำหรับการหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง

โดย

จิราภรณ์ ธนียวัน

และ

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์

กรกฎาคม 2533

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศศ
ธ๘๑.๒
ว๘๖๙
๑๕๓๘
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....๑๗๘
วันที่.....เดือน 1 2 มิ.ย. 2534 พ.ศ.....

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ลุล่วงลงได้โดยผู้วิจัยได้รับความกรุณาช่วยเหลือ ให้คำแนะนำและปรึกษา จาก ดร. จรูญ คำนวนตา ซึ่งได้ให้ความสำคัญและสนับสนุนโครงการนี้มาตั้งแต่ต้น นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้รับความกรุณาแนะนำและให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์จาก รศ.ดร.สุมาลี พิชญางกูร ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน และ ผศ.ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ

ผู้วิจัยขอขอบคุณเงินทุนวิจัยรัชดาภิเษกสมโภช จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ช่วยวิจัยทุกคนที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ตามความมุ่งหมายทุกประการ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อภาษาไทย

ชื่อโครงการวิจัย : การคัดเลือกสายพันธุ์คิลเลอร์ยีสต์ที่มีศักยภาพสูง สำหรับการหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง

ชื่อผู้วิจัย : จิราภรณ์ ธนียวัน และ ปราโมทย์ ธรรมรัตน์

เดือนและปีที่ทำวิจัยเสร็จ : กรกฎาคม 2533

บทคัดย่อ

ทำการทดลองแยกยีสต์จากแหล่งต่างๆ จากตัวอย่างทั้งหมด 183 ตัวอย่าง พบว่ามีสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสามารถในการฆ่าได้ดี 36 สายพันธุ์ กลุ่มของยีสต์ที่จัดแยกตามความกว้างของโซนใส พบว่าสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างสูงสุดได้แก่ T1, N2, G2.1 และ 5/19 กลุ่มของยีสต์ที่มีความสามารถในการฆ่ายีสต์ที่ใช้ทดสอบสายพันธุ์อื่นๆ ได้ 9-17 ชนิด ได้แก่ T1, N1, N2, N12, 5/19 และ 5/24 ที่ฆ่าได้ 4-8 ชนิด ได้แก่ G2.1, N3,N5,N6, N11, 5/22, 5/34 และ 5/39

จากการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยาของเชื้อยีสต์สามารถจำแนกออกได้เป็น 5 สกุล คือ *Hansenula sp*, *Kloeckera sp*, *Trichosporon sp*, Torulopsis sp และ Candida sp ได้นำยีสต์ที่ได้ทดสอบแล้วว่ามีความสามารถในการการฆ่าเชื้อสูง และฆ่าเชื้ออื่นได้กว้างขวาง มาทดสอบต่อ 5 สายพันธุ์คือ T1 (Hansenula sp), G2.1 (Kloeckera sp), N2, N12 (Hansenula sp) และ 5/19 (Trichosporon sp) จากการทดสอบการฆ่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Torulopsis glabrata ที่ pH 4.5 25°C ได้ผลความกว้างของโซนใสดังนี้ T1 0.8 - 0.5 ซม., G2.1 0.5 - 0.3 ซม., N2 0.5 - 0.3 ซม., N12 0.3 - 0.1 ซม., 5/19 0.8 - 0.5 ซม. และพบว่าเชื้อทดสอบมีค่า optinum pH ที่ 6-3.5 optinum temperature 25°C-35°C temperature stability แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ เช่น 5/19 จะมี stability ที่ 40°C นานกว่า 180 นาที และที่ 45°C 60 นาที ส่วน G2.1 และ N2 stability ที่ 40°C 30 นาที และที่ 45°C 5 นาที ทำนองเดียวกัน pH stability ของสายพันธุ์ 5/19 จะอยู่ในช่วง pH 2-10 ส่วนที่ T1 และ N2 ที่ pH 2-8 และ G2.1 ที่ pH 2.5-7 นอกจากนี้ยังพบว่าสายพันธุ์ 5/19 ประกอบด้วย L และ M ds RNA ส่วนสายพันธุ์ T1, G2.1, N2 และ N12 พบเพียง L-ds RNA

จากการทดลองผสม สายพันธุ์ทีลเลอร์ (T1) และสายพันธุ์ยีสต์ที่หมักให้แอลกอฮอล์ได้ดี (M30) โดยวิธีโปรโตพลาสฟิวชั่น สามารถคัดเลือกโคโลนีที่ให้โซนใสบน Galactose blue medium 91 สายพันธุ์ และเมื่อนำไปทดสอบการหมักน้ำตาล sucrose 12% และ Galactose 12% สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่หมักได้ดี 70 สายพันธุ์ และเมื่อนำเชื้อเหล่านี้ไปทดสอบการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาล sucrose 20% พบว่ามีสายพันธุ์ที่หมักแล้ววัดได้ % Brix ลดต่ำลงมากกว่าสายพันธุ์ T1 คือ สายพันธุ์ 105, 108 และ 109 และเมื่อนำไปวัดหาปริมาณของ แอลกอฮอล์ โดยใช้ GC จะได้ผลแตกต่างกันดังนี้ M30 = 10.45%, T1 = 6.27%, 105 = 7.66%, 108 = 8.34% และ 109 = 7.71% ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title : Selection of Killer yeast strains for Alcohol Fermentation

Name of the Investigator : Jiraporn Thaniyavarn & Pramote Thammarate

: 1990

Abstract

A total of 183 samples were isolated, among these, 36 gave better cidal effect. In accordance to size of clear zone, strains showing widest clear zones were T1, N2, G2.1 and 5/19. Strains T1, N1, N2, N12, 5/19 and 5/24 were capable of killing 9-17 types of test organisms while strains G2.1, N3, N5, N6, N11, 5/22, 5/34 and 5/39 were capable of killing 4-8 strains.

Physiological and morphological studies made it possible to characterize these yeasts into 5 genera : Hansenula sp., Kloeckera sp , Trichosporon sp., Torulopsis sp., and Candida sp. Members with high cidal activity as well as wide range of killing of each genus were further tested. They were T1, N2, N12 (Hansenula sp), G2.1 (Kloeckera sp) and 5/19 (Trichosporon sp). For the clear zone, when tested with sensitive strain (Torulopsis glabrata), at pH 4.5, 25°C, the results given in term of width of clear zone were; T1 0.8-0.5 cm., G2.1 0.5-0.3 cm., N2 0.5-0.3 cm., N12 0.3-0.1 cm., 5/19 0.8-0.5 cm. The optimum pH and temperature for their cidal activities were of 6-3.5 and 25-35°C respectively. Thermal stability was varied among strains. Strain 5/19 was stable at 40°C over 180 minutes or at 45°C for 60 minutes while strains G2.1 and N2 were stable at 40 and 45°c for 30 and 5 minutes respectively. Strain 5/19 was stable at pH range of 2-10 while T2 N2 and G2.1 were stable between pH 2-8 and 2.5-7. In addition, it was found that strain 5/19 possessed L and M dsRNA whereas L-dsRNA alone were found in T1, G2.1, N2.

When killer strain (T1) was fused with a high alcohol producer strain (M30) via protoplast fusion, 91 colonies that gave clear zone on galactose blue medium were selected and tested for their abilities to ferment 12% sucrose and 12% galactose. Among strains tested 70 of them could ferment these two sugars rather well. There organisms, when subjected to alcohol fermentation from 20% sucrose, it was found that strains 105, 108 and 109 were capable to reduce % Brix to values lower than that produced by T1. Alcohol production determined by gas chromatography of strains M30, T1, 105, 108 and 109 were 10.45, 6.27, 7.66, 8.34 and 7.71% respectively.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

List of abbreviations

dsRNA	: double stranded RNA	
VLP	: virus like particle	
kb	: 1,000 base-pairs	
MD	: mega dalton	
TISTR	: Thailand Institute of Scientific and Technological Research	
NCYC	: National Collection of Yeast Culture Food Research Institute. Norwich. England	
ATCC	: American Type Culture Collection	
K_1	: Saccharomyces cerevisiae	A8209B
K_2	: Saccharomyces cerevisiae	NCYC 738
K_3	: S. capensis	NCYC 761
K_9	: Hansenula mrakii	NCYC 500
K_{10}	: Kluveromyces drosophilarum	NCYC 575
K_{11}	: Torulopsis glabrata	ATCC 15126
5/39, G2.1	: Kloeckera sp.	
N6	: Torulopsis sp.	
5/19	: Trichosporon sp.	
5/22	: Candida sp.	

T_1,N_1,N_2,N_3,N_{12},N_{16}, 5/24, 5/34 : Hansenula sp.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อภาษาไทย	iii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	v
สารบัญ	xiii
รายการตารางประกอบ	ix
รายการภาพประกอบ	xi
บทนำ	1
วิธีการวิจัย	7
ผลการวิจัย	19
สรุปผลการทดลอง	63
วิจารณ์ผลการทดลอง	68
เอกสารอ้างอิง	70
ภาคผนวก	73

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการตารางประกอบ

หน้า

ตารางที่ 1	แสดงชนิดของตัวอย่างที่เก็บจากสถานที่ต่าง ๆ	24
ตารางที่ 2	แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างแหล่งต่าง ๆ จำนวนตัวอย่างที่เก็บ และจำนวนเชื้อที่ให้ clear zone เมื่อทดสอบความสามารถในการฆ่า T. glabrata	29
ตารางที่ 3	แสดงตัวอย่างที่เก็บจากสถานที่ต่าง ๆ ที่แยกได้เชื้อให้ clear zone	30
ตารางที่ 4	แสดง clear zone ที่เกิดขึ้นจากเชื้อที่แยกได้ เมื่อใช้ T. glabrata เป็น sensitive strain บน blue medium 25°C 24 - 48 ชั่วโมง	31
ตารางที่ 5	แสดงความสามารถในการฆ่าของเชื้อที่คัดเลือกได้เมื่อทดสอบกับยีสต์สายพันธุ์มาตรฐาน และยีสต์ในสกุลต่าง ๆ จาก culture collection (24 - 48 ชั่วโมง)	33
ตารางที่ 6	แสดงผลการทดสอบสายพันธุ์ยีสต์ทางด้านสรีรวิทยา และคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา	37
ตารางที่ 7	แสดงชื่อสกุลของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้	39
ตารางที่ 8	แสดงรัศมีของ clear zone ที่วัดได้บน blue medium เมื่อทดสอบที่ pH ของการสร้าง killer Toxin ต่าง ๆ กัน ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์	40
ตารางที่ 9	แสดงการสร้าง Killer Toxin ของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 25°C , 30°C , 35°C , 37.5°C และ 40°C ตามลำดับ	46

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10	แสดงความเสถียรของ Killer Toxin ของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ ที่ 40°C เป็นเวลา 0, 5, 10, 20, 30 นาที 1 ช.ม., 2 ช.ม. และ 3 ช.ม. ตามลำดับ	48
ตารางที่ 11	แสดงความเสถียรของ Killer Toxin ของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ ที่ 45° เป็นเวลา 0, 5, 10, 20, 30 นาที 1 ช.ม., 2 ช.ม., และ 3 ช.ม. ตามลำดับ	50
ตารางที่ 12	แสดงความเสถียรของ Killer Toxin ของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ ที่ pH ต่างๆ กัน โดยแสดงรัศมีของ clear zone ที่วัดได้บน Blue medium เมื่อบ่มที่ 25°c เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	52
ตารางที่ 13	แสดงผลการ Fermentation ของน้ำตาล ของสายพันธุ์ที่ให้ clear zone บน Galactose-blue medium	55
ตารางที่ 14	เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่ลดลงภายหลังการหมักน้ำตาล sucrose ของสายพันธุ์ยีสต์เป็นเวลา 7 วัน	59
ตารางที่ 15	แสดง % แอลกอฮอล์ที่เชื้อ M30, T1, 105, 108 และ 109 หมักได้ในอาหาร sucrose 20% ที่ 25°c 7 วัน	62
ตารางที่ 16	สรุปจำนวนตัวอย่างที่เก็บ จำนวนเชื้อที่มีความสามารถในการฆ่าจากตัวอย่างต่างๆ	63
ตารางที่ 17	แสดงความสามารถในการฆ่ายีสต์มาตรฐาน และมียีสต์สกุลอื่นๆ ของเชื้อที่แยกได้ และแสดงความกว้างของ clear zone	64
ตารางที่ 18	สรุปคุณสมบัติของเชื้อที่คัดเลือกได้	66

รายการภาพประกอบ

		หน้า
รูปที่ 1	กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน blue medium เมื่อเลี้ยงเชื้อ T1 ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน	41
รูปที่ 2	กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน blue medium เมื่อเลี้ยงเชื้อ G 2.1 ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน	42
รูปที่ 3	กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน blue medium เมื่อเลี้ยงเชื้อ N2 ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน	43
รูปที่ 4	กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน blue medium เมื่อเลี้ยงเชื้อ 5/19 ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน	44
รูปที่ 5	กราฟแสดงรัศมี clear zone ที่เกิดขึ้นบน blue medium เมื่อเลี้ยงเชื้อ N12 ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน	45
รูปที่ 6	กราฟแสดงรัศมี clear zone ที่เกิดขึ้นบน blue medium (72 ช.ม.) เมื่อบ่ม Killer toxin ของแต่ละสายพันธุ์ ไว้ที่อุณหภูมิ 40°C ในเวลาต่าง ๆ กัน	49
รูปที่ 7	กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน blue medium (72 ช.ม.) เมื่อบ่ม Killer toxin ของแต่ละสายพันธุ์ ไว้ที่อุณหภูมิ 45°C ในเวลาต่าง ๆ กัน	51
รูปที่ 8	กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดบน Blue medium เมื่อแปรผัน pH ของ Killer toxin ของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้	53
รูปที่ 9	แสดง ds. RNA ของสายพันธุ์ K - Killer และยีสต์ที่คัดเลือกได้โดยการทำ Agarose gel electrophoresis	54

บทนำ

Killer yeasts ทั่วไป เป็นยีสต์ที่สามารถสร้าง killer factor หรือ killer toxin ออกมาฆ่ายีสต์อื่น ๆ ได้ killer factor นี้เป็นสารประกอบโปรตีนซึ่งได้พิสูจน์และเป็นที่ยอมรับกันแล้วว่าปลอดภัยต่อมนุษย์ killer yeasts ที่พบในต่างประเทศส่วนใหญ่มีความสามารถในการสร้าง killer factor ได้ที่อุณหภูมิต่ำ ประมาณ 20-25°C บางสายพันธุ์สามารถสร้างได้ที่อุณหภูมิ 30°C เรียกว่า superkiller ข้อสำคัญคือ killer factor ที่เชื้อสร้างขึ้นเสื่อมสภาพได้ง่าย ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง คือจะหมดความสามารถในการฆ่าได้เมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 40°C เพียงไม่กี่นาที ด้วยเหตุที่ killer factor เสื่อมสภาพได้ง่ายขึ้น ทำให้มีขีดจำกัดในการนำไปใช้ประโยชน์ เช่น ในการหมักไวน์ เบียร์ เหล้าสาเก ซึ่งต้องทำการหมักที่อุณหภูมิต่ำเท่านั้น

จากการศึกษา killer yeast ในประเทศไทยได้พบว่า killer yeast สร้าง killer factor ได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า killer yeast ที่พบในต่างประเทศมาก และมีคุณสมบัติทนต่อการฆ่าได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าด้วย killer yeast ที่พบในประเทศไทยบางสายพันธุ์เป็น killer yeast ชนิดใหม่ที่มีความสามารถในการฆ่าสูงสามารถฆ่ายีสต์อื่นได้กว้างขวาง บางสายพันธุ์สามารถฆ่าเชื้อยีสต์อื่นได้ที่อุณหภูมิ 40°C แสดงให้เห็นว่า killer yeasts ที่พบในประเทศไทยมีความสามารถพิเศษมาก ควรจะได้ทำการคัดเลือกเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม

มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณมากและราคาถูก ได้มีผู้สนใจนำมาใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงกันอย่างกว้างขวาง ขบวนการหรือกรรมวิธีหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลังที่กำลังได้รับความสนใจกันมากในขณะนี้ คือ การหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลังดิบ โดยใช้เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งดิบ หรือจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งดิบได้ แต่ขบวนการหมักดังกล่าวมีโอกาสที่ยีสต์ปนเปื้อนเจริญได้มาก ทำให้เกิดการสูญเสียแป้ง เกิด by product ที่เราไม่ต้องการและทำให้กลิ่นรสและคุณภาพของแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ด้อยลง การใช้ killer yeast ป้องกันการเจริญเติบโตของยีสต์ปนเปื้อนโดยปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลังดิบให้มีความสามารถเป็น killer yeast ที่มีประสิทธิภาพการฆ่าสูงจะช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้

การสำรวจแนวความคิด และการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Bevan และ Makover (2) เป็นผู้พบ Killer yeast เป็นครั้งแรก บุคคลทั้งสองได้แบ่งลักษณะการฆ่าของ Killer yeast เป็น 3 แบบ คือ ตัวฆ่า (Killer), ไม่เป็นทั้งตัวฆ่าและตัวถูกฆ่า (neutral) และตัวถูกฆ่า (sensitive) Killer yeasts ใน genus Saccharomyces และ genus อื่นจะปล่อยโปรตีนทอกซิน (หรือ Killer factors) ซึ่งจะก่อให้เกิดการตายของ sensitive strains และยีสต์อื่น เช่น Torulopsis glabrata

ในการวิเคราะห์ทางด้านพันธุกรรม (2, 3, 12, 14, 16) พบว่า Killer character อยู่ภายใต้การควบคุมของ ds RNA อย่างน้อย 2 ชนิด ซึ่งอยู่ภายในแคปซูลคล้ายอนุภาคไวรัส (virus like particle or VLP) ในไซโตพลาสซึม และสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้เมื่อเกิดการแบ่งเซล

dsRNA ประกอบด้วย L - dsRNA และ M - dsRNA โดยที่ M - dsRNA จะมีขนาด 1.2×10^6 MD หรือ 1.5 - 1.8 Kb ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างทอกซิน และการเกิดความต้านทาน ส่วน L - dsRNA จะมีขนาด 2.5×10^6 - 3.0×10^6 MD หรือ 4.5 Kb ทำหน้าที่ควบคุมยีนส์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างแคปซิด - โปรตีน (VLP) (12, 14, 16) MdsRNA สามารถดึงออกจาก Killer Strains ได้โดยการกระทำหลายวิธี เช่น การเพิ่มอุณหภูมิ หรือการเติม cyclo heximide (2, 14)

ได้มีรายงานว่า (8, 11, 17) Killer factor ของ S. cerevisiae สามารถฆ่า sensitive yeast ได้โดยการทำให้เกิดการสูญเสีย ATP (adenosine triphosphate) และมีผลยับยั้งการสังเคราะห์โมเลกุลขนาดใหญ่ และทำให้เกิดการหดตัวของเซล

นอกจากนี้ยังมี Killer yeast ในสกุลอื่นอีก เช่น Panchal C.J. และคณะ (12) ได้พบว่า Kluveromyces lactis มี Killer system ที่ถูกควบคุมด้วย linear ds - DNA plasmid 2 ชนิด คือ p GKll (k1) ซึ่งมีขนาด 8.8 Kb มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการสร้างทอกซิน และการเกิดความต้านทาน pGK12 (k2) ซึ่งมีขนาด 13.4 Kb มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความเสถียรของ pGKll และต่อมา Yokomori, Y. และคณะ (21) ได้รายงานพบว่า Candida SW - 55 มี Killer system ที่ถูกควบคุมโดยยีนส์ที่อยู่บนโครโมโซม Shimizu, K และคณะ (16) ได้รายงานว่านอกจะพบ Killer yeast ใน genus Saccharomyces sp แล้วยังพบใน genus อื่น เช่น Candida glabrata, Pichia Kluyveri, Kluveromyces lactis, Hansenula markli และ Hansenula saturnus. ซึ่งเป็นกลุ่มของ Wild yeast ที่พบในการทำ Wine และ Kitano, K. และคณะ (10) ได้รายงานพบว่า S. cerevisiae ที่ใช้ในการทำ Japanese wine ก็มีความสามารถ

ในการเป็น Killer yeast Starmer, W.T. และคณะ (18) ได้ทำการทดลองแยก Killer yeast จากส่วนต่าง ๆ ของพืชจำนวนต้นกระบอกเพชร (cactus) พบว่ามี Pichia kluyveri เป็น Killer yeast ที่มีบทบาทสำคัญที่จะควบคุมการแพร่กระจายของ Cryptococcus cereanus และการสร้างทอกซินขึ้นอยู่กับการควบคุมของยีนส์ที่อยู่บนโครโมโซมภายในนิวเคียส

Heard, G.M และคณะ (9) ได้ทดลองแยก Killer yeast ชนิดต่าง ๆ จาก Wine พบว่ามี S. carevisiae เท่านั้นที่มีความสามารถในการฆ่า แต่จะไม่พบใน Kloeckera, Candida, Hauscnula และ Torulospora ปราโมทย์ และคณะ (3) ได้ศึกษาเชื้อยีสต์ที่แยกมาจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 76 สายพันธุ์ พบว่า Killer yeasts ที่เป็น S. cervisiae 13 สายพันธุ์ Hausenula anomala 8 สายพันธุ์ และ Candida sp. 1 สายพันธุ์ และยังได้รายงานอีกว่า S. cerevisiae บางสายพันธุ์ไม่พบ plasmid ส่วน Hansenula anomala และ Candida sp. ทั้งหมดไม่พบว่ามี plasmid เลย

Killer yeasts ส่วนมากโดยทั่วไปแล้วจะมีความสามารถในการฆ่าได้สูงในช่วง pH ที่แคบและอยู่ในที่มีอุณหภูมิต่ำ Bevan , E.A. & D.R. Woods (20); Bevan, E.A. & D. Rogers (15), และ Yagiu, M. & T.W. Young (22) ได้รายงานว่าส่วนมาก Killer yeast ที่เป็น S. cerevisiae จะมีความสามารถในการฆ่ายีสต์อื่นได้ดีที่ pH 4.0 - 4.8 และจะมีความเสถียรในช่วง pH 2 - 4.5 Shimizu, K. และคณะ ได้รายงานว่า pH ที่เหมาะสมในการฆ่าของ wine killer yeasts ส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วง pH 4.0 - 4.2 Panchal, C. J. และคณะ (12) รายงานว่า pH ที่เหมาะสมในการทำงานของ K. lactis อยู่ในช่วง pH 4.5 - 6.5 Yokomori, Y และคณะ (21) รายงานว่า pH ที่เหมาะสมของ Candida SW - 55 อยู่ในช่วง 3.8 - 5.8 และมีความเสถียรในช่วง pH 2.0 - 8.5 ส่วน K2 และ K9 มี pH เหมาะสมในช่วง 4.0 - 4.2 และ 4.4 - 5.0 ตามลำดับ มีความเสถียรในช่วง pH 2.0 - 5.5 และ pH 2.0 - 6.0 ตามลำดับ นอกจากนี้ Yokomori, Y. ยังได้รายงานถึงความเสถียรของ Killer factors ของเชื้อ Candida SW - 55 ที่ 35°ซ นาน 24 ชั่วโมง และที่ 45°ซ นาน 3 ชั่วโมง

Woods, D. R และ E.A. Bevan (20) ได้รายงานถึงคุณสมบัติของ Killer factors ที่ได้จาก S. cerevisiae ว่าถูกทำลายที่อุณหภูมิสูงกว่า 25°ซ เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาพที่เป็นของเหลว แต่ถ้าหากเลี้ยงเชื้อไว้บนอาหารแข็ง Killer factor จะมีความเสถียรมากกว่า และจะถูกทำลายเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 42°ซ

Young, T.W. และ M. Yagiu (22) ได้รายงานถึง Killer factor ของ K2 ว่ามีความเสถียรที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงกว่าสายพันธุ์อื่น แต่ K3 จะมีความเสถียรสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับสกุล Saccharomyces และถ้าหากสายพันธุ์ Killer yeast ใด ๆ ก็ตามที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่มของ Saccharomycetes พบว่าจะมี Killer activity ที่มีความเสถียรที่อุณหภูมิสูงกว่าสายพันธุ์ใน Saccharomycetes

ปราโมทย์ และคณะ (3) สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ Killer yeast คือ S. cerevisiae A48 ซึ่งให้วงใส (clear zone) กว้างมากที่สุด แสดงคุณสมบัติการสร้างทอกซินได้ที่อุณหภูมิสูงสามารถฆ่ายีสต์สายพันธุ์อื่นได้กว้างขวาง มาทดสอบความเสถียรที่อุณหภูมิต่าง ๆ ดังนี้ ที่ 40°C มีความเสถียรได้นาน 180 นาที 55°C มีความเสถียรได้นาน 20 นาที และที่ 80°C มีความเสถียรได้นาน 10 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับ K1, K2 และ K3 จะมีความเสถียรที่ 40°C นาน 30 นาที แต่ที่อุณหภูมิ 55° และ 80°C ไม่มีความเสถียรเหลืออยู่เลย ซึ่งลักษณะความสามารถพิเศษของเชื้อสายพันธุ์ Killer yeast เหล่านี้จะมีประโยชน์อย่างยิ่งทางอุตสาหกรรมเกษตร เช่น การหมัก ไวน์ เบียร์ แอลกอฮอล์ การปรับปรุงขบวนการและคุณภาพของการหมักโดยจะมีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้ออื่น ๆ ที่ไม่ต้องการ

อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์เป็นอุตสาหกรรมที่กำลังได้รับความสนใจในแง่ของแหล่งพลังงานที่สำคัญแหล่งหนึ่ง โดยเฉพาะการผลิตแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลังดิบ มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณมากและราคาถูก ขบวนการหรือกรรมวิธีการหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลังดิบทำได้หลายวิธี อาจจะกระทำได้โดยใช้เอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งดิบ (1) หรือใช้จุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งดิบ (13) ได้แต่ขบวนการหมักดังกล่าวมีโอกาสที่ยีสต์ปนเปื้อนเจริญได้มาก ทำให้เกิดการสูญเสียแป้ง เกิด by product ที่เราไม่ต้องการ และทำให้กลิ่นรสและคุณภาพของแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ด้วยลง การใช้ Killer yeast ป้องกันการเจริญเติบโตของยีสต์ปนเปื้อน โดยการปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ให้มีความสามารถเป็น Killer yeast ที่มีประสิทธิภาพในการฆ่าสูงจะช่วยแก้ปัญหาเหล่านี้ได้ (4, 6, 7)

Bortol, A. และคณะ (6) ได้ทำการทดลองผสมสายพันธุ์ยีสต์ S. cerevisiae ที่มีความสามารถในการฆ่ากับสายพันธุ์ S. cerevisiae ที่ใช้ในการทำขนมปังโดยวิธีโปรโตพลาสฟิวชั่น (Protoplast fusion) สามารถคัดเลือกลูกผสมที่มีคุณสมบัติเป็น Killer และสามารถทำให้เกิด dough ได้ดี นอกจากนี้ Bortol, A. และคณะ (7) ยังได้ทำการผสมสายพันธุ์ยีสต์ S. cerevisiae ที่มีความสามารถในการฆ่ากับสายพันธุ์ S. cerevisiae STA2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถย่อยแป้งได้โดยวิธีโปรโตพลาสฟิวชั่นได้ลูกผสมที่มีคุณสมบัติเป็น Killer และสามารถย่อยแป้งได้ แล้วนำลูกผสมที่ได้ไปผสมกับ S. cerevisiae สายพันธุ์ Baker yeast ต่อไป

ปราโมทย์ และคณะ 1986 (4) ได้ทำการผสมสายพันธุ์ Killer yeast ชนิดใหม่ คือ S. cerevisiae A48 ซึ่งมีประสิทธิภาพในการฆ่าสูง ผสมกับยีสต์ที่หมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลได้ดีที่อุณหภูมิสูงคือ S. cerevisiae 389 เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีคุณสมบัติเป็น Killer และหมักแอลกอฮอล์ได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยใช้สายพันธุ์ S. cerevisiae AH22 เป็น marker strain เมื่อนำมาผสมกับ S. cerevisiae A48 โดยวิธี micromanipulator แล้วคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการฆ่าสูง 2 สายพันธุ์คือ S. cerevisiae 48H2 และ 48H16 และเมื่อนำมาผสมระหว่าง S. cerevisiae 389 กับ 48 H2 โดยวิธี mass mating ได้ลูกผสมที่สามารเจริญบน minimal medium และได้คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพการหมักสูงสุดไว้ คือ S. cerevisiae 389 K - 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.1 เพื่อแยก killer yeasts จากแหล่งต่าง ๆ

1.2 เพื่อศึกษาลักษณะคุณสมบัติต่าง ๆ ของ killer yeasts ที่แยกได้

1.3 เพื่อคัดเลือก killer yeasts ที่มีประสิทธิภาพการฆ่าสูงสำหรับนำไปใช้ประโยชน์

1.4 เพื่อปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลังดิบ ให้มีคุณสมบัติเป็น killer yeast

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิธีดำเนินการวิจัย

1 การเก็บตัวอย่าง ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างอาหารหมักดอง ผัก ผลไม้ น้ำตาลสด และอื่น ๆ จากตลาดสดแหล่งต่าง ๆ ในกรุงเทพฯ และจังหวัดใกล้เคียง ดังต่อไปนี้

1.1 เก็บจากตัวอย่างตลาดสดคลองเตย กรุงเทพฯ

1.2 เก็บตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ ที่จังหวัดสมุทรสงคราม และจังหวัดราชบุรี

1.2.1 ตลาดอำเภอเมือง จ.สมุทรสงคราม

1.2.2 สวนตามรายทาง อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม

1.2.3 ตลาดอัมพวา จ.สมุทรสงคราม

1.2.4 บริเวณเตาตาหวาน อ.บางคณฑี จ.สมุทรสงคราม

1.2.5 ตลาดน้ำดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี

1.3 เก็บตัวอย่างจากจังหวัดนครปฐม จังหวัดราชบุรี และจังหวัดเพชรบุรี

1.3.1 เขตอำเภอโพธาราม จ.ราชบุรี

1.3.2 ตลาดอำเภอเมือง จ.ราชบุรี

1.3.3 เขตอำเภอนครชัยศรี จ.นครปฐม

1.3.4 ตลาดอำเภอเมือง จ.เพชรบุรี

1.3.5 บริเวณหาดเจ้าสำราญ จ.เพชรบุรี

2 การแยกเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บได้ โดย streak เชื้อจากตัวอย่างต่าง ๆ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium ที่ปรับ pH เป็น 4.5 เพื่อให้ได้เป็น single colony บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25 C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำแต่ละ colony ไปทดสอบต่อไป

3 นำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 2 มาทดสอบความสามารถในการฆ่าโดยใช้เชื้อ Torulopsis glabrata เป็น sensitive strain ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Blue medium ดังได้ดำเนินการทดลองดังนี้

3.1 เตรียมเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างต่าง ๆ ตามวิธีการทดลองข้อ 2 บนอาหาร YM-agar อายุ 24 ชั่วโมง - 48 ชั่วโมง

3.2 เลี้ยง T. glabrata ในอาหาร YEDP-broth ที่ 25 C เขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm. เป็นเวลา 18 - 20 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางให้มีจำนวนเซลล์ประมาณ 10^5 เซลล์ ต่อ มิลลิลิตร ในน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว

3.3 นำไม้พันสำลีจุ่มน้ำกลั่นที่มีเซลล์ T. glabrata ที่เจือจางแล้ว มา Swab บน Blue - medium จากนั้นนำเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.1 มา Streak ลงใน plate เดียวกัน

3.4 นำ plate จากข้อ 3.3 ไปบ่มที่ 25 C สังเกตุ Clear zone ที่เกิดขึ้นเมื่อบ่มเชื้อให้ 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ให้ Clear zone เก็บใน YM-slant เพื่อทดสอบต่อไป

4 ศึกษาลักษณะความสามารถในการเป็น Killer yeast โดยทดสอบความสามารถในการฆ่ายีสต์สายพันธุ์มาตรฐานต่าง ๆ และยีสต์ในสกุลต่าง ๆ จาก culture collection ได้ดำเนินการทดลองดังนี้

4.1 เตรียมเชื้อยีสต์ที่ได้ผ่านการทดสอบแล้วตามวิธีในข้อ 3 บน YEPD slant อายุ 24 ชั่วโมง

4.2 เตรียมเชื้อยีสต์ สายพันธุ์มาตรฐานต่าง ๆ เพื่อใช้เป็น sensitive strain ได้แก่

K1	Saccharomyces	cerevisiae	A8209B
K2	Saccharomyces	cerevisiae	NCYC 738
K3	S. capensis		NCYC 761
K9	Hansenula mrakii		NCYC 500
K10	Kluveromyces drosophilarum		NCYC 575
K11	Torulopsis glabrata		ATCC 15126

4.3 เตรียมเชื้อยีสต์จาก culture collection จำนวน 10 สายพันธุ์ เพื่อใช้เป็น sensitive strain ได้แก่

Kloeckera apiculata	TISTR 5208
Schizosacchromyces pombe	TISTR 5205
Saccharomycopsis lipolytica	TISTR 5054
Pichia kluyveri	TISTR 5150
Candida tropicalis	TISTR 5045
Endomycopsis fibuligera	TISTR 5097
Hansenula anomala	TISTR 5113
Candida lipolytica	TISTR 5151
C. krusei	A153
C. stellatroidae	B9

4.4 นำเชื้อที่เตรียมไว้ตามข้อ 4.1 มาทดสอบความสามารถในการฆ่าโดยใช้เชื้อที่เตรียมจากข้อ 4.2 และ 4.3 เป็น sensitive strain วิธีการดำเนินการวิจัยเช่นเดียวกับข้อ 3 และให้สังเกต clear zone ที่เกิดขึ้นบน Blue medium ที่ 25 C เวลา 24 - 48 ชั่วโมง

5 การจำแนกสายพันธุ์และการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยา

5.1 สายพันธุ์ยีสต์และอาหารที่ใช้ในการทดลอง

5.1.1 สายพันธุ์ยีสต์

N1	N_2	N3	N6	N11	N12
5/19	5/24	5/34	5/39	5/21	
T1	G2.1				
K1	K2	K3	(S. cerevisiae)		

5.1.2 5 ml of YM broth

5.1.3 YM agar plates

5.1.4 PDA plates

5.1.5 Potassium acetale agar

5.1.6 Gorodkowa's agar

5.1.7 Fermentation medium

5.1.8 Starch fermentation medium

5.1.9 Nitrogen assimilation medium

5.1.10 Carbon asssimilation medium

5.1.11 Vitamin free medium

5.2 วิธีการทดลอง

5.2.1 ตรวจสอบทางด้านสัณฐานวิทยา

5.2.1.1 นำสายพันธุ์ยีสต์ที่ต้องการตรวจสอบเลี้ยงเชื้อใน YM broth สังเกตการเจริญ การสร้าง pellicle และการตกตะกอน เมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 72 ชั่วโมง และ 21 วัน

5.2.1.2 นำเชื้อที่มีอายุได้ 72 ชั่วโมง ใน YM broth ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อการศึกษาลักษณะการแตกหน่อและขนาดของเซล (โดยใช้ Micrometer)

5.2.2 การสร้างสปอร์

นำสายพันธุ์ยีสต์ที่ต้องการตรวจสอบเลี้ยงเชื้อใน Potassium acetate slants และ Gorodkowa's slants สังเกตการสร้างสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ทุกวันจนถึง 21 วัน

5.2.3 การทดสอบทางด้านสรีรวิทยา

การเตรียม inoculum เขี่ยเชื้อจาก YM agar slant ทำให้เจือจางในน้ำกลั่น Sterile ที่มีปริมาณ 4.5 ml

5.2.3.1 Fermentation of carbon compounds

เตรียม fermentation medium หรือ Starch fermentation medium ในหลอดจุกเกลียวที่มี durham tube ใช้ pipette 1 ml ดูดเชื้อจาก inoculum ที่

เตรียมไว้ประมาณ 1 หยด ลงใน fermentation medium แล้วบ่มเชื้อไว้ที่ 25°C ตรวจสอบการเกิดแก๊สวันที่ 1 2 7 14 และ 21 วัน

5.2.3.2 Aerobic utilisation of carbon compounds

inoculate เชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบ 1 หยด จาก suspension ของเชื้อที่เตรียมเอาไว้ ลงใน C-assimilation medium โดยใช้ pipette 1 ml ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในวันที่ 2, 7, 14 และ 21 วัน โดยการเขย่าหลอดทดสอบด้วย mixer เพื่อให้มีความขุ่นของเชื้อเท่ากันตลอดทั้งหมด แล้วนำมาทาบบนกระดาษที่มีเส้นดำ รายงานระดับการเจริญของเชื้อ ดังนี้

0 = ไม่มีการเจริญ ไม่มีความขุ่น ; จะเห็นเส้นสีดำชัดเจน

+1 = มีการเจริญน้อยมาก ขุ่นเล็กน้อย ; เห็นเส้นสีดำแต่บริเวณขอบจะม้วเล็กน้อย

+2 = มีการเจริญน้อย - ยังมองเห็นสีดำ แต่เห็นไม่ชัดเจน

+3 = มีการเจริญดีมาก มองไม่เห็นเส้นสีดำเลย

5.2.3.3 Aerobic Utilisation of KNO_3

inoculate เชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบ 1 หยด จาก suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้ ลงใน KNO_3 - assimilation medium โดยใช้ pipette 1 ml ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในวันที่ 1, 2, 7, 14 และ 21 วัน บันทึกผลการเจริญของเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 5.2.3.2

5.2.3.4 การเจริญใน Vitamin - Free medium

inoculate เชื้อยีสต์ที่ต้องการทดสอบ 1 หยด จาก Suspension ของเชื้อที่เตรียมไว้ ลงใน Vitamin free medium โดยใช้ pipette 1 ml ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในวันที่ 1, 2, 7, 14 และ 21 บันทึกระดับการเจริญเช่นเดียวกับข้อ 5.2.3.3

6. การศึกษาคุณสมบัติของ Killer factor จากสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ โดยการศึกษา ดังต่อไปนี้

6.1 PH ที่มีผลต่อ killer activity ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

6.1.1 ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

- Sensitive strain : T. glabrata
- Killer strain : T1, G 2.1, N_2, N_{12} และ 5/19

6.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- YEDP - broth
- Blue - medium (20 ml/plate)

6.1.3 ที่เจาะวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 mm.

6.1.4. วิธีการดำเนินงานวิจัย

6.1.4.1 นำยีสต์ที่เป็น Killer strain เลี้ยงบน YEDP-slant ให้มีอายุ 24 ชม จากนั้นถ่ายเชื้อ ลงใน YEDP-broth ที่มีปริมาณ 50 ml. ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml. (YEPD-broth แปรผันค่า pH ตั้งแต่ 7-2.5 โดยแปรผันค่าที่ละ 0.5) แล้วนำไปเขย่าที่ 150 rpm. 25°C, 3 วัน

6.1.4.2 นำยีสต์ T. glabrata ที่มีอายุ 24 ชม. มาถ่ายเชื้อลงใน YEDP-broth (ไม่แปรผันค่า pH) ขนาด และ ปริมาณ เดียวกับที่ใช้กับ Killer strain จากนั้นนำไปเขย่าที่ 150 rpm., 25°C, 18-20 ชม.

6.1.4.3 นำ T. glabrate จากข้อ 6.1.4.2 มาเจือจางให้ได้เซลล์จำนวน 10^5 เซลล์ ต่อ ml. จากนั้นนำมา spread บน Blue medium แล้วเจาะวุ้นไว้ 3 หลุม ต่อ 1 plate

6.1.4.4 นำส่วนที่เป็น Spernatant จากการ centrifuge broth ในข้อ 2.1.4.1 ที่ 5,000 rpm. 10 นาที ใส่หลุมละ 0.1 ml.

6.1.4.5 นำ plate ในข้อ 6.1.4.4 ไปบ่มที่ 25°C ตรวจวัด Clear zone ที่เวลา 24 และ 48 ชม. โดยวัดค่ารัศมี

6.2 Temperature ที่มีผลต่อ Killer activity ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

6.2.1 ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

Sensitive strain : T. glabrata

Killer strain -: T1, G2.1, N2, N12 และ 5/19

-: K1, K2 และ K3

6.2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

YEPD-broth

Blue medium

6.2.3 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 25°C, 30°C, 35°C, 37.5°C และ 40 °C

6.2.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

6.2.4.1 นำยีสต์ที่เป็น Killer strain มาเลี้ยงบน YEPD-slant บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24-48 ชม.

6.2.4.2 นำยีสต์ T. glabrata ที่มีอายุ 24 ชม. มาถ่ายเชื้อลงใน YEPD-broth ขนาด 50 ml ในขวดขนาด 250 ml แล้วนำไปเขย่าที่ 150 rpm, 25°C, 18-20 ชม.

6.2.4.3 นำ T. glabrata จากข้อ 6.2.4.2 มาเจือจางให้ได้เซลล์จำนวน 10^5 เซลล์ ต่อ ml จากนั้นนำมา spread บน Blue medium

6.2.4.4 นำสายพันธุ์ยีสต์ Killer strain ที่เตรียมได้จากข้อ 6.2.4.1 ทำเครื่องหมายกากบาทลงบน Blue medium ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ

6.2.4.3 เชื้อละ 3 จุด ต่อ 1 plate ทำเชื้อละ 5 plate

6.2.4.5 นำ plate ในข้อ 6.2.4.4 ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25°C, 30°C, 35°C, 37.5°C และ 40°C ตรวจวัด clear zone ที่เกิดขึ้นที่เวลา 24, 48 และ 72 ชม.

6.3 ศึกษาถึงผลของ Temperature ที่มีต่อ Stability ของ Killer factor

6.3.1 ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

Sensitive Strain : T. glabrata

Killer Strain -: T1, G2.1, N2, N12 และ 5/19

-: K2 และ K9

6.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

YEPD-broth

Blue-medium (20 ml/plate)

6.3.3 ที่เจาะวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 mm.

6.3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

6.3.4.1 นำยีสต์ที่เป็น Killer Strain เลี้ยงบน YEPD-slant ให้มีอายุ 24 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน YEPD-broth ที่มีปริมาณ 50 ml ในขวดขนาด 250 ml แล้วนำไปเขย่าที่ 150 rpm., 25°C, 3 วัน

6.3.4.2 นำยีสต์ T. glabrata ที่มีอายุ 24 ชม. มาถ่ายเชื้อลงใน YEPD-broth ขนาดและปริมาณเดียวกับที่ใช้ในข้อ 6.3.4.1 จากนั้นนำไปเขย่าที่ 150 rpm., 25°C, 18-20 ชม.

6.3.4.3 นำ T. glabrata จากข้อ 6.3.4.2 มาเจือจางให้ได้เซลล์จำนวน 10^5 เซลล์ต่อ ml จากนั้นนำมา spread บน Blue medium แล้วเจาะวุ้นไว้ 3 หลุม ต่อ 1 plate

6.3.4.4 นำ culture broth จากข้อ 6.3.4.1 มาปั่นที่ 5,000 rpm 10 นาที แล้วนำส่วนที่เป็น supernatant ที่ได้แบ่งออกเป็น 2 หลอด หลอดหนึ่งไป incubate ใน water bath 40°C และอีกหลอดหนึ่งนำไป incubate ใน water bath 45°C ตามลำดับ

6.3.4.5 ให้จับเวลา แต่ละหลอดในข้อ 6.3.4.4 ดังนี้ 0 5 10 20 30 นาที 1 ชม. 2 ชม. และ 3 ชม. เมื่อครบกำหนดเวลาแล้ว จึงนำเอา supernatant ของแต่ละ culture ไปใส่ในหลุมที่เจาะวุ้นไว้แล้วในข้อ 6.3.4.3 หลุมละ 0.1 ml

6.3.4.6 นำ plate ในข้อ 6.3.4.5 ไปบ่มที่ 25°C ตรวจวัด clear zone ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชม. โดยวัดค่ารัศมี

6.4 ศึกษา pH Stability ของ Killer factor ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

6.4.1 ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

Sensitive strain : T. glabrata

Killer strain : T1, N2, G2.1 , 5/19 และ N12

6.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

YEPD - broth

Blue - medium (20 ml/plate)

6.4.3 ที่เจาะวุ้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 mm.

6.4.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

6.4.4.1 นำยีสต์ที่เป็น Killer strain เลี้ยงบน YEPD-slant ให้มีอายุ 24 ชม. จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน YEPD-broth ที่มีปริมาณ 50 ml ในขวดขนาด 250 ml แล้วนำไปเขย่าที่ 150 rpm., 25 C, 3 วัน

6.4.4.2 นำยีสต์ T. glabrata ที่มีอายุ 24 ชม. มาถ่ายเชื้อลงใน YEPD-broth ขนาดและปริมาณเดียวกับที่ใช้ในข้อ 6.4.4.1 จากนั้นนำไปเขย่าที่ 150 rpm., 25 C , 18-20 ชม.

6.4.4.3 นำ T. glabrata จากข้อ 6.4.4.2 มาเจือจางให้ได้เซลล์จำนวน 10^5 เซลล์ต่อ ml จากนั้นนำมา spread บน blue medium แล้วเจาะวุ้นไว้ 3 หลุมต่อ 1 plate

6.4.4.4 นำ culture broth จากข้อ 6.4.4.1 มาปั่นที่ 5000 rpm. 10 นาที แล้วนำส่วนที่เป็น supernatant ที่ได้แบ่งออกเป็นหลอด โดยปรับ pH ให้แตกต่างกันตั้งแต่ pH

2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, 10 ตามลำดับ แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 6 C เป็นเวลานาน 8 ชม.

6.4.4.5 นำ supernatant ที่ pH แล้วจากข้อ 6.4.4.4 ไปใส่ในหลุมที่เจาะวุ้นไว้แล้วในข้อ 6.4.4.3 หลุมละ 0.1 ml

6.4.4.6 นำ plate จากข้อ 6.4.4.5 ไปบ่มที่ 25 C ตรวจวัด clear zone ที่เวลา 24, 48 และ 72 ชม. โดยวัดค่ารัศมี

7. การสกัด ds RNA

7.1 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้

K1 : S. cerevisiae A 8209 B

K2 : S. cerevisiae NCYC 738

K3 : S. capensis NCYC 761

K9 : Hansenula mrakii NCYC 500

สายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ T1, G2.1, N2, N12 และ 5/19

7.2 DNA marker (λ DNA / Hind III)

7.3 YEPD broth 80 ml/flask

7.4 50 mM EDTA. Na_2 (pH 7)

7.5 50 mM Tris-H_2SO_4 (pH 9.3)

7.6 2 - mercaptoethanol

7.7 0.2% Sodium dodesyl sulfate solution

7.8 10 mM Tris HCL

7.9 o.1 M NaCL

7.10 Redistilled phenol

7.11 cold. ethanol (-20°C)

7.12 Electrephoresis buffer

7.13 Ethidiumbromide

7.14 Agarose stab gel

7.15 loading buffer

7.16 Electrophoresis และ power supply

7.17 Short ware UV light illuminator

7.18 Sterile tips and pipette

สูตร Agarose gel

7% agarose gel Type II medium EEO (Sigma) ใน TB buffer

TB Buffer

5X : Tris base 54 g

boric acid 27.5 g

0.5 M EDTA (pH 8.0) 20 ml

เติมน้ำกลั่นให้เป็น 1 lit

7.1.1 วิธีดำเนินการทดลอง

Cell yeast grown in 80 ml (YEPD) medium 25°C 48 hrs

↓

3,000 rpm (0°C, 5 min)

↓

Add 30 ml of 50 mM EDTA. Na2 (pH 7) to the Sediment

incubate at 25°C, 10 min

↓

3,000 rpm (0°C, 5 min)

Add 25 ml of 2.5% 2-mercaptoethanol in 50 mM tris - H_2SO_4 (pH 9.3) incubate at 30°C 15 min

↓ 3,000 rpm (0°C, 5 min)

Add 5-6 ml of 0.2% Sodium dodecyl sulfate, 0.1 M. NaCl, 10 mM. EDTA, 10 mM. Tris HCl (pH 7.5) incubate at 10 min (shaker bath)

↓

Extract with 10 ml Phenol (redistilled & Saturated with buffer), incubate at 25°C, 10 min (Shaker bath)

↓ 3,000 rpm (0°C 15 min)

Aqueous phase (about 3 ml)

Add 6 ml cold ethanol, keep over night in freezer

↓ 3,000 rpm (0°C, 10 min)

Sediment rinse by 70% ethanol dry up at 30°C 3 hrs

add 40 ml buffer (40 mM Tris HCL, 20 mM AccNa, 1 mM EDTA, pH 7.8)

↓

20 ul dissolved solution

↓

Agarose gel electrophoresis

10-15°C, 40V (15A) for 6 hrs

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมัก แอลกอฮอล์ และมีความสามารถในการตกตะกอนได้ดี (S. cerevisiae M30) ให้มีความสามารถเป็น Killer yeast โดยได้วางแผนการทดลองไว้ดังนี้

8.1 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง : S.cerevisiae M30

: Killer st rain (T_1)

8.2 วิธีดำเนินการทดลอง

8.2.1. การสร้างยีสต์ลูกผสมโดยวิธีรวมตัวของเซลโปรโตพลาส

YEPD Slant

24 hrs

↓

YEPD broth (50 ml)

↓

shaking (250 rpm 30 C) until log phase

↓

3,000 rpm 5 min

H_2C

H_2O

↓

Zymolyase

30 C

↓

Protoplast 80%

↓

3,000 rpm 5 min

0.6 M KCL

↓

0.6 M KCL (10^7 Cell/ml)

Protoplast yeast cell I + Protoplast yeast cell II

(M 30) (Killer strain)

↓

3,000 rpm 5 min

↓

PEG 4 ml

37 C 15 min

↓

3,000 rpm 10 min

↓

0.6 M - KCL

↓

dilution

↓

0.1 ml

↓

Galactose – Blue medium

เททับด้วยอาหารแข็งชนิดเดิม แต่เพิ่มความเข้มข้นวุ้นเป็น 3 % บ่มเชื้อไว้ที่ 25 C 5-7 วัน

↓

ตรวจหา Fusant ที่เกิดขึ้น โดยอาศัยคุณสมบัติเป็น Killer strain ซึ่งมีความสามารถหมักแอลกอฮอล์ และตกตะกอนได้ดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8.2.2 การทดสอบการเฟอร์เมนต์น้ำตาล sucrose และ galactose นำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 8.1.1 มาทดสอบใน Fermentation tube ที่เตรียมไว้แล้วตามวิธีในข้อ 5.2.3.1 (ความเข้มข้นของน้ำตาล 12%) แล้วนำไปบ่มที่ 30°C สังเกตฟองแก๊สที่เกิดในหลอด Durham บันทึกผล 48 ชั่วโมง และ 7 วัน คัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถหมัก sucrose และ galactose ได้ดีไว้ทดสอบต่อไป

8.2.3 การทดสอบการหมักแอลกอฮอล์ เลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ลงในอาหารสำหรับทดสอบการหมัก โดยการเตรียมอาหารดังนี้ yeast extract 0.3% , malt extract 0.3% , Bacto - peptone 0.5% , D - sucrose 20% ปริมาตร 10 ml ในหลอดทดสอบปิดด้วยจุกสำลีหมักไว้ที่อุณหภูมิ 25°C ทำการวัดเปอร์เซนต์น้ำตาลด้วยเครื่อง Refractometer ทุก ๆ วัน จนครบ 7 วัน เพื่อดูผลของการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล

ได้ทดลองนำเอาสายพันธุ์ที่สามารถหมัก จน % Brix ลดต่ำลงกว่าสายพันธุ์ T1 ไปวิเคราะห์หา % แอลกอฮอล์ โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography (Pora pak Q , Col. temp. 200°C injection temp. 250°C N_2 40 ml / min , range 10^3 , attenuation 2^3 injection volume 1 ul)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการวิจัย

1 การเก็บตัวอย่าง ได้ดำเนินการเก็บตัวอย่างจากตลาดสดในกรุงเทพมหานครและเขตจังหวัดใกล้เคียง โดยสามารถแยกตัวอย่างออกเป็น 4 ประเภทใหญ่ ๆ คือ ผลไม้ อาหารผัก-ผลไม้หมักดอง น้ำตาลสด และประเภทอื่น ๆ รวมทั้งสิ้น 183 ตัวอย่าง ซึ่งมีตัวอย่างจากตลาดสดคลองเตย กทม. 51 ตัวอย่าง จังหวัดสมุทรสงคราม 52 ตัวอย่าง จังหวัดราชบุรี 30 ตัวอย่าง จังหวัดนครปฐม 20 ตัวอย่าง และจังหวัดเพชรบุรี 30 ตัวอย่าง ดังแสดงชนิดของตัวอย่างที่เก็บจากแต่ละสถานที่ไว้ในตารางที่ 1

2 การแยกเชื้อจากตัวอย่างที่เก็บ โดยแยกเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium ที่ปรับ pH 4.5 เมื่อแยกได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้ว นำไปทดสอบความสามารถในการฆ่าโดยใช้เชื้อ T. glabrata เป็น sensitive strain ในอาหารเลี้ยงเชื้อ blue medium สามารถแยกเชื้อที่ให้ clear zone ได้ทั้งหมด 44 สายพันธุ์ ผลการทดลองดังแสดงไว้ใน ตารางที่ 2 และแสดงตัวอย่างที่เก็บมาจากสถานที่ต่าง ๆ ที่แยกเชื้อให้ clear zone ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3

3 เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการฆ่าโดยใช้ T. glabrata เป็น sensitive strain บนอาหารเลี้ยงเชื้อ blue medium ที่บ่มที่ 25 C เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง และได้ตรวจสอบชนิดของเชื้อที่แยกได้โดยนำมาย้อมด้วยน้ำยา Lacto phenol cotton blue และตรวจสอบดูภายใต้กล้อง จุลทรรศน์ พบว่ามียีสต์อยู่ทั้งหมด 37 สายพันธุ์และแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ ดังแสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 4

4 ศึกษาลักษณะความสามารถในการเป็น Killer yeast ของเชื้อที่แยกมาได้ โดยทดสอบความสามารถในการฆ่ากับยีสต์สายพันธุ์มาตรฐานต่าง ๆ และยีสต์ในสกุลต่าง ๆ จาก culture collection เชื้อยีสต์ที่แยกมาได้ทั้ง 37 สายพันธุ์ พบว่าจะมีบางสายพันธุ์ที่สูญเสียความสามารถในการฆ่าหลังจากเก็บไว้ระยะหนึ่ง ดังนั้นมีเชื้อที่ยังคงแสดงความสามารถในการฆ่าและมีประสิทธิภาพดี จำนวน 22 สายพันธุ์ และเมื่อนำไปทดสอบกับยีสต์สายพันธุ์มาตรฐานและยีสต์ในสกุลอื่น ๆ อีกรวมทั้งสิ้น 17 สายพันธุ์ ดังได้ผลการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 5

5. การจำแนกสายพันธุ์และการทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยา

ได้นำเอาสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสามารถที่ฆ่ายีสต์สายพันธุ์อื่นได้ดีและมี clear zone กว้าง ทั้งหมด 13 สายพันธุ์มาทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยา และสัณฐานวิทยา ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 6

เชื้อที่คัดเลือกได้สามารถจำแนกตามชื่อสกุลได้เป็น 5 ชนิด คือ Kloeckera sp, Torulopsis sp., Trichosporon sp. Candida sp และ Hansenula sp. ดังแสดงผลในตารางที่ 7

6. การศึกษาคุณสมบัติของ Killer factor จากสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

จากผลการทดลองในข้อ 5 ได้คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ T1, G2.1, N2, N12 และ 5/19 ไว้ทดสอบ

6.1 pH ที่มีผลต่อ Killer activity ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ จากการทำ well test ผลการทดลองพบว่า

Hansenula sp (T1) จะมีรัศมีความกว้างของ Clear zone ได้ดีในช่วงของ pH 5-3.5
Kloeckera sp (G2.1) " " " pH 6-3.5
Hansenula sp (N2) " " " pH 5-3.5
Trichosporon sp (5/19)" " " pH 5.5-4.5

ส่วน Hansenula sp (N12) รัศมีความกว้างของ clear zone ค่อนข้างคงที่ในแต่ละช่วงของ pH

ดังแสดงผลการทดลองไว้ในตารางที่ 8 และ กราฟรูปที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ

6.2 การศึกษาผลของ Temperature ที่มีต่อ Killer activity ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

จากผลการทดลองพบว่า

Hansenula sp (T1) สามารถสร้าง Killer toxin ได้ดีในช่วง 25 C, 30 C และ 35 C
Kloeckera sp (G2.1) " " 25 C และ 30 C
Hansenula sp (N2) " " 25 C, 30 C และ 35 C
Hansenula sp (N12) " " 25 C, 30 C และ 35 C
Trichosporon sp (5/19) " " 25 C, 30 C และ 35 C

เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน (K1, K2 และ K3) ซึ่งสามารถสร้าง Killer toxin ได้ดีในช่วง 25 C และ 30 C ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 9

6.3 ศึกษาถึงผลของ Temperature ที่มีต่อ Stability ของ Killer factor ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

*ที่ 40 C พบว่า Killer factor ของแต่ละสายพันธุ์ที่ยังคงมี Stability อยู่แตกต่างกัน เช่น

	K9	Stability อยู่ในช่วง	120 นาที
Trichosporon sp	(5/19)	" "	> 180 นาที
Kloeckera sp	(G2.1)	" "	30 นาที
Hansenula sp	(N2)	" "	30 นาที

Hansenula sp (T1, N12) และ K2 เชื้อมี Stability เหลืออยู่น้อยมากที่ 0 นาที และจะหมดความเสถียรไปในเวลา 5 นาที

ดังผลการทดลองแสดงในตารางที่ 10 และกราฟรูปที่ 6

*ที่ 45 C พบว่า Killer factor ของแต่ละสายพันธุ์มี Stability แตกต่างกันดังนี้

	K9	จะมี	Stability	อยู่ได้นานถึง	30 นาที
Trichosporon sp	(5/19)	"	"	"	60 นาที
Kloeckera sp	G2.1	"	"	"	5 นาที
Hansenula sp	N2	"	"	"	5 นาที

Hansenula sp (T1, N12) และ K2 ไม่มีความเสถียรเหลืออยู่เลย ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 11 กราฟรูปที่ 7

6.4 ศึกษาถึงผลของ pH ที่มีต่อ Stability ของ Killer factor ของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้

จากการทดลองแปรผันค่า pH ของ culture filtrate ของสายพันธุ์ Killer yeast ตั้งแต่ pH 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4, 4.5, 5, 6, 7, 8, 9, และ 10 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 6 C นาน 8 ชั่วโมง จากนั้นจึงเอา culture filtrate ที่แปรผันค่า pH มาทดสอบโดยการทำ well test ผลการทดลอง สามารถวัดรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน Blue medium ได้ดังแสดงในตารางที่ 12 และรูปที่ 8

Kloeckera sp	สายพันธุ์	G2.1	pH stability	ในช่วง pH	2.5 - 7.0
Trichosporon sp	"	5/19	"	"	2.0 - 10.0
Hansenula sp	"	T1	"	"	2.0 - 8.0
Hansenula sp	"	N2	"	"	2.0 - 8.0
		N9	"	"	2.0 - 8.0

ส่วน N12 และ K2 นั้นปรากฏว่า clear zone จะสังเกตเห็นได้น้อยมาก แม้นจะอยู่ในช่วง pH 4.5

7. การสกัด dS RNA

เมื่อนำสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์มาสกัด ds RNA ตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วในวิธีดำเนินการวิจัย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน K_1, K_2, K_3 และ K_9 ดังแสดงผลการทดลองในรูปที่ 9

จากผลการทดลองพบว่า สายพันธุ์มาตรฐาน K_1, K_2 และ K_3 ประกอบด้วย ds RNA 2 ชนิด (L และ M ds RNA) ส่วน K_9 (Hansenula mrakii NCYC 500) ประกอบด้วย ds RNA เพียง 1 ชนิด (L ds RNA) ทำนองเดียวกันกับสายพันธุ์ T1 , N2, N12 และ G2.1 มีเพียงสายพันธุ์เดียวคือ 5/19 ที่มี ds RNA 2 ชนิด

จากเอกสารอ้างอิง เคยมีรายงานการทำ L และ M ds RNA ของ Killer yeast มาแล้ว และ Young & Yagiu ได้รายงานถึงขนาดของ ds RNA ดังนี้

M.W. ds RNA x 10^6

Killer gr.	Strain	L species	Mspeies	Reference
K1	A 8209 B	2.43	1.25	Young and Yagiu, (1975)
K2	738	2.54	1.00	
K3	761	2.50	0.87	

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์

8.1 การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมัก แอลกอฮอล์ และมีความสามารถตกตะกอนได้ดี (S. cerevisiae M30) ให้มีความสามารถเป็น Killer yeast โดยการทำโปรโตพลาสฟิวชั่นกับสายพันธุ์ Killer yeast T1 ได้ผลการทดลองพบว่าหลังจากที่เลี้ยงเชื้อที่ทำการผสมได้แล้วบน Galactose blue medium บ่มที่ 25°C เป็นเวลา 5-6 วัน พบว่ามีโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อและให้ clear zone ทั้งหมด 91 โคโลนี

8.2 การทดสอบการเฟอร์เมนต์น้ำตาล นำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 8.1 มาทดสอบการเฟอร์เมนต์น้ำตาล sucrose 20% และ galactose 20% เมื่อบ่มเชื้อไว้ที่ 30°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ 7 วัน ได้ผลการทดลองดังในตารางที่ 13

8.3 การทดสอบการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาล sucrose เข้มข้น 20% ได้ทำการบันทึกผลการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลเป็น % brix (ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณแอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้น) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อ parent T1 และ M30 ดังแสดงผลการทดลองในตารางที่ 14 และผลของการวัด % แอลกอฮอล์ของสายพันธุ์ T1, M30, 105, 108 และ 109 ด้วยเครื่อง GC. ดังในตารางที่ 15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 แสดงชนิดของตัวอย่างที่เก็บจากสถานที่ต่าง ๆ

1.1 ตลาดสดคลองเตย กทม. (51 ตัวอย่าง)

ผลไม้		อาหาร-ผลไม้หมักดอง	อื่น ๆ
1. ส้ม	28. ลูกชิด	34. มะยมดอง	44. พริก
2. พุทรา	29. ฟักทองเชื่อม	35. มะขามดอง	45. เต้าหู้ขาว
3. ขนุน	30. ถั่วเขียวต้ม	36. พุทราดอง	46. เต้าหู้เหลือง
4. ลูกหมาก	31. มันเชื่อม	37. มะม่วงดอง	47. ลอดช่อง
5. ชมพู่	32. สาลี่	38. องุ่นดอง	48. กระยาสารท
6. กล้วยไข่	33. องุ่นแดง	39. ปลาร้า	49. ข้าวโพด
7. สับปะรด		40. หัวไชโป้ว	50. ลูกเดือย
8. มะพร้าว		41. หน่อไม้ดอง	51. น้ำตาลปี๊บ
9. มะม่วงแช่อิ่ม		42. ผักดอง	
10. มะขาม		43. มะกอกดอง	
11. มะละกอ			
12. น้อยหน่า			
13. อ้อย			
14. มะดัน			
15. ระกำ			
16. องุ่นเขียว			
17. มันเทศ			
18. มันมือเสือ			
19. เผือก			
20. ละมุด			
21. มะเฟือง			
22. แอลเบิล			
23. มะเขือ			
24. มะเกลือ			
25. มะกอก			
26. แห้วเชื่อม			
27. สับปะรดเชื่อม			

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 จังหวัดสมุทรสงคราม (52 ตัวอย่าง)

1.2.1 ตลาด อ.เมือง จ.สมุทรสงคราม

อาหาร-ผัก-ผลไม้ดอง	ผลไม้	อื่น ๆ
1. หอยดอง	11. อ้อย	20. น้ำตาล
2. กระเทียมดอง	12. องุ่น	
3. ปลาร้า	13. ละมุด	
4. ปลาเจ่า	14. เงาะ	
5. กะปิ	15. มะละกอ	
6. ปูเค็ม	16. มะเขือ	
7. กุ้งหมัก	17. สาลี่	
8. หัวไชโป้ว	18. ลางสาด	
9. ผักดอง	19. ลูกตาลเชื่อม	
10. หน่อไม้ดอง		

1.2.2 สวนตามรายทาง อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม

(21-42) น้ำตาลจากสวน + น้ำตาลค้างคืน + น้ำตาลก้นกระบอกเทรวมกัน น้ำมะพร้าวก้นกะลา + น้ำล้างกระบอก + น้ำตาลสดพึ่งเก็บ

(43) เศษมะพร้าวจากสวน

1.2.3 ตลาดอัมพวา จ.สมุทรสงคราม

อาหาร - ผัก - ผลไม้หมักดอง	ผลไม้	อื่น ๆ
44. ผักดอก	47. เชอรี่	
45. มะม่วงดอง	48. องุ่น	
46. ขนมจีน	49. สาเกเชื่อม	

1.2.4 บริเวณเตาตาหวาน อ.บางคณฑี จ.สมุทรสงคราม

ผลไม้	อื่น ๆ
50. องุ่นเขียว	52. ดอกไม้ (ไม่ทราบชื่อ)
51. องุ่นแดง	

1.3 จังหวัดราชบุรี (30 ตัวอย่าง)

1.3.1 ตลาดน้ำดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี

ผลไม้	แป้งหมัก	อื่น ๆ
1. มะกอก	5. ขนมจีน	6. ดอกหญ้า
2. เงาะ		
3. องุ่น		
4. มะขาม		

1.3.2 เขตอำเภอโพธาราม จ.ราชบุรี

ผลไม้	อื่น ๆ
7. ลูกตาล	9. งวงตาล
8. เปลือกผลตาล	

1.3.3 เขตตลาดอำเภอเมือง จ.ราชบุรี

ผลไม้	อาหาร-ผัก-ผลไม้หมักดอง	อื่น ๆ
10. เปลือกกล้วยไข่	19. กุ้งจ่อม	28. กุ้งกุลาดำ
11. เปลือกกล้วยน้ำว้า	20. ผักดอง	29. เกล็ดปลา
12. ส้ม	21. หอมดอง	30. พริก
13. องุ่น	22. น้ำพุทราดอง	
14. มะขามเทศ	23. กระเทียมดอง	
15. ชมพู่	24. เต้าเจี้ยว	
16. ชังชนุน	25. ปลาร้า	
17. ละมุด	26. เต้าหู้ยี้	
18. ส้ม	27. หัวไชโป้ว	

1.4 จังหวัดนครปฐม (20 ตัวอย่าง)

1.4.1 เขตอำเภอนครชัยศรี จังหวัดนครปฐม

น้ำผลไม้	อื่น ๆ
ตัวอย่างน้ำตาลสด 18 ตัวอย่าง	ดินบริเวณเตาต้ม
น้ำตาลต้ม 1 ตัวอย่าง	

1.5 จังหวัดเพชรบุรี (30 ตัวอย่าง)

1.5.1 ตลาดอำเภอเมือง จังหวัดเพชรบุรี

ผลไม้	อาหาร-ผัก-ผลไม้หมักดอง	อื่น ๆ
1. มะม่วง	8. น้ำผักดอง	14. น้ำพริก
2. ผลไม้ (ไม่ทราบชื่อ)	9. เต้าเจี้ยว	15. ชาแมงดาทะเล
3. เม็ดเหลียง	10. ขนมจีน	16. หอยแครงแกะ
4. อ้อย	11. น้ำมะขามดอง	17. ไตปลา
5. ถั่วลิสง	12. หน่อไม้ส้ม	
6. ลูกตาล	13. เต้าหู้ยี้	
7. ลูกหมาก		

1.5.1 ต่อ

ผลไม้	อาหาร-ผัก-ผลไม้ผักดอง	อื่น ๆ
18. น้ำอ้อย	21. น้ำมะดันดอง	
19. พุทรา	22. หอยดอง	
20. ชมพู่	23. หอมดอง	
	24. หัวไชโป้ว	
	25. หน่อไม้ดอง	

1.5.2 บริเวณหาดเจ้าสำราญ จังหวัดเพชรบุรี

ผลไม้	อื่น ๆ
26. ขนุน	27. น้ำทะเล
	28. โคลนริมทะเล
	29. น้ำล้างปลาหมึก
	30. น้ำทิ้งจากโรงงานปลาหมึก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างแหล่งต่าง ๆ จำนวนตัวอย่างที่เก็บ และจำนวนเชื้อที่ให้ clear zone เมื่อทดสอบความสามารถในการฆ่า T. glabrata

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่ให้ clear zone
1. ตลาดคลองเตย กทม.	51	12 (N_1, N_2, N_3, $N_{4/1}$, N_5, N_6, N_7, N_8, N_9, N_{10}, N_{11}, N_{12})
2. ตลาดสดอำเภอเมือง บริเวณอำเภอเมือง บริเวณเตาตาหวาน ตลาดอัมพวา สวนระหว่างทาง อ.อัมพวา อ.บางคณที จ.สมุทรสงคราม	52	11 ($F_{1.1}$, $F_{1.2}$, $F_{2.1}$, $F_{2.2}$, $F_{2.3}$, $G_{1.1}$, $G_{1.2}$, $G_{2.1}$, $G_{2.2}$, C_1, C_2)
3. ตลาดสดเสรี ตลาดน้ำ อ.ดำเนินสะดวก เขตอำเภอโพธาราม ตลาดอำเภอเมือง จ.ราชบุรี	30	9 ($J_{1.1}$, $J_{1.2}$, $J_{1.3}$, $J_{2.1}$ 3/29, 3/38, 3/41, 3/42, 3/43)
4. เขตอำเภอนครชัยศรี จ.นครปฐม	20	3 (1/27 , 1/13, 1A)
5. ตลาดสด อ.เมือง จ.เพชรบุรี และไร่ตาล บริเวณหาดเจ้าสำราญ จ.เพชรบุรี	30	9 (5/7, 5/11, 5/12, 5/19 5/22, 5/24, 5/29, 5/34 5/39)
รวม	183	44

ตารางที่ 3 แสดงตัวอย่างที่เก็บจากสถานที่ต่าง ๆ ที่แยกได้เชื้อให้ clear zone

No. isolate	ตัวอย่าง	สถานที่เก็บ
N1	สับปะรด	ตลาดคลองเตย กทม.
N2, N3	ละมุด	"
N4/1	ข้าวโพด	"
N5	สับปะรด	"
N6,N7,N8,N9,N10	น้ำผักดอง 1A, 11A	"
N11, N12	อ้อย	"
C1, C2	หอยดอง	ตลาด อ.เมือง จ.สมุทรสงคราม
F1.1, F1.2, F2.1	ลางสาด No.1	ตลาดอัมพวา จ.สมุทรสงคราม
F2.2, F2.3		"
G1.1, G1.2	ลางสาด No.2	"
G2.1, G2.2		"
J1.1, J1.2	ดอกหญ้า	ตลาดน้ำ อ.ดำเนินสะดวก
J1.3, J2.1		จ.ราชบุรี
3/29	มะขามเทศ	ตลาด อ.เมือง จ.ราชบุรี
3/38	เต้าเจี้ยว	ตลาด อ.เมือง จ.ราชบุรี
3/41	พริกเน่า	"
3/42	พริกเน่า	"
3/43	เต้าหู้ยี้	"
1/27	น้ำตาลสด	เขตอำเภอนครชัยศรี
1/13	น้ำตาลสด	จ.นครปฐม
1A	น้ำตาลสด	"
5/7	หัวไชโป้ว	ตลาดสด อ.เมือง จ.เพชรบุรี
5/11	น้ำพริก	"
5/12	น้ำพริก	"
5/19	ชาแมงดาทะเล	ตลาดสด อ.เมือง จ.เพชรบุรี
5/22	เต้าเจี้ยว	"
5/24		"
5/29	ขนมจีน	"
5/34	หอยแครงแกะ	"
5/39	ถั่วลิสงเน่า	"

ตารางที่ 4 แสดง clear zone ที่เกิดขึ้นจากเชื้อที่แยกได้ เมื่อใช้ T. glabrata เป็น sensitive strain บน blue medium 25 C 24-48 ชั่วโมง

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	หมายเหตุ
T1	+ + + +	+ + + +	Y (มาจาก lab)
N1	+	+	Y
N2	+ +	+ + +	Y
N3	+ +	+ +	Y
N4/1	+	+ +	Y
N5	+	-	Y
N6	+ +	+ +	Y
N7	+ +	+ +	Y
N8	+ +	+ +	Y
N9	+ +	+ +	Y
N10	+ +	+ +	Y
N11	+ +	+ +	Y
N12	+ +	+ +	Y
F1.1	+	-	Y
F1.2	+	+	Y
F2.1	+	-	Y
F2.2	+ +	+ + +	(+ + +) Y
F2.3	+	-	Y
G1.1	+ +	+ +	Y
G1.2	+ +	+ +	Y
G2.1	+ + +	+ + +	Y
G2.2	+ + +	+ + +	B
C1	-	+ +	(+ +) Y
C2	-	+	(+ +) Y
J1.1	+ +	-	Y
J1.2	+ +	-	Y
J1.3	+ +	-	Y
J2.1	+	-	Y

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	หมายเหตุ
3/29	+	+	Y
3/38	+ + +	+ + + +	B
3/41	+ +	+ +	B
3/42	+ + +	+ +	B
3/43	+ + +	+ +	B
1/27	+	+	Y
1/13	+	+ +	Y
1 A	+ +	+	Y
5/7	+	+	Y
5/11	+	+ + +	B
5/12	+ +	+ + +	B
5/19	+ +	+ + + +	Y
5/22	+ +	+ +	Y
5/24	+	+	Y
5/29	+ + +	+ + +	B
5/34	+	+ +	Y
5/39	+ +	+	Y

ยีสต์ (Y) = 37

แบคทีเรีย (B) = 8

หมายเหตุ ++++ ความกว้าง = 0.8 - 0.5 ซม.

+++ ความกว้าง = 0.5 - 0.3 ซม.

++ ความกว้าง = 0.3 - 0.1 ซม.

+ ความกว้าง = 0.1 ซม.

ตารางที่ 5 ตารางแสดงความสามารถในการฆ่าของเชื้อที่คัดเลือกได้ เมื่อทดสอบกับยีสต์สายพันธุ์มาตรฐาน และยีสต์ในสกุลต่าง ๆ จาก culture collection (24-48 ชั่วโมง)

Sensitive strain	Killer strain				
	KL 88	K1	K2	K3	G2.1
K1	− / −	− / −	− / −	+ / +	− / −
K2	+ / +	+ / +	− / −	− / −	− / −
K3	+ / +	+ / +	− / −	− / −	− / −
K9	− / −	− / −	− / −	− / −	− / −
K10	− / −	+ / +	− / −	− / −	+ / +
K11	+ / +	− / −	+ / +	+ / +	+ / +
T. glabrata	+ / +	+ / +	− / −	+ / +	+ / +
TISTR 5208	−	−	−	−	−
K.apiculata	−	−	−	−	−
TISTR 5205	−	−	−	−	−
Schizo. pombe	−	−	−	−	−
TISTR 5054	−	−	−	−	−
S.lipolytica	+	+	+	+	+
TISTR 5150	−	−	−	−	−
Pichia kluyveri	−	−	−	−	−
TISTR 5045	−	−	−	−	−
C. tropicalis	−	−	−	−	−
TISTR 5097	−	−	−	−	−
E. fibuligera	−	−	−	−	−
*TISTR 5113	−	−	−	−	+
H.anomala	−	−	−	−	+
TISTR 5151	−	−	−	−	−
C.lipolytica	−	−	−	−	−
Candida sp A153	−	−	−	−	−
C. krusei	−	−	−	−	−
Candida sp B9	−	−	−	−	−
C. stellatroidae	−	−	−	−	−

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Sensitive strain	Killer strain T1	N2	3/29	5/22	5/24	5/19	5/39
K1	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
K2	- -	- -	- -	- -	- -	- +	- -
K3	- +	+ +	- -	- -	- -	- -	- -
K9	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -
K10	+ +	+ +	- -	- -	+ +	- +	- -
K11	+ +	+ +	- -	- -	- +	+ +	- +
T.glabrata	+ +	+ +	- -	- -	- +	+ +	- -
*TISTR 5208	-	-	-	-	+	-	-
K.apiculata	+	-	-	-	+	-	-
*TISTR 5205	-	-	-	-	-	+	-
Schizo. pombe	-	-	-	-	-	+	-
TISTR 5054	+	+	-	-	+	+	-
S. lipolytica	+	+	+	+	+	+	+
TISTR 5150	-	-	-	-	-	+	-
Pichia kluyveri	+	-	-	-	-	+	-
TISTR 5045	+	+	-	-	+	+	-
C. tropicalis	+	+	-	-	+	+	-
TISTR 5097	-	-	-	-	-	+	-
E.fibuligera	-	-	-	-	-	+	-
*TISTR 5113	+	+	+	+	+	-	+
H. anomala	+	+	+	+	+	-	+
TISTR 5151	-	-	-	-	-	+	-
C.lipolytica	+	+	+	-	+	+	+
Candida sp A153	-	+	-	-	-	+	-
C. krusei	-	-	-	-	-	+	-
Candida sp B9	-	+	-	+	+	+	+
C. stellatroidae	-	+	-	-	+	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Sensitive strain	Killer strain						
	C1	C2	F2.2	N1	N3	N5	N6
K1	− −	− −	+ +	− −	− −	− −	− −
K2	− −	− −	++ ++	− −	− −	− −	− +
K3	− −	− −	+ +	− −	− −	− −	− −
K9	− −	− −	+ +	− −	− −	− −	− −
K10	− −	− −	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
K11	+ +	− −	+++ +++	+ +	+ +	+ +	− −
T. glabrata	− +	− +	++ +++	+ +	+ +	+ −	+ +
*TISTR 5208	−	−	+	+	−	+	−
K.apiculata	−	−	+	+	−	+	−
TISTR 5205	−	−	+	−	−	−	−
Schizo pombe	−	−	+	−	−	−	−
*TISTR 5054	−	−	+	+	+	+	−
S.lipolytica	−	−	+	+	+	+	+
TISTR 5150	−	−	+	+	−	+	+
Pichia kluyveri	−	−	+	+	−	+	+
TISTR 5045	−	−	+	−	−	−	−
C. tropicalis	−	−	+	+	+	−	−
TISTR 5097	−	−	+	−	−	−	−
E. fibuligera	−	−	+	−	−	−	−
*TISTR 5113	−	−	+	−	−	−	−
H.anomala	−	−	+	−	−	−	−
TISTR 5151	−	−	+++	+	+	+	−
C.lipolytica	−	−	+++	+	+	+	−
Candida sp A153	−	−	+++	+	−	−	−
C. krusei	−	−	+++	+	−	−	−
Candida sp B9	−	−	+	−	−	−	−
C. stellatroidae	−	+	−	+	−	+	−

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Sensitive strain	Killer strain 5/34	N7	N8	N9	N10	N11	N12
K1	− −	− −	− −	− −	− −	− −	− −
K2	+ +	− −	− −	− −	− −	− −	+ −
K3	− −	− −	− −	− −	− −	− −	− −
K9	− −	− −	− −	− −	− −	− −	− −
K10	+ +	− −	− −	− −	− −	+ +	+ +
K11	+ +	− −	− −	− −	− −	− −	+ +
T. glabrata	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +
*TISTR 5208	−	−	−	−	−	−	+
K.apiculata	−	−	−	−	−	−	+
TISTR 5205	−	−	−	−	−	+	−
Schizo pombe	−	−	−	−	−	+	−
*TISTR 5054	+	−	−	−	−	+	+
S.lipolytica	+	−	−	−	−	+	+
TISTR 5150	−	−	−	−	−	−	+
Pichia kluyveri	−	−	−	−	−	−	+
TISTR 5045	+	−	−	−	−	−	−
C. tropicalis	+	−	−	−	−	−	+
TISTR 5097	−	−	−	−	−	−	−
E. fibuligera	−	−	−	−	−	−	−
*TISTR 5113	−	−	−	−	−	−	−
H.anomala	−	−	−	−	−	−	−
TISTR 5151	−	−	−	−	−	−	+
C.lipolytica	−	−	−	−	−	−	+
Candida sp A153	−	−	−	−	−	−	+
C. krusei	−	−	−	−	−	−	+
Candida sp B9	−	−	−	−	−	−	−
C. stellatroidae	+	−	−	−	−	+	+

ตารางที่ 6 แสดงผลการทดสอบสายพันธุ์ยีสต์ทางด้านสรีรวิทยา
และคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา

	N_1	N_2	N_3	N_6	N_{11}	N_{12}	$S/_{19}$	$S/_{22}$	$S/_{24}$	$S/_{34}$	$S/_{39}$	T_1	$G_{2.1}$	K_1	K_2	K_3
1. F/A																
Glu	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	0/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	0/+	+/+	+/+	+/+
Gal	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/+	0/0	0/0	0/0	0/0	+/+	0/0	+/+	+/+	0/0
Su	+/+	+/+	+/+	0/0	+/+	+/+	0/+	0/0	+/+	+/+	0/0	+/+	0/0	+/+	+/+	+/+
Mal	+/+	+/+	+/+	0/0	+/+	+/+	0/+	0/0	+/+	+/+	0/0	+/+	0/0	+/+	+/+	0/0
Lact	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/+	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	
Mel	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0	0/0		0/0	
Raf	+/+	+/+	+/+	0/0	+/0	+/+	0/0	0/0	+/+	0/0	0/0	+/0	0/0		+/+	
Starch	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inositol	NT	NT	0/0	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT
2. Assim																
Insulin																
L-Rhamnos	0	0	0	NT	0	0	NT	NT	0	0	NT	0	NT	NT	NT	NT
Vit-Free	+	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	0	NT	+	NT

	N_1	N_2	N_3	N_8	N_{11}	N_{12}	$S/_{19}$	$S/_{22}$	$S/_{24}$	$S/_{84}$	$S/_{89}$	T_1	$G_{2.1}$	K_1	K_2	K_3
3. spore shape	1-2 แตกง่าย hat	1-2 hat	1-2 hat	-ve	2 hat	2 แตกง่าย hat	-ve	-ve	1-3 แตกง่าย hat	1-2 hat	-ve	2-3 hat	-ve	NT	1-3 asco oval	NT
4. size of cell YM broth 2-3 วัน	3-6 X 2.5-3.75 μ	5.5-3.75 X 3-5 μ	3-5 X 3-4.5 μ	3-5 X 3-3.75 μ	4.5-5.5 X 3.75-4.5 μ	3-5.5 X 3-5 μ	3.75-7.5 X 2-3 μ	2.5-12.5 X 2-3.75 μ	3-5.5 X 2.5-5 μ	4.5-6.5 X 3.5-4.5 μ	3.75-5 X 3.5-3.75 μ	3.75-6.3 X 3.5-5 μ	3-5 X 3-3 μ	NT	3-4.25 X 3-4.5 μ	NT
5. NO_3^- Assim.	+	+	+	0	+	+	0	0	+	+	0	+	0	NT	0	NT
6. Pellicl 72 hrs./ 21 วัน	+/+	+/+	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	-/+	-/+	-/-	+/+	-/-	NT	-/-	NT
7. budding	multi polar	multi polar	multi polar	multi polar	multi polar	multi polar	multi polar และมีการ true mycel. arthospore, chlamydospor	multi polar pseudo mycel.	multi polar	multi polar	bi polar	multi polar	bi polar	NT	multi polar	NT
8. Growth at 37° C 72 hrs.	+	+	+	++	+	+	++	++	+	+	+	+	-	NT	+	NT

หมายเหตุ 0 = negative test

\+ = positive test

NT = no test

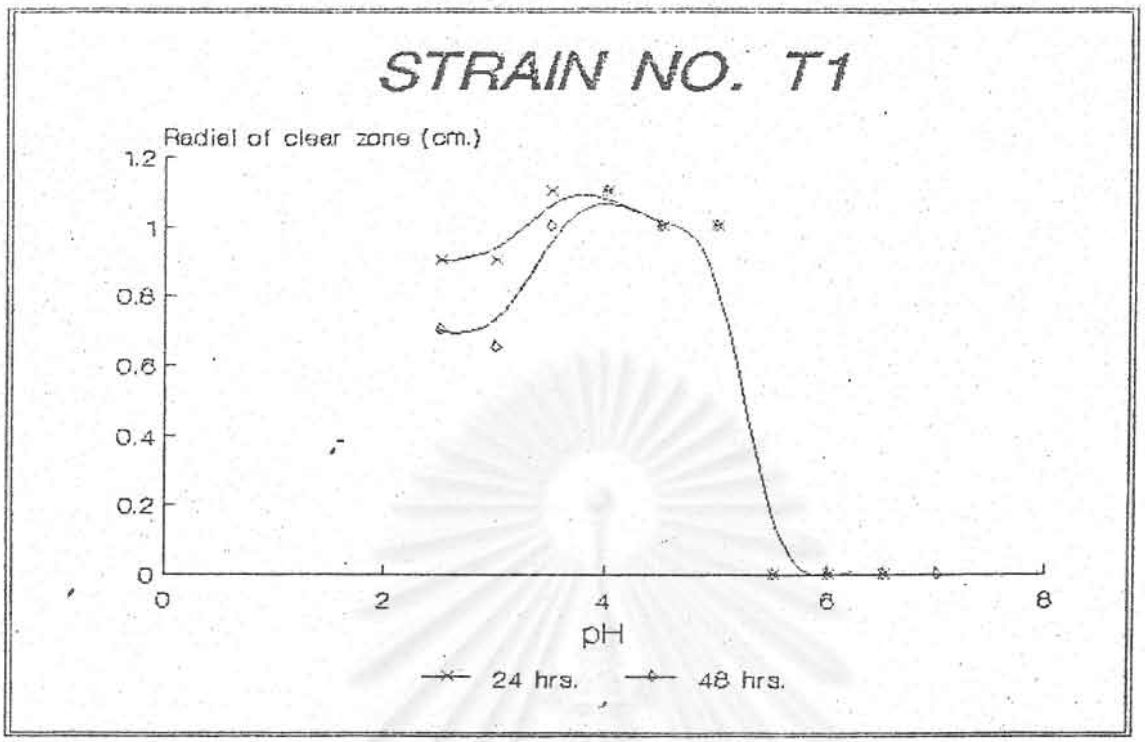
BIPOLAR		MULTIPOLAR				
SPORE +VE	SPORE - VE	SPORE -VE			SPORE +VE	
			true mycelium arthospore chlamydospore	primitive pseudo mycelium	hat shape	hat shape แตกง่าย
	$5/_{29}$ $G_{2.1}$	N_6	$5/_{19}$	$5/_{22}$	T_1 N_2 N_3 N_{16} $5/_{24}$	$5/_{24}$ N_1 N_{12}
	Kloeckera	Torulopsis	Trichosporon	Candida	Hansenula	

ตารางที่ 7 แสดงชื่อสกุลของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

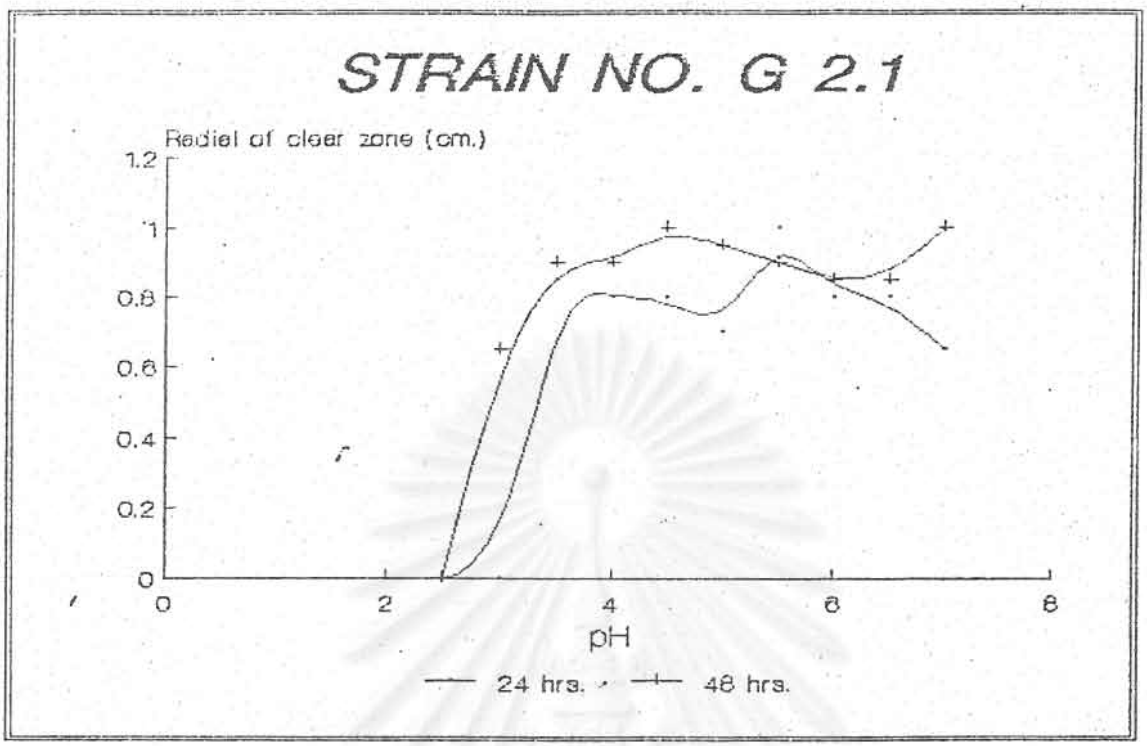
Killer strain		Radial of Clear Zone (cm.)									
		7	6.5	6	5.5	5	4.5	4	3.5	3	2.5
T_1	24 hrs.	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.100	1.100	0.900	0.900
	48 hrs.	0.000	0.000	0.000	0.000	1.000	1.000	1.100	1.000	0.650	0.700
$G_{2.1}$	24 hrs.	0.650	0.800	0.800	1.000	0.700	0.800	0.800	0.850	0.000	0.000
	48 hrs.	1.000	0.850	0.850	0.900	0.950	1.000	0.900	0.900	0.650	0.000
N_2	24 hrs.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.900	1.100	1.100	1.000	0.000	0.000
	48 hrs.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.900	1.000	1.000	0.850	0.650	0.600
N_{12}	24 hrs.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	48 hrs.	0.700	0.650	0.700	0.600	0.700	0.600	0.660	0.600	0.700	0.700
$5_{/19}$	24 hrs.	0.000	0.000	0.000	0.000	0.900	0.950	0.000	0.000	0.000	0.000
	48 hrs.	0.000	0.000	0.650	0.850	0.800	0.950	0.000	0.000	0.000	0.000

ตารางที่ 8 แสดงรัศมีของ clear zone ที่วัดได้บน Blue medium เมื่อทดสอบที่ pH ของการสร้าง Killer Toxin ต่าง ๆ กัน ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์



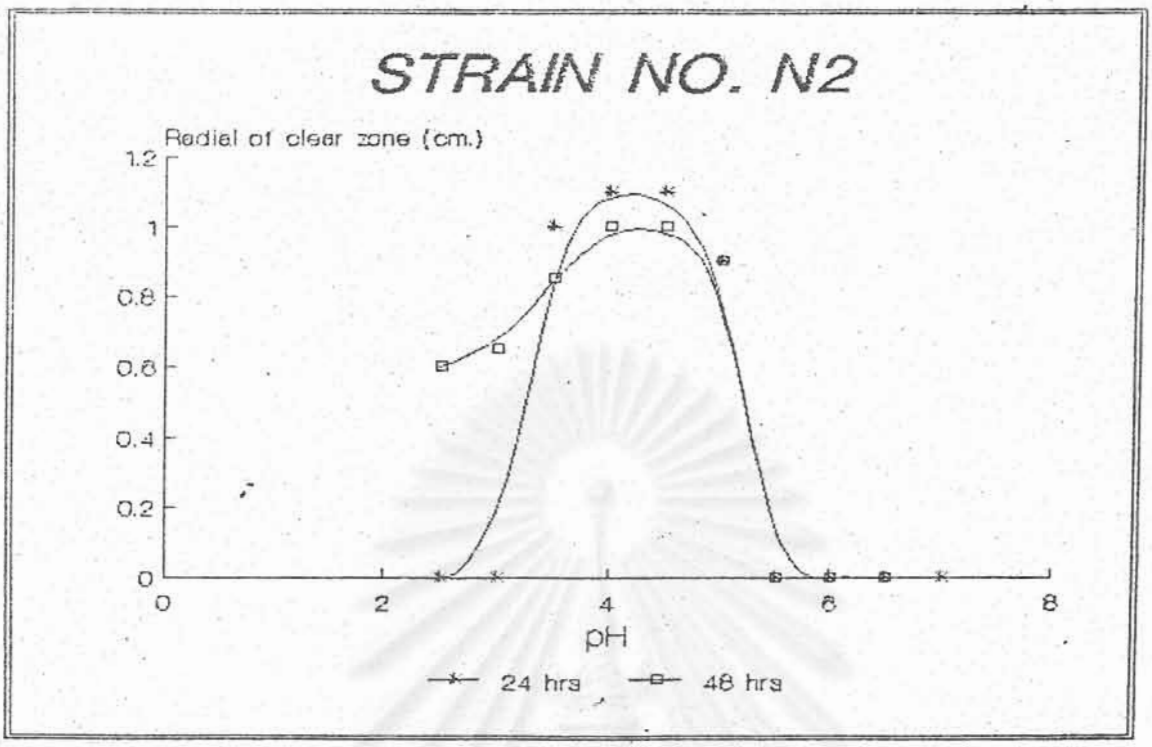
รูปที่ 1 กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน Blue medium เมื่อเลี้ยงเชื้อ T1 ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



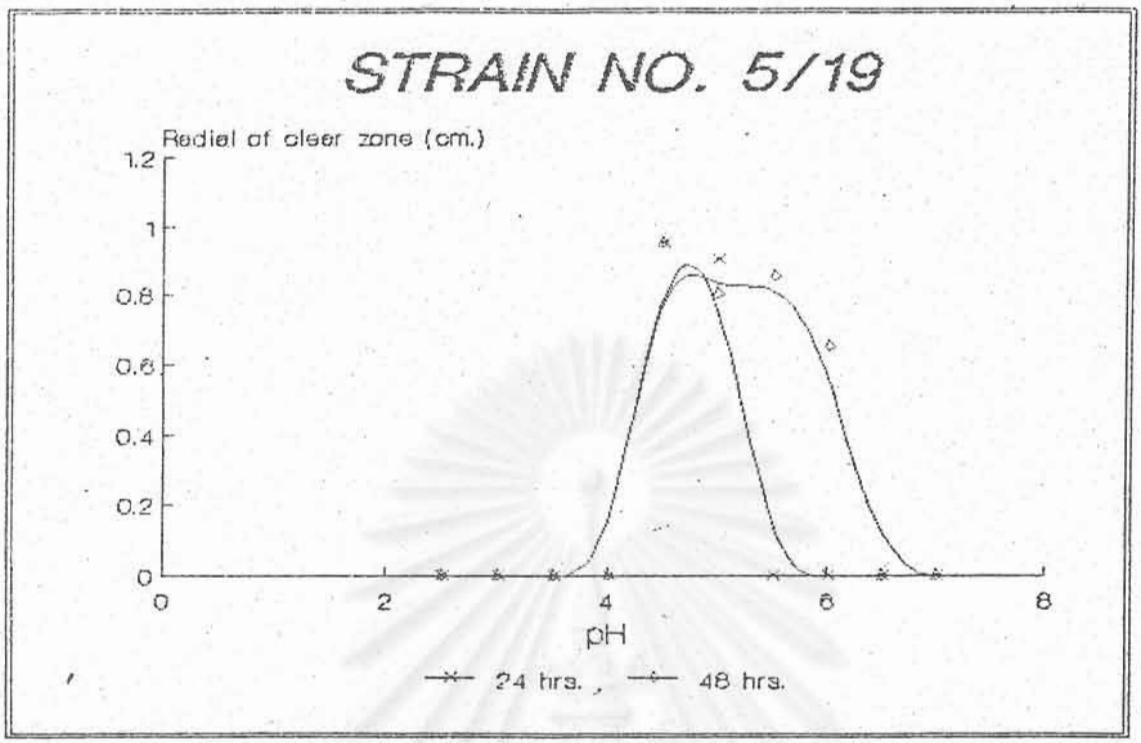
รูปที่ 2 กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน Blue medium เมื่อเลี้ยงเชื้อ G2.1 ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



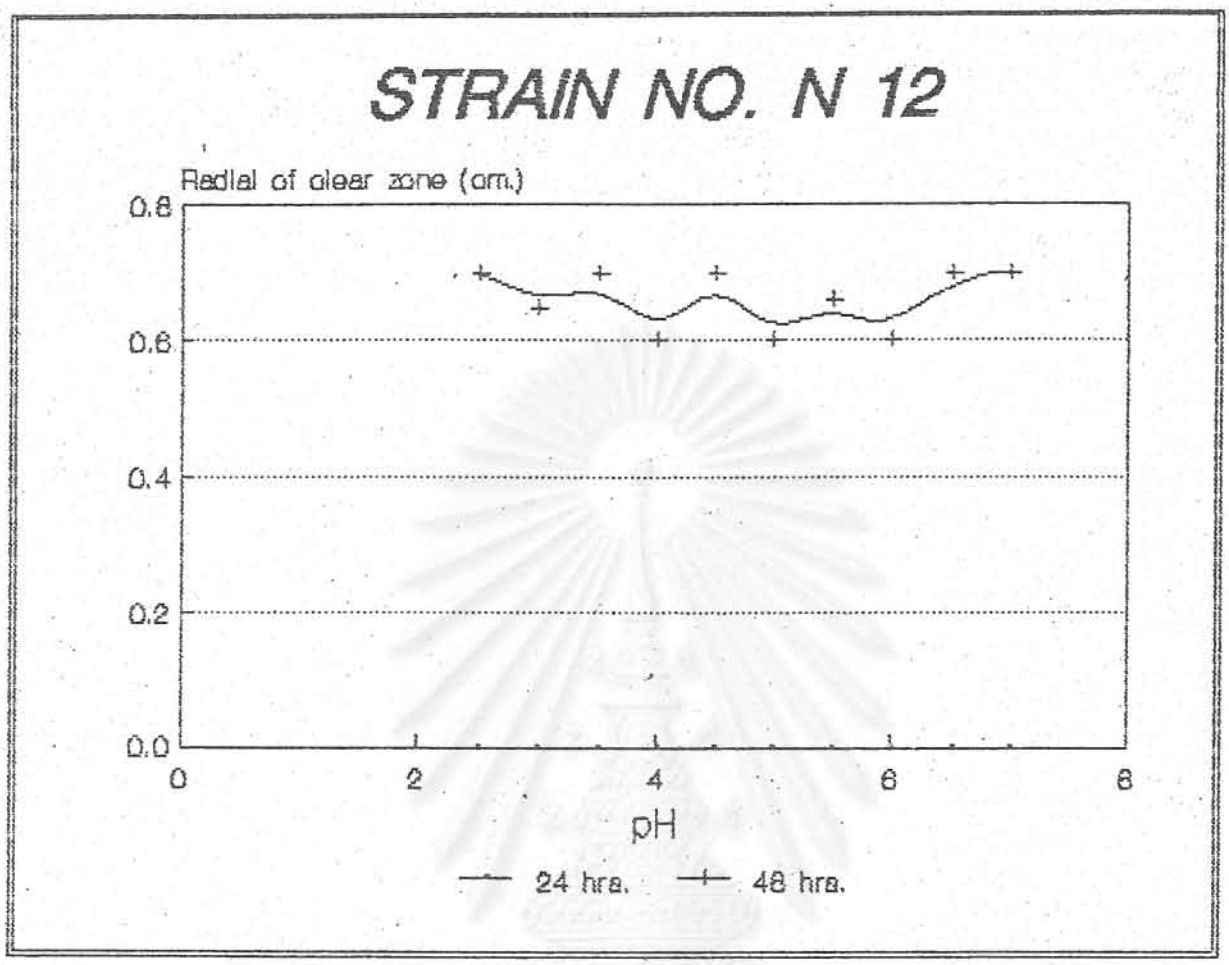
รูปที่ 3 กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน Blue medium เมื่อเลี้ยงเชื้อ N2 ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน Blue medium เมื่อเลี้ยงเชื้อ 5/19 ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 5 กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน Blue medium เมื่อเลี้ยงเชื้อ N12 ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ต่าง ๆ กัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงการสร้าง Killer Toxin ของสายพันธุ์ยีสต์ ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 25 C , 30 C , 35 C , 37.5 C และ 40 C ตามลำดับ

Killer strain	25°C	30°C	35°C	37.5°C	40°C
K_1 24 hrs.	+	+	-	-	-
48	+	+	-	-	-
72	+	+	-	-	- (เริ่มมีสีฟ้า)
K_2 24 hrs.	+	+	-	-	-
48	+	+	-	-	-
72	+	+	-	-	- (เริ่มมีสีฟ้า)
K_3 24 hrs.	+	+	-	-	-
48	+	+	-	-	-
72	+	+	-	-	- (เริ่มมีสีฟ้า)
T_1 24 hrs.	+	+	+	+	-
48	+	+	++	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า
72	+	+	++ (เริ่มมีสีฟ้า)	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า
$G_{2.1}$ 24 hrs.	++	++	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า
48	++	++	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า
72	++	++	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า
N_2 24 hrs.	++	+	+	-	-
48	++	+	+	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า
72	++	++	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า

Killer strain		25°C	30°C	35°C	37.5°C	40°C
N_{12}	24 hrs.	++	+	+	-	-
	48	++	+	+	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า
	72	++	++	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า	เซลล์ติดสีฟ้า
$S_{/19}$	24 hrs.	++++	++++	+++	-	เซลล์ติดสีฟ้า
	48	++++	+++	+++	-	เซลล์ติดสีฟ้า
	72	++++	++	++	-	เซลล์ติดสีฟ้า

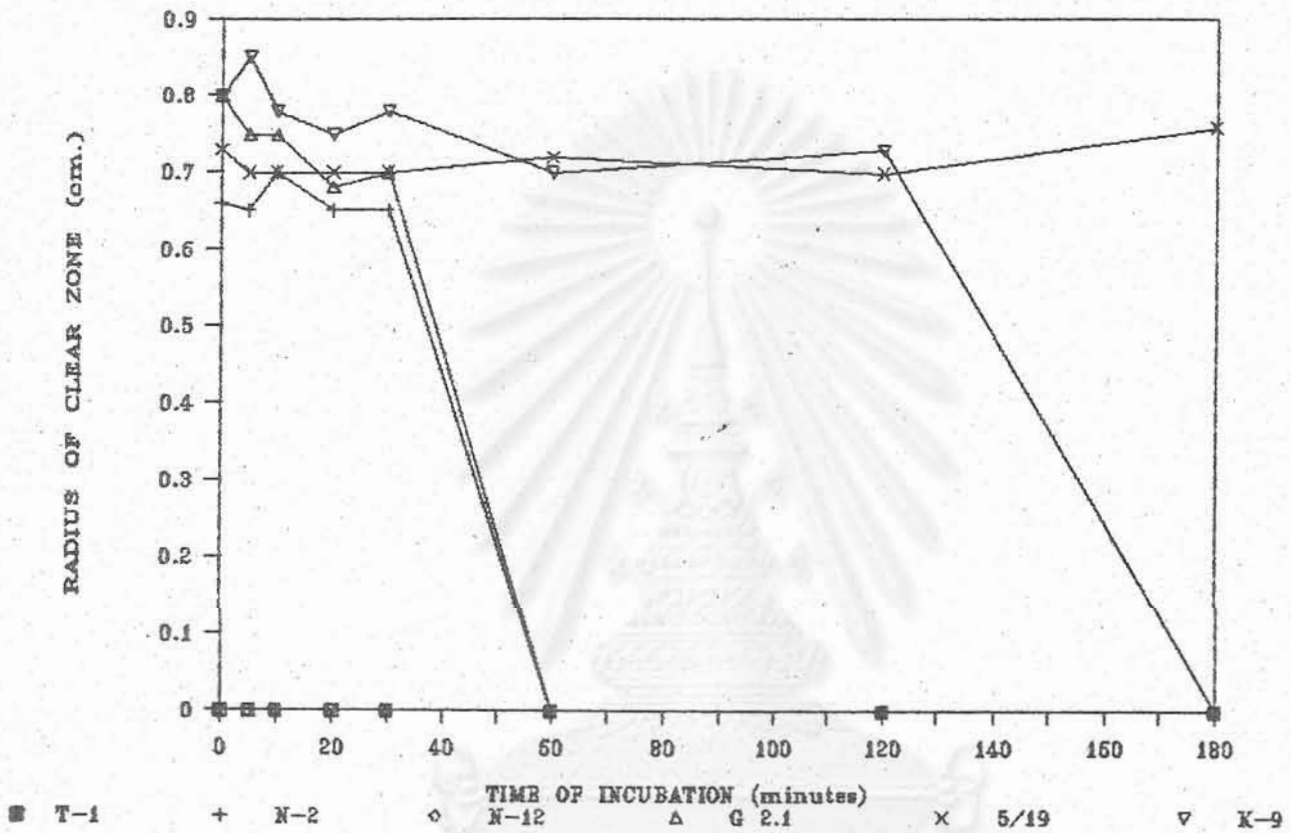
+ : แสดงความกว้างของ clear zone

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงความเสถียรของ Killer Toxin ของสายพันธุ์ยีสต์ ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ ที่ 40 C เป็นเวลา 0,5,10,20,30 นาที 1 ชม.,2 ชม. และ 3 ชม. ตามลำดับ

	incubate plate (ชม.)	0	5	10	20	30	1 hr	2 hr	3 hr
T_1	24	*	0	0	0	0	0	0	0
	48	*	0	0	0	0	0	0	0
	72	*	0	0	0	0	0	0	0
N_2	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0.66	.65	.7	.65	.65	*	*	0
N_{12}	24	*	0	0	0	0	0	0	0
	48	*	0	0	0	0	0	0	0
	72	*	0	0	0	0	0	0	0
G2.1	24	0.73	0	0	0	0	0	0	0
	48	0.78	.75	.72	0.68.	0.68	0	0	0
	72	0.8	.75	.75	0.68	0.7	0	0	0
5/19	24	0.83	0.72	0.76	0.60	0.60	0	0	0
	48	0.78	0.66	0.72	0.65	0.66	0.70	0.70	0.68
	72	0.73	0.70	0.70	0.70	0.70	0.72	0.70	0.76
K_2	24	*	0	0	0	0	0	0	0
	48	*	0	0	0	0	0	0	0
	72	*	0	0	0	0	0	0	0
K_9	24	0.7	0.63	0.60	0.60	0.63	0	0	0
	48	0.82	0.8	0.80	0.75	0.75	0.65	0.66	0
	72	0.8	0.85	0.78	0.75	0.78	0.70	0.73	0

(* = มีค่าน้อยมาก)

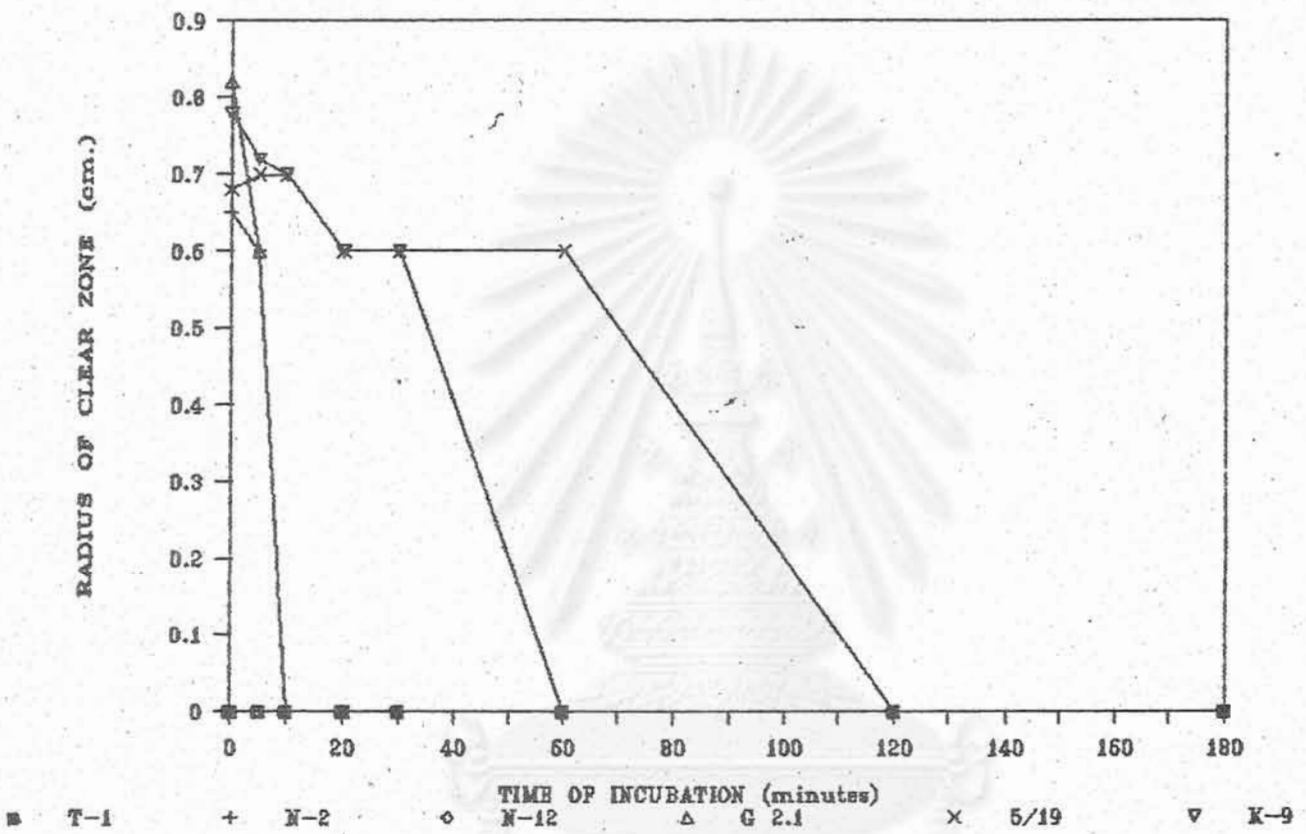


รูปที่ 6 กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน Blue medium (72 ซม.) เมื่อบ่ม Killer toxin ของแต่ละสายพันธุ์ ไว้ที่อุณหภูมิ 40 C ในเวลาต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 11 แสดงความเสถียรของ Killer Toxin ของสายพันธุ์ยีสต์ ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ ที่ 45 C เป็นเวลา 0,5,10,20,30 นาที 1 ชม., 2 ชม. และ 3 ชม. ตามลำดับ

	เวลาที่ incubate (ชม)	0	5	10	20	30	1 hr	2 hr	3 hr
T_1	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0
N_2	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0.65	0.60	0	0	0	0	0	0
N_{12}	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0
$G_{2.1}$	24	0.73	0	0	0	0	0	0	0
	48	0.82	.6	0	0	0	0	0	0
	72	0.82	0.6	0	0	0	0	0	0
5/19	24	0.73	0.7	0.63	0	0	0	0	0
	48	0.73	0.70	0.80	0.60	0.63	0.60	0	0
	72	0.68	0.70	0.70	0.60	0.60	0.60	0	0
K_2	24	0	0	0	0	0	0	0	0
	48	0	0	0	0	0	0	0	0
	72	0	0	0	0	0	0	0	0
K_8	24	0.70	0.60	*	*	*	*	0	0
	48	0.83	0.77	0.7	0.6	*	*	0	0
	72	.78	0.72	0.70	0.60	0.60	*	0	0

(* = มีค่าน้อยมาก)



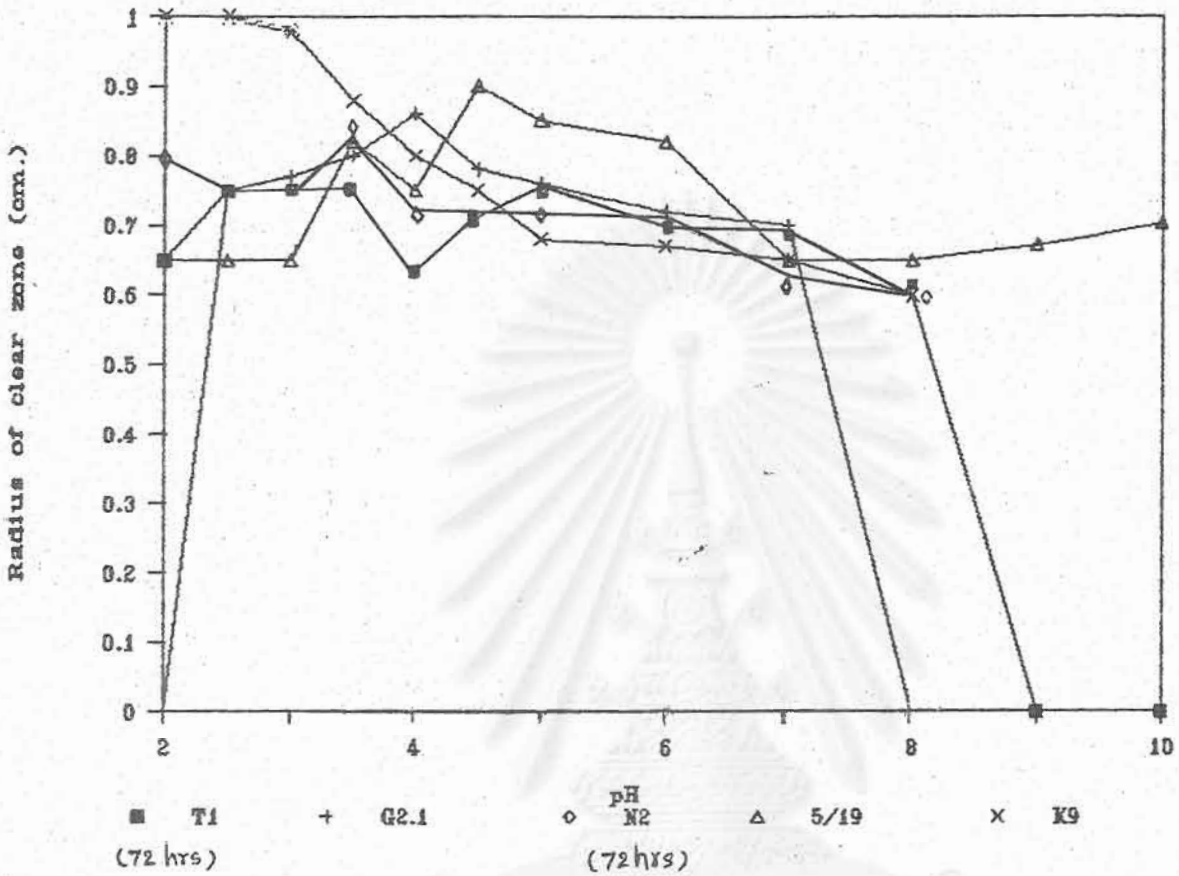
รูปที่ 7 กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดขึ้นบน Blue Medium (72 ชม.) เมื่อบ่ม Killer toxin ของแต่ละสายพันธุ์ ไว้ที่อุณหภูมิ 45 C ในเวลาต่าง ๆ กัน

ตารางที่ 12 แสดงความเสถียรของ Killer toxin ของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ที่ pH ต่าง ๆ กัน โดยแสดงรัศมีของ clear zone ที่วัดได้บน Blue medium เมื่อบ่มที่ 25° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

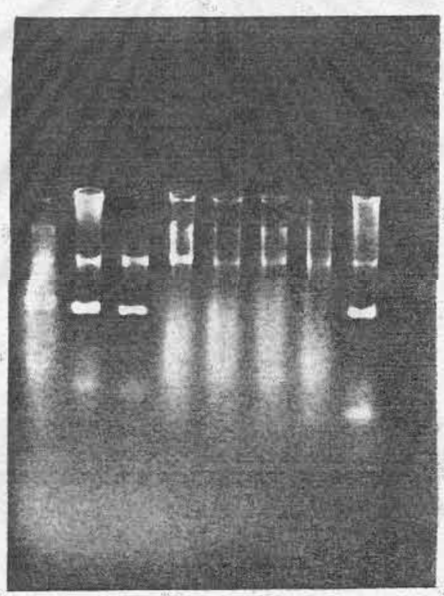
	Radius of clear zone (cm.)								
pH	T1 (72 hrs)		G2.1	N2 (72 hrs)		N12	5/19	K2	K9
2.0	0.65	(0.65)	0	0.65	(0.80)	0	0.65	0	1.0
2.5	0.75	(0.75)	0.75	0.75	(0.75)	0	0.65	0	1.0
3.0	0.73	(0.75)	0.77	0.73	(0.75)	0	0.65	0	0.98
3.5	*	(0.75)	0.80	0.75	(0.80)	0	0.82	0	0.88
4.0	*	(0.63)	0.86	*	(0.73)	0	0.75	0	0.80
4.5	*	(0.70)	0.78	*	(0.73)	*	0.90	*	0.75
5	0	(0.75)	0.76	*	(0.73)	0	0.85	0	0.68
6	0	(0.70)	0.72	0	(0.73)	0	0.82	0	0.67
7	0	(0.70)	0.70	0	(0.63)	0	0.65	0	0.65
8	0	(0.60)	0	0	(0.60)	0	0.65	0	0.60
9	0	(0)	0	0	(0)	0	0.67	0	0
10	0	(0)	0	0	(0)	0	0.70	0	0

(* = น้อยมาก)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 8 กราฟแสดงรัศมีของ clear zone ที่เกิดบน Blue medium เมื่อแปรผัน pH ของ Killer toxin ของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้



รูปที่ 9 แสดง dsRNA ของสายพันธุ์ K Killer และ ยีสต์ที่คัดเลือกได้ โดยการทำ Agarose gel clectrophoresis

1. K1
2. K2
3. K3
4. K9
5. T1
6. N2
7. G2.1
8. 5/19

ตารางที่ 13 แสดงผลการ Fermentation ของน้ำตาล ของสายพันธุ์ที่ให้ clear zone บน Galactose - blue medium

No เชื้อ	Fermentation test SUC 48 ช.ม	GAL. 48 ช.ม	GAL. 7 วัน
T1	+	-	+
M3Ø	++	-	+++
1	+++	-	+
2	+	-	++
3	+++	-	+
4	+++	-	+
6	++	-	++
7	+++	-	++
8	+	-	++
9	++	-	+
1Ø	+++	-	++
11	+++	-	+
14	+	-	++
15	-	-	++
25	+++	-	++
26	+++	-	+
28	+++	-	+
29	+++	-	++
3Ø	+++	-	++
31	+++	-	+
32	+++	-	+
33	+++	-	+
34	+++	-	+++
36	+++	-	+++
37	+++	-	+
38	+++	-	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Fermentation test

No เชื้อ	SUC 48 ช.ม	GAL. 48 ช.ม	GAL. 7 วัน
39	+++	-	+
40	+++	-	+
41	+++	-	+
42	+++	-	++
43	+++	-	+
44	+	-	+
45	+++	-	+
46	+++	-	++
47	+++	-	+
48	+++	-	++
49	+	-	+
51	+	-	+
52	+	-	+
53	++	-	+
54	+++	-	+
55	+	-	+
56	+++	-	+
58	+++	-	+
59	+++	-	+
60	+++	-	+
61	+	-	+
63	+++	-	+
64	+++	-	+
71	++	-	+
75	+++	-	+
81	+++	-	+
82	+++	-	+
83	+	-	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Fermentation test

No เชื้อ	SUC 48 ช.ม	GAL. 48 ช.ม	GAL. 7 วัน
84	+++	-	+
86	+++	-	+
87	++++	-	+
88	+	-	-
89	++	-	-
90	+++	-	-
92	+++	-	+
94	++	-	+
91	+	-	-
98	+	-	+
101	-	-	-
104	+	-	+++
105	+++	-	+++
106	+++	-	++
107	+++	-	+
108	+++	-	+
109	+++	-	+
110	+++	-	+
111	+++	-	-
112	+	-	-
121	+	-	+
122	+++	-	+
123	+++	-	+
124	++	-	+
125	+	-	+
126	+++	-	+
127	+++	-	+
128	+++	-	++

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Fermentation test

No เชื้อ	SUC 48 ช.ม	GAL 48 ช.ม	GAL 7 วัน
130	++	-	+
132	+++	-	+
133	+++	-	+
135	+	-	+
137	+++	-	+
138	+++	-	-
139	+	-	+
140	+++	-	+
141	+++	-	+
143	++	-	+
144	+	-	+

หมายเหตุ Fermentation test : +++ : มีแก๊สเต็มหลอด Durham

++ : มีแก๊สมากกว่าครึ่งหลอด Durham

+ : มีแก๊สน้อยกว่าครึ่งหลอด Durham

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่ลดลงภายหลังการหมักน้ำตาล sucrose ของสายพันธุ์ยีสต์ เป็นเวลา 7 วัน

° Brix

เลขที่ \ วันที่	0	3	5	7
T1	18.6	16.8	14.0	12.8
M30	18.6	9.0	6.4	5.6
1	18.6	17.0	14.8	13.0
3	18.6	17.0	15.2	13.6
4	18.6	16.8	15.2	13.8
6	18.6	17.4	15.2	13.8
7	18.6	17.2	15.4	14.2
9	18.6	17.2	15.3	13.6
10	18.6	17.4	15.4	14.0
11	18.6	17.0	15.0	13.8
25	18.6	17.2	14.9	13.0
26	18.6	17.0	15.2	13.6
28	18.6	17.0	15.0	14.0
29	18.6	17.4	15.8	14.4
30	18.6	17.2	15.8	14.0
31	18.6	17.2	14.4	12.4
32	18.6	16.6	14.2	12.2
33	18.6	17.2	15.7	14.2
34	18.6	17.0	15.4	13.8
36	18.6	17.0	14.8	13.0
37	18.6	17.2	14.8	13.0
38	18.6	17.2	15.4	14.6
39	18.6	17.0	14.6	12.8
40	18.6	16.4	14.2	12.6
41	18.6	17.0	15.2	13.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

° Brix

วันที่ / เลขที่	0	3	5	7
41	18.6	17.0	15.2	13.8
42	18.6	16.8	14.6	13.4
43	18.6	17.4	15.8	15.0
45	18.6	17.0	15.0	13.8
46	18.6	17.0	15.2	14.4
47	18.6	17.0	15.2	14.2
48	18.6	17.2	15.2	14.0
53	18.6	17.0	14.4	12.6
54	18.6	16.8	15.0	13.2
56	18.6	17.3	15.8	14.4
58	18.6	16.8	14.8	13.4
59	18.6	16.4	14.0	12.2
60	18.6	17.0	14.4	12.6
63	18.6	17.4	16.0	15.0
64	18.6	16.9	15.0	13.8
71	18.6	16.8	14.2	12.2
75	18.6	16.8	14.8	13.0
81	18.6	17.4	16.2	15.4
82	18.6	17.0	14.8	13.0
84	18.6	17.8	17.8	17.8
86	18.6	17.0	15.0	13.4
87	18.6	16.6	14.2	12.6
89	18.6	16.2	14.0	12.0
90	18.6	17.0	14.6	13.0
92	18.6	16.8	14.8	13.4
94	18.6	16.8	14.2	12.8
* 105	18.6	16.8	14.0	11.8
106	18.6	16.6	14.6	12.8

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

° Brix

วันที่ / เลขที่	0	3	5	7
107	18.6	17.0	14.8	13.0
* 108	18.6	16.4	14.3	12.0
* 109	18.6	16.6	14.3	12.0
110	18.6	17.4	15.4	13.6
111	18.6	17.2	15.0	13.0
122	18.6	17.2	15.3	13.8
123	18.6	17.0	14.6	12.8
124	18.6	17.2	15.2	13.8
126	18.6	17.0	15.0	13.8
127	18.6	17.2	15.2	13.8
128	18.6	17.0	15.0	13.2
130	18.6	17.0	15.0	13.0
132	18.6	16.4	14.2	12.4
133	18.6	17.0	15.2	13.6
137	18.6	17.0	14.8	13.0
138	18.6	17.0	14.8	13.0
140	18.6	16.8	15.0	13.4
141	18.6	17.2	14.6	12.8
143	18.6	17.4	15.4	14.0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดง % แอลกอฮอล์ที่เชื้อ M30, T1, 34, 105, 108 และ 109 หมัก ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20% sucrose 25°C 7 วัน (ทำการวิเคราะห์ โดยใช้เครื่อง GC)

STD : Absolute ethanol AR grade (Merck)

เชื้อ		% ETOH V/V
S.cerevisiae	M30	10.445
Hansenula sp.	T1	6.274
	105	7.662
	108	8.344
	109	7.711

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย

จากการเก็บตัวอย่างในเขตจังหวัดต่าง ๆ เป็นการกระจายตัวอย่างไปในเขตจังหวัดกรุงเทพมหานคร และจังหวัดใกล้เคียง ตัวอย่างที่เก็บจะมีทั้งที่เป็นผลไม้ อาหาร-ผัก-ผลไม้ดอง และตัวอย่างชนิดอื่น ๆ น้ำตาลมะพร้าว แหล่งของน้ำตาลชนิดอื่น ๆ ที่คาดว่าจะมีเชื้อยีสต์อยู่เป็นจำนวนมาก และเลือกเก็บตัวอย่างจากแหล่งที่คาดว่าจะได้เชื้อยีสต์ชนิดที่แตกต่างไปจากที่เคยรายงานมาแล้ว เช่น หอยดอง หอยแครงแกะ แมงดาทะเล ดอกหญ้า เป็นต้น จำนวนตัวอย่างที่เก็บมาได้ทั้งหมด 183 ตัวอย่าง

เมื่อเก็บตัวอย่างมาได้แล้วจะนำมาแยกเชื้อ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสภาพเหมาะแก่การเจริญของยีสต์ คืออยู่ในช่วง pH 4.5 พบว่าสามารถแยกเชื้อที่มีความสามารถในการฆ่าเมื่อทดสอบกับ T. glabrata จำนวน 44 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้เมื่อนำมาย้อมสีด้วย Lacto phenol cotton blue แล้วตรวจสอบดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นยีสต์ 36 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ ดังสรุปไว้ในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 สรุปจำนวนตัวอย่างที่เก็บ จำนวนเชื้อที่มีความสามารถในการฆ่าจากตัวอย่างต่าง ๆ

สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่เก็บ	จำนวนเชื้อที่แสดงว่ามีความสามารถในการฆ่า	แสดงชนิดของเชื้อที่แยกได้
ตลาดคลองเตย กทม.	51	12	(Y = 12)
จ.สมุทรสงคราม	52	11	(B = 1) (Y = 10)
จ.นครปฐม	20	3	(Y = 3)
จ.ราชบุรี	30	9	(B = 4) (Y = 5)
จ.เพชรบุรี	30	9	(B = 3) (Y = 6)

หมายเหตุ Y = ยีสต์ B = แบคทีเรีย

ตารางที่ 17 แสดงความสามารถในการฆ่ายีสต์มาตรฐานและยีสต์สกุลอื่น ๆ ของเชื้อที่แยกได้และแสดงความกว้างของ clear zone เมื่อทดสอบกับ T. glabrata

เชื้อที่แยกได้	จำนวนเชื้อที่ฆ่าได้	T. glabrata			
		24	48 ชั่วโมง	ความกว้าง	รวมจำนวน
T_1	10 ***	++++	++++	***	6*
N_2	10 ***	++	+++	***	6*
G2.1	5 **	+++	+++	***	5*
3/29	3 *	+	+	*	2*
5/22	4 **	++	++	**	4*
5/24	9 ***	+	+	*	4*
5/19	12 ***	++	++++	***	6*
5/39	5 **	++	+	**	4*
C_1	2 *	-	++	**	3*
C_2	2 *	-	+	*	2*
N_1	10 ***	+	+	*	4*
N_3	6 **	++	++	**	4*
N_5	8 **	+	-	*	3*
N_6	5 **	++	++	**	4*
N_7	1 *	++	++	**	3*
N_8	1 *	++	++	**	3*
N_9	2 *	++	++	**	3*
N_{10}	1 *	++	++	**	3*
N_{11}	5 **	++	++	**	4*
N_{12}	11 ***	++	++	**	5*
5/34	7 **	+	++	**	4*
F2.2	17 ***	++	+++	***	6*

หมายเหตุ กำหนดให้ 9-17 : *** +++ : ***

4-8 : ** ++ : **

3-1 : * + : *

จากการทดลองได้นำเอาสายพันธุ์ยีสต์ ที่คัดเลือกได้ว่ามีความสามารถในการฆ่าเชื้ออื่นได้กว้างขวางและมี clear zone กว้างทั้งหมด 13 สายพันธุ์ มาศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยา สัญฐานวิทยา และสามารถจำแนกออกได้เป็น 5 กลุ่มดังนี้

Kloeckera sp (5/39, G2.1)

Torulopsis sp (N6)

Trichosporon sp (5/19)

Candida sp (5/22)

Hansenula sp (T1, N1, N2, N3, N12, N16, 5/24, 5/34)

นอกจากนี้ยังได้คัดเลือกเอาสายพันธุ์ยีสต์จำนวน 5 สายพันธุ์ (T1, G2.1, N2, N12, 5/19) ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีความสามารถสูงกว่าสายพันธุ์อื่นมาทดสอบต่อไป

ผลการศึกษาอิทธิพลของ pH และ Temperature ที่มีต่อการสร้าง Killer toxin ตลอดจน Stability เมื่อแปรผันค่า Temperature และ pH การสกัด ds RNA ดังแสดงผลไว้ในตารางที่ 18

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 สรุปคุณสมบัติของเชื้อที่คัดเลือกได้

Killer Strain	5/19	G2.1	T1	N2	N12	K2	K9
Genus	Trichosporon	Kloeckera	Hansenula	Hansenula	Hansenula	S.cervisive	H.marki
spore	-ve	-ve	+ve	+ve	+ve	+ve	+ve
จำนวนเชื้อที่ฆ่าได้	12	5	10	10	11	NT	NT
opt.pH	5.5-4.5	6-3.5	5-3.5	5-3.5	>4.5<	*4.2-4.0	*5.0-4.
opt.temp	25-35°c	25-30°c	25-35°c	25-35°c	25-35°c	25-30°c	NT
Stability at 40°c	>180 นาที	30 นาที	<5 นาที	30 นาที	<5 นาที	<5 นาที	120 นาที
Stability at 45°c	60 นาที	5 นาที	0 นาที	5 นาที	0 นาที	0 นาที	30 นาที
Stability pH	2-10	2.5-7	2-8	2-8	4.5	4.5	2-8
ds RNA	M+L ds RNA	L ds RNA	L ds RNA	L ds RNA	NT	M + L ds RNA	L ds RNA

* จาก Ref : Yokomori, Y.; et al, 1988

เมื่อนำเชื้อที่ทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการฆ่าสูง และฆ่ายีสต์สายพันธุ์อื่นได้อย่างกว้างขวาง คือ สายพันธุ์ T1 (Hansenula sp) มาทดลองผสมกับสายพันธุ์ยีสต์ที่ให้แอลกอฮอล์ได้สูงคือ สายพันธุ์ M30 (Sacharomyces cerevisiae) โดยการทำโปรโตพลาสฟิวชั่น ผลปรากฏว่าสามารถคัดเลือกเชื้อที่ให้ clear zone บน Galactose blue medium 91 สายพันธุ์ เมื่อนำเชื้อเหล่านี้มาทดสอบต่อไปโดย หมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ sucrose 12% และ galactose 12% สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่หมักได้ดี 70 สายพันธุ์ เพื่อนำไปทดสอบต่อไป

ได้นำเชื้อที่ผ่านการทดสอบข้างต้นแล้วไปหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ 20% sucrose เพื่อทดสอบความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ พบว่ามีสายพันธุ์ที่วัดได้ % brix ลดลงมากกว่าสายพันธุ์ T1 คือ 105 , 108 และ 109 และเมื่อนำสารละลายส่วนใสไปวัดปริมาณ แอลกอฮอล์ด้วยเครื่อง GC ได้ผล % แอลกอฮอล์ดังนี้ M30 = 10.445%, T1 = 6.274%, 105 = 7.662%, 108 = 8.344% และ 109 = 7.711%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการทดลองแยกเชื้อจากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติพบว่าสามารถแยก Killer yeast จากแหล่งที่แตกต่างจากที่เคยมีรายงานมาแล้ว เช่น Killer yeast บางชนิด แยกได้จาก หอยแครง แมงดาทะเล หอยดอง ดอกหญ้า และพริก เป็นต้น ส่วนน้ำตาลจากมะพร้าวและจากสวนตาล พบว่ามี killer yeast อยู่น้อยกว่าแหล่งอื่นๆ และนอกจากนี้การทดลองนี้ยังสามารถแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถฆ่า T. glabrata ได้ดีอีกด้วย

จากตัวอย่างที่เก็บมาทั้งหมด 183 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อที่ให้ clear zone จำนวน 44 สายพันธุ์ เชื้อที่แยกได้เป็นยีสต์ 36 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรีย 8 สายพันธุ์ พบว่าบางสายพันธุ์สูญเสียความสามารถในการฆ่าเมื่อนำมาทดสอบอีกครั้ง จึงเหลือเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีไว้ทดสอบ 22 สายพันธุ์

ในจำนวนเชื้อยีสต์ 22 สายพันธุ์ สามารถจัดกลุ่ม ตามความสามารถในการฆ่าได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 แสดงเชื้อที่แยกได้ สามารถฆ่า ยีสต์ สายพันธุ์มาตราฐานอื่น ๆ ได้หลายชนิด แตกต่างกันจากเชื้อทดสอบ 17 ชนิด ดังนี้คือ

ฆ่าได้ 9-17 ชนิด ได้แก่ T_1 N_2 5/24 5/19 N_1 N_{12} $F_{2.2}$

โดยเฉพาะเชื้อ F2.2 สามารถฆ่ายีสต์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด

ฆ่าได้ 4-8 ชนิด ได้แก่ $G_{2.1}$ 5/22 5/39 N_3 N_5 N_6 N_{11} 5/34

ฆ่าได้ 3-1 ชนิด ได้แก่ 3/29 C_1 C_2 N_7 N_8 N_9 N_{10}

กลุ่มที่ 2 แสดงเชื้อที่แยกได้ เมื่อทดสอบความสามารถในการฆ่ากับ T. glabrata ได้ clear zone ที่มีความกว้างแตกต่างกัน ดังนี้

(+++) หรือ (++++) ได้แก่ T_1 N_2 $G_{2.1}$ 5/19 $F_{2.2}$

(++) ได้แก่ 5/22 5/39 C_1 N_3 N_6 N_7 N_8 N_9 N_{10} N_{11} N_{12} 5/34

(+) ได้แก่ 3/29 5/24 C_2 N_1 N_5

การทดลองครั้งนี้ นับว่าได้ผลเป็นที่น่าพอใจอย่างยิ่ง เพราะสามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง เช่น $F_{2.2}$ ซึ่งมีความสามารถในการฆ่ายีสต์มาตราฐาน ที่นำมาทดสอบได้ทั้งหมด และโดยเฉพาะเมื่อทดสอบกับ C. krusci และ C. lipolytica จะมีรัศมีของ clear zone ได้กว้างถึง 2.2 - 2.4 cm. ส่วนเชื้อ T1 , N2 และ G2.1 เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการฆ่าสูงและยังคงความเสถียรไว้ได้นานอีกด้วย

จากผลของรายงานการวิจัย ฉบับ ที่ 1 นี้จะได้เชื้อที่ได้ผ่านการทดสอบแล้วว่ามีประสิทธิภาพสูง คือ สามารถฆ่ายีสต์สกุลอื่นได้หลายชนิดและมีความสามารถฆ่ายีสต์อื่นแล้วให้ clear zone กว้างไว้ทดสอบต่อไป

จากผลการนำสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ว่ามีความสามารถในการฆ่ายีสต์สายพันธุ์อื่นได้มาก และมี clear zone กว้าง 13 สายพันธุ์ มาทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและสัณฐานวิทยา สามารถจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ออกได้เป็น 5 สกุล คือ Kloeckera sp, Torulopsis sp, Candida sp, Trichosporon sp และ Hansenula sp.

การศึกษาถึงอิทธิพลของ pH ที่มีต่อ Killer activity พบว่า สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ (T1, G2.1, N2, N12, 5/19) มีค่า pH ที่เหมาะสมอยู่ในช่วงกว้าง คือ pH 6-3.5 หรือ pH 5-3.5 ซึ่งกว้างกว่า สายพันธุ์มาตรฐานที่เคยมีรายงานมา

การศึกษาถึงอิทธิพลของ Temperature ที่มีต่อ Killer activity พบว่า สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ส่วนใหญ่จะมีค่า pH ที่เหมาะสม Temperature อยู่ในช่วง 25°C - 35°C ยกเว้น G2.1 มีค่า pH ที่เหมาะสม temperature อยู่ในช่วง 25°C - 30°C

การศึกษาถึง Stability ของ Killer factor ของสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ 5 สายพันธุ์ พบว่ามี Stability ที่ 40°C และ 45°C ได้นานแตกต่างกัน โดยเฉพาะ 5/19 Killer factor มี Stability ที่ 40°C และ 45°C ได้นานกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน K2 และ K9 มาก ส่วน G2.1 และ N2 มีค่า Stability ที่ 40°C และ 45°C ได้นานกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน K2

การศึกษาถึง pH Stability พบว่า สายพันธุ์ 5/19 มีค่า pH stability กว้างที่สุดคือ ตั้งแต่ pH 2-10 ส่วน T1, N2 มี pH stability ตั้งแต่ pH 2-8 และ G2.1 มี pH stability ที่ช่วง 2.5 - 7 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ K2 และ N12 พบว่า Killer activity น้อยลงไปมากกว่าเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

การสกัด dsRNA พบว่า สายพันธุ์ 5/19 ประกอบด้วย dsRNA 2 ชนิด คือ L และ MdsRNA ส่วนสายพันธุ์ T1, G2.1 และ N2 พบเพียง L dsRNA

ได้ทำการผสมสายพันธุ์คิลเลอร์ยีสต์ที่คัดเลือกได้ T1 (Hansenula sp) และสายพันธุ์ M30 (Sacharomyces cerevisiae) ที่มีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ได้ดี โดยวิธีโปรโตพลาสฟิวชั่น สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการฆ่า และหมักแอลกอฮอล์ได้ดี คือ สายพันธุ์ 105, 108 และ 109 และเมื่อทดสอบเปรียบเทียบความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์กับสายพันธุ์ T1 และ M30 ได้ผลการทดลองดังนี้ M30 = 10.445%, T1 = 6.274%, 105 = 7.622%, 108 = 8.344% และ 109 = 7.711% ตามลำดับ

NRM
589.2
0377
2533
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....1678.....
วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....
12 มิ.ย. 2534

เอกสารอ้างอิง

1. ฉกามาส วงค์ข้าหลวง ปทุมพร ฉิมเอนก พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์ และ วิเชียร ยงมานิตชัย กระบวนการที่เหมาะสมในการย่อยแป้งมันสำปะหลังเพื่อการหมักแอลกอฮอล์ รายงานการวิจัยสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
2. ประดิษฐ์ ดรุวัณณา 2527 Killer phenotype of Saccharomyces killer yeasts isolated from Thailand วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอลแห่งประเทศไทย ปีที่ 3 (1): 27-41
3. ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ ธงชัย คัมภีร์ คาซูโยชิ คิตาโน และ เอกิร่า ท็อดซูกะ 2529 ลักษณะของ Killer yeast ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพการฆ่าสูง รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 24 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมการเกษตร
4. ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ ธงชัย คัมภีร์ คาซูโยชิ คิตาโน และ เอกิร่า ท็อดซูกะ 2529 ลักษณะของ Killer yeast ชนิดใหม่ที่มีประสิทธิภาพการฆ่าสูงเพื่อการผลิตแอลกอฮอล์ รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 24 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาอุตสาหกรรมการเกษตร
5. ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ การควบคุมกระบวนการหมักสาขาวและสาแดง การสัมมนาการควบคุมการหมัก และการวิเคราะห์เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ 2533
6. Bortol,A., Nudel, C., Fraile,E., Torres,R.D., Giuletti,A.M., Spencer, J.F.T., and D. Spencer. 1986. Isolation of yeast with killer activity and its breeding with an industrial baking strain by protoplast fusion. App. Micro. Biotech. 24:414-416
7. Bortol, A., Nudel, C., Giuletti, A.M., Spencer, J.F.T., and D. Spencer. 1988. Industrial yeast strain improvment: Construction of strains having the killer character and capable of utilizing starch. Appl. Micro. Biotech. 28: 577-579
8. Bussey, H., and N. Skipper. 1975. Membrane-mediated killing of Saccharomyces cerevisiae by glycoproteins from Torulopsis glabrata. J. of Bacteriol. 124 (1): 476-483
9. Heard, G.M., and G.H. Fleet. 1987. Occurence and growth of killer yeasts during wine fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 53(9): 2171-2174
10. Kitano, K., Sata, M., Shimazaki, T., and S. Hara. 1984. Occurence of wild killer yeasts in Japanese Wineries and their characteristics. J. Ferment. Technol., 63(1): 1-6

11. Kotani, H., Shimyo, A., and T. Enatsu. 1977. Killer toxin for Sake · yeast: Properties and effect of Adenosine-5-diphosphate and calcium ion on killing action. J. Bacteriol. 129(2): 640-650

12. Panchal, C.J., Meacher, C., Oostrom, J.V., and G.C. Stewart. 1985. Phenotypic expression of Kluyveromyces lactis killer toxin against Saccharomyces spp. Appl. Environ. Micro. 50(2): 257-260

13. Park, Y.K., and B.C. Rivas .1982. Alcohol production from various enzyme-converted starches with or without cooking. Biotechnol. Bioeng. 24: 495-500

14. Porntaveewat, W., Songuandeekul, R., Karuwanna, P., and A. Chaiprasert.1987. Isolation and hybridization of high temperature tolerant killer wine yeasts. A thesis of Graduate School, Chulalongkorn University. 83 p.

15. Rogers,D., and E.A. Bevan. 1978. Group classification of killer yeasts based on cross reactions between strains of different species and origin. J. of Gen. Microbiol. 105: 199-202

16. Shimizu, K., Adachi, T., Kitano, K., Shimizaki, T., Totsuka, A., Hara, S., and H.H. Dittrich. 1985. Killer properties of wine yeasts and characterization of killer yeasts. J. Ferment Technol. 63: 421-429

17. Skipper, N., and H. Bussey. 1977. Mode of action of yeast toxins: Energy requiremenbt for Saccharomyces cerevisae killer toxin. J. of Bacteriol. 129 (2): 668-677

18. Starmer, W.T., Ganter, P.F., and V. Aberdeen. 1987. The ecological in natural communities of yeasts. Can. J. of Microbiol. 33: 783-796

19. Tammarate, P., Takada,N., and Y. Oshima. 1981. Taxonomic study on yeasts isolated from Thai coconut sap and lookpang and selection of the strains for alcoholic fermentation. Ann. Reports of ICME vol. 4 p. 315-332. Osaka U. Japan.

20. Woods, D.R., and E.A. Bevan. 1968. Studies on the nature of the killer factor produced by Saccharomyces cerevisiae. J. Gen. Microbiol. 51:115-126

21. Yokomori,Y., Akiyama, H., and K. Shimizu. 1988. Isolation of a wild Candida killer yeast with a novel killer property. Agric. Biol. Chem., 52(11): 2791-2796

22. Young, T.W., and M. Yagiu. 1978. A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. Antonio van Leeuvenhoek 44: 59-77

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

1. Media

1.1 YM

Yeast extract	Ø.3	g
Malt extract	Ø.3	g
Bacto - peptone	Ø.5	g
D - glucose	1.Ø	g
Distilled water	1ØØ	ml

(for solid medium added Bacto - agar 2 g)

all components are autoclaved together at 15 pounds for 15 minutes.

1.2 YEPD (OR Complete medium)

Yeast extract	1	g
Bacto - peptone	1	g
D - glucose	2	g
Distilled water	1ØØ	ml

(for solid medium add Bacto - agar 2 g or screening medium add Ø.Ø1 % chloramphenicol) all components are autoclaved together at 15 pounds for 15 minutes.

1.3 Potssium acetate agar (Sporulation medium)

Potassium chloride	Ø.82	g
Sodium acetate	Ø.18	g
D - glucose	Ø.Ø5	g
Yeast extract	Ø.1	g
Bacto - agar	1.5	g
Distilled water	1ØØ	ml

Dissolve and dispense, in 1Ø ml amounts in test tubes. Autoclave 15 pounds/15 minutes and allow to set at an angle.

1.4 Gorodkowa agar

D - glucose	0.1	g
Bacto - peptone	1	g
Sodium chloride	0.5	g
Bacto - agar	2	g
Distilled water	100	ml

Dissolve and dispense in 10 ml amounts in test tubes. Autoclave 15 pounds/15 minutes and allow to set at an angle.

1.5 Fermentation medium

Yeast extract	0.5	g
Distilled water	100	ml

Dissolve and dispense in 4.5 ml amount in screw capped test tubes containing durham tubes. Autoclave at 10 pounds/15 minutes. Add 0.5 ml of each of the 20 % filter sterilised sugar solutions* , except for raffinose for which 1 ml was added.

* Sugar used in fermentaiton tests

Glucose

Galactose

Sucrose

Maltose

Melibiose

Raffinose

Inositol

1.6 Starch fermentation medium

Yeast extract	0.5	g
Starch	2	g
Distilled water	100	ml

Dissolve and dispense in 5 ml amounts in screw capped test tubes containing durham tubes. Autoclave at 10 pounds/15 minutes.

blue o.4 ml.

2.5 Zymolyase solution

1.5 M Kcl	4	ml
Ø.1 M2 - Mercaptoethanol	1	ml
2 M Phosphate buffer pH 7.5	4	ml
15		
1.5 mg/ml Zymolyase 100 T	1	ml

Mix each solution just before use. The solution is sterilised by filtration. (Membrane filter Ø.45 u)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.7 KNO_3 assimilation medium

Yeast carbon base	11.7	g
KNO_3	0.64	g
Distilled water	100	ml

Filter sterilised, then add 1 ml to test tubes containing 9 ml of sterile water. The test tubes shall be covered with loose fitting caps to keep the conditions as aerobic as possible.

1.8 Carbon assimilation medium

Yeast nitrogen base	6.7	g
carbon compound*	5	g
Distilled water	100	ml

Filter sterilised, then added 1 ml to test tubes containing 9 ml of sterile water. The test tubes shall be covered with loose fitting caps to keep the condition as aerobic as possible.

* Compounds used in carbon assimilation

Glucose, Galactose, Sucrose, Maltose, Melibiose and Raffinose, L - Rhamnose , Inulin

For other carbon sources the glucoes is replaced by replaced by the weight of carbon compound containing the same amount of carbon as 5 g glucose. An exception is raffinose, which need to be twice as concentrated as glucose.

1.9 Vitamin - free medium

Vitamin - free yeast base "Difco"	16.7	g
Distilled water	100	ml

Dissolve, filter sterilise and store in 10 ml amounts

1.10 Killer detect assay medium (YEPD - MB)

Yeast extract	1	g
Bacto - peptone	1	g
D - glucose	2	g
Bacto - agar	2	g
Distilled water	90	ml

Autoclave the above ingredient and add, the following sterile solutions Phospate - citrate buffer 10 ml and 1 % Methylene

รายนามผู้ช่วยวิจัย

1) นายหนึ่ง เตียอำรุง

2) นางสาวชัญญา พุทธิชันธ์

3) นางสาวอรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนต

4) นางสาวอรุณ แซ่เจ๊า

5) นางสาวบาจรีย์ จันทราภาณุกร

ผู้วิจัยหลัก

จิราภรณ์ ธนิยวัน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬา ฯ)

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์
(นักวิจัย ผู้ชำนาญการสถาบันค้นคว้า และพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร ม. เกษตรศาสตร์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย