การคัดแยกและจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ที่พบในน้ำหมักผักดอง

ดำรงเดช มณีวัฒนา [1] ฐิติพร รพีศักดิ์ [1] และ วรพจน์ สุนทรสุข [2]
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี บางมด ทุ่งครุ กรุงเทพฯ 10140

บทคัดย่อ

การศึกษาตัวอย่างน้ำหมักผักดองจำนวน 105 ตัวอย่างซึ่งเก็บจากร้านค้าทั่วไปและโรงงานผลิตผักกาดดอง โดยทำการนับจำนวนการปนเปื้อนของยีสต์บนอาหาร acidified potato dextrose agar คัดแยกยีสต์ให้บริสุทธิ์ และจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์โดยการศึกษารูปร่าง สัณฐานของโคโลนี และคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของยีสต์ และด้วยชุดจัดจำแนกยีสต์สำเร็จรูป (API ID32 C)

ผลการศึกษาพบว่า 15 ตัวอย่างจากทั้งหมด 105 ตัวอย่างของน้ำหมักผักดองพบการปนเปื้อนของยีสต์ และมีจำนวนของยีสต์ประมาณ $5x10^2$ ถึง $1.7x10^7$ เซลล์/มิลลิลิตร ยีสต์ที่พบได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae, Pichia etchell/carsonii, Candida krusei, C. tropicalis, C. lipolytica, C. rugosa, C. holmii, C. utilis, Rhodotorula glutinis, Trichosporon cutaneum* และ *Zygosaccharomyces* sp. จะเห็นว่ามีการปนเปื้อนจากยีสต์หลายสายพันธุ์ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแหล่งที่มาของการปนเปื้อนมาจากผัก (วัตถุดิบ) มนุษย์ ดิน และแมลง

[1] นักศึกษาระดับปริญญาตรี ภาควิชาจุลชีววิทยา
[2] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. ปีที่ 23 ฉบับที่ 3 กันยายน-ธันวาคม 2543

Isolation and Identification of Yeasts from Fermented Vegetable Brine.

Damrongdech Maneewatthana [1], Thitiporn Rapeesak [1] and Worapot Suntornsuk [2]

King Mongkut's University of Technology Thonburi, Rangmod, Toongkru, Bangkok 10140

Abstract

In this study, 105 pickle brine samples were collected from retailed stores in the markets and fermented vegetable factories. A number of yeasts in the samples were counted on acidified potato dextrose agar medium. Yeast colonies were also isolated into a pure culture on the same medium. The pure isolates were identified by morphological and physiological studies. They were also confirmed by an API ID 32 C test kit.

in range of $5.0x10^2$ to $1.7x10^7$ cells/ml. Many species of yeasts were identified as *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia etchell/carsonii*, *Candida krusei*, *C. tropicalis*, *C. lipolytica*, ***C. rugosa***, ***C. holmii***, ***C. utilis***, ***Rhodotorola glutinis***, ***Trichosporon cutaaneum*** and Zygosaccharomyces sp. The results suggest that the vegetables, humans, soil and insects might be sources of yeast contamination.

[1] *Undergraduate Student, Department of Microbiology.*

[2] *Assistant Professor, Department of Microbiology.*

บทนำ

ผลิตภัณฑ์ผักหมักดองเป็นผลิตภัณฑ์ที่ประชาชนนิยมบริโภคและถูกผลิตขึ้นในปริมาณมาก ผักชนิดต่างๆ อาทิ ผักกาดเขียว แตงกวา และ ขิง ถูกใช้เป็นวัตถุดิบหลัก เมื่อเริ่มกระบวนการผลิตจะใส่เกลือในผักดังกล่าวเพื่อถนอมผักจากกิจกรรมของจุลินทรีย์และป้องกันการนิ่มของผัก จากนั้นน้ำในผักจะละลายออกจากเซลล์ผัก ลดความเข้มข้นของเกลือลง และเกิดกระบวนการหมักผักดองตามธรรมชาติ ในการหมักดองแตงกวาในต่างประเทศ จุลินทรีย์หลายชนิดเข้ามามีบทบาทในกระบวนการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค เช่น *Streptococcus faecalis, Leuconostoc mesentoroides, Pediococcus cerevisiae, Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นเฉพาะของแตงกวาดอง [1] นอกจากนี้อาจมีการปนเปื้อนของยีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *Debaryomyces* spp., *Endomycopsis* spp., *Candida* spp., *Pichia* spp., *Torulopsis* spp., *Brettanomyces* spp., *Hansenula* spp., *Saccharomyces* spp. และ *Torulaspora* spp. มีผลให้แตงกวาเน่าเสียได้ [1]

จากกระบวนการหมักผักดองดังกล่าวก่อให้เกิดน้ำหมักผักดองที่มีคุณสมบัติเปรี้ยว มีความเป็นกรดสูง มีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ต่ำและมีปริมาณเกลือสูง ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นอาหารสำหรับยีสต์เนื่องจากมีสารอาหารเพียงพอต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ อาทิ สารอาหารในรูปของกรดอินทรีย์ ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส [2], [3] ดังนั้นการศึกษาสายพันธุ์ยีสต์ในน้ำหมักผักดองที่ผลิตในประเทศทำให้ทราบถึงยีสต์ชนิดต่างๆ ที่อาจปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ผักดองซึ่งอาจเป็นยีสต์ก่อโรคหรืออาจเป็นยีสต์ที่มีประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม

วิธีการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างน้ำหมักผักดอง

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักผักดองชนิดต่างๆ เช่น ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ขิงดอง กระเทียมดอง หน่อไม้ดอง และมะม่วงดอง จากร้านค้าทั่วไปและโรงงานผลิตผักดองในเขตกรุงเทพและปริมณฑล ในช่วงเดือนมิถุนายน พ.ศ. 2541 จำนวน 105 ตัวอย่าง

2. การคัดแยกและจัดจำแนกยีสต์ในน้ำหมักผักดอง

2.1 การตรวจสอบยีสต์และนับจำนวนยีสต์ในน้ำหมักผักดอง

ทำการลาก (streak) ตัวอย่างน้ำหมักผักดองบนอาหาร potato dextrose agar (PDA) ซึ่งปรับ pH เท่ากับ 3.5 ด้วยกรดทาทาริก แล้วนำไปบ่ม ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นทำการตรวจสอบและแยกยีสต์ให้บริสุทธิ์ (pure culture) ต่อไป สำหรับการนับยีสต์ทำโดยกระจาย (spread) ตัวอย่างน้ำหมักผักดองที่เจือจางที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมบนอาหาร PDA ซึ่งปรับ pH เท่ากับ 3.5 ด้วยกรดทาทาริก แล้วนำไปบ่ม ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-3 วัน จากนั้นนับจำนวนยีสต์ที่ปรากฏ

2.2 การแยกยีสต์จากน้ำหมักผักดอง

เลือกโคโลนีของยีสต์ที่มีลักษณะต่าง ๆ กันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร PDA ซึ่งปรับ pH เท่ากับ 3.5 แล้วทำเป็นคลังเชื้อ (stock culture) เก็บไว้ในห้องเย็น ณ อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส เพื่อทำการศึกษาต่อไป

2.3 การจำแนกชนิดของยีสต์

ทำโดยวิธีการของ Larone [4] Kurtzman และ Fell [5] และ Barnett *et al.* [6]

2.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่เจริญบนอาหาร PDA อายุ 72 ชั่วโมง และลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 X และ 1000 X

2.3.2 การศึกษาลักษณะการสืบพันธุ์ของยีสต์

2.3.2.1 ศึกษาการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) โดยเลี้ยงยีสต์ลงบน acetate agar บ่ม ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นทำการย้อมสีแอสโคสปอร์ที่เกิดขึ้นและศึกษารูปร่างและลักษณะแอสโคสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 X และ 1000 X

2.3.2.2 ศึกษาการแตกหน่อของเชื้อยีสต์ โดยเลี้ยงยีสต์ใน malt extract broth บ่ม ณ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 X และ 1000 X

2.3.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา

2.3.3.1 ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้แก่ กลูโคส มอลโตส ซูโครส แลคโตส และกาแลคโตส ในอาหาร fermentative medium

2.3.3.2 ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลต่างๆ ได้แก่ กลูโคส มอลโตส ซูโครส แลคโตส และกาแลคโตส ในอาหาร assimilative medium

2.3.3.3 ทดสอบความสามารถในการใช้เกลือไนเตรตในอาหาร glucose/nitrate medium

2.3.3.4 ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ยูรีเอสบนอาหาร urea agar

2.3.4 ทำการเปรียบเทียบคุณสมบัติที่ได้จากการศึกษาในข้อ 2.3.1-2.3.3 กับคุณสมบัติของยีสต์ที่ระบุใน Larone [4] Kurtzman และ Fell [5] และ Barnett *et al.* [6]

2.3.5 การจำแนกยีสต์โดยใช้ชุดทดสอบยีสต์ทางการค้า

ทดสอบยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้ด้วยชุดจัดจำแนกยีสต์สำเร็จรูปของ API ID32 C (bioMerieux, France) โดยทำตามคู่มือการใช้ชุดทดสอบ

ผลและวิจารณ์การทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างน้ำหมักผักดองจากแหล่งต่างๆ ในกรุงเทพและตลาดในจังหวัดใกล้เคียง เป็นจำนวน 105 ตัวอย่าง พบว่ามีเพียง 15 ตัวอย่างเท่านั้นที่ตรวจพบยีสต์ คิดเป็นร้อยละ 14 ของตัวอย่างน้ำหมักผักดองทั้งหมด จาก 15 ตัวอย่างมีปริมาณยีสต์อยู่ระหว่าง $5.0x10^2$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถึง $1.7x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ยีสต์ที่พบอาจปนเปื้อนมาจากผักที่ใช้ทำเป็นวัตถุดิบและจากการปนเปื้อนจากผู้ผลิตหรือจากสิ่งแวดล้อมในระหว่างกระบวนการผลิต อย่างไรก็ตาม การที่ปริมาณยีสต์แตกต่างกันในแต่ละตัวอย่างขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของน้ำหมักผักดองซึ่งในแต่ละแหล่งผลิตจะมีการควบคุมดูแลทางด้านสุขลักษณะและการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการผลิตมากน้อยแตกต่างกันไป

จากยีสต์ทั้งหมดแยกเป็นยีสต์บริสุทธิ์ได้ 30 สายพันธุ์ ซึ่งทำการจัดจำแนกยีสต์ดังกล่าวโดยเริ่มจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์บนอาหาร PDA ดังแสดงในตารางที่ 1 ยีสต์ส่วนใหญ่มีสีขาวนูน มัน และผิวหน้าเรียบ ซึ่งเป็นลักษณะที่พบได้ทั่วๆ ไปของยีสต์และพบบางโคโลนีมีสีเหลือง (H21 และ J21) หรือสีแดง (J22 และ P21) บางโคโลนีมีผิวขรุขระ (F42, I22 และ P22) และเมื่อทำการศึกษาลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ายีสต์มีลักษณะเซลล์เดี่ยวและเป็นกลุ่ม มีรูปร่างทั้งแบบกลม รี และทรงกระบอก

การสร้างแอสโคสปอร์เป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์แบบหนึ่ง ซึ่งรูปร่างและจำนวนของแอสโคสปอร์เป็นลักษณะจำเพาะของยีสต์ อาทิ *Saccharomyces* sp. มีแอสโคสปอร์ลักษณะกลมและมีจำนวน 1-4 แอสโคสปอร์ในแต่ละถุงสปอร์ (ascus) *Pichia* sp. มีแอสโคสปอร์รูปหมวก และมี 1-4 แอสโคสปอร์ในแต่ละถุงสปอร์ [4] จากตารางที่ 1 พบยีสต์เพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่มีการสังเกตเห็นแอสโคสปอร์ คือ ยีสต์รหัส A12 และ K11 ในขณะที่ยีสต์รหัสอื่นไม่พบการสร้างแอสโคสปอร์อาจเนื่องมาจากยีสต์เหล่านั้นไม่ถูกเหนี่ยวนำให้สร้างแอสโคสปอร์บนอาหาร acetate agar นอกจากนี้สภาวะการเลี้ยงยีสต์อาจมีผลต่อการสร้างแอสโคสปอร์ [7] ในการเลี้ยงยีสต์ในอาหาร malt extract broth เพื่อดูการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ พบว่ายีสต์ทุกชนิดมีการแตกหน่อแบบหลายทิศทาง (multilateral budding) และไม่มีปรากฏการแบ่งตัว (ไม่ได้แสดงผล)

ผลการตรวจสอบทางสรีรวิทยาของยีสต์ดังแสดงในตารางที่ 2-4 จากตารางที่ 2 แสดงผลการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ของยีสต์ พบว่ายีสต์ส่วนใหญ่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส ยีสต์ 12 สายพันธุ์ไม่สามารถหมักน้ำตาลทุกชนิด ได้แก่ ยีสต์รหัส A11, D21, D22, I21, I22, J22, K12, L22, M22, N24, P21 และ P22 ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถหมักน้ำตาลมอลโตส ซูโครส แลคโตส หรือกาแลคโตส อาทิ ยีสต์รหัส H21, K11, N21, N22 และ P23 สามารถหมักน้ำตาลมอลโตส ยีสต์รหัส J21, K11, N22 และ P23 สามารถหมักน้ำตาลซูโครส ยีสต์รหัส P23 เท่านั้นสามารถหมักน้ำตาลแลคโตส และยีสต์รหัส H21, K11 และ N22 สามารถหมักน้ำตาลกาแลคโตส ไม่มียีสต์ใดเลยหมักน้ำตาล

ทุกชนิดได้ การทียีสต์สามารถหมักน้ำตาลได้ หมายถึงยีสต์นั้นสามารถใช้น้ำตาลโดยผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) ผลจากการหมักจะได้แอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สำหรับผลการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 3 พบว่ายีสต์แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการใช้น้ำตาลแตกต่างกัน ยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ มียีสต์เพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้น คือ I22 และ P22 ที่สามารถใช้น้ำตาลได้ครบทั้ง 5 ชนิด การที่ยีสต์ใช้น้ำตาล หมายถึง ยีสต์ สามารถนำน้ำตาลในอาหารไปใช้ประโยชน์เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้ในการเจริญเติบโต นอกจากนี้ตารางที่ 4 แสดงความสามารถของยีสต์ในการใช้แหล่งไนโตรเจน พบว่ายีสต์จำนวน 2 สายพันธุ์เท่านั้น คือ J22 และ P21 สามารถใช้ไนเตรต และยีสต์จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ I22, J22, L22, P21 และ P22 สามารถใช้ยูเรีย จะเห็นได้ว่ายีสต์รหัส J22 และ P21 ใช้แหล่งไนโตรเจนทั้งสองได้ ยีสต์ที่ใช้ยูเรียจะผลิตเอนไซม์ยูรีเอสออกมาเพื่อทำการย่อยยูเรียได้ผลผลิตเป็นแอมโมเนียและน้ำ ยีสต์เหล่านั้นได้แก่ *Candida krusei, Candida holmii* และ *Candida utilis* [4]

จากการทดสอบข้างต้นสามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ในกลุ่มของ *Candida, Pichia, Saccharomyces, Rhodotorula, Zygosaccharomyces* และ *Trichosporon* สำหรับการตรวจสอบยีสต์ทุกสายพันธุ์ด้วยชุดทดสอบ API ID32C ซึ่งเป็นชุดการจัดจำแนกยีสต์ทางการค้าโดยอาศัยการทดสอบการใช้ (assimilation) สารอาหารคาร์โบไฮเดรต 31 ชนิด เพื่อความถูกต้องอีกครั้ง ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 5 และนำผลมาประมวลด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป ApiLab ซึ่งเป็นโปรแกรมในการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ พบว่ายีสต์ทั้งหมดที่แยกได้จำแนกได้เป็น 11 สายพันธุ์ คือ *Pichia ethellsii, Candida rugosa, Candida krusei, Candida holmii, Candida utilis, Candida lipolytica, Candida tropicalis, Zygosaccharomyces* sp., *Sacchromyces cerevisiae, Rhodotorula glutilis* และ *Trichosporon cutaneum* ดังแสดงในตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าผลการจัดจำแนกยีสต์ทั้งสองวิธีสอดคล้องกัน ทั้งนี้ผลการจัดจำแนกยีสต์ด้วย API ID 32C ส่วนใหญ่มีค่าความแม่นยำสูง (มากกว่าร้อยละ 90) ยกเว้นยีสต์บางสายพันธุ์ที่มีค่าความแม่นยำต่ำ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยีสต์เหล่านั้นเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ได้รวบรวมอยู่ในแหล่งข้อมูล (database) ของโปรแกรมซึ่งมีสายพันธุ์ยีสต์รวบรวมราว 65 สายพันธุ์โดยยีสต์ดังกล่าวอยู่ในกลุ่มของ *Candida, Cryptococcus, Geotrichum, Kloeckera, Rhodotorula, Sporobolomyces, Trichosporon, Debaryomyces, Hansenula, Pichia, Saccharomyces* และ *Zygosaccharomyces* ดังนั้นผลการวิเคราะห์ที่ได้จึงเป็นยีสต์สายพันธุ์

จากการตรวจสอบยีสต์ในน้ำหมักผักดอง แสดงถึงการปนเปื้อนของยีสต์จากแหล่งต่าง ๆ อาทิ *Candida* sp. อาจปนเปื้อนมาจากน้ำที่ใช้หรือมนุษย์ *Rhodotorula* sp. อาจปนเปื้อนมาจากดิน ผัก อากาศหรือน้ำ *Saccharomyces* sp. และ *Zygosaccharomyces* sp. อาจอยู่ในผักที่ใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิต *Trichosporon* sp. อาจปนเปื้อนมาจากผมมนุษย์ ขนสัตว์หรือแมลง *Pichia* sp. อาจปนเปื้อนมาจากสัตว์ หรือแมลง [7] ยีสต์ที่พบ อาทิ *Candida rugosa* และ *Candida krusei* สอดคล้องกับรายงานของวิลาวัณย์ [8] ที่กล่าวถึงการเน่าเสียของผักดองโดยยีสต์ดังกล่าวจากการที่ยีสต์เจริญบนผิวหน้าผักดอง (film yeast) สำหรับยีสต์ *Candida holmii*, *Rhodotorula* sp., *Saccharomyces* sp. และ *Phichia* sp. มีความสอดคล้องกับรายงานของอาภรณ์ [9] ซึ่งพบว่ายีสต์เหล่านี้พบตามใบพืชและอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูง นอกจากนี้ Fleming *et al.* [1] กล่าวถึงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ อาทิ *Debaryomyces* spp., *Endomycopsis* spp., *Candida* spp., *Pichia* spp., *Torulopsis* spp., *Brettanomyces* spp., *Hansenula* spp., *Saccharomyces* spp. และ *Torulaspora* spp. ในแตงกวาดองและน้ำหมักแตงกวาดอง Rohm *et al.* [10] รายงานการพบยีสต์ *Saccharomyces* sp., *Pichia* sp., *Rhodotorula* sp., *Candida* sp., *Kluyveromyces* sp. และ *Trichosporon* sp. ในผลิตภัณฑ์นมหมัก

จะเห็นได้ว่า ผลิตภัณฑ์ผักหมักดองชนิดต่างๆ ที่วางขายตามท้องตลาด มีความปลอดภัยกับผู้บริโภคในระดับหนึ่ง เนื่องจากยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบในน้ำหมักผักดองเป็นยีสต์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ยกเว้น *Trichosporon cutaneum* ซึ่งมีรายงานว่าก่อให้เกิดการติดเชื้อของเส้นผมหรือขนได้ [4] อย่างไรก็ตาม การปนเปื้อนของยีสต์หรือแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ผักหมักดองจะไม่ก่อโรคให้กับผู้บริโภค เมื่อผู้บริโภคปรุงผลิตภัณฑ์ผักหมักดองให้สุกหรือผ่านความร้อนแก่ผลิตภัณฑ์ก่อนรับประทาน

สำหรับยีสต์ที่พบในน้ำหมักผักดองสามารถนำไปใช้ประโยชน์ อาทิ *Candida utilis, Candida tropicalis* และ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถใช้เป็นอาหารมนุษย์หรืออาหารสัตว์ในรูปของโปรตีนเซลล์เดียว [11] *Saccharomyces cerevisiae, Candida utilis* และ *Rhodotorula* sp. ถูกแปรรูปเป็นสารสกัดจากยีสต์ [11] *Rhodotorula glutinis* และ *Candida utilis* ใช้ผลิตไขมัน [11] *Rhodotorula* sp. ใช้ผลิตสีผสมอาหาร [11], [12] *Saccharomyces cerevisiae* ใช้ผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำตาลซูโครส (invertase) และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส (glucose oxidase) [11], [13] *Candida utilis* ใช้ผลิตเอนไซม์อินนิเนส (inulinase) [11], [14]

ตารางที่ 1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ ในน้ำหมักผักดองเมื่อเลี้ยงบนอาหาร PDA

ตัวอย่างที่	รหัสยีสต์	ลักษณะของโคโลนีที่สังเกตได้			ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	การสร้าง ascospore
		สี	ความนูน	ผิวหน้า		
2	A11	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
2	A12	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี	y
8	B11	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี	n
9	C31	ขาว	+	เรียบ	กลม,รี	n
12	D21	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
12	D22	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
12	D23	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี	n
13	E31	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี	n
13	E32	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี	n
72	F41	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
72	F42	ขาว	++	ขรุขระ	กลม,รี	n
80	G11	un	++	เรียบ	กลม,รี	n
81	H21	เหลือง	+++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
82	I21	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
82	122	ขาว	-	ขรุขระ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
83	J21	เหลือง	+++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
83	122	แดง	+++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
85	K11	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี	y
85	K12	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
86	L21	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี	n
86	L22	ขาว	+++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
88	M21	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี	n
88	M22	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
91	N21	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
91	N22	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
91	N23	ขาว	+	เรียบ	กลม,รี	n
91	N24	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
93	P21	แดง	+++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
93	P22	ขาว	-	ขรุขระ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n
93	P23	ขาว	++	เรียบ	กลม,รี,ทรงกระบอก	n

หมายเหตุ : - ลักษณะที่ไม่ปรากฏ + ลักษณะที่ปรากฏเล็กน้อย y สร้าง ascospore
++ ลักษณะที่ปรากฏปานกลาง +++ ลักษณะที่ปรากฏมาก n ไม่สร้าง ascospore

ตารางที่ 2 แสดงผลการหมัก (fermentation) ในน้ำตาลชนิดต่างๆ

รหัสยีสต์	ชนิดของน้ำตาลที่หมัก				
	กลูโคส	มอลโตส	ซูโครส	แลคโตส	กาแลคโตส
A11		-	-	-	-
A12	+	-	-	-	-
B11	+	-	-	-	-
C31	+	-		-	-
D21		-		-	-
D22		-		-	-
D23	+	-		-	-
E31	+	-		-	-
E32	+	-		-	-
F41	+	-		-	-
F42	+	-		-	-
G11	+	-		-	-
H21	+	+		-	+
121				-	-
122				-	-
J21	+		+	-	-
J22				-	-
K11	+	+	+	-	+
K12				-	-
L21	+			-	-
L22				-	-
M21	+			-	-
M22				-	-
N21	+	+		-	-
N22	+	+	+	-	+
N23	+			-	
N24				-	
P21				-	
P22				-	
P23	+	+	+	+	

หมายเหตุ + สามารถหมักน้ำตาลได้
- ไม่สามารถหมักน้ำตาล

ตารางที่ 4 แสดงผลการใช้แหล่งไนโตรเจน

รหัสยีสต์	แหล่งไนโตรเจน	
	KNO_3	ยูเรีย
A11	-	-
A12	-	-
B11	-	-
C31	-	-
D21	-	-
D22	-	-
D23	-	-
E31		-
E32	-	-
F41	-	-
F42	-	-
G11	-	-
H21	-	
121		
122		+
J21		
J22	+	+
K11		-
K12		-
L21		
L22		+
M21		
M22		
N21	-	-
N22		-
N23		
N24		
P21	+	+
P22		+
P23		

หมายเหตุ : + สามารถใช้ได้
- ไม่สามารถใช้ได้

ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์ยีสต์ด้วย API ID32C

NO.	GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG	MAN	LAC	NO	SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	CAT	MLZ	GNT	LVT	GLU	SBE	GLN	ESC
A11	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	.	.
A12	+	.	+	+	+	.	.	+	+	.	.	+	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	+	.
B11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	+	.	.
C31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
D21	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
D22	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
D23	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
E31	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
E32	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
F41	.	.	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	.	.	+	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
F42	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
G11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
H121	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
I21	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
I22	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
J21	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
J22	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.
K11	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	+	+	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	+	.	.	.

ตารางที่ 5 (ต่อ) แสดงผลการวิเคราะห์ยีสต์ด้วย API ID32C

NO.	GAL	ACT	SAC	NAG	LAT	ARA	CEL	RAF	MAL	TRE	2KG	MDG	MAN	LAC	INO	SOR	XYL	RIB	GLY	RHA	PLE	ERY	MEL	GRT	MLZ	GNT	LVT	GLU	SBE	GLN	ESC
K12	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
L21	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-
L22	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-
M21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
M22	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
N21	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
N22	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
N23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
N24	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
P21	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
P22	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+
P23	+	-	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-

GAL GALactose ACT ACTidione SAC Sucrose

NAG N-Acetyl –Glucosamine LAT DL-LAcTate ARA L-ARAbinose CEL CELlobiose RAF RAFfinose

MAL MALtose TRE TREhalose 2KG 2-Keto-Gluconate

MDG alpha-Methyl-D-Glucoside MAN MANnitol LAC LACtose INO INOsitol

SOR SORbitol XYL D-XYLose RIB RIBose

GLY GLYcerol RHA RHAmose PLE PaLatinosE ERY ERYthritol MEL MELibiose

GRT GlucuRonaTe MLZ MeLeZitose GNT GlucoNaTe

LVT LeVulinaTe GLU GLUcose SBE SorBosE GLN GLucosamiNe ESC ESCulin

\+ สามารถใช้ได้ - ไม่สามารถใช้ได้

ตารางที่ 6 แสดงผลการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ด้วย API ID32C

รหัสยีสต์	สายพันธุ์ยีสต์	เปอร์เซ็นต์ความแม่นยำ (% identification)
A11	*Candida rugosa*	99.7%
A12	*Pichia etchellsii*	99.9%
B11	*Zygosaccharomyces* sp.	92.8%
C31	***Zygosoccharomyces*** sp.	56.9%
D21	*Candida rugosa*	99.9%
D22	*Candida rugosa*	99.9%
D23	***Zygosocchoromyces*** sp.	56.9%
E31	***Zygosocchoromyces*** sp.	56.9%
E32	*Zygosaccharomyces* sp.	97.3%
F41	*Candida krusei*	99.9%
F42	*Zygosaccharomyces* sp.	96.3%
G11	***Zygosoccharomyces*** sp.	56.9%
H21	*Candida holmii*	99.9%
I21	*Candida rugosa*	99.9%
122	***Trichosporon*** *cutaneum*	99.9%
J21	*Candida utilis*	99.9%
J22	*Rhodotorula glutinis*	99.6%
K11	*Saccharomyces cerevisiae*	99.9%
K12	*Candida rugosa*	99.9%
L21	*Pichia etchellsii*	99.9%
L22	*Candida lipolytica*	99.9%
M21	***Zygosocchoromyces*** sp.	56.9%
M22	*Candida rugosa*	99.9%
N21	*Candida tropicalis*	99.6%
N22	*Candida rugosa*	99.9%
N23	***Zygosoccharomyces*** sp.	56.9%
N24	*Candida rugosa*	99.9%
P21	*Rhodotorula glutinis*	99.6%
P22	***Trichosporon*** *cutaneum*	99.9%
P23	*Candida tropicalis*	99.6%

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนวิจัยพระจอมเกล้าธนบุรี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

สรุปผลการทดลอง

การคัดแยกและจัดจำแนกยีสต์จำนวน 11 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pichia ethellsii, Candida rugosa, Candida krusei, Candida holmii, Candida utilis, Candida lipolytica, Candida tropicalis, Zygosaccharomyces* sp., *Sacchromyces cerevisiae, Rhodotorula glutilis* และ *Trichosporon cutaneum* ได้จากผลิตภัณฑ์ผักหมักดอง ทั้งนี้ยีสต์ที่พบบางสายพันธุ์อาจนำไปใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมได้โดยจำเป็นต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้กันในปัจจุบันก่อน

เอกสารอ้างอิง

1. Fleming, H. P., McFeeters, R. F. and Daeschel, M. A., 1992, Fermented and Acidified Vegetables, In: Vanderzant, C. and Splittstoesser, D. F. (Eds), Compendium *of Methods for the Microbiological* Examination *of Foods.* 3rd ed., Edwards Brothers, Ann Arbor, pp. 929-952.

2. Hang, Y. D., Downing, D. L., Stamer, J. R. and Spittstoesser, D. F., 1972, "Wastes Generated in the Manufacture of Sauerkraut," *Journal of Milk and Food Technology,* Vol. 35, pp. 432-435.

3. Hang, Y. D., Spittstoesser, D. F. and Landschoot, R. L., 1972, "Sauerkraut Waste: a Favorable Medium for Cultivating Yeasts," *Applied Microbiology,* Vol. 24, pp. 1007-1008.

4. Larone, D. H., 1993, *Medically Important Fungi: A Guide to Identification, 2"" ed.*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

5. Kurtzman, C. P. and Fell, J. W., 1998, *The Yeasts: A Taxonomic Study,* 4th ed., Elsevier Science, Amsterdam.

6. Barnett, J. A., Payne, R. W. and Yarrow, D., 1990, *Yeasts: Characteristics and Identification,* Cambridge University, Cambridge.

'7. Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. and Blackwell, M., 1996, *Introductory Mycology*, 4'" ed., John Wiley & Sons, New York.

8. วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2537, *การเน่าเสียของอาหารและการป้องกัน*, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, สงขลา.

9. อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์, 2526, *ยีสต์และรา*, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี, กรุงเทพ.

10. Rohm, H., Eliskases-Lechner, F. and Brauer, M., 1992, "Diversity of Yeasts in Selected Dairy ... *of Applied Bacteriolology*, 370-371.

11. Halasz, A. and Lasztity, R., *1991, Use of Yeast Bioma... Food Production*, C... Press, Boca Raton.

12. Shih, C. T. and Hang, Y. D., 1996, "Production of Carotenoids by Rhodotorula rubra from Sauerkraut Brine," *Lebensmittel- Wissenschaft and Technologie*, Vol.2... *pp*. 570-572.

13. Goldstein, A. and Lampen, J. O., 1975, "β-D-Fructofuranoside Fructohydrolase from Yeast," Methods in Enzymology, Vol. 42, pp. 504.

14. Ku, M. A. and Hang, Y. D., 1994, "Effect of Inulin on Yeast Inulinase Production in Sauerkraut Brine," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol. 10, pp. 354-355.