ชื่อเรื่อง การคัดแยกและสมบัติของคิลเลอร์ยีสต์จากอาหารหมักดอง

ผู้เขียน นางสาวสุนีย์ แวมะ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การอาหารและโภชนาการ

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

การศึกษาตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านจากพืชในจังหวัดปัตตานีและนราธิวาส จำนวน 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง สะตอดอง หน่อไม้ดอง และ กะหล่ำปลีดองพบว่า ตัวอย่างน้ำหมักดองมีค่าพีเอชในช่วง 3.33-3.96 มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วงร้อยละ 2.4-8.2 และสามารถคัดแยกยีสต์ให้บริสุทธิ์ได้ทั้งหมด 82 ไอโซเลต เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไว 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida tropicalis* TISTR 5045, *Hansenula anomala* TISTR 5113, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 และ *Torulopsis glabrata* TISTR 5241 บนอาหารแข็ง YPD ที่มีการเติม methylene blue ร้อยละ 0.0003 พบว่า คิลเลอร์ยีสต์จำนวน 13 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไว โดยสามารถแบ่งได้สองกลุ่ม กลุ่มแรกได้แก่ W02, W03, W07, W09 และ W10 เกิดการยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ในขณะที่กลุ่มที่สอง ได้แก่ W06, C07, C09, C10, C12, B17, B18 และ B19 สามารถยับยั้งยีสต์ที่มีความว่องไวได้ 4 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 887, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* TISTR 868 พบว่าคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W02, W03, W06, W07, W09 และ W10 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์

เมื่อศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินของไอโซเลต W02, W03, W06, W07, W09 และ W10 พบว่า การเลี้ยงในอาหารเหลว YPD เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 พีเอช 5.0 และเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตคิลเลอร์ท็อกซินได้ดีโดยคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W02, W07, W09 และ W09 มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292, *S. aureus* TISTR 118 และ *B. cereus* TISTR 868 เท่ากับร้อยละ 42.3, 35.7, 43.8 และ 45.0 ตามลำดับโดยเฉพาะไอโซเลต W07 และ 09 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายสายพันธุ์ และจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยชุดทดสอบทางชีวเคมี API ID 32 C พบว่า เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Candida krusei* จึงเลือกเพียงคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 สายพันธุ์เดียวเพื่อใช้ในการศึกษาการทำให้บริสุทธิ์เพียงบางส่วนโดยการ

Prince of Songkla University Pattani Campus

คัดแยกขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่น้อยกว่าและมากกว่า 10 kDa พบว่า มีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 219.88 และ 277.53 µg/ml ตามลำดับ และคิลเลอร์ท็อกซินของทั้งสองขนาดโมเลกุลมีความคงตัวในการเกิดกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส พีเอช 3.33-4.02 และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 โดยสามารถยับยั้ง *B. cereus* TISTR 868 ได้ดีที่สุด มีขนาดวงใสและกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 14.5 มิลลิเมตร และร้อยละ 64.4 ตามลำดับ

คำสำคัญ : killer yeast, killer toxin, fermented food, pathogenic bacteria

Prince of Songkla University
Pattani Campus

Thesis Title	Isolation and Characterization of Killer Yeast from Fermented Food
Author	Miss Sunee Waema
Major Program	Food Science and Nutrition
Academic Year	2009

ABSTRACT

Four samples of fermented foods (pak-sein, sator, bamboo shoot and cabbage) taken from Pattani and Narathiwat provinces, were studied. The fermented liquid samples had pH about 3.3-3.9 and NaCl concentration range between 2.4-8.2%. A total of 82 yeasts isolates strains were screening for against the five sensitive reference strains, *Candida tropicalis* TISTR 5045**,** *Hansenula anomala* TISTR 5113**,** *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5020**,** *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5055 and *Torulopsis glabrata* TISTR 5241 on YPD agar plate supplementing 0.0003% methylene blue. Only 13 yeast isolates were killer-sensitive and these were separated into two groups. Group one, the isolates W02, W03, W07, W09 and W10 showed killer activity in all five sensitive reference strains. Whileas, group two the isolates W06, C07, C09, C10, C12, B17, B18 and B19 showed killer activity in four sensitive reference strains. The inhibition of food pathogenic bacteria, *Escherichia coli* TISTR 887, *Salmonella typhimurium* TISTR 292, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 and *Bacillus cereus* TISTR 868 were tested. Isolate W02, W03, W07, W09 and W10 can inhibit of all bacteria.

The optimum factors of killer toxin production by the isolates W02, W03, W06, W07, W09 and W10 were studied. The results showed that the killer yeasts for killer toxin production were cultivated in YPD broth, addition to 3% NaCl, pH 5.0 and shaking at 35 ^{o}C for 24 hour. The killer yeast isolate W02, W07, W09 and W09 were against pathogenic bacteria *E. coli* TISTR 887, *S. typhimurium* TISTR 292**,** *S. aureus* TISTR 118 and *B. cereus* TISTR 868 and the killer activity were about 42.3,35.7, 43.8 and 45.0%, respectively. Specially in isolate W07 and W09 had broad spectrum of inhibition. Both killer yeast were identified and revealed as *Candida krusei* using biochemical test. Only W07 was selected and studied in purification with cut-off molecular mass of less and more than 10 kDa of protein. The protein were about 219.88 and 277.53 μg/ml respectively. Stability of all the molecular mass of killer toxin for inhibit pathogenic bacteria

Prince of Songkla University Pattani Campus

were temperature (30-50 ^{0}C), pH (3.33-4.02) and NaCl concentration (3%). The most inhibition was *B. cereus* TISTR 868. The clear zone of inhibition and killer activity were about 14.5 mm and 64.4%, respectively.

Keywords : killer yeast, killer toxin, fermented food, pathogenic bacteria

Prince of Songkla University
Pattani Campus