บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การศึกษาความหลากหลายและการแพร่กระจายของยีสต์ในแหล่งธรรมชาติในประเทศไทยมีน้อยเมื่อเทียบกับการศึกษาจุลินทรีย์อื่นและมีน้อยมากเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตอื่น ดั้งนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษายีสต์ ซึ่งจะทำให้สามารถทราบแหล่งข้อมูลพื้นฐานเพื่อจะใช้เป็นข้อมูลการกระจายตัวความสัมพันธ์ของยีสต์กับสิ่งแวดล้อมและการเปลี่ยนแปลงแต่ละฤดูกาล ข้อมูลที่ได้จะเป็นการแสดงทรัพยากรของประเทศรวมถึงประโยชน์ในแง่ของการอนุรักษ์ นอกจากนี้แล้วยังสามารถเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีคุณสมบัติพิเศษต่างๆ ที่น่าสนใจที่จะนำมาใช้ประโยชน์ อีกทั้งยังสามารถแยกยีสต์ได้สายพันธุ์ใหม่ๆ ที่มีคุณค่าด้านวิชาการอื่นๆ และมีคุณค่าด้านเศรษฐกิจในอนาคต

การศึกษาการกระจายตัวและสภาวะการเจริญของยีสต์ เป็นส่วนหนึ่งของโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯสยามบรมราชกุมารี บริเวณ เขื่อนห้วยกุ่ม อำเภอเกษตรสมบูรณ์ จังหวัดชัยภูมิ เป็นพื้นที่ปกปักรักษาไว้เพื่อให้เป็นแหล่งในการศึกษา เรียนรู้ทั้งพืช สัตว์ จุลินทรีย์ เห็ด รา ยีสต์ และนำผลที่ได้จากการศึกษาไปใช้ประโยชน์

สิ่งมีชีวิตทั้งหมดไม่สามารถบอกจำนวนสปีชีส์ที่แน่นอนได้ จากการสำรวจจำนวนสปีชีส์แปรผันในช่วงตั้งแต่ 3-5 ล้านสปีชีส์ ถึง 1.4 ล้านล้านสปีชีส์ มีการศึกษาแล้วตั้งชื่อประมาณ 1.4-1.8 ล้านสปีชีส์ สำหรับยีสต์มีการค้นพบและอธิบายแล้วประมาณ 900 สปีชีส์ (Kurtzman and Fell, 1998) การสำรวจความหลากหลายของจุลินทรีย์ในแต่ละแหล่งที่อยู่มีประโยชน์หลายประการ เช่น จุลินทรีย์บางสายพันธุ์ให้ผลผลิตที่มีศักยภาพในด้านอุตสาหกรรม จุลินทรีย์หลายชนิดมีบทบาทในกานเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารและพลังงานทำให้ระบบนิเวศน์ป่าไม้ ระบบนิเวศน์เกษตร และระบบนิเวศน์ประมงคงสภาพเดิม จุลินทรีย์บางชนิดทำลายสารพิษจากของเหลือใช้ต่างๆในธรรมชาติ การค้นพบและศึกษาจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในสภาวะวิกฤติ เช่น อุณหภูมิสูง ความเค็มสูง และพีเอชต่ำ สามารถอธิบายสิ่งเหล่านั้นได้อย่างไรในสภาวะแบบนั้น นอกจากนั้นการรู้องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในแหล่งต่างๆนำไปสู่การจัดการเกี่ยวกับจุลินทีรย์ได้ดีขึ้น และยังเป็นพื้นฐานให้รู้ถึงการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมแหล่งนั้น สำหรับการสำรวจความหลากหลายของยีสต์ในแหล่งที่อยู่ต่างๆนั้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย ทำให้ทราบถึงระบบนิเวศน์แหล่งนั้นและการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดแยกยีสต์บริเวณเขื่อนสิรินธร
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ที่แยกได้

1.3 ขอบเขตของการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างดิน ดอกไม้ ใบไม้ และผลไม้ บริเวณป่าเขื่อนสิรินธร

2. คัดแยกและศึกษาคุณสมบัติยีสต์ในด้านต่างๆ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ยีสต์บริสุทธิ์จากเขื่อนสิรินธร เพื่อศึกษาสมบัติต่างๆ
2. ทราบคุณสมบัติบางประการของยีสต์ที่คัดแยกจากเขื่อนสิรินธร

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับยีสต์

ยีสต์ (yeast) คือ รากลุ่มหนึ่งที่ส่วนใหญ่เป็นเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รีสามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาว ฝรั่ง เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ พบทั่วไปในธรรมชาติในดิน ในน้ำ ในส่วนต่างๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดพบอยู่กับแมลง และในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์อยู่บ่อยๆ คือแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน ยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ มักจะปนลงไปในอาหาร เป็นเหตุให้อาหารเน่าเสียได้ ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่รู้จักกันมาตั้งแต่สมัยโบราณถึงกับมีผู้กล่าวว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ รายงานแรกเกี่ยวกับการใช้ยีสต์ คือการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 6,000 ปีก่อนคริสต์ศักราช คนไทยรู้จักใช้ประโยชน์จากยีสต์มาเป็นเวลานาน เช่นในการทำอาหารหมักบางชนิด ได้แก่ ข้าวหมาก ปลาแจ่ว เครื่องดองของเมาหลายชนิด เช่น อุ สาโท และกระแช่ เป็นต้น ปัจจุบันมีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เป็นต้นว่าการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ชนิดต่างๆเช่น เบียร์ ไวน์ และวิสกี้ การผลิตเอธิลแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นสารเคมี และเชื้อเพลิง การผลิตเซลล์ยีสต์ เพื่อใช้เป็นยีสต์ขนมปังและเป็นโปรตีนเซลล์เดียว (วิกิพีเดีย สารานุกรม, 2553)

ยีสต์ทนเค็ม (Halotolerant yeast) หรือยีสต์ทนเกลือ (Salt tolerant yeast) คือยีสต์ที่สามารถเจริญได้ในที่มีเกลือ ซึ่งมักเป็นเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูง จัดเป็นออสโมโทเลอแรนท์ยีสต์ (Osmotolerant yeast) ชนิดหนึ่ง ยีสต์ในกลุ่มนี้มักพบในสิ่งแวดล้อมที่มีเกลือ เช่น น้ำเค็ม น้ำกร่อย อาหารหมักที่ใช้เกลือ เช่น ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว มิโส ปลาร้า ปลาเจ่า ผักดองเค็ม รวมทั้งอาจพบในอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผึ้ง แยม ผลไม้แห้ง และน้ำผลไม้เข้มข้น (Ingram, 1957; Onishi, 1963; Tokuoka และ Ishitani, 1991)

ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง มีประโยชน์ในการหมักเอทานอลเพราะสามารถเจริญและหมักเอทานอลในน้ำตาลความเข้มข้นสูง ซึ่งไม่เพียงแต่ลดความปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ แต่ยังให้เอทานอลในน้ำตาลความเข้มข้นสูงซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกลั่น และปรับปรุงการหมักเอทานอลภายใต้แรงดันออสโมซีสทำได้โดยค่อยๆ เติมสับสเตรทเป็นระยะๆเพื่อลดแรงดันออสโมซีสและทำให้ความมีชีวิตของเซลล์สูงขึ้น (นฤมล และคณะ 2550)

ยีสต์การผลิตเอทานอล ปัจจุบันปัญหาเรื่องแหล่งพลังงานที่ใช้ในประเทศได้ลดลงอย่างรวดเร็วและมีแนวโน้มว่าจะหมดในไม่ช้านี้ จึงมีการทำวิจัยเพื่อหาแหล่งพลังงานทดแทนที่แทนแหล่งพลังงานเดิม ซึ่งแหล่งพลังงานที่ได้รับความสนใจในปัจจุบันคือ เอทานอล ซึ่งสามารถผลิตได้จากผลิตผลทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลังแลอ้อย เป็นต้น รวมทั้งผลิตภัณฑ์ที่มีองค์ประกอบของเซลลูโลส เช่นกระดาษและใบหญ้าแฝก เป็นต้น โดยเอทานอลที่ได้นำไปผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงในอัตราส่วนที่เหมาะสมเพื่อลดการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงให้น้อยลงได้ เรียกว่า แก๊สโซฮอล์

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด แต่ยีสต์ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลาย เพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็ว ผลิตเอทานอลได้ในปิมาณมาก และสามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งอาหารได้หลายชนิด ยีสต์ที่ใช้ผลิตเอทานอลได้ในอุตสาหกรรม คือ *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum (carlsbergensis), Shizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces*

fragilis สำหรับ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่นๆ การหมักเอทานอลที่มีอัตราการหมักสูงจะมีความร้อนเกิดขึ้นในอัตราที่สูง การหมักด้วยยีสต์ทั่วไปซึ่งมักเป็นยีสต์ที่ชอบอุณห๓มิปานกลาง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความสามารถในการหมักเอทานอลจะลดลงอย่างมาก เนื่องจากการยับยั้งด้วยเอทานอลที่มีมากขึ้น ดังนั้นการใช้ยีสต์ที่เจริญและหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง ยีสต์มักมีอัตราการหมักสูงทำให้ผลิตเอทานอลได้เร็วและยังช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นได้อีกด้วย (Seki *et al*., 1983; Limtong, 1986)

วิธีการแยกเชื้อ (Isolation)

1. เทคนิคการเพิ่มจำนวน (Enrichment technique)

เป็นการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการในตัวอย่าง ซึ่งในตัวอย่างนั้นอาจมีจุลินทรีย์หลายชนิดผสมกันอยู่จึงต้องมีการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ต้องการในสภาวะการเจริญที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ที่ต้องการแต่ไม่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์ที่ม่ต้องการ เช่น การเติมสับสเตรท หรือสารบางอย่างลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารเหลว (Enrichment liquid culture) โดยการนำตัวอย่างมาเพาะลงในอาหาร ซึ่งการเพิ่มจำนวนนี้อาจมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ ดังนั้นจึงมีการคัดเลือกโดยนำเชื้อที่มีการเพิ่มจำนวนที่ได้ไปเพาะลงในอาหารใหม่โดยเอามาเลี้ยงในอาหารแข็งที่เหมาะสม สิ่งสำคัญของวิธีนี้คือเวลาในการถ่ายเชื้อควรสัมพันธ์กับเวลาที่จุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการมากที่สุด (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2. เทคนิคการแยกเชื้อโดยใช้เทคนิคการเจือจาง

เป็นการแยกเชื้อทั้งหมดในตัวอย่างโดยการนำตัวอย่างที่ต้องการแยกเชื้อมาเตรียมเป็นสารแขวนลอยหรือสารละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ทำการเจือจางและนำไปใส่ในอาหารที่เหมาะสมในจานเพาะเลี้ยงเชื้อ อาจใช้วิธี pour plate, streak plate, drop plate เป็นการแยกตัวอย่างและคัดเลือกตัวอย่างที่สนใจมาทำการศึกษาในขั้นต่อไป

3. การแยกยีสต์ด้วยเทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน

การแยกเชื้อด้วยวิธีนี้ใช้ได้ทั้งที่เป็นของแข็งและของเหลว แผ่นกรองที่นำมากรองนั้นต้องมีขนาดรูกรอง 0.8-1.2 ไมครอน ถ้ายีสต์มีขนาดเล็กมากต้องใช้ขนาด 0.45 ไมครอน ยีสต์และจุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่จะติดอยู่บนแผ่นกรองเมมเบรน จากนั้นนำแผ่นกรองไปวางบนผิวหน้าอาหารสำหรับยีสต์จะมีโคโลนีขึ้นมา

2.2 ทบทวนวรรณกรรม

ประดิษฐ์ (2520) คัดเลือกสายพันธ์ยีสต์ที่เหมาะสมในการหมักไวน์ ได้ใช้ยีสต์บริสุทธิ์ 6 ชนิดในการหมักไวน์จากองุ่นขาวพันธุ์ไวท์มะละกา น้ำองุ่นแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1ทำการยับยั้งและทำลายเชื้อปนเปื้อนด้วย SO2 100 พีพีเอ็ม อีกส่วนหนึ่งทำการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน 15 psi เป็นเวลา 20 นาที หมักที่ 23°C พบว่าเชื้อยีสต์ KY7 (Ellipsoideus) และ KY10 (Montrachet) ให้ไวน์คุณภาพดีหากเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) ในน้ำองุ่นก่อนการหมัก เชื้อ KY18 (Champagne) และเชื้อ C117 (Bordeaux) ให้ไวน์คุณภาพดีหากทำการฆ่าเชื้อปนเปื้อนในน้ำองุ่นด้วยความร้อน นอกจากนี้ยังทำการเปรียบเทียบคุณภาพไวน์จากองุ่นขาวพันธุ์ไวท์มะละกาและไวน์แดงจากดอกกระเจี๊ยบแห้ง โดยใช้เชื้อยีสต์แห้ง (Active Dry Wine Yeast หรือ ADY) จากต่างประเทศจำนวน 9 เชื้อ เปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์มาตรฐานที่ใช้หมักไวน์เป็น

ประจำของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร 1 เชื้อหมักที่ 20 °C พบว่าในการหมักไวน์ขาวจากองุ่นพันธุ์ไวท์มะละกาเชื้อยีสต์ทั้ง 10 เชื้อให้ความแตกต่างด้านกลิ่นและการยอมรับจากผู้ชิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างด้านรส สำหรับไวน์แดงจากดอกกระเจี๊ยบแห้งนั้น พบว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 10 เชื้อไม่ทำให้ไวน์มีกลิ่น รสและการยอมรับแตกต่างกัน

สาวิตรี และคณะ (2526) เพื่อผสมพันธุ์ยีสต์เพื่อให้ได้ลูกผสมที่มีคุณสมบัติในการทนเกลือและคุณสมบัติในการหมักแอลกอฮอล์ได้ดีในอุณหภูมิสูง ได้แยกเชื้อบริสุทธิ์ของยีสต์ทนเกลือได้จำนวน 413 สายพันธุ์ จากตัวอย่างชนิดต่างๆ จำนวน 285 ตัวอย่าง และนำยีสต์ที่ได้รวบรวมไว้ใน stock culture จำนวน 690 สายพันธุ์มาคัดเลือกเพิ่มเติม ได้ยีสต์ทนเกลือซึ่งสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5% ได้จำนวน 261 สายพันธุ์ เมื่อนำเชื้อทั้งหมดมาทำการคัดเลือกอีกครั้งได้ยีสต์ที่สามารถเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5% จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ 251, S013, S037, S065 และS090 และคัดเลือกยีสต์ทนเกลือที่สามารถเจริญได้ดีที่เปอร์เซ็นต์เกลือ 17 % จำนวน 4 สายพันธุ์ คือ 356, 370, 126 และ130 สำหรับพ่อแม่ที่มีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ได้ดี ได้รวบรวมจากยีสต์สายพันธุ์ดีที่มีผู้คัดเลือกไว้แล้ว 9 สายพันธุ์ มาทำการคัดเลือกอีกครั้งหนึ่ง ได้ยีสต์ทนเกลือซึ่งสามารถเจริญในการหมักแอลกอฮอล์ที่อุณหภูมิ 40 °ซ จำนวน 3 สายพันธุ์ คือ M30, SC90 และAM12 จากนั้นได้นำยีสต์สายพันธุ์พ่อแม่ที่ได้คัดเลือกได้มาผสมกันโดยวิธีโปรโตพลาสฟิวชั่นจำนวนหลายคู่ ผลปรากฏว่าได้ลูกผสมจากพ่อแม่ระหว่างเชื้อสายพันธุ์ 251 กับ AM12, S037 กับ AM12, S090 กับ AM12 และ S037 กับ Sc90 ได้คัดเลือกลูกผสมไว้เป็นจำนวนรวมทั้งหมด 15 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาลักษณะคุณสมบัติเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่ต่อไป

วราวุฒิ และคณะ (2526) จากการวิเคราะห์ส่วนประกอบของสารสกัดของเปลือกไม้เคี่ยมด้วยวิธี paper chromatography โดยใช้ตัวนำละลายที่ประกอบด้วย เอธิลอะซิเตท : กรดฟอร์มิค : น้ำ อัตราส่วน 10:2:3 โดยปริมาตร พบว่ามีแทนนินเป็นส่วนประกอบหลักนอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นรวมอยู่ด้วย ปริมาณแทนนินในสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมด้วยเอธานอล 95 % เท่ากับ 10.6 % โดยน้ำหนักแห้ง

ปราโมทย์ และคณะ (2526) ได้ศึกษาผลของยากำจัดวัชพืชพาราควอท (1-1‘dimethyl 1-4-4’ bipyridylium) ต่อการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ ทั้งนี้เนื่องจากในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลในโรงงานอุตสาหกรรมใช้น้ำจากแม่น้ำลำคลองโดยตรงสำหรับการหมัก อาจมีการปนเปื่อนของพาราควอทมากับน้ำที่ใช้ในการหมัก ประกอบกับเคยมีรายงานข่าวว่าผู้ผลิตสุราเถื่อนใช้สารพิษชนิดนี้เจือปนเพื่อเป็นตัวเร่งส่าให้ต้มกลั่นได้เร็วขึ้น จากการทดลองโดยใช้กรัมม็อกโซนซึ่งเป็นชื่อทางการค้าของพาราควอท 20 % พบว่าในการหมักน้ำตาลที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว กรัมม็อกโซนที่ความเข้มข้น 500-5000 ppm. มีผลยับยั้งการหมักทำให้อัตราการเจริญของยีสต์และอัตราการหมักแอลกอฮอล์ลดลงก่วาเดิมมากถึงแม้ว่าที่ความเข้มข้น 10-100 ppm. ช่วยให้เซลล์ยีสต์สูงสุดและแอลกอฮอล์สูงสุดเล็กน้อย อันเนื่องจากเชื้อสามารถใช้พาราควอทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ การทดลองการหมักแอลกอฮอล์จากข้าวเหนียวได้แสดงให้เห็วว่า เมื่อมีแงไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมซัลเฟตเพียงพอ พาราควอทไม่ได้ช่วยให้การหมักดีขึ้น แต่กลับทำให้การเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ลดลง

ปทุมพร และคณะ (2526) น้ำทิ้งที่ได้จากการบีบเปลือกสับปะรด นำมากรองโดยใช้ filter press แล้วผ่านขบวนการ Reverse osmosis และ Ultrafiltration ก่อนที่จะใช้เป็น substrate ในการเลี้ยงเชื้อยีสต์ ยีสต์สายพันธุ์ PT-1 ที่ผ่านการคัดเลือกแล้วว่าเหมาะสมต่อการใช้หมักแอลกอฮอล์ เมื่อนำมา identify พบว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae* ยีสต์ PT-1 สามารถเจริญได้ดีใน retentate ที่ความเข้มข้น 22 บริกซ์ (19 % น้ำตาล) KH_2PO_4 0.02 % ที่อุณหภูมิ 37 °ซ จะได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 7.4 x 10^7 เซลล์/

มิลลิลิตร ภายในเวลา 24 ชม. และเมื่อใช้เวลาหมัก 37 ชม. จะได้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดคือ 10.22 % โดยปริมาตร หรือ 81 กรัม/ลิตร พบว่า 80.95 % ของกลูโคสใน substrate ถูกเปลี่ยนไปเป็นเอธานอล และมีน้ำตาลเหลืออยู่ประมาณ 1,300 มิลลิกรัม/ลิตร การเติมสารอาหารพวก $(NH_4)_2SO_4$ และ $MgSO_4$ ไม่ช่วยเพิ่มปริมาณของแอลกอฮอล์แต่อย่างใด

ฉกามาศ และคณะ (2531) ได้ทำการผสมพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ระหว่างสายพันธุ์ที่ทนการแช่แข็งได้ กับสายพันธุ์ที่ใช้ทำขนมปัง โดยวิธี โปรโตพลาสฟิวชั่น เพื่อจะรวมคุณลักษณะทั้ง 2 นี้ไว้ในลูกผสม เพื่อใช้ทำขนมปังชนิด Frozen dough marker ที่ใช้การชักนำ parental strain หนึ่งให้เกิด petite mutant และต้านทาน antibiotic ลูกผสมที่ได้นำมาวิเคราะห์หา DNA content ลักษณะของ chromosomal DNA และตรวจสอบคุณสมบัติในการ from dough ทั้งชนิดธรรมดา และชนิดแช่แข็งโดยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่

ฉกามาศ และคณะ (2531) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการแยก Chromosomal DNA molecules ของยีสต์ *Candida maltosa* สายพันธุ์ IAM 12247 โดยใช้วิธี Pulse Field Gel Electrophores (PFGE) พบว่าสามารถแยกโครโมโซมออกได้เป็น 8 band ในสภาวะที่ใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1%, กระแสไฟคงที่ที่ 180 mA , Pulse switching interval 100 วินาที ในช่วง 20 ชั่วโมงแรก และ 300 วินาที ต่อไปอีก 24 ชั่วโมง อุณหภูมิ ของบัฟเฟอร์ 12 °C DNA bands บน gel นำมาถ่ายลงบน nylon membrane filter เพื่อศึกษาคุณลักษณะของแต่ละ Chromosomal band ต่อไป โดยใช้วิธี hybridization

ศุภนิตย์ และ สัญชัย (2533) กระบวนการหมักแอลกอฮอล์เกิดจากการทำงานของยีสต์ ซึ่งทำการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงาน พลังงานที่เกิดขึ้นทำให้อุณหภูมิในขบวนการหมักเพิ่มขึ้น และอุณหภูมิจะขึ้นสูง ถึง 40-44° C ในช่วงฤดูร้อนทำให้ยีสต์ทำลานช้าลง ดังนั้นการหมักแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง 40° C ก็จะเป็นการแก้ปัญหานี้ได้ เชื้อยีสต์ Y168 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกและคัดเลือกได้จากธรรมชาติ สามารถจะเจริญและหมักน้ำอ้อยเป็นแอลกอฮอล์ได้ดีที่อุณหภูมิ 40° C หากทราบปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมก็จะเป็นประโยชน์อย่างยิ่ง จึงได้ทำการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของยีสต์ Y168 ซึ่งได้แก่ ความหวานเริ่มต้น พีเอช การเติมกล้าเชื้อยีสต์ การเติมรำ $(NH_4)_2.SO_4$, KH_2PO_4 และ $MgSO_4.7H_2O$ พบว่าในการหมักน้ำอ้อยเป็นแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อยีสต์ Y168 นี้ ที่อุณหภูมิ 40° C ความหวานเริ่มต้น 15 ดีกรีบริกซ์ (ปริมาณน้ำตาลอินเวอร์ท 15.32 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) พีเอชประมาณ 5-5.2 เติม KH_2PO_4 และ $MgSO_4.7H_2O$ ในอัตรา 0.04 และ 0.01 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ แล้วนำไปนึ่งที่อุณหภูมิ 70° C เป็นเวลา 5 นาที จึงเติมกล้าเชื้อยีสต์ (ซึ่งเลี้ยงในน้ำอ้อยที่มีความหวาน 15 ดีกรีบริกซ์ ที่อุณหภูมิ 40° C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง) ในอัตรา 1 โดยปริมาตร และหมักโดยการเขย่า 85 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40° C เป็นเวลา 68 ชั่วโมง จะได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูง 8.36 (โดยปริมาตร) และมีประสิทธิภาพในการหมัก 88.2

สาวิตรี ลิ่มทอง (2549) ได้ศึกษาความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพของยีสต์ การจัดจำแนกและวิธีการจัดจำแนกยีสต์ อนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลของยีสต์และไฟโลจีนี นิเวศวิทยาและความหลากหลายของยีสต์ และหลักการ วิธีการเก็บรักษายีสต์ ส่วนเรื่องที่เกี่ยวกับเทคโนโลยีชีวภาพของยีสต์ เป็นหลักการสำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ การปรับปรุงพันธุกรรมของยีสต์

อุตสาหกรรมให้มีประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์มีลักษณะที่เหมาะสมและดีในการใช้ในระดับอุตสาหกรรม ด้วยวิธีการกลายพันธุ์ โปรพลาสฟิวชันและรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอเทคโนโลยี

นฤมล และคณะ (2550) แยกยีสต์ทนร้อนจากผลไม้ ดอกไม้ ใบไม้ ดิน และผลปาล์มจำนวน 145 ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสามารถแยกยีสต์ทนร้อนได้ 70 ไอโซเลท มี 6ไอโซเลทที่เจริญญได้ดีในอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบการหมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครสพบยีสต์ 3 ไอโซเลท (MIY1 MIY48 และ MIY57) หมักน้ำตาลทั้งสองชนิดได้เอทานอลภายใน 24 ชั่งโมง เจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เมื่อคัดเลือกจากความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจากอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 15% ไฮโซเลท MIY57 ผลิตเอทานอลได้ 4.6% (v/v) นำยีสต์ MIY57 มาเลี้ยงเพื่อศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล พบว่ายีสต์ MIY57 ผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด 5.0 % (v/v) เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5% ในอาหารที่มีกลูโคส 15%, yeast extract 1%, pH เริ่มต้น 4.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่า *Saccharomyces cerevisiae* TISIR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ 3.7 % (v/v) และได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 7.2 กรัม/ลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง ในขณะที่ *Saccharomyces cerevisiae* TISIR 5048 ได้ 4.1 กรัม/ลิตร เมื่อจัดจำแนกยีสต์ MIY57 โดยใช้ลักษณะสัณานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางอนูชีววิทยา บ่งชี้ว่าเป็น *Saccharomyces cerevisiae*

อนุพงษ์ (2551) ศึกษาและคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดิน ดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้ จากป่าบริเวณเขื่อนจุฬาภรณ์ อำเภอคอนสาร จังหวัดชัยภูมิ จำนวน 57 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกยีสต์ได้ 59 ไอโซเลต โดยแยกได้จากตัวอย่างดิน 40 ไอโซเลต ตัวอย่างใบไม้ 3 ไอโซเลต ตัวอย่างผลไม้ 8 ไอโซเลต และตัวอย่างดอกไม้ 8 ไอโซเลต เมื่อศึกษาการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆพบว่าอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้คือที่ 42°C ซึ่งมี 3 ไอโซเลต แต่จะไม่สามารถเจริญได้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 42°C ขึ้นไป การศึกษาการเจริญที่ปริมาณเกลือความเข้มข้นต่างๆพบว่า ปริมาณ 15% เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ซึ่งมี 6 ไอโซเลต แต่ไม่สามารถเจริญได้ในปริมาณเกลือสูงกว่า 18% ขึ้นไป การทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยสลายสับสเตรท ได้แก่ Skim milk พบว่ามี 3 ไอโซเลต ที่สามารถย่อยได้โดย CHD-FW4 มีขนาดโซนใสกว้างที่สุดคือ 0.5 ซม., Soluble starch มี 7 ไอโซเลต แต่ย่อยได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น, Xylan มี 15 ไอโซเลต โดย CHD-S4-1-2 มีขนาดโซนใสกว้างที่สุด คือ 1.6 ซม., Carboxymethyl cellulose มี 10 ไอโซเลต โดย CHD-S4-1-2 มีขนาดโซนใสกว้างที่สุด คือ 1.6 ซม. สำหรับการสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสมี 28 ไอโซเลต โดย CHD-S2-1-2 มีขนาดของโซนเรื่องแสงเมื่อส่องดูภายใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลตมากที่สุดคือ 2.0 ซม. การศึกษาความสามารถในการผลิตแอลกอฮอร์คัดเลือกยีสต์ที่มีลักษณะเด่น 9 ไอโซเลท หมักในอาหาร 20% glucose YM broth บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตแอลกอฮอร์ได้สูงที่สุด คือ CHD-S1-1 ผลิตได้ 5.86% v/v แต่อย่างไรก็ตามยังคงผลิตได้น้อยกว่า *Saccharomyces cereviciae Sweden* สามารถผลิตแอลกอฮอร์ได้ถึง 7.5%

ชาลิณีย์ (2552) ได้ศึกษาคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสและบีต้ากลูโคซิเดส จากเขื่อนอุบลรัตน์ จัดหวัดขอนแก่น ได้ทำการเก็บตัวอย่างดิน, ดอกไม้, ผลไม้ และใบไม้ทั้งหมด 70 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถคัดแยกยีสต์ยีสต์ได้ทั้งหมด 118 ไอโซเลต เมื่อนำมาศึกษาการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็ง Yeast extract Malt extract ที่มี 1% Carboxymethyl cellulose เป็นองค์ประกอบพบยีสต์จำนวน 30 ไอโซเลต มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เซลลูเลส เมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โดยเลี้ยงในอาหาร YPD ที่มี 1% Carboxymethyl cellulose เป็นองค์ประกอบ ไอโซเลต

109-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์แบบ intracellular สูงสุด คือ 162.13 U/ml และไอโซเลต S11-1 ผลิตเอนไซม์แบบ extracellular สูงสุด คือ 17.33 U/ml และเมื่อศึกษาความสามารถในการสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสบนอาหารแข็ง Yeast nitrogen base ที่มี 0.004%(w/v) MUG (4-methylumbelliferyl-β-D-glucoside) เป็นส่วนประกอบ พบยีสต์จำนวน 38 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส และเมื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์โดยเลี้ยงในอาหาร YPD พบไอโซเลต F14-2 มีกิจกรรมของเอนไซม์แบบ intracellular สูงสุดคือ 1.63 U/ml และไอโซเลต 203-1 มีกิจกรรมของเอนไซม์แบบ extracellular สูงสุดคือ 3.40 U/ml

Limtong *et al*. (1986) แยกยีสต์ทนเค็มจากตัวอย่างหลายประเภทในประเทศไทย เช่น อาหารหมักที่มีเกลือ เนื้อเค็นตากแห้ง และกากน้ำตาลโดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวน (enrichment technique) ด้วยอาหารกากน้ำตาลที่มีโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 17 เปอร์เซ็น บ่มที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ได้ยีสต์ทนเค็มทั้งหมด 413 ไอโซเลท และเมื่อศึกษาการทนเกลือของยีสต์ทนเค็มที่แยกได้พบว่ามีบางไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ในที่มีโซเดียมคลอไรด์ 23-24 เปอร์เซ็น (4.0 โมลาร์) ปัจจุบันการประยุกต์ใช้ยีสต์ทนเค็มส่วนใหญ่เป็นการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักเนื่องจากยีสต์ทนเค็มสามรถเจริญได้ในที่มี A_w ต่ำ

Suzuki *et al*. (1991) รายงานการแยก *Candida fragi* ซึ่งเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่จากผลสตอเบอรี่ที่เสียโดยการหมักจากตลาดในกรุงโตเกียว ประเทศญี่ปุ่น นอกจากนั้น Suzuki *et al*. (1991) แยก *Candid stellimalicola* ซึ่งเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่จากผลมะเฟืองในประเทศไทย

Reverdin *et al*. (1996) การศึกษานี้ถูกออกแบบมาเพื่อทดสอบผลของยีสต์ probiotic (*Saccharomyces cerevisiae* I - 1077) ที่ระดับสองของการให้ไนโตรเจนในน้ำนมช่วงต้น แสดงเป็น PDI (Protein truly Digestible in the small Intestine) ในระดับปกติของ 108 g PDI kg-1 DM (dry matter) เทียบกับระดับที่ต่ำ78 g PDI kg-1 DM (dry matter) การผลิตนมและองค์ประกอบในเลือดมียี่สิบแปดชนิดในผลิตภัณฑ์นมแพะได้รับอาหารที่สมบูรณ์ ในหญ้าแห้ง (25% dry matter) หญ้าหมักกากน้ำตาล (50%) และ สารประกอบอาหาร (25%) จะได้ยีสต์ที่ลดพลังงานและสมดุลไนโตรเจนในช่วง 6 สัปดาห์แรกหลังคลอดลูก ยีสต์เป็นตัวส่งเสริมการเพิ่มการผลิตกรดไขมันในนม ดังนั้น การแก้ไขการเพิ่มขึ้นของไขมันนมในผลผลิตจะต้องอยู่ในช่วงของการโภชนาการของสัตว์

Kurtzman and Robnett (1998) ทดสอบไฟโลจีนีโดยอาศัยบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA ยีน เป็นไปในทางเดียวกันกับต้นไม้วิวัฒนาการที่ได้จาก 18S rRNA ยีน จากการวิเคราะห์แสดงให้เห็นว่าลำดับเบสบริเวณ D1/D2 สามารถแยกวิวัฒนาการได้ดีกว่า 18S rRNA ยีน แต่ความสัมพันธุ์ของชนิดเมื่อใช้สองโมเลกุลค่อน้างเหมือนกัน เมื่อแขนงมีค่า boostrap สูง ข้อยกเว้นที่สำคัญคือ *Zygosaccharomyces mrakii* ซึ่งใกล้ *Zygosaccharomyces florentinus* ในต้นไม้ที่ได้จากบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA ยีน แต่อยู่ในกลุ่มของ *Torulaspora clade* ในต้นไม่จาก 18S rRNA ยีน

Kurtzman *et al*. (1998) เป็นการศึกษาและวิธีการจัดจำแนกยีสต์ซึ่งเป็นหนังสือมาตราฐานสำหรับอนุกรมวิธารสำหรับยีสต์ที่มีประโยชน์ในการจัดจำแนกยีสต์ถูกจำแนกประเภทโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี รวมทั้งเกณฑ์อนุกรมวิธานเคมีและอนุกรมวิธารระดับโมเลกุล

Fell *et al.* (2002) รายงานสปีชีส์ใหม่ของ *Sporobolomyces* คือ *Sporobolomyces ruverrimus* สปีชีส์นี้แยกได้จากสปีชีส์อื่นโดยลำดับเบสในบริเวณ D1/D2 และ ITS รวมทั้งสัณฐานวิทยา

Swangkeaw *et al*. (2008) ศึกษาการทำเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดสที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ของยีสต์ MDD24 ที่ทำให้บริสุทธิ์ ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเท่ากับ 657.86 ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีน และมีขนาดของโมเลกุล 43 กิโลดาลตัน เอนไซม์บริสุทธิ์บีต้ากลูโคซิเดส ของยีสต์ MDD24 ถูกยับยั้งการทำงานด้วยฟรัคโทสและซูโครส ในทำนองเดียวกันกลูโคสยับยั้งการทำงานของเอนไซม์แบบแข่งขันด้วยค่าคงที่ของการยับยั้งเท่ากับ 0.0026 โมลาร์ ส่วนเอทานอลมีผลในการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ พีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์คือ 4.5 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ถึงแม้ว่าที่สภาวะของการหมักไวน์ (พีเอช 3.5 และ 20 องศาเซลเซียส) กิจกรรมของเอนไซม์มีเพียงประมาณร้อยละ 40 ของกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์มีความคงตัวที่พีเอชและอุณหภูมิดังกล่าว จากคุณลักษณะต่างๆของเอนไซม์ที่ตรวจสอบข้างต้นสรุปได้ว่าสามารถนำเอนไซม์ที่ผลิตได้จาก *P.anomala* MDD24 ไปใช้ในการเพิ่มโมโนเทอร์ปีนในไวน์ได้

Giovanna *et al*. (2009) การปล่อย polysaccharide ระหว่างการหมักเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์โดยตรวจสอบสามขนิดของ *Saccharomyces cerevisiae* ในการทดลองหมักดำเนินการที่สองอุณหภูมิ (25°C และ 32 °C) และสามคือ ความเข้มข้นน้ำตาล (20%, 23.5% และ 27%) มีหรือไม่มีอาหารยีสต์เพื่อเร่งการหมักน้ำองุ่น diammonium phosphate (DAP) หรือ microcrystalline cellulose ในสองสายพันธุ์ยีสต์จะปล่อย polysaccharides เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยในการหมักที่อุณหภูมิและความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้นในน้ำองุ่นนั้น จะปล่อย polysaccharide แล้วเซลล์มีการทำงานได้น้อยลงและน้อยกว่าแบบ metabolically ในสามสายพันธุ์ที่เฉลี่ยจำนวน polysaccharides ลดลง อย่างมากที่ 32 ° C มีน้ำตาล 27% และเพิ่มขึ้นในน้ำองุ่นที่มีการส่งเสริม DAP ดังนั้นสายพันธุ์นี้จะปล่อย polysaccharides มากขึ้นและเซลล์ยีสต์มีการทำงาน ได้มากขึ้น จากผลแนะนำให้สายพันธุ์ยีสต์ในการปล่อย polysaccharides ในผนังเซลล์โดยผ่านกลไกอื่นและโดยการปล่อย polysaccharide จะแตกต่างกันระหว่างสายพันธุ์

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การคัดแยกยีสต์ที่แยกได้จากเขื่อนสิรินธร

การเก็บตัวอย่างสุ่มเก็บตัวอย่างดิน ผลไม้ ใบไม้ และดอกไม้จากบริเวณภายในป่าเขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี โดยแบ่งเส้นทางคือ 3 เส้นทาง 4 แปลงในการเก็บตัวอย่างจะต้องเก็บอย่างน้อย 2 ครั้ง และเก็บอย่างน้อย 40 ตัวอย่าง ชั่งตัวอย่าง ดิน ดอกไม้ ผลไม้ และใบไม้ จำนวน 25 กรัม ใส่ในอาหาร Yeast extract malt extract both (YM both) พีเอช 5.0 ปริมาณ 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน จากนั้นแยกยีสต์นำเชื้อด้วยวิธี cross streak บนอาหาร YM agar plate (ที่ผสมยาปฏิชีวนะคลอแรมฟินิคอล ความเข้มข้น 0.05%)

คัดเลือกยีสต์ที่เป็นโคโลนีเดี่ยวและมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมา cross streak บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน ทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้วิธี cross streak บนอาหาร YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน เก็บเชื้อบริสุทธิ์ในอาหาร YM agar slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ใช้เป็น stock culture เพื่อนำไปศึกษาคุณสมบัติต่อไป

3.2 การศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ที่แยกได้จากเขื่อนสิรินธร

3.2.1 การทดสอบประสิทธิภาพการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

Cross streak ยีสต์ที่แยกได้จากข้อ 3.1 ลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงทำเป็น suspension โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 5 มิลลิลตร จากนั้นใช้ pasture pipette ดูดตัวอย่าง suspension เชื้อยีสต์ โดยหยดเชื้อลง 1 หยด ลงในอาหาร YM broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ตามลำดับ บันทึกผลทุกๆ วันโดยสังเกตการเจริญ เป็นเวลา 7 วัน

3.2.2 การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 30, 50, 60 และ 70 %

Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง จากนั้น Simple streak เชื้อที่ทำการกล้าไว้ลงใน YM agar plate ที่มีน้ำตาล 30, 50, 60, 70 และ 80% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน บันทึกผลทุกๆวันโดยสังเกตการเจริญ เป็นเวลา 7 วัน

3.2.3 การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของเกลือ 3, 5, 10, 15 และ 20%

Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง จากนั้น Simple streak เชื้อลง YM agar plateที่ความเข้มข้นของเกลือ 3, 5, 10, 15 และ 20% บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน บันทึกผลทุกๆ วันโดยสังเกตการเจริญ เป็นเวลา 7 วัน

3.3 การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสับสเตรท

3.3.1 การย่อยโปรตีน

Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง จากนั้น Point inoculation เชื้อลง YM agar plate ที่ผสม 1% Skim milk บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน ตรวจผลการย่อยโปรตีน เชื้อที่สามารถย่อยได้จะสร้างโซนใส (clear zone) รอบๆโคโลนี

3.3.2 การย่อยแป้ง

Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง จากนั้น Point inoculation เชื้อลง YM agar plate ที่ผสม 1% soluble starch บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน ตรวจผลความสามารถในการย่อยแป้ง โดยวางเกล็ดไดโอดีนลงบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อให้โคโลนีอยู่เหนือเกล็ดไอโอดีนทิ้งไว้ 10-20 นาที ไอโอดีนจะเข้าทำปฏิกิริยากับแป้งในอาหารทำให้เกิดสีน้ำเงิน เชื้อที่สามารถย่อยแป้งได้จะเกิดโซนใสรอบๆโคโลนี

3.3.3 การย่อย Xylan

Cross streak เชื้อลง YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24- 48 ชั่วโมง จากนั้น Point inoculation เชื้อลง YM agar plate ที่ผสม 1% Oat spelt xylan บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 7 วัน ตรวจผลความสามารถในการใช้ไซแลนเป็นสับสเทรต โดยใช้ congo red ราดลงจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการ Point inoculation ของเชื้อสังเกตโซนใส (Clear zone) รอบโคโลนี

3.3.4 การย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

ทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสยีสต์ จาก stock มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหา YM agar plate เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้น point inoculation เชื้อลงบนอาหาร CMC agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส โดยราด congo red ลงบริเวณผิวหน้าอาหารที่มีเชื้ออยู่ ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที จากนั้นดูโซนใสที่เกิดขึ้น ยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้ จะเห็นโซนใส รอบๆ โคโลนีวัดขนาดโซนใส และขนาดของเซลล์ยีสต์

3.3.5 การย่อย 4-methylumbelliferyl- β-glucoside

ทดสอบการย่อย 4-methylumbelliferyl- β-glucoside นำเชื้อยีสต์จาก YM slant stock มา streak บนอาหาร YM agar plate บ่มที่ 30° C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้น point inoculation เชื้อลงบนอาหาร Yeast Nitrogen Base ที่ไม่มี amino acids (YNB) agar plate ที่มี 0.004% (w/v) MUG (4-methylumbelliferyl- β-glucoside) บ่มที่อุณหภูมิ 30° C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการย่อย 4-methylumbelliferyl- β-glucoside โดยส่องดูภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต บันทึกผล วัดขนาดโซนของแสง และขนาดของเซลล์

3.4 การจัดจำแนกประเภทยีสต์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2

3.4.1 การสกัดดีเอนเอ

เขี่ยเชื้อที่เป็นเซลล์ยีสต์มาละลายใน lysis buffer 200 ไมโครลิตร ต้มในน้ำเดือด 15 นาที เติม 2.5M Potassiumacetate pH 7.5 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและแช่ในน้ำแข็ง 1 ช.ม นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13000 rpm 5 นาที 4 องศาเซลเซียส จากนั้นก็ดูดส่วนใสมาใส่ในหลอดอันใหม่ เติม $CHCl_3$-isoamylalchol (24:1) 1 เท่าของสารละลาย ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยง 13000 rpm 5 นาที 4 องศาเซลเซียส จากนั้นก็ดูดส่วนใสมาใส่ใน eppendrof อันใหม่ เติม 1 เท่าของ cold-isopropanal ผสมให้เข้ากันและแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส 20 นาทีและ ต่อจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 14500 rpm 16 นาที และจากนั้นนำส่วนใสทิ้งไป ล้างตะกอนดีเอนเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยงที่ 14500 rpm 5 นาที และ เอทานอล 95เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำให้ตะกอนดีเอนเอ แห้ง จากนั้นเติมน้ำ (sterilized nanopure water) 20-30 ไมโครลิตร จากนั้นเก็บที่ -20 องศาเซลเซียส

3.4.2 ขั้นตอนการหาความเข้มข้นของ DNA ที่เหมาะสม

การเตรียมสารสำหรับ PCR (100 ไมโครลิตร)

10X Taq buffer	10.0	ไมโครลิตร
MgCl2 (25mM)	8.0	ไมโครลิตร
dNTP mixture (2.5 mM)	8.0	ไมโครลิตร
Primer : F63 (10 pM)	3.0	ไมโครลิตร
: LR3 (10 pM)	3.0	ไมโครลิตร
Sterilized nano pure water	57.5	ไมโครลิตร
Taq Polymerase (5U / µl)	0.5	ไมโครลิตร

ผสม Reaction mixture ให้เข้ากันและใส่ใน PCR 9 ไมโครลิตร เติมดีเอนเอ 1 ไมโครลิตร ต่อหลอด สำหรับการหาความเข้มข้นของดีเอนเอที่เหมาะสมผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นโดยใช้เวลาสั้นๆ จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR ที่ 30 รอบ ตรวจสอบผลด้วย Gel electrophoresis หยดสารละลายสี 1.3 ไมโครลิตร ลงในแผ่นพาราฟิล์ม เติมตัวอย่างที่เข้าเครื่อง PCR แล้ว 3 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายดีเอนเอ ลงใน agarose gel Run gel โดยใช้ 100 โวลต์ 35 นาที

3.4.3 การเพิ่มจำนวนดีเอนเอ บริเวณ D1/D2 ของ 26s rDNA

การเตรียมสารสำหรับ PCR (100 ไมโครลิตรl)

10X Taq buffer	10.0	ไมโครลิตร
$MgCl_2$ (25mM)	8.0	ไมโครลิตร
dNTP mixture (2.5 mM)	8.0	ไมโครลิตร
Primer : F63 (10 pM)	3.0	ไมโครลิตร
: LR3 (10 pM)	3.0	ไมโครลิตร
Sterilized nano pure water	57.5	ไมโครลิตร
Taq Polymerase (5U / µl)	0.5	ไมโครลิตร

ผสม Reaction mixture ให้เข้ากันและใส่ใน PCR 90 ไมโครลิตร เติมดีเอนเอ 10 ไมโครลิตรต่อหลอดจากนั้นเมื่อเข้าเครื่อง PCR แล้วนำไป gel electrophoresis

3.4.4 การทำดีเอนเอของผลผลิตของ PCR ให้บริสุทธิ์

1. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

นำดีเอนเอ จาก PCR product 100 µl ใส่ใน microcentrifuge tube อันใหม่ เติม DF buffer ปริมาตร 5 เท่าของดีเอนเอ ตัวอย่าง และผสมให้เข้ากัน

2. ขั้นตอนการจับกันของดีเอนเอ

ดูดสาร DF buffer และเติมดีเอนเอ ลงใน DF column ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 30 วินาที ดึง DF column ออก และเทสารที่อยู่ข้างล่างทิ้งไป

3. ขั้นตอนการล้าง

เติมบัปเฟอร์ที่เติม ethanol 600 µl ลงในตรงกลางของ DF column ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 30 วินาที เทสารทิ้งอีกที ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 3 นาที

3.4.5 การชะดีเอนเอ

ย้ายคอลัมน์ไปบน หลอด microcentrifuge เติม Elution buffer หรือน้ำ 15-50 ไมโครลิตร ลงตรงกลางของ column ตั้งทิ้งไว้ 2นาที เพื่อละลายดีเอนเอบนเมมเบรน ปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 rpm 2 นาที

3.4.6 Gel electrophoresis

การเตรียม Agarose 0.8 เปอร์เซ็นต์ Agarose ผสมใน 1X TAE buffer (50X TAE buffer : Tris base 242 กรัม glacial acetic acid 57.1 มิลลิลิตร Na_2EDTA 37.2 กรัม) หยดสารละลายสี 1.3 ไมโครลิตร ลงในแผ่นพาราฟิล์ม เติมตัวอย่างที่เข้าเครื่อง PCR แล้ว 3 ไมโครลิตร และผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายดีเอนเอลงในเจล agarose Run gel โดยใช้ 100 โวลต์ 35 นาที

3.4.7 Sequencing reaction โดยวิธี PCR

การเตรียมสารสำหรับ Sequencing reaction

Primer F63 (5' – GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG- 3')

5X buffer	1.0	ไมโครลิตร
BigDye	2.0	ไมโครลิตร
Primer F63 (1.6 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
Sterilized nanopure water	.....	ไมโครลิตร
	(ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 µl)	
DNA template	1-3	ไมโครลิตร

Primer LR3 (5' – GGTCCGTGTTTCAAGACG- 3')

5X buffer	1.0	ไมโครลิตร
BigDye	2.0	ไมโครลิตร
Primer LR3 (1.6 pmol)	1.0	ไมโครลิตร
Sterilized nanopure water	...	ไมโครลิตร
	(ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ไมโครลิตร)	
DNA template	1-3	ไมโครลิตร

ผสมให้เข้ากันและใส่ใน PCR 7- 9 µl เติมดีเอนเอ 1-3 ไมโครลิตรต่อหลอด สำหรับการหาความเข้มข้นของดีเอนเอที่เหมาะสมผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นโดยใช้เวลาสั้นๆจากนั้นนำไปเข้าเครื่อง PCR ที่ 25 รอบ

4.4.8 การเตรียมดีเอนเอหลังจาก sequencing

เมื่อนำดีเอนเอ เข้าเครื่อง PCR แล้วย้ายลงใส่หลอดอันใหม่ เติม ethanol-acetate solution 80 ไมโครลิตร สำหรับตัวอย่าง 10-20 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที เพื่อให้มีการรวมตัวกันของดีเอนเอ นำหลอดไปปั่นที่ 15,00 rp 20 นาที ค่อยๆดูดสารที่เป็นส่วนใสทิ้งไป เติม 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล 250 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นที่15,000 rpm 5 นาที ดูดสารที่เป็นส่วนใสทิ้งไป ทำให้ดีเอนเอแห้งโดยใช้ heat box ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 1 นาที เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปวิเคราะห์โดย Automate DNA Sequncer วิเคราะห์ sequences เทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยวิธี BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ที่แยกได้จากเขื่อนสิรินธร

4.1.1 การเก็บตัวอย่างและคัดแยกยีสต์

การเก็บตัวอย่างจากเขื่อนสิรินธร จังหวัดอุบลราชธานี จะแบ่งการสำรวจออกเป็น 3 เส้นทาง โดยเลือกเก็บตัวอย่างผลไม้ ใบไม้ ดอกไม้ และ ตัวอย่างดิน เพื่อนำมาแยกยีสต์ ตัวอย่างทั้งหมดมี 70 ตัวอย่าง ดังตารางที่แสดงข้างล่าง

ตารางที่ 4.1 ชนิดและจำนวนตัวอย่าง

เส้นทาง	ชนิดตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
เส้นทางที่ 1	ผลไม้	มะเหลื่อม , พุทรา , หนามคอม , สะคาง , องุ่นป่า , กะบก	6
	ดอกไม้	ดอกงิ้ว , ดอก Unknow , บุก , ดอก Unknow 3 , กระถินณรงค์ , รังใบใหญ่ , ไมยราบ , ดาวกระจาย	8
	ใบไม้	ใบชาด , ใบแต้	2
	ดิน	ดินใต้ต้นมะรุม , ดินต้นทางเส้น 1 , ดินปลายทางเส้น 1	3
เส้นทางที่ 2	ผลไม้	มะกอก , จานเครือ , มะม่วง , ไค้น้ำ 1 , เหมือดแอ่ , หมากหวด , กะเบา , เหมือดคน , หมากแสง	9
	ดอกไม้	มะดูก , ดอกนมสาว , ดอกขี้เหล็ก , เอื้องหมายนา , ดอกเปราะ , ดอก Unknow 5 , มันปลา , ผักอีทก , หนามคอม , ดอกมัน , ต้างไก้ , กระเจียวลาย , ผักลิ้นหมา	13
	ใบไม้	ใบ Unknow 1 , ใบแสง , ใบติ้ว	3
	ดิน	ดินใต้ต้นยาง , ดินใต้ต้นขาอึ่ง , ดินใต้ต้นติ้ว , ดินใต้ต้นมะรุม , ดินเส้นทางที่ 2 , ดินต้นทางเส้น 2 , ดินกลางทางเส้น 2 , ดินปลายทางเส้น 2	8

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) ชนิดและจำนวนตัวอย่าง

เส้นทาง	ชนิดตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง
เส้นทางที่ 3	ผลไม้	ผล Unknow 1 , ผล Unknow 1 , ผลชะมวง , ผล Unknow 6 , โกธา , กะเบา , หมากเม่าป่า	7

	ดอกไม้	ดอกโทงเทง , ดอกแคป่า , ดอก Unknow 4 , ดอกพุด , ขิงป่า , ดอก Unknow 6	6
	ใบไม้	ใบ Unknow 2 , ใบไม้ทางเข้า	2
	ดิน	ดินใต้ต้นเปลือย , ดินใต้ต้นบก , ดินใต้ต้นไผ่	3

4.1.2 การคัดแยกยีสต์จากตัวอย่าง

เมื่อนำตัวอย่างจำนวน 70 ตัวอย่าง มาคัดแยกยีสต์โดยเพาะเลี้ยงบนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-2 วัน สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 97 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างผลไม้ 34 ไอโซเลต ดอกไม้ 36 ไอโซเลต ใบไม้ 9 ไอโซเลตและดิน 18 ไอโซเลต

ตารางที่ 4.2 จำนวนยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่าง

เส้นทาง	ชนิดตัวอย่าง	ชื่อตัวอย่าง	รหัสไอโซเลท	จำนวนตัวอย่าง
เส้นทางที่ 1	ผลไม้	มะเหลื่อม พุทรา หนามคอม สะคาง องุ่นป่า กะบก	SF 1-1, SF 1-2, SF 23 SF 4 SF 14-1, SF 14-2 SF 15 SF 16 SF 22-1, SF 22-2	10
	ดอกไม้	ดอกงิ้ว ดอก Unknow บุก ดอก Unk 3 กระถินณรงค์ รังใบใหญ่ ไมยราบ ดาวกระจาย	SFL 2 SFL3-1, SFL3-2 SFL 4-1, SFL 4-2 SFL 8 SFL 9-1, SFL 9-2 SFL 14-1, SFL 14-2 SFL 19 SFL 27	12
	ใบไม้	ใบชาด ใบแต้	SL 3 SL 4	2
	ดิน	ดินใต้ต้นมะรุม ดินต้นทางเส้น 1 ดินปลายทางเส้น 1	SS 6 SS 11 SS 13-1, SS 13-2	4
เส้นทางที่ 2	ผลไม้	มะกอก จานเครือ มะม่วง ไค้น้ำ 1	SF 2 SF 5 SF 6-1, SF 6-2, SF 6-3, SF 6-4 SF 9-1, SF 9-2	15

		เหมือดแอ่	SF 10-1, SF 10-2	
		หมากหวด	SF 11	
		กะเบา	SF 17	
		เหมือดคน	SF 20	
		มะกอก	SF 21	
		หมากแสง	SF 24	
	ดอกไม้	มะดูก	SFL 5	15
		ดอกนมสาว	SFL 6	
		ดอกขี้เหล็ก	SFL 11	
		เอื้องหมายนา	SFL 12	
		ดอกเปราะ	SFL 13	
		ดอก Unk 5	SFL 15	
		มันปลา	SFL 17	
		ผักอีทก	SFL 18	
		หนามคอม	SFL 20-1, SFL 20-2	
		ดอกมัน	SFL 21	
		ต้างไก้	SFL 22	
		กระเจียวลาย	SFL 24	
		ผักลิ้นหมา	SFL 25-1, SFL 25-2	
	ใบไม้	ใบ Unknow 1	SL 1	4
		ใบแสง	SL 2	
		ใบติ้ว	SL 6-1, SL 6-2	
	ดิน	ดินใต้ต้นยาง	SS 1	11
		ดินใต้ต้นขาอึ่ง	SS 2-1, SS 2-2	
		ดินใต้ต้นติ้ว	SS 5	
		ดินใต้ต้นมะรุม	SS 6	
		ดินเส้นทางที่ 2	SS 7	
		ดินต้นทางเส้น 2	SS 8	
		ดินกลางทางเส้น 2	SS 9	
		ดินปลายทางเส้น 2	SS 10-1, SS 10-2, SS 10-3	
เส้นทางที่ 3	ผลไม้	ผล Unknow 1	SF 3	8
		ผล Unknow 1	SF 7-1, SF 7-2	
		ผลชะมวง	SF 8-1, SF 8-2	
		ผล Unknow 6	SF 12	
		โกธา	SF 13	
		หมากเม่าป่า	SF 19	

	ดอกไม้	ดอกโทงเทง ดอกแคป่า ดอก Unknow 4 ดอกพุด ขิงป่า ดอก Unknow 6	SFL 1 SFL 7-1, SFL 7-2 SFL 10 SFL 16-1, SFL 16-2 SFL 23-1, SFL 23-2 SFL 26	9
	ใบไม้	ใบ Unknow 2 ใบไม้ทางเข้า	SL 5 SL 7-1, SL 7-2	3
	ดิน	ดินใต้ต้นเปลือย ดินใต้ต้นบก ดินใต้ต้นไผ่	SS 3 SS 4 SS 12, SS 13	4
จำนวนทั้งสิ้น				97

ใบชะมวง

ดอกเหมือดแอ่

ดอกเอื้องหมายนา **ผลองุ่นป่า**

ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างใบไม้ ดอกไม้และผลไม้จากเขื่อนสิรินธร

4.2. ผลการศึกษาคุณสมบัติของยีสต์

4.2.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการเจริญของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ

เมื่อทดสอบคุณลักษณะของยีสต์ที่แยกได้โดยบ่มเชื้ออุณหภูมิ 25-50°C พบว่ายีสต์ส่วนมากเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-45°C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์จะอยู่ในช่วง 30-35°C แต่อย่างไรก็ตามไอโซเลต SF 2, SFL 20-1, SF 1-2 สามารถเจริญได้ที่ 50°C (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
1	SS 5	2+	3+	3+	1+	0	0
2	SS 10-1	2+	3+	3+	1+	1+	0
3	SF 9-2	1+	3+	3+	2+	0	0
4	SF 3	1+	2+	3+	1+	0	0
5	SF 22-2	1+	3+	3+	2+	1+	0
6	SF 8-2	1+	2+	3+	1+	1+	0
7	SF 2	1+	2+	2+	3+	1+	1+
8	SFL 20-1	1+	2+	3+	3+	1+	1+
9	SF 1-2	1+	3+	3+	3+	1+	1+
10	SS12-1	1+	3+	3+	1+	0	0
11	SFL 25-2	1+	3+	3+	0	0	0
12	SFL 16-1	2+	3+	3+	0	0	0
13	SS 10-3	2+	3+	3+	0	0	0
14	SS11	0	2+	3+	1+	0	0
15	SF 6-2	1+	3+	2+	0	0	0
16	SFL 15	1+	3+	3+	1+	0	0
17	SF 9-1	1+	3+	2+	0	0	0
18	SFL 20-2	1+	3+	3+	0	0	0
19	SFL 18	2+	3+	3+	1+	0	0
20	SS 13-1	1+	3+	3+	1+	0	0

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
21	SF 4	2+	3+	3+	1+	0	0
22	SS 6	1+	3+	3+	1+	0	0

23	SS 13-2	1+	3+	3+	0	0	0
24	SFL 27	2+	3+	3+	1+	0	0
25	SFL 14-2	1+	3+	3+	2+	2+	0
26	SFL 12	1+	3+	2+	1+	0	0
27	SFL 4-1	1+	3+	3+	1+	0	0
28	SFL 5	1+	2+	3+	1+	0	0
29	SFL 21	0	2+	3+	1+	1+	0
30	SFL 24	1+	3+	2+	1+	0	0
31	SL 7-2	0	3+	2+	1+	1+	0
32	SF 24	2+	3+	3+	2+	1+	0
33	SL 3	1+	3+	2+	1+	1+	0
34	SFL 23-2	1+	3+	2+	2+	0	0
35	SL 4	2+	3+	3+	2+	0	0
36	SFL 4-2	1+	3+	3+	2+	0	0
37	SL 5	2+	3+	2+	1+	0	0
38	SFL 2	1+	3+	2+	1+	0	0
39	SFL 3-2	1+	2+	2+	1+	0	0
40	SFL 22	1+	3+	3+	0	0	0
41	SFL 6	0	2+	3+	0	0	0
42	SL 7-1	0	2+	3+	1+	0	0
43	SFL 9-1	1+	3+	1+	0	0	0
44	SFL 7-1	0	2+	1+	1+	0	0
45	SF 17	2+	3+	3+	2+	0	0
46	SFL 25-1	2+	3+	2+	2+	1+	0
47	SF 11	3+	3+	3+	2+	0	0

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
48	SF 13	2+	3+	2+	1+	1+	0
49	SF 1-1	2+	3+	2+	2+	0	0
50	SF 6-4	2+	3+	3+	2+	1+	0
51	SF 5	2+	3+	3+	2+	1+	0
52	SF 6-1	1+	3+	1+	2+	0	0
53	SF 10-2	2+	3+	3+	2+	0	0
54	SF 15	1+	3+	3+	2+	0	0

55	SL 6-2	1+	3+	3+	2+	0	0
56	SFL 11	3+	3+	3+	1+	0	0
57	SL 2	3+	3+	3+	2+	0	0
58	SF 10-1	2+	3+	2+	1+	0	0
59	SF 6-3	1+	3+	3+	2+	0	0
60	SF 7-2	2+	3+	2+	1+	0	0
61	SF 14-1	2+	3+	2+	1+	0	0
62	SF 23	2+	3+	2+	1+	0	0
63	SF 21	2+	3+	3+	1+	0	0
64	SF 20	2+	3+	2+	1+	0	0
65	SFL 14-1	2+	3+	2+	1+	0	0
66	SF 22-1	1+	3+	2+	1+	0	0
67	SFL 19	1+	2+	2+	0	0	0
68	SS 2-1	2+	3+	2+	1+	0	0
69	SF 14-2	2+	3+	2+	1+	0	0
70	SF12	1+	3+	2+	1+	0	0
71	SS 7	1+	2+	3+	1+	0	0
72	SF 16	2+	3+	2+	1+	0	0
73	SFL 1	1+	3+	3+	1+	0	0
74	SS 9	1+	3+	2+	1+	0	0

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	25°C	30°C	35°C	40°C	45°C	50°C
75	SFL 8	1+	3+	2+	1+	0	0
76	SFL 16-2	1+	3+	2+	0	0	0
77	SF 19	1+	3+	2+	0	0	0
78	SS 8	1+	3+	2+	1+	0	0
79	SFL 7-2	1+	3+	3+	0	0	0
80	SFL 17	1+	3+	2+	0	0	0
81	SFL 13	1+	3+	3+	0	0	0
82	SF 7-1	1+	3+	2+	1+	0	0
83	SS 1	1+	3+	3+	1+	0	0
84	SF 8-1	1+	3+	2+	0	0	0
85	SS 4	2+	3+	3+	1+	0	0

86	SFL 3-1	1+	3+	2+	1+	0	0
87	SF 18	2+	3+	3+	1+	0	0
88	SFL 10	1+	3+	3+	1+	0	0
89	SL 1	2+	3+	3+	1+	0	0
90	SFL 9-2	2+	3+	2+	0	0	0
91	SS 12-2	0	3+	3+	1+	0	0
92	SFL 23-1	3+	3+	3+	1+	0	0
93	SS 10-2	3+	3+	3+	1+	0	0
94	SFL 26	1+	3+	3+	1+	0	0
95	SL 6-1	3+	3+	3+	1+	0	0
96	SS 2-2	3+	3+	3+	1+	0	0
97	SS 3	2+	3+	3+	1+	0	0

4.2.2 การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 30, 50, 60 และ 70 %

เมื่อทดสอบคุณลักษณะของยีสต์ที่แยกได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นตั้งแต่ 30-70 % (w/v) พบว่ายีสต์ส่วนมากเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 30 % โดยยีสต์จำนวน 17 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต SF 10-1, SF 10-2, SF 11, SF 1-2, SF 14-1, SF 14-2, SF 3, SF 4, SF 6-3, SF 7-1, SFL 18, SFL 23-1, SFL 3-2, SFL 4-2, SL 2, SL 4 และ SS 13-2 สามารถได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 70 % แต่อย่างไรก็ตามมีเชื้อจำนวน 11 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต SF 23, SF 8-2, SF 9-1, SFL 10, SFL 2, SL 7-1, SL 7-2, SS 12-1, SS 12-2, SS 13-1 และ SS 9 ไม่สามารถเจริญได้ในเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นตั้งแต่ 30-70 % (w/v) (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	30% glucose	50% glucose	60% glucose	70% glucose
1	SF 10-1	3+	2+	2+	1+
2	SF 10-2	3+	2+	2+	1+
3	SF 11	3+	2+	1+	1+
4	SF 1-1	3+	2+	0	0
5	SF 12	3+	1+	0	0
6	SF 1-2	3+	2+	1+	1+
7	SF 13	3+	1+	0	0

8	SF 14-1	3+	2+	1+	1+
9	SF 14-2	3+	2+	1+	1+
10	SF 15	2+	1+	1+	0
11	SF 17	2+	0	0	0
12	SF 18	2+	0	0	0
13	SF 19	1+	0	0	0
14	SF 2	3+	2+	0	0
15	SF 23	0	0	0	0
16	SF 24	1+	1+	0	0
17	SF 3	3+	2+	2+	2+
18	SF 4	3+	2+	1+	1+

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	30% glucose	50% glucose	60% glucose	70% glucose
19	SF 5	2+	1+	0	0
20	SF 6-1	2+	1+	0	0
21	SF 6-2	2+	1+	0	0
22	SF 6-3	2+	2+	1+	1+
23	SF 6-4	3+	2+	1+	0
24	SF 7-1	3+	2+	1+	1+
25	SF 7-2	2+	1+	0	0
26	SF 8-1	2+	1+	0	0
27	SF 8-2	0	0	0	0
28	SF 9-1	0	0	0	0
29	SF 9-2	3+	2+	1+	0
30	SFL 1	1+	1+	0	0
31	SFL 10	0	0	0	0
32	SFL 11	2+	1+	1+	0
33	SFL 12	2+	1+	1+	0
34	SFL 13	2+	1+	1+	0
35	SFL 14-2	3+	1+	1+	0
36	SFL 15	1+	0	0	0
37	SFL 16-1	2+	1+	1+	0
38	SFL 16-2	1+	0	0	0
39	SFL 18	3+	1+	1+	1+

40	SFL 19	2+	0	0	0
41	SFL 2	0	0	0	0
42	SFL 20	2+	0	0	0
43	SFL 20-1	2+	1+	1+	0
44	SFL 20-2	2+	2+	2+	0
45	SFL 21	2+	0	0	0

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	30% glucose	50% glucose	60% glucose	70% glucose
46	SFL 25-2	1+	0	0	0
47	SFL 22	2+	1+	1+	0
48	SFL 26	2+	0	0	0
49	SFL 23-1	2+	1+	1+	1+
50	SFL 23-2	2+	1+	1+	0
51	SFL 24	2+	1+	0	0
52	SFL 25-1	2+	1+	0	0
53	SFL 27	3+	2+	1+	0
54	SFL 3-1	1+	1+	0	0
55	SFL 3-2	2+	2+	1+	1+
56	SFL 4-2	3+	2+	2+	1+
57	SFL 5	3+	0	1+	0
58	SFL 7-1	2+	0	0	0
59	SFL 9-1	3+	0	0	0
60	SFL 9-2	3+	1+	0	0
61	SL 1	3+	2+	1+	0
62	SL 2	3+	2+	1+	1+
63	SL 4	3+	2+	1+	1+
64	SL 5	3+	2+	1+	0
65	SL 7-1	0	0	0	0
66	SL 7-2	0	0	0	0
67	SS 10-1	2+	0	0	0
68	SS 10-2	3+	0	0	0
69	SS 10-3	2+	0	0	0
70	SS 11	3+	1+	0	0
71	SS 12-1	0	0	0	0

ตารางที่ 4.4 (ต่อ) การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	30% glucose	50% glucose	60% glucose	70% glucose
72	SS 12-2	0	0	0	0
73	SS 13-1	0	0	0	0
74	SS 13-2	2+	2+	1+	1+
75	SS 2-1	1+	1+	0	0
76	SS 2-2	1+	0	0	0
77	SS 3	1+	0	0	0
78	SS 4	3+	2+	1+	0
79	SS 6	3+	0	0	0
80	SS 8	3+	2+	0	0
81	SS 7	2+	2+	1+	0
82	SS 9	0	0	0	0
83	SS 10-1	1+	2+	1+	0
84	SS 10-2	1+	1+	0	0
85	SS10-3	1+	2+	1+	0
86	SF22-1	1+	1+	0	0
87	SF 22-2	1+	1+	0	0
88	SFL 4-1	1+	1+	1+	0
89	SFL 7-2	1+	2+	0	0
90	SFL 8	1+	1+	0	0
91	SFL 14-1	2+	1+	0	0
92	SFL 17	1+	1+	0	0
93	SL 3	2+	2+	1+	0
94	SL 6-1	2+	1+	0	0
95	SL 6-2	2+	1+	0	0
96	SS 1	1+	2+	0	0
97	SS 8	1+	2+	1+	0

4.2.3 การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของเกลือ 3, 5, 10, 15 และ 20 %

เมื่อทดสอบคุณลักษณะของยีสต์ที่แยกได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเกลือ (NaCl) ตั้งแต่ 3-20 % (w/v) พบว่ายีสต์ส่วนมากเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3% NaCl แต่อย่างไรก็ตามยีสต์ทุกไอโซเลต ไม่สามารถเจริญได้ในเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 15-20 % NaCl (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของเกลือความเข้มข้นต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	3% NaCl	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	20% NaCl
1	SF 10-1	1+	2+	1+	0	0
2	SF 10-2	1+	2+	1+	0	0
3	SF 11	1+	1+	1+	0	0
4	SF 1-1	1+	1+	1+	0	0
5	SF 12	1+	1+	1+	0	0
6	SF 1-2	1+	1+	1+	0	0
7	SF 13	1+	1+	1+	0	0
8	SF 14-1	1+	2+	2+	0	0
9	SF 14-2	3+	2+	2+	0	0
10	SF 15	3+	2+	2+	0	0
11	SF 16	3+	2+	2+	0	0
12	SF 17	3+	2+	0	0	0
13	SF 18	3+	2+	1+	0	0
14	SF 19	3+	2+	0	0	0
15	SF 2	1+	0	0	0	0
16	SF 20	3+	2+	1+	0	0
17	SF 21	3+	2+	0	0	0
18	SF 22-1	2+	1+	0	0	0
19	SF 22-2	2+	2+	0	0	0
20	SF 23	2+	1+	0	0	0
21	SF 24	2+	2+	0	0	0
22	SF 3	1+	1+	1+	0	0
23	SF 4	1+	1+	1+	0	0

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของเกลือความเข้มข้นต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	3% NaCl	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	20% NaCl
24	SF 5	1+	1+	1+	0	0
25	SF 6-1	1+	1+	1+	0	0
26	SF 6-2	1+	1+	1+	0	0
27	SF 6-3	1+	1+	1+	0	0
28	SF 6-4	1+	1+	1+	0	0

29	SF 7-1	1+	2+	2+	0	0
30	SF 7-2	1+	1+	1+	0	0
31	SF 8-1	1+	1+	1+	0	0
32	SF 8-2	1+	1+	1+	0	0
33	SF 9-1	1+	1+	1+	0	0
34	SF 9-2	1+	1+	1+	0	0
35	SFL 1	3+	2+	1+	0	0
36	SFL 10	3+	2+	0	0	0
37	SFL 11	3+	2+	1+	0	0
38	SFL 12	3+	2+	1+	0	0
39	SFL 13	3+	2+	1+	0	0
40	SFL 14-2	3+	2+	0	0	0
41	SFL 15	3+	2+	0	0	0
42	SFL 16-1	3+	2+	1+	0	0
43	SFL 16-2	3+	2+	1+	0	0
44	SFL 17	3+	1+	1+	0	0
45	SFL 18	3+	2+	2+	0	0
46	SFL 19	3+	2+	1+	0	0
47	SFL 2	2+	1+	0	0	0
48	SFL 20-1	3+	2+	1+	0	0
49	SFL 20-2	3+	2+	1+	0	0
50	SFL 21	3+	2+	1+	0	0
51	SFL 22	3+	2+	1+	0	0

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของเกลือความเข้มข้นต่างๆ

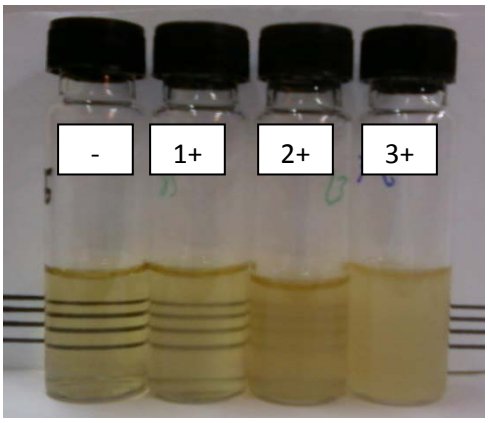
ลำดับ	รหัสเชื้อ	3% NaCl	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	20% NaCl
52	SFL 23-1	3+	1+	1+	0	0
53	SFL 23-2	2+	2+	1+	0	0
54	SFL 24	3+	1+	0	0	0
55	SFL 25-1	3+	2+	1+	0	0
56	SFL 25-2	3+	1+	0	0	0
57	SFL 26	3+	1+	0	0	0
58	SFL 27	3+	2+	1+	0	0
59	SFL 3-1	3+	2+	1+	0	0
60	SFL 3-2	3+	2+	1+	0	0

61	SFL 4-2	3+	2+	2+	0	0
62	SFL 5	3+	2+	1+	0	0
63	SFL 6	2+	2+	0	0	0
64	SFL 7-1	2+	2+	0	0	0
65	SFL 7-2	2+	2+	0	0	0
66	SFL 8	2+	2+	0	0	0
67	SFL 9-1	2+	2+	0	0	0
68	SFL 9-2	2+	2+	0	0	0
69	SL 1	1+	2+	2+	0	0
70	SL 2	1+	2+	1+	0	0
71	SL 3	1+	2+	2+	0	0
72	SL 4	1+	1+	1+	0	0
73	SL 5	1+	2+	1+	0	0
74	SL 6-1	1+	2+	2+	0	0
75	SL 6-2	1+	1+	1+	0	0
76	SL 7-1	1+	1+	1+	0	0
77	SL 7-2	1+	1+	1+	0	0
78	SS 1	1+	1+	0	0	0
79	SS 10-1	1+	1+	1+	0	0

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) การทดสอบการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของเกลือความเข้มข้นต่างๆ

ลำดับ	รหัสเชื้อ	3% NaCl	5% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	20% NaCl
80	SS 10-2	2+	1+	1+	0	0
81	SS 10-3	1+	1+	1+	0	0
82	SS 11	1+	1+	1+	0	0
83	SS 12-1	1+	0	0	0	0
84	SS 12-2	1+	0	0	0	0
85	SS 13-1	1+	2+	1+	0	0
86	SS 13-2	1+	2+	1+	0	0
87	SS 2-1	1+	1+	2+	0	0
88	SS 2-2	1+	1+	0	0	0
89	SS 3	1+	2+	2+	0	0
90	SS 4	1+	2+	1+	0	0
91	SS 5	1+	3+	2+	0	0
92	SS 6	1+	2+	1+	0	0

93	SS 8	1+	2+	1+	0	0
94	SS 9	1+	2+	1+	0	0
95	SFL 14-1	1+	2+	3+	0	0
96	SFL 4-1	1+	2+	1+	0	0
97	SS 7	2+	2+	1+	0	0



- คือ ไม่มีการเจริญ

1+ คือ มีการเจริญน้อย

2+ คือ มีการเจริญปานกลาง

3+ คือ มีการเจริญดี

ภาพที่ 4.2 การเจริญของยีสต์ในอาหารเหลวในอาหารชนิดต่างๆ หรือบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ

4.3 ผลทดสอบประสิทธิภาพการย่อยสับสเตรท

4.3.1 ประสิทธิภาพการย่อยโปรตีน

จากการแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 97 ไอโซเลต ตรวจไม่พบยีสต์ที่แยกได้ทุกสายพันธุ์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้

4.3.2 ประสิทธิภาพการย่อยแป้ง

การทดสอบการย่อยแป้ง โดยวัด Clear zone หลังการบ่มตัวอย่างแล้ว 72 ชั่งโมง เมื่อวางเกล็ดไอโอดีนลงบนฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อและคว่ำจานยีสต์ลงบนฝาจานทิ้งไว้ 10-20 นาที เพื่อให้ไอโอดีนทำปฏิกิริยากับแป้ง บริเวณที่ไม่ถูกย่อยจะเกิดโซนใสรอบๆ โคโลนี ซึ่งยีสต์จำนวน 97 ไอโซเลต สามารถย่อยแป้งจำนวน 6 ไอโซเลต คือ SF 22-2, SL 7-2, SS 13-2, SS 7, SF 8-1 และ SFL 13 พบว่าไอโซเลต SL 13-2 มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งสูงสุด (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง

ลำดับ	รหัสเชื้อ	colony zone (cm)	clear zone (cm)
1	SF7-1	0.5	0
2	SF16	0.7	0
3	SF14-2	0.8	0
4	SF19	0.9	0
5	SF26	0.5	0

6	SF14-1	0.6	0
7	SFL24	0.6	0
8	SL7-1	0.7	0
9	SFL22	1	0
10	SL3	0.6	0
11	SFL23-2	0.6	0
12	SFL9-1	0.7	0
13	SFL2	0.6	0
14	SFL4-1	0.6	0
15	SFL4-2	0.8	0

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง

ลำดับ	รหัสเชื้อ	colony zone (cm)	clear zone (cm)
16	SFL6	0.4	0
17	SF22-2	2.4	0.2
18	SF8-2	0.5	0
19	SF9-2	0.5	0
20	SF2	0.6	0
21	SF4	0.7	0
22	SF1-2	0.6	0
23	SF3	0.8	0
24	SF9-1	0.5	0
25	SFL18	0.6	0
26	SFL20-2	0.7	0
27	SFL20-1	0.5	0
28	SFL12	0.6	0
29	SFL7-1	0.7	0
30	SFL3-2	0.6	0
31	SFL3-1	0.6	0
32	SS10-2	1.1	0
33	SL2	0.6	0
34	SL7-2	3.5	0.4
35	SL4	0.6	0
36	SF24	1	0
37	SFL25-1	0.6	0

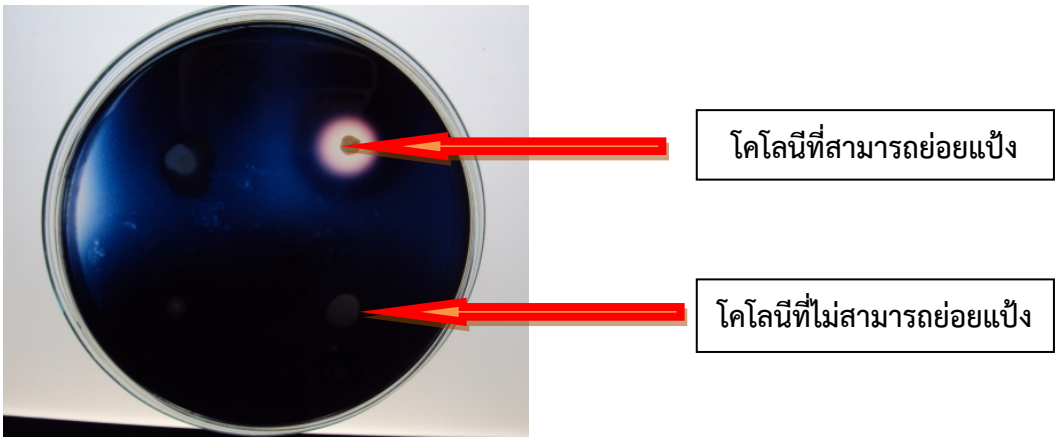
38	SFL14-2	1	0
39	SL6-2	0.6	0
40	SFL11	0.6	0
41	SF23	1.2	0
42	SF7-2	0.6	0

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง

ลำดับ	รหัสเชื้อ	colony zone (cm)	clear zone (cm)
43	SF17	0.5	0
44	SF14-1	0.7	0
45	SS13-2	1	2.3
46	SS6	0.7	0
47	SS10-3	0.9	0
48	SS12-1	0.6	0
49	SF11	0.7	0
50	SF5	0.3	0
51	SF10-2	0.7	0
52	SF15	0.6	0
53	SS7	0.3	1.5
54	SS8	0.6	0
55	SF12	0.7	0
56	SF22-1	0.5	0
57	SS9	0.6	0
58	SS2-1	0.6	0
59	SL6-1	0.8	0
60	SS4	0.6	0
61	SS1	1.5	0
62	SFL10	0.5	0
63	SFL9-2	0.7	0
64	SFL23-1	0.7	0
65	SL1	0.6	0
66	SS3	0.5	0
67	SF8-1	2	1.2
68	SS12-2	0.6	0
69	SF18	0.6	0

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง

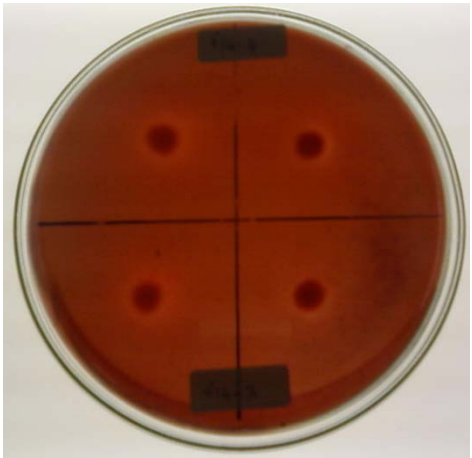
ลำดับ	รหัสเชื้อ	colony zone (cm)	clear zone (cm)
70	SFL5	0.8	0
71	SL5	0.5	0
72	SF1-1	0.5	0
73	SF6-1	0.7	0
74	SF20	0.6	0
75	SF6-3	0.8	0
76	SF13	0.6	0
77	SF21	0.7	0
78	SF6-4	0.7	0
79	SF10-1	0.5	0
80	SF6-2	0.6	0
81	SFL15	0.8	0
82	SFL25-2	0.7	0
83	SFL13	0.9	1
84	SFL7-2	0.7	0
85	SFL8	0.6	0
86	SFL17	0.8	0
87	SFL19	1.6	0
88	SFL1	0.5	0
89	SFL14-1	0.6	0
90	SFL16-2	0.8	0
91	SS2-2	0.5	0
92	SFL16-1	0.8	0
93	SFL21	0.9	0
94	SS11	0.9	0
95	SS10-1	1.1	0
96	SS13-1	4	0
97	SS5	4	0



ภาพที่ 4.3 ตัวอย่างไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งได้และที่ไม่สามารถย่อยแป้งได้

4.3.3 ประสิทธิภาพในการย่อย Xylan

การทดสอบประสิทธิภาพการย่อยXylan โดยวัด clear zone ที่เกิดขึ้นหลังราดด้วย congo red และล้างด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 % ที่บ่มแล้ว 72 ชั่งโมง ตรวจสอบ โซนใสรอบๆ โคโลนีที่เกิดขึ้นพบยีสต์จำนวน 2 ไอโซเลต ที่สามารถย่อย xylan ได้ คือ ไอโซเลต SFL 1 และ SFL13 โดยลักษณะโคโลนีที่ย่อย xylan ได้ แสดงดังภาพที่ 4.4



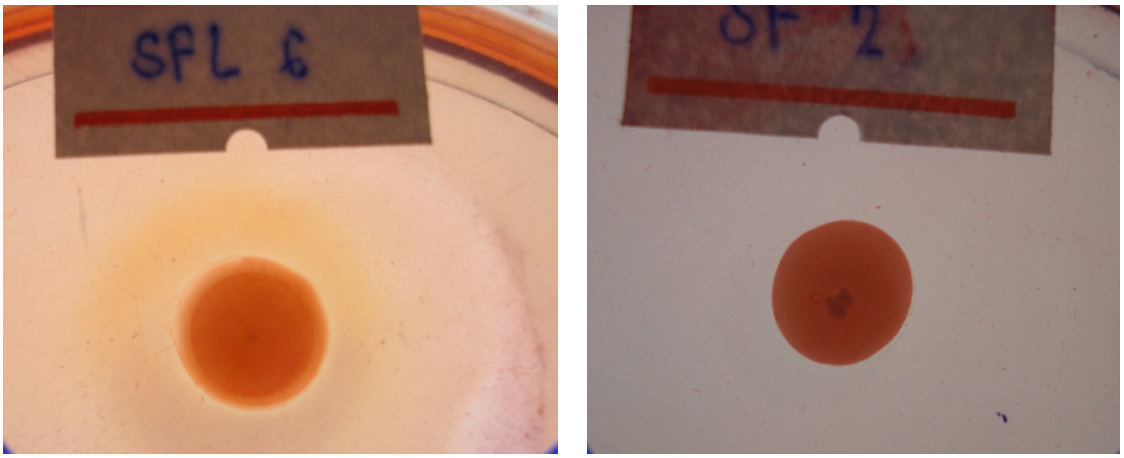
ภาพที่ 4.4 ลักษณะ clear zone ที่เกิดจากการย่อย xylan หลังจากราดด้วย congo red

4.3.4 ประสิทธิภาพในการย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

เมื่อนำยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างรวมทั้งหมด 97 ไอโซเลต มาคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสบนอาหารแข็งที่ประกอบไปด้วย 1% Carboxymethyl

cellulose บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน แล้วนำมาราด Congo red ให้ท่วมหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสจะพบวงใสรอบโคโลนีของเชื้อ โดยกิจกรรมของเอนไซม์คาร์บอกซีเมทิลเซลลูเลส จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเทียบกับเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อ

จากผลการทดลองพบว่ายีสต์ทั้งหมด 97 ไอโซเลต สามารถย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้จำนวน 31 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.7 โดยยีสต์ที่สามารถย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้สูงจำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต SFL 14-2 (คัดแยกได้จากดอกรังใบใหญ่) มีค่าความแตกต่างของโคโลนีกับโซนใสเท่ากับ 5 มิลลิเมตร ไอโซเลต SS 9 (แยกได้จากดินกลางทางเส้น 2) มีค่าความแตกต่างของโคโลนีกับโซนใสเท่ากับ 4 มิลลิเมตร ไอโซเลต SL 7-2 (แยกได้จากใบไม้ปากทางเข้า) มีค่าความแตกต่างของโคโลนีกับโซนใสเท่ากับ 2.5 มิลลิเมตร ไอโซเลต SF 2 (คัดแยกได้จากผลมะกอก) มีค่าความแตกต่างของโคโลนีกับโซนใสเท่ากับ 2.5 มิลลิเมตร ไอโซเลต SFL 6 (คัดแยกได้จากดอกนมสาว) มีค่าความแตกต่างของโคโลนีกับโซนใสเท่ากับ 2.5 มิลลิเมตร และไอโซเลต SS 6 (คัดแยกได้จากดินใต้ต้นมะรุม) มีค่าความแตกต่างของโคโลนีกับโซนใสเท่ากับ 2.5 มิลลิเมตร



ภาพที่ 4.5 ลักษณะ clear zone ที่เกิดจากการย่อย Carboxymethyl cellulose หลังราดด้วย Congo red

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส

Isolation code	CZ-CD (mm)	CZ/CD
SFL 2	2	1.21
SFL 6	2.5	1.31
SFL 14-1	1	1.13
SFL 14-2	**5**	**1.26**
SFL 17	1	1.09
SFL 19	2	1.09

SFL 21	1.5	1.11
SFL 27	2	1.15
SF 1-2	1	1.14
SF 2	2.5	1.28
SF 6-2	2	1.16
SF 6-3	2	1.11
SF 8-2	1	1.11
SF 10-1	2	1.13
SF 10-2	2	1.14
SF 11	2	1.11
SF 12	1	1.11
SF 13	2	1.14
SF 17	1	1.17
SF 20	1	1.13
SS 2-1	2	1.19
SS 2-2	2	1.20
SS 3	1.5	1.18
SS 6	2.5	1.15
SS 7	2	1.24
SS 9	4	1.29
SS 10-2	2	1.12
SL 5	1	1.10
SL 6-1	2	1.12
SL 7-1	1.5	1.19
SL 7-2	2.5	1.29

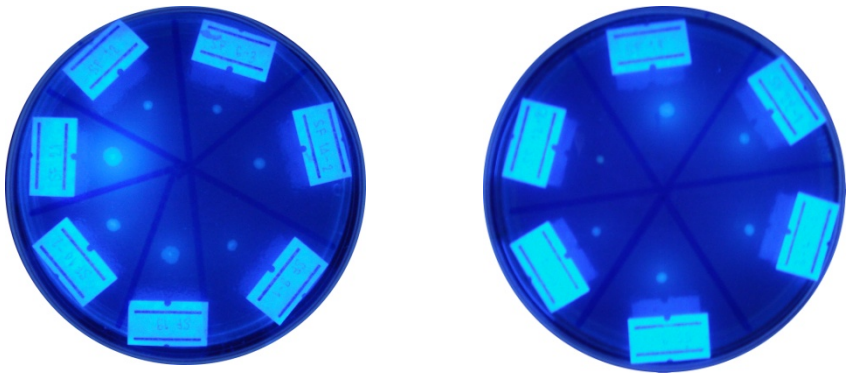
* CZ = Clear zone diameter, * CD = Colony diameter

4.3.5 ประสิทธิภาพการย่อย 4-methylumbelliferyl-β-glucoside

ยีสต์ทั้งหมด 97 ไอโซเลต นำมาคัดเลือกความสามารถในการย่อยสลาย 4-methylumbelliferyl-β-D-glucoside บนอาหารแข็ง Yeast nitrogen base ที่ประกอบด้วย 0.004% (w/v) MUG (4-methylumbelliferyl-β-D-glucoside) เมื่อตรวจผลภายใต้แสงอัลตราไวโอเลตพบว่าไอโซเลตมีการผลิตที่สามารถย่อยสลาย 4-methylumbelliferyl-β-D-glucoside ได้จะตรวจพบการเรืองแสงรอบโคโลนีของเชื้อเป็นผลเนื่องจาก methylumbelliferone อิสระถูกปลดปล่อยออกมาจากสับสเตรท โดยกิจกรรมของเอนไซม์บีต้ากลูโคซิเดส

จากผลการทดลองพบยีสต์จำนวน 30 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 4-methylumbelliferyl-β-D-glucoside ได้สูงบนอาหารแข็ง ดังตารางที่ 4.8 ได้แก่ ไอโซเลต SF 22-1 (คัดแยกได้จากผลกะบก) มีการสร้างเอนไซม์กว้าง 12 มิลลิเมตร ไอโซเลต SF 7-1 (คัดแยกได้จากผลผล Unknow 1) มีการสร้างเอนไซม์กว้าง 11 มิลลิเมตร ไอโซเลต SF 21 (คัดแยกได้จากผลมะกอก) มีการสร้างเอนไซม์กว้าง 11 มิลลิเมตร ไอโซเลต SL 1 (คัดแยกได้จากใบ Unknow 1) มีการสร้างเอนไซม์กว้าง 11

มิลลิเมตร ไอโซเลต SS 9 (คัดแยกได้จากดินกลางทางเส้นที่ 2) มีการสร้างเอนไซม์กว้าง 10 มิลลิเมตร ไอโซเลต SF 8-2 (คัดแยกได้จากผลชะมวง) มีการสร้างเอนไซม์กว้าง 10 มิลลิเมตร ไอโซเลต SF 13 (คัดแยกได้จากผลโกธา) มีการสร้างเอนไซม์กว้าง 10 มิลลิเมตร ไอโซเลต SF 18 (คัดแยกได้จากผลกระดังงา) มีการสร้างเอนไซม์กว้าง 10 มิลลิเมตร



ภาพที่ 4.6 การเกิดโซนเรืองแสงของยีสต์จากการย่อยสลาย 4-methylumbelliferyl-β-D-glucosideภายหลังนำไปส่องใต้รังสีอัลตร้าไวโอเลต

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการย่อย 4-methylumbelliferyl-β-D-glucoside

Isolation code	VZ-CD (mm)	VZ/CD
SFL 13	7	1.30
SFL 6	8	3.00
SFL 14-2	9	1.90
SFL 20-1	6	2.20
SS 2-1	3	1.75
SS 8	6	1.86
SS 10-3	7	2.40
SS 11	6	1.86
SF 13	10	2.67
SFL 8	5	1.71
SL 4	7	2.17
SL 5	9	1.90
SL 1	11	2.22
SF 6-2	6	2.00
SF 7-2	6	1.67
SS 10-1	8	1.89

SS 2-2	5	2.67
SS 13-2	5	3.50
SF 7-1	11	2.83
SF 16	7	2.00
SFL 20-2	4	1.80
SF 8-2	10	2.67
SL 2	9	2.50
SL 3	8	2.14
SF 2	5	1.71
SF 21	11	2.10
SF 18	10	2.00
SS 9	10	2.43
SF 22-1	**12**	**3.40**
SL 7-2	9	2.50

* VZ = Visualize zone diameter, * CD = Colony diameter

4.4 การจัดจำแนกประเภทยีสต์โดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA ของยีสต์ ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ดอกไม้ ผลไม้ สามารถจัดแนกชนิดได้เป็นยีสต์ที่รู้ชนิด (Known species) แล้ว 13 ไอโซเลต และ 3 ไอโซเลต เป็นยีสต์ที่คาดว่าจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ (New species) เมื่อเทียบกับยีสต์มาตรฐานที่อยู่ในฐานข้อมูล Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) คือ ไอโซเลต SF7-1, SF2 และ SF8-2 ดังแสดงในตารางที่ 4.9) โดย Yeast strains ที่มี D1/D2 sequence จำนวน >1% nucleotide substitutions สามารถจัดจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อ **new species** (Kurtzman and Robnett, 1998)

ตารางที่ 4.9 ผลการจัดจำแนกยีสต์โดยใช้บริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA

No.	Sequence rang	Closet species	Identity	subtitution	Gap	Remark
SL1	575	*Pichia myanmaensis* AB126678.1	573/575 (99%)	0	2	Known species
SS6	587	*Candida maltosa* U45745	570/573 (99%)	1	2	Known species
SF7-1	**573**	***Pichia anomala* U74592**	**567/573 (99%)**	**6**	**0**	**new species**
SF2	**562**	***Issatchenkia terricola* EF550233.1**	**554/562 (99%)**	**6**	**2**	**new species**

SFL2	574	*Kluyveromyces africanus* AY048159.1	574/574 (100%)	0	0	Known species
SF21	586	*Candida natalensis* U45818.1	563/566 (99%)	3	0	Known species
SS22-1	498	*Candida incommunis* U62303.1	496/498 (99%)	1	1	Known species
SFL14-2	525	*Hyphopichia burtonii* CBS 2353	524/525 (99%)	0	1	Known species
SS9	487	*Pichia guilliermondii* GU478321	487/488 (99%)	0	1	Known species

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) ผลการจัดจำแนกยีสต์โดยใช้บริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA

No.	Sequence rang	Closet species	Identity	subtitution	Gap	Remark
SF13	627	*Candida orthopsilosis* HE681725.1	578/578 (100%)	0	0	Known species
SF8-1	582	*Zygoascus hellenicus* U40125	565/566 (99%)	1	0	Known species
SF8-2	**590**	***Pichia anomala* U74592.1**	**567/573 (99%)**	**6**	**0**	**new species**
SF13-2	513	*Kodamaea ohmeri* GU597323.1	499/502 (99%)	0	3	Known species
SFL20-2	584	*Candida orthopsilosis* HE681725.1	579/580 (99%)	0	1	Known species
SL7-2	497	*Pichia* sp. ST-236 DQ404483.1	491/492 (99%)	0	1	Known species
SF18	576	Pichia guilliermondii FJ455111.1	574/576 (99%)	1	1	Known species

subtitution =6 น่าจะเป็น new >6 new species, 0-3 = known species และ 4-5 sisiter species

บทที่ 5
ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง ทั้งในด้านชนิด (สปีชีส์) หรือความหลากหลายของสายพันธุ์ ซึ่งแต่ละชนิดและสายพันธ์ก็จะให้คุณสมบัติที่แตกต่างออกไป ซึ่งจัดว่ามีคุณค่าในการศึกษาความหลากหลาย และมีการค้นพบจุลินทรีย์ชนิดใหม่ๆ ที่มีสมบัติแตกต่างออกไปจากที่เคยมีรายงานไว้อยู่ตลอดเวลา และมากกว่าสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น การค้นพบจุลินทรีย์ใหม่ๆ ก่อให้เกิดการนำจุลินทรีย์ใหม่ที่มีสมบัติพิเศษไปใช้ให้เกิดประโยชน์ในวิทยาศาสตร์ และอุตสาหกรรม หลายด้าน และที่แตกต่างจากการค้นพบสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น เช่น พืช หรือสัตว์ ก็คือ เรื่องการยืนยันพื้น หรือตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ที่พบ ซึ่งในจุลินทรีย์จำทำได้ยากกว่า หรืออาจไม่สามารถยืนยันได้เลย ซึ่งจะมีผลต่อการอ้างสิทธิ์การค้นพบและใช้ประโยชน์ทางภูมิศาสตร์ กล่าวคือ หากมีชาวต่างชาติค้นพบจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติพิเศษในประเทศไทยและนำไปใช้ประโยชน์เค้าอาจไม่บอกว่าเป็นการค้นพบในประเทศไทยก็ได้ ซึ่งในการโต้แย้งทำได้ยากมาก แต่หากเป็นพืช หรือสัตว์ เราอาจสามารถยืนยันพื้นที่การค้นพบทางภูมิศาสตร์ว่าอยู่ในประเทศไทยได้ไม่ยากนัก ดังนั้นการศึกษาความหลากหลายทางจุลินทรีย์เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและใช้เพื่อการอ้างอิงจึงเป็นงานที่มีประโยชน์และสำคัญอย่างยิ่ง และหากจุลินทรีย์ที่ค้นพบมีสมบัติพิเศษที่มีศักยภาพในการพัฒนาสู่อุตสาหกรรมต่อไป ก็จะยิ่งมีคุณค่ามากขึ้น คณะผู้วิจัยได้มีการศึกษาการกระจายตัวของจุลินทรีย์กลุ่มยีสต์ในโครงอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริ นี้และได้ มีการรายงานการค้นพบจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ๆ ทำให้เกิดข้อมูลพื้นฐานทางด้านวิชาการ ตลอดจนสามารถอนุรักษ์จุลินทรีย์สายใหม่ได้ จากการสำรวจและคัดเลือกยีสต์ของคณะผู้วิจัยภายใต้จากเขตพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี (ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551 จนถึงปี 2555) ได้ค้นพบยีสต์สายพันธุ์ใหม่ (new species) จำนวนหลายสายพันธุ์ นอกจากนั้นยังพบค้นคุณลักษณะพิเศษของยีสต์สายพันธุ์ เช่น ผลิตเอนไซม์ ย่อยสลายแป้ง เซลลูโลส โปรตีน และ ผลิตเอทานอล เป็นต้น

จากการคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้ และดินทั้งหมด 70 ตัวอย่าง บริเวณเขื่อนสิรินธร ภายใต้โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาสยามบรมราชกุมารี จังหวัดอุบลราชธานี คัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 97 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างดอกไม้ 36 ไอโซเลต ผลไม้ 34 ไอโซเลต ใบไม้ 9 ไอโซเลตและจากตัวอย่างดิน 18 ไอโซเลต

เมื่อทดสอบคุณลักษณะของยีสต์ที่แยกได้โดยบ่มเชื้ออุณหภูมิ 25-50°C พบว่ายีสต์ส่วนมากเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 25-45°C โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์จะอยู่ในช่วง 30-35°C แต่อย่างไรก็ตามไอโซเลต SF 2, SFL 20-1, SF 1-2 สามารถเจริญได้ที่ 50°C และเมื่อทดสอบคุณลักษณะของยีสต์ที่แยกได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นตั้งแต่ 30-70 % (w/v) พบว่ายีสต์ส่วนมากเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 30 % โดยยีสต์จำนวน 17 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต SF 10-1, SF 10-2, SF 11, SF 1-2, SF 14-1, SF 14-2, SF 3, SF 4, SF 6-3, SF 7-1, SFL 18, SFL 23-1, SFL 3-2, SFL 4-2, SL 2, SL 4 และ SS 13-2 สามารถได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 70 % แต่อย่างไรก็ตามมีเชื้อจำนวน 11 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต SF 23, SF 8-2, SF 9-1, SFL 10, SFL 2, SL 7-1, SL 7-2, SS 12-1, SS 12-2, SS 13-1 และ SS 9 ไม่สามารถเจริญได้ในเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นตั้งแต่ 30-70 % (w/v) และ เมื่อทดสอบคุณลักษณะของยีสต์ที่แยกได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร

ที่มีเกลือ (NaCl) ตั้งแต่ 3-20 % (w/v) พบว่ายีสต์ส่วนมากเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 3% NaCl แต่อย่างไรก็ตามยีสต์ทุกไอโซเลต ไม่สามารถเจริญได้ในเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี 15-20 % NaCl

จากการศึกษาความสามารถของยีสต์ในการย่อยสลายสารอินทรีย์ชนิดต่างๆ พบว่าตรวจไม่พบยีสต์ที่สามารถย่อยสลายโปรตีนได้ และ ตรวจพบยีสต์จำนวน 6 ไอโซเลตสามารถย่อยแป้ง คือ SF 22-2, SL 7-2, SS 13-2, SS 7, SF 8-1 และ SFL 13 พบว่า ไอโซเลต SL 13-2 มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งสูงสุด พบยีสต์จำนวน 2 ไอโซเลต ที่สามารถย่อย xylan ได้ คือ ไอโซเลต SFL 1 และ SFL13 พบยีสต์ที่สามารถย่อยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลสได้สูงจำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต SFL 14-2, SS 9, SL 7-2, SF2, SFL 6, SS 6 ยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยสลาย 4-methylumbelliferyl-β-D-glucoside ได้สูงบนอาหารแข็ง ได้แก่ ไอโซเลต SF 22-1, SF 7-1, SF 21, SL 1, SS 9, SF 8-2, SF 13

จากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA ของยีสต์ ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน ดอกไม้ ผลไม้ สามารถจัดแนกชนิดได้เป็นยีสต์ที่รู้ชนิด (Known species) แล้ว 13 ไอโซเลต และ 3 ไอโซเลต เป็นยีสต์ที่คาดว่าจะเป็นสายพันธุ์ใหม่ (New species) เมื่อเทียบกับยีสต์มาตรฐานที่อยู่ในฐานข้อมูล Genbank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) คือ ไอโซเลต SF7-1, SF2 และ SF8-2 ดังแสดงในตารางที่ 4.9) โดย Yeast strains ที่มี D1/D2 sequence จำนวน >1% nucleotide substitutions สามารถจัดจำแนกได้ว่าเป็นเชื้อ new species (Kurtzman and Robnett, 1998) ได้แก่ ไอโซเลต SF 7-1 มีความเหมือน *Pichia anomala* U74592 99% (567/573), ไอโซเลต SF 2 มีความเหมือน *Issatchenkia terricola* EF550233.1 99% (554/562), ไอโซเลต SF8-2 มีความเหมือน *Pichia anomala* U74592.1 99% (567/573)

การศึกษาการกระจายตัวของจุลินทรีย์เพื่อที่จะได้จุลินทรีย์ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญและมีศักยภาพสูงสำหรับอุตสาหกรรม จุลินทรีย์หลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารและพลังงาน ทำให้ระบบนิเวศน์ป่าไม้ ระบบนิเวศน์เกษตร และระบบนิเวศน์ประมงยังคงสภาพเดิม การค้นพบและศึกษาจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาวะวิกฤต เช่น อุณหภูมิสูง ความเค็มสูง น้ำตาลสูง ความสามารถในการย่อยสับสเทรต สามารถอธิบายสิ่งเหล่านั้นอยู่ได้อย่างไรในสภาวะแบบนั้นและนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดและปรับเปลี่ยนให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น นอกจากนั้นการรู้องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในแหล่งต่างๆ นำไปสู่การจัดการเกี่ยวกับจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น

เอกสารอ้างอิง

ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง, ฮากิฮิโร ฮิโน และมาซามิชิ มาซากิ. 2531**. การแยกดีเอ็นเอโครโมโซมของยีสต์ *Candida maltosa* โดยวิธีพัลส์ ฟิลด์ เจล อิเล็คโตรโฟเรซิส**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. กรุงเทพฯ. 179-205.

ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง, ฮากิฮิโร ฮิโน และฮิโรยูกิ ทากาโน. 2531. **Protoplast Fusion ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่ทนการแช่แข็งกับยีสต์ขนมปังเพื่อใช้ทำขนมปังชนิด Frozen Dough**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. กรุงเทพฯ. 159-178.

นฤมล โตอ่อน, วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และเยาวลักษณ์ ดิสระ. 2550. **ยีสต์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล**. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. หน้า 971.

ปทุมพร ฉิมเอนก, ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง, ไปรมา ภัทรกุลพงษ์ และพรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์. 2526. **การแยกและคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำทิ้งที่มาทำให้เข้มข้น**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. กรุงเทพฯ. 321-322.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. **งานวิจัยและพัฒนาไวน์ของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร** (ออนไลน์). [อ้างเมื่อ 24 มกราคม 2553]. จาก http://www.ku.ac.th/kaset60/ku60/wine.html

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, กาญจนิจ วาจนะวินิจ, ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง, ประดิษฐ์ ครุวัณณา, วิเชียร ยงมานิตชัย และบุญฤทธิ์ ล้ำสกุล. 2526. **ผลของพาราควอทต่อการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ยีสต์**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. กรุงเทพฯ. 323-324.

ยีสต์: จุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์นำมาใช้ประโยชน์ (ออนไลน์) 25 ตุลาคม 2550. [อ้างเมื่อ 23 มกราคม 2553]. จาก http://www.vcharkarn.com/vcafe/125301

วราวุฒิ ครูส่ง, ณัฐศิษฐ์ ไทยตระกูล และปราโมทย์ ธรรมรัตน์. 2526. **ผลของสารสกัดจากเปลือกไม้เคี่ยมต่อเชื้อยีสต์และแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. กรุงเทพฯ. 327-328.

วิกิพีเดีย สารานุกรมเสรี. 2553. **ยีสต์** (ออนไลน์). แหล่งที่มา:http://th.wikipedia.org/wiki/%E0%B8%A2%E0%B8%B5%E0%B8%AA%E0%B8%95%E0%B9%8C

ศุภนิตย์ หิรัญประดิษฐ์ และ สัญชัย ตันตยาภรณ์. 2533. **ศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการหมักน้ำอ้อยเป็นแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ที่อุณหภูมิสูง** (ออนไลน์). แหล่งที่มา: http://www.phtnet.org/research/view-abstract.asp?research_id=we063

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 1 .กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาวิตรี ลิ่มทอง,วิเชียร ยงมานิตชัย, มณี ตันติรุ่งกิจ, จรูญ คำนวณตา และปราโมทย์ ธรรมรัตน์. 2526. **การผสมพันธุ์ยีสต์ทนเกลือเพื่อการหมักแอลกอฮอล์**. ผลงานวิจัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สถาบัน ค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. กรุงเทพฯ. 303-304.

Barnett J.A., Payne R.W., Yarrow D. 2000. **YEAST characteristics and identification**. 3 rd ed. Cambridge : Cambridge University press.

Fell, J.W., Scorzetti G., Tallman A.S., Pinel N. and Yarrow D. 2002. Recognition of the basidiomyceteous yeast *Sporobolomyces ruberriumus* sp. Nov.as a distinct species based on molecular and morphological analysis. **FEMS Yeast Research**. 1:265-270.

Giovani G., Canuti V., Rosi I . 2009 . Effect of yeast strain and fermentation conditions on the release of cell wall polysaccharides. **International Journal of Food Microbiology** 137:303-307.

Ingram, M. 1957. Microorganisms resisting high concentrations of sugars or salt. Symp. **Soc. Gen. Microbiol**. 7:90-133.

Kurtzman, C.P. and Robneet C.J. 1998. Identification and phylogeney of ascomyetous yeasts from analysis of nucler lage subunit (26S) ribosomal DNA patial sequence. **Antonie van Leewenhoek**. 73:331-317.

Limtong S., Yongmanichai W., Tamamrate P. and Tantirungkij M. 1986b.Progress report no. 2 on Hybridization of haloterolant yeast for alcohol fermentation. **S Research Project USAID/PSTC Program .** 2 March-August, 1986, 785p.

Onisihi, H. 1963. Osmophilic yeasts. **Advance Food Research**. 12:53-94.

Reverdin S.G., Bezaulta N., sauvant D., Bertin G. 1996. Effect of a probiotic yeast in lactating ruminants:Interaction with dietary nitrogen level. **Animal Feed Science Technology** 63:149-162.

Seki T., Myoga S., Limtong, S., Uedono S., Kumnuata J. and Taguchi H. 1983. Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. **Biotechnol. Lett**. 5: 351-356

Suzuki, M., Nakase T. and Komagata K. 1994. Candida stellimalicola a new species of anamorphic yeast isolated from star apple in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol**. 40:115-121.

Suzuki, M., Nakase T. and Fukazawa Y. 1991. Candida frgi a new species of anamorphic yeast isolated from fermenting strawberry. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 37:424-429.

Tokuoka K. and Ishitani T. 1991. Minimum water activities for the growth of yeast isolated from high sugar foods. **J. Gen. Appl. Microbiol**. 37:111-119.

Velente, P., Ramsoe and J.P. , Leoncini O. 1999. Sequencing as a tool in yeast molecular taxonomy. **Can. J. Microbiol.** 45:949-958.

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

สูตรอาหาร

Yeast extract malt extract (YM) agar

Glucose	1	g
Peptone	0.5	g
Yeast extract	0.3	g
Malt extract	0.3	g
Agar	1.5	g
Distill water	100	ml

Preparation antibiotic in media

Glucose	1	g
Peptone	0.5	g
Yeast extract	0.3	g
Malt extract	0.3	g
Agar	1.5	g
Distill water	100	ml
Chloramphenicol solution	0.5	ml

Custer's medium

Yeast extract	5	g
Glucose	50	g
$CaCO_3$	5	g
Agar	1	5g
Purified water	1000	ml

50% Glucose agar

Yeast extract	1	g
Glucose	50	g
Agar	13	g
Purified water	100	ml

5% Glucose and 10% Sodium chloride agar

Yeast nitrogen base	6.7	g
Sodium chloride	100	g
Glucose	50	g
Agar	20	g
Reversosmosis water	1000	ml

Gelatin medium

Barto yeast nitrogen base	6.7	g
Glucose	5	g
Gelatin	100	g

Distrill water	1000	ml

Basal medium

Peptone	7.5	g
Yeast extract	4.5	g
Distrill water	1000	ml
Bromothymol blue		
(glucose, galactose, sucrose, maltose, lactose, raffinose)		

Acetate-GSH agar

Potassium acetate	1.50	g
Yeast extract	0.01	g
Glucose	0.02	g
Glutathione	0.307	g
Agar	1.50	g
pH 7.5		

Acid formation from glucose

Yeast extract	5	g
Glucose	50	g
Calcium carbonate	5	g
Agar	15	g
Purified water	1000	ml

Growth in vitamin free medium

Glucose	10	g
Vitamin assay Cassamino acids	5	g
KH_2PO_4	1	g
$MgSO_4 . 2H_2O$	0.5	g
NaCl	0.1	g
$CaCl_2 . 2H_2O$	0.1	g
Purified water	1000	ml

Urease

Glucose	1	g
Peptone	1	g
NaCl	5	g
K2HPO	2	g
Phenol red	12	µg
Purified water	1000	ml
Agar	15	g
pH 6.8		

Corn meal agar

Corn meal agar	1.7	g
Reversosmosis water	100	ml

Preparation of 10-fold solution

Yeast nitrogen base	6.7	g
Carbon compound	5.0	g
Purified water	100	ml

Yeast extract malt extract (YM) broth

Glucose	1	g
Peptone	0.5	g
Yeast extract	0.3	g
Malt extract	0.3	g
Distill water	100	ml

Yeast extract malt extract (YM) agar + NaCl 3%

Glucose	1	g
Peptone	0.5	g
Yeast extract	0.3	g
Malt extract	0.3	g
NaCl	3	g
Agar	1.5	g
Distill water	100	ml

Yeast carbon base (YCB)

Yeast carbon base	11.7	g
Purifide water	100	ml
Nitrogen compound		

Yeast extract malt extract (YM) agar + Glucose 30%

Glucose	1	g
Peptone	0.5	g
Yeast extract	0.3	g
Malt extract	0.3	g
Glucose	30	g
Agar	1.5	g
Distill water	100	ml

อาหารดัดแปลงสำหรับการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายสับสเตรท

อาหารทดสอบการย่อยแป้ง

Yeast extract malt extract (YM) agar + soluble starch (1%)

Glucose	1	g
Peptone	0.5	g
Yeast extract	0.3	g
Malt extract	0.3	g
Soluble starch	1	g
Agar	1.5	g
Distill water	100	ml

อาหารทดสอบโปรตีน

Yeast extract malt extract (YM) agar + skimmilk (1%)

Glucose	1	g
Peptone	0.5	g
Yeast extract	0.3	g
Malt extract	0.3	g
Skimmilk	1	g
Agar	1.5	g
Distill water	100	ml

อาหารทดสอบไซแลน

Yeast extract malt extract (YM) agar + oct spelt xylan (1%)

Glucose	1	g
Peptone	0.5	g
Yeast extract	0.3	g
Malt extract	0.3	g
Oct spelt xylan	1	g
Agar	1.5	g
Distill water	100	ml

Preparation of carbon assimilation

1. Glucose
2. Galactose
3. L-Sorbose
4. Sucrose
5. Maltose
6. Cellobiose
7. Trehalose
8. Lactose
9. Melibiose
10. Raffinose

11. Melezitose
12. Inulin
13. SolStarch
14. D-Xylose
15. L-Arabinose
16. D-Arabinose
17. D-Ribose
18. L-Rhamnose
19. Ethanol
20. Glycerol
21. Erythritol
22. Ribitol
23. Galactitol
24. D-Mannitol
25. D-Glucitol
26. α-Me-gluc.
27. Salicin
28. δ-Gluc.Lact.
29. 2-Ketogluc.
30. 5-Ketogluc.
31. DL-lactic acid
32. Succinic acid
33. Citric acid
34. Inositol
35. D-Glucur.acid
36. D-Galactur.acid
37. Xylitol
38. L-Arabinitol
39. D-Gluconate
40. D-Glucosamine
41. N-Acetyl-D.glu
42. Propane 1,2 diol
43. Butane 2,3 diol
44. Methanol
45. Hexadecane
46. Control(distrill water)

ภาคผนวก ข
สารเคมี

สารเคมีสำหรับสกัด DNA

1. Lysis buffer
   100 mM Tris (pH 8.0)
   30 mM EDTA (pH 8.0)
   0.5% SDS
2. Potassium acetate solution
   2.5 M Potassium acetate (pH 7.5)
3. Sterile multi Q water
4. 70%ethanol and 90%ethanol
5. Chloroform:Isoamyl alcohol (24:1)
6. Isopropanol
7. Lugol' s solution

2. Reaction mixture for PCR (100 µl)

10X Taq buffer	10.0 µl
MgCl2 (25mM)	8.0 µl
dNTP mixture (2.5 mM)	8.0 µl
Primer: F63 (10 pM)	3.0 µl
Primer: LR3 (10 pM)	3.0 µl
Sterilized nano pure water	57.5 µl
Taq Polymerase (5U / µl)	0.5 µl

3.การเตรียม Agarose

0.8% Agarose ผสมใน 1X TAE buffer

(50X TAE buffer: 242 g Tris base, 57.1 ml glacial acetic acid, 37.2 g Na_2EDTA)

4.การเตรียมสารละลาย ethanol-sodium acetate

3 M sodium acetate solution (NaOAc), pH 4.6	3.0 µl
Sterilized nanopure water	14.5 µl
99% ethanol	62.5 µl

5. Sodium Chloride

Stock solution

Sodium chloride	30 mg
Distilled water	200 ml
100% alcohol	800 ml

Working Solution

Stock Sodium chloride	50 ml
1% sodium hydroxide	0.5 ml

6. Congo red

Stock Solution

Congo red stain	1.0 mg
Stock Sodium Chloride	500 ml

Working Solution

Stock Congo red solution	50 ml
1% Sodium hydroxide	0.5 ml

7. Preparation antibiotic

Chloramphenicol solution	10 ml

8. Nitrogen compound

N0= No nitrogen (negative control)

N1= $(NH_4)_2PO_4$ (Ammonium sulfate) (positive control)

N2= KNO_3 (Potassium nitrate)

N3= $NaNO_2$ (Sodium nitrate)

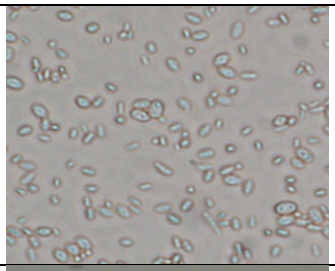
N4= Ethylamine

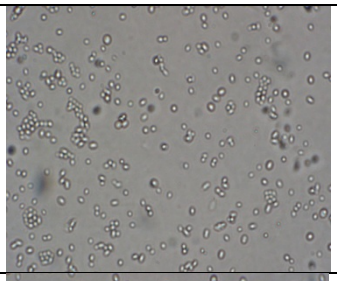
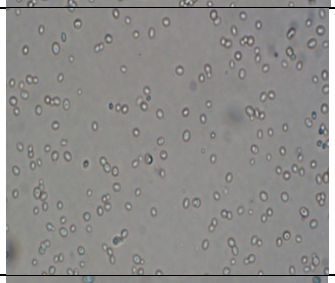
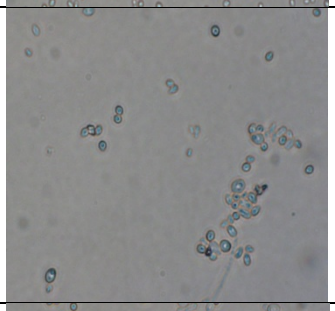
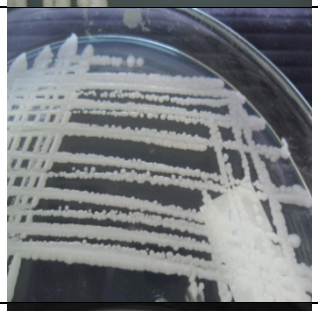
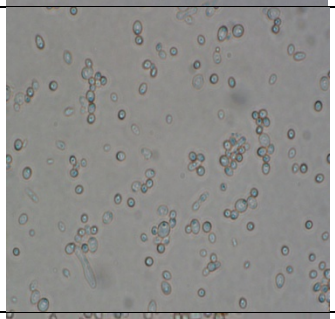
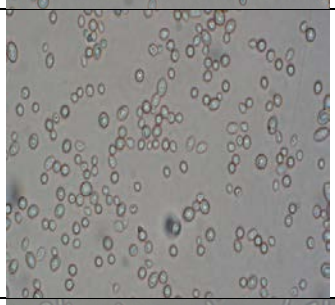
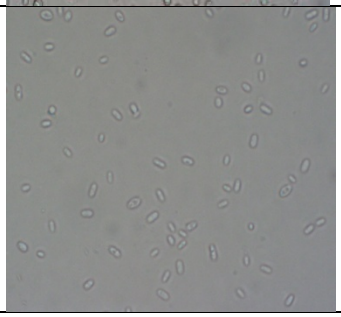
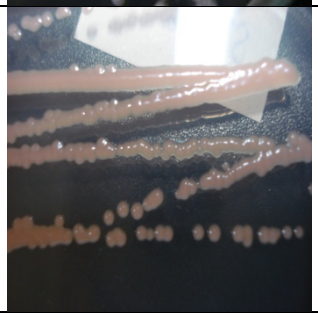
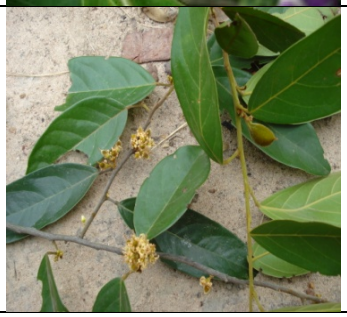
N5= L-Lysine

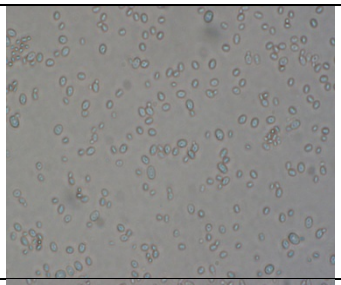
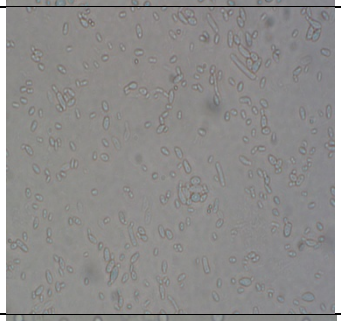
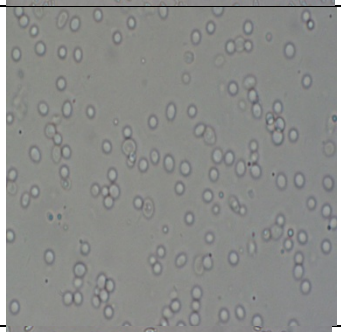
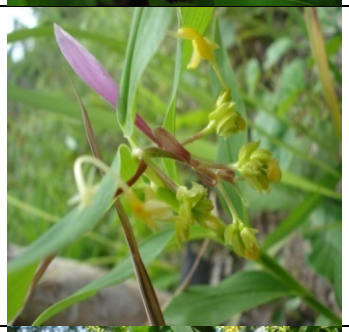
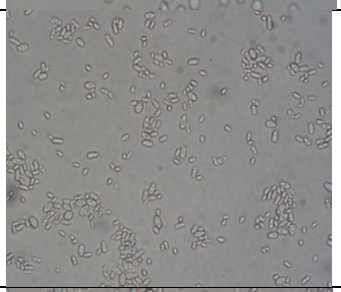
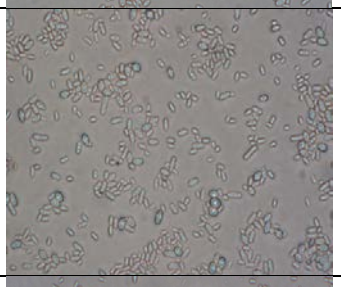
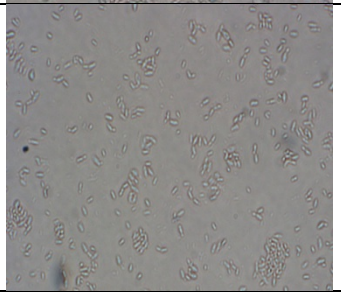
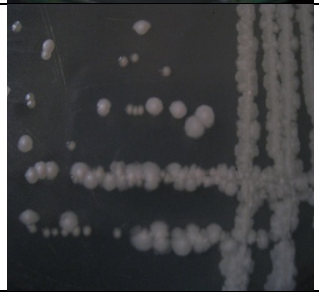
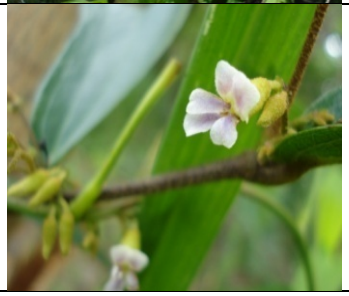
N6= Cadaverine

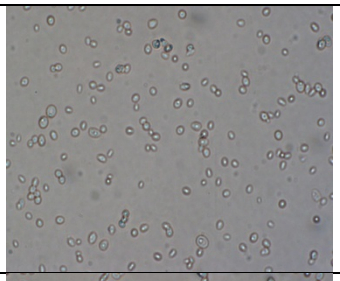
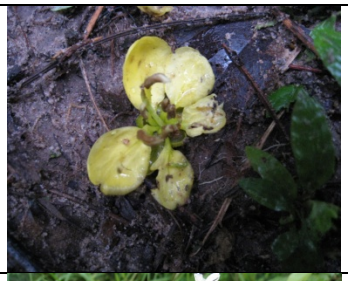
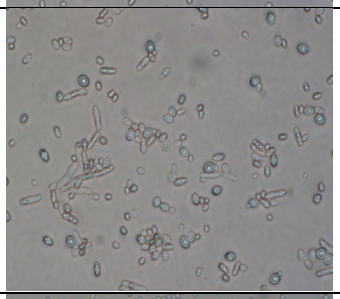
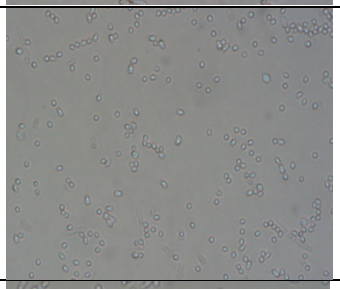
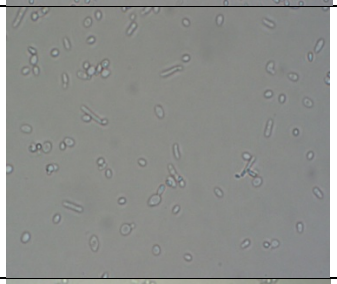
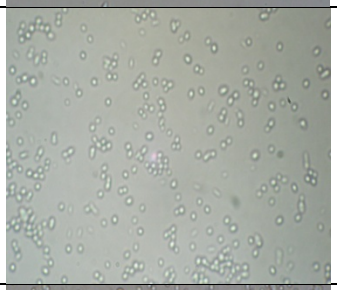
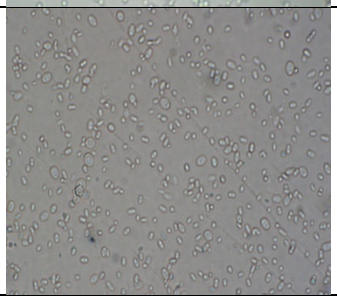
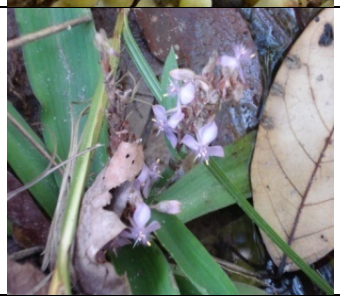
ภาคผนวก ค
ลักษณะของยีสต์ที่แยกได้จากเขื่อนสิรินธร

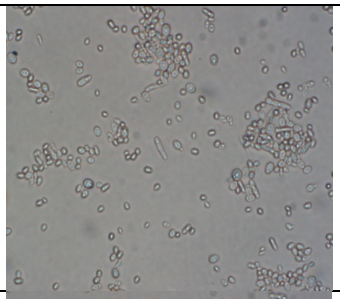
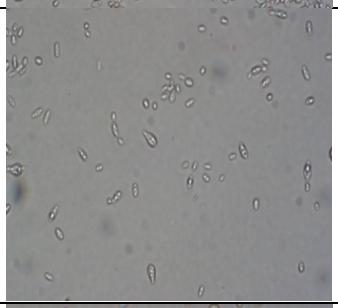
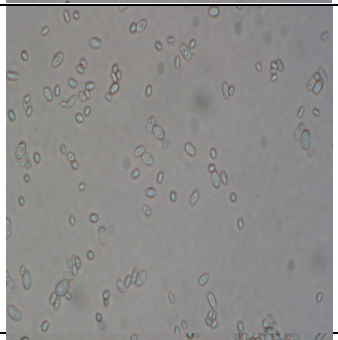
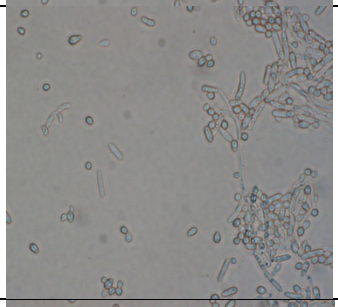
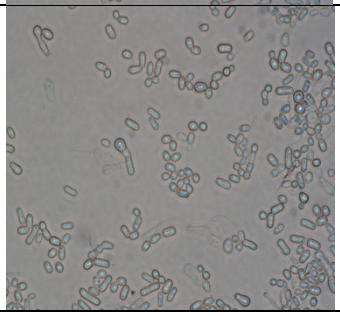
ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จากเขื่อนสิรินธร จังหวัด อุบลราชธานี

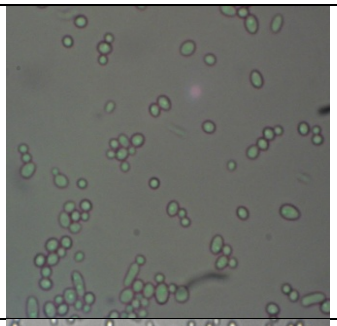
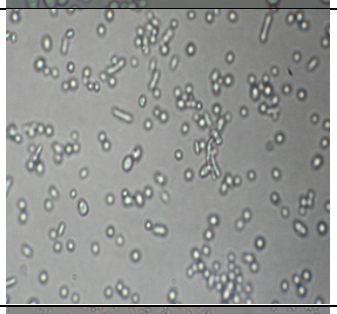
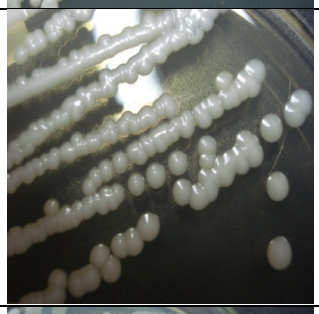
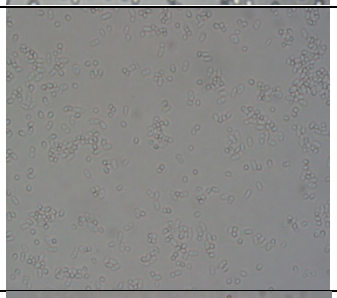
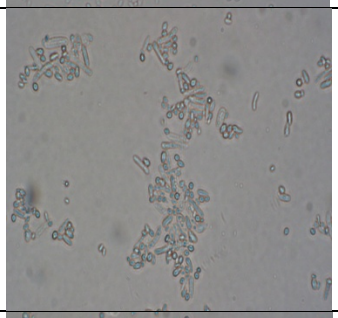
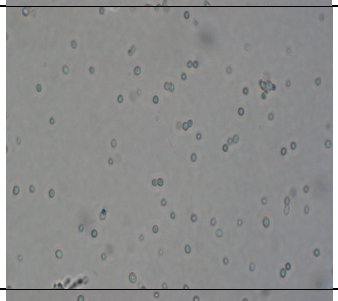
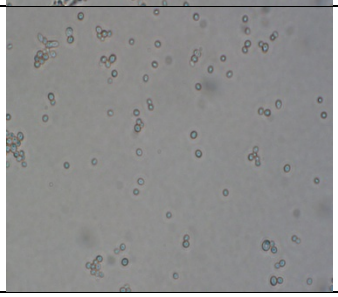
Isolate code	Cell	Colony	Sample	หมายเหตุ
SFL 1			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างรี มีการแตกหน่อ
SFL 2			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม มีการแตกหน่อ

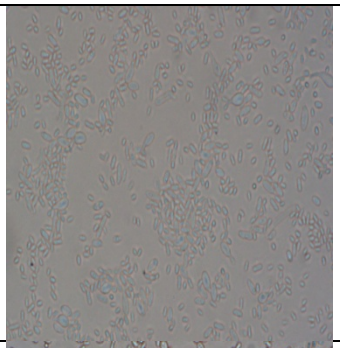
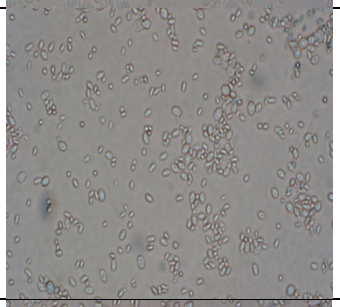
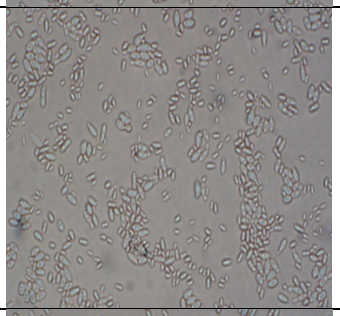
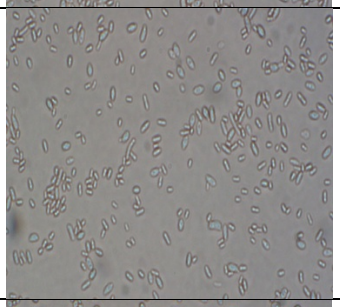
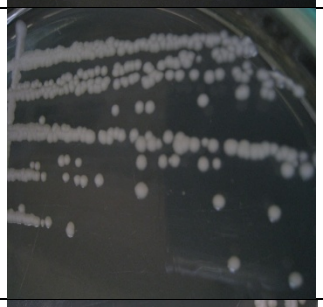
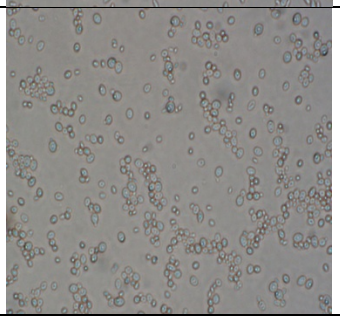
SFL3-1				โคโลนีสีขาว ขนาดเล็ก มันวาว เซลล์รูปร่างกลม ขนาดค่อนข้างเล็ก พบการแตกหน่อ
SFL 3-2				โคโลนีสีขาวขุ่นตรงกลางนูน มันวาว เซลล์รูปร่างกลม แตกหน่อ
SFL 4-1				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม ค่อนข้างเล็ก มีการแตกหน่อ
SFL 4-2				โคโลนีสีขาวตรงกลางนูนเซลล์รูปร่างกลม มีการแตกหน่อ
SFL 5				โคโลนีสีขาวขอบไม่เรียบขนาดเล็ก เซลล์รูปร่างกลม มีการแตกหน่อ
SFL 6				โคโลนีสีส้มอ่อน มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ

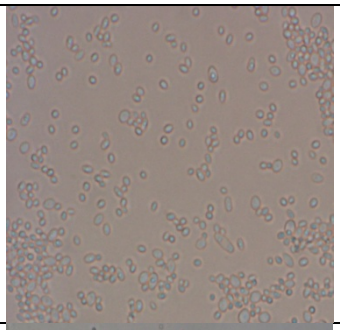
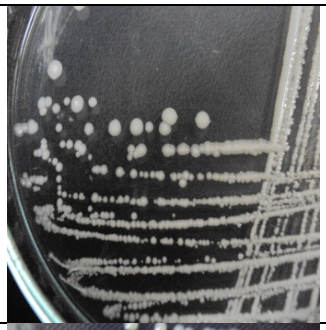
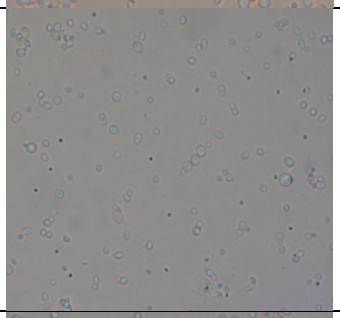
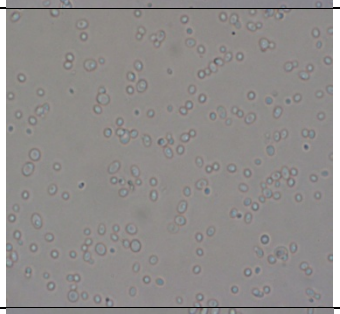
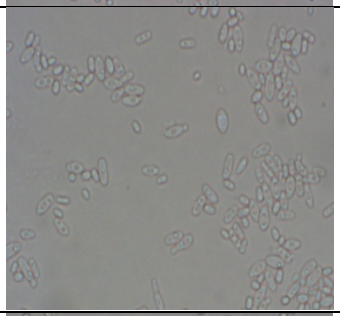
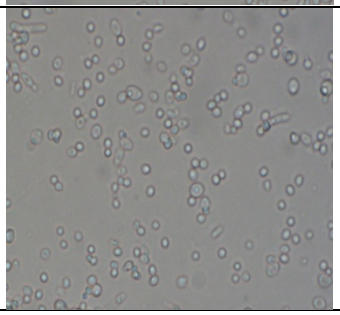
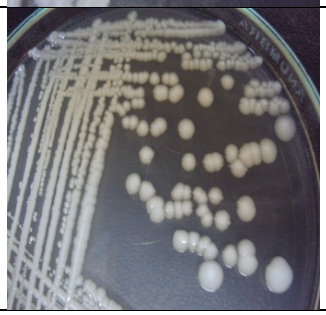
SFL 7-1				โคโลนีมีขาว มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SFL 7-2				โคโลนีมีขาว มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SFL 8				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SFL 9-1				โคโลนีสีขาว มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SFL 9-2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รี มีการแตกหน่อ
SFL 10				โคโลนีสีขาว แผ่ออก เซลล์รี พบการแตกหน่อ

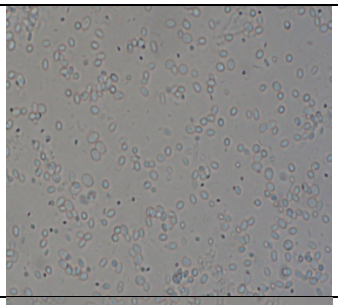
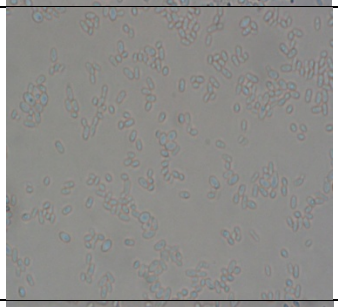
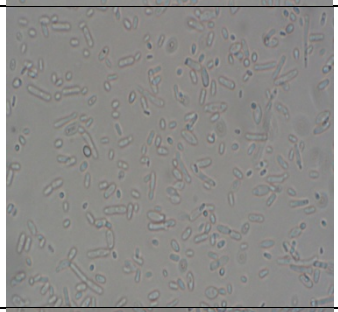
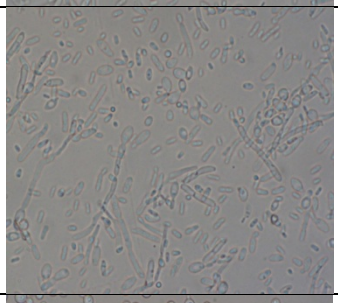
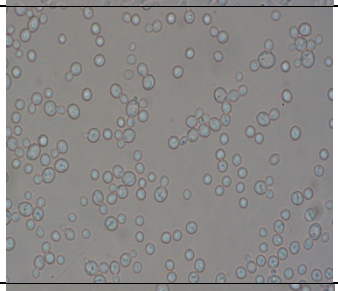
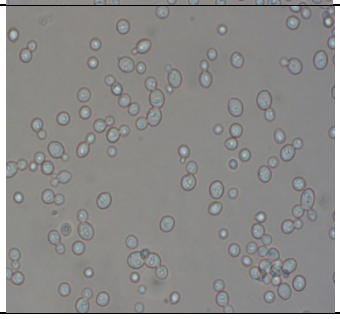
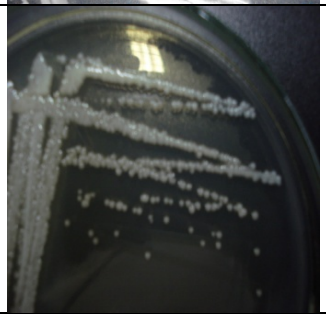
SFL 11				โคโลนีสีขาว มันวาว เซลล์กลม พบการแตกหน่อ
SFL 12				โคโลนีสีขาว แผ่ออก เซลล์กลม มีการสร้าง Psuedomycilium
SFL 13				โคโลนีสีขาว ผิวด้าน เซลล์รูปร่างกลม ค่อนข้างเล็ก พบการแตกหน่อ
SFL 14-1				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SFL 14-2				โคโลนีสีขาว ผิวด้าน เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SFL 15				โคโลนีสีขาว มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ

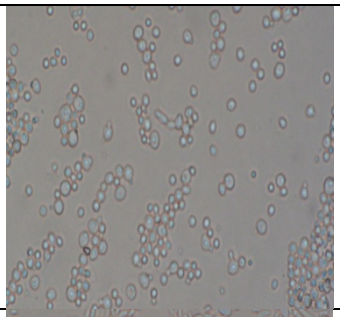
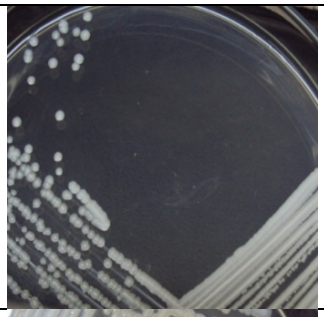
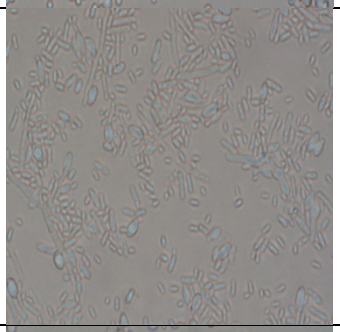
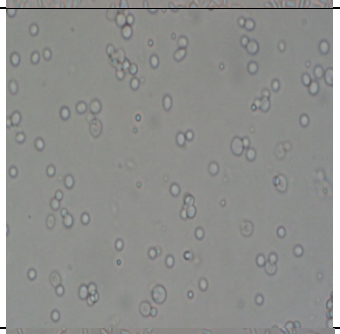
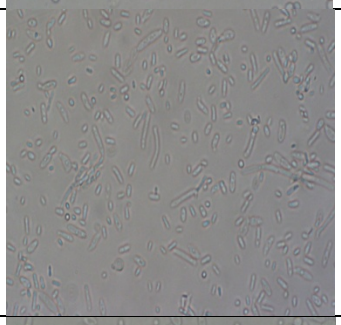
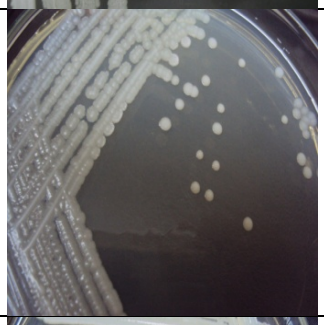
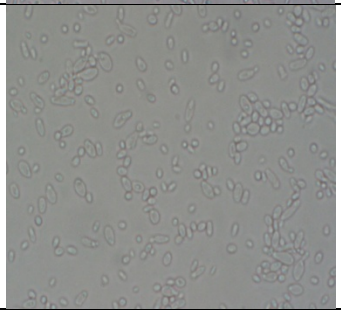
SFL 16-1				โคโลนีสีขาว มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SFL 16-2				โคโลนีสีขาวขุ่น มันวาว เซลล์รูปร่างหัวท้ายแหลม พบการแตกหน่อ
SFL 17				โคโลนีสีขาว ผิวด้าน เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SFL 18			–	โคโลนีสีขาว แผ่ออก เซลล์รูปร่างกลม มีการสร้าง *Psuedomycilium*
SFL 19				โคโลนีสีขาวขุ่น ผิวด้าน เซลล์กลม พบการแตกหน่อ

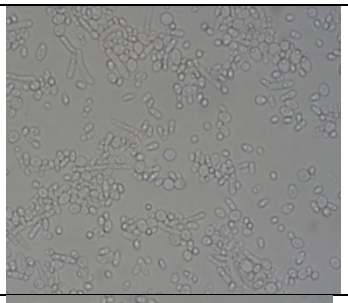
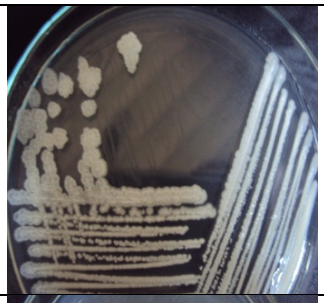
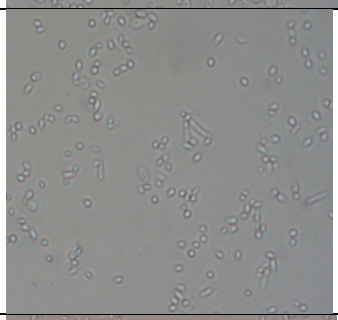
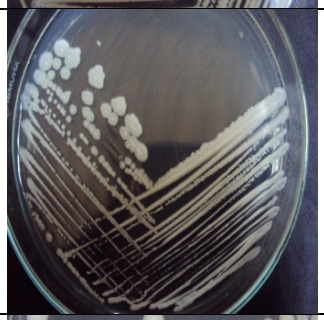
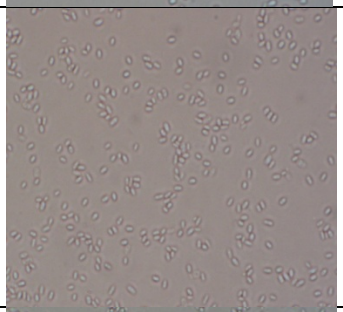
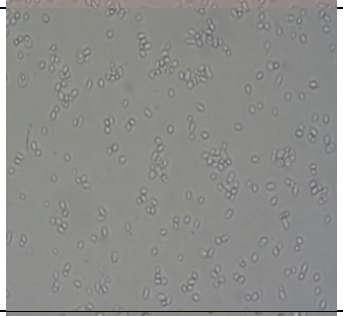
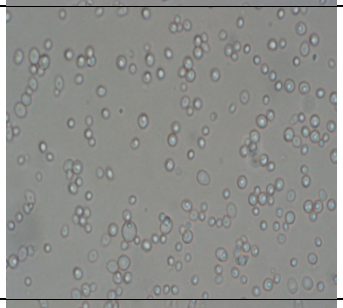
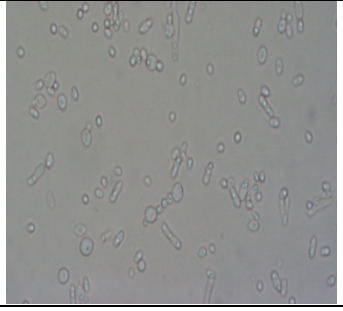
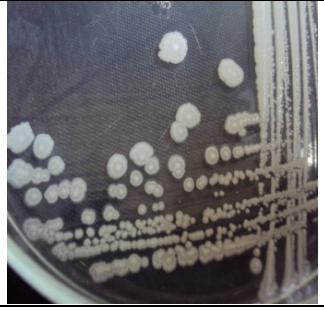
SFL 20-1				โคโลนีสีขาว ขอบไม่เรียบ ผิวด้าน เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SFL 20-2				โคโลนีสีขาว มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SFL 21				โคโลนีสีขาวขุ่น ตรงกลางนูน เซลล์กลม ค่อนข้างเล็ก พบการแตกหน่อ
SFL 22			–	โคโลนีสีขาว แผ่ออก เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SFL 23-1				โคโลนีสีขาว มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SFL 23-2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม ค่อนข้างเล็ก พบการแตกหน่อ

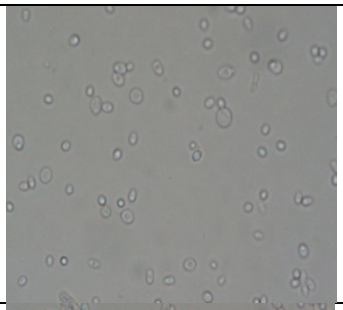
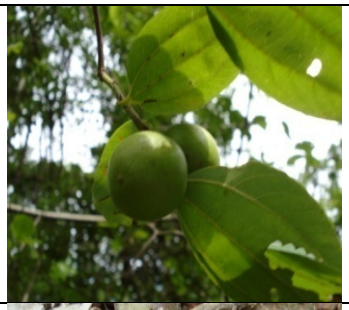
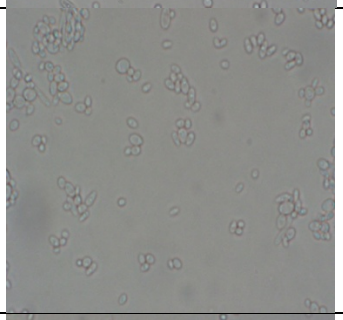
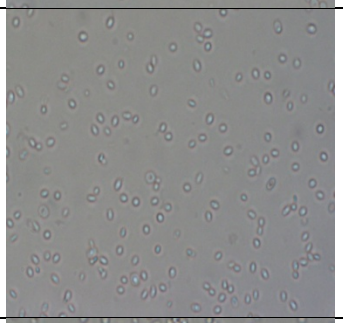
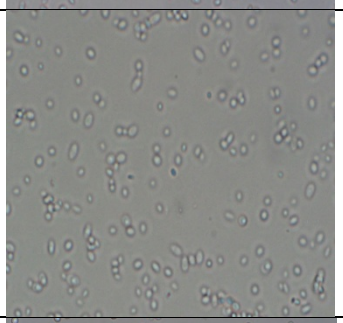
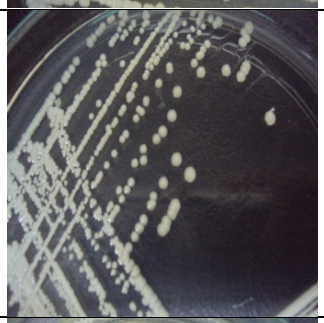
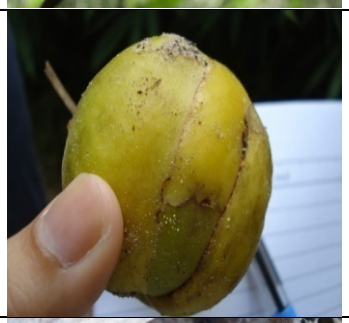
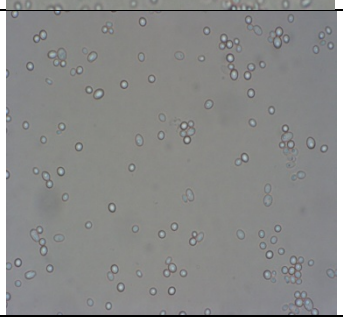
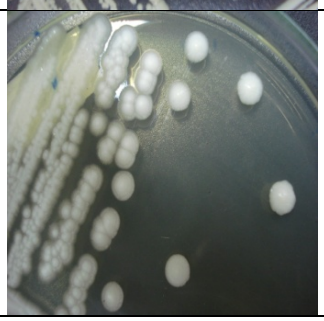
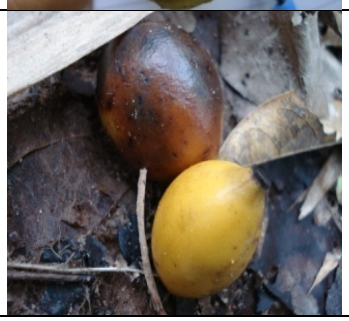
SFL 24				โคโลนีสีขาว มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SFL 25-1			-	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SFL 25-2			-	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ ผิวด้าน เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SFL 26				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SFL 27				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ

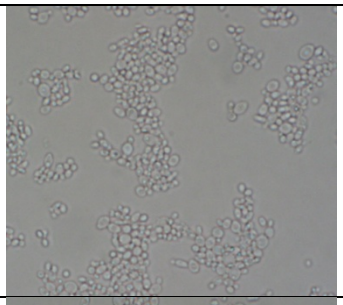
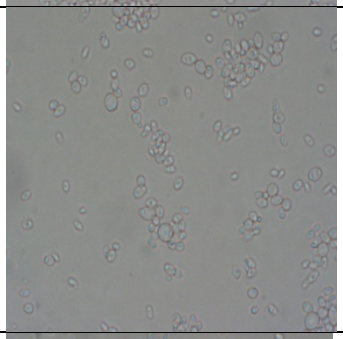
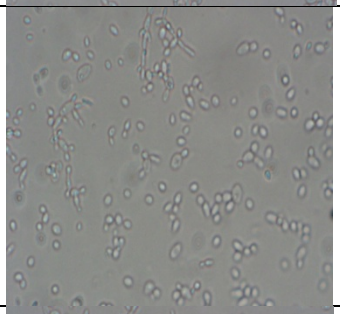
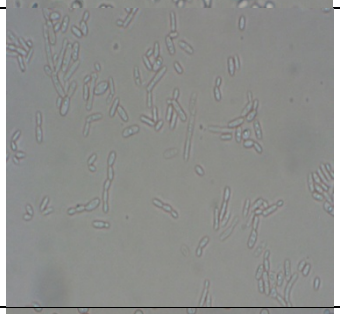
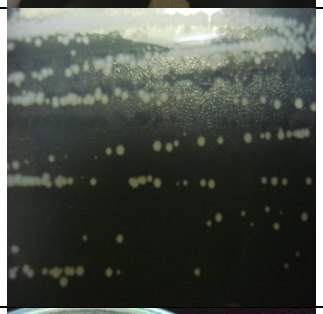
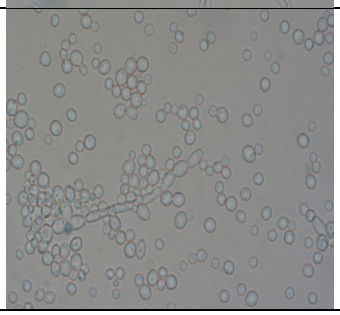
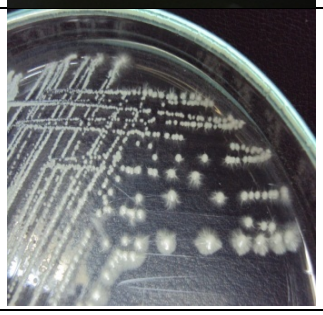
SF 1-1				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 1-2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 3			–	โคโลนีสีขาว ขอบหยัก แผ่ออก เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SF 4			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ ผิวด้าน เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ

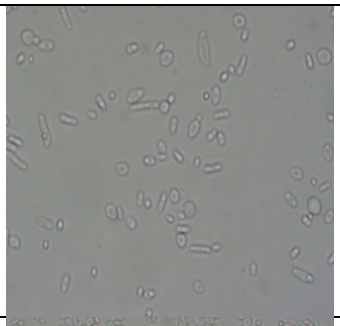
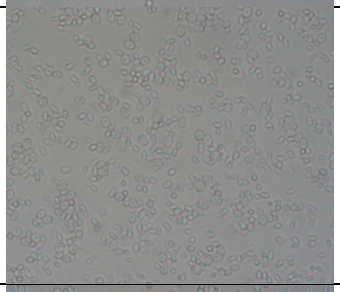
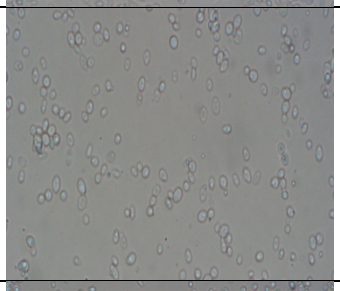
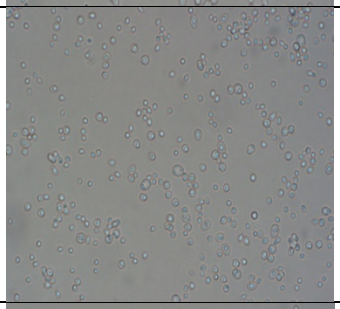
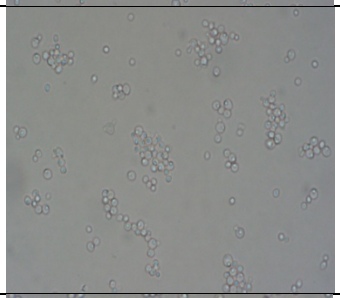
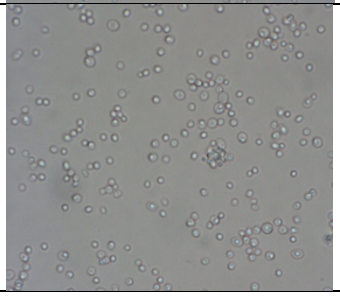
SF 5			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 6-1				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 6-2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SF 6-3				โคโลนีสีขาว ขอบไม่เรียบ เซลล์รูปร่างรี พบการสร้าง Psuedomycilium
SF 6-4				โคโลนีสีขาว ขอบไม่เรียบ เซลล์รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ พบการแตกหน่อ
SF 7-1				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ พบการแตกหน่อ

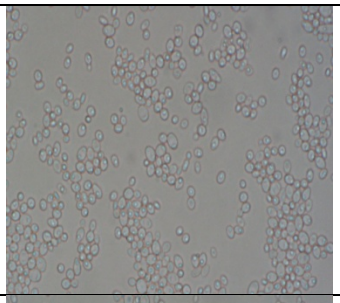
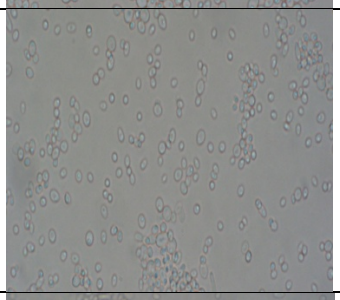
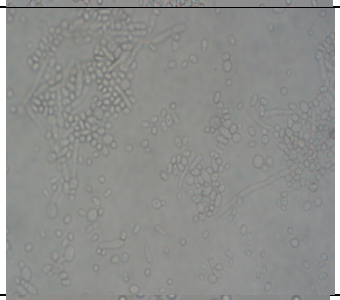
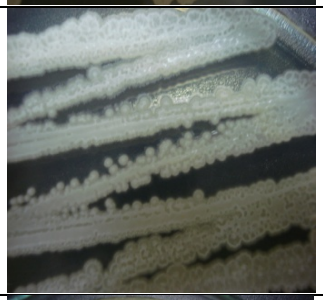
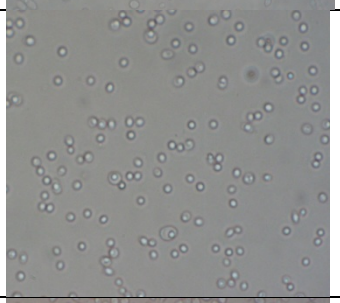
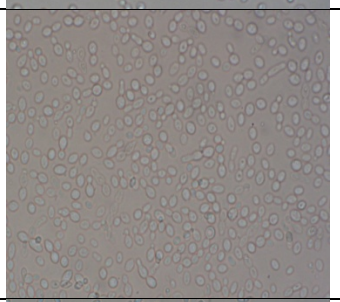
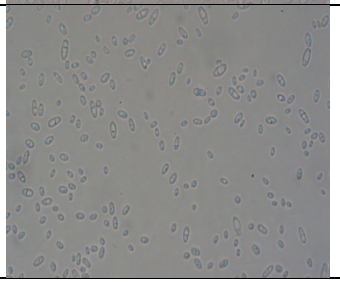
SF 7-2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 8-1				โคโลนีสีขาว แบน เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SF 8-2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 9-1				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SF 9-2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลมรี พบการแตกหน่อ

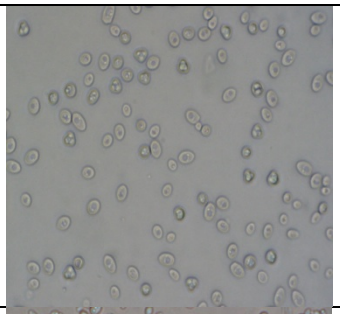
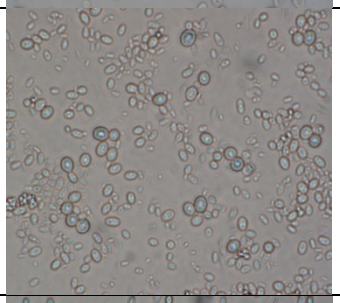
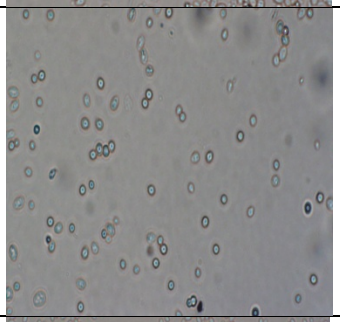
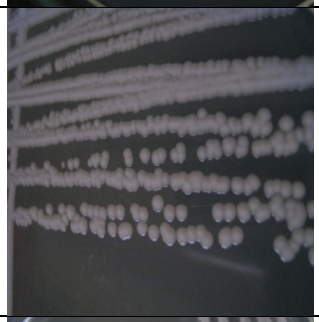
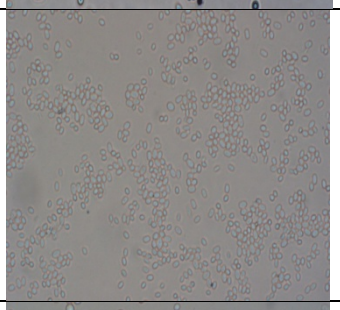
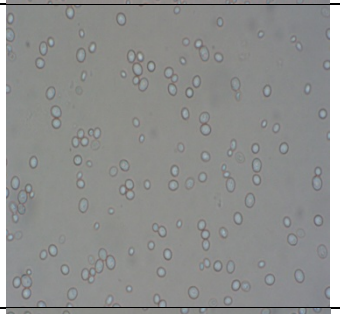
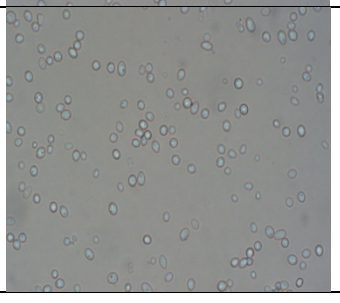
SF 10-1				โคโลนีสีขาว ขอบหยัก แผ่ออก เซลล์รูปร่างกลม พบการสร้าง Psuedomycilium
SF 10-2				โคโลนีสีขาว ขอบหยัก แบน เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 11				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ ผิวด้าน เซลล์รูปร่างกลมรี พบการแตกหน่อ
SF 12				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 13				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 14-1				โคโลนีสีขาว ขอบหยัก แผ่ออก ตรงกลางนูน เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ

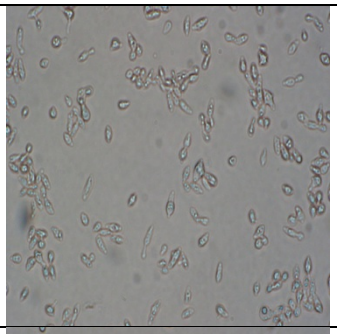
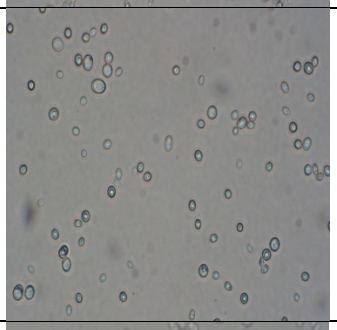
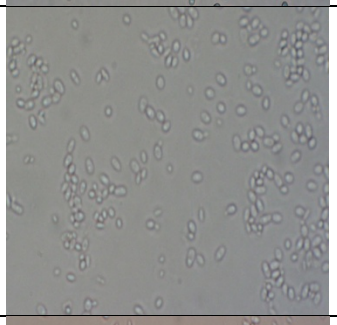
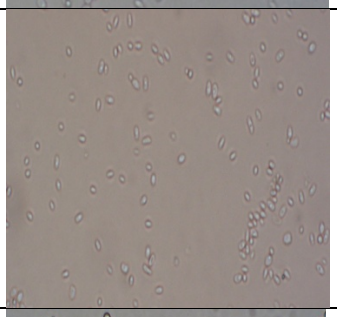
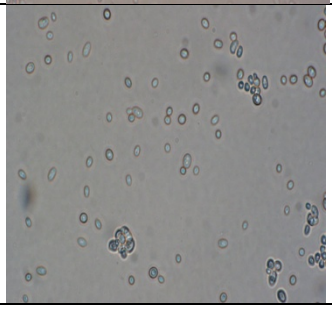
SF 14-2				โคโลนีสีขาว ขอบหยัก แผ่ออก ตรงกลางนูน เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 15				โคโลนีสีขาว ขอบหยัก แผ่ออก ตรงกลางนูน เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 16				โคโลนีสีขาว ขอบไม่เรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 17				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 18				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ ผิวด้าน เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ

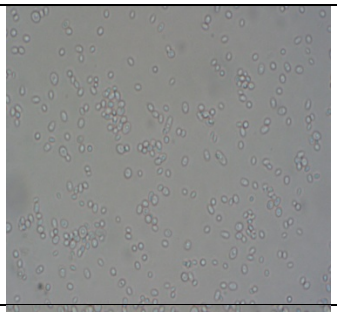
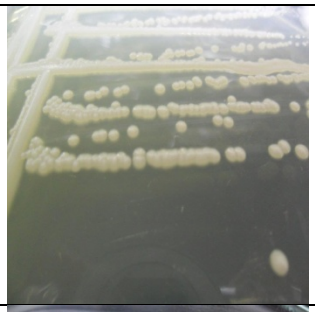
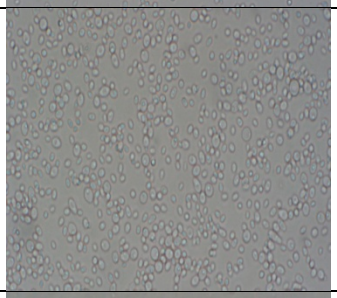
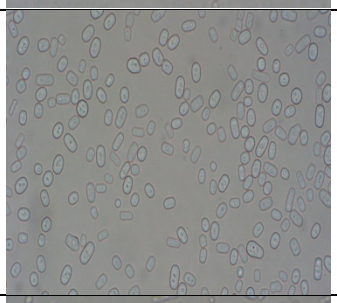
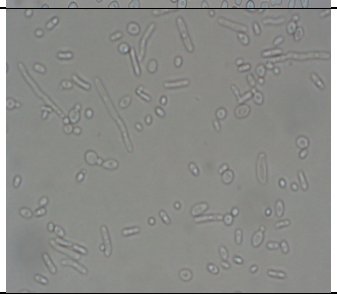
SF 19				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ แผ่ออก เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 20				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 21				โคโลนีสีขาว ขอบหยัก แผ่ออก เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 22-1				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว ขนาดเล็ก เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SF 22-2				โคโลนีสีขาว ขอบไม่เรียบ เซลล์รูปร่างกลม พบการสร้าง Psuedomycilium

SF 23				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SF 24			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SL 1			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SL 2			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SL 3				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม ขนาดค่อนข้างเล็ก พบการแตกหน่อ
SL 4			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม ขนาดค่อนข้างเล็ก พบการแตกหน่อ

SL 5			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SL 6-1				โคโลนีสีขาว ขอบหยัก แผ่ออก เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SL 6-2				โคโลนีสีขาว ขอบหยัก แผ่ออก เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SL 7-1				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SL 7-2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 1			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ แผ่ออก เซลล์รูปร่างรี ขนาดค่อนข้างเล็ก พบการแตกหน่อ

SS 2-1			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 2-2			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 3				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 4			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 5			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 6			–	โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ

SS 7				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการแตกหน่อ
SS 8				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ ตรงกลางนูน เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 9				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 10-1				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ แผ่ออก เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 10-2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลมรี พบการแตกหน่อ

SS 10-3				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 11				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลม พบการแตกหน่อ
SS 12				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างรี พบการสร้าง Psuedomycilium
SS 13-1				โคโลนีสีขาว เซลล์รูปร่างเป็นท่อน พบการแตกหน่อ
SS 13-2				โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ มันวาว เซลล์รูปร่างกลมรี พบการแตกหน่อ