การแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุรา เพื่อการผลิตสาโท

นางสาว อภิชญา เตชะวสัญญู

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION, CLASSIFICATION AND CHARATERIZATION OF YEASTS AND MOLDS ISOLATED FROM LOOG PANG FOR SATO PRODUCTION

Miss Apichaya Techavasonyoo

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโท
โดย	นางสาว อภิชญา เตชะวสัญญู
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยอนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชุลี ยมภักดี)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

อภิชญา เตชะวสัญญู: การแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุรา เพื่อการผลิตสาโท. ISOLATION, CLASSIFICATION AND CHARATERIZATION OF YEASTS AND MOLDS ISOLATED FROM LOOG PANG FOR SATO PRODUCTION
อ. ที่ปรึกษา : รศ. จิราภรณ์ ธนียวัน, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ผศ. ดร. ชุลี ยมภักดี , 114 หน้า.

การทำสาโทเป็นภูมิปัญญาพื้นบ้านของไทยภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคกลางของไทย ลูกแป้งเป็นแหล่งหัวเชื้อจุลินทรีย์ในการหมักข้าวเหนียวเพื่อผลิตเป็นสาโท ราและยีสต์มีบทบาทหลักในกระบวนการผลิตดังกล่าว การผลิตสาโทในระดับอุตสาหกรรมยังไม่ประสบผลสำเร็จเนื่องจากความไม่สม่ำเสมอของคุณภาพของสาโทในแต่ละชุดการผลิต งานวิจัยนี้มุ่งหมายที่จะศึกษาความหลากหลายและประสิทธิภาพการหมักของราและยีสต์จากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้ จากตัวอย่างลูกแป้ง 114 ตัวอย่าง ที่เก็บรวบรวมมาจาก 42 จังหวัดทั่วประเทศ สามารถคัดเลือกลูกแป้งได้ 7 แหล่ง แล้วทำการแยกเชื้อราและยีสต์ในวันที่ 0, 3, 5, 7 และ 9 ของกระบวนการหมักสาโท เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) ถูกใช้แบ่งกลุ่มยีสต์ตามรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS-5.8srDNA-ITS2 ทำให้แบ่งกลุ่มยีสต์ได้ 7 กลุ่ม การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์และการทดสอบทางชีวเคมี ทำให้สามารถจำแนกชนิดของยีสต์ได้เป็น *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomycopsis fibuligera*, *Pichia anomala*, *Issatchenkia orientalis*, *Tolulaspora delbrueckii* และ *Candida glabrata* ส่วนราที่แยกได้ถูกนำมาจำแนกโดยวิธีทางสัณฐานวิทยาและตรวจสอบยืนยันผลการจำแนกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของรา ทำให้สามารถจำแนกราที่คัดแยกได้เป็น *Mucor hiemalis* , *Mucor racemosus*, *Mucor indicus* , *Rhizopus microsporus* และ *Rhizopus oryzae* ยีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้งที่คัดเลือกได้มีความหลากหลายทางชีวภาพไม่มาก จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราในระหว่างการหมัก พบว่าสามารถตรวจพบราได้เฉพาะช่วงต้นของการหมักเท่านั้น (วันที่ 0 และ/หรือ 3) และพบยีสต์จำพวก non-*Saccharomyces* ในช่วงต้นของการหมัก (วันที่ 0 - 3) หลังจากนั้นยีสต์เหล่านี้จะถูกแทนที่ด้วยยีสต์ *Saccharomyces* รา *Mucor heimalis* NN6/0/9 มีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลว (Liquefaction) ได้ดีที่สุด และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NK1/9/33 มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลสูงสุด คือร้อยละ 14.50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ..จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....อภิชญา เตชะวสัญญู.....
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..จิราภรณ์ ธนียวัน.....
ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4772555623 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
KEY WORD: LOOG PANG/SATO/PCR-RFLP/DYNAMIC/DIVERSITY

APICHAYA TAECHAVASONYOO : ISOLATION, CLASSIFICATION AND CHARATERIZATION OF YEASTS AND MOLDS ISOLATED FROM LOOG PANG FOR SATO PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAPORN THANIYAVARN, THESIS COADVISOR : ASST. PROF. CHULEE YOMPAKDEE, Ph.D. 114 pp.

Traditional Thai rice wine, Sato, is usually produced in north, north eastern and central part of Thailand. Production of Sato used an amylolytic starter, loog pang, as a source of microorganisms to ferment glutinous rice to rice wine. Molds and yeasts in the starter play major roles in production process. Commercial Sato production was not successful because of the quality inconsistency. This study aimed on studying diversity and fermentation dynamics of molds and yeasts for further improvement in the consistency and/or quality of the product. Seven out of 114 Loog pang samples collected from 42 provinces were selected for the activities of the yeasts and molds and the flavor of the produced Sato. Samples were taken from each Sato at day 0, 3, 5, 7 and 9 for mold and yeast isolations followed by identifications using morphological, biochemical and molecular methods, respectively. Using PCR-RFLP method, the yeast isolates could be divided into 7 groups. Analysis of ITS1-5.8srDNA-ITS2 sequences as well as the biochemical tests could identify the yeast isolates as *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycopsis fibuligera, Pichia anomala* 2 groups, *Issatchenkia orientalis, Tolulaspora delbrueckii* and *Candida glabrata* . Morphological methods and the ITS sequence of the rDNA could identify the mold isolates as *Mucor hiemalis, Mucor racemosus, Mucor indicus, Rhizopus microsporus* and *Rhizopus oryzae.* We could not detect much diversity in the molds and yeasts. During Sato fermentation, molds and non-*Saccharomyces* yeasts were dominated only in the early stage (day 0-3), then were replaced by the yeast *S. cerevisiae* at the later fermentation process. The mold isolate NN6/0/9 showed the highest liquefying activity and the yeast isolate NK1/9/33, *Saccharomyces cerevisiae* , produced the highest level of ethanol in the Sato as 14.502%.(v/v)

Department Microbiology Student's signature Apichaya Taechavasonyoo
Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature Jiraporn Thaniyavarn
Academic year 2007 Co-advisor's signature Chulee Yompakdee

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของรองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุลี ยมภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา และรองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้ คำแนะนำต่างๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ประดิษฐ์คุรุวัณนา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆ เกี่ยวกับการชิมสาโทแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

กราบขอบพระคุณทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยา ที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบพระคุณผู้ประสานงานในการเก็บตัวอย่างลูกแป้งสุราจากจังหวัดน่าน ดังนี้

คุณ ขนิษฐา วงศ์วิเศษ ศูนย์การเรียนรู้โครงการขยายโอกาส จ.น่าน

คุณศาสตรา สินันตา ศูนย์ประสานงานประชาคม จ.น่าน

คุณประเสริฐ ศรีสบานงา ประธานเครือข่ายสุราพื้นบ้านประจำจังหวัดน่าน

คุณนันทมิตร นันทเสน สถานีอนามัยไหล่น่าน จ. น่าน

คุณรัตนา ศรีสุขคำ โรงเรียน ศรีสวัสดิ์

ขอขอบพระคุณ คุณสุวิทย์ จันทรร์หวร ผู้ประสานงานในการเก็บตัวอย่างลูกแป้งสุราจากทั่วประเทศ

เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจาก ทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์สำหรับนิสิต และทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอบคุณ คุณปาริฉัตร ราวีศรี คุณนิสา วงศ์ทางประเสริฐ รวมถึงพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน สำหรับทุกความห่วงใย ความช่วยเหลือ และกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา พี่ น้อง และครอบครัว ที่ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ซ

สารบัญรูป.....ฌ

บทที่

1 บทนำ.....1

2 วารสารปริทัศน์.....3

3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....19

4 ผลการทดลอง.....28

4.1 การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง.....28

4.2 การคัดเลือกลูกแป้งสุราที่ดี.....37

4.3 การคัดแยกยีสต์และราจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้.....45

4.4 การจำแนกชนิดยีสต์และราที่อยู่ในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคอณูชีววิทยา.....50

4.5 การเปลี่ยนแปลงประชากรของราและยีสต์ชนิดต่างๆ ในระหว่างการหมักสาโท.....66

4.6 การคัดเลือกราบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี.....74

4.7 การคัดเลือกยีสต์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลได้ดี.....75

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....77

รายการอ้างอิง.....88

ภาคผนวก.....93

ภาคผนวก ก.....94

ภาคผนวก ข.....95

ภาคผนวก ค.....96

ภาคผนวก ง.....111

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....114

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 หัวเชื้อชนิดต่างๆ และะชื่อไวน์ข้าวที่เรียกกันในแต่ละประเทศ.....3
4.1 จำนวนแหล่งที่มาของตัวอย่างลูกแป้งสุราจากจังหวัดต่างๆ.....29
4.2 แสดงรหัสของตัวอย่างลูกแป้งที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ.....31
4.3 การเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว(liquefaction) ปริมาณกลูโคส(มิลลิกรัมต่อลิตร)และร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท ที่ผลิตได้จากแหล่งตัวอย่างลูกแป้งทั้งหมดที่เก็บได้จากจังหวัดต่างๆ.....38
4.4 จำนวนของยีสต์และราจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้ โดยทำการแยกเชื้อในวันที่ 0, 3 ก่อนและหลังการผ่านำ้, 5, 7 และ 9 46
4.5 ผลการจำแนกราในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐาวิทยา.....51
4.6 ผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITSของราที่คัดแยกได้.....55
4.7 การแบ่งกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ตามรูปแบบชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณ ITS1-5.8srDNA-ITS2 โดยวิธีPCR-RFLP 60
4.8 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ ITS1-5.8srDNA-ITS2 เทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank.....61
4.9 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมี.....64
4.10 แสดงชนิดและจำนวนของยีสต์ ที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างที่คัดเลือกได้.....67
4.11 การเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (liquefaction)เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส(clear zone) ของราที่แยกจากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้ว.....74
4.12 การแบ่งกลุ่มตามประสิทธิภาพของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่แยกได้จากวันที่ 9 ของการหมักโดนใช้ร้อยละของเอทานอลในน้ำหมักจากยีสต์ที่แยกได้เป็นเกณฑ์.....75

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท.....10
2.2 การเจริญของยีสต์ 2 ชนิด จากลูกแป้งสุราจากผู้ผลิต 3 แห่ง ระหว่างการหมักสาโท.11
2.3 กระบวนการเปลี่ยนแปลงกลูโคสเมื่อเข้าสู่เซลล์ 13
2.4 The Embden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway for glucose metabolism..14
3.1 แสดงบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของ *Saccharomyces cerevisiae*.....23
4.1 แสดงจังหวัดต่างๆที่สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งสุราได้.....28
4.2 แสดงตัวอย่างของลักษณะลูกแป้งที่สามารถเก็บได้จากจังหวัดต่างๆ.....36
4.3 แสดงตัวอย่างการหมักสาโทในการคัดเลือกลูกแป้งที่ดี ก)น้ำต้อย ข)สาโท.....43
4.4 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วทั้ง 7 แหล่ง ก) NN6 ข) NN25 ค) NN27 ง) LA1 จ) NP1 ฉ) NK2 และ ช) SS1.....48
4.5 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วทั้ง 7 แหล่ง ก) NN6(◆) ข) NN25(▲) ค) NN27(◆) ง) LA1(◆) จ) NP1(■) ฉ) NK2(■)และ ช) SS1 (▲).....49
4.6 ราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้ว บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA.....53
4.7 ราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้ว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 200เท่า.....54
4.8 ต้นไม้วิวัฒนาการ(phylogenetic tree) ของตัวแทนราที่แย.....56
4.9 แสดงตัวอย่างของอะกาโรสเจลของจีโนมิกดีเอนเอของยีสต์ที่แยกได้.....57
4.10 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีสต์ที่แยกได้จากกลุ่มต่างๆ จากตารางที่ 8.....58
4.11 แสดงตัวอย่างของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของยีสต์ที่แยกได้ ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ที่จำเพาะ.....59
4.12 ต้นไม้วิวัฒนาการ(phylogenetic tree) ของตัวแทนยีสต์ที่ได้จากการจัดกลุ่มโดยใช้เทคนิคPCR-RFLP.....62
4.13 แสดงตัวอย่างการศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ของ N6/0/1.....65
4.14 แสดงลักษณะแอสโคสปอร์ที่มีรูปร่างต่างๆ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า 65

รูปที่ **หน้า**

4.15 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโท ของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้ว 3 ก) NN6 ข) NN25 และ ค) NN27....70
4.16 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโท ของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้ว ก) LA1 ข) NP1 และค) NK2……..…71
4.17 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโท ของตัวอย่างลูกแป้งสุรา SS1……..……..72
5.1 แสดงตำแหน่งของอำเภอต่างๆ ในจังหวัดน่านที่เป็นแหล่งของตัวอย่างลูกแป้งที่ คัดเลือกแล้วและชนิดของราและยีสต์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งนั้นๆ…….84
5.2 แสดงตำแหน่งของจังหวัดต่างๆ ที่เป็นแหล่งของตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้ว และชนิด ของราและยีสต์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งนั้นๆ……86
6.1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และน้ำตาลกลูโคส....112
6.2 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ และร้อยละของเอทานอล.....113

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

การผลิตไวน์ข้าว (rice wine) โดยใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์เป็นที่รู้จักกันมานานแล้วในประเทศแถบเอเชีย โดยหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในประเทศต่างๆ มีส่วนผสม ลักษณะการเตรียม และชนิดของจุลินทรีย์รวมทั้งมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไป ไวน์ข้าวที่ผลิตในประเทศจีนเรียกว่าเชาชินชูใช้หัวเชื้อเรียกว่าชู(Chu) ในประเทศเกาหลีเรียกว่ามักการิมีหัวเชื้อเรียกว่านุรุก(Nuruk) สาเกที่ผลิตในประเทศญี่ปุ่นจะใช้หัวเชื้อที่เรียกว่าโคจิ(Koji) ในประเทศอินโดนีเซียใช้ราจิเป็นหัวเชื้อในการผลิตเบรม และชอนติมาชาในประเทศอินเดียใช้หัวเชื้อเรียกว่ามาชา สำหรับในประเทศไทยนั้น ไวน์ข้าวเป็นที่นิยมผลิตและบริโภคกันเองภายในท้องถิ่น จึงมีชื่อเรียกต่างกันไปตามแต่ละท้องที่ เช่น สาโท (เหล้าโท) อุ และเหล้าขาว เป็นต้น โดยใช้หัวเชื้อที่เรียกว่าลูกแป้ง ซึ่งในกระบวนการหมักสาโทโดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ปฏิบัติกันมาแต่เดิมนั้น มักจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพที่ไม่แน่นอน เช่น มีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ต่ำหรือสูงเกินไป หรืออาจมีกลิ่นรสที่ไม่ชวนดื่ม ตลอดจนปัญหาอื่นๆอีกมาก ซึ่งส่วนหนึ่งของปัญหาเกิดขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแป้งสุรา ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพตลอดจนปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักหรือขยายกำลังการผลิตให้สูงขึ้นจากเดิมได้ หากสามารถศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของชนิดของยีสต์และราในลูกแป้งสุรา และได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์พิเศษ เพื่อการปรับปรุงคุณภาพของสาโทในด้านต่างๆเช่น ให้มีกลิ่นและรสชาติดีขึ้น การทนต่อ pH ที่เป็นกรด การทนต่ออุณหภูมิสูง เป็นต้น ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อการผลิตสาโทในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ฉะนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งทำการคัดแยก จำแนกยีสต์ และราในลูกแป้งสุราจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย โดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี ร่วมกับเทคนิคอณูชีววิทยา ตลอดจนติดตามประชากรของยีสต์และราในระหว่างการหมัก และศึกษาสมบัติของยีสต์และราในด้านการย่อยแป้งและความสามารถในการผลิตเอทานอล เพื่อให้เป็นองค์ความรู้ทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์และราในลูกแป้งสุราของไทย รวมทั้งเป็นแนวทางในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสาโท อันจะนำไปสู่การพัฒนาคุณภาพของสาโทให้ดีขึ้น หรือให้มีมาตรฐานการผลิตที่คงที่และยังใช้ในอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องอื่นต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

การคัดแยก จำแนกยีสต์ และราในลูกแป้งสุราจากจังหวัดต่างๆ ในประเทศไทย โดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี ร่วมกับเทคนิคอณูชีววิทยา ตลอดจนติดตามประชากรของยีสต์และราในระหว่างการหมัก และศึกษาสมบัติของยีสต์และราในด้านการย่อยแป้งและความสามารถในการผลิตเอทานอล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบถึงชนิดของยีสต์ และราในลูกแป้งสุราจากภูมิภาคต่างๆในประเทศไทยรวมทั้งติดตามประชากรของยีสต์และราในระหว่างการหมัก ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งและความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ และรา เพื่อการผลิตสาโท

ขั้นตอนงานวิจัย

1. เก็บตัวอย่างลูกแป้งสุราจากแหล่งผลิตลูกแป้งสุรา
2. แยกและหาจำนวนยีสต์และราที่อยู่ในลูกแป้งสุรา
3. พิสูจน์เอกลักษณ์ยีสต์และราในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคอณูชีววิทยา
4. ศึกษาแอกทิวิตีของแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลสในยีสต์และราที่แยกได้และศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์และราที่แยกได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่2

วารสารปริทัศน์

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีผลผลิตทางการเกษตรตลอดปี ผลผลิตที่มีความสำคัญอันดับหนึ่งก็คือ ข้าว ข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจของไทยและเป็นอาหารหลักประจำชาติ สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นเครื่องดื่มหมักพื้นบ้าน ซึ่งเกิดจากภูมิปัญญาชาวบ้านของไทย โดยมีชื่อเรียกต่างๆกันไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น กระแช่ อุ น้ำขาว น้ำแดง สาโท เป็นต้น อีกทั้งประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อรา จึงเป็นที่มาของขบวนการหมักโดยใช้ยีสต์และรา เนื่องจากยีสต์ ราและจุลินทรีย์อื่น สามารถย่อยแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลและแอลกอฮอล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูง

เทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ในปัจจุบันมีต้นกำเนิดจากขบวนการหมักดั้งเดิมเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ เช่นในการผลิตสุราพื้นบ้าน เป็นต้น โดยเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จะมีบทบาทสำคัญต่อวัฒนธรรมและวิถีชีวิตของคน ทั้งในแถบซีกโลกตะวันออกและตะวันตก ขณะที่ประเทศในแถบทวีปยุโรป และตะวันออกกลาง นิยมผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากผลไม้ แต่ประเทศในแถบเอเชียแปซิฟิก จะนิยมผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์จากธัญพืช(Cereals) ซึ่งเบียร์ที่ผลิตจากยุโรปใช้ข้าวบาร์เลย์และมอลต์เป็นวัตถุดิบในการผลิต ในขณะที่เบียร์(Rice wine) จากทวีปเอเชียใช้ข้าวที่มีราและยีสต์เป็นหัวเชื้อในการหมัก

กระบวนการผลิตไวน์ข้าวของแต่ละประเทศจะมีความแตกต่างกันทั้งวัตถุดิบ สัดส่วน อุณหภูมิ และระยะเวลา แต่โดยรวมแล้วเป็นการหมักแบบธรรมชาติโดยใช้ธัญพืชเป็นหลักโดยแต่ละแห่งมีการทำก้อนแป้งหัวเชื้อ(Starter) ด้วยส่วนผสม รูปร่าง และเชื้อจุลินทรีย์แตกต่างกัน และมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 หัวเชื้อชนิดต่างๆ และชื่อไวน์ข้าวที่เรียกกันในแต่ละประเทศ

ประเทศ	ชื่อหัวเชื้อ	ส่วนผสมหลัก	รูปร่าง	เชื้อ	ชื่อไวน์ข้าว
จีน	Chu	Wheat, Barley, Millet, Rice (Whole grain, Grits or Flour)	ก้อน หรือก้อนเค้ก	*Rhizopus* sp. *Amylomyces* sp.	Shao-Shin-Chu
เกาหลี	Nuruk	Wheat, Rice, Barley (Whole grain, Grits orFflour)	ก้อนเค้กขนาดใหญ่	*Aspergillus* sp. *Rhizopus* sp. Yeast	Makkari

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

ประเทศ	ชื่อหัวเชื้อ	ส่วนผสมหลัก	รูปร่าง	เชื้อ	ชื่อไวน์ข้าว
ญี่ปุ่น	Koji	Wheat, Rice (Whole grain, Grits or Flour)	ก้อนเล็ก-ผง	*Aspergillus* sp.	Sake, Amazake
อินโดนีเซีย	Ragi	Rice (Flour)	ก้อนเค้กขนาดเล็ก	*Amylomyces* sp. *Endomycopsis* sp.	Brem
ฟิลิปปินส์	Bubod	Rice, Glutinous rice (Flour)	ก้อนเค้กขนาดเล็ก	*Mucor* sp. *Rhizopus* sp. *Saccharomyces sp.*	Tapuy
ไทย	Lookpang	Rice bran	ก้อนเล็ก-ผง	*Amylomyces* sp. *Aspergillus* sp.	กระแช่, น้ำขาว, สาโท, อุ
อินเดีย	Marcha, Murcha	Rice	ก้อนเค้กชนิดแบน	*Hansenula anomala* *Mucor fragilis* *Rhizopus arrhizus*	Shonti, Murcha

ไวน์ข้าวแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามลักษณะความใสของผลิตภัณฑ์ (Yoshizawa, 1985) คือ

1. Alcoholic beverage เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะใส ได้แก่ สาเก และ Shao-Shin-Chu เป็นต้น

2. Miscellaneous alcoholic drinks เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีลักษณะขุ่น เนื่องมาจากจุลินทรีย์ และของแข็งที่เหลือตกค้างอยู่ ได้แก่ Tapuy, Baside, Tapay, Amazake และสาโท เป็นต้น

ไวน์ข้าวที่รู้จักกันดี และเป็นที่นิยมไปทั่วโลก คือ สาเก เนื่องจากมีการพัฒนาการผลิตมากกว่าไวน์ข้าวชนิดอื่นๆ (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2535) ไวน์ข้าวของไทยหรือที่เรียกกันว่า สาโท จัดเป็นสุราแช่ตามความหมายในพระราชบัญญัติสุรา พ.ศ.2492 มาตรา 4 ซึ่งให้คำนิยามว่า “สุราแช่” หมายถึงสุราที่ไม่ได้กลั่น และให้ความหมายรวมถึงสุราแช่ที่ได้ผสมกับสุรากลั่นแล้ว แต่ยังมีความแรงแอลกอฮอล์ไม่เกิน 15 ดีกรีด้วย คำว่า แรงแอลกอฮอล์ (Alcohol strength) หมายถึง ดีกรี หรือหน่วยวัดความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ในสุรา คิดเป็นร้อยละโดยปริมาตร (มาตรฐานอุตสาหกรรม, 2516) วัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตสาเก คือ ข้าวและน้ำ เช่นเดียวกับสาโทของประเทศไทย แต่แตกต่างกันที่สาเก ดำเนินการหมักโดยโคจิ (Koji) ซึ่งเป็นเชื้อบริสุทธิ์ของ *Aspergillus oryzae* ที่เจริญบนข้าวสุก และเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์ *Saccharomyces sake* แต่สาโทดำเนินการหมักโดยเชื้อในลูกแป้งสุรา ซึ่งเป็นกล้าเชื้อผสมของจุลินทรีย์หลายชนิด ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย (นภา โล่ห์ทอง, 2535) ดังนั้นคุณภาพของสาโท จึงขึ้นกับคุณภาพของลูกแป้งสุราเป็นสำคัญ

การผลิตสุราแช่พื้นบ้านไทยมีมาช้านานแล้ว ได้จากการหมักข้าวเหนียวในโอ่งหรือไหดินเผา ขั้นตอนการผลิตและส่วนผสมแตกต่างกันไป นับตั้งแต่การทำลูกแป้งสุราหรือก้อนแป้งหัวเชื้อที่ใช้แป้งข้าวเหนียวผสมกับสมุนไพรหลายๆชนิด โดยมีเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรียชนิดต่างๆกันไปในแต่ละท้องถิ่นของประเทศ จนกระทั่งถึงกระบวนการหมัก โดยใช้ข้าวเหนียวนึ่งผสมกับลูกแป้งสุราและน้ำ เพื่อให้ได้สุราที่เรียกว่า สาโท หรือเหล้าโท หรือน้ำขาว ซึ่งนิยมผลิตกันมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ สาโทที่ผลิตได้มีลักษณะเป็นของเหลวสีขุ่นหรือสีตามข้าว รสหวานหอม เฝื่อนเล็กน้อย ถ้าหมักจากข้าวเหนียวดำจะมีสีดำมีรสชาติอร่อย ในพื้นที่ภาคกลางภาคเหนือ อาจมีการใช้ข้าวเจ้าในการผลิตสาโทแต่ไม่ค่อยเป็นที่นิยม บางชุมชนจะใช้การหมักข้าวเหนียวนึ่งผสมแกลบกับลูกแป้งสุราและน้ำในไห เรียกสุราแช่ประเภทนี้ว่า อุ หรือเหล้าแกลบ หรือเหล้าไห หรือช้าง รสชาติของสาโทขึ้นอยู่กับความเหนียวของข้าว ยิ่งข้าวมีความเหนียวมากเท่าใดก็ยิ่งทำให้สาโทมีรสชาติอร่อยนุ่มนวล โดยเฉพาะหากมีความหอมของข้าวด้วยแล้วจะทำให้สาโทเกิดกลิ่นหอมยิ่งขึ้น (สุพัฒน์ กุมพิทักษ์ และ กำพล กาหลง, 2545) นอกจากนั้นก็ยังมีปัจจัยอื่นๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโทด้วย

การทำสาโทของชาวบ้านเป็นการทำตามภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ได้รับการถ่ายทอดกันมาหลายชั่วอายุคน ลูกแป้งสุราในแต่ละหมู่บ้านมีสูตรเฉพาะเป็นของตนเอง และส่วนใหญ่ถูกปกปิดเป็นความลับ ไม่เผยแพร่แก่ผู้อื่น โดยภูมิปัญญาท้องถิ่นยังเชื่อมโยงกับสภาพแวดล้อม หรือความหลากหลายทางชีวภาพ เช่น สมุนไพร ที่นำไปทำเป็นหัวเชื้อ เป็นต้น สูตรการทำลูกแป้งสุราของแต่ละแหล่งจะมีความแตกต่างกันไปตามวัตถุประสงค์และสรรพคุณของสมุนไพร แต่โดยรวมจะคล้ายคลึงกันซึ่งจะประกอบด้วยสมุนไพรหลากหลายชนิด ได้แก่ กระเทียม ข่า ดีปลี พริกแดง ปิดปลิวแดง เป็นต้น นำมาบดรวมกัน ผสมกับแป้งข้าวเหนียว และลูกแป้งสุราเก่าที่มียีสต์และรา

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตสาโท

1. ข้าว

เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิตสาโท มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ คือ *Oryza sativa* โดยข้าวที่ปลูกในประเทศไทยจัดอยู่ใน indica type มี 2 ชนิด คือ ข้าวเจ้า (Rice , Ordinary rice) และข้าวเหนียว (Glutinous rice , Sticky rice) มีลักษณะเมล็ดยาวรี

องค์ประกอบหลักในเมล็ดข้าว คือ แป้ง(Starch) ซึ่งอยู่ในรูปของเม็ดแป้ง (Starch granule) ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลและแอลกอฮอล์ เมื่อมีการหมักเกิดขึ้น แป้งมีสูตรทั่วไปคือ $(C_6H_{10}O_5)n$ มีค่า n ไม่น้อยกว่า 1,000 โดยโมเลกุลของแป้งจะประกอบด้วย β -D-glucopyranose ซึ่งต่อกันเป็นลูกโซ่ด้วย 1,4- glycosidic linkage โดยการสร้าง Oxygen bridge ขึ้นมาระหว่างอะตอมของคาร์บอนตัวที่หนึ่งกับคาร์บอนตัวที่สี่ของกลูโคสโมเลกุลถัดไป แป้งส่วน

ใหญ่เป็นสาร Heterogeneous ซึ่งเป็นโพลีเมอร์ของกลูโคส ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ Amylose และ Amylopectin ซึ่งมีโครงสร้างทางเคมีแตกต่างกัน

- Amylose เป็นสายตรง ประกอบด้วย 70-2,100 หน่วยของน้ำตาลกลูโคส ต่อกันด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic linkage ซึ่งในแป้งทั่วๆไปจะมีพันธะแบบนี้ได้ถึง 90 ถึงเกือบ 100%

- Amylopectin เป็นโพลีเมอร์ที่มีการแตกแขนง ส่วนที่เป็นแขนงจะต่อกันด้วยพันธะβ -1,6 glycosidic linkage แต่ส่วนกลูโคสหน่วยอื่นๆต่อด้วยพันธะ β-1,4 glycosidic linkage

ปริมาณ Amylose ในข้าวเหนียวยังขึ้นอยู่กับพันธุ์ข้าวอีกด้วย เช่น ข้าวเหนียวดำมี 5.7% ข้าวเหนียวสันป่าตอง 2.8% และข้าวเหนียวดำไผ่41มี 5.2% เป็นต้น การที่ข้าวมี Amylose มากน้อยแตกต่างกัน ทำให้ลักษณะของข้าวเมื่อสุกแล้วแตกต่างกันด้วย คือ ข้าวที่มีปริมาณ Amylose สูง จะมีความเหนียว (sticky) และมีความชื้นน้อยกว่าข้าวที่มีปริมาณ Amylose ต่ำ และข้าวเหนียวมีเมล็ดแข็งกว่าข้าวเจ้า และแป้งข้าวเหนียวจะมีความหนืดมากว่าแป้งข้าวเจ้า

การแบ่งประเภทของข้าว

จำแนกตามลักษณะการบริโภค หรือชนิดของแป้ง (สุภมาส ไข่คำ, 2544)

1.1 ข้าวเจ้า (Non glutinous rice) มี Amylose อยู่ประมาณ 7-33% ที่เหลือเป็นAmylopectin เมล็ดข้าวจะมีสีขาวใส และเมื่อหุงสุกแล้วเมล็ดจะร่วนกว่าข้าวเหนียว ข้าวเจ้าแต่ละพันธุ์มีความนุ่มเหนียวแตกต่างกัน

1.2 ข้าวเหนียว (Glutinous rice หรือ Waxy rice) ประกอบด้วย Amylopectin 98% และมี Amylose อยู่น้อยมากเพียง 0-2% เมล็ดข้าวสารจะมีสีขาวขุ่น เมื่อนึ่งแล้วจะได้ข้าวสุกที่จับตัวเหนียวติดกัน และมีลักษณะใส

การทำสาโทนิยมใช้ข้าวเหนียวขาว หรือข้าวเหนียวดำ เป็นวัตถุดิบมากกว่าข้าวเจ้า เนื่องจากข้าวเหนียวให้กลิ่นและรสที่ดีกว่า และจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราสามารถย่อยแป้งข้าวเหนียวได้ดีกว่าแป้งข้าวเจ้า (มนตรี เชาวสังเกต, 2521) องค์ประกอบภายในเมล็ดข้าว ส่วนใหญ่คือ Starch ซึ่งประกอบด้วย Amylose และ Amylopectin เป็นองค์ประกอบหลัก และจะมีผลต่อคุณสมบัติของข้าวเมื่อนึ่งสุกแล้ว โดยข้าวที่มี Amylose ต่ำจะสามารถดูดน้ำและขยายตัวได้น้อยกว่าข้าวที่มี Amylose สูง เมื่อนึ่งสุกข้าวจะเหนียวนุ่มกว่า จึงทำให้การแทงเส้นใยของเชื้อราเข้าสู่ภายในเมล็ดข้าวได้ง่าย (เชื้อราโตดี) และองค์ประกอบของข้าวเหนียว พบว่า มี Amylose น้อยมากจนแทบไม่มีเลย ดังนั้นข้าวเหนียวจึงเหมาะที่จะนำมาทำสาโทมากกว่าข้าวเจ้า (สุภมาส ไข่คำ, 2544) ส่วนการขัดสีข้าวก็อาจมีผลต่อคุณภาพและการหมักสาโท หากใช้ข้าวที่ยังมีรำข้าวเหลืออยู่บ้างอาจช่วยให้มีการหมักดีขึ้น เนื่องจากมีสารอาหารให้จุลินทรีย์มากกว่าข้าวขัดขาว

2. น้ำ

เป็นองค์ประกอบที่มีอยู่ในสาโทไม่ต่ำกว่า 80% คุณภาพของน้ำมีผลต่อคุณภาพของสาโทเป็นอย่างมาก การผลิตจะต้องคำนึงถึงคุณภาพของน้ำเป็นพิเศษ น้ำที่เหมาะสมควรเป็นน้ำที่มีคุณภาพใกล้เคียงกับมาตรฐานน้ำดื่ม คือ ใส ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และไม่มีรสชาติ สะอาด ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ควรเป็นน้ำอ่อน ไม่มีสนิมเหล็ก ไม่มีคลอรีน เพราะคลอรีนจะไประงับการเจริญของยีสต์ ทำให้ปฏิกิริยาการหมักเกิดขึ้นช้า และจะทำให้สาโทมีกลิ่นที่ผิดปกติไป

3. ลูกแป้งสุรา

เป็นกล้าเชื้อผสม (Mixed cullture) ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่เป็นตัวการสำคัญในการเปลี่ยนสภาพแป้งในข้าวให้กลายเป็นน้ำตาลหรือแอลกอฮอล์ (กฤษฎา ขุนแหลม, 2542) ลูกแป้งสุรามีหลายชนิดผลิตขึ้นตามวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้ เช่นลูกแป้งสุรา ลูกแป้งสุราข้าวหมาก ลูกแป้งสุราทำน้ำส้มสายชู เป็นต้น (มนตรี เชาวสังเกต, 2521) การผลิตลูกแป้งสุรามักทำกันเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน โดยมีกรรมวิธีทีคล้ายคลึงกัน และคล้ายคลึงกับการผลิตลูกแป้งสุราของชนชาติอื่น ต่างกันแต่เพียงองค์ประกอบของวัตถุดิบ ขนาด รูปร่าง ตลอดจนชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์เท่านั้น (มนตรี เชาวสังเกต, 2521) องค์ประกอบสำคัญของลูกแป้งสุรา ก็คือปลายข้าว ซึ่งใช้ได้ทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้า นำมาผสมกับเครื่องเทศหรือสมุนไพรต่างๆ คุณภาพของลูกแป้งสุราขึ้นอยู่กับคุณภาพของข้าวและเครื่องเทศ

ลักษณะทั่วๆไปของลูกแป้งสุราที่ดีคือ จะมีลักษณะโปร่งเบา สีขาวนวล (Grey-white) ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผงละเอียด ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว ลูกแป้งสุราที่ผลิตจากแต่ละแหล่งจะมีประสิทธิภาพการหมักต่างกัน (นภา โล่ห์ทอง, 2535) โดยลูกแป้งสุราที่นำมาใช้ในการผลิตสาโทนั้น จะใช้ลูกแป้งสุราสุรา
บทบาทสำคัญของจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราต่อกระบวนการหมัก มี 2 ประเภท คือ

1) การเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาล โดยรา เช่น *Amylomyces rouxii* และ *Rhizopus* spp. จะสร้างเอนไซม์ amylase ชนิด α-Amylase และ Glucoamylase

2) การหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้น ให้เป็นเอธานอลกับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยยีสต์ เช่น *S. cerevisiae* ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอธานอล (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

กระบวนการที่เกิดขึ้นในสาโท มีดังนี้

1. กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล มีกระบวนการดังนี้

1.1 Gelatinization เป็นขั้นตอนการทำให้แป้งสุก เม็ดแป้งในข้าวเมื่อสัมผัสความร้อนชื้นทำให้โครงสร้างของแป้งขยายตัวและเกิด Gelatinization ทำให้แป้งมีลักษณะนุ่มเหนียวเหมาะสมต่อการทำกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Tester และ Morrison, 1990)

1.2 Liquefaction เป็นขั้นตอนเพื่อลดความหนืดของแป้งที่ gelatinize แล้ว โดยเอนไซม์จะทำการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่ม(Random hydrolysis) เมื่อการไฮโดรไลซ์เกิดขึ้นจะทำให้ Polymer ของกลูโคส ถูกตัดเป็นสายสั้นๆ มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้มีความหนืดลดลง

1.3 Saccharification เป็นการไฮโดรไลซ์แป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาลดังนั้นหลังการย่อยแล้วจะได้ Monosaccharide หรือ Disaccharide หรือ น้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่าบ้างเล็กน้อย จะได้เป็นน้ำตาลกลูโคส มอลโทส หรือ มอลโทไทรโอส

2.กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยจุลินทรีย์

การหมักแอลกอฮอล์จากน้ำตาล แสดงได้เป็นสมการดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 + H_2O \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2$$

การหมักแอลกอฮอล์จากแป้งมีความจำเป็นที่ต้องใช้เชื้อราในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ปัจจุบันการผลิตแอลกอฮอล์นิยมใช้เอนไซม์ α -Amylase และGlucoamylase จากรา การใช้ราย่อยแป้งเพื่อผลิตแอลกอฮอล์หรือที่เรียกว่า Amylo process (Inui และคณะ, 1965) นั้น ใช้เชื้อราในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล และเชื้อราเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้เล็กน้อย ดังนั้นการหมักแอลกอฮอล์จึงจำเป็นต้องเติม ยีสต์ร่วมด้วย เพื่อจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์
การย่อยแป้งมีกระบวนการทำได้ ดังนี้ (Grace, 1977)

การย่อยแป้งด้วยกรด มีกรดอยู่หลายชนิดที่สามารถย่อยแป้งได้ โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมีชนิดหนึ่ง ซึ่งส่งผลให้แป้งมีโมเลกุลเล็กลง กรดดังกล่าว ได้แก่ กรดเกลือ(HCl), กรดคาร์บอนิก(H_2CO_3), กรดกำมะถัน(H_2SO_4), กรดไนตริก(HNO_3) และพบว่ากรดไนตริก สามารถย่อยสลายแป้งได้ดีกว่ากรดเกลือ หรือกรดชนิดอื่น แต่อาจมีผลอย่างอื่นเกิดขึ้นด้วย ปัจจุบันในต่างประเทศเลิกใช้กรดในการย่อยแป้งในอุตสาหกรรมแล้ว เพราะการใช้กรดทำให้ pH ต่ำ ซึ่งต้องทำให้เป็นกลางโดยการใช้ด่าง ผลที่ได้คือ เกลือซึ่งมีผลต่อรสชาติผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังสิ้นเปลืองในการใช้อุปกรณ์ที่ทนต่อความเป็นกรดสูงอีกด้วย

การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ เริ่มใช้ในปี 1930 การผลิตน้ำตาลจากแป้งโดย ใช้เอนไซม์ เป็นวิธีที่สามารถควบคุมคุณภาพของน้ำตาลได้ดีกว่า คือ มีสารเคมีชนิดอื่นปนเปื้อนน้อย สามารถเพิ่มการผลิตน้ำตาลได้มากกว่าการย่อยด้วยกรด(กรดสามารถย่อยได้ประมาณ 87%, เอนไซม์สามารถย่อยได้ปริมาณ 96%) และไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ทนต่อความเป็นกรด และทนต่อความดันในการผลิต ปัจจุบันเอนไซม์ที่นิยมใช้ย่อยแป้ง ได้แก่ α-Amylase และ β-Amylase
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการหมักสาโท

เอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในการหมักสาโท คือ เอนไซม์ Amylase ซึ่งเป็น Extra cellular enzyme มีความสามารถในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล พบได้ทั้งในพืช สัตว์ และจากการสร้างของจุลินทรีย์หลายชนิด

เอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยแป้ง สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิดตามตำแหน่งการย่อยแป้งดังนี้

1. Endoamylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อย (Hydrolyze) แป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α-D-(1,4) glycosidic linkage ถ้าการย่อยไม่สมบูรณ์จะมีกลูโคส มอลโตส และเด็กสตรินเกิดขึ้น ถ้าการย่อยสมบูรณ์จะได้น้ำตาลมอลโตส และกลูโคสเท่านั้น เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ α-Amylase หรือ Amylo(1,4)dextrinase พบได้ใน พืช สัตว์ และจุลินทรีย์

2. Exoamylase เป็นเอนไซม์ที่ย่อยแป้งจากปลายทางด้าน non-reducing end เข้ามา ทำให้ได้น้ำตาลกลูโคส (Glucose unit) โดยย่อยที่ α-D-(1,4) glycosidic linkage และ α-D-(1,6) glycosidic linkage เอนไซม์ประเภทนี้ ได้แก่ β-Amylase และ Glucoamylase

- β-Amylase จะย่อยแป้งที่ตำแหน่ง α-D-(1,4) glycosidic linkage เข้าไปทีละ 2 หน่วยของกลูโคส แต่ไม่สามารถย่อยพันธะที่ต่อแบบ α-D-(1,6) glycosidic linkageได้ ผลที่ได้จากการย่อยคือ น้ำตาลมอลโทส และเด็กสตรินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง เอนไซม์ชนิดนี้ พบได้ในพืชและจุลินทรีย์บางชนิด

- Glucoamylase (γ-Amylase) เป็นเอนไซม์ที่พบครั้งแรกในจุลินทรีย์ และพบว่ามีในเนื้อเยื่อของสัตว์ด้วย โดยสามารถย่อยแป้งได้อย่างสมบูรณ์จากทางด้าน Non-reducing end ที่ตำแหน่ง α-D-(1,4) glycosidic linkage เข้าไปทีละ 1 หน่วยกลูโคส แล้วยังสามารถย่อยที่ตำแหน่ง α-D-(1,6) glycosidic linkage และ α-D-(1,3) glycosidic linkage ได้ดีพอๆกับ α-D-(1,4) glycosidic linkage อีกด้วย ดังนั้นผลการย่อยที่สมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคส(D-glucose) เพียงอย่างเดียว

จุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในลูกแป้งสุรา ประกอบด้วย

- เชื้อรา ได้แก่*Amylomyces rouxii Mucor* spp. *Rhizopus* spp. และ *Aspergillus* sp. ปริมาณที่พบมากน้อยนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของลูกแป้งสุรา
- ยีสต์ ที่พบในลูกแป้งสุราสุรา ส่วนใหญ่จะพบ *Saccharomyces cerevisiae* ในปริมาณมากกว่า *Endomycopsis* spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535) นอกจากนี้ยังมียีสต์อื่นที่พบในลูกแป้งสุราเฉพาะแหล่ง ได้แก่ *Candida* spp. *Pichia* spp. และ *Torulopsis* spp.
- แบคทีเรีย ตรวจพบแบคทีเรียแลคติก ซึ่งส่วนใหญ่ ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* และอาจพบ *Lactobacillus* spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ Amylase

จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ Amylase ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา

- แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ amylase ได้แก่ *Bacillus subtilis, Bacillus mesentericus* (Porter และคณะ, 1937) *Aerobacillus macerans, Aerobacillus polymyxa, Bacillus stearothermophilus, Bacillus macerans, Bacillus polymyxa* (Porter และคณะ, 1937) *Bacillus diastaticus* (Peltier และคณะ, 1945; Walter และคณะ, 1965) *Actinomyces* sp.(Peltier และคณะ, 1945)

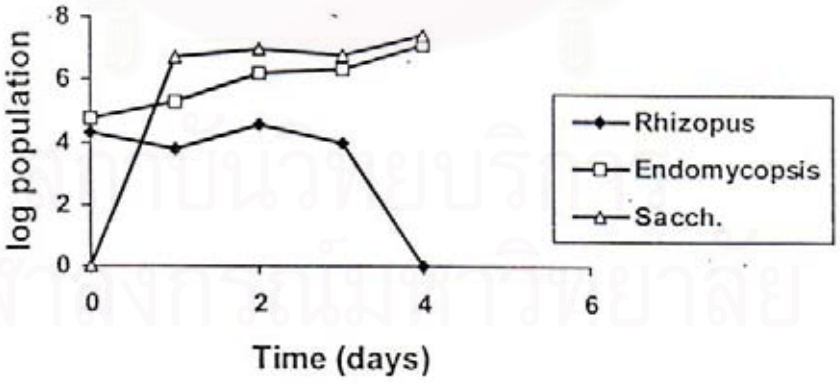
- ยีสต์ที่มีสามารถย่อยแป้งที่สำคัญ คือ *Endomycopsis fibuligera* ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ glucoamylase ได้ในปริมาณมาก ส่วนยีสต์อื่นๆที่ผลิต amylase ได้ดี คือ *Endomycopsis hordei, Endomycopsis lindneri* และ *Endomycopsis javanensis* (จิราภรณ์ สุขุมาวาสี, 2518)

- ราที่สร้างเอนไซม์ amylase ได้แก่ *Aspergillus oryzae, Aspergillus niger, Penicillium* sp., *Monilia* sp. (Le Minse และคณะ, 1947; Sukumavasi, 1973) และราในกลุ่ม Mucoraceous Fungi เช่น *Mucor* sp., *Amylomysis* sp. และ *Rhizopus* sp. (Ellis, 1974)

การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท

รา

ในระหว่างการหมักสาโท เชื้อราจะเจริญในช่วง 2-3 วันแรกของการหมัก ซึ่งเป็นสภาพการหมักที่ใช้อากาศ เนื่องจากการบรรจุข้าวในถังหมัก จะบรรจุเพียง 1 ใน 4 ของปริมาตร ทำให้ราได้รับออกซิเจนจากอากาศอย่างทั่วถึง จากนั้นเมื่อเกิดน้ำต้อย(น้ำเชื่อมข้าว)ขึ้น และยีสต์เริ่มการหมัก ทำให้มีปริมาณแอลกอฮอล์ และสภาพไร้ออกซิเจน ซึ่งเกิดจากการที่ยีสต์ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้ราตายไป ดังกราฟในรูปที่ 2.1

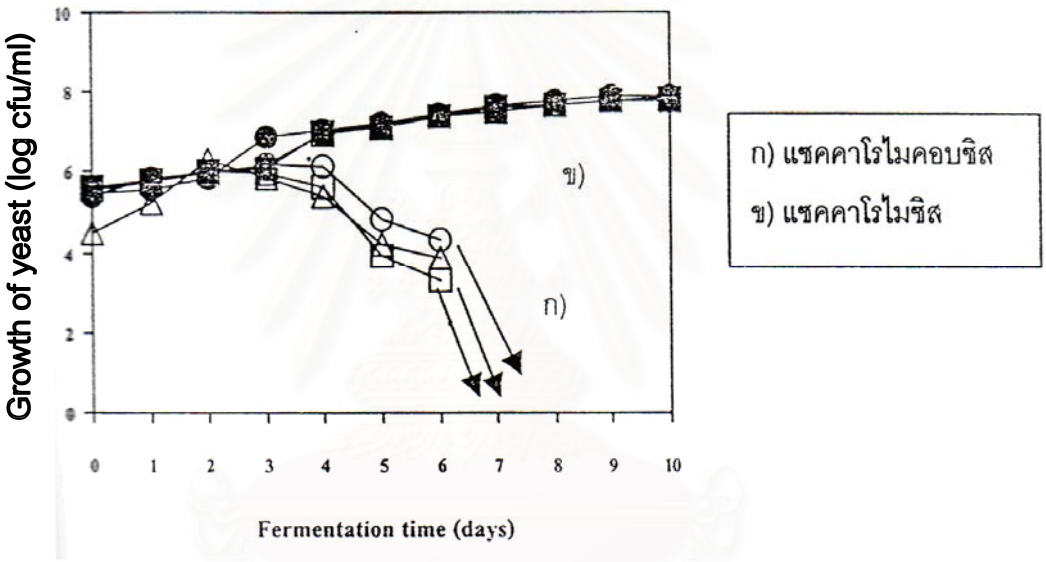


รูปที่ 2.1 การเจริญของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักสาโท

ที่มา: เจริญ เจริญชัย (2545)

ยีสต์

แม้ว่ายีสต์ในลูกแป้งสุราจะเป็นยีสต์ *Saccharomycopsis* sp. แต่ในระหว่างการหมักสาโท ยีสต์นี้จะเจริญเพียงช่วงระยะเวลาหนึ่งเท่านั้นแล้วยีสต์นี้จะตายไป แต่จะเกิดยีสต์ *Saccharomyces* sp. ทำหน้าที่ในการหมักแทน ดังกราฟในรูปที่ 2.2 โดยยีสต์ *Saccharomyces* sp. จะมีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ได้ดีกว่า และทนปริมาณแอลกอฮอล์ได้สูงกว่ายีสต์จากลูกแป้งสุรา แหล่งที่มาของยีสต์ที่ทำให้เกิดการหมักนี้ยังไม่ทราบเป็นที่แน่นอน แต่อาจมาจากลูกแป้งสุราเช่นกัน แต่มีอยู่ในลูกแป้งสุราในปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจพบได้ แต่สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ในสภาพที่เหมาะสมของการหมักสาโท



รูปที่ 2.2 การเจริญของยีสต์ 2 ชนิด จากลูกแป้งสุราจากผู้ผลิต 3 แห่ง ระหว่างการหมักสาโท

ที่มา: เจริญ เจริญชัย (2545)

การที่ในลูกแป้งสุรามียีสต์ *Saccharomycopsis* sp.ซึ่งสามารถย่อยแป้งได้นั้น อาจเป็นเพราะเอนไซม์ของเชื้อราไม่สามารถย่อยแป้งได้หมด เพราะราจะตายไปหลังจากการหมักเพียง 3 วัน ดังนั้นจึงต้องอาศัยเอนไซม์ของยีสต์นี้ ช่วยย่อยแป้งที่เหลือเพื่อให้เกิดเป็นน้ำตาล เพื่อยีสต์จะได้ใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์ต่อไป

3. แบคทีเรีย

ปัจจุบันไม่พบรายงานการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในระหว่างการหมักสาโท ทั้งนี้เนื่องจากในการหมักสาโท รา และยีสต์ มีบทบาทมากกว่า

อย่างไรก็ตามมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สำคัญต่อการหมักสาโทดังนี้

3.1 แบคทีเรียกรดแลคติค

แบคทีเรียกรดแลคติค มีความสำคัญต่อการหมักสาโท เนื่องจากสาเหตุ 2 ประการ คือ แบคทีเรียเหล่านี้มีส่วนในการทำให้สาโทเสื่อมเสีย และทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะของผลิตภัณฑ์

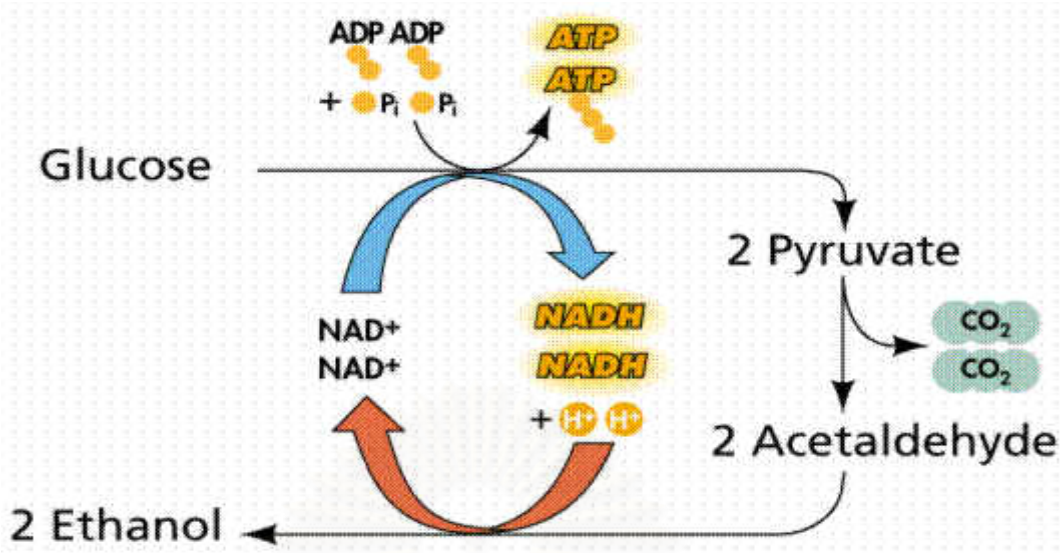
3.2 แบคทีเรียกรดอะซิติค

แบคทีเรียกรดอะซิติค หรือที่เรียกว่า แบคทีเรียกรดน้ำส้ม เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง(rod shaped) ที่สามารถออกซิไดซ์ เอธานอล ให้เป็นกรดอะซิติก (กรดน้ำส้มสายชู) แบ่งเป็น 2 genera คือ *Acetobacter* sp.และ*Gluconobacter* sp. ซึ่งทำให้เกิดการเสื่อมเสียของสาโท แบบเกิดน้ำรสน้ำส้มสายชู

เดิมการจำแนกราและยีสต์นิยมใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมีและสรีระวิทยา ดังเช่น Lee และ Fujio(1999) ทำการจำแนกราและยีสต์จากบาห์เมนซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักรูเนปซึ่งเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของประเทศเวียดนาม โดยการจำแนกยีสต์และราตามวิธีทดสอบทางชีวเคมีและสรีระวิทยา เป็นต้น ต่อมาเมื่อมีการพัฒนาทางด้านอณูชีววิทยาจึงมีการนำมาใช้ร่วมกับการจำแนกเชื้อยีสต์และราโดยวิธีทดสอบด้วยชีวเคมีและสรีระวิทยา ดังเช่น Tsuyoshi และคณะ (2005) ได้ทำการคัดแยกเชื้อยีสต์จากมาร์ชาซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับการหมักจาร์นซึ่งเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ของบริเวณเทือกเขาหิมาลัย ประเทศอินเดีย เนปาล และภูฏาน โดยการจำแนกยีสต์ใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมีและสรีระวิทยาร่วมกับการหาลำดับเบสในบริเวณ18sDNA ของตัวแทนกลุ่มที่ได้จากการทดสอบทางชีวเคมี แล้วจึงจัดทำเป็นต้นไม้วิวัฒนาการขึ้น ทางด้าน Sipiczki และคณะ(2001)ทำการคัดแยกยีสต์ที่มีอยู่ในบริเวณที่ทำการหมักไวน์ซึ่งใช้วิธีทดสอบทางชีวเคมีและสรีระวิทยาร่วมกับการใช้การแยกลำดับพันธุกรรม 2 มิติ ต่อมาได้มีการนำวิธี การตัดชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorhism,PCR-RFLP) ดังเช่น Torija และคณะ(2001)ได้ทำการจำแนกยีสต์ในระหว่างการหมักไวน์โดยไม่ใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ แต่ใช้วิธีการตัดชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะ (Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorhism,PCR-RFLP) ในบริเวณ ITS (Internal Transcribed spacer) ร่วมกับการตัดชิ้นส่วนสารพันธุกรรมในไมโตคอนเดรียโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะเพื่อจัดจำแนกยีสต์ที่แยกได้

กระบวนการหมักของยีสต์

กลูโคสในอาหารที่เลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* จะเข้าสู่เซลล์โดยกระบวนการนำเข้าซึ่งอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อเข้าสู่เซลล์แล้วจะเปลี่ยนแปลงไป ดังรูปที่ 2.3



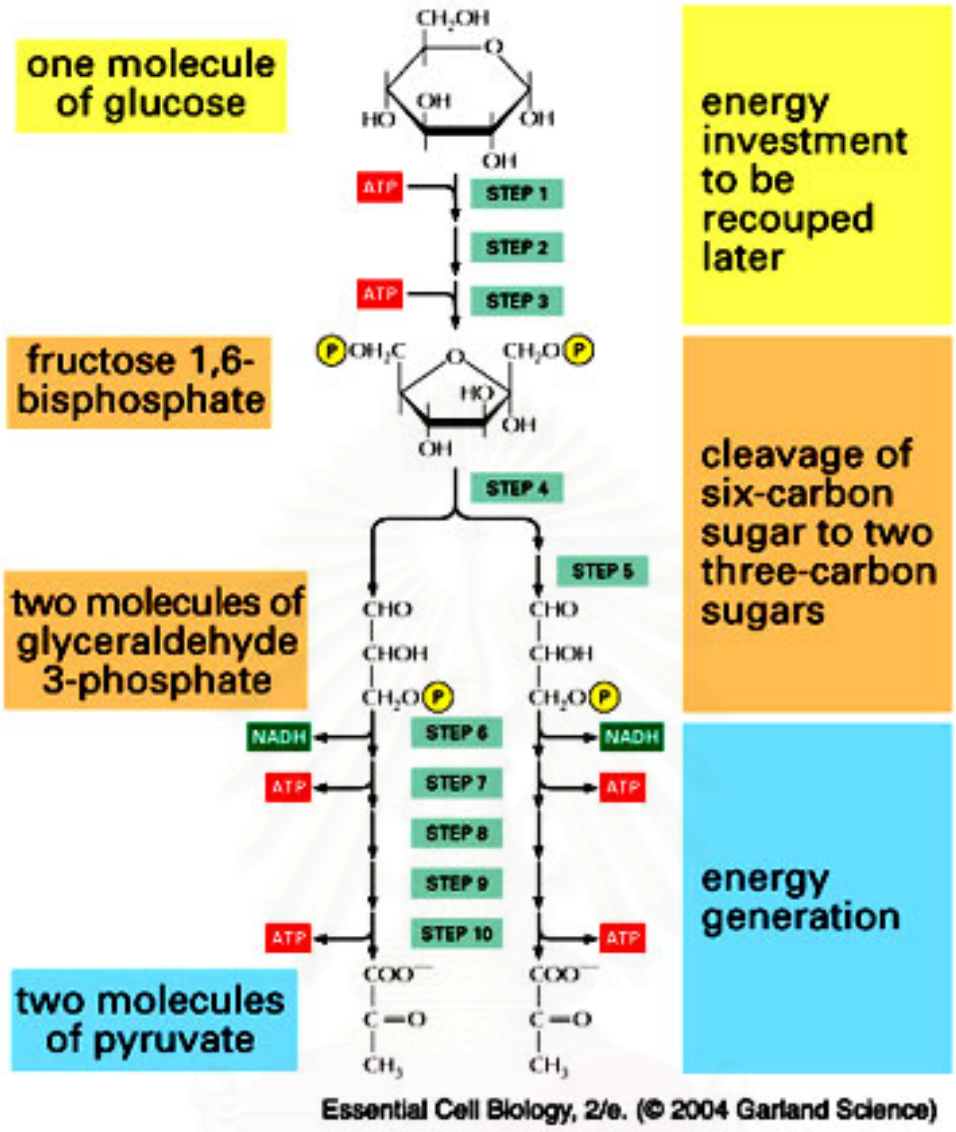
รูปที่ 2.3 กระบวนการเปลี่ยนแปลงกลูโคสเมื่อเข้าสู่เซลล์

ที่มา: http://fungifood.tripod.com

กระบวนการนี้จะทำให้เกิดการสังเคราะห์ ATP ขึ้นมา 2 โมเลกุล ซึ่ง ATP นี้นำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ (biosynthesis) เพื่อให้เซลล์เจริญต่อไป ถ้าขาดแหล่งไนโตรเจน กลูโคสจะถูกสะสมอยู่ภายในเซลล์ กล่าวคือ ประมาณ 70% ของกลูโคสจะถูกใช้ไป อีก 30% จะถูกสะสมไว้ และยีสต์จะใช้อาหารที่สะสมไว้อย่างช้าๆ ระหว่างการบ่มหรือการเพาะเลี้ยง เรียกว่าเกิดการหมักภายใน (endogenous fermentation)

กระบวนการในการผลิตแอลกอฮอล์นั้นเป็นกระบวนการย่อยสลายน้ำตาลไปเป็นเอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเป็นกระบวนการที่อาศัย The Embden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway ซึ่งประกอบไปด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.4 The Embden-Meyerhof-Parnas glycolytic pathway for glucose metabolism

ที่มา : http://fig.cox.miami.edu

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์

1) ธาตุอาหาร, เกลือแร่ และวิตามิน

- ไนโตรเจน: ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10% ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น

- ซัลเฟอร์: ยีสต์มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบประมาณ 0.4% ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ในรูปของ methionine แต่เนื่องจาก methionine มีราคาแพงมาก ดังนั้นจึงใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตแทน

- ฟอสฟอรัส: โดยมากใช้ในรูปของเกลือฟอสเฟต มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ฟอสเฟตจึงเป็น Ionic factor ที่สำคัญที่สุดในการหาอัตราการหมัก

- แร่ธาตุต่างๆ: มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. Macroelements ได้แก่ K, Mg, Ca, Zn, Fe, Mn, Cl ยีสต์ต้องการ 0.1-1 มิลลิโมลาร์

2. Microelements ได้แก่ Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni, Na ยีสต์ต้องการในระดับ 0.1-100 ไมโครโมลาร์

3. Inhibitors ได้แก่ Ag, As, Bd, Hg, Li, Ni, Os, Pd, Se, Te ถ้ามีในระดับความเข้มข้นสูงกว่า 10-100 ไมโครโมลาร์ จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการหมักของยีสต์

- วิตามิน: เป็นตัวควบคุม Metabolism ของยีสต์ โดยจะควบคุม Enzyme ที่เกี่ยวข้อง ทั้งนี้เพราะวิตามินเป็น Coenzyme หรือสารเริ่มต้น (Precursor) ที่ทำให้ Enzyme สามารถทำงานได้เต็มที่ วิตามินที่ยีสต์ต้องการนั้นส่วนใหญ่เป็น Biotin และ Pantothenic acid นอกจากนี้ความต้องการวิตามิน ชนิดอื่นๆขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์

- Growth promoting factor ได้แก่ Amino acid, Nucleic acid, Fatty acid และ Steroid ซึ่งสารเหล่านี้ถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์และเพิ่มปริมาณเอธานอล ในบางกรณีความต้องการ Growth factor ของยีสต์ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม

2) อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีความสำคัญมากในการหมัก ระดับที่ใช้กันในโรงงานอุตสาหกรรมอยู่ที่ประมาณ 30-35^{0}C และทนได้ถึงประมาณ 37^{0}C แต่ถ้าสูงกว่า 40^{0}C ส่วนใหญ่การเจริญเติบโตจะหยุดชะงัก ต้องมีการควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมักให้ดี เนื่องจากในระหว่างการหมักอุณหภูมิอาจสูงขึ้น อันเนื่องมาจากกิจกรรมของยีสต์ ทำให้เกิดความร้อนแบบ Exothermic energy ทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้นได้ เมื่ออุณหภูมิที่ใช้หมักสูงขึ้น สาร Secondary metabolites (กลีเซอรอล) ที่จะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์จะมีปริมาณสูงขึ้นด้วย และพบว่าผลที่ได้ของแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิต่ำมีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิสูง

3) พีเอช (pH)

ยีสต์และราชอบเจริญในสภาพที่เป็นกรดพอสมควร คือ ในระดับ 3.5-3.8 ถ้า pH ต่ำกว่า 3.5 การเจริญจะลดลง ถ้า pH ต่ำถึง 3.0 หรือ มากกว่านั้นจะไม่มีการเจริญ ดังนั้นจึงมักนิยมปรับ pH ให้อยู่ในช่วงประมาณ 4.0-4.5 ซึ่งสามารถช่วยในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียส่วนใหญ่ด้วย การติดตามวัดค่า pH ในช่วงหมักเป็นสิ่งจำเป็น บ่อยครั้งสามารถบอกถึงความผิดปกติในระหว่างการหมักได้

4) ความเข้มข้นของน้ำตาล

เราพอจะทราบปริมาณแอลกอฮอล์ที่ควรจะหมักได้เมื่อทราบความเข้มข้นของน้ำตาล โดยปกติเราจะใช้ค่าเปอร์เซ็นต์น้ำตาลคูณด้วย 0.55 หรือถ้าประสิทธิภาพของการหมักไม่ดีนัก จะหมักแอลกอฮอล์ 15% ในสภาพปกติ ถ้าต้องการหมักให้ได้แอลกอฮอล์สูงกว่านั้นต้องหมักในที่อุณหภูมิ

ต่ำกว่า 15^{0}C และเติมน้ำตาลให้ทีละน้อยๆในช่วงการหมักซึ่งจะเป็นไปอย่างช้าๆและใช้เวลาน้อยกว่า 1 สัปดาห์ การหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์สูง นิยมหมักในเครื่องดื่มประเภทไวน์และสาเก แต่เครื่องดื่มประเภทกลั่น จะหมักแอลกอฮอล์ในช่วง 8-10% ภายใน 1 หรือ 2 ชั่วโมง ดังนั้นการหมักให้ได้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำ แต่ใช้ระยะเวลาสั้นจะให้ผลคุ้มค่าทางเศรษฐกิจมากกว่า การหมักแอลกอฮอล์ต่ำกว่า 8% จะทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น โดยเฉพาะต้นทุนที่เกี่ยวกับการใช้ไอน้ำและการกำจัดของเสีย

น้ำตาลสำหรับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisae* มักอยู่ในรูปของน้ำตาลกลูโคส ฟลุกโทส แมนโนส ซูโครส มอลโทส กาแลคโทส และราฟฟิโนส ซึ่งหมักได้ 1/3 ของโมเลกุล

การหมักแอลกอฮอล์ที่มีปัญหาส่วนใหญ่ มาจากน้ำตาลที่มีคุณภาพต่ำ เพราะเก็บไว้นานและมีแบคทีเรียที่สร้างกรดอยู่มาก

5) ความเข้มข้นของเอธานอล

เอธานอลที่ได้จากการหมักเองกลับมีผลมายับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ จะเห็นได้ว่าถ้าเอธานอลที่ได้มีความเข้มข้นสูง อัตราการเจริญของยีสต์จะลดลง ซึ่งจะทำให้อัตราการหมักลดลงไปด้วย ทั้งนี้เนื่องจากเอธานอลไปมีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ alcohol dehydrogenase และ Hexokinase และยังมีผลต่อสรีรวิทยาของ membrane ของเซลล์ยีสต์ กล่าวคือ อาจมีการทำลายหรือทำให้ membrane เปลี่ยนแปลงไป

ปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโทที่ผลิตได้ ได้แก่

1. ลูกแป้งสุรา กล่าวคือ ในลูกแป้งสุรามีจุลินทรีย์ทั้งชนิดที่จำเป็นและไม่จำเป็นต่อการหมัก ลูกแป้งสุราที่ผลิตในแหล่งที่ต่างกันจะมีชนิดของจุลินทรีย์ที่ต่างกัน ดังนั้นการคัดเลือกลูกแป้งสุราจากแหล่งต่างๆที่ให้กลิ่นและรสชาติที่ดีในสาโทก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ

2. สายพันธุ์ของข้าวที่ใช้ในการหมัก ข้าวแต่ละสายพันธุ์ก็จะมีคุณสมบัติต่างๆ เช่น ความเหนียวของข้าว กลิ่นหอมของข้าว และรสชาติที่แตกต่างกันไป อันจะส่งผลให้เกิดกลิ่นและรสชาติในสาโทแตกต่างกัน

3. ระยะเวลาในการหมัก ก็ส่งผลต่อกลิ่นและรสชาติของสาโท

4. การเก็บรักษาหลังการหมัก หากเก็บในภาชนะที่ไม่ดี ก็มีผลทำให้กลิ่นและรสชาติที่ดีของสาโทเสียไปได้

เนื่องจากจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุรามีความสำคัญต่อคุณภาพของไวน์ข้าว จึงมีรายงานการศึกษาจุลินทรีย์ในหัวเชื้อสำหรับผลิตไวน์ข้าวจากประเทศต่างๆ ดังนี้

Lee และ Fujio (1999) ได้รายงานว่า สามารถแยกยีสต์และราจาก Banh men ซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิต ruou nep ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของประเทศเวียดนาม และทำการจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี พบว่าราที่แยกได้เป็น *Rhizopus oryzae*,

Mucor indicus, *Mucor circinilloides* และ *Amylomyces rouxii* ส่วนยีสต์ที่แยกได้เป็น *Saccharomyces cerevisiae, Hyphopichia burtonii, Saccharomycopsis fibuligera, Pichia anomala* และ *Candida* sp.

Sujiya (2004)ได้รายงาน เบรม ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของประเทศอินโดนีเซีย สามารถแยกยีสต์โดยใช้วิธีทางอณูชีววิทยาถึง 4 ชนิด คือ *Saccharomyces cerevisiae , Candida glabrata , Pichia anomala* และ *Issatchenkia orientalis* ซึ่ง *Saccharomyces cerevisiae* karyotype 3 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลในการสร้างเอทานอล และสร้างกรดซักซินิก มากกว่า *Saccharomyces cerevisiae* karyotype อื่นๆ

Tsuyoshi และคณะ(2004)ได้รายงานว่า มาร์ชาซึ่งเป็นไวน์ข้าวจากประเทศอินเดีย โดยทั่วไปพบว่ามีmicroflora ทั้งราและยีสต์ ได้แก่ *Mucor circinelloides*, *Rhizopus chinensis*, *Saccharomycopsis fibuligella* และ *Pichia anomala* แต่ มาร์ชาในแคว้นสิกขิม สามารถแยกชนิดของยีสต์เพิ่มขึ้นโดยใช้วิธีทางอณูชีวิทยา สัณฐานวิทยา ชีววิทยา พบยีสต์ถึง 6 ชนิดคือ *Saccharomyces bayanus*, *Candida glabata*, *Pichia anomala*, *Saccharomycopsis fibuligella, Saccharomycopsis capsularis, Pichia burtonii* ซึ่งบางสายพันธุ์มีความสามารถในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและบางสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้น้ำตาลในการสร้างเอทานอล

สำหรับในประเทศไทย ได้มีการศึกษาจุลินทรีย์ในลูกแป้งและสาโทดังนี้

มนตรี เชาว์สังเกต (2521) รายงานว่า สามารถแยกราและยีสต์จากตัวอย่างข้าวหมาก ลูกแป้งสุราข้าวหมาก น้ำขาว อุ ลูกแป้งสุรา และลูกแป้งอุ 76 ตัวอย่าง ได้ *Rhizopus* sp. 59 ไอโซเลต , *Amylomyces* sp. 28 ไอโซเลต, *Mucor* sp. 61 ไอโซเลต *Saccharomyces* sp. 79 ไอโซเลต และยีสต์ที่มีสายใย(Filamentous yeast) 55 ไอโซเลต โดยถ้าใช้ *Amylomyces* sp. MM-136 กับ *Saccharomyces cerevisiae* MS50 ในการหมักสาโทจะทำให้สาโทที่ได้มีปริมาณเอทานอลสูง มีปริมาณกรดต่ำ และใช้เวลาในการหมักน้อยกว่าการใช้ลูกแป้งสุราหมักสาโท

สมพร สินธารา(2544) รายงานว่า จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง และ ลูกแป้งสุรา 19 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ 43 ไอโซเลต รา 91 ไอโซเลตจากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก และสามารถแยกยีสต์ 49 ไอโซเลต รา 35 ไอโซเลตจากตัวอย่างลูกแป้งสุรา พบว่ายีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *Saccharomycopsis fibuligera* ราที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *Rhizopus* sp. และ *Amylomyces* sp. และยังพบอีกว่ายีสต์และราดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์เกือบทุกไอโซเลตหมักเอทิลแอลกอฮอล์จากกลูโคสได้ในปริมาณต่างๆกัน

จะเห็นได้ว่า ความหลากหลายของสายพันธุ์ของยีสต์และรามีความสำคัญต่อความสามารถในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ความสามารถในการใช้น้ำตาลในการสร้างเอทานอล

และกลิ่นรสของไวน์ข้าวอีกด้วย ทำให้การศึกษาและจัดจำแนกยีสต์และรามีความสำคัญ ในอดีตการจำแนกยีสต์นิยมใช้วิธีวิเคราะห์ทางชีวเคมี ในขณะที่การจำแนกรานิยมจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยา ปัจจุบันการศึกษาในด้านอณูชีววิทยามีการพัฒนามากขึ้นทำให้สามารถใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งยีสต์และราได้ โดยในประเทศไทยยังไม่มีการศึกษาในแง่ของความหลากหลายทางชีวภาพของจุลินทรีย์ในลูกแป้งสุราเลย

ในกระบวนการหมักโดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ปฏิบัติกันมาแต่เดิมนั้น มักจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพที่ไม่แน่นอน เช่น มีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ต่ำหรือสูงเกินไป หรืออาจมีกลิ่นรสที่ไม่ชวนดื่ม ตลอดจนปัญหาอื่นๆอีกมาก ซึ่งส่วนหนึ่งของปัญหาเกิดขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแป้งสุรา ทำให้ไม่สามารถควบคุมคุณภาพตลอดจนปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักหรือขยายกำลังการผลิตให้สูงขึ้นจากเดิมได้ หากเราสามารถศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของชนิดของยีสต์และราในลูกแป้งสุรา และได้มีการทำ culture collection ก็จะเป็นประโยชน์ในการคัดเลือกสายพันธุ์พิเศษ เพื่อการปรับปรุงคุณภาพของสาโทในด้านต่างๆเช่น ให้มีกลิ่นและรสชาติดีขึ้น การทนต่อ pH ที่เป็นกรด การทนต่ออุณหภูมิสูง เป็นต้น ซึ่งจะเป็นแนวทางในการพัฒนาเพื่อการผลิตสาโทในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany.
2. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น BE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
3. ตู้เขี่ยเชื้อ รุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
4. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Thermo Spectronic, USA.
5. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น ของบริษัท Mettler-Toledo, Switzerland.
6. เครื่องควบคุมอุณหภูมิและระเหยแห้งแบบให้ความร้อน (thermo-block) รุ่น MylabTH Thermo-Block SLTDB-120 ของบริษัท SeouLin Bioscience, Korea.
7. เครื่องชั่ง รุ่น AG285 PG2002-S และ PB3002 ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland.
8. เครื่องปั่นผสม (vortex mixer) รุ่น GenieII G-560E ของบริษัท Scientific Industries, USA.
9. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น MLS 3020 ของบริษัท SANYO, Japan.
10. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น 2600 ของบริษัท Denvelle, Germany.
11. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิพร้อมเครื่องเขย่า (waterbath shaker) รุ่น NST 2000 ของบริษัท EYELA, Japan.
12. ไมโครปิเปต (micropipette) รุ่น P10 P20 P100 P200 P1000 และ P5000 ของบริษัท Gilson, France.
13. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.
14. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตท ขนาดความกว้างรู 0.22 ไมโครเมตร Restek,Thailand
15. อุปกรณ์สำหรับถ่ายภาพ
    - Gel Documentation และโปรแกรม Quantity One เวอร์ชั่น 4.4.1 ของบริษัท Bio-Rad, USA.
16. ชุดเครื่องมือทำอะกาโรสเจลอีเลคโทรโฟเรซิส (agarose gel electrophoresis) Mini gel electrophoresis system ของบริษัท Mupid-ex, Japan.

3.2 เคมีภัณฑ์และชุดทดสอบสำเร็จ

1. ทริปโตน (tryptone) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
2. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Difco Laboratories, USA.
3. น้ำตาลกลูโคสของบริษัท Difco Laboratories, USA.
4. อะกาโรสเจล (agarose gel) ของบริษัท Prondisa, .
5. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท E Merck, Germany.
6. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
7. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ของบริษัท LAB-SCAN, Ireland.
8. กรดอะซีติกเข้มข้น (glacial CH_3COOH) ของบริษัท E Merck, Germany.
9. กลีเซอรอล ของบริษัท Carlo ERBA, France.
10. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท E Merck, Germany.
11. Trizma base (tris [hydroxymethyl] aminomethane), ($C_4H_{11}NO_3$) ของบริษัท Sigma, USA.
12. EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid), ($C_{10}H_{14}N_2O_8Na_2 \bullet 2H_2O$) ของบริษัท Sigma, USA.
13. SDS (sodium dodecyl sulfate), ($C_{12}H_{25}OSO_3$) ของบริษัท Nacalai tesque, Japan.
14. CTAB (cetyltrimethylammonium bromide), [($C_{16}H_{32}N(CH_3)_3$)Br] ของบริษัท Bio-basic, Canada.
15. เอนไซม์ตัดจำเพาะทุกชนิดของบริษัท New England Biolab, UK.
16. 1 kb DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, UK.
17. 100 bp DNA ladder ของบริษัท New England Biolabs, UK.
18. Deep Vent polymerase ของบริษัท New England Biolabs, UK.
19. dATP, dCTP, dGTP และ dTTP ของบริษัท New England Biolabs, UK.
20. Ribonuclease A (RNase A) ของบริษัท Sigma, USA.
21. Proteinase K ของบริษัท Sigma, USA.
22. ชุดสกัดดีเอ็นเอจากผลิตภัณฑ์ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส QIAquick PCR purification Kit ของบริษัท Qiagen, Germany.

<u>หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นเกรดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)</u>

3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1 การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง

ทำการรวบรวมตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทยโดยไปเก็บตัวอย่างด้วยตนเองหรือประสานงานกับบุคคลต่างๆในจังหวัดนั้นๆ

เก็บตัวอย่างตั้งแต่เดือนตุลาคม 2547 - มิถุนายน 2548โดยเก็บลูกแป้งสุราแหล่งละ 10 ลูก และเก็บรักษาในถุงพลาสติกซิบล็อค โดยแยกไม่ให้ปะปนกัน หลังจากนั้นนำลูกแป้งสุรามากำหนดรหัส และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปทำการแยกเชื้อต่อไป

3.2.2 การผลิตสาโทในห้องปฏิบัติการ

เพื่อการคัดเลือกลูกแป้งสุราที่สามารถนำไปผลิตสาโทที่มีคุณภาพดี จึงได้ทำการผลิตสาโทจากแหล่งตัวอย่างลูกแป้งสุรา 41 แหล่ง ทำได้โดยบดตัวอย่างลูกแป้งสุรา 2 กรัม ใส่ในข้าวเหนียวนึ่ง 100 กรัม ที่บรรจุขวดขนาด 500 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน โดยเติมน้ำในช่วงการหมักวันที่ 3 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างน้ำหมักในทุกวันที่ 3 และ 10 เพื่อเปรียบเทียบหาความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง(ข้าวเหนียวนึ่ง)ให้กลายเป็นของเหลว(น้ำต้อย)ปริมาณกลูโคส(มิลลิกรัมต่อลิตร) และร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท

3.2.3 การแยกยีสต์และราจากตัวอย่างลูกแป้งสุรา

เพื่อให้สามารถแยกยีสต์และราได้ทุกชนิดทั้งที่มีจำนวนมากและน้อยในลูกแป้งให้ได้ทั้งหมด จึงต้องทำการแยกโดยใช้วิธี enrichment technique ทำได้โดยบดตัวอย่างลูกแป้งสุรา 2 กรัม ใส่ในข้าวเหนียวนึ่ง 10 0กรัม ที่บรรจุขวดขนาด 50 0มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน โดยเติมน้ำในช่วงการหมักวันที่ 3 ปริมาตร 3 00มิลลิลิตร เก็บตัวอย่างน้ำหมักในทุกวันที่0 , 3, 5, 7และ 9 ทำการคัดแยกราและยีสต์โดยเจือจางในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ ใส่ในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร เจือจางในระดับต่างๆ หยดสารละลายที่ได้ปริมาณ0.1 มิลลิลิตร และเกลี่ยเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM (สำหรับเลี้ยงยีสต์)L-lysine medium (สำหรับคัดแยกเชื้อ *Saccharomyces* และ non-*Saccharomyces* โดย *Saccharomyces* ไม่สามารถเจริญบน L-lysine medium)และ Rose bengal agar (สำหรับเลี้ยงรา)เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-1 วัน แยกจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วเก็บไว้ศึกษาต่อไป โดยยีสต์จะเก็บใน YM agarผิวหน้าเอียงในหลอดทดสอบ ที่ 4 องศาเซลเซียส และเชื้อราจะเก็บในหลอดอาหาร PDA ที่ผิวหน้าเอียง ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2.4 การจำแนกชนิดยีสต์และราที่อยู่ในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคอณูชีววิทยา

3.2.4 1.การจำแนกยีสต์

เนื่องจากยีสต์ที่แยกได้มีจำนวนมาก การจำแนกโดยวิธีทางชีวเคมี ต้องใช้แรงงาน และสิ้นเปลืองเวลาสูง อีกทั้งชุดตรวจทางชีวเคมี(Biochemical test kit)มีราคาสูงมาก คณะผู้วิจัยจึงได้เปลี่ยนแผนการดำเนินการจำแนกยีสต์ จากเดิมที่จะใช้วิธีการตรวจทางชีวเคมีกับทุกๆไอโซเลตของยีสต์ มาเป็นวิธีทางอณูชีววิทยา โดยใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR- RFLP) เพื่อช่วยจัดกลุ่มของยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งสุราก่อน จากนั้นจะทำการเลือกตัวแทนของยีสต์จากแต่ละกลุ่มเพื่อไปทดสอบทางชีวเคมี และนำไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ไรโบโซมอลดีเอนเอ ต่อไป

เทคนิค PCR- RFLP เป็นเทคนิคหนึ่งทางอณูชีววิทยา เพื่อศึกษารูปแบบของชิ้นส่วนดีเอนเอที่เป็นผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส(PCR product) เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ (Restriction enzyme) โดยในงานวิจัยนี้จะใช้เทคนิค PCR- RFLP เพื่อการจัดกลุ่มของยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่แยกได้โดยมีขั้นตอนการทำดังนี้

สกัดดีเอนเอของยีสต์โดยวิธีเลี้ยงยีสต์ในอาหารเหลว YEPD ที่30 °C 2-3 วัน ปั่นแยกเซลล์ที่10,000 รอบต่อนาที นาน 5นาที แล้วล้างเซลล์โดยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 500 ไมโครลิตร ปั่นแยกเซลล์ที่10,000 รอบต่อนาที นาน 5นาที อีกครั้ง นำเซลล์ที่ได้ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติม 200 ไมโครลิตร ของสารละลาย A (สารละลายA ประกอบด้วย 2 % Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8.0 และ 1 mM EDTA) 200 ไมโครลิตรของ Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) และ 0.3 กรัมของเม็ดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.52-0.45 ไมครอน หลังจากนั้น เขย่าผสมโดยใช้เครื่องเขย่าผสมเป็นเวลา 3 นาที 30 วินาที แล้วจึงเติม 200 ไมโครลิตร TE บัฟเฟอร์ ปั่น14 ,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) ปั่น14 ,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาเติม 1 มิลลิลิตร ของเอทานอลบริสุทธิ์ ปั่นแยกตะกอนดีเอนเอที่14 ,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอนเอที่ได้ มาเติม 4 00 ไมโครลิตร TE บัฟเฟอร์ pH8.0 และRNase A 30 ไมโครกรัม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติม แอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นเติม 1 มิลลิลิตร ของเอทานอลบริสุทธิ์ และไกลโคเจน ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่2- 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงปั่นแยกตะกอนดีเอนเอที่14 ,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอนเอที่ได้มาล้างด้วย70 %เอทานอล ทำให้ตะกอนดีเอนเอแห้ง แล้วจึงละลายตะกอนด้วย 50 ไมโครลิตร ของ TE บัฟเฟอร์

เนื่องจากยีสต์ที่แยกได้มีจำนวนมากถึง 681 ไอโซเลต จึงต้องทำการแยกชนิดของยีสต์ที่แยกได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ L-lysine เพื่อแยกความแตกต่างระหว่างยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* และกลุ่ม non-*Saccharomyces* ซึ่งยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* จะไม่สามารถเจริญบนอาหาร

เลี้ยงเชื้อ L-lysine เนื่องจากยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* ไม่สามารถใช้ L-lysine เป็นแหล่งคาร์บอน แล้วจึงทำการสกัดดีเอนเอของยีสต์ในกลุ่ม non-*Saccharomyces* ทุกตัวซึ่งมีทั้งหมด 150 ไอโซเลต และนำยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* มารวมกัน 5 ไอโซเลตต่อการสกัดดีเอนเอ 1 ครั้ง

นำดีเอนเอมาเพิ่มจำนวนของบริเวณ Internal transcribed spacer (ITS) ของไรโบโซมอลดีเอนเอ ซึ่งบริเวณ ITS เป็นบริเวณที่อยู่ระหว่าง18 S rDNA และ26S rDNA บริเวณ ITS จะรวมถึง 5.8S rDNA ด้วยดังรูปที่3.1 บริเวณ ITS เป็นบริเวณที่นิยมใช้ในการจำแนกยีสต์และรา(Heras-Vazquez และคณะ, 2003 ; Granchi และคณะ,1999 ; Sabate และคณะ,2002 ; Cappello และคณะ,2004) ในเทคนิคลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้ใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 ซึ่งเป็น universal primers ของบริเวณ ITS โดยไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 มีลำดับเบสดังนี้5 '-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' และ 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' ตามลำดับ โดยใช้สภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 15นาที ; 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 56 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, 35 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ -20 องศาเซลเซียส

รูปที่ 3.1 แสดงบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของ Saccharomyces cerevisiae

ที่มา: homepages.uni-tuebingen.de

นำผลิตภัณฑ์ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาตัดด้วย *Hin*FI, *Hha*I และ *Hae*III แล้วจึงจัดกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ตามรูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ โดยใช้โปรแกรม Quantity one จากเครื่อง Gel doc (Bio-rad,USA) ในการวิเคราะห์ผล รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ทำการสุ่มตัวอย่างของยีสต์จากแต่ละกลุ่มมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ และทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี โดย

ก. การใช้แหล่งอาหารคาร์บอน ทำได้โดยการลงเชื้อ 5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร ลงในอาหาร ยีสต์ไนโตรเจนเบสและเติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน 10 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส ซอร์โบส กลูโคซามีน ไรโบส ซูโครส กลีเซอรอล มอลโทส เมทานอล และแรมโนส

ข. การใช้แหล่งอาหารไนโตรเจน ทำได้โดยการลงเชื้อ 5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร ลงในอาหาร ยีสต์คาร์บอนเบสและเติมแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ กลูโคซามีน

ค. การหมักแหล่งอาหารคาร์บอน ทำได้โดยการลงเชื้อ 5 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร 500 ไมโครลิตร ลงในอาหาร ยีสต์ไนโตรเจนเบสที่มีหลอดดักก๊าซ(Durham's tube)และเติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส มอลโทส และซูโครส

ง. การสร้างสปอร์ ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 3 ชนิด คืออาหารเลี้ยงเชื้อแข็งอะซิเตต อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งมอลต์เอกซ์แทรกซ์อะการ์ และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งวีแปด บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

ทำการยืนยันผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์กลุ่มที่ 4 ที่ได้จากการวิเคราะห์ผล รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ โดยนำดีเอนเอมาเพิ่มจำนวนของบริเวณ D1-D2 ของ 26S rDNA ในเทคนิคลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้ใช้ไพรเมอร์ NL1 และ NL4 ซึ่งเป็น universal primers ของบริเวณ D1-D2 โดยไพรเมอร์ NL1 และ NL4 มีลำดับเบสดังนี้5 '- GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG -3' และ 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG -3' ตามลำดับ โดยใช้สภาวะของปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสดังนี้ 94 องศาเซลเซียส 15นาที ; 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 1 นาที, 35 รอบ; 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เก็บผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสที่ -20 องศาเซลเซียส นำผลิตภัณฑ์ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ D1-D2 ของ 26S rDNA

3.2.4.2 การจำแนกราโดยใช้สัณฐานวิทยา อ้างอิงตาม Introduction to food and airborne fungi (Samson และคณะ, 2002; de Hoog และคณะ, 2000) ทำการศึกษาสัณฐานวิทยาทั้งภายใต้กล้องและดูด้วยตาเปล่า โดยศึกษา ขนาดและลักษณะของสปอร์ ขนาดก้านสปอร์ การมีไรซอยด์ การมีคลามัยโดสปอร์ ขนาดของคอลาเมลลา ขนาดของสปอร์แรงเจียม ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) และ อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt extract agar (MEA)และทำการยืนยันโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาเข้ามาร่วมด้วย โดยมีขั้นตอนการสกัดดีเอนเอของราดังนี้

ทำการเลี้ยงราบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 2-3 วัน ใช้ คอร์กบอร์เรอร์ เบอร์ 8 เจาะอาหารเลี้ยงเชื้อบริเวณที่เชื้อเจริญ นำสายใยที่ได้ใส่ในหลอดไมโครฟิวจ์ขนาด 1.5มิลลิลิตร เติม 600 ไมโครลิตร ของสารละลาย Lysis buffer (สารละลาย Lysis buffer ประกอบด้วย2 % CTAB,1.4 M NaCl, 100 mM Tris pH 8.0 และ 25 mM EDTA) และ10 ไมโครลิตรของ Proteinase K (10mg/ml) บ่มที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปั่น 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา1 5 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ เติม Phenol/Chloroform/Isoamyl alcohol (25/24/1) 1 เท่าของชั้นน้ำ ปั่น14 ,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาสกัดด้วย Phenol/Chloroform/ Isoamyl alcohol (25/24/1) อีกครั้ง ปั่น14 ,000 รอบต่อนาที เป็น

เวลา 5 นาที ดูดเก็บชั้นน้ำ นำชั้นน้ำมาเติม 1 มิลลิลิตร ของ Isopropanol บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ปั่นแยกตะกอนดีเอนเอที่14 ,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนดีเอนเอที่ได้ มาเติม 400 ไมโครลิตร TE บัฟเฟอร์ pH8.0 และ RNase A 30 ไมโครกรัม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติม แอมโมเนียมอะซิเตต ความเข้มข้น 4 โมลาร์ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร เติม 1 มิลลิลิตร ของเอทานอลบริสุทธิ์ และไกลโคเจน ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 3 ไมโครลิตร บ่มที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงปั่นแยกตะกอนดีเอนเอที่14 ,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอนดีเอนเอที่ได้มาล้างด้วย 70%เอทานอล ทำให้ตะกอนดีเอนเอแห้ง แล้วจึงละลายตะกอนด้วย 50 ไมโครลิตร ของ TE บัฟเฟอร์

หลังจากนั้นจึงนำดีเอนเอมาเพิ่มจำนวนของบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอนเอดังข้อ 4.1.2 นำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสมาวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ

3.2.5 การวิเคราะห์ผลทางอณูชีววิทยา

นำรูปอะการ์โรสเจลที่ได้มาวิเคราะห์ความยาวเบสโดยใช้โปรแกรม Quantity One (Biorad,USA)

นำผลการวิเคราะห์ลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอเปิดในโปรแกรม Bioedit มาเปรียบเทียบกับลำดับเบสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของยีสต์และราสปีชีส์ต่างๆ จากฐานข้อมูลใน Genbank แล้วจึงนำลำดับเบสดังกล่าวมาทำต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม Phylip และดูต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้โปรแกรม Treeview

3.2.6 การศึกษาแอกทิวิตีของแอลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสในราที่แยกได้

เพื่อคัดเลือกราที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี โดยทำการเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยแป้งโดยวิธีต่างๆกัน 3 วิธี ดังนี้

3.2.6.1 การทดสอบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลว (Liquefaction)ของราบริสุทธิ์ที่แยกได้ ทำได้โดยนำราบริสุทธิ์ที่แยกได้ 3 คอร์กบอร์เรอร์ ใส่ในข้าวเหนียวนึ่ง 100 กรัม ที่บรรจุขวดขนาด 500 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เพื่อเปรียบเทียบหาความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง(ข้าวเหนียวนึ่ง)ให้กลายเป็นของเหลว(น้ำต้อย)

3.2.6.2 การศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Starch agar) โดยทำการถ่ายรา 1 คอร์กบอร์เรอร์ ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น

3.2.6.3 การศึกษาแอกทิวิตีของแอลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสในราที่แยกได้ โดยเลี้ยงเชื้อราที่แยกได้ในอาหารเหลว Starch medium ซึ่งประกอบด้วย 3% Soluble starch, ยีสต์เอ็กแทรกซ์ 3 กรัม เปปโทน 3 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 5 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร บ่มที่30 °C เป็นเวลา 3วัน

ก. การศึกษาแอกทิวิตีของแอลฟาอะมัยเลสทำได้โดย นำน้ำเลี้ยงเชื้อ 0.5 มิลลิลิตรมาเติมลงใน reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย 0.5 มิลลิลิตรของ 1 % soluble starch ใน 0.25 M sodium acetate buffer pH 5.0 บ่มที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid(DNSA) (Miller, 1959) โดย 1 unit ของ **α**-amylase activity เทียบเท่ากับการปลดปล่อย 1 ไมโครโมล ของน้ำตาลรีดิวซ์ ในเวลา 1 นาที

ข. การศึกษาแอกทิวิตีของกลูโคอะมัยเลส ทำได้โดย นำน้ำเลี้ยงเชื้อมาเติมลงใน reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย 1% (w/v) soluble starch ซึ่งละลายใน 0.1 M citrate phosphate buffer, pH 5.0 บ่มที่ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หาปริมาณกลูโคสโดยวิธี peroxidase/glucose oxidase assay (Cereia และคณะ, 2000) โดย 1 unit ของ glucoamylase activity เทียบเท่ากับการปลดปล่อย 1 ไมโครโมล ของ กลูโคส ในเวลา 1 นาที

3.2.7 **การหาปริมาณเอทานอล** Gas Chromatography(GC)

การศึกษาความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลจากยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces sensu stricto* ที่แยกได้จากวันที่ 9 ของการหมัก เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอล และสามารถทนเอทานอลได้ดี ทำได้โดย ลงเชื้อ *M. hiemalis* N6/0/9 ลงในข้าวเหนียวนึ่ง 200 กรัม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน เติมน้ำปลอดเชื้อ 400 มิลลิลิตร แบ่งน้ำหมักที่ได้ ลงในขวดปลอดเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร แล้วจึงลงเชื้อยีสต์ที่แยกได้ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำน้ำหมักดังกล่าวมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้ ก๊าซโครมาโตกราฟี(GC) รุ่น 3800 Varian ภายใต้สภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	:	แคปพิลลารี คอลัมน์(capillary column) รุ่น CP-WAX 52CB เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 30 ม.
อุณหภูมิของ injector	:	250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ column	:	40 องศาเซลเซียส (4นาที) เพิ่มอุณหภูมิให้ เท่ากับ 130 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่ม อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิของ detector	:	250 องศาเซลเซียส (ใช้ detector ชนิด FID)

ก๊าซตัวพา(carrier gas) : ก๊าซไนโตรเจน (อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที)

ปริมาณตัวอย่าง : 1 ไมโครลิตร

คำนวณหาปริมาณเอทานอล (หน่วยเป็นร้อยละของเอทานอล) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล

ทำการเก็บสายพันธุ์ของยีสต์และราตัวแทนของแต่ละกลุ่ม และยีสต์และราที่มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลและมีความสามารถในการย่อยแป้งตามลำดับ ไว้ที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

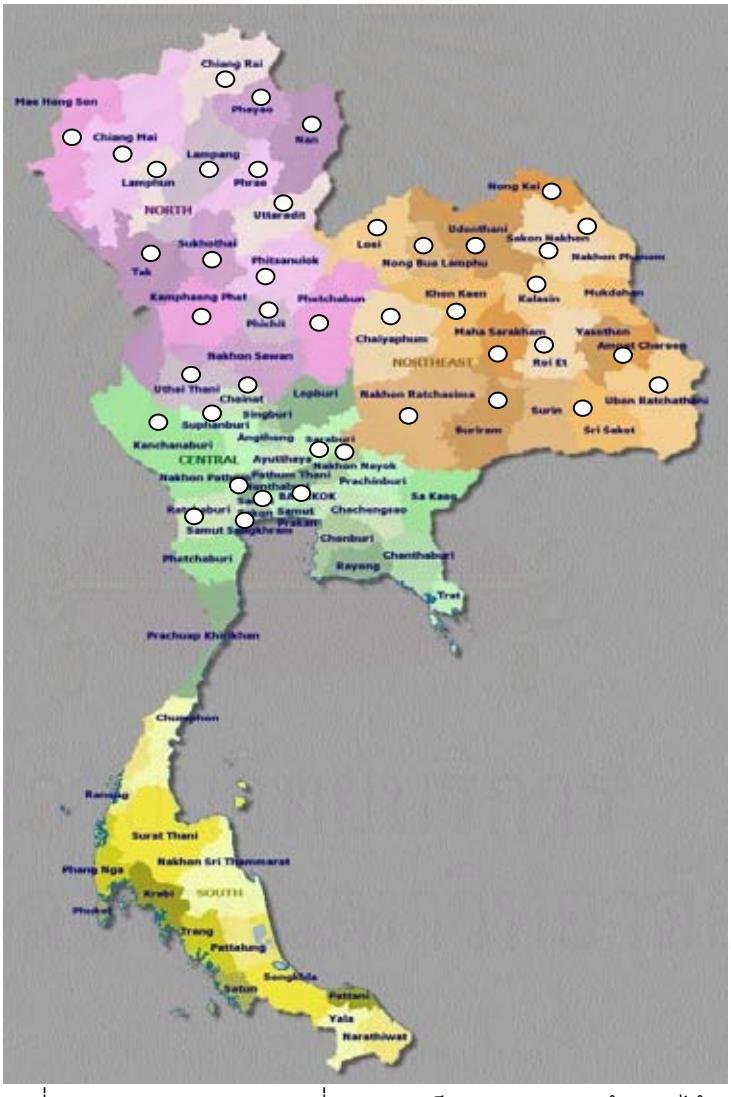
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่4

ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง

สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทยได้ทั้งหมด 114 ตัวอย่าง จาก 42 จังหวัด โดยตำแหน่งจังหวัดของตัวอย่างลูกแป้งสุราได้แสดงไว้ในรูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงจังหวัดต่างๆที่สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งสุราได้

ตารางที่ 4.1 จำนวนแหล่งที่มาของตัวอย่างลูกแป้งสุราจากจังหวัดต่างๆ

จังหวัด	จำนวนแหล่งที่มาของตัวอย่างลูกแป้งสุรา
น่าน	41
แพร่	6
ลำปาง	3
พะเยา	5
เชียงใหม่	3
แม่ฮ่องสอน	2
ลำพูน	2
เชียงราย	5
ชัยภูมิ	2
ศรีษะเกศ	1
สุรินทร์	1
กาฬสินธุ์	1
บุรีรัมภ์	1
นครราชสีมา	1
สกลนคร	1
ร้อยเอ็ด	1
อำนาจเจริญ	2
นครพนม	2
หนองบัวลำภู	2
อุบลราชธานี	1
อุดรธานี	1
หนองคาย	3
มหาสารคาม	2
ขอนแก่น	1
เพชรบูรณ์	1
สระบุรี	1
กรุงเทพฯ	3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.1(ต่อ)

จังหวัด	จำนวนแหล่งที่มาของตัวอย่างลูกแป้งสุรา
ชัยนาท	1
อุทัยธานี	1
กำแพงเพชร	1
นครปฐม	1
สุพรรณบุรี	1
นครนายก	1
สุโขทัย	3
พิจิตร	1
ตาก	1
สมุทรสาคร	1
สมุทรสงคราม	3
ราชบุรี	1
กาญจนบุรี	1
พิษณุโลก	1
เลย	1
รวม	114

สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งได้ 114 ตัวอย่าง จาก 42 จังหวัดทั่วประเทศ โดยแบ่งเป็น

1. ภาคเหนือเก็บตัวอย่างลูกแป้งได้ 75 ตัวอย่างจาก 14 จังหวัด ได้แก่ น่าน แพร่ ลำปาง พะเยา เชียงใหม่ แม่ฮ่องสอน ลำพูน เชียงราย พิษณุโลก สุโขทัย พิจิตร ตาก กำแพงเพชร และเพชรบูรณ์
2. ภาคกลางเก็บตัวอย่างลูกแป้งได้ 16 ตัวอย่างจาก 11 จังหวัด ได้แก่ สมุทรสาคร สมุทรสงคราม ราชบุรี กาญจนบุรี นครปฐม สุพรรณบุรี นครนายก ชัยนาท อุทัยธานี สระบุรี และกรุงเทพฯ
3. ภาคตะวันออกเฉียงเหนือเก็บตัวอย่างลูกแป้งได้ 23 ตัวอย่างจาก 17 จังหวัด ได้แก่ ชัยภูมิ ศรีษะเกศ สุรินทร์ กาฬสินธุ์ บุรีรัมภ์ นครราชสีมา สกลนคร ร้อยเอ็ด อำนาจเจริญ นครพนม หนองบัวลำภู อุบลราชธานี อุดรธานี หนองคาย มหาสารคาม ขอนแก่น และเลย

ตัวอย่างลูกแป้งที่เก็บได้จากจังหวัดต่างๆอาจมาจากหลายอำเภอของจังหวัดหนึ่งๆ ดังเช่นแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงรหัสของตัวอย่างลูกแป้งที่เก็บจากจังหวัดต่างๆ

รหัส	แหล่งของตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดน่าน
NN1	ต.ท่าน้าว กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN2	ต.นาน้อย อ.นาน้อย จ.น่าน
NN3	ต.สวก อ.เมือง จ.น่าน
NN4	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN5	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN6	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN7	อ.บ้านหลวง จ.น่าน
NN8	ต.สวด อ.บ้านหลวง จ.น่าน
NN9	ต.นาเหลือง กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN10	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN11	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN12	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN13	ต.น้ำมวบ อ.เวียงสา จ.น่าน
NN14	ต.น้ำเกี๋ยน กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN15	ต.ส้าน อ.เวียงสา จ.น่าน
NN16	ต.น้ำเกี๋ยน กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN17	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN18	ต.น้ำแก่น กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN19	ต.ทรายแก้ว กิ่ง อ.ภูเพียง จ.น่าน
NN20	ต.สวด อ.บ้านหลวง จ.น่าน
NN21	ต.น้ำมวบ อ.เวียงสา จ.น่าน
NN22	ต.ปงสนุก อ.เวียงสา จ.น่าน
NN23	ต.งอบ อ.ทุ่งช้าง จ.น่าน
NN24	ต.พระพุทธบาท อ.เชียงกลาง จ.น่าน
NN25	ต.เปือ อ.เชียงกลาง จ.น่าน

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัส	แหล่งของตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดต่างๆ
NN26	ต.นาชาว อ.เมือง จ.น่าน
NN27	ต.ศิลาแลง อ.ปัว จ.น่าน
NN28	ต.ศิลาแลง อ.ปัว จ.น่าน
NN29	ต.เชียงกลาง อ.เชียงกลาง จ.น่าน
NN30	ต.วงนคร อ.ปัว จ.น่าน
NN31	ต.แสนทอง อ.ท่าวังผา จ.น่าน
NN32	ต.ผาตอ อ.ท่าวังผา จ.น่าน
NN33	ต.สถาป อ.ปัว จ.น่าน
NN34	ต.นาทะนุง อ.นาน้อย จ.น่าน
NN35	ต.นาทะนุง อ.นาน้อย จ.น่าน
NN36	ต.ตังจุม อ.ท่าวังผา จ.น่าน
NN37	ต.จอมพระ อ.ท่าวังผา จ.น่าน
NN38	ต.หมอมเมือง อ.แม่จริม จ.น่าน
NN39	ต.แม่จริม อ.แม่จริม จ.น่าน
NN40	ต.ป่าแลวหลวง อ.สันติสุข จ.น่าน
NN41	ต.ป่าแลวหลวง อ.สันติสุข จ.น่าน
PH1	อ.เมือง จ.แพร่
PH2	อ.เมือง จ.แพร่
PH3	อ.เมือง จ.แพร่
PH4	ต.สวนเขื่อน อ.เมือง จ.แพร่
PH5	ต.สวนเขื่อน อ.เมือง จ.แพร่
PH6	อ.เมือง จ.แพร่
LA1	บ.เสริมงาม อ.เสริมงาม จ.ลำปาง
LA2	บ.ใหม่ อ.วังเหนือง จ.ลำปาง
LA3	บ.พระบาท ต.พระบาท อ.เมือง จ.ลำปาง

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัส	แหล่งของตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดต่างๆ
PY1	ต.น้ำแวน อ.เชียงคำ จ.พะเยา
PY2	ต.ดอนน้ำชุม อ.ดอกคำใต้ จ.พะเยา
PY3	ต.ฝายกวาง อ.เชียงคำ จ.พะเยา
PY4	บ.หนองร่มเย็น ต.ร่มเย็น อ.เชียงคำ จ.พะเยา
PY5	บ.ร่องคือ ต.แม่ปืม อ.เมือง จ.พะเยา
CM1	อ.เมือง จ.เชียงใหม่
CM2	บ.สันทรายหลวง อ.สันทราย จ.เชียงใหม่
MH1	ต.เวียงใต้ อ.ปาย จ.แม่ฮ่องสอน
MH2	อ.สบเมย จ.แม่ฮ่องสอน
LP1	ต.เหมืองจี้ อ.เมือง จ.ลำพูน
LP2	ต.วังผาง กิ่ง อ.เวียงหนองร้อง จ.ลำพูน
CR1	ต.เจริญเมือง อ.พาน จ.เชียงราย
CR2	ต.ป่าอ้อดอนชัย อ.เมือง จ.เชียงราย
CR3	ต.แม่อ้อ อ.พาน จ.เชียงราย
CR4	ต.เวียงห้าว อ.พาน จ.เชียงราย
CR5	ต.เหมืองจี้ อ.พาน จ.เชียงราย
CP1	อ.เมือง จ.ชัยภูมิ
CP2	อ.เมือง จ.ชัยภูมิ
SK1	อ.ขุนหาญ จ.ศรีษะเกศ
SR1	อ.เมือง จ.สุรินทร์
KS1	อ.หนองกุงศรี จ.กาฬสินธุ์
BR1	อ.เมือง จ.บุรีรัมภ์
NR1	อ.โนนสูง จ.นครราชสีมา
SN1	ต.เชียงเครือ อ.เมือง จ.สกลนคร
RA1	อ.เมือง จ.ร้อยเอ็ด

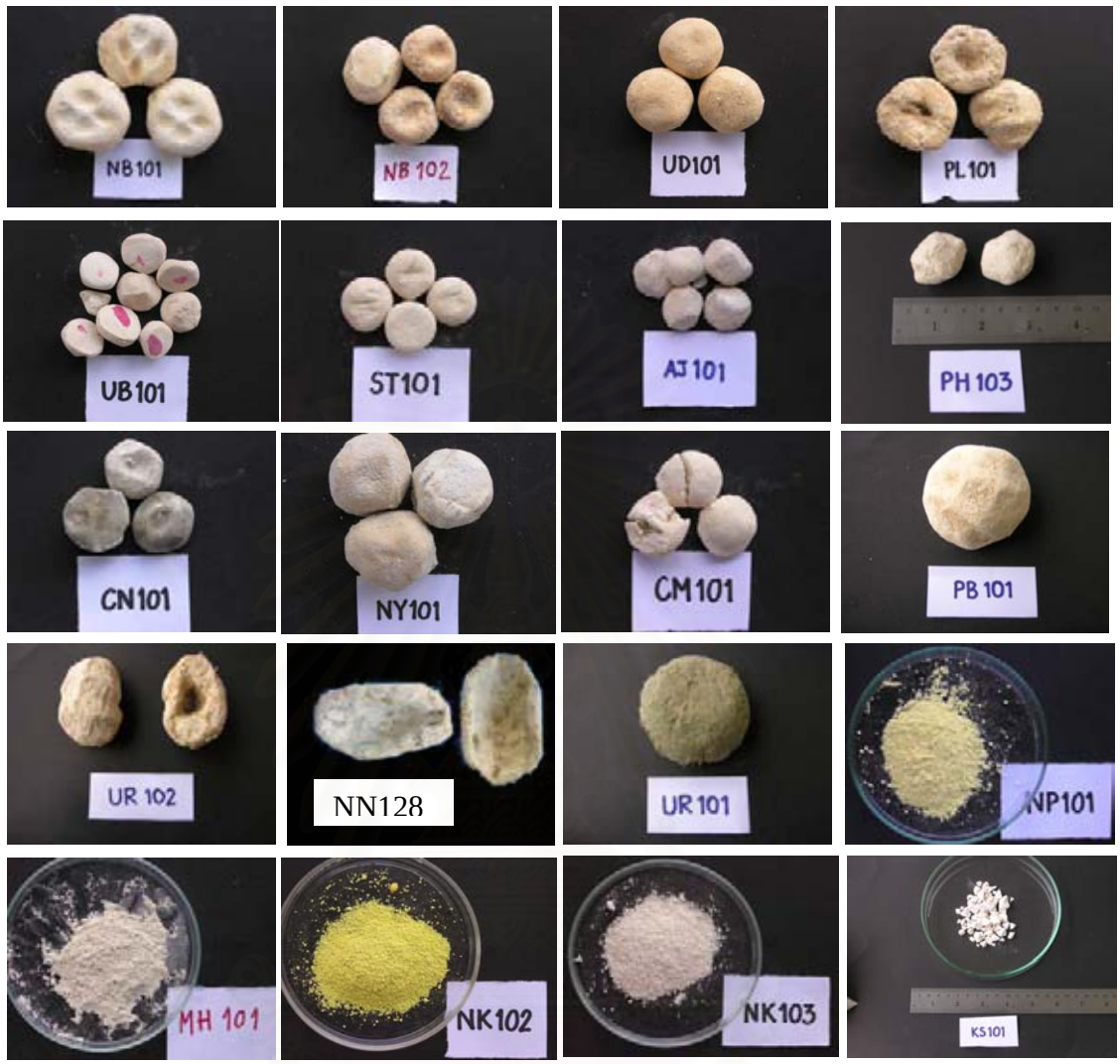
ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัส	แหล่งของตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดต่างๆ
AJ1	ต.บุ่ง อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ
AJ2	ต.บุ่ง อ.เมือง จ.อำนาจเจริญ
NP1	ต.โพงพาง อ.เรณูนคร จ.นครพนม
NP2	ต.โพงแพง อ.ธาตุพนม จ.นครพนม
NB1	ต.นาคำไฮ อ.เมือง จ.หนองบัวลำภู
NB2	ต.นาคำไฮ อ.เมือง จ.หนองบัวลำภู
UB1	อ.เมือง จ.อุบลราชธานี
UD1	ต.หนองนาคง อ.เมือง จ.อุดรธานี
NK1	ต.สร้างนาง อ.โพนพิสัย จ.หนองคาย
NK2	ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย
NK3	ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย
MK1	ต.กำพี้ อ.บรบือ จ.มหาสารคาม
MK2	ต.กำพี้ อ.บรบือ จ.มหาสารคาม
KO1	อ.กระนวน จ.ขอนแก่น
PB1	อ.เมือง จ.เพชรบูรณ์
SB1	อ.เมือง จ.สระบุรี
BK1	เขต พระโขนง กรุงเทพฯ
BK2	เขต หลักสี่ กรุงเทพฯ
BK3	เขต มีนบุรี กรุงเทพฯ
CN1	ต.หนองมะโมง อ.วัดสิงห์ จ.ชัยนาท
UT1	ต.ดงขวาง อ.หนองขาหย่าง จ.อุทัยธานี
KP1	อ.นครชุม จ.กำแพงเพชร
NT1	ต.บางภาษี อ.บางเลน จ.นครปฐม
SP1	ต.ดอนคา อ.อู่ทอง จ.สุพรรณบุรี
NY1	ต.ศรีสะแก้ว อ.บ้านนา จ.นครนายก

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัส	แหล่งของตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดต่างๆ
ST1	ต.บ้านกล้วย อ.เมือง จ.สุโขทัย
ST2	ต.บ้านตึก อ.ศรีสัชนาลัย จ.สุโขทัย
ST3	ต.ไกรกลาง อ.กงไกรกาศ จ.สุโขทัย
PJ1	ต.โรงช้าง อ.เมือง จ.พิจิตร
TK1	ต.ตาดออก อ.บ้านตาก จ.ตาก
SS1	อ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร
SM1	อ.แม่กลอง จ.สมุทรสงคราม
SM2	อ.แม่กลอง จ.สมุทรสงคราม
SM3	อ.อัมพวา จ.สมุทรสงคราม
RB1	อ.ดำเนินสะดวก จ.ราชบุรี
KJ1	ต.ท่าม่วง อ.ท่าม่วง จ.กาญจนบุรี
PL1	ต.หอกลอง อ.พรหมพิราม จ.พิษณุโลก
LO1	อ.ท่าลี่ จ.เลย

สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งได้ 114 ตัวอย่าง จาก 42 จังหวัด โดยสามารถเก็บตัวอย่างได้จากจังหวัดน่าน ถึง 41 ตัวอย่าง เนื่องจาก จังหวัดน่านได้มีการสนับสนุนให้มีการผลิตสาโทเป็นหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์(OTOP) โดยถ้าแบ่งตัวอย่างจากแหล่งที่มา พบว่า มีตัวอย่างลูกแป้งจากภาคเหนือ 75 ตัวอย่าง ตัวอย่างลูกแป้งจากภาคตะวันออกเฉียงเหนือ 24 ตัวอย่าง และตัวอย่างลูกแป้งจากภาคกลาง 16 ตัวอย่าง จะเห็นได้ว่า ตัวอย่างลูกแป้งส่วนใหญ่เป็นตัวอย่างลูกแป้งจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เนื่องจากชาวบ้านภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือนิยมทำสาโทกันมาก จึงทำให้สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งจากภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และไม่สามารถเก็บตัวอย่างจากภาคใต้ได้ เนื่องจากสาโทไม่เป็นที่นิยมทำกันในภาคใต้ นอกจากนี้ภาคใต้ยังมีสภาพภูมิอากาศไม่เหมาะสมกับการหมักสาโทคือ มีความชื้นและอุณหภูมิสูงเกินไป



รูปที่ 4.2 แสดงตัวอย่างของลักษณะลูกแป้งที่สามารถเก็บได้จากจังหวัดต่างๆ

ตัวอย่างลูกแป้งส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายกันคือมีลักษณะกลมแบนสีขาวนวล ขนาดประมาณ -1.94 x 3-5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แต่มีตัวอย่างลูกแป้งบางตัวอย่างที่มีลักษณะต่างออกไป ได้แก่ ตัวอย่างลูกแป้งรหัส NN128 และ UR102 ที่มีลักษณะรีคล้ายเรือ ขนาดกว้าง 6 ซม.ยาว 10 ซม. มีสีขาวคล้ำเล็กน้อย ตัวอย่างลูกแป้งรหัส UR101 มีลักษณะกลมแบนสีเขียว ขนาดประมาณ 3 x 5 ลูกบาศก์เซนติเมตร ตัวอย่างลูกแป้งรหัส MH101 NP101 NK102 และ NK103 ที่มีลักษณะเป็นผง โดยที่ตัวอย่างลูกแป้งรหัส MH101 และ NK103 มีสีขาว ส่วนตัวอย่างลูกแป้งรหัส NP101 และ NK102 มีสีเหลืองซึ่งอาจเป็นเพราะสมุนไพรที่เติมลงไปเป็นส่วนประกอบของลูกแป้ง

4.2 การคัดเลือกลูกแป้งสุราที่ดี

เนื่องจากมีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงและรักษาคุณภาพของสาโทให้ดีขึ้นหรือรักษาคุณภาพที่ดีอยู่ให้คงที่จึงจำเป็นต้องคัดเลือกและแยกเชื้อจากลูกแป้งสุราที่มีคุณภาพดีก่อน เพื่อนำไปศึกษาความหลากหลายของราและยีสต์เฉพาะในลูกแป้งที่คัดเลือกได้ และทำการอนุรักษ์ และเพื่อการปรับปรุงสายพันธุ์ต่อไป จึงทำการคัดเลือกลูกแป้งสุราจากลูกแป้งสุราทั้งหมด 114 ตัวอย่าง โดยนำไปผลิตเป็นสาโท และทำการวัดความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง (ข้าวเหนียว)เป็นของเหลว(น้ำต้อย) (Liquifaction) ความเข้มข้นของกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร) ทั้งในน้ำต้อย(ในวันที่ 3 ของการหมักก่อนการผ่าน้ำ)และ สาโท(ในวันที่ 9 ของการหมัก) ปริมาณเอทานอลในสาโท(ในวันที่ 9 ของการหมัก) และการชิมสาโทโดยผู้เชี่ยวชาญ ได้ผลดังแสดงในตารางที่4.3 และรูปที่ 4.3

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.3 การเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (liquefaction) ปริมาณกลูโคส(มิลลิกรัมต่อลิตร)และร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท ที่ผลิตได้จากแหล่งตัวอย่างลูกแป้งทั้งหมดที่เก็บได้จากจังหวัดต่างๆ

รหัสลูกแป้งสุรา	ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (วันที่3)	ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท (วันที่9)
		ในน้ำต้อย (วันที่3)	ในสาโท (วันที่9)	
NN1	+++	428.77	4.08	9.74
NN2	+++	169.78	2.24	9.20
NN3	+++	748.20	5.01	9.05
NN4	+++	273.38	3.37	10.83
NN5	++++	3292.08	6.35	9.11
NN6	**+++++**	**2757.55**	**1.55**	**14.19**
NN7	+++	1602.88	1.67	13.50
NN8	++++	2164.03	4.09	9.49
NN9	+++	1464.03	6.13	7.80
NN10	++++	1484.89	3.65	9.59
NN11	+	1223.02	59.43	2.69
NN12	++++	1553.96	2.07	8.48
NN13	+++	595.68	6.13	7.65
NN14	+	892.50	14.07	5.95
NN15	+++	414.39	4.57	12.78
NN16	++++	1766.91	2.19	9.68
NN17	+++	1412.95	2.50	8.34
NN18	+++	725.18	2.91	9.07
NN19	+++	313.67	5.67	8.41
NN20	++	2089.21	3.45	9.25
NN21	++	1574.10	5.87	10.32

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสลูกแป้งสุรา	ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (วันที่3)	ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท (วันที่9)
		ในน้ำต้อย (วันที่3)	ในสาโท (วันที่9)	
NN22	++	1317.99	3.86	8.15
NN23	++	1732.37	48.66	6.74
NN24	+++	161.15	3.54	9.15
NN25	**++++**	**1309.35**	**3.42**	**8.14**
NN26	+++	3271.94	54.33	6.94
NN27	+++	**1335.25**	**5.27**	**7.90**
NN28	++++	546.76	31.40	10.03
NN29	+++	610.07	1.67	10.21
NN30	++	926.62	3.31	7.62
NN31	++++	1201.88	1.18	8.24
NN32	++	1985.61	2.33	11.59
NN33	+++	246.75	3.11	8.7
NN34	+++	241.72	3.28	8.05
NN35	+++	362.59	2.79	6.81
NN36	+++	2693.52	1.64	10.51
NN37	++++	1297.84	3.08	7.22
NN38	+++	500.72	1.67	9.22
NN39	++	1269.06	1.27	9.51
NN40	++++	351.08	3.05	6.74
NN41	+++	3162.58	4.06	7.71
PB1	+++	2215.98	6.05	7.01
PH1	++	210.38	4.99	8.75
PH2	+++	2224.40	6.88	8.48

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสลูกแป้งสุรา	ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (วันที่3)	ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท (วันที่9)
		ในน้ำต้อย (วันที่3)	ในสาโท (วันที่9)	
PH3	++	687.24	6.28	9.77
PH4	++	19.72	7.05	8.09
PH5	++	488.08	4.76	7.41
PH6	++	255.26	8.25	8.04
KP1	+++	1495.09	17.91	5.13
KP2	+++	2176.72	1742.93	1.60
PL1	+++	1817.67	670.95	2.00
CM1	+++	939.69	794.34	2.66
CM2	+++	950.91	8.28	6.74
PY1	++	1262.27	3.90	6.87
PY2	++	813.46	3.84	8.04
PY3	+++	1065.92	454.42	6.11
PY4	++++	1604.49	6.44	8.90
CR1	++++	992.99	3.29	8.36
CR2	+++	2016.83	0.72	6.60
CR3	+++	1223.00	3.29	8.60
CR4	+++	1523.14	3.04	8.17
CR5	++++	690.04	4.47	9.56
LP1	-	-	25.67	5.77
ST1	++++	229.17	1383.03	2.51
ST2	+++	1537.17	27.45	2.26
ST3	+++	1893.41	20.89	6.44
PJ1	+++	2591.86	1493.57	1.74

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสลูกแป้งสุรา	ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (วันที่3)	ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท (วันที่9)
		ในน้ำต้อย (วันที่3)	ในสาโท (วันที่9)	
TK1	+++	1077.14	7.16	8.07
LA1	**+++**	**1632.54**	**9.08**	**8.49**
LA2	++	426.37	9.08	5.50
LA3	+++	2129.03	19.74	9.34
MH1	++	381.49	10.14	7.97
MH2	++++	974.47	12.26	7.55
UR1	++++	1012.62	17.91	5.11
UR2	+++	1927.06	27.68	1.3
CP1	+++	524.54	1.37	8.82
CP2	+++	86.95	2.69	9.39
SK1	+++	1265.08	13.15	8.31
SR1	++	1556.80	24.38	1.58
KS1	++	1453.01	69.41	8.30
BR1	++	1725.11	21.32	7.91
NR1	++++	2255.26	6.88	8.70
SN1	+++	1144.46	8.39	7.84
RA1	+++	2373.07	1110.54	1.83
NK1	++	305.75	4.24	8.41
AJ1	+++	2378.68	22.41	5.47
AJ2	++	260.87	28.54	2.27
NP1	++	**378.68**	**4.10**	**9.60**
NP2	+++	911.64	2.84	9.55
NB1	++	1211.78	5.67	7.90

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสลูกแป้งสุรา	ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (วันที่3)	ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท (วันที่9)
		ในน้ำต้อย (วันที่3)	ในสาโท (วันที่9)	
NB2	++++	2109.40	17.42	1.85
UB1	++	1138.85	228.79	4.99
UD1	+++	720.90	4.90	6.59
NK3	+++	591.86	5.62	8.41
NK2	**+++**	**1354.84**	**6.30**	**9.02**
MK1	+++	1323.98	1.58	7.26
MK2	++++	1091.16	0.95	9.62
KO1	+++	2100.98	4.04	8.36
LO1	+++	1088.36	8.65	7.81
SB1	++	2168.30	1233.93	1.89
BK1	+++	701.26	27.82	3.14
BK2	+++	1699.86	89.97	5.87
BK3	++	2322.58	1002.57	1.92
NT1	+++	1646.56	1591.25	1.47
SP1	+++	2230.01	24.01	4.30
CN1	++++	2437.59	4.67	7.61
UT1	++	1009.82	4.73	2.40
NY1	+++	1848.53	681.23	4.56
SS1	**++**	**2280.50**	**892.03**	**3.36**
SM1	+++	2084.15	23.87	5.31
SM2	++++	2168.30	27.34	2.30
SM3	+++	1537.17	19.97	2.74
RB1	+++	1424.96	1077.14	1.66

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสลูกแป้งสุรา	ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (วันที่3)	ปริมาณกลูโคส (มิลลิกรัมต่อลิตร)		ร้อยละของแอลกอฮอล์ในสาโท (วันที่9)
		ในน้ำต้อย (วันที่3)	ในสาโท (วันที่9)	
KJ1	++	1315.57	776.35	2.07
AT1	++	1009.82	1.95	7.65

+ → +++++ หมายถึง ปริมาณของของเหลว(น้ำต้อย)ที่ได้ จากน้อยไปมาก

- หมายถึง ไม่มีน้ำต้อยจึงไม่สามารถหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้

ก)

ข)

รูปที่ 4.3 ตัวอย่างการหมักสาโทในการคัดเลือกลูกแป้งที่ดี ก)น้ำต้อย ข)สาโท

จากรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นถึงปริมาณของน้ำต้อยในช่วงการหมักวันที่ 3 ก่อนการผ่าน้ำ(เติมน้ำปริมาณ 2 เท่าของปริมาณข้าวเหนียวนึ่งสุก) ของตัวอย่างลูกแป้ง NN6 ที่มีค่าการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลวได้สูงที่สุด คือ +++++ (รูปที่ 4.3 ก) จะพบว่าข้าวเหนียวนึ่งสุกจะเปลี่ยนสภาพกลายเป็นก้อน

แป้งไม่มีสภาพเป็นเมล็ดข้าว น้ำที่เกิดขึ้น(น้ำต้อย)มีลักษณะสีขาวขุ่น เหนียว และมีกลิ่นข้าว ทำการเก็บตัวอย่างน้ำต้อยไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคส เมื่อทำการหมักจนถึงวันที่ 9 พบว่าสาโทที่ได้มีลักษณะใส มีสีเหลืองอ่อน มีกลิ่นแอลกอฮอล์ มีฟองแก๊สลอยขึ้นมาเป็นระยะและมีก้อนข้าวลอยอยู่บนผิวน้ำหมัก ทำการเก็บตัวอย่างน้ำต้อยไปวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสและเอทานอล

เนื่องจากต้องการคัดเลือกลูกแป้งสุราที่มีจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้สูงในน้ำต้อย และมีกิจกรรมกรรมเอนไซม์ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้สูงในน้ำหมักสาโท รวมทั้งเพื่อให้ได้สาโทที่มีกลิ่นรส ดี จึงได้ทดสอบการดมและชิมจากผู้เชี่ยวชาญ ผลจากตารางที่ 4.3 ประกอบกับผลการดม และชิมสาโทที่ได้ ทำให้สามารถคัดเลือกได้ลูกแป้งสุราจำนวน 7 แหล่งที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ลูกแป้ง NN6 (จากกิ่ง อ .ภูเพียง จ. น่าน) NN25 (จาก อ.เชียงกลาง จ. น่าน) NN27 (จาก อ.ปัว จ. น่าน) LA1(จาก อ.เสริมงาม จ.ลำปาง) SS1(จาก อ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร) NK2(จาก ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย) และ NP1(จากอ.เรณูนคร จ.นครพนม) (ตารางที่ 4.3) เนื่องจากตัวอย่างลูกแป้ง 5 ตัวอย่าง คือ NN6 (จากกิ่ง อ .ภูเพียง จ. น่าน) NN25 (จาก อ.เชียงกลาง จ. น่าน) NN27 (จาก อ.ปัว จ. น่าน) LA1(จาก อ.เสริมงาม จ.ลำปาง) และ NK2(จาก ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย)ให้ค่าการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลวได้สูง (+++ → +++++) (รูปที่4.3) ได้ความเข้มข้นกลูโคสที่สูงในน้ำต้อย (1,309.35 – 2,757.55 มิลลิกรัมต่อลิตร) ซึ่งบ่งบอกว่ามีจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมเอนไซม์ในการเปลี่ยนข้าวเหนียวเป็นน้ำต้อยได้ดี ในขณะที่ได้ความเข้มข้นกลูโคสที่ต่ำ (1.55 – 5.27 มิลลิกรัมต่อลิตร) และปริมาณเอทานอลในสาโทที่สูง (ร้อยละ 7.90 - 14.19)

ส่วนตัวอย่างลูกแป้ง SS1(จากอ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร) และตัวอย่างลูกแป้ง NP1(จากอ.เรณูนคร จ.นครพนม) ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลวและการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ไม่ดีนักแต่ให้สาโทที่มีกลิ่นรสที่ดี จึงคัดเลือกให้ ตัวอย่างลูกแป้ง NP1(จากอ.เรณูนคร จ. นครพนม) เป็นหนึ่งในตัวอย่างลูกแป้งที่ได้รับการคัดเลือก

จากรูปที่ 4.3 แสดงให้เห็นถึงปริมาณของน้ำต้อยในช่วงการหมักวันที่ 3 ก่อนการผ่าน้ำ (เติมน้ำปริมาณ 2 เท่าของปริมาณข้าวเหนียวนึ่งสุก) ของตัวอย่างลูกแป้ง NN6 ที่มีค่าการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลวได้สูงที่สุด คือ +++++ (รูปที่ 4.3 ก) พบว่าข้าวเหนียวนึ่งสุกได้เปลี่ยนสภาพกลายเป็นก้อนแป้งไม่มีสภาพเป็นเมล็ดข้าว เมื่อทำการหมักจนถึงวันที่ 9 พบว่าสาโทมีสีเหลืองอ่อน ใส มีกลิ่นแอลกอฮอล์ มีก้อนแป้งลอยอยู่ด้านบนผิวสาโท

เป็นที่น่าสังเกตว่า ในตัวอย่างลูกแป้งบางตัวอย่าง เมื่อหมักแล้วได้น้ำต้อยที่มีปริมาณกลูโคสสูง แต่มีปริมาณเอทานอลต่ำในสาโทที่ได้ ทั้งนี้อาจเกิดจากในตัวอย่างลูกแป้งมีราและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดี แต่มียีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักให้ได้เอทานอลได้ไม่ดี ดังนั้น

กลูโคสที่มีปริมาณสูงในน้ำต้อยจึงถูกยีสต์นำไปใช้เพื่อการเจริญและเปลี่ยนไปเป็นเมแทบอไลท์อื่นๆ แทน

4.3 การคัดแยกยีสต์และราจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้

จากตัวอย่างลูกแป้ง 7 แหล่งที่คัดเลือกได้ ได้นำมาผลิตสาโทเพื่อแยกยีสต์และรา ในวันที่ 0, 3 ก่อนและหลังการผ่าน้ำ, 5, 7 และ 9 ได้ผลดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.4 ซึ่งแสดงจำนวนไอโซเลตและปริมาณของยีสต์และราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกได้ตามลำดับ

ผลจากตารางที่ 4.4 พบว่าจากตัวอย่างลูกแป้งส่วนใหญ่ได้แก่ NN6 (จากกิ่ง อ .ภูเพียง จ. น่าน), NN25 (จาก อ.เชียงกลาง จ. น่าน), NN27(จาก อ.ปัว จ. น่าน) LA1(อ. เสริมงาม จ.ลำปาง), NP1 (อ. ธาตุพนม จ.นครพนม) สามารถแยกราได้เฉพาะวันที่ 0 ของการหมักโดยมีจำนวน 9 $\times 10^3$, 8 $\times 10^3$, 3 $\times 10^4$, 2 $\times 10^4$ และ 7$\times 10^3$ cfu/g ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างลูกแป้ง NK2 (อ.โพนพิสัย จ. หนองคาย)และ SS1 (อ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร)สามารถแยกราได้ถึงวันที่ 3 ในทั้ง 2 ตัวอย่างลูกแป้ง โดยในตัวอย่างลูกแป้ง NK2 (อ.โพนพิสัย จ.หนองคาย) สามารถทำการแยกราได้ 40 $\times 10^4$ cfu/g ในวันที่ 0 และ 2 $\times 10^5$ และ3 $\times 10^5$ cfu/g ในการหมักวันที่ 3 ก่อนและหลังการผ่าน้ำตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างลูกแป้ง SS1 (อ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร) สามารถทำการแยกราได้ 5 $\times 10^4$ cfu/g ในวันที่ 0 และ 4 $\times 10^4$ และ 4 $\times 10^4$ cfu/g ในการหมักวันที่ 3 ก่อนและหลังการผ่าน้ำตามลำดับ

ในทุกตัวอย่างลูกแป้งสามารถแยกยีสต์ได้จำนวน 3 $\times 10^5$ - 6.1 $\times 10^6$ cfu/g ได้ในวันที่ 0 ของการหมักและสามารถแยกยีสต์ได้ในปริมาณที่มากขึ้นในทุกวันที่ทำการคัดแยกเชื้อจนถึง 4.3 $\times 10^7$-1.75 $\times 10^9$ cfu/ g ในวันที่ 9 ของการหมัก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.4 จำนวนของยีสต์และราจากลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้ โดยทำการแยกเชื้อในวันที่ 0, 3 ก่อนและหลังการผ่านน้ำ, 5, 7 และ 9

รหัสของลูกแป้งสุรา	วันที่ทำการแยกเชื้อ	ยีสต์		รา	
		จำนวนไอโซเลต	จำนวน (CFU/g)	จำนวนไอโซเลต	จำนวน (CFU/g)
NN6 (จากกิ่ง อ .ภูเพียง จ. น่าน)	0	30 (10^4)	0.3 ×10^6	9 (10^3)	9 ×10^3
	3/1	36 (10^5)	3.6 ×10^6	NT(10^3)	NT(10^3)
	3/2	64 (5 ×10^4)	3.2 ×10^6	NT(10^1)	NT(10^1)
	5	66 (10^6)	66 ×10^6	NT(10^1)	NT(10^1)
	7	57 (10^6)	57 ×10^6	NT(10^1)	NT(10^1)
	9	43 (10^6)	43 ×10^6	NT(10^1)	NT(10^1)
NN25 (จาก อ.เชียงกลาง จ. น่าน)	0	32 (10^5)	0.32 ×10^7	8 (10^3)	8 ×10^3
	3/1	37 (5 ×10^5)	1.85× 10^7	NT(10^3)	NT(10^3)
	3/2	24 (10^6)	2.4 ×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	5	29 (10^7)	29 ×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	7	34 (5 ×10^7)	170 ×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	9	31 (10^8)	310 ×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
NN27 (จาก อ.ปัว จ. น่าน)	0	30(5 ×10^5)	0.15 ×10^7	3 (10^4)	3 ×10^4
	3/1	36 (10^6)	3.6 ×10^7	NT(10^3)	NT(10^3)
	3/2	37 (10^6)	3.7 ×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	5	30 (10^7)	30 ×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	7	27 (10^7)	26.5× 10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	9	30 (10^7)	30 ×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
LA1 (อ. เสริมงาม จ.ลำปาง)	0	33 (10^5)	33 ×10^5	2 (10^4)	2 ×10^4
	3/1	32 (10^6)	32 ×10^6	NT(10^3)	NT(10^3)
	3/2	21 (10^6)	21 ×10^6	NT(10^1)	NT(10^1)
	5	42 (10^7)	42 ×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	7	50 (5 ×10^6)	25 ×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)
	9	35 (5 ×10^7)	175 ×10^7	NT(10^1)	NT(10^1)

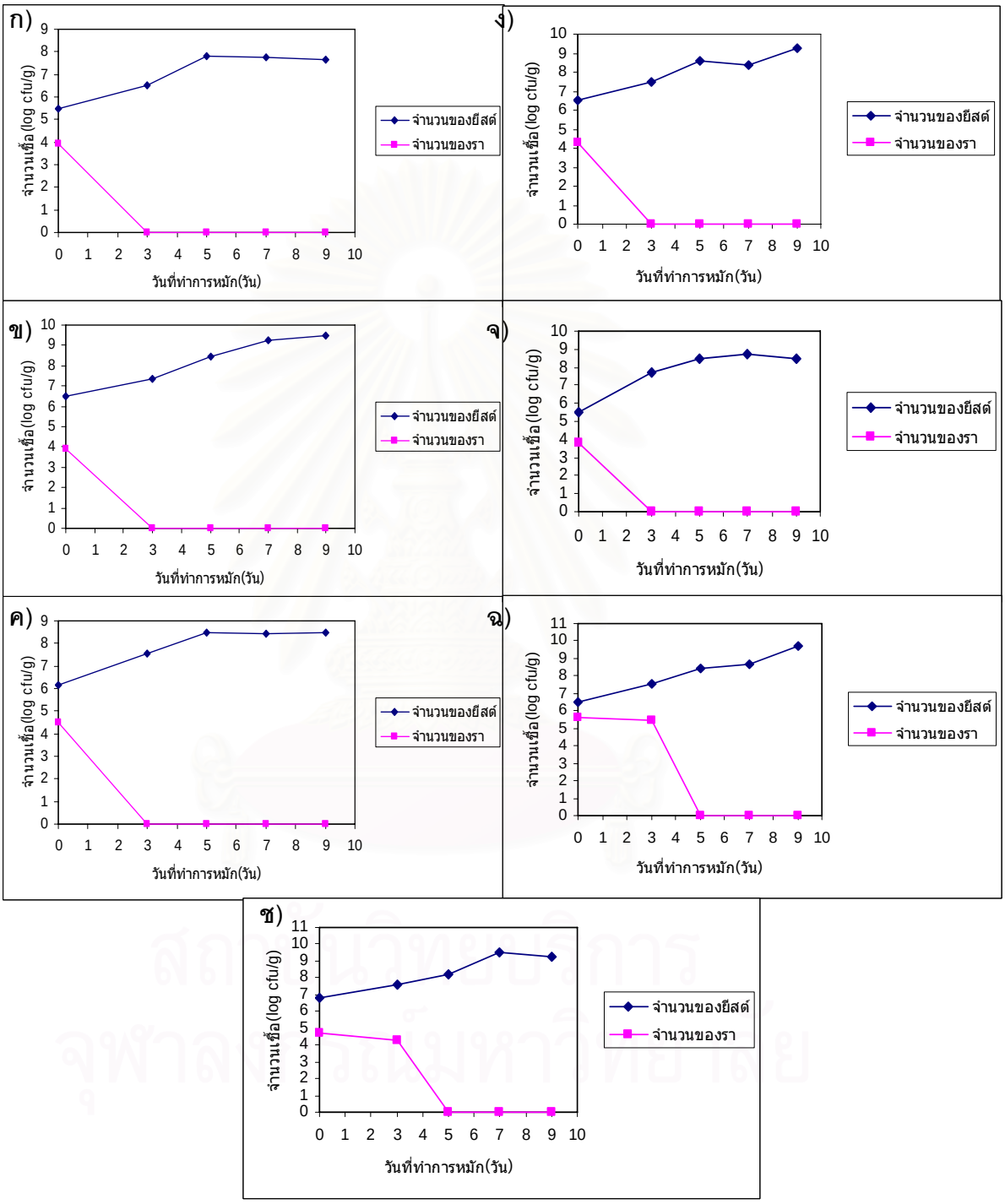
ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

รหัสของลูกแป้งสุรา	วันที่ทำการแยกเชื้อ	ยีสต์		รา	
		จำนวนไอโซเลต	จำนวน (CFU/g)	จำนวนไอโซเลต	จำนวน (CFU/g)
NP1 (อ. ธาตุพนม จ.นครพนม)	0	30 (10^4)	30 $\times 10^4$	7(103)	7 $\times 10^3$
	3/1	52 (10^6)	52 $\times 10^6$	NT(10^3)	NT(10^3)
	3/2	44 (10^6)	44 $\times 10^6$	NT(10^1)	NT(10^1)
	5	29 (10^7)	29 $\times 10^7$	NT(10^1)	NT(10^1)
	7	52 (10^7)	52 $\times 10^7$	NT(10^1)	NT(10^1)
	9	31 (10^7)	31 $\times 10^7$	NT(10^1)	NT(10^1)
NK2 (อ.โพนพิสัย จ.หนองคาย)	0	31 (10^5)	31 $\times 10^5$	8 (5 $\times 10^4$)	40 $\times 10^4$
	3/1	37 (10^6)	37 $\times 10^6$	2(10^5)	2 $\times 10^5$
	3/2	30 (10^6)	30 $\times 10^6$	3(10^5)	3 $\times 10^5$
	5	52 (5 $\times 10^6$)	260 $\times 10^6$	NT(10^1)	NT(10^1)
	7	51 (10^7)	51 $\times 10^7$	NT(10^1)	NT(10^1)
	9	39 (5 $\times 10^7$)	519 $\times 10^7$	NT(10^1)	NT(10^1)
SS1 (อ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร)	0	61 (10^5)	61 $\times 10^5$	5 10^4	5 $\times 10^4$
	3/1	40 (10^6)	40 $\times 10^6$	4(10^4)	4 $\times 10^4$
	3/2	32 (10^6)	32 $\times 10^6$	2(10^4)	2 $\times 10^4$
	5	33 (5 $\times 10^6$)	16.5 $\times 10^7$	NT(10^1)	NT(10^1)
	7	34 (10^8)	34 $\times 10^8$	NT(10^1)	NT(10^1)
	9	34 (5 $\times 10^7$)	17 $\times 10^8$	NT(10^1)	NT(10^1)
รวมจำนวนไอโซเลต		1598		52	

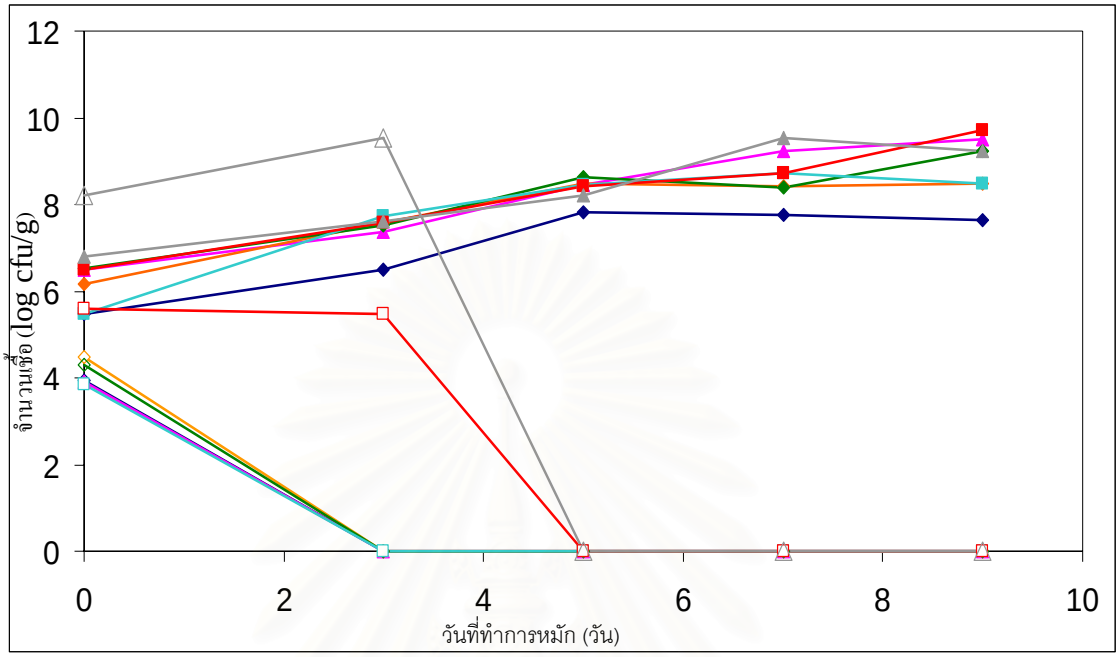
3/1= แยกเชื้อก่อนผ่าน้ำ, 3/2= แยกเชื้อหลังผ่าน้ำ

NT= non detectable, D=วันที่ทำการแยกเชื้อ, ตัวเลขในวงเล็บหมายถึง dilution factor

Cfu/g = colony forming unit ต่อ 1 กรัม น้ำหนักเปียก



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงประชากรระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วทั้ง 7 แหล่ง ก) NN6 ข) NN25 ค) NN27 ง) LA1 จ) NP1 ฉ) NK2 และ ช) SS1



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงประชากรระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้วทั้ง 7 แหล่ง ก) NN6 (◆) ข) NN25 (▲) ค) NN27 (◆) ง) LA1 (◆) จ) NP1 (■) ฉ) NK2 (■) และ ช) SS1(▲)

จากรูปที่ 4.4 และ 4.5 พบว่าในทุกตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วนั้นมีปริมาณยีสต์เพิ่มขึ้นตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมักจนถึงวันที่ 5 ของการหมัก จากนั้นปริมาณยีสต์จะคงที่หรือเพิ่มขึ้นได้อีกเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 5 จนถึงวันที่ 9 ของการหมัก

ส่วนปริมาณราที่แยกได้นั้น พบว่าในทุกตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกได้ยกเว้น NK2 และ SS1 สามารถตรวจพบและแยกราได้เฉพาะวันที่ 0 ของการหมักโดยมีจำนวน 9 $\times 10^3$, 8 $\times 10^3$, 3 $\times 10^4$, 2 $\times 10^4$ และ 7$\times 10^3$ cfu/g ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างลูกแป้ง NK2 (อ.โพนพิสัย จ.หนองคาย) และ SS1 (อ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร)นั้น สามารถแยกราได้ถึงวันที่ 3 หลังจากวันที่ 3 ของการหมักก็ไม่สามารถแยกราได้อีก จากนั้นนำยีสต์และราที่แยกได้มาจำแนกชนิดต่อไปดังข้อ4.4

4.4 การจำแนกชนิดยีสต์และราที่อยู่ในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา ชีวเคมี และเทคนิคอณูชีววิทยา

4.4.1 การจำแนกชนิดของราโดยใช้สัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา

เมื่อนำราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งจากข้อ 4.3 ทั้งหมด 52 ไอโซเลต มาจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทำการศึกษาสัณฐานวิทยาทั้งภายใต้กล้องและดูด้วยตาเปล่าบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง 2 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง PDA และได้ทำการศึกษาขนาดและลักษณะของสปอร์ ขนาดก้านสปอร์ การมีไรซอยด์ การมีคลามัยโดสปอร์ การมีโปรเจคชั่น ขนาดของสปอร์แรงเจียม และ การเจริญได้ที่ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลการจำแนกดังตารางที่ 4.5 พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น *Mucor hiemalis* จำนวน 10 ไอโซเลต *Mucor racemosus* 29 ไอโซเลต *Mucor indicus* 6 ไอโซเลต *Rhizopus oligosporus* 3 ไอโซเลต และ *Rhizopus oryzae* 1 ไอโซเลต ดังรูปที่ 4.6 และ 4.7

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.5 ผลการจำแนกราในลูกแป้งสุราโดยใช้สัณฐานวิทยา(อ้างอิงตาม Samson และคณะ, 2002 และ de Hoog และคณะ, 2000)

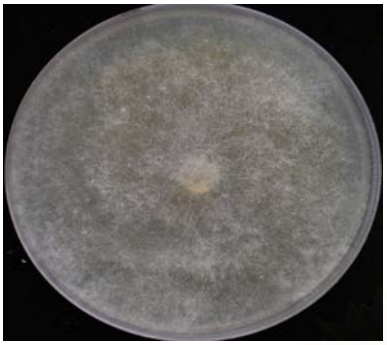
รหัสของรา	การมีไรซอยด์	การมีคลามัยโดสปอร์	ลักษณะก้านสปอร์	ขนาดของก้านสปอร์ (ไมโครเมตร)	การเจริญที่อุณหภูมิ 40°C	ลักษณะสปอแรงจิโอสปอร์			ชื่อสปีชีส์
						ลักษณะ	สี	ขนาด (ไมโครเมตร)	
NN6/0/1	-	+++	branch	72	-	Subglobose	Hyaline	5.2× 6	Mucor racemosus
NN6/0/2	-	+++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	6.5× 6.8	Mucor racemosus
NN6/0/3	-	+++	branch	74	-	Subglobose	Hyaline	4.9× 4.8	Mucor racemosus
NN6/0/4	-	-	unbranch	73	-	ellipsoidal	Hyaline	5.9× 3.4	Mucor hiemalis
NN6/0/5	-	-	unbranch	75	-	ellipsoidal	Hyaline	6.3× 3.9	Mucor hiemalis
NN6/0/6	-	-	unbranch	79	-	ellipsoidal	Hyaline	6.4×4.5	Mucor hiemalis
NN6/0/7	-	-	unbranch	75	-	ellipsoidal	Hyaline	6.8×5.1	Mucor hiemalis
NN6/0/8	-	-	unbranch	70	-	ellipsoidal	Hyaline	6.3×4.0	Mucor hiemalis
NN6/0/9	-	-	unbranch	71	-	ellipsoidal	Hyaline	6.5×4.1	Mucor hiemalis
NN25/0/1	-	+	branch	87	+	ellipsoidal	Hyaline	5.4×3.9	Mucor indicus
NN25/0/2	-	+++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	5.8× 6.5	Mucor racemosus
NN25/0/3	-	+++	branch	72	-	Subglobose	Hyaline	6.2× 6.8	Mucor racemosus
NN25/0/4	-	+++	branch	78	-	Subglobose	Hyaline	4.9× 5.2	Mucor racemosus
NN25/0/5	-	+++	branch	71	-	Subglobose	Hyaline	5.9× 6.2	Mucor racemosus
NN25/0/6	-	+++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	6.8× 7.0	Mucor racemosus
NN25/0/7	-	+++	branch	73	-	Subglobose	Hyaline	4.8× 5.4	Mucor racemosus
NN25/0/8	-	+++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	4.2× 5.5	Mucor racemosus
NN27/0/1	-	+	branch	84	+	ellipsoidal	Hyaline	4.2× 6.8	Mucor indicus
NN27/0/2	-	+	branch	76	+	ellipsoidal	Hyaline	4.9× 5.4	Mucor indicus
NN27/0/3	-	+	branch	95	+	ellipsoidal	Hyaline	4.6×5.2	Mucor indicus
LA1/0/1	-	++	branch	82	-	Subglobose	Hyaline	4.8× 5.0	Mucor racemosus
LA1/0/2	-	+	branch	68	-	Subglobose	Hyaline	5.9× 6.2	Mucor racemosus
NP1/0/1	+	+++	Unbranch	42	-	Irregular	Hyaline	8 12	Rhizopus microsporus
NP1/0/2	-	++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	5.3 5.2	Mucor racemosus
NP1/0/3	-	+++	branch	82	-	Subglobose	Hyaline	4.8 5.4	Mucor racemosus
NP1/0/4	-	++	branch	68	-	Subglobose	Hyaline	3.9 5.1	Mucor racemosus
NP1/0/5	+	+++	Unbranch	49	-	irregular	Hyaline	9 15	Rhizopus microsporus
NP1/0/6	-	++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	4.2 5.2	Mucor racemosus
NP1/0/7	+	++	Unbranch	52	-	irregular	Hyaline	8 13	Rhizopus microsporus

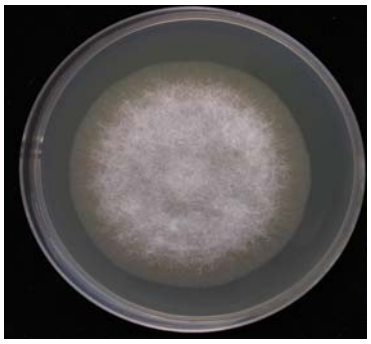
ตารางที่ 4.5(ต่อ)

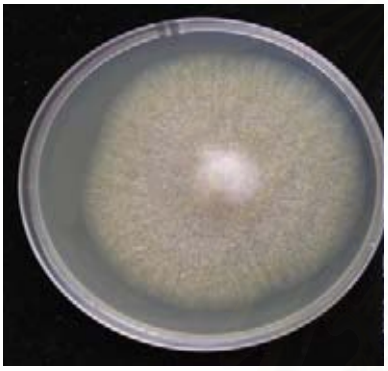
รหัสของรา	การมีไรซอยด์	การมีคลามัยโดสปอร์	ลักษณะก้านสปอร์	ขนาดของก้านสปอร์ (ไมโครเมตร)	การเจริญที่อุณหภูมิ 40°C	ลักษณะสปอแรงจิโอสปอร์			ชื่อสปีชีส์
						ลักษณะ	สี	ขนาด (ไมโครเมตร)	
NK2/0/1	-	+++	branch	72	-	Subglobose	Hyaline	5.2× 6	Mucor racemosus
NK2/0/2	-	+++	branch	75	-	ellipsoidal	Hyaline	6.5× 6.8	Mucor hiemalis
NK2/0/3	-	+++	branch	74	-	Subglobose	Hyaline	4.9× 4.8	Mucor racemosus
NK2/0/4	-	++	branch	73	-	ellipsoidal	Hyaline	5.9× 3.4	Mucor hiemalis
NK2/0/5	-	+++	branch	75	-	ellipsoidal	Hyaline	6.3× 3.9	Mucor racemosus
NK2/0/6	-	+	branch	79	+	ellipsoidal	Hyaline	6.4×4.5	Mucor indicus
NK2/0/7	-	+	branch	75	+	ellipsoidal	Hyaline	6.8×5.1	Mucor indicus
NK2/0/8	+	+	unbranch	123	+	globose	Hyaline	6.3×4.0	Rhizopus oryzae
NK2/3.1/1	-	+	branch	71	-	ellipsoidal	Hyaline	6.5×4.1	Mucor hiemalis
NK2/3.1/2	-	+	branch	87	-	ellipsoidal	Hyaline	5.4×3.9	Mucor hiemalis
NK2/3.2/1	-	+	branch	82	-	ellipsoidal	Hyaline	4.2× 4.8	Mucor hiemalis
NK2/3.2/2	-	+	branch	79	-	ellipsoidal	Hyaline	3.4×5.9	Mucor hiemalis
SS1/0/1	-	++	branch	78	-	Subglobose	Hyaline	4.9× 5.2	Mucor racemosus
SS1/0/2	-	+++	branch	51	-	Subglobose	Hyaline	5.9× 6.2	Mucor racemosus
SS1/0/3	-	+++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	6.8× 7.0	Mucor racemosus
SS1/0/4	-	+++	branch	63	-	Subglobose	Hyaline	4.8× 5.4	Mucor racemosus
SS1/0/5	-	++	branch	75	-	Subglobose	Hyaline	4.2× 5.5	Mucor racemosus
SS1/3.1/1	-	+++	branch	68	-	Subglobose	Hyaline	4.2× 6.8	Mucor racemosus
SS1/3.1/2	-	++	branch	76	-	Subglobose	Hyaline	5.8× 6.5	Mucor racemosus
SS1/3.1/3	-	++	Branch	91	-	Subglobose	Hyaline	6.2× 6.8	Mucor racemosus
SS1/3.1/4	-	+++	branch	82	-	Subglobose	Hyaline	4.9× 5.2	Mucor racemosus
SS1/3.2/1	-	++	branch	76	-	Subglobose	Hyaline	5.9× 6.2	Mucor racemosus
SS1/3.2/1	-	++	branch	74	-	Subglobose	Hyaline	5.7×6.1	Mucor racemosus

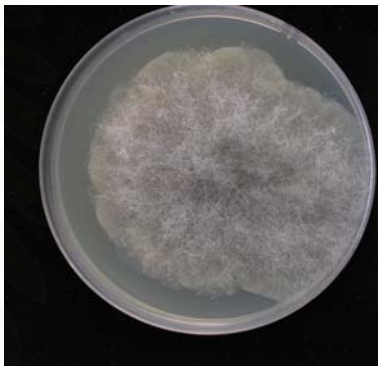
* ราทุกไอโซเลตไม่มีโปรเจคชั่น

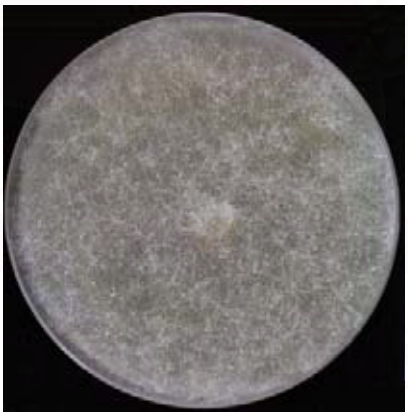
ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ก 

ข 

ค 

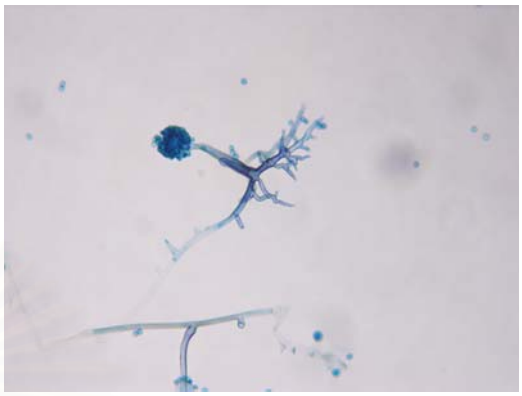
ง 

จ 

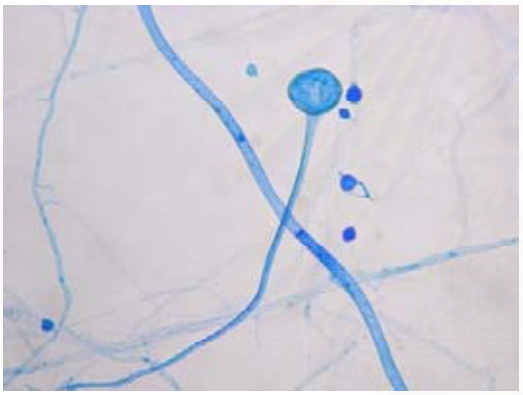
รูปที่ 4.6 ราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้ว บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MEA บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ก *M. hiemalis* NN6/0/9 ข *R. microsporus* NP1/0/7 ค *M. indicus* NK2/0/6 ง *R oryzae* NK2/0/8 จ *M. racemosus* NP1/0/3

ก

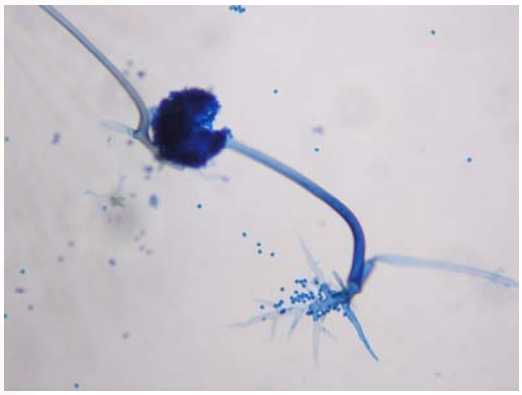
ข



ค



ง



จ

รูปที่ 4.7 ราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้ว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 200 เท่า

ก *M. hiemalis* NN6/0/9 ข *R. microsporus* NP1/0/7 ค *M. indicus* NK2/0/6

ง *R oryzae* NK2/0/8 จ *M. racemosus* NP1/0/3

หลังจากการจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยาแล้ว ได้นำตัวแทนของกลุ่มราที่จำแนกได้มาทำการตรวจยืนยันผลการจำแนกใช้เทคนิคอณูชีววิทยาโดย NN6/0/9 NN6/0/1 NN27/0/3 NP1/0/1 และ NK2/0/8เป็นตัวแทนของ *Mucor hiemalis, Mucor racemosus, Mucor circinellodes, Rhizopus oligosporus* และ *Rhizopus oryzae* ตามลำดับ ทำการสกัดจีโนมิกดีเอนเอ เพิ่มจำนวนของบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอนเอ และนำผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ โดยใช้วิธีตามข้อ 3.2.4.2 ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.6 และทำการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ดังแสดงในรูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์นิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของราที่คัดแยกได้

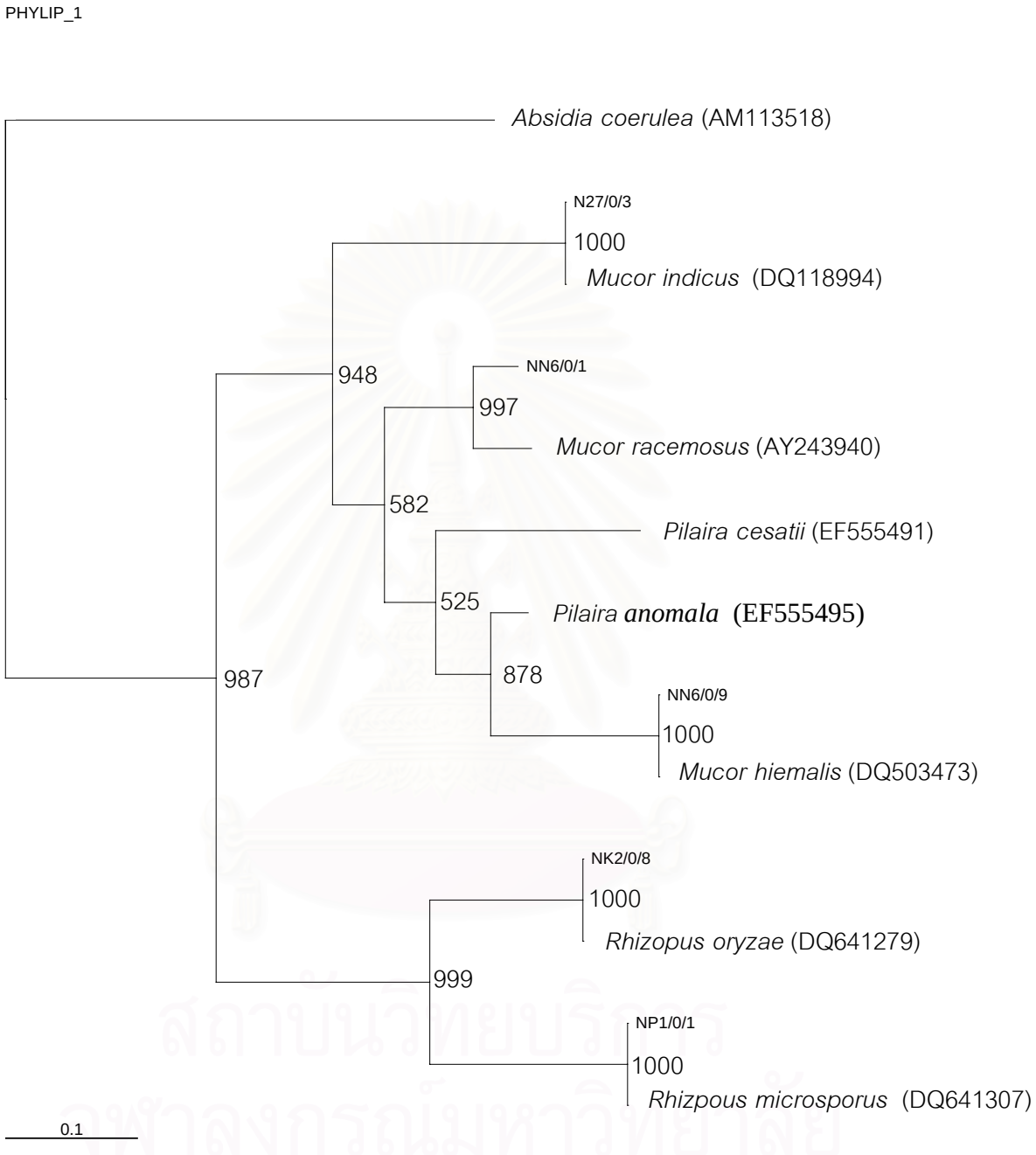
รหัส	สปีชีส์
NN6/0/1	*Mucor racemosus*
NN6/0/9	*Mucor hiemalis*
NN27/0/3	*Mucor indicus*
NP1/0/1	*Rhizopus microsporus*
NK2/0/8	*Rhizopus oryzae*

* ชนิดของราที่จำแนกได้มีความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ ITS เป็น 100% ในทุกกรณี

จากตารางที่ 4.6 พบว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ ของ NN6/0/1 NN27/0/3 NP1/0/1 และ NK2/0/8 กับฐานข้อมูล GenBank พบว่ามีร้อยละของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่คล้ายกับ *Mucor racemosus Mucor indicus Rhizopus microsporus* และ*Rhizopus oryzae* ในฐานข้อมูลเป็น 100%

ดังนั้นการจำแนกราโดยใช้วิธีทางสัณฐานวิทยาและการเปรียบเทียบความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของรากับฐานข้อมูล GenBank ได้ผลที่ตรงกัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

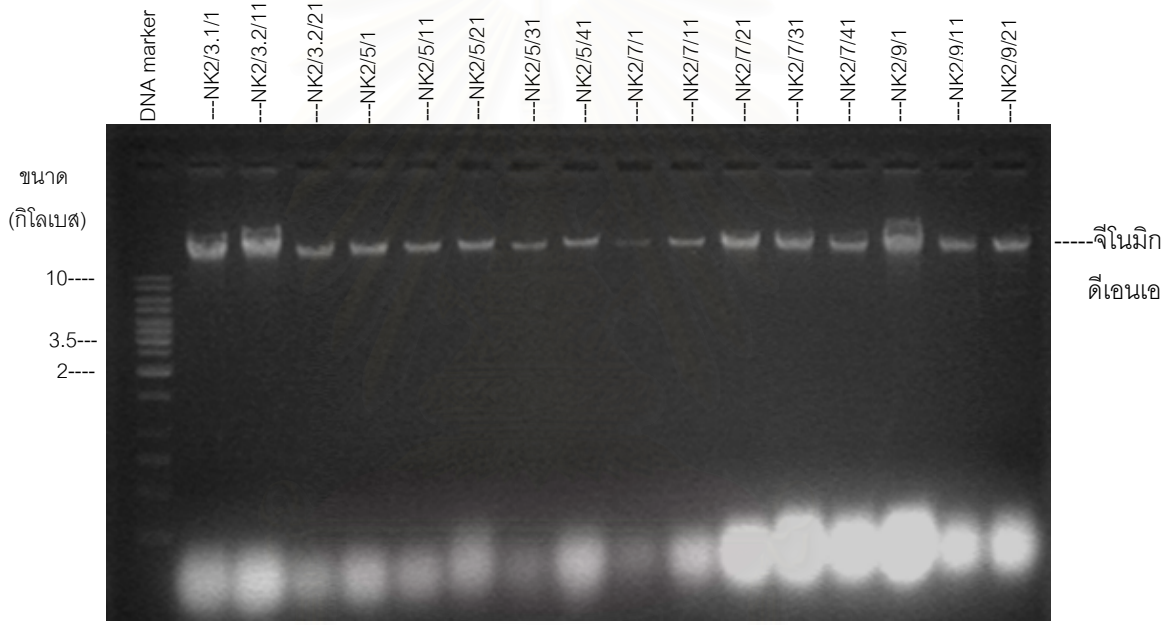


รูปที่ 4.8 ต้นไม้วิวัฒนาการ(phylogenetic tree) ของตัวแทนของราที่แยกได้

4.4.2 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยาและชีวเคมี

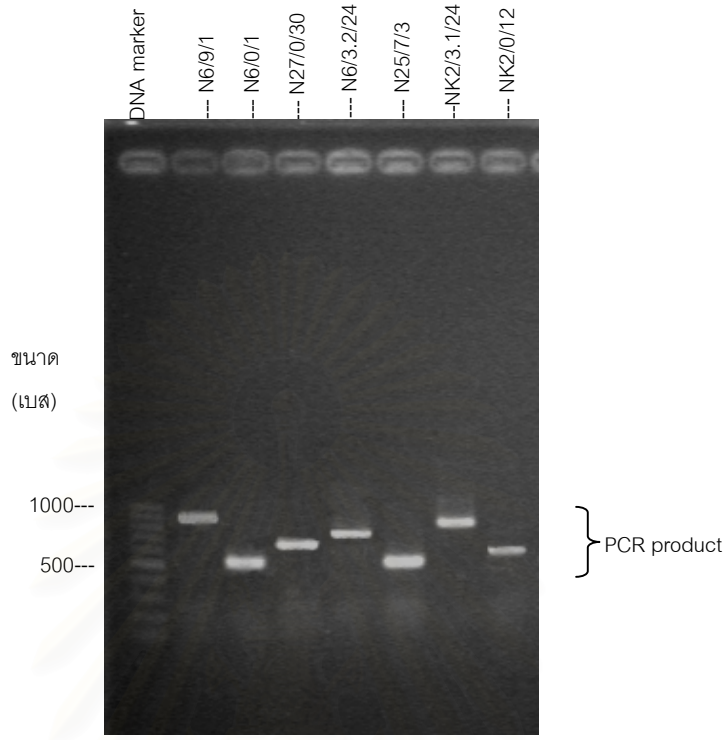
4.4.2.1 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้เทคนิคอณูชีววิทยา

เนื่องจากยีสต์ที่สามารถแยกได้จากข้อ 4.3 มีจำนวนมากถึง 1,598 ไอโซเลต จึงจำเป็นต้องทำการจัดกลุ่มยีสต์ก่อนที่นำไปจำแนกต่อ ได้เลือกใช้เทคนิค Polymerase Chain Reaction - Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR- RFLP) มาช่วยจัดกลุ่มด้วยรูปแบบของชิ้นส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดผลิตภัณฑ์ลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิดคือ *Hin*FI, *Hha*I และ *Hae*III โดยเริ่มต้นจากทำการสกัดจีโนมิกดีเอนเอของยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งสุรา ตามวิธีการทดลองข้อ 3.2.4. 1 ซึ่งได้ผลดังรูปที่ 4.9



รูปที่ 4.9 ตัวอย่างของอะกาโรสเจลของจีโนมิกดีเอนเอของยีสต์ที่แยกได้

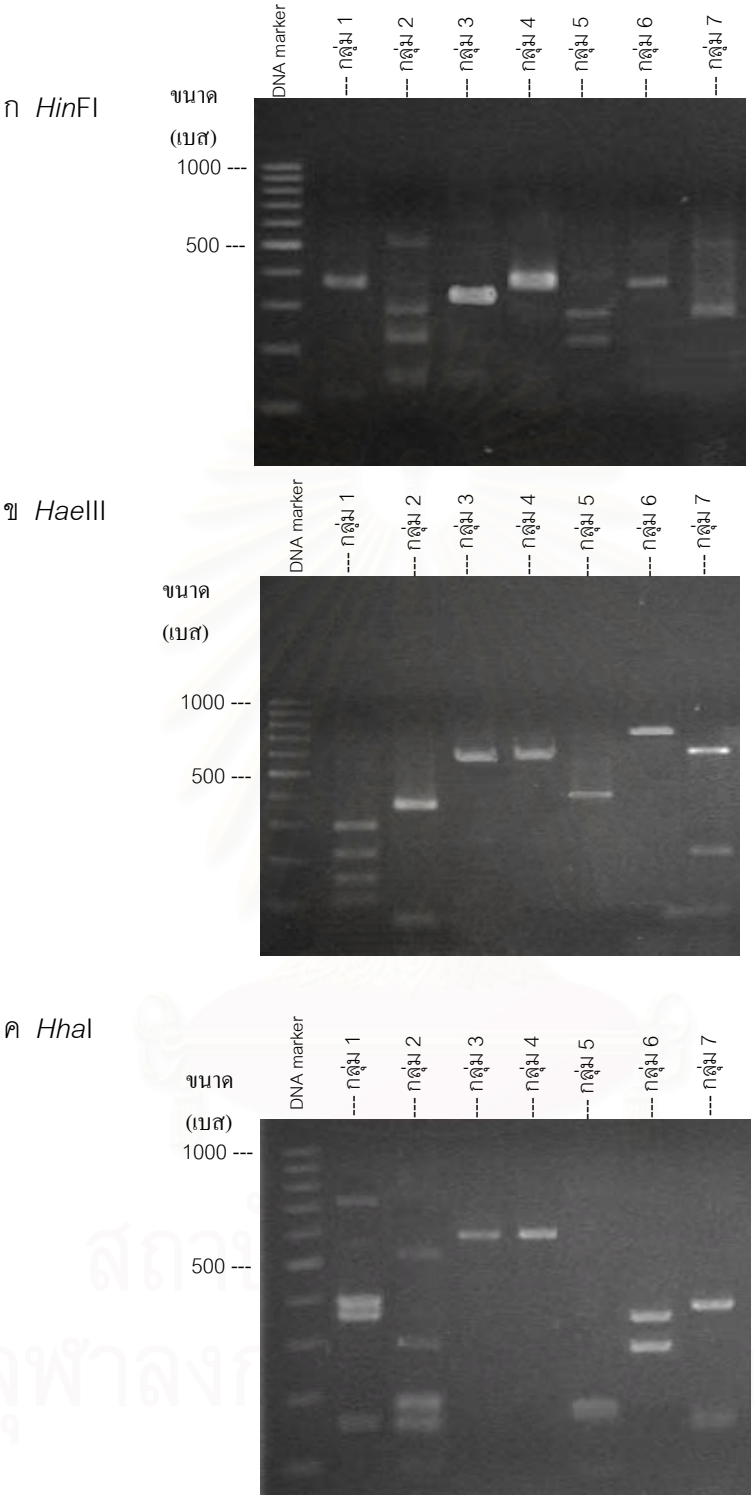
หลังจากนั้นใช้จีโนมิกดีเอนเอเป็นดีเอ็นเอต้นแบบ และใช้ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 เพื่อเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอนเอโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ปฏิกริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสเป็นดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 อะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของตัวแทนของยีสต์ที่แยกได้

จากผลการเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนของดีเอ็นเอบริเวณไรโบโซมอลของยีสต์ไอโซเลตต่างๆ พบผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสมี 1 ผลิตภัณฑ์ จากการใช้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากยีสต์แต่ละไอโซเลต พบว่ามีขนาดอยู่ระหว่าง 500- 880 เบส

เพื่อศึกษารูปแบบของชิ้นส่วนของไรโบโซมอลดีเอ็นเอจากยีสต์แต่ละไอโซเลต เมื่อถูกตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ (restriction enzyme) เพื่อใช้รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอดังกล่าว เพื่อการแบ่งกลุ่มยีสต์ จึงได้นำเอาผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสตัดด้วยเอนไซม์ที่จำเพาะ 3 ชนิด คือ *Hin*FI, *Hha*I และ *Hae*III ได้ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 ตัวอย่างของอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟริซิสของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ที่แยกได้ ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ที่จำเพาะ ก) เอนไซม์ที่จำเพาะ *Hin*FI ข) เอนไซม์ที่จำเพาะ *Hae*III และ ค) เอนไซม์ที่จำเพาะ *Hha*I

จากรูปที่ 4.11 จะเห็นได้ว่า ผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสของดีเอ็นเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์รหัส NN106Y03 ถึง NN110Y01 ที่ถูกตัดด้วย เอนไซม์ที่จำเพาะ *Hin*FI, *Hha*I และ *Hae*III ได้รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอนเอที่สามารถจัดกลุ่มของยีสต์ที่แยกจากลูกแป้งได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 4.7 เพื่อการจำแนกชนิดของยีสต์ต่อไปจึงได้เลือกตัวแทนกลุ่มแบบสุ่มไปยืนยันการจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีวเคมีควบคู่กับนำชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ตัวแทนไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ ไปเปรียบเทียบร้อยละความคล้าย (% Similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันของยีสต์ที่มีในฐานข้อมูล GenBank

ตารางที่ 4.7 การแบ่งกลุ่มยีสต์ที่แยกได้ตามรูปแบบชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณ ITS1-5.8srDNA-ITS2 โดยวิธี PCR-RFLP

กลุ่ม	จำนวนไอโซเลต	ขนาดของผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส(เบส)	ขนาดของ ชิ้นส่วนดีเอนเอ (เบส)		
			*Hin*FI	*Hae*III	*Hha*I
1	1164	880	360,350,180	320,230,180,130	385,365
2	184	510	220,140	380	300,200,170
3	83	650	320,270	630	630
4	9	650	350,200	650	320,310,105
5	8	500	280,220	390	190
6	2	780	395	780	290,350
7	148	600	285	230	400,155

สำหรับการจำแนกชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ เริ่มจากการสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากยีสต์ตัวแทนแต่ละกลุ่ม เพื่อใช้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบสำหรับเพิ่มขยายชิ้นส่วนดีเอนเอบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้คู่ไพรเมอร์ ITS1 และ ITS4 จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่ที่ได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลจาก GenBank ผลการจำแนกชนิดของยีสต์ได้แสดงในตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 การจำแนกชนิดของยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ เทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูลใน GenBank

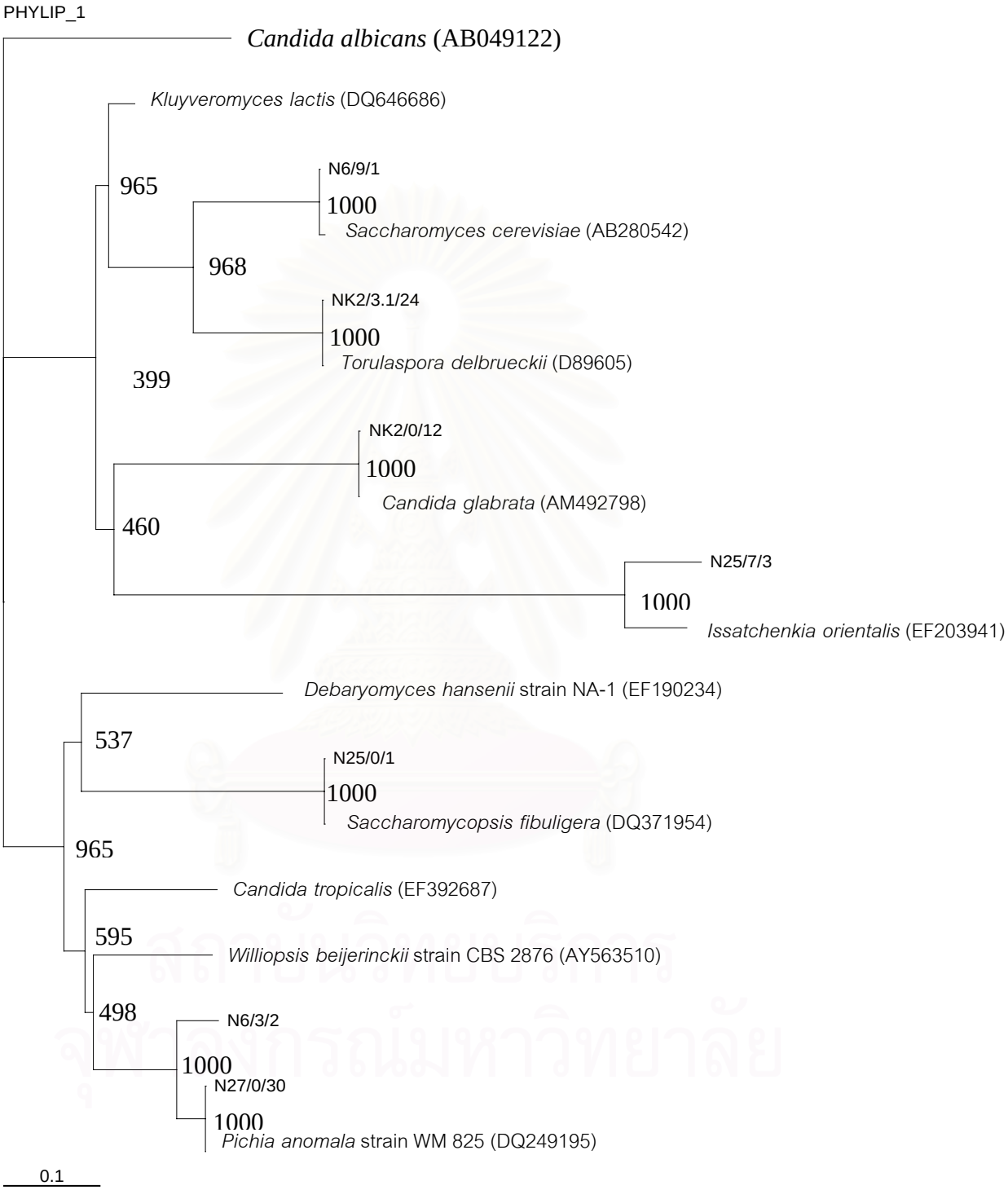
กลุ่มยีสต์	ชนิดของยีสต์	%similarity*
1	*Saccharomyces cerevisiae*	99
2	*Saccharomycopsis fibuligera*	99
3	*Pichia anomala*	100
4	*Pichia anomala*	92
5	*Issatchenkia orientalis*	99
6	*Tolulaspora delbrueckii*	100
7	*Candida glabrata*	99

* %similarity= ร้อยละความคล้ายกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ เมื่อเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันในฐานข้อมูล

จากผลการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ ITS (Internal transcribed spacer) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ กลุ่ม 1(N6/9/1), กลุ่ม 2(N6/0/1), กลุ่ม 3(N27/0/30), กลุ่ม 5(N25/7/3), กลุ่ม 6 (NK2/3.1/24) และ กลุ่ม 7(NK2/0/12) กับฐานข้อมูล Genbank พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycopsis fibuligera, Pichia anomala, Issatchenkia orientalis, Tolulaspora delbrueckii* และ *Candida glabrata* ตามลำดับ และทำการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ดังแสดงในรูปที่ 4.12

ส่วน กลุ่ม 4(N6/3.2/12) มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน การหมักและการสร้างสปอร์คล้ายกับ *Pichia anomala* การจำแนกโดยใช้การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอพบว่ามีความคล้ายกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Pichia anomala* เพียงร้อยละ 92 เท่านั้น เพื่อยืนยันว่าเป็นยีสต์ *Pichia anomala* หรือไม่จึงได้ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสในบริเวณ D1-D2 ของ26 srDNA ต่อไป

โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของยีสต์ N6/3.2/12 เป็นดีเอ็นเอต้นแบบและใช้คู่ไพรเมอร์ NL1 และ NL4 เพื่อนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณ D1-D2 ของ 26srDNA ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณดังกล่าวกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันกับที่มีในฐานข้อมูล GenBank พบว่าตัวแทนของยีสต์ในกลุ่มที่ 4 มีร้อยละความคล้ายของลำดับนิวคลีโอไทด์ของบริเวณ D1-D2 ความคล้ายกับ *Pichia anomala* ถึงร้อยละ 99 แสดงว่ายีสต์ในกลุ่มที่ 4 เป็น *Pichia anomala* แต่มีพอลิมอฟิซึมของยีสต์ในสปีชีส์เดียวกัน ซึ่งการมีพอลิมอฟิซึมอาจเกิดจากสภาพสิ่งแวดล้อมได้



รูปที่ 4.12 แสดงต้นไม้วิวัฒนาการ(phylogenetic tree)ของตัวแทนยีสต์ที่ได้จากการจัดกลุ่มโดยใช้เทคนิคPCR-RFLP

จากตารางที่ 4.7 และ 4.8 พบว่ายีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่(1164 ไอโซเลต) เป็น *Saccharomyces cerevisiae* เนื่องจาก *Saccharomyces cerevisiae* มีบทบาทในการหมักให้ได้เอทานอล จึงเป็นยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักสาโท ยีสต์ที่มีจำนวนรองลงมาคือ *Saccharomycopsis fibuligera* และ*Candida glabrata* (184 และ148 ไอโซเลต ตามลำดับ) ซึ่งมีความสำคัญในการหมักสาโทเช่นกันโดย *Saccharomycopsis fibuligera* มีบทบาทในการย่อยแป้งจึงสามารถพบ *Saccharomycopsis fibuligera* ได้ในการหมักที่มีข้าวเป็นวัตถุดิบ ส่วน *Candida glabrata* ความสำคัญในการสร้างสารให้กลิ่นรสของสาโท ส่วนยีสต์ที่สามารถพบได้น้อยได้แก่ *Pichia anomala* 2 กลุ่ม, *Issatchenkia orientalis* และ *Tolulaspora delbrueckii* (83, 9, 8 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ) ทั้ง 3 ชนิด *Pichia anomala* มีบทบาทในแง่การสร้างสารให้กลิ่นรสของสาโท (Aidoo และคณะ, 2006)

4.4.2.1 การจำแนกยีสต์โดยวิธีทางชีวเคมี

จากการจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมีได้ผลดังตารางที่ 10 ทำการเลี้ยงตัวแทนของยีสต์ N6/0/1, N6/9/1, 27/0/30, N6/3.2/12, 25/7/3, NK2/3.1/24 และ NK2/0/12 เป็นตัวแทนของกลุ่มที่ 1- 7 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) ในแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน ต่างๆตลอดจน ชักนำให้สร้างสปอร์และศึกษารูปแบบของแอสโคสปอร์ ได้ผลการจำแนกดังแสดงในตารางที่ 4.9

การจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมี เป็นการศึกษารูปแบบการใช้ (assimilation) แหล่งอาหาร ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน รูปร่างของแอสโคสปอร์ เป็นต้น แหล่งคาร์บอนที่ใช้ศึกษาต่างๆ 10 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส ซอร์โบส กลูโคซามีน ไรโบส ซูโครส กลีเซอรอล มอลโทส เมทานอล และแรมโนส แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ศึกษา ได้แก่ กลูโคซามีน ในการศึกษารูปแบบของการหมัก(Fermentation) ได้ใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน 4 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส มอลโทส และซูโครส ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่4.9, รูปที่ 4.13 และ 4.14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.9 ผลการจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้ลักษณะทางชีวเคมี(อ้างอิงตาม Barnett และคณะ, 1999)

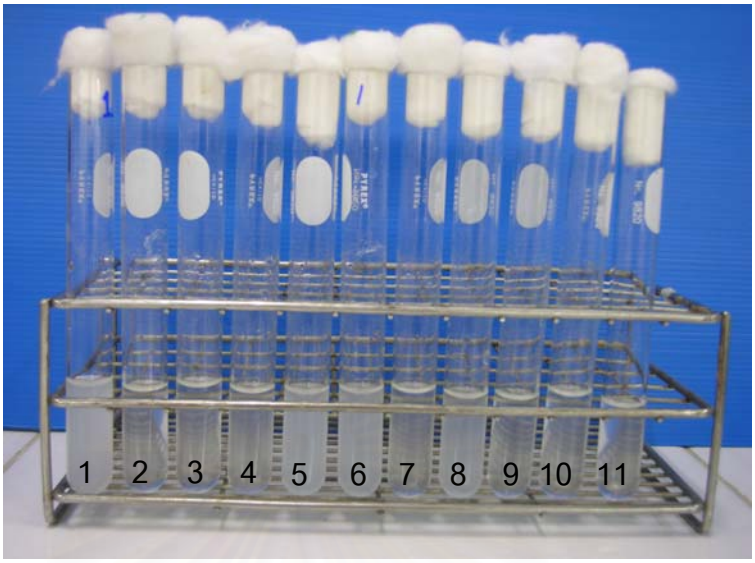
รหัส	การใช้แหล่งคาร์บอน**										การหมัก***				การใช้กลูโคซามีนเป็นแหล่งไนโตรเจน	การสร้างแอสโคสปอร์
	กลูโคส	กาแลคโทส	ซอร์โบส	กลูโคซามีน	ไรโบส	ซูโครส	กลีเซอรอล	มอลโทส	เมทานอล	แรมโนส	กลูโคส	กาแลคโทส	มอลโทส	ซูโครส		
กลุ่ม 1 (N6/9/1)	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	Round
*Saccharomyces cerevisiae**	+	v	-	-	-	v	-	v	-	-	+	v	v	v	-	Round
กลุ่ม 2 (N6/0/1)	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	Hat shape
*Saccharomycopsis fibuligera**	+	-	-	-	v	v	+	+	-	-	v	-	v	-	-	Hat shape
กลุ่ม 3 (N27/0/30)	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	Hat shape
*Pichia anomala**	+	V	-	-	V	+	+	V	-	-	+	V	V	V	-	Hat shape
กลุ่ม 4 (N6/3.2/12)	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	Hat shape
*Pichia anomala**	+	v	-	-	v	+	+	+	-	-	+	-	v	v	-	Hat shape
กลุ่ม 5 (N25/7/3)	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	Round
*Issatchenkia orientalis**	+	-	-	v	v	-	v	-	-	-	+	-	-	-	-	Round
กลุ่ม 6 (NK2/3.1/24)	+	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	Round
*Tolulaspora delbrueckii**	+	v	v	-	-	v	-	v	-	-	+	v	v	v	-	Round
กลุ่ม 7 (NK2/0/12)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-****
*Candida glabrata**	+	-	-	-	-	-	v	-	-	-	+	-	-	-	-	-****

* แสดงเฉพาะลักษณะทางชีวเคมีที่สามารถแยกความแตกต่างของสปีชีส์ได้

** ในการใช้แหล่งคาร์บอน: + สามารถเจริญได้, - ไม่สามารเจริญได้ และ v สามารถเจริญหรือไม่สามารเจริญได้

*** การหมัก: + สามารถหมักให้แก๊ส, - ไม่สามารหมักให้แก๊สได้ และ v สามารถหมักให้แก๊สหรือไม่สามารหมักให้แก๊สได้

**** -- หมายถึง ไม่สร้างแอสโคสปอร์



รูปที่ 4.13 แสดงตัวอย่างการศึกษาความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ของ N6/0/1

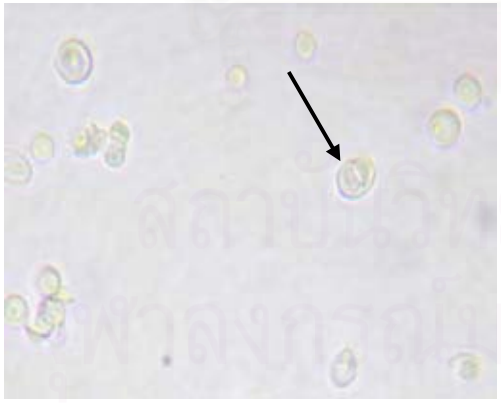
1= กลูโคส 5= กาแลกโตส 9= เมทานอล

2= ไรโบส 6= ซูโครส 10= แรมโนส

3= ซอร์โบส 7= กลีเซอรอล 11=การใช้กลูโคซามีนเป็นแหล่งไนโตรเจน

4= กลูโคซามีน 8= มอลโทส

ก



ข

รูปที่ 4.14 ลักษณะแอสโคสปอร์รูปร่างต่างๆ ที่กำลังขยาย 1000 เท่า

ก รูปร่างคล้ายหมวก(Hat shape)ของยีสต์ ไอโซเลต NN27/0/30

ข รูปกลม(Round shape)ของยีสต์ ไอโซเลต NN6/9/1

จากตารางที่ 4.9 พบว่า N6/9/1, N6/0/1, N27/0/30, N25/7/3, NK2/3.1/24 และ NK2/0/12 มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน การหมักและการสร้างสปอร์เหมือนกับ *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycopsis fibuligera, Pichia anomala, Issatchenkia orientalis, Tolulaspora delbrueckii* และ *Candida glabrata* ตามลำดับ

จากผลที่ได้ในตารางที่ 4.8 และ 4.9 ทำให้สามารถจำแนกชนิดของยีสต์กลุ่มต่างๆ ได้ดังนี้ กลุ่ม 1(N6/9/1), กลุ่ม 2(N6/0/1), กลุ่ม 3(N27/0/30), กลุ่ม 5(N25/7/3), กลุ่ม 6 (NK2/3.1/24) และกลุ่ม 7(NK2/0/12) ได้ว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycopsis fibuligera, Pichia anomala, Issatchenkia orientalis, Tolulaspora delbrueckii* และ *Candida glabrata* ตามลำดับ

ส่วนยีสต์กลุ่ม 4 (N6/3.2/12) นั้นสามารถจำแนกได้ว่าเป็น *Pichia anomala* ในส่วนของการจำแนกโดยวิธีชีวเคมี ว่ามีรูปแบบการใช้แหล่งอาหารและรูปร่างแอสโคสปอร์ที่คล้ายกลุ่ม 3 คือ *Pichia anomala* มาก ยกเว้นความสามารถในการใช้น้ำตาลกาแลคโทสที่ต่างกัน ซึ่งผลการจำแนกทางชีวเคมีสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอ ที่คล้ายกับ *Pichia anomala* ในฐานข้อมูลเพียงร้อยละ 92 (92% similarity) แต่เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1-D2 ของ 26srDNA ของ N6/3.2/12 ซึ่งเป็นยีสต์ตัวแทนกลุ่มที่4 พบว่ามีร้อยละความคล้ายคลึงกับ *Pichia anomala* ถึง 99 ดังนั้นจึงสามารถจำแนกชนิดของยีสต์กลุ่มที่ 4 ว่าเป็น *Pichia anomala* ด้วยเช่นกันเพียงแต่ยีสต์กลุ่มที่ 4 เป็นส่วนน้อยเมื่อเทียบกับ *Pichia anomala* ในกลุ่มที่ 3 (ตารางที่ 4.7)

4.5 การเปลี่ยนแปลงประชากรของราและยีสต์ชนิดต่าง ๆ ในระหว่างการหมักสาโท

ผลจากการทราบจำนวนและชนิดของยีสต์และราที่ได้ ทำให้ทราบถึงการเปลี่ยนแปลงประชากรของราและยีสต์ชนิดต่างๆ ในระหว่างการหมัก ดังแสดงผลดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4.10 ชนิดและจำนวนของยีสต์ ที่แยกได้จากแหล่งตัวอย่างที่คัดเลือกได้

รหัสลูกแป้งสุรา	วันที่ทำการแยกเชื้อ	ชนิดของยีสต์	จำนวนไอโซเลต	ความเข้มข้นของยีสต์ (cfu/g)
NN6 (จากกิ่งอ.ภูเพียง จ.น่าน)	0	*Saccharomycopsis fibuligera*	30	3×10^5
	3/1	*Saccharomycopsis fibuligera*	14	1.4×10^6
		Saccharomyces cerevisiae	22	2.2×10^6
	3/2	*Saccharomycopsis fibuligera*	40	2×10^6
		Pichia anomala (gr4)**	5	2.5×10^5
		Saccharomyces cerevisiae	11	5.5×10^5
	5	*Saccharomyces cerevisiae*	66	6.6×10^7
	7	*Saccharomyces cerevisiae*	54	5.4×10^7
	9	*Saccharomyces cerevisiae*	37	3.4×10^7
NN25 (จาก อ.เชียงกลาง จ. น่าน)	0	*Saccharomycopsis fibuligera*	28	2.8×10^6
		Pichia anomala	4	4×10^5
	3/1	*Pichia anomala*	3	1.5×10^6
		Saccharomyces cerevisiae	34	1.7×10^7
	3/2	*Pichia anomala*	23	2.3×10^6
		Saccharomyces cerevisiae	1	1×10^5
	5	*Issatchenkia orientalis*	1	1×10^7
		Saccharomyces cerevisiae	28	2.8×10^8
	7	*Issatchenkia orientalis*	7	3.5×10^8
		Saccharomyces cerevisiae	26	1.3×10^9
	9	*Issatchenkia orientalis*	1	1×10^8
		Saccharomyces cerevisiae	30	3×10^9
NN27 (จาก อ.ปัว จ.น่าน)	0	*Pichia anomala*	30	1.5×10^7
	3/1	*Pichia anomala*	1	1×10^6
		Saccharomyces cerevisiae	30	3.0×10^7
	3/2	*Pichia anomala*	2	2×10^6
		Saccharomyces cerevisiae	35	3.5×10^7
	5	*Saccharomyces cerevisiae*	30	3.0×10^8
	7	*Saccharomyces cerevisiae*	27	2.7×10^8
	9	*Saccharomyces cerevisiae*	30	3.0×10^8

*ความเข้มข้นของยีสต์=จำนวนไอโซเลต×dilution factor

** Pichia anomala จากยีสต์กลุ่มที่ 4

ตารางที่ 4.10(ต่อ)

รหัสลูกแป้งสุรา	วันที่ทำการแยกเชื้อ	ชนิดของยีสต์	จำนวนไอโซเลต	ความเข้มข้นของยีสต์ (cfu/g)
LA1 (อ. เสริมงาม จ.ลำปาง(	0	*Saccharomycopsis fibuligera*	12	12×10^5
		Pichia anomala	10	10×10^5
		Saccharomyces cerevisiae	9	9×10^5
	3/1	*Saccharomyces cerevisiae*	35	35×10^6
	3/2	*Saccharomyces cerevisiae*	21	21×10^6
	5	*Saccharomyces cerevisiae*	42	42×10^7
	7	*Saccharomyces cerevisiae*	50	50×10^7
	9	*Saccharomyces cerevisiae*	35	35×10^7
NP1 (อ .ธาตุพนมจ. นครพนม)	0	*Saccharomycopsis fibuligera*	2	2×10^4
		Pichia anomala	13	13×10^4
		Saccharomyces cerevisiae	16	16×10^4
	3/1	*Saccharomyces cerevisiae*	52	52×10^6
	3/2	*Saccharomyces cerevisiae*	44	44×10^6
	5	*Saccharomyces cerevisiae*	30	30×10^7
	7	*Saccharomyces cerevisiae*	52	52×10^7
	9	*Saccharomyces cerevisiae*	31	31×10^7
NK2 (อ.โพนพิสัย จ.หนองคาย)	0	*Saccharomycopsis fibuligera*	2	2×10^4
		Candida glabrata	20	20×10^5
	3/1	*Pichia anomala*	20	20×10^6
		Tolulaspora delbrueckii	2	2×10^6
		Candida glabrata	5	5×10^6
	3/2	*Candida glabrata*	40	40×10^6
	5	*Candida glabrata*	40	40×10^7
		Saccharomyces cerevisiae	12	12×10^7
	7	*Saccharomyces cerevisiae*	51	51×10^7
	9	*Saccharomyces cerevisiae*	34	34×10^7

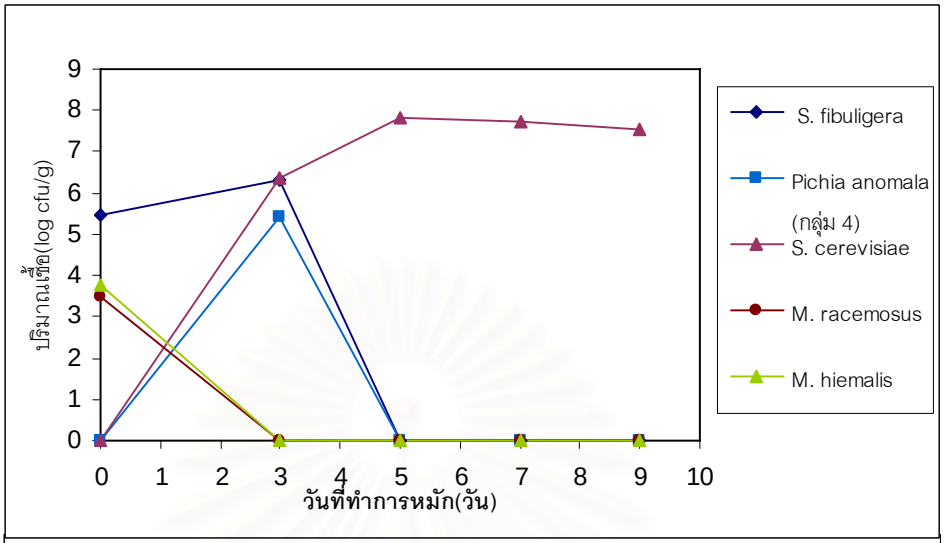
ตารางที่ 4.10(ต่อ)

รหัสลูกแป้งสุรา	วันที่ทำการแยกเชื้อ	ชนิดของยีสต์	จำนวนไอโซเลต	ความเข้มข้นของยีสต์ (cfu/g)
SS1 (อ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร)	0	*Sacchromycopsis fibuligera*	61	61×10^5
	3/1	*Sacchromycopsis fibuligera* *Candida glabrata*	7 33	7×10^6 33×10^6
	3/2	*Sacchromycopsis fibuligera* *Candida glabrata*	7 25	7×10^6 25×10^6
	5	*Saccharomyces cerevisiae*	10	10×10^7
	7	*Saccharomyces cerevisiae*	35	35×10^8
	9	*Saccharomyces cerevisiae*	30	30×10^8

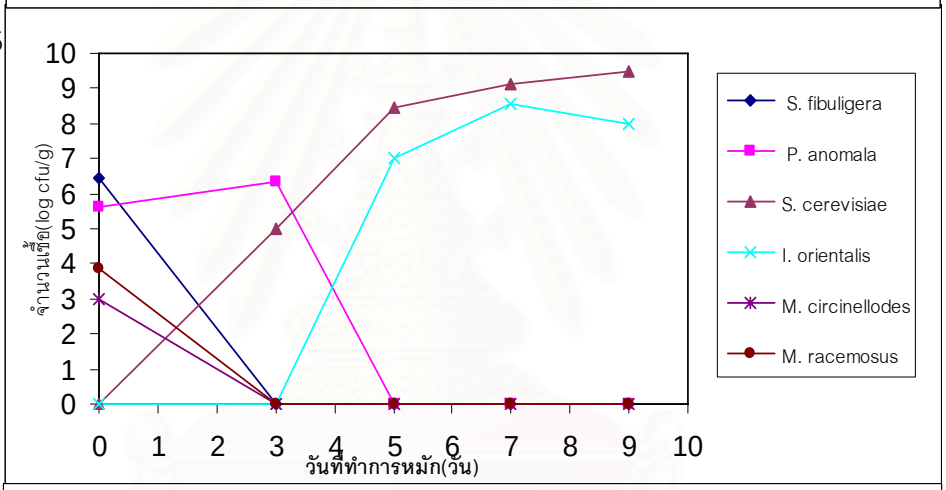
รูปที่ 4.15 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้ว 3 แหล่งตัวอย่าง คือ NN6 NN25 และ NN27 รูปที่ 4.16 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้ว 3 แหล่งตัวอย่าง คือ LA1 NP1 และ NK2 ส่วนรูปที่ 4.17 แสดงการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุรา SS1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

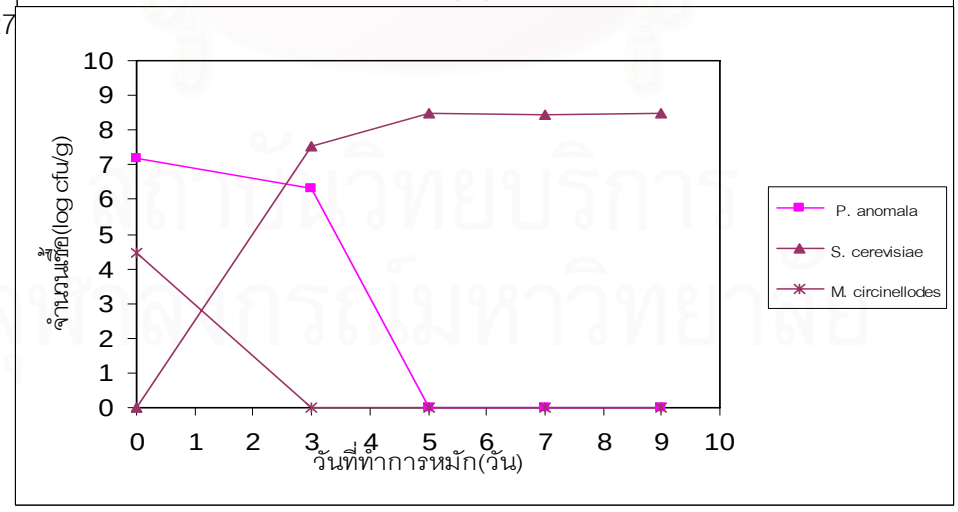
ก) NN6



ข) NN25

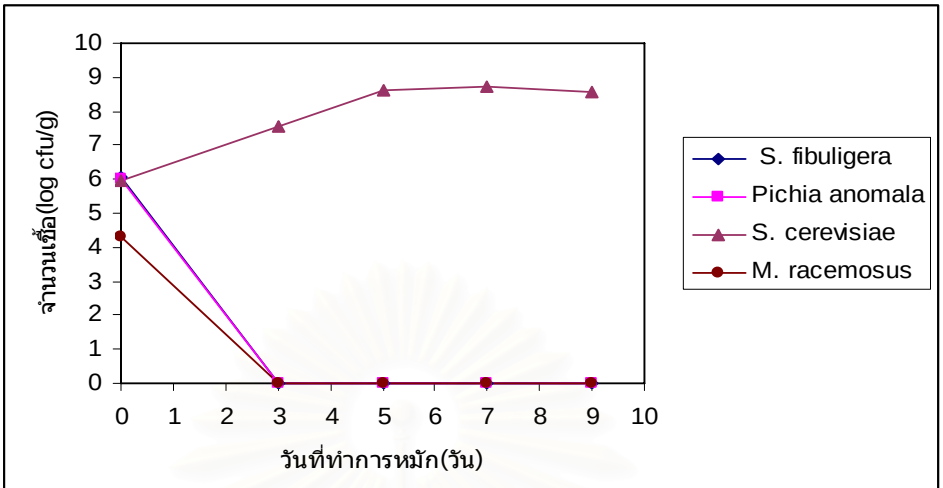


ค) NN27

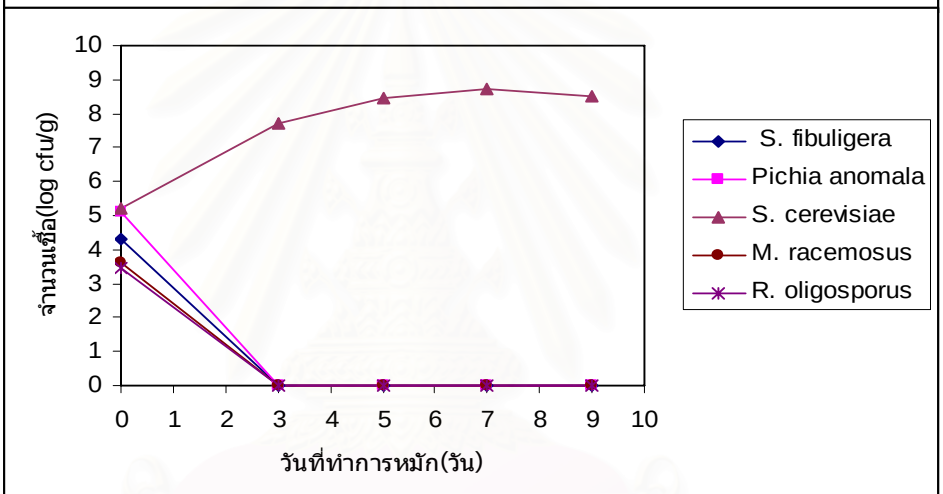


รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้ว ก) NN6 ข) NN25 และ ค) NN27

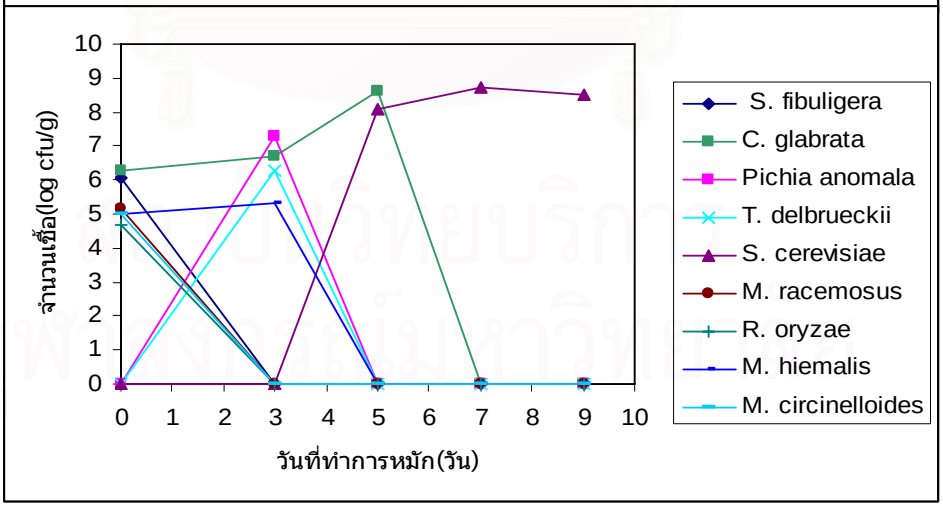
ก) LA1



ข) NP1

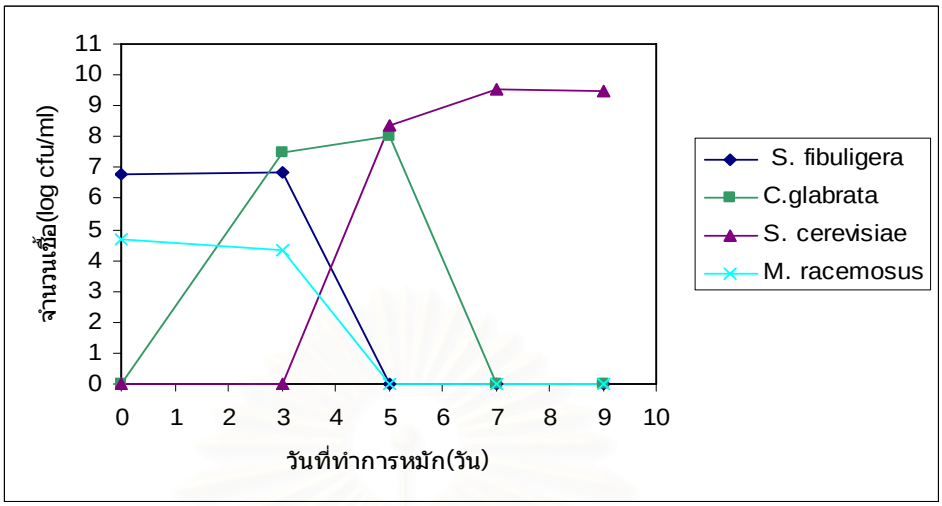


ค) NK2



รูปที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุราที่ได้ทำการคัดเลือกแล้ว ก) LA1 ข) NP1 และค) NK2

SS1



รูปที่ 4.17 การเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราแต่ละสปีชีส์ระหว่างการหมักสาโทของตัวอย่างลูกแป้งสุรา SS1

จากรูปที่ 4.15-4.17 สามารถพบราได้ในเฉพาะวันที่ 0 ของการหมักจากทั้ง 5 ตัวอย่างลูกแป้ง โดยในตัวอย่างลูกแป้ง NN6 พบ *Mucor racemosus* และ *Mucor hiamalis* จำนวน 3 $\times 10^3$ และ 6 $\times 10^3$ cfu/g ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างลูกแป้งNN25 พบ *Mucor racemosus* และ *Mucor indicus* จำนวน 7 $\times 10^3$ และ 1 $\times 10^3$ cfu/g ตามลำดับ ในตัวอย่างลูกแป้งNN27 พบ *Mucor indicus* เพียงชนิดเดียวจำนวน 3 $\times 10^3$ cfu/g ลูกแป้ง LA1 พบ *Mucor racemosus* จำนวน 2 $\times 10^4$ cfu/g ส่วนในตัวอย่างลูกแป้ง NP1 พบ *Mucor racemosus* และ *Rhizopus oligosporus* จำนวน 4 $\times 10^3$ และ 3 $\times 10^3$ cfu/g ตามลำดับ

ในตัวอย่างลูกแป้งอีก 2 ตัวอย่างสามารถคือลูกแป้ง NK2 และ SS1 สามารถตรวจพบราได้ในช่วงต้นของการหมัก(วันที่ 0 และ 3) ชนิดของราที่พบในตัวอย่างลูกแป้ง NK2 ได้แก่ *Mucor racemosus, Rhizopus oryzae, Mucor hiemalis* และ *Mucor indicus* จำนวน 1.5 $\times 10^5$,5 $\times 10^4$ 1 $\times 10^5$และ 1 $\times 10^5$ cfu/g ตามลำดับในวันที่ 0 ของการหมักและพบ *Mucor hiemalis* จำนวน 2 $\times 10^5$ cfu/g ในวันที่ 3 ของการหมัก ในตัวอย่างลูกแป้งSS1 พบ *Mucor racemosus* จำนวน 5 $\times 10^4$ cfu/g ในวันที่ 0 ของการหมักและพบ *Mucor racemosus* จำนวน 4 $\times 10^4$ cfu/g ในวันที่ 3 ของการหมัก หลังจากนั้นไม่สามารถแยกราได้จากน้ำหมักสาโทได้อีก

ในการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้งทุกตัวอย่าง ยกเว้น NN27 เป็นหัวเชื้อสามารถพบ *Saccharomycopsis fibuligera* ในช่วงแรกของการหมัก โดยในวันที่ 0 ของการหมักพบ *Saccharomycopsis fibuligera* จำนวน 3 $\times 10^5$, 2.8 $\times 10^6$, 12 $\times 10^5$, 2 $\times 10^4$, 11 $\times 10^5$ และ 61

$\times 10^5$ cfu/g (จากตัวอย่างลูกแป้ง NN6, NN25, LA1, NP1, NK2 และ SS1ตามลำดับ) และพบเฉพาะวันที่ 0 ของการหมักเท่านั้น ยกเว้นในตัวอย่างลูกแป้ง SS1 สามารถพบ *Saccharomycopsis fibuligera* ได้ในวันที่ 3 ของการหมัก จำนวน 7×10^6 cfu/g แต่การหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN27 ไม่พบ *Saccharomycopsis fibuligera* เลย พบแต่ *Pichia anomala* ในวันที่ 0 และ3 ของการหมักแทน

นอกจากนี้การหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN6 ยังพบ *Pichia anomala* (กลุ่ม 4) ในวันที่ 3 ของการหมัก ส่วนการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN25 พบ *Pichia anomala* ในวันที่ 0 และ3 ของการหมัก และพบ *Issatchenkia orientalis* 1×10^7 3.5×10^8 และ1×10^8 cfu/g ในวันที่ 5, 7 และ9 ของการหมักตามลำดับ แต่การหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN27 ไม่พบ *Saccharomycopsis fibuligera* เลย พบแต่ *Pichia anomala* ในวันที่ 0 และ3 ของการหมัก

ในตัวอย่างลูกแป้ง LA1 และ NP1พบ *Pichia anomala* ในวันที่ 0 ของการหมัก จำนวน 1×10^6 และ 1.3×10^5cfu/g ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างลูกแป้ง NK2 พบ *Candida glabrata* ในวันที่ 0 ของการหมัก จำนวน 2×10^6 cfu/g พบ *Candida glabrata Tolulaspora delbrueckii* และ *Pichia anomala* จำนวน 5×10^6 2×10^6 และ 2×10^7cfu/g ตามลำดับ ในวันที่ 3 ของการหมักและพบ *Candida glabrata* จำนวน 4×10^7 cfu/g ในวันที่ 5 ของการหมัก และในตัวอย่างลูกแป้ง SS1 พบ *Candida glabrata* จำนวน 3.3×10^7 และ 1×10^8 cfu/g ในวันที่ 3 และ 5 ของการหมักตามลำดับ

ในส่วนของยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถถูกตรวจพบได้ ตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 9 (ช่วงหลัง)ของการหมักเหมือนกัน 5 ตัวอย่างลูกแป้ง คือ NN6, NN25, NN27, NK2 และ SS1 โดยพบ *S. cerevisiae* เพิ่มจำนวนมากขึ้นในระหว่างการหมักจาก 5.5×10^5- 5.4×10^7, 1×10^5- 31×10^8 และ 3.0×10^7- 3.0×10^8 cfu/g ตามลำดับ โดยยกเว้น LA1 และ NP1 ซึ่งสามารถตรวจพบ *S. cerevisiae* ได้ตั้งแต่วันที่ 0 ของการหมักซึ่งอาจเป็นเพราะในลูกแป้งทั้งสองมีปริมาณเริ่มต้นของยีสต์ *S. cerevisiae* ในปริมาณมาก

จากที่เคยมีรายงานว่า ยีสต์จำพวก Non- *Saccharomyces* มักพบเฉพาะในช่วงต้นของการหมัก (ก่อนผ่าน้ำ) ในการศึกษานี้ (รูปที่ 4.15 ข) พบ *Issatchenkia orientalis* ได้ในช่วงหลังของการหมักเท่านั้น (ในวันที่ 5 ถึง 9) จากตัวอย่างลูกแป้งNN25 จึงน่าสนใจที่จะได้มีการศึกษาสมบัติของยีสต์ *Issatchenkia orientalis* ทั้งในแง่ของการทนต่อเอทานอลที่สูง และบทบาทที่มีต่อกระบวนการหมักสาโทต่อไป

โดยที่ในเกือบทุกตัวอย่างจะสามารถพบ *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Pichia anomala* อาจมีบทบาทในการย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลร่วมกับราอีกด้วย ทำให้สามารถพบยีสต์

ทั้งสองชนิดได้ในช่วงแรกของการหมักและในตัวอย่างN25 พบว่า *Issatchenkia orientalis* และ *S. cerevisiae* จะมีบทบาทในการหมักให้ได้เอทานอล

4.6 การคัดเลือกราบริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี

ทำการคัดเลือกราที่แยกจากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกได้ โดยเปรียบเทียบการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว(liquefaction) เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส(clear zone) บนจานเพาะเชื้อ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 การเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว (liquefaction) เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส(clear zone) ของราที่แยกจากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้ว

กลุ่ม	จำนวนของรา	ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว	เส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) (เซนติเมตร)	แอกทิวิตีของเอนไซม์ unit(umol/min/ml)	
				แอลฟาอะมัยเลส	กลูโคอะมัยเลส
1	3	++++ - +++++	9.0	0.134 - 0.210	0.032 - 0.034
2	21	+++	5.0-9.0	0.136 - 0.327	0.028 - 0.045
3	28	+ - ++	5.0 - 9.0	0.178 - 0.320	0.014 - 0.040

+ → +++++ หมายถึง ปริมาณของของเหลว(น้ำต้อย)ที่ได้ จากน้อยไปมาก

จากตารางที่ 4.11 พบว่าแอกทีวิตีของอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลส และเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสบน starch agar ไม่มีความสอดคล้องกับความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง(ข้าวเหนียว)ให้กลายเป็นของเหลว(น้ำต้อย) ซึ่งความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลวนั้น เป็นภาพรวมของประสิทธิภาพของเอนไซม์หลายๆชนิดจากจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งคือ รา ในลูกแป้งสุรา ที่สามารถย่อยข้าวเหนียวได้ ซึ่งมีเอนไซม์มากกว่าอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสที่สามารถย่อยข้าวเหนียวได้ นอกจากนี้ starch agar ที่ใช้ทดสอบ แม้จะได้ผลที่สอดคล้องกว่าค่า แอกทีวิตีของอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลส แต่starch agar ไม่เหมือนวัตถุดิบโดยตรงสำหรับการผลิตสาโท ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้เกณฑ์ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็น

ของเหลว ซึ่งเปรียบเทียบความสามารถโดยตรงของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแป้งแต่ละแหล่งตัวอย่าง ในการย่อยข้าวเหนียวซึ่งเป็นวัตถุดิบโดยตรงสำหรับการผลิตสาโท มาคัดเลือกราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดี ซึ่งสามารถแบ่งกลุ่มตามความสามารถของการย่อยแป้งจากมากไปน้อยได้ 3 กลุ่ม (ตารางที่ 4.11)

จากตารางที่ 4.11 เมื่อใช้ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลว(Liquefaction)ได้ดีที่สุดเป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกราที่มีความสามารถย่อยแป้งได้สูงสุด ทำให้เลือกรารหัส NN6/0/9 ซึ่งเมื่อทำการจำแนกชนิด พบว่าเป็น *Mucor heimalis* เป็นราสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลว(Liquefaction)ได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบหาความสามารถในการย่อยแป้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Starch agar) พบว่ามีเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส(clear zone) สูงที่สุดคือ 9.0 เซนติเมตร และมีแอกทีวิตีของอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสเท่ากับ 0.174 และ 0.032 ยูนิต ตามลำดับโดยที่ 1 ยูนิต คือความสามารถในการเปลี่ยนสับสเตรตให้เป็นน้ำตาลปริมาณ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที

4.7 การคัดเลือกยีสต์บริสุทธิ์ที่มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลได้ดี

การศึกษาความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลจากยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces sensu stricto* ที่แยกได้จากวันที่ 9 ของการหมัก เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอล และสามารถทนเอทานอลได้ดี ทำได้โดย ลงเชื้อ *M. hiemalis* N6/0/9 ลงในข้าวเหนียวนึ่ง 200 กรัม บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน เติมน้ำปลอดเชื้อ 400 มิลลิลิตร แบ่งน้ำหมักที่ได้ ลงในขวดปลอดเชื้อขวดละ 5 มิลลิลิตร แล้วจึงลงเชื้อยีสต์ที่แยกได้ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น $5x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วจึงนำน้ำหมักดังกล่าวมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้ ก๊าซโครมาโตกราฟี(GC) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.12

ตารางที่ 4.12 ร้อยละของเอทานอลในน้ำหมักจากยีสต์ *S. cerevisiae* ที่แยกได้ในวันที่9

กลุ่ม	จำนวนยีสต์	ร้อยละของเอทานอล
1	3	7.11-14.50
2	19	3.00-4.81
3	196	0.20-2.83

*แบ่งกลุ่มตามความสามารถในการสร้างเอทานอลในน้ำหมัก

จากตารางที่ 4.12 พบว่ายีสต์ที่สามารถแยกได้จากวันที่ 9 ของการหมักจากทั้ง 3 แหล่งลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วทั้งหมด 218 ไอโซเลต มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลตั้งแต่ร้อยละ 0.201-14.502 แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มตามความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอล พบว่ายีสต์ที่สามารถแยกได้ส่วนใหญ่สร้างเอทานอลได้ต่ำมาก คือเพียง 0.201-2.835 และ จากผลการหาปริมาณเอทานอลที่ยีสต์หมักได้ *Saccharomyces cerevisiae* NK2/9/33 ซึ่งสามารถแยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งNK2 จากจังหวัดหนองคาย สามารถแยกได้ในวันที่ 9 ของการหมัก สามารถหมักให้ได้เอทานอลสูงสุด คือ ร้อยละ 14.502

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง

สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ ได้ เนื่องจากในบริเวณดังกล่าวมีการส่งเสริมให้ทำสาโทเป็นผลิตภัณฑ์ในโครงการหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์(OTOP) ผู้ผลิตลูกแป้งสุราเพื่อทำสาโทจึงมีมากกว่าอำเภออื่นๆ โดยสำรวจพบว่าส่วนมากชาวบ้านจะทำสาโทกันเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน และจะทำเมื่อว่างจากการปลูกพืชไร่ เวลาทำการผลิตลูกแป้งจะทำครั้งละไม่มาก จะเก็บไว้ไม่นาน เมื่อต้องการจึงเริ่มผลิตใหม่ ดังนั้นพบว่าการเก็บตัวอย่างลูกแป้งจึงหาได้ยากมีเฉพาะแหล่งเท่านั้น และแต่ละสูตรจะไม่เหมือนกัน ไม่มีความคงที่ของสูตร แล้วแต่ฤดูกาลหรือการผสมของสัดส่วนสมุนไพรจะแตกต่างกันตามความเหมาะสม เชื้อลูกแป้งก็มักอาศัยเชื้อลูกแป้งเก่าหรือเชื้อที่ยังคงมีอยู่ในบริเวณฟางที่อบลูกแป้ง เมื่อหมักสาโทเสร็จแล้วมักนิยมนำไปกลั่นเป็นสุราขาวไว้ส่งขายต่อไป จากการเก็บตัวอย่างลูกแป้งสุราจาก 42 จังหวัด ได้ทั้งหมด 114 แหล่งตัวอย่าง โดยลักษณะของลูกแป้งที่เก็บได้มี 5 ลักษณะ

5.1.1 มีลักษณะกลมแบน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.0-2.8 เซนติเมตร มีสีขาวนวล หรือคล้ำเล็กน้อย

5.1.2 มีลักษณะกลมแบน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.6-3.4 เซนติเมตร สีขาวนวล

5.1.3 มีลักษณะกลมแบน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.6-3.4 เซนติเมตร สีเขียว

5.1.4 มีลักษณะรีคล้ายเรือกว้าง 6 เซนติเมตร ยาว 10 เซนติเมตร สีขาวคล้ำเล็กน้อยและมีสมุนไพร

5.1.5 มีลักษณะเป็นผง มีสีขาวนวล หรือสีเหลือง

จากตัวอย่างลูกแป้งสุราที่เก็บรวบรวมได้ทั้งหมด 114 แหล่งตัวอย่าง จาก 42 จังหวัด เมื่อนำมาผลิตสาโทเพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมของราและยีสต์ในลูกแป้งในการผลิตสาโท ได้ผลดังตารางที่ 4 ประกอบกับผลการชิมสาโทที่ผลิตได้โดยผู้เชี่ยวชาญ ทำให้คัดเลือกตัวอย่างลูกแป้งได้ 7 ตัวอย่าง ได้แก่ NN6 (จากกิ่ง อ. ภูเพียง) NN25 (จาก อ.เชียงกลาง) NN27(จาก อ.ปัว) LA1(จาก อ.เสริมงาม จ.ลำปาง) SS1(จาก อ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร) NK2(จาก ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย) และ NP1(จากอ.เรณูนคร จ.นครพนม) สำหรับนำไปแยกยีสต์ และรา ในการทดลองต่อไป

5.2 การคัดแยกยีสต์และราจากตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกได้

จากลูกแป้งสุรา 7 แหล่งตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 1,598 ไอโซเลต ซึ่งยีสต์แต่ละไอโซเลต มีจำนวน $1x10^5$-10^8 cfu ต่อลูกแป้ง 1 กรัม ได้ราทั้งหมด 52 ไอโซเลต ราแต่ละไอโซเลตมีจำนวนประมาณ10^4 ต่อลูกแป้ง 1 กรัม ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถแยกราได้ในวันที่เหลือของการหมักสาโท ยกเว้นตัวอย่างลูกแป้ง NK2 และ SS1 ที่สามารถแยกราได้ในวันที่ 3 ของการหมักด้วย ทั้งนี้เนื่องจากภายหลังการผ่าน้ำจะเป็นการสร้างสภาพที่ขาด O_2 ซึ่งเหมาะกับกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยยีสต์ สภาพดังกล่าวที่ไม่เหมาะต่อการเจริญของรา ลักษณะโคโลนีของราที่พบมักจะเป็นสีขาว หรือขาวเทา ฟูเหมือนปุยฝ้าย สปอร์สีดำ เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จะเห็นลักษณะสายใย ก้านชูสปอร์ อับสปอร์ สปอร์ ของราแต่ละชนิดที่แตกต่างกัน ส่วนยีสต์จะพบว่ามีลักษณะโคโลนีสีขาว ขาวครีม หรือขาวนวล เมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ส่วนใหญ่จะเห็นเป็นลักษณะเซลล์รูปกลมรี มีขนาดเล็ก

5.3 การจำแนกราโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและอณูชีววิทยา

จากราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้ง เมื่อนำมาจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาทั้งภายใต้กล้องและดูด้วยตาเปล่า โดยศึกษา ขนาดและลักษณะของสปอร์ขนาดก้านสปอร์ การมีไรซอยด์ การมีคลามัยโดสปอร์ ขนาดของคอลาเมลลา ขนาดของสปอร์แรงเจียม และความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าสามารถจำแนกได้เป็น *Mucor hiemalis* จำนวน12 ไอโซเลต *Mucor racemosus* 30 ไอโซเลต *Mucor indicus* 6 ไอโซเลต *Rhizopus oligosporus* 3 ไอโซเลตและ *Rhizopus oryzae* 1 ไอโซเลต

เมื่อยืนยันผลการจำแนกโดยใช้เทคนิคทางอณูชีววิทยาพบว่าได้ผลตรงตามที่จำแนกโดยใช้วิธีสัณฐานวิทยา ซึ่งในงานวิจัยนี้ถือเป็นรายงานแรกที่ได้ทำการจำแนกราที่แยกได้จากลูกแป้งสุราของไทยถึงระดับสปีชีส์ ในงานวิจัยที่ใกล้เคียงกันได้แก่ รายงานของ Tsuyoshi และคณะ (2004) ที่สามารถจำแนกได้รา *Mucor circinellodes*, *Rhizopus chinensis* จาก Marcha ซึ่งเป็นไวน์ข้าวจากประเทศอินเดีย Lee และ Fujio (1999) ได้รายงานว่า สามารถแยกราจาก Banh men ซึ่งเป็นหัวเชื้อสำหรับการผลิต ruou nep ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของประเทศเวียดนาม และทำการจำแนกโดยใช้สัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมี พบว่าราที่แยกได้เป็น *Rhizopus oryzae, Mucor indicus, Mucor circinilloides* และ *Amylomyces rouxii*

5.4 การจำแนกยีสต์โดยใช้อณูชีววิทยาและลักษณะทางชีวเคมี

จากเดิมที่จะใช้วิธีทางชีวเคมี แต่เนื่องจากในงานวิจัยนี้แยกยีสต์ได้ถึง 1,598 ไอโซเลต ทำให้ต้องใช้เวลานานและค่าใช้จ่ายในการดำเนินการด้วยวิธีทางชีวเคมีสูง ดังนั้นจึงได้เลือกใช้วิธีทาง

อณูชีววิทยา เข้ามาช่วยในการจัดจำแนกแบ่งกลุ่มของยีสต์ก่อน เพื่อเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มไปทดสอบทางชีวเคมีและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอต่อไป โดยได้เลือกใช้วิธี Polymerase chain reaction – Restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้ ทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอจากยีสต์ไอโซเลตต่างๆ และเพิ่มจำนวนบริเวณไรโบโซมอลดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส และทำการตัดผลิตภัณฑ์ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสโดยใช้เอนไซม์ที่จำเพาะ *Hin*FI, *Hha*I และ *Hae*III ได้รูปแบบของชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำให้สามารถจัดกลุ่มของยีสต์ที่แยกจากลูกแป้งได้ทั้งหมด 7 กลุ่ม เลือกยีสต์ตัวแทนกลุ่มเพื่อไปจำแนกชนิกโดย การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และทดสอบทางชีวเคมีจากยีสต์ตัวแทนกลุ่มโดยคัดเลือกแบบสุ่ม พบว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomycopsis fibuligera, Pichia anomala* 2 กลุ่ม, *Issatchenkia orientalis*, *Tolulaspora delbrueckii* และ *Candida glabrata* ตามลำดับ ซึ่งเมื่อทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของตัวแทนยีสต์ในกลุ่มที่ 4 พบว่ามีความคล้ายกับ *Pichia anomala* เพียง 92%จึงทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ D1-D2 ของ 26srDNA ของตัวแทนยีสต์ในกลุ่มที่ 4 แล้วพบว่ามีความคล้ายกับ *Pichia anomala* ถึง 99%แสดงว่ายีสต์ในกลุ่มที่ 4 เป็น *Pichia anomala* แต่มีพอลิมอฟิซึม(Polymorphism) ของยีสต์ในสปีชีส์เดียวกัน ซึ่งการมีพอลิมอฟิซึมเกิดจาก point mutation หรือ small deletion ซึ่งมีอิทธิพลจากสภาพสิ่งแวดล้อมได้(NADAL และคณะ,1996)

5.5 การเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราชนิดต่าง ๆในระหว่างการหมักโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกเพื่อผลิตสาโท

จากการจำแนกยีสต์และราทำให้สามารถทราบถึงการเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราในระดับสปีชีส์ ดังนี้

สามารถพบราได้เฉพาะในวันที่ 0 ของการหมักจาก 5 ตัวอย่างลูกแป้ง (NN6, NN25, NN27, LA1 และ NP1) โดยในตัวอย่างลูกแป้ง NN6 พบ *Mucor racemosus* และ *Mucor hiamalis* จำนวน 3 $\times 10^3$ และ 6 $\times 10^3$ cfu/g ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างลูกแป้งNN25 พบ *Mucor racemosus* และ *Mucor indicus* จำนวน 7 $\times 10^3$ และ 1 $\times 10^3$ cfu/g ตามลำดับ ในตัวอย่างลูกแป้งNN27 พบ *Mucor circinellodes* จำนวน 3 $\times 10^3$ cfu/g ลูกแป้ง LA1 พบ *Mucor racemosus* จำนวน 2 $\times 10^4$ cfu/g และในตัวอย่างลูกแป้ง NP1 พบ *Mucor racemosus* และ *Rhizopus oligosporus* จำนวน 4 $\times 10^3$ และ 3 $\times 10^3$ cfu/g ตามลำดับ

ส่วนตัวอย่างลูกแป้งอีก 2 ตัวอย่าง(NK2 และ SS1) สามารถแยกราได้ในวันที่ 0 และ 3 ของการหมัก คือตัวอย่างลูกแป้งNK2 พบ *Mucor racemosus Rhizopus oryzae Mucor hiemalis* และ *Mucor indicus* จำนวน 1.5 $\times 10^5$ 5 $\times 10^4$ 1 $\times 10^5$และ 1 $\times 10^5$ cfu/g ตามลำดับใน

วันที่ 0 ของการหมักและพบ *Mucor hiemalis* จำนวน 2 $\times 10^5$ cfu/g ในวันที่ 3 ของการหมัก ในตัวอย่างลูกแป้งSS1 พบ *Mucor racemosus* จำนวน 5 $\times 10^4$ cfu/g ในวันที่ 0 ของการหมักและพบ *Mucor racemosus* จำนวน 4 $\times 10^4$ cfu/g ในวันที่ 3 ของการหมัก หลังจากนั้นไม่สามารถแยกราได้จากน้ำหมักสาโทได้อีก การที่สามารถแยกราได้เฉพาะวันที่ 0 ของการหมักอาจเนื่องมาจากในวันที่ 3 ของการหมักรามีอาหารคือแป้ง ที่อุดมสมบูรณ์จึงยังไม่สร้างสปอร์และเมื่อใช้เครื่องstamacherในการแยกเชื้อทำให้สายใยของราซึ่งไม่มีเซบเตต(septate) ฉีกขาดและไม่สามารถเจริญได้ ส่วนการที่สามารถแยกราได้ในวันที่ 3 ของการหมักใน 2 ตัวอย่างลูกแป้งนี้ อาจเนื่องจากมีความเข้มข้นของราสูงกว่าในอีก 5 ตัวอย่างข้างต้น

ในการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้งทุกตัวอย่าง ยกเว้น NN27 เป็นหัวเชื้อ สามารถพบ *Saccharomycopsis fibuligera* ในช่วงแรกของการหมัก โดยในวันที่ 0 ของการหมักพบ *Saccharomycopsis fibuligera* 3 × 10^5 2.8 × 10^6 12 $\times 10^5$ 2 $\times 10^4$ 11 $\times 10^5$ และ 61 $\times 10^5$ cfu/g (ตัวอย่างลูกแป้ง NN6 NN25 LA1 NP1 NK2 และ SS1ตามลำดับ) และพบเฉพาะวันที่ 0 ของการหมักเท่านั้น ยกเว้นในตัวอย่างลูกแป้ง SS1 สามารถพบ *Saccharomycopsis fibuligera* ได้ในวันที่ 3 ของการหมัก จำนวน 7$\times 10^6$ cfu/g แต่การหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN27 ไม่พบ *Saccharomycopsis fibuligera* เลย พบแต่ *Pichia anomala* ในวันที่ 0 และ3 ของการหมักแทน ทั้งนี้อาจขึ้นกับจำนวนของยีสต์ดังกล่าวในลูกแป้ง หากมีน้อยมากอาจไม่พบเลย เช่นกรณีของ NN27 และหากมีมาก(ประมาณ 10^6 cfu/g) ทำให้สามารถพบได้ถึงวันที่ 3 ของการหมัก

นอกจากนี้การหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN6 ยังพบ *P.anomala*(กลุ่ม 4) ในวันที่ 3 ของการหมัก ส่วนการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN25 พบ *Pichia anomala* ในวันที่ 0 และ3 ของการหมัก และพบ *Issatchenkia orientalis* 1$\times 10^7$ 3.5 × 10^8 และ1 $\times 10^8$ cfu/g ในวันที่ 5 7 และ 9 ของการหมักตามลำดับ แต่การหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN27 ไม่พบ *Saccharomycopsis fibuligera* เลย พบแต่ *Pichia anomala* ในวันที่ 0 และ3 ของการหมัก

ในตัวอย่างลูกแป้ง LA1 และ NP1พบ *Pichia anomala* ในวันที่ 0 ของการหมัก จำนวน 1 ×106 และ 1.3$\times 10^5$cfu/g ตามลำดับ ส่วนในตัวอย่างลูกแป้ง NK2 พบ *Candida glabrata* ในวันที่ 0 ของการหมัก จำนวน 2$\times 10^6$ cfu/g พบ *Candida glabrata Tolulaspora delbrueckii* และ *Pichia anomala* จำนวน 5 $\times 10^6$ 2 $\times 10^6$ และ 2 $\times 10^7$cfu/g ตามลำดับ ในวันที่ 3 ของการหมักและพบ*Candida glabrata* จำนวน 4 $\times 10^7$ cfu/g ในวันที่ 5 ของการหมัก และในตัวอย่างลูกแป้ง SS1 พบ *Candida glabrata* จำนวน 3.3 $\times 10^7$ และ 1 $\times 10^8$ cfu/g ในวันที่ 3 และ 5 ของการหมักตามลำดับ ซึ่ง Ciani และคณะ(2006) พบว่า *Tolulaspora delbrueckii* เป็นยีสต์ในกลุ่มnon Saccharomyces ที่สามารถสร้างกลิ่นที่ดีของไวน์ได้

ในการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้งในทุกตัวอย่าง สามารถพบ *Saccharomyces cerevisiae* ตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 9 (ช่วงหลัง)ของการหมัก โดยพบ *S. cerevisiae* เพิ่มจำนวนมากขึ้นในระหว่างการหมักจาก 5.5×10^5- 5.4×10^7,1×10^5- 3.1×10^9 และ 3.0×10^7- 3.0×10^8 cfu/g ตามลำดับ

จากที่เคยมีรายงานว่า ยีสต์จำพวก Non- *Saccharomyces* มักพบเฉพาะในช่วงต้นของการหมัก (ก่อนผ่านำ้) แต่สามารถพบ *Issatchenkia orientalis* ได้ในช่วงหลังของการหมักเท่านั้น (ในวันที่ 5 ถึง 9) จากตัวอย่างลูกแป้งNN25 จึงน่าสนใจที่จะได้มีการศึกษาสมบัติของยีสต์ *Issatchenkia orientalis* ทั้งในแง่ของการทนต่อเอทานอลที่สูง และบทบาทที่มีต่อกระบวนการหมักสาโทต่อไป Clemente-Jimenez และคณะ(2004) ได้รายงานว่าสามารถพบ *Issatchenkia orientalis* ได้ในการหมักไวน์ และพบว่า *Issatchenkia orientalis* สามารถสร้างเอทานอลได้สูงรองจาก S. *cerevisiae* และ *Hanseniaspora uvarum* เท่านั้น และ *I. orientalis* สามารถสร้าง 2-Methyl-1-propano และ3-Methyl-1-butanol ได้ดี ซึ่งสารทั้งสองสารที่ให้กลิ่นดี ซึ่ง Sipicski และคณะ (2001) รายงานว่าความหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์จำพวก non *Saccharomyces* จะเกี่ยวข้องกับการให้กลิ่นที่ดีของไวน์

ผลจากงานวิจัยนี้สอดคล้องกับที่ Perez-Nevado และคณะ (2006), Torija และคณะ (2001) และParaggio(2004) ได้รายงานว่าในช่วงแรกของการหมักไวน์จะมีการเจริญของยีสต์พวก non-*Saccharomyces* ได้ดี ซึ่งอาจเกิดจากมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสในปริมาณสูงและมีแอลกอออล์ต่ำ แต่เมื่อมีการเจริญของ *S. cerevisiae* ถึง 5×10^6 cfu/ml ขึ้นไป ยีสต์พวก non-*Saccharomyces* จะตายลงซึ่งอาจเป็นเพราะเมแทบอไลท์ของ *S. cerevisiae* ที่ยังไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าเป็นอะไร แต่ไม่ใช่ killer toxin และยังสอดคล้องกับ Tamang และ Thapa(2006) ซึ่งพบว่าราสามารถเจริญได้ในช่วงแรกของการหมัก Bhaati Jaanr (ถึงวันที่ 4 ของการหมัก) แต่ยีสต์และแบคทีเรียพวกที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้สามารถเจริญได้โดยเพิ่มขึ้นในช่วง 2 วันแรก และลดลงเพียงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 10 ซึ่งยีสต์ที่สามารถแยกได้ ได้แก่ *Saccharomycopsis fibuligera, Pichia anomala*, *Saccharomyces cerevisiae*และ *Candida glabrata* โดย *Saccharomycopsis fibuligera* เจริญได้ดีใน 2 วันแรกของการหมักเนื่องจาก ทำหน้าที่ในการย่อยแป้งให้กลายเป็นกลูโคส หลังจากนั้น ยีสต์ชนิดอื่นที่สามารถผลิตเอทานอล จะนำกลูโคสไปหมักให้ได้เอทานอลต่อไป

พบว่ายีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่(1164 ไอโซเลต) เป็น *Saccharomyces cerevisiae* เนื่องจาก *Saccharomyces cerevisiae* มีบทบาทในการหมักให้ได้เอทานอล จึงเป็นยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักสาโท ยีสต์ที่มีจำนวนรองลงมาคือ *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Candida glabrata* (184 และ148 ไอโซเลต ตามลำดับ) ซึ่งมีความสำคัญในการหมักสาโทเช่นกัน

โดย *Saccharomycopsis fibuligera* มีบทบาทในการย่อยแป้งจึงสามารถพบ *Saccharomycopsis fibuligera* ได้ในการหมักที่มีข้าวเป็นวัตถุดิบ ส่วน *Candida glabrata* ความสำคัญในการสร้างสารให้กลิ่นรสของสาโท ส่วนยีสต์ที่สามารถพบได้น้อยได้แก่ *Pichia anomala* 2 กลุ่ม, *Issatchenkia orientalis* และ *Tolulaspora delbrueckii* (83, 9, 8 และ 2 ไอโซเลต ตามลำดับ) ทั้ง 3 ชนิด *Pichia anomala* มีบทบาทในแง่การสร้างสารให้กลิ่นรสของสาโท (Aidoo และคณะ, 2006)

ถึงแม้ว่า *Saccharomycopsis fibuligera* จะมีบทบาทในการย่อยแป้ง ทำให้สามารถพบ *Saccharomycopsis fibuligera* ได้ในการหมักที่มีข้าวเป็นวัตถุดิบ แต่ประสิทธิภาพในการย่อยแป้งของ *Saccharomycopsis fibuligera* มีน้อยกว่ารา ดังจะเห็นได้จากในตัวอย่างลูกแป้ง NN27 ที่ไม่พบ *Saccharomycopsis fibuligera* แต่ยังมีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้เป็นของเหลวได้ดี

5.6 ความหลากหลายของยีสต์และราในลูกแป้งสุราที่คัดเลือกได้

เนื่องจากงานวิจัยนี้มีแหล่งตัวอย่างลูกแป้งเป็นจำนวนมาก จึงทำให้การศึกษาความหลากหลายของยีสต์และราเป็นไปได้ยาก และเพื่อการหาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพดีเพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสาโทต่อไป จึงได้ทำการคัดเลือกลูกแป้งสุราที่เมื่อนำมาผลิตสาโทแล้ว ได้สาโทคุณภาพดีในแง่ของกิจกรรมของราและยีสต์และกลิ่นรสของสาโทที่ได้ ทำให้สามารถคัดเลือกลูกแป้งได้ 7 แหล่งตัวอย่าง จาก 114 แหล่งตัวอย่างจากทั้งประเทศ ได้แก่ NN6 (จากกิ่ง อ. ภูเพียง) NN25 (จาก อ.เชียงกลาง) NN27(จาก อ.ปัว) LA1(จาก อ.เสริมงาม จ.ลำปาง) SS1(จาก อ.มหาชัย จ.สมุทรสาคร) NK2(จาก ต.หินโงม อ.เมือง จ.หนองคาย) และ NP1(จากอ.เรณูนคร จ.นครพนม)

จาก 7 แหล่งตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกได้ทั่วประเทศ มี 3 ตัวอย่างที่ได้จากจังหวัดน่าน เพื่อศึกษาความหลากหลายของชนิดของราและยีสต์จากลูกแป้งจากจังหวัดน่าน พบว่าตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วภายในจังหวัดน่านซึ่งประกอบด้วย N6 NN25 และNN27 มีความหลากหลายทางชีวภาพดังนี้ ในตัวอย่างลูกแป้งN6 พบรา *Mucor racemosus* และ *Mucor hiemalis* ในตัวอย่างลูกแป้ง NN25 พบรา *Mucor racemosus* และ *Mucor indicus* และในตัวอย่างลูกแป้ง NN27 พบรา *Mucor indicus* เป็นที่สังเกตว่าราที่พบจากทั้ง 3 แหล่ง มีความซ้ำกันของชนิดของราที่แยกได้จากแหล่งที่ใกล้กัน ยกตัวอย่าง ตามสภาพภูมิประเทศ อำเภอปัวตั้งอยู่ระหว่าง กิ่งอำเภอภูเพียง และ อำเภอเชียงกลาง และพบว่า ราจากลูกแป้ง NN25 (จากอำเภอปัว) มีชนิดที่พบได้จากลูกแป้งทั้งจากอำเภอเชียงกลาง และ จากกิ่งอำเภอภูเพียง ในที่นี้รา *Mucor racemosus* พบได้เช่นกัน ในลูกแป้ง NN6 (จากกิ่งอำเภอภูเพียง) ส่วนรา *Mucor indicus* พบได้เช่นกันในลูก

แป้ง NN27 (จาก อำเภอปัว) แต่ไม่พบ ราชนิดนี้ในลูกแป้ง NN6 ซึ่งมาจากแหล่งที่ไกลออกไป ส่วนชนิดของยีสต์ก็เป็นไปในทำนองเดียวกัน ยกเว้น *S. cerevisiae* ที่พบได้ในช่วงหลัง (ตั้งแต่วันที่ 3 ถึงวันที่ 9) ของการหมักในทุกตัวอย่างสาโท (รูปที่ 5.1)

ในส่วนของยีสต์จำพวก non-*Saccharomyces* พบ *Saccharomycopsis fibuligera* ในช่วงแรกของการหมักเมื่อใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN6 และ NN25 เป็นหัวเชื้อ ส่วนการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้ง NN27 ไม่พบ *Saccharomycopsis fibuligera* แต่พบ *Pichia anomala* เช่นเดียวกันกับตัวอย่างลูกแป้ง NN25 นอกจากนี้ ยังสามารถพบยีสต์ *Pichia anomala*และ *Issatchenkia orientalis* ในสาโทจากตัวอย่างลูกแป้ง NN6 และ NN25 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5.1 แสดงตำแหน่งของอำเภอต่างๆ ในจังหวัดน่านที่เป็นแหล่งของตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วและชนิดของราและยีสต์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งนั้นๆ

ตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วทั่วประเทศ(จากรูปที่ 5.2) ซึ่งประกอบด้วย LA1 SS1 NK2 และ NP1 มีความหลากหลายของชนิดของราและยีสต์ดังนี้ ในตัวอย่างลูกแป้ง LA1 และ SS1พบราเพียง 1 สปีชีส์คือ *Mucor racemosus* ส่วนในตัวอย่างลูกแป้ง NK2 พบรา *Mucor racemosus* *Mucor hiemalis* และ Rhizopus oryzae และในตัวอย่างลูกแป้ง NP1 พบรา *Mucor racemosus* และ *Rhizopus oligosporus* เป็นที่สังเกตว่าราที่พบจากทั้ง 4 แหล่ง มีความซ้ำกันของชนิดของรา *Mucor racemosus* ที่แยกได้จากทุกตัวอย่างลูกแป้ง ส่วนในตัวอย่างลูกแป้ง NK2 และ NP1 พบราที่แตกต่างจากแหล่งอื่นๆ คือ *Rhizopus oryzae* และ *Rhizopus oligosporus* ตามลำดับ

ในส่วนของยีสต์จำพวก non-*Saccharomyces* พบ *Saccharomycopsis fibuligera* ในช่วงแรกของการหมักเมื่อใช้ตัวอย่างลูกแป้งทุกตัวอย่าง เป็นหัวเชื้อ และสามารถพบ *Pichia anomala* ในทุกตัวอย่างลูกแป้งยกเว้น ตัวอย่างลูกแป้ง SS1 อีกทั้งยังสามารถพบ *Candida glabrata* ในตัวอย่างลูกแป้ง NP1 NK2และ SS1 นอกจากนี้ยังสามารถพบ *Torulaspora delbrueckii* ในสาโทจากตัวอย่างลูกแป้ง NK2 อีกด้วย(รูปที่ 5.2)

ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความหลากหลายของยีสต์และราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งที่ได้รับการคัดเลือกจากจังหวัดน่านกับหลากหลายทางชีวภาพของยีสต์และราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งที่ได้รับการคัดเลือกจากทั่วประเทศ พบว่าตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกจากทั่วประเทศมีความหลากหลายของชนิดของราและยีสต์สูงกว่าในตัวอย่างลูกแป้งที่ได้จากจังหวัดเดียว(น่าน)

อย่างไรก็ตาม จะเห็นว่าราและยีสต์ในตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกได้จากทั่วประเทศ มีความหลากหลายไม่มากนักกล่าวคือ พบรา 5 ชนิด และพบยีสต์ 6 ชนิด เท่านั้น ปัจจัยต่างๆที่ทำให้ได้ความหลากหลายไม่มาก ได้แก่ วัตถุดิบที่เป็นข้าว, ส่วนประกอบของลูกแป้งที่มีสมุนไพรเป็นตัวคัดเลือกจุลินทรีย์ และการหมักที่มีแอลกอฮอล์เกิดขึ้น(Querol และ Fleet, 2006)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 5.2 แสดงตำแหน่งของจังหวัดต่างๆ ที่เป็นแหล่งของตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วและชนิดของราและยีสต์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งนั้นๆ

5.7 การศึกษาหาประสิทธิภาพของราและยีสต์ที่แยกได้

แอกทีวิตีของอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลส และเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสบน starch agar ไม่มีความสอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลว ซึ่งความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลวเป็นภาพรวมของประสิทธิภาพของเอนไซม์หลายๆชนิดที่ย่อยแป้งได้ (ซึ่งมีนอกเหนือไปจากเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลส) อีกทั้งการเปรียบเทียบความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลวเป็นการเปรียบเทียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์จากจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง คือ รา ในการเปลี่ยนวัตถุดิบในการผลิตสาโทโดยตรงคือ ข้าวเหนียวให้กลายเป็นน้ำต้อย ดังนั้นจึงได้เลือกใช้เกณฑ์ความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งให้กลายเป็นของเหลวมาคัดเลือกราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งได้ดี และพบว่ารารหัส NN6/0/9 เมื่อทำการจำแนกชนิด พบว่าเป็น *Mucor heimalis* มีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็งเป็นของเหลว(Liquefaction)ได้ดีที่สุด เมื่อทดสอบหาความสามารถในการย่อยแป้งบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Starch agar) พบเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส(clear zone) สูงที่สุดคือ 9.0 เซนติเมตร และมีแอกทีวิตีของอัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสเท่ากับ 0.174 และ 0.032 ยูนิต ตามลำดับ โดยที่ 1 ยูนิต คือความสามารถในการเปลี่ยนสับสเตรตให้เป็นน้ำตาลปริมาณ 1 ไมโครโมลในเวลา 1 นาที

จากตารางที่ 4.9 พบว่ายีสต์ที่สามารถแยกได้จากวันที่ 9 ของการหมักจากทั้ง 3 แหล่งลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วทั้งหมด 218 ไอโซเลต มีความสามารถในการหมักให้ได้เอทานอลตั้งแต่ร้อยละ 0.201-14.502 และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NK1/9/33 สามารถหมักให้ได้เอทานอลสูงสุด คือร้อยละ 14.502

ราและยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งลูกแป้งที่คัดเลือกได้จากทั่วประเทศนี้จะเป็นวัตถุดิบเบื้องต้นสำหรับการศึกษา เพื่อการปรับปรุงคุณภาพหรือรักษาคุณภาพของสาโทที่ผลิตได้ในแต่ละชุดการผลิต ตลอดจนการศึกษานี้ได้อนุรักษ์ราและยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ จากลูกแป้งที่คัดเลือกแล้วโดยทำการเก็บสายพันธุ์ไว้ที่ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

งานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึง ความหลากหลายทางชีวภาพ การเปลี่ยนแปลงประชากรของยีสต์และราในระหว่างการหมัก ตลอดจนสามารถแยกราและยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งและหมักให้ได้เอทานอลได้ดี ทำให้สามารถนำความรู้จากงานวิจัยนี้ไปพัฒนาคุณภาพของสาโทโดยการใช้หัวเชื้อบริสุทธิ์ผสมเพื่อให้สามารถคงคุณภาพของสาโทในทุกชุดของการผลิตได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กฤษฎา ขุนแหลม. 2542 . ปัญหาพิเศษเรื่องการศึกษาประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้ง ภาควิชาวิทยาศาสตร์และ เทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

จิราภรณ์ สุขุมาวาลี. 2518 .การศึกษากิจกรรมเอนไซม์ของลูกแป้ง วิทยานิพนธ์ปริญญาปริญญามหาบัณฑิต แผนกวิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เจริญ เจริญชัย. 2545 . เอกสารประกอบการอบรมหลักสูตรการผลิตสุราพื้นบ้าน สำหรับผู้ประกอบการ ภาควิชาวิศวกรรมอาหาร คณะวิศวกรรมและเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จ.ปทุมธานี และสมาคมผู้ผลิตไวน์ผลไม้และสุราพื้นบ้านไทย.

นภา โล่ห์ทอง. 2535 . กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต กรุงเทพฯ: พันนี พัลลิชชิ่ง.

มนตรี เชาว์สังเกต. 2521 . การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อใช้ผลิตไวน์ข้าว วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มาตรฐานอุตสาหกรรมสุรา. 2516 .กรุงเทพฯ : กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. กระทรวงอุตสาหกรรม

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์ 2535 .ข้าวสู่ไวน์ วารสารเกษตร 8 (1): 49-54

สมพร สินธารา. 2544 .การแยก การจัดจำแนก และการเก็บรักษายีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพัฒน์ กุมพิทักษ์ และกำพล กาหลง. 2545 . กรรมวิธีการผลิต อุ สาโท น้ำตาลเมา และเหล้ากลั่น เกษตรกรรมธรรมชาติ. ฉบับที่ 8/2545: บริษัทฐานการพิมพ์ จำกัด

สุภมาส ไข่คำ. 2544. การศึกษาคุณภาพของสุรากลั่นพื้นบ้านที่ผลิตในเขตภาคเหนือตอนบน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ภาษาอังกฤษ

Aidoo, K.E. Rob Nout, M.J. Sarkar, P.K. 2006. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermentation. FEMS Yeast Res. 6:30-39

Barnett, J.A. Payne, R.W. and Yarrow, D. 1999. Yeast: Characteristics and identification. Cambridge University press. England.

Cappello, M.S. Bleve, G. Grieco,F. Dellagio,F. and Zacheo, G. 2004. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. J. Applied Microbiol. 97:1274-1280

Cereia, M. Terenzi, H. F. Jorge, J. A. Greene, L. J. Rosa, J. C. De Lourdes, M. and Polizeli, T.M. 2000. Glucoamylase activity from the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum.* Biochemical and regulatory properties. J Basic Microbiol. 40(2):83 – 92

Ciani, M. Beco, L. Comitini, F. 2006. Fermentation behaviour and metabolic interactions of multistarter wine yeast fermentations. Inter. J. Food Microbiol.108:239-245

Clemente-Jimenez, J. M. Mingorance-Cazorla,L. Mart!ınez-Rodr!ıguez, S. Heras-V!azquez, F. J. L. and Rodr!ıguez-Vico F. 2004. Molecular characterization and oenological properties of wine yeasts isolated during spontaneous fermentation of six varieties of grape must. Food Microbiol. 21:149-155

de Hoog, G.S. , Guarro, J. , Gene J. and Figueras M.J. 2000. Atlas of clinical Fungi 2nd edition Centraalbureau voor Schimmelcultures Universitat Rovira i Virgili Netherlands

Ellis, J. Wang, H. J. and Hesseltine. 1974. Rhizopus and chlamydomucor strains surveyed for milk-clotin, amylolytic and antibiotic activities. Mycologia. 66 :593-599

Esteve-Zarzoso, B. Belloch, C. Uruburu, F. and Querol, A. 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. Inter J Syst Bact. 49: 329–337

Grace, M.R. 1977. Cassava Starch and its Use. Cassavas Processing. Rome :FAO Consultant : 87-100

Granchi, L. Bosco, M. Messini, A. and Vincencini, M. 1999 . Rapid detection and qualification of yeast species during spontaneous wine fermentation by PCR-RFLP analysis of the rRNA ITS region. J. App. Microbiol. 87:949-956.

Heras-Vazquez, F. J. L. Mingorance-Cazola, L. Clemnte-Jimenez, J. M. and Rodriguez-Vico, F. 2003. Identification of yeast species from orange fruit and juice by RFLP and sequence analysis of the 5.8S rRNA gene and the two internal transcribed spacers. FEMS Yeast Res. 3:3-9.

Inui, T. Takeda, Y. and Iizuka, H. 1965. Taxonomical studies on Genus Rhizopus. J Gen Appl Microbiol. 11:103-107

Le Mense, E. H. Van Lamen, J. M. and Langlykke A. P. 1947. Production of mold amylases in submerged culture. J. Bact. 54:144-159

Lee, A.C. and Fujio, Y. 1999. Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. World J Microbiol and Biotechnol. 15: 51-55

Miller, G.L., 1959. Use of dinitro salicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chem. 31: 426–428.

Nadal, D. Colomer, B. and Pina, B. 1996. Molecular Polymorphism Distribution in Phenotypically Distinct Populations of Wine Yeast Strains. Appl. Environment. Microbiol. 1944–1950

Paraggio, M. 2004.Biodiversity of a natural population of Saccharomyces cerevisiae and Hanseniaspora uvarum from Agloanico del vulture. Food Technol. Biotechnol. 42(3):165-168

Pérez-Nevado, F. Albergaria, H. Hogg, T. and Girio, F. 2006. Cellular death of two non-*Saccharomyces* wine-related yeasts during mixed fermentations with *Saccharomyces cerevisiae.* Inter J Food Microbiol. 108 (3): 336-345

Peltier, G. L. and Beckord, L. D . 1945. Source of amylase producing bacteria. J. Bact. 50:711-714.

Porter, R. Mc Cleskey, C. S. and Levine, M. 1937. The facultative assimilating bacteria producing gas from lactose. J. Bact. 33:163-182.

Querol, A. and Fleet, G. 2006.Yeast in Food and Beverages. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany

Sabate, J. Cano J. Esteve-Zarzoso, B. and Guillamon, J.M. 2002. Isolation and identification of yeasts associated with vineyard and winery by RFLP analysis of ribosomal gene and mitochondria DNA . Microbiol. Res.157:267-274.

Samson, R.A. Hoekstra, E.S. Frisvad, J.C. Filtenborg, O. 2002. Introduction to food-and airborne fungi. Centraalbeau voor Schimmelculture. Utrecht, Netherland

Sipiczic, M. Romano, P. Lipani, G. Miklos, I. and Antunovics, Z. 2001. Analysis of yeast derived from natural fermentation in a Tokaj winery. Antonie van Leeuwanhoek. 79:97-105

Sujaya, I.N. Antara, N.S. Sone, T. Tamura, Y. Aryanta, W.R. Yokota, A. Asano, K. and Tomita, F. 2004. Identification and characterization of yeasts in brem, a traditional Balinese rice wine. World J Microbiol and Biotechnol. 20: 143–150

Sukumavasi, J. Kato, K. and Harada, T. 1973. Glucoamylase of a strain of *Endomycopsis fibuligera* isolated from mold bran (Look Pang) of Thailand. J. Ferment. Technol. 53(8):559-565.

Tamang, J.P. and Thapa, S. 2006. Fermentatopn Dynamics During Production of Bhaati Jaanr, a Treditional Fermented Rice Beverage of the Eastern Himalayas. Food Biotechnol. 20:251-261

Tester, R. F. Morrison, W. R.1990. Swelling and gelatinization of cereal starches. I, Effects of amylopectin, amylose, and lipids. Cereal chemistry 67: 551-557

Torija, M.J. Rozes, N. Poblet, M. Guillamon, J.M. Mas , A. 2001.Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. Antonie van Leeuwanhoek.79: 345-352

Tsuyoshi, N. Fudou, R. Yamanaka, S. Kozaki, M. Tamang, N. Thapa, S. and Tamang J. P. 2005. Identification of yeast strains isolated from marcha in Sikkim, a microbial starter for amylolytic fermentation . Inter J Food Microbiol. 99:135-146.

Walter, W. W. and Nagesh, S. M. 1965. Microbial amylase. Advances in Appli Microbiol. 7:273-304.

Yoshizawa, K. 1985. Rice in brewing. In Juliano B. O. (ed.). Rice chemistry and technology. The American association of Cereal Chemists Inc. Minnesota

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การกำหนดรหัสลูกแป้งโดยกำหนดทั้งรหัสจังหวัด ชนิดของลูกแป้ง โดยกำหนดรหัสใช้เกณฑ์ดังต่อไปนี้

-อักษรภาษาอังกฤษ 2 ตัวอักษรแทนจังหวัด

-ตัวเลข 2 หลักหลังใช้แทนลำดับที่ของลูกแป้งจากจังหวัดเดียวกัน

เช่น NN 1หมายถึง ลูกแป้งสุราตัวอย่างที่ 1 จากจังหวัดน่าน

NN28 หมายถึง ลูกแป้งสุราตัวอย่างที่ 28 จากจังหวัดน่าน

การกำหนดรหัสเชื้อยีสต์และรา โดยใช้เกณฑ์ในการกำหนดรหัสดังนี้

-รหัส 3-4 ตัวแรกเป็นรหัสลูกแป้งที่นำมาแยก

-ตัวเลขตัวกลางคือวันที่ทำการแยกเชื้อในระหว่างการหมักสาโทโดยใช้ตัวอย่างลูกแป้งที่คัดเลือกแล้ว

-ใช้ Y ต่อจากรหัสลูกแป้งแทน ยีสต์

ใช้ M ต่อจากรหัสลูกแป้งแทน รา

-ใช้ตัวเลข 2 หลักต่อจาก Y หรือ M แสดงลำดับที่ไอโซเลท

เช่น NN6/0/Y1 หมายถึง ยีสต์ไอโซเลตที่ 1ทำการแยกเชื้อในระหว่างการหมักสาโทวันที่ 0 โดยใช้ตัวอย่างลูกแป้งสุราตัวอย่างที่ 6 จากจังหวัดน่าน

NN1/0/M1 หมายถึง ราไอโซเลตที่ 1 ทำการแยกเชื้อในระหว่างการหมักสาโทวันที่ 0 โดยใช้ตัวอย่างลูกแป้งสุราตัวอย่างที่ 6 จากจังหวัดน่าน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Potato dextrose agar (PDA)

Potato starch	200	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายสารสามชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล เป็น 4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Yeast malt extract agar (YM)

Yeast extract	3	กรัม
malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายสารสี่ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล เป็น 4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Rose bengal agar

peptone	5	กรัม
glucose	10	กรัม
potassium dihydrogen phosphate	1	กรัม
magnesium sulfate	0.5	กรัม
Rose Bengal	0.05	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

L-lysine medium

Glucose	44.5	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	1.78	กรัม
Magnesium sulphate	0.89	กรัม
Calcium chloride fused	0.178	กรัม
Sodium chloride	0.089	กรัม
Adenine	0.00178	กรัม
DL-methionine	0.000891	กรัม
L-histidine	0.000891	กรัม
DL-tryptophane	0.000891	กรัม
Boric acid	0.0000089	กรัม
Zinc sulphate	0.0000356	กรัม
Ammonium molybdate	0.0000178	กรัม
Manganese sulphate	0.0000356	กรัม
Ferrous sulphate	0.0002225	กรัม
Lysine	1.0	กรัม
Inositol	0.02	กรัม
Calcium pantothenate	0.002	กรัม
Aneurine	0.0004	กรัม
Pyridoxine	0.0004	กรัม
p-aminobenzoic acid	0.0002	กรัม
Nicotinic acid	0.0004	กรัม
Riboflavin	0.0002	กรัม
Biotin	0.000002	กรัม
Folic acid	0.000001	กรัม

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายกรดแลกติกเข้มข้นร้อยละ 10 ให้มีความเป็นกรดด่างเป็น 4.8 แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Starch agar

Soluble starch	5	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายสารทั้งสองในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Acetate agar

Sodium acetate	4	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายสารทั้งสองในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

Malt extract agar

Malt extract	5	กรัม
Agar	20	กรัม

ละลายสารทั้งสองในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

V8 medium

V8 juice	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	20	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล ทำให้มีความเป็นกรดด่างเป็น 5.5 แล้วไปกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

นำมาผสมกับน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:2, 1:9 หรือ 1:19 แล้วจึงเติม Agar ให้เป็น 0.2 %แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

C-assimilation medium

Yeast nitrogen base	6.7	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วไปกรองด้วยหัวกรอง 0.22 ไมครอน ทำเป็น 10x base medium เมื่อใช้จริงให้เตรียม ดังนี้

10x base medium	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	4.5	มิลลิลิตร

เติมแหล่งคาร์บอนต่างๆ กัน 10 ชนิด ได้แก่ กลูโคส กาแลกโตส ซอร์โบส กลูโคซามีน ไรโบส ซูโครส กลีเซอรอล มอลโทส เมทานอล และแรมโนส ที่กรองด้วยหัวกรอง 0.22 ไมครอนแล้ว ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 มิลลิโมลาร์

N-assimilation medium

Yeast carbon base	11.4	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วไปกรองด้วยหัวกรอง 0.22 ไมครอน ทำเป็น 10x base medium เมื่อใช้จริงให้เตรียม ดังนี้

10x base medium	0.5	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	4.5	มิลลิลิตร

เติมแหล่งไนโตรเจนคือ กลูโคซามีนที่กรองด้วยหัวกรอง 0.22 ไมครอนแล้ว ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 มิลลิโมลาร์

Fermentation medium

Yeast extract	5	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ใส่หลอด Durham ลงไปด้วย แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เติมแหล่งไนโตรเจนคือ กลูโคซามีน ที่กรองด้วยหัวกรอง 0.22 ไมครอนแล้ว ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 50 มิลลิโมลาร์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

1. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ N6/9/1 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ Saccharomyces cerevisiae

Score = 1360 bits (736), Expect = 0.0
Identities = 744/747 (99%), Gaps = 3/747 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    tttttttGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  58   TTTTTTTGTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGGCAAGAAGACAAGAGATGGAGA  117

Query  61   GTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  118  GTCCAGCCGGGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTCTTGCTAGGCTTGTAAGTTTCTTTCTTGC  177

Query  121  TATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAAT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  178  TATTCCAAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTTGTTATAGGACAATTAAAACCGTTTCAAT  237

Query  181  ACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCG  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  238  ACAACACACTGTGGAGTTTTCATATCTTTGCAACTTTTTCTTTGGGCATTCGAGCAATCG  297

Query  241  GGGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  298  GGGCCCAGAGGTAACAAACACAAACAATTTTATTTATTCATTAAATTTTTGTCAAAAACA  357

Query  301  AGAATTTTCGTAACTGGAAATTTTAAAATATTAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  358  AGAATTTTCGTAACTGGAAATTTTAAAATATTAAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGT  417

Query  361  TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  418  TCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAATTGCAGAATTCCGT  477

Query  421  GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  478  GAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAGGGGGCATGCCTGTT  537

Query  481  TGAGCGTCATTTCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  538  TGAGCGTCATTTCCTTCTCAAACATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACTCTTTGGAGTTAA  597

Query  541  CTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGttttttttCCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGT  600
            |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||
Sbjct  598  CTTGAAATTGCTGGCCTTTTCATTGGATGTTTTTTTT-CCAAAGAGAGGTTTCTCTGCGT  656

Query  601  GCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTT  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  657  GCTTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCGTTTTAGGTTTTACCAACTGCGGCTAATCTTTTT  716

Query  661  TATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCT  720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  717  TATACTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGTCTAGGCGAACAATGTTCT  776

Query  721  TAAAGTT-GACCTCAAATCAGG-AGGA  745
            ||||||| ||||||||||||| ||||
Sbjct  777  TAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGA  803
```

2. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ N6/0/1 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Saccharomycopsis fibuligera* strain 21511

Score = 1035 bits (560), Expect = 0.0
Identities = 560/560 (100%), Gaps = 0/560 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  4    TATTTGTTTTTAGACCTGCGCTTAACTGCGCGGTTTAATAAACTCTTATACACAGTGTTT  63
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  5    TATTTGTTTTTAGACCTGCGCTTAACTGCGCGGTTTAATAAACTCTTATACACAGTGTTT  64

Query  64   TTGTTTGCGAATTTGGTTTAGTTTGTTGGTTTTCATTCGAAAGGATGAAGATTGATTGCT  123
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  65   TTGTTTGCGAATTTGGTTTAGTTTGTTGGTTTTCATTCGAAAGGATGAAGATTGATTGCT  124

Query  124  AAATCTTATTCAGCTTTTTAAACTCAGATCTCTTTTTAAGAGAAATGTAttttttAATT  183
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  125  AAATCTTATTCAGCTTTTTAAACTCAGATCTCTTTTTAAGAGAAATGTATTTTTTTAATT  184

Query  184  ACAACTAGTCGATTTTACAAACTAAAAGTTTAAAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTC  243
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  185  ACAACTAGTCGATTTTACAAACTAAAAGTTTAAAACTTTCAGCAACGGATCTCTTGGTTC  244

Query  244  TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA  303
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  245  TCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAATTGCGATAAGTAATGTGAATTGCAGATTTTCGTGA  304

Query  304  ATCATCGAATCTTTGAACGCATATTGCGCTCTATAGTATTCTATAGAGCATGCCTGTTTG  363
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  305  ATCATCGAATCTTTGAACGCATATTGCGCTCTATAGTATTCTATAGAGCATGCCTGTTTG  364

Query  364  AGCGTCATTTCTCTCTTAAACCTTTGGGTTTAGTATTGAAGGTTGTGTTAGCTTCTGCTA  423
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  365  AGCGTCATTTCTCTCTTAAACCTTTGGGTTTAGTATTGAAGGTTGTGTTAGCTTCTGCTA  424

Query  424  ACTCCTTTGAAATGACTTGGCAATTGATTGAGTTTTCCATATATTTGCTTAAGGATTTAA  483
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  425  ACTCCTTTGAAATGACTTGGCAATTGATTGAGTTTTCCATATATTTGCTTAAGGATTTAA  484

Query  484  TATTAGGTTCTACCAACTTATTAAATACCCTTTTGCGAAGGACTTACTCGTGTATCAAGG  543
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  485  TATTAGGTTCTACCAACTTATTAAATACCCTTTTGCGAAGGACTTACTCGTGTATCAAGG  544

Query  544  CCTTATAACTTTGTCATTAA  563
            ||||||||||||||||||||
Sbjct  545  CCTTATAACTTTGTCATTAA  564
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ N27/0/30 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Pichia anomala* strain WM 825 100%

Score = 1005 bits (544), Expect = 0.0
Identities = 544/544 (100%), Gaps = 0/544 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    TCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGttttttttG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  11   TCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCTAGTTTTTTTG  70

Query  61   AACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACAttttttttAA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  71   AACTTTGCTTTGGGTGGTGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGGTCTAAACACATTTTTTTTAA  130

Query  121  TGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAAATTAAAATCTTCAAAAC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  131  TGTTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAACAAAAATTAAAATCTTCAAAAC  190

Query  181  TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  191  TTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGT  250

Query  241  ATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  251  ATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCACCCTCTGG  310

Query  301  TATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTAT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  311  TATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCAAACCTTCGGGTTTGGTAT  370

Query  361  TGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  371  TGAGTGATACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATATTGACTTAGCAAGAGTGTACTAATAA  430

Query  421  GCAGTCTTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAACTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  431  GCAGTCTTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAACTCGTTATATCAGCTAGGCAGGTT  490

Query  481  TAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAATCAGGT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  491  TAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAACTAAAAGTTTGACCTCAAATCAGGT  550

Query  541  AGGA  544
            ||||
Sbjct  551  AGGA  554
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ N6/3.2/24 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Pichia anomala* strain WM 825 92%

Length=571

Score = 811 bits (439), Expect = 0.0
Identities = 532/573 (92%), Gaps = 22/573 (3%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    ATTATAGTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    ATTATAGTATTCTATTGCCAGCGCTTAATTGCGCGGCGATAAACCTTACACACATTGTCT  60

Query  61   AGttttttGAACTTTGCTTTGGGTAGGCT-TTTATGGC-T--TGCCCAGAGGACAACTA  116
            |||||||||||||||||||||||| || |    |||| |  |||||| |||    |||
Sbjct  61   AGTTTTTTTGAACTTTGCTTTGGGT-GG-TGAGCCTGGCTTACTGCCCAAAGG---TCTA  115

Query  117  AACACATTTTTTACAAATGTTTTAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAAC-AA  175
            ||||||||||||   |||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||
Sbjct  116  AACACATTTTTT--TAATG-TTAAAACCTTTAACCAATAGTCATGAAAATTTTTAACAAA  172

Query  176  AATTAAAATCTTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACG  235
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  173  AATTAAAATCTTCAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCAACGATGAAGAACG  232

Query  236  CAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  295
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  233  CAGCGAAATGCGATACGTATTGTGAATTGCAGATTTTCGTGAATCATCGAATCTTTGAAC  292

Query  296  GCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCA  355
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  293  GCACATTGCACCCTCTGGTATTCCAGAGGGTATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCTCTCTCA  352

Query  356  AACCTTTGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTTAAATAGGGTTAACTTGAAATAATGTC  415
            |||||| |||||||||||||||||||||||| ||   |||||||||||||||| || |
Sbjct  353  AACCTTCGGGTTTGGTATTGAGTGATACTCTGTCAA---GGGTTAACTTGAAATATTGAC  409

Query  416  TTAGCAAGAGTGTACTAATTTAT-ACGTCTTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAAC  474
            |||||||||||||||||  |  | ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  410  TTAGCAAGAGTGTACTAATA-AGCA-GTCTTTCTGAAATAATGTATTAGGTTCTTCCAAC  467

Query  475  TCGTTATATCAGCTAGGCAGATGAATA-GTATTTTAGGCTCGGCTTAACAAT--TAAACT  531
            |||||||||||||||||| |  | | |||||||||||||||||||||   ||||||
Sbjct  468  TCGTTATATCAGCTAGGCAGGTTTAGAAGTATTTTAGGCTCGGCTTAACAACAATAAACT  527

Query  532  AAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC  564
            |||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  528  AAAAGTTTGACCTCAAATCAGGTAGGACTACCC  560
```

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ N25/7/3 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Issatchenkia orientalis*

Score = 907 bits (491), Expect = 0.0
Identities = 496/498 (99%), Gaps = 1/498 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  3    TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTACTACTACACTGCGTGAGCGG  62
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  1    TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTACTGTGATTTAGTACTACACTGCGTGAGCGG  60

Query  63   AACGAAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTAC  122
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   AACGAAAACAACAACACCTAAAATGTGGAATATAGCATATAGTCGACAAGAGAAATCTAC  120

Query  123  GAAAAAACAAACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGC  182
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  GAAAAAACAAACAAAACTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAGCGC  180

Query  183  AGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGC  242
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  AGCGAAATGCGATACCTAGTGTGAATTGCAGCCATCGTGAATCATCGAGTTCTTGAACGC  240

Query  243  ACATTGCGCCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGCG  302
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  ACATTGCGCCCCTCGGCATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCGTTTCCATCTTGCG  300

Query  303  CGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACG-TGTAAAGAGCGTCGGAGCTGCGACT  361
            |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  CGTGCGCAGAGTTGGGGGAGCGGAGCGGACGACGCTGTAAAGAGCGTCGGAGCTGCGACT  360

Query  362  CGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAACTAGACtttttttCAGGGACGCTTGGCG  421
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  CGCCTGAAAGGGAGCGAAGCTGGCCGAGCGAACTAGACTTTTTTTCAGGGACGCTTGGCG  420

Query  422  GCCGAGAGCGAGTGTTGCGAGACAACAAAAAGCTCGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCC  481
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  GCCGAGAGCGAGTGTTGCGAGACAACAAAAAGCTCGACCTCAAATCAGGTAGGAATACCC  480

Query  482  GCTGAACTTAAGCATATC  499
            ||||||||||||||||||
Sbjct  481  GCTGAACTTAAGCATATC  498
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ NK2/3.1/24 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ Torulaspora delbrueckii

Score = 1343 bits (727), Expect = 0.0
Identities = 727/727 (100%), Gaps = 0/727 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    ATCTATATGAATGAAGTTAGAGGACGTCTAAAGATACTGTAAGAGAGGATCTGGTTCAAG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36   ATCTATATGAATGAAGTTAGAGGACGTCTAAAGATACTGTAAGAGAGGATCTGGTTCAAG  95

Query  61   ACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTGCGGCTTGGTTCGCCTTTTGCGGAACATGTCTTTTCTC  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96   ACCAGCGCTTAATTGCGCGGTTGCGGCTTGGTTCGCCTTTTGCGGAACATGTCTTTTCTC  155

Query  121  GTTGTTAACTCTACTTCAACTTCTACAACACTGTGGAGTTTTCTACACAACTTTTCTTCT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  156  GTTGTTAACTCTACTTCAACTTCTACAACACTGTGGAGTTTTCTACACAACTTTTCTTCT  215

Query  181  TTGGGAAGATACGTCTTGTGCGTGCTTCCCAGAGGTGACAAACACAAACAACTTTTTATT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  216  TTGGGAAGATACGTCTTGTGCGTGCTTCCCAGAGGTGACAAACACAAACAACTTTTTATT  275

Query  241  ATTATAAACCAGTCAAAACCAATTTCGTTATGAAATTAAAAATATTTAAAACTTTCAACA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  276  ATTATAAACCAGTCAAAACCAATTTCGTTATGAAATTAAAAATATTTAAAACTTTCAACA  335

Query  301  ACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  336  ACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGTGAA  395

Query  361  TTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  396  TTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCTTGGTATTCCAG  455

Query  421  GGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCTTCTCAAACAATCATGTTTGGTAGTGAGTGAT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  456  GGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCTTCTCAAACAATCATGTTTGGTAGTGAGTGAT  515

Query  481  ACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATTGCTAGCCTGTTATTTGGTTGTGATTTTGCTGGCT  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  516  ACTCTGTCAAGGGTTAACTTGAAATTGCTAGCCTGTTATTTGGTTGTGATTTTGCTGGCT  575

Query  541  TGGATGACTTTGTCCAGTCTAGCTAATACCGAATTGTCGTATTAGGTTTTACCAACTTCG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  576  TGGATGACTTTGTCCAGTCTAGCTAATACCGAATTGTCGTATTAGGTTTTACCAACTTCG  635

Query  601  GCAGACTGTGTGTTGGCTCGGGCGCTTTAAAGACTTTGTCGTAAACGATTTATCGTTTGT  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  636  GCAGACTGTGTGTTGGCTCGGGCGCTTTAAAGACTTTGTCGTAAACGATTTATCGTTTGT  695

Query  661  TTGAGCTTTTCGCATACGCAATCCGGCGAACAATACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAG  720
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  696  TTGAGCTTTTCGCATACGCAATCCGGCGAACAATACTCTCAAAGTTTGACCTCAAATCAG  755

Query  721  GTAGGAA  727
            |||||||
Sbjct  756  GTAGGAA  762
```

7. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของยีสต์ NK2/0/12 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ Candida glabrata

Score = 1247 bits (675), Expect = 0.0
Identities = 677/679 (99%), Gaps = 0/679 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    TCCTGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTTGGTGGGTGTTCTGCAGTGGGGGGAGGGAGCCGAC  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  140  TCCTGCCTGCGCTTAAGTGCGCGGTTGGTGGGTGTTCTGCAGTGGGGGGAGGGAGCCGAC  199

Query  61   AAAGACCTGGGAGTGTGCGTGGATCTCTCTATTCCAAAGGAGGTGTTTTATCACACGACT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  200  AAAGACCTGGGAGTGTGCGTGGATCTCTCTATTCCAAAGGAGGTGTTTTATCACACGACT  259

Query  121  CGACACTTTCTAATTACTACACACAGTGGAGTTTACTTTACTACTATTCTTTTGTTCGTT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  260  CGACACTTTCTAATTACTACACACAGTGGAGTTTACTTTACTACTATTCTTTTGTTCGTT  319

Query  181  GGGGGAACGCTCTCTTTCgggggggAGTTCTCCCAGTGGATGCAAACACAAACAAATAtt  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  320  GGGGGAACGCTCTCTTTCGGGGGGGAGTTCTCCCAGTGGATGCAAACACAAACAAATATT  379

Query  241  tttttAAAATAATTCAGTCAACACAAGATTTCTTTTAGTAGAAAACAACTTCAAAACTTT  300
            |||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  380  TTTTTAAACTAATTCAGTCAACACAAGATTTCTTTTAGTAGAAAACAACTTCAAAACTTT  439

Query  301  CAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAAT  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  440  CAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAAT  499

Query  361  GTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTAT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  500  GTGAATTGCAGAATTCCGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCTCTGGTAT  559

Query  421  TCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCTTCTCAAACACRTTGTGTTTGGTAGTG  480
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  560  TCCGGGGGGCATGCCTGTTTGAGCGTCATTTCCTTCTCAAACACGTTGTGTTTGGTAGTG  619

Query  481  AGTGATACTCTCGTTTTTGAGTTAACTTGAAATTGTAGGCCATATCAGTATGTGGGACAC  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  620  AGTGATACTCTCGTTTTTGAGTTAACTTGAAATTGTAGGCCATATCAGTATGTGGGACAC  679

Query  541  GAGCGCAAGCTTCTCTATTAATCTGCTGCTCGTTTGCGCGAGCGGCGGGGGTTAATACTG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  680  GAGCGCAAGCTTCTCTATTAATCTGCTGCTCGTTTGCGCGAGCGGCGGGGGTTAATACTG  739

Query  601  TATTAGGTTTTACCAACTCGGTGTTGATCTAGGGAGGGATAAGTGAGTGTTTTGTGCGTG  660
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  740  TATTAGGTTTTACCAACTCGGTGTTGATCTAGGGAGGGATAAGTGAGTGTTTTGTGCGTG  799

Query  661  CTGGGCAGACAGACGTCTT  679
            |||||||||||||||||||
Sbjct  800  CTGGGCAGACAGACGTCTT  818
```

8.ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณ D1-D2 ของ 26srDNA ของยีสต์ N6/3.2/24 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ *Pichia anomala* strain DBVPG 3826 99%

Score = 918 bits (497), Expect = 0.0
Identities = 501/503 (99%), Gaps = 0/503 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    GCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAAGAT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  28   GCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAAGAT  87

Query  61   GGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  88   GGTAACCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAG  147

Query  121  AATCCCGTCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  148  AATCCCGTCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTT  207

Query  181  GGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  208  GGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC  267

Query  241  GATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  268  GATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAG  327

Query  301  TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTATGATTATCTT  360
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct  328  TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTACGATTATCTT  387

Query  361  CTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCGGATGGCAAGATA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  388  CTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCGGATGGCAAGATA  447

Query  421  ATGGTAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTG  480
            |||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  448  ATGGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTG  507

Query  481  TCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTT  503
            |||||||||||||||||||||||
Sbjct  508  TCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTT  530
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

9. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของรา NP1/0/1 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ Rhizopus microsporus var. oligosporus strain AS 3.1161

Score = 1129 bits (611), Expect = 0.0
Identities = 611/611 (100%), Gaps = 0/611 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    CTTTACTGGGATTTACTTCTCAGTATTGTTTGCTTCTATACTGTGAACCTCTGGCGATGA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  46   CTTTACTGGGATTTACTTCTCAGTATTGTTTGCTTCTATACTGTGAACCTCTGGCGATGA  105

Query  61   AGGTCGTAACTGACCTTCGGGAGAGACTCAGGACATATAGGCTATAATGGGTAGGCCTGT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  106  AGGTCGTAACTGACCTTCGGGAGAGACTCAGGACATATAGGCTATAATGGGTAGGCCTGT  165

Query  121  TCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCCTTTGGGAAGGAAGGTGCCT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  166  TCTGGGGTTTGATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCCTTTGGGAAGGAAGGTGCCT  225

Query  181  GGTACCCTTTACCATATACCATGAATTCAGAATTGAAAGTATAATATAATAACAACTTTT  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  226  GGTACCCTTTACCATATACCATGAATTCAGAATTGAAAGTATAATATAATAACAACTTTT  285

Query  241  AACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  286  AACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTG  345

Query  301  TGAATTGCATATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGATCTTC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  346  TGAATTGCATATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGATCTTC  405

Query  361  TATAGAGTACGCTTGCTTCAGTATCATAACCAACCCACACATAAAATTTATTTTATGTGG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  406  TATAGAGTACGCTTGCTTCAGTATCATAACCAACCCACACATAAAATTTATTTTATGTGG  465

Query  421  TGATGGACAAGCTCGGTTAAATTTAATTATTATACCGATTGTCTAAAATACAGCCTCTTT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  466  TGATGGACAAGCTCGGTTAAATTTAATTATTATACCGATTGTCTAAAATACAGCCTCTTT  525

Query  481  GTAATTTTCATTAAATTACGAACTACCTAGCCATCGTGCTTTTTTGGTCCAACCAAAAAA  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  526  GTAATTTTCATTAAATTACGAACTACCTAGCCATCGTGCTTTTTTGGTCCAACCAAAAAA  585

Query  541  CATATAATCTAGGGGTTCTGCTAGCCAGCAGATATTTTAATGATCTTTAACTATGATCTG  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  586  CATATAATCTAGGGGTTCTGCTAGCCAGCAGATATTTTAATGATCTTTAACTATGATCTG  645

Query  601  AAGTCAAGTGG  611
            ||||||||||
Sbjct  646  AAGTCAAGTGG  656
```

10.ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของรา NN6/0/9 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ Mucor hiemalis

Score = 593 bits (321), Expect = 4e-168
Identities = 321/321 (100%), Gaps = 0/321 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    TGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCTCAATGGTATTCCATTG  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    TGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCTCAATGGTATTCCATTG  60

Query  61   AGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAAACACCCCACATTCATAATTTTGTTGTGAATGGAATT  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   AGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAAACACCCCACATTCATAATTTTGTTGTGAATGGAATT  120

Query  121  GAGAGTTTCGGCTTTATTGCTGAATTCTTTAAAATTATTAGGCCTGAACTATTGTTCTTT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  GAGAGTTTCGGCTTTATTGCTGAATTCTTTAAAATTATTAGGCCTGAACTATTGTTCTTT  180

Query  181  CTGCCTGAACAttttttAATATAAAGGAATGCTCTAGTAAAAAGACTATCTCTGGGGCC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  CTGCCTGAACATTTTTTTAATATAAAGGAATGCTCTAGTAAAAAGACTATCTCTGGGGCC  240

Query  241  TCCCAAATAAATCATTCTTAAATTTGATCTGAAATCAGGCGGGATTACCCGCTGAACTTA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  TCCCAAATAAATCATTCTTAAATTTGATCTGAAATCAGGCGGGATTACCCGCTGAACTTA  300

Query  301  AGCATATCAATAAGCGGAGGA  321
            ||||||||||||||||||||
Sbjct  301  AGCATATCAATAAGCGGAGGA  321
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

11. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของรา NN6/0/1 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ Mucor racemosus strain UWFP 1084

Score = 1173 bits (635), Expect = 0.0
Identities = 635/635 (100%), Gaps = 0/635 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATAATCAATAATCTTGGCTTGTCCATTAT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1    TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAAATAATCAATAATCTTGGCTTGTCCATTAT  60

Query  61   TATCTATTTACTGTGAACTGTATTATTATTTGACGTTTGAGGGATGTTCCAATGTTATAA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  61   TATCTATTTACTGTGAACTGTATTATTATTTGACGTTTGAGGGATGTTCCAATGTTATAA  120

Query  121  GGATAGACATTGGAGATGTTAACCGAGTCATAATCAGGTTTAGGCCTGGTATCCTATTAT  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  121  GGATAGACATTGGAGATGTTAACCGAGTCATAATCAGGTTTAGGCCTGGTATCCTATTAT  180

Query  181  TATTTACCAAATGAATTCAGAATTAATATTGTAACATAGACCTAAAAAATCTATAAAACA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  181  TATTTACCAAATGAATTCAGAATTAATATTGTAACATAGACCTAAAAAATCTATAAAACA  240

Query  241  ACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAA  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  241  ACTTTTAACAACGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAA  300

Query  301  CTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCTCATTG  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  301  CTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAACTTGCGCTCATTG  360

Query  361  GTATTCCAATGAGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAACAAACCCTCTATCCAACTTTTGTTG  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  361  GTATTCCAATGAGCACGCCTGTTTCAGTATCAAAACAAACCCTCTATCCAACTTTTGTTG  420

Query  421  TATAGGATTATTGGGGGCCTCTCGATCTGTATAGATCTTGAAACCCTTGAAATTTACTAA  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  421  TATAGGATTATTGGGGGCCTCTCGATCTGTATAGATCTTGAAACCCTTGAAATTTACTAA  480

Query  481  GGCCTGAACTTGTTTAATGCCTGAACtttttttttAATATAAAGGAAAGCTCTTGTAATTG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  481  GGCCTGAACTTGTTTAATGCCTGAACTTTTTTTTTAATATAAAGGAAAGCTCTTGTAATTG  540

Query  541  ACTTTGATGGGGCCTCCCAAATAAATCTTTTTTAAATTTGATCTGAAATCAGGTGGGATT  600
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  541  ACTTTGATGGGGCCTCCCAAATAAATCTTTTTTAAATTTGATCTGAAATCAGGTGGGATT  600

Query  601  ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  635
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  601  ACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA  635
```

12. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของรา NK2/0/8 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ Rhizopus oryzae strain NRRL 1469

Score = 1007 bits (545), Expect = 0.0
Identities = 545/545 (100%), Gaps = 0/545 (0%)
Strand=Plus/Plus

```
Query  1    GTTAAAGCGCCTTACCTTAGGGTTTCCTCTGGGGTAAGTGATTGCTTCTACACTGTGAAA  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36   GTTAAAGCGCCTTACCTTAGGGTTTCCTCTGGGGTAAGTGATTGCTTCTACACTGTGAAA  95

Query  61   ATTTGGCTGAGAGACTCAGACTGGTCATGGGTAGACCTATCTGGGGTTTGATCGATGCCA  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96   ATTTGGCTGAGAGACTCAGACTGGTCATGGGTAGACCTATCTGGGGTTTGATCGATGCCA  155

Query  121  CTCCTGGTTTCAGGAGTACCCTTCATAATAAACCTAGAAATTCAGTATTATAAAGTTTAA  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  156  CTCCTGGTTTCAGGAGTACCCTTCATAATAAACCTAGAAATTCAGTATTATAAAGTTTAA  215

Query  181  TAAAAAACAACTTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAA  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  216  TAAAAAACAACTTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAA  275

Query  241  GTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTG  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  276  GTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTG  335

Query  301  CACTCTATGGTTTTTCTATAGAGTACGCCTGCTTCAGTATCATCACAAACCCACACATAA  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  336  CACTCTATGGTTTTTCTATAGAGTACGCCTGCTTCAGTATCATCACAAACCCACACATAA  395

Query  361  CATTTGTTTATGTGGTGATGGGTCGCATCGCTGTTTTATTACAGTGAGCACCTAAAATGT  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  396  CATTTGTTTATGTGGTGATGGGTCGCATCGCTGTTTTATTACAGTGAGCACCTAAAATGT  455

Query  421  GTGTGATTTTCTGTCTGGCTTGCTAGGCAGGAATATTACGCTGGTCTCAGGATCtttttt  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  456  GTGTGATTTTCTGTCTGGCTTGCTAGGCAGGAATATTACGCTGGTCTCAGGATCTTTTTT  515

Query  481  tttGGTTCGCCCAGGAAGTAAAGTACAAGAGTATAATCCAGTAACTTTCAAACTATGATC  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  516  TTTGGTTCGCCCAGGAAGTAAAGTACAAGAGTATAATCCAGTAACTTTCAAACTATGATC  575

Query  541  TGAAG  545
            |||||
Sbjct  576  TGAAG  580
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสในบริเวณITS ของไรโบโซมอล ดีเอ็นเอของรา N27/0/3 กับฐานข้อมูลใน Genbank พบว่าเหมือนกับ Mucor indicus strain CBS 226.29

Score = 1013 bits (548), Expect = 0.0
Identities = 548/548 (100%), Gaps = 0/548 (0%)
Strand=Plus/Plus

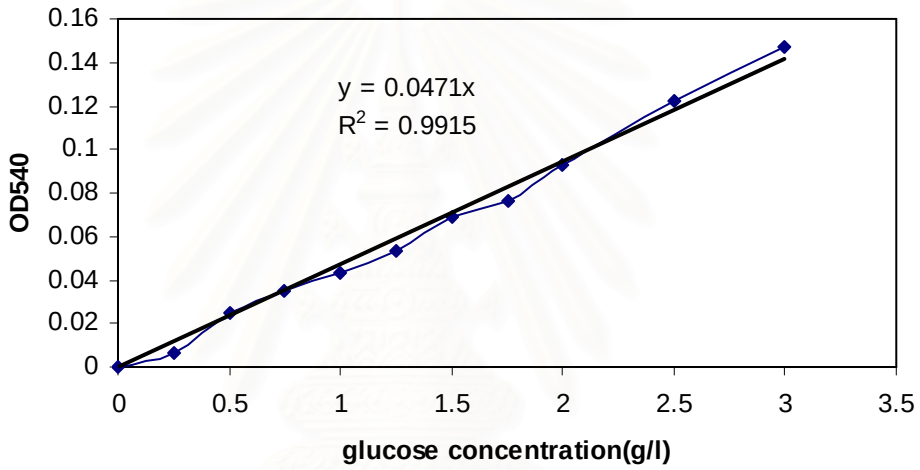
```
Query  1
TCTGATAATTCAATAATTATCTTATTTACTGTGAACTGTTTTTATTTATGACGTATAAGG 60
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  36   TCTGATAATTCAATAATTATCTTATTTACTGTGAACTGTTTTTATTTATGACGTATAAGG  95

Query  61   GGATGTCTTTAGGCTATAAGGGTAGGCCTATGGAATGTTAACCTAGTCATAGTCAAGCTT  120
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  96   GGATGTCTTTAGGCTATAAGGGTAGGCCTATGGAATGTTAACCTAGTCATAGTCAAGCTT  155

Query  121  GATGCTTGGTACCCGATTATTACTTACCAAAAGAATTCAGTTTAAAATATTGTAACATAG  180
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  156  GATGCTTGGTACCCGATTATTACTTACCAAAAGAATTCAGTTTAAAATATTGTAACATAG  215

Query  181  ACCTAAAAAATCTATAAAACAACTTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA  240
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  216  ACCTAAAAAATCTATAAAACAACTTTTAACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAA  275

Query  241  GAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT  300
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  276  GAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTT  335

Query  301  GAACGCATCTTGCACTCAATGGTATTCCATTGAGTACGCCTGTTTCAGTATCAAAAACAA  360
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  336  GAACGCATCTTGCACTCAATGGTATTCCATTGAGTACGCCTGTTTCAGTATCAAAAACAA  395

Query  361  CCCTTATTCAAAATTCttttttGAATAGATATGAGTGTAGCAACCTTACAAGTTGAGAC  420
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  396  CCCTTATTCAAAATTCTTTTTTTGAATAGATATGAGTGTAGCAACCTTACAAGTTGAGAC  455

Query  421  ATTTTAAATAAAGTCAGGCCATATCGTGGATTGAGTGCCGATACTTTTTTAATTTTGAAA  480
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  456  ATTTTAAATAAAGTCAGGCCATATCGTGGATTGAGTGCCGATACTTTTTTAATTTTGAAA  515

Query  481  AGGTAAAGCATGTTGATGTCCGCTTTTTGGGCCTCCCAAATAACTTTTTAAACTTGATCT  540
       ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  516  AGGTAAAGCATGTTGATGTCCGCTTTTTGGGCCTCCCAAATAACTTTTTAAACTTGATCT  575

Query  541  GAAATCAG  548
       ||||||||
Sbjct  576  GAAATCAG  583
```

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

1. การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid(DNSA) (Miller ,1959)

นำน้ำหมักที่ได้จากปฏิกิริยาการหาประสิทธิภาพของเอนไซม์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Dinitrosalicylic acid)ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และน้ำตาลกลูโคส



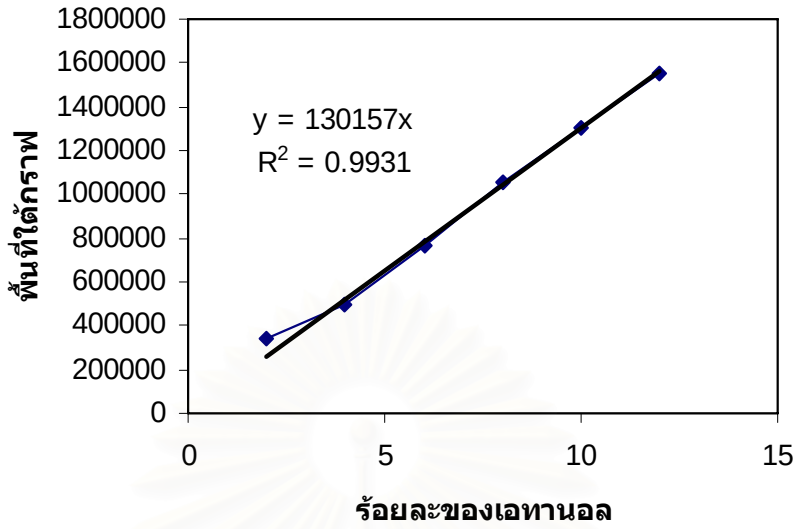
รูปที่ 6.1 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และน้ำตาลกลูโคส

2. การหาปริมาณกลูโคสโดยวิธี peroxidase/glucose oxidase assay (Cereia และคณะ, 2000)

นำน้ำหมักที่ได้จากปฏิกิริยาการหาประสิทธิภาพของเอนไซม์มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ 10 ไมโครลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500 นาโนเมตร (ใช้สารละลายเอนไซม์เป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณหาปริมาณกลูโคส(หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากสมการมาตรฐานดังนี้

$$\frac{\text{Abs. Unknown}}{\text{Abs. standard}} \times \text{Concentration of standard} = \text{Glucose (mg/l)}$$

3. การหาปริมาณเอทานอลโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี



รูปที่ 6.2 แสดงกราฟมาตรฐานระหว่างพื้นที่ใต้กราฟ และร้อยละของเอทานอล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวอภิชญา เตชะวสัญญู เกิดเมื่อวันที่ 16 กันยายน พ.ศ.2525 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย