การแยกและลักษณะสมบัติของยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าวและการประยุกต์เพื่อการผลิตขนมปัง ไวน์ และเอทานอล

นางสาวนิชานันท์ อุดมศักดิ์สกุล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF YEASTS FROM COCONUT NECTAR AND THEIR APPLICATION IN BREAD, WINE AND ETHANOL PRODUCTION

Miss Nichanun Udomsaksakul

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การแยกและลักษณะสมบัติของยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าวและการประยุกต์เพื่อการผลิตขนมปัง ไวน์ และเอทานอล
โดย	นางสาวนิชานันท์ อุดมศักดิ์สกุล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร. เคนทาโร โคดามะ

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาดุษฎีบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ดร. เคนทาโร โคดามะ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

นิชานันท์ อุดมศักดิ์สกุล : การแยกและลักษณะสมบัติของยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าวและการประยุกต์เพื่อการผลิตขนมปัง ไวน์ และเอทานอล (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF YEASTS FROM COCONUT NECTAR AND THEIR APPLICATION IN BREAD, WINE AND ETHANOL PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ดร. เคนทาโร โคดามะ, 97 หน้า.

คัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักเอทานอลสูงจำนวน 72 ไอโซเลตจากน้ำตาลสดมะพร้าวในจังหวัดสมุทรสงคราม ด้วยเทคนิคซีเลคทีฟคัลเจอร์ (selective culture) เมื่อจัดจำแนกโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบว่าทั้งหมดเป็นยีสต์ที่อธิบายสปีชีส์แล้ว ประกอบด้วยกลุ่มที่ 1 *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 56 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 *Hanseniaspora guilliermondii* จำนวน 1 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 3 *Zygosaccharomyces rouxii* จำนวน 1 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 4 *Saccharomycodes ludwigii* จำนวน 1 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 5 *Lachancea fermentati* จำนวน 5 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 6 *Wickerhamomyces anomalus* จำนวน 1 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 7 *Candida tropicalis* จำนวน 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 8 *Pichia kudriavzevii* จำนวน 2 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 9 *Pichia manshurica* จำนวน 1 สายพันธุ์ และกลุ่มที่ 10 *Shizosaccharomyces pombe* จำนวน 2 สายพันธุ์ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่พบเป็นกลุ่มหลักคิดเป็น 77.78 เปอร์เซ็นต์ของยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด ในจำนวนนี้สายพันธุ์ NC027 สามารถผลิตเอทานอลปริมาณสูงสุดจากอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 18% ได้เอทานอล 66.92 หรือ 1.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงมากกว่าสายพันธุ์ TISTR 5596 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ควบคุม สายพันธุ์ NC018 เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะกับการนำไปใช้ทำขนมปังเพราะสามารถผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้สูง ตกตะกอนเร็วและให้ผลผลิตชีวมวลปริมาณมาก ผลผลิตขนมปังที่ได้มีเนื้อสัมผัสดี ผลการทดสอบทางด้านประสาทสัมผัสของไวน์น้ำมะพร้าวที่ผลิตจากตัวแทน *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ พบว่าไวน์ทั้งหมดที่ผลิตได้ไม่มีความแตกต่างกันในด้านสีและความใส แต่ไวน์ที่ผลิตโดยใช้สายพันธุ์ NL010 มีรสชาติและความชอบโดยรวมจากผู้ทดสอบแตกต่างจากไวน์ที่ผลิตโดยสายพันธุ์อื่นอย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ค่าความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จาก *S. cerevisiae* ทั้งหมด 56 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้ สายพันธุ์ NL026 และ NL010 สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *S. cerevisiae* ทั้งสองสายพันธุ์ดังกล่าวมีศักยภาพในการเปลี่ยนวัตถุดิบที่มีราคาต่ำ เช่น ของทิ้งกลีเซอรอล (glycerol waste) ไปเป็นสารที่มีมูลค่าเพิ่มสูงขึ้นได้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2559 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

5373940623 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: COCONUT NECTER, SACCHAROMYCES CEREVISIAE, ETHANOL, GLYCEROL

NICHANUN UDOMSAKSAKUL: ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF YEASTS FROM COCONUT NECTAR AND THEIR APPLICATION IN BREAD, WINE AND ETHANOL PRODUCTION. ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. ANCHARIDA AKARACHARANYA, Ph.D., CO-ADVISOR: DR. KENTARO KODAMA, Ph.D., 97 pp.

Seventy-two high ethanol fermenting yeasts were isolated from coconut nectar in Samut Songkhram province by selective culture method. Base on molecular taxonomic characterization using sequence analysis of D1/D2 region of the large-subunit ribosomal RNA gene (LSU rRNA), they were identified as *Saccharomyces cerevisiae* (Group I, 56 isolates), *Hanseniaspora quilliermondii* (Group II, 1 isolate), *Zygosaccharomyces rouxii* (Group III, 1 isolate), *Saccharomycodes ludwigii* (Group IV, 1 isolate), *Lachancea fermentati* (Group V, 5 isolates), *Wickerhamomyces anomalus* (Group VI, 1 isolate), *Candida tropicalis* (Group VII, 2 isolates), *Pichia kudriavzevii* (Group VIII, 2 isolates), *Pichia manshurica* (Group IX, 1 isolate), *Shizosaccharomyces pombe* (Group X, 2 isolate). *Saccharomyces cerevisiae* was found to be dominant species (77.78%). *Saccharomyces cerevisiae* NC027 was suitable for ethanol production. It gave maximum ethanol 66.92 g/L in medium containing 18% (w/v) glucose (ethanol productivity 1.39 g/L/h), which were higher than *S. cerevisiae* TISTR 5596 (control strain). *Saccharomyces cerevisiae* NC018 was suitable as baker's yeast due to its high carbon dioxide production, high biomass yield and faster flocculation. Bread prepared by the strain NC018 showed good texture. Sensory evaluation of coconut wine produced from coconut juice by 9 point hedonic scale testing of 5 representative *S. cerevisiae* strains selected showed no significant differences (p= 0.05) in color and clarity except those produced by strain NL010 whose flavor and its overall acceptance was significant difference. *Saccharomyces cerevisiae* NL026 and NL010 assimilated glycerol which indicated their potential to convert low-price raw material such as glycerol waste to higher value product

Field of Study: Biotechnology
Academic Year: 2016

Student's Signature .....
Advisor's Signature .....
Co-Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญาภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์อาจารย์ได้กรุณาให้คำปรึกษาคำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆอันเป็นประโยชน์ต่องานวิจัยตลอดมา รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณศาสตราจารย์ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ได้ให้ความกรุณาให้คำปรึกษาแก้ไขงานที่ส่งตีพิมพ์ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่ง

กราบขอบพระคุณดร. เคนทาโร โคดามะ จากสถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำปรึกษา ความช่วยเหลือ ในการทำวิจัยตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวันภาควิชาจุลชีววิทยา ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป นภาธร ภาควิชาจุลชีววิทยา รองศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ จันทร์เจ้า ภาควิชาชีววิทยา กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิชภาคจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.ปราณี อ่านเปรื่อง ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการสำหรับการทำขนมปัง

กราบขอบพระคุณ โรงงานน้ำตาลครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ที่ให้ความอนุเคราะห์กากน้ำตาลสำหรับงานวิจัย

กราบขอบพระคุณ บริษัทบางจากไบโอฟูเอล จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างกลีเซอรอลดิบสำหรับงานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตลอดจนพี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือเสมอมาและกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และคนในครอบครัวทุกท่านที่ให้การสนับสนุน ให้ความเข้าใจรวมทั้งเป็นกำลังใจสำคัญให้กับข้าพเจ้ามาโดยตลอด

กราบขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ (สกอ.) ที่สนับสนุนทุนการศึกษาในช่วงปีการศึกษา 2554-2556

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฎ
สารบัญภาพ ..... ฐ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.2 วัตถุประสงค์ 2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย 2
บทที่ 2 ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 3
2.1 น้ำตาลสดมะพร้าว 3
2.2 การจัดจำแนกประเภทของยีสต์ 4
2.3 คุณสมบัติที่ใช้ในการคัดกรองและจำแนกยีสต์ 5
2.3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา 5
2.3.1.1 รูปร่างของเซลล์ 5
2.3.1.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ 5
2.3.1.3 การสร้างเส้นใย 6
2.3.1.4 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ 7
2.3.2 การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ 10
2.3.2.1 การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 10
2.3.2.2 การเจริญบนอาหารแข็ง 10

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

2.3.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี 11
2.3.3.1 ความสามารถในการหมักน้ำตาล 11
2.3.3.2 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน 11
2.3.3.3 ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน 12
2.3.3.4 การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส 13
2.3.3.5 การเกิดปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี 13
2.3.3.6 การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมติกสูง 13
2.3.3.7 การเจริญในระดับอุณหภูมิต่างๆ 13
2.3.3.8 ความต้องการวิตามินในการเจริญเติบโต 13
2.3.3.9 การสร้างกรดจากกลูโคส 14
2.3.4 คุณลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี 14
2.3.5 การจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานโมเลกุล 14
2.4 คุณสมบัติของยีสต์ *S. cerevisiae* 15
2.4.1 การใช้ยีสต์เพื่อผลิตขนมปัง 16
2.4.2 องค์ประกอบที่มีผลต่อคุณภาพของขนมปัง 18
2.4.3 การผลิตยีสต์ขนมปัง 19
2.5 ประเภทของกระบวนการเมแทบอลิซึมน้ำตาล 20
2.6 ชีวเคมีของการหมักเอทานอล 20
2.7 ความสำคัญของเชื้อเพลิงชีวภาพ 21
2.8 บทบาทของยีสต์ในการหมักไวน์ 22
2.9 คุณสมบัติของยีสต์ที่มีต่อการหมักไวน์ 23
2.10 กลีเซอรอล (glycerol) 25
2.11 เมแทบอลิซึมในการใช้กลีเซลอรอลโดยยีสต์ 26

หน้า

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง 29
3.1 จุลินทรีย์ 29
3.2 น้ำตาลสดมะพร้าว 29
3.3 กากน้ำตาล 29
3.4 กลีเซอรอลดิบ 29
3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับงานวิจัย 29
3.6 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ 31
3.7 การแยกและคัดกรองยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าว 32
3.8 พิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่แยกได้ 33
3.8.1 ศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) ตามวิธีของ Kurtzman และคณะ., 2011 33
3.8.2 ทดสอบทางสรีรวิทยาและปฏิกิริยาชีวเคมีบางประการ (Kurtzman และคณะ, 2011) 33
3.8.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์และศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานโมเลกุล (molecular taxonomic characteristics) 35
3.8.3.1 การสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำพีซีอาร์ 35
3.8.3.2 การทำพีซีอาร์ส่วน D1/D2 ของยีน 26S rDNA 35
3.8.3.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟริซิส 36
3.8.3.4 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit 36
3.8.3.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอและการบ่งชี้สายพันธุ์ของยีสต์ 37
3.9 ศึกษาสมบัติบางประการของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่คัดกรองได้ 38
3.9.1 ทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการหมัก (Wijesinghe และ Samarajeewa, 1988) 38
3.9.2 หาอัตราเร็วของการหมัก (Asyikeen และคณะ., 2013) 38

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

3.9.3 หาความเร็วของเซลล์ในการตกตะกอน (flocculation test) (Asyikeen และคณะ, 2013)..... 39
3.9.4 ทดสอบความทนต่อเอทานอล..... 39
3.9.5 ทดสอบความทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูง..... 39
3.9.6 ทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง..... 39
3.9.7 หาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล..... 39
3.9.7.1 ผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°ซ..... 39
3.9.7.2 ผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°ซ..... 40
3.10. ทดสอบศักยภาพของยีสต์ *S. cereviaise* ที่คัดกรองได้ในการทำผลิตภัณฑ์อาหาร..... 40
3.11 ทดสอบยีสต์ *S. cereviaise* ที่คัดกรองได้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ..... 41
3.12 ทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน..... 41
3.13 วัดปริมาณชีวมวลที่ยีสต์ *S. cerevisaie* ผลิตได้จากการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน..... 42
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง..... 43
4.1 ผลการแยกยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าว..... 43
4.2 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่คัดแยกได้..... 56
4.2.1 ประสิทธิภาพการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างการหมัก..... 56
4.2.2 อัตราเร็วการหมักและความเร็วในการตกตะกอน..... 56
4.2.3 ผลความทนต่อเอทานอล..... 57
4.2.4 ผลความทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาล..... 59
4.2.5 ผลของความสามารถเจริญที่อุณหภูมิสูง..... 59
4.2.6 ผลของประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล..... 60
4.2.6.1 ผลการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°ซ..... 60
4.2.6.2 ผลการผลิตเอทานอลที่ 40°ซ..... 62

หน้า

4.3 ผลการทดสอบศักยภาพของ *S. cerevisiae* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร.. 63
4.3.1 ผลการทำขนมปัง 63
4.3.2 ผลการหมักไวน์จากน้ำมะพร้าว 65
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisaie* ที่คัดกรองได้ 68
4.5 ผลทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน 70
4.5.1 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน 70
4.5.2 ปริมาณชีวมวลที่ยีสต์ *S. cerevisaie* ผลิตได้จากการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน 71
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 74
รายการอ้างอิง 76
ภาคผนวก 83
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ 84
ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์ 89
ภาคผนวก ค ผลการทดสอบเพิ่มเติม 94
ผลการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และการทนต่ออุณหภูมิสูงของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากน้ำตาลมะพร้าว 94
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 97

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2.1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของยีสต์ 12

ตารางที่ 2.2 ปริมาณยีสต์ที่มีผลต่อระยะเวลาการหมักขนมปัง 17

ตารางที่ 2.3 ผลของอุณหภูมิการบ่มโดต่อระยะเวลาการหมัก 17

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติของยีสต์ขนมปังแต่ละชนิด 18

ตารางที่ 4.1 การใช้แหล่งคาร์บอนในภาวะมีอากาศและการหมักคาร์บอนในภาวะจำกัดออกซิเจนของตัวแทนแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากน้ำตาลสดมะพร้าว 46

ตารางที่ 4.2 ตารางเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ของตัวแทนยีสต์ S. cerevisiae และสายพันธุ์อื่นๆที่คัดแยกได้จากน้ำตาลสดมะพร้าว 53

ตารางที่ 4.3 ระยะเวลาในการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์และตกตะกอนของยีสต์ที่คัดกรองมาทดสอบเทียบกับสายพันธุ์ควบคุมของยีสต์ขนมปังและยีสต์ผลิตเอทานอล 58

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการทำให้ขนมปังขึ้นฟู และน้ำหนักสดของยีสต์ S. cerevisiae ที่คัดแยกได้จากน้ำตาลสดมะพร้าว 64

ตารางที่ 4.5 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดทั้งหมดและปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์น้ำมะพร้าวที่หมักโดยใช้ *S. cerevisiae* ทั้ง 12 สายพันธุ์ 67

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้านสี ความใส กลิ่น รสชาติและความชอบโดยรวม 68

ตารางที่ 4.7 ชีวมวลของ *S. cerevisiae* ที่ผลิตได้จากการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน 71

ตารางที่ 4.8 สรุปคุณสมบัติของ *S. cerevisiae* ทั้ง 12 สายพันธุ์และความสามารถในการหมักเอทานอล ทำขนมปังและทำไวน์ 73

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญภาพ

รูปที่ 2.1 ช่อดอกมะพร้าวที่เฉือนเพื่อเก็บน้ำตาลสดมะพร้าว 3

รูปที่ 2.2 ลักษณะรูปร่างและการสืบพันธุ์ของยีสต์จากซ้ายมือรูปกลม รูปท่อนยาว รูปทรงกระบอก รูปสามเหลี่ยม รูปขวด และรูปมะนาวฝรั่ง 5

รูปที่ 2.3 แสดงการแตกหน่อและแบ่งตัวของยีสต์ 6

รูปที่ 2.4 การสร้างเส้นใยเทียมของยีสต์ 7

รูปที่ 2.5 สัณฐานวิทยาของแอสโคสปอร์ในยีสต์บางชนิด 8

รูปที่ 2.6 การสร้างเบสิดิโอสปอร์ของยีสต์ 9

รูปที่ 2.7 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล 26

รูปที่ 8 วิถีการนำกลีเซอรอลไปใช้ในเมแทบอลิซึมของยีสต์ 27

รูปที่ 9 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล ในการสร้างสารเพิ่มมูลค่าต่างๆ 28

รูปที่ 4.1 เส้นใยเทียม (A) และแอสโคสปอร์ (B) ของ *S. cerevisae* สายพันธุ์ NL010 ที่กำลังขยาย 100 เท่า 44

รูปที่ 4.2 ลักษณะเซลล์ปกติของยีสต์ *H. guillermondii* (A) ไม่สร้างเส้นใยเทียมบนอาหารคอนมีลอะการ์ (B) 45

รูปที่ 4.3 ลักษณะเซลล์ปกติของยีสต์ *Z. rouxii* ในอาหาร YPD (A) สร้างเส้นใยเทียมอย่างง่าย ... 46

รูปที่ 4.4 ลักษณะเซลล์ปกติของยีสต์ *S. ludwigii* ในอาหาร YPD (A) 48

รูปที่ 4.5 ลักษณะเซลล์ปกติของยีสต์ *L. fermentati* ในอาหาร YPD (A) 49

รูปที่ 4.6 ลักษณะเส้นใยเทียมของสายพันธุ์ NT015 (A) และสายพันธุ์ NC029 (B) 50

รูปที่ 4.7 ลักษณะเซลล์ (A) และการสร้างเส้นใยเทียมของ NL003 (B) บนอาหารคอนมีลอะการ์ ... 51

รูปที่ 4.8 ลักษณะเซลล์ของ *Wickerhamomyces anomalus* (A) และการสร้างเส้นใยเทียมใน NT026 บนอาหารคอนมีลอะการ์ (B) 52

รูปที่ 4.9 ลักษณะเซลล์ของ *Sch. pombe* (A) แอสโคสปอร์ของ NT026 บนอาหาร YM (B) 53

รูปที่ 4.10 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และยีสต์สายพันธุ์อื่นที่คัดแยกได้จากน้ำตาลสดมะพร้าว สร้างขึ้นโดยวิธีเนเบอร์จอยนิง (Neighbor Joining) ที่ค่าบูทสแตรป (bootstrap values) 1,000 ซ้ำ โดยพิจารณาจากความเหมือนของลำดับเบสบริเวณ D1/D2 บนยีนอาร์ดีเอ็นเอของไรโบโซมหน่วยใหญ่ (26S) เทียบกับสายพันธุ์ยีสต์ที่อยู่ในฐานข้อมูลเอ็นซีบีไอ (NCBI database) 55

รูปที่ 4.11 ความทนต่อเอทานอลของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ; 10%, 13%, และ 15% ; ผลการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (% v/v) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 59

รูปที่ 4.12 ความทนต่อน้ำตาล (% w/v)ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ; 24%, 26%, และ 28% ; ผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 60

รูปที่ 4.13 ผลการหมักเอทานอลของ *S. cerevisae* 12 สายพันธุ์ที่คัดกรองจากน้ำตาลสดมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30 °ซ ผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$; Duncan's MRT) 61

รูปที่ 4.14 ผลการหมักเอทานอลของยีสต์ที่ไม่ใช่ *S. cerevisiae* จากน้ำตาลสดมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30 °ซ ผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$; Duncan's MRT) 62

รูปที่ 4.15 ผลการหมักเอทานอลของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำตาลสดมะพร้าว ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$; Duncan's MRT) 63

รูปที่ 4.16 เปรียบเทียบลักษณะการขึ้นฟูของโดซึ่งเตรียมโดย *S. cerevisiae* NC018 และที่เตรียมโดยยีสต์ขนมปังทางการค้าสายพันธุ์ M 64

รูปที่ 4.17 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดย *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 เปอร์เซ็นต์ (▩) 48 ชั่วโมง, (▨) 72 ชั่วโมง, (▨) 96 ชั่วโมง แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 69

รูปที่ 4.18 ผลทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* NC027 เปรียบเทียบกับของสายพันธุ์ควบคุม TISTR 5596 จากกากน้ำตาลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ 24, 48, 72, 96

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

และ 120 ชั่วโมง, (■) สายพันธุ์ NC027 (▨) TISTR 5596 ผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (P<0.05; Duncan's MRT)..... 70

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

น้ำตาลสดมะพร้าว (coconut nectar) คือน้ำหวานในช่อดอกมะพร้าวหรือจั่น (spadix) มะพร้าว ได้มาจากต้นมะพร้าวอายุ 3-40 ปี โดยการใช้เชือกมัดจั่นมะพร้าว ความยาวประมาณ 75-100 ซม. ให้โน้มลงมา 4-5 วัน ลอกเปลือกจั่น มัดรวบจั่นเหมือนเดิมแล้วใช้มีดเชือดบริเวณปลายสุดของจั่นให้ลึกประมาณ 0.5-1.0 ซม. ใช้ภาชนะ (คนไทยนิยมใช้กระบอกไม้ไผ่) ผูกเชือกเพื่อรองรับน้ำหวานที่ไหลออกมา (Wanichkul และคณะ, 2009) น้ำตาลสดมะพร้าวมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 15-18% (w/v) โดยมีน้ำตาลซูโครส เป็นน้ำตาลชนิดหลัก (Atputharajah และคณะ, 1986) น้ำตาลสดมะพร้าวเป็นวัตถุดิบของการผลิตน้ำตาลมะพร้าว ซึ่งเป็นส่วนผสมสำคัญของขนมหวานของไทยแบบดั้งเดิม เพราะทำให้ขนมหวานมีกลิ่นและรสหวานพิเศษเฉพาะตัว น้ำตาลที่พบในน้ำตาลมะพร้าวคือ ซูโครส 84.98% กลูโคส 2% และฟรักโทส 2.9% (w/w) (Kozaki, 2004) ดังนั้น น้ำตาลสดมะพร้าวจึงมีความน่าสนใจ ในด้านการนำมาแยกและคัดกรองยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นราเซลล์เดี่ยวใน Family *Saccharomycetaceae* ในสภาวะจำกัดออกซิเจน *S. serevisiae* สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ มีเอนไซม์อินเวอร์เทส ซึ่งทำหน้าที่ย่อยน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรักโทส จึงสามารถหมักน้ำตาลซูโครสเป็นเอทานอลได้ มีหลักฐานว่า *S. serevisiae* ถูกนำมาใช้ในการผลิตขนมปัง ไวน์และเบียร์มาตั้งแต่ก่อนคริสตกาล (Kevin, 2005) จากการที่มนุษย์สามารถบริโภคขนมปัง เบียร์ และไวน์ ซึ่งเป็นผลิตผลของ *S. cerevisiae* มาได้อย่างปลอดภัยเป็นระยะเวลาอันยาวนานนี้เอง จึงทำให้ *S. cerevisiae* เป็นที่ยอมรับด้านความปลอดภัยในการบริโภค ปัจจุบันเมื่อความรู้เกี่ยวกับ *S. cerevisiae* มีมากขึ้นและพัฒนาการของเทคโนโลยีต่างๆ เพิ่มสูงขึ้น *S. cerevisiae* ซึ่งมีความปลอดภัยในการนำมาบริโภคก็ได้มีการนำมาใช้ประโยชน์เพิ่มมากขึ้น เช่น ใช้เป็นแหล่งอาหารเสริมสำหรับคนและสัตว์ ผลิตสารสกัดจากยีสต์เพื่อเป็นสารปรุงรสและแหล่งของสารอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ หรือใช้ในการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง จากตัวอย่างข้างต้นการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ เหล่านี้โดยใช้ *S. cerevisiae* ต้องการสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่มีคุณลักษณะพิเศษเฉพาะสำหรับแต่ละผลิตภัณฑ์ เช่น สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สำหรับทำขนมปัง ควรหมักเร็ว ให้คาร์บอนไดออกไซด์สูง ผลิตเมทาโบไลต์ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับส่วนผสมในก้อนโดแล้วให้ขนมปังที่มีกลิ่นและรสชาติดี ในขณะที่สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สำหรับการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงควรให้เอทานอลสูง ทนเอทานอลซึ่งเป็นพิษต่อการ

เจริญและการหมักเอทานอลได้ดี ทนสารที่มีผลยับยั้งการเจริญที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบที่ใช้ได้ดี ทนอุณหภูมิสูง เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะแยกยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าว ศึกษาคุณลักษณะของยีสต์ ที่แยกได้ เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 คัดแยกและจำแนกชนิดของยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าว และหาประสิทธิภาพการหมักเอทานอล

1.2.2 คัดแยก *S. cerevisiae* จากน้ำตาลสดมะพร้าวที่มีลักษณะสมบัติเหมาะสมสำหรับการผลิตขนมปัง ไวน์และเอทานอล และการนำประยุกต์ใช้

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 คัดแยกและจำแนกชนิดของยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าว

1.3.2 หาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของยีสต์ที่แยกได้

1.3.3 ทดสอบลักษณะสมบัติของ *S. cerevisiae* ต่อความเหมาะสมสำหรับการผลิตขนมปัง ไวน์

1.3.4 ผลิตขนมปังและไวน์โดยใช้ *S. cerevisiae* ที่คัดเลือกได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

ได้ ยีสต์ที่มีความสามารถในการนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิต ขนมปัง ไวน์ และเอทานอลจากน้ำตาลสดมะพร้าวเพื่อการนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์ทางทรัพยากรที่หลากหลาย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 น้ำตาลสดมะพร้าว

น้ำตาลสดมะพร้าว (coconut inflorescence sap: CIS, coconut nectar) เป็นน้ำหวานที่ได้จากการตัดช่อดอกมะพร้าวที่ยังอ่อนและยังไม่บาน (Grimwood และ Ashman, 1975) ซึ่งกาบใบของช่อดอกจะหุ้มดอกมะพร้าวที่ยังอ่อนไว้แน่นก่อนดอกมะพร้าวจะบานประมาณ 3 สัปดาห์ ประเทศไทยมีการเก็บน้ำตาลสดมะพร้าวในกระบอกไม้ไผ่มาแต่ดั้งเดิม การตัดช่อดอกมะพร้าวจะเฉือนบริเวณปลายช่อดอกบางๆ ดังรูป 2.1 รองด้วยกระบอกไม้ไผ่ ใน 1 วันสามารถเก็บน้ำตาลสดได้สองครั้ง โดยมะพร้าว 1 ช่อจะให้น้ำตาลสดได้ประมาณ 4 ลิตรต่อ 1 วัน และสามารถเก็บผลผลิตได้ตลอดระยะเวลา 2 เดือน (Law และคณะ, 2011) น้ำตาลสดมะพร้าวโดยธรรมชาติจะมีสีค่อนข้างเหลืองออกน้ำตาล ใส ค่าความเป็นกรดเบสเป็นกลาง มีซูโครส 12-15% โปรตีน 0.23% และไขมัน 0.02% เป็นองค์ประกอบโดยประมาณ รวมถึงแร่ธาตุต่างๆ กลูโคส ฟรุกโทส มอลโทสและราฟฟิโนส นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งของโซเดียมและโพแทสเซียม (Kalaiyarasi และคณะ, 2013) หลังจากน้ำตาลมะพร้าวหยดออกมาจากช่อดอกจะเกิดการหมักของจุลินทรีย์ที่อยู่ในช่อดอก หรือสิ่งแวดล้อมตามธรรมชาติขึ้นอย่างรวดเร็ว จากรายงานของ (Sanni, 1993*) Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์สายพันธุ์หนึ่งที่พบว่าคัดกรองได้เป็นสายพันธุ์หลักๆจากน้ำตาลมะพร้าว ในปี 2004 มีรายงานจาก (Wellala และคณะ, 2004) คัดกรองยีสต์จำนวน 12 สายพันธุ์ จากการหมักของช่อดอกมะพร้าวแบบธรรมชาติที่ประเทศศรีลังกา พบว่าจุลินทรีย์สายพันธุ์ที่แยกได้คือ *Saccharomyces* sp.

รูปที่ 2.1 ช่อดอกมะพร้าวที่เฉือนเพื่อเก็บน้ำตาลสดมะพร้าว

2.2 การจัดจำแนกประเภทของยีสต์

ยีสต์จัดเป็นราที่มีเซลล์อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยว บางชนิดมีลักษณะหลายเซลล์หรือต่อกันแบบเส้นใยเทียม (pseudohyphae) มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) หรือแบ่งตัวแบบไบนารีฟิสชัน (binary fission) นอกจากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศยีสต์หลายชนิดยังมีระยะสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) กลไกในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์มี 2 แบบ คือการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore formation) และการสร้างแบสิดิโอสปอร์ (basidiospore formation) ซึ่งยีสต์ที่สร้างแอสโคสปอร์เรียกว่าแอสโคมัยซีตัสยีสต์ (ascomycetous yeast) ยีสต์ที่สร้างแบสิดิโอสปอร์เรียกว่าแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ (basidiomycetous yeast) แหล่งอาศัยโดยธรรมชาติของยีสต์โดยทั่วไปจะอยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น (Lodder, 1970) ยีสต์มีการแพร่กระจายอยู่ในสิ่งแวดล้อมทุกหนแห่ง แต่ในแหล่งตัวอย่างที่พบในความถี่สูงคือบริเวณที่มีน้ำตาลสูง แหล่งตัวอย่างที่ดี เช่น ผลไม้ ผิวผลไม้ที่มีบาดแผลหรือมียางไหลออกมา ยีสต์บางจำพวกพบความสัมพันธ์เกี่ยวข้องกับแมลงและดิน ซึ่งยีสต์ที่จะนำมาใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมต้องมีลักษณะคุณสมบัติทางกายภาพที่จำเพาะเจาะจง (Ekunsanmi และ Odunfa, 1990) การจัดจำแนกประเภทของยีสต์เกิดขึ้นครั้งแรกใน ปี ค.ศ. 1960 โดยใช้หลักการทางสัณฐานวิทยา (morphology) เปรียบหลักการใช้สารอาหารและทางสรีรวิทยา (Physiology) รวมทั้งพันธุศาสตร์ขั้นพื้นฐาน (Boekhout และ Robert, 2003) ต่อมามีการคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์ให้บริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการ การให้ชื่อวิทยาศาสตร์ โดยอาศัยความแตกต่างของรูปร่างเซลล์ รูปร่างและการสร้างแอสโคสปอร์ การหมักน้ำตาล การใช้น้ำตาลในที่มีอากาศ ความทนต่ออุณหภูมิ ซึ่งเมื่อเทคนิคในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์มีการพัฒนามากขึ้นการค้นพบยีสต์สายพันธุ์ใหม่อาจจะมีเพิ่มขึ้นเช่นกัน

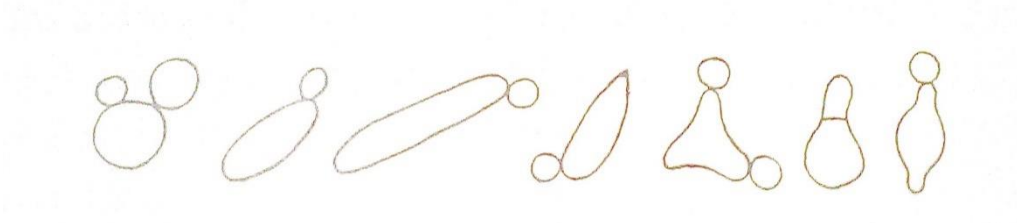
((Asyikee และคณะ, 2013) แยก *S. cerevisiae* จากผักและผลไม้ชนิดต่างๆ จำนวน 30 ชนิดในประเทศมาเลเซีย โดยวิธี enrichment culture ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากผลองุ่น และน้ำตาลซูโครส 27% (w/v) ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 3.2 ได้ *S. cerevisiae* 5 ไอโซเลต ที่มีคุณลักษณะเหมาะที่จะนำไปใช้ทำให้ก้อนโดฟูขึ้น (leavening agent) เพราะนอกจากสามารถหมักได้เร็วกว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้าแล้วยังสามารถทนภาวะเครียด ซึ่งยีสต์ที่จะใช้เป็นสารที่ทำให้ขึ้นฟู (leavening agent) ในการทำขนมปังควรจะทนได้คือเจริญบนอาหารแข็ง YPD ซึ่งประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ 1% เปปโทน 1% น้ำตาลกลูโคส 2% วุ้น 2% ที่เติมเอทานอล 8% (v/v) นาน 3 วัน ตามด้วยเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 20% นาน 3 วัน ตามด้วยเจริญบนอาหารแข็ง YP ซึ่งประกอบด้วย สารสกัดจากยีสต์ 10% เปปโทน 1% ซูโครส 20% และเอทานอล 8% (v/v) นาน 3 วัน รวมทั้งสิ้น 9 วัน

2.3 คุณสมบัติที่ใช้ในการคัดกรองและจำแนกยีสต์

2.3.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา

2.3.1.1 รูปร่างของเซลล์

ยีสต์มีรูปร่างที่แตกต่างกันหลายแบบ นอกจากรูปร่างกลม (spherical, globose) รูปไข่ (ovoid) รูปท่อน ยาว (elongated) และทรงกระบอก (cylindrical) ดังรูปที่ 2.2 ยีสต์บางชนิดมีรูปร่างคล้ายขวด เช่น *Brettanomyces* ซึ่งเคยเป็นที่นิยมทำเบียร์ในประเทศไอร์แลนด์และเบลเยี่ยม ยีสต์ที่มีรูปร่างเฉพาะอีกชนิดหนึ่งคือ *Trigonopsis* มีรูปร่างเป็นสามเหลี่ยม (Phaff และคณะ, 1966) รายงานว่ารูปร่างของยีสต์เป็นคุณลักษณะเฉพาะที่จะบ่งบอกเกี่ยวกับจำนวนประชากรหรือแหล่งที่อยู่ และสามารถบอกช่วงเวลาการพัฒนาของเซลล์ยีสต์ได้ ยีสต์ที่มีรูปทรงคล้ายผลมะนาวฝรั่ง (apiculate) จะพบได้ในช่วงแรกๆของการหมักพวกผลไม้หรือวัตถุดิบที่มีความหวานในธรรมชาติ ยีสต์ที่มีรูปร่างแบบนี้เช่นสกุล *Hanseniaspora* และ *Kloekera*



รูปที่ 2.2 ลักษณะรูปร่างและการสืบพันธุ์ของยีสต์จากซ้ายมือรูปกลม รูปท่อนยาว รูปทรงกระบอก รูปสามเหลี่ยม รูปขวด และรูปมะนาวฝรั่ง
(ที่มา: Phaff และคณะ 1966)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

2.3.1.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

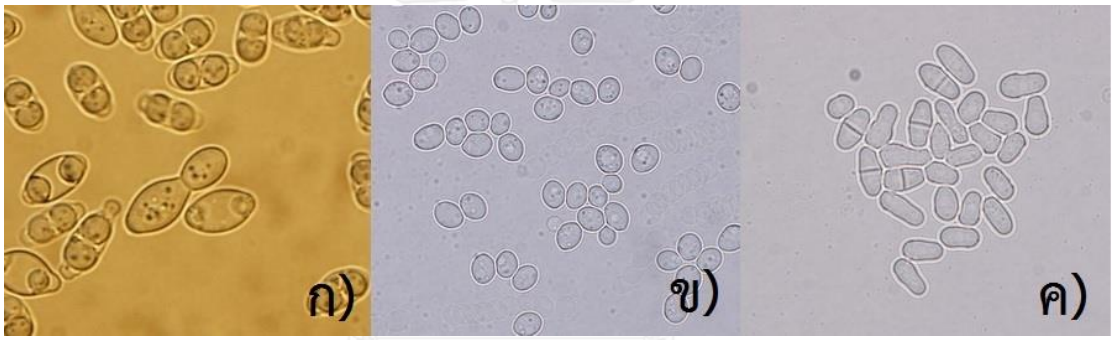
1) การแตกหน่อ (budding)

ยีสต์ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ การแตกหน่อเป็นการแบ่งเซลล์ที่มีลักษณะค่อนข้างจำเพาะต่างจากการแบ่งเซลล์ของยูคาริโอต (Eukaryote) ชนิดอื่นๆ การแตกหน่อของยีสต์แบ่งตามตำแหน่งที่เกิดหน่อได้เป็น 3 แบบ(Yarrow, 1998) คือ 1. การแตกหน่อที่ขั้วเดียว (unipolar หรือ monopolar budding) เป็นการแตกหน่อเกิดที่ขั้วหรือปลายเพียงด้านเดียว โดยการแตกหน่อจะเกิดขึ้นซ้ำๆกันที่ตำแหน่งเดิม 2. การแตกหน่อที่สองขั้ว (bipolar budding) การแตกหน่อแบบนี้เกิดขึ้นที่ขั้วหรือปลายทั้งสองด้านของเซลล์ ซึ่งปกติจะเกิดทีละขั้วหรืออาจเกิดพร้อมกันทั้งสองขั้วก็ได้ 3. การแตกหน่อที่หลายขั้ว (multipolar หรือ multilateral budding) ยีสต์ส่วนใหญ่มีการแตกหน่อแบบนี้ โดยการแตกหน่อเกิดได้โดยรอบเซลล์ทุกด้าน ยีสต์ที่มี

การแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Saccharomyces* sp., *Zygosaccharomyces* sp., *Pichia* sp. และ *Hansenula* sp.

2) การแบ่งเซลล์แบบไบนารี (binary fission)

สำหรับการแบ่งเซลล์แบบไบนารีนั้นเกิดโดยเซลล์ขยายขนาดจนถึงขนาดวิกฤตซึ่งมีขนาดประมาณสองเท่าของเซลล์เดิม มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิสซึ่งเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์จะเกิดผนังกั้นขวาง (cross wall) ระหว่างนิวเคลียสทั้งสองกั้นแยกเซลล์ออกเป็นสองเซลล์ที่มีขนาดเกือบเท่ากัน การตัดขาดตลอดตามผนังขวางทำให้เซลล์ลูกทั้งคู่แยกจากกัน เมื่อแยกจากกันแล้วจะมีรอยแผลที่เกิดจากการแบ่ง (division scar) ปรากฏอยู่ตรงตำแหน่งที่มีการแยกเซลล์ทั้งสองออกจากกันดังรูปที่ 2.3 ซึ่งมียีสต์เพียงสายพันธุ์เดียวที่สืบพันธุ์โดยการแบ่งเซลล์คือ *Scizosaccharomyces pombe*



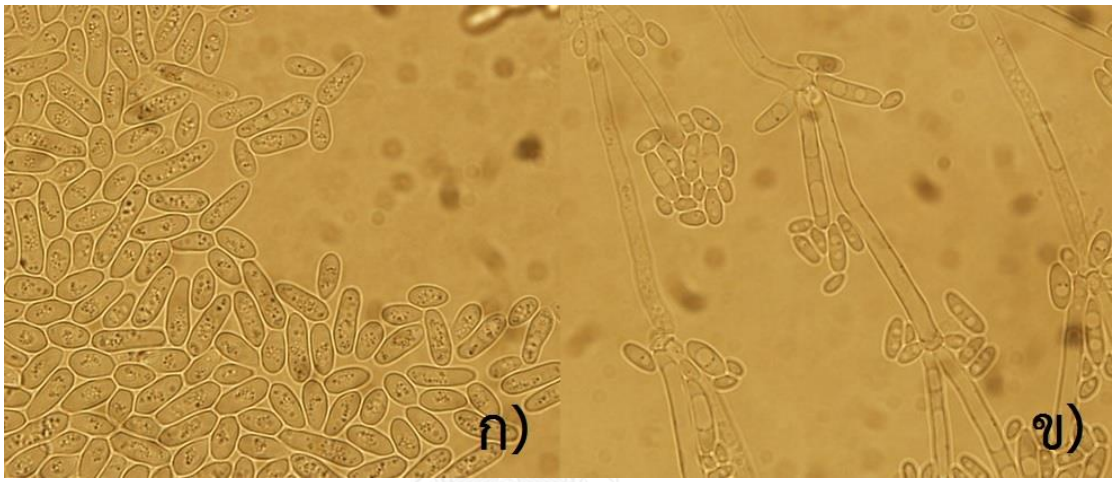
รูปที่ 2.3 แสดงการแตกหน่อและแบ่งตัวของยีสต์

ก) การแตกหน่อแบบสองขั้ว ข) การแตกหน่อหลายขั้ว ค) การแบ่งเซลล์แบบไบนารี

2.3.1.3 การสร้างเส้นใย

การสร้างเส้นใย (filamentation) ในยีสต์มีทั้งเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมซึ่งมีความแตกต่างกัน การสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) เกิดจากการที่ยีสต์แตกหน่อตามปกติแต่เซลล์ลูกไม่หลุดออกจากเซลล์แม่ เส้นใยเทียมในยีสต์พบ 2 แบบ คือ 1) รูดิเมนทารี ซูโดไมซีเลียม rudimentary pseudomycelium เซลล์เป็นสายยาวที่เกิดการแตกหน่ออย่างต่อเนื่อง ซึ่งหน่อที่เกิดขึ้นแต่ละครั้งไม่หลุดออกจากเซลล์แม่ ทำให้มองเห็นเซลล์ในรูดิเมนทารี ซูโดไมซีเลียม จะมีขนาดเท่ากันรูปร่างคล้ายกันเพียงแต่ต่อกันเป็นสาย 2) ซูโดไมซีเลียมที่ได้รับการพัฒนาอย่างดี (well- developed pseudomycelium) เป็นเส้นใยที่แตกหน่อต่อเนื่องและมีการแตกหน่อบริเวณรอยคอดของจุดเชื่อมต่อระหว่างหน่อกับเซลล์แม่ โครงสร้างจึงมองดูเหมือนเป็นกิ่งก้านแตกต่างจากรูดิเมนทารี ซูโดไม

ซีเลียมรูปที่ 2.4 ส่วนเส้นใยแท้ (true mycelium) เป็นโครงสร้างที่พบในบางระยะของการเจริญในยีสต์บางสกุล เช่น *Tricosporon* เส้นใยแท้มีลักษณะคล้ายคลึงกับเส้นใยของรา คือมีผนังกั้นเส้นใยซึ่งต่างกับเส้นใยเทียมคือเส้นใยเทียมไม่มีผนังกั้นมีเพียงรอยคอดบริเวณที่เคยเป็นเซลล์แม่และเซลล์ของหน่อ การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมเป็นลักษณะเฉพาะที่เป็นประโยชน์ในการจัดจำแนกยีสต์ เป็นคุณสมบัติเฉพาะของยีสต์แต่ละสกุล ยีสต์บางชนิดพบการสร้างเส้นใยได้ทั้งสองแบบ (Phaff และคณะ, 1966)



รูปที่ 2.4 การสร้างเส้นใยเทียมของยีสต์

ก) แบบ rudimentary pseudomycelium

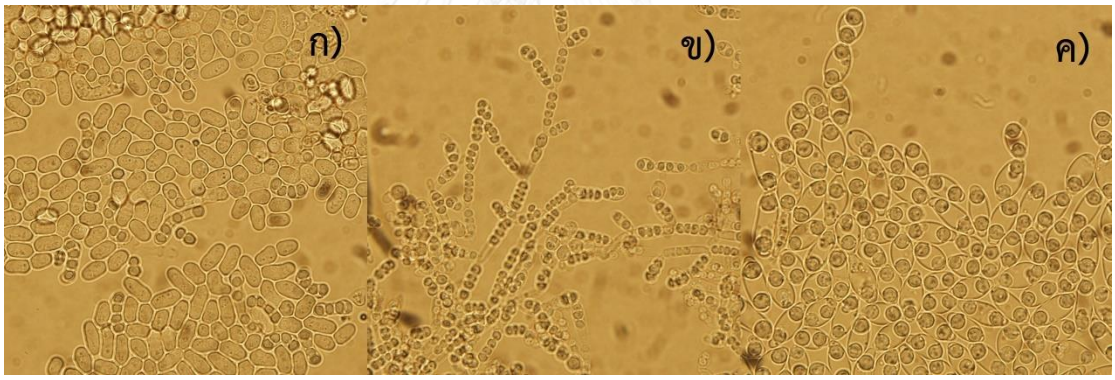
ข) แบบ well-developed pseudomycelium

2.3.1.4 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

1) การสร้างแอสโคสปอร์ โดยทั่วไปมักเกิดในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่ยีสต์บางชนิดสามารถสร้างแอสโคสปอร์ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา บางชนิดต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่จำเพาะเจาะจงต่อการสร้างสปอร์ (sporulation medium) โดยยีสต์บางชนิดต้องเลี้ยงในอาหารที่สมบูรณ์คืออาหารก่อนการสร้างสปอร์เพื่อให้เซลล์เจริญดีแล้วจึงถ่ายไปยังอาหารสำหรับการสร้างสปอร์ ปกติอาหารสำหรับการสร้างสปอร์จะมีคาร์โบไฮเดรตปริมาณน้อย ทำให้ยีสต์มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศน้อย อาหารที่ใช้สำหรับการสร้างแอสโคสปอร์มีหลายชนิด เช่น อาหารแข็งอะซิเตท (acetate agar),อาหารแข็งโกร็อดโควา (Gorodkowa agar), อาหารแข็งสารสกัดจากยีสต์และสารสกัดจากมอลต์ (yeast extract malt extract agar) และอาหารแข็งคอร์นมีล (corn meal agar) ยีสต์บางชนิดตรวจพบการสร้างสปอร์ได้เร็วเมื่อบ่มเพียง 48 ชั่วโมง บางชนิดต้องใช้เวลานาน 3-6 สัปดาห์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสปอร์จะต่ำกว่าอุณหภูมิที่ยีสต์นั้นเจริญได้ แอสโคสปอร์มี

รูปร่างหลายแบบ เช่น กลม รี หรือรูปถั่ว (reniform) ทรงกระบอกหัวท้ายมน (cylindrical with obtusen ends) รูปหมวก (hat) รูปหมวกทหาร (helmet) รูปกระสวยและมีรยางค์ (spindle with appendages) และรูปดาวเสาร์ (Saturn, saturniform) ดังรูป 2.5 ผิวของแอสโคสปอร์อาจจะมีลักษณะเรียบ บาง หนา ขรุขระหรือเป็นรอยหยักที่ผิว (warty) นอกจากนั้นการเรียงตัวของแอสโคสปอร์ในแอสคัส สี ขนาด และจำนวนของแอสโคสปอร์ต่อแอสคัสมีความสำคัญในการจัดจำแนกยีสต์ เช่น *Wickerhamia* สร้างแอสโคสปอร์รูปหมวก *Schwaniomyces* สร้างแอสโคสปอร์รูปดาวเสาร์ สำหรับจำนวนแอสโคสปอร์ของยีสต์มีได้ตั้งแต่ 1-4 แอสโคสปอร์ โดยอาจมีจำนวนมากกว่า 4 แอสโคสปอร์ เป็น 8, 16 หรือมากกว่า 16 ซึ่งพบได้น้อย (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

นอกจากแอสโคสปอร์แล้วรูปแบบของแอสคัสสามารถใช้บ่งบอกสกุลของยีสต์ได้ เช่น แอสคัสของยีสต์บางชนิดมีความคงทน (persistent ascus) จะแตกเมื่อสปอร์งอก เช่น แอสคัสของ *Saccharomyces* และแอสคัสของ *Zygosaccharomyces* ส่วนบางชนิดแอสคัสแตกง่าย (evanescent) เช่น แอสคัสของ *Kluveromyces* ผนังแอสคัสจะแตกปล่อยแอสโคสปอร์ออกมาเป็นอิสระและแอสโคสปอร์ที่ปล่อยออกมาอาจจะรวมกันเป็นกลุ่ม (Walt และ Yarrow, 1984)



รูปที่ 2.5 สัณฐานวิทยาของแอสโคสปอร์ในยีสต์บางชนิด

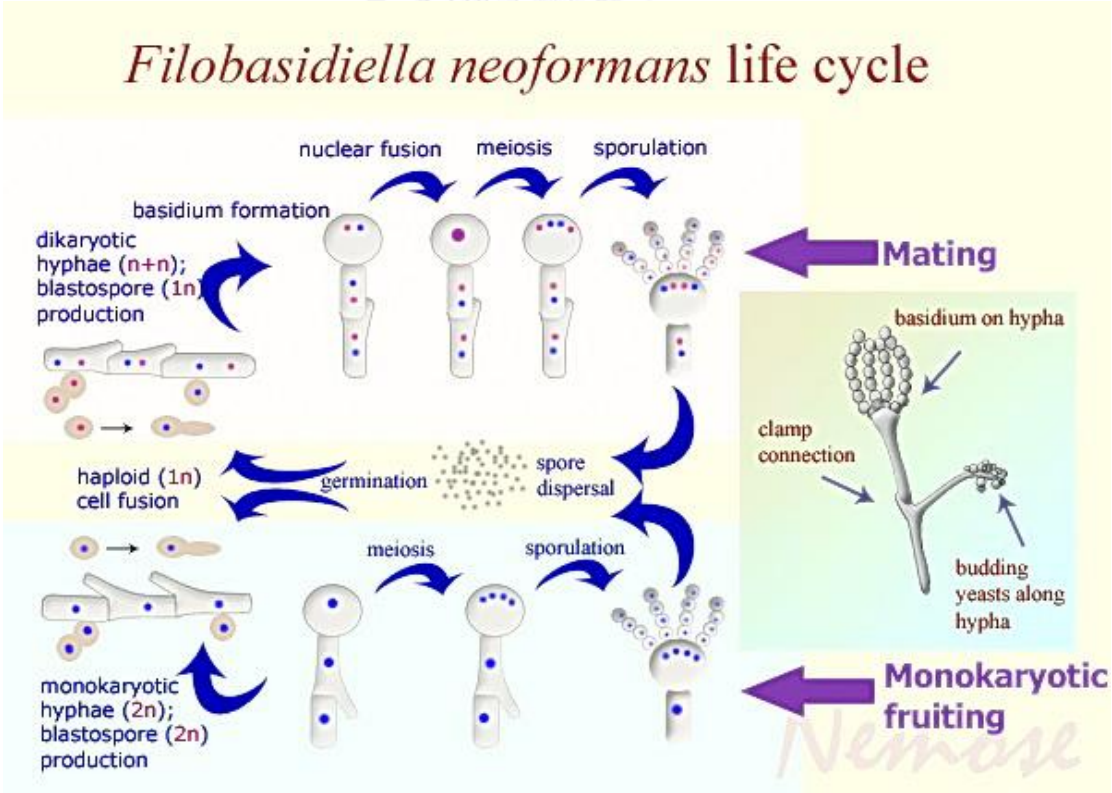
ก) แอสโคสปอร์รูปร่างกลมจำนวน 4 แอสโคสปอร์ในแอสคัสรูปร่างยาวของ *Schizosaccharomyces pombe*

ข) แอสโคสปอร์รูปหมวกของ *Pichia manshurica*

ค) แอสโคสปอร์รูปกลมขอบเรียบ 2 แอสโคสปอร์ใน 1 แอสคัสของ *Saccharomycodes ludwigii*

2) การสร้างเบสิดิโอสปอร์

เป็นการสร้างสปอร์แบบมีเพศในยีสต์กลุ่ม basidiomycetous yeast เนื่องจากการสร้างเบสิดิโอสปอร์เป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ก่อนการสร้างเบสิดิโอสปอร์ เซลล์ของยีสต์ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์จะมาเข้าคู่กัน อาศัยคุณสมบัติการเข้ากันได้ทางเพศ เกิดกระบวนการพลาสโมแกมี แคริโอแกมี และไมโอซิส ผลที่ได้จากพลาสโมแกมีคือ เซลล์หรือเส้นใยที่มี 2 นิวเคลียส (dikaryotic cells or hyphae) ขนาดของเซลล์จะใหญ่ขึ้นเนื่องจากการสะสมของเม็ดไขมัน (lipid granules)จำนวนมาก ก่อนเกิดกระบวนการคารีโอแกมี basidiomycetous yeast ที่มีลักษณะเซลล์เป็นเส้นใยจะมีการเชื่อมกันของเส้นใยที่จะพัฒนาเป็นโปรเบสิเดียม (probasidium) อาจอยู่ตรงกลางด้านข้างหรือส่วนปลาย โปรเบสิเดียมจะพัฒนาเป็นเบสิเดียม (basidium) และเกิดการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสได้ 4 นิวเคลียส หลังจากนั้นสร้างผนังกั้นแต่ละนิวเคลียสได้ 4 เบสิดิโอสปอร์หรือเรียกว่าสปอริเดียที่มีรูปร่างต่างกันในยีสต์แต่ละชนิด กระบวนการสร้างเบสิดิโอสปอร์สรุปดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 การสร้างเบสิดิโอสปอร์ของยีสต์

(ที่มา: http://www.metapathogen.com/cryptococcus/#image: ออนไลน์)

2.3.2 การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3.2.1 การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

การเจริญในอาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ เช่น อาหารเหลวยีสต์สกัดและมอลต์สกัด และอาหารเหลวยีสต์สกัด เปปโทนและเดกซ์โทรส (YPD) เป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้จัดจำแนกยีสต์ โดยลักษณะสำคัญที่พบ เช่น การเจริญเป็นวงรอบติดที่ขอบหลอด (ring) ลักษณะเป็นแผ่นลอยอยู่บนผิวหน้าอาหารเหลว (pellicle) ลักษณะตกตะกอนลอยอยู่ในอาหาร (flocculent) ลักษณะเป็นฝ้าบางค่อนข้างเหนียวลอยติดอยู่ที่ผิวหน้าของอาหารเหลว (membranous) ลักษณะเป็นตะกอนที่ก้นหลอด (sediment) เช่น ตะกอนจับติดที่ก้นหลอดมีลักษณะเหนียวเป็นก้อนเดียว (compact) ตะกอนเป็นก้อนลักษณะต่างๆ หลายก้อน (granular) ตะกอนเป็นก้อนเล็กตกที่ก้นหลอด เมื่อเขย่าหลอดอาหารเบาๆจะเกิดการฟุ้งกระจายขึ้น และตกตะกอนอย่างรวดเร็ว (flaky) และตะกอนจับเละๆที่ก้นหลอด เมื่อเขย่าหลอดทดสอบจะลอยเป็นสายเมือกขึ้นไปในอาหาร (viscid)

2.3.2.2 การเจริญบนอาหารแข็ง

อาหารแข็งที่ใช้ในการศึกษาลักษณะของการเจริญ คือ อาหารแข็งยีสต์สกัดและมอลต์สกัด (YM agar),อาหารแข็งยีสต์สกัดเปปโทนและเดกซ์โทรส (YPD agar) และอาหารแข็งมอลต์สกัด (malt extract agar) ลักษณะที่ต้องศึกษา คือ สีโคโลนี (colony colour) เนื้อโคโลนี (colony texture) ผิวหน้าโคโลนี (colony surface) ความนูนของโคโลนี (colony elevation) และขอบโคโลนี (colony margin) เนื่องจากยีสต์บางสายพันธุ์มีสีโคโลนีที่โดดเด่นแตกต่างจากยีสต์โดยทั่วไป เช่น โคโลนีสีดำเป็นลักษณะที่จำเพาะของยีสต์ในกลุ่มที่เรียกว่า black yeasts เนื่องจากมีการสร้างรงควัตถุ หรือเม็ดสี (pigments) สีดำเป็นองค์ประกอบของเซลล์ ตัวอย่าง เช่น ยีสต์ในสกุล *Aureobasidium* sp., *Hortaea* sp. และ *Phaeococcomyces* sp. เป็นต้น นอกจากนี้ยีสต์หลายชนิดในบางสายพันธุ์พบสีโคโลนีแตกต่างจากยีสต์ส่วนใหญ่ซึ่งมีโคโลนีสีขาว และสีครีม เช่น ยีสต์หลายชนิดในสกุล *Rhodosporidium* sp. และ *Rhodotorula* sp. โคโลนีมีสีส้ม แตกต่างจากยีสต์ในสกุล *Bullera* sp. และ *Cryptococcus laurentii* sp.ที่โคโลนีมีสีเหลือง นอกจากสีโคโลนี สิ่งที่ต้องพิจารณา คือ เนื้อโคโลนี ผิวหน้าโคโลนี ความนูนของโคโลนี เนื้อโคโลนี เช่น ลักษณะเละคล้ายเนยเหลว (butyrous) ลักษณะเป็นเมือกเหนียว (viscous) ลักษณะคล้ายเยื่อเมมเบรน (membranous) ลักษณะเหลวเคลื่อนไปยังบริเวณข้างเคียง (fluid) และลักษณะเป็นเมือกแต่ไม่เหนียว (mucoid) ผิวหน้าโคโลนี ผิวหน้าเรียบ (smooth) ผิวหน้าขรุขระ (rough) ผิวหน้ามันวาว (glistening) ผิวหน้าไม่มันวาว (dull) ผิวหน้ามีลักษณะพับทบไปทบมา (folded) และผิวหน้าเป็นเส้นใยคล้ายเส้นใยของรา (filamentous) ความนูนของโคโลนี เช่น ลักษณะแบนราบบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (flat)

ลักษณะนูนเรียบ (raised) ลักษณะนูนโค้ง และบริเวณตรงกลางนูนคล้ายโดม (convex) ขอบของโคโลนี พิจารณาว่ามีลักษณะแบบใด เช่น เรียบไม่มีรอยหยัก (entire) เป็นคลื่นโค้งหรือเว้าเข้าเล็กน้อย (undulate) ลักษณะขอบเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้ามาก (lobate) และลักษณะขอบเป็นเส้นใย (filamentous)

2.3.3 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

2.3.3.1 ความสามารถในการหมักน้ำตาล

โดยทั่วไปอาศัยความแตกต่างในคุณสมบัติต่างๆ เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ได้แก่ โคโลนี รูปร่างเซลล์ ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนทั้งในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน ที่นิยมใช้จนเป็นแบบแผนคือความสามารถในการหมักน้ำตาลประเภทต่างๆ อาทิ กลูโคส (glucose) กาแลกโทส (galactose) มอลโทส (maltose) ซูโครส (sucrose) แลกโทส (lactose) ราฟฟิโนส (raffinose) ทรีฮาโลส (Trehalose) และไซโลส (xylose) ในการทดสอบเบื้องต้นของการหมักน้ำตาลมักใช้น้ำตาลกลูโคสก่อน ซึ่งถ้ายีสต์นั้นไม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้แสดงว่าไม่หมักน้ำตาลชนิดอื่นด้วย สำหรับการทดสอบการหมักน้ำตาลจะมีการใช้หลอดดักก๊าซ (Durham tube) ลงไปในหลอดทดลองด้วยเพื่อให้วิธีการแม่นยำขึ้นสำหรับกรณีที่ยีสต์บางชนิดเป็นยีสต์ที่มีการหมักช้า เกณฑ์การตัดสินว่ายีสต์นั้นเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักหรือหรือผลเป็นบวกให้สังเกตจากการเกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซข้างในหลอดทดลองหากมี 70-100% ภายในระยะเวลาการหมัก 7 วันแสดงว่ามีความสามารถในการหมักรวดเร็ว ช้ากว่า 7 วันถือว่ามีความสามารถในการหมักช้า และถ้ามีปริมาณก๊าซในหลอดดักก๊าซน้อยกว่า 30% ถือว่ามีการหมักแต่อ่อนมาก ส่วนหากไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซคือผลเป็นลบ (Kurtzman และคณะ, 2003)

(Kumar และคณะ, 2011) ได้คัดกรองยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* จากลูกตาลโดยทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการหมักน้ำตาล พบว่าสายพันธุ์ *S. cerevisae* ที่คัดแยกได้มีความทนต่อเอทานอลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 15 เปอร์เซ็นต์

2.3.3.2 ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน

ความสามารถของยีสต์ในการใช้แหล่งคาร์บอนผ่านวิถีเมแทบอลิซึมที่เกี่ยวเนื่องกับการหายใจแบบใช้ออกซิเจนของยีสต์หรือเรียกว่าคาร์บอนแอสสิมิเลชัน (carbon assimilation) เป็นการทดสอบสำคัญที่มีประสิทธิภาพในการจัดจำแนกยีสต์ในระดับชนิด เนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบมีอย่างน้อย 36 ชนิด โดยทดสอบในอาหาร yeast nitrogen base และแหล่งคาร์บอนที่ต้องการทดสอบทำ

ให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมครอน ตัวอย่างแหล่งคาร์บอนที่ใช้ดังตาราง 2.1

ตารางที่ 2.1 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการทดสอบคุณสมบัติของยีสต์

แหล่งคาร์บอน	ตัวอย่าง
เฮกโซส	ดี-กลูโคสD-glucose, ดี-กาแลกโทส D-galactose,แอล-แรมโนส L-rhamnose, L-sorbose แอล-ซอร์โบส
เพนโทส	ดี-ไซโลส D-xylose, ดี- ไรโบสD-ribose, แอล-อะราบิโนส, ดี-อะราบิโนส
ไดแซคคาไรด์	ซูโครส, มอลโทส เซลโลไบโอส ทรีฮาโลสแลกโทส, เมลิไบโอส
ไตรแซคคาไรด์	ราฟฟิโนส, เมเลไซโทส
โพลีแซคคาไรด์	แป้ง อินนูลิน
แอลกอฮอล์	เอริทริทอล, ไรบิทอล (อะโดนิทอล),ดีแมนนิทอล, ไมโอ-อินโนซิทอล,เมทานอล, เอทานอล, กลีเซอรอล, ไกลคอล,โพรเพน 1,2 ไดอัล,บิวเทน 2,3 ไดอัล กาแลกทิทอล (ดัลซิทอล) ดี-กลูซิทอล (ซอร์บิทอล)
กรดอินทรีย์	ซักซิเนต,ซิเทรต,ดีแอล-แลกเตท ดี-กลูโคเนต,ดี-กลูคูโรเนต ดี-กาแลกทูโรเนต, 2- คีโต-ดี-กลูโคเนต 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต
ไกลโคไซด์	แอลฟา-เมธิล-ดี-กลูโคไซด์ อาร์บูติน ซาลิซินsalicin
อื่นๆ	กลูโคโน- แลกโตน ดี-กลูโคซามีนเอชซีแอล,เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน,เดคเคน เฮกซาเดคเคน

(ที่มา: Kurtzman และคณะ, 2003)

2.3.3.3 ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจน

ยีสต์ที่ต่างชนิดกันอาจมีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนหรือไนโตรเจนแอสสิมิเลชัน (nitrogen assimilation) ซึ่งเป็นกระบวนการเมแทบอไลต์ในภาวะที่มีออกซิเจนเช่นเดียวกับการแอสสิมิเลทแหล่งคาร์บอนได้ไม่เท่ากัน ยีสต์ส่วนใหญ่มีความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนประมาณ 10 ชนิดขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ แหล่งไนโตรเจนดังกล่าวได้แก่ โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3), โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$), คาดาเวอรีน (cadaverine), เอทิลลามีน(ethylamine), ไลซีน (lysine), ทริปโตเฟน

(tryptophan), ครีเอทีน (creatine), ครีเอทีนีน (creatinine), อิมิดาโซน (imidazone) และกลูโคซามีน (glucosamine) การทดสอบนี้จะใช้ เปปโทน (peptone) หรือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) เป็นโพสิทีฟคอนโทรล (Wickerham, 1951)

2.3.3.4 การสร้างเอนไซม์ยูรีเอส

เอนไซม์ยูรีเอส (urease) เป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายยูเรีย พบเฉพาะในยีสต์กลุ่มเบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ (basidiomycetous yeast) แต่ไม่พบในกลุ่มแอสโคมัยซีตัสยีสต์ ascomycetous yeast

2.3.3.5 การเกิดปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี

ยีสต์ในกลุ่ม basidiomycetous yeast จะทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (diazonium blue B หรือ DBB) ให้เกิดสีแดงเข้ม ซึ่งไม่พบในกลุ่ม ascomycetous yeast

2.3.3.6 การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมติกสูง

ยีสต์หลายชนิด มีความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) สูง เรียกยีสต์กลุ่มนี้ว่าออสโมโทเลแรนต์ยีสต์ (osmotolerant yeasts) ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ยีสต์กลุ่มดังกล่าวมีกลไกทางสรีรวิทยาในการปรับตัวทางสรีรวิทยา การสร้างสารประกอบ เช่น กลีเซอรอล (glycerol) สารประกอบดังกล่าวช่วยปรับสมดุลของแรงดันออสโมติกภายในและภายนอกเซลล์ให้มีค่าสมดุล นอกจากนี้ในกลุ่มของยีสต์ทนเกลือ (halotolerant yeasts) หรือชอบเกลือ (halophilic yeasts) ซึ่งเป็น ออสโมโทเลแรนต์ และ ออสโมฟิลิกยีสต์ กลุ่มหนึ่ง ซึ่งทนหรือชอบความเข้มข้นของเกลือประมาณ 10-15 เปอร์เซ็นต์ มีกลไกในการขนส่งเกลือออกนอกเซลล์ที่มีประสิทธิภาพ การทดสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะทดสอบโดยตรวจการเจริญบนอาหารแข็งที่มีกลูโคส 50 และ 60 เปอร์เซ็นต์ และการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ สามารถใช้ร่วมในการจัดจำแนกยีสต์ในระดับชนิด

2.3.3.7 การเจริญในระดับอุณหภูมิต่างๆ

ยีสต์ส่วนใหญ่ชอบอุณหภูมิปานกลาง ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม แต่มีบางชนิดที่เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่านี้ โดยเฉพาะพวกที่สร้างเบสิดิโอสปอร์อาจเจริญได้ที่ 0 องศาเซลเซียส ดังนั้นการเจริญในที่อุณหภูมิต่างๆจึงเป็นลักษณะหนึ่งที่ใช้ช่วยในการจัดจำแนกยีสต์

2.3.3.8 ความต้องการวิตามินในการเจริญเติบโต

ยีสต์บางชนิด เช่น *S. cerevisiae* ต้องการวิตามินบางชนิดในการเจริญ เช่น อินนอซิทอล (inositol) และไธอะมีน (thiamine) อย่างไรก็ดียีสต์หลายชนิดไม่ต้องการวิตามินในการเจริญ เช่น *Candida edaphicus* เป็นต้น เนื่องจากสามารถสังเคราะห์วิตามินได้ภายในเซลล์ ตัวอย่างการจัด

จำแนกยีสต์โดยใช้ความต้องการวิตามินในการเจริญ เช่น การแยกความแตกต่างของยีสต์ในสกุล *Pichia* sp. 2 ชนิด คือ *P. cactophila* และ *P. membranifaciens* โดยใช้การเจริญในอาหารที่ปราศจากไพริดอกซิน

2.3.3.9 การสร้างกรดจากกลูโคส

ยีสต์บางชนิดสร้างกรดที่ระเหยหรือไม่ระเหยได้ปริมาณน้อย จะตรวจพบการสร้างกรดเมื่อมีการสร้างกรดอะซีติกปริมาณมากเท่านั้น สามารถทดสอบโดยใช้ อาหารที่มีกลูโคส 5% และแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5% โดยพิจารณาจากการละลายของแคลเซียมคาร์บอเนต

2.3.4 คุณลักษณะทางอนุกรมวิธานเคมี

ได้แก่องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ แคปซูล องค์ประกอบของกรดไขมันและโคเอนไซม์คิว ราและแบคทีเรียมีควิโนนหลายชนิด แต่ยีสต์มีเพียงไอโซพรีนอยด์ยูบิควิโนน โคเอนไซม์คิวที่พบในยีสต์กลุ่ม ascomycetous yeasts เป็นชนิดที่ 5, 6, 7 และ 8 (coenzyme Q5, Q6, Q7 และ Q8) ส่วนยีสต์กลุ่ม basidiomycetous yeasts เป็นชนิดที่ 8, 9 และ 10 (coenzyme Q8, Q9 และ Q10)

2.3.5 การจัดจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานโมเลกุล

การจัดจำแนกยีสต์โดยใช้คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณลักษณะของการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คุณลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมี และคุณลักษณะทางเคมี ตามหลักการอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมของยีสต์ มีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การทดสอบมีจำนวนมาก ใช้เวลานาน สิ้นเปลืองแรงงาน สารเคมีทดสอบบางชนิดราคาแพง คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี อาจมีความผันแปรขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของยีสต์ ทำให้หลายครั้งผลการจัดจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้คุณลักษณะข้างต้นตามหลักการอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม ให้ผลการจัดจำแนกที่ผิดพลาด (misidentification) ต่อมาจึงมีการใช้เทคนิคทางชีววิทยาโมเลกุลที่ทันสมัยร่วมในการจัดจำแนกยีสต์ โดยเทคนิคเริ่มแรกที่นำมาใช้ คือ การวิเคราะห์สัดส่วน mol % G + C

2.3.5.1 การจัดจำแนกชนิดของยีสต์โดยใช้การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วนของ D1/D2 ยีน rRNA

ด้วยข้อจำกัดของอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม นักอนุกรมวิธานของยีสต์ได้พยายามพัฒนาเทคนิคทางโมเลกุลขึ้นใหม่เพื่อจัดจำแนกยีสต์ โดยมีพื้นฐานของการใช้เทคนิค PCR และการหาลำดับ DNA สำหรับนักอนุกรมวิธาน

(Kurtzman และ Robnett, 1998) วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ในบริเวณ D1/D2 ของ large subunit rRNA gene ที่มีความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ ของยีสต์ทุกชนิดในกลุ่ม ascomycetous yeasts ที่มีรายงานการค้นพบ โดยศึกษาเปรียบเทียบในยีสต์ที่มีรายงานไว้ใน

ฐานข้อมูลที่ฝากไว้ใน international culture collection จากผลการศึกษา Kurtzman และ Robnett สรุปว่า ยีสต์ต่างชนิดจะมีลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ D1/D2 แตกต่างกันมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์

คุณสมบัติสำคัญของยีน ซึ่งทำให้ rRNA หรือ rDNA ที่นักอนุกรมวิธานของยีสต์ใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ทางอนุกรมวิธานโมเลกุล ในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ คือ ยีนนี้เป็นยีนที่พบในยีสต์ทุกชนิด มีหน้าที่เหมือนกันในยีสต์ทุกชนิด มีอัตราการกลายหรืออัตราการเกิดมิวเตชันต่ำ และสามารถเปรียบเทียบยีนดังกล่าวได้เบสต่อเบส จากคุณสมบัติสำคัญดังกล่าวยีน rRNA โดยเฉพาะส่วนของ D1/D2 โดเมน ของ 26S rDNA จึงได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายในการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ สำหรับยีนอื่นๆที่อยู่ใน ไรโบโซม DNA คลัสเตอร์ ของยีสต์ที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ คือ หน่วยย่อยเล็กของไรโบโซมอล rDNA (SSU rDNA) หรือ 18S rDNA ที่มีความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ประมาณ 1600-1800 นิวคลีโอไทด์ และยีนในส่วน internal transcribed spacer (ITS) regions ที่ประกอบด้วย ITS1 และ ITS2 ครอบคลุมส่วนของ 5.8S rDNA (ITS1-5.8S-ITS2) โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 18S rDNA ใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ในระดับสกุล ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์ของ ITS1-5.8S-ITS2 ใช้ในการจัดจำแนกยีสต์ในระดับชนิด โดยเฉพาะในกรณีที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 ให้ผลในการจัดจำแนกยีสต์บางชนิดไม่ชัดเจน เนื่องจากมีความใกล้ชิดกันของสายวิวัฒนาการ เช่น *S. cerevisiae, S. bayanus* และ *S. pastorianus* เป็นต้น

(Covadonga และคณะ, 2002) คัดกรองยีสต์จากน้ำส้มด้วยวิธีการที่ต่างกัน 5 วิธี ทั้งวิธีการดั้งเดิม รวมถึงการตรวจสอบโดยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ LSU rRNA ,(5.8S-ITS), และวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ พบยีสต์ทั้งหมด 99 สายพันธุ์ โดยยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างไปตามแหล่งที่อยู่และแหล่งตัวอย่าง ว่าเป็นน้ำส้มสดหรือน้ำส้มที่ผ่านการพาสเจอร์ไรซ์แล้ว ผลการตรวจสอบแนวโน้มของสายพันธุ์ที่จะเป็นไปได้กับการจัดจำแนกด้วยวิธีการต่างๆพบว่า 26s rRNA gene ให้ผลที่ถูกต้องที่สุดตามด้วยวิธีการแบบดั้งเดิมและ 5.8s-Its

2.4 คุณสมบัติของยีสต์ *S. cerevisiae*

S. cerevisiae เป็นที่รู้จักกันในชื่อ เบเกอร์ยีสต์ ยีสต์ขนมปัง หรือบริวเวอร์ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมชีวภาพ เนื่องจากคุณสมบัติความทนต่ออุณหภูมิสูง ทนแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นคุณลักษณะหลักๆที่ทำให้มีการนำ *S. cerevisiae* ไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเป็นส่วนใหญ่(Osho, 2005) ซึ่งในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล มีปัจจัยหลายประการต่อการเลือกสายพันธุ์ยีสต์ เช่น ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอล แอลกอฮอล์ และน้ำตาลสูง มีการตอบสนองต่อ

เอนไซม์รวมถึงมีระบบการจัดการโดยรวมได้ดี ความทนต่ออุณหภูมิและความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ปริมาณสูงเป็นปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งที่จะเพิ่มศักยภาพการผลิตของจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรม *S. cereviae* ถูกใช้ในการศึกษามานานและเป็นตัวอย่างเซลล์ยูคาริโอตที่เป็นที่รู้จักมากที่สุดชนิดหนึ่งทั้งในทางทฤษฎีและปฏิบัติ ซึ่งเป้าหมายในการนำไปใช้เป็นไปกับทางอุตสาหกรรมเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งคุ้นเคยกันดีว่าเป็นยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมปัง มีการศึกษาลำดับ นิวคลีโอไทด์รวมทั้งศึกษาบทบาทหน้าที่ต่างๆในเซลล์ยีสต์จนเป็นที่เผยแพร่มาเป็นระยะเวลานาน (Goffeau และคณะ, 1997)

2.4.1 การใช้ยีสต์เพื่อผลิตขนมปัง

ขนมปังเป็นอาหารของคนทั่วโลกมานานเช่นเดียวกับการบริโภคเบียร์หรือไวน์ ในระยะแรกสมัยบาบิโลเนียน การทำขนมปังเริ่มจากการผสมข้าวบาร์เลย์ กับน้ำหรือนมแล้วนำส่วนผสมไปตากแห้งหรืออบโดยวางบนก้อนหินที่ร้อนจัดหรืออบในขี้เถ้าร้อน ในกรณีที่ส่วนผสมของขนมปังยังไม่ถูกนำไปตากแห้งจะเกิดการหมักตามธรรมชาติ ได้ผลิตภัณฑ์เบียร์ ต่อมาการทำขนมปังนิยมหมักให้มีการขึ้นฟูก่อนนำไปอบและใช้ข้าวสาลีหรือข้าวไรน์แทนข้าวบาร์เลย์ จากหลักฐานทางประวัติศาสตร์พบว่าชาวอิยิปต์เริ่มทำขนมปังขึ้นฟูและซาวโด (sour dough) เป็นอาหารมานานกว่า 450 ปีก่อนคริสตกาล สำหรับการทำขนมปังสมัยใหม่เริ่มขึ้นเมื่อศตวรรษที่ 18 ส่วนการผลิตเบเกอร์ยีสต์เป็นการค้าเริ่มขึ้นในศตวรรษที่ 19 (อรุณ ชาญชัยเชาวน์วิวัฒน์, 2558)

โดยทั่วไปขั้นตอนการทำขนมปังได้แก่ การเตรียมวัตถุดิบ การผสมส่วนผสมให้เข้ากันและนวดแป้ง การหมักโดและการแบ่งก้อนโด การอบ การตัดแบ่งขนมปัง และการอบ ส่วนประกอบหลักของขนมปัง ได้แก่แป้งจากเมล็ดธัญพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าวไรน์ น้ำ เกลือ และเบเกอร์ยีสต์ นอกจากนี้อาจมีสารปรุงแต่งเพิ่มเติม เช่น น้ำตาล เนย ไข่ กรดแลกติก เป็นต้น ก้อนแป้งและส่วนผสมต้องทำให้ขึ้นฟูก่อนนำไปอบ การฟูขึ้นของก้อนแป้งเกิดจากการเติมเบเกอร์ยีสต์ ซึ่งชนิดที่ใช้คือ *S. cerevisiae* ขั้นแรกนำแป้งมาผสมกับน้ำตาล น้ำและยีสต์ อาจจะผสมเนยด้วยเพื่อให้ขนมปังมีผิวสัมผัสนุ่มขึ้น จากนั้นนั้นนวดให้เข้ากัน บ่มไว้ 1-2 ชั่วโมง ยีสต์จะเจริญขึ้นพร้อมปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ก้อนแป้งจะฟูขึ้นเรียกว่าก้อนโด การนำก้อนโดมารีดเป็นแผ่นจะทำให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กระจายทั่วเนื้อของโด เมื่อนำไปอบจะทำให้เนื้อขนมปังมีรูพรุนสม่ำเสมอ ในการทำขนมปังแบบดั้งเดิมก้อนโดจะถูกเก็บไว้หลายวัน ทำให้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกสามารถเจริญขึ้นได้จึงเรียกว่าซาวโด ซึ่งทำให้ขนมปังมีคุณภาพดีขึ้น

การทำขนมปังหรือผลิตภัณฑ์เบเกอรีให้ขึ้นฟูได้มีปัจจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

ก) ขั้นตอนการหมัก

sugar + yeasts $\rightarrow$ ethanol + CO_2 + ATP (energy)

ข) การแยกตัวของแอมโมเนียมไบคาร์บอเนต

$NH_4HCO_3 \rightarrow NH_3 + H_2O + CO_2$

ค) ปฏิกิริยาเคมีระหว่างกรดและเบส

ง) การเปลี่ยนสภาวะของน้ำในโมเลกุลแป้ง

จ) การรวมกันของอากาศในส่วนผสมของขนมปัง

(Boekhout และ Robert, 2003)

แรงดันออสโมติกซึ่งเกิดในช่วงที่ขนมปังเกิดการหมักเป็นโดนั้นเกิดจากการเคลื่อนของโมเลกุลน้ำจากเซลล์ยีสต์ไปสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก แรงดันออสโมติกในโด ยังขึ้นอยู่กับเปอร์เซ็นต์เกลือ น้ำตาลและส่วนผสม ถ้ามีความแตกต่างระหว่างสัดส่วนในการผสมสูงมากจะทำให้ไปลดกิจกรรมการ หมักของยีสต์ได้ โดยปกติความเข้มข้นของน้ำตาลควรต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ จึงจะมีผลเพิ่มอัตราการหมัก น้ำตาลที่เข้มข้นมากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ มีผลยับยั้งอัตราการหมักโดเช่นเดียวกันกับเกลือที่เข้มข้นเกิน 1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2.2 ปริมาณยีสต์ที่มีผลต่อระยะเวลาการหมักขนมปัง

เปอร์เซ็นต์ยีสต์	ระยะเวลาการหมัก (นาที)	ปริมาตรของขนมปัง (ลิตร/กิโลกรัม)
2	155	5.6
4	100	5.5
8	60	5.7

(ที่มา: Boekhout และ Robert, 2003)

ตารางที่ 2.3 ผลของอุณหภูมิการบ่มโดต่อระยะเวลาการหมัก

อุณหภูมิที่บ่มโด	ระยะเวลาการหมัก (นาที)	ปริมาตรขนมปัง (ลิตร/ กิโลกรัม)
24	200	5.6
30	141	5.5

(ที่มา: Boekhout และ Robert, 2003)

ซึ่งยีสต์จะมี 2 ประเภทที่แยกกันอย่างเด่นชัดตามบทบาทหน้าที่ของความสามารถในการใช้น้ำตาลในช่วงเวลาการบ่มโด ชนิดแรกจะทำให้โดขึ้นเต็มประสิทธิภาพโดยใช้น้ำตาลในช่วง 0-10 เปอร์เซ็นต์ อีกชนิดหนึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้สำหรับหมักขนมปังหวานโดยใช้น้ำตาลในการหมักตั้งแต่ 5 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติของยีสต์ขนมปังแต่ละชนิด

ชนิดของยีสต์	น้ำหนักแห้ง (%)	อายุการเก็บรักษา
ยีสต์ครีม	19-21	1
ยีสต์สด	29-34	1
ยีสต์แห้งชนิดเม็ด Active dry yeast (ADY)	92-94	12
ยีสต์ผงแห้ง Instant dry yeast (IDY)	95-97	24

(ที่มา: Boekhout และ Robert, 2003)

โดยทั่วไปแหล่งคาร์บอนของยีสต์ขนมปังคือกากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยหรือหัวบีท ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากโรงงานน้ำตาลที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดโดยเฉลี่ย 50-55 เปอร์เซ็นต์ที่ยีสต์จะสามารถนำไปใช้ได้ โดยมีซูโครสเป็นสัดส่วนที่มากที่สุด

2.4.2 องค์ประกอบที่มีผลต่อคุณภาพของขนมปัง

องค์ประกอบโดยทั่วไปของขนมปัง ได้แก่ แป้ง น้ำ เกลือ น้ำตาล เนย หรือไขมัน สารปรุงแต่งและจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมักก้อนแป้ง ปริมาณและอัตราส่วนของส่วนประกอบเหล่านี้ทำให้ขนมปังในแต่ละประเทศหรือแต่ละท้องถิ่นมีรสชาติแตกต่างกันโดยแต่ละส่วนประกอบมีบทบาทสำคัญดังนี้

แป้ง

องค์ประกอบของแป้งที่มีบทบาทสำคัญต่อโครงสร้างของขนมปังคือโปรตีนกลูเตน ซึ่งมีคุณสมบัติในการดูดซับน้ำ มีความเหนียวยืดหยุ่น นอกจากนี้แป้งที่ใช้ในการทำขนมปัง เช่นแป้งสาลีจะสามารถสลายตัวได้เป็นน้ำตาลมอลโทสให้ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการหมักได้อย่างรวดเร็ว ปริมาณโปรตีนและกลูเตนจะต่างกันในขนมปังแต่ละชนิด

น้ำ

น้ำที่เติมลงในแป้งเพื่อทำขนมปัง มีบทบาทต่อการให้ไอออนิกอิออน (ionic ion) น้ำที่ใช้จึงควรมีความกระด้างในช่วงระหว่าง 75-150 พีพีเอ็ม คาร์บอเนตและซัลเฟตในน้ำจะทำให้กลูเตนมีความเหนียวคงตัวมากขึ้น

เกลือ

ในการทำขนมปังนิยมใช้เกลือประมาณ 1.5-2 เปอร์เซ็นต์ เกลือมีบทบาทต่อการให้รสชาติ เกลือโซเดียมคลอไรด์ สามารถยับยั้งปฏิกิริยาไฮเดรชัน (hydration) ของกลูเตนทำให้แป้งเหนียวนุ่ม โดอยู่ในสภาพไม่เหลว ไม่ยุบตัวและเก็บก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไว้ได้นานขึ้น

เนยหรือไขมัน

จะช่วยทำให้ขนมปังมีลักษณะนุ่มเบามากขึ้น ทำให้เกิดฟิล์มระหว่างแป้งและโปรตีน

น้ำตาล

บทบาทสำคัญของน้ำตาลต่อการทำขนมปังคือ ส่งเสริมการหมักของยีสต์ ทำให้เกิดสีน้ำตาล (browning) ในปฏิกิริยาเมลลาร์ด (Maillard reaction) ทำให้แป้งเหนียวนุ่ม โดคงรูปไม่ยุบตัว

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการทำให้ขนมปังขึ้นฟูคือยีสต์ โดยทั่วไปนิยมใช้ *S. cerevisiae* ปริมาณ 1-6 เปอร์เซ็นต์ ในรูปยีสต์สดที่มีปริมาณของแข็ง 25-32 เปอร์เซ็นต์ ถ้าเก็บที่อุณหภูมิ 4°ซ จะมีอายุการใช้งาน 6-8 วันแต่ควรเติมน้ำก่อนการผสมกับแป้ง นอกจากนี้อาจใช้ยีสต์ครีมที่มีปริมาณของแข็ง 18 เปอร์เซ็นต์ หรือยีสต์แห้งที่ปริมาณของแข็ง 92-96 เปอร์เซ็นต์ซึ่งจะเก็บได้นานกว่ายีสต์ก้อนและยีสต์ครีม

(Oda และ Tonomura, 1993) รายงานว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 3% สามารถเพิ่มความสามารถในการหมักโดให้ดีขึ้นได้

2.4.3 การผลิตยีสต์ขนมปัง

ในแต่ละปีมีการผลิตยีสต์ขนมปังออกสู่ตลาดประมาณสองล้านตันในรูปแบบของครีมยีสต์ (cream yeast) มีลักษณะเป็นครีมเหลวประกอบด้วยเซลล์ยีสต์เป็นองค์ประกอบประมาณ 16-20 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์สด (compressed yeast, fresh yeast) มีลักษณะเป็นก้อนประกอบด้วยเซลล์ยีสต์ 30-35 เปอร์เซ็นต์ ทั้งสองชนิดนี้ต้องเก็บรักษาด้วยการให้ความเย็น ส่วนยีสต์แห้ง (dry yeast) ความชื้นเหลือเพียงเล็กน้อย ยีสต์แห้งแบ่งเป็นชนิดเม็ด (active dry yeast) กับยีสต์ผง (instant dry yeast) สามารถเก็บรักษาไว้ได้นาน ปัจจัยสำคัญของการผลิตยีสต์ขนมปังคือการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ได้ปริมาณเพียงพอ และเมื่อทำให้มีความชื้นน้อยลงยีสต์จะยังคงรักษากิจกรรมได้ดี อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้นิยมเป็นกากน้ำตาลและแหล่งไนโตรเจนอย่างง่าย เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และธาตุอาหารอื่นที่จำเป็น ให้ความร้อนเป็นการฆ่าเชื้อและนำใส่ในถังหมักกวนเพื่อให้อากาศ ให้ยีสต์มีการเจริญได้ดี สภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เซลล์จำนวนมากมีหลายปัจจัย เช่น อัตราการให้อาหาร ต้องมีการเติมอาหารเป็นระยะ ควบคุมปริมาณแหล่งคาร์บอนให้ต่ำ ให้อากาศให้เพียงพอต่อความต้องการเพื่อให้กระบวนการหายใจของยีสต์เกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และระดับ

เอทานอลให้อยู่ในปริมาณเหมาะสม รวมถึงอัตราส่วนของคาร์บอนไดออกไซด์กับออกซิเจนด้วย ในระยะสุดท้ายของการหมักควรให้อากาศกับยีสต์อีก 1 ชั่วโมง ในระยะที่ปริมาณสารอาหารใกล้หมด ยีสต์จะสะสมทรีฮาโลสเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจนจะขาดแคลนแต่ยังคงมีปริมาณอากาศ สภาพเช่นนี้เหมาะกับการเกิดวิถีกลูโคนีโอจีนีซิส (gluconeogenic pathway) และการสังเคราะห์ทรีฮาโลสซึ่งจะช่วยป้องกันเซลล์ยีสต์จากความ เครียดในช่วงที่มีการทำให้เซลล์แห้งเพื่อผลิตเป็นยีสต์ขนมปัง(O'Toole และ & Lee, 2006)

2.5 ประเภทของกระบวนการเมแทบอลิซึมน้ำตาล

กระบวนการเมแทบอลิซึมน้ำตาลด้วยยีสต์ ปกติจะหมายถึง *S.cerevisiae* จะสามารถสร้างพลังงานผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันของกลูโคส ผ่านเส้นทางต่างๆได้ถึง 3 เส้นทาง คือ

1. กระบวนการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ (alcoholic fermentation) ภายใต้ภาวะที่ไม่มีอากาศ กระบวนการไกลโคไลซิสจะมีการย่อยสลายน้ำตาลได้เป็นไพรูเวท จากนั้นไพรูเวทจะเปลี่ยนเป็นแอซีทาลดีไฮด์หรือที่เรียกว่าเอทานอล (ethanol) ได้พลังงานคือ ATP 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล และถือเป็นเส้นทางหลักที่เกิดขึ้นในการทำไวน์

2. กระบวนการหมักให้เกิดกลีเซอรอล (glyceropyruvic fermentation) มีความสำคัญมากในช่วงเริ่มของการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ ปกติจะมีกลูโคสประมาณร้อยละ 8 เข้าสู่วิถีนี้ในการหมักไวน์ และเกิดขึ้นเมื่อมีปริมาณของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ต่ำ

3. กระบวนการหายใจ (respiration) ภายใต้ภาวะที่มีอากาศ กระบวนการไกลโคไลซิสจะให้พลังงานคือ ATP 2 โมเลกุล ต่อกลูโคสเริ่มต้น 1 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวทจะถูกออกซิไดส์เปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำโดยผ่านวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle หรือ citric acid cycle) และปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสฟอริเลชัน (oxidative phosphorylation) ให้ ATP 36-38 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล โดยทั่วไปยีสต์ต้องการสร้างพลังงานผ่านเส้นทางนี้มากกว่าเส้นทางการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์ ดังนั้นในกระบวนการหมักที่ต้องการปริมาณเอทานอลหรือการหมักไวน์ จึงต้องมีการควบคุมปริมาณก๊าซออกซิเจน และควบคุมไม่ให้ยีสต์สร้างพลังงานผ่านการหายใจ เพื่อให้มีการสร้างแอลกอฮอล์เป็นไปตามวัตถุประสงค์ (วันเพ็ญ จิตรเจริญ, 2556)

2.6 ชีวเคมีของการหมักเอทานอล

การหมักเอทานอลของยีสต์เกิดจากน้ำตาลถูกทำให้เปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคไลซิสหรือเอมบ์เดน เมเยอร์ฮอฟ พาร์นัส Embden-Mayerhof-Parnas (EMP) pathway ได้เป็นไพรูเวท น้ำตาล 1 โมเลกุลให้ไพรูเวต 2 โมเลกุลดังสมการ

$$\text{Glucose} + 2\,\text{ATP} + 2\text{NAD}^{+} \longrightarrow 2\text{pyruvate} + 4\,\text{ATP} + (\text{NADH}+\text{H})$$

จากนั้นไพรูเวทแยกคาร์บอนไดออกไซด์ออก (decarboxylation) โดยเอนไซม์ไพรูเวทดีคาร์บอกซีเลส (pyruvate decarboxylate) เร่งสร้างแอซีทาลดีไฮด์ และเปลี่ยนเป็นเอทานอลด้วยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549: 455) ในทางทฤษฎีกลูโคส 1 กรัมจะเปลี่ยนเป็นเอทานอล 0.51 กรัม ซึ่งในทางปฏิบัติมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดเอทานอลเพียง 90 เปอร์เซ็นต์ เพราะน้ำตาลกลูโคสบางส่วนนำไปใช้ในการสร้างเซลล์ นอกจากนี้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลยังขึ้นกับปัจจัยหลายประการ เช่น การยับยั้งของผลพลอยได้ (byproduct) บางชนิด การยับยั้งของเอทานอลหรือน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงทำให้เกิดแรงดันออสโมซิส การให้อากาศ การปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น หรือสายพันธุ์ของยีสต์ที่นำมาใช้กับการหมักนั้นไม่เสถียร ปัจจัยต่างๆเหล่านี้นับว่าการยับยั้งการหมักโดยเอทานอลมีความสำคัญที่สุด (Panchal และ Tavares, 1990) ความทนทานต่อเอทานอลเป็นลักษณะเฉพาะของยีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *S. cerevisiae* และ *Schizosaccharomyces pombe* ซึ่ง *S. cerevisiae* นับเป็นสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อเอทานอลมากกว่าสายพันธุ์อื่น

2.7 ความสำคัญของเชื้อเพลิงชีวภาพ

ในภาวะที่มีการเพิ่มจำนวนของประชากรอย่างรวดเร็ว ทำให้ความต้องการด้านทรัพยากรเพื่อการอุปโภคบริโภคมีมากขึ้นอย่างต่อเนื่องทั้งด้านอาหารและพลังงาน อัตราการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงที่ไม่เพียงพอ ข้อจำกัดในการเก็บสำรองน้ำมันเชื้อเพลิง ปัญหาภาวะมลพิษ ปัญหาโลกร้อน รวมถึงความไม่มั่นคงทางการเมืองล้วนกระทบต่อปัญหาด้านพลังงานเชื้อเพลิง จึงมีแนวโน้มที่จะค้นคว้าวิธีการเลือกใช้ ดูแลรักษา และประหยัดทั้งทรัพยากรและแหล่งพลังงานไปพร้อมๆกัน (Antoni และคณะ, 2007) สืบเนื่องจากประสิทธิภาพของ *S. cerevisiae* และยีสต์ต่างๆที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลและผลิตภัณฑ์อินทรีย์ต่างๆ ทำให้มีการพัฒนาศักยภาพของจุลินทรีย์เหล่านี้ในด้านของการใช้ผลิตเอทานอลและเชื้อเพลิงอื่นอย่างต่อเนื่อง เชื้อเพลิงชีวภาพที่ประกอบด้วยเอทานอลชีวภาพ (bioethanol) และไบโอดีเซล (biodiesel) ได้ชื่อว่าเป็นพลังงานหมุนเวียนที่ใช้การย่อยชีวมวลและแหล่งวัตถุดิบที่มีลิกโนเซลลูโลส เช่น ข้าวโพด หญ้า ของเหลือทิ้งอื่นๆซึ่งเหลือตกค้างอยู่ในแหล่งเพาะปลูกและสภาพแวดล้อม ตัวอย่างประเทศสหรัฐอเมริกามีวัสดุเหลือทิ้งตกค้างจำพวกชีวมวลจากกระบวนการเพาะปลูกถึงปีละประมาณ 1.3 พันล้านตัน (Himmel และคณะ, 2007) ปัจจุบันรัฐบาลของอเมริกาตั้งเป้าหมายในการใช้วัสดุเหลือทิ้งมาใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพแทนเชื้อเพลิงจากถ่านหินให้ได้ถึง 75 เปอร์เซ็นต์ในปี 2025 ถึงแม้ว่าเชื้อเพลิงชีวภาพอย่างอื่นที่มีลักษณะพิเศษ เช่น มีเทน (methane) ไฮโดรเจน (Hydrogen) จะยังอยู่ในระหว่างขั้นตอนการศึกษาคิดค้นวิธีทดแทน แต่การหมักเอทานอลชีวภาพโดยใช้จุลินทรีย์ก็มีประวัติความเป็นมาที่ต่อเนื่องยาวนานและมีการเพิ่มความต้องการมากขึ้นในแต่ละประเทศ (Antoni และคณะ, 2007) ผลจากการขาดแคลนน้ำมันในปี ค.ศ. 1973 และ 1979

ประเทศบราซิลได้พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลชีวภาพด้วยการใช้ยีสต์ในการหมักน้ำตาล (Dorfler และ Amorin, 2007, Goldenberg, 2007)

กากน้ำตาลเป็นวัสดุหมักราคาถูกที่มีแหล่งน้ำตาลเพียงพอในการเจริญของยีสต์ขนมปัง เมแทบอลิซึมของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เกี่ยวข้องกับน้ำตาลกลูโคสมี 2 แบบ คือ แบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ออกซิเจน กรณีของยีสต์ขนมปังจะเป็นกระบวนการที่ใช้ออกซิเจนเพื่อควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลในภาวะที่มีอากาศ (Ferrari และคณะ, 2001) การผลิตเซลล์ขนมปัง ต้องอยู่ในสาวะที่มีออกซิเจนสูงเพื่อให้เซลล์เจริญเติบโตสูงสุดโดยใช้ระยะเวลาการหมักน้อยที่สุด ในขณะที่ภาวะการหมักโดนั้นตรงกันข้าม คือต้องการให้เซลล์เจริญน้อยและมีปฏิกิริยาที่เกิดการหมักสูง ยีสต์ขนมปังที่ดีจึงต้องมีการหมักเร็ว(Tanaka และคณะ, 2006)

2.8 บทบาทของยีสต์ในการหมักไวน์

ยีสต์ส่วนใหญ่ที่พบบนผลองุ่นและมีบทบาทในการหมักไวน์เกือบทั้งหมดเป็น *Saccharomyces* sp. การผลิตไวน์โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกเติมลงในน้ำหมัก เพื่อให้สามารถควบคุมไคเนติกส์ (kinetics) ของการหมักได้มากขึ้นเริ่มนำมาใช้ในศตวรรษที่ 19 ทำให้การใช้ยีสต์เฉพาะสายพันธุ์ที่ทำไวน์กลายเป็นเรื่องปกติ (Reed และ Nagodawithana, 1991) ในปลายปี ค.ศ. 1960 ได้มีการนำยีสต์ไวน์แบบแอคทีฟ (active dry wine yeast) หรือยีสต์ผงมาใช้ในประเทศสหรัฐอเมริกาและแพร่หลายไปยังออสเตรเลีย นิวซีแลนด์และแอฟริกาจนในที่สุดกลายเป็นที่นิยมทั่วโลกเพราะการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่เหมาะในการทำไวน์ ทำให้เกิดผลดีคือการเริ่มหมักเร็ว มีระยะพักสั้น ได้ไวน์ที่มีลักษณะทางประสาทสัมผัสเป็นที่ยอมรับ องค์ประกอบและคุณภาพของไวน์ที่ได้จะมีความสัมพันธ์กับสายพันธุ์ที่ใช้มาก (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ยีสต์ที่นิยมใช้สำหรับการผลิตไวน์มี 3 รูปแบบคือ ยีสต์ที่เลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารเหลว และยีสต์แห้งที่แอคทีฟ ปัจจุบันยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมเป็นยีสต์ผงเพราะใช้ง่ายสะดวกในการขนส่ง ให้คุณภาพผลิตภัณฑ์สม่ำเสมอ เก็บรักษาง่ายสามารถต่อเชื้อได้หลายรุ่น (วันเพ็ญ จิตรเจริญ, 2550) ยีสต์ที่ใช้สำหรับหมักไวน์ ต้องเป็นสายพันธุ์ที่เจริญและหมักได้อย่างดีในสภาพที่มีความเป็นกรดค่อนข้างสูง เนื่องจากค่าพีเอชของน้ำองุ่นมักอยู่ในช่วง 3.0-3.9 ต้องทนทานเอทานอลมากพอเพื่อสามารถผลิตเอทานอลให้สูงกว่าร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) และปรับตัวให้สามารถเจริญและหมักเป็นปกติได้ในภาวะที่มีซัลเฟอร์ไดออกไซด์ความเข้มข้นต่ำ นอกจากยีสต์จะสามารถสร้างเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการเมแทบอไลต์น้ำตาลที่อยู่ในน้ำองุ่นหรือน้ำผลไม้แล้ว ยีสต์ยังมีส่วนสำคัญยิ่งต่อกลิ่นรสของไวน์ เนื่องจากผลพลอยได้จากการหมักน้ำตาล จะได้สารให้กลิ่นรสต่างๆมากมาย เช่น กรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์ และเอสเทอร์ต่างๆ ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยใช้เครื่องมือวิเคราะห์ขั้นสูง เช่น โครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid

chromatography) และเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี (gas chromatography) ทั้งนี้ *S. cerevisae* แต่ละสายพันธุ์จะให้กลิ่นรสแตกต่างกัน โรงงานผลิตไวน์แต่ละแห่งจึงเลือกใช้ยีสต์ให้เหมาะสมกับชนิดและความเป็นเอกลักษณ์ด้านกลิ่นรสของไวน์ที่ต้องการผลิต (วันเพ็ญ จิตรเจริญ, 2556)

โดยทั่วไปยีสต์ที่ใช้สำหรับการหมักไวน์คือ *S. cerevisiae* ได้มีการผลิตออกมาจำหน่ายเชิงพานิชย์จำนวนมาก และมีการพัฒนาคุณสมบัติด้านต่างๆ เพื่อให้ผลิตไวน์ที่มีคุณภาพตามความต้องการ เช่น มอนตราเชต์ (Montrachet)และ พาสเจอร์แชมเปญ (Pasteur Champegne) สำหรับมอนตราเชต์ เป็นสายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุดทั้งการหมักไวน์แดงและไวน์ขาว ส่วน พาสเจอร์แชมเปญเป็นสายพันธุ์ของ *S. bayanus* มีอัตราการหมักปานกลาง ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอลสูง ทนทานต่อเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิการหมักทั่วไป จากหลักการหมักไวน์ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ พบว่ายีสต์ชนิดต่างๆมีบทบาทในการหมักต่อเนื่องกัน ซึ่งการใช้ยีสต์หลายชนิดผสมกันอาจเหมาะสมหรือให้ประโยชน์กว่าการใช้ยีสต์ชนิดเดียว (Nagodawithana, 1991; Reed และ Nagodawithana, 1991) ยีสต์สายพันธุ์หนึ่งอาจจะเจริญได้ดีที่น้ำหมักที่ทำจากวัตถุดิบชนิดหนึ่ง แต่อาจจะไม่เหมาะกับวัตถุดิบอีกชนิดก็เป็นได้

2.9 คุณสมบัติของยีสต์ที่มีต่อการหมักไวน์

ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถเมแทบอไลต์น้ำตาลกลูโคส ฟรักโทสและซูโครสให้เป็นเอทานอลโดยผ่านกระบวนการหมัก มีแอซีทาลดีไฮด์ เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย แล้วนำสู่การสร้างเอทานอล จึงนิยมใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไวน์ ยีสต์สายพันธุ์นี้แบ่งเป็น 2 ชนิด ตามลักษณะการหมัก คือ บอตทอมยีสต์ (bottom yeast) เป็นยีสต์ที่เจริญอยู่ในน้ำหมัก และเมื่อการหมักสิ้นสุดจะตกตะกอนลงก้นถังหมัก ส่วนท็อปยีสต์ (top yeast) เป็นยีสต์ที่เจริญเป็นฟองลอยเป็นฝ้าอยู่ที่ผิวหน้าของน้ำหมัก แต่เมื่อการหมักลดลงก็จะตกลงมาที่ก้นถังหมักเช่นกัน

เนื่องจากยีสต์มีการเจริญ 2 ลักษณะ คือสภาพที่มีอากาศยีสต์จะใช้น้ำตาลในการเจริญเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์และสภาพที่ไม่มีอากาศยีสต์จะเมแทบอไลต์น้ำตาลเพื่อสร้างแอลกอฮอล์ ดังนั้นในการหมักแอลกอฮอล์ การควบคุมปริมาณอากาศที่ยีสต์ได้รับจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อปริมาณของแอลกอฮอล์ที่จะผลิตได้ ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตไวน์จึงเป็นยีสต์ที่มีลักษณะเฉพาะ คือสามารถทนต่อแอลกอฮอล์และซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่มีความเข้มข้นสูงกว่ายีสต์ปกติ ทำงานได้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้ไวน์ออกมามีกลิ่นรสที่ดี การจะทราบว่ายีสต์มีคุณภาพดีมากน้อยเพียงใด ตรวจสอบได้เมื่อนำไปใช้ในการผลิตไวน์แล้ว โดยควรมีคุณภาพที่สังเกตได้คือ (วันเพ็ญ จิตรเจริญ, 2550)

1. มีระยะพักตัวสั้น หมายถึงสามารถทำการหมักได้รวดเร็ว ขึ้นกับอายุของเซลล์ยีสต์ อุณหภูมิ การเก็บรักษา ความแตกต่างของอุณหภูมิระหว่างกล้าเชื้อกับน้ำหมัก จำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตในสับสเตรท อุณหภูมิของน้ำหมักและความเข้มข้นของสารบางชนิดที่อาจเป็นตัวยับยั้งการเจริญ

ของยีสต์ เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ ในระยะพักตัวยีสต์จะสังเคราะห์เอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นเอทานอลและสร้างสารบางอย่าง เช่น สารให้กลิ่นรส ระยะนี้ยีสต์สามารถย่อยสารประกอบไนโตรเจนได้ลดลงส่งผลให้มีการย่อยน้ำตาลเป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลดลง ยีสต์จะสร้างสเตียรอยด์และกรดไขมันจำเป็นสำหรับการสร้างเซลล์เมมเบรนเพื่อใช้ควบคุมการผ่านเข้า-ออกเซลล์ของกลูโคสและฟรุกโทสที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำให้เซลล์สามารถรักษาการสังเคราะห์ของน้ำตาลในอัตราคงที่มีจะมีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลภายนอก กล้าเชื้อจะมีการปรับตัวเพื่อเตรียมเข้าสู่ระยะการเพิ่มจำนวนเซลล์ ระยะพักตัวของยีสต์ขึ้นกับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณสารอาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Alberti และคณะ, 2011)

2. ความสามารถในการเมแทบอไลต์น้ำตาล ยีสต์มีความสามารถในการเมแทบอไลต์น้ำตาลให้เปลี่ยนเป็นเอทานอลอย่างสมบูรณ์ โดยหลังสิ้นสุดกระบวนการหมักจะเหลือน้ำตาลในผลิตภัณฑ์ต่ำมาก ควรเหลือไม่เกิน 5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Varela และคณะ, 2004)

3. มีอัตราเร็วของการหมักเหมาะสม ถ้าอัตราการหมักเป็นไปแบบช้าๆจะทำให้มีการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ต่ำภาวะเช่นนี้ทำให้องค์ประกอบน้ำหมักถูกออกซิไดซ์ ผลิตภัณฑ์จะมีคุณภาพต่ำลง เช่น เปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลหรือมีกลิ่นอับ หากการหมักเกิดขึ้นเร็วเกินไปจะมีการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูง เป็นตัวพาสารให้กลิ่นรสที่ยีสต์สร้างขึ้นออกไปจากถังหมัก อีกประการหนึ่งอุณหภูมิของน้ำหมักและบรรยากาศรอบๆสูงขึ้น ทำให้การหมักเกิดการยุติก่อนที่น้ำตาลทั้งหมดจะเปลี่ยนเป็นเอทานอล ทั้งนี้อัตราการหมักจะมีความสัมพันธ์กับปัจจัยอื่นๆอีก เช่น ปริมาณสารอาหารหรืออุณหภูมิการหมัก ซึ่งปัจจัยใดเหมาะสมต้องพิจารณาร่วมกับคุณภาพทางเคมีและประสาทสัมผัสของไวน์ (Peynaud, 1984)

4. ความทนทานต่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูง เนื่องจากไวน์มีความหวานหลายระดับ ต้องคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ให้เหมาะสม ไวน์ชนิดไม่หวานควรเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ทนน้ำตาลได้ร้อยละ 20-24 ส่วนไวน์หวานมากต้องคัดเลือกยีสต์ที่ทนน้ำตาลได้สูงกว่า 35 องศาบริกซ์ ซึ่งยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีความทนทานต่อสภาวะความเข้มข้นของน้ำตาลได้ต่างกัน (Erasmus และคณะ, 2004)

5. สามารถทำนายพฤติกรรมการหมักได้ การทำนายพฤติกรรมการหมัก เช่น อัตราการหมัก ระยะเวลา และปริมาณแอลกอฮอล์ที่จะได้จากผลิตภัณฑ์ ผู้ผลิตต้องทราบสมบัติของยีสต์ระหว่างการหมัก เพื่อให้วิเคราะห์ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักได้ทันเวลา เช่น การที่อุณหภูมิสูงอาจทำให้ยีสต์มีอัตราการหมักและระยะพักตัวสั้นกว่าอุณหภูมิต่ำ (Varela และคณะ, 2004)

6. มีความทนทานต่ออุณหภูมิ ยีสต์ต้องไม่ถูกทำลายง่ายด้วยความเย็นหรือความร้อน อย่างเช่นไวน์ขาวและไวน์แดงหมักที่อุณหภูมิสูงต่ำไม่เท่ากัน เพื่อวัตถุประสงค์ต่างกัน อย่างไรก็ตามทั้งอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมากเกินไปล้วนมีผลกระทบต่อเซลล์ยีสต์ คือทำให้เจริญช้าจนยุติการหมักก่อนที่น้ำตาลจะถูกย่อยหมดหรือเจริญเร็วเกินไปจนปริมาณเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็วจนปริมาณยีสต์ที่เหลือ

ไม่เพียงพอต่อการเมแทบอไลต์น้ำตาลเป็นเอทานอลได้อย่างสมบูรณ์ (Kramer, 2001, Usansa, 2003)

7. มีความทนทานต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เติมลงไป การเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์เพื่อเป็นแอนตีออกซิแดนซ์ และป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ที่ไม่ต้องการเพราะยีสต์ที่ได้จากการคัดเลือกมาทำไวน์จะเป็นสายพันธุ์ *Saccharomyces* spp. จะทนต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่เติมโดยทั่วไประดับหนึ่ง ดังรายงานของ (Sevda และ Rodrigues, 2011) คือการเติมซัลเฟอร์ไดออกไซด์ลงในน้ำฝรั่งที่หมักไวน์ ทำให้อัตราการหมักลดลงเพราะซัลเฟอร์ไดออกไซด์ไปยับยั้งการเจริญของยีสต์

8. มีความทนทานต่อเอทานอลในปริมาณที่ต้องการ ขึ้นกับชนิดของไวน์ที่ต้องการผลิต เช่น ไวน์ไม่หวานต้องการแอลกอฮอล์ร้อยละ 11-13 โดยปริมาตร การหมักไวน์ขาวด้วยยีสต์สายพันธุ์ทางการค้า EC1118 ทนเอทานอล 13.9 โดยปริมาตร แสดงว่าสายพันธุ์ยีสต์มีความทนทานต่อเอทานอลต่างกัน (Osho, 2005)

9. สร้างซัลเฟอร์ไดออกไซด์ปริมาณต่ำ เพราะถ้าสร้างมากเกินไปจะทำให้ไวน์มีกลิ่นรสผิดปกติ เช่น กลิ่นของไฮโดรเจนซัลไฟด์หรือก๊าซไข่เน่า กลิ่นกะหล่ำปลี กลิ่นหัวหอม เป็นต้น (Julien และคณะ, 2012)

10. สร้างกรดอะซิติกปริมาณต่ำหรือไม่มีเลย ยีสต์แต่ละสายพันธุ์สร้างกรดอะซิติกได้ต่างกัน สัมพันธ์กับความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำหมักหากน้ำตาลสูงยีสต์จะสร้างอะซิติกได้สูง (Erasmusและคณะ 2004)

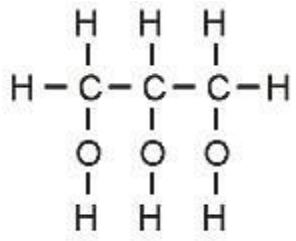
11. สามารถเจริญร่วมกับจุลินทรีย์อื่นที่ต้องการในการหมัก ป้องกันปัญหาการแย่งสารอาหารในการเจริญเติบโต ยีสต์ควรทนต่อการถูกทำลายได้ดี (Loubser, 1999)

12. สร้างสารให้กลิ่นรสที่ดีกับผลิตภัณฑ์ สารให้กลิ่นรสเป็นสารที่ระเหยได้และให้คุณสมบัติเฉพาะตัว (Boulton และคณะ, 1996)

2.10 กลีเซอรอล (glycerol)

กลีเซอรอลหรือกลีเซอรีน คือแอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอน 3 ตัวต่อกัน ต่อด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH group) ดังรูปที่ 2.7 กลีเซอรอลบริสุทธิ์เป็นของเหลว หนืด ใส ไม่มีกลิ่น รสหวาน จุดเดือดอยู่ที่ 290 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว 18 องศาเซลเซียสละลายน้ำและแอลกอฮอล์ได้ดี กลีเซอรอลสามารถสังเคราะห์ได้ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตจากน้ำตาลกลูโคส โดยกลูโคสจะสลายตัวในวิถีไกลโคไลซิสและใช้เป็นตัวกลางในการสังเคราะห์กลีเซอรอล ร่างกายนำกลีเซอรอลที่สังเคราะห์ได้ไปทำปฏิกิริยากับกรดไขมันได้เป็นไตรกลีเซอไรด์ใช้เป็นพลังงานสำรองในร่างกาย ในระบบอุตสาหกรรม กลีเซอรอลเป็นผลิตผลจากกระบวนการผลิตสบู่ การผลิตกรดไขมันและไบโอดีเซล ซึ่งการผลิตไบโอดีเซล

จะมีกลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำมากลั่นแยกเมทานอลออกจะได้กลีเซอรอลที่มีความบริสุทธิ์ต่างกัน เช่น 82-85% เป็นเกรดที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ 99.7% ใช้ผลิตเครื่องสำอาง รวมทั้งผลิตภัณฑ์อื่นๆที่ใช้ในชีวิตประจำวัน



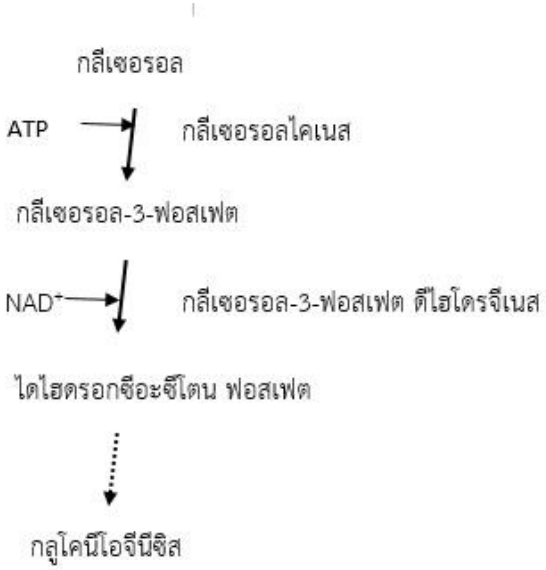
รูปที่ 2.7 สูตรโครงสร้างของกลีเซอรอล
(ที่มา: http://www.il.mahidol.ac.th/e-media/ap-biology1/Chapter2/Part4_2.html: ออนไลน์)

(Yang และคณะ, 2012) ได้ใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากไบโอดีเซลมาเพิ่มมูลค่าโดยทำเป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์

(Young และคณะ, 2011) ในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนของ *S. crrevisiae* ด้วยการตัดต่อพันธุกรรมโดยอาศัย *E. coli* ทำให้ *S. cerevisiae* สามารถใช้กลีเซอรอลในการเจริญได้

2.11 เมแทบอลิซึมในการใช้กลีเซลอรอลโดยยีสต์

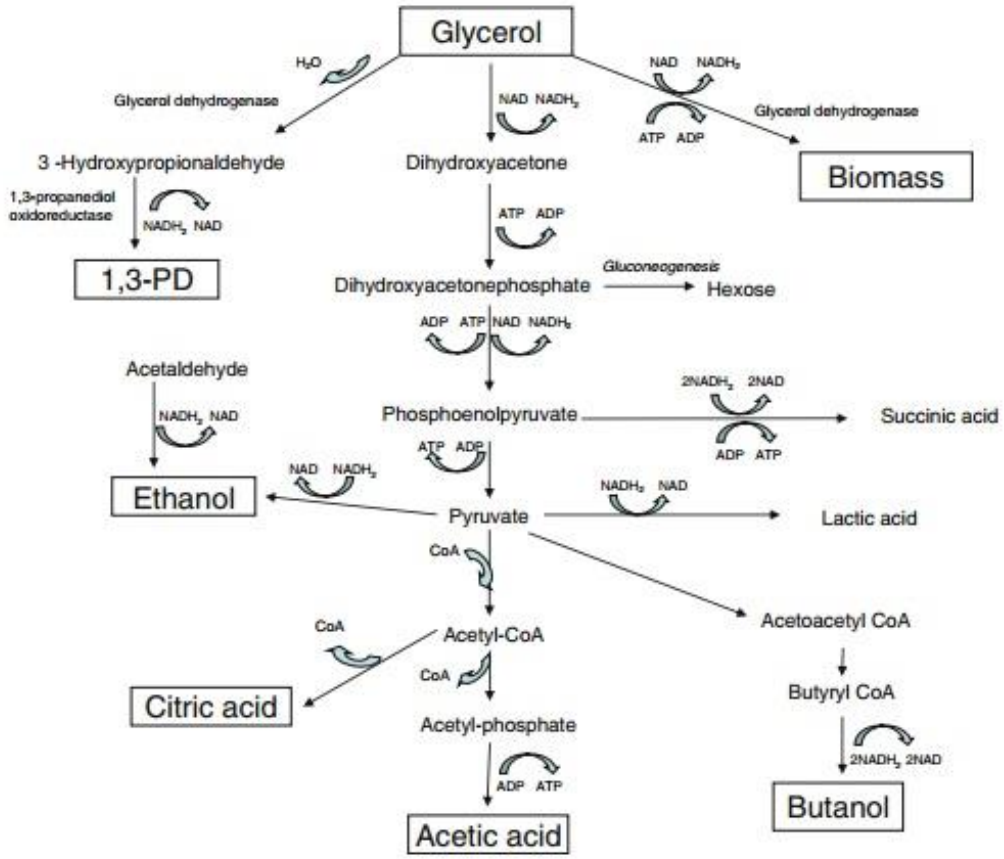
กระบวนการหายใจของยีสต์ประกอบด้วยวิถีไกลโคไลซิส วิถีในวัฏจักรกรดซิตริกและกระบวนการสายโซ่ขนส่งอิเลกตรอน ปฏิกิริยาออกซิเดทีฟฟอสโฟรีเลชันที่เกิดขึ้นในกระบวนการหายใจจะทำให้ได้พลังงานสะสมในรูปของเอทีพีจากสารตั้งต้นกลูโคส กรณีการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนนั้น ยีสต์จะใช้กลีเซอรอลในปฏิกิริยาออกซเดทีฟอสโฟรีเลชันได้เป็น กลีเซอรอล 3 ฟอสเฟตด้วยเอนไซม์กลีเซอรอลไคเนส และถูกออกซิไดซ์ต่อให้เป็นไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟตก่อนเข้าสู่ปฏิกิริยาในวิถีกลูโคนีโอจีนีซิสต่อไป (รูปที่ 2.8)



รูปที่ 8 วิถีการนำกลีเซอรอลไปใช้ในเมแทบอลิซึมของยีสต์
(ที่มา: (Walker, 1998)

ซึ่งกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ยีสต์หลายชนิดนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้ รวมทั้ง *S. cerevisiae* ส่วนใหญ่ด้วย แต่มียีสต์บางชนิดเช่นกันที่สามารถใช้กลีเซอรอลได้เช่นเดียวกับการใช้กลูโคสเช่น *Candida utilis* (Gancedo และคณะ, 1968) นอกจากนี้ยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนอื่นนอกจากกลูโคสเพื่อใช้สร้างพลังงานงานผ่านกระบวนการหายใจ เช่น ไซโลส กลีเซอรอล กรดซิตริก เมทานอล เอทานอลเป็นต้น (ดังรูปที่ 2.9) ถึงแม้จุลินทรีย์จำนวนมากจะใช้กลีเซอรอลเป็นตัวรับอิเลกตรอนในกระบวนการหายใจ แต่จุลินทรีย์บางชนิดสามารถใช้กลีเซอรอลในกระบวนการหมักได้ มีการศึกษาเมแทบอลิซึมของการหมักกลีเซอรอลของแบคทีเรียในสกุล*Enterobacteriaceae* เช่น *Citrobacter freundii* และ *Klebsiella pneumonia* สามารถหมักกลีเซอรอลได้เป็น 1,3- โพรเพนไดอัล (1,3-propanediol; 1,3 PDO) (Bouvet และคณะ, 1995) ซึ่งการทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นนอกเหนือจาก 1,3- โพรเพนไดอัล โดยใช้จุลินทรีย์ในการหมักกลีเซอรอลมีรายงานจาก (Biebl, 2001) ใช้ *Clostridium pasteurianum* ในการหมักกลีเซอรอลได้เป็น บิวทานอล 17 กรัมต่อลิตร (Jarvis และคณะ, 1997) รายงานการผลิตเอทานอลจาก *K. planticola* ซึ่งแยกได้จากกระเพาะส่วนรูเมนของกวางแดง เกี่ยวกับเรื่องความสัมพันธ์ของกระบวนการหมักให้เกิดแอลกอฮอล์กับกระบวนการหายใจ หลุยส์ ปาสเตอร์เป็นนักวิทยาศาสตร์คนแรกที่ได้เปรียบเทียบการเจริญของยีสต์แบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน โดยในภาวะที่มีกลูโคสยีสต์จะย่อยน้ำตาลผ่านทั้งการหายใจและการหมัก การหายใจทำให้ปริมาณเซลล์ยีสต์เพิ่มจำนวนขึ้น ลดการสร้างแอลกอฮอล์และการย่อยสลายน้ำตาล ในภาวะที่ปริมาณน้ำตาลสูงการสร้างพลังงานจากกระบวนการหายใจจะไม่จำเป็น เพราะปริมาณที่

สร้างได้จากกระบวนการหมักมีเพียงพอ พลังงานจึงผ่านทางไกลโคไลซิสของการหมักแบบแอลกอฮอล์มากกว่าการหายใจ สำหรับการหมักเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์นั้นจะมีการย่อยสลายน้ำตาลเฮกโซส ซึ่งจะถูกใช้และเปลี่ยนเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์กับเอทานอล โดยร้อยละ 1 ใช้ในการสร้างเซลล์ใหม่ ร้อยละ 4 ใช้สร้างสารต่างๆ เช่น ไพรูเวท อะซิเตท แอซีทาลดีไฮด์ กลีเซอรอลและแลกเทต การสร้างสารเหล่านี้จะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม กลีเซอรอลถูกสร้างจากไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟตโดยใช้ NADH ในกระบวนการสร้างกลีเซอรอล การสร้างกลีเซอรอลจะสูงขึ้นในภาวะที่ไพรูเวทไม่มีความสามารถในการสร้าง $NADH^{+}$ เป็นสาเหตุให้กลีเซอรอลเกิดขึ้นมาพร้อมกับการสร้างไพรูเวท คุณสมบัติที่น่าสนใจของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* คือยีสต์จะเข้าสู่กระบวนการหมักได้ในภาวะที่มีน้ำตาลสูงถึงแม้จะเป็นภาวะที่มีก๊าซออกซิเจนก็ตาม เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้มีระบบกลไกที่ทำให้เกิดการหมักมากกว่าการหายใจ กลูโคสจะเข้าสู่วิถีการย่อยสลายสลับกันไประหว่างการหมักและการหายใจ ซึ่งภาวะที่มีน้ำตาลสูง ยีนที่เกี่ยวกับเมแทบอลิซึมในการหายใจจะถูกยับยั้งการทำงาน (วันเพ็ญ จิตรเจริญ, 2556)



รูปที่ 9 เมแทบอลิซึมของกลีเซอรอล ในการสร้างสารเพิ่มมูลค่าต่างๆ
(ที่มา: (Dobson และคณะ, 2012)

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 จุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae สายพันธุ์ TISTR 5596 ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

S. cerevisiae สายพันธุ์ M (Marine) จากความอนุเคราะห์ของ ดร.เคนทาโร โคดามะ ประเทศญี่ปุ่น

S. cerevisiae สายพันธุ์ทางการค้า (Saftinstant) บ. S.I.Lesaffre ประเทศฝรั่งเศส

3.2 น้ำตาลสดมะพร้าว

งานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างน้ำตาลสดมะพร้าวจาก ตำบลคลองเขิน ตำบลบางคนที และตำบลอัมพวา จังหวัดสมุทรสงคราม เมื่อวันที่ 30 พฤษภาคม 2554 นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาทำการทดลอง

3.3 กากน้ำตาล

ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทน้ำตาลครบุรีจำกัด (มหาชน) จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บตัวอย่างกากน้ำตาลในแกลลอนพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 °ซ จนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.4 กลีเซอรอลดิบ

ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทบางจากไบโอฟูเอลจำกัด จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เมื่อวันที่ 26 พฤศจิกายน 2558

3.5 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับงานวิจัย

3.5.1 กล้องจุลทรรศน์ (microscope) บริษัท Olympus จำกัด รุ่น CH30RF200 ประเทศญี่ปุ่น

3.5.2 กล้องฟลูออเรสเซนต์ (fluorescence microscope) บริษัท Olympus จำกัด ประเทศญี่ปุ่น

3.5.3 เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 2 ตำแหน่ง (analytical balance) รุ่น PG6002-S บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.5.4 เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 4 ตำแหน่ง (analytical balance) รุ่น AG285 บริษัท Mettler Toledo ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.5.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) บริษัท Beckman coulter จำกัด รุ่น Allegra™ 25R, USA

3.5.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับหลอดไมโครเซ็นตริฟิวจ์ (eppendorf centrifuge) รุ่น MIKRO 200R บริษัท Hettich ประเทศเยอรมนี

3.5.7 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) รุ่น G560 บริษัท Scientific Industries, USA

3.5.8 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) ห้างหุ้นส่วนจำกัด LAB service รุ่น v.6 ประเทศไทย

3.5.9 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) รุ่น UE600 บริษัท Memert จำกัด ประเทศเยอรมนี

3.5.10 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น ES-215 และรุ่น SS-325 บริษัท TOMY Digital Biology ประเทศญี่ปุ่น

3.5.11 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) รุ่น Innova™ 4330 บริษัท New Brunswick Scientific , USA

3.5.12 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) บริษัท Gilson จำกัด (ขนาด 1 มิลลิลิตร) และบริษัท Mettler Toledo จำกัด (ขนาด 5 มิลลิลิตร) ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.5.13 เครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพแบบพารามิเตอร์ (biochemistry analyzer) รุ่น 7100 บริษัท YSI, USA

3.5.14 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) บริษัท Mettler Toledo จำกัด รุ่น SevenEasy ประเทศจีน

3.5.15 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี (gas chromatography) บริษัท Hewlett-Packard จำกัด รุ่น HP5890 , USA

3.5.16 ตู้บ่มเชื้อแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator) บริษัท Memmert จำกัด รุ่น INE500 ประเทศเยอรมนี

3.5.17 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำติดลบ 20 องศาเซลเซียสแนวนอน (-20°C Freezer) บริษัท Sanyo electric จำกัด ประเทศญี่ปุ่น

3.5.18 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิต่ำติดลบ 80 องศาเซลเซียสแนวนอน (-80°C Freezer) บริษัท Thermo scientific จำกัด USA

3.5.19 เครื่องวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (refractometer 0-32° Brix)

3.5.20 เครื่องวัดแอลกอฮอล์ ebulliometer บริษัท DUJARDIN-SALLERON ประเทศฝรั่งเศส

3.5.21 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Genesys™ 10S UV-VIS บริษัท Thermo scientific จำกัด , USA

3.5.22 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC Industries จำกัด , USA

3.5.23 เครื่องโครมาโทกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (hyperformance liquid chromatograph, HPLC รุ่น Altech) , USA

3.5.24 เครื่องแยกสารด้วยไฟฟ้า (gel electrophoresis equipment) บริษัท Mupid-2 plus ประเทศญี่ปุ่น

3.5.25 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (spin down) บริษัท Farcemini ประเทศเกาหลี

3.5.26 เครื่องถ่ายภาพและวิเคราะห์ภาพเจล (gel documentary system) บริษัท Bio-Rad , USA

3.5.27 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermalcycler) บริษัท Bio-Rad , USA

3.5.28 เครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (nanodrop 2000 UV-Vis Spectrophotometer) บริษัท Thermo Fisher Sciencetific , USA

3.5.29 ชุดวัดค่าคาร์บอนแอสสิมิเลชัน API kit บริษัท BioMerieux ประเทศฝรั่งเศส

3.6 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.6.1 เอทานอล (ethanol 99% (ปริมาตร/ปริมาตร) บริษัท Sigma ประเทศเยอรมนี

3.6.2 กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid : HCl) บริษัท Sigma ประเทศเยอรมนี

3.6.3 กรดแอซิติก (acetic acid: $C_2H_4O_2$) บริษัท Sigma ประเทศเยอรมนี

3.6.4 กรดซัลฟิวริก (sulfuric acid: H_2SO_4) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.5 คอปเปอร์ซัลเฟต (copper (II) sulfate: $CuSO_4{\cdot}5H_2O$) : บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.6 โซเดียมซัลเฟต (sodium sulphate: Na_2SO_4)) : บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.7 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide: NaOH) : บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.8 กลูโคส (glucose: $C_6H_{12}O_6$) : บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.6.9 ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดกคะไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.10 กลีเซอรอล ($C_3H_8O_3$) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.11 ไตรโซเดียมซิเตรต(tri-sodium citrate: $C_6H_5Na_3O_7{\cdot}2H_2O$) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.12 โพลีเปปโทน (polypeptone) บริษัท Becton Dickinson, USA

3.6.13 โพแทสเซียมโซเดียมทาเทรต (potassium sodium tartrate: $KNaC_4H_4O_6 \cdot 5H_2O$) บริษัท Merck , USA)

3.6.14 ฟีนอล (phenol: C_6H_6O) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.15 แอมโมเนียมเฮปตะโมลิบเดตเตตระไฮเดรต (ammonium heptamolybdate tetrahydrate: $NH_4)6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.16 แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate: $(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.17 โพแทสเซียมไนเตรต (potassium nitrate: KNO_3) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.18 มอลต์สกัด (malt extract) บริษัท Becton จำกัด , USA

3.6.19 ยีสต์สกัด (yeast extract) บริษัท Becton จำกัด, USA

3.6.20 ผงวุ้น (agar) บริษัท Becton จำกัด, USA

3.6.21 กรดบอริก (boric acid: H_3BO_3) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.22 ไดโซเดียมไฮโดรเจนอาร์เซเนต(di-sodium hydrogen arsenate: $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.6.23 ซิตริกแอซิด โมโนไฮเดรต (citric acid monohydrate: $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.24 โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride: NaCl) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.25 คอร์นมีลอะการ์ (cornmeal agar) บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี

3.6.26 ยีสต์ไนโตรเจนเบส (yeast nitrogen base) บริษัท Becton ประเทศเยอรมนี

3.6.27 ยีสต์คาร์บอนเบส (yeast carbon base) บริษัท Becton ประเทศเยอรมนี

3.7 การแยกและคัดกรองยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าว

นำตัวอย่างน้ำตาลสดมะพร้าวจากจังหวัดสมุทรสงครามจำนวน 60 ตัวอย่าง มาแยกยีสต์โดยใส่ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 2% เปปโทน 0.3% ยีสต์สกัด 0.3% คลอแรมฟินิคอล 0.01% (w/v) และเอทานอล 3% (v/v) ค่าความเป็นกรด-เบส 5.6 ปริมาตร 5 มล. บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มม. บ่มที่ 30°ซ ในสภาวะปราศจากออกซิเจนโดยใช้ anaerobic pouch เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นทำให้เป็นโคโลนีเดี่ยว โดยวิธีขีดเชื้อ (streak plate method) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10 % เปปโทน 0.3 % สารสกัดจากยีสต์ 0.3 % วุ้น 2.0% และ คลอแรมฟินิคอล 0.01% (w/v) ค่าความเป็นกรด-เบส 5.6 บ่มที่ 30°ซ ในสภาวะปราศจากออกซิเจน 5 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ที่มีขนาด เส้น

ผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า 1 มม.มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเดิมเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวอีก 1 ครั้ง บ่มที่สภาวะเดิมต่ออีก 5 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยวขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางใหญ่กว่า 1 มม. จากการขีดเชื้อครั้งที่ 2 มาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดเดิม บ่มที่ 30°ซ สภาวะมีอากาศ 3 วัน ถ่ายโคโลนีเดี่ยวที่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ที่ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 1% เปปโทน 0.5% ยีสต์สกัด 0.3% สารสกัดจากมอลต์ 0.3% และวุ้น 2% (w/v) บ่มที่ 30°ซ สภาวะมีอากาศ 2 วัน ถ่ายโคโลนีเดี่ยวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ชนิดหลอดเอียง หลังการบ่มที่สภาวะเดิมต่ออีก 2 วัน จึงเก็บที่ 4°ซ เพื่อศึกษาต่อไป

3.8 พิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่แยกได้

3.8.1 ศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ (phenotypic characteristics) ตามวิธีของ Kurtzman และคณะ., 2011

3.8.1.1) นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้จากข้อ 3.7 ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ที่ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ แล้วเลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลม ขอบเรียบเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 มม. สีขาวครีมนูนตรงกลาง มาตรวจดูลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X และ 40X เลือกโคโลนีที่เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรีค่อนข้างใหญ่ภายใต้กำลังขยาย 10X มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *S. cerevisiae*

3.8.1.2) ศึกษาการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยนำโคโลนีเดี่ยวที่คัดได้จากข้อ 3.8.1.1) ซึ่งเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM ที่ 30°ซ เป็นเวลา 7-10 วันมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10X และ 40X เพื่อตรวจหาการสร้างสปอร์แบบมีเพศหรือแอสโคสปอร์ (ascospore) ที่มีรูปร่างกลม จำนวน 1-4 แอสโคสปอร์อยู่ภายในแอสคัส (ascus) ซึ่งเป็นลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของ *S. cerevisiae*

3.8.2 ทดสอบทางสรีรวิทยาและปฏิกิริยาชีวเคมีบางประการ (Kurtzman และคณะ, 2011)

3.8.2.1) ทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคส เมลลิไบโอส แมนนิทอล ในสภาวะที่มีอากาศ ทำโดยปลูกเซลล์ยีสต์ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.7 ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชม. และแขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (w/v) จำนวน 1 x 10^6 เซลล์/มล. ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Yeast Nitrogen Base (YNB) เข้มข้น 0.67% (w/v) ที่มีน้ำตาลกลูโคส เมลลิไบโอสหรือแมนนิทอล 0.5% (w/v) ปริมาตร 5 มล.

ในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มม. บ่มที่ 30 °ซ สภาวะมีอากาศเป็นเวลา 7-21 วัน ตรวจหาการเจริญทุก 7 วัน

3.8.2.2) ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.8.2.1 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YNB ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.5% (w/v) แต่บ่มที่ 37 °ซ

คัดเลือกยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่ 30°ซ แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลเมลลิไบโอสและแมนนิทอล และสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่ 37°ซ ได้ ซึ่งเป็นลักษณะของ *S. cerevisiae* เพื่อศึกษาต่อไป

3.8.2.3) ทดสอบความสามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และ โพแทสเซียมไนเตรต เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการทดลอง เช่นเดียวกับข้อ 3.8.2.1 แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว yeast carbon base (YCB) เข้มข้น 1.17% (w/v) ที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.3% (w/v) หรือโพแทสเซียมไนเตรต 0.078% (w/v) บ่มที่ 30°ซ ภาวะมีอากาศ เลือกยีสต์ที่สามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟตแต่ไม่สามารถใช้โพแทสเซียมไนเตรตเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเป็นลักษณะของ *S. cerevisiae* เพื่อศึกษาต่อไป

3.8.2.4 ทดสอบความสามารถในการสร้างเส้นใยเทียม (pseudomycelium) ของเชื้อที่คัดแยกได้โดยวิธี Dalmua โดยปลูกโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในอาหารคอร์นมีลอะการ์ (cornmeal agar) ในจานเพาะเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการเจริญของเส้นใยเทียมโดยส่องผ่านกล้องจุลทรรศน์

3.8.2.5 ทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนในที่มีอากาศของยีสต์ที่คัดกรองได้โดยใช้ชุดทดสอบ (API kit) ขนาด 32 หลุมบ่มตามวิธีที่บริษัทผู้ผลิตกำหนด ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 7 วัน

3.8.2.6 ทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนในที่ไม่มีอากาศของยีสต์ที่คัดแยกได้โดย ดูดสารละลายยีสต์ที่ต้องการทดสอบอายุ 48 ชม. ปริมาตร 0.2 มล.เพื่อทดสอบกับน้ำตาล 7 ชนิด คือ เด็กโทรส dextrose (D), มอลโทส maltose (M), ซูโครส sucrose (S), แลกโทส lactose (L), กาแลกโทส galactose (G), ทรีฮาโลส trehalose (T) และ ราฟฟิโนส raffinose (R) โดยเตรียมน้ำตาลชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 2% (w/v) ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°ซ 15 นาทีดูดสารละลายน้ำตาลแต่ละชนิด 1 มล. ลงในbasal yeast fermentation (สารสกัดจากยีสต์ 0.55% เปปโทน 0.75%) ที่มีโบรโมไทมอลบลู ละลายอยู่ 1% (w/v) ในหลอดทดลองขนาด 16×150 มล. ปริมาตร 5 มล. ซึ่งมีหลอดดักก๊าซบรรจุอยู่ในหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชม.อ่านผลเป็นบวกในหลอดที่มีการสร้างก๊าซเกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซที่ใส่ไว้ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.8.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์และศึกษาลักษณะอนุกรมวิธานโมเลกุล (molecular taxonomic characteristics)

ทำโดยนำยีสต์ไอโซเลตที่คัดกรองได้จาก 3.10.2 มาสกัดดีเอ็นเอ ทำพีซีอาร์และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ บริเวณส่วน D1/D2 ของยีน 26S rDNA (large subunit ribosomal DNA) ตามวิธีการของ (Kurtzman และคณะ, 2011) นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ClustalX version 1.8 สร้างแผนภาพต้นไม้ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ตามวิธีของ (Saitou และ Nei, 1987)เพื่อวิเคราะห์สายพันธุ์ของยีสต์

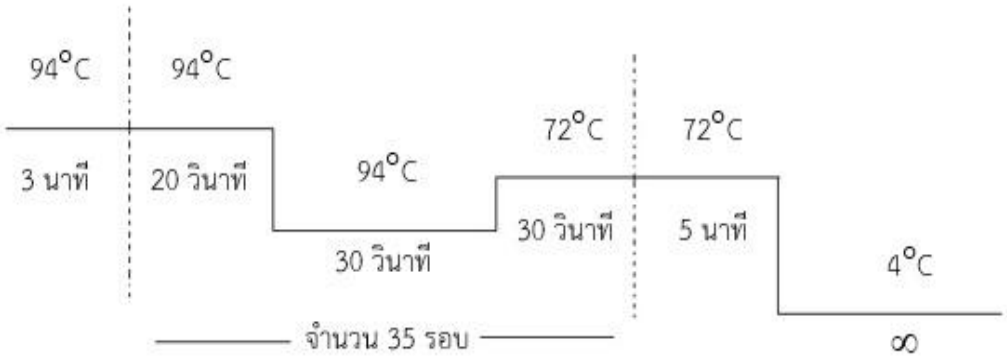
3.8.3.1 การสกัดดีเอ็นเอเพื่อทำพีซีอาร์

ปลูกยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ลงบนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชม. ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีมาแขวนลอยลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่มีไลซิสบัพเฟอร์ (lysis buffer) (100 mM TRis-HCl (pH 8.0), 30 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS) 200 ไมโครลิตร ล็อคฝาด้วยตัวล็อค นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลาเติมสารละลาย 2.5 M โพแทสเซียมอะซิเตท Potassium acetate (pH 7.5) 200 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำแข็ง 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที นำมาเติม คลอโรฟอร์มไอโซเอมิล (chloroform-isoamylalcohol) ปริมาตร 1 เท่า เขย่าให้เข้ากันแรงๆ นำไปปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำที่อุณหภูมิ 4°ซ ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำมาเติม คลอโรฟอร์มไอโซเอมิล ปริมาตร 1 เท่า อีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำที่ 4°ซ ความเร็วรอบ 13,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที เติม ไอโซโพรพานอล (isopropanol) ที่เย็นจัด ปริมาตร 1 เท่าผสมให้เข้ากัน เก็บที่อุณหภูมิ -20°ซ 20 นาที นำออกมาปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอ ที่ 4°ซ ความเร็ว 14,500 รอบ/นาทีเป็นเวลา 16 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยเติมเอทานอล 70% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 4°ซ ความเร็ว 14,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ตกตะกอนดีเอ็นเออีกครั้งด้วยการเติมเอทานอล 99% ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนดีเอ็นเอที่ 4°ซ ความเร็ว 14,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนดีเอ็นเอที่ได้ไปทำให้แห้งด้วยเครื่องให้ความร้อนแก่หลอดทดลอง (heating block) ละลายดีเอ็นเอด้วยน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 20-30 ไมโครลิตร เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะนำออกมาใช้

3.8.3.2 การทำพีซีอาร์ส่วน D1/D2 ของยีน 26S rDNA

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณส่วนของ D1/D2 ของยีน 26S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ F63 และ LR3 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ต้องการควรมีความยาวในช่วงประมาณ

600 นิวคลีโอไทด์ เตรียม DNA template โดยเจือจางดีเอ็นเอที่สกัดได้ให้มีความเข้มข้น 300-800 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจวัดความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม (nanodrop spectrophotometer) จากนั้นเตรียมสารละลายของการทำปฏิกิริยา (master mixed) (10X Taq buffer 10 ไมโครลิตร, 25 mM $MgCl_2$ 8 ไมโครลิตร, 2.5 mM dNTP mixture 8 ไมโครลิตร, Primer : 10 pM F63 3 ไมโครลิตร, 10 pM LR3 3 ไมโครลิตร, น้ำปราศจากไอออน 57.5 ไมโครลิตร, 5U/ul Taq polymerase 0.5 ไมโครลิตร แล้วดูดสารละลายดังกล่าวปริมาตร 45 ไมโครลิตรใส่ในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 0.2 มิลลิลิตร เติม DNA template 5 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง (spin down) ให้ของเหลวทั้งหมดตกมารวมกันอยู่ก้นหลอด นำไปใส่เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermal cycler) โดยมีวัฏจักรในการทำพีซีอาร์ดังต่อไปนี้



3.8.3.3 การตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ด้วยเจลอิเล็กโทรโฟริซิส

ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ต้องมีความยาวประมาณ 600 นิวคลีโอไทด์ (Kurtman และ Robnett, 1998) ตรวจสอบโดยใช้ไมโครปิเปตต์หยดสีย้อมดีเอ็นเอ (dye solution) ลงบนแผ่นพาราฟิน ปริมาตร 1.5 ไมโครลิตร หยดสารละลายพีซีอาร์ปริมาตร 5 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากัน ดูดสารทั้งหมดไปหยอดลงหลุมในอะกาโรสเจลที่เตรียมไว้ รันเจลโดยใช้ความต่างศักย์ไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 35 นาที ย้อมเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจสอบแถบของดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

3.8.3.4 การทำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์โดยใช้ PCR purification kit

ก่อนส่งตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง automated DNA sequencer ต้องทำความสะอาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ให้บริสุทธิ์ โดยดูดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ 100

ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย DF buffer ปริมาตร 5 เท่าของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ ผสมให้เข้ากัน กรองด้วยชุดเครื่องมือ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ เป็นเวลา 30 วินาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอไว้เพื่อนำไปกรองโดยนำชุดกรอง (DF column) ไปวางบนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรที่เป็นอุปกรณ์มาพร้อมชุดกรอง นำชุดกรองที่มีดีเอ็นเอไปวางบนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมสารละลาย wash buffer (ethanol) 600 ไมโครลิตร บริเวณกึ่งกลางของชุดกรอง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อกำจัดส่วนน้ำให้ไหลผ่านชุดกรอง ปั่นเหวี่ยงซ้ำอีกครั้งที่ความเร็ว 13,000 รอบ/นาที ที่ 4°ซ เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอที่อยู่บนชุดกรองแห้ง ย้ายชุดกรองที่มีตะกอนดีเอ็นเอไปวางบนหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ เติมสารละลาย elution buffer หรือน้ำปราศจากไอออนปริมาตร 15-50 ไมโครลิตรเพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ ตั้งทิ้งไว้ 2 นาที เพื่อให้ตะกอนดีเอ็นเอละลาย นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,500 รอบ/นาที ที่ 4 °ซ เป็นเวลา 30 วินาที เก็บสารละลายดีเอ็นเอที่ไหลลงหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์หลอดดังกล่าวไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ จนกว่าจะนำมาใช้

3.8.3.5 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอและการบ่งชี้สายพันธุ์ของยีสต์

นำสารละลายดีเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 3.9.3.4 มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วง 50-100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ตรวจความเข้มข้นของดีเอ็นเอด้วยเครื่องวัดปริมาณสารพันธุกรรม ส่งตัวอย่างไปอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี ตัดข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้บริเวณหัวท้ายเพื่อลดความคลาดเคลื่อนก่อนนำไปเทียบกับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน NCBI โดยใช้โปรแกรม Bioedit

เปิดไฟล์ข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้จากเครื่อง Automated DNA sequencer โดยเลือกใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้จากไพรเมอร์ทั้งสองสายคือ LR3 และ F63 ตัดลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณต้นสายออกโดยตัดลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ก่อนหน้าลำดับ AAACTAA หรือ AAACCAA ปลายสายนิวคลีโอไทด์ตัดลำดับเบสที่มีการซ้อนทับกันออกและตัดตั้งแต่หลังลำดับเบส CCGTCTTGAAACA จากนั้นนำข้อมูลของนิวคลีโอไทด์ที่ตัดลำดับเบสหัวท้ายแล้วมาเทียบกับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เข้าไปที่หน้าเว็บไซต์ http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi เลือกเมนู nucleotide blast ใส่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่องที่มีคำว่า Enter Query Sequence ในหัวข้อ Optimize for เลือกเป็น Somewhat similar sequences (blastn) กด blast ระบบจะเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลใน NBCI และแสดงรายชื่อสายพันธุ์ยีสต์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ใกล้เคียงกับตัวอย่างลำดับ นิวคลีโอไทด์ที่

นำไปเปรียบเทียบ เลือกสายพันธุ์ที่มีค่า identity ใกล้เคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์มากที่สุดที่ปรากฏในฐานข้อมูล นำมาคำนวณค่า nucleotide substitution

-ค่าอยู่ในช่วง 0-3 เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ทำการเปรียบเทียบ

-ค่าอยู่ในช่วง 3-5 เป็นยีสต์ในกลุ่มเดียวกัน (sister species)

-ค่าอยู่ในช่วง 6 เป็นยีสต์สายพันธุ์ใหม่ (new species)

เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับยีสต์ที่เป็นสายพันธุ์ Type strain แบบ pair wise alignment โดยเข้าไปที่หน้าเว็บไซต์ http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/nucleotide.html

บ่งชี้สายพันธุ์ยีสต์โดยทำแผนภาพต้นไม้ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยใช้โปรแกรม MEGA 6(Saitou และ Nei, 1987)

3.9 ศึกษาสมบัติบางประการของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่คัดกรองได้

3.9.1 ทดสอบประสิทธิภาพการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระหว่างการหมัก (Wijesinghe และ Samarajeewa, 1988)

ทำโดยแขวนลอยเซลล์ *S. cerevisiae* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YM แบบเอียง ที่ 30°ซ นาน 48 ชั่วโมงจำนวน 1 หลอด ลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับหมักเอทานอลที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 18% (w/v) สารสกัดจากยีสต์ 0.45% (w/v) เปปโทน 0.75% (w/v) ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 5.6 ปริมาตร 50 มล. บรรจุใน ฟลาส์กขนาด 125 มล. ชั่งน้ำหนักฟลาส์กเริ่มต้น ใส่ฟลาส์กลงถุงพลาสติกที่มีสำลีชุบน้ำเพื่อให้ความชื้น มัดปากถุงให้แน่น บ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 5 วัน ทุก 24 ชั่วโมงในเวลาเดียวกัน นำฟลาส์กออกมาจากถุง เช็ดให้แห้งแล้วชั่งนำหนัก ทำการทดลองสายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ คัดเลือกมาจำนวน 12 สายพันธุ์เพื่อจะทำการทดลองต่างๆเป็นลำดับต่อไป

ประสิทธิภาพการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ คำนวณจากผลต่างสูงสุดระหว่างน้ำหนักของฟลาส์กก่อนและหลังการหมักน้ำตาลกลูโคส

3.9.2 หาอัตราเร็วของการหมัก (Asyikeen และคณะ., 2013)

ปลูก *S. cerevisiae* แต่ละสายพันธุ์ ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.9 ซึ่งเจริญด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ที่ 30°ซ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YFB ประกอบด้วย สารละลายเปปโทน/สารสกัดจากยีสต์ (เปปโทน 0.75% สารสกัดจากยีสต์ 0.45%) ที่มีโบรโมไทมอลบลูเข้มข้น 1.6% (w/v) ปริมาตร 1 มล. และสารละลายกลูโคส 6% ที่ปราศจากเชื้อ โดยวิธีการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) แยกกัน อัตราส่วน 1:1 ในหลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซ บ่มที่ 30 °ซ บันทึกระยะที่เห็นการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมักจากเขียวเป็นเหลืองทุก 10 นาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.9.3 หาความเร็วของเซลล์ในการตกตะกอน (flocculation test) (Asyikeen และคณะ, 2013)

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *S. cerevisiae* ที่แต่ละสายพันธุ์ คัดกรองได้จากข้อ 3.9 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มที่ 30 °ซ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม 10 มล. บรรจุในหลอดทดลองขนาด 25 X150 มม. บ่มที่สภาวะเดิมต่ออีก 3 วัน เขย่าหลอดที่มี *S. cerevisiae* เจริญ เมื่อวางทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องสังเกตการตกตะกอนของเซลล์ บันทึกผลความเร็ว-ช้าของการทดลองเปรียบเทียบกันในแต่ละไอโซเลตที่ทดสอบ

3.9.4 ทดสอบความทนต่อเอทานอล

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *S. cerevisiae* แต่ละสายพันธุ์ ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.9 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่เติมเอทานอล 10 13 หรือ 15% (v/v) บ่มที่ 30°ซ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที 72 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.9.5 ทดสอบความทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูง

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *S. cerevisiae* แต่ละสายพันธุ์ ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.9 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 24 26 และ 28% (w/v) บ่มที่ 30°ซ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที 72 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

3.9.6 ทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *S. cerevisiae* ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.9 ลงอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ในหลอดทดลองขนาด 25 X 200 มล. ปริมาตร 10 มล. นำไปแยกบ่มที่อุณหภูมิ 37 40 42 และ 45° ซ เป็นเวลา 48 ชม. สังเกตการเจริญของเซลล์เทียบกับหลอดที่บ่มอุณหภูมิ 30°ซ ปกติ

3.9.7 หาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

3.9.7.1 ผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°ซ

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *S. cerevisiae* แต่ละสายพันธุ์ ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.9.1 ลงอาหาร YPD ปริมาตร 50 มล. ในฟลาส์กขนาด 250 มล. บ่มที่ 30°ซ เขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1% (v/v) ลงอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม บ่มที่สภาวะเดิมต่ออีก 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 10% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับหมักเอทานอล (กลูโคส 18% เปปโทน 0.75% สารสกัดจากยีสต์ 0.45% (w/v) ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5.6 ปริมาตร 42.5 มล. ในฟลาส์กขนาด 50 มล. บ่มที่ 30°ซ สภาวะจำกัดออกซิเจน คือไม่เขย่าและปิดฟลาส์กด้วยจุกยางพันทับด้วยแผ่นพาราฟิล์ม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกจากส่วนน้ำใสแล้ว

วิเคราะห์เอทานอลส่วนน้ำใสโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับหมักเอทานอลที่ไม่ปลูกเชื้อและในส่วนน้ำใสที่ได้ ตามวิธีของ (Somogyi และ Nelson., 1952)

3.9.7.2 ผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°ซ

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *S. cerevisiae* แต่ละสายพันธุ์ ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.10.6 ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.10.7.1 แต่เปลี่ยนอุณหภูมิจาก 30°ซ เป็น 40°ซ

3.10. ทดสอบศักยภาพของยีสต์ *S. cereviaise* ที่คัดกรองได้ในการทำผลิตภัณฑ์อาหาร

3.10.1 นำ *S. cerevisiae* ที่สามารถผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มากกว่า 80 กรัมต่อลิตร ขึ้นไปและมีอัตราการหมักเร็ว มาทดสอบการทำให้ขนมปังขึ้นฟู เทียบกับยีสต์ขนมปัง (baker's yeast) ทางการค้า โดยเลี้ยงบนอาหาร YM ชนิดหลอดเอียง ที่ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชม. ถ่ายเชื้อทั้งหมดลงอาหารกากน้ำตาล (กากน้ำตาล 16% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% (w/v)) ค่าความเป็นกรด-เบส 5.6 ในฟลาส์กขนาด 250 มล.ที่มีอาหาร 50 มล. บ่มที่ 32°ซ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที 14 ชม. ถ่ายเชื้อ 2.5 มล. ลงในอาหารเดิม บ่มที่สภาวะเดิมต่ออีก 14 ชม. เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (w/v) ปริมาตร 20 มล. ปั่นเหวี่ยงเพื่อล้างตะกอนเซลล์ที่ความเร็ว 4000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์โดยการปั่นเหวี่ยงซ้ำอีก 1 ครั้ง ชั่งน้ำหนักเซลล์ยีสต์ที่ได้ แล้วเก็บไว้ที่ 4°ซ นำยีสต์ที่ได้มาทำขนมปังเทียบกับยีสต์ขนมปังทางการค้า โดย 1) ละลายน้ำตาลซูโครส 19 กรัมและเกลือ 7.5 กรัม ในน้ำ 225 มล. 2) แขวนลอยเซลล์ยีสต์ 1.9 กรัมในสารละลายที่เตรียมได้ให้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 5 มล. 3) ผสมแป้งสาลี 75 กรัมในสารละลายที่เหลือ นวดให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที 4) เติมสารแขวนลอยเซลล์ยีสต์ลงไปผสมกับแป้งสาลีที่นวดแล้วและนวดต่ออีกเป็นเวลา 9 นาที 5) ตั้งทิ้งไว้ที่ 30°ซ เป็นเวลา 50 นาที จนแป้งโดขึ้นฟู รีดก้อนแป้งเพื่อไล่อากาศ บ่มต่อที่ 30°ซ 15 นาที 6) ย้ายก้อนโดที่ได้ลงบีกเกอร์ขนาด 500 มล. วัดระดับความสูงของก้อนโด บ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 50 นาที อบที่อุณหภูมิ 200°ซ นาน 30 นาที วัดระดับการขึ้นฟูและชั่งน้ำหนักของขนมปังที่ได้

3.10.2 นำ *S. cerevisiae* กลุ่มเดียวกับ 3.10.1 มาทดสอบการหมักไวน์ โดยเลี้ยงบนอาหาร YM แบบหลอดเอียง ที่ 30°ซ 48 ชม. ถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในน้ำมะพร้าวที่ปรับค่าความหวานด้วยน้ำตาลมะพร้าวให้ได้ค่า 23 องศาบริกซ์ ความเป็นกรด-เบส 5.6 ปริมาตร 50 มล. ในฟลาส์กขนาด 250 มล. บ่ม 30°ซ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที 24 ชม. ถ่ายเชื้อปริมาตร 1 มล. ลงในอาหารชนิดเดิม 50 มล. บรรจุในฟลาส์กขนาด 125 มล. ตั้งทิ้งไว้ที่ 30°ซ เป็นเวลา 8 วัน เขย่า ฟลาส์กทุก

วัน วันละ 1 ครั้งในช่วงเวลาเดียวกัน วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และค่าความเป็นกรด-เบสทุกวัน เมื่อครบกำหนด นำไวน์ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วย ebulliometer ไตเตรทหาค่าความเป็นกรดทั้งหมด (Total acidity) (รายละเอียดวิธีทำอยู่ในภาคผนวก) และเลือกสายพันธุ์ที่หมักไวน์ได้แอลกอฮอล์สูงมา 5 สายพันธุ์มาทดสอบทางประสาทสัมผัส

3.11 ทดสอบยีสต์ *S. cereviaise* ที่คัดกรองได้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ

3.11.1 ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *S. cerevisiae* ที่มีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงจากข้อ 3.9.7 ลงในอาหาร YPD ปริมาตร 50 มล. ในฟลาส์กขนาด 250 มล. บ่มที่ 30°ซ เขย่าให้อากาศที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที 24 ชม. ถ่ายเชื้อ 1% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดิม บ่มที่สภาวะเดิมต่ออีก 24 ชม. ถ่ายเชื้อ 10% (v/v) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับหมักเอทานอลที่มีกากน้ำตาลทั้งหมด 10% (w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% (w/v) ค่าความเป็นกรด-เบส 5.6 ปริมาตร 50 มล. ในฟลาส์กขนาด 250 มล. บ่มที่ 30°ซ เขย่าที่ความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชม. ปั่นเหวี่ยงเซลล์ออกจากส่วนน้ำใส วิเคราะห์เอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในส่วนน้ำใส โดยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.10.7 เลือก *S. cerevisiae* ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุดมาทดสอบประสิทธิภาพการหมักในอาหารเดิมโดยเทียบกับ *S. cerevisaie* สายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลสูงทางการค้า TISTR 5596 แต่ควบคุมให้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากันโดยการนับ เซลล์ที่จะใช้เริ่มต้นด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer) และเปลี่ยนระยะเวลาการบ่มเป็น 120 ชม. โดยเก็บผลการทดลองทุก 24 ชั่วโมงเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอลชีวภาพ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.12 ทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *S. cerevisiae* ที่คัดกรองได้จากข้อ 3.10 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YNB ที่มีกลูโคส 0.005 กรัม (w/v) ปริมาตร 50 มล. ในฟลาส์ก ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชม. เจือจางเซลล์ที่ได้อีก 100 เท่าด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (w/v) แล้วถ่ายเซลล์ปริมาตร 0.5 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YNB ที่เติมน้ำตาลกลูโคสและกลีเซลรอลอย่างละ 0.5% ในหลอดทดลองขนาด 16X150 มล. ปริมาตร 5 มล. บ่มที่ 30°ซ และสังเกตผลการเจริญเป็นเวลา 21 วัน นำเชื้อที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ไปทดสอบความสามารถการหมักเอทานอลโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป

3.13 วัดปริมาณชีวมวลที่ยีสต์ *S. cerevisaie* ผลิตได้จากการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ NL010 และ NL026 ที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ ลงในในหลอดทดลองขนาด 16×25 มล.ซึ่งมีอาหารยีสต์สกัดและมอลต์สกัดชนิดเหลวอยู่ 5 มล. บ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชม. ถ่ายเชื้อ 1 มล.ลงในฟลาส์กขนาด 250 มล. ที่มีอาหาร YNB 50 มล. พร้อมแหล่งคาร์บอนคือกลูโคส 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และกลีเซอรอล 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) ใช้ฟลาส์กที่ไม่ได้ใส่แหล่งคาร์บอนเป็นฟลาส์กควบคุม บ่มที่ 30°ซ ความเร็ว 220 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำมาปั่นเหวี่ยงที่ 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ชั่งน้ำหนักสดของชีวมวลที่ได้และบันทึกข้อมูล เก็บส่วนใสส่งวิเคราะห์หาปริมาณคาร์บอนที่เหลือโดยกลีเซอรอลวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโทกราฟฟีของเหลวสมรรถนะสูงและกลูโคสวิเคราะห์ด้วยเครื่องวิเคราะห์สารชีวภาพแบบพารามิเตอร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

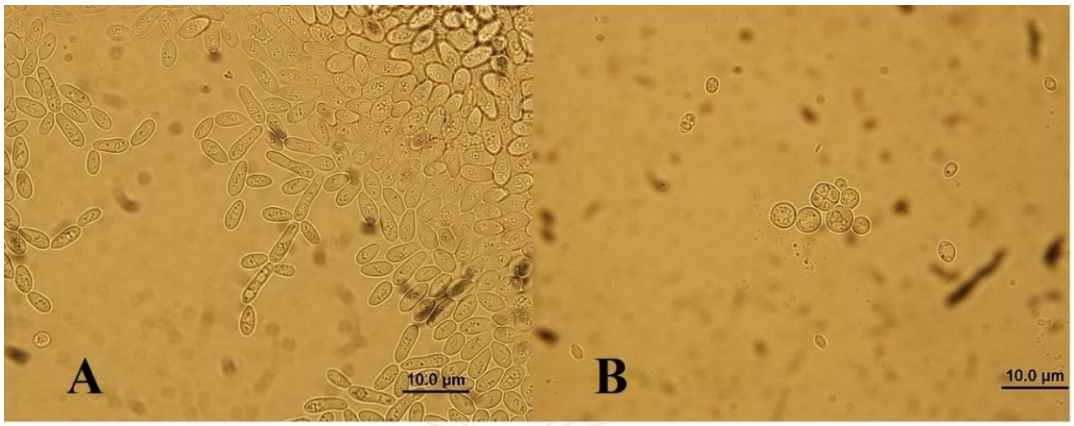
บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าว

จากการเก็บตัวอย่างน้ำตาลสดมะพร้าว 56 ตัวอย่างจากจังหวัดสมุทรสงครามนำมาคัดแยกยีสต์ด้วยอาหารซีเลคทีฟ (selective medium) ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด พีเอช 5.6 และคลอแรมฟีนิคอลเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนั้นทำการจำแนกยีสต์ที่คัดแยกได้โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนบริเวณ D1/D2 domain ของ LSU rRNA พบว่าเป็นยีสต์ที่อธิบายสปีชีส์แล้วทั้งหมดและจากการศึกษาคุณลักษณะทางฟีโนไทป์ของยีสต์ สามารถคัดแยกได้ 72 สายพันธุ์ โดยมี *S. cerevisiae* เป็นกลุ่มหลัก 56 สายพันธุ์คิดเป็น 77.78 เปอร์เซ็นต์และเชื้อชนิดอื่นอีก 16 สายพันธุ์ คิดเป็น 22.22 เปอร์เซ็นต์ อธิบายคุณลักษณะทางฟีโนไทป์ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ได้ดังนี้

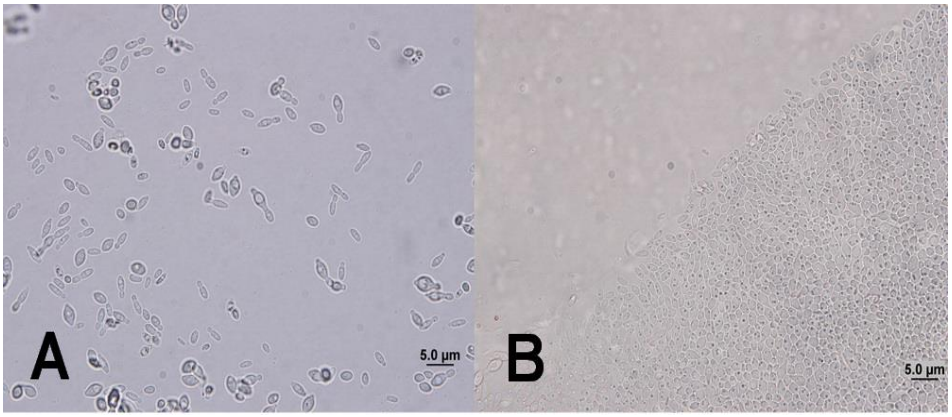
Saccharomyces cerevisiae (จำนวน 56 สายพันธุ์) สัณฐานวิทยาของเซลล์การเจริญในอาหาร YPD ที่อุณหภูมิ 30°ซ พบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม (spherical) หรือ รูปไข่ (ovoid) อยู่แบบเดี่ยวและแบบกลุ่ม เมื่อเจริญบนอาหาร YM โคโลนีมีสีครีม กลมนูน ขอบเรียบขนาดประมาณ 1-3 มม. สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว (multilateral budding) สามารถสร้างเส้นใยเทียมแบบที่ไม่ซับซ้อนได้ (รูปที่ 4.1 A) สร้างแอสคัสที่มีแอสโคสปอร์รูปร่างกลม 1-4 แอสโคสปอร์ เมื่อเจริญเต็มที่ถุงแอสคัสไม่แตก (รูปที่ 4.1 B) ส่วนการใช้แหล่งคาร์บอนในที่จำกัดอากาศ สามารถหมัก น้ำตาลกลูโคส มอลโทส ราฟฟิโนส ซูโครส ทรีฮาโลส และบางสายพันธุ์หมักกาแลกโทส ได้ *S. cerevisiae* ทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกไม่เจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium) ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ แต่ไม่ใช้โพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) เป็นแหล่งไนโตรเจน คุณสมบัติหลักอีกประการหนึ่งในการคัดเลือก *S. cerevisiae* แบบดั้งเดิมคือ *S. cerevisiae* ไม่ใช้น้ำตาลเมลลิไบโอส และแมนนิทอล ในสภาวะที่มีอากาศ ส่วนน้ำตาลที่ *S. cerevisiae* ใช้ในสภาวะที่มีอากาศคือกลูโคส กาแลกโทส มอลโทส ราฟฟิโนส ซูโครส และทรีฮาโลส ทุกสายพันธุ์เจริญที่อุณหภูมิ 37°ซ มีจำนวน 9 สายพันธุ์เจริญที่อุณหภูมิ 40°ซ ได้ คือ NC002, NC006, NC009, NC014, NC015, NC021, NL039, NT028 และ NT029 (ตารางที่ 4.1) ซึ่งเมื่อนำ *S. cerevisiae* ที่คัดแยกได้ด้วยคุณลักษณะทางฟีโนไทป์และชีวเคมีมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอ่านค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26s rRNA แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าสาย

พันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่คัดแยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับสายพันธุ์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลในช่วง 99.8 -100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.10



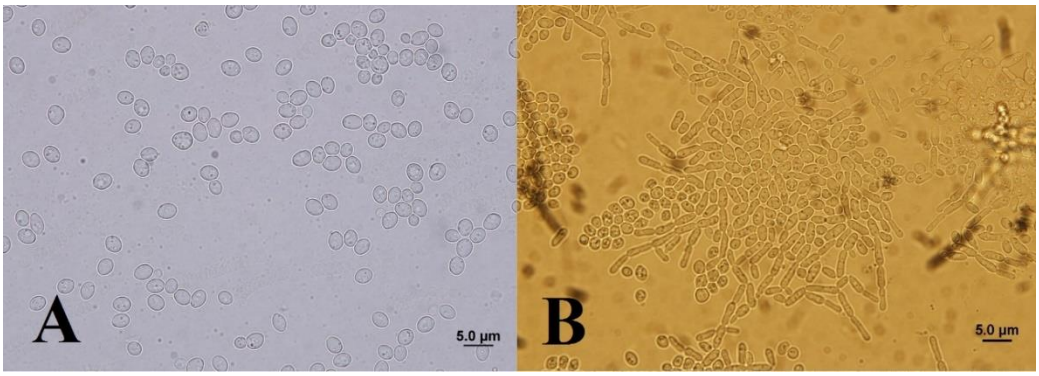
รูปที่ 4.1 เส้นใยเทียม (A) และแอสโคสปอร์ (B) ของ *S. cerevisae* สายพันธุ์ NL010 ที่กำลังขยาย 100 เท่า

Hanseniaspora guilliermondii (1 สายพันธุ์) สัณฐานวิทยาพบว่าลักษณะของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD อุณหภูมิ 30°ซ คือ เซลล์เป็นรูปท่อนยาวมีส่วนที่เป็นติ่งเล็กๆ (Apiculate Elongate) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบสองขั้ว (bipolar budding) มีขนาดค่อนข้างเล็กเมื่อเทียบกับยีสต์ชนิดอื่นเมื่อดูผ่านกล้องจุลทรรศน์ เมื่อเจริญบนอาหาร YM โคโลนีมีสีครีม ลักษณะค่อนข้างแบนขอบเรียบ ขนาดประมาณ 2 มม. ไม่สร้างเส้นใยเทียม (รูปที่ 4.2) สร้างแอสโคสปอร์รูปหมวก (Hat shape) 1-4 แอสโคสปอร์ ซึ่งเมื่อเจริญเต็มที่จะแตกออกมาจากถุงแอสคัส สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียว และสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอากาศได้เช่น กลูโคส เซลโลไบโอสไซโคลเฮกซามีน (แอคติไดโซน) และโพแทสเซียม- 2-คีโตกลูโคเนต potassium 2 ketogluconate ดังตารางที่ 4.1 ซึ่งเมื่อนำ *H. guilliermondii* ที่คัดแยกได้ด้วยคุณลักษณะทางฟีโนไทป์และชีวเคมีมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอ่านค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26s rRNA แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า *H. guilliermondii* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับยีสต์ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลในช่วง 99.8 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.2 ลักษณะเซลล์ปกติของยีสต์ *H. guillermondii* (A) ไม่สร้างเส้นใยเทียมบนอาหารคอนมีลอะการ์ (B)

Zygosaccharomyces rouxii (1 สายพันธุ์) สัณฐานวิทยาพบว่าลักษณะของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD อุณหภูมิ 30°ซ คือ เซลล์เป็นรูปไข่ค่อนข้างกลม (spherical to ovoid) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว เมื่อเจริญบนอาหาร YM โคโลนีมีสีค่อนข้างขาว ลักษณะนูนขอบเรียบมีขนาดประมาณ 1 มม. สามารถสร้างเส้นใยเทียมอย่างง่าย (รูปที่ 4.3) สร้างแอสโคสปอร์รูปกลม 1-4 แอสโคสปอร์ หมักน้ำตาลกลูโคสและมอลโทส ใช้น้ำตาลกลูโคส กลีเซอรอล มอลโทส และแมนนิทอลเป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอากาศได้ และไอโซเลตนี้สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40° ซ (ตารางที่ 4.1.1) ซึ่งแตกต่างจาก *Z. rouxii* Y-229^{NT} ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอ่านค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26s rRNA แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า *Z. rouxii* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.3 ลักษณะเซลล์ปกติของยีสต์ *Z. rouxii* ในอาหาร YPD (A) สร้างเส้นใยเทียมอย่างง่ายบนอาหารคอนมีลอะการ์ (B)

ตารางที่ 4.1 การใช้แหล่งคาร์บอนในภาวะมีอากาศและการหมักคาร์บอนในภาวะจำกัดออกซิเจนของตัวแทนแต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากน้ำตาลสดมะพร้าว

Characteristics	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Growth at 37°C	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
Growth at 40°C	-(+9)	-	+	+	-	-	-	+/-	+	-
ภาวะมีอากาศ										
N-Acetyl-Glucosamine	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Cellobiose	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-
cyclohexamide(Actidizone)	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	-(+4)	+	-	-	+	-	-	-	+	-
D-Galactose	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-
Glucosamine	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-(+1)	-	+	+	-	-	-	+	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Lactose (bovine origin)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
levulinic acid (LevulinaTe)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Maltose	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
D-Mannitol	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

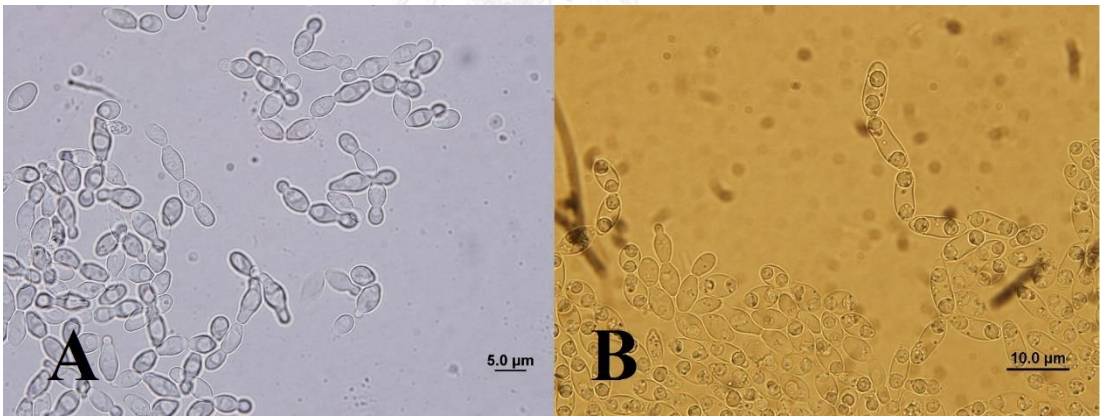
ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

Characteristics	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Growth at 37°C	+	-	+	+	-	-	+	+	+	-
Growth at 40°C	-(+9)	-	+	+	-	-	-	+/-	+	-
ภาวะมีอากาศ										
D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-αD Glucopyranoside	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
No substrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PalatinosE	-	-	-	-	-(+1)	-	+	-	-	-
potassium Gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
potassium 2 ketoGluconate	-	+	-	-	+	+	+	-	-	-
D-Raffinose	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Saccharose (sucrose)	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
sodium Glucuronate	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-(+1)	-	-	-	-	-
D-Trehalose	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-(+1)	-	+	-	+	-
ภาวะจำกัดออกซิเจน										
Galactose	-(+1)	-	-	-	+	-	+	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+/s	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-
Raffinose	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
Trehalose	-	-	-	-	+	-	+/s	-	-	-

I, *Saccharomyces cerevisiae*; II, *Hanseniaspora guilliermondii*; III, *Zygosaccharomyces rouxii*; IV, *Saccharomycodes ludwigii* (1 isolate); V, *Lachancea fermentati* (5 isolates); VI, *Wickerhamomyces anomalus* (1 isolate); VII, *Candida tropicalis* (2 isolates); VIII, *Pichia kudriavzevii* (2 isolates); IX, *Pichia manshurica* (1 isolate); X, *Schizosaccharomyces pombe* (2 isolate)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

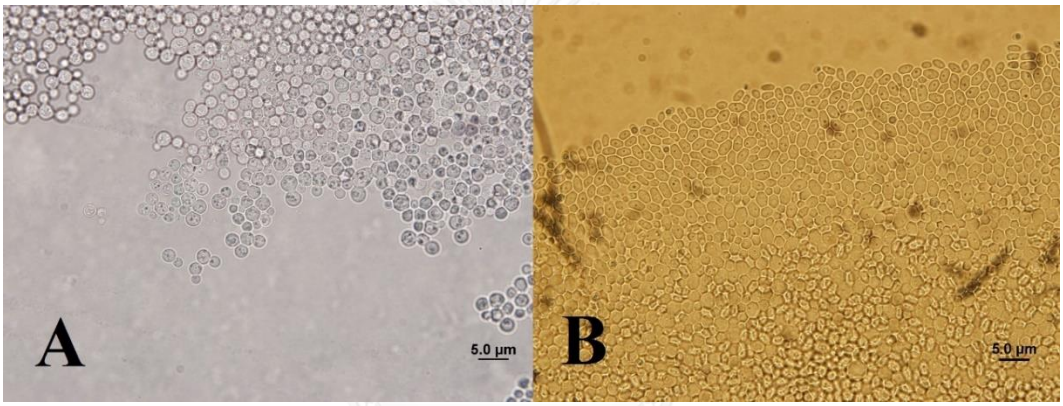
Saccharomycodes ludwigii NT008 (1 สายพันธุ์) สัณฐานวิทยาพบว่าลักษณะของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD อุณหภูมิ 30°ซ คือ เซลล์เป็นรูปมะนาวฝรั่งค่อนข้างใหญ่ (lemon shape) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบสองขั้ว เมื่ออยู่บนอาหาร YM โคโลนีมีสีครีมจนเกือบเป็นน้ำตาลอ่อน ลักษณะนูนขอบเรียบมีขนาดประมาณ 1-2 มม. สร้างเส้นใยเทียมอย่างง่ายสั้นๆ (รูปที่ 4.4) สร้างแอสโคสปอร์รูปกลม 1-2 แอสโคสปอร์ แอสโคสปอร์ไม่แตกออกเมื่อเจริญเต็มที่หมักน้ำตาลกลูโคส ราฟฟิโนสและซูโครส ใช้น้ำตาลกลูโคส กาแลกโทส เซลโลไบโอส ซูโครส ไซโคลเฮกซามีน (แอคติไดโซน) และ กลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอากาศได้ และไอโซเลตนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37- 40°ซ (ตารางที่ 4.1) ซึ่งแตกต่างจาก *S. ludwigii* NRRL Y-12793^{T} ที่มีรายงานไว้กับฐานข้อมูล เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอ่านค่าลำดับ นิวคลีโอไทด์ของ 26s rRNA แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อ่านได้มาเปรียบเทียบกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า NT008 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล 99.1 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.4 ลักษณะเซลล์ปกติของยีสต์ *S. ludwigii* ในอาหาร YPD (A)
สร้างเส้นใยเทียมอย่างง่ายบนอาหารคอนมีลอะการ์ (B)

Lachancea fermentati (5 สายพันธุ์) สัณฐานวิทยาพบว่าลักษณะของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD อุณหภูมิ 30°ซ คือ เซลล์มีรูปร่างกลม รี (ellipsoidal) จนถึงทรงกระบอก (cylindrical) สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว เมื่อเจริญบนอาหาร YM โคโลนีมีสีครีมวาวเล็กน้อย ลักษณะขอบเรียบมีขนาดประมาณ 1-2 มม.ไม่สร้างเส้นใยเทียม(รูปที่ 4.5)

สร้างแอสโคสปอร์รูปร่างกลม หมักน้ำตาลกลูโคส กาแลกโทส มอลโทส ทรีฮาโลสและซูโครส ใช้น้ำตาลกลูโคส กาแลกโทส เซลโลไบโอส ซูโครส ราฟฟิโนส มอลโทส แมนนิทอล และ ไซโคลเฮกซามีน (แอคติไดโซน) เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอากาศได้ บางสายพันธุ์ เช่น NL014 ใช้น้ำตาลซอร์โบส (sorbose) พาลาติโนส (palatinose) และไซโลส (xylose) (ตารางที่ 4.1) เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอ่านค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26s rRNA แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ของ *L. fermentati* NRRL Y-1559^{T} ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า *L. fermentati* สายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูลช่วง 99.8-100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.10

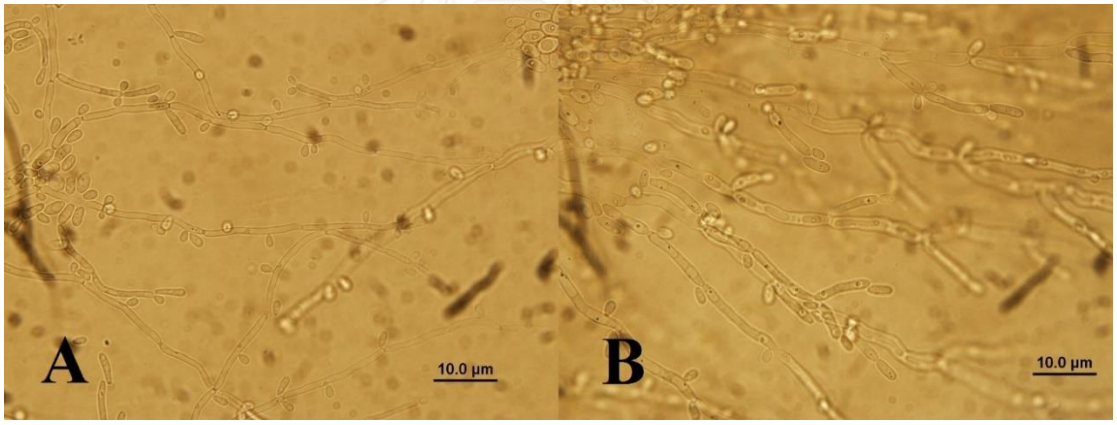


รูปที่ 4.5 ลักษณะเซลล์ปกติของยีสต์ *L. fermentati* ในอาหาร YPD (A)
สร้างเส้นใยเทียมอย่างง่ายบนอาหารคอนมีลอะการ์ (B)

Wickerhamomyces anomalus (1 สายพันธุ์) สัณฐานวิทยาพบว่าลักษณะของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD อุณหภูมิ 30°ซ คือ เซลล์มีรูปร่างกลม จนถึงเป็นรูปท่อน สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว เมื่อเจริญบนอาหาร YM โคโลนีมีสีครีม ลักษณะขอบเรียบมีขนาดประมาณ 1-2 มม. ไม่สร้างเส้นใยเทียม(รูปที่ 4.8 A) สร้างแอสโคสปอร์รูปร่างครึ่งวงกลมเหมือนหมวกทหาร หมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครสและ มอลโทส ใช้น้ำตาลกลูโคส กาแลกโทส เซลโลไบโอส ซูโครส ราฟิโนส มอลโทส แมนนิทอล เมธิล-แอลฟาดี-กลูโคไพราโนไซด์, โพแทสเซียม 2 คีโตกลูคาเนต และโซเดียมกลูคูโรเนต เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอากาศ (ตารางที่ 4.1) เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอ่านค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26s rRNA แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ *W. anolmalus* NRRL Y-366^{NT} ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า *W. anomalus* สายพันธุ์ที่คัดแยกมี

เปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล ในช่วง 99 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.10

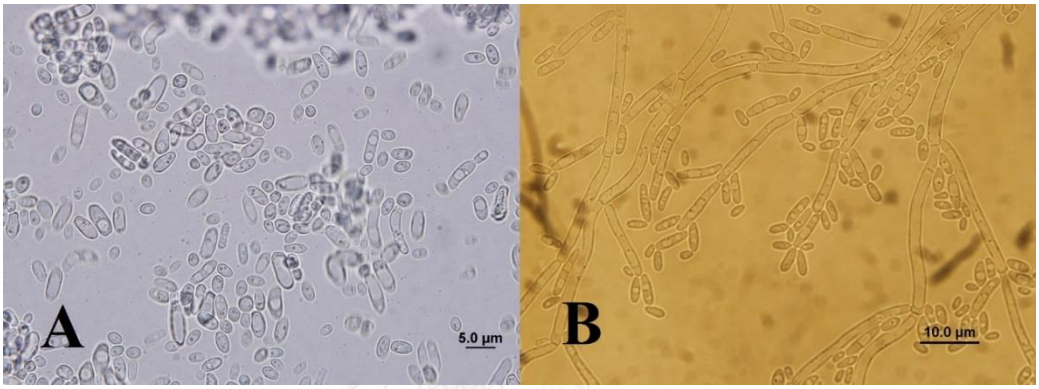
Candida tropicalis (2 สายพันธุ์) สัณฐานวิทยาพบว่าลักษณะของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD อุณหภูมิ 30°ซ คือ เซลล์มีรูปร่างกลม จนถึงเป็นรูปท่อน สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว เมื่อเจริญบนอาหาร YM โคโลนีมีสีครีม ลักษณะขอบเรียบมีขนาดประมาณ 1-2 มม. สร้างเส้นใยเทียมเป็นลักษณะสมบูรณ์เห็นชัดเจน(รูปที่ 4.6) ไม่พบการสร้างแอสโคสปอร์ หมักน้ำตาลกลูโคส กาแลกโทส ซูโครส ทรีฮาโลสและ มอลโทส ใช้น้ำตาลกลูโคส กาแลกโทส มอลโทส แมนนิทอล พาลาติโนส, ไซโคลเฮกซามีน (แอคติไดโซน), โพแทสเซียม 2 คีโตกลูคาเนต ทรีฮาโลส และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอากาศได้ (ตารางที่ 4.1) เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอ่านค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26s rRNA แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ *Candida tropicalis* NRRL Y-12968^{T} ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าสายพันธุ์ NT015 และ NC029 ที่คัดแยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับ ที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล 100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.6 ลักษณะเส้นใยเทียมของสายพันธุ์ NT015 (A) และสายพันธุ์ NC029 (B) บนอาหารคอนมีลอะการ์

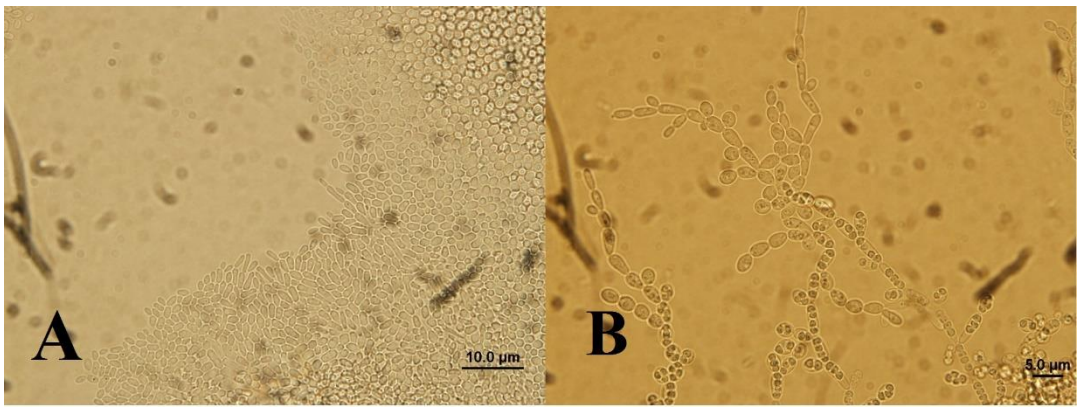
Pichia kudriavzevii (2 สายพันธุ์) สัณฐานวิทยาพบว่าลักษณะของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD อุณหภูมิ 30°ซ คือ เซลล์มีรูปไข่ จนถึงเป็นรูปท่อนยาว สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว เมื่อเจริญบนอาหาร YM โคโลนีมีสีครีม ลักษณะขอบหยัก ทรงแบนเล็กน้อย มีขนาดประมาณ 1-4 มม. สร้างเส้นใยเทียมเป็นลักษณะสมบูรณ์เห็นชัดเจน(รูปที่ 4.7) แอสโคสปอร์รูปกลม หมักน้ำตาลกลูโคสได้เพียงอย่างเดียว ใช้น้ำตาลกลูโคส เอ็น-อะซิติล-กลูโคซามีน กลูโคซามีน

และกลีเซอรอล เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอากาศได้ (ตารางที่ 4.1) ทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญที่ 37-40°ซ เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอ่านค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26s rRNA แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ *P. kudriavzevii* Y-5396^{T}ในฐานข้อมูล NCBI พบว่าสายพันธุ์ NT014 และ NL003 ที่คัดแยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับที่มีรายงานไว้ในฐานข้อมูล100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.10



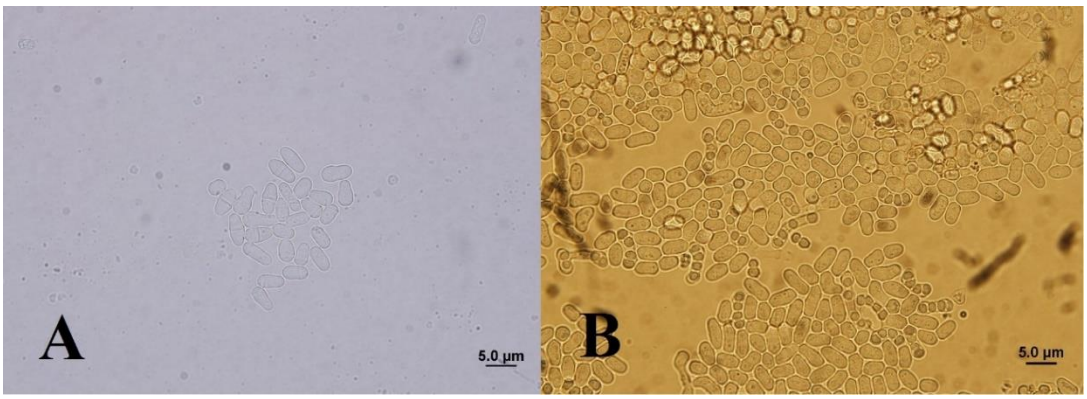
รูปที่ 4.7 ลักษณะเซลล์ (A) และการสร้างเส้นใยเทียมของ NL003 (B) บนอาหารคอนมีลอะการ์

P. manshurica (1 สายพันธุ์) สัณฐานวิทยาพบว่าลักษณะของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD อุณหภูมิ 30°ซ คือ เซลล์มีรูปไข่ จนถึงทรงกระบอก สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบหลายขั้ว เมื่อเจริญบนอาหาร YM โคโลนีมีสีครีม ลักษณะขอบหยัก ทรงแบนเล็กน้อย มีขนาดประมาณ 1-2 มม. สร้างเส้นใยเทียมเป็นลักษณะสมบูรณ์เห็นชัดเจน(รูปที่ 4.8 B) แอสโคสปอร์รูปครึ่งวงกลมเหมือนหมวก หมักน้ำตาลกลูโคสได้เพียงอย่างเดียวและหมักได้ช้า ใช้น้ำตาลกลูโคสเอ็น-อะซิติล-กลูโคซามีน และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอากาศได้ (ตารางที่ 4.1) สามารถเจริญที่ 37-40°ซ เมื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอ่านค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26s rRNA แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ *Pichia manshurica* Y-17349^{T} ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า NT026 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับสายพันธุ์ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล 100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.8 ลักษณะเซลล์ของ *Wickerhamomyces anomalus* (A) และการสร้างเส้นใยเทียมใน NT026 บนอาหารคอนมีลอะการ์ (B)

Schizosaccharomyces pombe (2 สายพันธุ์) สัณฐานวิทยาพบว่าลักษณะของเซลล์ที่เจริญในอาหารเหลว YPD อุณหภูมิ 30°ซ คือ เซลล์มีรูปกลม จนถึงเป็นรูปท่อนยาวเหมือนแคปซูลยา สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแบ่งเซลล์แบบไบนารีฟิสชัน เมื่อเจริญบนอาหาร YM โคโลนีมีสีครีม ลักษณะขอบเรียบ มีขนาดประมาณ 1-2 มม. ไม่สร้างเส้นใยเทียม (รูปที่ 4.9) แอสโคสปอร์รูปกลมอยู่เป็นคู่แบบ 2-4 แตกออกมานอกแอสคัสตอนที่แก่จัด และอาจจะมารวมกลุ่มเกาะกันอยู่ภายนอก หมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครสได้ ใช้น้ำตาลกลูโคส ราฟิโนส และซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนในสภาวะที่มีอากาศได้ (ตารางที่ 4.1) ไม่เจริญที่ 37-40°ซ เมื่อเพิ่มปริมาณ ดีเอ็นเอในส่วน D1/D2 ของยีน 26S rRNA ด้วยวิธีพีซีอาร์ นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำให้บริสุทธิ์มาอ่านค่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 26s rRNA แล้วนำมาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ *Sch. pombe* Y-12796^{T} ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า สายพันธุ์ NT007 และ NT027 ที่คัดแยกได้มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนกับสายพันธุ์ที่รายงานไว้ในฐานข้อมูล 100 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.9 ลักษณะเซลล์ของ *Sch. pombe* (A) แอสโคสปอร์ของ NT026 บนอาหาร YM (B)

ตารางที่ 4.2 ตารางเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ของตัวแทนยีสต์ *S. cerevisiae* และสายพันธุ์อื่นๆที่คัดแยกได้จากน้ำตาลสดมะพร้าว

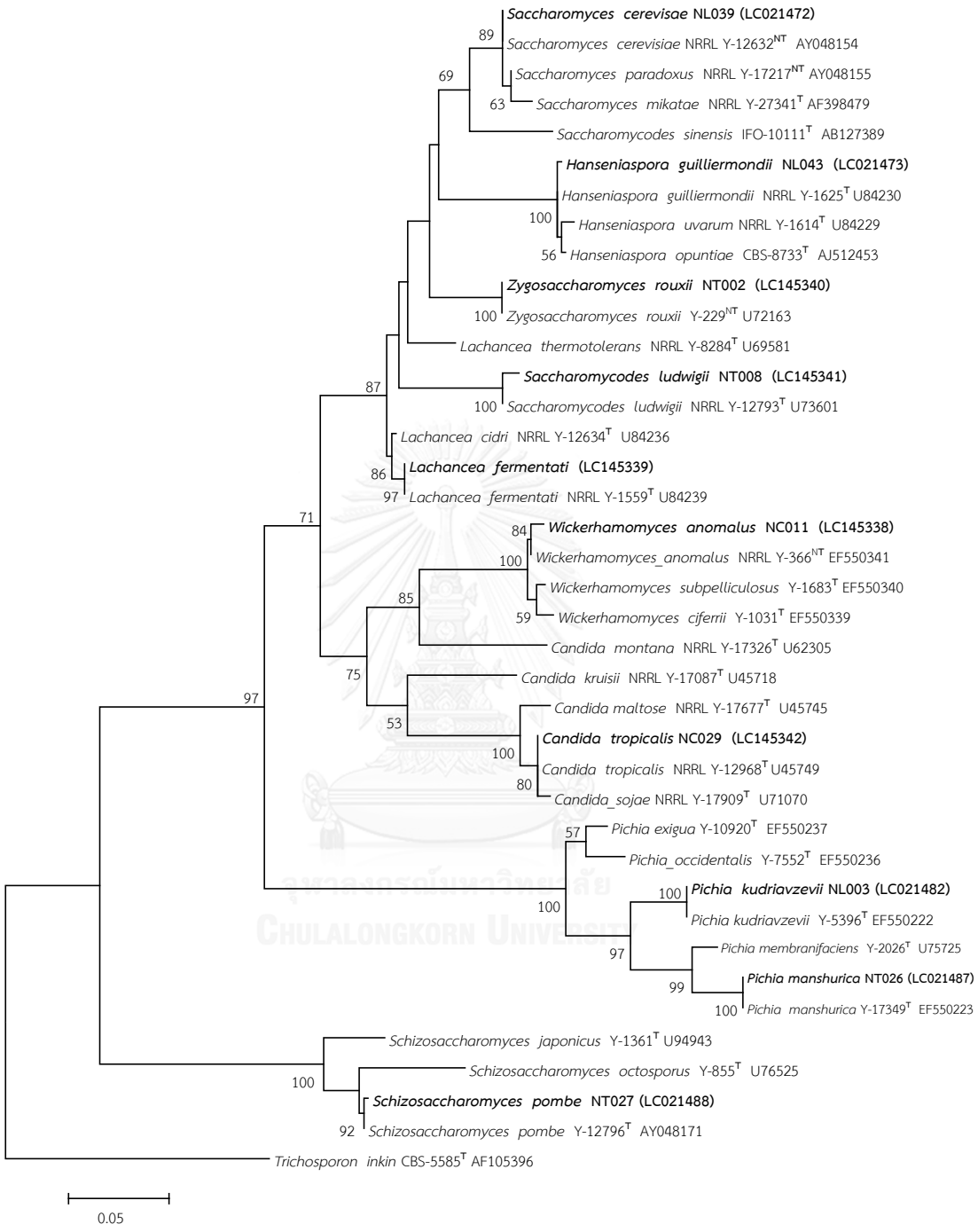
สายพันธุ์	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับฐานข้อมูลใน NCBI	เปอร์เซ็นต์ความเหมือน	[a]Accession number
NT001	*S. cerevisiae* NRRL Y-12632^{T}	100	LC021478
NT016	S. cerevisiae NRRL Y-12632^{T}	100	LC051017
NT017	*S. cerevisiae* NRRL Y-12632^{T}	100	LC016751
NC003	S. cerevisiae NRRL Y-12632^{T}	100	LC021481
NC004	*S. cerevisiae* NRRL Y-12632^{T}	100	LC050997
NC007	*S. cerevisiae* NRRL Y-12632^{T}	100	LC050999
NC008	*S. cerevisiae* NRRL Y-12632^{T}	100	LC021469
NL010	*S. cerevisiae* NRRL Y-12632^{T}	100	LC016750
NL019	S. cerevisiae NRRL Y-12632^{T}	99.8	LC021471
NL033	*S. cerevisiae* NRRL Y-12632^{T}	100	LC016752
NL003	*Pichia kudriavzevii* Y-5396^{T}	100	LC021482
NL014	*Lachancea fermentati* NRRL Y-1559^{T}	99.8-100	LC145339
NL043	*Hanseniaspora quilliermondii* NRRL Y-12625^{T}	99.8	LC021473
NC011	*Wickerhamomyces anomalus* NRRL Y-366^{NT}	99	LC145338
NC029	*Candida tropicalis* NRRL Y-12968^{T}	100	LC145342
NT002	*Zygosaccharomyces rouxii* Y-229^{NT}	99.8	LC145340
NT008	*Saccharomycodes ludwigii* NRRL Y-12793^{T}	99.1	LC145341
NT026	*Pichia manshurica* Y-17349^{T}	100	LC021487
NT027	*Schizosaccharomyces pombe* Y-12796^{T}	100	LC021488

[a]Accession Number บริเวณ LSU rDNA D1/D2 ที่ฝากเก็บรักษาไว้กับธนาคารยีน DDBJ (DNA Data Bank of Japan)

(Obasi และคณะ, 2014) คัดกรองยีสต์จากน้ำส้มสดหมักและส้มที่มีตำหนิ สุกงอมโดยธรรมชาติ ด้วยการทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ได้ยีสต์ที่มีแนวโน้มอยู่ในสายพันธุ์ *Candida* sp. และ *Rhodotorula sp.* เป็นกลุ่มหลัก ซึ่งยีสต์กลุ่มดังกล่าวสามารถเมแทบอไลต์น้ำตาลไซโลสได้ ทำให้สายพันธุ์ที่คัดแยกได้นี้มีคุณสมบัติเหมาะที่จะใช้หมักเอทานอลจากวัสดุหมักพวกเซลลูโลส

(Santosh และคณะ, 2013) ได้แยกยีสต์ *P. kudriavzvii* ได้จากผลไม้สุก ได้ทดสอบการผลิตน้ำมันโดยปรับสภาวะทางกายภาพและสารอาหารด้วยการเลี้ยงในสับสเตรทราคาถูก เช่น กลีเซอรอลดิบ ยีสต์ออโตไลเสทและคอร์นสตีฟลิควอร์ แบบ fed-batch คัลเจอร์ ได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 33 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำมัน 19% (w/w) ซึ่งได้มีการทดสอบหาค่าความเหมาะสมของสัดส่วนคาร์บอนและไนโตรเจนเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำมันให้ได้ 23%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ 4.10 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และยีสต์สายพันธุ์อื่นที่คัดแยกได้จากน้ำตาลสดมะพร้าว สร้างขึ้นโดยวิธีเนเบอร์จอยนิง (Neighbor Joining) ที่ค่าบูทสแตรป (bootstrap values) 1,000 ซ้ำ โดยพิจารณาจากความเหมือนของลำดับเบสบริเวณ D1/D2 บนยีนอาร์ดีเอ็นเอของไรโบโซมหน่วยใหญ่ (26S) เทียบกับสายพันธุ์ยีสต์ที่อยู่ในฐานข้อมูลเอ็นซีบีไอ (NCBI database)

4.2 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่คัดแยกได้

4.2.1 ประสิทธิภาพการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างการหมัก

ประสิทธิภาพของการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่แยกได้พบว่า 56 สายพันธุ์ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในปริมาณสูงตั้งแต่ 80 กรัมต่อลิตรขึ้นไป ส่วนสายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *S. cerevisiae* ผลิตได้ในปริมาณน้อยกว่า 80 กรัมต่อลิตร (ผลและวิธีการคำนวณอยู่ในภาคผนวก) คัดเลือก 12 สายพันธุ์ คือ NL001, NL009, NL010, NL021, NL026, NL033, NL041, NT017, NC018, NC023, NC024 และ NC027 เนื่องจาก (Benitez และคณะ, 1996) รายงานว่า หน้าที่เบื้องต้นของยีสต์ขนมปังในการทำให้โดขึ้นฟูนั้น ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนในการหมักและการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นปัจจัยสำคัญซึ่ง (Thais และคณะ, 2006) ได้รายงานเช่นกันว่าลักษณะเด่นของสารที่ทำให้ขึ้นฟูที่ดีคือต้องมีการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้สูง ดังนั้นในการคัดเลือกยีสต์เพื่อผลิตขนมปัง ไวน์ และเอทานอลในการทดลองนี้จึงใช้หลักการดังกล่าวมาคัดเลือกยีสต์เพื่อมาทดสอบคุณสมบัติอื่นต่อไป

4.2.2 อัตราเร็วการหมักและความเร็วในการตกตะกอน

เมื่อนำยีสต์ *S. cerevisiae* 12 สายพันธุ์ที่ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณสูงที่คัดกรองได้มาทดสอบอัตราเร็วการหมักพบว่าสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์โดยใช้ระยะเวลาน้อยที่สุดคือ NT017, NC027 และ NT033 ใช้เวลา 30 และ 40 นาทีตามลำดับเมื่อเทียบกับ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ควบคุมที่ใช้ทำขนมปังและผลิตเอทานอลชีวภาพใช้เวลา 50 นาที ส่วนสายพันธุ์ที่เหลือใช้เวลาในการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ประมาณ 60 นาที (ตารางที่ 4.3) ยีสต์สำหรับทำขนมปังและหมักเอทานอลที่ดีควรหมักเอทานอลเร็วซึ่งรายงานของ Asyikeen, 2013 กล่าวว่าลักษณะการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์อาจจะบ่งชี้ถึงแนวโน้มการเริ่มสร้างกรดเพื่อเข้าสู่กระบวนการหายใจหรือการให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นการแสดงออกถึงการเริ่มต้นทำงานของยีสต์ สายพันธุ์ที่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในเวลาสั้นนั้นจะเริ่มต้นการหมักเร็วกว่า

ผลของระยะเวลาการตกตะกอน พบว่ายีสต์ *S. cerevisaie* ทุกสายพันธุ์ที่คัดกรองมาสามารถตกตะกอนได้แต่ใช้ระยะเวลาในการตกตะกอนไม่เท่ากัน โดยสายพันธุ์ NL009, NL021, NL026 และ NT017 ใช้เวลาในการตกตะกอน 3.30 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ NL010, NL033, NL041, NC018, NC023 และ NC024 ใช้เวลา 4.30 ชั่วโมง สายพันธุ์ที่ใช้ระยะเวลาในการตกตะกอนนานคือ NL001 และ NC027 ใช้ระยะเวลาตกตะกอนนาน 5.30 ชั่วโมงเท่ากับสายพันธุ์ควบคุม (ตารางที่ 4.3) (Iraj และคณะ, 2002) รายงานถึงผลการตกตะกอนโดยธรรมชาติของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ช่วยลดค่าใช้จ่ายของขั้นการเก็บแยกชีวมวล ดังนั้นยีสต์สำหรับผลิตขนมปังและไวน์ควรตกตะกอนได้เพื่อลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการแยกเซลล์ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อและออกจากผลิตภัณฑ์สุดท้ายตามลำดับ

จากรายงานของ (Basso และคณะ, 2008) กล่าวว่าการตกตะกอนที่เร็วเกินไปของยีสต์จะทำให้ยีสต์ยึดติดกับสับสเตรทได้น้อยลง ทำให้เหลือน้ำตาลตกค้างหลังการหมักจำนวนมาก ทำให้ยีสต์นั้นให้ผลเอทานอลได้ไม่ดีเท่าที่ควร ซึ่งหากดูจากผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์ NC027 ซึ่งให้ค่าเอทานอลปริมาณสูงสุดนั้นมีค่าเริ่มต้นของการหมักหรือ Lag period และการตกตะกอนใกล้เคียงกับสายพันธุ์ควบคุม แต่มีอัตราการหมักเร็วกว่าจึงให้ผลของเอทานอลสูงกว่า

4.2.3 ผลความทนต่อเอทานอล

เมื่อนำยีสต์สายพันธุ์ที่คัดกรองมาทดสอบความทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่เติมเอทานอล 10 13 หรือ 15% (v/v) บ่มที่ 30°ซ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที 72 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร พบว่ายีสต์ทุกสายพันธุ์ที่คัดกรองมาสามารถเจริญได้ถึงแม้ในอาหาร YPD จะมีความเข้มข้นของเอทานอลสูงถึง 15% (v/v) (รูปที่ 4.11) แต่ทั้งนี้จำนวนเซลล์ที่เจริญในระยะเวลาเท่ากันแปรผกผันกับความเข้มข้นของเอทานอล คือเมื่อความเข้มข้นเอทานอลเพิ่มขึ้นจำนวนเซลล์ที่เจริญจะลดลง โดยจำนวนเซลล์จะเริ่มลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 10% (v/v) ขึ้นไป ในปี 2011 Kumar และคณะรายงานผลการคัดแยกยีสต์ *S. cerevisiae* จากลูกตาลพบว่าสามารถทนเอทานอลที่ความเข้มข้น 15%ได้ ซึ่งในปี (Iticha, 2016)ได้รายงานว่าพบยีสต์ที่ทนต่อเอทานอลเข้มข้น 15% ขึ้นไปและสูงสุดที่ทนเอทานอลได้เท่ากับ 16.5% ยีสต์ดังกล่าวอยู่ในจีนัส *Saccharomyces* คัดแยกได้จากน้ำผึ้ง ความทนทานต่อเอทานอลเป็นอีกคุณสมบัติเหมาะสมประการหนึ่งที่จำเป็นในการทำขนมปังให้มีกลิ่นรสดี จากรายงานของ Asyikeen, 2013 พบว่ายีสต์ที่แยกได้จากมะม่วงไม่สามารถทนเอทานอลที่ 13% ก็จะไม่เหมาะสมกับการนำไปทำเป็นขนมปังเช่นกัน

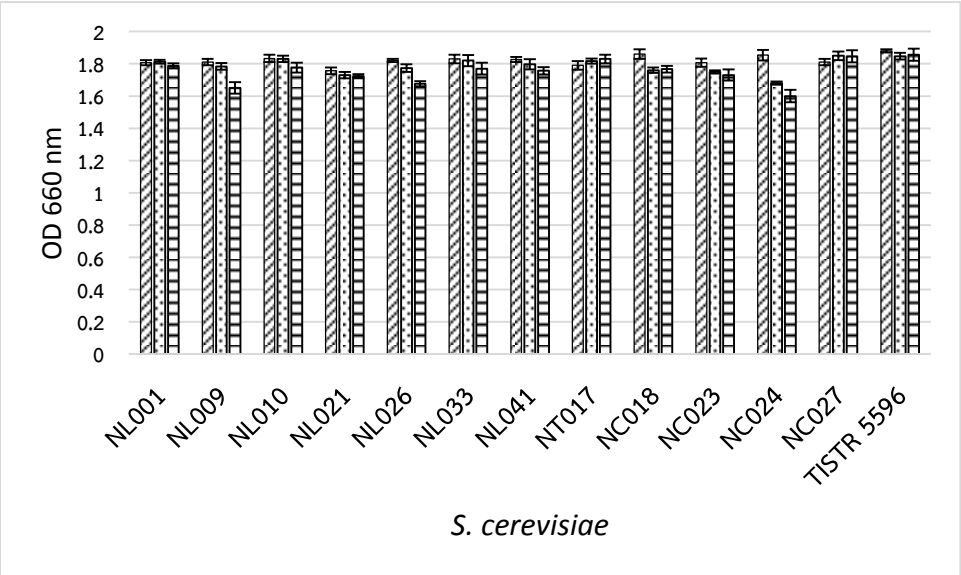
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.3 ระยะเวลาในการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์และตกตะกอนของยีสต์ที่คัดกรองมาทดสอบเทียบกับสายพันธุ์ควบคุมของยีสต์ขนมปังและยีสต์ผลิตเอทานอล

S. cerevisiae	ระยะเวลาที่ใช้เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ (นาที)	ระยะเวลาที่ใช้ตกตะกอน (ชั่วโมง)
NL001	60	5.30
NL009	60	3.30
NL010	50	4.30
NL021	60	3.30
NL026	60	3.30
NL033	40	4.30
NL041	60	4.30
NC018	60	4.30
NC023	60	4.30
NC024	50	4.30
NC027	40	5.30
NT017	30	3.30
สายพันธุ์ควบคุม:		
M ยีสต์ขนมปัง, (Sankyo yeast M)	50	5.30
TISTR 5596 (ยีสต์หมักเอทานอลสูง)	50	5.30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ผลการทดสอบความทนต่อเอทานอลของแต่ละสายพันธุ์ที่คัดกรองมาทั้ง 12 สายพันธุ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05; Duncan's MRT) โดยเฉลี่ยความทนต่อเอทานอลในช่วง 10, 13 และ 15% พบว่าสายพันธุ์ NL001, NL010, NL033, NL041, NC018 และ NC027 มีความทนเอาทานอลไม่ต่างจากของ TISTR 5596 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลการหมักเอทานอลสูง



รูปที่ 4.11 ความทนต่อเอทานอลของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ; (▨) 10, (⊡) 13, (▤) 15 ; ผลการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ (% v/v) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

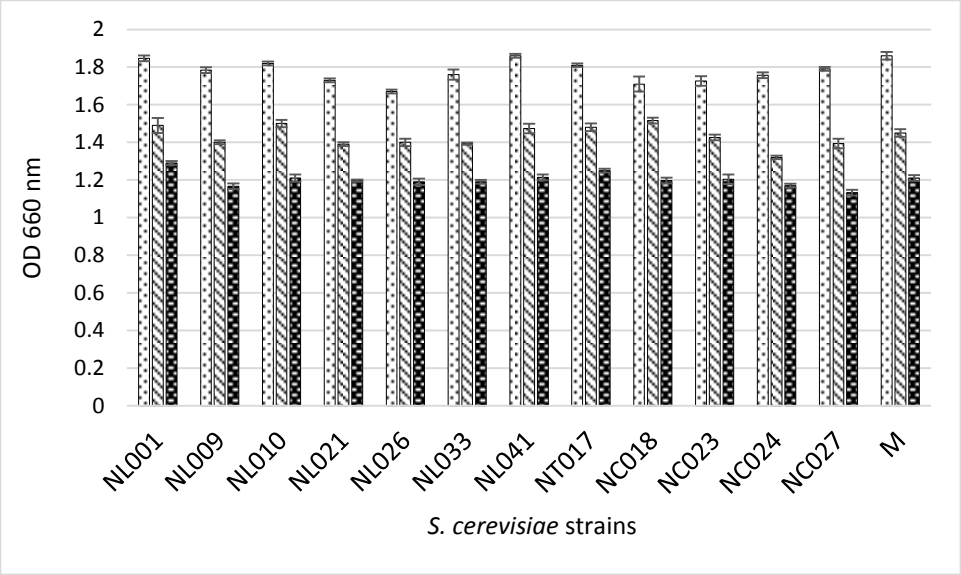
4.2.4 ผลความทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาล

ผลการทดสอบ *S. cerevisiae* ทั้ง 12 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่เติมน้ำตาลกลูโคส 24 26 และ 28% (w/v) บ่มที่ 30°ซ เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที 72 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 28% ได้ โดยการเจริญจะค่อยๆลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มมากขึ้น เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05; Duncan's MRT) โดยเฉลี่ย สายพันธุ์ NC018 มีความทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลไม่แตกต่างจากยีสต์ M ซึ่งเป็นยีสต์ขนมปังสายพันธุ์ทางการค้าที่นำมาใช้เป็นชุดควบคุม (รูปที่ 4.12)

4.2.5 ผลของความสามารถเจริญที่อุณหภูมิสูง

เมื่อนำ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดกรองได้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 37 40 42 และ 45°ซ ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37°ซ และ 9 สายพันธุ์ ได้แก่ NC002, NC006, NC009, NC014, NC015, NC021, NL039, NT028 และ NT029 สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40°ซ ไม่มีสายพันธุ์ใดเจริญที่อุณหภูมิ 42°ซ และ 45°ซ (ผลการทดลองอยู่ในภาคผนวก ค)

ส่วนยีสต์สายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *S. cerevisiae* พบว่ามี 4 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37°ซ และ 40°ซ คือ *P. kudriavzevii* NL003, *Z. rouxii* NT002, *S. ludwigii* NT008 และ *P. manshurica* NT026 (ภาคผนวก ค) ไม่มีสายพันธุ์ใดเจริญได้ที่ 42°ซ และ 45°ซ (Edgardo และคณะ, 2008) รายงานผลการคัดกรอง *S. cerevisiae* ที่สามารถหมักน้ำตาลจากวัสดุหมักพวกลิกโนเซลลูโลสที่อุณหภูมิ 35°ซ พบว่ามี *S. cerevisiae* จำนวน 11 สายพันธุ์เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็งได้ที่อุณหภูมิ 35°ซ และ 40°ซ และมี 2 สายพันธุ์ที่เจริญได้ที่ 42°ซ แต่ไม่พบสายพันธุ์ใดเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45°ซ



Chulalongkorn University

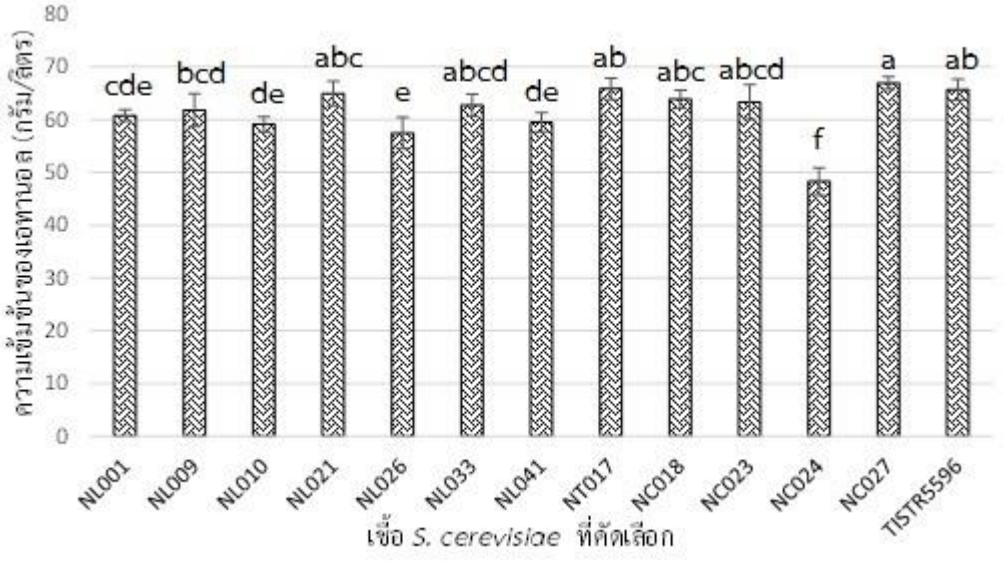
รูปที่ 4.12 ความทนต่อน้ำตาล (% w/v) ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ; (⬚) 24, (▨) 26, (▩) 28 ; ผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)

4.2.6 ผลของประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

4.2.6.1 ผลการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 30°ซ

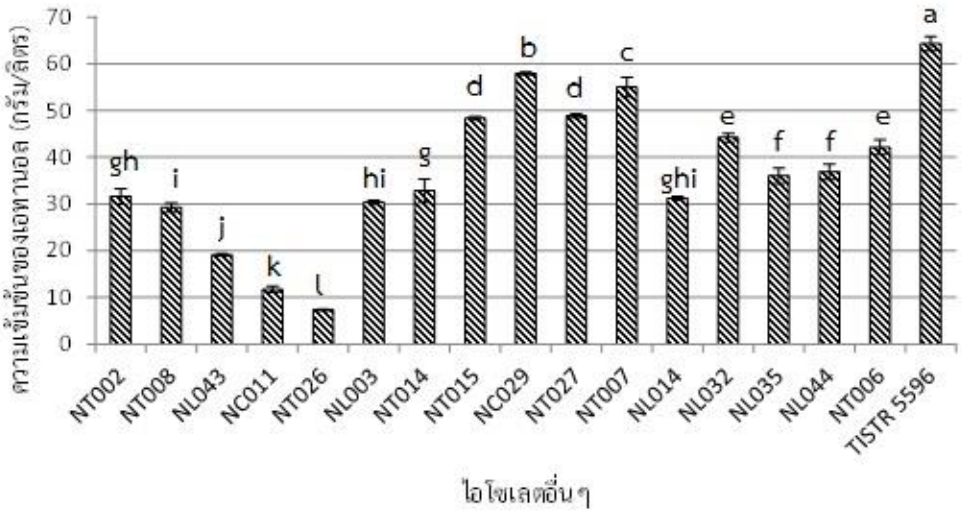
ผลการทดสอบความสามารถของ *S. cerevisiae* ทั้ง 12 สายพันธุ์โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับหมักเอทานอล ที่มีกลูโคส 18% ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า *S. cerevisiae* จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ NL001, NL009, NL021, NL033, NT017, NC018, NC023 และ NC027 ผลิตเอทานอลได้มากกว่า 60 กรัมต่อลิตร หรือสูงกว่า 1.25 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง โดยสายพันธุ์ NC027 ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 66.92 กรัมต่อลิตร หรือ 1.39 กรัมเอทานอล/ลิตร/

ชั่วโมง มากกว่าการผลิตเอทานอลของสายพันธุ์ TISTR 5596 ซึ่งเป็นชุดควบคุมที่ให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 65.67 กรัมต่อลิตร หรือคิดเป็น 1.36 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง(วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05; Duncan's MRT)) (รูปที่ 4.13)



รูปที่ 4.13 ผลการหมักเอทานอลของ *S. cerevisae* 12 สายพันธุ์ที่คัดกรองจากน้ำตาลสดมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°ซ ผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05; Duncan's MRT)

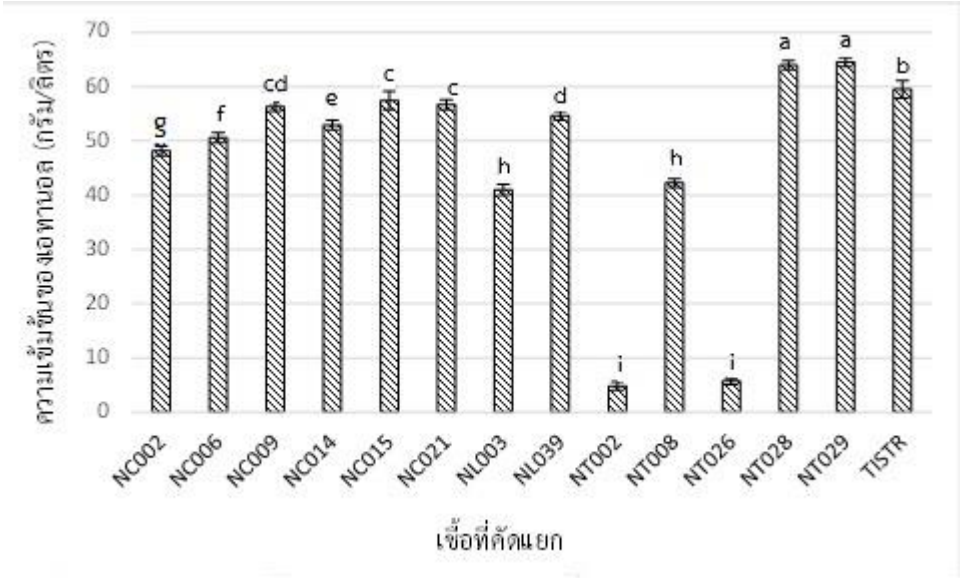
สำหรับผลการทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์อื่น ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับหมักเอทานอลที่มีกลูโคส 18% ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *C. tropicalis* NC029 ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 57.93 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 1.20 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง ในขณะที่สายพันธุ์ TISTR 5596 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ควบคุมผลิตเอทานอลได้ 64.29 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 1.33 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05; Duncan's MRT) *P. manshurica* NT026 หมักเอทานอลได้ต่ำที่สุดเพียง 7.35 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.15 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง (รูปที่ 4.14)



รูปที่ 4.14 ผลการหมักเอทานอลของยีสต์ที่ไม่ใช่ *S. cerevisiae* จากน้ำตาลสดมะพร้าวที่อุณหภูมิ 30°ซ ผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$; Duncan's MRT)

4.2.6.2 ผลการผลิตเอทานอลที่ 40°ซ

ผลการทดสอบความสามารถของ *S. cerevisiae* และยีสต์สายพันธุ์อื่นที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°ซ โดยการหมักเอทานอลที่อุณภูมิ 40°ซ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับหมักเอทานอลที่มีกลูโคส 18% เป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ NT028 และ NT029 สามารถผลิตเอทานอลได้ 63.9 และ 64.5 กรัมต่อลิตรหรือ 1.33 และ 1.34 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง ตามลำดับ มากกว่าสายพันธุ์ TISTR 5596 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ควบคุมที่ผลิตเอทานอลได้ 59.5 กรัมต่อลิตรหรือ 1.23 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง (วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$; Duncan's MRT)) ดังรูปที่ 4.15 พบว่ายีสต์ที่ไม่ใช่ *S. cerevisiae* อีก 4 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40°ซ มี 2 สายพันธุ์ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°ซ ได้คือ *P. kudriavzevii* NL003 และ *S. ludwigii* NT008 ให้เอทานอลเท่ากับ 41.0 และ 42.2 กรัมต่อลิตรหรือ 0.85 และ 0.87 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมงตามลำดับ ส่วน *Z. rouxii* NT002 และ *P. manshurica* NT026 ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้



รูปที่ 4.15 ผลการหมักเอทานอลของยีสต์ที่แยกได้จากน้ำตาลสดมะพร้าว ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°ซ ผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$; Duncan's MRT)

4.3 ผลการทดสอบศักยภาพของ *S. cerevisiae* เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร

4.3.1 ผลการทำขนมปัง

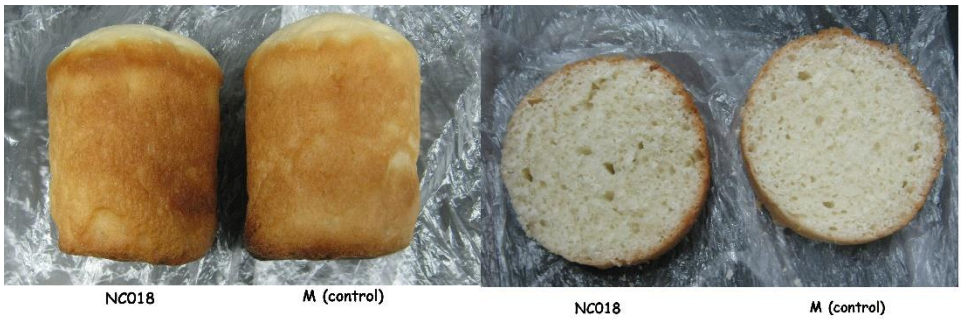
ผลจากการทดสอบ *S. cerevisiae* ต่อการทำให้ขนมปังขึ้นฟู เทียบกับยีสต์ขนมปัง (baker's yeast) สายพันธุ์ทางการค้า พบว่าสายพันธุ์ NC018 ความสามารถทำให้ขนมปังขึ้นฟูในปริมาตรที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ M (ยีสต์ขนมปังทางการค้า, Sankyo yeast M) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$; Duncan's MRT)) ดังตารางที่ 2.4 น้ำหนักสดของ *S. cerevisiae* พบว่า NL041 มากที่สุดเท่ากับ 3.16 กรัมน้ำหนักสด/100 มล. มากกว่ายีสต์ขนมปังสายพันธุ์การค้าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สายพันธุ์อื่นที่ให้น้ำหนักสดใกล้เคียงกัน คือ NL033, NC018 และ NC024 ซึ่งสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการนำไปใช้ทำขนมปังคือ NC018 เนื่องจากทำให้ขนมปังขึ้นฟูได้เท่ากับยีสต์ขนมปังสายพันธุ์ทางการค้า แต่ปริมาณน้ำหนักสดของเซลล์มากกว่าเมื่อเทียบกับอีกสองสายพันธุ์

ผลการนำสายพันธุ์ NC018 มาทำขนมปังเปรียบเทียบกับยีสต์ขนมปังสายพันธุ์ควบคุม ผลที่ได้คือ ขนมปังที่ทำจากสายพันธุ์ NC018 มีเนื้อสัมผัสที่เหนียวกว่ายีสต์ขนมปังสายพันธุ์ทางการค้า แต่ยีสต์ขนมปังสายพันธุ์ทางการค้าให้ขนมปังที่มีกลิ่นและรสชาติดีกว่า (รูปที่ 4.16)

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการทำให้ขนมปังขึ้นฟู และน้ำหนักสดของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่คัดแยกได้จากน้ำตาลสดมะพร้าว

S. cerevisiae ที่คัดเลือก	ปริมาตรของโด (มล.)	น้ำหนักสดของยีสต์ (กรัมน้ำหนักสด/100 มล.)
NL001	278^{h}±1.15	2.96^{cdef}±0.06
NL009	321^{b}±1.15	3.00^{bcde}±0.10
NL010	301^{f}±1.00	2.93^{defg}±0.06
NL021	301^{f}±1.50	2.86^{fg}±0.06
NL026	304^{e}±1.50	2.63^{h}±0.06
NL033	301^{f}±1.00	3.06^{abc}±0.06
NL041	306^{de}±1.50	3.16^{a}±0.06
NC018	336^{a}±1.70	3.06^{abc}±0.06
NC023	286^{g}±152	3.03^{bcd}±0.06
NC024	308^{cd}±1.50	3.10^{ab}±0.10
NC027	310^{c}±1.50	2.90^{efg}±0.06
NT017	299^{f}±1.52	3.03^{bcd}±0.06
M (ยีสต์ขนมปัง, Sankyo yeast M)	337^{a}±1.70	2.83^{g}±0.06

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD เปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$; Duncan's MRT)



รูปที่ 4.16 เปรียบเทียบลักษณะการขึ้นฟูของโดซึ่งเตรียมโดย *S. cerevisiae* NC018 และที่เตรียมโดยยีสต์ขนมปังทางการค้าสายพันธุ์ M

(Ma'aruf และคณะ, 2011) คัดกรองยีสต์จากผลไม้พื้นเมืองของประเทศมาเลเซียในอาหารเอนริชเมนต์ โดยการศึกษาทางสรีรวิทยา สัณฐานวิทยา ความทนต่ออุณหภูมิและความสามารถในการหมักเอทานอล เมื่อนำยีสต์ที่ได้จากการคัดกรองมาทดสอบการทำให้ขึ้นฟูพบว่าให้ผลดีกว่ายีสต์ขนมปังทางการค้า

(Angelov และคณะ, 1996) สร้าง *S. cerevisiae* สายพันธุ์กลายโดยการใช้เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methanesulfonate; EMS) คัดกรองสายพันธุ์กลาย ซึ่งมีประสิทธิภาพการหมักน้ำตาลมอลโทสสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม เพื่อจะนำไปใช้ผลิตขนมปังจากแป้งสาลีที่มีน้ำตาลต่ำ (lean wheat dough) และไม่เติมน้ำตาล ผลการทดลองพบว่าสายพันธุ์กลายที่มีประสิทธิภาพการหมักน้ำตาลมอลโทสสูงมีมอลเทสแอคติวิตีสูงเช่นกัน

(อรวรรณ พึ่งคำ และคณะ, 2559) รายงานว่าการใช้กล้ายีสต์เหลวที่แยกได้จากลูกตาลสุกประกอบด้วย *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia kudriavzeii, Issatchenkia orientalis* และ *S. cerevisiae* ซึ่งมีความสามารถในการผลิตก๊าซได้รวดเร็วในแป้งขนมตาล พบว่าขนมตาลที่ใช้ยีสต์ทั้ง 4 ชนิดมีค่าความขึ้นฟูไม่ต่างกัน แต่ความนุ่มต่างกัน *H. guilliermondii* ให้ขนมตาลที่มีความนุ่มมากที่สุด การประเมินคุณภาพด้านประสารทสัมผัสในยีสต์ 4 สายพันธุ์พบว่าผู้บริโภคให้คะแนนความชอบด้านต่างๆของขนมตาลที่ใช้ยีสต์ *H. guilliermondii* มากที่สุด การผลิตขนมตาลโดยใช้กล้าเชื้อ *H. guilliermondii* กับไม่ใช้กล้าเชื้อโดยวิธีดั้งเดิมพบว่าผู้บริโภคชอบขนมตาลที่ใส่กล้าเชื้อมากกว่าทั้งในด้านกลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม

4.3.2 ผลการหมักไวน์จากน้ำมะพร้าว

ผลทดสอบคุณภาพของไวน์น้ำมะพร้าวที่หมักโดยใช้ *S. cerevisiae* 12 สายพันธุ์ที่คัดกรองได้ โดยการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ค่าความเป็นกรด-เบสทุกวัน เมื่อครบกำหนด นำไวน์ที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ด้วย ebulliometer และไตเตรทหาค่าความเป็นกรดทั้งหมด (Total acidity) นำไวน์น้ำมะพร้าวซึ่งหมักโดย *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ให้แอลกอฮอล์สูงจำนวน 5 สายพันธุ์ มาทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสโดยผู้ทดสอบจำนวน 15 คนให้คะแนนความพึงพอใจด้วยวิธี 9 point hedonic scale กำหนดคะแนนต่ำสุดคือ 1 คะแนนและคะแนนสูงสุดคือ 9 คะแนน โดยพิจารณาจาก สี ความใส กลิ่น รสชาติและความชอบโดยรวมของผลิตภัณฑ์ไวน์ การให้คะแนนเป็นดังนี้ 1 คะแนน = ไม่ชอบมากที่สุด, 2 คะแนน = ไม่ชอบมาก, 3 คะแนน = ไม่ค่อยชอบปานกลาง, 4 คะแนน = ไม่ค่อยชอบ, 5 คะแนน = เฉยๆ, 6 คะแนน = ชอบน้อย, 7 คะแนน = ชอบปานกลาง, 8 คะแนน = ชอบมาก, 9 คะแนน = ชอบมากที่สุด

ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้เมื่อเริ่มต้นเท่ากับ 23°บริกซ์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของสายพันธุ์ NL026 สูงสุด (17.23°บริกซ์) สายพันธุ์ NL009 มีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ต่ำสุด (12.17°บริกซ์) ผลวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์พบว่า สายพันธุ์ NL010 ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงที่สุด (10.3 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือสายพันธุ์ NL009 (9.7 เปอร์เซ็นต์) สายพันธุ์ NL026 ให้ปริมาณแอลกอฮอล์ต่ำสุด (7.4 เปอร์เซ็นต์) ดังตารางที่ 4.5 แสดงว่า *S. cerevisiae* NL026 นำน้ำตาลไปใช้เปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์น้อยเพราะยังมีปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้เหลือมากกว่าของสายพันธุ์อื่น ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดพบว่าทุกสายพันธุ์มีค่าความเป็นกรดอยู่ในช่วง 0.43 - 0.46 สายพันธุ์ NC027 ให้ไวน์ที่มีค่าความเป็นกรดเบสสูงที่สุดคือ 4.13 รองลงมาคือสายพันธุ์ NL009, NL010, NL041, NC018, NC023 และ NC024 ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3.70, 3.83, 3.83, 3.73, 3.70 และ 3.67 ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ สายพันธุ์ที่ให้ไวน์ที่มีค่าความเป็นกรดเบสต่ำสุดคือสายพันธุ์ NL001, NL021, NL026, NL033 และ NT017 ค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3.0, 2.93, 2.97, 2.97 และ 2.93 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 4.5) ค่าความเป็นกรดเบสทุกสายพันธุ์เฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.93 -4.13 ไวน์ทั่วไปมีค่าความเป็นกรดด่างในช่วง 2.9 ถึง 4.2 ไวน์ที่หมักโดยยีสต์ทุกสายพันธุ์ มีค่าความเป็นกรดเบสอยู่ในช่วงที่มีความเหมาะสม กรดมีความสำคัญต่อคุณภาพของไวน์ ถ้ามีมากหรือน้อยเกินไปจะทำให้รสชาติของไวน์ไม่ดี คือต้องมีสัดส่วนที่พอสมควร ความเป็นกรดเบสต่ำจะส่งผลให้ไวน์มีสีเข้มและมีความเสถียรมากกว่าไวน์ที่มีความเป็นกรดด่างสูง กรดซิตริกและกรดมาลิกใช้เป็นสารอาหารของจุลินทรีย์ ส่วนกรดทาร์ทาริกจะลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นทำให้ไวน์มีอายุการเก็บยาวนานขึ้น(ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย และไพบูลย์ ด่านวิรุทัย, 2547)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.5 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรดทั้งหมดและปริมาณแอลกอฮอล์ของไวน์น้ำมะพร้าวที่หมักโดยใช้ *S. cerevisiae* ทั้ง 12 สายพันธุ์

S. cerevisiae สายพันธุ์	Characters			
	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (°Brix)	ค่าความเป็นกรด-เบส (pH)	ปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) %	ปริมาณแอลกอฮอล์ (%Ethanol)
NL001	$15.5^{bc} \pm 0.46$	$3.0^{c} \pm 0.10$	$0.44^{ab} \pm 0.01$	$8.9^{c} \pm 0.10$
NL009	$12.17^{g} \pm 0.76$	$3.70^{b} \pm 0.20$	$0.46^{a} \pm 0.01$	$9.7^{b} \pm 0.25$
NL010	$13.60^{ef} \pm 0.46$	$3.83^{b} \pm 0.06$	$0.45^{ab} \pm 0.01$	$10.3^{a} \pm 0.20$
NL021	$15.17^{bcd} \pm 0.21$	$2.93^{c} \pm 0.05$	$0.47^{a} \pm 0.02$	$9.2^{c} \pm 0.20$
NL026	$17.23^{a} \pm 0.87$	$2.97^{c} \pm 0.05$	$0.43^{b} \pm 0.01$	$7.4^{e} \pm 0.45$
NL033	$15.17^{bcd} \pm 0.93$	$2.97^{c} \pm 0.06$	$0.44^{ab} \pm 0.02$	$9.3^{bc} \pm 0.15$
NL041	$16.57^{ab} \pm 0.67$	$3.83^{b} \pm 0.05$	$0.46^{a} \pm 0.02$	$8.0^{d} \pm 0.20$
NT017	$15.33^{bcd} \pm 1.17$	$2.93^{c} \pm 0.06$	$0.45^{ab} \pm 0.01$	$9.3^{bc} \pm 0.34$
NC018	$14.2^{cde} \pm 0.72$	$3.73^{b} \pm 0.05$	$0.46^{a} \pm 0.01$	$9.1^{c} \pm 0.37$
NC023	$14.0^{def} \pm 1.00$	$3.70^{b} \pm 0.10$	$0.43^{b} \pm 0.01$	$9.3^{bc} \pm 0.35$
NC024	$12.67^{fg} \pm 0.41$	$3.67^{b} \pm 0.05$	$0.45^{ab} \pm 0.01$	$9.0^{c} \pm 0.15$
NC027	$15.00^{cde} \pm 1.00$	$4.13^{a} \pm 0.05$	$0.46^{ab} \pm 0.01$	$9.1^{c} \pm 0.10$

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$; Duncan's MRT)

ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของไวน์น้ำมะพร้าวซึ่งหมักโดย *S. cerevisiae* 5 สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดพบว่าผู้ทดสอบให้คะแนนด้านรสชาติและความชอบโดยรวมแก่ไวน์ที่หมักโดยสายพันธุ์ NL010 มากที่สุดเท่ากับ 7.93 และ 7.97 คะแนนตามลำดับซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งกับไวน์ซึ่งหมักโดยสายพันธุ์อื่นๆ ไวน์ที่หมักโดย *S. cerevisiae* ทั้ง 5 สายพันธุ์มีคะแนนของสีและความใสไม่แตกต่างกัน ส่วนคะแนนกลิ่นไวน์ที่หมักโดยสายพันธุ์ NL009 ได้คะแนนสูงที่สุดเท่ากับ 7.82 ในขณะที่สายพันธุ์ NC023 ได้ 7.22 คะแนนซึ่งต่ำสุด (ตารางที่ 4.6) ความพึงพอใจในรสชาติของไวน์จะแตกต่างกันในแต่ละบุคคล(โชคชัย วนภู และคณะ, 2546) ดังนั้นคุณภาพและความพึงพอใจของผู้บริโภคที่มีต่อไวน์น้ำมะพร้าวจึงมีความแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.6 ผลการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส ด้านสี ความใส กลิ่น รสชาติและความชอบโดยรวม

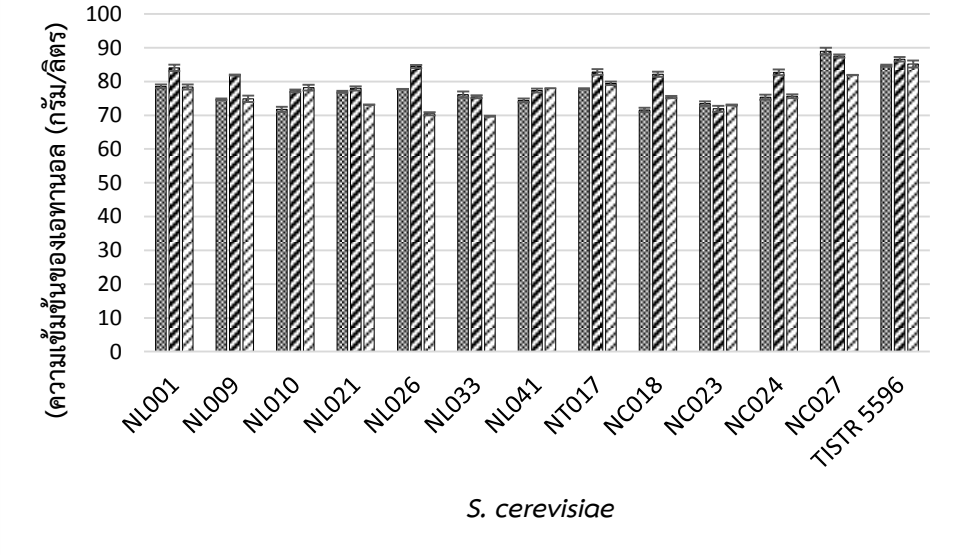
*S. cerevi*siae สายพันธุ์	เกณฑ์การตัดสิน				
	สี	ความใส	กลิ่น	รสชาติ	ความชอบโดยรวม
NL009	7.38±1.03	7.71±1.01	7.82^{a} ± 0.86	7.33^{b} ± 1.09	7.17^{bc} ± 1.09
NL010	7.71±0.84	7.53±0.69	7.68^{ab} ± 0.97	7.93^{a} ± 1.07	7.97^{a} ± 1.25
NL033	7.69±0.73	7.56±0.76	7.40^{bc} ± 0.72	7.26^{b} ± 0.84	7.00^{c} ± 0.77
NC023	7.78±0.93	7.69±0.67	7.22^{c} ± 0.90	7.40^{b} ± 0.78	7.44^{b} ± 0.94
NT017	7.76±0.91	7.78±0.67	7.71^{ab} ± 0.87	7.04^{b} ± 0.71	6.77^{c} ± 0.76

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05; Duncan's MRT)

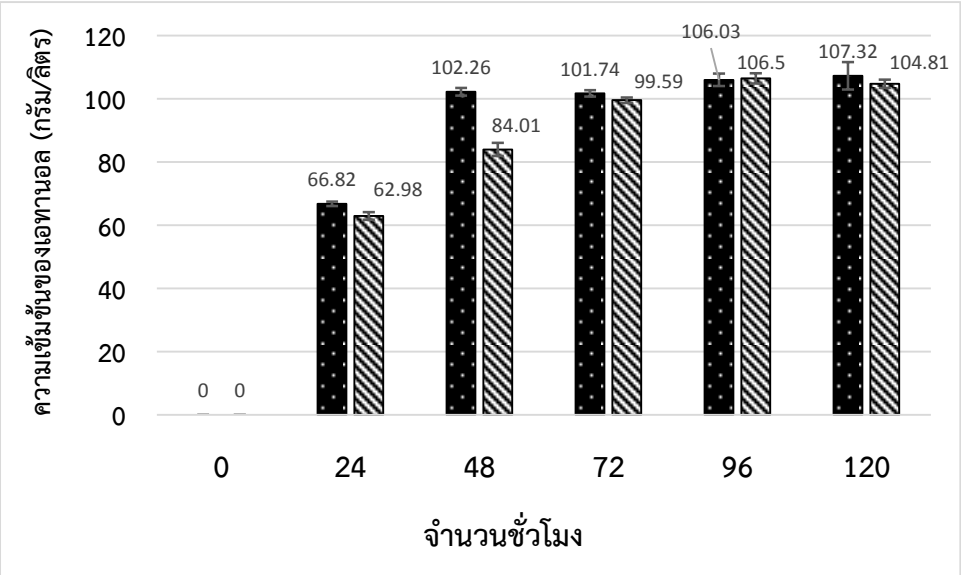
4.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisaie* ที่คัดกรองได้

ผลการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 12 สายพันธุ์โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับหมักเอทานอลที่มีกลูโคส 18% ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า *S. cerevisiae* NC027 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด และเมื่อนำ *S. cerevisiae* ทั้ง 12 สายพันธุ์มาศึกษาประสิทธิภาพเบื้องต้นในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์พบว่าสายพันธุ์ NC027 ยังคงให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดซึ่งใกล้เคียงกับประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของสายพันธุ์ควบคุม (รูปที่ 4.17) จึงทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของสายพันธุ์ NC027 เทียบกับสายพันธุ์ควบคุมอีกครั้งหนึ่งในอาหารที่มีกากน้ำตาลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เสริมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาการหมัก 120 ชั่วโมง จำนวนเชื้อเริ่มต้น 2.1×10^{6} เซลล์/มล. เก็บผลการทดสอบทุก 24 ชั่วโมงเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ดังรูปที่ 4.18 สายพันธุ์ NC027 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า TISTR 5596 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ควบคุมในชั่วโมงที่ 48 โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (p<0.05; Duncan's MRT)) ชั่วโมงที่ 24, 72, 96 และ 120 พบว่าผลการผลิตเอทานอลไม่แตกต่างกัน (รูปที่ 4.18) สายพันธุ์ NC027 ผลิตเอทานอลได้ 102.26 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 48 คิดเป็น 2.13 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง ในขณะที่สายพันธุ์ TISTR ผลิตเอทานอลได้เพียง 84.01 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 1.75 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง ทั้งนี้การที่ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ได้

สูงกว่าจากน้ำตาลกลูโคสที่เข้มข้น 18 เปอร์เซ็นต์อาจมีปัจจัยอื่นที่เข้ามาเกี่ยวข้องเช่น น้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์มีแรงดันออสโมติกสูง ส่วนในกากน้ำตาลจะประกอบด้วยแร่ธาตุและสารอาหารต่างๆที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ที่จะใช้ในการหมัก เช่น น้ำตาลที่ประกอบด้วยซูโครส กลูโคสและฟรักโทส (30-40, 4-9 และ 5-12 กรัม/100กรัมกากน้ำตาลโดยประมาณ ตามลำดับ)(Chen และ Chou, 1993) ซึ่งซูโครสจะเป็นน้ำตาลหลักในกากน้ำตาลโดยยีสต์ที่มีเอนไซม์อินเวอร์เทสจะย่อยน้ำตาลซูโครสเป็นกลูโคสและฟรักโทสก่อนนำเข้าสู่กระบวนการหมัก ซึ่งภายใต้กระบวนการหมักนอกจากน้ำตาลแล้วยังมีองค์ประกอบอื่น เช่น โปรตีน แร่ธาตุ (โพแทสเซียม แคลเซียม โซเดียม แมกนีเซียม ทองแดง เหล็ก แมงกานีส สังกะสี คลอรีนและกำมะถัน) วิตามิน เช่น ไบโอติน ไรโบฟลาวิน กรดโฟลิก ไธอะมีน และไนอะซิน) ซึ่งบางอย่างจำเป็นต่อการเจริญและการเมแทบอลิซึมของยีสต์ (Chotineeranat และคณะ, 2010) *S. cerevisiae* หมัก 18 % glucose ได้เอทานอลต่ำกว่า จาก 10% molasses เพราะใช้ปริมาณ inoculum ใน 10% molasses สูงกว่าที่ใช้ใน 18 % glucose



รูปที่ 4.17 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดย *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาล 10 เปอร์เซ็นต์และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 เปอร์เซ็นต์ (▩) 48 ชั่วโมง, (▨) 72 ชั่วโมง, (▨) 96 ชั่วโมง แสดงผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD)



รูปที่ 4.18 ผลทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของ S. cerevisiae NC027 เปรียบเทียบกับของสายพันธุ์ควบคุม TISTR 5596 จากกากน้ำตาลเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ที่ 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง, (■) สายพันธุ์ NC027 (▨) TISTR 5596 ผลวิเคราะห์ 3 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS แบบ CRD โดยเปรียบเทียบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$; Duncan's MRT)

Basso และคณะ (2008) รายงานผลการคัดกรอง *S. cerevisiae* ซึ่งให้ผลผลิตเอทานอลสูง ต้นทุนการผลิตต่ำ จากการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล ในกระบวนการที่มีการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ (cell recycle) ในโรงงานผลิตเอทานอลเป็นเวลา 12 ปี พบว่าคุณลักษณะของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ข้างต้น นอกจากต้องให้ผลผลิตเอทานอลสูง มีน้ำตาลเหลือในน้ำหมักต่ำ ยังต้องผลิตกลีเซอรอลและฟองต่ำ เซลล์ตกตะกอนช้า จำนวนเซลล์มีชีวิตระหว่างกระบวนการนำเซลล์กลับมาใช้สูง ทั้งนี้เพราะปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมักที่ต่ำเป็นตัวบ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของการหมัก (Oura, 1973) และหากเซลล์ผลิตฟองมากจะทำให้เซลล์ลอยขึ้น ทั้งการที่เซลล์ลอยตัวขึ้นหรือการที่เซลล์ตกตะกอนเร็ว จะมีผลทำให้เซลล์ได้รับสารอาหารจากวัตถุดิบลดลง น้ำตาลจึงเหลือในน้ำหมักปริมาณมาก

4.5 ผลทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

4.5.1 ผลการทดสอบความสามารถในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

ผลการคัดแยกยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าวพบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้คือ สายพันธุ์ NL026 และ NL010 ยีสต์สายพันธุ์อื่นที่สามารถใช้ กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้คือ *P. kudriavezvii* NL003 และ *S. ludwigii* NT008 (Ochoa-

Estopier A. และคณะ, 2011) รายงานว่าพบ *S. cerevisiae* ที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้โดยไม่จำเป็นต้องเสริมสารอาหารอื่น (Swinnen, 2016) แยก *S. cerevisae* ได้จำนวน 52 สายพันธุ์จากการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน (Yu และคณะ, 2010) รายงานการใช้วิธีทางพันธุวิศวกรรมปรับปรุงยีนใน *S. cerevisiae* เพื่อลดการสังเคราะห์กลีเซอรอลที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักเอทานอล ช่วยลดแรงดันออสโมติก ความเครียดในระหว่างการหมัก และเพิ่มปริมาณเอทานอล และทำให้ *S. cerevisiae* สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้

4.5.2 ปริมาณชีวมวลที่ยีสต์ *S. cerevisaie* ผลิตได้จากการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

ผลของชีวมวลที่ได้จากการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า *S. cerevisiae* ทั้งสองสายพันธุ์คือ NL010, NL026 ให้ผลผลิตเซลล์ชีวมวลเท่ากับ 0.48 กรัม/100 มล. และ 0.47กรัม/100 มล.ตามลำดับ ยังคงมีกลีเซอรอลคงเหลือจำนวนมาก ต่างจากการใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ถึงแม้จะได้เซลล์จำนวนมาก แต่ก็ใช้ปริมาณแหล่งคาร์บอนสิ้นเปลืองมากเช่นกัน หรืออาจกล่าวได้ว่าอัตราการเปลี่ยน glycerol ไปเป็นชีวมวล สูงกว่า อัตราการเปลี่ยน glucose ไปเป็นชีวมวล (ตารางที่ 4.7) จากการทดสอบนี้อาจจะทำให้มีแนวโน้มในการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเซลล์ชีวมวลใน *S. cerevisiae* และสายพันธุ์อื่นที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นสิ่งเหลือทิ้งให้เป็นประโยชน์ ทั้งนี้เซลล์ชีวมวลที่ได้ก็สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในทางปศุสัตว์ โดยนำมาเป็นอาหารสัตว์หรือผลิตโปรตีนเซลล์เดียวเพื่อเป็นอาหารเสริมให้กับสัตว์กระเพาะเดี่ยวได้ (Marchand และคณะ, 2013) กับ (Papannikolaou และคณะ, 2008) ซึ่งรายงานการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวและกรดซิตริกกับยีสต์สายพันธุ์ *Yarrow lipolytica*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.7 ชีวมวลของ *S. cerevisiae* ที่ผลิตได้จากการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

S. cerevisiae Strain	Glycerol		Glucose		No carbon
	Biomass (g/100 mL)	Residue glycerol (g/L)	Biomass (g/100 mL)	Residue (g/L)	Biomass (g/100 mL)
NL010	0.48	18.58	9.8	0.15	0.05
NL026	0.47	16.72	9.6	0.14	0.06

สำหรับผลการการคัดแยกยีสต์จากน้ำตาลมะพร้าวมาทดสอบคุณสมบัติด้านต่างๆและนำมาประยุกต์เพื่อใช้ในการทำ ขนมปัง ไวน์และเอทานอล (ตารางที่ 4.8) พบว่า สายพันธุ์ที่ให้ผลการผลิตขนมปังดีเทียบเท่ากับยีสต์ขนมปังทางการค้า จะมีค่าระยะเวลาเริ่มต้นในการหมัก 60 นาที ทนความเข้มข้นของน้ำตาลที่ 28% ได้ใกล้เคียงกับยีสต์ขนมปังทางการค้า ทนต่อเอทานอล 15% ได้ และให้ปริมาณแอลกอฮอล์ 63.88 g/L ซึ่งนับว่าค่อนข้างสูง ตรงกับความเห็นของ Asyikeen, 2013 ที่กล่าวว่ายีสต์ที่มีความทนต่อเอทานอลจะให้ผลิตภัณฑ์ของขนมปังที่มีกลิ่นและรสดี ส่วนการผลิตไวน์และเอทานอลหลักการในการคัดเลือกยีสต์คือเลือกสายพันธุ์ที่ทนแอลกอฮอล์ เนื่องจากต้องมีการผลิตเอทานอลซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ ยีสต์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอลต้องมีความสามารถในการหมักเร็วและพิสูจน์แล้วว่าเป็นยีสต์ที่ตกตะกอนหลังการหมัก นอกจากนี้ยังทนต่อน้ำตาลและเอทานอลความเข้มข้นสูงได้(Brooks, 2008) ซึ่งจากการทดลองนี้สายพันธุ์ NC027 ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงก็มีความสามารถในการหมักเร็วคือเริ่มระยะเวลาที่หมักตั้งแต่ช่วง 40 นาทีแรก เป็นยีสต์ที่ตกตะกอนและสามารถเจริญในเอทานอลความเข้มข้น 15% ได้ดีเมื่อเทียบกับ *S. cerevisae* สายพันธุ์อื่น ดังนั้นการทดสอบคุณสมบัติบางประการเบื้องต้น เช่น ระยะเวลาการหมัก การตกตะกอนของยีสต์ ค่าความทนต่อน้ำตาลหรือเอทานอล ล้วนเป็นพื้นฐานสำคัญที่ควรทำก่อนการเลือกยีสต์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมเหล่านั้นไปใช้ในการประยุกต์ใช้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4.8 สรุปคุณสมบัติของ *S. cerevisiae* ทั้ง 12 สายพันธุ์และความสามารถในการหมักเอทานอล ทำขนมปังและทำไวน์

S. cerevisiae	ระยะเวลาที่เริ่มต้นการหมัก (นาที)	ระยะเวลาที่ใช้ตกตะกอน (ชั่วโมง)	ค่าการเจริญของเซลล์ที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 28% (w/v)	ค่าการเจริญของเซลล์ที่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ 15% (v/v)	เอทานอลที่ผลิตได้ (g/L)	ค่าการขึ้นฟูของโด	เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ในไวน์
NL001	60	5.30	1.29	1.79	60.79	278	8.9
NL009	60	3.30	1.16	1.65	61.80	321	9.7
NL010	50	4.30	1.21	1.78	59.13	301	10.3
NL021	60	3.30	1.20	1.72	64.95	301	9.2
NL026	60	3.30	1.19	1.67	57.45	304	7.4
NL033	40	4.30	1.19	1.77	62.75	301	9.3
NL041	60	4.30	1.21	1.76	59.49	306	8.0
NC018	60	4.30	1.20	1.77	63.88	336	9.1
NC023	60	4.30	1.20	1.73	63.32	286	9.3
NC024	50	4.30	1.17	1.60	48.28	308	9.0
NC027	40	5.30	1.13	1.84	66.92	310	9.1
NT017	30	3.30	1.25	1.83	65.83	299	9.3
สายพันธุ์ควบคุม: ยีสต์ขนมปัง, (Sankyo yeast M)	50	5.30	1.21	-	-	337	-
TISTR 5596 (ยีสต์หมักเอทานอลสูง)	50	5.30	-	1.85	65.67	-	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บตัวอย่างยีสต์จากน้ำตาลสดมะพร้าว ที่จังหวัดสมุทรสงคราม นำมาคัดกรองยีสต์โดยศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คุณลักษณะทางชีวเคมีและทางสรีรวิทยาบางประการ ร่วมกับการศึกษาตามหลักการอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล พบว่าได้ยีสต์ทั้งหมด 72 สายพันธุ์ โดยมี *S. cerevisiae* เป็นกลุ่มสายพันธุ์หลัก (77.78%) และยีสต์สายพันธุ์อื่นอีก 16 สายพันธุ์ (22.22%) ประกอบด้วย *P. kudriavezvii, P. manshurica, S. ludwigii, Z. rouxii, Sch. pombe, L. fermentati, W. anomalus, H. gulliermondii* และ *C. tropicalis*

ผลจากการทดสอบประสิทธิภาพของยีสต์ที่คัดกรองได้ในการทำขนมปังพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* NC018 สามารถทำให้ขนมปังขึ้นฟูได้ใกล้เคียงกับยีสต์ขนมปังทางการค้า Sankyo yeast M แบบไม่แตกต่างกันทางสถิติ และ ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* NL010 สามารถหมักไวน์ได้แอลกอฮอล์สูงสุด 10.3% และมีรสชาติเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

การทดสอบประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลพบว่า ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* NC027 สามารถให้เอทานอลจากการหมักในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 18% อุณหภูมิ 30°ซ ในระยะเวลา 48 ชั่วโมงได้สูงที่สุดมากกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ควบคุมซึ่งเมื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนในการหมักเป็นกากน้ำตาลเข้มข้น 10% สายพันธุ์ NC027 ยังคงให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 102.26 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 48 คิดเป็น 2.13 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง ในขณะที่สายพันธุ์ TISTR ผลิตเอทานอลได้เพียง 84.01 กรัมต่อลิตรที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 1.75 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง

สำหรับยีสต์สายพันธุ์อื่นที่ไม่ใช่ *S. cerevisiae* เช่น *Z. rouxii* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความทนทานต่อแรงดันออสโมติกสูงนิยมนำไปถนอมอาหารเช่น การหมักซอสถั่วเหลือง ซีอิ๊ว ส่วน *P. kudriavezvii, P. manshurica* มีรายงานว่าเป็นยีสต์ผลิตและสะสมน้ำมันภายในเซลล์ *W. anomalus* มีรายงานในเรื่องของการใช้เป็นยีสต์ปฏิปักษ์ พวกที่ใช้น้ำตาลไซโลสได้อย่างเช่น *C. tropicalis* อาจนำไปใช้ในการหมักเอทานอลกับวัสดุหมักที่เป็นลิกโนเซลลูโลสได้เนื่องจากให้เอทานอล 57.93 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 1.20 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง ส่วน *L. fermentati, Sch. Pombe, H. guilliermondii, S. ludwigii* เป็นยีสต์ที่มีรายงานเกี่ยวกับความสามารถในการให้กลิ่นรสในเครื่องดื่ม

ยีสต์ที่คัดกรองได้จากน้ำตาลมะพร้าวทั้งหมดนี้มี 4 สายพันธุ์ที่สามารถใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญเติบโตได้ คือสายพันธุ์ *S. cerevisiae* NL010, NL026 , *P. kudriavezvii* NL003 และ *S. ludwigii* NT008 ซึ่งอาจสามารถนำไปปรับใช้กับกลีเซอรอลดิบซึ่งเป็นของเหลือทิ้ง

จากการทำไบโอดีเซลเพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์โดยไม่ต้องใช้กลูโคส และนำเซลล์ชีวมวลที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับงานต่างๆที่เกี่ยวข้องต่อไปทั้งนี้กลีเซอรอลที่เป็นของเหลือทิ้งดังกล่าวจะได้ไม่เป็นมลพิษต่อสภาวะแวดล้อม เหมือนได้ใช้ทรัพยากรหมุนเวียนอย่างคุ้มค่า

ด้วยข้อมูลสนับสนุนที่กล่าวมาข้างต้นจึงอาจสรุปได้ว่าน้ำตาลสดมะพร้าวเป็นแหล่งของยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีประสิทธิภาพเพราะทำให้ได้ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่มีคุณภาพในการผลิตขนมปัง, ไวน์ และเอทานอล นอกจากนี้ยังได้ยีสต์สายพันธุ์อื่นซึ่งหากศึกษาต่อถึงคุณสมบัติที่เหมาะสมที่จะนำไปประยุกต์ใช้อาจมีแนวโน้มที่จะได้ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพตรงกับงานที่ต้องการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Alberti A, Vieira RG, Drilleau JF, Wosiacki G & Nogueira A (2011) Apple wine processing with different nitrogen contents. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 54: 551-558.

Angelov AI, Karadjov GI & Roshkova ZG (1996) Strain selection of baker's yeast with improved technological properties. *SFood Research International* 29: 235-239.

Antoni D, Zverlov VV & Schwarz WH (2007) Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology* 77: 23-25.

Asyikee NZ, Ma'raruf AG, Sahilah AM, Mohd KA & Wan Aida WM (2013) A new source of *Saccharomyces cerevisiae* as a leavening agent in bread making. *International Food Research Journal* 20: 967-973.

Atputharajah JD, Widanapathlranat S & Samarajeewa U (1986) Microbiology and biochemistry of natural fermentation of coconut palm sap. *Food Microbiology* 3: 273-280.

Basso LC, Amorim HV, Oliveira AJ & Lopas ML (2008) Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *Federation of European Microbiological Societies Yeast Research* 8: 1155-1163.

Benitez B, Gasent RJM, Castrejon F, Codon AC & (1996) Development of new strains for the food industry. *Biotechnology Progress* 12.

Biebl H (2001) Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* batch and continuous culture studies. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 27: 18-26.

Boekhout T & Robert V (2003) Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects. p. 488. B.Behr’s Verlag GmbH & Co, Hamburg.

Boulton B, Singleton VL, Bisson LF & Kunkee RE (1996) Yeast and biochemistry of ethanol fermentation. *Principles and Practices of wine making,*(2, ed.) p. 139-172. Chapman and Hall, NewYork.

Brooks AA (2008) Ethanol production potential of local yeast strains isolated from ripe banana peels. *African Journal of Biotechnology* 7: 3749-3752.

Chen JCP & Chou C (1993) *Cane Sugar Handbook*. John Wiley & Sons, Inc, New York, USA.

Chotineeranat S, Wansuksri R, Piyachomkwan K, Chatakanonda P, Weerathaworn P & Sriroth K (2010) Effect of calcium ions on ethanol production from molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. *Sugar Tech* 12: 120-124.

Covadonga RA, Jaqueline KB, Lorrie MF, Ranee MG & Micky EP (2002) Yeast species associated with orange Juice: evaluation of different identification methods. *Applied and Environmental Microbiology* 68: 1955-1961.

Dobson R, Gray V & Rumbold K (2012) Microbial utilization of crude glycerol for the production of value-added products. *Journal Industrial Microbiology and Biotechnology* 39: 217-226.

Dorfler J & Amorin HV (2007) Applied bioethanol technology in Brazil. *Sugar Industry Zuckerindustrie* 132: 694-697.

Edgardo A, Carolina P, Manuel R, Juanita F & Baeza J (2008) Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. *Enzyme and Microbial Technology* 43: 120-123.

Ekunsanmi TJ & Odunfa SA (1990) Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activities of some yeast strains isolated from steep water of fermenting cassava tubers. *Journal of Applied Microbiology* 69: 672-675.

Erasmus JD, Cliff M & Vuuren JJvH (2004) Impact of yeast strain on the product of acetic acid, glycerol and the sensory attributes of Ice wine. *American Journal Enology and Viticulture* 55: 371-378.

Ferrari MD, Bianco R, Froche C & Loperena ML (2001) Baker's yeast production from molasses/cheese whey mixtures. *Biotechnology Letters* 23: 1-4.

Gancedo C, Gancedo JM & Sols A (1968) Glyceerol metabolism in yeasts: Pathways of utilization and production. *European Journal of Biochemistry* 5: 165-172.

Goffeau A, Park J, Paulsen IT, Jonniaux JL, Dinh T, Mordant P & Saier MHJ (1997) Multidrug-resistant transport protein in yeast: complete inventory and phylogenetic characterization of yeast open reading frames with the major facilitator super family. *Yeast* 13: 43-54.

Goldenberg J (2007) Ethanol for sustainable energy future. *Science* 315: 808-810.

Grimwood BE & Ashman F (1975) Coconut palm production: Their process in developing countries. *Food and Agriculture Organization* 189-190.

Himmel ME, Ding SY, Johnson DK, Adnen WS, Nimlos MR, Brady JW & Foust TD (2007) recalcitrance: Engineering plants and enzymes for biofuels production. *Science* 315: 804.

Iraj N, Giti E & Lila A (2002) Isolation of a flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* and investigation of its performance in the fermentation of beet molasses to ethanol. *American Journal of Biomass and Bioenergy* 23: 481-486.

Iticha NT (2016) Isolation and screening of ethanol tolerant yeast for bio-ethanol production in Ethiopia. *Global Journal of Life Sciences and Biological Research* 2: 1-7.

Jarvis GN, Moore ER & Thiele JH (1997) Formate and ethanol are the major products of glycerol fermentation produced by a Klebsiella planticola strain isolated from red deer. *J Appl Microbiol* 83: 166-174.

Julien A, Theodore D, Specht G, Dumont A & Brung C (2012) The state of art:yeast nutrition and protection for rliable alcoholic fermentation. Lallermand.

Kalaiyarasi K, Sangeetha. K & Rajarajan S (2013) A comparative study on the microbial flora of the fresh sap from cut inflorescence and fermented sap (toddy) of *Borrassus flabellifer* Linn. (palmyrah tree) and of Cocos nucifera Linn. (coconut tree) to identify the microbial fermenters. *International Journal of research in Pure and Applied Microbiology* 3: 43-47.

Kevin K (2005) *Fungi :Biology and Applications*. John Wiley and Sons, Ltd.

Kozaki (2004) Coconut sugar " The natural choice for diabetic and everyone" All Natural & Certified Organic.

Kramer LE (2001) *The effect of temperature on the fermentation rate and production and retention of yast volatiles*. Spring200.

Kumar RS, Shankar T & Anandapandian KTK (2011) Characterization of alcohol resistant yeast Saccharomyces cerevisiae isolated from toddy. *International Research Journal of Microbiology* 2: 399-405.

Kurtzman CP & Robnett CJ (1998) Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73: 331-371.

Kurtzman CP, Fell JM & Boekhout T (2011) *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier Science Publisher, Amsterdam.

Kurtzman CP, Boekhout T, Robert V, Jack W, Deak T & (2003) Methods to identify yeasts. *Yeasts in Food: Beneficial and Detrimental Aspects,*(Boekhout T & Robert V, eds.). B.Behr's Verlag GmbH & Co., Hamburg.

Law SV, Abu BF, Mat HD & Abdul HA (2011) Popular fermented foods and beverages in Southeast Asia. *International Food research Journal* 18: 475-484.

Lodder J (1970) *The yeasts, a Taxonomic Study*. North- Holland, Amsterdam.

Loubser PA (1999) the intraction between malolactic bacteria wine grape cultivars and SA wine yeasts.

Ma'aruf AG, Asyikeen ZN, Sahilah AM & Khan AM (2011) Leavening ability of yeast isolated from different local fruits in bakery product. *Sains Malaysiana* 40: 1413-1419.

Marchand K, Lubitz W & Nicol R (2013) Utilization of biodiesel derived crude glycerol by fungal isolates for biomass and single cell oil production. *Journal of Biobased Materials and Bioenergy* 7.

O'Toole DK & & Lee YK (2006) Food Involving Yeast and Ethanol Fermentation. (Lee KY, ed.).

Obasi BC, Whong CMZ, Ado SA & Abdullahi IO (2014) Isolation and identification of yeast associated with fermented orange juice. *The International Journal of Engineering and Science* 3: 64-69.

Ochoa-Estopier A., Lesage J, Gorret N & Guillouet SE (2011) Kinetic analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain adapted for improved growth on glycerol: Implications for the development of yeast bioprocess on glycerol. *Bioresource Technology* 102: 1521-1527.

Oda Y & Tonomura K (1993) Sodium chloride enhances the potential leavening ability of yeast in dough. *Food Microbiology* 10: 249-254.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Osho A (2005) Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. *African Journal of Biotechnology* 4: 660-662.

Oura E (1973) Energetics of yeast growth under different intensities of aeration. *Biotechnology Bioengineering Symposium* 0: 117-127.

Panchal CJ & Tavares FCA (1990) Yeast strain selection for ethanol production. *Yeast Strain Selection,*(Panchal CJ, ed.) p. 225-243. Marcel Dekker, New York.

Papannikolaou S, Fakas S, Fick M, Chevalot I, Galiotou-Panayotou M, Komaitis M, Marc I & Aggelis G (2008) Biotechnological valorization of raw glycerol discharged after bio-diesel (fatty acid methyl esters) manufacturing process: production of 1,3-propanediol, citric acid and single cell oil. *Biomass Bioenergy* 32: 60-71.

Peynaud E (1984) *Condition for development of yeast-conducting alcoholic fermentation in knowing and making wine*. John Wiley & Sons, Inc.

Phaff HJ, Miller MW & Mrak EM (1966) *The Life of Yeasts*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Reed G & Nagodawithana TW (1991) Baker's Yeast Production. *Yeast Technology* (Reed GN, T.W., ed.) p. 261-314. Nostrand Reinhold, New York.

Saitou N & Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4: 406-425.

Sanni AI (1993) The need for process optimization of African fermented foods and beverage. *International Journal of Food Microbiology* 18: 85-95.

Santosh S, Thira M, Saran S & Rangaswamy V (2013) Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Fuel,* 106: 690-696.

Sevda SB & Rodrigues L (2011) Fermentative behavior of *Saccharomyces cerevisiae* during guava (*Psidium guajava* L.) must fermentation and optimization of guava wine production. *Journal of Food Processing and Technology* 2: 1-9.

Somogyi M & Nelson. N (1952) Determination of reducing sugars by Nelson-Somogyi method. *Journal of Biological Chemistry* 200: 245.

Swinnen S, Ho, P. W., Klein, M., & Nevoigt, E. (2016) Genetic determinants for enhanced glycerol growth of *Saccharomyces cerevisae*. *Metabolic Engineering* 36: 68-79.

Tanaka F, Ando A, Nakamura T, Takagi H & Shima J (2006) Functional genomic analysis of commercial baker's yeast during initial stages of model dough fermentation. *Food Microbiology* 23.

Thais MG, Danilo GM, Iara PM, Cyntia MT, Fadel P & Tania MBB (2006) Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains of winery interest. *Brazilian Journal of Pharmaceutical and Sciences* 42: 119-126.

Usansa U (2003) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. Thesis, Suranaree University of Technology.

Varela C, Pizarrrg F & Agosin E (2004) Biomass conten governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 3392-3400.

Walker GM (1998) *Yeast Physiology Biotechnology*. John Wiley & Sons, Chichester.

Walt JP, van der., & Yarrow D (1984) Method for the isolation, maintenance, classification and identification of yeasts. *The yeasts, A Taxonomic Study,* (Kreger NJW, van Rij ed.). Elsevier, Amsterdam.

Wanichkul K, Sakunnum T & Tangkitchote P (2009) Production process and yield characteristic of coconut sugar. *Agricultural Science Journal* 40: 169-172.

Wellala CKD, Gunawardhane MHW, Wijeratne MCP & Illeperuma CK (2004) Fermentation of rice using yeast isolated from coconut and palmyrah sap. *Agricultural Research* 16: 114-120.

Wickerham LJ (1951) Taxonomy of the Yeasts. *Technical Bulletin of the U S* 1029: 1-55.

Wijesinghe DGNG & Samarajeewa U (1988) Screening yeast from coconut inflorescence sap for continuous alcoholic fermentation. *Food Microbiology* 5: 119-123.

Yang F, Hanna M & Sun R (2012) Value-added uses for crude glycerol-a byproduct of biodiesel production. *Biotechnology for Biofuels* 5: 13.

Yarrow D (1998) Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. . *The Yeast, A Taxonomy Study,*(Kurtzman CPF, J. W., ed.) p.77-100. Elsevier, Amsterdam.

Young JJ, Yun HS, Lee J & Kyu Oh M (2011) Production of 1,2-propanediol from glycerol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal Microbiology Biotechnology* 21: 846-853.

Yu KO, Kim SW & Han SO (2010) Reduction of glycerol production to improve ethanol yield in an engineered *Saccharomyces cerevisiae* using glycerol as a substrate. *Journal of Biotechnology* 150: 209-214.

โชคชัย วนภู, นันทกร บุญเกิด & ลำไพร ดิษฐวิบูลย์ (2546) *คนทำไวน์*: *wine maker*1. สมบูรณ์พริ้นติ้ง, นครราชสีมา.

วันเพ็ญ จิตรเจริญ (2556) *คู่มือไวน์เมกเกอร์*. เชียงใหม่พริ้นติ้ง จำกัด, เชียงใหม่.

ศักดิ์สิทธิ์ จันทร์ไทย & ไพบูลย์ ด่านวิรุทัย (2547) การวิเคราะห์ทางเคมีของไวน์พื้นบ้าน. *วารสารศูนย์บริการวิชาการ* 12: 27.

สาวิตรี ลิ่มทอง (2549) *ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.* สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อรวรรณ พึ่งคำ, อนันต์ บุญปาน, อภิญญา พุกสุขสกุล & ปณิธาน เศรษฐบุตร (2559) การผลิตและทดสอบการยอมรับผลิตภัณฑ์ขนมตาลที่ใช้กล้าเชื้อยีสต์ของผู้บริโภค. สถาบันการจัดการปัญญาภิวัฒน์.

อรุณ ชาญชัยเชาวน์วิวัฒน์ (2558) *ยีสต์และเทคโนโลยีของยีสต์*. ก้าวไทยแอดเวอร์ไทซิ่ง แอนพริ้นติ้ง จำกัด, กรุงเทพฯ.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Enrichment medium

Glucose	20	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Peptone	3	กรัม
Chloramphenicol	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	970	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้ได้ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำออกมาทิ้งไว้ให้เย็น เติมเอทานอล 30 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิประมาณ 4°ซ

2. Yeast extract peptone dextrose agar medium (YPD)

Glucose	10	กรัม
Yeast extract	0.3	กรัม
Bacto-peptone	0.3	กรัม
Agar	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้ได้ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

3. Chloramphenicol solution

ละลาย Chloramphenicol 1 กรัมในเอทานอล 100 มิลลิลิตร

4. Saline solution (0.85% NaCl)

ละลาย NaCl 8.5 กรัมในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

5. 5% Malt extract agar

Malt extract	5	กรัม
Agar	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้ได้ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Stock Carbon solution (10X)

Yeast Nitrogen Base	6.7	กรัม
Carbon compound	5	กรัม

ละลายอาหารแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน

7. Stock Nitogen solution (10X)

Yeast Carbon Base	11.7	กรัม
Ammonium sulfate: $(NH_4)_2SO_4$	0.3	กรัม
Or Potassium nitrate: KNO_3	0.078	กรัม

ละลายอาหารแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.22 ไมครอน เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

8. Fermentation medium (18% glucose)

Glucose	180	กรัม
Yeast extract	4.5	กรัม
Peptone	7.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้ได้ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

9. Yeast Malt Extract Agar (YM)

Glucose	1	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
Yeast extract	0.3	กรัม
Malt extract	0.3	กรัม
Agar	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ให้ได้ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. องค์ประกอบของแหล่งคาร์บอนใน API 32 KIT

N-Acetyl-Glucosamine	D-Melezitose
L-Arabinose	D-Melibiose
D-Cellobiose	Methyl-αD Glucopyranoside
cyclohexamide(Actidizone)	No substrate
Esculin	PalatinosE
Erythritol	potassium Gluconate
D-Galactose	potassium 2 ketoGluconate
Glucosamine	D-Raffinose
D-Glucose	L-Rhamnose
Glycerol	D-Ribose
Inositol	D-Saccharose (sucrose)
Lactic acid	sodium Glucuronate
D-Lactose (bovine origin)	L-Sorbose
levulinic acid (LevulinaTe)	D-Trehalose
D-Maltose	D-Sorbitol
D-Mannitol	D-Xylose

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

11. Basal yeast fermentation

Yeast extract	5.5	กรัม
Peptone	7.5	กรัม
1% Bromothymol blue	10	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

12. Yeast Fermentation Broth

A.	Glucose	6	กรัม
	น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
B			
	Yeast extract	0.45	กรัม
	Peptone	0.75	กรัม
	Bromothymol blue (1.6% (w/v)	1	มิลลิลิตร
	น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

คนสารละลาย A และ B ให้ละลาย นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแยกกันด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ผสมให้เข้ากันในอัตราส่วน 1:1 ในหลอดทดลองที่มีหลอดดักแก๊ส (durham tube) ก่อนนำไปใช้งาน

13. อาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อทดสอบการทำขนมปัง

กากน้ำตาล	16	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.1	กรัม

ผสมกากน้ำตาลและแอมโมเนียมซัลเฟตให้ละลายให้หมด ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เท่ากับ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

14. ส่วนผสมของขนมปัง

แป้งสาลี	75	กรัม
ยีสต์สด	1.9	กรัม
น้ำตาลทราย	3.8	กรัม
เกลือ	1.5	กรัม
น้ำ	51	มิลลิลิตร

15. องค์ประกอบของกากน้ำตาล

ตาราง ภาคผนวก ก 1 องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาล

Inorganic nutrients:	3.00×10^{-1}
Nitrogen (N)	
Phosphorus (P)	1.20×10^{-1}
Potassium (K)	1.27
Magnesium (Mg)	2.30×10^{-1}
Trace elements:	
Calcium (Ca)	0.68
Copper (Cu)	$<3.60\times10^{-4}$
Zinc (Zn)	1.70×10^{-4}
Manganese (Mn)	4.43×10^{-3}
Sugars:	
Sucrose	31.69
Glucose	8.73
Fructose	8.87
Volatile acid:	
Acetic acid	1.00
Non-volatile acid:	
Lactic acid	1.50

*Food research and testing laboratory (FRTL), Faculty of Science, Chulalongkorn University

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1992)

1.1 Alkaline Copper Reagent

$Na_2HPO_4.12H_2O$	71	กรัม
$KNaC_4H_4O_6.5H_2O$ (Rochelle salt)	40	กรัม
1N NaOH	100	มิลลิลิตร
10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $CuSO_4.5H_2O$	80	มิลลิลิตร

(ละลาย 8 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ ในน้ำกลั่น 80 มล.)

Na_2SO_4	180	กรัม

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชาและนำมากรองก่อนใช้งาน)

1.2 Nelson's Reagent

$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$	53.2	กรัม
กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4)conc.	21	มิลลิลิตร
12% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $Na_2HAsO_4.7H_2O$	50	มิลลิลิตร

(ละลาย 6 กรัม $Na_2HAsO_4.7H_2O$ ในน้ำกลั่น 50 มล.)

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรและเก็บในขวดสีชา นำมากรองก่อนการใช้งาน)

วิธีการวิเคราะห์

1. ทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (สาหรับ blank) ใส่ในหลอดทดลองขนาด 16X150 ซม.
2. เติม Alkaline Copper Reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ต้มในน้ำเดือด 15 นาที ทำให้เย็นทันทีโดยการแช่ในน้ำเย็นประมาณ 2-3 นาที
3. เติม Nelson's reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

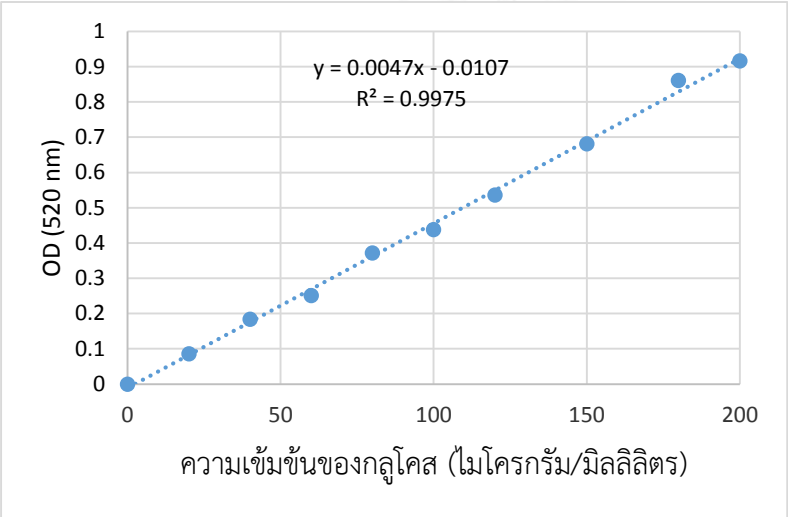
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180 และ 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

รูปที่ 1.3.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสวิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi- Nelson



1.4 การหาปริมาณแอลกอฮอล์ด้วย Ebulliometer (Amerine และ Ough, 1988)

หาจุดเดือดของน้ำโดยเติมน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ลงในส่วนกระเปาะสำหรับใส่น้ำและเติมน้ำเย็นในส่วนของคอนเดนเซอร์ เสียบเทอร์โมมิเตอร์ลงในตำแหน่งของช่องเทอร์โมมิเตอร์ที่กำหนดไว้ แล้วจุดตะเกียงแอลกอฮอล์ อ่านค่าอุณหภูมิจากเทอร์โมมิเตอร์ เมื่อมีค่าคงที่ประมาณ 15-30 วินาที ซึ่งจะบ่งบอกจุดเดือดของน้ำ ตั้งไว้เป็นค่ามาตรฐานบนจานอ่านค่า ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วล้างทำความสะอาดเครื่องมือ ทำการทดลองซ้ำแต่เปลี่ยนจากน้ำกลั่นเป็นตัวอย่างที่ต้องการ อ่านค่าอุณหภูมิเทียบกับค่าบนจานอ่านค่าบันทึกผลการทดลอง

1.5 การเตรียม McFarland Standard

(มาตรฐาน McFarland ใช้เป็นข้อมูลอ้างอิงในการปรับความขุ่นของเชื้อ)

การเตรียมสาร

1. Sulfuric acid (H_2SO_4) 1% (v/v)

เติมน้ำที่ปราศจากไอออน 90 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยการเติมน้ำปราศจากไอออนจนครบ 100 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันเก็บในขวดแก้วไว้ใช้งานได้นาน 1 ปี (อุณหภูมิ 25°ซ)

2. Barium chloride ($BaCl_2$).$2H_2O$ 1.175% (w/v)

ชั่งแบเรียมคลอไรด์ 1.175 กรัม ละลายในน้ำ 50 มิลลิลิตรแล้วเทลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรต่อให้ครบ 100 มิลลิลิตร เก็บในที่ไม่มีแสงไว้ใช้งานได้ 1 ปี

สัดส่วนการผสมสารละลายดังตาราง

สารเคมี	หมายเลข										
	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Barium chloride (มล.)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8	0.9	1.0
Sulfuric acid (มล.)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2	9.1	9.0
ความหนาแน่นของเซลล์โดยประมาณ ($\times 10^8$)/มล.	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24	27	30

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

1.6 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอล

ปิเปตเอทานอล 99% มา 1.28 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 8.72 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ได้สารละลายเอทานอล 100 กรัม/ลิตร) แล้วปิเปตสารละลายดังกล่าวมา 9.00 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ได้สารละลายเอทานอล 90 กรัม/ลิตร) ปิเปตสารตามตาราง ก จะได้สารละลายเอทานอลมาตรฐานในช่วง 10 – 100 กรัม/ลิตร นำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟีตามสภาวะตามตาราง ข และใช้ค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานของเอทานอล

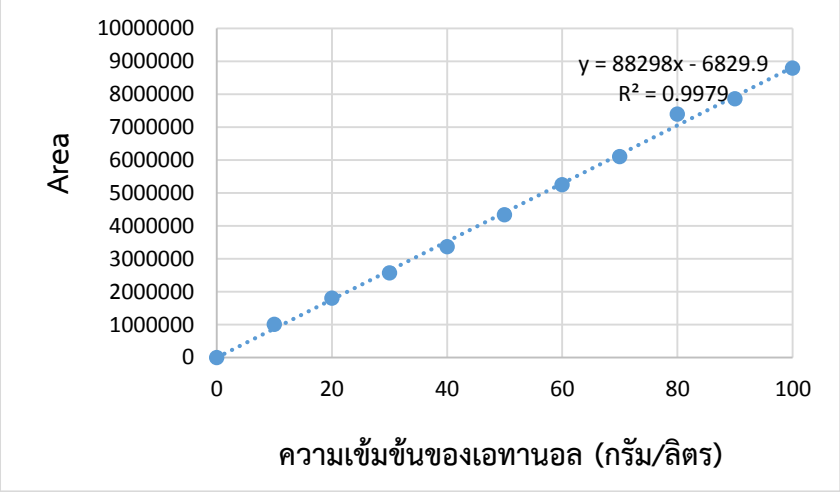
ตาราง ก ปริมาตรของเอทานอลและน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆ สำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร)	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
ปริมาตรเอทานอล (มล.)	5.00	6.67	7.5	8.00	8.33	8.57	8.75	8.89	9.00	1.28
ปริมาตรน้ำกลั่น (มล.)	5.00	3.33	2.5	2.00	1.67	1.43	1.25	1.11	1.00	8.72

ตาราง ข สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี

รุ่นของเครื่อง	7AG บริษัท Shimazu ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องตรวจวัด (detector)	ชนิด FID
คอลัมน์ (column)	ชนิด PQ
อุณหภูมิ (°ซ)	อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด 220°ซ อุณหภูมิหัวฉีด 170°ซ
อัตราของแก๊ส (ml/min)	แก๊สตัวพา (mobile gas): Nitrogen = ml/min
ปริมาณที่ฉีด (volume injection)	1 ไมโครลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1.6.1 กราฟมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณเอทานอล

1.7 วิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมดโดยวิธีไตเตรท (AOAC, 2000)

1. นำตัวอย่างไวน์ 5 มิลลิลิตรใส่ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีน้ำกลั่นต้มสุกอยู่ 50 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยดผสมให้เข้ากัน

2. ไตเตรทด้วย 0.1 M NaOH จนได้ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 8.2 นำมาคำนวณตามสูตร

Tritratable acidity (%) = (ปริมาณ NaOH ที่ใช้ × นอมอลิตี้ของด่าง × 0.75/ ปริมาณตัวอย่างที่ใช้) ×100

* น้ำหนักโมเลกุลของกรดทาร์ทาริกเท่ากับ 75

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค
ผลการทดสอบเพิ่มเติม

ผลการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และการทนต่ออุณหภูมิสูงของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากน้ำตาลมะพร้าว

ตารางภาคผนวก ค 1

Strain	CO_2 production (g/L)	Growth at 37°C	Growth at 40°C
NL001	90.4	+++	-
NL003	40.2	+++	+++
NL009	83.4	+++	-
NL010	83.2	+++	-
NL011	78.4	+++	-
NL014	76.0	-	-
NL015	80.6	+++	-
NL016	77.5	+++	-
NL018	86.8	+++	-
NL019	91.2	+++	-
NL021	81.9	+++	-
NL022	79.2	+++	-
NL024	79.6	+++	-
NL026	73.8	+++	-
NL031	84.6	+++	-
NL032	76.5	-	-
NL033	89.4	+++	-
NL034	81.1	+++	-
NL035	71.4	-	-
NL039	83.4	+++	+++
NL041	88.0	+++	-
NL043	38.7	-	-
NL044	82.0	-	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางภาคผนวก ค 1 (ต่อ)

Strain	CO_2 production (g/L)	Growth at 37°C	Growth at 40°C
NT001	86.4	+++	-
NT002	56.4	+++	+++
NT004	75.2	+++	+++
NT005	81.5	+++	-
NT006	72.7	-	-
NT007	34.2	-	-
NT008	75.2	+++	+++
NT009	83.8	+++	-
NT010	80.9	+++	-
NT011	84.0	+++	-
NT012	82.3	+++	+++
NT014	57.9	-	-
NT015	54.8	-	-
NT016	84.9	+++	-
NT017	92.6	+++	-
NT018	82.3	+++	-
NT019	91.6	+++	-
NT021	82.1	+++	-
NT024	83.8	+++	-
NT025	81.9	+++	-
NT026	57.4	+++	+++
NT027	35.2	-	-
NT028	74.2	+++	+++
NT029	72.3	+++	+++
NC002	81.5	+++	+++
NC003	83.2	+++	-
NC004	81.9	+++	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางภาคผนวก ค 1 (ต่อ)

Strain	CO_2 production (g/L)	Growth at 37°C	Growth at 40°C
NC005	83.2	+++	-
NC006	80.9	+++	+++
NC007	84.6	+++	-
NC008	90.6	+++	-
NC009	81.5	+++	+++
NC010	75.3	+++	-
NC011	51.4	-	-
NC012	77.8	+++	-
NC014	83.6	+++	+++
NC015	83.4	+++	+++
NC016	81.3	+++	-
NC018	80.7	+++	-
NC019	81.5	+++	-
NC020	84.4	+++	-
NC021	83.2	+++	+++
NC022	82.3	+++	-
NC023	83.6	+++	-
NC024	81.1	+++	-
NC025	83.0	+++	-
NC026	82.6	+++	-
NC027	90.0	+++	-
NC029	84.0	+++	-

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิชานันท์ อุดมศักดิ์สกุล เกิดวันที่ 5 มีนาคม พ.ศ. 2520 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยบูรพาในปีการศึกษา 2543 และระดับปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังในปีการศึกษา 2548 ปัจจุบันสอนหนังสืออยู่ที่มหาวิทยาลัยราชภัฏราชนครินทร์ จังหวัดฉะเชิงเทรา ผลงานตีพิมพ์อยู่ระหว่างนำเสนอเพื่อตีพิมพ์ 2 หัวข้อคือ

1. Diversity of Yeasts Isolated from Coconut Inflorescence Sap and the Applications of Saccharomyces cerevisiae strains ลงวารสาร Mycoscience

2.Wine fermenting yeast: Saccharomyces cerevisiae strains isolated from coconut inflorescence sap in Thailand ลงวารสาร Malaysian Journal of Microbiology

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University