

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ.....	(7)
สารบัญ.....	(8)
สารบัญตาราง.....	(11)
สารบัญตารางภาคผนวก.....	(13)
สารบัญรูป.....	(15)
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทนำต้นเรื่อง.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	2
ขอบเขตการศึกษา.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 อาหารหมักดอง.....	3
2.1.1 ชนิดของผักดอง.....	3
2.1.2 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในอาหาร.....	4
2.2 ยีสต์.....	5
2.2.1 ลักษณะทั่วไปของยีสต์.....	5
2.2.2 โครงสร้างภายในของยีสต์.....	7
2.2.3 การสืบพันธุ์.....	9
2.2.4 นิเวศวิทยาของยีสต์.....	11
2.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์.....	11
2.3 คิลเลอร์ยีสต์	
2.3.1 แหล่งที่พบคิลเลอร์ยีสต์.....	14
2.3.2 คิลเลอร์ที่ออกซิน.....	16

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของคิลเลอรี์ท็อกซิน.....	20
2.3.4 กลไกการทำงานของคิลเลอรี์ท็อกซิน.....	24
2.4 แบคทีเรียก่อโรค	
2.4.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย.....	29
2.4.2 โรคอาหารเป็นพิษ.....	30
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	
3.1 วัสดุคิบ.....	32
3.1.1 ตัวอย่างอาหารหมักดอง.....	32
3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี.....	32
3.1.3 วัสดุ.....	33
3.2 เครื่องมือ.....	33
3.3 วิธีการ.....	34
3.3.1 การเก็บตัวอย่างอาหารหมักดอง.....	34
3.3.2 การคัดแยกยีสต์.....	34
3.3.3 การทดสอบการเป็นคิลเลอรี์ยีสต์ต่อยีสต์ที่มีความว่องไว.....	34
3.3.4 การทดสอบยีสต์ที่เป็นคิลเลอรี์ยีสต์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร.....	35
3.3.5 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตคิลเลอรี์ท็อกซิน.....	35
3.3.6 การจัดจำแนกสายพันธุ์.....	37
3.3.7 ผลของคิลเลอรี์ท็อกซินต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร.....	37
3.3.8 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค.....	38
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	
4.1 ตัวอย่างอาหารหมักดอง.....	39
4.2 การคัดแยกคิลเลอรี์ยีสต์.....	39
4.3 ผลการทดสอบการเป็นคิลเลอรี์ยีสต์ต่อยีสต์ที่มีความว่องไว.....	41
4.4 ผลการทดสอบยีสต์ที่เป็นคิลเลอรี์ยีสต์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร.....	51

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.5 การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกิลเลอร์ที่ออกซินจากสายพันธุ์ที่แยกได้.....	54
4.5.1 ชนิดของอาหาร.....	54
4.5.2 พีเอช.....	57
4.5.3 อุณหภูมิ.....	59
4.5.4 ผลของเกลือ.....	61
4.5.5 ระยะเวลาที่เหมาะสม.....	62
4.6 การจำแนกสายพันธุ์.....	66
4.7 ผลของกิลเลอร์ที่ออกซินต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร.....	69
4.5.1 อุณหภูมิ.....	70
4.5.2 พีเอช.....	73
4.8 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค.....	76
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	80
เอกสารอ้างอิง.....	82
ภาคผนวก.....	91
ประวัติผู้เขียน.....	104

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ความสามารถของยีสต์ในการใช้แหล่งคาร์บอนต่าง ๆ.....	12
2 การทำให้บริสุทธิ์ของคิลเลอร์ที่ออกซินชนิด KpKt จากเชื้อ <i>Kluyveromyces phaffii</i>	18
3 น้ำหนักโมเลกุลของคิลเลอร์โปรตีนจากคิลเลอร์ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ.....	19
4 อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของคิลเลอร์ที่ออกซิน ในการยับยั้งของยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ.....	23
5 เปรียบเทียบส่วนประกอบภายในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย.....	30
6 ชนิดและแหล่งที่มาของตัวอย่างอาหารหมักดองจากพืช.....	32
7 ชนิดของตัวอย่าง แหล่งที่มา พีเอช และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ของน้ำหมักตัวอย่าง.....	40
8 กำหนดรหัสของยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำหมักดอง.....	40
9 การยับยั้งยีสต์ที่มีความไวด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืช ในอาหาร YPD ที่ไม่เติมและเติมโซเดียมคลอไรด์.....	43
10 ความสามารถในการเกิดกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยคิลเลอร์ ที่ออกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ.....	53
11 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยคิลเลอร์ที่ออกซินจาก คิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และ W09 ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร YPD พีเอช 5.0 เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 ที่เวลาต่างๆ.....	65
12 การใช้น้ำตาลและอินทรีย์สารชนิดต่างๆ ของคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และ W09.....	68
13 ปริมาณโปรตีนที่ผลิตจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07.....	70
14 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วย คิลเลอร์ที่ออกซินที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	72
15 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วย คิลเลอร์ที่ออกซินที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10 kDa และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง.....	72

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
16	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วย คิลเลอร์ที่ออกซิเจนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และมีพีเอชต่างๆ.....75
17	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วย คิลเลอร์ที่ออกซิเจนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa และมีพีเอชต่างๆ.....75
18	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วย คิลเลอร์ที่ออกซิเจนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 kDa ในอาหารที่มีการ เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ.....77
19	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วย คิลเลอร์ที่ออกซิเจนที่มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 10 kDa ในอาหารที่มีการ เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ.....77
20	ความคงตัวของโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0, 3 และ 6.....78

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1 การเตรียม Sodium citrate-phosphate buffer ที่พีเอชต่างๆ.....	95
2 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วย คิลเลอร์ที่ออกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่าง ๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YPD และ Modified Sabouraud.....	96
3 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>E. coli</i> TISTR 887 ด้วยคิลเลอร์ที่ออกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่ เลี้ยงในอาหารเหลว YPD และพีเอชต่าง ๆ.....	97
4 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>S. typhimurium</i> TISTR 292 ด้วยคิลเลอร์ที่ออกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต ต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YPD และพีเอชต่าง ๆ.....	97
5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>S. aureus</i> TISTR 118 ด้วยคิลเลอร์ที่ออกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่ เลี้ยงในอาหารเหลว YPD และพีเอชต่าง ๆ.....	98
6 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>B. cereus</i> TISTR 867 ด้วยคิลเลอร์ที่ออกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่ เลี้ยงในอาหารเหลว YPD และพีเอชต่าง ๆ.....	98
7 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>E. coli</i> TISTR 887 ด้วยคิลเลอร์ที่ออกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยง ในอาหารเหลว YPD พีเอช 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ.....	99
8 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>S. typhimurium</i> TISTR 292 ด้วยคิลเลอร์ที่ออกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต ต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YPD พีเอช 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ.....	99
9 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>S. aureus</i> TISTR 887 ด้วยคิลเลอร์ที่ออกซินจากคิลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต ต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YPD พีเอช 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ.....	100

รายการตารางภาคผนวก (ต่อ)

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
10 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>B. cereus</i> TISTR 118 ด้วยคีลเลอร์ที่ออกซินจากคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YPD พีเอช 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ.....	100
11 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>E. coli</i> TISTR 887 ด้วยคีลเลอร์ที่ออกซินจากคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YPD พีเอช 5.0 เติม โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นที่เหมาะสม และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	101
12 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>S. typhimurium</i> TISTR 292 ด้วยคีลเลอร์ที่ออกซินจากคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YPD เติม โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 5.0 เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	101
13 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>S. aureus</i> TISTR 118 ด้วยคีลเลอร์ที่ออกซินจากคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YPD เติม โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ พีเอช 5.0 เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	102
14 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ <i>B. cereusi</i> TISTR 887 ด้วยคีลเลอร์ที่ออกซินจากคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหารเหลว YPD เติม โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ที่พีเอช 5.0 เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	102
15 การเจริญเติบโตของคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และ W09 ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร YPD พีเอช 5.0 เติม โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	103
16 ปริมาณโปรตีนในระหว่างการเจริญเติบโตของคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และ W09 ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร YPD พีเอช 5.0 เติม โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	103

รายการรูป

รูปที่	หน้า
1	ลักษณะรูปร่างของยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>6
2	การนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในด้านต่าง.....6
3	ลักษณะการแตกหน่อของเซลล์ยีสต์.....9
4	การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ <i>Sacharomyces cerevisiae</i>10
5	การเกิดรูหรือช่องของเซลล์ยีสต์เมื่อได้รับคิลเลอรัที่ออกซิน (A) เซลล์ยีสต์ ชุดควบคุม (B) เซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงด้วยคิลเลอรัที่ออกซินชนิด HM-1 และ (C) เซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงด้วย scFv.....25
6	การจับกันระหว่างคิลเลอรัที่ออกซิน K1 ของ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> กับรีเซปเตอร์ที่บริเวณผนังเซลล์.....26
7	กลไกการทำปฏิกิริยาของคิลเลอรัที่ออกซินชนิด PMKT.....27
8	แผนภาพแสดงโครงสร้างของคิลเลอรัที่ออกซินชนิด K1.....28
9	ลักษณะการเกิดการยับยั้งเชื้อที่มีความว่องไวของคิลเลอรัยีสต์.....42
10	การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิด <i>E. coli</i> TISTR 887 (A) และ <i>S. aureus</i> TISTR 118 (B) ด้วยคิลเลอรัที่ออกซินจากยีสต์ (a) W 02 (b) W 03 (c) W 06 และ (d) เอทานอลร้อยละ 70.....52
11	การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิด <i>S. typhimurium</i> TISTR 292 (A) และ <i>B.</i> <i>cereus</i> TISTR 867 (B) ด้วยคิลเลอรัที่ออกซินจากยีสต์ (a) W 07 (b) W 09 (c) W 10 และ (d) เอทานอลร้อยละ 70.....52
12	การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารด้วยคิลเลอรัยีสต์ไอโซเลตต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ เอทานอลร้อยละ 70.....54
13	ความสามารถของการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยคิลเลอรัที่ออกซินไอโซเลตต่าง ๆ ที่เลี้ยง ในอาหารเหลว YPD (a) และ Modified Sabuuraud (b).....56
14	ความสามารถของกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคชนิด <i>E. coli</i> TISTR 887 (a), <i>S. typhimurium</i> TISTR 292 (b), <i>S. aureus</i> TISTR 118 (c) และ <i>B. cereus</i> TISTR 867 (d) ด้วยคิลเลอรัที่ออกซินจากคิลเลอรัยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหาร YPD พีเอชต่างๆ.....58

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
15	ความสามารถของกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนชนิด <i>E. coli</i> TISTR 887 (a), <i>S. typhimurium</i> TISTR 292 (b), <i>S. aureus</i> TISTR 118 (c) และ <i>B. cereus</i> TISTR 867 (d) ด้วยคีลเลอร์ที่ออกซินจากคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่าง ๆ ที่เลี้ยงในอาหาร YPD พีเอช 5.0 และเขย่าที่อุณหภูมิต่างๆ.....60
16	ความสามารถของกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคนชนิด <i>E. coli</i> TISTR 887 (a), <i>S. typhimurium</i> TISTR 292 (b), <i>S. aureus</i> TISTR 118 (c) และ <i>B. cereus</i> TISTR 867 (d) ด้วยคีลเลอร์ที่ออกซินจากคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลตต่างๆ ที่เลี้ยงในอาหาร YPD พีเอช 5.0 เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละต่างๆ และเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....62
17	การเจริญเติบโตและปริมาณโปรตีนของคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 และ W09 ที่เวลาต่างๆ ในอาหาร YPD พีเอช 5.0 เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 และปมที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....64
18	ลักษณะโคโลนีของคีลเลอร์ยีสต์ไอโซเลต W07 (a) และ W09 (b) เวลา 48 ชั่วโมง.....66
19	ลักษณะรูปร่างเซลล์ของคีลเลอร์ยีสต์ <i>C. krusei</i> W07 (a) และ W09 (b) เวลา 48 ชั่วโมง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า.....67
20	บริเวณที่เกิดการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารชนิด <i>B. cereus</i> TISTR 867 ของคีลเลอร์ที่ออกซินแช่ที่อุณหภูมิต่างๆ กัน คือ 30 °C (a), 35 °C (b), 40 °C (c), 45 °C (d) และ 50 °C (e) เปรียบเทียบกับเอทานอลร้อยละ 70 (control) โดยรูป A คือ ขนาดน้ำหนักโปรตีนน้อยกว่า 10 kDa และ B คือ ขนาดน้ำหนักโปรตีนมากกว่า 10 kDa.....73
21	บริเวณวงใสที่เกิดการยับยั้ง <i>B. cereus</i> TISTR 867 ของคีลเลอร์ที่ออกซินในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3 โดยยับยั้งด้วยขนาดโปรตีนน้อยกว่า 10 kDa (a) ขนาดโปรตีนมากกว่า 10 kDa (b) และเปรียบเทียบกับเอทานอลร้อยละ 70 (control).....79

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
22	
บริเวณวงใสที่เกิดการยับยั้ง <i>S. aureus</i> TISTR 867 ของคิลเลอร์ท็อกซิน	
ในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 โดยยับยั้งด้วยขนาดโปรตีน	
น้อยกว่า 10 kDa (a) ขนาดโปรตีนมากกว่า 10 kDa (b) และเปรียบเทียบกับ	
กับเอทานอลร้อยละ (control).....79	
23	
กราฟมาตรฐานการวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Lowry.....94	

Prince of Songkla University
Pattani Campus