การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมากเพื่อพัฒนาไรซ์โคจิ

นางสาวรังสิมา ดรุณพันธ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository(CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

SELECTION OF MOLD STRAINS FROM LOOKPANG-KHAOMAK FOR DEVELOPING RICE KOJI

Miss Rungsima Daroonpunt

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Food technology

Department of Food technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมากเพื่อพัฒนาไรซ์โคจิ
โดย	นางสาวรังสิมา ดรุณพันธ์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(นางมาลัย เมืองน้อย)

รังสิมา ดรุณพันธ์ : การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมากเพื่อพัฒนาไรซ์โคจิ. (SELECTION OF MOLD STRAINS FROM LOOKPANG-KHAOMAK FOR DEVELOPING RICE KOJI) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ดร. สุวิมล กีรติพิบูล, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ , 116 หน้า.

ลูกแป้งข้าวหมาก เป็นกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บในรูปเชื้อแห้งเพื่อใช้ในการผลิตข้าวหมาก มีแหล่งผลิตตามท้องถิ่นต่างๆในประเทศไทย เชื้อราและยีสต์บางสายพันธุ์ในลูกแป้งข้าวหมากมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาล ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อยีสต์และราในลูกแป้งข้าวหมาก และศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อที่คัดแยกได้ ในขั้นตอนแรกได้ศึกษาสมบัติทางกายภาพของลูกแป้งข้าวหมากที่ได้มาจาก 21 แหล่ง คือ นครปฐม, ตราด, กระบี่, นครราชสีมา, พัทลุง, ฉะเชิงเทรา, ลพบุรี, ชุมพร (4 แหล่ง), สงขลา (4 แหล่ง) และนครศรีธรรมราช (6 แหล่ง) พบว่า ในแต่ละแหล่งการผลิตแตกต่างกันในส่วนของน้ำหนัก, ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง, สี และกลิ่น จากการคัดแยกเชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมาก 21 แหล่ง พบว่าได้เชื้อรา 100 ไอโซเลท โดยเชื้อรา 4 ไอโซเลทได้แก่ LK4-1, LK8-2, LK12-5 และ LK17-1 มีความสามารถในการย่อยแป้งได้สูง โดยมีกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสอยู่ในช่วง 32.24-39.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทดสอบสารที่ได้จากการย่อยโดยใช้วิธี Dinitrosalicylic acid method พิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อราโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยเทคนิค Slide Culture และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (Internal Transcribed-Spacer) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่า LK4-1, LK8-2 และ LK12-5 เป็น *Amylomyces rouxii* และ LK17-1 เป็น *Rhizopus microsporus* จากการคัดแยกเชื้อยีสต์ พบเชื้อยีสต์ 32 ไอโซเลทในลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA สามารถพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อยีสต์ได้เป็น *Saccharomycopsis fibuligera* (9 ไอโซเลท), *Candida rugosa* (2 ไอโซเลท), *C. tropicalis* (1 ไอโซเลท), *Clavispora lusitaniae* (1 ไอโซเลท), *Pichia anomala* (15 ไอโซเลท) และ *P. guilliermondii* (4 ไอโซเลท) โดยเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้เป็น *S. fibuligera* เมื่อนำเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทมาเตรียมกล้าเชื้อรา (Koji) และนำมาหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 และข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าค่าความเป็นกรดและค่าองศาบริกซ์สูงขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก แต่ค่า pH ลดลงตามระยะเวลาของการหมัก และพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีค่าสูงสุดภายหลังการบ่มที่ 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อนำเชื้อ *A. rouxii* มาเตรียมเป็นกล้าเชื้อราและหมักบนข้าว จะให้ประสิทธิภาพการหมักสูงกว่าเชื้อ *R. microsporus*

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5272502123 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS : Lookpang-Khaomak / ITS / D1/D2 / Dinitrosalicylic acid method

RUNGSIMA DAROONPUNT : SELECTION OF MOLD STRAINS FROM LOOKPANG-KHAOMAK FOR DEVELOPING RICE KOJI. ADVISOR : ASSOC.PROF. SUWIMON KEERATIPIBUL, Ph.D., CO-ADVISOR : PROF.SOMBOON TANASUPAWAT, Ph.D., 116 pp.

Lookpang-Khaomak, a traditional starter culture used to produce Khaomak in several places in Thailand. Some yeasts and molds play important role in hydrolysis of starch to sugar in Lookpang-Khaomak. This study aims to isolate and identify the mold and yeast strains from the starter and to investigate their amylolytic activity. Firstly, the physical characteristics (weight, diameter, color and odor) of 21 samples of Lookpang-Khaomak collected from Nakhon Pathom, Trad, Chumporn (4 samples), Songkhla (4 samples), Nakorn Sri Thammarat (6 samples), Lopburi, Nakorn Ratchasima, Pattalung, Krabi and Chachoengsao provinces are determined. The results showed that 21 samples of Lookpang-Khaomak were different. One-hundred isolates of mold were isolated from twenty-one samples of Lookpang-Khaomak. Four isolates, LK4-1, LK8-2, LK12-5 and LK17-1 showed strong amylase activity ranged from 32.24 to 39.74 unit/ml by Dinitrosalicylic acid (DNSA) method. All four isolates were identified based on their morphological characteristics by using slide culture techniques and the sequences of the ribosomal RNA-encoding DNA (rDNA) internal transcribed spacer (ITS). The isolates LK4-1, LK8-2 and LK12-5 were identified as *Amylomyces rouxii* and LK17-1 was *Rhizopus microsporus*. Thirty-two yeasts were isolated from ten samples of Lookpang-Khaomak. All isolates were identified based on their morphological characteristics, biochemical characteristics and the sequencing of D1/D2 domain of large subunit (26S) ribosomal DNA analyses. They were identified as *Saccharomycopsis fibuligera* (9 isolates), *Candida rugosa* (2 isolates), *C. tropicalis* (1 isolate), *Clavispora lusitaniae* (1 isolate), *Pichia anomala* (15 isolates) and *P. guilliermondii* (4 isolates). All isolates of *S. fibuligera* showed strong amylolytic activity. The koji of mold isolates, LK4-1, LK8-2, LK12-5 and LK17-1 were prepared to ferment Pathumtanee no. 1 brown rice and Surin jasmine rice incubated at 30 °C for 96 hours. The results revealed, the acidity and total soluble solid were increased but pH was decreased at 96 hours. Amylase activity was highest at 48 hours. In addition, the Koji of *A. rouxii* was showed high efficiency of rice fermentation than the koji of *R. microsporus*.

Department : Food Technology Student's Signature .....

Field of Study : Food Technology Advisor's Signature .....

Academic Year : 2011 Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของรองศาสตราจารย์ ดร.สุวิมล กีรติพิบูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และศาสตราจารย์ ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่คอยดูแล ให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดจนตรวจแก้ต้นฉบับวิทยานิพนธ์ ซึ่งผู้วิจัยมีความซาบซึ้งและขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.รมณี สงวนดีกุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชื่นจิต ประกิตชัยวัฒนา ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความรู้และคำแนะนำต่างๆแก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์มาลัย เมืองน้อย ที่กรุณารับเป็นกรรมการ (ผู้ทรงคุณวุฒิจากภายนอก) ในการสอบวิทยานิพนธ์ และคอยแนะนำ ดูแล ให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆเกี่ยวกับการเตรียมกล้าเชื้อรา ตลอดจนช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อนุเคราะห์สถานที่และอุปกรณ์ในการเตรียมกล้าเชื้อรา

กราบขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์ในการทำงานวิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอขอบพระคุณ คุณจรวย ณรงค์เดชและคุณสุรัชฎา ณรงค์เดช ผู้ประสานงานในการเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจากจังหวัดชุมพรและคอยให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

ขอขอบพระคุณคุณเมธินี สีนวนปาน และครอบครัว ผู้ประสานงานในการเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจากจังหวัดกระบี่ และอำเภอเชียรใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช

เนื่องจากงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช รุ่นที่ 14 (1/2554) จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณ คุณวัลลภา หล่อเหลี่ยม และพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่คอยดูแล ให้ความรู้ และคำแนะนำต่างๆ รวมทั้งกำลังใจที่ดีแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และพี่สาว ที่ประสานงานในการเก็บตัวอย่างลูกแป้งจากจังหวัดนครศรีธรรมราช ให้การสนับสนุน ความช่วยเหลือ รวมทั้งให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง…… ฎ

สารบัญภาพ…… ฎ

บทที่

1 บทนำ…….. 1

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…….. 3

2.1 ลูกแป้ง…… 3

2.2 ลูกแป้งข้าวหมาก…… 11

2.2.1 วิธีการหมักข้าวหมาก …… 11

2.3 จุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้ง…….. 12

2.3.1 เชื้อราที่พบในลูกแป้ง…… 12

2.3.2 ยีสต์ที่พบในลูกแป้ง…… 13

2.4 เอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยแป้ง…….. 15

3 วิธีการดำเนินการวิจัย……... 19

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์ และสารเคมี…….. 19

3.1.1 วัตถุดิบ……... 19

3.1.2 อุปกรณ์……... 19

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ……... 20

3.1.4 สารเคมี……... 20

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย…….. 22

3.2.1 การเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก…… 22

3.2.2 การศึกษาสมบัติทางกายภาพของลูกแป้งข้าวหมาก……..... 22

บทที่ หน้า

3.2.3 การคัดแยกเชื้อราและยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก…….…… 22
3.2.3.1 การแยกเชื้อรา……..…… 22
3.2.3.1.1 Spread Plate Technique……..….. 22
3.2.3.1.2 Enrichment Technique……..…. 23
3.2.3.2 การแยกยีสต์……..…. 23
3.2.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งของเชื้อราและยีสต์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก……. 23
3.2.4.1 การเตรียมสปอร์แขวนของเชื้อรา…….. 23
3.2.4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา 24
3.2.4.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา……. 24
3.2.4.4 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์…… 25
3.2.4.5 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของยีสต์ 25
3.2.5 พิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรา……..... 25
3.2.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์ยีสต์…….…… 26
3.2.6.1 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ…….. 26
3.2.6.2 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนของยีสต์……..…. 27
3.2.7 การเตรียมกล้าเชื้อรา……... 27
3.2.8 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของกล้าเชื้อรา…….…… 28
3.2.8.1 การสกัดกล้าเชื้อรา……..... 28
3.2.8.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ของกล้าเชื้อรา…….. 28
3.2.9 ศึกษาการย่อยข้าว โดยใช้กล้าเชื้อรา……..…….. 29
3.2.9.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องปทุมธานี 1 หรือข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์และนำกล้าเชื้อราหมักบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 หรือข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์…….…… 29
3.2.9.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีกายภาพของข้าวไฮไดรไลซ์……. 29

บทที่	หน้า
4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	30
4.1 การเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก	30
4.2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของลูกแป้งข้าวหมาก	31
4.3 การคัดแยกสายพันธุ์เชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมาก	39
4.4 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา	43
4.5 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา	44
4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรา	46
4.7 การคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก	50
4.7.1 การคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก	50
4.7.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก	54
4.8 ศึกษากิจกรรมการย่อยแป้งของยีสต์	62
4.9 การเตรียมกล้าเชื้อรา	64
4.10 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของกล้าเชื้อราที่เจริญบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์และข้าวกล้องปทุมธานี 1	65
4.11 ศึกษาการย่อยข้าว โดยใช้กล้าเชื้อรา	66
4.11.1 กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวกล้องของเชื้อรา 4 ไอโซเลท หมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1	66
4.11.2 กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวกล้องของเชื้อรา 4 ไอโซเลท หมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์	69
4.11.3 กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวขาวของเชื้อรา 4 ไอโซเลท หมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1	72
4.11.4 กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวขาวของเชื้อรา 4 ไอโซเลท หมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์	75
5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	81
5.1 สรุปผลการทดลอง	81
5.2 ข้อเสนอแนะ	83
รายการอ้างอิง	84
ภาคผนวก	91

บทที่ หน้า

ภาคผนวก: ก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 92

ภาคผนวก: ข สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี..... 94

ภาคผนวก: ค วิธีวิเคราะห์..... 97

ภาคผนวก: ง ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA..... 101

ภาคผนวก: จ นิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal transcribed Spacer (ITS) ของไรโบโซ-มอลดีเอ็นเอ..... 110

ภาคผนวก: ฉ ผลการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป ID 32 C..... 113

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 116

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตำรับลูกแป้งข้าวหมากจากขุนกฤษณามรวิสิฐ (2494).....	5
2.2	ตำรับลูกแป้งข้าวหมากจากพิไลพรรณ พงษ์บูล (2523).....	5
2.3	ตำรับลูกแป้งข้าวหมากจาก ส.ก.ศ. (2513).....	6
2.4	ตำรับลูกแป้งข้าวหมากจากคำบอกเล่า.....	6
2.5	ตำรับลูกแป้งข้าวหมากจากศิริลักษณ์ สินธวาลัย (2520).....	7
2.6	พีเอชและปริมาณความชื้นในลูกแป้งของประเทศต่างๆ.....	10
2.7	ชื่อเรียกลูกแป้งตามภาษาท้องถิ่นของประเทศต่างๆและการใช้ประโยชน์.....	10
2.8	จำนวนเชื้อราในลูกแป้งของแต่ละประเทศ.....	12
2.9	จำนวนยีสต์ในลูกแป้งของแต่ละประเทศ.....	14
2.10	สมบัติของแอลฟา-อะไมเลสจาก *Aspergillus oryzae*.....	16
4.1	จำนวนแหล่งที่มาของตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจากจังหวัดต่างๆ.....	30
4.2	แหล่งที่มาและลักษณะทางกายภาพของลูกแป้งข้าวหมาก.....	32
4.3	จำนวนไอโซเลท หมายเลขไอโซเลทและอะไมเลสแอกติวิตีของเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก.....	40
4.4	จำนวนไอโซเลท หมายเลขไอโซเลทและลักษณะโคโลนีของยีสต์แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก 21 แหล่ง.....	51
4.5	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนของยีสต์ทั้ง 6 กลุ่มที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก.....	59
4.6	กิจกรรมการย่อยแป้งของยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก.....	63
4.7	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของกล้าเชื้อราจากเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทที่เจริญบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์และข้าวกล้องปทุมธานี 1.....	65

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนการผลิตลูกแป้ง……	9
4.1	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อราที่คัดเลือกจำนวน 13 ไอโซเลท โดยมีสปอร์เริ่มต้นที่ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร……....	44
4.2	ความเข้มข้นของกลูโคสของเชื้อราที่คัดเลือกจำนวน 13 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงใน Starch broth โดยมีสปอร์เริ่มต้นที่ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร…….....	45
4.3	บริเวณ Internal Transcribed Spacer ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ…….....	47
4.4	ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA……	48
4.5	ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา 4 ไอโซเลท…….....	48
4.6	ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรา LK4-1, LK8-2, LK12-5 และ LK17-1……...	49
4.7	ลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง……	53
4.8	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA……	61
4.9	กราฟแสดงค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง……..	67
4.10	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง…….....	67
4.11	กราฟแสดง Total Soluble solid ของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง……..	68
4.12	กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง……..…	68
4.13	กราฟแสดงค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง……..	70
4.14	กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง……..	70

ภาพที่ หน้า

4.15 กราฟแสดง Total Soluble solid ของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง…….. 71

4.16 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง…… 71

4.17 กราฟแสดงค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง……. 73

4.18 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง…….. 73

4.19 กราฟแสดง Total Soluble solid ของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง……. 74

4.20 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง…….. 74

4.21 กราฟแสดงค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง……... 76

4.22 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง……. 76

4.23 กราฟแสดง Total Soluble solid ของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง……. 77

4.24 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง…….. 77

ค1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส…… 97

ค2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส……..... 98

ค3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส…… 99

บทที่1

บทนำ

ลูกแป้งข้าวหมากเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ได้รับการถ่ายทอดกันมาหลายชั่วอายุคน มีแหล่งผลิตตามท้องถิ่นต่างๆในประเทศไทย เป็นองค์ประกอบที่สำคัญในการผลิตข้าวหมาก ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของไทยที่นิยมใช้บริโภคเป็นของหวานและอาหารว่าง มีรสหวานและมีแอลกอฮอลล์เล็กน้อย ลูกแป้งข้าวหมากในแต่ละแหล่งการผลิตก็จะมีความแตกต่างกันในส่วนของวัตถุดิบ ขนาด รูปร่าง สี ตลอดจนชนิดและสายพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งขึ้นอยู่กับสูตรเฉพาะของท้องถิ่นนั้นๆ จุลินทรีย์ในลูกแป้งข้าวหมากที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก คือเชื้อยีสต์และรา โดยกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ การเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลและการหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยในขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลนั้น เกิดจากเชื้อราและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง แต่เชื้อราและยีสต์แต่ละสายพันธุ์ก็มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งที่แตกต่างกัน ผลิตภัณฑ์ที่ได้ในขั้นตอนนี้มักเรียกว่าข้าวไฮโดรไลซ์ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์อื่นๆ เช่น ไวน์น้ำตาลไซรัป น้ำส้มสายชู เป็นต้น แม้ว่าลูกแป้งข้าวหมากจะสามารถนำมาใช้ในการหมักได้ง่าย แต่ก็เกิดปัญหาเกี่ยวกับคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้ เนื่องจากปริมาณเชื้อยีสต์และราในแต่ละครั้งการผลิตไม่แน่นอนและการผลิตลูกแป้งข้าวหมากมักเป็นการผลิตกันเองภายในครัวเรือนจึงมีการจัดการด้านสุขลักษณะที่ไม่ดี ทำให้มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นปนเปื้อน ส่งผลกระทบต่อกระบวนการหมักและผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการหมักมีคุณภาพไม่แน่นอน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะคัดเลือกชนิดของเชื้อราและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งสูงมาปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการหมักให้มีคุณภาพที่แน่นอนตลอดทุกการผลิต โดยการรวบรวมลูกแป้งข้าวหมากจากหลายแหล่งผลิตในประเทศไทยมาจำแนกชนิดของเชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งข้าวหมาก แล้วคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งสูงมาผลิตเป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ (Koji) จากนั้นนำกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้มาทดสอบประสิทธิภาพ เพื่อคัดเลือกกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่มีประสิทธิภาพสูงมาใช้ในการพัฒนาและปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งข้าวหมากจากท้องถิ่นต่างๆ ในประเทศไทยและศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อราและยีสต์ที่แยกได้เพื่อนำมาพัฒนาเป็นไรซ์โคจิ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบสายพันธุ์ของเชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งข้าวหมากในท้องถิ่นต่างๆในประเทศไทย ทราบเชื้อราและยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง และได้กล้าเชื้อราที่ประกอบด้วยสายพันธุ์ของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งสูง มาใช้ในการผลิตข้าวไฮโดรไลซ์ ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กลูโคสไซรัป ไวน์ น้ำส้มสายชู เป็นต้น เป็นการยกระดับผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพที่ดี และนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้

บทที่2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีข้าวเป็นพืชเศรษฐกิจและเป็นอาหารหลักประจำชาติ สามารถนำมาใช้ในการผลิตอาหารหมักได้หลากหลายชนิด ได้แก่ กระแช่ ข้าวหมาก สาโท ไวน์ เป็นต้น อีกทั้งประเทศไทยมีสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราและยีสต์ จึงเป็นที่มาของกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อราและยีสต์ เนื่องจากเชื้อราและยีสต์บางสายพันธุ์สามารถย่อยแป้งหรือคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพ (อภิชญา เตชะวสัญญู, 2550)

ข้าวหมากเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของไทยที่นิยมใช้บริโภคเป็นของหวานและอาหารว่าง ใช้ลูกแป้งในการหมัก โดยมีจุลินทรีย์ที่สำคัญในการหมัก คือ เชื้อยีสต์และรา มีรสหวานและมีแอลกอฮอลล์เล็กน้อย แต่ไม่ใช่อาหารมึนเมาประเภทสุรา การทำข้าวหมากจึงไม่มีการควบคุม จะมีแต่พระราชบัญญัติสุราควบคุมเฉพาะการทำลูกแป้งข้าวหมากเท่านั้น มีบางประเทศในแถบเอเชียก็ทำข้าวหมากเป็นอาหาร ตัวอย่างเช่น ข้าวหมากของประเทศจีน เรียกว่า Lao-chao ข้าวหมากของประเทศอินโดนีเซีย เรียกว่า Tape เป็นต้น (ชัยวัฒน์ จาติเสถียร, 2520)

2.1 ลูกแป้ง

ลูกแป้ง คือ กล้าเชื้อจุลินทรีย์ (Inoculums) ที่เก็บในรูปเชื้อแห้งเพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิดในประเทศแถบเอเชีย การผลิตและการใช้ลูกแป้งมีมาแต่โบราณก่อนที่มนุษย์จะเข้าใจถึงศาสตร์ทางจุลชีววิทยา โดยเข้าใจกันว่ามีต้นกำเนิดจากประเทศจีน มีชื่อเรียกว่า Chinese yeast cake หรือ Chinese koji และได้ถ่ายทอดไปยังประเทศเพื่อนบ้าน เช่น ทิเบต อินเดีย เกาหลี และกลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย (นภา โล่ห์ทอง, 2537) ลูกแป้งสามารถใช้ในการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น ข้าวหมาก น้ำส้มสายชู สาโท กระแช่ เป็นต้น ลูกแป้งเป็นภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ได้รับการถ่ายทอดมาหลายชั่วอายุคน ในแต่ละ

ท้องถิ่นก็จะมีสูตรลับเฉพาะของตนเอง โดยมีกรรมวิธีที่คล้ายคลึงกัน ต่างกันเพียงองค์ประกอบของวัตถุดิบ ขนาด รูปร่าง ตลอดจนชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เท่านั้น ซึ่งจะมีการถ่ายทอดเฉพาะลูกหลานและคนใกล้ชิดเท่านั้น ลูกแป้งมีหลายชนิดผลิตขึ้นตามวัตถุประสงค์ที่จะนำไปใช้ เช่น ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งทำน้ำส้มสายชู และลูกแป้งที่ใช้ทำขนมถ้วยฟู (มนตรี เชาวน์สังเกต, 2521) ลูกแป้งที่ดีจะโปร่งเบา สีขาวนวล ไม่มีรอยแตกร้าว เมื่อขยี้จะยุ่ยเป็นผงละเอียด ก้อนแป้งเป็นรูพรุน ซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีรูปร่างและขนาดต่างๆกัน (นภา โล่ห์ทอง, 2537)

องค์ประกอบของลูกแป้ง คือ

1. แป้ง จะไม่นิยมใช้แป้งสำเร็จ ตามตำรับเดิมผู้ผลิตจะบดแป้งใช้เป็นคราวๆไป ทั้งนี้เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจมีอยู่ในแป้งที่ผลิต แป้งที่นำมาใช้ผลิตลูกแป้งนั้นควรใช้แป้งข้าวเจ้าล้วนๆ จะมีคุณภาพดีกว่าที่ผลิตด้วยแป้งข้าวเหนียว หรือแป้งข้าวเจ้าผสมแป้งข้าวเหนียว นอกจากนั้นแป้งที่ผลิตในทางการค้ามักมีการเติมสารเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น กรดโพรพิโอนิก ซึ่งสารเหล่านี้ก็จะมีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้งที่เป็นเชื้อราและยีสต์ (นภา โล่ห์ทอง, 2537)

2. เครื่องเทศหรือสมุนไพร เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ซึ่งในแต่ละแหล่งการผลิตก็จะมีสูตรในการผลิตที่แตกต่างกัน โดยเครื่องเทศและสมุนไพรมีหน้าที่สำคัญในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆที่ไม่ต้องการในลูกแป้ง เนื่องจากเครื่องเทศมีน้ำมันหอมระเหยที่ประกอบด้วยองค์ประกอบหลายชนิดได้แก่ แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ เทอร์ปีน ฟีนอล อัลคาลอยด์ เรซิน กรดอินทรีย์ สารประกอบที่มีกำมะถันและสารอื่นๆ จึงมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่าการฆ่า เนื่องจากมีปริมาณไม่มากพอที่จะไปทำลายจุลินทรีย์ได้ (ชัยวัฒน์ จาติเสถียร, 2520) เครื่องเทศและสมุนไพรที่นิยมใช้มีดังต่อไปนี้ คือ ดีปลี, กระเทียม, ชะเอมเทศ, ขิง, ข่า, พริกไทย, กานพลู, หัวหอม, ดอกจันทร์, กระชาย (ชัยวัฒน์ จาติเสถียร, 2520; นภา โล่ห์ทอง, 2537) เนื่องจากการใส่เครื่องเทศและสมุนไพรที่แตกต่างทั้งชนิดและปริมาณ (ดังแสดงในตารางที่ 2.1-2.5) จึงเป็นสาเหตุให้เกิดความแตกต่างของลูกแป้งในแต่ละท้องถิ่น ซึ่งส่งผลต่อความหลากหลาย

ของจุลินทรีย์ในลูกแป้งด้วย แต่อย่างไรก็ตามการนำเครื่องเทศและสมุนไพรมาใช้ต้องคำนึงถึงความสะอาด ความสด และความใหม่ รวมถึงไม่ควรบดเครื่องเทศก่อนใช้งานนานๆ เพราะสิ่งเหล่านี้จะมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของเครื่องเทศและสมุนไพรเหล่านั้น (สมพร สินธารา, 2544)

ตารางที่ 2.1 ตำรับลูกแป้งข้าวหมากจากขุนกฤษณามรวิสิฐ (2494)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
ชะเอม	180
พริกไทย	60
ดีปลี	120
กระเทียม	420
ขิง	120
ข่า	60
ข้าวเจ้า	1200

หมายเหตุ หน่วยเดิมเป็นตำลึงและชั่ง แปลงโดยนภา โล่ห์ทอง (2537)

ที่มา : นภา โล่ห์ทอง (2537)

ตารางที่ 2.2 ตำรับลูกแป้งข้าวหมากจากพิไลพรรณ พงษ์บูล (2523)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
ดีปลี	60
ขิงแห้ง	15
ข่าแห้ง	15
กระเทียม	15
ชะเอม	15
ข้าวเจ้า	1500
พริกไทย	7(เมล็ด)

หมายเหตุ หน่วยเดิมเป็นบาท แปลงโดยนภา โล่ห์ทอง (2537)

ที่มา : นภา โล่ห์ทอง (2537)

ตารางที่ 2.3 ตำรับลูกแป้งข้าวหมากจาก ส.ก.ศ. (2513)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กิโลกรัม)
แป้งข้าวเจ้า	15
ข่าแห้งบด	1
ชะเอม	0.5
กระเทียมบด	1
ผงฟูยีสต์	ไม่ระบุปริมาณ

หมายเหตุ หน่วยเดิมเป็นถังและกิโลกรัม แปลงโดยสมพร สินธารา (2544)

ที่มา : สมพร สินธารา (2544)

ตารางที่ 2.4 ตำรับลูกแป้งข้าวหมากจากคำบอกเล่า

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
ชะเอม	15
ขิงแห้ง	3.75
พริกไทย	3.75
กระเทียม	15
แป้ง	1000

หมายเหตุ หน่วยเดิมเป็นสลึง แปลงโดยชัยวัฒน์ จาติเสถียร (2520)

ที่มา : ชัยวัฒน์ จาติเสถียร (2520)

ตารางที่ 2.5 ตำรับลูกแป้งข้าวหมากจากศิริลักษณ์ สินธวาลัย (2520)

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
ข้าวเจ้า	1500
ชะเอม	15
พริกไทย	3.75
ขิง	15
กระเทียม	30

หมายเหตุ หน่วยเดิมเป็นลิตร, บาท และสลึง แปลงโดยสมพร สินธารา (2544)
ที่มา : สมพร สินธารา (2544)

3. น้ำ ปริมาณน้ำเป็นส่วนสำคัญในการควบคุมความชื้นของลูกแป้ง โดยผู้ผลิตจะต้องกะให้มีปริมาณที่พอเหมาะไม่แฉะจนเกินไปเพราะจะทำให้ลูกแป้งเหม็นเปรี้ยวและเสียได้หรือแห้งจนเกินไปจนลูกแป้งแตกหรือราเจริญในลูกแป้งได้ไม่ดี (สมพร สินธารา, 2544)

4. ลูกแป้งเดิม ใช้เป็นแหล่งจุลินทรีย์ จะต้องไม่เป็นลูกแป้งที่เก็บไว้นานจนเกินไป หรือมีมอดแมลงกัดกิน

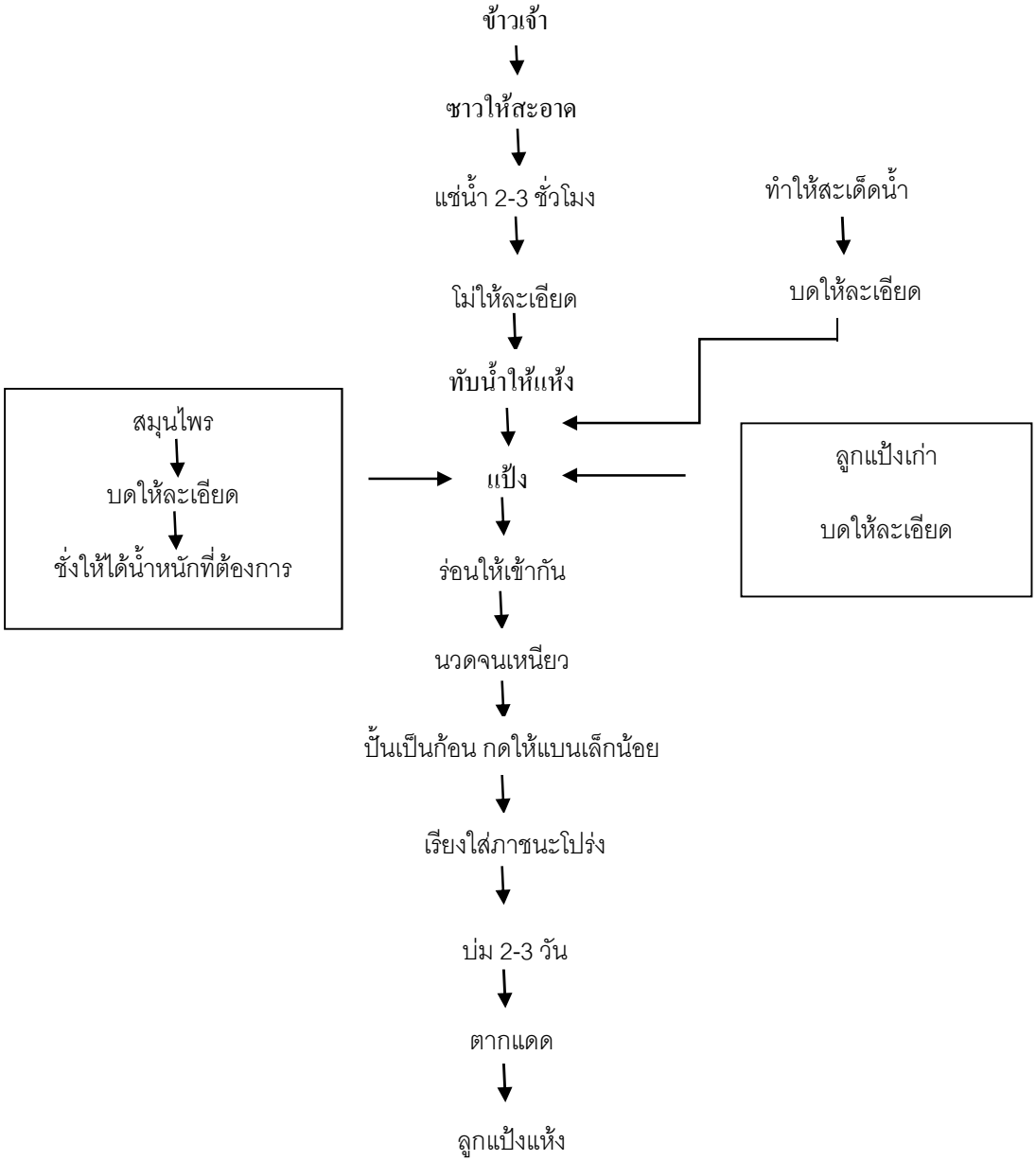
5. รำหยาบหรือแกลบ ใส่เพื่อให้ลูกแป้งโปร่งมีอากาศเข้าได้มาก ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่สำคัญในลูกแป้งเจริญได้ดี ในบางสูตรไม่ใช้

วิธีการเตรียมวัตถุดิบและการปั้นลูกแป้งแสดงดังรูปที่ 2.1 มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1. เตรียมแป้งโดยซาวข้าวให้สะอาด แช่น้ำไว้ประมาณ 2-3 ชั่วโมง นำไปโม่แล้วทับน้ำให้แห้งหรือทำให้ข้าวสะเด็ดน้ำ แล้วจึงนำไปบดหรือปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าให้ละเอียดแล้วร่อนด้วยแร่ง ไม่ควรแช่ข้าวนานจนเกินไปเพราะจะทำให้แบคทีเรียแลคติก และ *Baciilus* spp. เจริญเพิ่มจำนวนในปริมาณมาก ทำให้ลูกแป้งที่ได้ด้อยคุณภาพ
2. บดสมุนไพรชนิดแห้งให้ละเอียด สมุนไพรสดอาจนำไปบดพร้อมกับข้าว
3. ผสมแป้งและสมุนไพรกับลูกแป้ง (ลูกแป้ง 5 กรัม ต่อแป้ง 1 กิโลกรัม) ที่ละเอียดให้เข้ากันโดยการร่อนด้วยแร่งหรือปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าความเร็วต่ำๆ เติมน้ำหรือน้ำต้มชะเอมในปริมาณ

ที่เมื่อนวดแป้งแล้วจะปั้นเป็นก้อนได้ ปริมาณน้ำที่ใช้นั้นกำหนดไม่ได้แน่นอนขึ้นกับความแห้งของแป้งที่ใช้ปริมาณสมุนไพรสดซึ่งแตกต่างกันในแต่ละตำรับและสภาวะความชื้นในบรรยากาศ ขณะบ่มลูกแป้ง ซึ่งต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้ผลิต

4. เมื่อนวดแป้งจนเหนียวแล้วจึงปั้นเป็นก้อนกลมขนาดต่างๆ กันตามชนิดของลูกแป้งในการผลิตลูกแป้งเหล่านั้น พบว่าการหมักแป้งที่นวดแล้วไว้ประมาณ 6-12 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาปั้นจะได้ลูกแป้งที่มีคุณภาพดีกว่าที่ปั้นโดยไม่หมักแป้ง
5. เรียงลูกแป้งบนกระด้งหรือภาชนะก้อนโปร่งให้แต่ละลูกห่างกันเล็กน้อย เนื่องจากเมื่อจุลินทรีย์เจริญจะทำให้ลูกแป้งฟูขึ้น ส่วนของลูกแป้งด้านที่ติดกับภาชนะจะแบนราบตามผิวที่สัมผัส โดยที่ด้านบนยังคงรูปร่างโค้งเป็นครึ่งวงกลม สำหรับการปั้นลูกแป้งขนาดใหญ่เมื่อเรียงบนภาชนะแล้วควรกดด้านบนลงเล็กน้อย เพื่อให้ลูกแป้งบางลง จุลินทรีย์ภายในก้อนแป้งจะมีโอกาสรับอากาศมากขึ้น
6. เมื่อเรียงลูกแป้งเต็มภาชนะแล้ว โรยผงลูกแป้งที่เตรียมไว้ลงบนผิวของลูกแป้งที่ปั้นใหม่ คลุมภาชนะด้วยผ้าหนาๆ โดยไม่ให้ผ้าสัมผัสกับผิวลูกแป้ง บ่มประมาณ 48 ชั่วโมง นำไปตากแดดให้แห้งแล้วเก็บในภาชนะที่ปิดผาได้สนิท การที่ลูกแป้งได้รับแสงแดดโดยตรง จะทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ลดลงไปบ้าง ซึ่งเป็นผลจากรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) ดังนั้นจึงควรตากลูกแป้งโดยมีแผ่นกระจกใสกั้นแสงอยู่ด้านบน โดยเว้นระยะระหว่างผิวลูกแป้งและกระจกให้อากาศถ่ายเทได้



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนการผลิตลูกแป้ง

ที่มา : นภา โล่ห์ทอง (2537)

นอกจากนี้ลูกแป้งควรจะมีพีเอชและความชื้นต่ำเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อราภายในลูกแป้ง เพราะเชื้อราเป็นจุลินทรีย์ประเภท Acidophilic และXerophilic Microorganisms ช่วงพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราอยู่ในช่วง 3.8 – 5.6 (สมจิตร อยู่เป็นสุข, 2552) โดยพีเอชและปริมาณความชื้นในลูกแป้งของประเทศต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 พีเอชและปริมาณความชื้นในลูกแป้งของประเทศต่างๆ

ชื่อลูกแป้ง	พีเอช	ปริมาณความชื้น (w/w%)	แหล่งอ้างอิง
Banh men	5.7	13.6	Lee และ Fujio (1999)
Ragi	5.4	10.3	Lee และ Fujio (1999)
Murcha	5.2	13.0	Tamang และ Sakar (1995)

ที่มา : Lee และ Fujio (1999)

นอกจากนี้ยังมีกล้าเชื้อในประเทศแถบเอเชียที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับลูกแป้งของประเทศไทย ซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปในแต่ละประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 ชื่อเรียกลูกแป้งตามภาษาท้องถิ่นของประเทศต่างๆและการใช้ประโยชน์

ประเทศ	ชื่อท้องถิ่น	ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ลูกแป้ง
จีน	Chu	ข้าวหมาก, เครื่องดื่มประเภทกะแช่, สุราจากข้าว
ไต้หวัน	Pekka	สุราจากข้าว
ทิเบต	Phab	เครื่องดื่มประเภทกะแช่, สุราจากข้าว
สิขิม	Levian	เครื่องดื่มประเภทกะแช่, สุราจากข้าว
อินเดีย	Murcha	เครื่องดื่มประเภทกะแช่, สุราจากข้าว

ตารางที่ 2.7 (ต่อ)

ประเทศ	ชื่อท้องถิ่น	ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ลูกแป้ง
เกาหลี	Nuruk	สุราจากข้าว
อินโดนีเซีย	Ragi	ข้าวหมาก, เครื่องดื่มประเภทกระแช่
ฟิลิปปินส์	Bubod	เครื่องดื่มประเภทน้ำตาลเมา
ไทย	Lookpang	ข้าวหมาก, กระแช่, สาโท, อุ, สุราจากข้าว, น้ำส้มสายชู
เวียดนาม	Banh men	สุราจากข้าว

ที่มา : นภา โล่ห์ทอง (2537)

2.2 ลูกแป้งข้าวหมาก

ลูกแป้งข้าวหมากเป็นปัจจัยที่สำคัญที่สุดในการทำข้าวหมาก ซึ่งเป็นแป้งเชื้อ (Mould Bran) ชนิดหนึ่ง มีลักษณะเป็นก้อนแป้งครึ่งวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 - 3 เซนติเมตร (ขึ้นกับการปั้น) สีขาวนวล อาจมีสีน้ำตาลอ่อนถ้ามีเครื่องเทศมาก และจะเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นเมื่อมีอายุนาน มีกลิ่นหอมไม่เหม็นเปรี้ยว ก้อนแป้งจะเบา ภายในค่อนข้างโปร่งมีเส้นใยของเชื้อรายึดเกาะติดกับแป้งอยู่ทั่วไป (สิรินทรเทพ ภักดีศุภผล, 2523)

2.2.1 วิธีการหมักข้าวหมาก

นำข้าวเหนียวมาล้างน้ำให้สะอาด แช่น้ำทิ้งไว้ 6-12 ชั่วโมง นึ่งให้สุก แล้วนำมาล้างน้ำให้หมดเมือก จากนั้นนำมาทำให้สะเด็ดน้ำ เอาลูกแป้งซึ่งขยี้ให้ละเอียดมาคลุกเคล้าไว้ให้ทั่ว อัตราส่วนในการผสมคือ ½-1 ลูกต่อข้าวเหนียว 1 ลิตร อาจแบ่งมาห่อด้วยใบตองหรือใส่ลงในภาชนะที่เป็นถ้วย ชาม เป็นต้น หมักทิ้งไว้ 3-4 วัน จะได้ข้าวหมากที่มีลักษณะเมล็ดขาวนุ่ม กลิ่นหอม รสหวาน มีแอลกอฮอล์เล็กน้อย

2.3 จุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้ง

ลูกแป้งข้าวหมากประกอบด้วยเชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่มักเป็นจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเข้ามาในกระบวนการผลิต เช่น Lactic Acid Bacteria, *Lactobacillus* spp., *Acetobacter* spp., *Gluconobacter* spp. และ *Bacillus* spp. เป็นต้น (นภา โล่ห์ทอง, 2537; สิรินทรเทพ ภักดีศุภผล, 2523)

บทบาทที่สำคัญของจุลินทรีย์ในลูกแป้งต่อกระบวนการผลิตมี 2 ประการ คือ

1. การเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลโดยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลส
2. การหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นเอธิลแอลกอฮอล์กับคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเชื้อยีสต์

บทบาทของจุลินทรีย์ทั้งสองประเภทนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันตลอดระยะเวลาของการหมัก โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้ในขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลนั้น เรียกว่า “ ข้าวไฮโดรไลซ์ ”

2.3.1 เชื้อราที่พบในลูกแป้ง

เชื้อราในลูกแป้งมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาล โดยปริมาณเชื้อราในลูกแป้งพบว่าอยู่ในช่วง 10^3-10^7 cfu/g ดังแสดงในตารางที่ 2.8

ตารางที่ 2.8 จำนวนเชื้อราในลูกแป้งของแต่ละประเทศ

ชื่อลูกแป้ง	จำนวนเชื้อราทั้งหมด (cfu/g)	แหล่งอ้างอิง
Banh men	1.3×10^6	Lee และ Fujio (1999)
Ragi	3.5×10^4	Hadisepoetro, Takada และ Oshima (1979)
Bubod	1.15×10^7	Del Rosario (1980)
Murcha	2.1×10^7	Tamang และ Sakar (1995)
Lookpang-Khaomang	$2.0 \times 10^3 - 1.6 \times 10^6$	Limtong และคณะ (2005)
Lookpang-Lao	$7.0 \times 10^3 - 1.8 \times 10^6$	Limtong และคณะ (2005)

มนตรี เชาวน์สังเกต (2521) สามารถจำแนกราจากลูกแป้งข้าวหมาก 23 ตัวอย่างได้ดังนี้ *Rhizopus* spp., *Amylomyces* spp. และ *Mucor* spp. จากการศึกษาเชื้อราใน Banh men ที่เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิต Ruou nep ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของประเทศเวียดนาม พบว่าเชื้อราที่จำแนกได้ คือ *Rhizopus oryzae*, *Mucor indicus*, *Mucor circinilloides* และ *Amylomyces rouxii* (Lee และ Fugio, 1999) และจากการรายงานของ สมพร สินธารา (2544) พบว่า เชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมากสามารถจัดจำแนกได้ 8 สกุล ส่วนใหญ่เป็นราในสกุล *Amylomyces* spp. รองลงมาคือ *Rhizopus* spp. นอกจากนั้นเป็น *Actinomucor* spp., *Aspergillus* spp., *Aspergillus niger group, Monascus* spp., *Mucor* spp. และ *Penicilium* spp. โดยเชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้สูง ได้แก่ ราในสกุล *Actinomucor* spp., *Amylomyces* spp. และ *Rhizopus* spp.

นอกจากนี้ สิรินทรเทพ ภักดีศุภผล (2523) และ ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง และคณะ (2534) กล่าวว่า *Amylomyces rouxii* เป็นเชื้อราที่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการย่อยข้าว

2.3.2 เชื้อยีสต์ที่พบในลูกแป้ง

เชื้อยีสต์มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้กลายเป็นเอธิลแอลกอฮอล์ โดยปริมาณเชื้อยีสต์ในลูกแป้งพบว่าอยู่ในช่วง 10^{4} - 10^{8} cfu/g ดังแสดงในตารางที่ 2.9

ตารางที่ 2.9 จำนวนยีสต์ในลูกแป้งของแต่ละประเทศ

ชื่อลูกแป้ง	จำนวนเชื้อยีสต์ทั้งหมด (cfu/g)	แหล่งอ้างอิง
Banh men	4.3×10^{6}	Lee และ Fujio (1999)
Ragi	7.6×10^{6}	Hadisepoetro และคณะ (1979)
Bubod	1.5×10^{7}	Del Rosario (1980)
Murcha	2.0×10^{8}	Tamang และ Sakar (1995)
Lookpang-Khaomang	$3.9 \times 10^{4} - 2.9 \times 10^{7}$	Limtong และคณะ (2005)
Lookpang-Lao	$2.9 \times 10^{4} - 5.0 \times 10^{7}$	Limtong และคณะ (2005)

Thanh และคณะ (2008) สามารถแยกเชื้อยีสต์จาก Banhmen 52 ตัวอย่าง ได้ดังนี้ *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Issatchenkia* sp., *Pichia anomala*, *Candida tropicalis*, *Pichia ranonggensis*, *Clavispora lusitaniae*

Lee และ Fugio (1999) นำ Banhmen ที่เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิต Ruou nep ซึ่งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์พื้นบ้านของประเทศเวียดนาม 12 ตัวอย่าง มาแยก พบเชื้อยีสต์ 33 ไอโซเลท สามารถจำแนกได้ดังนี้ *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia anomala*, *Hyphopichia burtonii*, *Candida* sp.

Limtong และคณะ (2002) แยกเชื้อยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่างและลูกแป้งเหล้า 19 ตัวอย่าง ได้เชื้อยีสต์ 43 และ 49 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Saccharomycopsis fibuligera* รองลงมา คือ *Pichia anomala* นอกจากนั้นเป็น *Issatchenkia orientalis*, *Pichia burtonii*, *Pichia fabianii*, *Candida rhagii*, *Candida glabrata*, *Torulaspora globosa*, *Pichia mexicana*, *Pichia heimii*, *Rhodotorula philyla*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* และ *Trichosporon asahii*

จากการรายงานของชัยวัฒน์ จาติเสถียร (2520) แยกเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า และข้าวหมากจากท้องถิ่นต่างๆของประเทศไทยได้เชื้อยีสต์ 227 ไอโซเลท จัดเป็นเชื้อยีสต์ในสกุล Endomycopsis (138 ไอโซเลท), Hansenula (52 ไอโซเลท) และ Saccharomyces (35 ไอโซเลท)

วิมลักษณ์ รัตนปรีดากุล (2549) แยกลูกแป้งเหล้า 20 ตัวอย่างในอาหารเหลว ได้เชื้อยีสต์ 30 ไอโซเลท พบเชื้อยีสต์ที่สามารถหมักได้แอลกอฮอล์สูง คือ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pelliculosa*

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า *Saccharomycopsis fibuligera* สามารถย่อยแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลได้ (Lee และ Fugio, 1999; Limtong และคณะ, 2002; Aidoo และคณะ, 2005; Thanh และคณะ, 2008; Saelim และคณะ, 2008) มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง (Knox และคณะ, 2004) และมีการนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตน้ำตาลไซรัป (Sandhu และคณะ, 1987), single cell protein (Lemmel และคณะ, 1980; Clementi และคณะ, 1980) และเอทานอล (Verma และคณะ, 2000) เป็นต้น

2.4 เอนไซม์ที่มีบทบาทในการย่อยแป้ง

สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด ตามตำแหน่งการย่อยแป้งดังนี้

1 . Endoamylase ซึ่งได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส (α – Amylase) มีชื่อทางการค้าเป็นที่รู้จักกันว่า Termamyl และมีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (Diastase) มีชื่อตามระบบว่า α – 1,4-Glycan 4-Glucanohydrolase พบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2547) เป็นเอนไซม์ที่ย่อย (Hydrolyze) แป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α- 1,4 Glycosidic Linkage แต่ไม่สามารถย่อยน้ำตาลที่ต่อกันแบบ α – 1,6 Glycosidic Linkage (ชัยวัฒน์ จาติเสถียร, 2520) ถ้าการย่อยไม่สมบูรณ์จะมีมอลโตส กลูโคส และเดกซ์ทรินเกิดขึ้น ถ้าการย่อยสมบูรณ์จะได้น้ำตาลมอลโตสและกลูโคสเท่านั้น (ชุลี ยมภักดี และคณะ, 2548-2550) ดังปฏิกิริยา

แป้ง + H2O → ออลิโกแซ็กคาไรด์ G1-G6 + แอลฟา-ลิมิตเดกซ์ทริน

G1-G6 คือ กลูโคสถึงมอลโทเฮกซะโอส (Maltohexaose) และแอลฟา-ลิมิตเดกซ์ทรินคือเดกซ์ทรินที่มีโซ่กิ่ง 1,6- ที่แอลฟา-อะไมเลสย่อยไม่ได้ โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้มีหมู่ –OH ที่ C-1 อยู่ในโครงสร้างแบบแอลฟา เหมือนซับสเตรทแป้ง เอนไซม์นี้จึงเป็น Anomer retaining enzyme

นอกจากนี้ผลของการย่อยจะทำให้แป้งมีความหนืดลดลง (Starch Liquefaction) เอนไซม์นี้จึงถูกเรียกว่า Starch Liquefying Amylase (สมพร สินธารา , 2544)

จากการศึกษาสมบัติของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส จาก *Aspergillus oryzae* ซึ่งเป็นแหล่งผลิต เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสที่ดีและนิยมใช้เชิงพาณิชย์ พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.0 อุณหภูมิที่เหมาะสม (พีเอช 5.0) อยู่ในช่วง 50-60 องศาเซลเซียส ความเสถียรของเอนไซม์ต่ออุณหภูมิ จะต่ำกว่าเอนไซม์จากแบคทีเรีย โดยไม่สามารถทนอุณหภูมิที่ใช้ในการเจลาทิไนซ์แป้ง (68-70 องศาเซลเซียส) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้ง คือ G2-G12 (G3 สูงสุด) และเดกซ์ทรินที่มีโซ่กิ่ง (Yamamoto และคณะ, 1988) ดังแสดงในตารางที่ 2.10

ตารางที่ 2.10 สมบัติของแอลฟา-อะไมเลสจาก *Aspergillus oryzae*

น้ำหนักโมเลกุล (กิโลดาลตัน)	53
โครงสร้างโมเลกุล	เป็นไกลโคโปรตีนที่มีแมนโนสในปริมาณสูง
พีเอชที่เหมาะสม	5.0
อุณหภูมิที่เหมาะสมที่ pH 5.0 (องศาเซลเซียส)	50-60
ความเสถียรต่ออุณหภูมิ	ต่ำกว่าเอนไซม์จากแบคทีเรีย โดยไม่สามารถทนอุณหภูมิที่ใช้ในการเจลาทิไนซ์แป้ง (68-70 องศาเซลเซียส)
ผลิตภัณฑ์จากการย่อยแป้ง	G2-G12 (G3 สูงสุด) และเดกซ์ทรินที่มีโซ่กิ่ง

เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ อุตสาหกรรมแป้ง โดยนำมาย่อยแป้งเพื่อผลิตเดกซ์ทรินใช้ในอาหาร ซึ่งเดกซ์ทรินเองก็สามารถนำมาเป็นสารเติมในอาหาร (Food ingredient) เพื่อเพิ่มเนื้อ ปรับสมบัติด้านความหนืด ควบคุมความชื้น เพิ่มความคงตัว และใช้เป็นสารให้ความหวานแทนน้ำตาลกลูโคสหรือซูโครส อุตสาหกรรมขนมปังอบ โดยเอนไซม์ทำให้เกิดผลหลายอย่างคือ ช่วยลดความหนืดของโดในระหว่างการทำให้เม็ดแป้งแตก ทำให้เกิดเดกซ์ทรินจากการย่อยแป้งซึ่งจะถูกสลายเป็นมอลโตสโดยบีตา-อะไมเลสที่มีอยู่ในแป้งธรรมชาติ และการหมักโดยยีสต์ก็จะเกิดขึ้นโดยใช้มอลโตสเป็นอาหาร มีผลทำให้เกิดฟองอากาศเป็นการเพิ่มเนื้อขนมปัง นอกจากนี้ ทำให้ขนมปังสดเหมาะแก่การเก็บ เนื่องจากเอนไซม์จะไปลดขนาดแอมิโลเพกตินให้เล็กลง อุตสาหกรรมเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ และสุรา ได้จากการหมักวัตถุดิบจำพวกแป้งจากเมล็ดธัญพืชหรือผลไม้ด้วยจุลินทรีย์ อุตสาหกรรมน้ำผลไม้ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ เพื่อช่วยในการย่อยอาหารของสัตว์เป็นต้น (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551)

2. Exoamylase ซึ่งได้แก่ กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) หรือ γ - amylase [Amylo (1-4,1-6) Glucosidase] และบีตา-อะไมเลส [Amylo (1-4) Maltosidase] (ชัยวัฒน์ จาติเสถียร, 2520) ในส่วนของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งจาก Non-Reducing ของ α- 1,4-D-Glucan ทีละหน่วยกลูโคส โดยทำลายพันธะ α- 1,4 Glycosidic Linkage และ α – 1,6 Glycosidic Linkage ทำให้ได้ D-Glucose เพียงอย่างเดียว (สมพร สินธารา, 2544) ส่วนบีตา-อะไมเลส จะย่อยทีละ 2 หน่วยกลูโคส ทำให้ได้มอลโตส นอกจากนี้บีตา-อะไมเลสยังไม่สามารถทำลายพันธะ α – 1,6 Glycosidic ซึ่งเป็นจุดแตกแขนงในแป้ง ดังนั้นการย่อยแป้งของบีตา-อะไมเลส จึงให้พวก Limiting Dextrin ด้วย (Voet และ Voet, 1990)

เอนไซม์กลูโคอะไมเลสส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร มีปริมาณการใช้สูงรองลงมาจากแอลฟา-อะไมเลส โดยใช้ย่อยผลิตภัณฑ์ของแอลฟา-อะไมเลสในอุตสาหกรรมต่อไปนี้ อุตสาหกรรมแป้ง โดยจะใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการแซ็กคาริฟายเดกซ์ทริน เพื่อให้ได้กลูโคสไซรัป อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม เช่น น้ำผลไม้และเบียร์ อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ เพื่อใช้เป็นเครื่องดื่มหรือใช้เป็นเชื้อเพลิง โดยใช้ย่อยเดกซ์ทรินต่อจากแอลฟา-อะไมเลส ได้ผลิตภัณฑ์น้ำตาล

ขนาดเล็กและกลูโคส ซึ่งยีสต์จะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ในขั้นตอนการหมัก เป็นต้น (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551)

Nigam and Singh (1995) กล่าวว่า เอนไซม์อะไมเลสที่พบจากจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ได้แก่ แอลฟา-อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ส่วน บีตา-อะไมเลส ส่วนใหญ่พบในพืช

เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์ Amylase ได้แก่ *Rhizopus oryzae*, *Rhizopus microsporus*, *Mucor indicus*, *Mucor circinilloides*, *Amylomyces rouxii* (Lee และ Fugio, 1999; Thanh และคณะ, 2008), *Rhizopus oligosporus* (Dung และคณะ, 2006; Dung และคณะ, 2007) *Penicillium*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* (ชัยวัฒน์ จาติ-เสถียร, 2520) *Mucor heimalis* (ชุลี ยมภักดี และคณะ, 2548-2550) เชื้อยีสต์ที่มีการสร้างเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบในจีนัส *Saccharomycopsis, Saccharomyces* และ *Candida* เป็นต้น (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551)

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

1. ลูกแป้งข้าวหมาก
2. ข้าวกล้องปทุมธานี 1 เป็นพันธุ์ข้าวหลักฤดูฝน ทำนาเมื่อปี 2553 ซื้อจากศูนย์วิจัยข้าวปทุมธานี กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
3. ข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ซื้อจากร้านต้นข้าว (ห้วยขวาง) เป็นศูนย์ขนาดใหญ่ขายส่งและขายปลีกข้าวสารคุณภาพดี โดยเป็นข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ 100% ไม่มีการผสมข้าวชนิดอื่นลงไป

3.1.2 อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave) รุ่น HA-3D ของบริษัท HIRAYAMA
2. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV 160A ของบริษัท SHIMADZU
3. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ของบริษัท SARTORIUS
4. เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) ของบริษัท METTLER TOLEDO
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge) รุ่น 2 K 15 ของบริษัท SIGMA
6. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Waterbath) ของบริษัท PRECISSION THELCO, USA
7. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHS ของบริษัท OLYPUS OPTICAL, JAPAN
8. เครื่องเขย่าผสม (Vortex mixer) รุ่น GENIE 2 ของบริษัท SCIENTIFIC INDUSTRIES, USA
9. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer)
10. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น 6 ของบริษัท PRECISSION THELCO, USA

11. ไมโครปิเปต รุ่น P10 P20 P200 P1000 ของบริษัท GILSON, FRANCE
12. บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร
13. แฮนด์รีแฟรคโตมิเตอร์ (Hand refractometer) 0-32 เปอร์เซ็นต์
14. เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
15. เครื่องวัดสี (Colorimeter) ของบริษัท Minolta รุ่น CR-400
16. เครื่องวัดความชื้น (Moisture analyzer) Sartorius รุ่น MA 30

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Potato Dextrose Agar (PDA) ของบริษัท DIFCO, USA
2. Soluble starch ของบริษัท AJAX FINECHEM PTY, AUSTRALIA
3. Yeast extract malt extract Agar (YM agar) ของบริษัท DIFCO, USA
4. ยีสต์สกัด (Yeast extract) ของบริษัท DIFCO, USA
5. เปปโตน (Peptone) ของบริษัท DIFCO, USA
6. วุ้น (Agar) ของบริษัท DIFCO, USA

3.1.4 สารเคมี

1. กลูโคส (Glucose) ของบริษัท CARLO ERBA, Italy
2. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท MERCK, Germany
3. ทวีน 80 (Tween 80)
4. ไดไนโตรซาลิไซลิก แอซิด (DNS) ของบริษัท FLUKA, China
5. 8.5 % แลคติก แอซิด ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
6. 0.25 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.0
7. 0.05 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.4
8. 0.1 โมลาร์ โซเดียมอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH 5.4
9. ฟีนอฟทาลีน
10. ฟีนอล ของบริษัท CARLO ERBA, Italy

11. โซเดียม เมทาไบซัลไฟต์ ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
12. คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) ของบริษัท MERCK, Germany
13. โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
14. โซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
15. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
16. ไดเบสิก โซเดียมอาร์เซเนต ($Na_2HAsO_4.7\ H_2O$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
17. แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
18. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) ของบริษัท MERCK, Germany
19. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ของบริษัท CARLO ERBA, Italy
20. กลีเซอรอล (Glycerol) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
21. สตาร์ท (Soluble starch) ของบริษัท Ajax Finechem, Australia
22. โซเดียม อะซิเตต ($CH_3COONa.3H_2O$ ของบริษัท MERCK, Germany
23. กรดอะซิติก (CH_3COOH) ของบริษัท MERCK, Germany

3.2 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

3.2.1 การเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก

เก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 21 แหล่งจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทย คือ นครปฐม, ตราด, กระบี่, นครราชสีมา, พัทลุง, ฉะเชิงเทรา, ลพบุรี, ชุมพร (4 แหล่ง), สงขลา (4 แหล่ง) และนครศรีธรรมราช (6 แหล่ง) โดยซื้อจากหาบเร่แผงลอย ร้านขายสมุนไพร และสั่งซื้อทางอินเตอร์เน็ต บางส่วนได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ผลิตที่ใช้ลูกแป้งข้าวหมากในการผลิตข้าวหมาก

3.2.2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของลูกแป้งข้าวหมาก

นำลูกแป้งข้าวหมากมาศึกษาสมบัติทางกายภาพ คือ น้ำหนัก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง ค่าสี (L*, a*, b*) ด้วยเครื่องวัดสี (Colorimeter) และกลิ่น โดยทดลอง 3 ซ้ำ ออกแบบการทดลองแบบ CRD และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

3.2.3 การคัดแยกเชื้อราและยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก

3.2.3.1 การแยกเชื้อรา

3.2.3.1.1 Spread Plate Technique นำตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจำนวน 3 ลูกใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ บดให้เป็นผงละเอียดด้วยโกร่งที่ฆ่าเชื้อ แล้วเขย่าให้เข้ากันเพื่อให้เชื้อกระจายอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นนำผงลูกแป้งข้าวหมาก 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร หยด Suspension ที่เตรียมไว้ 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA) เกลี่ยด้วยแท่งแก้วงอให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจดูลักษณะการเจริญของเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง แล้วแยกเชื้อราที่มีลักษณะต่างๆมาเลี้ยงบน PDA จนกว่าจะแน่ใจว่าได้เชื้อราบริสุทธิ์ จึงถ่ายเชื้อลงบนอาหารเอียง (PDA Slant) บ่มจนเชื้อเจริญดี เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.3.1.2 Enrichment Technique นำตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจำนวน 3 ลูก ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ บดให้เป็นผงละเอียดด้วยโกร่งที่ฆ่าเชื้อ แล้วเขย่าให้เข้ากัน เพื่อให้เชื้อกระจายอย่างสม่ำเสมอ จากนั้นชั่งลูกแป้งมา 1 กรัมใส่ลงในน้ำที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าผสม แล้วปิเปตสารละลายลูกแป้ง 1 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract-malt extract broth 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งราจะเจริญเป็นเม็ดกลมและกรองออกจากอาหารเหลวมา Streak ลงบน PDA นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจดูลักษณะการเจริญของเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง แล้วแยกเชื้อราที่มีลักษณะต่างๆมาเลี้ยงบน PDA จนกว่าจะแน่ใจว่าได้เชื้อราบริสุทธิ์ จึงถ่ายเชื้อลงบนอาหารเอียง (PDA Slant) บ่มจนเชื้อเจริญดี เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.3.2 การแยกยีสต์

วิธีในการแยกยีสต์จะเหมือนข้อ 3.2.3.1.1และ 3.2.3.1.2 แต่จะนำมาเลี้ยงไว้บน Yeast extract malt extract agar (YM agar) นำมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจดูลักษณะการเจริญของเชื้อในจานเลี้ยงเชื้อทุก 24 ชั่วโมง แล้วแยกเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาเลี้ยงบน YM agar โดยขีดเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อหลายๆครั้งจนกว่าจะได้โคโลนีเดี่ยว จากนั้นจึงถ่ายเชื้อลงบนอาหารเอียง (YM Slant) บ่มจนเชื้อเจริญดี เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.4 การทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งของเชื้อราและยีสต์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก

3.2.4.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา

ถ่ายเชื้อราลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน เพื่อให้เชื้อราเจริญและสร้างสปอร์ จากนั้นเตรียมสารแขวนลอยสปอร์ โดยเติมน้ำกลั่นที่มีทวีน 80 ร้อยละ 0.05 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหาร PDA ที่มีเชื้อราเจริญอยู่ ใช้แท่งแก้วที่ผ่านการ

ฆ่าเชื้อขูดให้สปอร์ออกจากเส้นใย แล้วนำส่วนของเหลวที่มีสปอร์แขวนลอยอยู่มานับจำนวนด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ให้มีสปอร์ของเชื้อราเริ่มต้นที่ 1 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.4.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา โดยใช้วิธีที่พัฒนาโดย ชุลี ยมภักดี และคณะ (2548-2550)

นำเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.4.1 มาเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว Starch medium 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย Soluble starch ความเข้มข้น 3% ยีสต์เอ็กแทรกซ์ 3 กรัม เปปโทน 3 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 5 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยใส่เชื้อลงไปร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ 0.5 มิลลิลิตรมาเติมลงใน 0.5 มิลลิลิตร Reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย Soluble starch ความเข้มข้น 3 % ใน 0.25 M Sodium acetate buffer pH 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNSA) (Miller, 1959) เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้สูงสุด เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.4.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา

นำเชื้อที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.4.1 มาเลี้ยงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว Starch medium 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย Soluble starch ความเข้มข้น 3% ยีสต์เอ็กแทรกซ์ 3 กรัม เปปโทน 3 กรัม และน้ำตาลกลูโคส 5 กรัม ต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร โดยใส่เชื้อลงไปร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วัน

นำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้ 0.5 มิลลิลิตรมาเติมลงใน 0.5 มิลลิลิตร Reaction mixture ซึ่งประกอบด้วย Soluble starch ความเข้มข้น 3 % ใน 0.25 M Sodium acetate buffer pH 5.0 บ่มที่

อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1944)

3.2.4.4 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

ถ่ายเชื้อยีสต์จาก YM slant มา 1 ลูป ลงในอาหารเหลว YM Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเทียบความขุ่นกับความขุ่นมาตรฐานให้ได้ 0.5 McFarland เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อเริ่มต้น

3.2.4.5 การทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อยีสต์

นำกล้าเชื้อยีสต์เริ่มต้นที่เตรียมไว้จากข้อ 3.2.4.4 มาเลี้ยงลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Starch Broth 100 มิลลิลิตร โดยใส่กล้าเชื้อยีสต์เริ่มต้นลงไปร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNSA) (Bernfeld, 1955)

3.2.5 พิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรา

พิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อราโดยการศึกษาราบนอาหารแข็ง PDA และศึกษาสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยใช้เทคนิค Slide culture แล้วนำผลการศึกษามาเปรียบเทียบกับ Taxonomic Keys ในหนังสือ Introduction to Food and Airborne Fungi (Samson และคณะ, 2002) Textbook of Fungi (Sharma, 1989) Introduction to Fungi (Webster and Weber, 2007)

วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS-1 (5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) และ ITS-4 (5’-TCCTCCGCTTATTGATATGC -3’) โดยเขี่ยสปอร์และเส้นใยของเชื้อราลงใน 10% กลีเซอรอล แล้วส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่ Macrogen Incorporation ประเทศเกาหลี นำลำดับ

นิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวภาพ GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) และคัดเลือกลำดับของเชื้อในกลุ่มเดียวกันที่มีรายงานเก็บไว้ในฐานข้อมูล เพื่อทำการเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม multiple alignment program CLUSTAL-X (Thompson และคณะ, 1997) สร้างต้นไม้วิวัฒนาการ ตามวิธีของ Waterman (1986) โดยใช้ Neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985)

3.2.6 พิสูจน์เอกลักษณ์ยีสต์

3.2.6.1 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

นำยีสต์ที่เพาะบนอาหาร YM agar อายุ 48-72 ชั่วโมง มาสกัดดีเอ็นเอ ดัดแปลงจากวิธีของ Lachance และคณะ (1999) จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA โดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ตามวิธีที่ดัดแปลงจาก Wang และคณะ (2003) โดยใช้ F63 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') เป็น Forward primer และ LR3 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') เป็น Reverse primer โดยตั้งโปรแกรมการทำงานของเครื่อง PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) ดังนี้

1. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 5 นาที (Predenaturation)
2. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 1 นาที (Denaturation)
3. อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส 1.30 นาที (Annealing)
4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 2.30 นาที (Extension)
5. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 10 นาที (Final extension)

ทำข้อ 2-4 จำนวน 30 รอบ เมื่อสิ้นสุดการทำงาน นำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) มาตรวจสอบความบริสุทธิ์ โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส จากนั้นนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR

Purification Kit (Qiagen, Germany) ส่งไปวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ Macrogen Incorporation ประเทศเกาหลี นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลทางชีวภาพ GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) และคัดเลือกลำดับของเชื้อในกลุ่มเดียวกันที่มีรายงานเก็บไว้ในฐานข้อมูล เพื่อทำการเปรียบเทียบโดยใช้โปรแกรม Multiple Alignment Program CLUSTAL-X (Thompson และคณะ, 1997) ส่วนต้นไม้วิวัฒนาการสร้างจากข้อมูลความแตกต่างทางวิวัฒนาการตามวิธี Two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ Neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985)

3.2.6.2 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนของยีสต์

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนเป็นการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญแบบใช้ออกซิเจน ซึ่งเป็นการทดสอบที่ใช้ในการจัดจำแนกเชื้อยีสต์ในระดับสปีชีส์ ทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป API ID 32 C (BioMerieux SA, ประเทศฝรั่งเศส) โดยนำเซลล์ยีสต์ที่เจริญบนอาหาร YM agar 1-2 วัน มาถ่ายลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เทียบความขุ่นให้ได้ 2 McF จากนั้นปิเปตมา 250 ไมโครลิตร ถ่ายลงในอาหารเหลว C-medium ที่มากับชุดทดสอบ จากนั้นก็ผสมเชื้อกับอาหารให้เข้ากัน ถ่ายเชื้อจาก C-medium ลงในหลุมทดสอบสารประกอบคาร์บอนแต่ละชนิด หลุมละ 135 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 29 ± 2 องศาเซลเซียส ตรวจผลที่ 24, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยสังเกตการเจริญจากความขุ่นที่บังเส้นสีดำที่อยู่ใต้อาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเทียบกับหลุมควบคุม

3.2.7 การเตรียมกล้าเชื้อรา (Rice koji)

นำเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือกในขั้นตอนที่ 3.2.4.2 มาเตรียมกล้าเชื้อรา ดัดแปรตามวิธีของฉกามาศ วงศ์ข้าหลวงและ คณะ (2534)

เตรียมกล้าเชื้อราบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 หรือข้าวหอมมะลิสุรินทร์ โดยนำข้าวมาล้างให้สะอาด แช่น้ำทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นทำให้สะเด็ดน้ำ ชั่งข้าว 100 กรัม ลงในฟลาสก์ขนาด 500

มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็น แล้วนำเชื้อราที่เจริญบนอาหาร PDA บนจานเพาะเชื้อเป็นเวลา 3 วัน เติม 0.85 % Normal saline ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงไป 10 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วที่ผ่านการฆ่าเชื้อขูดให้สปอร์ออกจากเส้นใย แล้วปิเปต 10 % Spore Suspension ของเชื้อราที่ได้ลงไป บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ดูลักษณะการเจริญของเชื้อรา แล้วนำมาอบที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 6 ชั่วโมง นำมาบดให้ละเอียดจะได้ไรซ์โคจิ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3.2.8 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของกล้าเชื้อรา

นำกล้าเชื้อราในขั้นตอนที่ 3.2.6 มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ดัดแปรตามวิธีของฉกามาศ วงศ์ข้าหลวงและ คณะ (2534)

3.2.8.1 การสกัดกล้าเชื้อรา

นำกล้าเชื้อรามาเติม 0.05 M Sodium acetate buffer pH 5.4 อัตราส่วนของกล้าเชื้อรา: บัฟเฟอร์ = 1:5 นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำไปเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 rpm เป็นเวลา 20 นาที ปิเปตเอาส่วนใสไปวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

3.2.8.2 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของกล้าเชื้อรา

ปิเปต Koji extract ที่ได้จากขั้นตอน 3.2.7.1 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติม 1 มิลลิลิตรของ 0.1 M Sodium acetate buffer pH 5.4 และ 1.5 มิลลิลิตรของ 2% Soluble starch ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มใน Water bath ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็นทันที นำมาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNSA) (Miller, 1959)

3.2.9 ศึกษาการย่อยข้าว โดยใช้กล้าเชื้อรา

3.2.9.1 การเตรียมตัวอย่างข้าวกล้องปทุมธานี 1 หรือข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์และนำกล้าเชื้อราหมักบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 หรือข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์

นำข้าวกล้องปทุมธานี 1 หรือข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ล้างน้ำ เติมน้ำให้ได้อัตราส่วนข้าว: น้ำ = 1:1.75 แช่ทิ้งไว้ 3 ชั่วโมง ปรับพีเอชด้วย 8.5 % กรดแลคติก ให้ได้พีเอชเท่ากับ 4.0 ทำให้สุกโดยใช้ Rice Cooker แล้วนำมาวัดความชื้นด้วยเครื่องวัดความชื้น จากนั้นใช้ช้อนปราศจากเชื้อแบ่งข้าวใส่ลงในกระปุกพลาสติกกลมที่ปราศจากเชื้อ 200 กรัม เติมกล้าเชื้อราลงไป 5 % ของน้ำหนักข้าวแห้ง ผสมให้เข้ากัน ปิดฝากระปุกพลาสติกเพื่อให้เป็นการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน แล้วนำบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง และคณะ, 2534) โดยจะเก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.9.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีกายภาพของข้าวไฮไดรไลซ์

1. วัดค่า Total Soluble Solid โดยใช้ Refractometer
2. วัดความเป็นกรด - ด่าง โดยใช้ pH Meter
3. วิเคราะห์ปริมาณกรด ตามวิธีของ AOAC (1995) แล้วคำนวณในรูปเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก
4. วิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยวิธี Dinitrosalicylic Acid (DNSA) (Miller, 1959)

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก

สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทยได้ทั้งหมด 21 แหล่ง คือ นครปฐม, ตราด, กระบี่, นครราชสีมา, พัทลุง, ฉะเชิงเทรา, ลพบุรี, ชุมพร (4 แหล่ง), สงขลา (4 แหล่ง) และนครศรีธรรมราช (6 แหล่ง) ดังแสดงไว้ในตารางที่ 4.1

ตาราง 4.1 จำนวนแหล่งที่มาของตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจากจังหวัดต่างๆ

จังหวัด	จำนวนแหล่งที่มาของตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก
นครปฐม	1
ตราด	1
กระบี่	1
นครราชสีมา	1
พัทลุง	1
ฉะเชิงเทรา	1
ลพบุรี	1
ชุมพร	4
สงขลา	4
นครศรีธรรมราช	6
รวม	21

โดยส่วนใหญ่เก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจากจังหวัดต่างๆในภาคใต้ สามารถเก็บได้ 16 ตัวอย่าง คือ จังหวัดชุมพร 4 ตัวอย่าง จังหวัดสงขลา 4 ตัวอย่าง จังหวัดกระบี่ 1 ตัวอย่าง จังหวัดนครศรีธรรมราช 6 ตัวอย่าง และจังหวัดพัทลุง 1 ตัวอย่าง เนื่องจากภาคใต้นิยมบริโภคข้าวหมากเป็นอาหารว่าง จึงมีแหล่งผลิตลูกแป้งข้าวหมากหลากหลายแหล่ง

4.2 ศึกษาสมบัติทางกายภาพของลูกแป้งข้าวหมาก

จากการศึกษาสมบัติทางกายภาพ คือ น้ำหนัก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง สี (L*, a*, b*) และกลิ่นของลูกแป้งข้าวหมาก พบว่า ลูกแป้งข้าวหมากในแต่ละแหล่งการผลิตมีน้ำหนัก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง สี แตกต่างกัน โดยมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 1.5768-6.5617 กรัม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.81 - 3.51 เซนติเมตร สำหรับค่าสีของลูกแป้งข้าวหมาก *L** แสดงถึงความสว่างของสี *a** แสดงระดับสีแดง-เขียว และค่า *b** แสดงระดับสีเหลือง-น้ำเงิน พบว่าอยู่ในช่วง 44.33 - 69.70, (+3.55) - (-1.81) และ (+6.51) - (+23.35) ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.2 ซึ่งลูกแป้งข้าวหมากที่มีสีน้ำตาลอ่อนนั้นแสดงว่ามีส่วนผสมของเครื่องเทศมาก และจะเป็นสีน้ำตาลมากขึ้นเมื่อมีอายุการเก็บรักษานาน (สิรินทรเทพ ภักดีศุภผล, 2523) นอกจากนี้ลูกแป้งข้าวหมากบางแหล่งก็มีกลิ่นหอมของสมุนไพรมาก (จังหวัดตราด, อำเภอท่าแซะ จังหวัดชุมพร, จังหวัดนครราชสีมา, อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช, จังหวัดสงขลา, จังหวัดลพบุรี) ในขณะที่บางแหล่งมีกลิ่นหอมของสมุนไพรเล็กน้อย (อำเภอสะทิงพระ จังหวัดสงขลา (1), อำเภอลานสกา จังหวัดนครศรีธรรมราช, จังหวัดพัทลุง, จังหวัดชุมพร, ตำบลท้ายสำเภา อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช) ดังแสดงในตารางที่ 4.2 สาเหตุที่ลูกแป้งข้าวหมากในแต่ละแหล่งการผลิตมีความแตกต่างกันทางกายภาพ เนื่องมาจากในแต่ละแหล่งการผลิตมีการใช้ชนิดและปริมาณของวัตถุดิบแตกต่างกัน อีกทั้งในแต่ละแหล่งการผลิตยังมีสูตรการผลิตที่แตกต่างกัน จึงทำให้ตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากที่เก็บได้จากแหล่งต่างๆ มีความแตกต่างกัน

ตาราง 4.2 แหล่งที่มาและลักษณะทางกายภาพของลูกแป้งข้าวหมาก

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มา		น้ำหนัก (กรัม)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	สี			กลิ่น
					L*	a*	b*	
1	นครปฐม		5.5823^{c}	3.17^{c}	57.12^{cde}	$+1.51^{bcd}$	$+11.72^{def}$	++
2	ตราด		5.22^{d}	2.54^{j}	61.72^{abcd}	$+0.52^{defg}$	$+11.51^{def}$	+++
3	อ. เมือง จ.ชุมพร		1.6767^{k}	1.81^{k}	58.68^{bcde}	-0.08^{g}	$+9.62^{fghi}$	++

หมายเหตุ : +, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรเล็กน้อย; ++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรปานกลาง; +++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรมาก

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับ a,b,c,... ต่างกันในแต่ละแถวแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มา		น้ำหนัก (กรัม)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	สี			กลิ่น
					L*	a*	b*	
4	อ.สะทิงพระ จ.สงขลา		4.3240^{e}	2.64^{hij}	64.20^{abc}	$+0.74^{defg}$	$+14.52^{c}$	+
5	อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร		1.6936^{k}	1.87^{k}	57.28^{cde}	-1.18^{h}	$+6.51^{i}$	+++
6	กระบี่		1.5768^{k}	2.64^{hij}	52.71^{def}	$+1.43^{bcde}$	$+12.17^{cde}$	++

หมายเหตุ : +, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรเล็กน้อย; ++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรปานกลาง; +++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรมาก

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับ a,b,c,... ต่างกันในแต่ละแถวแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มา		น้ำหนัก (กรัม)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	สี			กลิ่น
					L*	a*	b*	
7	อ.หลังสวน จ.ชุมพร		3.3162^{hi}	2.74^{fgh}	67.95^{ab}	$+0.47^{efg}$	$+12.97^{cd}$	++
8	อ.บางขัน จ.นครศรีธรรมราช		4.2369^{e}	2.58^{ij}	44.33^{f}	$+1.29^{cde}$	$+8.36^{ghi}$	++
9	นครราชสีมา		6.5617^{a}	3.51^{a}	51.21^{ef}	-0.27^{gh}	$+7.55^{hi}$	+++

หมายเหตุ : +, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรเล็กน้อย; ++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรปานกลาง; +++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรมาก มาก

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับ a,b,c,... ต่างกันในแต่ละแถวแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มา		น้ำหนัก (กรัม)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	สี			กลิ่น
					L*	a*	b*	
10	อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช		3.1120^{i}	3.00^{d}	66.04^{abc}	+2.35^{b}	+19.77^{b}	+++
11	ต.กราย อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช		3.7612^{g}	2.69^{ghi}	58.04^{cde}	-0.25^{gh}	+6.65^{i}	++
12	อ.ลานสกา จ. นครศรีธรรมราช		4.9658^{e}	2.84^{ef}	65.87^{abc}	+0.27^{fg}	+8.74^{ghi}	+

หมายเหตุ : +, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรเล็กน้อย; ++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรปานกลาง; +++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรมาก

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับ a,b,c,... ต่างกันในแต่ละแถวแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มา		น้ำหนัก (กรัม)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	สี			กลิ่น
					L*	a*	b*	
13	จ.พัทลุง		3.6007^{gh}	2.84^{ef}	58.80^{bcde}	+0.19^{g}	+7.54^{hi}	+
14	ชุมพร		4.1527^{ef}	2.57^{ij}	64.79^{abc}	+1.22^{cdef}	+10.30^{efg}	+
15	จ.สงขลา		4.2512^{e}	2.64^{hij}	69.70^{a}	+1.41^{bcde}	+13.09^{cd}	+++

หมายเหตุ : +, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรเล็กน้อย; ++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรปานกลาง; +++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรมาก

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับ a,b,c,... ต่างกันในแต่ละแถวแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มา		น้ำหนัก (กรัม)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	สี			กลิ่น
					L*	a*	b*	
16	บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา		5.9467^{b}	3.42^{ab}	64.52^{abc}	$+2.19^{bc}$	$+19.62^{c}$	++
17	อ.สะทิงพระ จ.สงขลา (2)		3.9217^{fg}	2.78^{fg}	63.59^{abc}	$+1.79^{bc}$	$+12.07^{cdef}$	++
18	อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา		3.8481^{fg}	2.61^{hij}	68.20^{ab}	$+1.80^{bc}$	$+13.32^{cd}$	++

หมายเหตุ : +, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรเล็กน้อย; ++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรปานกลาง; +++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรมาก

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับ a,b,c,... ต่างกันในแต่ละแถวแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	แหล่งที่มา		น้ำหนัก (กรัม)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (ซม.)	สี			กลิ่น
					L*	a*	b*	
19	ลพบุรี		2.1193^{j}	3.47^{ab}	63.08^{abc}	+2.35^{b}	+19.72^{b}	+++
20	ต.ท้ายสำเภา อ.ร่อนพิบูลย์ จ.นครศรีธรรมราช		3.4114^{hi}	2.95^{de}	65.64^{abc}	+3.55^{a}	+21.35^{ab}	+
21	อ.เชียรใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช		3.3185^{hi}	3.38^{b}	63.77^{abc}	+3.49^{a}	+23.35^{a}	++

หมายเหตุ : +, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรเล็กน้อย; ++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรปานกลาง; +++, มีกลิ่นหอมของสมุนไพรมาก

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับ a,b,c,... ต่างกันในแต่ละแถวแนวตั้ง หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range

4.3 การคัดแยกสายพันธุ์เชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมาก

การคัดแยกเชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมาก ใช้วิธีแยก 2 วิธีคือ Spread Plate Technique โดยบดตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร หยด Suspension ที่เตรียมไว้ 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เกลี่ยด้วยแท่งแก้วงอให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ Enrichment Technique โดยนำตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากมาบดให้เป็นผงละเอียด ใส่ลงในน้ำที่ปราศจากเชื้อ 9 มิลลิลิตร แล้วปิเปตสารละลายลูกแป้ง 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะพบเชื้อราลักษณะแตกต่างกันไป แล้วแยกเชื้อราที่มีลักษณะต่างๆมาเลี้ยงบน PDA จนกว่าจะแน่ใจว่าได้เชื้อราบริสุทธิ์ ซึ่งสามารถแยกเชื้อราได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท จากลูกแป้งข้าวหมาก 21 แหล่ง ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 จำนวนไอโซเลท หมายเลขไอโซเลทและอะไมเลสแอกติวิตีของเชื้อราที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 21 แหล่ง

แหล่งที่มา	จำนวนไอโซเลท	หมายเลขไอโซเลท	อะไมเลสแอกติวิตี
จ.นครปฐม	5	LK1-1, LK1-5 LK1-2,LK1-3,LK1-4	+ +++
จ.ตราด	4	LK2-1 LK2-2, LK2-3 LK2-4	No activity ++ +
อ.เมือง จ.ชุมพร	3	LK3-1 LK3-2, LK3-3	++ No activity
อ.สะทิงพระ จ.สงขลา (1)	5	LK4-1 LK4-2,LK4-3,LK4-4 LK4-5	+++ + ++
อ.ท่าแซะ จ.ชุมพร	1	LK5-1	No activity
จ.กระบี่	5	LK6-1,LK6-2,LK6-3 LK6-4 LK6-5	No activity ++ +++
อ.หลังสวน จ.ชุมพร	8	LK7-1,LK7-4 LK7-2,LK7-5,LK7-6,LK7-7 LK7-3,LK7-8	+ ++ +++
อ.บางขัน จ.นครศรีธรรมราช	4	LK8-1 LK8-2 LK8-3,LK8-4	++ +++ +

หมายเหตุ: +, กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสต่ำ; ++, กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสปานกลาง; +++, กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

แหล่งที่มา	จำนวน ไอโซเลท	หมายเลขไอโซเลท	อะไมเลสแอกติวิตี
จ.นครราชสีมา	3	LK9-1,LK9-2 LK9-3	+ ++
อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช	4	LK10-1,LK10-2, LK10-3,LK10-4	++
ต.กราย อ.ท่าศาลา จ.นครศรีธรรมราช	3	LK11-1,LK11-2 LK11-3	+ ++
อ.ลานสกา จ.นครศรีธรรมราช	6	LK12-1,LK12-2,LK12-3 LK12-4,12-6 LK12-5	+ ++ +++
จ.พัทลุง	6	LK13-1, LK13-3, LK13-4, LK13-5, LK13-6 LK13-2	++ +
จ.ชุมพร	4	LK14-1,LK14-2,LK14-3, LK14-4	++
จ.สงขลา	7	LK15-1,LK15-2, LK15-3,LK15-4 LK15-5 LK15-6,LK15-7	+ +++ +
บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา	8	LK16-1,LK16-2, LK16-8 LK16-3,LK16-4, LK16-6	+ ++

หมายเหตุ: +, กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสต่ำ; ++, กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสปานกลาง; +++, กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

แหล่งที่มา	จำนวน ไอโซเลท	หมายเลขไอโซเลท	อะไมเลสแอกติวิตี
		LK16-7	++
		LK16-5	+++
อ.สะทิงพระ จ.สงขลา (2)	4	LK17-1	+++
		LK17-2	No activity
		LK17-3,LK17-4	++
อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา	3	LK18-1,LK18-2	++
		LK18-3	No activity
ลพบุรี	6	LK19-1	+++
		LK19-2, LK19-3, LK19-6	++
		LK19-4	No activity
		LK19-5	+
ต.ท้ายสำเภา อ.ร่อนพิบูลย์ จ.นครศรีธรรมราช	6	LK20-1,LK20-3,LK20-4, LK20-5	+
		LK20-2	++
		LK20-6	No activity
อ.เชียรใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	5	LK21-1,LK21-2	+
		LK21-3,LK21-4,LK21-5	++

หมายเหตุ: +, กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสต่ำ; ++, กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสปานกลาง; +++, กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง

4.4 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา

ในขั้นตอนแรกจะนำเชื้อราทั้ง 100 ไอโซเลทมาคัดเลือกเบื้องต้น โดยนำมาทดสอบในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว Starch medium ซึ่งประกอบด้วย 3% Soluble starch เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง สามารถแบ่งเชื้อราตามกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสได้ ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 เชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง (แสดงเครื่องหมาย +++ ในตาราง 4.3) ได้แก่ LK1-2, LK1-3, LK1-4, LK4-1, LK6-5, LK7-3, LK7-8, LK8-2, LK12-5, LK15-5, LK16-5, LK17-1 และ LK19-1

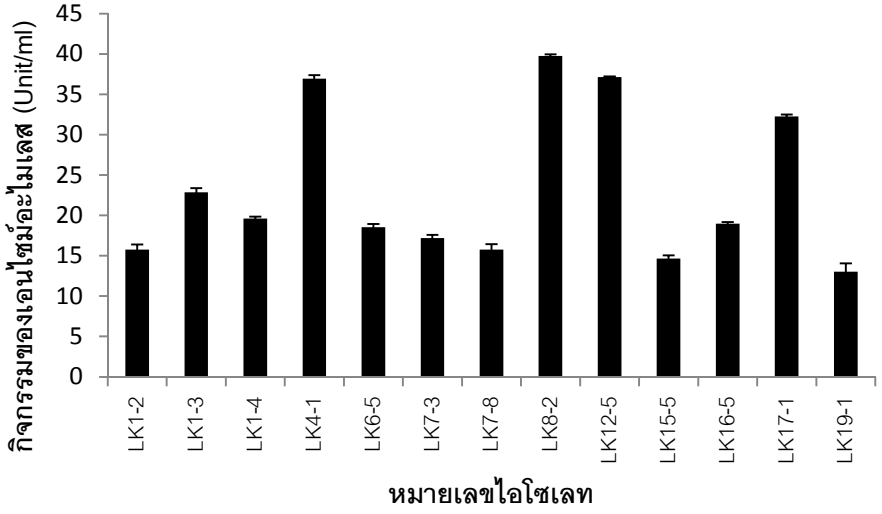
กลุ่มที่ 2 เชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสปานกลาง (แสดงเครื่องหมาย ++ ในตาราง 4.3) ได้แก่ LK2-2, LK2-3, LK3-1, LK4-5, LK6-4, LK7-2, LK7-5, LK7-6, LK7-7, LK8-1, LK9-3, LK10-1, LK10-2, LK10-3, LK10-4, LK11-3, LK12-4, LK12-6, LK13-1, LK13-3, LK13-4, LK13-5, LK13-6, LK14-1, LK14-2, LK14-3, LK15-1, LK15-2, LK15-3, LK15-4, LK16-3, LK16-4, LK16-6, LK16-7, LK17-3, LK17-4, LK18-1, LK18-2, LK19-2, LK19-3, LK19-6, LK20-2, LK21-3, LK21-4 และ LK21-5

กลุ่มที่ 3 เชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสต่ำ (แสดงเครื่องหมาย + ในตาราง 4.3) ได้แก่ LK1-1, LK1-5, LK2-4, LK4-2, LK4-3, LK4-4, LK7-1, LK7-4, LK8-3, LK8-4, LK9-1, LK9-2, LK11-1, LK11-2, LK12-1, LK12-2, LK12-3, LK13-2, LK15-6, LK15-7, LK16-1, LK16-2, LK16-8, LK19-5, LK20-1, LK20-3, LK20-4, LK20-5, LK21-1 และ LK21-2

กลุ่มที่ 4 เชื้อราที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (No activity) ดังแสดงในตาราง 4.3 ได้แก่ LK2-1, LK3-2, LK3-3, LK5-1, LK6-1, LK6-2, LK6-3, LK 17-2, LK18-3, LK19-4 และ LK20-6

จากการคัดเลือกเชื้อราตามกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสได้ พบว่าเชื้อราในกลุ่มที่ 1 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง จึงนำเชื้อรากลุ่มที่ 1 จำนวน 13 ไอโซเลทมาศึกษากิจกรรมของ

เอนไซม์อะไมเลส โดยนำเชื้อรามาเลี้ยงลงในฟลาสก์ที่มีอาหาร Starch medium ใช้3% Soluble starch เป็นซับสเตรทและมีสปอร์ของเชื้อราเริ่มต้นที่ 1 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ จากผลการทดลองพบว่าเชื้อราทั้ง 13 ไอโซเลทมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส อยู่ในช่วง 14.65 – 39.74 หน่วยต่อมิลลิลิตร โดยเชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดคือ LK8-2 จากอำเภอบางขัน จังหวัดนครศรีธรรมราช มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงถึง 39.74 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาอีก 3 อันดับคือ LK12-5 จากอำเภอลานสกา จังหวัดนครศรีธรรมราช, LK4-1 จากอำเภอสะทิงพระ จังหวัดสงขลา และ LK17-1 จากอำเภอสะทิงพระ จังหวัดสงขลา (2) มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 37.13, 36.93 และ 32.24 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.1



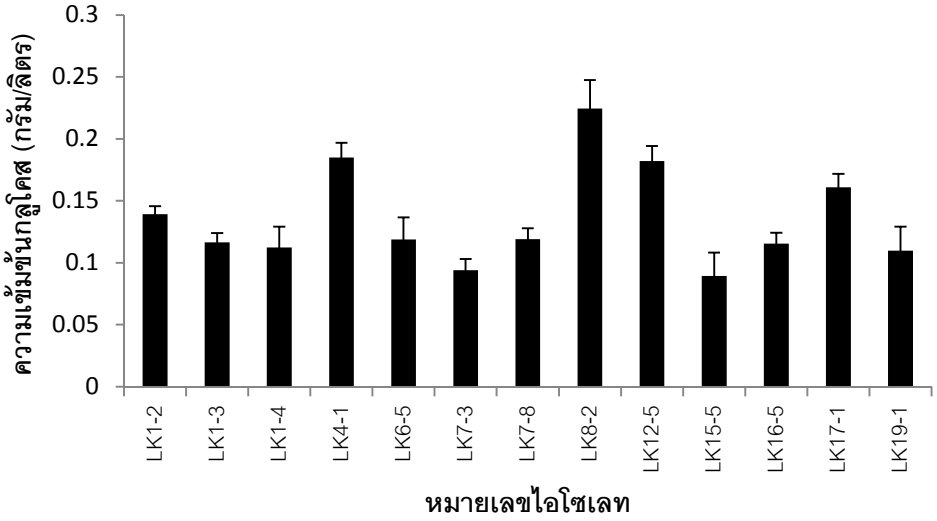
รูปที่ 4.1 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อราที่คัดเลือกจำนวน 13 ไอโซเลท โดยมีสปอร์เริ่มต้นที่ 1x10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4.5 ศึกษากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา

นำเชื้อราที่ผ่านการคัดเลือก 13 ไอโซเลท มาวัดปริมาณน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) โดยปริมาณน้ำตาลกลูโคสที่วัดได้ จะแสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา เนื่องจากเอนไซม์กลูโคอะไมเลสจะเร่งปฏิกิริยาการย่อยแป้งจาก Non-Reducing ของ α- 1,4-D-Glucan

ที่ละหน่วยกลูโคส โดยทำลายพันธะ α- 1,4 Glycosidic Linkage และ α – 1,6 Glycosidic Linkage ทำให้ได้ D-Glucose เพียงอย่างเดียว (สมพร สินธารา, 2544) จากผลการทดลองพบว่า มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ในช่วง 0.0839 – 0.2245 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อราที่สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงที่สุดคือ LK8-2 จากอำเภอบางขัน จังหวัดนครศรีธรรมราช มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงถึง 0.2245 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาอีก 3 อันดับคือ LK4-1 จากอำเภอสะทิงพระ จังหวัดสงขลา, LK12-5 จากอำเภอลานสกา จังหวัดนครศรีธรรมราช และ LK17-1 จากอำเภอสะทิงพระ จังหวัดสงขลา (2) มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.185, 0.182 และ 0.1609 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.2

จากผลการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา 13 ไอโซเลท จึงคัดเลือกเชื้อรา 4 ไอโซเลท คือ LK8-2, LK4-1, LK12-5 และ LK17-1 มาพิสูจน์เอกลักษณ์และนำไปเตรียมกล้าเชื้อรา เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

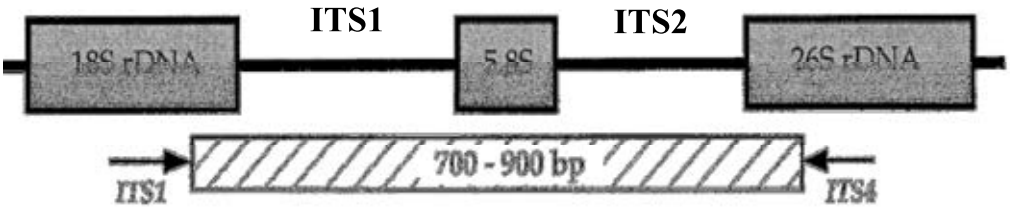


รูปที่ 4.2 ความเข้มข้นของกลูโคสของเชื้อราที่คัดเลือกจำนวน 13 ไอโซเลท เมื่อเลี้ยงใน Starch broth โดยมีสปอร์เริ่มต้นที่ $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4.6 การพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรา

พิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรา โดยอาศัยลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA และดูลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา 4 ไอโซเลท พบว่าเชื้อรา LK4-1, LK8-2 และLK12-5 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA มีเส้นใยสีขาว ยาว แต่ไม่ฟูมาก เจริญเติบโตเต็มจานเพาะเชื้อภายใน 2-3 วัน ดังรูปที่ 4.4 (a, b, c) ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ คือ เส้นใยไม่มีผนังกั้น พบคลามัยโดสปอร์ที่ใส ไม่มีสี เจริญอยู่เป็นจำนวนมากภายในเส้นใย ภายในสปอร์แรงเจียม (Sporangium) ไม่มีสปอร์ เรียกว่า Abortive sporangium ดังรูปที่ 4.5 (a, b, c) ส่วน LK17-1 เมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA มีเส้นใยมีสีขาว ยาวฟู สปอร์จะเป็นสีเทาดำเมื่อมีอายุมากขึ้น เจริญเติบโตเต็มจานเพาะเชื้อภายใน 2-3 วัน ดังแสดงในรูป 4.4 (d) ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า มีส่วนที่เป็นไรซอยด์ (Rhizoid) สีน้ำตาล ผิวเรียบ แตกแขนง มีส่วนของสปอร์แรงจิโอฟอร์ (Sporangiophores) เกิดเป็นก้านเดี่ยวๆ หรือเกิดรวมเป็นกลุ่มอยู่เหนือไรซอยด์ สปอร์แรงจิโอสปอร์เป็นรูปทรงกลม ไม่มีผนังกั้นเส้นใย จากลักษณะสัณฐานวิทยาดังกล่าว เมื่อเปรียบเทียบกับ Taxonomic keys ในหนังสือ Introduction to food and airborne fungi (Samson และคณะ, 2002) และ Introduction to Fungi (Webster and Weber, 2007) เชื้อรา LK4-1, LK8-2 และLK12-5 จัดเป็นราสกุล *Amylomyces* ส่วนเชื้อรา LK17-1 จัดเป็นราสกุล *Rhizopus*

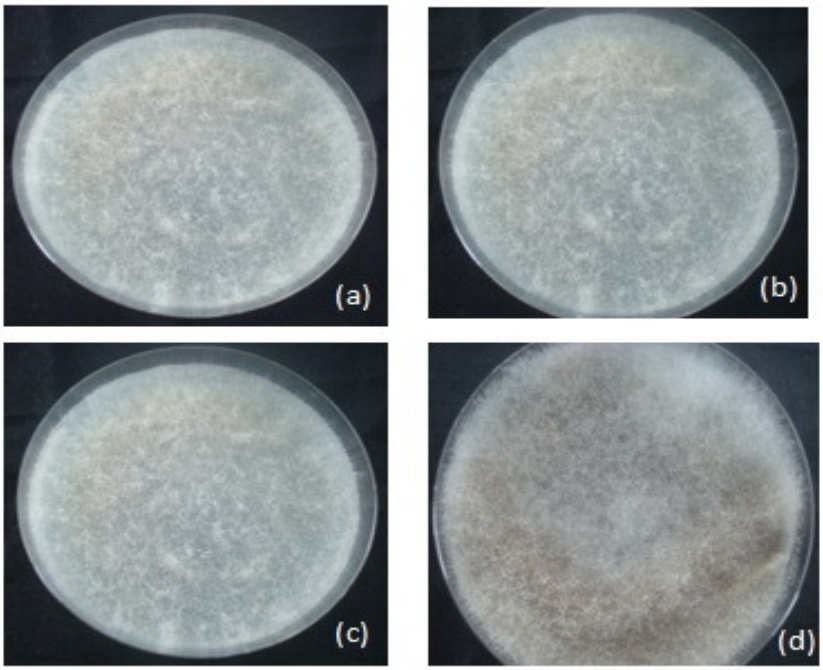
เพื่อให้ทราบสายพันธุ์ของเชื้อราให้แน่ชัดจึงวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS-1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') และ ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') ดังแสดงในรูปที่ 4.3 โดยบริเวณ ITS นั้น เป็นบริเวณที่ใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ รา และพืช โดยนิยมใช้เพื่อกำหนดสปีชีส์ของเชื้อรา (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)



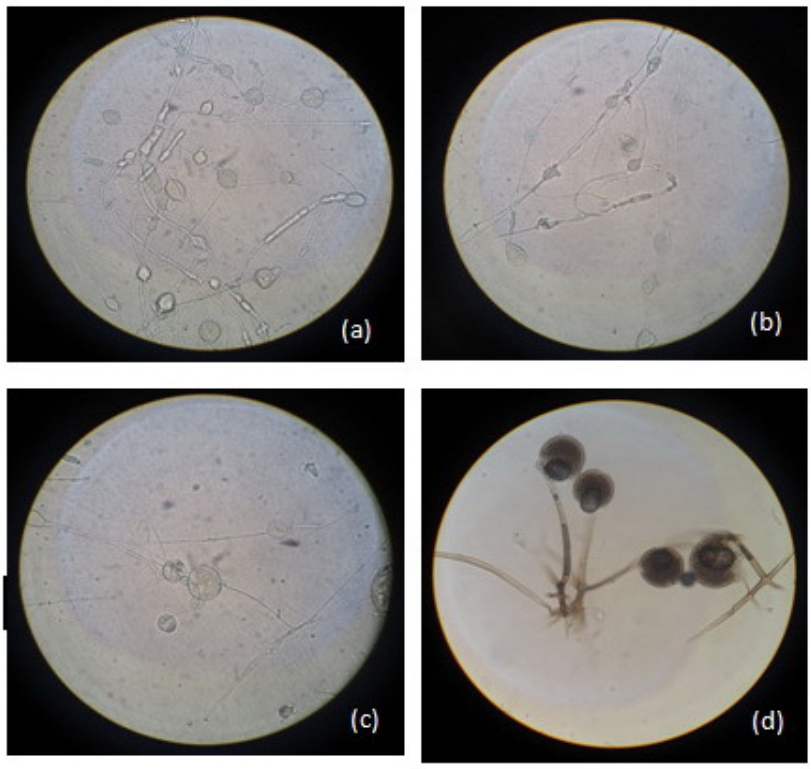
รูปที่ 4.3 บริเวณ Internal Transcribed Spacer ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ

จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LK4-1, LK8-2, LK12-5 บริเวณ ITS แล้วเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Amylomyces rouxii* และ*Rhizopus oryzae* เป็น 100% เนื่องจากเชื้อราทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกันมาก (Abe และคณะ, 2003) จึงต้องใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย ซึ่งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า ไม่มีการสร้างไรซอยด์ (รูปที่ 4.5 (a,b,c)) ดังนั้นจัดว่าเป็นเชื้อ *Amylomyces rouxii* และเมื่อนำไปสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ พบว่า LK4-1, LK8-2, LK12-5 มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Amylomyces rouxii* (รูปที่ 4.6) ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ LK17-1 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณเดียวกันกับฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Rhizopus microsporus* เป็น 99% เมื่อนำไปสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Rhizopus microsporus* (รูปที่ 4.6)

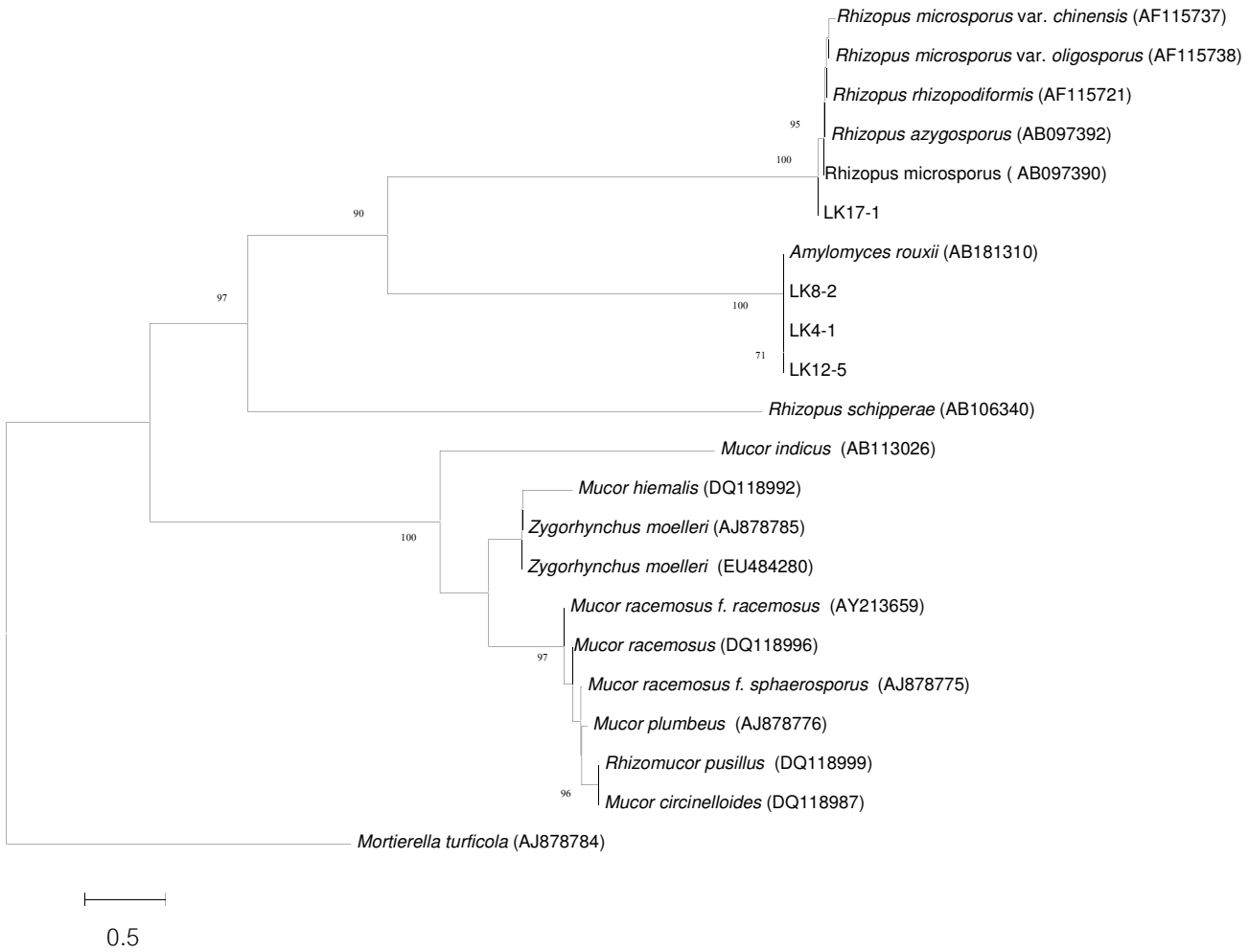
จะเห็นได้ว่าชนิดของเชื้อราที่พบนั้นเป็นเชื้อราที่จำแนกได้ในลูกแป้ง ดังรายงานของ Limtong และคณะ (2005) แยกเชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง พบว่าได้เชื้อราสกุล *Amylomyces* 31 ไอโซเลท *Rhizopus* 27 ไอโซเลท Mucor 2 ไอโซเลท *Aspergillus* 9 ไอโซเลท *Actinomucor* 5 ไอโซเลท *Penicillium* 1 ไอโซเลท และ *Monascus* 2 ไอโซเลท เช่นเดียวกันกับ Dung และคณะ (2007) แยกเชื้อราใน Banhmen 6 ตัวอย่าง พบว่าได้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* 3 ไอโซเลท *Rhizopus oligosporus* 1 ไอโซเลท *Rhizopus oryzae* 3 ไอโซเลท นอกจากนี้ Lee และ Fujio (2005) แยกเชื้อราใน Banhmen 12 ตัวอย่าง พบว่าได้เชื้อราสกุล *Rhizopus* 10 ไอโซเลท *Amylomyces* 1 ไอโซเลท และ *Mucor* 9 ไอโซเลท



รูปที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA (a) LK4-1 (b) LK8-2 (c) LK12-5 (d) LK17-1



รูปที่ 4.5 ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา 4 ไอโซเลท (a) LK4-1 (b) LK8-2 (c) LK12-5 (d) LK17-1



รูปที่ 4.6 ต้นไม้วิวัฒนาการของเชื้อรา LK4-1, LK8-2, LK12-5 และ LK17-1

4.7 การคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก

4.7.1 การคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์จากลูกแป้งข้าวหมาก

การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 21 แหล่ง โดยใช้วิธีแยก 2 วิธีคือ Spread Plate Technique และ Enrichment Technique สามารถแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลท ในตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง คือ อำเภอสะทิงพระ จังหวัดสงขลา (1), อำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร, อำเภอบางขัน จังหวัดนครศรีธรรมราช, อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช, จังหวัดสงขลา, อำเภอบางน้ำเปรี้ยว จังหวัดฉะเชิงเทรา,อำเภอสะทิงพระ จังหวัดสงขลา (2), จังหวัดลพบุรี, ตำบลท้ายสำเภา อำเภอร่อนพิบูลย์ จังหวัดนครศรีธรรมราช, อำเภอเชียรใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช ดังแสดงในตารางที่ 4.4 สาเหตุที่แยกยีสต์จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากเพียง 10 แหล่ง เนื่องจากได้คัดแยกยีสต์ภายหลังจากการเก็บตัวอย่างไว้นานกว่า 8 เดือน อาจทำให้ยีสต์ในลูกแป้งข้าวหมากบางแหล่งตายไป

สามารถจำแนกยีสต์ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันได้ 6 ลักษณะ (รูปที่ 4.7) ดังนี้

ลักษณะที่ 1 โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน ไม่มันวาว มีเส้นใยปกคลุม ขอบมีเส้นใยชัดเจน จากลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง พบยีสต์ลักษณะนี้ ทั้งหมด 9 ไอโซเลท

ลักษณะที่ 2 โคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวหน้าด้าน ลักษณะเป็นทรงกลม จากลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง พบเชื้อยีสต์ลักษณะนี้ ทั้งหมด 2 ไอโซเลท

ลักษณะที่ 3 โคโลนีมีสีขาวขุ่น ลักษณะกลม ผิวด้านตรงกลางนูนขอบมีเส้นใยเล็กน้อยรอบโคโลนี จากลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง พบยีสต์ลักษณะนี้ ทั้งหมด 1 ไอโซเลท

ลักษณะที่ 4 โคโลนีสีขาวขุ่น มันวาว จากลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง พบยีสต์ลักษณะนี้ ทั้งหมด 1 ไอโซเลท

ลักษณะที่ 5 โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า จากลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง พบยีสต์ลักษณะนี้ ทั้งหมด 15 ไอโซเลท

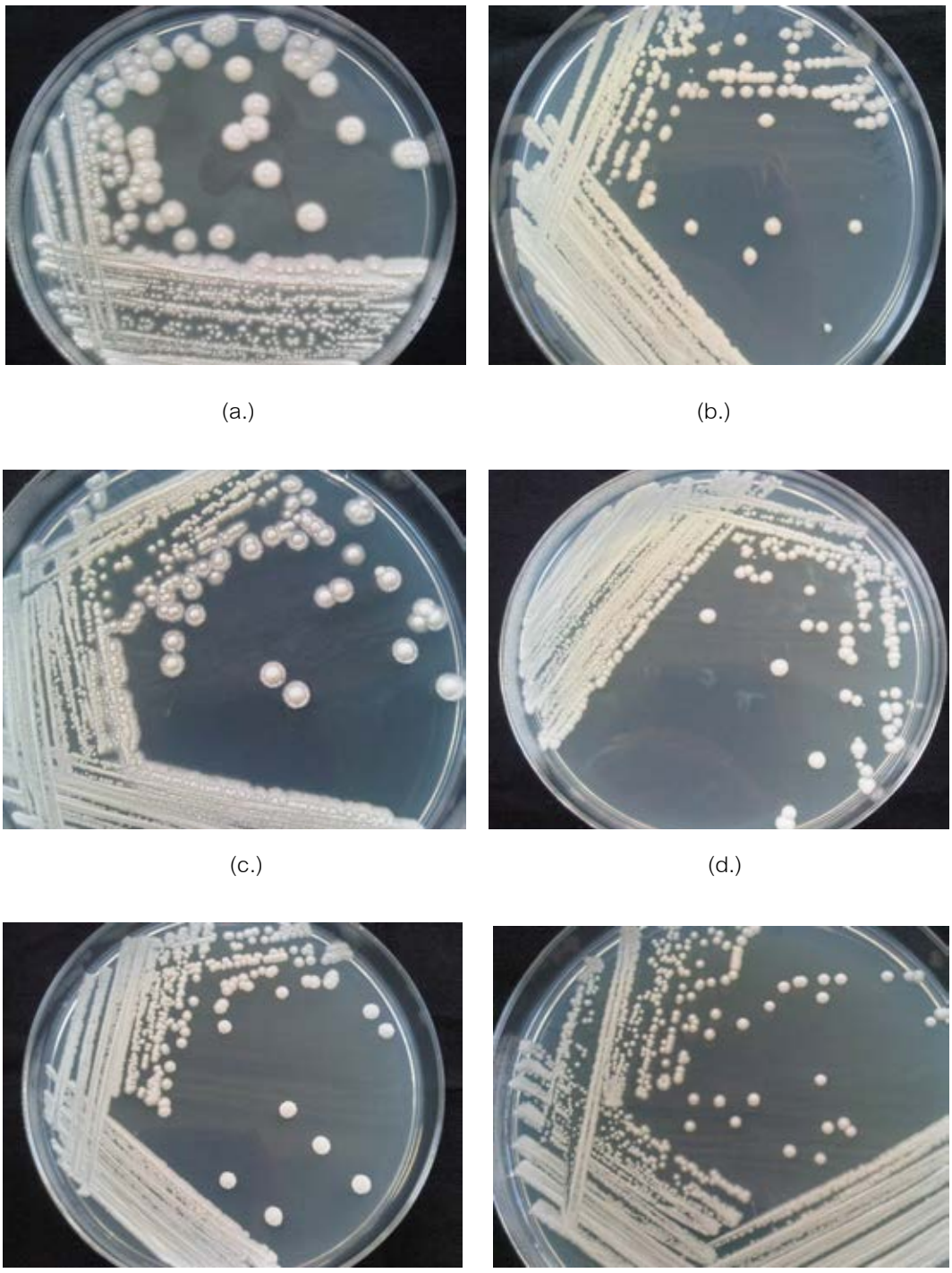
ลักษณะที่ 6 โคโลนีมีสีครีม ผิวหน้าเรียบ เยิ้ม จากลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง พบเชื้อลักษณะนี้ ทั้งหมด 4 ไอโซเลท

ตาราง 4.4 จำนวนไอโซเลท หมายเลขไอโซเลทและลักษณะโคโลนีของยีสต์แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก

แหล่งที่มา	จำนวนไอโซเลท	หมายเลขไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่พบ
อ.สะทิงพระ จ.สงขลา	4	LY4-1	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY4-2	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY4-3	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY4-4	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
อ.หลังสวน จ.ชุมพร	2	LY7-1	โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน ไม่มันวาว มีเส้นใยปกคลุม ขอบมีเส้นใยชัดเจน
		LY7-2	โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน ไม่มันวาว มีเส้นใยปกคลุม ขอบมีเส้นใยชัดเจน
อ.บางขัน จ.นครศรีธรรมราช	2	LY8-1	โคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวหน้าด้าน ลักษณะเป็นทรงกลม
		LY8-2	โคโลนีมีสีขาวขุ่น ผิวหน้าด้าน ลักษณะเป็นทรงกลม
อ.เมือง จ.นครศรีธรรมราช	2	LY10-1	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY10-2	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
จ.สงขลา	4	LY15-1	โคโลนีมีสีครีม ผิวหน้าเรียบ เยิ้ม
		LY15-2	โคโลนีมีสีครีม ผิวหน้าเรียบ เยิ้ม
		LY15-3	โคโลนีมีสีครีม ผิวหน้าเรียบ เยิ้ม
		LY15-4	โคโลนีมีสีครีม ผิวหน้าเรียบ เยิ้ม
บางน้ำเปรี้ยว จ.ฉะเชิงเทรา	5	LY16-1	โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน ไม่มันวาว มีเส้นใยปกคลุม ขอบมีเส้นใยชัดเจน
		LY16-2	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY16-3	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY16-4	โคโลนีมีสีขาวขุ่น ลักษณะกลม ผิวด้านตรงกลางนูน ขอบมีเส้นใยเล็กน้อยรอบโคโลนี
		LY16-5	โคโลนีสีขาวขุ่น มันวาว

ตาราง 4.4 (ต่อ)

แหล่งที่มา	จำนวนไอโซเลท	หมายเลขไอโซเลท	ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่พบ
อ.สะทิงพระ จ.สงขลา	5	LY17-1	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY17-2	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY17-3	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY17-4	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY17-5	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
ลพบุรี	3	LY19-1	โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน ไม่มันวาว มีเส้นใยปกคลุม ขอบมีเส้นใยชัดเจน
		LY19-2	โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน ไม่มันวาว มีเส้นใยปกคลุม ขอบมีเส้นใยชัดเจน
		LY19-3	โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน ไม่มันวาว มีเส้นใยปกคลุม ขอบมีเส้นใยชัดเจน
ต.ท้ายสำเภา อ.ร่อนพิบูลย์ จ.นครศรีธรรมราช	2	LY20-1	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
		LY20-2	โคโลนีขาว ผิวเรียบ มันวาว ขอบเรียบจนถึงเว้า
อ.เชียรใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช	3	LY21-1	โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน ไม่มันวาว มีเส้นใยปกคลุม ขอบมีเส้นใยชัดเจน
		LY21-2	โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน ไม่มันวาว มีเส้นใยปกคลุม ขอบมีเส้นใยชัดเจน
		LY21-3	โคโลนีมีสีขาว ผิวหน้าหยาบด้าน ไม่มันวาว มีเส้นใยปกคลุม ขอบมีเส้นใยชัดเจน



(a.) (b.)

(c.) (d.)

(e.) (f.)

รูปที่ 4.7 ลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง (a.) ลักษณะที่ 1 (LY19-1) (b.) ลักษณะที่ 2 (LY8-1) (c.) ลักษณะที่ 3 (LY16-4) (d.) ลักษณะที่ 4 (LY16-5) (e.) ลักษณะที่ 5 (20-1) (f.) ลักษณะที่ 6 (LY15-1)

4.7.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ยีสต์

จากผลการคัดแยกยีสต์ พบว่ามีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 6 ลักษณะ จึงคัดเลือกตัวแทนของแต่ละลักษณะมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA โดยใช้ F63 (5'- GCATATCAA TAAGCGGAGGAAAAG-3') เป็น Forward primer และ LR3 (5'- GGTCCGTGTTTCAAGA CGG-3') เป็น Reverse primer เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ยีสต์ที่แยกได้ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 (คัดเลือกยีสต์หมายเลข LY19-2 เป็นตัวแทนกลุ่ม)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า แอสโคสปอร์เป็น Hat-shaped มีการสร้าง Pseudohyphae สามารถแอสซิมิเลทสารประกอบคาร์บอนได้ดังนี้ คือ Cyclohaxamide, D-Sucrose, N-acetyl-glucosamine (เฉพาะหมายเลข LY21-1), D-cellobiose, D-ruffinose, D-maltose, Methyl-α-D-glucopyranoside, Inositol (เฉพาะหมายเลข LY21-1, LY21-2), D-mannitol (เฉพาะหมายเลข LY7-1), Glycerol, D-glucose และ Esculin ferric citrate (ดังแสดงในตาราง 4.5) จากผลการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนของ LY19-2 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ Taxonomic Keys ในหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study (Kurtzman and Fell, 1998) และ Summary of specific characteristics. Yeast: Characteristics and identification (Barnett และคณะ, 2000) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับ *Saccharomycopsis fibuligera*

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของ LY19-2 โดยใช้ไพรเมอร์ F63 และ LR3 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Saccharomycopsis fibuligera* เป็น 100% และนำไปสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (รูปที่ 4.8) พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Saccharomycopsis fibuligera* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีสต์ในกลุ่มที่ 1 ซึ่งได้แก่ ยีสต์หมายเลข LY7-1, LY7-2, LY16-1, LY19-1, LY19-2, LY19-3, LY21-1, LY21-2 และ LY21-3 จัดเป็น *Saccharomycopsis fibuligera*

กลุ่มที่ 2 (คัดเลือกยีสต์หมายเลข LY8-1 เป็นตัวแทนกลุ่ม)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์ มีการสร้าง Pseudohyphae สามารถแอสซิมิเลทสารประกอบคาร์บอนได้ดังนี้ คือ D-galactose, N-acetyl-glucosamine, Lactic acid, D-mannitol, D-sorbitol, D-xylose, D-glucose, Glucosamine และ Esculin ferric citrate (ดังแสดงในตาราง 4.5) จากผลการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนของ LY8-1 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ Taxonomic Keys ในหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study (Kurtzman and Fell, 1998) และ Summary of specific characteristics. Yeast: Characteristics and identification (Barnett และคณะ, 2000) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับ *Candida rugosa*

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของ LY8-1 โดยใช้ไพรเมอร์ F63 และ LR3 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Candida rugosa* เป็น 100% และนำไปสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (รูปที่ 4.8) พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Candida rugosa* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีสต์ในกลุ่มที่ 2 ได้แก่ ยีสต์หมายเลข LY8-1 และ LY8-2 จัดเป็น *Candida rugosa*

กลุ่มที่ 3 (LY16-4)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่าไม่สร้างแอสโคสปอร์ มีการสร้าง Pseudohyphae สามารถแอสซิมิเลทสารประกอบคาร์บอนได้ดังนี้ คือ D-Galactose, Cyclohexamide, D-sucrose, N-acetyl-glucosamine, Lactic acid, D-cellobiose, D-raffinose, D-maltose, D-trehalose, Potassium 2-keto gluconate, Methyl-α-D-glucopyranoside, D-mannitol, D-sorbitol, D-xylose, D-ribose, Glycerol, D-rhamnose, Palatinose, D-melezitose, Potassium gluconate, Levulinic acid, D-glucose, L-sorbose, Glucosamine และ Esculin ferric citrate (ดังแสดงในตาราง 4.5) จากผลการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนของ LY16-4 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ Taxonomic Keys ในหนังสือ

The Yeasts, A Taxonomic Study (Kurtzman and Fell, 1998) และ Summary of specific characteristics. Yeast: Characteristics and identification (Barnett และคณะ, 2000) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับ *Candida tropicalis*

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของ LY16-4 โดยใช้ไพรเมอร์ F63 และ LR3 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Candida tropicalis* เป็น 100% และนำไปสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (รูปที่ 4.8) พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Candida tropicalis* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีสต์ในกลุ่มที่ 3 ซึ่งได้แก่ ยีสต์หมายเลข LY16-4 จัดเป็น *Candida tropicalis*

กลุ่มที่ 4 (LY16-5)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีลักษณะ 1-2 Clavate ascospores มีการสร้าง Pseudohyphae สามารถแอสซิมิเลทสารประกอบคาร์บอนได้ดังนี้ คือ D-galactose, D-sucrose, D-cellobiose, D-maltose, D-trehalose, Potassium 2-keto gluconate, Methyl-α-D-glucopyranoside, D-mannitol, D-sorbitol, D-xylose, D-ribose, Glycerol, D-rhamnose, Palatinose, D-melezitose, Potassium gluconate, D-glucose, Glucosamine และ Esculin ferric citrate (ดังแสดงในตาราง 4.5) จากผลการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนของ LY16-5 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ Taxonomic Keys ในหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study (Kurtzman and Fell, 1998) และ Summary of specific characteristics. Yeast: Characteristics and identification (Barnett และคณะ, 2000) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับ *Clavispora lusitaniae*

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของ LY16-5 โดยใช้ไพรเมอร์ F63 และ LR3 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Clavispora lusitaniae* เป็น 100% และนำไปสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (รูปที่ 4.8) พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Clavispora*

lusitaniae ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีสต์ในกลุ่มที่ 4 ซึ่งได้แก่ ยีสต์หมายเลข LY16-5 จัดเป็น *Clavispora lusitaniae*

กลุ่มที่ 5 (คัดเลือกยีสต์หมายเลข LY20-1 เป็นตัวแทนกลุ่ม)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า มีลักษณะ 1-4 Hat-shaped ascospores ไม่มีการสร้าง Pseudohyphae สามารถแอสซิมิเลทสารประกอบคาร์บอนได้ดังนี้ D-sucrose, Lactic acid, D-cellobiose (เฉพาะหมายเลข LY16-2) , D-raffinose, D-maltose, D-trehalose, Methyl-α-D-glucopyranoside, D-mannitol, D-sorbitol, D-xylose, Glycerol, Palatinose, Erythritol, D-melezitose, Potassium gluconate (เฉพาะหมายเลข LY16-2), D-glucose และ Esculin ferric citrate (ดังแสดงในตาราง 4.5) จากผลการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนของ LY20-1 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ Taxonomic Keys ในหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study (Kurtzman and Fell, 1998) และ Summary of specific characteristics. Yeast: Characteristics and identification (Barnett และคณะ, 2000) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับ *Pichia anomala*

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของ LY20-1 โดยใช้ไพรเมอร์ F63 และ LR3 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Pichia anomala* เป็น 100% และนำไปสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (รูปที่ 4.8) พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Pichia anomala* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีสต์ในกลุ่มที่ 5 ซึ่งได้แก่ ยีสต์หมายเลข LY4-1, LY4-2, LY4-3, LY4-4, LY10-1, LY10-2, LY16-2, LY16-3, LY17-1, LY17-2, LY17-3, LT17-4, LY17-5, LY20-1 และ LY20-2 จัดเป็น *Pichia anomala*

กลุ่มที่ 6 (คัดเลือกยีสต์หมายเลข LY15-1 เป็นตัวแทนกลุ่ม)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่า มีลักษณะ 1-4 Hat-shaped ascospores มีการสร้าง Pseudohyphae สามารถแอสซิมิเลทสารประกอบคาร์บอนได้ดังนี้ คือ D-galactose, Cyclohexamide, D-sucrose, N-acetyl-glucosamine, Arabinose, D-cellobiose, D-raffinose, D-Maltose, D-trehalose, Potassium 2-keto gluconate, Methyl-α-D-glucopyranoside, D-mannitol, D-sorbitol, D-xylose, Glycerol, D-rhamnose, Palatinose, D-melezitose, Potassium gluconate, Levulinic acid, D-glucose, L-sorbose, Glucosamine และ Esculin ferric citrate (ดังแสดงในตาราง 4.5) จากผลการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนของ LY15-1 เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับ Taxonomic Keys ในหนังสือ The Yeasts, A Taxonomic Study (Kurtzman and Fell, 1998)และ Summary of specific characteristics. Yeast: Characteristics and identification (Barnett และคณะ, 2000) พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับ *Pichia guilliermondii*

จากการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของ LY15-1 โดยใช้ไพรเมอร์ F63 และ LR3 เปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA กับสปีชีส์ในฐานข้อมูล GenBank พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกับ *Pichia guilliermondii* เป็น 100% และนำไปสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ (รูปที่ 4.8) พบว่ามีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับ *Pichia guilliermondii* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่ายีสต์ในกลุ่มที่ 6 ซึ่งได้แก่ ยีสต์หมายเลข LY15-1, LY15-2, LY15-3, LY15-4 จัดเป็น *Pichia guilliermondii*

ตาราง 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนของยีสต์ทั้ง 6 กลุ่มที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก

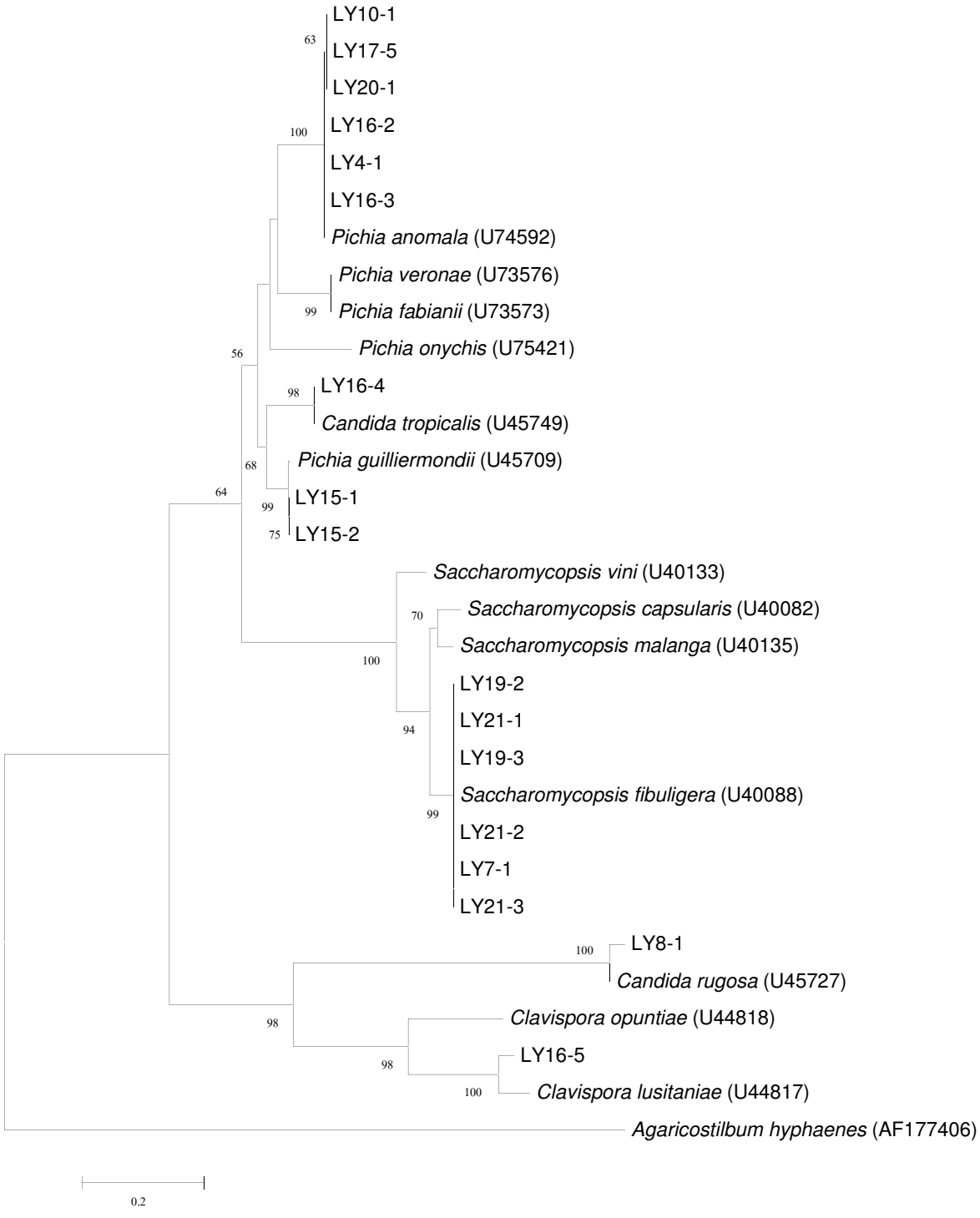
	Group 1	SF [a/b]	Group 2	CR [a/b]	Group 3	CT [a/b]	Group 4	CL [a/b]	Group 5	PA [a/b]	Group 6	PG [a/b]
Number of strains	4		2		1		1		4		2	
Ascospore[c]	+[d]	+[d]	-	-	-	-	+[e]	+[e]	+[f]	+[f]	+[f]	+[f]
Pseudohyphae	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+,-	+	+
D-Galactose	-	-	+	+ / +,d	+	+	+	+ / +,-	-	v	+	+
Cycloheximide[g]	+	nd / +, d	-	nd / +,-	w	nd / +,d	-	nd / -	-	nd / -	+	nd / +,-
D-Sucrose	+	+ / +, -	-	-	+	v	+	+	+	+	+	+
N-acetyl-glucosamine	- (w1,+1)	- / nd	+	nd	+	+ / nd	-	+ / nd	-	- / nd	+	+ / nd
Lactic acid	-	nd	+	nd	w	nd	-	nd	+	nd	-	nd
Arabinose	-	-	-	-	-	- / d,-	-	v / -	-	-	+	+ / +,-
D-Cellobiose	+ (w1)	+	-	-	w	+ / +,-	w	+ / +,d	- (+1)	+ / +,-	w	+ / +,-
D-Raffinose	+ (w1)	v / +, -	-	-	w	-	-	-	+	+ / +,-	+	+ / +,d
D-Maltose	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+ / +,-	+	+ / +,d
D-Trehalose	- (w1)	v / +, d	-	-	+	+	+	+ / +,d	+	+ / +,d	+	+
Potassium 2-keto gluconate	-	- / +, -	-	-	+	+ / +,d	+	d / +	-	- / +,-	+	+
Methyl-α-D-Glucopyranoside	+	+	-	-	+	v	+	v	+	+ / +,-	+	+ / +,-
D-Mannitol	- (+1)	v /+, -	+	- / +,d	+	+	+	+	+	+	+	+ / +,-
D-Lactose	-	-	-	-	w	-	-	-	-	-	-	-

Group 1, LY7-1, LY19-1, LY19-2, LY21-1; SF, *S. fibuligera*; Group 2, LY8-1, LY8-2; CR, *C. rugosa*; Group 3, LY16-4; CT, *C. tropicalis*; Group 4. LY16-5; CL, *Cl. lusitaniae*; Group 5, LY4-1, LY4-3, LY16-2, LY20-1; PA, *P. anomala*; Group 6, LY15-1, LY15-4; PG, *P. guilliermondii*. +, strong positive; d, delayed positive; w, weakly positive; v, variable; -, negative reaction; nd, not determined. [a] Kurtzman and Fell (1998); [b] Barnett et al. (2000). [c] 2-4 Hat-shaped ascospores. [d]one or two clavate ascospores. [e]1-4 Hat-shaped ascospores. [f]0.1 g/100 ml Cycloheximide for reference strains. Numbers in parentheses indicate the number of strains showing a positive or negative reaction.

ตาราง 4.5 (ต่อ)

	Group 1	SF [a/b]	Group 2	CR [a/b]	Group 3	CT [a/b]	Group 4	CL [a/b]	*Group 5*	PA [a/b]	Group 6	PG [a/b]
Number of strains	4		2		1		1		4		2	
Inositol	- (w1,+2)	+, w / +,-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Sorbitol	- (+1)	+ / +, -	+	+ / +,d	+	+	+	+ / +,d	+ (w1)	+ / +,d	+	+ / +,-
D-Xylose	-	-	+	- / +,-	+	+	-	+ / +,d	+ (w1)	v	+	+
D-Ribose	-	- / +, -	-	-	d	- / d,-	+	- / +,-	-	v	-	+ / +,d
Glycerol	+	+	-	- / -,+	d	v	+	+ / +,d	+	+	w	+ / +,d
D-Rhamnose	-	-	-	- / nd	d	-	+	v	-	-	-	v
Palatinose	- (+2)	nd	-	nd	+	nd	+	nd	+	nd	+	nd
Erythritol	-	v / +	-	-	-	-	-	-	+	+ / +,-	-	-
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+ / +,-
Sodium glucuronate	- (w2)	nd /+	-	nd / -	-	-	-	nd / -	-	nd / -	-	nd / -
D-Melezitose	- (w1)	v / d, -	-	-	+	v	+	+ / +,-	+	+ / +,-	+	+ / +,-
Potassium gluconate	- (w2)	+,w / +,d	-	- / +,-	d	v	+	d / +,-	- (w1)	v	w	v
Levulinic acid	-	nd	-	nd	d	nd	-	nd	-	nd	w	nd
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	- / +,-	+	v	-	+ / +,-	-	-	w	v
Glucosamine	-	-	+	+ / -	+	v / -	+	- / +,-	-	-	+	+ / +,d
Esculin ferric citrate	+	nd	w	nd	d	nd	+	nd	+	nd	+	nd

Group 1, LY7-1, LY19-1, LY19-2, LY21-1; SF, *S. fibuligera*; Group 2, LY8-1, LY8-2; CR, *C. rugosa*; Group 3, LY16-4; CT, *C. tropicalis*; Group 4. LY16-5; CL, *Cl. lusitaniae*; Group 5, LY4-1, LY4-3, LY16-2, LY20-1; PA, *P. anomala*; Group 6, LY15-1, LY15-4; PG, *P. guilliermondii*. +, strong positive; d, delayed positive; w, weakly positive; v, variable; -, negative reaction; nd, not determined. [a] Kurtzman and Fell (1998); [b] Barnett et al. (2000). Numbers in parentheses indicate the number of strains showing a positive or negative reaction.



รูปที่ 4.8 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธี Two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ Neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า Bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า Bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

4.8 ศึกษากิจกรรมการย่อยแป้งของยีสต์

นำยีสต์ทั้ง 32 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหาร Starch broth ที่มี 3% Soluble starch เก็บตัวอย่างทุกวัน เป็นระยะเวลา 4 วัน พบว่า สามารถแบ่งยีสต์ตามความสามารถในการย่อยแป้งได้ 2 กลุ่มดังนี้ (ตารางที่ 4.6)

กลุ่มที่ 1 ยีสต์ย่อยแป้งได้เล็กน้อยในช่วง 1-2 วันแรกหรือ ไม่ย่อยแป้งเลย (แสดงตารางที่ 4.6) ได้แก่ LY4-1, LY4-2, LY4-3, LY4-4, LY8-1, LY8-2, LY10-1, LY10-2, LY15-1, LY15-2, LY15-3, LY15-4, LY16-2, LY16-3, LY16-4, LY16-5, LY17-1, LY17-2, LY17-3, LY17-4, LY17-5, LY20-1 และ LY20-2

กลุ่มที่ 2 ยีสต์มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี (แสดงตารางที่ 4.6) ได้แก่ LY7-1, LY7-2, LY16-1, LY19-1, LY19-2, LY19-3, LY21-1, LY21-2 และ LY21-3

จากผลการทดลอง พบว่า ยีสต์ในกลุ่มที่ 1 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้งน้อยมาก หรือแทบไม่มีเลย เมื่อดูผลการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์กลุ่มนี้ พบว่า เป็นยีสต์สายพันธุ์ *Pichia anomala* (LY4-1, LY4-2, LY4-3, LY4-4, LY10-1, LY10-2, LY16-2, LY16-3, LY17-1, LY17-2, LY17-3, LT17-4, LY17-5, LY20-1, LY20-2), *Candida tropicalis* (LY16-4), *Pichia guilliermondii* (LY15-1, LY15-2, LY15-3, LY15-4), *Clavispora lusitaniae* (LY16-5), *Candida rugosa* (LY8-1, LY8-2)

ยีสต์ในกลุ่มที่ 2 มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์อะไมเลสในการย่อยแป้ง ยีสต์ที่มีกิจกรรมการย่อยแป้งสูงที่สุด คือ LY16-1 เป็นตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอบางน้ำเปรี้ยว จังหวัดฉะเชิงเทรา มีกิจกรรมการย่อยแป้งสูงถึง 171.1667 Unit/ml ในวันที่ 4 ของการหมัก โดยจากผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ยีสต์ในกลุ่มนี้จัดเป็น *Saccharomycopsis fibuligera*

ดังจะเห็นได้ว่าจากผลการทดสอบกิจกรรมการย่อยแป้งของยีสต์ สอดคล้องกับรายงานของ Lee และ Fugio, 1999; Limtong และคณะ, 2002; Shrestha และคณะ, 2002; Aidoo และคณะ, 2005; Thanh และคณะ, 2008; Saelim และคณะ, 2008 ซึ่งรายงานว่า *Saccharomycopsis fibuligera* สามารถย่อยแป้งในเมล็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลได้ และมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง

ตาราง 4.6 กิจกรรมการย่อยแป้งของยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก

หมายเลขไอโซเลท	กิจกรรมการย่อยแป้ง (Unit/ml)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
LY4-1	0	0	0	0
LY4-2	0	0	0	0
LY4-3	0	0	0	0
LY4-4	0	0	0	0
LY7-1	42.3833	36.0667	114.55	115.8167
LY7-2	50.3333	40.6333	70.8	40.6833
LY8-1	1.4667	0.1833	0	0
LY8-2	0.2	0.0333	0	0
LY10-1	0	0	0	0
LY10-2	0	0	0	0
LY15-1	0	0	0	0
LY15-2	0	0	0	0
LY15-3	0	0	0	0
LY15-4	0	0	0	0
LY16-1	37.7333	48.0833	141.6	171.1667
LY16-2	0		0	0
LY16-3	0	0	0	0
LY16-4	0	0	0	0
LY16-5	0	0	0	0

ตาราง 4.6 (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลท	กิจกรรมการย่อยแป้ง (Unit/ml)			
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4
LY17-1	0.2833	0.0333	0	0
LY17-2	0.2667	0	0	0
LY17-3	0	0	0	0
LY17-4	0	0	0	0
LY17-5	0	0	0	0
LY19-1	37.7	50.9833	84.25	164.8333
LY19-2	39.15	93.6667	128.8667	133.65
LY19-3	44.45	45.9	89.35	154.4833
LY20-1	0	0	0	0
LY20-2	0	0	0	0
LY21-1	68.3333	51.6167	48.2333	81.65
LY21-2	32.9667	107.3667	136.9833	119.0167
LY21-3	77.2333	53.4667	46.5833	127.65

4.9 การเตรียมกล้าเชื้อรา

ภายหลังการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไม-เลสของเชื้อรา และการทดสอบกิจกรรมการย่อยแป้งของยีสต์ที่แยกได้ จึงนำเชื้อราที่คัดเลือก 4 ไอโซเลท (LK4-1, LK8-2, LK12-5 และ LK17-1) และยีสต์ 1 ไอโซเลท (LY16-1) มาทดลองเตรียมเป็นกล้าเชื้อและนำมาย่อยบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์เป็นเวลา 5 วัน พบว่าข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อราของเชื้อรา 4 ไอโซเลท ให้ลักษณะเมล็ดข้าวสีขาว นุ่ม น้ำเยิ้ม มีกลิ่นหอม ส่วนกล้าเชื้อยีสต์ เมื่อหมักลงบนข้าวขาว พบว่า ในวันที่ 1-3 ของการหมัก เมล็ดข้าวยังคงแข็งและแห้ง โดยในวันที่ 4 ของการหมักเริ่มมีกลิ่นเหม็นบูด เมล็ดข้าวเละ แฉะ เนื่องจากยีสต์ใช้เวลาในการย่อยนานและความสามารถในการกระจายไปทั่วๆเมล็ดข้าวไม่ดีเหมือนการกระจายของเส้นใยเชื้อรา ทำให้เกิดการเน่าเสียก่อน จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการย่อยข้าว เพื่อผลิตข้าวไฮโดรไลซ์

ดังนั้นจึงนำเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทมาเตรียมกล้าเชื้อราบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์และข้าวกล้องปทุมธานี 1 เพื่อศึกษาในขั้นตอนต่อไป

4.10 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของกล้าเชื้อราที่เจริญบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์และข้าวกล้องปทุมธานี 1

ภายหลังจากการเตรียมกล้าเชื้อราบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์และข้าวกล้องปทุมธานี 1 นำกล้าเชื้อรามาทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส เพื่อดูประสิทธิภาพในการสร้างเอนไซม์ของเชื้อรา ภายหลังการเตรียมเป็นกล้าเชื้อรา จากการทดลองพบว่า กล้าเชื้อราของเชื้อทั้ง 4 ไอโซเลทที่เจริญบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสอยู่ในช่วง 15.61-19.61 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ส่วนกล้าเชื้อราที่เตรียมจากข้าวกล้องปทุมธานี 1 ของเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลทก็มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสอยู่ในช่วง 70.98 - 78.84 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.7 ดังนั้นจึงนำกล้าเชื้อราเหล่านี้ไปศึกษาการย่อยข้าวในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.7 กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลสของกล้าเชื้อราจากเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท ที่เจริญบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์และข้าวกล้องปทุมธานี 1

หมายเลขไอโซเลท	กิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	
	กล้าเชื้อราจากข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ns	กล้าเชื้อราจากข้าวกล้องปทุมธานี 1 ns
LK4-1	19.14 ± 2.44	78.84 ± 7.90
LK8-2	19.61 ± 2.06	75.41 ± 8.52
LK12-5	17.62 ± 3.05	73.89 ± 1.01
LK17-1	15.61 ± 0.44	70.98 ± 10.59

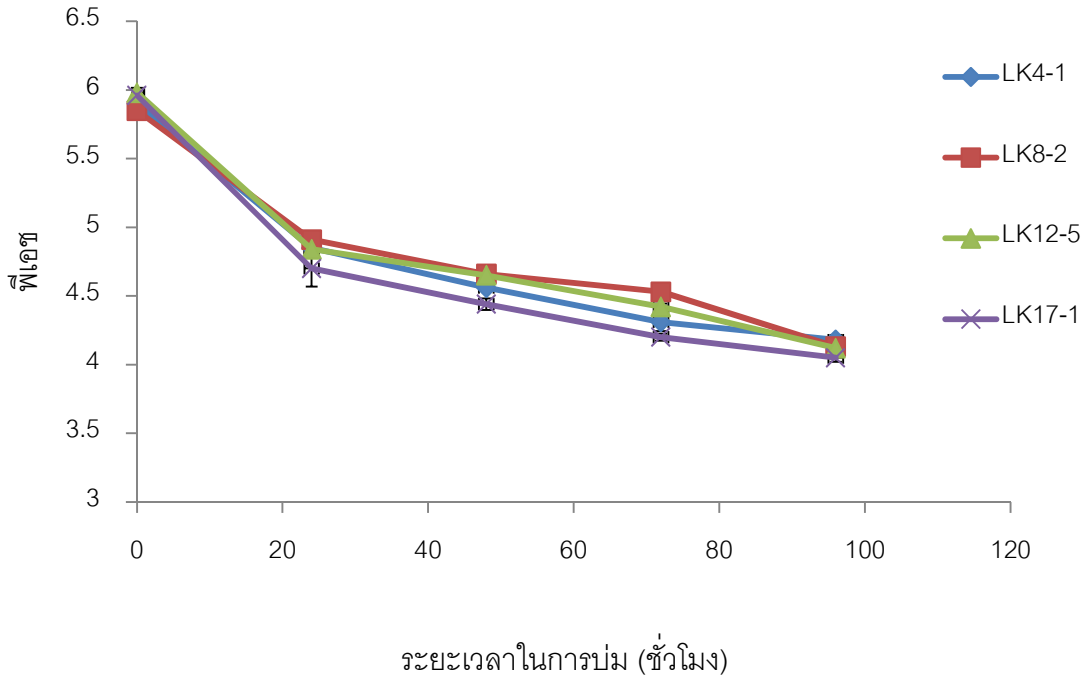
หมายเหตุ: ns = No significant

4.11 ศึกษาการย่อยข้าว โดยใช้กล้าเชื้อรา

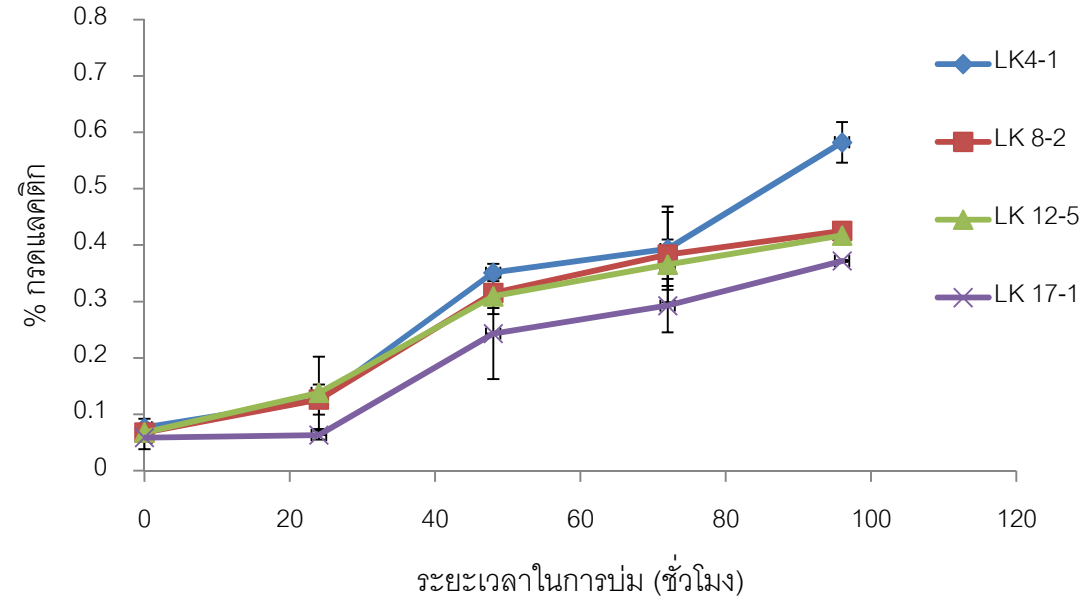
หลังจากทำให้ข้าวสุกด้วย Rice cooker จึงนำมาวัดความชื้นด้วยเครื่องวัดความชื้น พบว่า เปอร์เซ็นต์ความชื้นของข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ เท่ากับ 58.91 ส่วนเปอร์เซ็นต์ความชื้นของข้าวกล้องปทุมธานี 1 เท่ากับ 55.56 หลังจากนั้นก็เติมกล้าเชื้อราลงไป 5 % ของน้ำหนักข้าวแห้ง แล้วนำบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

4.11.1 กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวกล้องของเชื้อรา 4 ไอโซเลท หมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1

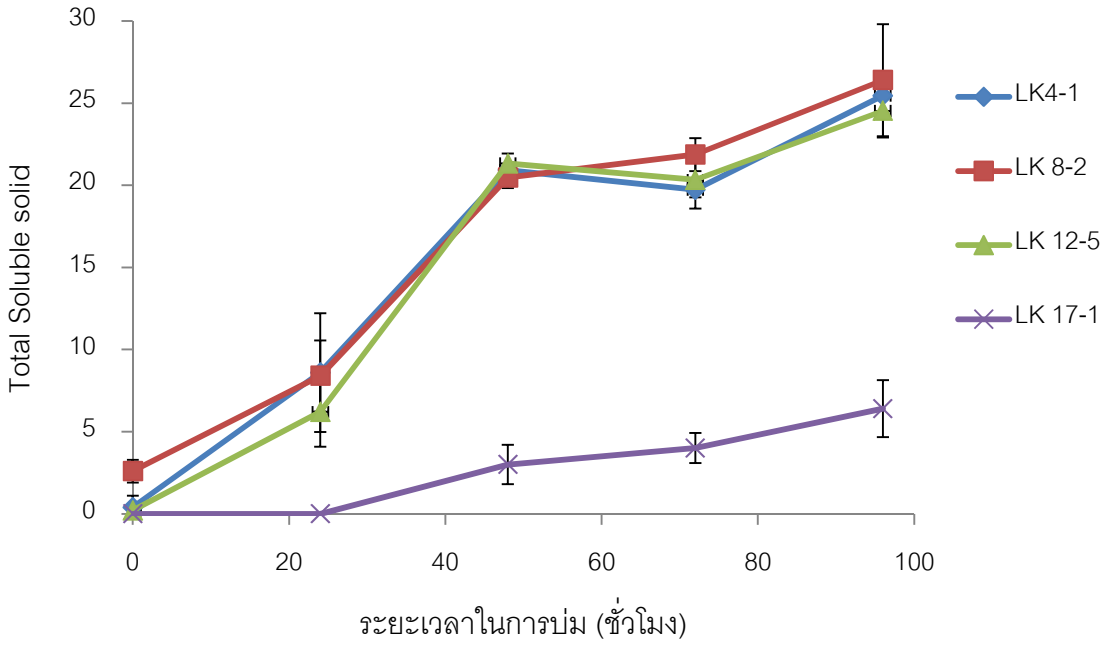
โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าพีเอช, Total soluble solid, ค่าความเป็นกรด และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากการทดลองพบว่า ค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีค่าลดลงตามระยะเวลาของการหมัก ซึ่งค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.98 – 5.85 ค่าพีเอชภายหลังการหมักที่ 96 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 4.09 – 4.17 ดังแสดงในรูปที่ 4.9 สอดคล้องกับค่าความเป็นกรด (เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก) ที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก โดยมีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่ 96 ชั่วโมงของการหมักอยู่ในช่วง 0.3-0.6 ดังแสดงในรูปที่ 4.10 เมื่อวัดค่า Total Soluble Solid ของข้าวไฮโดรไลซ์ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก โดยค่า Total Soluble Solid ของข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อรา LK8-2 มีค่าสูงที่สุด คือ 26.4 รองลงมาคือ LK4-1 และ LK12-5 มีค่าเท่ากับ 25.47 และ 24.53 ตามลำดับ ส่วนข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อรา LK17-1 มีค่า Total Soluble Solid ต่ำสุดเพียง 6.4 ดังแสดงในรูปที่ 4.11 เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์ที่ระยะเวลาในการหมักที่ 0-96 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง โดยข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อรา LK8-2 ให้ค่าสูงที่สุด คือ 156.49 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ LK4-1, LK12-5 และ LK17-1 มีค่าเท่ากับ 140.49, 129.46 และ 97.51 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.12



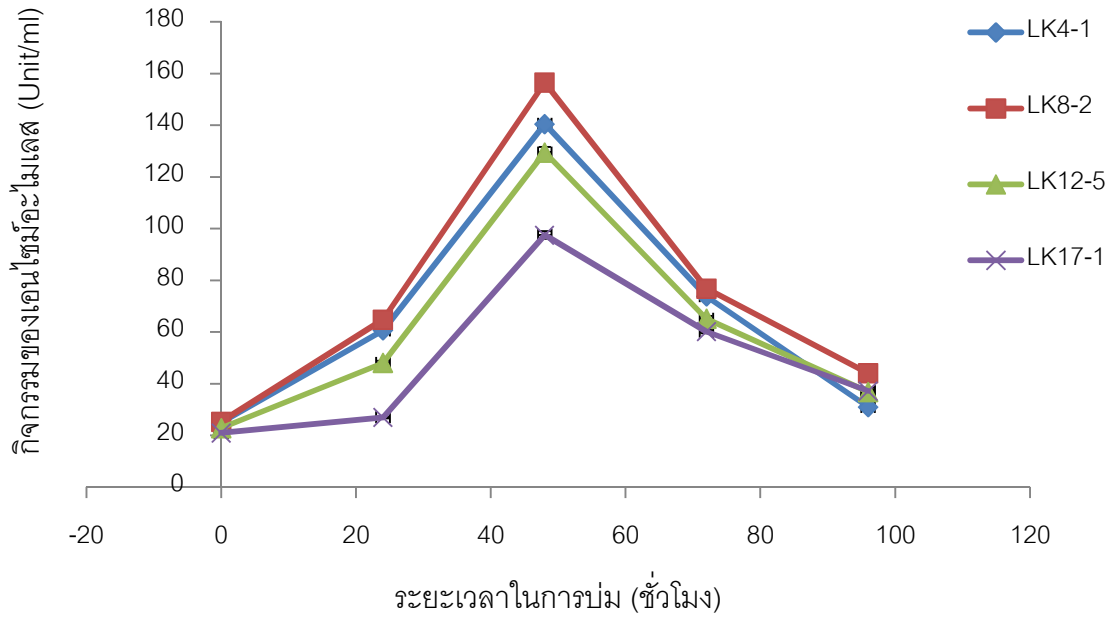
รูปที่ 4.9 กราฟแสดงค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.10 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



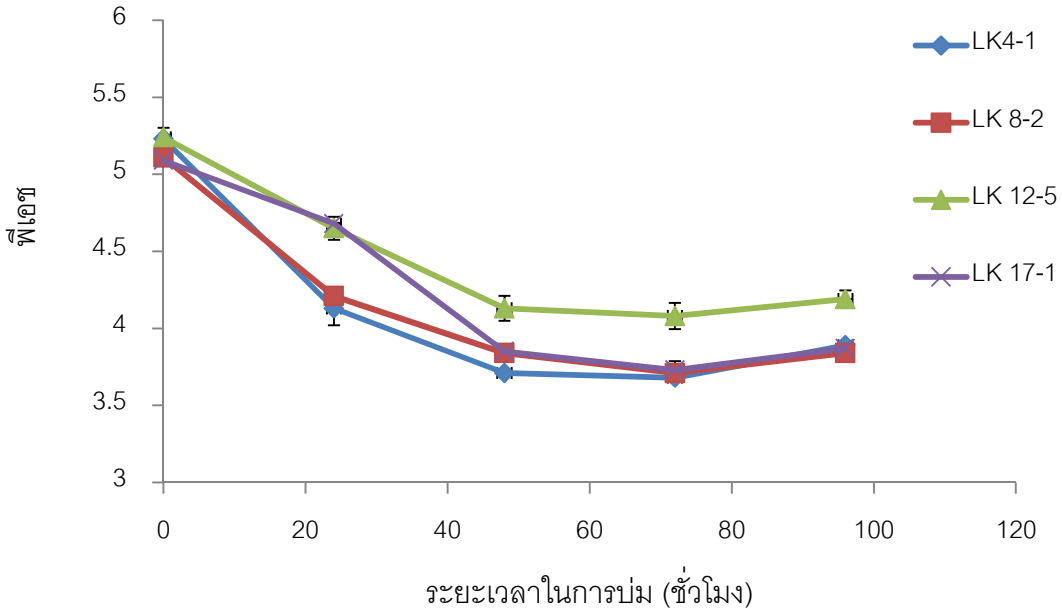
รูปที่ 4.11 กราฟแสดงค่า Total Soluble solid ของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



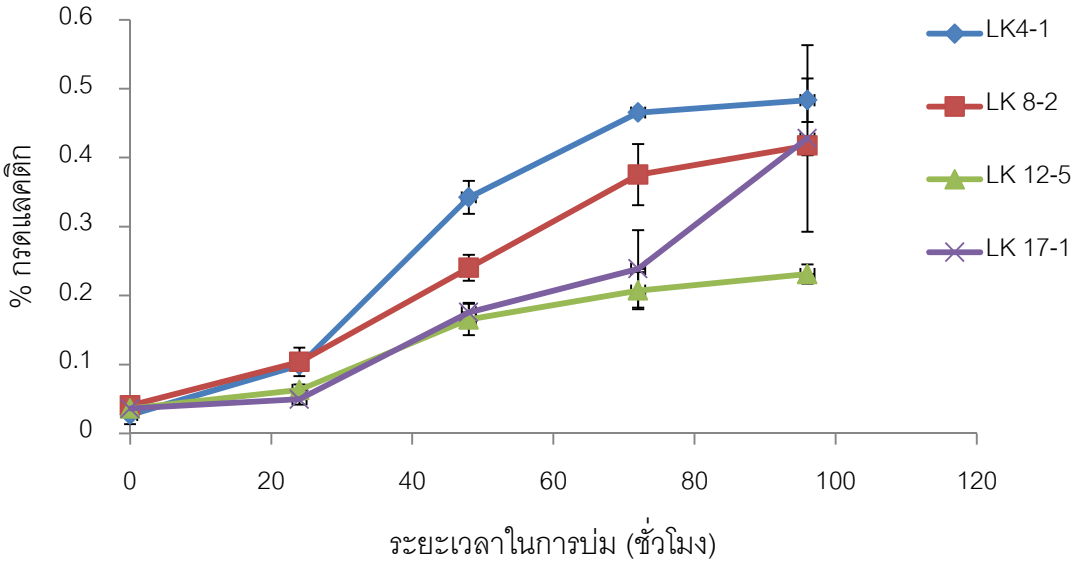
รูปที่ 4.12 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง

4.11.2 กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวกล้องของเชื้อรา 4 ไอโซเลท หมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์

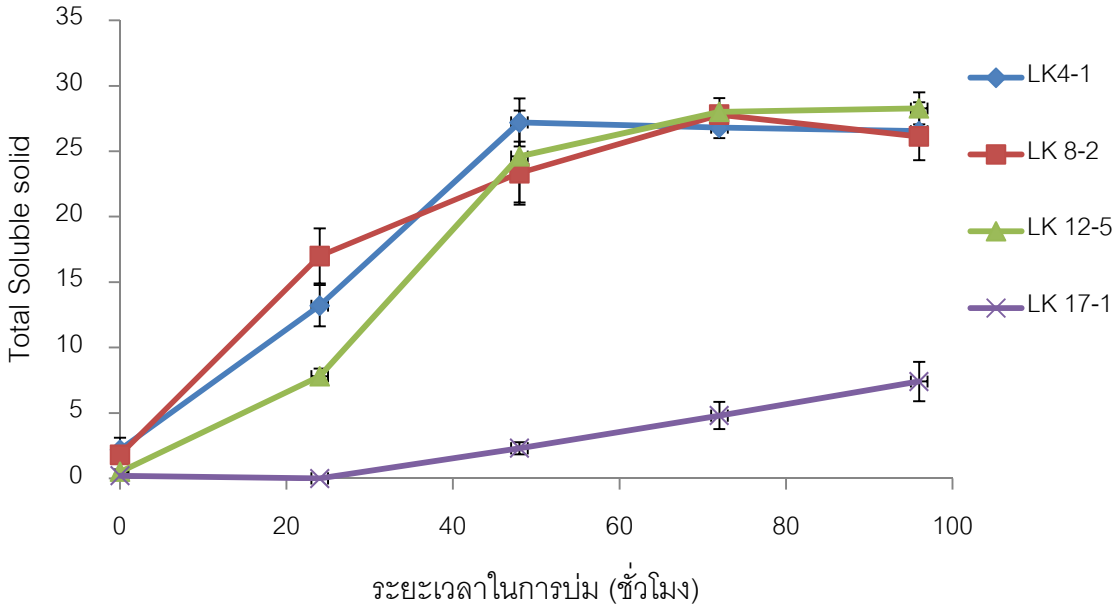
โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าพีเอช, Total soluble solid, ค่าความเป็นกรด และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากการทดลองพบว่า ค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีค่าลดลงตามระยะเวลาของการหมัก ซึ่งค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.09 – 5.24 ค่าพีเอชภายหลังการหมักที่ 96 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 3.84 – 4.19 ดังแสดงในรูปที่ 4.13 สอดคล้องกับค่าความเป็นกรด (เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก) ที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก โดยมีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่ 96 ชั่วโมงของการหมักอยู่ในช่วง 0.2-0.4 ดังแสดงในรูปที่ 4.14 เมื่อวัดค่า Total Soluble Solid ของข้าวไฮโดรไลซ์ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก โดยค่า Total Soluble Solid ของข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อรา LK12-5 มีค่าสูงที่สุด คือ 28.27 รองลงมาคือ LK8-2, LK4-1 และ LK17-1 มีค่าเท่ากับ 27.8 (ระยะเวลาในการหมักที่ 72 ชั่วโมง) , 26.8 (ระยะเวลาในการหมักที่ 72 ชั่วโมง) และ 7.4 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.15 เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์ที่ระยะเวลาในการหมักที่ 0-96 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง โดยข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อรา LK8-2 ให้ค่าสูงที่สุด คือ 147.39 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ LK4-1, LK12-5 และ LK17-1 มีค่าเท่ากับ 130.25, 124.36 และ 88.32 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.16



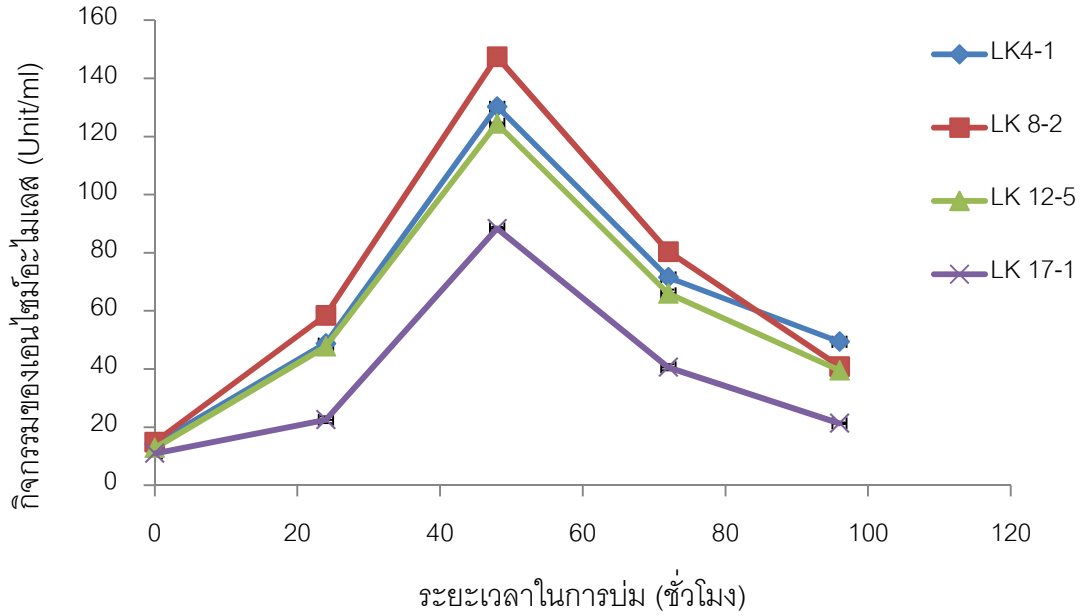
รูปที่ 4.13 กราฟแสดงค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.14 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



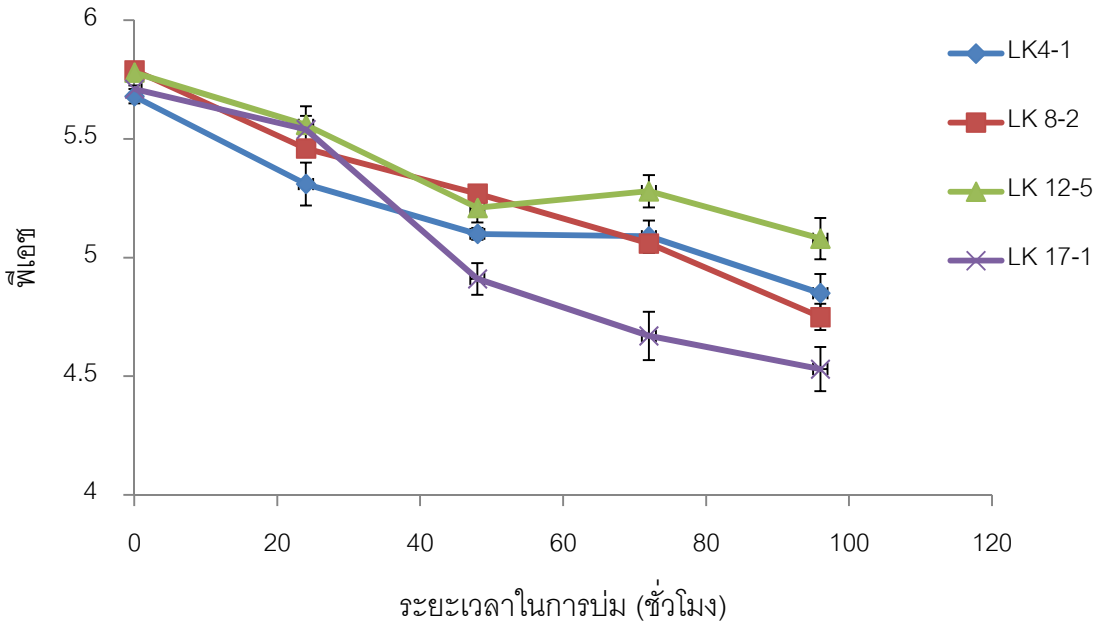
รูปที่ 4.15 กราฟแสดง Total Soluble solid ของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



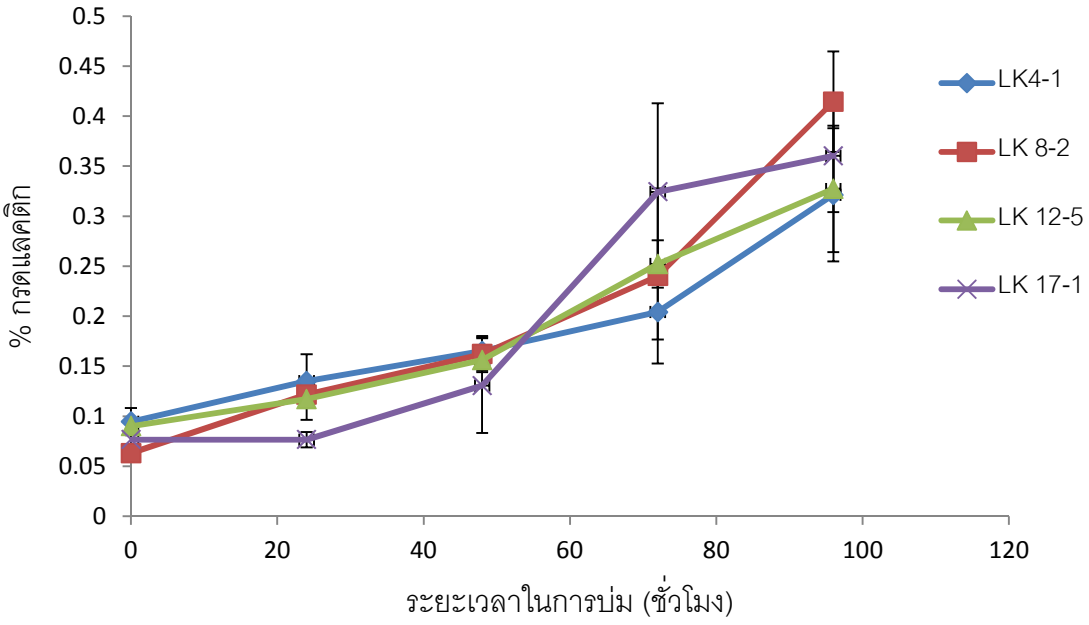
รูปที่ 4.16 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวกล้องหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง

4.11.3 กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวขาวของเชื้อรา 4 ไอโซเลท หมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1

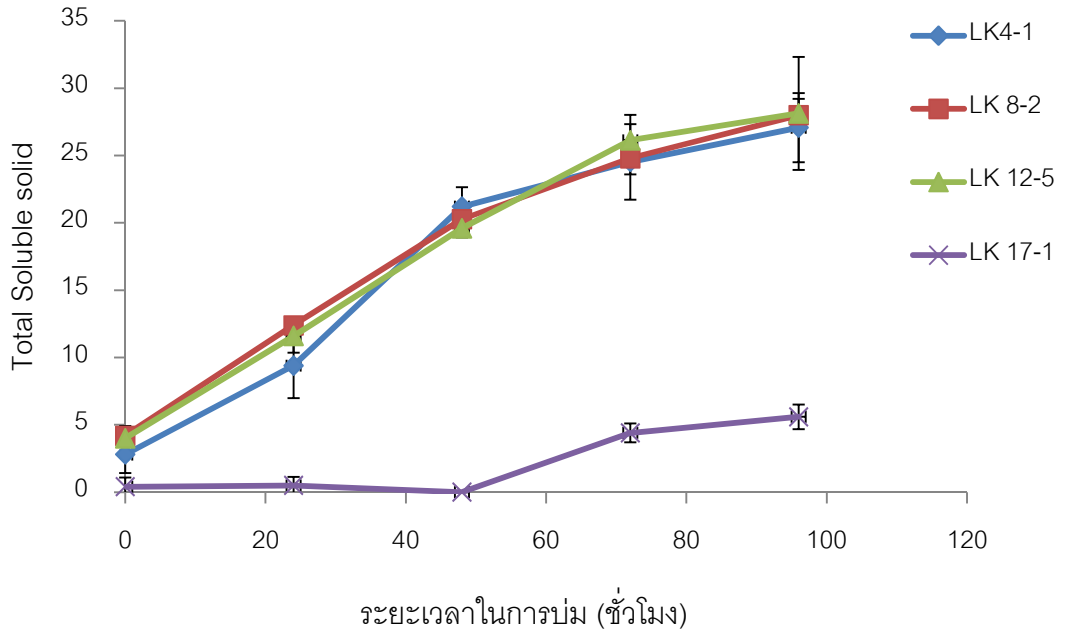
โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าพีเอช, Total soluble solid, ค่าความเป็นกรด และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากการทดลองพบว่า ค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีค่าลดลงตามระยะเวลาของการหมัก ซึ่งค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.68 – 5.79 ค่าพีเอชภายหลังการหมักที่ 96 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 4.53 – 5.08 ดังแสดงในรูปที่ 4.17 สอดคล้องกับค่าความเป็นกรด (เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก) ที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก โดยมีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่ 96 ชั่วโมงของการหมักอยู่ในช่วง 0.32-0.41 ดังแสดงในรูปที่ 4.18 เมื่อวัดค่า Total Soluble Solid ของข้าวไฮโดรไลซ์ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก โดยค่า Total Soluble Solid ของข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อรา LK12-5 มีค่าสูงที่สุด คือ 28.13 รองลงมาคือ LK8-2, LK4-1 และ LK17-1 มีค่าเท่ากับ 28, 27.07 และ 5.6 ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.19 เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์ที่ระยะเวลาในการหมักที่ 0-96 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจะมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง โดยข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อรา LK8-2 ให้ค่าสูงที่สุด คือ 149.43 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ LK4-1, LK12-5 และ LK17-1 มีค่าเท่ากับ 137.44, 123.01 และ 82.02 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.20



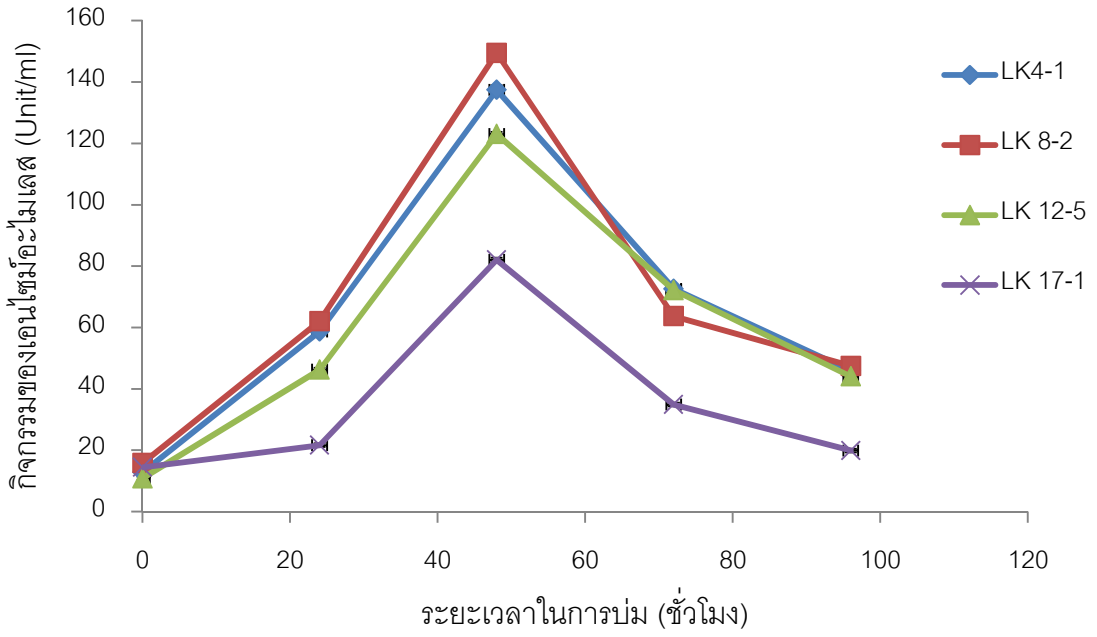
รูปที่ 4.17 กราฟแสดงค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



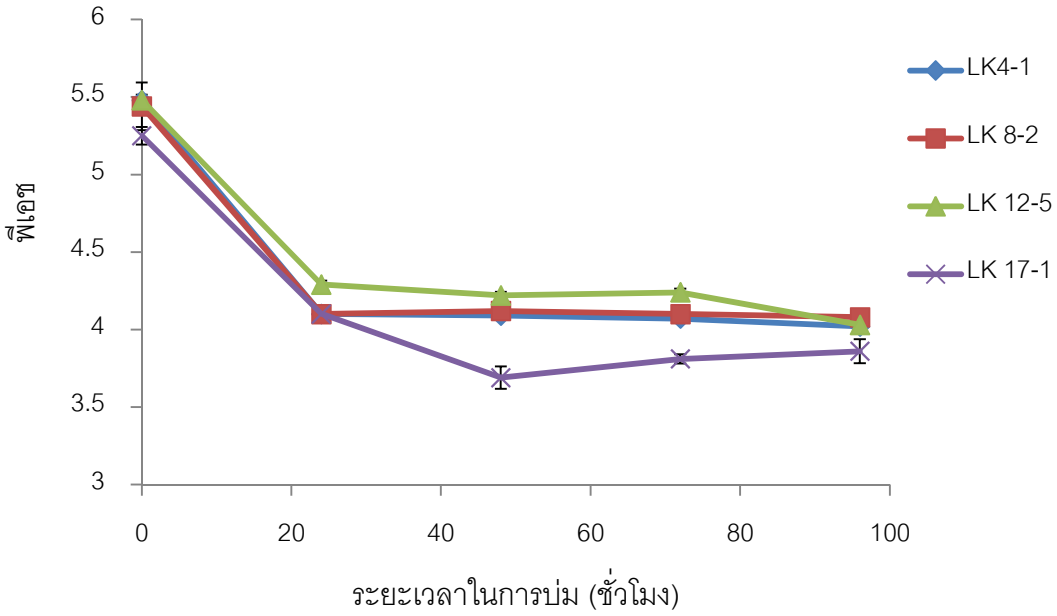
รูปที่ 4.19 กราฟแสดง Total Soluble solid ของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



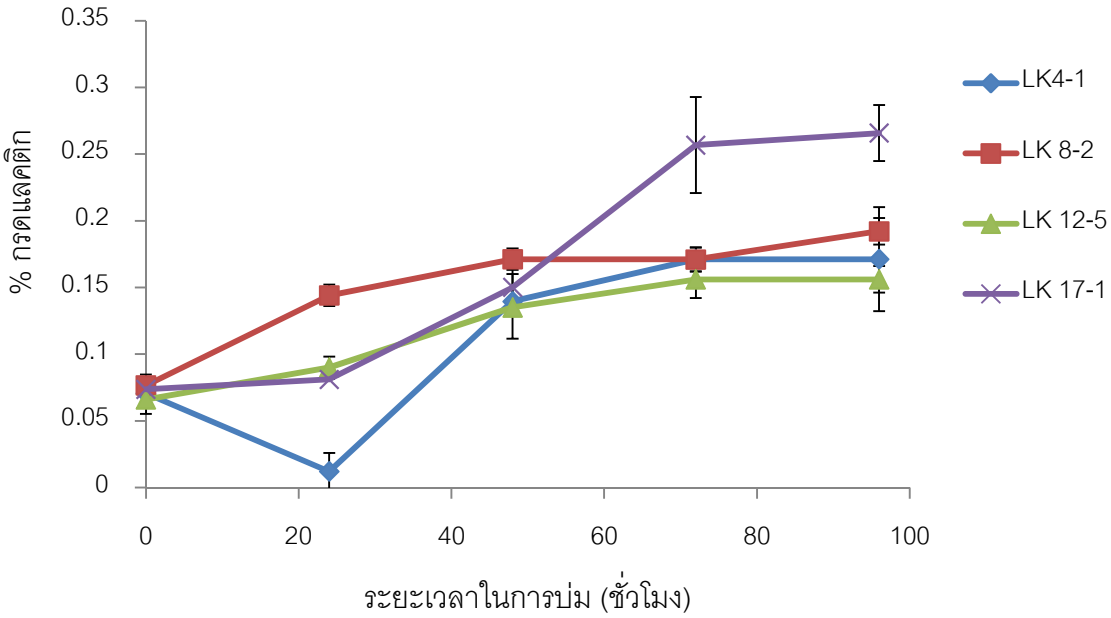
รูปที่ 4.20 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง

4.11.4 กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวขาวของเชื้อรา 4 ไอโซเลท หมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์

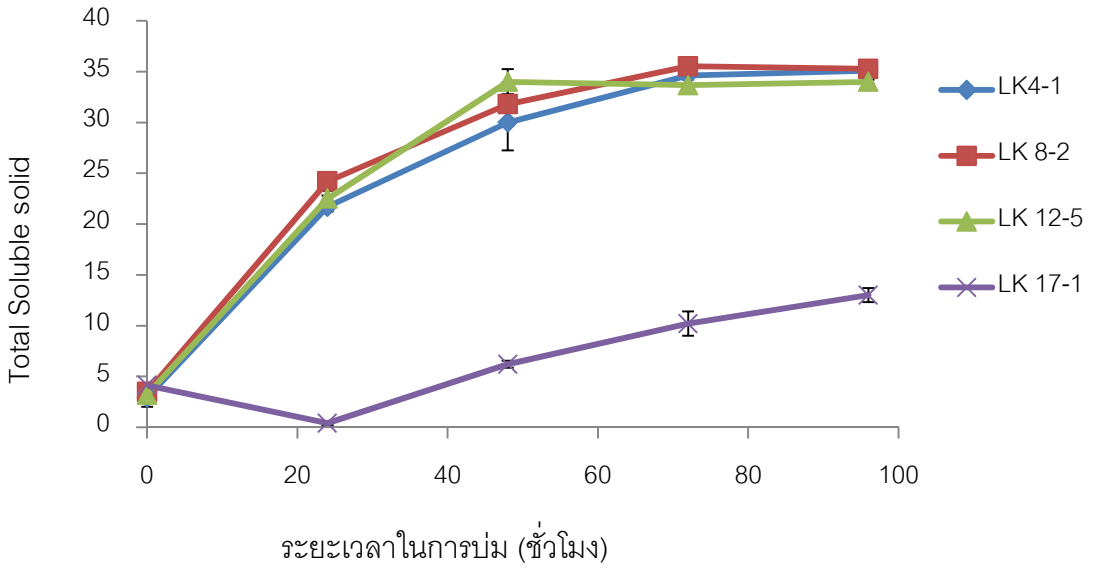
โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดค่าพีเอช, Total soluble solid, ค่าความเป็นกรด และกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส จากการทดลองพบว่า ค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์ทั้ง 4 ตัวอย่าง มีค่าลดลงตามระยะเวลาของการหมัก ซึ่งค่าพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5.25 – 5.48 ค่าพีเอชภายหลังการหมักที่ 96 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 3.86 – 4.08 ดังแสดงในรูปที่ 4.21 สอดคล้องกับค่าความเป็นกรด (เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก) ที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก โดยมีเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่ 96 ชั่วโมงของการหมักอยู่ในช่วง 0.15-0.26 ดังแสดงในรูปที่ 4.22 เมื่อวัดค่า Total Soluble Solid ของข้าวไฮโดรไลซ์ทั้ง 4 ตัวอย่าง พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก โดยค่า Total Soluble Solid ของข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อรา LK8-2 มีค่าสูงที่สุด (ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง) คือ 35.53 รองลงมาคือ LK4-1, LK12-5 และ LK17-1 มีค่าเท่ากับ 35.1, 34 และ 13 ตามลำดับ (ระยะเวลาในการหมักที่ 96 ชั่วโมง) ดังแสดงในรูปที่ 4.23 เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์ที่ระยะเวลาในการหมักที่ 0-96 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจะมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง โดยข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อรา LK8-2 ให้ค่าสูงที่สุด คือ 145.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาคือ LK4-1, LK12-5 และ LK17-1 มีค่าเท่ากับ 121.57, 109.72 และ 70.73 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 4.24



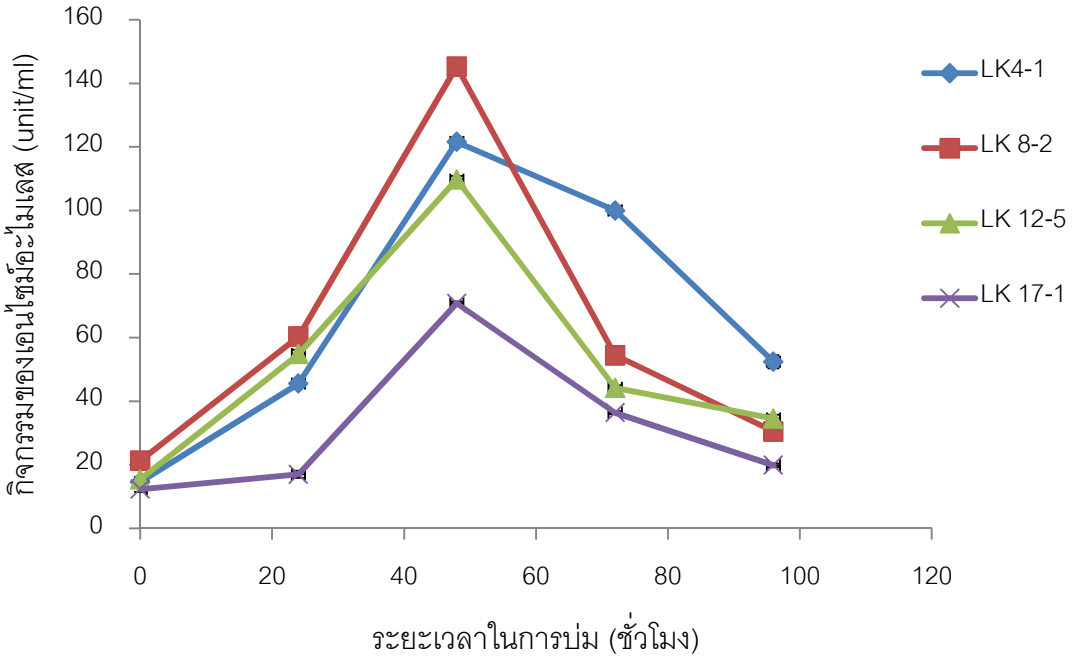
รูปที่ 4.21 กราฟแสดงค่าพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.22 กราฟแสดงเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.23 กราฟแสดง Total Soluble solid ของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง



รูปที่ 4.24 กราฟแสดงกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของข้าวไฮโดรไลซ์จากโคจิข้าวขาวหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ตามระยะเวลาในการหมักที่ 0 - 96 ชั่วโมง

จากการศึกษาการย่อยข้าว โดยใช้กล้าเชื้อราทั้ง 4 การทดลองพบว่าข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยเชื้อ *Amylomyces rouxii* จะมีค่าพีเอชต่ำ โดยค่าพีเอชสุดท้ายของการหมักอยู่ในช่วง 3.8-4.5 ซึ่งจากการรายงานของชัยวัฒน์ จาติเสถียร (2520) ได้วัดค่าพีเอชในข้าวหมากที่ได้จากเชื้อบริสุทธิ์ *Amylomyces spp.* พบว่าในวันที่ 5 ของการหมักค่าพีเอชเท่ากับ 4.05 และค่าพีเอชจะลดลงอีกในวันที่ 7 ของการหมัก เท่ากับ 3.98 นอกจากนี้ Saito และคณะ(2004) ได้นำเชื้อ *Amylomyces rouxii* ที่เจริญบนเปลือกแอปเปิ้ลหมักลงบนเนื้อมันฝรั่งบด พบว่าค่าพีเอชสุดท้ายของการหมักต่ำกว่า 4 ทั้งนี้ทั้งนั้นเนื่องจากเชื้อ *Amylomyces rouxii* สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกได้ (Ellis และคณะ, 1976) โดยค่าพีเอชที่ลดลงนั้นสอดคล้องกับค่าความเป็นกรดด่างที่มีค่าสูงขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก ซึ่งจะวัดในรูปของเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก เนื่องจากเชื้อราส่วนใหญ่สามารถเกิด Lactic acid fermentation จากน้ำตาลกลูโคสที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักได้ (สมจิตร อยู่เป็นสุข, 2552)

ที่เวลา 24-48 ชั่วโมงของการหมัก พบว่าค่าพีเอชมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกก็มีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน โดยค่าพีเอชมีค่าต่ำกว่า 4.5 เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกสูงกว่า 0.15 ในช่วงหลังจาก 48 ชั่วโมงของการหมัก ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสลดลง ภายหลังการหมักที่ 48 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์มีค่าลดลงต่ำกว่า 4.5 ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสลดลง เนื่องจากค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์นี้เท่ากับ 5 (เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์, 2551) ดังนั้นจึงส่งผลให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมีค่าลดลง ทั้งนี้ยังพบว่าข้าวไฮโดรไลซ์จากการหมักของเชื้อ *Amylomyces rouxii* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยเชื้อ *Rhizopus microsporus* โดยมีการรายงานสอดคล้องกันดังนี้

Limtong และคณะ (2005) ได้นำเชื้อที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากมาทดสอบการย่อยแป้ง พบว่า *Amylomyces rouxii* มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมากที่สุด

วิมลักษณ์ รัตนปรีดากุล (2549) นำเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้ามาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส นำเชื้อราไปเลี้ยงใน Starch broth เป็นระยะเวลา 5 วัน พบว่า เชื้อมีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุดในวันที่ 3 ของการหมัก โดยเชื้อที่มีการผลิตเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด คือ *Amylomyces rouxii*

สิรินทรเทพ ภักดีศุภผล (2523) ได้แยกเชื้อราจากลูกแป้งข้าวหมาก 21 แห่ง เพื่อคัดเลือกเชื้อราที่ให้คุณสมบัติเหมาะสมในการทำข้าวหมาก พบว่า *Amylomyces rouxii* เหมาะสมในการทำข้าวหมาก โดยให้ข้าวหมากที่มีเมล็ดขาว นิ่ม มีน้ำเยิ้ม เหมือนข้าวหมากตามท้องตลาดทุกประการ

นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวไฮโดรไลซ์จากข้าวกล้องปทุมธานี 1 ที่หมักด้วยกล้าเชื้อราจากข้าวขาวและข้าวกล้อง ยังมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าข้าวไฮโดรไลซ์จากข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ อาจเนื่องมาจากในข้าวกล้องนั้นมีสารอาหารสูงกว่าในข้าวขาว ซึ่งเป็นข้าวที่ผ่านการขัดสีทำให้สารอาหารน้อยกว่าข้าวกล้อง โดยสารอาหารในข้าวกล้องที่มีค่ามากกว่าในข้าวขาว ได้แก่ โปรตีน ไขมัน ใยอาหาร โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม เหล็ก สังกะสี วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 และไนอาซิน (แหล่งที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/vocab/wordcap/Brown%20Rice) ดังนั้นเชื้อราจึงนำสารอาหารเหล่านั้นมาใช้ในการเจริญเติบโต ทำให้เชื้อรามีจำนวนมากขึ้น ส่งผลให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสในข้าวไฮโดรไลซ์จากข้าวกล้องสูงกว่าในข้าวขาว

ข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยเชื้อ *Amylomyces rouxii* (LK4-1, LK8-2, LK12-5) มีค่า Total Soluble Solid สูงกว่าข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยเชื้อ *Rhizopus microsporus* (LK17-1) โดย มนตรี เชาวน์สังเกต (2521) ได้นำเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งต่างๆ ข้าวหมาก และไวน์ข้าว มาหมักบนข้าวเหนียว บ่มไว้เป็นระยะเวลา 4 วันที่อุณหภูมิห้อง พบว่าเชื้อที่ให้ค่า Total Soluble Solid และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดคือ *Amylomyces spp.* และรองลงมาคือ *Rhizopus spp.*

นอกจากนี้ข้าวไฮโดรไลซ์ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อ *Rhizopus microsporus* (LK17-1) ที่เวลา 0-48 ชั่วโมงของการหมัก ลักษณะของเมล็ดข้าวแห้ง แข็ง มีกลิ่นหอมเล็กน้อย ที่ 96 ชั่วโมง

ของการหมัก พบว่าเมล็ดข้าวนิ่มลง มีน้ำต้อยและกลิ่นหอมเล็กน้อย มีสปอร์ของเชื้อราสีเทาดำชูขึ้นมาอยู่ในเมล็ดข้าวมากมาย เนื่องจากเชื้อ *Rhizopus microsporus* มีการสร้างสปอร์สีเทาดำ ดังนั้นหากจะนำไปใช้ผลิตในการบริโภค หรือนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรม อาจไม่เหมาะสม เนื่องจากไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ส่วนข้าวไฮโดรไลซ์ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อ *Amylomyces rouxii* (LK4-1, LK8-2, LK12-5) ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการหมัก พบว่ามีกลิ่นหอมคล้ายข้าวหมาก เมล็ดข้าวนิ่ม สีขาว เริ่มมีน้ำต้อยออกมาเล็กน้อย ที่เวลา 96 ชั่วโมงของการหมัก เมล็ดข้าวนิ่ม สีขาว มีน้ำต้อยออกมามาก มีกลิ่นหอม ซึ่งกลิ่นที่ได้คล้ายกับกลิ่นข้าวหมากที่ขายตามท้องตลาด ซึ่งจากการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่าเชื้อ *Amylomyces rouxii* มีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง (ข้าว) ไปเป็นของเหลว (น้ำต้อย) (Liquifaction) ได้ดีกว่าเชื้อ *Rhizopus microsporus*

กล้าเชื้อราจาก LK8-2 ที่เตรียมบนข้าวกล้องนำมาหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 ให้กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด จึงเหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในการผลิตข้าวไฮโดรไลซ์เพื่อนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กลูโคสไซรัป น้ำส้มสายชู เหล้า สาโท ไวน์ เป็นต้น

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

สามารถเก็บตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจากจังหวัดต่างๆในประเทศไทยได้ทั้งหมด 21 แหล่ง คือ นครปฐม, ตราด, กระบี่, นครราชสีมา, พัทลุง, ฉะเชิงเทรา, ลพบุรี, ชุมพร (4 แหล่ง), สงขลา (4 แหล่ง) และนครศรีธรรมราช (6 แหล่ง)

ลูกแป้งข้าวหมากในแต่ละแหล่งการผลิตมีน้ำหนัก ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง สี แตกต่างกัน โดยมีน้ำหนักอยู่ในช่วง 1.5768-6.5617 กรัม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.81 - 3.51 เซนติเมตร ค่า *L**, *a**, *b** อยู่ในช่วง 44.33 - 69.70, (+3.55) - (-1.81) และ (+6.51) - (+23.35) ตามลำดับ

จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 21 แหล่ง แยกเชื้อราได้ทั้งหมด 100 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสเพื่อคัดเลือกเบื้องต้น พบว่ามีเชื้อรา 13 ไอโซเลท ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง คือ LK1-2, LK1-3, LK1-4, LK4-1, LK6-5, LK7-3, LK7-8, LK8-2, LK12-5, LK15-5, LK16-5, LK17-1 และ LK19-1

จากการนำเชื้อราจำนวน 13 ไอโซเลทนี้ มาศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยใช้ 3% Soluble starch เป็นซับสเตรทและมีสปอร์ของเชื้อราเริ่มต้นที่ 1 x 10^6 สปอร์ต่อมิลลิลิตร พบว่า เชื้อราที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุดคือ LK8-2 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 39.74 หน่วยต่อมิลลิลิตร รองลงมาอีก 3 อันดับคือ LK12-5, LK4-1 และ LK17-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 37.13, 36.93 และ 32.24 หน่วยต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส พบว่าเชื้อราที่สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้สูงที่สุดคือ LK8-2 ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส 0.2245 กรัมต่อลิตร รองลงมาอีก 3 อันดับ

คือ LK4-1, LK12-5 และ LK17-1 ได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 0.185, 0.182 และ 0.1609 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรา โดยอาศัยลักษณะโคโลนีของเชื้อราบนอาหาร PDA ลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS (Internal Transcribed Spacer) ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ โดยใช้ไพรเมอร์ ITS-1(5'-TCCGTAGGTG AACCTGCGG-3') และ ITS-4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') พบว่า LK4-1, LK8-2, LK12-5 เป็น *Amylomyces rouxii* ส่วน LK17-1 เป็น *Rhizopus microsporus*

จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 10 แหล่ง แยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 32 ไอโซเลท เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์จำแนกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่าเป็น *Saccharomycopsis fibuligera* 9 ไอโซเลท, *Candida rugosa* 2 ไอโซเลท, *Candida tropicalis* 1 ไอโซเลท, *Clavispora lusitaniae* 1 ไอโซเลท, *Pichia anomala* 15 ไอโซเลท และ *Pichia guilliermondii* 4 ไอโซเลท

เชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้ดี คือ LY7-1, LY7-2, LY16-1, LY19-1, LY19-2, LY19-3, LY21-1, LY21-2 และ LY21-3 เมื่อพิสูจน์เอกลักษณ์พบว่าทั้ง 9 ไอโซเลท เป็น *Saccharomycopsis fibuligera* เชื้อยีสต์ที่มีกิจกรรมการย่อยแป้งสูงที่สุด คือ LY16-1 เป็นตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมากจากอำเภอบางน้ำเปรี้ยว จังหวัดฉะเชิงเทรา มีกิจกรรมการย่อยแป้งสูงถึง 171.1667 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในวันที่ 4 ของการหมัก

จากการศึกษาการย่อยข้าวโดยใช้กล้าเชื้อรา ทั้งกล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวกล้องหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 105, กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวกล้องหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์, กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวขาวหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 105, กล้าเชื้อราที่เตรียมบนข้าวขาวหมักลงบนข้าวขาวหอมมะลิสุรินทร์ ของเชื้อราทั้ง 4 ไอโซเลท พบว่า มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ค่า pH ของข้าวไฮโดรไลซ์ที่ได้ มีค่าลดลงตามระยะเวลาของการหมัก สอดคล้องกับค่าความเป็นกรด (เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก) ที่มีค่าเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาของการหมัก ค่า Total

soluble solid ของข้าวไฮโดรไลซ์มีค่าเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมัก โดยข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยเชื้อ *Amylomyces rouxii* (LK4-1, LK8-2, LK12-5) จะให้ค่า Total Soluble Solid สูงกว่าข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยเชื้อ *Rhizopus microsporus* (LK17-1) กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจะมีค่าสูงสุดที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง โดยข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยกล้าเชื้อรา LK8-2 ให้ค่าสูงที่สุด รองลงมาคือ LK4-1, LK12-5 และ LK17-1 ตามลำดับ กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสลดลงภายหลังการหมักที่ 48 ชั่วโมงนั้น เนื่องจากพีเอชของข้าวไฮโดรไลซ์มีค่าลดลงต่ำกว่า 4.5 ทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าข้าวไฮโดรไลซ์จากการหมักของเชื้อ *Amylomyces rouxii* ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าข้าวไฮโดรไลซ์ที่หมักด้วยเชื้อ *Rhizopus microsporus*

จากการศึกษาการย่อยข้าวด้วยกล้าเชื้อราของเชื้อรา 4 ไอโซเลท พบว่ากล้าเชื้อราจาก LK8-2 ที่เตรียมบนข้าวกล้องนำมาหมักลงบนข้าวกล้องปทุมธานี 1 เหมาะสมที่สุดที่จะนำไปใช้ในการผลิตข้าวไฮโดรไลซ์ เพื่อนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กลูโคสไซรัป น้ำส้มสายชู เหล้า สาโท ไวน์ เป็นต้น

5.2 **ข้อเสนอแนะ**

- ควรมีการวิเคราะห์สารอื่นๆ เช่น ปริมาณน้ำตาลกลูโคส มอลโตส เดกทรินซ์ สารประกอบให้กลิ่น (Volatile compound) เป็นต้น ที่เกิดขึ้นภายหลังการศึกษาการย่อยข้าวด้วยกล้าเชื้อรา โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เพื่อจะได้ทราบชนิดและปริมาณของสารต่างๆ ที่เกิดขึ้น ทำให้ผลการศึกษาการย่อยข้าวด้วยกล้าเชื้อรามีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

- ควรมีการศึกษาอายุการเก็บรักษาของกล้าเชื้อรา เพื่อจะนำไปพัฒนาสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง, มาลัย บุญรัตนกรกิจ, ปทุมพร ฉิมเอนก, และปราโมทย์ ธรรมรัตน์. 2534. แนวทางการพัฒนาผลิตภัณฑ์หมักจากข้าวโดยกระบวนการหมักแลคติก. โครงการความร่วมมือกับต่างประเทศ (ไทย-อาเซียน) ประจำปี 2534 – 2535, สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชัยวัฒน์ จาติเสถียร. 2520. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งสำหรับการหมักข้าวหมาก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ชุลี ยมภักดี, จิราภรณ์ ธนียวัน , และ ณัฐชนัญ ลีพิพัฒน์ไพบูลย์. 2550. ความหลากหลายของยีสต์และราจากลูกแป้งในจังหวัดน่าน. ทุนอุดหนุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2548-2550 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภา โล่ห์ทอง. 2537. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: ฟันนี่ พับลิชชิ่ง.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

เปี่ยมสุข พงษ์สวัสดิ์. 2551. เอนไซม์ดัดแปรคาร์โบไฮเดรตในอุตสาหกรรม. จำนวน 1000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มนตรี เชาวน์สังเกต. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และราเพื่อใช้ผลิตไวน์ข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิมลักษณ์ รัตนปรีดากุล. 2549. การศึกษาเชื้อราและเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าเปรียบเทียบกับเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล. 2541. ข้าวกล้อง [Online]. บริษัท Food Network Solution จำกัด: แหล่งที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/vocab/wordcap/Brown%20Rice[2012,May 5]

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สิรินทรเทพ ภักดีศุภผล. 2523. การหมักข้าวหมากด้วยเชื้อบริสุทธิ์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมจิตร อยู่เป็นสุข. 2552. ราวิทยา. 500 เล่ม. เชียงใหม่: พงษ์สวัสดิ์การพิมพ์.

สมพร สินธารา. 2544. การแยก การจัดจำแนก และการเก็บรักษายีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิชญา เตชะวสัญญู. 2550. การแยก จำแนก และลักษณะสมบัติของยีสต์และราในลูกแป้งสุราเพื่อการผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abe, A., Sone, T., Sujaya, I.N., Saito, K., Oda, K., Asano, K., and Tomita, F. 2003. rDNA ITS Sequence of *Rhizopus oryzae*: Its Application to Classification and Identification of Lactic Acid Producers. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 67: 1725-1731.

Aidoo, K.E., Nout, M.J.R., and Sarkar, P.K. 2006. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. Federation of European Microbiological Societies 6: 30-39.

Barnett, J. A., Payne, R. W., and Yarrow, D. 2000. Summary of specific characteristics Yeast: Characteristics and identification. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press.

Bernfeld, P. 1955. Amylase α and β. Method in Enzymology (Vol.1). New York: Academic Press.

Clementi, F., Rossi, J., Costamagna, L., and Rosi, J. 1980. Production of amylase (s) by *Schwanniomyces castellii* and *Saccharomycopsis fibuligera*. Antonie Van Leeuwenhoew 46: 399-405.

Del Rosario, R.R. 1980. Traditional Filipino fermented foods. Proceedings in Oriental fermented foods, pp. 71-87. Food Industry Research and Development Institute Hsinchu, Taiwan, Republic of China.

Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., and Nout, M.J.R. 2006. Functionality of selected strains of molds and yeasts from Veitnamese rice wine starters. Journal of Food Microbiology 23: 331-340.

Dung, N.T.P., Rombouts, F.M., and Nout, M.J.R. 2007. Characteristics of some traditional Vietnamese starch – based rice wine fermentation starters (men). Food Science and Technology 40: 130–135.

Ellis, J.J., Rhodes, L.J., and Hesseltine, C.W. 1976. The genus Amylomyces. Mycologia. 68: 131-143.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. Evolution 39: 738-791.

Hadisepoetro, C.W., Takada, N., and Oshima, Y. 1979. Microflora in ragi and usar. Journal of Fermentation Technology 77: 251-259.

Kimura, M. 1980. A sample method for estimationary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111-120.

Knox, A.M., Preez, J.C., and Kilian, S.G. 2004. Starch fermentation characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* strains transforms with amylase genes from *Lipomyces kononenkoae* and *Saccharomycopsis fibuligera*. Enzyme Microbiology Technology 34: 453-460.

Kurtzman, C. P., and Fell, J. W. 1998. The yeasts, a taxonomic study. Amsterdam: Elsevier Science.

Lachance, M.A., Bawies, J.M., Atarmer, W.T., and Barker, J.S.F. 1999. *Kodamaea kakadeuensis* and *Candida tolerans*, two new ascomycetous yeast species from Australian Hibiscus flowers. *Canadian Journal of Microbiology* 45: 172-177.

Lee, A.C., and Fujio, Y. 1999. Microflora of banh men, a fermentation starter from Vietnam. Journal of Microbiology & Biotechnology 15: 51-55.

Lemmel, S.A., Heimsch, R.C., and Korus, R.A. 1980. Kinetic of growth and amylase production of *Saccharomycopsis fibuligera* on potato processing wastewater. Applied and Environmental Microbiology 39: 387-393.

Limtong, S., Sintara, S., Suwanarit, P., and Lotong, N. 2005. Species Diversity of Mold in Thai Traditional Fermentation Starters (Loog-Pang). Kasersart Journal: Natural Science 39: 511-518.

Limtong, S., Sintara, S., Suwanarit, P., and Lotong, N. 2002. Yeast Diversity in Thai Traditional Fermentation Starter (Loog-Pang). Kasersart Journal: Natural Science 36: 149-158.

Miller, G.L., 1959. Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry 31: 426-428.

Nelson, N. 1994. A Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. Journal of Bacteriology 48: 413-421.

Nigam, P., and Singh, D. 1995. Enzyme and microbial systems involved in starch processing. Enzyme and Microbial Technology 17: 770 – 778.

Saelim, K., Dissara, Y., and H-Kittikun, A. 2007. Saccharification of cassava starch by *Saccharomycopsis fibuligera* YCY1 isolated from Loog-Pang (rice cake starter). Songklanakarin Journal of Science and Technology 30: 65-71.

Saito, K., Abe, A., Sujaya, I.N., Sone, T., and Oda, Y. 2004. Comparison of Amylomyces rouxii and Rhizopus oryzae in lactic acid fermentation of potato pulp. Food Science and Technology Research 10: 229-231.

Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution 4: 406-425.

Samson, R.A., Hoekstra, E.S., Frisvad, J.C., and Filtenborg, O. 2002. Introduction to Food and Airborne Fungi. Utrecht, Netherland: Centraalbeau voor Schimmelculture.

Sandhu, D.K., Vilkhu, K.S., and Soni, S.K. 1987. Production of a-amylase by *Saccharomycopsis fibuligera* (Syn.Endomycopsis fibuligera). Journal of Technology 65: 387-394.

Sharma, O.P. 1989. Textbook of Fungi. New Delhi: Tata McGraw-Hill Publishing Company Limited.

Shrestha, H., Nand, K., and Rati, E.R. 2002. Microbiological profile of Mucha starters and physic-chemical characteristics of poko, a rice based traditional fermented food product of Nepal. Food Biotechnology 16: 1-15.

Tamang, J.P., and Sakar, P.K. 1995. Microflora of murcha: an amylolytic fermentation starter. Microbios 81: 115-122.

Thanh, V.N., Mai, L.T., and Tuan, D.A. 2008. Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR-mediated DGGE. International Journal of Food Microbiology 128: 268-273.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., and Higgins, J.D. 1997. The Clustal X window interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Research 24: 4876-4882.

Verma, G., Nigam, P., Singh, D., and Chaudhary, K. 2000. Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevissiae* 21. Bioresource Technology 72: 261-266.

Voet, D., and Voet, J.G. 1990. Biochemistry. Canada. John Wiley & Sons.

Wang, P.H., Chang, C.W., and Wang, Y.T. 2003. Phylogenetic analysis of five Rhodotorula spp. Taiwanese Journal of Agricultural Chemistry and Food science 41: 101-112

Waterman, M.S. 1986. Multiple sequence alignment by consensus. Nucleic Acids Research. 14: 9095-9102.

Webster, J., and Weber, R. 2007. Introduction to Fungi. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Yamamoto, T., Minamiura, N., Sakano, Y., Shinke, R., Omichi, K., Ikenaka, T., Endo, S., and Mizokami, K. 1988. Data on Individual Amylases. In the Amylase Research Society of Japan (ed.). Handbook of Amylases and Related Enzymes. Tokyo: Pergamon Press.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร PDA (Potato Dextrose Agar)

PDA สำเร็จรูป	39	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท DIFCO ประเทศสหรัฐอเมริกา ชั่งอาหาร PDA สำเร็จรูปมา 39 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหาร YM broth (Yeast extract-malt extract broth)

YM broth สำเร็จรูป	21	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ใช้อาหารสำเร็จรูปของบริษัท DIFCO ประเทศสหรัฐอเมริกา ชั่งอาหาร YM broth สำเร็จรูปมา 21 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหาร YM agar (Yeast extract-malt extract agar)

YM broth สำเร็จรูป	21	กรัม
Agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร YM broth สำเร็จรูปมา 21 กรัม ใส่วุ้นลงไป 18 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหาร Starch broth

Soluble starch	3%	
ยีสต์สกัด (Yeast extract)	3	กรัม
เปปโตน (Peptone)	3	กรัม
กลูโคส (Glucose)	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	กรัม

ละลายสารทั้งสี่ชนิดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สูตรและวิธีการเตรียมสารเคมี

1. ซิเตรท-ฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (Citrate-Phosphate Buffer) pH 5.0

   สารละลาย A : 0.1 M กรดซิตริก (Citric acid) (ละลายกรดซิตริก 21.01 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

   สารละลาย B : 0.2 M ไดเบสิก โซเดียมฟอสเฟต (Dibasic sodium phosphate) (ละลาย $Na_2HPO_4.7H_2O$ 53.65 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 24.3 มิลลิลิตรกับสารละลาย B ปริมาณ 25.7 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. โซเดียม แอซิเตต บัฟเฟอร์ (Sodium acetate buffer) pH 5.0

   สารละลาย A : 0.2 M กรดแอซิติก (Acetic acid) (ละลายกรดแอซิติก 11.55 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

   สารละลาย B : 0.2 M โซเดียมแอซิเตต (Sodium acetate) (ละลาย $C_2H_3O_2Na$ 16.4 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร)

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 14.8 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 35.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. โซเดียม แอซิเตต บัฟเฟอร์ (Sodium acetate buffer) pH 5.4

   สารละลาย A : 0.2 M กรดแอซิติก (Acetic acid) (ละลายกรดแอซิติก 11.55 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

   สารละลาย B : 0.2 M โซเดียมแอซิเตต (Sodium acetate) (ละลาย $C_2H_3O_2Na$ 16.4 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร)

ผสมสารละลาย A ปริมาตร 8.8 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 41.2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

4. สารละลายไดไนโตรซาลิไซลิก แอซิด (Dinitrosalicylic acid)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	1	กรัม
โซเดียม-โพแทสเซียมทาร์เทรต (Sodium-potassium tartrate)	20	กรัม
โซเดียมเมทาไบซัลไฟด์ (Sodium metabisulfite)	0.05	กรัม
ฟีนอล (Phenol)	0.2	กรัม
กรดไดไนโตรซาลิไซลิค แอซิด (3,5-Dinitrosalicylic acid)	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 กรัม ในน้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร เติมโซเดียม-โพแทสเซียมทาร์เทรต ลงไป 20 กรัม ละลายให้เข้ากันจนหมด เติมโซเดียมเมทาไบซัลไฟด์ 0.05 กรัม ละลายให้เข้ากันจนหมด เติมฟีนอลลงไป 0.2 กรัม ละลายให้เข้ากันจนหมด จากนั้นค่อยๆเติมกรดไดไนโตรซาลิไซลิค แอซิด (3,5-Dinitrosalicylic acid) ลงไปทีละน้อย ละลายให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา (Miller, 1959)

5. โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล (0.1 N NaOH)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	4	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ใส่ใน volumetric flask แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นเป็น 1000 มิลลิลิตร

6. สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent)

คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$)	10	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	71	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$)	40	กรัม
โซเดียมซัลเฟต ($NaSO_4$)	120	กรัม

โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล	100	มิลลิลิตร

เตรียมคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.5H_2O$) 10 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร จากนั้นเตรียมสารละลายฟอสเฟตทาร์เทรต โดยชั่ง ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) 71 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 700 มิลลิลิตร เติมโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต ($NaKC_4H_4O_6.4H_2O$) 40 กรัม เติมโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 นอร์มัล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เติมโซเดียมซัลเฟต ($NaSO_4$) 120 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา 2 วัน นำมากรองตะกอนออก จึงนำมาผสมกับสารละลายคอปเปอร์

7. สารละลายเนลสัน (Nelson's Arsenomolybdate color reagent)

ไดเบสิก โซเดียมอาร์เซเนต ($Na_2HAsO_4.7\ H_2O$)	3	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$)	25	กรัม
กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid)	21	มิลลิลิตร

ละลายไดเบสิก โซเดียมอาร์เซเนต ($Na_2HAsO_4.7\ H_2O$) 3 กรัม ในน้ำกลั่น 25 มิลลิลิตร นำไปผสมกับแอมโมเนียมโมลิบเดต ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$) 25 กรัม ในน้ำ 450 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟูริก 21 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 วัน

ภาคผนวก ค

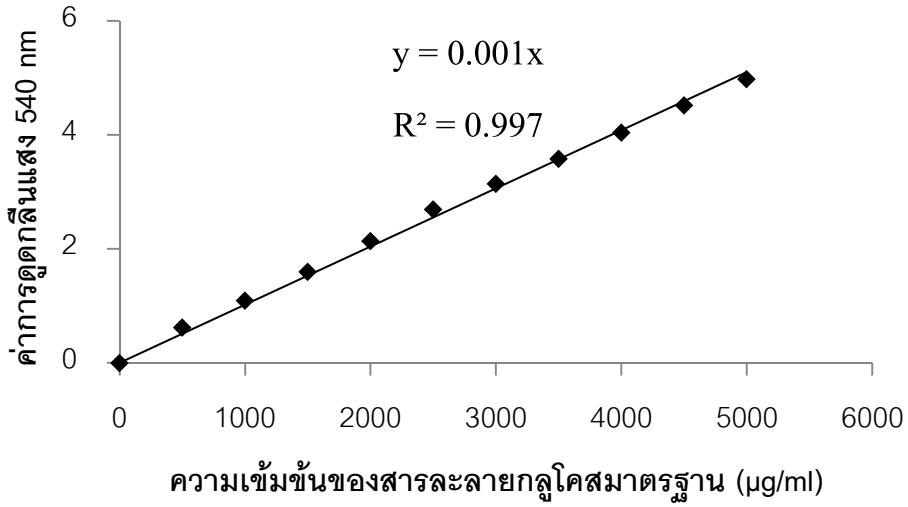
1. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNSA) (Miller, 1959)

นำน้ำหมักที่ได้จากปฏิกิริยาการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่นลงไปปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ)

คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส} = \frac{A_{540} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา}}$$ หน่วย(Unit) ต่อมิลลิลิตร

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยแป้งและให้น้ำตาลรีดิวซ์ (เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส) 1 ไมโครกรัมภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ



ภาพที่ ค 1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส ตามวิธีของ Bernfeld (1955)

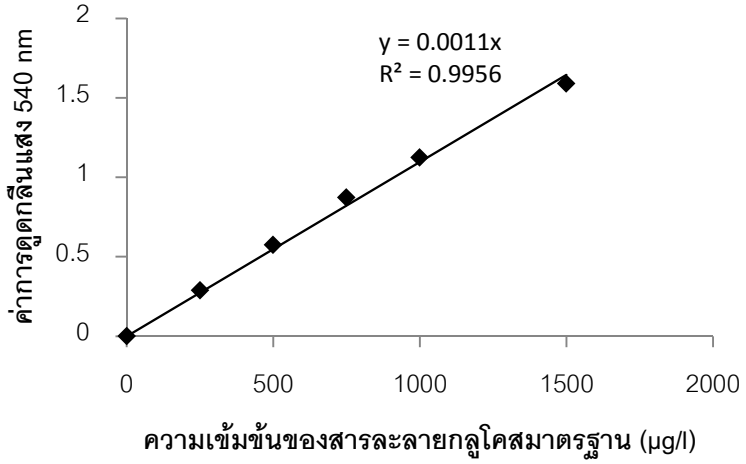
นำน้ำหมักที่ได้จากปฏิกิริยาการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับซิเตรท ฟอสเฟสบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมน้ำแป้งอุ่น (1% Soluble Starch) 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที หยุดปฏิกิริยาเอนไซม์ โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

นำสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลาย DNS 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ทำแบลงค์โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายตัวอย่าง

คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส} = \frac{A_{540} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา}}$$ หน่วย(Unit) ต่อมิลลิลิตร

กำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่ย่อยแป้งและให้น้ำตาลรีดิวซ์ (เทียบเท่าน้ำตาลกลูโคส) 1 ไมโครกรัมภายใน 1 นาที ภายใต้สภาวะที่ทำการทดสอบ



ภาพที่ ค 2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

3. การหาปริมาณกลูโคสโดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1994)

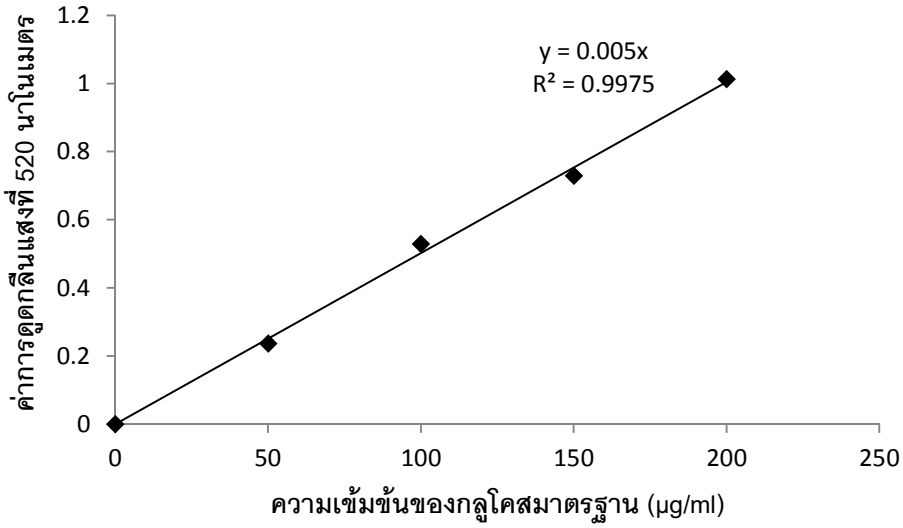
สารเคมีที่ใช้

1. สารละลายคอปเปอร์ (Copper reagent) (ภาคผนวก ข)
2. สารละลายเนลสัน (Nelson's Arsenomolypdate color reagent)

นำน้ำหมักที่ได้จากปฏิกิริยาการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายคอปเปอร์ลงไป 1 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็น เติมสารละลายเนลสันลงไป 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นลงไป 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 15 นาที แต่ไม่ควรเกิน 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 520 นาโนเมตร

คำนวณความเข้มข้นของกลูโคส

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{A_{520} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1000}$$



ภาพที่ ค 3 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

4. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด

สารเคมีที่ใช้

1. น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มเดือนนาน 20 นาที
2. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล นำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อน
3. การหาความเข้มข้นมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล ทำได้โดยชั่ง Acid potassium phathalate (Potassium hydrogen phathalate analytical reagent) อบไว้ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นลงในเดซิเคเตอร์ ชั่งอย่างละเอียด 0.3 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 90-100 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 3 หยด แล้วไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล ความเข้มข้นมาตรฐานคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัม } COOH.C_6H_4.COOK \times 1000}{\text{มิลลิลิตรของ NaOH} \times 204.22}$$

สารละลายฟีนอฟทาลีน (Phenolphthalein) ชัง 1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 3 หยด ไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มัล จนกระทั่งถึงจุดยุติ (End point) (สีชมพู) ปริมาณกรดคำนวณเป็นกรดแลคติก ตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก} = \frac{\text{มิลลิลิตรของ NaOH} \times \text{N ของ NaOH} \times 90.08 \times 100}{1000 \times 10 \text{ (มิลลิลิตรของตัวอย่าง)}}$$

(น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก = 90.08)

ภาคผนวก ง

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก โดยใช้ไพรเมอร์ F63 กับ LR3

LY8-1

GAGGAAAAGAAACCAACCGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAACAGC
TTCAAATTTTGAAAGCCCGCGGGCGTTTGTAATTTGCAGGCGGATGTTTTGGGGCGGG
CGCTGTCTACGTTCCTTGGAACAGGACGCCGCAGAGGGTGAGAGCCCCGTGCGATG
GCGCCTCTAACCGCGTAAAACTCCGCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTC
CAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAAC
AAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGA
AATTGTTGAAAGGGAAGGGTATGCGATTAGCGGCCAGCAGGAGGTGCCTTCTCGTGA
AAAGGCCGTGCACCGTCTTCGGACACCGTGCGCGGAGATGGCGAGGGGGCGCCTG
AGGTCTGCGAACTCGAGGTTGCTGGCGTAATGATTGCATACCACCCGTCT

LY4-1

GGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTC
AAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTTGGG
TTTGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCT
GATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGC
AGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGC
GAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTAC
GTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTACGATTATCTTCT
CTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCGGATGGCAAGATA
ATGGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATATTGCCT
GTCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTAATGATCTAATGCCGC
CCG

LY10-1

AGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCT
CAAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTTGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTTGG
GTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTC
TGATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATG
CAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTA
CGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTACGATTATCTTC
TCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCGGATGGCAAGAT
AATGGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATATTGCC
TGTCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTAATGATCTAATGCCG
CCCGTC

LY16-2

TAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCA
AAAGCTCAAATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAA
CCTTGGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAAT
CCCGTCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTG
GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGAC
CGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAA
AAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTACGATT
ATCTTCTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCGGATGGC
AAGATAATGGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATA
TTGCCTGTCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTAATGATCTAA
TGCCGCCCGTCTTG

LY16-3

AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGA
AATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTTGGGTTTGGCTC
TTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGATGAGAT
GCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAA
GTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGT
ACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTG
TTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTACGATTATCTTCTCTTCTTGAGT
TGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCGGATGGCAAGATAATGGCAGTTG
AATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTGTCTGGATCG
AGGGCTGCGTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTAATGATCTAATGCCGCCCG

LY17-5

AAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAA
ATTTGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTTGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTTGGGTTT
GGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGAT
GAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGC
TCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAA
CAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGA
AATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTACGATTATCTTCTCTTCT
TGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCGGATGGCAAGATAATGGC
AGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTGTCTG
GATCGAGGGCTGCGTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTAATGATCTAATGCCG

LY20-1

AGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCT
CAAATTTGAAATCCTAGCACCTTTCGGTTGTTTGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTT
GGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCG
TCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAA
TGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGAT
AGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAG
TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTACGATTATCT
TCTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCGGATGGCAAG
ATAATGGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATATTG
CCTGTCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTAATGATCTAATGC
CGCCCGTC

LY16-4

GAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGC
TCAAATTTGAAATCCTGGCTCTTTTCAGAAGTCCGAGTTTGTAATTTGAAGAAGGTATCT
TTGGGTCTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGAACGTCACAGAGGGTGAGAATCC
CGTGCGATGAGATGATCCAGGCCTATGTAAAGTTCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGG
GAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC
GATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAA
AAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACTTGGTATTTTGTATGTT
ACTTCTTCGGGGGTGGCCTCTACAGTTTATCGGGCCAGCATCAGTTTGGGCGGTAGG
AGAATTGCGTTGGAATGTGGCACGGCTTCGGTTGTGTGTTATAGCCTTCGTCGATACT
GCCAGCCTAGGACTGAGGACTGCGGTTTATACCTAGGATGTTGGCATAATGATCTTAA
GTCGCCCGTCT

LY16-5

GAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGC
TCAAATTTGAAATCCTGCGGGAATTGTAATTTGAAGGTTTCGTGGTCTGAGTCGGCCG
CGCCCAAGTCCATTGGAACATGGCGCCTGGGAGGGTGAGAGCCCCGTCTGGCGCA
CGCCGACTCTTTGCACCGCGGCTCCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTA
AGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAA
GTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAA
TTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGCAAGCAGACACGGTTTTACCGGGCCAGCGTCGAAAA
GGGGGGAGGAACAAGAACTCGAGAAATGTGGCGCGCACCTTCGGGCGCGCGTGTT
ATAGCTCGTGTTGGACGCCTCCATCCCTTTTCGAGGCCTGCGATTCTAGGACGCTGG
CGTAATGGTTGCAAGCCGCCCGTCTTGA

LY15-1

TAGGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAA
AAGCTCAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGATTGTAAC
CTTGGGGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATC
CCGTGCGATGAGATGCCCAATCCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGG
GAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACC
GATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAA
AAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGC
CTTGCCTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGG
TAGGATAATGGCGTAGGAATGTGACTTTGCTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGA
TGCTGCCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCC
AAACCGCCCGTCTGA

LY15-2

AGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCT
CAAATTTGAAATCTGGCACCTTCGGTGTCCGAGTTGTAATTTGAAGATTGTAACCTTGG
GGTTGGCTCTTGTCTATGTTTCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCGTG
CGATGAGATGCCCAATCCTATGTAAGGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATG
CAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTA
CGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTTTGAGATCAGACTCGATATTTTGTGAGCCTTGC
CTTCGTGGCGGGGTGACCCGCAGCTTATCGGGCCAGCATCGGTTTGGGCGGTAGGA
TAATGGCGTAGGAATGTGACTTTGCTTCGGTGAAGTGTTATAGCCTGCGTTGATGCTG
CCTGCCTAGACCGAGGACTGCGATTTTATCAAGGATGCTGGCATAATGATCCCAAACC
GCCCGT

LY7-1

GGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTC
AAATTTGAAAGCTAGCACCTTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAG
TAGTCCTTTATCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAACCCCGTATG
ATTTTGGATACTACTCTTTGTGGGATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAG
CTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGA
ACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGT
GAAATTGCTGAAAGGGAAGGGCTTGAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCAGTTCT
TCTTGGACTGTGCACTCGTTTTTCACCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGTACC
CCTTGAAATGTGGCTTCCTTCGGGGAGTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGCTGG
GACTGAGGACTGCGCTTCGGCAAGGATATTGGCGTAATGACCTTAAGCCGCCCGTCT
TG

LY19-2

GAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGC
TCAAATTTGAAAGCTAGCACCTTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGA
GTAGTCCTTTATCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAACCCCGTAT
GATTTTGGATACTACTCTTTGTGGGATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCA
GCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCG
AACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACG
TGAAATTGCTGAAAGGGAAGGGCTTGAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCAGTTC
TTCTTGGACTGTGCACTCGTTTTTCACCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGTACC
CCTTGAAATGTGGCTTCCTTCGGGGAGTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGCTGG
GACTGAGGACTGCGCTTCGGCAAGGATATTGGCGTAATGACCTTAAGCCGCCCG

LY19-3

GGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTC
AAATTTGAAAGCTAGCACCTTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAG
TAGTCCTTTATCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAACCCCGTATG
ATTTTGGATACTACTCTTTGTGGGATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAG
CTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGA
ACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGT
GAAATTGCTGAAAGGGAAGGGCTTGAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCAGTTCT
TCTTGGACTGTGCACTCGTTTTTCACCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGTACC
CCTTGAAATGTGGCTTCCTTCGGGGAGTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGCTGG
GACTGAGGACTGCGCTTCGGCAAGGATATTGGCGTAATGACCTTAAGCCGCCCGTCT

LY21-1

AGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCT
CAAATTTGAAATCCTAGCACCTTTCGGTTGTTTGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTT
GGGTTTGGCTCTTGTCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCG
TCTGATGAGATGCCCATTCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAA
TGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGAT
AGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAG
TACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGGTGTTTTACGATTATCT
TCTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAGCATCGATTCGGATGGCAAG
ATAATGGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGGAGTGTTATAGCTTCTGCTGATATTG
CCTGTCTGGATCGAGGGCTGCGTCTTTTGACTAGGATGCTGGCGTAATGATCTAATGC
CGCCCGTC

LY21-2

GGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAG
CTCAAATTTGAAAGCTAGCACCTTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTT
GAGTAGTCCTTTATCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAACCCCGT
ATGATTTTGGATACTACTCTTTGTGGGATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATG
CAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAG
CGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTA
CGTGAAATTGCTGAAAGGGAAGGGCTTGAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCAG
TTCTTCTTGGACTGTGCACTCGTTTTTCACCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGT
ACCCCTTGAAATGTGGCTTCCTTCGGGGAGTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGC
TGGGACTGAGGACTGCGCTTCGGCAAGGATATTGGCGTAATGACCTTAAGCCGCCCG
TCT

LY21-3

GGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTC

AAATTTGAAAGCTAGCACCTTCGGTGTTCGCGTTGTAATTTGAAGATAGTTTCCTTGAG

TAGTCCTTTATCTATGTTCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAACCCCGTATG

ATTTTGGATACTACTCTTTGTGGGATTCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAG

CTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGA

ACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTCTGAAGAGAGAGTGAAAAAGTACGT

GAAATTGCTGAAAGGGAAGGGCTTGAGGTCAGACTTGGTGTTTAATGATTATCAGTTCT

TCTTGGACTGTGCACTCGTTTTTCACCGGGCCAATATCAGTTTTAGCGGTAGAGTACC

CCTTGAAATGTGGCTTCCTTCGGGGAGTGTTATAGTCTTGGGGAGATCTACTTGCTGG

GACTGAGGACTGCGCTTCGGCAAGGATATTGGCGTAATGACCTTAAGCCGCCCGTCT

ภาคผนวก จ

ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS ของเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมาก โดยใช้ไพรเมอร์ ITS1 กับ ITS4

LY4-1

AACCTGCGGAAGGATCATTAATTATGTTAAAGCGCCTTACCTTAGGGTTTCCTCTGGG
GTAAGTGATTGCTTCTACACTGTGAAAATTTGGCTGAGAGACTCAGACTGGTCATGGG
TAGACCTATCTGGGGTTTGATCGATGCCACTCCTGGTTTCAGGAGTACCCTTCATAATA
AACCTAGAAATTCAGTATTATAAAGTTTAATAAAAAACAACTTTTAACAATGGATCTCTTG
GTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATTGCATATTC
AGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGTTTTTCTATAGAGTACGC
CTGCTTCAGTATCATCACAAACCCACACATAACATTTGTTTATGTGGTGATGGGTCGCA
TCGCTGTTTTATTACAGTGAGCACCTAAAATGTGTGTGATTTTCTGTCTGGCTTGCTAGG
CAGGAATATTACGCTGGTCTCAGGATCTTTTTTTTTGGTTCGCCCAGGAAGTAAAGTAC
AAGAGTATAATCCAGTAACTTTCAAACTATGATCTGAAGTCAGGTGGGATTACCCGCT
GAACTTAAGCATATCATA

LY8-2

CTTCCGTAGGGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATTATGTTAAAGCGCCTTACCTTA
GGGTTTCCTCTGGGGTAAGTGATTGCTTCTACACTGTGAAAATTTGGCTGAGAGACTC
AGACTGGTCATGGGTAGACCTATCTGGGGTTTGATCGATGCCACTCCTGGTTTCAGGA
GTACCCTTCATAATAAACCTAGAAATTCAGTATTATAAAGTTTAATAAAAAACAACTTTTA
ACAATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGT
GTGAATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGTTT
TTCTATAGAGTACGCCTGCTTCAGTATCATCACAAACCCACACATAACATTTGTTTATGT
GGTGATGGGTCGCATCGCTGTTTTATTACAGTGAGCACCTAAAATGTGTGTGATTTTCT
GTCTGGCTTGCTAGGCAGGAATATTACGCTGGTCTCAGGATCTTTTTTTTTGGTTCGCC
CAGGAAGTAAAGTACAAGAGTATAATCCAGTAACTTTCAAACTATGATCTGAAGTCAG
GTGGGATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGT

LY12-5

CTTCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAATTATGTTAAAGCGCCTTACCTTAGG
GTTTCCTCTGGGGTAAGTGATTGCTTCTACACTGTGAAAATTTGGCTGAGAGACTCAGA
CTGGTCATGGGTAGACCTATCTGGGGTTTGATCGATGCCACTCCTGGTTTCAGGAGTA
CCCTTCATAATAAACCTAGAAATTCAGTATTATAAAGTTTAATAAAAAACAACTTTTAACA
ATGGATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTG
AATTGCATATTCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGTTTTTCT
ATAGAGTACGCCTGCTTCAGTATCATCACAAACCCACACATAACATTTGTTTATGTGGT
GATGGGTCGCATCGCTGTTTTATTACAGTGAGCACCTAAAATGTGTGTGATTTTCTGTC
TGGCTTGCTAGGCAGGAATATTACGCTGGTCTCAGGATCTTTTTTTTTGGTTCGCCCAG
GAAGTAAAGTACAAGAGTATAATCCAGTAACTTTCAAACTATGATCTGAAGTCAGGTGG
GATTACCCGCTGAACTTAAGCATATCT

LY17-1

TCCGTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATTAACTAATGTATTGGCACTTTACTGGGATTT
ACTTCTCAGTATTGTTTGCTTCTATACTGTGAACCTCTGGCGATGAAGGTCGTAACTGA
CCTTCGGGAGAGACTCAGGACATATAGGCTATAATGGGTAGGCCTGTTCTGGGGTTT
GATCGATGCCAATCAGGATTACCTTTCTTCCTTTGGGAAGGAAGGTGCCTGGTACCCT
TTACCATATACCATGAATTCAGAATTGAAAGTATAATATAATAACAACTTTTAACAATGG
ATCTCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGTAGCAAAGTGCGATAACTAGTGTGAATT
GCATATTCGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCAGCTTGCACTCTATGGATCTTCTATAG
AGTACGCTTGCTTCAGTATCATAACCAACCCACACATAAAATTTATTTTATGTGGTGATG
GACAAGCTCGGTTAAATTTAATTATTATACCGATTGTCTAAAATACAGCCTCTTTGTAATT
TTCATTAAATTACGAACTACCTAGCCATCGTGCTTTTTTGGTCCAACCAAAAAACATATA
ATCTAGGGGTTCTGCTAGCCAGCAGATATTTTAATGATCTTTAACTATGATCTGAAGTCA
AGTGGGACTACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

ภาคผนวก ฉ

ผลการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน โดยใช้ชุดทดสอบสำเร็จรูป ID 32 C (BioMerieux SA, ประเทศฝรั่งเศส)

LY4-1

LY4-3

LY7-1

LY8-1

LY8-2

LY15-1

LY15-4

LY16-2

LY16-4

LY16-5

LY19-1

LY19-2

LY20-1

LY21-1

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวรังสิมา ดรุณพันธ์ เกิดเมื่อวันที่ 5 พฤศจิกายน 2529 ที่จังหวัดนครศรีธรรมราช สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาอาหารและโภชนาการ ภาควิชาโภชน-วิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เมื่อปีการศึกษา 2551 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2552

การนำเสนอผลงานทางวิชาการ

Daroonpunt, R., Thitinunsomboon, S., Luangsakull, N., Jindamorakot, S., Tanasupawat, S., and Keeratipibull, S. 2010. Screening and identification of yeasts for alcoholic fermentation and amylolytic activity in 28th International Specialised Symposium on yeasts. 15th-18th September 2010 at Montien Riverside Hotel, Bangkok, Thailand.

Daroonpunt, R., Tanasupawat, S., and Keeratipibull, S. 2011. Selection of mold strains from Lookpang-Khaomak for high amylase activity in The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. 29th-31st August 2011 at Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.