การคัดแยกเชื้อและสร้างลูกผสมเชื้อยีสต์หมักไวน์ชนิดทนอุณหภูมิสูง ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อยีสต์อื่น

นางสาว วิมลศิริ พรหมวัฒน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ.2530

ISBN 974-567-990-9

012818

i 10298459

ISOLATION AND HYBRIDIZATION OF HIGH TEMPERATURE TOLERANT KILLER WINE YEASTS.

Ms.Wimolsiri Porntaveewat

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Food Technology

Graduate School

Chulalongkorn University

1987

ISBN 974-567-990-9

Copyright of the Graduate School, Chulalongkorn University

Thesis Title Isolation and Hybridization of High Temperature Tolerant Killer Wine Yeasts.

By Ms. Wimolsiri Porntaveewat

Department Food Technology

Thesis Advisor Dr. Romanee Sanguandeekul

Mr. Pradit Karuwanna

Dr. Angkana Chaiprasert

Accepted by the Graduated School, Chulalongkorn University in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree.

Thavorn Vajrabhya ..... Dean of Graduate School

(Professor Thavorn Vajrabhya Ph.D.)

Thesis Committee

P Pankul ..... Chairperson

(Associate Professor Pacharee Pankul Ph.D.)

Romanee Sanguandeekul ..... Thesis Advisor

(Romanee Sanguandeekul Ph.D.)

Pradit Karuwanna ..... Thesis Advisor

(Pradit Karuwanna)

Angkana Chaiprasert ..... Thesis Advisor

(Angkana Chaiprasert Ph.D.)

..... Commitee

(Suwimon Keeratipibul Ph.D.)

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดแยกเชื้อและสร้างลูกผสมเชื้อยีสต์หมักไวน์ชนิดทนอุณหภูมิสูงที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อยีสต์อื่น

ชื่อนิสิต นางสาววิมลศิริ พรทวีวัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.รมณี สงวนดีกุล

นายประดิษฐ์ ครุวัฒนา

ดร.อังคณา ฉายประเสริฐ

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ปีการศึกษา 2529

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกเชื้อยีสต์จานวน 1,190 สายพันธุ์ ซึ่งได้มาจากการแยกเชื้อยีสต์ที่มีอยู่ในตัวอย่างอาหารชนิดต่างๆ รวมทั้งเชื้อยีสต์ที่ได้รับมาจากงานวิจัยที่เกี่ยวกับอาหารของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ พบว่ามีอยู่จานวน 5 สายพันธุ์ เป็นเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อยีสต์อื่นได้แม้ในที่มีอุณหภูมิสูง ซึ่งมีอยู่ 4 สายพันธุ์ ที่จัดเป็น แซคคาโรมัยซีส ซีรีวิซีอี (Saccharomyces cerevisiae) ได้แก่สายพันธุ์หมายเลข 23 50 265 และ 266 ส่วนอีกหนึ่งสายพันธุ์เป็น แฮนเซนูล่า แซทเทอนัส (Hansenula saturnus) ได้แก่สายพันธุ์ KY 78 พบว่าเชื้อยีสต์หมายเลข 266 เป็นเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อยีสต์อื่นได้หลายชนิด และมีเสถียรภาพในการฆ่าดี จึงถูกคัดเลือกให้เป็นยีสต์ต้นแบบในการสร้างลูกผสม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อยีสต์นี้จัดอยู่ในสายพันธุ์ แซคคาโรมัยซีส ซีรีวิซีอี ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่นิยมมากในการผลิตไวน์ ฉะนั้น เชื้อยีสต์ที่จะนามาเป็นต้นแบบในการสร้างลูกผสมดังกล่าว ได้แก่ เชื้อยีสต์หมักไวน์สายพันธุ์หมายเลข 2 กับเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการฆ่า คือ สายพันธุ์หมายเลข 266 ในการสร้างลูกผสมสมควรที่จะต้องมีการวิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมก่อน โดยเริ่มจากการ

ชักนำให้ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีตำหนิการสร้างกรดอะมิโนและไนโตรจีเนียสเบส (Auxotrophic marker) ที่ต่างกันด้วยสารชักนำให้เกิดการผ่าเหล่า ได้แก่ เอทธิลมีเธนซัลไฟเนท (Ethylmethanesulfonate) เพื่อช่วยให้สามารถติดตามลูกผสมเชื้อยีสต์โดยอาศัยลักษณะโดยตำหนิ (marker) กับสายพันธ์ต้นแบบที่นำมารวมกัน ซึ่งลูกผสมที่ถูกคัดเลือกจะเป็นสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตได้บนอาหารแข็งต่ำสมบูรณ์ชนิดไม่มีกรดอะมิโนอยู่เลย โดยเป็นไปตามหลักคอมพลีเมนทารี (Complememtary) ในการทดลองได้สายพันธุ์ที่เหมาะสมจากการคัดเลือกคือ สายพันธุ์หมายเลข 2 มีจีโนไทพ์ (Genotype) เป็น a his ส่วนสายพันธุ์หมายเลข 266 มีจีโนไทพ์ a/∝ lys ซึ่งเป็นไฮโบรดาลลิคยีสต์ ด้วยสาเหตุนี้จึงนำมาผสมโดยตรงระหว่างสปอร์กับเซลของเชื้อทั้งสองในการสร้างลูกผสม อันเป็นวิธีการหนึ่งที่จะได้เชื้อสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณลักษณะดังกล่าวตามต้องการ เพื่อทดสอบคุณสมบัติของการหมักไวน์ของลูกผสมพบว่า มีความสามารถดีใกล้เคียงกับสายพันธุ์หมายเลข 2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ควบคุมในการหมักไวน์และยังมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อยีสต์อื่นด้วย

Thesis Title	Isolation and Hybridization of High Temperature Tolerant Killer Wine Yeasts.
Name	Ms.Wimolsiri Porntaveewat
Thesis Advisor	Dr.Romanee Sanguandeekul
	Mr.Pradit Karuwanna
	Dr.Angkana Chaiprasert
Department	Food Technology
Academic Year	1986

ABSTRACT

Five out of 1,190 strains of yeast, which had been isolated from variuos food and from culture collection of Institute of Food Research and Product Development (IFRPD), Kasetsart University, exhibited killing activity against sensitive tester strain at elevated temperature (37 °C and 40 °C). Four selected strains i.e., No. 23, 50, 265 and 266 were identified to be Saccharomyces cerevisiae and the other i.e., KY 78 was Hansenula saturnus. Only Saccharomyces cerevisiae No.266 which had the strongest killing ability and highest killing stability was selected to be parental killer yeast strain. The main objective of this investigation is to produce a high temperature tolelant killer wine yeast. The genetic analysis of wine yeast (strain No. 2) and killer yeast (strain No. 266) was done. Both strains were induced auxotrophic markers by using ethylmethanesulfonate and then crossed the different marked strains together. Complementary genetic markers were used in hybridization to facilitate hybrid recovery. The genotype of the selected strain No.2 was a his (heterothallic) while

the genotype of the selected strain No.266 was a/α lys (homothallic). Spore-to-cell mating was used in this research, so that killer wine yeast strain having extended ranges of desirable characteristics can be obtained by genetic techniques. The hybrid could fermented at nearly the same rate as the parental wine strain (No.2) and also had the killing ability as the parental killer strain (No.266).

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ACKNOWLEDGEMENT

I wish to express my profound gratitude to Dr. Romanee Sanguandeekul, Dr.Angkana Chaiprasert and Mr.Pradit Karuwanna for their guidance, valuable suggestion and advice offered during the course of this research.

Thanks to Mr.Pradit Karuwanna, Ms.Patoomporn Chim-anage, Mr.Boontiem Punpaeng, Ms.Malai Boonyaratanakornkit and KU-NRIB joint research project for supplying yeast strains.

I would like to thank Ms.Wanchern Daengsubpa at Bangkok MIRCEN, Thailand Institute of Scientific and Technological Research and Dr.Angkana Chaiprasert at Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University, who allowed me to use the Skerman's micromanipulator and Leitz Mot-E micromanipulator, respectively.

Special appreciation is extended to Ms.Chakamas Wongkhaluang, Ms.Malai Boonyaratanakornkit, Ms.Patoomporn Chim-anage, Mr.Boontiem Punpaeng, Mr.Wichien and Ms.Prima Yongmanitchai, Mr.Somboon and Ms.Pailin Poopat and Ms.Pornsri Raengsilpsuvit for their aids and valuable suggestions in this research. Special thanks also go to Ms.Sivalee Boonkunya and Mr.Suriyan Thaithavorn for their technical assistance.

Finally, I wish to thank the Institute of Food Research and Product Development for providing the laboratory equipments and facilities which made this investigation possible.

CONTENT

		Page
ABSTRACT IN THAI		iv
ABSTRACT		vi
ACKNOWLEDGEMENTS		viii
LIST OF TABLES		ix
LIST OF FIGURES		x
CHAPTER:		
I	INTRODUCTION	1
II	MATERIALS AND METHODS	10
III	RESULTS AND DISCUSSION	33
IV	CONCLUSION AND RECOMMENDATION	74
REFERENCES		77
APPENDIX		84
VITA		99

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

LIST OF TABLES

Table		Page
1	List of isolated yeasts from various sources collected from Sunday Market, Suan Jatujuk, Bangkok	34
2	Phenotypes of the tested yeasts	39
3	Killing reaction of the tested killer strains at different temperature	40
4	Morphological characteristics of yeasts	43
5	Physiological characteristics of yeasts	44
6	Interaction between killer yeasts	46
7	Killing reaction of selected killer yeasts against various yeasts	48
8	Curing of killer yeasts	52
9	Characters of the parental strains used	56
10	Recovery mutant from parental strains after mutagenesis with EMS	60
11	Characters of mutants	60
12	Percentage of ascospore-germination of selected auxotrophic mutants and determination of mating type of single-spore colonies	63
13	The selected characters of haploid clones	64
14	Appearance of cross combination	67
15	Characteristics of parental strains and hybrids recovered from spore-to-cell mating	69
16	Chemical analysis of the finished wines	73

LIST OF FIGURES

Figure		Page
1	Life cycle of Saccharomyces species	6
2	The killer phenomenon of Saccharomyces cerevisiae	38
3	ds RNA of killer yeasts on agarose gel electrophoresis	50
4	Effect of pH on the activity of killer yeast culture filtrates	54
5	Effect of 0.3% ethylmethane sulfonate on the viability of parental cells at various time	58
6	Decrement of reducing sugar in grape juice during fermentation	71
7	Concentration of ethanol in grape juice during fermentation	72
A	Location of genetics material in the yeast cell	84
B	Pattern of haemacytometer and Magnified picture of ruling on platform	87
C	The method of pouring gels	89
D	There is 0.5 - 1.0 mm of agarose between the bottom of the teeth and the base of the gel	89