

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่องนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อสืบหาสาระต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินงานวิจัยให้สำเร็จลงอย่างมีคุณภาพตามประเด็นและรายละเอียดต่อไปนี้

2.1 ลูกแป้ง

ลูกแป้ง คือ ก้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บในรูปเชื้อแห้งเป็นลูกกลมแบนๆ เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 เซนติเมตร ลูกแป้งมีการใช้มาแต่โบราณก่อนที่มนุษย์จะเข้าใจถึงศาสตร์ทางจุลชีววิทยา โดยเชื่อกันว่ามีต้นกำเนิดจากประเทศจีน และถ่ายทอดไปยังประเทศเพื่อนบ้าน หรือที่ชาวตะวันตกรู้จักกันในชื่อ “chinese yeast cake” โดยมีชื่อเรียกที่ต่างกันไปในแต่ละประเทศ ลูกแป้งมีหลายชนิดคือ ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งน้ำส้มสายชู และลูกแป้งขนมถ้วยฟู รายละเอียดที่เกี่ยวกับการเรียกชื่อของลูกแป้งในแต่ละท้องถิ่นและประโยชน์ใช้สอยปรากฏในตารางที่ 1 ซึ่งจะใช้ในการหมักเพื่อให้เกิดกิจกรรมการเปลี่ยนแป้งในวัตถุดิบประเภทธัญพืชและพืชหัวให้เป็นน้ำตาล เพื่อผลิตอาหารหมักประเภท ข้าวหมาก น้ำส้มสายชู สุรา และเมรัย เช่น กระแช่ สาโท หรือ อุ (ไพบูรณ์ และ พัฒนา, 2548) สำหรับในประเทศไทยนั้นยังมีลูกแป้งที่ใช้ในการหมักน้ำส้มสายชูจากวัตถุดิบพวกข้าว ซึ่งเรียกว่า “สำน้ำส้ม” (สมพร, 2544 อ้างโดย นภา, 2537)

ปัจจุบันลูกแป้งในประเทศไทยสามารถผลิตได้เองโดยจะต้องได้รับการอนุญาตจัดตั้งและผลิตอย่างถูกต้องตามระเบียบของกรมสรรพสามิตว่าด้วยการทำและขายแป้งข้าวหมาก พ.ศ. 2544 (กรมสรรพสามิต, 2544) และปัจจุบันได้มีการจดทะเบียนขึ้นมากมายในนาม โรงกลั่นสุราชุมชน ของหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (OTOP) โดยได้รับการสนับสนุนจากรัฐบาลอีกด้วย

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของลูกแป้ง

ลูกแป้งที่ดีจะโปร่งเบา สีขาวนวล ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูปพูน ซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม เมื่อขยี้จะยุบเป็นผงละเอียด ไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว มีรูปร่างและขนาดต่างๆ กัน ลูกแป้งส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นวงกลม หรือว่ากลมรี ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3-4 เซนติเมตร บางที่ก็มักนิยมปั้นเป็นก้อนขนาดใหญ่ประมาณ 5-6 เซนติเมตรและมีกลิ่นเครื่องเทศ จนจัด (มณชัย , 2546)

ตารางที่ 1 การเรียกลูกแป้งตามภาษาท้องถิ่นและการใช้ประโยชน์

ประเทศ	ชื่อท้องถิ่น	ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ลูกแป้ง
จีน	ซิเหยว , เป้เหยว	ข้าวหมาก, เครื่องดื่มประเภทกระแช่
	ชิ-ซู	สุราจากข้าว
ไต้หวัน	เพคคา (pekka)	สุราจากข้าว
ทิเบต	ฟับ (phab)	เครื่องดื่มประเภทกระแช่, สุราจาก
ลีซิม	ลีเวน (levian)	ข้าว
อินเดีย	บุคคาร์ (bukha)	เครื่องดื่มประเภทกระแช่, สุราจาก
	เมอร์ชา (mercha)	ข้าว
	รามู (ramur)	เครื่องดื่มประเภทกระแช่, สุราจาก
เกาหลี	นุรุก	ข้าว
	ชิ – ซู	
อินโดนีเซีย	ราจิฮาเป้	
	ราจิเบลาส	สุราจากข้าว
	ราจิพอยยัม	สุราจากข้าว
		ข้าวหมาก
	ราจิเทมเป้	เครื่องดื่มประเภทกระแช่
มาเลเซีย	ราจิมาไป, จูเปียง	มันสำปะหลังหมักแบบข้าวหมาก
ฟิลิปปินส์	นูปอท	(tape ketela)
ไทย	ลูกแป้งข้าวหมาก	เทมเป้
	ลูกแป้งเหล้า	เครื่องดื่มประเภทกระแช่
	แป้งเชื้อสุรา	เครื่องดื่มประเภทน้ำตาลเมา
	ลูกแป้งน้ำส้ม, สำน้าส้ม	ข้าวหมาก
		กระแช่, สาโท, อุ
		สุราจากข้าว
		น้ำส้มสายชู

ที่มา : นภา (2541)

2.1.2 ชนิดของลูกแป้ง

ลูกแป้งที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักเบียร์ออกเป็น 3 ประเภทตามลักษณะของปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก ได้แก่

1) ลูกแป้งชนิดเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลเพียงอย่างเดียว

ลูกแป้งประเภทนี้ได้แก่ลูกแป้งหวานหรือลูกแป้งข้าวหมาก เชื้อที่ได้จากแป้งประเภทนี้คือ เชื้อรา *Mucor* sp. ซึ่งมีหน้าที่ย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล ที่เรียกว่า น้ำต้อยในข้าวหมาก น้ำตาลที่ได้นั้นส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาลมอลโตส (maltose) น้ำต้อยนี้จะมีรสหวานจัดและซ่านิดๆ เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก

2) ลูกแป้งชนิดเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลและแอลกอฮอล์

ลูกแป้งชนิดนี้ทำหน้าที่เปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล แล้วเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ไปด้วย โดยทั่วไปเรียกลูกแป้งชนิดนี้ว่า ลูกแป้งเล็กหรือลูกแป้งกลาง ตามขนาดของลูกแป้ง แต่ชาวบ้านมักจะเรียกว่า “ลูกแป้งเหล้า” ลูกแป้งชนิดนี้มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมสุราพื้นบ้านเป็นอย่างมาก เพราะสามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลและเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ได้โดยที่มีการเติมเชื้อเพียงครั้งเดียว สุราที่ใช้ข้าวเป็นวัตถุดิบผลิตมักใช้ลูกแป้งชนิดนี้เช่นกัน

3) ลูกแป้งชนิดที่เปลี่ยนแต่น้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์

ลูกแป้งชนิดนี้ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว ไม่สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นแอลกอฮอล์ในขั้นตอนเดียว เรียกว่า “ลูกแป้งใหญ่” เนื่องจากมีขนาดใหญ่ที่สุดในบรรดาลูกแป้งด้วยกัน การที่ทำลูกแป้งชนิดนี้ให้มีขนาดใหญ่ก็เพื่อให้ลูกแป้งมีพื้นที่ผิวมาก เพื่อให้ยีสต์ปริมาณมากขึ้น ลูกแป้งชนิดนี้ใช้ผสมน้ำตาลเพียงอย่างเดียว โดยยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ หากผสมกับแป้งหรือข้าวจะไม่ได้ผล จะใช้ผลิตสุราที่ใช้น้ำเหลืองอ้อยหรือกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการหมัก (พิชญาพร, 2542)

2.1.3 วัตถุดิบในการผลิตลูกแป้ง

1) ข้าวหรือแป้ง

ในการผลิตลูกแป้งสามารถใช้ได้ทั้งแป้งข้าวเจ้าและข้าวเหนียว แต่ผลจากการศึกษาพบว่าลูกแป้งที่ผลิตโดยข้าวเจ้าล้วนจะมีคุณภาพดีกว่าผลิตด้วยข้าวเหนียว หรือแป้งข้าวเจ้าผสมข้าวเหนียว ตามตำรับดั้งเดิม ผู้ผลิตจะบดแป้งใช้เป็นคราวๆ ไป นิยมใช้แป้งสำเร็จทั้งนี้เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ซึ่งอาจมีอยู่ในแป้งที่ผลิตและเก็บโดยขาดความระมัดระวัง เนื่องการผลิตแป้งสำเร็จเป็นการค้าส่วนใหญ่จะมีการเติมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อรา เช่น กรดโพรปิโอนิก (propionic acid) สารเหล่านี้มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อราและเชื้อยีสต์จากการรายงานพบว่าการใช้แป้งที่ผลิตเป็นทางการค้าให้ผลดีกว่าการใช้แป้งที่ผลิตเอง และจาก

การตรวจวิเคราะห์พบว่าแป้งที่ผลิตขายในทางการค้าในปัจจุบัน ที่บรรจุถุงพลาสติกปิดสนิท มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนน้อยมากอีกทั้งสะดวกกว่าและประหยัดเวลาได้พอสมควร (สุภาพ, 2546)

2) สมุนไพร และเครื่องเทศ

เป็นส่วนผสมสำคัญที่แต่ละท้องถิ่นจะมีสูตรของการผสม และสมุนไพรชนิดต่างๆ ที่ใช้ผลิตลูกแป้งแตกต่างกันไป และมักจะเก็บเป็นความลับที่ถ่ายทอดกันเฉพาะครอบครัวเท่านั้น สำหรับสมุนไพรหลักที่เป็นองค์ประกอบพื้นฐานในการผลิตลูกแป้ง ได้แก่ ขิง ข่า กระเทียม พริกไทย พริกชี้ฟ้าแห้ง ชะเอม ดีปลี ซึ่งจะพบเป็นส่วนผสมในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าไทยเกือบทุกชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2, 3 และ 4 เป็นตัวอย่างสูตรลูกแป้งข้าวหมาก และลูกแป้งสุรา นอกจากปริมาณและชนิดของสมุนไพรแล้ว สิ่งสำคัญอีกประการหนึ่งคือ คุณภาพของสมุนไพรจะต้องแห้งสนิทปราศจากการเจริญของเชื้อรา ส่วนที่เป็นของสดจะต้องตัดส่วนที่เน่าเสียออกก่อน (พุทธรินทร์, 2527) ความเก่าใหม่ของสมุนไพรที่ใช้ถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่ง เนื่องจากว่าสารออกฤทธิ์ส่วนใหญ่เป็นสารระเหย การเก็บสมุนไพรเป็นระยะเวลานาน ๆ จะส่งผลให้สารเหล่านี้ลดปริมาณลง โดยเฉพาะสมุนไพรที่เก็บไว้ในลักษณะเป็นผงละเอียด อัตราการระเหยก็จะยิ่งเป็นไปอย่างรวดเร็วส่งผลทำให้สมุนไพรชนิดนั้นเสื่อมคุณภาพได้ ดังนั้นควรเลือกซื้อและเก็บสมุนไพรชนิดที่ยังไม่ได้บดแล้วนำมาบดใช้เป็นคราว ๆ ไป (สุภาพ, 2546) สมุนไพรเหล่านี้ทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ไม่ต้องการใน ลูกแป้ง เนื่องจาก การที่สมุนไพรหรือว่าเครื่องเทศมีน้ำมันหอมระเหยซึ่งเป็นส่วนประกอบ ด้วยองค์ประกอบหลายชนิดได้แก่ แอลกอฮอล์ เอสเตอร์ เทอร์ปีน ฟีนอล เรซิน อัลคาลอยด์ กรดอินทรีย์ สารประกอบที่มีกำมะถัน และสารอื่น ๆ ซึ่งโดยทั่วไปน้ำมันหอมระเหยเหล่านี้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าการฆ่า เนื่องจากมีปริมาณไม่เพียงพอที่จะไปทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ (สมพร, 2544)

3) น้ำ

ปริมาณน้ำที่ใช้มีความสำคัญมากในการควบคุมความชื้นของลูกแป้ง ผู้ทำต้องกะให้พอเหมาะไม่แฉะจนเกินไป ซึ่งจะทำให้ลูกแป้งเหม็นเปรี้ยวและเสียได้หรือแห้งจนเกินไปจนลูกแป้งแตกหรือราเจริญในลูกแป้งได้ไม่ดี นอกจากนี้ความชื้นที่พอเหมาะยังมีผลต่อการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในลูกแป้งให้อยู่ได้นานอย่างมีประสิทธิภาพอีกด้วย

4) ลูกแป้งเดิม

ซึ่งใช้เป็นแหล่งจุลินทรีย์จะต้องเป็นลูกแป้งที่ไม่เก็บไว้นานจนเกินไปหรือลูกมอดกินหรือใช้ลูกแป้งซึ่งมีเชื้อราอื่นปนเปื้อนอยู่ภายนอกจนเห็นได้ชัด

5) รำหยาบหรือแกลบ

เป็นส่วนผสมที่ใส่ลงไป เพื่อให้ลูกแป้งโปร่งมีอากาศเข้าได้มาก ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญสามารถเจริญได้ดี ในบางสูตรไม่ใช้

6) จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในลูกแป้งที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักในลูกแป้ง มีส่วนผสมของเชื้อราและยีสต์ โดย เชื้อรา ทำหน้าที่ย่อยแป้งได้มีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อราที่มีเส้นใยสีขาวฟู เชื้อราที่มีเส้นใยสีเทาดำ เชื้อราที่มีเส้นใยสีเทาเหลือง เชื้อราที่มีเส้นใยสีเหลืองเขียว และบางชนิดมีสีดำ เชื้อยีสต์ ทำหน้าที่ทำการหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ (สมพร, 2544)

ตารางที่ 2 สูตรลูกแป้งข้าวหมาก

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

ที่มา : นภา (2541)

ตารางที่ 3 สูตรลูกแป้งสุรา

องค์ประกอบ	ปริมาณ(กรัม)
ชะเอม	40
พริกไทย	6
ดีปลี	6
กระเทียม	40
ขิง	40
ข่า	20
หัวหอม	20
ข้าวเจ้า	2500

ที่มา : นภา (2541)

ตารางที่ 4 สูตรการผลิตลูกแป้งเหล้า

องค์ประกอบ	ปริมาณ (กรัม)
เครื่องเทศ	30
ข้าว	300
กระเทียม	100
แป้งข้าวเหนียว	850
ดอกจันทร์	15
เปราะหอม	15
กานพลู	15
โกฐพุงปลา	15
พริกไทยขาว	50
ขิงแห้ง	25
ดีปลี	50
ลูกจันทร์เปลือก	40
แปดกลีบ	15
ชะเอมไทย	130
อบเชย	100
จะค่าน	100
รากไคร้เครือ	100
เจตมูลเพลิงแดง	30
โกฐสอ	50
มะตูมแห้ง	75
โกบจุฬาลัมพา	25

ที่มา : พิษณุพร (2542)

2.1.4 กรรมวิธีการผลิตลูกแป้ง

ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบและการปั้นลูกแป้งเพื่อผลิตลูกแป้ง ดังแสดงภาพที่ 2.2 โดยมีรายละเอียดดังต่อไปนี้

1) เตรียมแป้งโดยซาวข้าวให้สะอาด แช่วัไว้ประมาณ 2- 3 ชั่วโมง นำไปโม่ให้ละเอียดแล้วทับน้ำให้แห้ง หรือทำให้ข้าวสะเด็ดน้ำเสียก่อนแล้วจึงนำไปบดหรือปั่นด้วยเครื่องปั่นไฟฟ้าให้ละเอียดแล้วร่อนด้วยร่อน การแช่ข้าวนานเกินไปโดยไม่มีการเปลี่ยนน้ำ จะมีผลทำให้

แบคทีเรียแลคติก และ *Bacillus* spp. เจริญเพิ่มจำนวนในปริมาณมาก ทำให้ลูกแบ่งที่ผลิตได้
ด้อยคุณภาพ

2) บดสมุนไพรชนิดแห้งให้ละเอียด สมุนไพรสดอาจนำไปบดพร้อมกับข้าว

3) ผสมแบ่งและสมุนไพรและสมุนไพรกับลูกแบ่งเก่า ในอัตราส่วน ลูกแบ่ง 5
กรัม ต่อแบ่ง 1 กิโลกรัม บดละเอียด เติมน้ำหรือน้ำชะเอม ในปริมาณที่เมื่อนวดแบ่งแล้วจะปั้น
เป็นก้อนได้ ปริมาณน้ำที่ใช้นั้นกำหนดไม่ได้แน่นอนขึ้นอยู่กับความแห้งของแบ่งที่ใช้ ปริมาณ
สมุนไพรสดซึ่งแตกต่างในแต่ละสูตร และสภาวะความชื้นในบรรยากาศขณะที่บ่มลูกแบ่งซึ่งล้วน
แต่ต้องอาศัยประสบการณ์ของผู้ผลิต

4) เมื่อนวดแบ่งจนเหนียวแล้วจึงปั้นเป็นก้อนกลมขนาดต่างๆ กันตามชนิดของ
ลูกแบ่งนั้น

5) เรียงลูกแบ่งบนกระดังหรือภาชนะที่โปร่ง ให้แต่ละลูกห่างกัน เนื่องจากเมื่อ
จุลินทรีย์เจริญจะทำให้ลูกแบ่งฟูขึ้น ส่วนของลูกแบ่งด้านที่ติดกับภาชนะจะแบบราบตามผิวที่
สัมผัส โดยที่ด้านบนยังคงรูปร่างโค้งเป็นครึ่งวงกลม สำหรับการปั้นลูกแบ่งขนาดใหญ่เมื่อเรียง
บนภาชนะแล้วควรกดด้านบนลงเล็กน้อย เพื่อให้ลูกแบ่งบางลง จุลินทรีย์ภายในก้อนแบ่งจะมี
โอกาสมากขึ้น

6) เมื่อเรียงลูกแบ่งเต็มภาชนะแล้ว โรยผงลูกแบ่งที่เตรียมไว้ลงบนผิวของ ลูก
แบ่งที่ปั้นใหม่ โดยใช้ผงลูกแบ่งประมาณ 15 กรัม ต่อสูตรที่ใช้แบ่ง 1 กิโลกรัม คลุมภาชนะด้วย
ผ้าหนา ๆ โดยไม่ให้ผ้าสัมผัสกับผิวลูกแบ่ง บ่มประมาณ 48 ชั่วโมง นำไปตากแดดให้แห้งแล้ว
เก็บในภาชนะที่ปิดฝาสนิท การที่ลูกแบ่งได้รับแสงแดดโดยตรงจะทำให้ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์
ลดลงไปบ้าง ซึ่งเป็นผลจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) ดังนั้นจึงควรตากลูกแบ่งที่มีแผ่นกระจกใส
กันแสงอยู่ด้านบนโดยเว้นระยะระหว่างผิวลูกแบ่งและกระจกให้อากาศถ่ายเทได้ นอกจากนั้น
การทำให้ลูกแบ่งแห้งอย่างได้ผลดีอีกวิธีหนึ่ง คือการอบในตู้อบ

การผลิตลูกแบ่งสิ่งที่ควรระวัง คือ การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่
ต้องการ เนื่องจากไม่สามารถเพาะเชื้อจุลินทรีย์ในสภาวะที่ปลอดเชื้อได้ ดังนั้นจึงต้องมีการลด
ปริมาณการปนเปื้อนและป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ทุกขั้นตอนของการ
ผลิตลูกแบ่งได้แก่ การเลือกวัตถุดิบ การรักษาความสะอาดในทุกขั้นตอนของการผลิต การ
ควบคุมปริมาณความชื้นนั้น จะต่ำกว่าที่จะเอื้ออำนวยต่อการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อน
และเลือกใช้สมุนไพรทั้งชนิดและปริมาณ ที่จะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน
โดยไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ลูกแบ่ง ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของลูกแบ่งที่ผลิต

2.1.5 การเก็บรักษาลูกแป้ง

ลูกแป้งที่เก็บไว้ใช้ในระยะเวลาสั้นๆ จะต้องแห้ง โดยควรมีค่าความชื้นต่ำกว่า 12% เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อราบนเปลือกบางชนิดและควรเก็บในภาชนะปิดสนิททันที โดยที่แน่ใจว่าแมลงจะไม่สามารถเจาะผ่านไปได้ ลูกแป้งที่เก็บโดยขาดความระมัดระวังจะมีปัญหาจากแมลงพวกมอดและมวนต่าง ๆ การเก็บลูกแป้งในตู้เย็นในภาชนะปิดสนิท จะลดปัญหาการถูกทำลายโดยแมลง และทำให้เชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้งลดจำนวนชั่วคราว ลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าโดยทั่ว ๆ ไป เมื่อแห้งแล้ว และเก็บในภาชนะที่ปิดสนิทจะใช้เป็นกล้าเชื้อได้อย่างน้อยที่สุดประมาณ 6 เดือน ลูกแป้งข้าวหมากจากบางแหล่งเก็บไว้ได้นานถึง 18 เดือน ถึงแม้ว่าปริมาณจุลินทรีย์ในลูกแป้งจะลดลงตามระยะเวลาที่เก็บ แต่ปริมาณที่เหลือจะเพียงพอสำหรับเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมัก โดยคุณสมบัติในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลไม่เปลี่ยนแปลง ซึ่งตามปกติแล้ว *Amylomyces rouxii* เป็นเชื้อราที่เก็บรักษาค่อนข้างยาก กล่าวคือเมื่อเก็บในสภาพเชื้อสดในตู้เย็นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA agar) คุณสมบัติของเชื้อจะเปลี่ยนไปค่อนข้างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับเชื้อราชนิดอื่นๆ ดังนั้นจึงนับได้ว่ากรรมวิธีการผลิต ลูกแป้งเป็นวิธีการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ด้วยเทคโนโลยีที่เหมาะสม ซึ่งได้มีการพัฒนาเป็นระยะเวลานาน ก่อนที่จะค้นพบวิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์โดยอาศัยหลักการทางวิทยาศาสตร์

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ในลูกแป้ง

2.2.1 รา

ในการผลิตสาโท หรือสุรากลั่นที่ผลิตจากข้าว จะต้องมีการย่อยข้าว ให้เป็นน้ำตาลเสียก่อนแล้วเชื้อยีสต์จะหมักน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ภูมิปัญญาไทยใช้การหมักข้าวด้วยลูกแป้ง ซึ่งมีเชื้อราอยู่ตามธรรมชาติ เช่น *A. rouxii*, *Rhizopus oryzae* เป็นต้น ในการผลิตสุราจากข้าวเชิงอุตสาหกรรม มีความจำเป็นต้องใช้เชื้อราแทนการใช้ลูกแป้ง เพื่อใช้สามารถผลิตสุราที่คุณภาพสม่ำเสมอ การผลิตเชื้อราที่ใช้ในการหมักข้าว จึงต้องคัดเลือกเชื้อราจากลูกแป้งที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการหมัก แล้วนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนสปอร์ของเชื้อรา โดยอาจเลี้ยงบนปลายข้าว หรือแป้งผสมกับรำข้าว เพื่อเพิ่มสารอาหารให้กับรา เมื่อราสร้างสปอร์แล้วจึงนำไปอบแป้งเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อต่อไป ราที่พบในลูกแป้งจากการศึกษาของนักวิจัยหลายคณะพบว่า ราที่พบมากที่สุดได้แก่ *Rhizopus* spp. และ *A. rouxii* นอกจากเชื้อราหลัก ๆ ที่กล่าวมายังพบเชื้อราชนิดอื่น ดังแสดงในตารางที่ 5 (ศิริ, 2546)

ตารางที่ 5 เชื้อราที่พบในลูกแป้งชนิดต่างๆ

ชนิดลูกแป้ง	เชื้อรา
ลูกแป้งข้าวหมาก	<i>A. rouxii</i> , <i>Rhizopus</i> spp. , <i>Mucor</i> spp. , <i>Aspergillus</i> spp. , <i>Penicillium</i> spp. , <i>Hyalodendron</i> spp.
ลูกแป้งเหล้า	<i>Rhizopus</i> spp. , <i>A. rouxii</i> , <i>Mucor</i> spp. , <i>Aspergillus</i> spp. , <i>Penicillium</i> spp.
ที่มา : ศิระ (2546)	

2.2.2 ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ใช้หมักน้ำตาลให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ ยีสต์ที่ใช้ คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ที่มีหลายสายพันธุ์มาก แต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติแตกต่างกัน เช่นยีสต์ที่ใช้ทำขนมปัง (baker yeast) จะผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา แต่ผลิตแอลกอฮอล์ได้น้อยและให้กลิ่นรสที่ไม่ดีเท่ากับยีสต์ที่ใช้ทำไวน์โดยเฉพาะ ส่วนยีสต์ที่ใช้หมักกากน้ำตาลสำหรับผลิต สุราขาว หรือเหล้ารัม จะมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตในกากน้ำตาลได้อย่างรวดเร็วและผลิตแอลกอฮอล์ได้ก่อนที่น้ำหมัก จะถูกแบคทีเรียปนเปื้อนเสียก่อน ดังนั้นในการผลิตสุราแต่ละชนิด จึงควรเลือกยีสต์ให้เหมาะสมกับชนิดสุรานั้นๆ ยีสต์ที่มีความสามารถผลิตเอโนไซม์ ย่อยแป้งได้ แต่ในลูกแป้งกลับไม่ค่อยพบยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ทำไวน์ ซึ่งขัดกับความเชื่อดั้งเดิมที่ว่า ลูกแป้งเป็นแหล่งของยีสต์นี้ ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทำให้เกิดการหมัก เพราะผลิตแอลกอฮอล์ได้เมื่อเกิดกระบวนการหมักแล้ว เอโนไซม์อัมัยเลสที่ปล่อยออกนอกเซลล์ โดยหลังจากที่เอโนไซม์เหล่านี้ไฮโดรไลซ์แป้งเป็นน้ำตาลแล้วยีสต์นำไปใช้โดยพวก brewer's yeastสามารถใช้กลูโคส ฟรุคโตส มอลโทส ซูโครส และมอลโตไตรโอสได้ในขณะที่ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้ ไอโซมอลโทสได้ ซูโครสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่จะถูกไฮโดรไลซ์โดยเอโนไซม์ที่อยู่นอกเซลล์อีกชนิดหนึ่งคืออินเวอร์เตส ได้เป็นกลูโคสและฟรุคโทสก่อนจึงจะนำเข้าสู่เซลล์ได้ เมื่อกลูโคสผ่านสู่เซลล์จึงมีการเติมฟอสเฟตโดยมีเอโนไซม์ไคเนส เร่งปฏิกิริยาทั้งนี้ใน *S. cerevisiae* มีไคเนส 3 ชนิด คือ เฮกโซไคเนส I , เฮกโซไคเนส II และกลูโคไคเนส ส่วนในยีสต์อื่น เช่น *Rhodotorula glutinis* มีไคเนส 2 ชนิด เฮกโซไคเนส I, เฮกโซไคเนส II ไพรูเวทที่สร้างขึ้นจากวิถีไกลโคไลซิสสามารถถูกเปลี่ยนไปจนได้เอซิลแอลกอฮอล์ ในยีสต์บางชนิดโดยเฉพาะ *S. cerevisiae* การหมักเอซิลแอลกอฮอล์เริ่มจากไพรูเวทเกิดดีคาร์บอกซิเลชัน โดยมีเอโนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาให้

อะซิทาลดีไฮด์ซึ่งรีดิวส์ต่อไปเป็นเอริธแอลกอฮอล์ โดยมี NADH_2 – dependent alcohol dehydrogenase เป็นเอนไซม์เร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญ ถูกกระตุ้นโดยฟอสเฟตและเมื่อเชื้อเจริญบนกลูโคสจะเหี่ยวนำไปให้มีการสร้าง

แต่ในทางปฏิบัติปริมาณเอริธแอลกอฮอล์ที่ได้ต่ำกว่านี้ เนื่องจากน้ำตาลส่วนหนึ่งจะถูกยีสต์นำไปใช้ในการเจริญเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ บางส่วนถูกนำไปใช้สังเคราะห์ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ เช่น กลีเซอรอล เอสเทอร์ อัลดีไฮด์ เอมีลแอลกอฮอล์ ไอโซเอมีลแอลกอฮอล์ ไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ ฟิวเซลอยล์และกรด โดยทั่วไปเอริธแอลกอฮอล์ที่ได้จะประมาณ 80-95 เปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ เช่น เอริธแอลกอฮอล์จากการหมักกากน้ำตาลจะได้เพียง 80-90 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เนื่องจากในกากน้ำตาลประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ทั้งที่ยีสต์หมักได้และหมักไม่ได้ น้ำตาลที่ *S. cerevisiae* หมักได้ เช่น กลูโคส ฟรุคโตส แมนโนส ซูโครส มอลโทส กาแลกโทส และราไฟโนส ซึ่งหมักได้ 1-3 ของโมเลกุลส่วนน้ำตาลชนิดที่หมักเป็นเอริธแอลกอฮอล์ไม่ได้ เช่น ซาโลส ดังนั้นในการหมักเอริธแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จะพบว่า น้ำตาลเหลือ 1-2 เปอร์เซ็นต์ ภายหลังสิ้นสุดการหมักแล้ว (สมพร, 2544)

ส่วนใหญ่ยีสต์ที่พบในการแยกเชื้อจากลูกแป้งข้าวหมาก ได้แก่ *Endomycopsis* spp. และ *H. malanga* โดยมี *S. cerevisiae* เป็นบางส่วนลูกแป้งเหล้าจะพบ *S. cerevisiae* ในปริมาณที่มากกว่า *Endomycopsis* spp. นอกจากนี้ยังพบ *Candida* spp. , *Torulopsis* spp. ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เชื้อยีสต์ที่พบในลูกแป้งชนิดต่าง ๆ

ชนิดลูกแป้ง	เชื้อยีสต์
ลูกแป้งข้าวหมาก	<i>Endomycopsis fibuligera</i> , <i>Endomycopsis</i> spp. , <i>H. malanga</i> , <i>Candida</i>
ลูกแป้งเหล้า	<i>S. cerevisiae</i> , <i>E. fibuligera</i> , <i>Endomycopsis</i> spp.

ที่มา : ศิระ (2546)

2.2.3 แบคทีเรีย

ในระหว่างการหมัก จะพบว่าเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ แบคทีเรียที่ผลิตกรด แลคติก และแบคทีเรียที่ผลิตกรดอะซิติก ซึ่งหากพบแบคทีเรียเหล่านี้ปนเปื้อน จะส่งผลทำให้ผลิตภัณฑ์มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยวคล้าย น้ำส้มสายชู กลิ่นหมักดอง กลุ่มลูกโป่งวิทยาศาสตร์ อีกทั้งยังไม่รสชาติไม่พึงประสงค์อีกด้วย นอกจากนี้ยังได้มีการรายงานตรวจพบแบคทีเรียในกลุ่มแลคติก ซึ่งได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* , *Lactobacillus* spp. และเชื้อน้ำส้ม *Acetobacter* spp. , *Gluconobacter* spp. และแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่พบ คือ *Bacillus* spp. ในลูกแบ่งที่ใช้หมักเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อนในปริมาณ จุลินทรีย์ อาทิ สมุนไพรจำพวก ชะเอม อบเชย ดอกจันทร์ ลูกจันทร์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (สมชาย, 2523)

2.2.4 บทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแบ่ง

มีจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดที่พบว่ามียับยั้งบทบาทในกระบวนการหมัก โดยพบจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพย่อยแบ่งเป็นน้ำตาล และพวกที่ผลิตสารซึ่งให้กลิ่นหอมบางชนิดเท่านั้นในลูกแบ่งข้าวหมาก ส่วนลูกแบ่งเหล้านอกจากจะประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่ย่อยแบ่งได้ดีแล้วยังพบว่าเชื้อยีสต์มีบทบาทที่แท้จริงในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เชื้อรา *A. rouxii* และ *Rhizopus* spp. จัดเป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ย่อยแบ่งได้อย่างมีประสิทธิภาพ เอนไซม์ที่ผลิตได้มีทั้ง α -amylase และ glucoamylase ดังนั้นในกระบวนการหมักเชื้อราเหล่านี้จึงจะช่วยย่อยแบ่งไปเป็นน้ำตาล (พิไลพรรณ, 2523) ส่วนยีสต์ *Endomycopsis* spp. และ *H. malanga* เป็นยีสต์ที่สามารถย่อยแบ่งได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และเอสเตอร์ ดังนั้นในการหมักเชื้อ *A. rouxii* และยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ จึงมีบทบาทสำคัญในการหมักข้าวหมาก ส่วนใหญ่ลูกแบ่งเหล้าพบว่ามี *Rhizopus* spp. และ *A. rouxii* มีบทบาทเช่นเดียวกันในการหมัก แต่ยีสต์ที่มีบทบาทในการหมักสาโทได้แก่ *S. cerevisiae* ซึ่งมีประสิทธิภาพเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ สำหรับแบคทีเรียในกลุ่มแลคติก ไม่มีรายงานถึงบทบาทในการหมักข้าวหมากแน่ชัด ถ้ามีแบคทีเรียกลุ่มนี้ในปริมาณมาก จะส่งผลให้ข้าวหมากเกิดรสเปรี้ยวซึ่งไม่เป็นที่นิยม ส่วนสุราแช่ประเภท สาโท กระแช่ ยีสต์ จะเจริญและผลิตแอลกอฮอล์ได้ดีเมื่อน้ำหมักมี pH ต่ำ ประมาณ 4.2 – 4.5 (วชิราภา, 2545) และการทำน้ำหมักมีความเป็นกรดทำให้จุลินทรีย์อื่นที่ปนเปื้อนเจริญได้ช้าลง (สมพร, 2544)

2.3 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ในลูกแบ่ง

2.3.1 การแยกเชื้อยีสต์

วิธีการแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างมีอยู่หลายวิธี ดังนี้ (Kurtzman and Fell, 1998)

1) การแยกยีสต์โดยอาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาพเป็นกรด โดยทั่วไปมักนิยมใช้กรด หรือกรดเกลือ หรือกรดฟอสฟอริกในการปรับสภาพความเป็นกรดของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง pH 3.5-5.0 โดยไม่ควรรใช้กรดอินทรีย์เพื่อปรับสภาพความเป็นกรดของอาหาร เนื่องจากกรดเหล่านี้มักแตกตัวได้น้อยในช่วง pH 3.5-4.0 ทำให้เหลือกรดความเข้มข้นสูง จึงอาจส่งผลยับยั้งเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่

2) การแยกเชื้อยีสต์โดยใช้อาหารแข็งที่มีสภาพเป็นกรด วิธีนี้นิยมใช้กับตัวอย่างที่รู้ว่ามียีสต์อยู่ในปริมาณมาก ทำได้โดยนำตัวอย่างที่เป็นของแข็งมาเตรียมเป็นซัสเพนชันหรือนำตัวอย่างที่เป็นของเหลวอยู่แล้วมาเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร yeast extract malt extract agar (YM agar) หรืออาหาร malt extract agar ที่ปรับ pH ให้เท่ากับ 3.5-4.0 โดยปรับ pH ของอาหาร หลังจากทำให้ปลอดเชื้อและปล่อยให้เย็นลง ด้วยกรดเกลือ 1 นอร์มอล

3) การใช้ enrichment technique ในอาหารเหลวที่มีสภาพเป็นกรดเพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อยีสต์ วิธีนี้เหมาะสำหรับการแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างที่มีจำนวนยีสต์น้อยโดยใช้อาหารเหลว YM broth หรือ extract broth ที่ปรับความเป็นกรดให้เท่ากับ pH 3.7-3.8 หลังจากใส่ตัวอย่างในอาหารเหลวดังกล่าวแล้วเททับด้วยพาราฟินเหลวที่ปลอดเชื้อหนา 1 เซนติเมตร เพื่อจำกัดการเจริญของรา แต่วิธีนี้เหมาะสำหรับแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการหมัก (fermentative yeast) เท่านั้น นอกจากนั้นอาจแยกเชื้อราออกภายหลังโดยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างแล้วนำไปหมักบนเครื่องเขย่าแบบหมุนรอบ 1-2 วัน เส้นใยของราจะรวมกลุ่มกันมีลักษณะเป็นเม็ดกลม และไม่สร้างสปอร์ ในขณะที่ยีสต์จะเจริญเพิ่มจำนวนขึ้นจนมีจำนวนมากแล้ว นำไปกรองผ่านสำลีชนิดดูดน้ำที่ปลอดเชื้อ เพื่อแยกเชื้อราออก แล้วนำอาหารเหลวที่ได้จากการกรองซึ่งมียีสต์อยู่ไปแยกเชื้อบนอาหารแข็งที่เหมาะสมต่อไป

4) การแยกยีสต์โดยอาศัยอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงปานกลางได้ ในขณะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลในระดับเดียวกัน มีแนวโน้มจะกดดันการเจริญของแบคทีเรีย

5) การแยกเชื้อยีสต์ โดยใช้อาหารแข็งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงอาหารชนิดนี้เหมาะสำหรับแยกยีสต์ที่สามารถทนต่อแรงดันออสโมซิส และยีสต์ที่ชอบแรงดันออสโมซิสได้ โดยทั่วไปใช้ (YM agar) ที่มีกลูโคส 30-50 เปอร์เซ็นต์ และวัน 2 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นปรับ pH เป็น 4.5- 5.0 เพื่อช่วยส่งเสริมการแยกยีสต์ที่ต้องการ

6) การใช้ enrichment technique ในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เพื่อแยกเชื้อยีสต์พวกที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส และยีสต์ที่ชอบแรงดันออสโมซิส อาหารเหลวที่นิยมใช้คือ YM broth หรือ extract broth ที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 30- 40 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะ

ส่งเสริมการเจริญทั้งของยีสต์และราไปด้วยกัน ดังนั้นจึงมักนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนเหวี่ยง เพื่อให้ราเจริญเป็นเม็ดกลมก่อน จึงจะทำให้แยกยีสต์ได้ง่ายขึ้น

7) การแยกยีสต์โดยใช้สารปฏิชีวนะและสารประกอบที่สามารถยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์อื่น สารปฏิชีวนะและสารยับยั้งแต่ละชนิดที่ใส่ลงไปในการอาหารจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารปฏิชีวนะและสารยับยั้ง นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของเชื้อด้วย สารปฏิชีวนะที่เติมลงไปในการอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ทำให้สามารถแยกยีสต์ได้ง่ายขึ้น ได้แก่ actinine , actinomisine, oliomisine , chloramphenicol , penisiline และ streptomisine ส่วนสารประกอบชนิดอื่นที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียหรือรา เช่นสารประกอบไตรเฟนิลซึ่งยับยั้งการเจริญของราที่มีการเจริญของเส้นใย และไซโคล – เซรีนซึ่งยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย เป็นต้น

8) การแยกเชื้อยีสต์โดยใช้เทคนิคการกรองด้วยเมมเบรน วิธีนี้จะต้องเลือกใช้เมมเบรนที่มีขนาดเหมาะสม โดยเมื่อกรองตัวอย่างเมมเบรน จุลินทรีย์ที่มีขนาดใหญ่กว่ายีสต์ เช่น ราที่มีการเจริญแบบเส้นใยจะถูกแยกออกไป ส่วนของเหลวที่ได้จากการกรองจะประกอบด้วยยีสต์และแบคทีเรีย ดังนั้นจึงต้องนำของเหลวที่ได้จากการกรองไปเลี้ยงในอาหารแข็ง ที่เหมาะสมซึ่งส่งเสริมการเจริญของยีสต์หรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือทั้งสองอย่างรวมกัน เช่น อาหาร yeast extract malt extract agar (YM agar) และ malt extract agar ที่ปรับ pH ให้เป็นกรด

ในการแยกเชื้อยีสต์นั้นมาจากตัวอย่างต่าง ๆ เช่น ดิน , ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว หรือว่าจากผลิตภัณฑ์หมักดอง จะมีวิธีการต่าง ๆ กันออกไป เช่นการแยกเชื้อยีสต์จากผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวจากบัลแกเรียน ที่หมักดองแล้วสามารถแยกเชื้อยีสต์ได้ 12 ไอโซเลท ในการเลี้ยงเชื้อ Saborou medium ที่ใส่ chloramphenical ส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อยีสต์พวก *Ascomycotina* และ *Deuteromycotina* (Savova, 2002)ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้เป็นอาหารที่ใช้แยกเชื้อยีสต์ทางการแพทย์ และการแยกเชื้อยีสต์จากผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่ใช้ malt extract broth (MEB) โดยเติม chloramphenical 0.1 g/L และ yeast extract glucose chloramphenical agar (YGCA) ซึ่งนำเชื้อยีสต์ที่แยกได้ไปหมักหาความสามารถในการหมักบนน้ำตาลแลคโตส (Narvi and Moeini, 2004)

2.3.2 การแยกเชื้อรา

การแยกเชื้อราเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธี โดยการเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของราที่ต้องการ ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการแยก และตัวอย่างที่จะนำมาแยก แต่อย่างไรก็ตามควรเลือกใช้วิธีที่ง่ายและสะดวก ซึ่งมีวิธีที่นิยมใช้มีดังนี้ (Roheena, 2002)

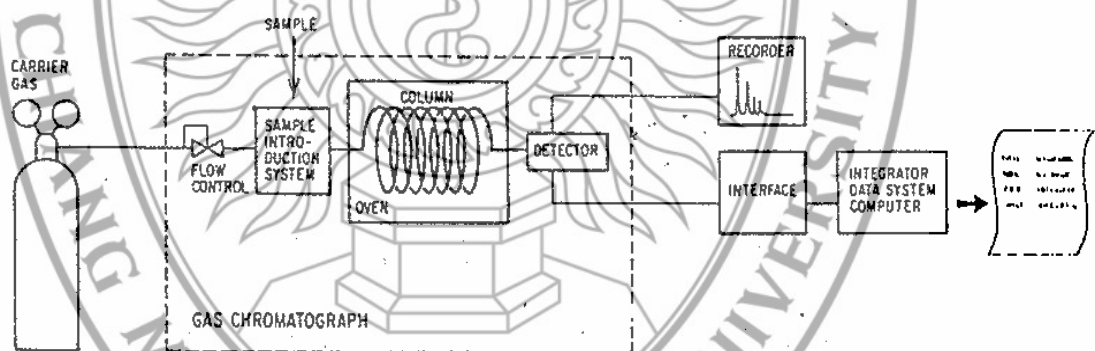
1) Dilution plate technique เป็นวิธีที่เหมาะสมสำหรับตัวอย่างที่มีราปริมาณสูง วิธีการคือนำตัวอย่างมาทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ให้ปริมาณเชื้อลดลงจนอยู่ใน

ระดับที่สามารถแยกได้ง่าย จากนั้นนำไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง ซึ่งอาหารที่นิยมมากที่สุดคือ PDA หรืออาจใช้ตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงในอาหารเหลว potato dextrose broth (PDB) แล้วนำเข้าเครื่องเขย่าแบบหมุนรอบ จะทำให้เส้นใยของรารวมกลุ่มกันเป็นเม็ดกลม แล้วจึงนำกลุ่มของเส้นใยเหล่านั้นมาเลี้ยงบนอาหาร PDA ต่อไป (สุกัลยา, 2547)

2) Enrichment นำตัวอย่าง 1 กรัม ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่ภายในบรรจุ YM broth ปริมาตร 30 มิลลิลิตรนำไปปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน แล้วจึงนำไป streak บนอาหาร PDA (สมพร, 2544)

2.4 การวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธี แก๊สโครมาโทกราฟี

แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคการแยกสารให้บริสุทธิ์ สามารถวิเคราะห์ได้ในทางคุณภาพและปริมาณ เป็นวิธีวิเคราะห์สารในเวลาที่รวดเร็ว มีความไวสูงสามารถแยกสารให้บริสุทธิ์สูง (high resolution separation) แสดงหลักการทำงานของเครื่องในภาพที่ 1 ส่วนมากแล้วจะใช้ในการแยกสารประกอบอินทรีย์ได้ในช่วงกว้างมาก แต่มีข้อจำกัดสำหรับสารประกอบอินทรีย์นั้นจะต้องอาศัยเทคนิคพิเศษเฉพาะเป็นกรณีไปเพื่อให้สารประกอบอินทรีย์เหล่านั้นระเหยกลายเป็นไอ



ภาพที่ 1 หลักการทำงานของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีพื้นฐาน
ที่มา : (วิรัช, 2542)

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟพื้นฐานประกอบด้วยส่วนสำคัญ 6 ส่วน คือ

- 1) ถังบรรจุแก๊ส (carrier gas tank) เครื่องควบคุมความดันแก๊ส (pressure regulator) และเครื่องวัดอัตราการไหลของแก๊ส (flow meter)
- 2) ระบบฉีดสารตัวอย่าง (sample injection system) ทำหน้าที่นำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์
- 3) คอลัมน์สำหรับแยกสาร (separation column) เป็นส่วนสำคัญที่สุดที่ทำให้สารตัวอย่างแยกสารประกอบต่าง ๆ ออกจากกัน
- 4) ระบบตรวจวัด (detection system) ทำหน้าที่ตรวจวัดองค์ประกอบของสารที่เคลื่อนที่ออกจากคอลัมน์ ส่วนประกอบที่สำคัญคือ เครื่องวัดสัญญาณ (detector) ซึ่งหลายชนิด เช่น เครื่องวัดสัญญาณชนิดฟเลมไอออนไนเซชัน (Flame Ionization Detector , F)
- 5) ระบบควบคุมอุณหภูมิในส่วนต่าง ๆ ของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟ (thermal compartment) ระบบควบคุมอุณหภูมิของระบบตรวจวัด
- 6) ระบบบันทึกและเก็บข้อมูล ประกอบด้วยเครื่องบันทึกโครมาโทแกรมหรือการเก็บข้อมูลที่เป็นสัญญาณอื่น ๆ จากระบบตรวจวัดซึ่งในปัจจุบันได้ต่อระบบนี้เข้ากับเครื่องคอมพิวเตอร์เพื่อช่วยในการเก็บข้อมูลและการประเมินผลทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณ

การทำงานของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีเมื่อกล่าวโดยย่อได้ดังนี้ เมื่อฉีดสารตัวอย่างเข้าสู่ระบบฉีดสารตัวอย่าง สารตัวอย่างได้รับความร้อนจะกลายเป็นไอ แล้วแก๊สพา ก็จะนำสารตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์สำหรับแยกสาร ส่วนประกอบต่าง ๆ ของสารจะถูกแยกออกจากกันที่ภายในคอลัมน์นี้ แก๊สพาซึ่งไหลผ่านคอลัมน์ตลอดเวลาจะนำส่วนประกอบของสารแต่ละชนิดออกจากคอลัมน์นี้เข้าสู่เครื่องวัดสัญญาณ แล้วเครื่องวัดสัญญาณจะส่งสัญญาณไปยังเครื่องบันทึกโครมาโทแกรม (recorder) ได้โครมาโทแกรมแล้วนำไปประเมินผลทางคุณภาพและปริมาณต่อไป ในปัจจุบันเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟได้พัฒนารูปแบบต่าง ๆ ของเครื่องมือไปอย่างกว้างขวาง การควบคุมกลไกต่าง ๆ ของเครื่องมือ การบันทึกข้อมูลต่าง ๆ ได้นำคอมพิวเตอร์มาช่วยในการวิเคราะห์และการประเมินผลได้รวดเร็วถูกต้องยิ่งขึ้นแม้ว่ารูปแบบและกลไกของเครื่องมือ ในปัจจุบันจะแตกต่างกันหลายรูปแบบ แต่ความรู้ขั้นพื้นฐานทางแก๊สโครมาโทกราฟีมีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อนักเคมีที่จะควบคุมกลไกของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

2.4.1 แก๊สพา

แก๊สพาที่ใช้สำหรับเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีต้องเป็นแก๊สเฉื่อยเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปฏิกิริยาใด ๆ ในคอลัมน์หรือในเครื่องวัดสัญญาณ ไม่เกิดปฏิกิริยาใด ๆ กับตัวละลายหรือสารตัวอย่างและไม่เกิดปฏิกิริยาใด ๆ กับเฟสที่อยู่กับที่รวมทั้งโซลิดซัพพอร์ตด้วย หากแก๊สพา

เกิดปฏิกิริยาในส่วนต่าง ๆ ข้างต้นจะต้องเกิดน้อยมากจนสามารถตัดทิ้งได้โดยไม่ต้องนำมาพิจารณาอย่างไรก็ตามปฏิกิริยาดังกล่าวอาจเกิดขึ้นได้ในกรณีที่ใช้ความดันแก๊สสูง ๆ แก๊สพาที่นำมาใช้งานทั่วไปได้แก่ ไฮโดรเจน อีเลียม อาร์กอน ไนโตรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ ฯลฯ แก๊สพาที่ใช้สำหรับเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟีจะต้องมีความบริสุทธิ์สูง เช่น ในกรณีที่ใช้ไนโตรเจนเป็นแก๊สพาและใช้เครื่องวัดสัญญาณชนิดจับอิเล็กตรอน (electron capture detector, ECD) ไนโตรเจนจะต้องมีความบริสุทธิ์สูงถึง 99.99% เพราะว่า เครื่องวัดสัญญาณสามารถวัดได้ในระดับต่ำถึงพิโกกรัม (pictogram ; pg , $1 \text{ pg} = 1 \times 10^{-12} \text{ g}$) ดังนั้นหากแก๊สพามีสารเจือปนเพียงเล็กน้อยเครื่องวัดสัญญาณจะถูกรบกวนได้มาก (noise) อาจทำให้การประเมินผลทางด้านคุณภาพและปริมาณคลาดเคลื่อนได้ นอกจากการพิจารณาความบริสุทธิ์ของแก๊สพาแล้วยังจำเป็นต้องพิจารณาในด้านความปลอดภัยต่อผู้ใช้เครื่องมืออีกด้วยเพราะแก๊สพาจะไหลผ่านเครื่องตลอดเวลาอาจเป็นปัญหาต่อสุขภาพหรืออาจเกิดการระเบิดได้ การพิจารณาเลือกใช้แก๊สพาจะต้องพิจารณาองค์ประกอบที่สำคัญ 2 ประการคือ

1) ความไวของเครื่องวัดสัญญาณ

การเลือกใช้แก๊สพาจะต้องคำนึงถึงความไวของเครื่องวัดสัญญาณ ซึ่งแก๊สแต่ละชนิดจะมีผลกระทบต่อความไวของเครื่องวัดสัญญาณแต่ละชนิดไม่เท่ากัน เช่น ไฮโดรเจนหรืออีเลียมนิยมใช้กับเครื่องวัดสัญญาณเกิดสภาพนำความร้อน (TCD)

2) ประสิทธิภาพของคอลัมน์

แก๊สพาไม่ค่อยมีผลต่อประสิทธิภาพของคอลัมน์มากนัก ประสิทธิภาพของคอลัมน์จะขึ้นอยู่กับอัตราการไหล (flow rate) ของแก๊สพามากกว่า นอกจากนี้อัตราการไหลของแก๊สพายังไม่ผลกระทบต่อความไวของเครื่องวัดสัญญาณอีกด้วย (วิรัช ,2542)

2.4.2 คอลัมน์สำหรับแยกสาร

คอลัมน์สำหรับแยกสารเป็นส่วนที่สำคัญที่สุดที่จะแยกองค์ประกอบต่าง ๆ ของตัวอย่างออกจากกันได้ดีหรือไม่ดีเพียงใด คอลัมน์สำหรับแยกสารประกอบด้วย ตัวคอลัมน์ที่ทำจากวัสดุที่เป็นแก้ว หรือโลหะสแตนเลส หรือท่อที่ทำการหลอมซิลิกา (fused silica tubing) แล้วเคลือบด้วยโพลิเมอร์ชนิดต่าง ๆ เพื่อความคงทน ตัวคอลัมน์จะมีลักษณะเป็นท่อกว้างปลายเปิดทั้งสองด้าน ดังนั้นการแบ่งประเภทของคอลัมน์สำหรับแยกสารประกอบชนิดต่าง ๆ จึงสามารถแบ่งได้หลายประเภทดังต่อไปนี้

การแบ่งประเภทคอลัมน์ตามชนิดของเฟสที่อยู่กับที่จะเป็นการกำหนดประเภทของแก๊สโครมาโทกราฟี ได้ 2 ประเภท ดังนี้

1) แก๊ส- ของเหลวโครมาโทกราฟี (gas – liquid chromatography) เรียกชื่อโดยย่อว่า GLC เทคนิคนี้ประกอบด้วยเฟสที่อยู่กับที่เป็นของเหลว ซึ่งเคลือบอยู่บนโซลิดซัพ

พอร์ท (solid supports) ซึ่งเป็นวัสดุแข็งมีความคงทนสูงมีความเฉื่อยต่อปฏิกิริยาเคมีและทนต่อความร้อนสูง สำหรับกลไกการแยกสำหรับเทคนิคแบบ GLC นี้ จะเป็นแบบพาร์ติชัน (partition)

2) แก๊ส – ของแข็งโครมาโทกราฟี (gas – solid chromatography) เรียกชื่อย่อว่า GSC เทคนิคการวิเคราะห์ GSC นี้จะมีกลไกการแยกสารประกอบชนิดต่าง ๆ โดยอาศัยหลักการดูดซับ (adsorption) ของสารประกอบบนผิวของของแข็งที่ทำหน้าที่เป็นเฟสที่อยู่กับที่ของแข็งที่ใช้ใน GSC นี้ไม่มากนัก ได้แก่ อะลูมินา (alumina, Al_2O_3) คาร์บอนแบล็ค (carbon black) ซีโอไลต์ (zeolites) ซิลิกาเจล (silica gel) โพลีเมอร์ชนิดที่เป็นรูพรุนขนาดต่าง ๆ (porous polymer) ถึงแม้ว่า GSC มีข้อจำกัด ในการเลือกชนิดของเฟสที่อยู่กับที่ แต่ข้อดีของลดสัญญาณการรบกวน (detection background) ได้ดีอีกด้วย

การแบ่งประเภทคอลัมน์ตามขนาดของคอลัมน์สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทคือ

1) เพคคอลัมน์ (packed column)

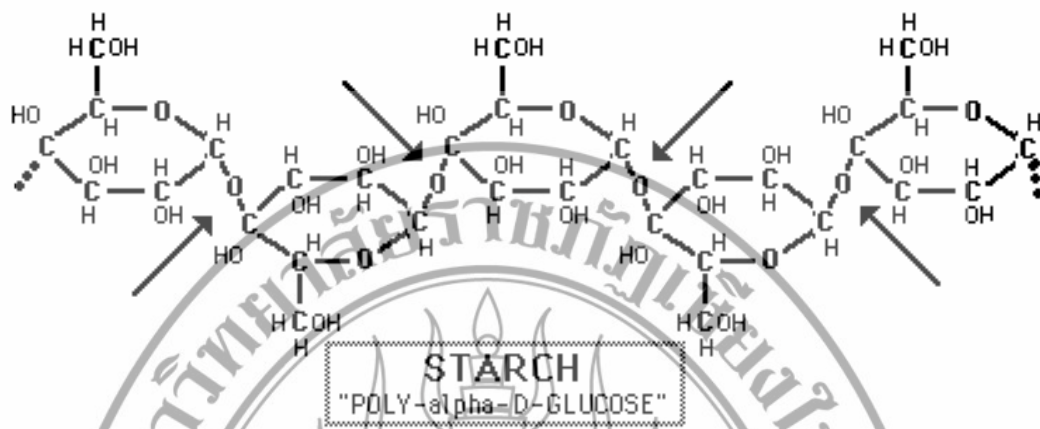
เพคคอลัมน์จะประกอบด้วยท่อแก้วหรือโลหะกลวงบรรจุด้วยเฟสที่อยู่กับที่ ความยาวของคอลัมน์โดยทั่วไปที่ใช้กันจะยาวประมาณ 1 – 4 เมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในคอลัมน์ประมาณ 2 – 6 มิลลิเมตร วัสดุที่ใช้ทำตัวคอลัมน์มีหลายชนิด เช่น แก้วบอโรซิลิเกต (borosilicate glass) โลหะสแตนเลสพลาสดิกหรือโพลีเมอร์ และอาจใช้โลหะอื่น ๆ ได้หลายชนิด เช่น อะลูมิเนียม ทองแดง เป็นต้น การเลือกใช้คอลัมน์ที่ทำด้วยวัสดุชนิดใดนั้นจะต้องพิจารณาว่าวัสดุที่ใช้ทำคอลัมน์จะต้องไม่เกิดปฏิกิริยาใด ๆ ภายในคอลัมน์อาจเป็นแบบรูปตัวยู รูปวงกลมหรือรูปวงรีก็ได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเฟสที่เคลื่อนที่

2) เคปิลลารีคอลัมน์ (capillary column)

เป็นคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางภายในเล็กมากประมาณ 0.2-0.5 มิลลิเมตร ความยาวของคอลัมน์ประมาณ 25-100 เมตร แล้วภายในจะฉาบหรือเคลือบด้วยเฟสของเหลว จึงเกาะยึดซึ่งแตกต่างจากเพคคอลัมน์ที่ต้องมีซิลิเคตพอร์ทให้เฟสของเหลวเกาะยึด

2.5 เอนไซม์อะไมเลส

อะไมเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้ง ไกลโคเจน และอนุพันธ์ของโพลีแซคคาไรด์ โดยจะย่อยแบบเติมน้ำ (hydrolysis) ที่ตำแหน่ง α -1,4-glucocidic ให้ได้สารพวกกลูโคส มอลโตส และเดกซ์ทริน ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ ซึ่งจะประกอบไปด้วยสารที่มีหน่วยของกลูโคส 3, 4, 6 หรือสูงกว่า ซึ่งจัดเป็นพวก oligosaccharide ดังแสดงในภาพที่ 2 การที่จะได้เป็นผลิตภัณฑ์ใดมากนั้นจะขึ้นอยู่กับชนิดของเอนไซม์อะไมเลส (โสภณ, 2541)



ภาพที่ 2 การทำงานของเอนไซม์อะไมเลส
ที่มา : (Peter, 2005)

2.5.1 ชนิดและคุณสมบัติของเอนไซม์อะไมเลส (โสภณ, 2541)

1) กลูโคอะไมเลส (glucoamylase)

เป็นเอนไซม์ ที่ย่อยสลายแป้งให้เป็นกลูโคสโดยเริ่มย่อยจากปลายสุดของโมเลกุล ซึ่งเป็น reducing end จะย่อยโมเลกุลของแป้งตรงจุดที่โมเลกุลของกลูโคสต่อกันเป็นแบบ α -(1-4) glucosidic linkage

2) บีต้าอะไมเลส (β -amylase)

จะย่อยสลายที่ตำแหน่ง α -(1-4) glucosidic linkage ให้เป็น มอลโทส ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลมาต่อกัน โดยจะเริ่มย่อยจากปลายสุดของโมเลกุลของแป้ง ซึ่งเป็น reducing end และจะตัดโมเลกุลของอะไมโลส (amylose) ออกทีละ 2 โมเลกุล ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทส และ limit dextrins ปฏิกริยานี้เรียกว่า saccharification

3) แอลฟาอะไมเลส (α -amylase)

เป็นเอนไซม์ ที่ย่อยสลายแป้งที่มีตำแหน่ง α -(1-4) glucosidic linkage โดยจะย่อยบริเวณใดก็ได้ ไม่จำกัดว่าจะย่อยเพียงปลาย reducing end อย่างเอนไซม์ glucoamylase และ β -amylase ดังนั้นหลังจากการย่อยสลายแป้งแล้วจะได้พวกกลูโคส และ limit dextrins (ที่มีโมเลกุลเล็ก) ปฏิกริยานี้เรียกว่า liquefaction

4) ไอโซเมอเรส (isomerase)

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งตรงจุด ที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลของกลูโคส ตำแหน่ง α -(1-6)glucosidic linkage ที่เกิดการแตกแขนงในโมเลกุลของ amylopectin หลังจากย่อยตรงส่วนที่แตกแขนงแล้วจะช่วยให้เอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดข้างต้น สามารถย่อยสลายแป้งให้เป็นโมเลกุลของกลูโคสได้มากที่สุด

2.6 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

ในการวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์นั้น เทียบเป็นความเข้มข้นของความสามารถในการย่อยเอนไซม์ เราไม่สามารถหาด้วยวิธีทางเคมีจากโมเลกุลของเอนไซม์โดยตรง ทั้งนี้เนื่องจากส่วนประกอบทางเคมีของเอนไซม์เมื่ออยู่ในสภาพแรง และเมื่อสูญเสียสภาพแรงไม่แตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องหาโดยทางอ้อม โดยใช้คุณสมบัติการเป็นตัวเร่งแล้วหาความสามารถของเอนไซม์จากปฏิกิริยา ดังนั้นความเข้มข้นของเอนไซม์ทุกๆ ไป จึงแสดงได้ในรูปของหน่วยเอนไซม์ ซึ่งหน่วยเอนไซม์นี้กำหนดขึ้นโดย Enzyme Commission of the International Union of Biochemistry โดยกำหนดในหน่วยของเอนไซม์ที่เปลี่ยนสับสเตรท 1 ไมโครโมลต่อนาทีภายใต้สภาพที่ทดลอง หรือในบางกรณีอาจใช้ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ 1 ไมโครโมลต่อวินาทีแทนสับสเตรท 1 ไมโครโมล ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของสับสเตรทเป็นหลัก

การวัดกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสสามารถวัดได้โดยใช้วิธี

1) Practical assay method เป็นวิธีการวัดความสามารถในการทำงานของ complex enzyme ซึ่งได้จาก culture filtrate คือ การสลายให้ได้น้ำตาล (saccharolytic method) เป็นการวัดปริมาณกลูโคสที่ได้จากการย่อยสลายแป้งในอาหารเพาะเลี้ยง โดยใช้ dinitrosalicylic acid reagent (DNS reagent) เป็นสารทดสอบ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของ substrate เช่น

- Filter paper assay เป็นวิธีที่นิยมใช้กันมาก เนื่องจากใช้กระดาษกรองซึ่งเตรียมได้ง่ายเป็นสับสเตรท ดังงานวิจัยของ Roheena (1975) ใช้ในการวัดความสามารถในการทำงานของเอนไซม์จากเชื้อรา วิธีการคือใช้ กระดาษกรองใส่ในหลอดที่มีส่วนผสมของเอนไซม์และบัฟเฟอร์ ทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 50°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติมน้ำ DNS reagent 3 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยา ทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับเส้นกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส แล้วนำไปคำนวณเป็นค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์

- Amylase activity was determined using a modification เป็นวิธีที่คล้ายกับ filter paper assay ซึ่งได้จาก Alli *et al.* (1998) method. โดยใช้ 1% soluble starch เป็น

สับสเตรตทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 30 นาที เติม DNS reagent 2 มิลลิลิตรแล้ว นำหลอดไปต้มในน้ำเดือด 5 นาที ทำให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตรนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร เพื่อหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับเส้นกราฟมาตรฐานของ สารละลายกลูโคส แล้วนำไปคำนวณเป็นค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

จิราภรณ์ (2518) ทำการแยกและคัดเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ให้เอนไซม์ย่อยแป้งจาก ลูกแป้งที่เก็บตัวอย่าง 10 แหล่ง โดยแยกจุลินทรีย์ได้ 26 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อทำการศึกษา เปรียบเทียบความสามารถในการย่อยแป้ง โดยวิธีวัด dextrinizing value พบว่าจุลินทรีย์ 23 ไอโซเลต ที่ให้เอนไซม์ย่อยแป้ง ได้แก่ ยีสต์ 7 ไอโซเลต รา 15 ไอโซเลต จุลินทรีย์ที่ให้ ประสิทธิภาพสูงสุดคือ ราพวก *Aspergillus niger* group และยีสต์ *Endomycopsis fibuligera* Y1 ซึ่งต่อมาพบว่ายีสต์นี้ให้อะไมเลสสูง และอะไมเลสชนิดที่เขื่อนนี้สร้างได้เป็น กลูโคอะไมเลส เช่นเดียวกับที่ได้จาก *Endomycopsis fibuligera* IFO 0111 ของญี่ปุ่น

ชัยวัฒน์ (2520) แยกยีสต์และราจากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 48 ตัวอย่าง ได้รา 122 ไอโซเลต ได้ยีสต์ 141 ไอโซเลต จากตัวอย่างลูกแป้งเหล้า 10 ตัวอย่าง ได้รา 26 ไอโซเลต ได้ ยีสต์ 24 ไอโซเลต และจากตัวอย่างข้าวหมาก 15 ตัวอย่าง ได้รา 62 ไอโซเลต เมื่อจัดจำแนก ยีสต์แล้วพบว่าอยู่ใน 3 สกุล คือ *Endomycopsis hansenula* และ *Saccharomyces* ส่วน ราเมื่อจัดจำแนกแล้วพบว่าอยู่ใน 5 สกุลคือ *Rhizopus* *Mucor* *Clamydoimucor* *Penicillium* และ *Aspergillus* ซึ่งแบ่งได้เป็นกลุ่มย่อยๆ 3 กลุ่มคือ *Aspergillus niger* group *Aspergillus flavus* group และ *Aspergillus* กลุ่มอื่นๆ

มนตรี (2542) แยกราจากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า จำนวน 32 ตัวอย่าง จำแนกออกเป็น 4 สกุล ได้แก่ *Rhizopus* *Mucor* และ *Amylomyces* ส่วนอีก 1 ไอโซเลต ไม่สามารถจัดจำแนกได้

สุราษฏรและจรรยา (2524) ได้มีการศึกษาการผลิตลูกแป้งเหล้าด้วยเชื้อบริสุทธิ์ในรูปเชื้อ ผสม ระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* 281 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกจากลูกแป้งและ คัดเลือกแล้วว่า มีประสิทธิภาพในการหมักแอลกอฮอล์กับเชื้อราสายพันธุ์ต่างๆ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Rhizopus oryzae* MB₃₉, *Aspergillus niger* H₅, *Amylomyces rouxii* AH₃ และ *Endomycopsis fibuligera* ER₁₀ ซึ่งจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์นี้มีที่มาจากลูก แป้ง และได้ทดสอบประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงเป็นน้ำตาลแล้วเช่นกัน โดยใช้ตำรับที่ ประกอบด้วยแป้งข้าวเจ้า 400 กรัม ขิง ข่า ชะเอม กระเทียม และพริกไทยอย่างละ 6 กรัม และ ดิบลิ 2 กรัม ผลปรากฏว่าลูกแป้งที่ผลิตได้ มีลักษณะในเรื่องเนื้อสัมผัสไม่แตกต่างจากลูกแป้งที่มีขายใน

ห้องตลาด แต่ผลจากการวิเคราะห์แอลกอฮอล์ที่หมักได้ จะใกล้เคียงกับลูกแป้งเหล้าจากแหล่งผลิตบางแห่ง แต่จะต่ำกว่าลูกแป้งจากบางท้องถิ่น คุณสมบัติของเชื้อที่ให้ผลดีได้แก่ การผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* 281 กับ *Rhizopus oryzae* MB₃₉ และ *Saccharomyces cerevisiae* 281 กับ *Aspergillus niger* H₅

ไกรฤกษ์และสุราษฎร์ (2525) ได้ศึกษาการผลิตแป้งเชื้อสุราที่ทำกันในระดับอุตสาหกรรมในประเทศไทยปัจจุบัน ได้พัฒนามาถึงขั้นที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์แทนลูกแป้ง เชื้อราที่ใช้ได้แก่ *Rhizopus* spp. เช่น *Rhizopus oryzae* ที่แยกจากลูกแป้ง และได้คัดเลือกแล้วว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส ในการผลิตจะใช้รำกับปลายข้าวเหนียวที่บดอย่างหยาบๆ เป็นวัตถุดิบ และบางแห่งจะไม่ใช้ปลายข้าวเหนียวเป็นส่วนผสม ซึ่งมีรายงานว่าประสิทธิภาพการผลิตเอนไซม์ กลูโคอะไมเลสจะต่ำลง เมื่อใช้ข้าวเหนียวเป็นวัตถุดิบ

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (2538) ได้กล่าวถึงการตรวจผลการสร้างเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อราที่เลี้ยงในอาหารแข็งแบ่งดิบไว้ว่า การตรวจผลการสร้างเอนไซม์อะไมเลสทำได้โดยเทน้ำยาไอโอดีนลงในอาหาร แล้วตรวจดูบริเวณในขอบโคโลนีของเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใส แสดงว่าเชื้อนั้นเกิดการสร้างเอนไซม์อะไมเลส ถ้าไม่เกิดบริเวณใส แสดงว่าเชื้อไม่สร้างเอนไซม์ แต่เชื้อบางชนิดอาจสร้างเอนไซม์ได้น้อยมาก อาจเกิดบริเวณใสๆ ภายใต้โคโลนีเท่านั้น ดังนั้นการตรวจสอบจึงควรกวาดเอาโคโลนีออกก่อน เพื่อดูบริเวณที่ใสๆ ควรอ่านผลในเวลา 2 นาที หลังจากเทน้ำยาไอโอดีนลงไปแล้วเพราะถ้าทิ้งไว้นานสีน้ำเงิน หรือม่วงอาจหายไป

สมพร (2544) ได้แยกเชื้อจากจากลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง และลูกแป้งเหล้า 19 ตัวอย่าง เมื่อแยกเชื้อยีสต์และเชื้อราจากลูกแป้งทั้งหมดโดยใช้หลายวิธี พบว่าจากลูกแป้งข้าวหมากได้แยกเชื้อยีสต์ 43 ไอโซเลท และรา 91 ไอโซเลท ส่วน ลูกแป้งเหล้าแยกได้เชื้อยีสต์ 49 ไอโซเลท และเชื้อรา 35 ไอโซเลท เมื่อนำยีสต์ทั้งหมดมาทำการจัดจำแนก พบว่าเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากนั้นมีถึง 29 ไอโซเลท ที่เป็น *Saccharomyces filbuligera* ส่วนที่เหลือเป็น *Candida rhagii* , *Issatchenkia orientalis*, *Pichia anomala* , *P. burtonii* , *P. fabianii* , *Rhodotolura philyla* , *Torulaspora delbrueckii* และ *T. globosa* ส่วนเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าส่วนใหญ่เป็น *S. filbuligera* เช่นกัน โดยมีจำนวนถึง 17 ไอโซเลท ที่เหลือเป็น *C. glabrata* , *C. rhagii* , *I. orientalis* , *P. burtonii* , *P. fabianii* , *P. heimii* , *P. mexicana* , *Saccharomyces cerevisiae* , *T. globosa* และ *Trichosporon*

ฉวีวรรณ (2547) ได้ทดลองแยกเชื้อยีสต์และแบคทีเรียโดยวิธีแยกโดยตรงและการเพิ่มจำนวน พบว่าลูกแป้งจาก อ.แม่แจ่ม จ.เชียงใหม่ มีค่าเฉลี่ยจำนวน CFU/g ของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเร็วและเจริญช้า และเชื้อยีสต์มากที่สุดโดยเฉลี่ย 420×10^7 และ 3×10^7 ตามลำดับ สามารถแยกแบคทีเรียที่เจริญเร็วได้ 7 ไอโซเลท คือ CJF1, CJF2, CJF3, CJF5, CJF6, CJF7 และ CJF8 แบคทีเรียที่เจริญช้าได้ 1 ไอโซเลท คือ CJF1 และเชื้อยีสต์ที่เจริญเร็วได้ 2 ไอ

โชนเลข คือ CJF1 และ CJF2 แต่ในลูกแบ่งจาก ตลาดวโรรส จ.เชียงใหม่ พบความหลากหลายของเชื้อมากที่สุด คือมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง แกรมบวกรูปแท่งสั้น แกรมบวกรูปแท่งและสร้างเอนโดสปอร์ และแกรมบวกรูปกลม เป็นต้น ซึ่งแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญเร็วได้ 9 โชนเลข คือ CPF1, CPF2, CPF3, CPF4, CPF5, CPF6, CPF7, CPF8 และ CPF9 แบคทีเรียที่เจริญช้าได้ 2 โชนเลข คือ CPS1 และ CPS2 และเชื้อยีสต์ที่เจริญเร็วได้ 2 โชนเลข คือ CPY1 และ CPY2

Nakazawa และ Sato (2001) แยก *Monascus purpureus* จากลูกแบ่ง (DSMZ, 2001 a) ส่วน Yamazaki แยกได้ *Aspergillus candidus* จากลูกแบ่ง (DSMZ, 2001 b) และเชื้อเหล่านี้ขณะนี้เก็บไว้ที่สถาบัน DNSZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany (DSMZ) ซึ่งเป็นสถาบันที่เก็บรักษาจุลินทรีย์เพื่อบริการและจำหน่ายในประเทศเยอรมนี

Roheena (2002) ได้ทำการทดลองแยกและคัดเลือกเชื้อราที่ผลิต alpha amylase ซึ่งทำการแยกโดยวิธี serial dilution method โดยใช้ น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งทำการ diluted ตั้งแต่ 10^{-3} - 10^{-6} และนำไปตัดแยกด้วยอาหาร malt extract starch agar medium แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 3-4 วัน แล้วทำการแยกโคโลนีที่แตกต่างได้ 40 โชนเลข แล้วจึงนำไปเก็บในอาหาร PDA slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในเวลา 3-5 วัน เมื่อเจริญเต็มที่แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เพื่อทำการทดสอบเอนไซม์ต่อไปโดยในการทดสอบเอนไซม์นั้นจะสังเกตบริเวณ clear zone ที่อาหารแบ่งผลปรากฏว่าเชื้อที่สามารถผลิตเอนไซม์ alpha amylase ได้ดีที่สุด คือ No. 20 (*Saccharomyces cerevisiae*) และ No. 34 (*Aspergillus niger*)

Savitree และ Somporn (2002) ได้แยกเชื้อยีสต์จากลูกแบ่งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง และลูกแบ่งเหล้า 19 ตัวอย่าง พบว่า ได้เชื้อยีสต์ 31 โชนเลข ลูกแบ่งเหล้า จาก 20 โชนเลขของลูกแบ่งเหล้า เมื่อจัดจำแนกแล้วพบว่าเป็นเชื้อยีสต์ *S. fibuligera* และเป็นเชื้อยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ ที่แยกได้จากตัวอย่างลูกแบ่งข้าวหมากและลูกแบ่งเหล้า คือ *Pichia anomala* 8 โชนเลข, *Issatchenkia orientalis* 6 โชนเลข, *P. burtonii* 6 โชนเลข, *P. fabianii* 4 โชนเลข, *Candida rhagii* 4 โชนเลข, *C. glabrata* 3 โชนเลข, *Torulaspora* 3 โชนเลข, *P. mexicana* 2 โชนเลข, และ *P. heimii*, *Rhodotorula philyla*, *Saccharomyces cerevisiae*, *T. delbrueckii* และ *Trichosporon asahii* อย่างละ 1 โชนเลข