

<http://journal.rmutp.ac.th/>

ความหลากหลายของยีสต์และราที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง

กุสุมาวดี ฐานเจริญ ^{1*} และ อรรถพร มลาศรี ²

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

² คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

^{1,2} 80 ถนนนครสวรรค์ ตำบลตลาด อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000

รับบทความ 22 พฤษภาคม 2564 แก้ไขบทความ 16 ธันวาคม 2564 ตอรับบทความ 14 มีนาคม 2565

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกยีสต์และราจากลูกแป้งในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย ผลการศึกษาสามารถคัดแยกยีสต์จำนวน 68 ไอโซเลต ยีสต์ที่พบมีรูปร่างกลม 11 ไอโซเลต รี 22 ไอโซเลต ทรงกระบอก 18 ไอโซเลต และทรงกลมปลายมนคล้ายมะนาวฝรั่ง 16 ไอโซเลต และราจำนวน 32 ไอโซเลต ราที่พบมี 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สกุล *Alternaria* 7 ไอโซเลต *Aspergillus* 16 ไอโซเลต *Amylomyces* 4 ไอโซเลต *Penicillium* 4 ไอโซเลต และ *Rhizopus* 1 ไอโซเลต โดยยีสต์ 4 ไอโซเลตมีความสามารถในการย่อยแป้งสูง (ดัชนีวงใส 1.25–1.50) คือ รหัส STYC 05, STYN 02, STYN 07, STYS 03 และมีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้ร้อยละ 1.19–7.24 (ปริมาตร/ปริมาตร) ในอาหารเหลว Yeast extract-Peptide-Dextrose (YPD) ที่มีกลูโคสร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รา 3 ไอโซเลตมีความสามารถในการย่อยแป้งได้สูง (ดัชนีวงใส 11.0–13.0) คือ รหัส STMD 04, STNR 01, STMR 05

คำสำคัญ : การคัดแยก; การย่อยแป้ง; ลูกแป้ง; สาโท; แอลกอฮอล์

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร: +668 5771 1631, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: Kusumawadee.than14@gmail.com

<http://journal.rmutp.ac.th/>

Diversity of Yeasts and Molds Isolated from Look-pang

Kusumawadee Thancharoen^{1*} and Authaporn Malasri²

¹ Faculty of Science and Technology, Rajabhat MahaSarakham University

² Faculty of Education, Rajabhat MahaSarakham University

^{1,2} 80 Nakronsawan Road, Talad, Muang, Maha Sarakham 44000

Received 22 May 2021; Revised 16 December 2021; Accepted 14 March 2022

Abstract

This research was studied to isolated yeasts and molds from Look-Pang in Northeastern Thailand. The results indicated that sixty-eight isolates of yeast, classified from cell shape including spherical 11 isolates, oval 22 isolates, cylindrical 18 isolates and apiculate 16 isolates and thirty-two isolates of mold were obtained as *Alternaria* 7 isolates, *Aspergillus* 16 isolates, *Amylomyces* 4 isolates, *Penicillium* 4 isolates and *Rhizopus* 1 isolate. There from sixty-eight isolates of yeast strong amylolytic activity (clear zone index 1.25-1.50) were STYC 05, STYN 02, STYN 07, STYS 03 and gave alcohol 1.19 – 7.24 % (v/v) on yeast extract-Peptone-Dextrose (YPD) with glucose 2 % (W/V) at room temperature (30±2 °C) for 48 hour. Three from thirty-two isolates of mold strong amylolytic activity (clear zone index 11.0-13.0) were STMD 04, STNR 01, STMR 05.

Keywords : Isolation, Starch Hydrolysis, Look-pang, Sato, Alcohol

* Corresponding Author. Tel.: +668 5771 1631, E-mail Address: Kusumawadee.than14@gmail.com

1. บทนำ

ลูกแป้ง หรือที่ชาวตะวันตกรู้จักกันในชื่อ “Chinese yeast cake” คือ ก๋าล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บในรูปเชื้อแห้ง เพื่อใช้ในการหมักเหล้าหลายชนิดในประเทศแถบเอเชีย เข้าใจว่าลูกแป้งมีแหล่งกำเนิดมาจากประเทศจีนและได้ถ่ายทอดไปยังประเทศเพื่อนบ้านรวมทั้งประเทศไทย โดยมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ลูกแป้งมีหลายชนิดคือ ลูกแป้งสาโท ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งน้ำส้มสายชู และลูกแป้งขนมถ้วยฟู การใช้ประโยชน์จากลูกแป้งจะคล้ายคลึงกันเป็นส่วนใหญ่ คือ ใช้ในการหมักที่มีกิจกรรมการเปลี่ยนแป้งในวัตถุดิบประเภทธัญพืชและพืชหัวให้เป็นน้ำตาล เพื่อผลิตอาหารหมักประเภทข้าวหมาก น้ำส้มสายชู สุรา และเมรัย (เช่น กระแช่ สาโท หรืออุ) ยกเว้นราจิเทมเป้ที่ใช้ในการผลิตเทมเป้ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลือง [1] ปัจจุบันลูกแป้งในประเทศไทยเป็นสิ่งหายาก โดยเฉพาะลูกแป้งน้ำส้มสายชู และลูกแป้งขนมถ้วยฟู คงเหลือแต่ลูกแป้งข้าวสาโท และลูกแป้งเหล้าเท่านั้นที่ยังพอจะหาได้ตามท้องถิ่นต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากปัจจัยหลายประการคือ ความยุ่งยากและสลับซับซ้อนในการผลิต ไม่มีการถ่ายทอดความรู้ให้ผู้อื่นยกเว้นคนสนิทและลูกหลานเท่านั้น มีผู้เห็นความสำคัญและต้องการรู้เรื่องนี้น้อยลง มีเทคโนโลยีดีขึ้นจึงทำให้ผู้ผลิตสุรารายใหญ่หันมาใช้เชื้อบริสุทธิ์แทน และข้อจำกัดทางภาครัฐที่ห้ามมีการครอบครองและจำหน่ายลูกแป้งโดยไม่ได้รับอนุญาต นอกจากนี้ยังมีการจำกัดจำนวนของผู้ผลิตและจำหน่ายลูกแป้งตามพระราชบัญญัติสุรา พ.ศ. 2493 และระเบียบกรมสรรพสามิตว่าด้วยการกระทำและขายแป้งข้าวสาโท พ.ศ. 2524 อีกด้วย [2]

จุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้งมีหลายชนิด แต่จากการศึกษาพบจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่มีบทบาทเด่นๆ ในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ สำหรับลูกแป้งสาโทจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญ คือ จุลินทรีย์มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและพวกที่

ผลิตสารให้กลิ่นหอมบางชนิดเท่านั้น ส่วนลูกแป้งสาโทนอกจากจะต้องประกอบด้วยจุลินทรีย์ย่อยแป้งได้ดีแล้วยังต้องมีจุลินทรีย์ที่สามารถทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทิลแอลกอฮอล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพด้วย ลูกแป้งสาโทเป็นแหล่งของยีสต์และราที่มีบทบาทในการผลิตสาโท โดยเป็นสายพันธุ์ที่มีการคัดเลือกตามธรรมชาติมาเป็นเวลายาวนาน จึงทำให้เป็นสายพันธุ์ที่มีคุณลักษณะต่างๆที่เหมาะสม จากรายงานพบ *Saccharomyces fibuligera* ในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า อีกทั้งยังพบ *Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis*, *P. burtonii*, *P. fabianii*, *Candida rhagii*, *C. glabrata*, *Torulaspora globosa*, *P. Mexicana*, *P. heimii*, *Rhodotorula philyla*, *Saccharomyces cerevisiae*, *T. delbrueckii* และ *Trichosporon asahii* ในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า [3] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า พบยีสต์ที่มีสมบัติคล้ายกับ *Saccharomyces cerevisiae* จากก๋าล้าเชื้อไวน์ข้าวของเวียดนามด้วย [4, 5] สำหรับราที่พบในลูกแป้ง ได้แก่ *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. [6] ลูกแป้งสาโตนับวันจะหายากขึ้นและอาจสูญหายไปในที่สุดทำให้ยีสต์และราที่ถูกเก็บอยู่ในลูกแป้งจึงอาจสูญหายไป ถ้าหากไม่มีการรวบรวมไว้ก่อน และถึงแม้ว่าลูกแป้งจะยังคงอยู่แต่การเก็บยีสต์และราในรูปแป้งอาจจะไม่มีประสิทธิภาพพอ ยีสต์และราที่มีอยู่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมทำให้สายพันธุ์เปลี่ยนแปลงไป ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดแยกยีสต์และราจากลูกแป้ง รวมถึงการรวบรวมและเก็บรักษาสายพันธุ์ของยีสต์และราเหล่านี้ไว้ด้วยวิธีการที่ถูกต้องและเหมาะสม เพื่อเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญสำหรับผลิตภัณฑ์พื้นบ้าน นอกจากนี้ยังอาจนำยีสต์และราเหล่านี้ไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์สาโทในรูปเชื้อบริสุทธิ์ โดยอาจมีการปรับปรุงสายพันธุ์ให้เหมาะสมยิ่งขึ้น รวมทั้งอาจนำไปปรับใช้สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ ด้วย

2. เปรียบวิธีวิจัย

2.1 ขั้นตอนการวิจัย

2.1.1 การเก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโท

สุ่มเก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโทพื้นบ้านจากบางจังหวัดในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ 2563 - เดือนสิงหาคม พ.ศ 2563 โดยเก็บลูกแป้งสาโทแหล่งละ 10 ลูก และเก็บรักษาในถุงพลาสติกซิปล็อคไม่ให้ปะปนกัน หลังจากนั้นนำลูกแป้งสาโทมาทำหน้าพรหส์และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2 การคัดแยกยีสต์และราจากลูกแป้งสาโท

2.1.2.1 การคัดแยกยีสต์

ซังลูกแป้งสาโท 10 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปิเปิดตัวอย่างระดับความเจือจางที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar ด้วยวิธี Spread Plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกัน และตรวจสอบรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และจัดกลุ่มตามรูปร่างเซลล์ เก็บยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเยื่อ YPD Slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2.2 การคัดแยกรา

ซังลูกแป้งสาโท 10 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Potato Dextrose Broth (PDB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ปิเปิดตัวอย่างระดับความเจือจางที่เหมาะสม เพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยวิธี Spread Plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง ตรวจสอบโครงสร้างของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์และจัดจำแนกสกุลโดยเทียบกับ Taxonomic Key ของรา เก็บราที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA Slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.3 การศึกษาคุณสมบัติของยีสต์

2.1.3.1 การย้อยแบ่ง

เพาะเลี้ยงยีสต์แต่ละไอโซเลตบนอาหาร Yeast Extract-Peptone-Dextrose (YPD) Agar Slant ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบบ Point Inoculation ลงบนอาหาร YPD Agar ที่มี Starch Soluble ร้อยละ 1 (น้ำหนักโดยปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แล้วเททับด้วยสารละลาย Lugals' iodine ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เทสารละลายออก สังเกตบริเวณใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้น ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดขึ้นของเชื้อแต่ละไอโซเลต [7]

2.1.3.2 การผลิตแอลกอฮอล์

เพาะเลี้ยงยีสต์ 1 ลูป (Loop) ลงในอาหารเหลว YPD ที่เติมหลอดดักแก๊ส บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง บันทึกผลแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างแก๊สในอาหารเหลว ทดสอบการผลิตแอลกอฮอล์ในอาหารเหลว YPD ที่มีกลูโคสร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) โดยเชื้อยีสต์ลงในอาหารเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสง (OD 600 nm) เท่ากับ 1.0 ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) เติมห่วงเชื้อยีสต์ตั้งต้นร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) [8]

2.1.4 การศึกษาความสามารถในการย้อยแบ่งของรา

เพาะเลี้ยงราบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) slant ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อแบบ Point Inoculation 1 จุด ลงบนจุดกึ่งกลางของ PDA ในจาน

เพาะเชื้อที่มี Starch Soluble ร้อยละ 1 (น้ำหนักโดยปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 168 ชั่วโมง แล้วเททับด้วยสารละลาย Lugals' iodine ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เทสารละลายออก สังเกตบริเวณใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้น ทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส [7]

2.1.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ย (Analysis of Variance ; ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยรายคู่ด้วยวิธี Duncan's multiple range test ด้วยโปรแกรม SPSS version 17.0

3. ผลการศึกษาและอภิปรายผล

3.1 ลักษณะของลูกแป้งสาโท

จากการเก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโทตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2563 จากพื้นที่บางแห่งในจังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำนวน 10 ตัวอย่าง ตัวอย่างลูกแป้งส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายกัน คือ ลูกแป้งมีขนาดใหญ่และกลมแบน สีขาวนวล แต่มีตัวอย่างลูกแป้งบางตัวอย่างที่มีลักษณะแตกต่างออกไป คือ ลูกแป้งของจังหวัดอุบลราชธานี จะมีขนาดเล็ก ตรงกลางบวม มีจุดเชื้อราสีเขียวน้อย และมีสีขาวอมเหลือง ซึ่งอาจเป็นเพราะสมุนไพรที่เติมลงไปเป็นส่วนประกอบของลูกแป้งมีความแตกต่างกัน และอาจเป็นสูตรของบางพื้นที่ที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัวในการสืบทอดภูมิปัญญาการผลิตลูกแป้งสาโท (แสดงดังตารางที่ 1)

3.2 การคัดเลือกยีสต์และราจากลูกแป้ง

3.2.1 การคัดเลือกยีสต์

การคัดเลือกยีสต์จากลูกแป้ง จำนวน 10 แหล่งศึกษาสิรินธรวิทยานอาหารแข็ง YPD และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สามารถคัดเลือกยีสต์ได้จำนวน 68 ไอโซเลต มีความแตกต่างของโคโลนีทั้งหมด 6 ลักษณะ (แสดงดังตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ลักษณะของลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ

ลำดับ	แหล่ง	ลักษณะของลูกแป้ง
1	หนองบัวลำภู	ลูกแป้งขนาดใหญ่ รื่นนวลขรุขระ สีขาวนวล
2	ชัยภูมิ	ลูกแป้งขนาดใหญ่ กลมมน สีขาวนวล
3	อุดรธานี	ลูกแป้งขนาดใหญ่ รื่นนวล สีขาวนวล
4	ศรีสะเกษ	ลูกแป้งขนาดใหญ่ รื่นนวลขรุขระ สีขาวนวล
5	ขอนแก่น	ลูกแป้งขนาดใหญ่ กลมมน สีขาวนวล
6	นครราชสีมา	ลูกแป้งขนาดใหญ่ กลมมน สีขาวนวล
7	มหาสารคาม	ลูกแป้งขนาดใหญ่ กลมมน สีขาวนวล
8	ร้อยเอ็ด	ลูกแป้งขนาดใหญ่ กลมมน สีขาวนวล
9	สกลนคร	ลูกแป้งขนาดใหญ่ กลมมน สีขาวอมน้ำตาล
10	อุบลราชธานี	ลูกแป้งขนาดเล็ก ตรงกลางบวมมีจุดเชื้อราสีเขียวน้อย สีขาวอมเหลือง

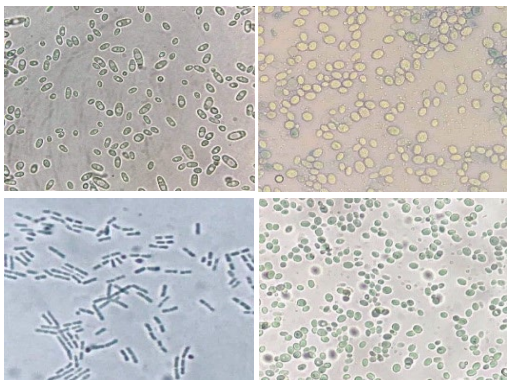
ตารางที่ 2 รูปแบบโคโลนียีสต์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง

แบบที่	รูปแบบโคโลนี	จำนวน (ไอโซเลต)	รหัส
1	สีขาว ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ วาว	17	STYB03, STYB06, STYC 08, STYD 01, STYD 02, STYG 01, STYG 02, STYM02, STYN01, STYN 02, STYN 06, STYS 01, STYS 03, STYS 04, STYS 06, STYS 07, STYS 09
2	สีขาวด้าน ขอบหยัก ผิวหน้าขรุขระ	8	STYB 05, STYD 03, STYM 04, STYM 05, STYN 05, STYR 02, STYR 05, STYU 06
3	สีขาว ขอบหยัก เส้นสาย ผิวหน้าขรุขระ	9	STYC 02, STYK 02, STYN 09, STYR 03, STYR 04, STYR 06, STYR 07, STYR 08, STYU 07
4	สีครีม ขอบเรียบ ผิวหน้าเรียบ วาว	16	STYB 01, STYB 07, STYC 06, STYC 07, STYG 03, STYG 04, STYG 05, STYK 01, STYK 03, STYM 03, STYM 06, STYN 04, STYR 01, STYU 02, STYU 03, STYU 05
5	สีครีม ขอบหยัก ผิวหน้าเรียบ ผิวหน้าขรุขระ	8	STYC 01, STYM 01, STYN 03, STYN 10, STYS 02, STYS 05, STYU 01, STYU 04
6	สีครีม ขอบหยัก ผิวหน้าเรียบ วาว	10	STYB 02, STYB 04, STYC 03, STYC 04, STYC 05, STYD 04, STYK 04, STYN 07, STYN 08, STYS 08

เมื่อนำมาศึกษารูปร่างเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยวิธี Wet Mount พบว่า มีรูปร่างเซลล์ 4 แบบ (แสดงดังตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 รูปร่างเซลล์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง

แบบที่	รูปร่าง	จำนวน (ไอโซเลต)	รหัส
1	ทรงกลม	11	STYK 02, STYM 02, STYN 01, STYN 02, STYN 08, STYN 09, STYN 10, STYS 01, STYS 02, STYS 03, STYS 05
2	รี/ไข่	23	STYB 02, STYB 06, STYB 07, STYD 01, STYD 02, STYD 03, STYG 04, STYK 04, STYM 01, STYM 03, STYM 05, STYN 03, STYN 04, STYN 05, STYN 07, STYNR 02, STYR 03, STYR 05, STYR 08, STYS 06, STYS 09, STYU 03, STYU 07
3	ทรง กระบอก	18	STYB 01, STYB 05, STYC 01, STYC 02, STYC 03, STYC 04, STYC 05, STYC 07, STYG 01, STYG 05, STYK 01, STYM 04, STYM 06, STYN 06, STYR 04, STYU 04, STYU 05, STYU 06
4	กลมปลาย มนคล้าย มะนาวฝรั่ง	16	STYB 03, STYB 04, STYC 06, STYC 08, STYD 04, STYG 02, STYG 03, STYK 03, STYR 01, STYR 06, STYR 07, STYS 04, STYS 07, STYS 08, STYU 01, STYU 02



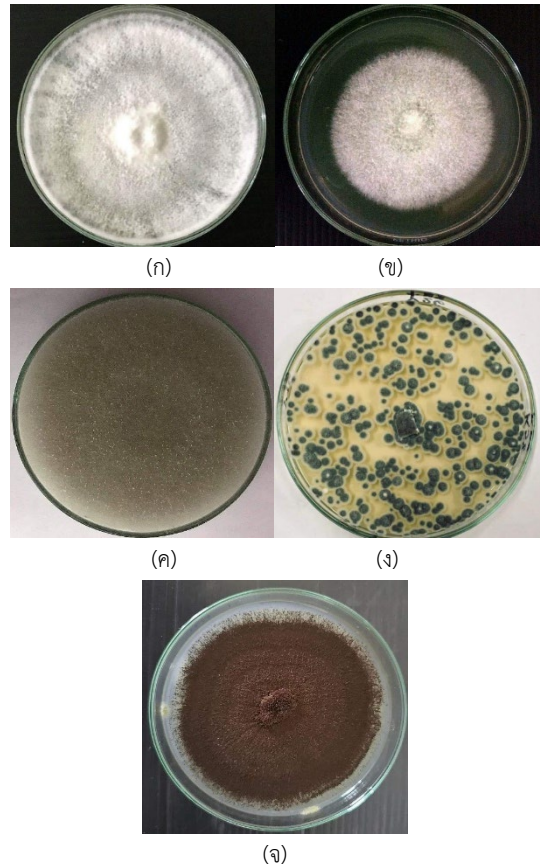
รูปที่ 1 รูปร่างเซลล์แบบต่างๆ ของยีสต์ที่คัดแยกจากลูกแป้ง (ก) รี/ไข่ (ข) ทรงกลม (ค) ทรงกระบอก และ (ง) ทรงกลมปลายมนคล้ายผลมะนาวฝรั่ง

ลูกแป้งในแต่ละแหล่งมีการผลิตที่แตกต่างกัน ทำให้มีความหลากหลายของจุลินทรีย์ พบว่าลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่ มีโคโลนีสีขาวครีม มันวาว ขอบเรียบ เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เซลล์ส่วนใหญ่มีรูปร่างสอดคล้องกับงานวิจัยของ Techavasonyoo [9] พบว่ายีสต์ที่คัดแยกจากลูกแป้งสาโท มีโคโลนีสีขาว ขาวครีม หรือขาวนวลเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่วนใหญ่กลมรี ขนาดเล็ก เช่นเดียวกับงานวิจัยของอรรถพล กลบุตร และคณะ [10] ซึ่งคัดแยกยีสต์จากลูกแป้งสาโท 5 แหล่ง ได้ยีสต์ทั้งหมด 64 ไอโซเลตและคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอล 22 ไอโซเลต พบว่าสัณฐานวิทยาส่วนใหญ่โคโลนี มีสีขาว ครีมนันวาว ขอบเรียบ ผิวหน้าแห้ง (11 ไอโซเลต) ผิวหน่มัน (11 ไอโซเลต) รูปแบบโคโลนีกลมและเซลล์กลมรีทั้งหมด

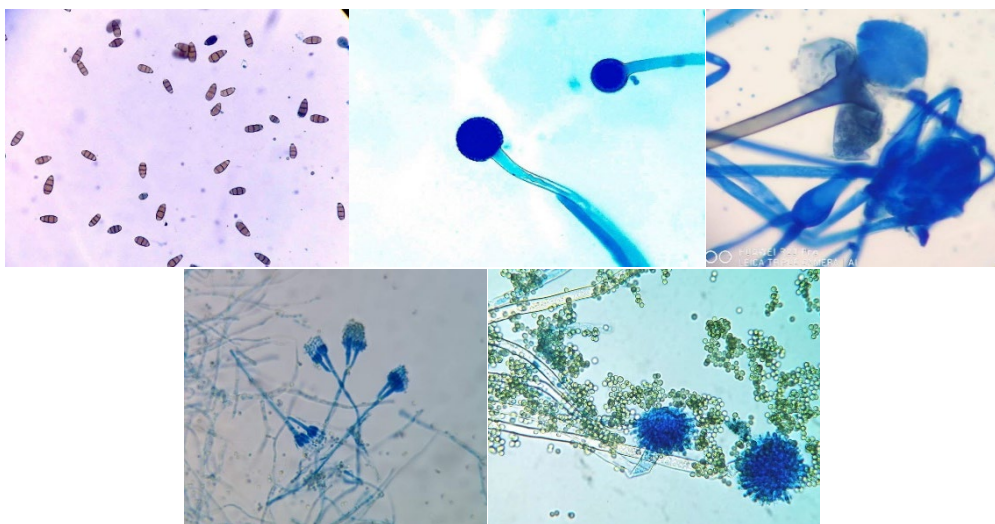
3.2.2 การคัดแยกกรา

การคัดแยกกราจากลูกแป้ง จำนวน 10 แหล่ง ศึกษาสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง PDA และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถคัดแยกกราได้จำนวน 32 ไอโซเลต จัดจำแนกสกุลโดยอาศัยสัณฐานวิทยาบนอาหารแข็ง PDA และโครงสร้างของเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (แสดงดังรูปที่ 2 และ 3) นำผลจากการศึกษาเทียบกับ Taxonomic Key [11]-[15] พบว่าราที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่ จำนวน 16 ไอโซเลต ได้แก่ รหัส STMC 02, STMC 03, STMD 01, STMD 02, STMG 01, STMG 02, STMG 03, STMK 02, STMK 04, STMN 01, STMN 02, STMM 02, STMR 01, STMR 03 STMS 02, STMU 03 มีเส้นใหญ่สีขาวสั้น สปอร์มีสีเขียวอมเหลือง เมื่ออายุมากขึ้นจะเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลจนถึงสีดำ โครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์โคนิเดียมีลักษณะเป็นแฉกรัศมีสีเขียวอมเหลือง โคนิเดียโอเฟอร์ผนังหนา ผิวขรุขระ ส่วนปลายเป็นเวลิเคลทรงกลม โคนิเดียเป็นรูปทรงกลมหรือรี มีผนังขรุขระ จากลักษณะที่กล่าวมาจัดเป็นราในสกุล *Aspergillus* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวิลลัทธิ รตนปรีดากุล [8] คัดแยกกรา

สกุลนี้จากรูปแบ่งเหล่าของจังหวัดนครราชสีมา และงานวิจัยของสมพร สันธรา [16] พบว่าราที่คัดแยกได้จากลูกแบ่งเหล่าและข้าวหมากในประเทศไทยจำนวน 9 ไอโซเลต ที่จำแนกเป็น *Aspergillus* รองลงมาคือ ราในสกุล *Alternaria* จำนวน 7 ไอโซเลต ได้แก่ รหัส STMB 03, STMD 03, STMK 01, STMK 03, STMR 02, STMS 01, STMU 01 มีเส้นใหญ่บางละเอียด เมื่ออ่อนมีสีขาวครีมและแก่เป็นสีเทาหรือเทาเข้มเกือบดำ โคนิดิโอเฟอร์เกิดหักงอแบบ Gelcilate มีสีน้ำตาลทอง ผงเรียบและมีผงกัน ลักษณะของโคนิดีมีขนาดใหญ่อาจเรียงต่อกันมีผงกันทั้งแบบตามยาวและตามขวาง รูปร่างของโคนิดีมีลักษณะเป็นกระบอกและมีสีเข้ม ผิวขรุขระ โคนิดีอันแรกเกิดที่ปลายก้านโคนิดิโอเฟอร์ และสามารถทำหน้าที่เป็นโคนิดีโอเฟอร์ จากลักษณะที่กล่าวมาจัดเป็นรากลุ่ม *Alternaria* นอกจากนี้ยังพบราจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ รหัส STMB 02, STMC 01, STMR 04, STMS 03 มีเส้นใหญ่สีขาวยาวแต่ไม่พุ่มมาก เส้นใหญ่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ไม่มีผงกัน สร้างคล้ามัยโตสปอร์จำนวนมากบนเส้นใย และพบการสร้างสปอร์แรนเจียนน้อยมากและไม่สมบูรณ์ อาจมีหรือไม่มีไรซอยด์



รูปที่ 2 ลักษณะวิทยาของราสกุลต่างๆ บนอาหารแข็ง PDA (ก) *Alternaria* (ข) *Amylomyces* (ค) *Rhizopus* (ง) *Penicillium* และ (จ) *Aspergillus*



รูปที่ 3 โครงสร้างเส้นใยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของราสกุลต่างๆ (ก) *Alternaria* (ข) *Amylomyces* (ค) *Rhizopus* (ง) *Penicillium* และ (จ) *Aspergillus*

จากลักษณะที่กล่าวมาจัดเป็นราในสกุล *Amylomyces* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของวิลลัคฆ์รัตน์ปรีดากุล [4] พบราสกุลนี้จากลูกแป้งเหล้าจังหวัดอุบลราชธานี และงานวิจัยของสมพร สีนธรา [12] คัดแยกราจากลูกแป้งเหล้าและลูกแป้งข้าวหมากพบราจำนวน 43 ไอโซเลตเป็นราในสกุลนี้ รวมทั้งงานวิจัยของมนชัย เดชสงกรานต์ [17] ที่พบราสกุลนี้ในลูกแป้งเหล้าและลูกแป้งข้าวหมากจำนวน 4 ไอโซเลต ราที่คัดแยกได้จำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ รหัส STMB 01, STMM 01, STMR 05, STMU 02 เส้นใยสีเขียวเข้ม มีผนังกันตามขวาง ตรงปลายมีลักษณะเป็นกระຈกเขียวคล้ายไม้กวาด ก้านของโคนิโอฟอร์แตกแขนง โคนิไดโอสปอร์รูปร่างกลมหรือไข่เกิดต่อกันเป็นลูกโซ่มีสีน้ำเงินจากลักษณะที่กล่าวมาจัดเป็นราในสกุล *Penicillium* สอดคล้องกับงานวิจัยของชัยวัฒน์ จาติกเสถียร [18] ที่พบ *Penicillium* และ *Aspergillus* ในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า ราที่คัดแยกได้จำนวน 1 ไอโซเลต ได้แก่รหัส STMD 04 เส้นใยมีสีขาวฟู สปอร์มีสีดำเส้นใยภายในกล้องจุลทรรศน์เป็นแบบไม่มีผนังกัน สร้างสปอร์แรงจีโอฟอร์ ตรงส่วนที่จะสร้างไรซอยด์ สปอร์แวนเจียมเป็นอันเดี่ยวรูปร่างกลมหรือเกือบกลม สปอร์แวนเจไอสปอร์มีลักษณะกลมหรือกลมรี ผิวขรุขระเป็นเส้นจากลักษณะที่กล่าวมาจัดเป็นราในสกุล *Rhizopus* สอดคล้องกับงานวิจัยของอภิญา เตชะวรัญญู [19] พบราสกุล *Mucor* และ *Rhizopus* ในลูกแป้งสาโทภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของประเทศไทย และมนชัย เดชสงกรานต์ [17] ได้คัดแยกราสกุล *Rhizopus* จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า โดยพบว่า *Rhizopus* ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้ จากรายงานวิจัยที่ผ่านมาอธิบายถึงจุลินทรีย์ที่พบในหัวเชื้อแต่ละแหล่งประกอบด้วยจุลินทรีย์หลากหลายชนิดที่แตกต่างกันและสามารถจัดจำแนกได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ รา ประกอบด้วยสกุล *Amylomyces*, *Rhizopus*, *Mucor* และ *Aspergillus* ส่วนยีสต์เป็นกลุ่ม *Ascomycetes* ยกตัวอย่างเช่น *saccharomyces* spp. ,*Endomycopsis* spp.

,*Hansenula* spp. ,*candida* spp. , *Wickerhamomyces* spp และแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobacter* spp. *Gluconobacter* spp; *Lactobacillus* spp. และ *Bacillus* spp. [20]-[24]

3.3 การศึกษาคุณสมบัติของยีสต์

3.3.1 การย่อยแป้ง

การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ที่คัดแยกได้ พบว่ามียีสต์จำนวน 14 ไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งบนอาหาร YPD ที่เติม starch soluble ร้อยละ 1 (น้ำหนักโดยปริมาตร) มีดัชนีวงใสของการย่อยแป้งที่เกิดขึ้น ตั้งแต่ 0.3 – 2.5 เซนติเมตร (แสดงดังตารางที่ 4) ยีสต์ที่มีดัชนีวงใสของการย่อยแป้งสูงสุด คือ STYS03 เท่ากับ 1.5 รองลงมาคือรหัส STYN 02 เท่ากับ 1.30 และยีสต์ที่มีดัชนีวงใสที่น้อยที่สุด คือ STYM 05 เท่ากับ 0.05 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติยีสต์ทุกรหัสไม่มีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 4 ความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้ง

ลำดับ	รหัส	แหล่ง	ดัชนีวงใส
1	STYB 06	หนองบัวลำภู	1.05 ^a ±0.06
2	STYC 05	ชัยภูมิ	1.25 ^a ±0.78
3	STYM 04	มหาสารคาม	0.90 ^a ±0.71
4	STYM 05	มหาสารคาม	0.50 ^a ±0.28
5	STYN 02	นครราชสีมา	1.30 ^a ±0.99
6	STYN 05	นครราชสีมา	0.80 ^a ±0.42
7	STYN 06	นครราชสีมา	0.75 ^a ±0.35
8	STYN 07	นครราชสีมา	1.25 ^a ±0.35
9	STYN 10	นครราชสีมา	0.65 ^a ±0.50
10	STYS 01	สกลนคร	0.80 ^a ±0.28
11	STYS 03	สกลนคร	1.50 ^a ±1.41
12	STYU 03	อุบลราชธานี	1.00 ^a ±0.99
13	STYU 04	อุบลราชธานี	0.90 ^a ±0.42
14	STYU 07	อุบลราชธานี	1.10 ^a ±1.27

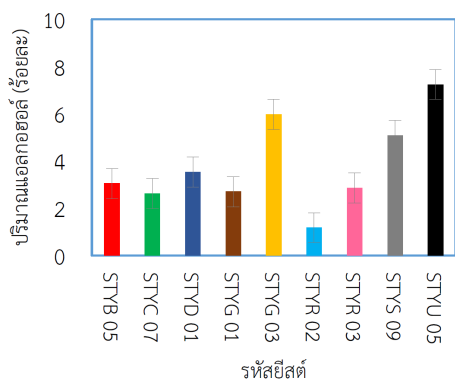
หมายเหตุ : ค่าที่มีอักษรต่างกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p<0.05)

ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการรายงานของ ชัยวัฒน์ จาติกเสถียร [15] ที่คัดแยกและจัดจำแนกราก และยีสต์จากลูกแป้ง โดยนำลูกแป้งมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ลูกแป้งที่มีเชื้อ *Sacharomyces* sp. อยู่ มาก และเนื่องจากในระหว่างการทำลูกแป้งยีสต์สกุล *Sacharomyces* sp. จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็น แอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ งานวิจัยของ มนตรี เชาวน์สังเกตุ [25] ที่คัดแยกรากและยีสต์จาก ตัวอย่างลูกแป้งสุรา ข้าวหมาก น้ำข้าว อก และลูกแป้งอุ จำนวน 76 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกรากสกุล *Rhizopus* ได้ 59 ไอโซเลต, *Amylomyces* 28 ไอโซเลต, *Mucor* 61 ไอโซเลต ยีสต์สกุล *Saccharomyces* ได้ 79 ไอโซเลต และยีสต์ที่สร้างเส้นใย (Filamentous yeast) 55 ไอโซเลต เมื่อใช้รากสกุล *Amylomyces* MM – 136 กับ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* MS50 ในการหมัก สาโทจะทำให้สาโทที่ได้มีปริมาณเอทานอลสูงร้อยละ 15 มีปริมาณกรดต่ำเท่ากับร้อยละ 4.6 และใช้เวลาในการหมักน้อยกว่าการใช้ลูกแป้งสุราหมักสาโท งานวิจัยของสิรินทรเทพ ภักดีสุกผล [26] ศึกษาการหมักข้าวหมากด้วยเชื้ออบริสุทธิ พบว่าจะมียีสต์สกุล *Saccharomyces* sp. ซึ่งสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในข้าวหมากเป็นแอลกอฮอล์ สอดคล้องกับวิจัยของเบญจพร บัวบาน [27] ที่ได้ทำการศึกษายีสต์ในลูกแป้งข้าวหมากในประเทศไทย จากการศึกษาพบเชื้อยีสต์สกุล *Saccharomycopsis* sp. ซึ่งเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่า การผลิตเอาน้ำสูงสุดเมื่อเจริญอยู่ในระยะ คงที่ การควบคุมพีเอชของน้ำหมักให้คงที่ในสภาพที่เป็น กรดอ่อน ทำให้เชื้อยีสต์สามารถเจริญได้ดี ผลิตเอาน้ำ ได้สูง และ sukhumvasi et al. [28] ได้รายงานว่ายีสต์ *S. fibuligera* ที่แยกจากลูกแป้งมีความสามารถในการ ผลิตเอาน้ำแอลกอฮอล์นอกเซลล์มาย่อยแป้งได้และ สอดคล้องกับการทดลองสมพร สนิธรา [16] ที่ใช้ยีสต์ เหล่านี้ในการทดสอบการสร้างสารย่อยแป้งและพบว่ามี ลักษณะการย่อยแป้งที่ดี อย่างไรก็ตามอัตราส่วน

ระหว่างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณวงใสและเส้นผ่าน ศูนย์กลางของโคโลนีอาจแตกต่างกันบ้าง ขึ้นอยู่กับ อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์

3.3.2 การผลิตแอลกอฮอล์

การทดสอบความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ เบื้องต้นพิจารณาจากความสามารถในการสร้างแก๊สใน อาหารเหลว YPD ที่มีกลูโคสร้อยละ 2 (น้ำหนักโดย ปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์จำนวน 25 ไอโซเลต ได้แก่ รหัส STYB 01, STYB 05, STYC 01, STYC 03, STYC 07, STYD 01, STYD 03, STYD 04, STYG 01, STYG 03, STYG 05, STYK 01, STYM 02, STYN 02, STYN 03, STYN 09, STYR 02, STYR 03, STYS 01, STYS 02, STYS 03, STYS 04, STYS 05, STYS 09, STYU 05 มีความสามารถในการสร้างแก๊ส ได้ตั้งแต่ 0.2–5.0 เซนติเมตร จึงคัดเลือกยีสต์ที่ให้ปริมาณแก๊สสูงสุด 9 ไอโซเลต ได้แก่ รหัส STYB 05, STYC 07, STYD 01, STYG 01, STYG 03, STYR 02, STYR 03, STYS 09, STYU 05 โดยมีปริมาณแก๊ส 3.95–5.0 เซนติเมตร (ไม่ แสดงข้อมูล) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า ไม่มีความ แตกต่างกัน จึงทดสอบความสามารถในการสร้าง แอลกอฮอล์ในอาหารเหลว YPD ในขั้นตอนต่อไป การ ผลิตแอลกอฮอล์ในอาหารเหลว YPD ที่มีกลูโคสร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลอง พบว่า ยีสต์ทั้ง 9 ไอโซเลต สามารถผลิตแอลกอฮอล์ตั้งแต่ ร้อย ละ 1.19–7.24 โดยยีสต์รหัส STYU 05 สามารถผลิต แอลกอฮอล์ได้มากที่สุด เท่ากับร้อยละ 7.24 รองลงมา คือ รหัส STYG 03 เท่ากับร้อยละ 5.98 และยีสต์รหัส STYR 02 มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์น้อย ที่สุด เท่ากับร้อยละ 1.18 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (แสดงดังรูปที่ 4)



รูปที่ 4 ปริมาณแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จาก
ลูกแป้ง

การทดสอบความสามารถในการสร้างเอทิลแอลกอฮอล์ของยีสต์มีค่าตั้งแต่ร้อยละ 1.19–7.24 ยีสต์รหัส STYU 05 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้มากที่สุด เนื่องจาก เป็นยีสต์ที่สามารถเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ได้ดีที่สุดจากกระบวนการหมักแบบมีออกซิเจนน้อย จากผลการทดลองถึงแม้ว่าร้อยละของเอทิลแอลกอฮอล์ที่ได้จะไม่สูงมากนักที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง อาจเนื่องจากปฏิกิริยาการหมักของยีสต์ทั้ง 9 ไอโซเลตยังไม่หยุด โดยสังเกตได้จากฟองแก๊สที่ยังผุดขึ้นจากน้ำหมักตลอดเวลา แต่เนื่องจากการทดลองนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นถึงความสามารถในการหมักเอทิลแอลกอฮอล์ของยีสต์ดังที่กล่าวมาแล้ว จึงหยุดปฏิกิริยาการหมักโดยการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักที่ 48 ชั่วโมงเท่านั้น แต่หากมีการเพิ่มเวลาของการหมักมากขึ้นและจัดสภาวะการหมักให้เหมาะสมกับยีสต์แต่ละไอโซเลตแล้ว คาดว่าร้อยละของเอทิลแอลกอฮอล์อาจจะสูงกว่าที่ได้จากการทดลองนี้ ซึ่งในอนาคตหากมีการศึกษาทดลองต่อไปโดยจัดสภาวะให้เหมาะสมกับแต่ละไอโซเลตแล้วคาดว่ายีสต์เหล่านี้อาจมีความสามารถในการหมัก เอทิลแอลกอฮอล์ได้สูงขึ้น ซึ่งน่าจะเป็นการดีต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์เพื่อเป็นเชื้อเพลิงที่ไม่ต้องคำนึงถึงกลิ่นและรสของเอทิลแอลกอฮอล์เหมือนกับการหมักเอทิลแอลกอฮอล์เพื่อนำไปผลิตสุรา

3.4 การศึกษาคุณสมบัติของราในการย่อยแป้ง

ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งของราบนอาหาร PDA ที่มี Starch Soluble ร้อยละ 1 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งเปรียบเทียบได้จากบริเวณที่แป้งถูกย่อย โดยการเทับราด้วยสารละลายไอโอดีนในบริเวณที่มีแป้งจะถูกย่อยจะเห็นเป็นบริเวณใส (แสดงดังตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ความสามารถในการย่อยแป้งของราที่คัด
แยกได้จากลูกแป้ง

ลำดับ	รหัส	แหล่ง	ดัชนีวงใส
1	STMB 01	หนองบัวลำภู	9.0 ^{de} ±1.41
2	STMC 02	ชัยภูมิ	2.5 ^{ab} ±0.78
3	STMC 03	ชัยภูมิ	5.0 ^{ab} ±1.41
4	STMG 02	ศรีสะเกษ	5.0 ^{abc} ±1.41
5	STMD 03	อุดรธานี	3.5 ^{ab} ±2.12
6	STMD 04	อุดรธานี	11.0 ^{ef} ±1.41
7	STMK 02	ขอนแก่น	1.5 ^a ±0.78
8	STMK 03	ขอนแก่น	2.5 ^{ab} ±0.78
9	STMN 02	นครราชสีมา	3.0 ^{ab} ±1.41
10	STMM 01	มหาสารคาม	6.0 ^{bcd} ±1.41
11	STMR 01	ร้อยเอ็ด	11.5 ^{ef} ±2.12
12	STMR 03	ร้อยเอ็ด	4.5 ^{ab} ±0.78
13	STMR 05	ร้อยเอ็ด	13.0 ^f ±2.83
14	STMU 02	อุบลราชธานี	8.5 ^{cde} ±2.12
15	STMU 03	อุบลราชธานี	5.5 ^{abc} ±2.12

หมายเหตุ : ค่าที่มีอักษรต่างกันในแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

สอดคล้องกับงานวิจัยของอัจฉริยา ชมเชย และ พสุ ปรามอกซ์ชน [29] คัดแยกได้จำนวน 66 ไอโซเลตจากลูกแป้ง 13 แห่ง พบว่า มีราเกิดวงใสการย่อยแป้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 19 ไอโซเลต (ขนาดวงใส 5.16-0.90 เซนติเมตร) โดยราที่พบส่วนใหญ่มีสกุล คือ *Rhizopus* และ *Amylomyces* และงานวิจัยของอรุณี ทรัพย์เจริญเลิศ [30] พบราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งจำนวน 15 ไอโซเลต โดยมี 2 รหัสคือ CMW-M5 และ CMW-M5

ย่อยแบ่งเป็นน้ำตาลได้ความเข้มข้นสูง และเหมาะสมในการย่อยแบ่งเพื่อผลิตเอทานอล ซึ่งการย่อยแบ่งของรามีความแตกต่างจากยีสต์ ทั้งนี้เนื่องจากราใช้อัตราการเจริญสูงกว่ายีสต์ ในขณะที่ราแต่ละกลุ่มมีอัตราการเจริญไม่เท่ากัน ดังนั้นจึงมีความสามารถสร้างเอนไซม์ต่างกันด้วย

4. สรุป

จากผลการทดลองสามารถคัดแยกยีสต์จากลูกแบ่งจำนวน 68 ไอโซเลต โดยเป็นยีสต์ที่มีรูปร่างกลมจำนวน 11 ไอโซเลต รูปร่างรีจำนวน 22 ไอโซเลต รูปร่างทรงกระบอกจำนวน 18 ไอโซเลต รูปร่างมะนาวฝรั่งจำนวน 16 ไอโซเลต และราจำนวน 32 ไอโซเลต จัดจำแนกเป็น 6 สกุล ได้แก่ *Alternaria* จำนวน 7 ไอโซเลต *Aspergillus* จำนวน 16 ไอโซเลต *Amylomyces* จำนวน 4 ไอโซเลต *Penicillium* จำนวน 4 ไอโซเลต และ *Rhizopus* จำนวน 1 ไอโซเลต ราส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Aspergillus* จำนวน 16 ไอโซเลต รองลงมา คือ *Alternaria* จำนวน 7 ไอโซเลต *Amylomyces* จำนวน 4 ไอโซเลต *Penicillium* จำนวน 4 ไอโซเลต และ *Rhizopus* จำนวน 1 ไอโซเลต ผลการจัดจำแนกรากจากตัวอย่างลูกแบ่งแสดงให้เห็นว่า ร้อยละของสกุลราที่พบมากที่สุดคือ *Aspergillus* เท่ากับร้อยละ 50 รองลงมาคือ *Alternaria* เท่ากับร้อยละ 21.88, *Amylomyces* เท่ากับร้อยละ 12.5, *Penicillium* เท่ากับร้อยละ 12.5 และ *Rhizopus* เท่ากับร้อยละ 3.12 โดยสกุล *Aspergillus* พบในลูกแบ่งจากจังหวัดชัยภูมิ อุดรธานี ศรีสะเกษ ขอนแก่น นครราชสีมา และมหาสารคาม สกุล *Alternaria* พบในลูกแบ่งจังหวัดหนองบัวลำภู อุดรธานี ขอนแก่น ร้อยเอ็ด สกลนคร และอุบลราชธานี สกุล *Amylomyces* พบในลูกแบ่งจังหวัดหนองบัวลำภู ชัยภูมิ ร้อยเอ็ด และสกลนคร และสกุล *Penicillium* พบในลูกแบ่งจังหวัดหนองบัวลำภู ร้อยเอ็ด มหาสารคาม และอุบลราชธานี สกุล *Rhizopus* ในลูกแบ่งจังหวัดอุดรธานี

ยีสต์ที่คัดแยกจากลูกแบ่ง รหัส STYB 06, STYC 05, STYN 02, STYN 07, STYS 03, STYU 03, STYU 07 มีความสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแบ่งได้ค่าสูง ขณะที่ยีสต์รหัสอื่นสร้างเอนไซม์ย่อยแบ่งได้น้อย (ดัชนีวงใส 0.50–0.90) และยีสต์ 54 ไอโซเลต ไม่สร้างเอนไซม์ย่อยแบ่ง การผลิตแอลกอฮอล์ในอาหารเหลว YPD ที่มีกลูโคสร้อยละ 2 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ทั้ง 9 ไอโซเลตสามารถผลิตแอลกอฮอล์ตั้งแต่ ร้อยละ 1.19–7.24 โดยยีสต์รหัส STYU 05 สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้มากที่สุดเท่ากับร้อยละ 7.24 รองลงมาคือ รหัส STYG 03 เท่ากับร้อยละ 5.98 และยีสต์รหัส STYR 02 มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์น้อยที่สุด เท่ากับร้อยละ 1.18

ราที่แยกจากลูกแบ่งสาโทที่มีความสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแบ่งได้สูงในอาหารแข็งมีแบ่งที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ ราสกุล *Rhizopus* รหัส STMD 04 รองลงมา คือ *Penicillium* รหัส STMR 05, STYMB 01, STYMM 01, STYMU 02 สร้างเอนไซม์ย่อยแบ่งได้น้อย ได้แก่ ราสกุล *Alternaria* รหัส STYMK 03, STMD 03 และไม่สร้างเอนไซม์ย่อยแบ่ง ได้แก่ สกุล *Aspergillus* รหัส STMB 02, STMB 03, STMC 01, STMD 01, STMD 02, STMG 01, STMG 03, STK 01, STMN 01, STMM 02, STMR 02, STYR 04, STMS 01, STMS 02, STMS 03, STMU 01

5. เอกสารอ้างอิง

- [1] N. Lotong, *Seed Culture of Food Fermentation and Technology Production*, Bangkok: Kasetsart University Press, 1994.
- [2] Department of Excise, *Department of Excise Regulation 1981 concerning Making and Selling Khomak*, Bangkok: Department of Excise, Ministry of Finance, 1981.
- [3] S. Limtong, S. Sintara, P. Suwannarit and N. Lotong, "Yeast Diversity in Thai Traditional

- Fermentation Starter (Loog-pang),” *Kasetsart Journal (Natural Sciences)*, vol. 36, pp. 149-158, 2002.
- [4] N.T.P. Dung, F.M. Rombouts and M.J.R. Nout, “Functionality of selected strains of moulds and yeasts from Vietnamese rice wine starters,” *Food Microbiology*, vol. 23, pp. 331-340, 2006.
- [5] N.T.P. Dung, F.M. Rombouts and M.J.R. Nout, “Development of defined mixed-culture fungal fermentation starter granulate for controlled production of rice wine,” *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, vol. 6, pp. 429-441, 2005.
- [6] N. Lotong, “Starter of Food Fermentation and Technology Production,” Bangkok: Kasetsart University Press, 1994.
- [7] J. Yodtheon, W. Chantarapanont and H. Rimkeeree, “Screening Pure Cultures by Testing Starch Hydrolysis and Alcohol Fermentation for Developing Sweeten Rice (Khaomak) Beverage,” in *Proceeding of Kasetsart University Academic Conferene*, Kasetsart University, Bangkok, 2011, pp. 1-8.
- [8] W. rattanapreedakul, “*Study of Fungi and Yeast Isolated from Look-pang in Comparison with Pure Culture of Sato Production*,” Master of Science Thesis, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 2006.
- [9] A. Techavasonyoo, “*Isolation, Classification and Characterization of Yeasts and Molds Isolated from Loog Pang for Sato Production*,” Master of Science (Industrial Microbiology) Thesis, Chulalongkorn University, Bangkok, 2007.
- [10] A. Kunlabut, S. Porntraai and J. Sangswan, “Ethanol Production from Loog-Pang-Sato Yeast Cultivation with Molasses,” *J. Res. Unit Sci. Technol. Environ. Learning*, vol. 11, pp. 53-65, 2020.
- [11] ARx, *Taxnomic key: Microbial Root Endophytes*, Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1978.
- [12] C.T. Ingold, “*The Biology of fungi*,” London: Wm Brendon & Son Ltd., 1987.
- [13] M. Watanabe, C.Y. Chen and D.E. Levin, “*Saccharomyces cerevisiae* PKC1 encodes a protein kinase C (PKC) homolog with a substrate specificity similar to that of mammalian PKC,” *J Biol Chem*, vol. 269, pp. 16829-16836, 1994.
- [14] C.J. Alexopoulos, C.W. Mims and M. Blackwell, “*Introductory Mycology*,” 4th. New York: John Wiley and Sons, Inc, 1996.
- [15] R.J. Hanin, “*Illustrated genera of Ascomycetes*,” Minnesota: The American Phytopathological Society St. Poul, 1996.
- [16] S. sinthara, “*Isolation identification and presservation of yeasts and molds from lookpang-khaomak and loopang-lao in Thailand*,” Master of Science Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 2001.
- [17] M. Techasangkranon, “*Properties of yeasts and moulds involed in Khaomak and Satho fermentation*,” Master of Science Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 2003.

- [18] C. Jaticasataen, "Isolation of Mold and Yeast in Look-pang Khomak," Master of Science Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 1977.
- [19] A. Techavasonyoo, "Isolation, classification and characterization of yeasts and molds isolated from Loog Pang for Sato production," Master of Science Thesis, Chulalongkorn University, Bangkok, 2007.
- [20] A. Chanchaichaovivat and A. Utiansut, "Inhibitory efficacies of lactic acid bacteria isolated from Loog Pang KaoMark against enteropathogenic bacteria," *Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning*, vol. 4, pp. 124–131, 2013.
- [21] W. Kanlayakrit, W. Changpha, M. Rodprapakorn and P. Sirirote, "The study of mixed culture for Thai traditional fermentation starter (Loog-Pang) production," in *Proceeding of 49th Kasetsart University Annual Conference*. Kasetsart University, Bangkok, 2012, pp. 523–531.
- [22] S. Limtong, S. Sintara, P. Suwanarit and N. Lotong, "Yeast diversity in Thai traditional fermentation starter (Loog-pang)," *Kasetsart Journal*, vol. 36, pp. 149-158, 2002.
- [23] T. Thanh, K. Willcox and O. Ghattas, "Model Reduction for Large-Scale Systems with High-Dimensional Parametric Input Space," *SIAM Journal on Scientific Computing*, vol. 30, pp. 3270-3288, 2008.
- [24] J. Sangswan and S. Looorroengsil, "Isolation of yeast from starter of wine (Sato) in Surin Province," in *Proceeding of 12th Ubon Ratchathani University National Research Conference*, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani, 2018, pp. 393–404.
- [25] M. Chosangket, "Screening of Yeast and Mold for Wine Production," Master of Science Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 1979.
- [26] S. Pakdeesupaphon, "Khomak Production by Pure Culture," Master of Science Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 1980.
- [27] B. Buaban, "Production and characterization of raw starch digesting amylase from *Saccharomycopsis* sp.," Master of Science Thesis, Kasetsart University, Bangkok, 2019.
- [28] J. Sukhumavasi, K. Kato and T. Harada, "Glucoamylase of a strain of *Endomycopsis fibulifera* isolated from Mold Bran (Loog-Pang) of Thailand," *J. Ferment. Technol.*, vol. 53, pp. 559-565, 1975.
- [29] A. Chomchoe and P. Pramokchon, "Screening of Microbial in Lookpang for Pure-inoculum Development in Rice Fermented Products," Master of Science Thesis, Chiang Mai Rajabhat University, Chiang Mai, 2005.
- [30] A. Sapcharoenlert, "Isolation of Mold and Yeast Isolated from Look-pang Lao," Master of Engineer Thesis, King Mongkut's Institute of Technology Thonburee, Bangkok, 2010.