ความหลากหลายของยีสต์และการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้โดยใช้ระบบการตรึงเซลล์

นางสาวสินีนาถ กันธิพรรณ์

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
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DIVERSITY OF YEAST AND ETHANOL PRODUCTION BY SELECTED YEAST USING IMMOBILIZATION SYSTEM

Miss Sineenath Kunthiphun

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

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

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ความหลากหลายของยีสต์และการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้โดยใช้ระบบการตรึงเซลล์
โดย	นางสาวสินีนาถ กันธิพรรณ์
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาดุษฎีบัณฑิต

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(รองศาสตราจารย์ ดร. พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา)

....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดิถี สิริศรัทธา)

....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สินีนาถ กันธิพรรณ์ : ความหลากหลายของยีสต์และการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ที่คัดเลือกได้โดยใช้ระบบการตรึงเซลล์ (DIVERSITY OF YEAST AND ETHANOL PRODUCTION BY SELECTED YEAST USING IMMOBILIZATION SYSTEM) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์, 151 หน้า.

ยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อการเจริญคัดแยกจากโรงงานน้ำตาล 5 แห่งที่อุณหภูมิ 30 °ซ รวม 29 ไอโซเลต และ 40 °ซ รวม 99 ไอโซเลต แยกยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญจากป่าพรุหนองจำรุงและจากลำไส้แมลงที่อุณหภูมิ 30 °ซ รวม 205 ไอโซเลต ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้ด้วยลำดับดีเอ็นเอของ LSU rRNA ตำแหน่ง D1/D2 พบว่า ยีสต์ที่แยกได้อยู่ในจีนัส *Saccharomyces*, *Candida*, *Pichia*, *Issactchenkia*, *Blastobotyrys*, *Cyberlindnera*, *Zygoascus*, *Meyerozyma*, *Ogataea*, *Schwanniomyces*, *Schizosaccharomyces*, *Hanseniaspora*, *Galactomyces* และ *Trichosporon* ประกอบด้วยยีสต์ที่ทราบสปีชีส์ 32 สปีชีส์และยีสต์ที่ยังไม่ทราบสปีชีส์ 12 สปีชีส์ จากยีสต์ซึ่งไม่ทราบสปีชีส์ ได้เลือกยีสต์ที่ถูกพบมากที่สุดที่คัดแยกได้จากแมลงกุดจี่ยักษ์มาศึกษาลักษณะสมบัติและได้เสนอตั้งชื่อสปีชีส์ใหม่ว่า *Trichosporon heliocopridis* sp. nov ลักษณะสำคัญที่แตกต่างจากสปีชีส์ใกล้เคียงในจีนัส *Trichosporon* คือไม่มีเอ็นไซม์ยูรีเอส ผลการหมักเอทานอลของยีสต์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อการเจริญที่อุณหภูมิ 30 °ซ พบว่า 7 ไอโซเลต สามารถผลิตเอทานอลสูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ควบคุม *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 (0.47 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ พบว่า 34 ไอโซเลตสามารถผลิตเอทานอลสูงกว่า 0.25 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส โดยไอโซเลต G40-6-2-2 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.42 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส การเพิ่มประสิทธิผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลของ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 พบว่าเซลล์ตรึงแบบเกาะจับกับกากใยหัวมันสำปะหลังผลิตเอทานอลได้สูงกว่าเซลล์อิสระ 10.95% ผลผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงแบบเกาะจับกับกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับการหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนตสูงกว่าของเซลล์ตรึงแบบหุ้มด้วยแคลเซียมอัลจิเนตอย่างเดียวแต่ต่ำกว่าของเซลล์ตรึงแบบเกาะจับกับกากใยหัวมันสำปะหลัง สันนิษฐานว่ากากใยหัวมันสำปะหลังนอกจากช่วยปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดต่างๆในระหว่างการหมัก เซลล์ยีสต์จากการหมักเอทานอลก่อนหน้าที่เกาะอยู่กับกากใยหัวมันสำปะหลังยังให้อะมิโนไนโตรเจนทำให้ยีสต์สามารถทนต่อเอทานอลและผลิตเอทานอลได้มากขึ้น

ภาควิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนิสิต	....
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก	....
ปีการศึกษา	2559	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม	....

5373911423 : MAJOR MICROBIOLOGY
KEYWORDS: BIOETHANOL / IMMOBILIZATION / SACCHAROMYCES CEREVISIAE / YEAST ASSOCIATED WITH INSECT / YEAST FROM SUGAR FACTORY

SINEENATH KUNTHIPHUN: DIVERSITY OF YEAST AND ETHANOL PRODUCTION BY SELECTED YEAST USING IMMOBILIZATION SYSTEM. ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. ANCHARIDA AKARACHARANYA, CO-ADVISOR: PROF. DR. SOMBOON TANASUPAWAT, 151 pp.

Twenty nine isolates and ninety nine isolates of glucose utilizing yeasts were isolated from five sugar factories, at 30 °C and 40 °C. 205 xylose utilizing yeasts were isolated from peat swam forest and from insect guts at 30°C. The 26s rDNA (D1/D2) sequence analysis revealed that the yeasts isolated were likely to be 32 known species and 12 undescribed species of which were belonged to genus *Saccharomyces*, *Candida, Pichia*, *Issactchenkia, Blastobotyrys, Cyberlindnera, Zygoascus, Meyerozyma, Ogataea, Schwanniomyces, Schizosaccharomyces, Hanseniaspora* and *Trichosporon*. Majority of the undescribed species isolated from insect gut was proposed as *Trichosporon heliocopridis* sp. nov. It was differentiated from other *Tricosporon* sp. by negative urease activity. From the 126 glucose utilizing yeasts isolated, there were 7 isolates produced ethanol higher than control; *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 (0.47 g/g) at 30 °C and 34 isolates produced ethanol higher than 0.25 g/g at 40 °C. *Saccharomyces cerevisiae* G40-6-2-2 gave the highest ethanol (0.42 g/g) from glucose at 40 °C. The improvement of molasses based ethanol production using the *S. cerevisiae* G40-6-2-2 by cell immobilization showed that cells adsorbed on waste Cassava tuber fiber (wCTF) produced ethanol (10.95%) higher than free cells. Ethanol production by wCTF adsorbed cells which entrapped in calcium alginate was higher than those by cells entrapped in calcium alginate, but lower than those by cells adsorbed on wCTF. Analysis of wCTF-molasses medium revealed that the wCTF provided amino nitrogen to fermenting yeast indicated that the cells not only protected from environment stresses but also supported aminonitrogen which resulted in an in creasing of ethanol tolerance and ethanol production.

Department:	Microbiology	Student's Signature	....
Field of Study:	Microbiology	Advisor's Signature	....
Academic Year:	2016	Co-Advisor's Signature	....

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ด้วยความกรุณาเป็นอย่างสูงจาก รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย Dr.Masako Takashima และ Dr. Rikiya Endoh อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมจาก Japan Collection of Microorganism, RIKEN ประเทศญี่ปุ่น ท่านได้ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และ กำลังใจ รวมทั้งการแก้ไขปัญหา ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำงานวิจัย ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ ที่นี้

กราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. รุ่งอรุณ วาดีถี สิริศรัทธา คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.วิเชียร กิจปรีชาวนิช กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ภาคจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณาให้คำแนะนำ ตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ โรงงานอ่างเวียน (ราชสีมา) จังหวัดนครราชสีมา สำหรับความอนุเคราะห์กากน้ำตาล และ บริษัท ทรัพย์ทิพย์ จำกัด จังหวัดลพบุรี สำหรับความอนุเคราะห์กากใยหัวมันสำปะหลังสำหรับใช้ในงานวิจัย

ขอบคุณเพื่อนสมาชิกห้องวิจัย 1804/15 เพื่อนนิสิตภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับกำลังใจ ข้อคิดเห็น และ ความช่วยเหลือ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ประจำภาคจุลชีววิทยาสำหรับการอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยนี้

กราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัว สำหรับความเข้าใจชีวิตนิสิตปริญญาเอก สนับสนุน และ เป็นกำลังใจแก่ผู้วิจัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ
กิตติกรรมประกาศ .... ฉ
สารบัญ .... ช
สารบัญตาราง .... ฐ
สารบัญภาพ .... ณ
บทที่ 1. บทนำ 1
1.1. แนวคิด ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน 1
1.2. วัตถุประสงค์ 3
1.3. ขอบเขตของงานวิจัย 3
1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2. ทบทวนวรรณกรรม 4
2.1 สถานการณ์การผลิตเอทานอลในประเทศไทย 4
2.2 การผลิตเอทานอล 5
2.2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล 5
2.2.1.1 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล 5
2.2.1.2 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง 6
2.2.1.3 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส 7
2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล 10
2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในประเทศไทย 11
2.4.1 กากน้ำตาล 11
2.4.2 มันสำปะหลัง (มันเส้น) 13

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

หน้า

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อความเครียดของยีสต์ในการผลิตเอทานอล 14
2.5.1. ความเข้มข้นของน้ำตาล 14
2.5.2 ความเข้มข้นของเอทานอล 16
2.5.3 ภาวะแวดล้อม 16
2.5.3.1 อุณหภูมิ 16
2.5.3.2 ค่าความเป็นกรดด่าง 17
2.5.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ 17
2.5.3.4 ออกซิเจน 18
2.5.4. สารยับยั้งการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล 18
2.6 การผลิตเอทานอลด้วยเซลล์ตรึง 19
2.6.1 การตรึงเซลล์แบบดูดซับ 20
2.6.2 การตรึงเซลล์แบบดักจับ 21
2.7 การระบุเอกลัษณ์ของยีสต์ 22
2.7.1 พิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม 23
2.7.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ตามหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล 23
บทที่ 3. วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง 25
3.1 กากน้ำตาล (molasses) 25
3.2 กากใยหัวมันสำปะหลัง (Cassava tuber fiber) 26
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ 26
3.4 สารเคมี 28
3.5 จุลินทรีย์ 30
3.6 วิธีการ29
3.6.1 การคัดแยกยีสต์ 29

หน้า

3.6.1.1 การคัดแยกยีสต์จากโรงงานผลิตน้ำตาลทราย 29

3.6.1.2 การคัดแยกยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสจากป่าพรุหนองจำรุง 29

3.6.1.3 การคัดแยกยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสจากตัวอย่างแมลง 30

3.6.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์โดยอาศัยหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ 31

3.6.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Endoh et al., 2008) 31

3.6.2.2 การจัดกลุ่มของเชื้อที่แยกได้ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสร้างโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR fingerprinting) (Endoh et al., 2011) 31

3.6.2.3 การหาลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่ง D1/D2 บนยีน large subunit ribosomal RNA (LSU D1/D2) small sub unit ribosomal RNA (SSU) และ internal transcribed spacer (ITS) (Endoh et al., 2008) 32

3.6.2.4 การสร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) 33

3.6.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของยีสต์สปีชีส์ใหม่ (Kurtzman et al., 2011c) 34

3.6.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 34

3.6.3.2 ลักษณะทางสรีรวิทยา 34

3.6.4 การทดสอบการหมักเอทานอลของยีสต์ที่คัดแยกได้ 35

3.6.4.1 การทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่คัดแยกได้ 35

3.6.4.2 การทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์ที่คัดแยกได้ 35

3.6.5 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4 36

3.6.5.1 การสร้างกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต (growth curve) 36

3.6.5.2 การหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล 37

3.6.5.3 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล 37

หน้า

3.6.5.4 การหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล.................. 37

3.6.6 การเปรียบเทียบประสิทธิผลการหมักเอทานอลของเซลล์ตรึง 38

3.6.6.1 การเตรียมกากใยหัวมันสำปะหลังสำหรับตรึงเซลล์....................................... 38

3.6.6.2 การศึกษาลักษณะของกากใยหัวมันสำปะหลัง 38

3.6.6.3 การเตรียมกล้าหัวเชื้อเริ่มต้น (seed culture) สำหรับการหมักเอทานอล 39

3.6.6.4 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างจำนวนเซลล์กับกากใยหัวมัน
สำปะหลังสำหรับการตรึงเซลล์ด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง 39

3.6.6.5 วิธีการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต 39

3.6.6.6 วิธีการตรึงเซลล์ด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต 40

3.6.6.7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยเซลล์ตรึงแบบต่างๆ..... 40

3.6.6.8 การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยเซลล์ตรึงกับกากใยหัวมันสำปะหลัง............ 41

3.6.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ 41

บทที่ 4. ผลการทดลองและการอภิปรายผล 42

4.1 ผลการคัดแยกยีสต์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์โดยหลักอนุกรมวิธานโมเลกุลและการ
วิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ 42

4.1.1 ผลการคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากโรงงานน้ำตาล 42

4.1.2 ผลการคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการ
เจริญจากป่าพรุหนองจำรุง 51

4.1.3 ผลการคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการ
เจริญจากตัวอย่างแมลง 54

4.2 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานและสรีรวิทยาของยีสต์สปีชีส์ใหม่.. 69

4.2.1 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Cylindnera* sp. RW2-7 69

4.2.2 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Cylindnera* sp. RW2-10 70

4.2.3 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Cylindnera* sp. RW3-2 71

หน้า

4.3.4 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Metschnikowia* sp. RW2-21 72

4.3.5 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Metschnikowia* sp. RW2-23 73

4.3.6 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Ogataea* sp. RW4-9 RW4-14 และ RW4-19 74

4.3.7 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Trichosporon* sp. DD1-1 DD2-23 DD4-11 DD5-15 และ DD6-1 75

4.3.8 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Saccharomycetes* sp. DD6-2 85

4.4. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของยีสต์ที่คัดแยกได้ 93

4.4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้ 93

4.4.1.1 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 93

4.4.1.2 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 93

4.4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์ที่แยกได้ 100

4.5 ผลการหาภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสโดย *S.cerevisiae* G40-6-2-2 104

4.5.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นและระยะเวลา (growth curve) 104

4.5.2 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล 104

4.5.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง 105

4.5.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลในน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นสูง 106

4.6 ผลการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการตรึงเซลล์ 106

4.6.1 ลักษณะของกากใยหัวมันสำปะหลัง 106

4.6.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเซลล์กับกากใยหัวมันสำปะหลังสำหรับการตรึงเซลล์ด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง 108

หน้า

4.6.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงบนกากใยหัวมันสำปะหลัง เซลล์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และ เซลล์ตรึงบนกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต 109

4.6.4 ผลการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยเซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง 113

บทที่ 5. สรุปผลการทดลอง 118

รายการอ้างอิง 121

ภาคผนวก 141

ภาคผนวก ก. อาหารเลี้ยงเชื้อ 142

ภาคผนวก ข. การเตรียมสารเคมี 147

ภาคผนวก ค. การวิเคราะห์น้ำตาล 148

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 151

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

ตารางที่ 2–1 องค์ประกอบทางเคมีของหัวมันสำปะหลัง (สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทน, 2556) 13

ตารางที่ 3–1 องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลจากโรงงานอุตสาหกรรมอ่างเวียน (ราชสีมา) 25

ตารางที่ 4–1 ตัวอย่างจากบริษัทไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมและจำนวนยีสต์ที่แยกได้ 43

ตารางที่ 4–2 ตัวอย่างจากบริษัทน้ำตาลครบุรีจำกัดมหาชนและจำนวนยีสต์ที่แยกได้ 44

ตารางที่ 4–3 ตัวอย่างจากโรงงานน้ำตาลราชสีมาและจำนวนยีสต์ที่แยกได้ 45

ตารางที่ 4–4 ตัวอย่างจากบริษัทอุตสาหกรรมน้ำตาลทีเอ็นจำกัดและจำนวนยีสต์ที่แยกได้ 46

ตารางที่ 4–5ตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานน้ำตาลสระบุรีทั้งหมด 22 ตัวอย่างและจำนวนยีสต์ที่แยกได้ 47

ตารางที่ 4–6 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริษัทไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส 48

ตารางที่ 4–7 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริษัทไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส 48

ตารางที่ 4–8 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริษัทน้ำตาลครบุรีจำกัดมหาชนที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส 49

ตารางที่ 4–9ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากโรงงานน้ำตาลราชสีมาที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส 49

ตารางที่ 4–10 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริษัทอุตสาหกรรมน้ำตาลทีเอ็นจำกัดที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส 50

ตารางที่ 4–11 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริษัทน้ำตาลสระบุรีจำกัดที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส 50

ตารางที่ 4–12 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากป่าพรุหนองจำรุง 52

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4–13 การระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากด้วงงวงมะพร้าว (*Rhynchophorus ferrugineus*) 60

ตารางที่ 4–14 การระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากแมลงกุดจี่ยักษ์ (*Heliocopridis bucephalus* Farbricius) 68

ตารางที่ 4–15 ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆของ *Cyberlindnera* sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; Metschnikowia sp.RW2-21, RW2-23 และ Ogataea sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19 77

ตารางที่ 4–16 ความสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆของ *Cyberlindnera* sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; *Metschnikowia* sp.RW2-21, RW2-23 และ *Ogataea* sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19 81

ตารางที่ 4–17 ความสามารถในการเจริญโตที่อุณหภูมิต่างๆของ *Cyberlindnera* sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; *Metschnikowia* sp.RW2-21, RW2-23 และ *Ogataea* sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19 82

ตารางที่ 4–18 ลักษณะสรีระวิทยาอื่นๆ ของ *Cyberlindnera* sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; *Metschnikowia* sp.RW2-21, RW2-23 และ *Ogataea* sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19 83

ตารางที่ 4–19 แสดงลักษณะสรีระวิทยาของ *Trichosporon heliocopridis* DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15 และ DD6-1 ที่แตกต่างจากยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง 84

ตารางที่ 4–20 ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของ *Trichosporon heliocopridis* DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ Saccharomycetes sp. DD6-2 86

ตารางที่ 4–21 ความสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆของ *Trichosporon heliocopridis* DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ *Saccharomycetes* sp. DD6-2 90

ตารางที่ 4–22 ความสามารถในการเจริญโตที่อุณหภูมิต่างๆของ *Trichosporon heliocopridis* DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15,DD6-1 และ Saccharomycetes sp. DD6-2 91

ตารางที่ 4–23 ลักษณะสรีระวิทยาของ *Trichosporon heliocopridis* DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15,DD6-1 และ *Saccharomycetes* sp. DD6-2 92

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 4–24 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว 109

ตารางที่ 4–25 จำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการตรึงเซลล์แบบต่างๆ 112

ตารางที่ 4–26 ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในอาหาร molasses medium ที่เติมและไม่เติมกากใยหัวมันสำปะหลัง (5% น้ำหนัก/ปริมาตร) (ALS Laboratory group (Thailand) CO., LTD.).. 117

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญภาพ

รูปที่ 2–1 การใช้น้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถี Embden–Meyerhof Pathway (EM Pathway)).............. 6

รูปที่ 2–2 การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโดยอะไมเลส โมเลกุลกลูโคส (o) ตำแหน่งปลายสายด้านรีดิวซ์ (Ø) 7

รูปที่ 2–3 โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส 9

รูปที่ 2–4 การหมักไซโลสเป็นเอทานอล 10

รูปที่ 2–5 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลในประเทศไทย.. 12

รูปที่ 2–6 กระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง 15

รูปที่ 2–7 การตรึงเซลล์แต่ละประเภท.. 20

รูปที่ 3–1กากใยหัวมันสำปะหลัง... 26

รูปที่ 4–1แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Wickerhamomyces* sp. N1-7 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง 53

รูปที่ 4–2 รูปแบบ PCR finger print ของยีสต์ที่แยกได้จากด้วงงวงมะพร้าว 54

รูปที่ 4–3 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum parsimony โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Cyberlindnera* sp., RW2-7, RW2-10 และ RW3-2 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง.. 56

รูปที่ 4–4 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Metschnikowia* sp., RW2-21 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง 57

รูปที่ 4–5แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Metschnikowia* sp., RW2-23... 58

รูปที่ 4–6 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Ogataea* sp., RW4-9, RW4-14 และ RW4-19 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง 59

รูปที่ 4–7 รูปแบบ PCR finger print ของยีสต์ที่แยกได้จากแมลงกุดจี่ยักษ์โดยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไมโครแซทเทิลไลท์ไพร์เมอร์จีทีจีไฟฟ์ (microsatellite primer $(GTG)_5$) 62

รูปที่ 4–8 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Tricosporon* sp., DD1-1, DD2-33, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ DD2-28 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง 65

รูปที่ 4–9แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum parsimony โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA และ ITS แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Tricosporon* sp., DD1-1, DD2-33, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ DD2-28 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง 66

รูปที่ 4–10 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ *Saccharomycetes* sp., DD6-2 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง.................................. 67

รูปที่ 4–11ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae (2) ของ *Cylindenera* sp. RW2-7 70

รูปที่ 4–12 ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae (2) ของ *Cylindnera* sp. RW2-10 71

รูปที่ 4–13ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae และ blastoconidia (2) ของ *Cynlindnera* sp. RW3-2.. 72

รูปที่ 4–14ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae และ blastoconidia (2) ของ *Metschnikowia* sp. RW2-21... 73

รูปที่ 4–15ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae (2) ของ *Metschnikowia* sp. RW2-23 74

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รูปที่ 4–16ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae และ blastoconidia (2) ของ *Ogataea* sp. RW4-14 75

รูปที่ 4–17 ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae (2) ของ *Trichosporon* sp. DD1-1 76

รูปที่ 4–18 ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อของไอโซเลต DD6-2 85

รูปที่ 4–19 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 95

รูปที่ 4–20 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากแมลงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 96

รูปที่ 4–21 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 98

รูปที่ 4–22 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลครบุรีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 98

รูปที่ 4–23 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลราชสีมาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 99

รูปที่ 4–24 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลทีเอ็นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 99

รูปที่ 4–25 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลสระบุรีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 100

รูปที่ 4–26 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์ที่แยกได้จากป่าพรุภายใต้ภาวะให้ออกซิเจน (▧) และ ภาวะจำกัดออกซิเจน (■) 101

รูปที่ 4–27 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์ที่แยกได้จากแมลงภายใต้ภาวะให้ออกซิเจน (▧) และ ภาวะจำกัดออกซิเจน (■) 102

รูปที่ 4–28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นและระยะเวลาของ S.cerevesiae G40-6-2-2 104

CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4–29 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อประสิทธิผลการหมักเอทานอลของ S.cerevisiae G40-6-2-2 105

รูปที่ 4–30 ผลการหมักเอทานอลของ S.cerevisiae G40-6-2-2 ที่อุณหภูมิ 40 – 48 องศาเซลเซียส 105

รูปที่ 4–31 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเหลว feremention medium ต่อประสิทธิผลการหมักเอทานอลของ S. cerevisiae G40-6-2-2 106

รูปที่ 4–32 ลักษณะพื้นผิวของกากใยหัวมันสำปะหลังที่กำลังขยาย 500 เท่า (1) กำลังขยาย 1000 เท่า (2) 107

รูปที่ 4–33 ผลการแปรผันปริมาณเซลล์เริ่มต้นและปริมาณกากใยหัวมันสำปะหลังต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ 108

รูปที่ 4–34 ผลการหมักเอทานอลของ S. cerevisiae G40-6-2-2 ที่ถูกตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง กากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต และ แคลเซียมอัลจิเนต 112

รูปที่ 4–35 ลักษณะของกากใยหัวมันสำปะหลังก่อนการตรึงเซลล์ ที่กำลังขยาย 500 เท่า (1) กำลังขยาย 1000 เท่า (2) เซลล์ยีสต์ที่ติดมากับกากใยหัวมันปะหลังที่กำลังขยาย 1000 เท่า (3) และ 10000 เท่า (4) จำนวนเซลล์ยีสต์ดูดซับบนกากใยหัวมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นหลังการหมักเอทานอล 48 ชั่วโมงที่กำลังขยาย 500 เท่า (5) กำลังขยาย 1000 เท่า (6) 115

รูปที่ 4–36 ผลการแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและเวลาในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลโดย S.cerevisiae G40-6-2-2 ที่ถูกตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง (1.2 กรัมน้ำหนักแห้ง) ☐ เซลล์อิสระ และ ■ เซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง 116

บทที่ 1.
บทนำ

1.1. แนวคิด ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน

ปัญหาน้ำมันปิโตรเลียมที่กำลังลดลงและภาวะโลกร้อนซึ่งเกิดจากการสะสมของแก๊สเรือนกระจกในชั้นบรรยากาศทำให้เอทานอลชีวภาพซึ่งเป็นพลังงานหมุนเวียน (renewable energy) ได้รับความสนใจเพิ่มอย่างมาก (Sarkar et al., 2012) วัตถุดิบหลักในการผลิตเอทานอลชีวภาพแบ่งออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่ น้ำตาล แป้ง และ ลิกโนเซลลูโลส แต่แป้งและลิกโนเซลลูโลสจำเป็นต้องผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาล (fermentable sugar) ก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก ดังนั้นจึงให้ทำวัตถุดิบจากน้ำตาลได้รับความนิยมมากกว่า เนื่องจากไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการย่อยก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก (Baeyens et al., 2015; Balat & Balat, 2009) ประเทศไทยเริ่มผลิตเอทานอลชีวภาพเพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือกตั้งแต่ พ.ศ. 2549 มีโรงงานผลิตเอทานอลจำนวน 23 โรงผลิต แบ่งเป็นโรงงานที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบจำนวน 11 โรง โรงงานที่ใช้มันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบเพื่อการผลิต 7 โรง และ โรงงานที่ใช้ทั้งกากน้ำตาลและมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบจำนวน 4 โรง ผลิตเอทานอลได้ 4.97 ล้านลิตรต่อวัน มีการใช้หัวมันสำปะหลัง 5,206 ตันต่อวันเพื่อการผลิตเอทานอล (Sawatdisawanee, 2015) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตเอทานอลจะได้เส้นใยหัวมันสำปะหลัง (cassava tuber fiber) เป็นของทิ้งอุตสาหกรรมเกษตร (agro industrial waste) ซึ่งโรงงานผลิตเอทานอลมักกำจัดโดยการนำไปขายเป็นอาหารสัตว์และฝังกลบ

การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เนื่องจากให้ผลผลิตเอทานอลสูงและทนต่อเอทานอลได้สูงกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่น แต่ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียสจึงทำให้ไม่เหมาะสำหรับการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง ซึ่งการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงมีข้อดีคือสามารถลดอัตราการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการในระบบการหมักได้ ใช้พลังงานสำหรับระบบหล่อเย็นต่ำ และ ลดระยะเวลาในการกลั่นเอทานอล (Hacking et al., 1984) ถึงแม้ว่าในการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสนั้น *S. cerevisiae* สามารถทนต่อตัวยับยั้งที่พบมากในไฮโดรไลเซสของลิกโนเซลลูโลสได้ดี แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีมากเป็นอันดับสองของลิกโนเซลลูโลสไปเป็นเอทานอลได้ ทำให้เหลือเซลลูโลสเป็นจำนวนมากหลังจากการหมักเอทานอลส่งผลให้การผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสโดย *S. cerevisiae* เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพต่ำและไม่คุ้มค่าต่อการผลิต (Edgardo et al., 2008; Hahn-hägerdal et al., 2006) ดังนั้นเพื่อให้ได้ยีสต์ที่มีสมบัติ

เหมาะสมกับความต้องการในการผลิตเอทานอลและให้ผลผลิตเอทานอลสูง จึงทำให้มีความพยายามในการคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากแหล่งต่างๆ เช่น อาหารหมัก (Yuangsaard et al., 2013) ดินจากโรงงานไฟฟ้า (Sree et al., 2000) และ ดินจากโรงกลั่นสุรา(Limtong et al., 2007) เป็นต้น รวมทั้งการคัดแยกยีสต์หมักน้ำตาลไซโลสจากแหล่งต่างๆ เช่น ไม้ผุ (Cadete et al., 2012; Urbina & Blackwell, 2012) แมลงสาบป่า (Urbina et al., 2013) และ ด้วงสองง่าม (Suh et al., 2013) เป็นต้น

การผลิตเอทานอลสามารถใช้เซลล์ยีสต์ในสภาพเซลล์อิสระ (free cell) หรือ เซลล์ตรึงรูป (immobilized cell) (Chandel et al., 2007)การใช้เซลล์ตรึงรูปมีข้อดีกว่าการใช้เซลล์อิสระคือให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่า แยกเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อได้ง่าย และเซลล์สามารถนำกลับมาใช้ได้หลายครั้ง เนื่องจากการตรึงเซลล์ช่วยปกป้องเซลล์จากแรงเฉือน ลดความเครียดสิ่งแวดล้อมต่อเซลล์ในขั้นตอนการหมัก เซลล์ตรึงรูปจึงมีประสิทธิภาพในการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอลสูงกว่าเซลล์อิสระ (Zhu, 2007) (Razmovski และ Vučurović 2011) การใช้เซลล์ตรึงรูปหมักเอทานอลนั้นสามารถใช้ทั้งการหมักแบบกะ (Batch) และการหมักต่อเนื่อง (continuous)(Zhu, 2007) (Rattanapan et al., 2011) วิธีการตรึงเซลล์ที่นิยมใช้ในการผลิตเอทานอลคือ การดักจับ (entrapment) และการดูดซับทางกายภาพ (physical adsorption) การตรึงเซลล์โดยวิธีการดักจับจุลินทรีย์จะถูกดักจับไว้ภายในสารประกอบพอลีเมอร์ได้แก่ อัลจิเนต (alginate) คาราจีแนน (carrageenan) พอลีไวนิลแอลกอฮอล์ (polyvinyl alcohol) และ อะคริลาไมด์ (acrylamide) (Strehaiano et al., 2006)การตรึงเซลล์โดยวิธีนี้มีข้อจำกัดเกี่ยวกับการถ่ายเทสับสเตรต (substrate) และเอทานอลระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อม (Groboillot et al., 1994; Kumakura et al., 1992) ส่วนการดูดซับทางกายภาพเซลล์จะถูกยึดไว้กับวัสดุดูดซับซึ่งเป็น สารอนินทรีย์หรือสารอินทรีย์ด้วยพันธะไอออนหรือพันธะโคเวเลนท์ระหว่างเซลล์กับพื้นผิวของวัสดุดูดซับ การตรึงเซลล์โดยวิธีนี้ไม่สามารถควบคุมให้มีจำนวนเซลล์ที่สูงได้ตลอดไปเพราะเซลล์บางส่วนจะถูกชะออกจากวัสดุดูดซับในขั้นตอนการหมัก (Iqbal & Saeed, 2005; Kolot, 1980) แต่กลับเป็นผลดีทำให้เซลล์ที่เกิดใหม่มีพื้นที่สำหรับยึดเกาะ (Bai et al., 2008) วัสดุดูดซับสำหรับวิธีดูดซับทางกายภาพที่นิยมใช้ได้แก่ แผ่นพลาสติกที่มีรูพรุน แก้วที่มีรูพรุน (Kourkoutas et al., 2004; Zhu, 2007) วัสดุทิ้งทางการเกษตรเช่น ผิวส้ม (Plessas et al., 2007) ใยบวบ(Behera et al., 2011) ชานอ้อย (Singh et al., 2013) ต้นข้าวฟ่างหวาน (Ariyajaroenwong et al., 20015) ต้นข้าวโพด (Razmovski และ Vučurović 2012) และ กากหัวบีท(Vučurović & Razmovski, 2012) เป็นต้น

ในงานวิจัยนี้ผู้จัยทำการคัดแยกและคัดกรองยีสต์หมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสและ/หรือน้ำตาลไซโลส พิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่แยกได้โดยอาศัยหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและสาย

สัมพันธ์ทางวิวัฒนการ รวมทั้งศึกษาประสิทธิผลการใช้เส้นใยหัวมันสำปะหลังเป็นวัสดุตรึงเซลล์เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ที่คัดเลือก เพื่อเป็นการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับกากใยหัวมันสำปะหลัง

1.2. วัตถุประสงค์

1.2.1 คัดแยกและคัดกรองยีสต์หมักเอทานอล

1.2.2 พิสูจน์เอกลัษณ์ของยีสต์ที่แยกได้โดยอาศัยหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนการ

1.2.3 ปรับปรุงการหมักเอทานอลโดยหมักแบบเซลล์ตรึงโดยใช้กากใยหัวมันสำปะหลัง

1.3. ขอบเขตของงานวิจัย

1.3.1 คัดแยกและคัดกรองยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลได้

1.3.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้

1.3.3 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ที่คัดเลือกได้

1.3.4 ศึกษาประสิทธิผลการหมักเอทานอลจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ด้วยการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต อัลจิเนตร่วมกับเส้นใยหัวมันสำปะหลัง และ การตรึงเซลล์แบบดูดซับด้วยเส้นใยหัวมันสำปะหลัง

1.3.5 ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้ในระบบตรึงเซลล์ที่เหมาะสม

1.4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้สายพันธุ์ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอล

1.4.2 ได้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปสำหรับหมักเอทานอลเพื่อเพิ่มประสิทธิผลการหมัก

1.4.3 เพิ่มมูลค่าของกากใยหัวมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการหมักเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2.
ทบทวนวรรณกรรม

2.1 สถานการณ์การผลิตเอทานอลในประเทศไทย

ตั้งแต่ปีพ.ศ. 2557 สถานการณ์ราคาน้ำมันดิบโลกลดลงทำให้ต้นทุนการผลิตน้ำมันเบนซินลดลงจึงทำให้ราคาแก๊สโซฮอล์ซึ่งมีเอทานอลเป็นต้นทุนการผลิตมีราคาสูงกว่าน้ำมันเบนซินโดยเฉพาะอย่างยิ่งแก๊สโซฮอล์ที่มีการเติมเอทานอลในปริมาณสูง (E85) ดังนั้นรัฐบาลจึงเข้ามาแก้ไขสถานการณ์นี้โดยใช้กลไกของโครงสร้างราคาปิโตรเลียมนั่นคือการใช้เงินในกองทุนน้ำมันชดเชยส่วนต่างระหว่างแก๊สโซฮอล์กับน้ำมันเบนซินเพื่อลดราคาแก๊สโซฮอล์ให้ถูกกว่าน้ำมันเบนซิน และ ลดการขายน้ำมันเบนซิน 91 เพื่อกระตุ้นให้เกิดการใช้แก๊สโซฮอล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นเพื่อลดต้นทุนในการผลิตเอทานอลจึงจำเป็นต้องพัฒนาความสามารถในการผลิต บริหารจัดการวัตถุดิบ พัฒนาวัตถุดิบทางเลือกอื่น และพัฒนาเทคโนโลยีการผลิต (กระทรวงพลังงาน, 2558; ธนาคารแห่งประเทศไทย, 2558) รัฐบาลไทยได้ทำการสนับสนุนการสร้างโรงงานผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพครั้งแรกในปี พ.ศ. 2549 โรงงานแรกที่ผลิตเอทานอลในเชิงอุตสาหกรรมคือ บริษัท พรวิไลอินเตอร์เนชั่นแนลกรุ๊ปเทรดดิ้ง จำกัด จากนั้นจึงมีการสร้างโรงงานผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้นจนกระทั่งปี พ.ศ. 2558 ประเทศไทยมีโรงงานผลิตเอทานอลทั้งสิ้น 23 โรง แบ่งเป็นโรงงานผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล 11 โรง โรงงานผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง 7 โรง โรงงานผลิตเอทานอลทั้งจากกากน้ำตาลและหัวมันสำปะหลัง 4 โรง และ โรงงานผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง 1 โรง กำลังการผลิต เอทานอลในประเทศไทยเพิ่มสูงขึ้นจากปี พ.ศ. 2553 – 2558 จาก 1.2 ล้านลิตรต่อวันเป็น 2.8 ล้านลิตรต่อวัน กำลังการบริโภคเพิ่มสูงขึ้นจากปี พ.ศ. 2552 – 2558 จาก 1.25 ล้านลิตรต่อวัน เป็น 3.50 ล้านลิตรต่อวัน (Sawatdisawanee, 2015) โดยในแผนพัฒนาพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือก พ.ศ. 2558 – 2579 ตั้งเป้าหมายในการใช้เอทานอลเท่ากับ 11.30 ล้านลิตรต่อวัน และกำหนดให้มีการใช้พลังงานทดแทน 30% ของเชื้อเพลิงฟอสซิลทั้งหมดที่ใช้ในประเทศ เทียบเท่ากับการลดการใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลได้ราว 39,388 พันตันน้ำมันดิบ (ktoe) ซึ่งประเมินเป็นมูลค่าการลดใช้เชื้อเพลิงฟอสซิลได้ราว 590,820 ล้านบาท (กระทรวงพลังงาน, 2558)

เอทานอลมีคุณสมบัติเป็นสารเคมีที่มีออกซิเจนอยู่ในโครงสร้างสูงเมื่อนำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน ทำให้น้ำมันเบนซินเกิดการออกซิเดชั่นได้ง่ายขึ้นส่งผลให้การเผาไหม้ของน้ำมันเบนซินในเครื่องยนต์เพิ่มสูงขึ้น ลดการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์และสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ที่เกิดจากกระบวนการเผาไหม้ที่ไม่สมบูรณ์ (Sanchez & Cardona, 2008) เอทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ 3 รูปแบบได้แก่ (1) ใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงโดยตรงเพื่อทดแทน

น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล (E100) (2) ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินเรียกว่าแก๊สโซฮอล์ (gasohol) หรือผสมกับน้ำมันดีเซลเรียกว่าดีโซฮอล์ (diesohol) และ (3) ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนของน้ำมัน โดยการเปลี่ยนรูปเอทานอลเป็นสาร Ethyl Tertiary Butyl Ether (ETBE) เพื่อทดแทนสาร Methyl Tertiary Butyl Ether (MTBE) แก๊สโซฮอล์ที่ใช้ในประเทศไทยปัจจุบันสามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่ แก๊สโซฮอล์ E10 เกิดจากการผสมเอทานอล 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) น้ำมันเบนซินออกเทน 95 หรือ น้ำมันเบนซินออกเทน 91 ปริมาณ 90% (ปริมาตร/ปริมาตร) แก๊สโซฮอล์ E20 ประกอบด้วยเอทานอล 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) น้ำมันเบนซินออกเทน 95 ปริมาณ 80% (ปริมาตร/ปริมาตร) แก๊สโซฮอล์ E85 ประกอบด้วยเอทานอล 85% (ปริมาตร/ปริมาตร) น้ำมันเบนซินออกเทน 95 ปริมาณ 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) (Silalertruksa & Gheewala, 2009; กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557)

2.2 การผลิตเอทานอล

2.2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

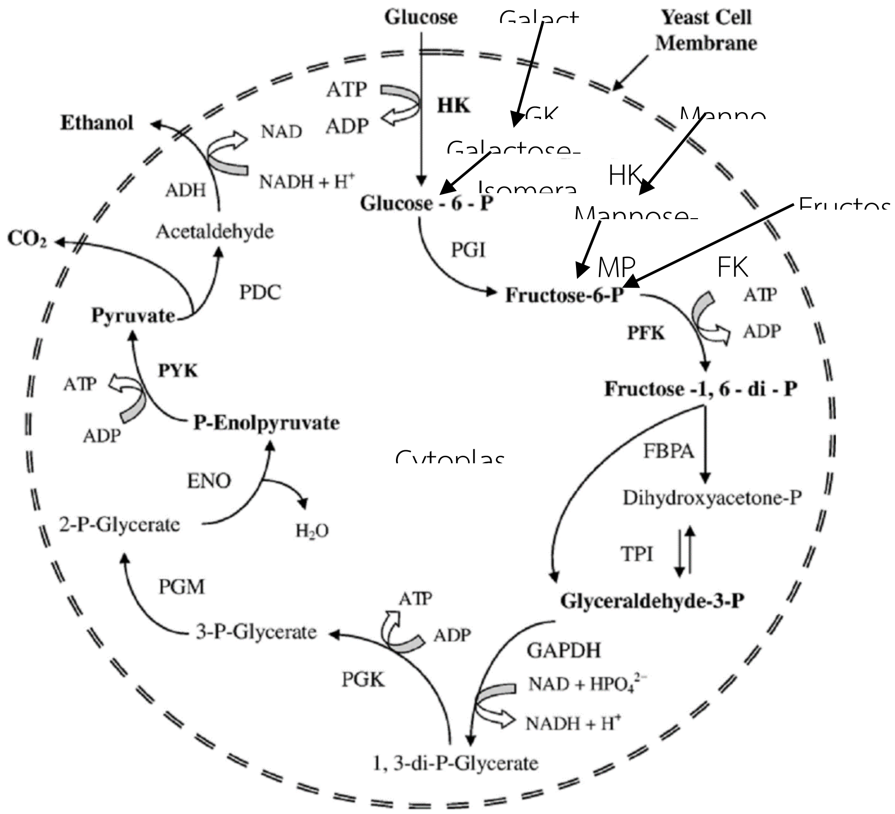
วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลแบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง และ วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) (Vohra et al., 2014)

2.2.1.1 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล

วัตถุดิบประเภทน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตเอทานอลได้แก่ น้ำอ้อย ข้าวฟ่างหวาน หัวบีทหางนม และ กากน้ำตาลเป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบประเภทนี้ไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการเตรียม (pretreatment) และกระบวนการย่อยเพื่อให้ได้น้ำตาล (fermentable sugar) สำหรับผลิตเอทานอลโดยยีสต์ (Cardona & Sanchez, 2007) น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในพืชเหล่านี้อาจเป็นน้ำตาลในรูปโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส และ กาแลคโตส เป็นต้น หรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) ได้แก่ ซูโครส และ แลคโตส เป็นต้น ในกระบวนการหมักเอทานอลจากน้ำตาลเฮกโซสโดยยีสต์ ยีสต์ใช้น้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถี Embden–Meyerhof (EM Pathway) ภายใต้ภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic) ไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีทอลดีไฮด์ (acetaldehyde) และเอทานอลโดยไพรูเวทดีคาร์บอกซีเลส (pyruvate decarboxylate) และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) (รูปที่ 2-1) (Bai et al., 2008; Ishizaki & Hasumi, 2013) การหมักเอทานอลจากน้ำตาลเฮกโซส 1 โมลจะทำให้ได้เอทานอล 2 โมลและคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมล (สมการที่ 2-1)

$$C_6H_{12}O_6 = 2C_2H_5OH + 2CO_2 \text{ (สมการที่ 2-1)}$$

ผลผลิตตามทฤษฎี (Theoritical yield) จากน้ำตาลเฮกโซสเท่ากับ 0.51 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลเฮกโซส (Bai et al., 2008)



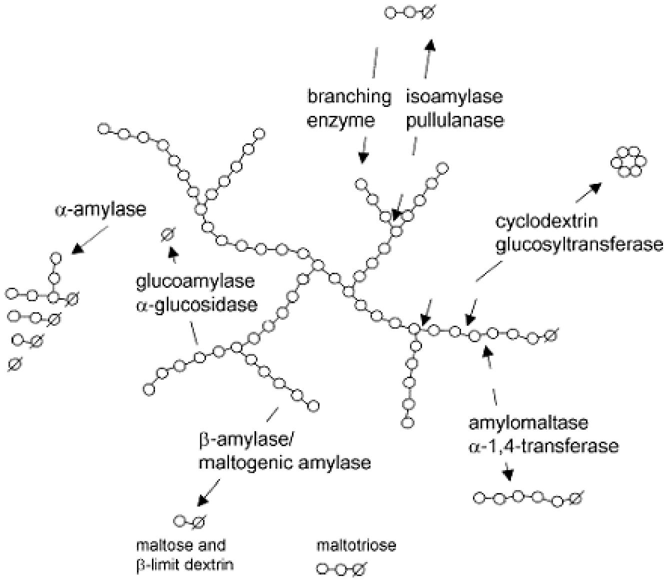
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 2–1 การใช้น้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถี Embden–Meyerhof Pathway (EM Pathway) ดัดแปลงจาก Bai และคณะ ปีค.ศ. 2008 เฮกโซไคเนส (HK) ฟอสโฟกลูโคไอโซเมอร์เรส (PGI) ฟอสโฟฟรุกโตไคเนส (PFK) ฟรุกโตสบิสฟอสเฟตอัลโดเลส (FBPA) ไตรโอสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (TPI) กลีเซอร์รอลดีไฮ-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) ฟอสโฟกลีเซอร์เรทไคเนส (PGK) ฟอสโฟกลีเซอโรมิวเทส (PGM) ไพรูเวทไคเนส (PYK) ไพรูเวทดีคาร์บอกซีเลส (PDC) แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (ADH) ฟรุกโตไคเนส (FK) แมนโนสฟอสเฟตไอโซเมอร์เรส (MPI) กาแลกโตไคเนส (GK)

2.2.1.2 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง

วัตถุดิบประเภทแป้งที่ใช้ในการผลิตเอทานอลมักนิยมใช้พืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบเช่น แป้งมันสำปะหลัง (หัวมันสำปะหลัง) มันฝรั่ง และ ธัญพืช เป็นต้น วันถุดิบเหล่านี้ต้องผ่านกระบวนการย่อยแป้งด้วยอะไมเลสเพื่อให้ได้น้ำตาลก่อนการหมักเป็นเอทานอลโดยยีสต์(Sanchez &

Cardona, 2008) อะไมเลสเป็นกลุ่มของเอนไซม์อัลฟ่าอะไมเลส เอกโซอะไมเลส และ กลูโคอะไมเลส ในการย่อยแป้งอะไมเลสจะสุ่มตัดตรงตำแหน่งพันธะอัลฟ่า-1,4-ไกลโคซิดิกภายในสายอะไมโลส และอะไมโลแพคตินได้เด็กทรินและโอลิโกแซคคาไรด์ เอกโซอะไมเลส ตัดตรงตำแหน่งพันธะอัลฟ่า-1,4-ไกลโคซิดิกที่ปลายสายด้านนอนรีดิวซ์ (nonreducing end) และตัดตรงตำแหน่งพันธะอัลฟ่า-1,6-ไกลโคซิดิกตรงกิ่งของอะไมโลสและอะไมโลเพคตินได้กลูโคส เอนไซม์กลูโคอะไมเลสตัดตรงตำแหน่งพันธะอัลฟ่า-1,4-ไกลโคซิดิกที่ปลายสายด้านรีดิวซ์ (reducing end) ได้กลูโคส มอลโทส และ เด็กซ์ทริน (รูปที่ 2-2) (Polakovic & Bryjak, 2003; Turner et al., 2007) จากนั้นน้ำตาลที่ได้จะถูกเปลี่ยนเป็น เอทานอลโดยกระบวนการเดียวกันกับวัตถุดิบประเภทน้ำตาล



รูปที่ 2–2 การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโดยอะไมเลส โมเลกุลกลูโคส (o) ตำแหน่งปลายสายด้านรีดิวซ์ (Ø) (Turner et al., 2007)

2.2.1.3 การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของพืชมีส่วนประกอบหลักคือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน (รูปที่ 2-3) เซลลูโลสเป็นโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) ของน้ำตาลกลูโคสที่ต่อกันด้วยพันธะอัลฟ่า-1,4-ไกลโคซิดิกแต่ละสายของกลูโคสพอลิเมอร์เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนและด้วยแรงแวนเดอวาลล์ (vander waals) เฮมิเซลลูโลสเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ (heteropolymer) ของน้ำตาลเฮกโซส (กลูโคส กาแลกโตส และ แมนโนส) น้ำตาลเพนโตส (ไซโลส และอะราบิโนส) และ กรดน้ำตาล (กรดกลูคูโรนิกและกรดแอซิติก) ลิกนินเป็นเฮเทอโรพอลิเมอร์ของไฮดรอกซีซินนามิลแอลกอฮอล์ (hydroxycinnamyl alcohol) ประกอบด้วย พาราเคามาริล

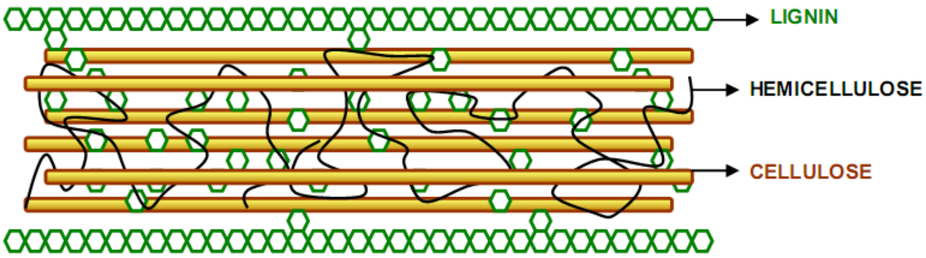
แอลกอฮอล์ (*p*-coumaryl alcohol) โคนิเฟอริลแอลกอฮอล์ (coniferyl alcohol) และ ซินาพิลแอลกอฮอล์ (sinapyl alcohols)(Mussatto & Teixeira 2010) ในโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส ลิกนินมีหน้าที่ให้ความแข็งแรงแก่เซลล์พืชและยังทำหน้าที่เป็นกาวยึดเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเข้าไว้ด้วยกัน (Ishizaki & Hasumi, 2013) วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ได้แก่ ของเหลือทิ้งทางการเกษตร (ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด และ แกลบ เป็นต้น) ของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตกระดาษ (เยื่อกระดาษ) และ ของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมป่าไม้และแปรรูปไม้ (ขี้เลื่อย เศษไม้สน ไม้เนื้ออ่อนและไม้เนื้อแข็งชนิดต่างๆ) (Sanchez & Cardona, 2008)โดยปกติยีสต์ไม่สามารถใช้ลิกโนเซลลูโลสได้โดยตรง ดังนั้นก่อนนำลิกโนเซลลูโลสมาใช้ในการผลิตเอทานอลจึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพด้วยกรดหรือด่างเพื่อกำจัดลิกนินและทำลายพันธะภายในลิกโนเซลลูโลส ทำให้โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสแตกออก ทำให้ง่ายต่อการย่อยสลายด้วยเซลลูเลส ในขั้นตอนการปรับสภาพพบว่าบางส่วนของเฮมิเซลลูโลสจะถูกย่อยออกเป็นน้ำตาลเพนโตสและกลูโคส นอกจากนั้นผลึกของเซลลูโลส (crystalline cellulose) บางส่วนจะถูกเปลี่ยนเป็นเซลลูโลสแบบอสัณฐาน (amorphous cellulose) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่ง่ายต่อการย่อยด้วยเซลลูเลส หลังจากการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์จะได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (Cardona & Sanchez, 2007) ในการเปลี่ยนไซโลสไปเป็นเอทานอลในจุลินทรีย์แบ่งออกเป็น 2 วิถี 1) วิถีออกซิโดรีดักเทส (oxidoreductase pathway) พบในยีสต์และรา ไซโลสจะถูกเปลี่ยนเป็นไซลิทอล (xylitol) ด้วยไซโลสรีดักเทส (xylose reductase) จากนั้นไซลิทอลถูกเปลี่ยนเป็นไซลูโลสโดยไซลิทอลดีไฮโดรจีเนส (xylitol dehydrogenase) และเปลี่ยนเป็นไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (xylulose-5-phosphate) โดยไซลูโลไคเนส (xylulokinase) จากนั้นไซลูโลส-5-ฟอตเฟสจะเข้าสู่ pentose phosphate pathway และ Embden–Meyerhof Pathway แล้วถูกหมักเป็นเอทานอล 2) วิถีไซโลสไอโซเมอร์เรส (xylose isomerase pathway) พบในแบคทีเรียและราที่ไม่ใช้อากาศ (anaerobic fungi) บางชนิด เช่น *Clostridium phytofermentans, Bacteroides stercoris* และ *Piromyces* sp. เป็นต้น ไซโลสไอโซเมอร์เรสจะเปลี่ยนไซโลสเป็นไซลูโลส-5-ฟอตเฟสแล้วจึงถูกหมักเป็นเอทานอล (รูปที่ 2-4) (Brat et al., 2009; Ha et al., 2011; Li et al., 2016; McMillan, 1993) จากการหมักไซโลส 3 โมลจะได้เอทานอล 5 โมล (สมการที่2-1)

$$3C_5H_{10}O_5 + 5ADP + 5P_i = 5C_2H_5OH + 5CO_2 + 5ATP + 5H_2O$$ (สมการที่ 2-1)

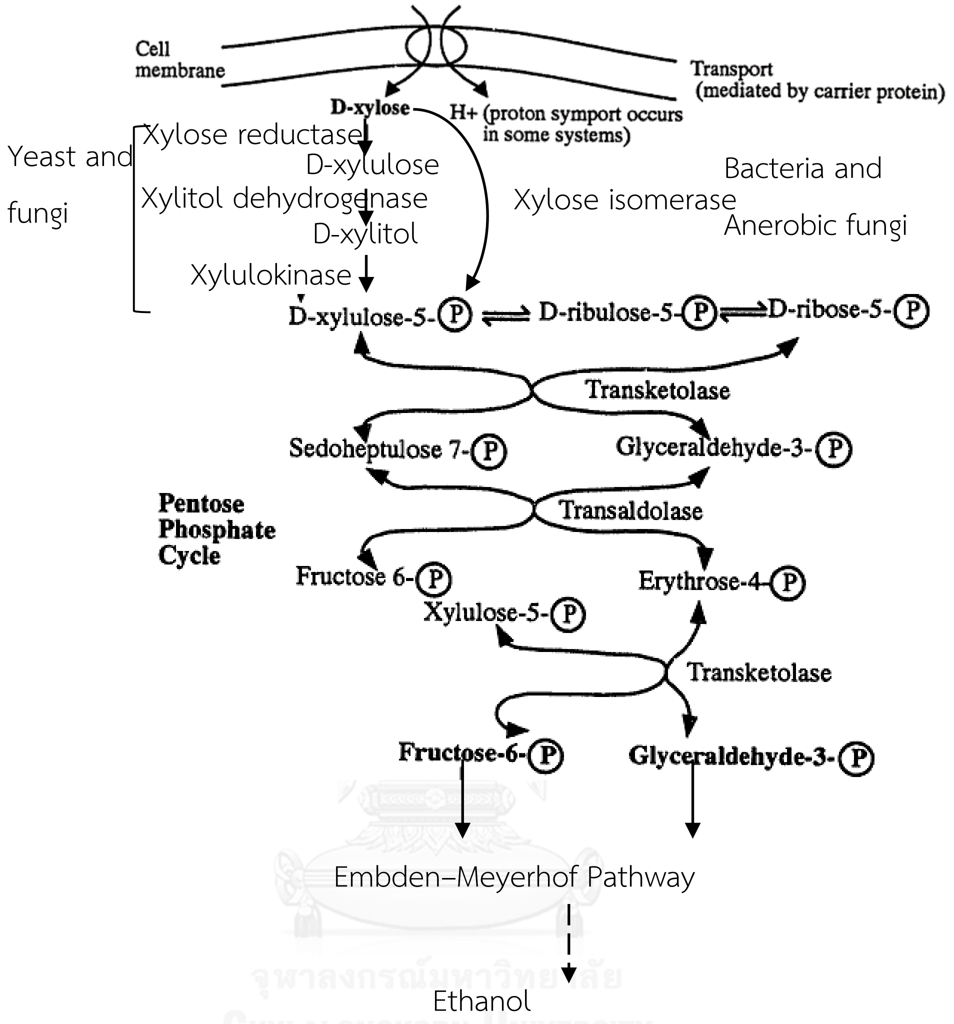
ผลผลิตตามทฤษฎี (Theoritical yield) จากไซโลสเท่ากับ 0.51 กรัมเอทานอล/กรัมไซโลส หรือ 1.67 โมลเอทานอล/โมลไซโลส (McMillan, 1993)

กระบวนการหมักลิกโนเซลลูโลสด้วย *S. cerevisiae* มีข้อจำกัดคือ *S. cerevisiae* ไม่สามารถหมักไซโลสให้เป็นเอทานอลได้ ทำให้หลังจากการผลิตเอทานอลเหลือไซโลสเป็นจำนวนมาก

ดังนั้นเพื่อให้ได้ประสิทธิผลสูงสุดในการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสทั้งกลูโคสและไซโลสจึงควรถูกหมักไปพร้อมกัน ยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลจากไซโลสได้แก่ *Scheffersomyces stipitis*, *Scheffersomyces sheahatea*, *Pachysolen tannophilus* และ *Candida bonidii* เป็นต้น แต่ยีสต์เหล่านี้ไม่สามารถทนเอทานอลที่ความเข้มข้นสูงได้ ผลิตเอทานอลจากกลูโคสต่ำกว่า *S.cerevisiae* และในระหว่างการหมักไซโลสต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการหมัก *(Hahn-hägerdal et al., 2006; Hahn-hägerdal et al., 2007)* การหมักเอทานอลร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* กับยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักไซโลสจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสและทำให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าการหมักด้วยยีสต์เพียงชนิดเดียว (Duarte et al., 2013) และนอกจากนั้นยังมีการสร้างรีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* ที่สามารถหมักทั้งกลูโคสและไซโลสได้ (Liu & Hu, 2010; Matsushika & Sawayama, 2010) หรือการสร้าง รีคอมบิแนนท์ *S. stipitis* และ รีคอมบิแนนท์ *Candida shehatae* ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากกลูโคสและไซโลสเพิ่มสูงขึ้น



รูปที่ 2-3 โครงสร้างของลิกโนเซลลูโลส (Mussatto & Teixeira 2010)



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 2–4 การหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดย ดัดแปลงจาก McMillan ปีค.ศ.1993

2.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ไบโอเอทานอลสามารถผลิตได้โดยอาศัยกระบวนการหมักน้ำตาลของจุลินทรีย์หลายชนิดได้แก่ *Bacillus stearothermophilus*, *Clostridium thermosaccharolyticum, Zymomonas mobilis, Saccharomyces cerevisiae, Kluyveromyces marxianus, Scheffersomyces stipitis* และ *Mucor rouxianus* เป็นต้น (Sarris & Papanikolaou, 2015) จุลินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมคือ ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* เนื่องจากให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นและสามารถทนต่อเอทานอลความเข้มข้นสูงได้ (Ruyters et al., 2015) แต่ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวมีข้อเสีย คือ ไม่สามารถหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง

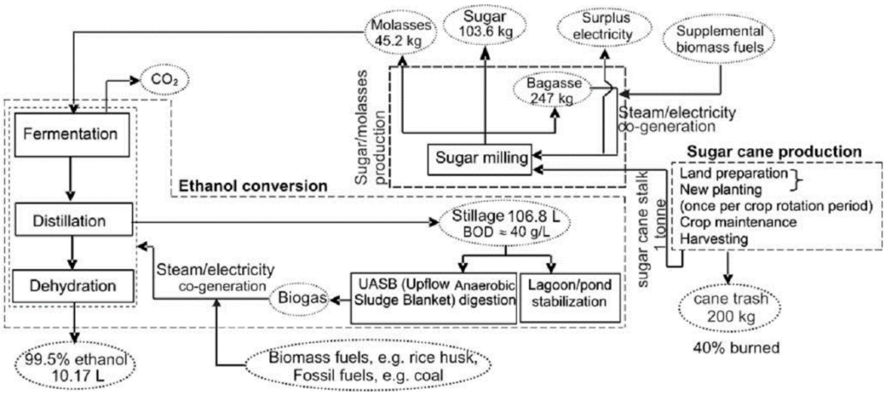
เนื่องจากมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลอยู่ในช่วง 25 – 30 องศาเซลเซียส จึงทำให้ *S. cerevisiae* ไม่เหมาะสมสำหรับการใช้ผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงสามารถช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ไม่พึ่งประสงค์ ลดการใช้พลังงานในระบบหล่อเย็นเพื่อควบคุมอุณหภูมิของถังหมัก และลดระยะเวลาในการกลั่นเอทานอล (Edgardo et al., 2008; Hacking et al., 1984) การใช้ยีสต์ทนร้อนที่สามารถผลิตเอทานอลได้จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นจึงมีรายงานถึงความพยายามในการคัดแยกยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์อื่นๆจากแหล่งต่างๆ เช่น *S. cerevisiae* แยกจากดินของโรงงานไฟฟ้า (Sree et al., 2000) *Pichia kudriavzevii* แยกจากอาหารหมัก (Yuangsaard et al., 2013) K. marxianus แยกจากดินของโรงกลั่นสุรา(Limtong et al., 2007) *Issatchenkia orientalis* แยกจากปุ๋ยหมัก(Kwon et al., 2011) และ นอกจากนี้ในปัจจุบันการผลิตเอทานอลนิยมผลิตจากวัตถุดิบในกลุ่มลิกโนเซลลูโลสเช่น ซังข้าวโพด ฟางข้าว ชานอ้อย และ ขี้เลื่อย เนื่องจากโดยมากเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจึงมีราคาถูก และ ไม่เกิดปัญหาการแย่งชิงวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลและการบริโภคเช่นเดียวกับวัตถุดิบประเภทน้ำตาลและแป้ง หลังจากการปรับสภาพและย่อยลิกโนเซลลูโลสจะได้น้ำตาลกลูโคสมากที่สุดอันดับต่อมาคือน้ำตาลไซโลสซึ่งในการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสที่มีประสิทธิภาพนั้นทั้งน้ำตาลกลูโคสและเซลลูโลสควรถูกหมักไปเป็นเอทานอล ถึงแม้ว่ายีสต์ *S. cerevisiae* นั้นสามารถทนต่อสารยับยั้งที่ปนเปื้อนอยู่ในไฮโดรไลเซสของลิกโนเซลลูโลสได้ดีแต่ *S. cerevisiae* ไม่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสได้จึงทำให้ไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส (Edgardo et al., 2008; Hahn-hägerdal et al., 2006; Hahn-hägerdal et al., 2007) ดังนั้นจึงมีความพยายามในการคัดแยกยีสต์หมักไซโลสจากแหล่งต่างๆ เช่น ไม้ผุ (Cadete et al., 2012; Urbina & Blackwell, 2012) แมลงสาบป่า (Urbina et al., 2013) และ ด้วงสองง่าม (Suh et al., 2013) เป็นต้น

2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในประเทศไทย

2.4.1 กากน้ำตาล

น้ำตาลทรายจัดเป็นหนึ่งในธุรกิจส่งออกหลักของประเทศไทยโดยประเทศไทยมีการส่งออกน้ำตาลทรายเป็นอันดับ 3 ของโลกรองจากสหรัฐอเมริกาและบราซิล และประเทศไทยยังจัดเป็นผู้ส่งออกกากน้ำตาลรายใหญ่ของโลก ในปี พ.ศ. 2558 สามารถผลิตกากน้ำตาลได้ 4.7 ล้านตันต่อปี (Sawatdisawanee, 2015; กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2555) กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายทั้งจากอ้อยและหัวบีท มีลักษณะเป็น

ของเหลวข้นสีน้ำตาลเข้มถึงดำที่ไม่สามารถตกผลึกเป็นน้ำตาลได้อีก องค์ประกอบของกากน้ำตาลจะขึ้นอยู่กับพื้นที่ปลูกอ้อยหรือหัวบีท และ โรงงานผลิตน้ำตาลทราย องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาล คือ น้ำ 17-25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซูโครส 30-40% (น้ำหนัก/ปริมาตร) น้ำตาลกลูโคส 4-9% (น้ำหนัก/ปริมาตร) น้ำตาลฟรุกโทส 5-12% (น้ำหนัก/ปริมาตร) องค์ประกอบอื่นๆได้แก่ แร่ธาตุ เช่น โซเดียม โพแทสเซียม แคลเซียม คลอไรด์ ซัลเฟต ฟอสเฟต แบเรียม ตะกั่ว โบรอน เหล็ก สังกะสี ซิลิกอน ไอโอดีน แมงกานีส และ โมลิบดีนัม เป็นต้น วิตามิน เช่น ไบโอติน วิตามินบี 5 วิตามินบี 1 วิตามินบี 6 วิตามินบี 2 กรดนิโคตินิก และ กรดโฟลิก เป็นต้น นอกจากนี้ยังประกอบด้วย โปรตีน และ กรดอะมิโน จากองค์ประกอบที่กล่าวมาจึงทำให้กากน้ำตาลเป็นสารอาหารที่เหมาะแก่การเจริญเติบโตของยีสต์ (Olbrich, 1963; Paturau, 1982) กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลประกอบด้วย การเตรียมกากน้ำตาลโดยเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการหมักของยีสต์ เติมสารอาหารและปรับ pH ด้วยกรดซัลฟูริก (H2SO4) จากนั้นจึงนำไปหมักด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* หลักจากการหมักน้ำหมักที่มีเอทานอลประมาณ 8% (ปริมาตร/ปริมาตร) จะถูกส่งไปยังหอกลั่นเพื่อแยกน้ำออกจากเอทานอล จากกระบวนการนี้ทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 95% (ปริมาตร/ปริมาตร) และผลพลอยได้คือฟูเซลออยล์ (fusel oil) และน้ำส่าประมาณ 25 ลบ.ม./ชม. เอทานอลเข้มข้น 95% (ปริมาตร/ปริมาตร) จะถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นโดยกระบวนการกลั่นแยกน้ำ (dehydration) ด้วยโมเลกุลาร์ซีฟ (molecular sieve) ที่ภายในประกอบด้วย zeolithes และมีภาวะเป็นสุญญากาศ (กรมพัฒนาพลังงานทดทแนและอนุรักษ์พลังงาน 2555) (รูปที่ 2–5) จากกากน้ำตาล 2.9 ล้านตันสามารถผลิตเอทานอลได้ทั้งหมด 1,059 ล้านลิตร(Sawatdisawanee, 2015)



รูปที่ 2–5 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลในประเทศไทย (Nguyen & Gheewala, 2008)

2.4.2 มันสำปะหลัง (มันเส้น)

ประเทศไทยสามารถผลิตมันสำปะหลังได้ปีละ 31 ล้านตัน ประมาณร้อยละ 6 ของมันสำปะหลังที่ผลิตได้ต่อปีจะถูกนำไปผลิตเป็นเอทานอลเชื้อเพลิง (Sawatdisawanee, 2015) มันสำปะหลังประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 70.63% น้ำหนักแห้ง โปรตีน 2.63% น้ำหนักแห้ง ไขมัน 0.51% น้ำหนักแห้ง และ กากใย 1.73% น้ำหนักแห้ง (ตารางที่ 2-1) (สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทน, 2556)

ตารางที่ 2–1 องค์ประกอบทางเคมีของหัวมันสำปะหลัง (สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทน, 2556)

ส่วนประกอบ	หัวมันสด	หัวมันแห้ง
ความชื้น (%)	63.25	10.63
คาร์โบไฮเดรต (%)	29.73	70.63
โปรตีน (%)	1.18	3.63
ไขมัน (%)	0.08	0.51
เถ้า (%)	0.85	2.20
กากใย (%)	0.99	1.73
โปตัสเซียม (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	0.26	0.43
ฟอสฟอรัส (มิลลิกรัม/กิโลกรัม)	0.04	0.08
กรดไฮโดรไซยานิก (ส่วนในล้านส่วน)	173	100

เนื่องจากองค์ประกอบหลักของมันสำปะหลังคือแป้งซึ่ง *S. cerevisiae* ไม่สามารถใช้ได้โดยตรงจึงทำให้กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังจำเป็นต้องย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อนนำไปผลิตเอทานอล จึงเป็นข้อเสียเปรียบของการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังประกอบด้วย (1) การเตรียมหัวมันสำปะหลังโดยการแยกสิ่งเจือปนต่างๆได้แก่หิน ทราย และโลหะ (2) บดละเอียดจนได้แป้ง (3) การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ 2 ชนิดคืออัลฟ่าอะไมเลส (α-amylase) เรียกขั้นตอนนี้ว่า liquefaction และกลูโคอะไมเลสหรือเบต้ากลูโคซิเดส (glucoamylase หรือ β-glucosidase) เรียกขั้นตอนนี้ว่า saccharification หลังจากกระบวนการนี้จะได้น้ำตาลกลูโคสและมี

การเติมสารอาหารและปรับค่าความเป็นกรดด่างเพื่อให้พร้อมเข้าสู่ (3) กระบวนการหมักโดย *S. cerevisiae* จากนั้นน้ำหมักที่มีความเข้มข้นของเอทานอลประมาณ 5-15% (ปริมาตร/ปริมาตร) จะถูกส่งต่อไปยัง (4) หอกลั่น จากกระบวนการกลั่น เอทานอลที่ผลิตได้จะมีความเข้มข้นเพิ่มเป็น 95% (ปริมาตร/ปริมาตร) และได้ผลพลอยได้ที่เรียกว่าฟูเซลออยล์ หลังจากกระบวนการกลั่นเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังจะมีผลพลอยได้อื่นๆเกิดขึ้นได้แก่ น้ำส่ากาก ยีสต์ และกากใยหัวมันสำปะหลัง (waste Cassva tuber fiber) เอทานอลเข้มข้น 95% โดยปริมาตรจากกระบวนการกลั่นจะถูกส่งไปยัง (5) กระบวนการแยกน้ำด้วยโมเลกุลาร์ซีฟ สุดท้ายจะได้เอทานอลเข้มข้น 99.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เหมาะต่อการไปผสมน้ำมันเบนซินเพื่อผลิตเป็นแก๊สโซฮอล์ต่อไป (รูปที่ 2-6) จากหัวมันสำปะหลัง 1.9 ล้านตันสามารถผลิตเอทานอลได้ 298 ล้านลิตรต่อปี หากเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังและกากน้ำตาล พบว่าการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังต้องการกระบวนการเตรียมหัวมันสำปะหลังก่อนนำไปหมัก ได้แก่ การแยกสิ่งเจือปน การบดละเอียด และกระบวนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อนการหมักด้วยยีสต์ แต่การหมักด้วยกากน้ำตาลไม่จำเป็นต้องใช้กระบวนการเหล่านี้ นอกจากนั้นการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังยังก่อให้เกิดผลพลอยได้ที่แตกต่างจากการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลคือกากใยหัวมันสำปะหลัง จากกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังทุกๆ 150,000 ลิตร จะได้กากใยหัวมันสำปะหลังที่เป็นผลพลอยได้ระมาณ 30-40 ตัน หรือ คิดเป็น 59,600 – 79,466 ตันต่อปี (Sorapipatana & Yoosin, 2011; กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2557; กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2555; กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2552)

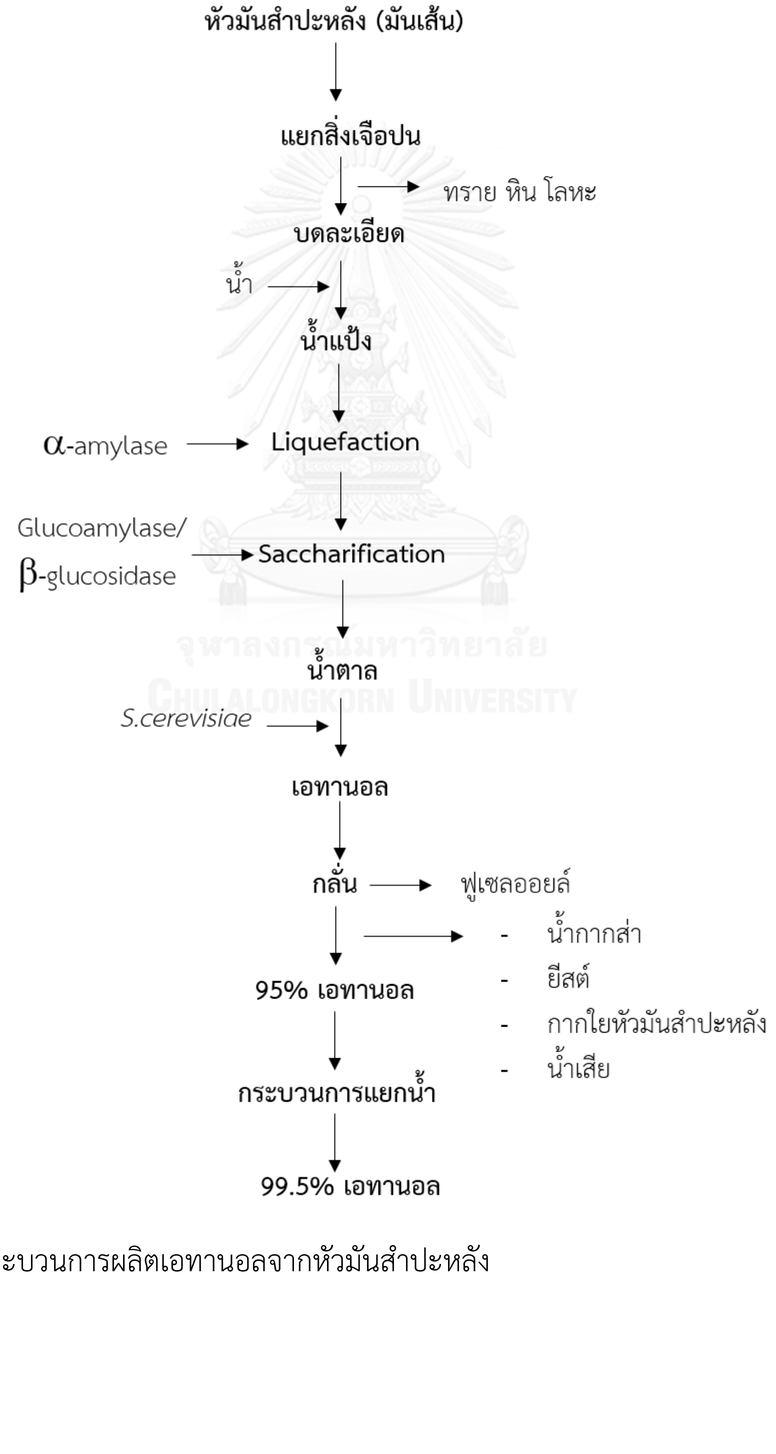
Chulalongkorn University

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อความเครียดของยีสต์ในการผลิตเอทานอล

2.5.1. ความเข้มข้นของน้ำตาล

จุลินทรีย์แต่ละชนิดสามารถเจริญได้ภายใต้ค่าความชื้นที่มีผลต่อการเจริญ (water activity, a_w) ที่จำกัดและมีค่าความชื้นที่มีผลต่อการเจริญต่ำสุดแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปยีสต์มีค่าความชื้นที่มีผลต่อการเจริญต่ำสุดประมาณ 0.91 แต่สำหรับยีสต์ที่ทนแรงดันออสโมติกได้ (osmotolorant yeast) มีค่าความชื้นที่มีผลต่อการเจริญต่ำสุดประมาณ 0.62 ปริมาณน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นทำให้ค่าความชื้นที่มีผลต่อการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของยีสต์ (Dale et al., 1994) ในอาหารที่มีน้ำตาลสูงนอกจากส่งผลให้ค่าความชื้นที่มีผลต่อการเจริญลดลง ยังทำให้เกิดความเครียดออสโมติก (osmotic stress) ต่อเซลล์ เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ความเข้มของน้ำตาลสูงทำให้เกิดแรงดันออสโมติกภายในเซลล์ส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์ไหลออก

นอกเซลล์จนกระทั่งเซลล์ขาดสมดุลของของเหลวภายในเซลล์ ทำให้การทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ลดลง เซลล์อยู่ในระยะ lag phase ยาวนานขึ้นและส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลง (Bajaj et al., 2003; Fadel et al., 2013) โดยทั่วไปแล้วยีสต์จะเริ่มถูกยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอลตั้งแต่ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 150 กรัม/ลิตร (Taherzadeh & Karimi, 2011) แต่ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถทนต่อความเข้มข้นน้ำตาลได้สูงถึง 300 กรัม/ลิตร (Sree et al., 2000) และ 500 กรัม/ลิตร (Ok & Hashinaga, 1997)



รูปที่ 2–6 กระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง

2.5.2 ความเข้มข้นของเอทานอล

เอทานอลสามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์ของยีสต์และไปจับกับส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interior) ของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ขาดความยืดหยุ่น ทำลายคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์และ transport system ในเยื่อหุ้มเซลล์โดยเฉพาะ proton motive pump (Beacven et al., 1982; Oliva-Neto et al., 2013) ยับยั้งการทำงานของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส เฮกโซไคเนส และ อินเวอร์เทส (Casey & Ingledew, 1976; Jones et al., 1981) โดยทั่วไปการเจริญเติบโตของยีสต์จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) อินเวอร์เทสใน *S. cervisiae* ถูกยับยั้งการทำงานแบบสมบูรณ์เมื่อความเข้มของเอทานอลสูงกว่า 8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (Zech & Gorisch 1995)ในกรณีหมักเอทานอลในอาหารที่มีน้ำตาลสูง ความเครียดจากแรงดันออสโมติกจะช่วยส่งเสริมความรุนแรงของเอทานอลในการยับยั้งการเจริญและการหมักของยีสต์ ทำให้ยีสต์ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลลดลงและความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลให้ค่าความชื้นที่มีผลต่อการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงด้วย (John, 1998; Jones & Greenfield, 1986) ยีสต์ที่สามารถทนต่อเอทานอลที่ความเข้มสูงจะมีการปรับตัวโดยเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีอัตราส่วนของกรดไขมันอิ่มตัว palmitic (C16:0) และ steric acid (C18:1) มากกว่ากรดไขมันไม่อิ่มตัว palmitoleic (C16:1) และ steric acid (C18:1) (Nguyen et al., 2015)

2.5.3 ภาวะแวดล้อม

ภาวะแวดล้อมในการหมักที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* ได้แก่ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และ ก๊าซออกซิเจน

2.5.3.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* เท่ากับ 25 – 30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลอย่างรุนแรงต่อการเจริญและประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* (Hacking et al., 1984) เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพขาดคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านและขนส่งสาร ทำให้โปรตีนและเอมไซม์เสียสภาพส่งผลให้อวัยวะภายในเซลล์ทำงานผิดปกติ และ รบกวนกระบวนการสังเคราะห์ ATP (Richter et al., 2010; Rowley et al., 1993) อุณหภูมิที่สูงขึ้นยังส่งผลให้เกิด oxidative stress ภายในเซลล์ของ *S. cerevisiae* เนื่องจากกระบวนขนส่งอิเล็กตรอนภายในไมโทคอนเดรียถูกทำลาย (Morano et al.,

2012) แต่การที่ยีสต์บางชนิดสามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงมีข้อดีหลายประการได้แก่ ช่วยลดต้นทุนในการรักษาอุณหภูมิของถังหมัก ลดอัตราเสี่ยงในการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นในระบบการหมักเอทานอล และ ทำให้การระเหยเอทานอลระหว่างกระบวนการหมักทำได้ง่ายซึ่งช่วยลดความเครียดจากความเข้มข้นของเอทานอลแก่ยีสต์(Babike et al., 2010)

2.5.3.2 ค่าความเป็นกรดด่าง

S. cerevisiae สามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรดด่างที่กว้างและสามารถเจริญได้ในภาวะที่เป็นกรดทำให้ลดปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรียไม่พึงประสงค์ในระบบการหมักได้ ถึงแม้ว่า *S. cerevisiae* สามารถทนภาวะที่เป็นกรดได้ดี แต่ค่าความเป็นกรดด่างในอาหารที่ต่ำกว่า 3.5 มีผลต่อ proton pump ในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้การขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์ลดลง ค่าความเป็นกรดต่างภายในเซลล์ที่ลดต่ำลงจะไปรบกวนการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส ทำให้ให้ยีสต์ใช้น้ำตาลได้ลดลงส่งผลให้การเจริญถูกยับยั้งและประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลลดลง (Bai et al., 2008; Oliva-Neto et al., 2013; Zhang et al., 2011) จากการศึกษาของ Graves และคณะ (2000) พบว่าการรักษาค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 – 5.5 ตลอดระยะเวลาของการหมักเอทานอลจะช่วยลดความเป็นพิษของกรดแอซิติกในอาหารเลี้ยงเชื้อได้

2.5.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์

ในกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ กลูโคส 1 โมเลกุลจะได้คาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล (Bai et al., 2008) คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นบางส่วนจะละลายอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อและพบอยู่ในรูปของ CO_2, H_2CO_3 และ HCO_3^- (Jones & Greenfield, 1982) ซึ่งสามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยกระบวนการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Simon & Gutknecht, 1980) คาร์บอนไดออกไซด์ที่เพิ่มขึ้นในกระบวนการหมักประมาณ 0.05 atm ทำให้อัตราการเจริญและอัตราแมตาบอลิซึ่มของยีสต์ลดต่ำลง ยับยั้งกระบวนการแบ่งเซลล์ และ ส่งผลให้อัตราการหมักเอทานอลลดลง นอกจากนั้นคาร์บอนไดออกไซด์ยังมีผลทำให้ปริมาณฟูเซลล์ออยล์ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการผลิตเอทานอลลดต่ำลงด้วย (Arcay-Ledezma & Slaughter, 1984; Jones & Greenfield, 1982; Norton & Krauss, 1971)

2.5.3.4 ออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์เนื่องจากออกซิเจนจำเป็นต่อกระบวนการสังเคราะห์สเตอรอลและกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ (Hammond, 2000) ในกระบวนการเจริญเติบโตแบบใช้อากาศ (aerobic growth) ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายสำหรับการสร้าง ATP (Verduyn et al., 1984) การให้ออกซิเจนแก่เซลล์ก่อนเริ่มกระบวนการหมักมีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของยีสต์ (Boulton, 2000; Depraetere et al., 2003) แต่ออกซิเจนที่มากเกินไปในกระบวนการหมักเอทานอลกลับส่งผลให้ยีสต์เจริญเติบโตแบบใช้อากาศแทนการหมักทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลง(Dasgupta et al., 2014)

2.5.4. สารยับยั้งการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล

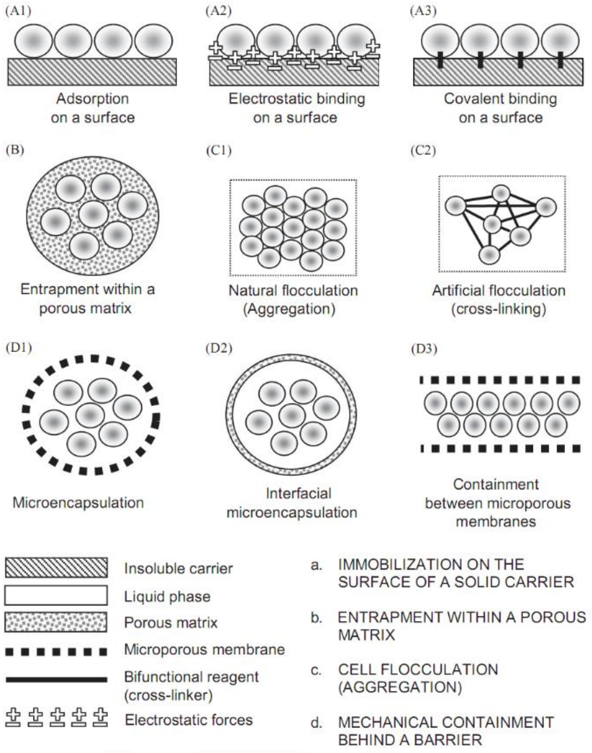
ถึงแม้กากน้ำตาลจะประกอบด้วยน้ำตาลและสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* แต่ในกากน้ำตาลยังประกอบด้วยสารยับยั้งการเจริญของยีสต์หลายชนิด ปริมาณของสารยับยั้งที่พบในกากน้ำตาลจะขึ้นอยู่กับโรงงานน้ำตาลที่ผลิตกากน้ำตาลนั้น สารยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ที่พบในกากน้ำตาลได้แก่ (1) ซัลไฟต์ (sulfite) ในกากน้ำตาลพบอยู่ในรูปของซัลเฟอร์ไดออกไซด์และไบซัลไฟต์ที่เติมเข้าไปในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาลเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าในกากน้ำตาลมีความเข้มข้นของซัลไฟต์ประมาณ 200-700 มิลลิกรัม/ลิตร (Oliva-Neto et al., 2013) Ingledew (1990) รายงานความเข้มข้นเริ่มต้นของซัลไฟต์เท่ากับ 100 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลยับยั้งกระบวนแมทาบอลิซึมของน้ำตาลในยีสต์ (2) กรดที่ระเหยง่าย (volatile acid) ได้แก่กรดแอซิติกและกรดแลคติก กรดเหล่านี้เมื่อผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่เซลล์จะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ลดลงส่งผลให้ของเหลวภายในไซโตพลาสซอล (cytosol) เกิดการแยกตัวออก รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิสและเอ็นไซม์ NADH dehydrogenase (Zhang et al., 2011; Zhao et al., 2008) ทำให้การเจริญของยีสต์หยุดชะงักส่งผลให้การผลิตเอทานอลลดต่ำลง ความเข้มข้นต่ำสุดของกรดแอซิติกและกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S.cerevisiae* เท่ากับ 6 กรัม/ลิตร และ 25 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (Narendranath et al., 2001) (3) สารที่ทำให้เกิดสีในกากน้ำตาลได้แก่เฟอร์ฟิวรอล (furfural) ไฮดรอกซีเมททิลเฟอร์ฟิวรอล (Hydroxymethyl furfuralm HMF) melanoidines สารประกอบ iron-phenol และ caramel (Olbrich, 1963) เนื่องจากผนังเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยโพลีแซ็กคาไรด์ซึ่งมีสมบัติเป็น ion exchange จึงทำให้ผนังเซลล์ของยีสต์สามารถดูดซับและจับกับโมเลกุลสีในกากน้ำตาลได้ สารเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น humin like substance การสะสมสารเหล่านี้ที่ผนังเซลล์

ยีสต์ส่งผลให้การเจริญลดลงและยับยั้งการหมักเอทานอล (Aksu & Dönmez, 2003; Nikolića et al., 2009; Olbrich, 1963) เฟอร์ฟูรอลและไฮดรอกซีเมททิลเฟอร์ฟิวรอลหากสะสมภายในเซลล์จะยับยั้งกระบวนการไกลโคไลซิสโดยรบกวนการทำงานของเอนไซม์dehydrogenase ทำให้การเจริญของยีสต์ลดลง (Banerjee et al., 1981) (4) แร่ธาตุในกากน้ำตาล ถึงแม้แร่ธาตุหลายชนิดจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์และยีสต์สามารถทนต่อความเป็นพิษของแร่ธาตุได้ แต่ความเข้มข้นของ ทองแดง สังกะสี และแมงกานีสที่มากเกินไปกลับส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของยีสต์ (Pandey & Agarwal, 1993) ความเข้มข้นของแคลเซียมในกากน้ำตาลเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญที่ส่งผลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์เนื่องจากที่ความเข้มข้นของแคลเซียมเท่ากับ 2.16% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สามารถยับยั้งการทำงานของอินเวอร์เทสที่เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญต่อการหมักกากน้ำตาลของยีสต์ได้ (Arshad et al., 2014; Chotineeranat et al., 2010; Takeshige & Ouchi, 1995)

2.6 การผลิตเอทานอลด้วยเซลล์ตรึง

การตรึงเซลล์เป็นวิธีการหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับว่ามีประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตเอทานอล เนื่องจากเซลล์ที่ถูกตรึงจะถูกป้องกันจากความเครียดที่มีผลต่อการหมักเอทานอลของเซลล์ ได้แก่ อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเอทานอล ความเข้มข้นของอาหาร และ สารยับยั้งการเจริญของเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถทนต่อความเครียดได้ดีขึ้นและทำให้การผลิตเอทานอลมีประสิทธิภาพสูงขึ้น ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ รักษาการทำงานของเซลล์ให้คงที่ตลอดการหมัก และช่วยป้องกันเซลล์จากแรงเฉือนที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก(Ariyajaroenwong et al., 20015; Kourkoutas et al., 2004; Nguyen et al., 2015; Singh et al., 2013; Zheng et al., 2012; Zhu, 2007) การตรึงเซลล์สามารถแบ่งได้ 4 ประเภทคือ การตรึงเซลล์แบบดูดซับ การตรึงเซลล์แบบดักจับ การตรึงเซลล์แบบ self-flocculation และ การตรึงเซลล์แบบห่อหุ้มในแคปซูล (encapsulation) (รูปที่ 2-7) (Kourkoutas et al., 2004; Strehaiano et al., 2006) ในการผลิตเอทานอลวิธีการตรึงเซลล์ที่นิยมใช้คือการดูดซับและการดักจับ เนื่องจากกระบวนการที่ใช้ในการตรึงเซลล์ไม่ยุ่งยากซับซ้อน วิธีการเตรียมเซลล์ตรึงทำได้ในภาวะที่ไม่รุนแรง ใช้เวลาน้อยในการเตรียมเซลล์ตรึง และ วัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์มีราคาถูก (Genisheva et al., 2014; Razmovski & Vučurović, 2012; Strehaiano et al., 2006) วัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ชนิดได้แก่ (1) วัสดุตรึงเซลล์จากธรรมชาติ ตัวอย่างเช่น ชานอ้อย ซังข้าวโพด ต้นข้าวโพด เซรามิก อัลจิเนต วุ้น ไคโตซาน และ คาราจีแนน เป็นต้น (2) วัสดุตรึงเซลล์สังเคราะห์ได้แก่ พอซีเลน (porcelain) โพลีอะคริลาไมด์ แผ่นโพลีเอทิลีน แผ่นโพลียูรีเทน และ โพลีไวนิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น คุณสมบัติของวัสดุตรึงเซลล์ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ ราคาไม่แพง มีความคงทน สามารถนำมาใช้ซ้ำได้

ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ สามารถรักษาปริมาณของเซลล์ให้คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก และ การถ่ายเทสับสเตรตและเอทานอลระหว่างเซลล์ไม่ถูกจำกัด (Ariyajaroenwong et al., 20015; Kourkoutas et al., 2004; Willaert, 2011; Zhu, 2007)



รูปที่ 2–7 การตรึงเซลล์แต่ละประเภท (Kourkoutas et al., 2004)

CHULALONGKORN UNIVERSITY

2.6.1 การตรึงเซลล์แบบดูดซับ

การตรึงเซลล์แบบดูดซับเกิดจากการดูดซับทั้งทางกายภาพและทางเคมีโดยแรงแวนเดอวาลล์ พันธะไอออนิก พันธะไฮโดรเจน พันธะโคเวเลนต์ทั้งที่เกิดโดยธรรมชาติหรือเกิดจากการเติมสาร cross linking agent หรือแรงดึงดูดไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างประจุลบบนผนังเซลล์ของยีสต์กับประจุบวกบนตัวดูดซับ แรงเหล่านี้ต่างก็เป็นแรงอย่างอ่อนเมื่อเซลล์เกิดการแบ่งเซลล์ใหม่หรือแก่ตัวลงจึงทำให้เซลล์ที่ถูกดูดซับสามารถหลุดออกจากตัวดูดซับได้ง่าย รวมทั้งภาวะที่รุนแรงในการหมักเช่นการกวนและการให้อากาศ หรือแม้กระทั่งค่าความเป็นกรดด่างและสารประกอบไอออนที่เป็นองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อก็มีผลต่อการหลุดของเซลล์บนวัสดุตรึงเซลล์ (Bai et al., 2008; Genisheva et al., 2014; Verica et al., 2010) วัสดุที่นิยมใช้ในการตรึงเซลล์แบบดูดซับส่วนใหญ่มักเป็นวัสดุธรรมชาติเนื่องจากหาง่าย มีความแข็งแรงคงทน มีราคาถูก และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ยกตัวอย่างเช่น ชานอ้อย (Singh et al., 2013; Yu et al., 2010) ต้นข้าวโพด(Razmovski & Vučurović, 2012;

Yan et al., 2012) กากใยหัวบีท (Vučurović & Razmovski, 2012) ใยบวบ (Phisalaphong et al., 2007) รังไหม (Eiadpum et al., 2012) ซังข้าวฟ่างหวาน (Ariyajaroenwong et al., 20015) และ เปลือกมะม่วงหิมพานต์ (Pacheco et al., 2010) เป็นต้น ข้อดีของการตรึงเซลล์แบบดูดซับคือเซลล์สามารถสัมผัสอาหารได้โดยตรงจึงทำให้การถ่ายเทสับสเตรตและเอทานอลระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อมเกิดได้อย่างอิสระ เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างอิสระบนตัวดูดซับ และ การที่เซลล์สามารถหลุดออกจากวัสดุตรึงเซลล์ได้ทำให้มีพื้นที่สำหรับเซลล์ใหม่เข้าไปเกาะติด (Bai et al., 2008; Singh et al., 2013)

2.6.2 การตรึงเซลล์แบบดักจับ

เซลล์ของยีสต์จะถูกกักไว้ภายในโครงสร้างที่เป็นร่างแหหรือเป็นรูพรุนของวัสดุตรึงเซลล์และถูกปกป้องจากปัจจัยที่ส่งผลต่อความเครียดของเซลล์โดยชั้นเจลที่ห่อหุ้มเซลล์ไว้ สารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อและเอทานอลที่ยีสต์ผลิตได้จะเกิดการแลกเปลี่ยนโดยการแพร่ผ่านชั้นเจล(Verica et al., 2010; Willaert, 2011) ข้อดีของการตรึงเซลล์แบบดักจับคือสามารถตรึงเซลล์ได้คราวละมากๆ เซลล์ที่ถูกตรึงจะถูกรักษาไว้ภายในวัสดุตรึงเซลล์ตลอดเวลาการหมัก และ การเก็บเกี่ยวเซลล์ตรึงทำได้ง่ายและไม่ซับซ้อน(Strehaiano et al., 2006; Zheng et al., 2012) แต่เซลล์ตรึงที่ถูกอัดแน่นไว้ในโครงสร้างของเม็ดเจลและไม่มีการหลุดออกอกเซลล์ส่งผลให้เกิดข้อจำกัดในการเจริญของเซลล์เนื่องจากภายในรูพรุนมีพื้นที่จำกัดต่อการเจริญของเซลล์ และ การที่เซลล์ถูกกักและอัดแน่นอยู่ภายในโครงสร้างที่เป็นรูพรุนของวัสดุตรึงเซลล์ทำให้เซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจลเจริญและหมักเอทานอลได้ไม่มีประสิทธิภาพเท่ากับเซลล์ที่อยู่บริเวณผิวของเม็ดเจลเนื่องจากข้อจำกัดของการแลกเปลี่ยนสับสเตรต เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างเซลล์ ชั้นเจล และ สิ่งแวดล้อม (mass transfer limitation) จึงทำให้พบว่าเซลล์ที่อยู่บริเวณผิวของเม็ดเจลจะเจริญได้ดีและมีจำนวนเซลล์มากกว่าเซลล์ที่อยู่ภายในเม็ดเจลเนื่องจากการแลกเปลี่ยนซับสเตรตและเอทานอลระหว่างเซลล์กับอาหารเลี้ยงเชื้อเกิดขึ้นได้ดีกว่าเซลล์ที่อยู่ตรงกลางเม็ดเจล ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์ที่สะสมอยู่ในเม็ดเจลส่งผลให้เม็ดเจลแตก (Bai et al., 2008; Kourkoutas et al., 2004; Singh et al., 2013) วัสดุที่ใช้ในการตรึงเซลล์แบบดักจับได้แก่ อัลจิเนต วุ้น ไคโตซาน คาราจีแนน พอลีอะคริลาไมด์ และ พอลีไวนิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น (Kourkoutas et al., 2004; Verica et al., 2010) วัสดุตรึงเซลล์แบบดักจับที่นิยมใช้ในการผลิตเอทานอลคืออัลจิเนตเนื่องจากราคาถูก การเตรียมเซลล์ตรึงไม่ยุ่งยากซับซ้อน ภาวะที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ตรึงไม่รุนแรง เม็ดเจลที่ได้ค่อนข้างมีความเสถียร และ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Willaert, 2011; Zheng et al., 2012) อัลจิเนตเป็นเฮเทอโรพอลีแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากผนังเซลล์ของสาหร่ายสีน้ำตาลในสกุล *Laminaria* หรือสร้างได้จากแบคทีเรียบาง

ชนิดได้แก่ *Azotobacter* และ *Pseudomonas* โครงสร้างทางเคมีของแอลจิเนตประกอบด้วย กรดเบต้าดีแมนนูโรนิก (β-D-mannuronic acid) และ กรดแอลฟ่าแอลกูลูโรนิก (α-L-guluronic acid) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ 1,4-ไกลโคซิดิก (Onsøyen, 2001) การเกิดเจลเกิดจากการแทนที่โซเดียมไอออนและเชื่อมขวางด้วยพันธะไอออนิกระหว่างกรดกูลูโรนิกกับพอลีวาเลนท์แคทไอออน ได้แก่ แคลเซียมไอออน (Ca^{2+}), คอปเปอร์ไอออน (Cu^{2+}), แบเรียมไอออน (Ba^{2+}), ซิงค์ไอออน (Zn^{2+}) และ อลูมิเนียมไอออน (Al^{3+}) เป็นต้น แคลเซียมไอออนนิยมใช้ในการเชื่อมขวางแอลจิเนตมากที่สุดเนื่องจากไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเจลที่เกิดขึ้นค่อนข้างเสถียรและแข็งแรง หากในอาหารเลี้ยงเชื้อมี ฟอสเฟต, ซิเตรตและ อีดีทีเอ (EDTA) ซึ่งเป็นตัวคีเลต (chelating agent) ที่จับกับแคลเซียมไอออนได้ดีจะทำให้เกิดการสูญเสียแคลเซียมไอออนออกจากโครงสร้างของเจลและส่งผลให้ความเสถียรของเม็ดเจลลดลง รวมทั้งแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) และโซเดียมไอออน (Na^{+}) ที่ความเข้มข้นสูงก็ส่งผลให้ความเสถียรของเม็ดเจลลดลงได้เช่นกัน นอกจากนั้นแล้วความสเถียรของเม็ดเจลยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายแอลจิเนต ความเข้มข้นของแคลเซียมคลอไรด์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึง (Kirdponpattara & Phisalaphong, 2013; Willaert, 2011; Yi et al., 2004; Zhu, 2007)

2.7 การระบุเอกลัษณ์ของยีสต์

ยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาณาจักรฟังไจ (Fungi kingdom) ที่อยู่ในรูปเซลล์เดี่ยว (unicellular fungi) และมีการขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อ (budding) หรือ ฟิชชั่น (fission) และไม่สร้างฟรุตติงบอดี (fruiting body) เซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์แบ่งออกเป็น 2 ชนิดคือ แอสโคสปอร์สร้างในถุงเก็บสปอร์ที่เรียกว่าแอสคัสพบในยีสต์ไฟลัมแอสโคไมโคตา และ แบสิดิโอสปอร์สร้างบนแบสิเดียมพบในยีสต์ไฟลัมแบสิดิโอไมโคตา (Kurtzman et al., 2011a) ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีแหล่งที่อยู่ที่หลากหลายสามารถพบได้เกือบทุกแห่งบนโลก ได้แก่ ในดิน ในอากาศ ในแหล่งน้ำจืดและน้ำเค็ม ในสิ่งแวดล้อมที่มีสภาพแวดล้อมรุนแรง เช่น ขั้วโลกใต้ ใต้ทะเลลึก ทะเลเดดซี น้ำผึ้ง รวมทั้งอาศัยร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่น ยกตัวอย่างเช่น ต้นไม้ ดอกไม้ และ แมลง เป็นต้น (Lachnace et al., 2006b; Raspor & Zupan, 2006) ในอดีตการระบุเอกลัษณ์ของยีสต์จะใช้หลักการตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมเพียงอย่างเดียวซึ่งประกอบด้วย การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (physiological and biochemical characteristics) และ ลักษณะเคมีอนุกรมวิธาน (chemotaxonomy) แต่การระบุเอกลัษณ์ของยีสต์ตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมมีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ มีการทดสอบเป็นจำนวนมาก สารเคมีบางชนิดมีราคาค่อนข้างสูง ใช้ระยะเวลานานในการทดสอบ และต้องใช้ผู้ที่มี

ความเชี่ยวชาญโดยเฉพาะ ยิ่งไปกว่านั้นผลจากการสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาและลักษณะทางสรีระและชีวเคมีที่ได้ค่อนข้างคลุมเครือและมีความผันแปรระหว่างแต่ละสายพันธุ์ในแต่ละสปีชีส์ ดังนั้นนับจากทศวรรษ 1970 เป็นต้นมาจึงมีการพัฒนาวิธีการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ตามหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล ทำให้ทราบว่ายีสต์ที่ถูกระบุเอกลัษณ์ตามวิธีการแบบดั้งเดิมนั้นมีความผิดพลาดสูง ดังนั้นในปัจจุบันวิธีพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ตามหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลจึงได้รับความนิยมอย่างแพร่หลาย (Barnett, 2004; Kurtman & Fell, 2006)

2.7.1 พิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม

เป็นวิธีการดั้งเดิมที่ใช้ในพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ประกอบด้วย (1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ ได้แก่ การศึกษาลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศและเซลล์สืบพันธุ์อาศัยเพศ รูปร่าง ขนาด และ การจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง และ ลักษณะการเจริญในอาหารเหลว (2) ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีเป็นการศึกษาความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต ความสามารถในการแอสสิมิเลท (assimilate) สารประกอบคาร์บอน และไนโตรเจน ความต้องการวิตามินสำหรับการเจริญ การเจริญในภาวะที่มีแรงดันออสโมติกสูง การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การใช้อาร์บูติน การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ การสร้างยูรีเอส การสร้างไลเปส การทนต่อไซโคลเฮกซิไมด์ การทนต่อกรดแอซิติกเข้มข้น 1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) การย่อยเจลลาติน การสร้างกรดจากกลูโคส และ การทำปฏิกิริยากับสีไดอะโซเนียมบลูบี (Kurtzman et al., 2011c) (3) ลักษณะอนุกรมวิธานเคมี ได้แก่ ชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ ชนิดของโคเอนไซม์คิวหรือยูบิควิโนน และชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Prillinger et al., 2011)

2.7.2 พิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ตามหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล

เนื่องจากข้อจำกัดหลายๆประการของพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ตามหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมทำให้ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของผิดพลาด ดังนั้นจึงได้มีการนำเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุลมาใช้แก้ไขปัญหาดังกล่าวเพื่อให้ได้ผลพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่มีความถูกต้องแม่นยำมากที่สุด พิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ตามหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลเริ่มต้นโดย (1) การวิเคราะห์ mol% guanine-cytosine (G-C) ของดีเอ็นเอ สัดส่วนของเบสกัวนีน (guanine) และไซโตซีน (cytocine) ในแอสโคไมซีสยีสต์มีค่าเท่ากับ 28-50% แบซิดิโอไมซีสยีสต์มีค่าเท่ากับ 50-70% ยีสต์ต่างสปีชีส์จะมีสัดส่วนของเบสกัวนีนและไซโตซีนแตกต่างกันประมาณ 1-2 mol% (Nakase & Komagata, 1968) (2) เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความเหมือนของดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DNA-hybridization เทคนิคนี้มักใช้ยืนยันการนำเสนอยีสต์ชนิดใหม่ที่พบนอกเหนือจากยีสต์ที่มีรายงาน

อยู่แล้ว โดยค่า %DNA-DNA homology (%DNA-DNA hybridization) ของยีสต์ชนิดเดียวจะกันเท่ากับ 70% ขึ้นไป ส่วนยีสต์ต่างชนิดกันมีค่า %DNA-DNA homology ระหว่าง 0-40% หากค่า %DNA-DNA homology ของยีสต์อยู่ระหว่าง 40-70 เปอร์เซ็นต์ อาจเป็นยีสต์ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันก็ได้ วิธีการนี้เป็นวิธีการที่บอกได้แต่เพียงว่าจีโนมทั้งหมดของยีสต์เหมือนหรือแตกต่างกันมากหรือน้อยเพียงใดแต่ไม่สามารถบอกระบุได้ว่าแตกต่างกันเท่าไรและไม่สามารถระบุลำดับของดีเอ็นเอที่แตกต่างกันได้ (Bonner et al., 1973; Britten et al., 1974; Vaughan-Martini & Kurtzman, 1985) (3) เปรียบเทียบความเหมือนของลายพิมพ์ดีเอ็นเอด้วยเทคนิค amplified fragment length polymorphism (AFLP), randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) และ restriction fragment length polymorphisms (RFLP)(De Barros Lopes et al., 1999; Gadanho et al., 2003) (4) การใช้ไพร์เมอร์ที่มีความจำเพาะต่อสปีชีส์ของยีสต์ (species-specific primer) หรือ การใช้ peptide nucleic acid (PNA) probes วิธีการนี้เหมาะสำหรับกรณีการจำแนกยีสต์ที่มีจำนวนน้อยหรือต้องการจำแนกยีสต์เพียงสปีชีส์ใดสปีชีส์หนึ่ง (Chapman, 2003; Stender et al., 2001) (5) เปรียบเทียบความเหมือนของลำดับดีเอ็นเอของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอยีน (ribosomal rRNA gene) เป็นวิธีที่ทำได้รวดเร็วและมีความถูกต้องแม่นยำค่อนข้างสูง ประกอบด้วย การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่ง D1/D2 ของหน่วยย่อยขนาดใหญ่ของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (D1/D2 domain of large subunit ribosomal RNA (LSU rRNA)) การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่งหน่วยย่อยขนาดเล็กของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA)) การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่ง internal transcribed spacers 1 และ 2 (ITS1 และ ITS2) และ ลำดับดีเอ็นของหน่วยย่อยใหญ่ที่สุดและหน่วยย่อยที่ใหญ่เป็นอันดับสองของอาร์เอ็นเอพอลีเมอร์เรส (RPB1 และ RPB2) โดยทั่วไปจะใช้ตำแหน่ง D1/D2 ร่วมกับตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 ในพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ (5) เปรียบเทียบความเหมือนของดีเอ็นเอของยีนอื่นๆได้แก่ ยีนสังเคราะห์โปรตีนแอคติน ยีนสังเคราะห์ translation elongation factor-1α, ยีน cytochrome oxidase II ปัจจุบันในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์นิยมใช้การเปรียบเทียบความเหมือนของดีเอ็นเอตรงตำแหน่งอนุรักษ์ของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอยีน ได้แก่ ตำแหน่ง D1/D2 ตำแหน่ง ITS1 และ ITS2 เนื่องจากสะดวกรวดเร็วและมีความแม่นยำสูง แต่ในบางกรณีเช่นการรายงานเชื้อในสกุลใหม่หรือยีสต์ในบางแฟมิลีที่มีความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอในไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอต่ำ การเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นจากยีนเพียงตำแหน่งเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการพิสูจน์เอกลักษณ์ของและระบุความแตกต่างของยีสต์ชนิดใหม่นั้นจึงจำเป็นต้องใช้การเปรียบเทียบความเหมือนของดีเอ็นเอตรงตำแหน่งไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอร่วมกับการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอของยีนจากตำแหน่งอื่น (Kurtzman et al., 2011b; Liu et al., 2015)

บทที่ 3.
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 กากน้ำตาล (molasses)

กากน้ำตาลซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานอุตสาหกรรมอ่างเวียน (ราชสีมา) อำเภอ แก้งสนามนาง จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บไว้ในแกลลอนพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งนำมาใช้ องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลตามตารางที่ 3-1 (พงษ์พรรณี, 2557)

ตารางที่ 3–1 องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลจากโรงงานอุตสาหกรรมอ่างเวียน (ราชสีมา)

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น กรัม/ลิตร	วิธีการทดสอบ	ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ กรัม/ลิตร
แคลเซียม	2.8	Inhouse method based on AOAC(2010),984.27,975.03	
คอบเปอร์	ND		$3.6x10^{-4}$
ซิงค์	2.1 มิลลิกรัม/ลิตร		
แมงกานีส	19 มิลลิกรัม/ลิตร		
โพแทสเซียม	9.8		
ฟอสฟอรัส	210 มิลลิกรัม/ลิตร		
ไนโตรเจน	2.8	Inhouse method based on AOAC(2012),991.20	
แมกนีเซียม	1.2	Inhouse method based on AOAC(2010),984.27,975.03	
กรดแอซิติก (กรดระเหยง่าย)	5.5	AOAC(2010),935.57,942.15	
กรดแลคติก (กรดระเหยยาก)	8.2		
ซูโครส	112.8	Asean Manual of Food Analysis (2011) p.27-32	
กลูโคส	ND		1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ฟรุกโตส	96.5		
HMF	0.4	HPLC	

*ND : ไม่สามารถตรวจหาได้

3.2 กากใยหัวมันสำปะหลัง (Cassava tuber fiber)

กากใยหัวมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง(มันเส้น)ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานผลิตเอทานอล โรงงานทรัพย์ทิพย์ อำเภอชัยบาดาล จังหวัด ลพบุรี ลักษณะกากใยหัวมันสำปะหลังที่ได้หลังจากกระบวนการผลิตเอทานอลมีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลขนาด (particle size) 100 – 1000 ไมครอน ความชื้น 73.57% ความเป็นกรดด่าง 3.87 (รูปที่ 3-1) เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกระทั่งนำมาใช้

รูปที่ 3–1กากใยหัวมันสำปะหลัง

CHULALONGKORN UNIVERSITY

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.1 กล้องจุลทรรศน์เชิงประกอบชนิดใช้แสง (light compound microscope) CH30, Olympus Co. Ltd., Japan อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.3.2 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงแบบสเตอริโอ (stereo microscope) SZ30, Olympus Co. Ltd., Japan

3.3.3 เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (hot plate magnetic stirrer) 502P-2, PMC Industries Inc., U.S.A.

3.3.4 *เครื่อง*แก๊สโครมาโทรกราฟี (*gas chromatography*) GC-2010, Shimadzu, Japan.

3.3.5 เครื่องควบคุมอุณหภูมิหลอดทดลอง (dry block bath) MG-1, Itohka, Japan

3.3.6 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหนง (2-digital balance) PG6002-S Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland

3.3.7 เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4-digital balance) AG285, Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland

3.3.8 เครื่องถ่ายและวิเคราะห์ภาพเจล (gel documentary system) Bio-Rad, USA

3.3.9 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (high speed refrigerated centrifuge) Allegra™ 25R, Beckman Coulter Inc., U.S.A.

3.3.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบควบคุมอุณหภูมิ (high speed refrigerated centrifuge) Kubota 1920, Kubota Cooperation, Japan

3.3.11 เครื่องปั่นเหวี่ยวขนาดเล็ก (spin down) Force mini, Korea

3.3.12 เครื่องผสมสารละลาย (vortex mixter) G560 Scientific Industries Inc., U.S.A

3.3.13 เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (thermocycler) Bio-Rad, U.S.A.

3.3.14 เครื่องแยกสารด้วยไฟฟ้า (gel electrophoresis equipment) Mupid-2plus, Japan

3.3.15 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) Genesys ™ 10S-UV-VIS Thermo Scientific Inc., U.S.A.

3.3.16 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงชนิดนาโน (nano drop 2000 UV-Vis Spectrophotometer) Thermo Fisher Scientific Inc., U.S.A.

3.3.17 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) S20 SevenEasy™ Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland

3.3.18 เครื่องวิเคราะห์ชีวเคมี (biochemistry analyzer) *YSI 2700 SELECT, USA.*

3.3.19 *เครื่อง*วิเคราะห์*หาลำดับ*เบสของสารพันธุกรรม (auto-sequencer) ABI prism 3130xl, Applied Biosystems, USA.

3.3.20 ตะแกรงร่อนเบอร์ 20 ขนาดตาข่าย 850 ไมครอน Retesch, Germanyข

3.3.21 เครื่องให้ความร้อนสารละลาย (hotplate) RK 18715 E.G.O., Poland

3.3.22 ตู้ดูดควันพิษ (fume hood) Dalton Co., Ltd., Japan

3.3.23 ตู้บ่มเพาะเชื้อ (incubator) SANYO, Japan

3.3.24 ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (incubator shaker) Innova 4330 New Brunswick Scientific Co. Ltd, UK

3.3.25 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) H2 LAB service Ltd., Thailand

3.3.26 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) UE600 Memmert Co. Ltd., Germany

3.3.27 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 5 มล. Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland

3.3.28 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) ขนาด 1000, 200, 20, 10 และ 2 ไมโครลิตร. Gilson Company Inc., U.S.A.

3.3.29 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ES-215 TOMY Digital Biology Co. Ltd., Japan

3.3.30 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) SS-325 TOMY Digital Biology Co. Ltd., Japa

3.3.31 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) SS40-D Grant Instrument Co. Ltd., UK

3.4 สารเคมี

3.4.1 กรดกลูโคนิก (D-gluconic acid: $C_6H_{12}O_7$) Sigma Inc., Germany

3.4.2 กรดกาแลกตูโรนิก (D-galacturonic acid: $C_6H_{10}O_7$) Merck Co. Ltd., German

3.4.3 กรดกลูโคโรนิก (D-glucoronuc acid: $C_6H_{10}O_6$) Sigma Inc., Germany

3.4.4 กรด2-คีโตกลูโคนิก (2-keto-gluconic acid: $C_6H_9O_7 \cdot 1/2Ca \cdot XH_2O$) Sigma Inc., Germany

3.4.5 กรด5-คีโตกลูโคนิก (5-keto-gluconic acid: ($C_6H_9KO_7$) Sigma Inc., Germany

3.4.6 กรดแลกติก (DL-Lactic acid: $CH_3CH(OH)COOH$) Sigma Inc., Germany

3.4.7 กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid: H_2SO_4) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.8 กรดซิตริก (Citric acid: $HOC(COOH)(CH_2COOH)_2$) Sigma Inc., Germany

3.4.9 กรดแอซีติก (Acetic acid: $C_2H_4O_2$), Sigma Inc., Germany

3.4.10 กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid: HCl) Sigma Inc., Germany

3.4.11 กาแลกโตส (D-Galactose: $C_6H_{12}O_6$) Sigma Inc., Germany

3.4.12 กลูโคส (D-Glucose: $C_6H_{12}O_6$) Sigma Inc.,Germany

3.4.13 กลูโคซามีน (D-glucosamine: $C_6H_{13}NO_5$) Sigma Inc., Germany

3.4.14 กลูซิทอล (Glucitol: $C_6H_{14}O_6$) Nacalai tesque, Inc., Japan

3.4.15 คาดาเวอรีน ไดไฮโดรคลอไรด์ (Cadaverine dihydrochloride: $C_5H_{14}N_2 \cdot 2HCl$) Sigma Inc., Germany

3.4.16 ครีเอทีน (Creatine: $H_2NC(=NH)N(CH_3)CH_2CO_2H$) Sigma Inc., Germany

3.4.17 ครีเอทินีน (Creatinine $C_4H_7N_3O$) Sigma Inc., Germany

3.4.18 แคลเซียมคลอไรด์ (Calcium Chloride: $CaCl_2$) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.19 แคลเซียมไฮดรอกไซด์ (Calcium hydroxide: $Ca(OH)_2$) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.20 คอร์นมีลอะการ์ (Corn meal agar) *Wako* Pure Chemicals Industries, *Ltd.,* Japan

3.4.21 คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (Copper (II) sulfate pentahydrate: $CuSO_4 \cdot 5H_2O$) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.22 เซลโลไบโอส (Cellobiose: $C_{12}H_{22}O_{11}$) Sigma Inc., Germany

3.4.23 ซูโครส (Sucrose: $C_{12}H_{22}O_{11}$) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.24 ซิงค์ซัลเฟตเฮฟตะไฮเดรต (Zinc sulfate heptahydrate: $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) Sigma Inc., Germany

3.4.25 โซเดียมคลอไรด์ (Sodium Chloride: NaCl) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.26 โซเดียมอัลจิเนต (Sodium alginate) Sigma Inc., Germany

3.4.27 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide: NaOH) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.28 ไซโลส (Xylose) Ameresco, LLC. U.S.A.

3.4.29 ซอร์โบส (sorbose) Sigma Inc., Germany

3.4.30 มอลต์สกัด (Malt extract) Becton Co. Ltd., Germany

3.4.31 มอลโตส (Maltose) Sigma Inc., Germany

3.4.32 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮพตะไฮเดรต (Magnesium sulfate heptahydrate : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.33 แมนนิทอล (D-mannitol: $C_6H_{14}O_6$) Nacalai tesque, Inc., Japan

3.4.34 วุ้นผง (Agar) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.35 โพรพีลีนไกลคอล (Propylene glycol: $CH_3CH(OH)CH_2OH$) Sigma Inc., Germany

3.4.36 โพลีเพปโตน (Polypeptone) Becton Co. Ltd., Germany

3.4.37 บิวเทน-2,3-ไดออล (Butane-2,3-diol ($C_4H_{10}O_2$)) *Wako* Pure Chemicals Industries, *Ltd.,* Japan

3.4.38 เบคโตเพปโตน (Bactopeptone) Becton Co. Ltd., Germany

3.4.39 โปรตีเนสเค (Proteinase K) Nakalai tesque, Japan

3.4.40 ยาตาเลส (Yatalase) Takara Bio Inc., Japan

3.4.41 ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Yeast nitrogen base) Becton Co. Ltd., Germany

3.4.42 ฟีนอล (Phenol 5% ((น้ำหนัก/ปริมาตร))) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.43 ไรโบส (D-ribose: $C_5H_{10}O_5$) Nacalai tesque, Inc., Japan

3.4.44 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) Becton Co. Ltd., Germany

3.4.45 อะกาโรส (Agarose) Sigma Inc., Germany

3.4.46 อะการ์โนเบล (Agar Nobel) Becton Co. Ltd., Germany

3.4.47 อะราบิโนส (D-arabinose: $C_5H_{10}O_5$) Nacalai tesque, Inc., Japan

3.4.48 อิริทริทอล (Erythritol: $C_4H_{10}O_5$) Sigma Inc., Germany

3.4.49 เอทานอล (Ethanol 99% (ปริมาตร/ปริมาตร)) Sigma Inc., Germany

3.4.50 อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A) Qiagen Ltd., Japan

3.4.51 แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium Sulphate ($(NH_4)_2SO_4$)) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.52 แอมโมเนียมฟอตเฟตไดเบสิก (Ammonium phosphate dibasic: ($(NH_4)_2HPO_4$)) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.53 แอมโมเนียมเฮปตะโมลิบเดรตเททระไฮเดรต (Ammonium heptamolybdate tetrahydrate: ($(NH_4)_6Mo_7O_{24}\cdot 4H_2O$)) Merck Co. Ltd., Germany

3.4.54 แอลฟาเมทิลดีกลูโคไซด์ (α-methyl-D-glucoside) Nacalai tesque, Inc., Japan

3.5 จุลินทรีย์

3.5.1 *Saccharomyces serevisiae* TISRT 5596 ซื้อมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.5.2 *Scheffersomyces stipitis* JCM 10742 ซื้อมาจาก Japan Collection of Microorganism ประเทศญี่ปุ่น

3.6 วิธีการ

3.6.1 การคัดแยกยีสต์

3.6.1.1 การคัดแยกยีสต์จากโรงงานผลิตน้ำตาลทราย

นำตัวอย่างดิน น้ำเสีย และของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากโรงงานผลิตน้ำตาลทราย 5 แห่ง ได้แก่ บริษัทไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม จังหวัดกาญจนบุรี บริษัทน้ำตาลครบุรีจำกัดมหาชน จังหวัดนครราชสีมา โรงงานน้ำตาลราชสีมา จังหวัดนครราชสีมา บริษัทอุตสาหกรรมน้ำตาลทีเอ็นจำกัด จังหวัดลพบุรี และบริษัทน้ำตาลสระบุรีจำกัด จังหวัดสระบุรี ปริมาณ 1 กรัม หรือปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร ที่มีอาหารส่งเสริมการเจริญของเชื้อ (enrichment media) ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดยีสต์ (yeast extract) 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เปปโตน (bacto peptone) 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) คลอแรมเฟนิคอล (chloramphenial) ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm และเอทานอล 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในภาวะจำกัดออกซิเจนโดยวิธี candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ/หรือ 40 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดยีสต์ 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เปปโตน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) วุ้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ คลอแรมเฟนิคอล ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ/หรือ 40 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง จนกระทั่งเกิดเป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นจับกลุ่มแต่ละลักษณะโคโลนีเข้าด้วยกัน ตามลักษณะสัณฐานของโคโลนีแล้วจึงเลือกตัวแทนของแต่ละลักษณะโคโลนีเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็ง YPD ผิวหน้าเอียงที่ประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดยีสต์ 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เปปโตน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ วุ้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5

3.6.1.2 การคัดแยกยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสจากป่าพรุหนองจำรุง

นำตัวอย่างดินและน้ำจากป่าพรุหนองจำรุง ต.ซากพง อ.แกลง จ.ระยอง ปริมาณ 1 กรัม หรือปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร ที่มีอาหารไซโลส (xylose enrichment media) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย น้ำตาลไซโลส 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดยีสต์ 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เปปโตน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และคลอแรมเฟนิคอลความเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm และ เอทานอล 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 แล้วบ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (incubator shaker) ที่ อุณหภูมิ 30 องศา

เซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไซโลส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นจับกลุ่มแต่ละลักษณะโคโลนีเข้าด้วยกัน ตามลักษณะสัณฐานของโคโลนีแล้วเลือกตัวแทนของแต่ละลักษณะโคโลนีเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส บนอาหารแข็งไซโลสผิวหน้าเอียง

3.6.1.3 การคัดแยกยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสจากตัวอย่างแมลง

นำตัวอย่างด้วงงวงมะพร้าว (Rhynchophorus ferrugineus) และ แมลงกุดจี่ยักษ์ (Heliocopri bucephalus fabricious) ที่เก็บจากจังหวัดเชียงราย เชียงใหม่ และพะเยา มางดน้ำและอาหารเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นฆ่าเชื้อบริเวณผิวภายนอก (surface sterilization) โดยการจุ่มในเอทานอลเข้มข้น 95% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 5 นาที จากนั้นจุ่มในเอทานอลเข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) นาน 10 นาทีพร้อมทั้งคนเป็นระยะ แล้วจึงนำมาล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 2 ครั้ง นำสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ล้างตัวอย่างครั้งสุดท้ายมานับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยวิธี spread plate บนอาหารแข็ง YPD ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm ตัดหัว ปีกคู่หน้า ปีกคู่หลัง และขาออก นำส่วนลำตัวของแมลงมาบดผสมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในโกร่ง นำสารผสมที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร ที่มีด้วยอาหารเหลว YPD ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที 72 ชั่วโมง จากนั้นนำมาขีดเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่เติมคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้นสุดท้าย 100 ppm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง จนกระทั่งได้เป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นจับกลุ่มแต่ละลักษณะโคโลนีเข้าด้วยกัน ตามลักษณะสัณฐานของโคโลนีแล้วเลือกตัวแทนของแต่ละลักษณะโคโลนีเก็บไว้บนอาหารแข็ง YPD ผิวหน้าเอียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำตัวแทนของแต่ละลักษณะโคโลนีไปทดสอบการใช้น้ำตาลไซโลส โดยเตรียมเซลล์แขวนลอยเข้มข้นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน 0.5 แมคฟาแลนด์ จากนั้นนำเซลล์แขวนลอยที่ได้หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งไซโลส บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 120 ชั่วโมง

3.6.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์โดยอาศัยหลักอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

3.6.2.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (Endoh et al., 2008)

นำยีสต์ที่แยกได้มาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) โดยผสมเซลล์จำนวน 1 ลูปที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD เข้ากับสารละลายไลซีส (lysis solution) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ที่ประกอบด้วย ยาตาเลส (yatalase) 30 มิลลิกรัม อาร์เอ็นเอสเอ (RNase A) เข้มข้น 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร 30 ไมโครลิตร ละลายใน ยาตาเลสบัฟเฟอร์ปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นเติมเม็ดแก้ว (Sigma Aldrich Co., LLC., U.S.A.) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 มิลลิเมตร ปริมาณ 0.3 กรัมลงไป พร้อมกับสารละลาย SDS เข้มข้น 8% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 67 ไมโครลิตร ผสมด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) นาน 2 นาที บ่มที่อุณหภูมิ 67 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมสารละลายโซเดียมอะซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 87 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 15,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) ปริมาตร 70 ไมโครลิตร ผสมกับไอโซโพรพานอล (isopropanol) ปริมาตร 110 ไมโครลิตร กรองด้วย AcroPrep 96 Multi-Well Filter Plate (PALL Corp., USA) จากนั้นล้างตัวกรองด้วยเอทานอลเข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียสนาน 1 นาที ชะตัวกรองด้วยบัฟเฟอร์ทีอี (TE buffer) เข้มข้น 1 เท่า ค่าความเป็นกรดด่าง 8.0 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร วางไมโครเวลเพลทจำนวน 96 ช่อง (96 well plate) อันใหม่ไว้ใต้ตัวกรองจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บจีโนมิกดีเอ็นเอที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้ ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.6.2.2 การจัดกลุ่มของเชื้อที่แยกได้ด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสร้างโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ (PCR fingerprinting) (Endoh et al., 2011)

นำจีโนมิกดีเอ็นเอจากข้อ 2.1 มาเพิ่มชิ้นส่วนดีเอ็นเอโดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไมโครแซทเทิลไลท์ไพร์เมอร์จีทีจีไฟฟ์ (microsatellite primer (GTG)5 (5’-GTGGTGGTGGTGGTG-3’)) กำหนดโปรแกรมเครื่องพีซีอาร์ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 5 นาที แล้วทำให้เกิดฏิกิริยาลูกโซ่พีซีอาร์ในขั้นตอน denaturation, annealing และ polymerization จำนวน 40 รอบ กำหนดขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 93 องศาเซลเซียส 45 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 1 นาที ขั้นตอน polymerization ที่อุณหภูมิ 72 องศา

เซลเซียส 1 นาที final polymerization ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 6 นาที องค์ประกอบปฏิกิริยาปริมาตร 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย โกแทกกรีน (GoTaq green, Promega Corp., USA.) ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์จีทีจีไฟฟ์ความเข้มข้น 10 พิโคโมล/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 ไมโครลิตร น้ำปราศจากไอออน (deionized water) ปริมาตร 3.8 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (amplicon) ที่ได้มาแยกขนาดของดีเอ็นเอโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส (agarose gel electrophoresis) เทียบกับ ดีเอ็นเอมาตรฐานขนาดช่วง 100 คู่เบส (100 bp DNA ladder) แล้วจึงจัดกลุ่มของเชื้อที่แยกได้ตามลักษณะของแถบดีเอ็นเอที่ปรากฏ

3.6.2.3 การหาลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่ง D1/D2 บนยีน large subunit ribosomal RNA (LSU D1/D2) small sub unit ribosomal RNA (SSU) และ internal transcribed spacer (ITS) (Endoh et al., 2008)

เลือกตัวแทนของเชื้อจากการจัดกลุ่มด้วยลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ได้จากการสร้างโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์ นำจีโนมิกดีเอ็นเอของเชื้อที่เป็นตัวแทนมาเพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่ง LSU D1/D2 โดยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไพร์เมอร์เอ็นแอลวัน (NL1 (5’-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3’)) และเอ็นแอลโฟร์ (NL4 (5’-GGTCCGTGTTTCA AGACGG-3’)) (Kurtzman & Robnett, 2003) ด้วยโปรแกรมเครื่องพีซีอาร์ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้น denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 30 วินาที ทั้งหมด 36 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 5 นาที เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอตำแหน่ง SSU ด้วยไพร์เมอร์ NS1 (5’-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3’) และ NS8 (5’-TCCGCAGGTTCACCTA CGGA-3’) (Kurtzman & Robnett, 2003) ด้วยโปรแกรมเครื่องพีซีอาร์ดังนี้ initial denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 3 นาที จากนั้น denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส 30 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส 30 วินาที extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 1 นาที 30 วินาที จำนวน 36 รอบ และ final extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส 8 นาที เพิ่มจำนวนชิ้นส่วนดีเอ็นเอตรงตำแหน่ง ITS ด้วยไพร์เมอร์ ITS1 (5’-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3’) และ ITS4 (5’- TCCTCCGCTTATTGATATGC-3’) (White et al, 1990) องค์ประกอบปฏิกิริยาปริมาตร 20 ไมโครลิตร ประกอบด้วย โกแทกกรีน ความเข้มข้น 2 เท่า ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์ฟอร์เวิร์ด ความเข้มข้น 10 พิโคโมล/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร ไพร์เมอร์รีเวิร์ส ความเข้มข้น 10 พิโคโมล/มิลลิลิตร ปริมาตร 0.4 ไมโครลิตร น้ำปราศจากไอออน ปริมาตร 7.2 ไมโครลิตร

ดีเอ็นเอแม่แบบ (DNA template) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้มาทำให้บริสุทธิ์โดยการกรองด้วย MinElute multi-well filter plate (Qiagen Inc., USA) แล้วล้างด้วยน้ำปราศจากไอออนสองครั้ง ชะผิวหน้าของ MinElute multi-well filter plate ด้วยบัฟเฟอร์ทีอีความเข้มข้น 1 เท่าปริมาตร 50 ไมโครลิตร นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ทำให้บริสุทธิ์แล้วมาหาลำดับดีเอ็นเอตำแหน่ง LSU D1/D2, ITS และ SSU ด้วยวิธี cycle sequencing โดยใช้ชุดสำเร็จรูป BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Stafford, USA) ตำแหน่ง LSU D1/D2 และ ITS ใช้ไพร์เมอร์ไพร์เมอร์ตามที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ตำแหน่ง SSU ใช้ไพร์เมอร์ NS1, NS8, NS2 (5’-GGCTGCTGGCACCAGACTTGC -3’), NS3 (5’-GCAAGTCT GGTGCCAGCAGCC-3’), NS4 (5’-CTTCCGTCAATTCCTTTAAG-3’) และ NS5 (5’-AACTTAAAGGAATTGACGGAAG-3’) (Kurtzman & Robnett, 1998)นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ มาทำให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยเติมสารละลายโซเดียมแอซิเตทเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 2 ไมโครลิตร และ เอทานอลเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอน ที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เติมเอทานอลเข้มข้น 70% (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาตร 180 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงเพื่อเก็บตะกอนที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากตะกอนแห้งเติมสารละลาย HiDi formamide ปริมาตร 15 ไมโครลิตร วิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอด้วยเครื่อง auto-sequencer ABI Prism 3100 (Applied Biosystems, Stafford, USA) ตรวจสอบความถูกต้องและปรับแต่งผลของลำดับดีเอ็นเอด้วยโปรแกรม Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999) เปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ของตำแหน่ง LSU D1/D2 กับฐานข้อมูลออนไลน์ที่ปรากฏอยู่ในเวปไซต์ DNA DataBank of Japan (DDBJ), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) และ GenBank at NCBI ด้วยโปรแกรม BLASTn (http://www.ncbi.nlm. nih.gov/blast)

3.6.2.4 การสร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree)

นำข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่สมบูรณ์ของตำแหน่ง LSU D1/D2, SSU และ ITS มาทำการเรียงเทียบ (multiple alignment) ด้วยโปรแกรม muscle (Edgar, 2004) จากนั้นวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี Neighbor-joining (NJ) และ maximum-parsimony (MP) ด้วยโปรแกรม MEGA 6 (Tamura et al., 2013) วิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการโดยวิธี NJ ใช้แบบจำลอง Kimura-2-parameter สำหรับการวิเคราะห์ nucleotide-sequence divergence วิเคราะห์ค่า Bootstrap จำนวน 1000 ซ้ำ

3.6.3 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาของยีสต์สปีชีส์ใหม่ (Kurtzman et al., 2011c)

3.6.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ ได้แก่ ลักษณะโคโลนี ลักษณะเซลล์ การสร้างเส้นใยแท้ (true hyphae) เส้นใยเทียม (pseudohyphae) และการสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อโดยขีดเชื้อเป็นเส้นตรงบนอาหารแข็งวุ้นเอียง YM หรือ 5% malt extract หรือ Sabouraud's glucose agar บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ศึกษาลักษณะเซลล์โดยถ่ายเซลล์ลงในอาหารเหลวชนิด YM บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียยส นาน 3 วัน ศึกษาการสร้างเส้นใยและเส้นใยเทียมด้วยเทคนิค Dalmau plate โดยขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง cornmeal หรือ 5% malt extract หรือ morphology agar วางกระจกปิดสไลด์บนรอยเขี่ยเชื้อบางส่วน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ชักนำให้เชื้อสร้างสปอร์แบบอาศัยเพศโดยขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง 5% malt extract, 2% malt extract, V8 juice เจือจาง 10 เท่า และ 20 เท่า, YM และ cornmeal บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส และ 25 องศาเซลเซียสนาน 30 วัน

3.6.3.2 ลักษณะทางสรีรวิทยา

ถ่ายสารละลายแขวนลอยเซลล์เข้มข้น 108 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลวสำหรับการทดสอบความสามารถในการใช้ (assimilation) สารประกอบคาร์บอนจำนวน 50 ชนิด (carbon assimilation) อาหารเหลวสำหรับทดสอบความสามารถในการใช้อาร์บูติน (arbutin) อาหารเหลวสำหรับทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส อาหารเหลวสำหรับทดสอบความทนต่อแรงดันออสโมติกของสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 10% และ 16% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และกลูโคสเข้มข้น 50% (น้ำหนัก/ปริมาตร) อาหารเหลวสำหรับทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อสารไซโคลเฮกซะไมด์ (cyclohexamide) เข้มข้น 0.01% และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) อาหารเหลวสำหรับทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารปราศจากวิตามิน (vitamin free medium) และอาหารเหลวทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 25 – 40 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหารเหลว YM อาหารแข็งสำหรับทดสอบความสามารถในการใช้สารประกอบไนโตรเจน 10 ชนิด อาหารแข็งสำหรับทดสอบความสามารถในการผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส อาหารแข็งสำหรับทดสอบความสามารถในการย่อยยูเรีย (hydrolysis of urea) อาหารแข็งสำหรับทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction) อาหารแข็งสำหรับทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อกรดแอซิติกเข้มข้น 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) และ อาหารแข็งสำหรับ

ทดสอบปฏิกิริยาต่อสารไดอะโซเมียมบลูบี (Diazomium Blue B) บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นการทดสอบความสามารถในการย่อยเจลาติน บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส นาน 42 วัน ตรวจสอบผลการทดลองทุกๆ 7 วัน

3.6.4 การทดสอบการหมักเอทานอลของยีสต์ที่คัดแยกได้

3.6.4.1 การทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่คัดแยกได้

นำยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.6.1.1 และ 3.6.1.3 มาทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยการถ่ายเชื้อจำนวน 1 ลูปที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10% ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ (inoculum medium) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 10% หรือ 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดยีสต์ 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ เปปโตน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ/หรือ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลวชนิดเดิม ที่ภาวะเดิม ถ่ายเชื้อ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว fermentation medium ปริมาตร 42.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลกลูโคส 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดยีสต์ 0.46% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ เปปโตน 0.76% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ/หรือ 40 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง ในภาวะจำกัดออกซิเจนโดยการใช้แผ่นพาราฟิล์มพันทับจุกสำลีให้แน่น เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อ (cell free culture) โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิค Gas chromatography (GC) ใช้ *S. serevisiae* TISRT 5596 เป็นยีสต์สายพันธุ์อ้างอิงเพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ผลิตได้ คำนวณผลได้เอทานอล (Ethanol yield) จากสมการที่ 3-1

$$\text{Ethanol yield} = \frac{\text{ความเข้มข้นผลผลิตเอทานอล}\ (\frac{g}{l})}{\text{ความเข้มน้ำตาลเริ่มต้น}\ (\frac{g}{l})} \quad \text{สมการที่ 3–1}$$

3.6.4.2 การทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์ที่คัดแยกได้

นำยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้อ 3.6.1.2 และ 3.6.1.3 มาทดสอบการหมักน้ำตาลไซโลสโดยการถ่ายเชื้อเจริญบนอาหารไซโลสจำนวน 1 ลูปลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวไซโลส ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ประกอบด้วย น้ำตาลไซโลส 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดยีสต์

0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ เปปโตน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 48 ชั่วโมง การถ่ายเชื้อ 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลวชนิดเดิม บ่มที่ภาวะเดิม ทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสภายใต้ภาวะให้อากาศ โดยการถ่ายเชื้อ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในหลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเหลว xylose fermentation medium ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย น้ำตาลไซโลส 15% หรือ 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดยีสต์ 0.46% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เปปโตน 0.76% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที 72 ชั่วโมง การทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ถ่ายเชื้อ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในหลอดทดลองขนาด 15 x 100 มิลลิเมตร ที่มีอาหารเหลว xylose fermentation medium ปริมาตร 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศา ภาวะจำกัดออกซิเจนโดยการปิดฝาเกลียวให้แน่นแล้วพันทับด้วยแผ่นพาราฟิล์มรอบรอยต่อระหว่างหลอดทดลองและฝา เซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิค Gas chromatography (GC) ใช้ *S. stipitis* JCM 10742 เป็นยีสต์สายพันธุ์อ้างอิง เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ผลิตได้

3.6.5 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4

3.6.5.1 การสร้างกราฟแสดงอัตราการเจริญเติบโต (growth curve)

นำยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4 เจริญบนอาหาร YPD ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูป มาถ่ายลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน side arm flask ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลิลิตร ปรับค่าความขุ่นเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.05 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที วัดค่าความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทุกๆ 30 นาที นำค่าความขุ่นที่วัดได้มาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์กับระยะเวลา

3.6.5.2 การหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล

ถ่ายยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4 เจริญบนอาหาร YPD ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จำนวน 1 ลูปลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลวชนิดเดิม บ่มที่ภาวะเดิม ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว fermentation medium ปริมาตร 42.5 มิลลิลิตร แปรผันค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ภาวะจำกัดออกซิเจนโดยการพันแผ่นพาราฟิล์มทับจุกสำลีให้แน่น เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลในส่วนใสที่ได้ด้วยเทคนิค Gas chromatography (GC)

3.6.5.3 การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4 ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.6.5.2 ถ่ายกล้าเชื้อ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว fermentation medium ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 42.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40, 42, 46 และ 48 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ภาวะจำกัดออกซิเจนโดยการพันแผ่นพาราฟิล์มทับจุกสำลีให้แน่น เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลในส่วนน้ำใสที่ได้ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.6.5.2

Chulalongkorn University

3.6.5.4 การหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4 ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.6.5.2 ถ่ายกล้าเชื้อ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลว fermentation medium ปริมาตร 42.5 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเป็น 15% 20% และ 25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ภาวะจำกัดออกซิเจน เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลในส่วนน้ำใสที่ได้ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.6.5.2

3.6.6 การเปรียบเทียบประสิทธิผลการหมักเอทานอลของเซลล์ตรึง

3.6.6.1 การเตรียมกากใยหัวมันสำปะหลังสำหรับตรึงเซลล์

นำกากใยหัวมันสำปะหลังมาล้างด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1 กรัม/น้ำ 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งน้ำล้างกากใยหัวมันสำปะหลังมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.0 กรองกากใยหัวมันสำปะหลังผ่านตะแกรงร่อนเบอร์ 20 (ขนาดช่องตะแกรง 850 ไมครอน) เก็บตัวอย่างกากใยฯที่ผ่านตะแกรงร่อน (ขนาดเล็กกว่า 850 ไมครอน) นำไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนกระทั่งน้ำหนักคงที่

3.6.6.2 การศึกษาลักษณะของกากใยหัวมันสำปะหลัง

นำกากใยหัวมันสำปะหลังที่เตรียมได้จากข้อ 3.6.6.1 มาศึกษาลักษณะ สัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, JSM-5410LV, JEOL Co. Ltd., Japan) ที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หาค่าดัชนีการดูดซับน้ำของกากใยฯ (water absorption index, WAI) (Razmovski & Vučurović, 2012)โดยนำกากใยของหัวมันสำปะหลัง 1.25 กรัมน้ำหนักแห้งมากวนผสมในน้ำปริมาตร 15 มิลลิลิตร นาน 10 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 10 นาที เทส่วนน้ำทิ้ง นำกากใยฯที่ได้มาชั่งน้ำหนัก คำนวณค่าดัชนีการดูดซับน้ำจากสมการที่ 3–2 ศึกษาความสามารถในการตรึงเซลล์ของกากใยหัวมันสำปะหลัง (cell retention capacity) (Razmovski & Vučurović, 2012)โดยนำเซลล์ปริมาณ 0.2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ตรึงบนกากใยหัวมันสำปะหลังปริมาณ 1.0 กรัมนาน 1 ชั่วโมงนำส่วนผสมระหว่างเซลล์และกากใยหัวมันสำปะหลังกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 (ขนาดรูพรุนเท่ากับ 20 – 25 ไมครอน) ล้างกากใยหัวมันสำปะหลังที่กรองได้ด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งเพื่อกำจัดเซลล์ที่ไม่ถูกตรึงจากนั้นนำกากใยหัวมันสำปะหลังไปทำแห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสจนกระทั่งน้ำหนักคงที่คำนวณความสามารถในการตรึงเซลล์ของกากใยหัวมันสำปะหลังจากสมการที่ 3-3

สมการที่ 3–2

$$\text{ดัชนีการดูดซับน้ำ} = \frac{\text{น้ำหนักเปียกของกากใยหัวมันสำปะหลัง (กรัม)}}{\text{น้ำหนักแห้งของกากใยหัวมันสำปะหลัง (กรัม)}}$$

สมการที่ 3–3

ความสามารถในการตรึงเซลล์

$$= \frac{\text{น้ำหนักเซลล์ที่เหลืออยู่บนกากใยหัวมันสำปะหลัง (กรัมน้ำหนักแห้ง)}}{\text{น้ำหนักกากใยหัวมันสำปะหลัง(กรัมน้ำหนักแห้ง)}}$$

3.6.6.3 การเตรียมกล้าหัวเชื้อเริ่มต้น (seed culture) สำหรับการหมักเอทานอล

ถ่ายยีสต์ซึ่งมีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.6.4 เจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมงจำนวน 1 ลูป ลงในอาหารเหลวสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุลงในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที นาน 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ลงใน side arm flask ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหารเหลวชนิดเดิมปริมาตร 50 มิลิลิตร ปรับค่าความขุ่นเริ่มต้นของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเป็น 0.05 บ่มบนเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็ว 200 รอบต่อนาที จนกระทั่งเชื้อเจริญอยู่ในช่วง late log phase (10 ชั่วโมง) หรือจนกระทั่งค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 1.4 ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที 4 องศาเซลเซียส 5 นาที นับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacyto meter)

3.6.6.4 การหาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างจำนวนเซลล์กับกากใยหัวมันสำปะหลังสำหรับการตรึงเซลล์ด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง

แขวนลอยกล้าเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.6.6.3 ปริมาณ 1.37x1010 เซลล์ ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมเซลล์ที่เตรียมได้และกากใยหัวมันสำปะหลัง 1.2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) เข้าด้วยกัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำกากใยหัวมันสำปะหลังที่มีเซลล์ตรึงอยู่ทั้งหมดไปหมักเอทานอลโดยใส่ในอาหารเหลว fermentation medium ปริมาตร 45 มิลลิลิตร บรรจุในขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ภาวะจำกัดออกซิเจนโดยการปิดฝาเกลียวให้แน่น เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิค Gas chromatography (GC) หาอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างจำนวนเซลล์และกากใยหัวมันสำปะหลังโดยแปรผันจำนวนเซลล์ของกล้าเชื้อเป็น 1x109 เซลล์ 6.1x109 เซลล์ 2.62x1010 เซลล์ และ 3.93x1010 เซลล์ และแปรผันปริมาณกากใยหัวมันสำปะหลังเป็น 2.4 และ 4.8 กรัม (น้ำหนักแห้ง)

3.6.6.5 วิธีการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนต

แขวนลอยกล้าเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.6.6.3 จำนวน 1.37x1010 เซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำเซลล์ที่เตรียมได้มาผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7

ปริมาตร 10 มิลลิลิตร หยดสารผสมระหว่างเซลล์และอัลจิเนตด้วยปิเปตแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร เส้นผ่านศูนย์กลางของปากปิเปตเท่ากับ 3.5 มิลลิเมตร ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 200 มิลลิลิตรที่มีการกวนผสมตลอดเวลา บ่มเม็ดเจลที่ได้ที่อุณหภูมิห้องนาน 15 นาที จากนั้นกรองเก็บเม็ดเจลที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง ล้างเม็ดเจลด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.9% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ทุกขั้นตอนทำในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow) นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ถูกตรึงด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.6.6.6 วิธีการตรึงเซลล์ด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต

แขวนลอยกล้าเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.6.6.3 จำนวน 1.37x1010 เซลล์ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมเซลล์ที่เตรียมได้กับกากใยหัวมันสำปะหลัง 1.2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตเข้มข้น 2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรดด่าง 7 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและผสมให้เข้ากัน หยดของเหลวผสมที่ได้ด้วยปิเปตแก้วขนาด 10 มิลลิลิตร เส้นผ่านศูนย์กลางของปลายปิเปตเท่ากับ 3.5 มิลลิเมตร ลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ปริมาตร 200 มิลลิลิตรที่ กวนผสมอยู่ตลอดเวลา บ่มเม็ดเจลที่ได้ที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 15 นาที จากนั้นกรองเก็บเม็ดเจลที่ได้ด้วยผ้าขาวบาง ล้างเม็ดเจลด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทุกขั้นตอนข้างต้นทำโดยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ถูกตรึงจากทุกขั้นตอนด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.6.6.7 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยเซลล์ตรึงแบบต่างๆ

<u>การหมักเอทานอลโดยเซลล์ตรึงกับเส้นใยหัวมันสำปะหลัง</u>

นำเซลล์ตรึงกับเส้นหัวใยหัวมันสำปะหลังจากข้อ 3.6.6.4 ลงในอาหารเหลว fermentation medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ภาวะจำกัดออกซิเจนโดยการปิดฝาเกลียวให้แน่น เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลด้วยเทคนิค Gas chromatography (GC)

<u>การหมักเอทานอลโดยเซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต และเซลล์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต</u>

นำเม็ดเจลจากข้อ 3.6.6.6 และข้อ 3.6.6.5 ลงในอาหารเหลว fermentation medium ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร หมัก เอทานอลตามวิธีข้างต้น เปรียบเทียบเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อใช้เซลล์อิสระ

3.6.6.8 การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยเซลล์ตรึงกับกากใยหัวมันสำปะหลัง

แขวนลอยกล้าเชื้อเริ่มต้นจากข้อ 3.6.6.3 ปริมาณ 1.37x1010 เซลล์ ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมเซลล์ที่เตรียมได้และกากใยหัวมันสำปะหลัง 1.2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) เข้าด้วยกัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที นำกากใยหัวมันสำปะหลังที่มีเซลล์ตรึงอยู่ทั้งหมดใส่ลงในอาหาร Molasses medium ที่แปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลให้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 20%, 22%, 24% และ 26% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แอมโมเนียมซัลเฟต 1.3 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2.7 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต 0.5 กรัม ในน้ำกลั่น 998 ลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดดูแรนขนาด 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 100 ชั่วโมง ภาวะจำกัดออกซิเจนโดยการปิดฝาเกลียวให้แน่น เขย่าผสมด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 24, 48, 72 และ 100 ชั่วโมง โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 5 นาที นำส่วนน้ำใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ เอทานอลด้วยเทคนิค Gas chromatography (GC)

3.6.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

เปรียบเทียบผลการหมักเอทานอลที่ได้ด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) ด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชั่น 17 กำหนดระดับนัยสำคัญเท่ากับ 0.05 (α=0.05)

บทที่ 4.
ผลการทดลองและการอภิปรายผล

4.1 ผลการคัดแยกยีสต์และพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์โดยหลักอนุกรมวิธานโมเลกุลและการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

4.1.1 ผลการคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากโรงงานน้ำตาล

ตัวอย่างน้ำอ้อย ดิน น้ำเสีย ตะกอนและอื่นๆจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายทั้งหมด 83 ตัวอย่าง จากโรงงานผลิตน้ำตาลทราย 5 แห่งได้แก่ บริษัทไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม บริษัทน้ำตาลครบุรีจำกัดมหาชน บริษัทอุตสาหกรรมน้ำตาลทีเอ็นจำกัด โรงงานน้ำตาลราชสีมา จำกัด และบริษัทน้ำตาลสระบุรีจำกัด แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 128 ไอโซเลต แบ่งเป็นยีสต์ที่แยกที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 29 ไอโซเลต (จากโรงงานไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม) และยีสต์ที่แยกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 99 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นยีสต์ที่แยกได้จากบริษัทไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม 25 ไอโซเลต (ตารางที่ 4-1) บริษัทน้ำตาลครบุรีจำกัดมหาชน 20 ไอโซเลต (ตารางที่ 4-2) โรงงานน้ำตาลราชสีมา 14 ไอโซเลต (ตารางที่ 4-3) บริษัทอุตสาหกรรมน้ำตาลทีเอ็นจำกัด 16 ไอโซเลต (ตารางที่ 4-4) และบริษัทน้ำตาลสระบุรีจำกัด 23 ไอโซเลต (ตารางที่ 4-5)

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ด้วยลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA พบว่ายีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจัดอยู่ใน 5 จีนัส 5 สปีชีส์ คือ *Pichia manshurica, Candida ethanolica, S. cerevisiae, Pichia kudriavzevii* และ *Kluyveromyces marxianus* (ตารางที่ 4-6) และพบว่า *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่พบมากที่สุดคิดเป็น 44.83% ของยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ *C. ethanolica* และ *P. manshurica* ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสยีสต์ที่แยกได้จัดอยู่ใน 7 จีนัส 7 สปีชีส์ คือ *P. manshurica, S. cerevisiae, Pichia kudriavzevii, K. marxianus, Ogataea polymorpha, Candida nivariensis* และ *Schizasaccharomyces pombe* (ตารางที่ 4-7 ถึง ตารางที่ 4-11) *O. polymorpha* เป็นยีสต์ที่พบมากที่สุดคิดเป็น 28.28% ของยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส รองลงมาคือ *S. cerevisiae* (27.27%) และ *K. marxianus* (25.25%) ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่มีการรายงานก่อนหน้านี้กล่าวคือยีสต์ที่คัดแยกได้จากโรงงานน้ำตาลส่วนใหญ่คือ *S. cerevisiae, K. marxianus* และ *O. polymorpha* (Abdel-Fattah et al., 2000; Anderson et al., 1988; Chandrasena et al., 2006; Shehata, 1960) Milintawisamai และคณะ (2008) รายงานว่า *S. cerevisiae, Candida guilliermondii* และ *Candida tropicalis*

เป็นยีสต์ที่พบปนเปื้อนในโรงงานน้ำตาลมากที่สุด นอกจากนี้ *S. cerevisiae, K. marxianus* และ *O. polymorpha* ยังสามารถคัดแยกได้จำนวนมากจากตัวอย่าง ลูกตาล (Kumar et al., 2011).

ตารางที่ 4–1 ตัวอย่างจากบริษัทไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมและจำนวนยีสต์ที่แยกได้

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่แยกได้	
		30 องศาเซลเซียส	40 องศาเซลเซียส
1	น้ำอ้อย	3	2
2	น้ำอ้อยบริเวณบ่อพัก 2	2	4
3	น้ำอ้อยบริเวณบ่อพัก ชุด 5	2	4
4	น้ำอ้อยบริเวณลูกหีบ ชุด 1	3	2
5	น้ำอ้อยบริเวณบ่อพัก ชุด 4	2	1
6	น้ำเสียบ่อแรก	1	1
7	น้ำอ้อย ที่ 70 องศาเซลเซียส	1	1
8	น้ำโคลนที่มาจากบ่อพักใส	4	-
9	น้ำอ้อยชุดแรก	1	2
10	น้ำล้างบ่อ	1	3
11	C-massecuite	1	-
12	กากอ้อย	2	3
13	ส่วนตะกอนที่ 70 องศาเซลเซียส	2	-
14	molass จากบ่อพัก (ที่เดือด)	-	-
15	molass	1	1
16	filter cake	3	1
รวม	16	29	25

ตารางที่ 4–2 ตัวอย่างจากบริษัทน้ำตาลครบุรีจำกัดมหาชนและจำนวนยีสต์ที่แยกได้

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่แยกได้ (40 องศาเซลเซียส)
1	น้ำอ้อย ชุด 1	1
2	น้ำอ้อยจากบ่อ	3
3	น้ำทิ้งจากลูกหีบ	1
4	น้ำทิ้งจากระบบ	3
5	น้ำอ้อยจากลูกหีบ	1
6	น้ำอ้อย (ในหม้อต้ม)	2
7	น้ำทิ้งบริเวณลูกหีบชุด 4	2
8	น้ำขี้โคลน	2
9	น้ำทิ้งจากหม้อต้ม	1
10	น้ำทิ้งจากหม้อเดี่ยว	2
11	filter cake	1
12	Bagassilo	2
13	ทราย (บริเวณถังดักทราย)	3
รวม	13	20

ตารางที่ 4–3 ตัวอย่างจากโรงงานน้ำตาลราชสีมาและจำนวนยีสต์ที่แยกได้

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่แยกได้ (40 องศาเซลเซียส)
1	น้ำทิ้งจากลูกหีบ ชุด 1	1
2	น้ำอ้อยชุด 1	1
3	น้ำทิ้งจากระบบ	1
4	น้ำอ้อย	1
5	น้ำทิ้งจากลูกหีบ ชุด 1 ราง 2	2
6	กากอ้อย	1
7	กากอ้อยจากหม้อกรอง	2
8	กากอ้อยจากลูกหีบ ชุด 1	1
9	กากอ้อยจากหม้อพักใส	2
10	ทรายบริเวณถังน้ำอ้อย ชุด 1	3
รวม	10	15

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4–4 ตัวอย่างจากบริษัทอุตสาหกรรมน้ำตาลทีเอ็นจำกัดและจำนวนยีสต์ที่แยกได้

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่แยกได้ (40องศาเซลเซียส)
1	ขี้เค้กเก่า (หมักแล้ว)	-
2	ขี้เค้กใหม่	1
3	น้ำอ้อยลูกหีบชุดแรก	1
4	น้ำทิ้งบริเวณทางเข้า	1
5	น้ำอ้อย	-
6	น้ำอ้อยด้านนอก (refine)	-
7	ตะกอน ที่ 70 องซาเซลเซียส	-
8	กากอ้อยจากลูกหีบชุด 1	1
9	น้ำจากรางบริเวณถัง re-melt	-
10	น้ำอ้อยที่กรองใส	3
11	กากอ้อย (ลูกหีบชุด 1)	-
12	น้ำเชื่อม	2
13	ตะกอน (63 องศาเซลเซียส ถังที่ 1)	1
14	ตะกอน (63 องศาเซลเซียส ถังที่ 2)	-
15	น้ำจากรางบริเวณถัง re-melt	1
16	น้ำทิ้ง	-
17	น้ำเชื่อม (re-melt sugar tank)	-
18	กากอ้อยจากลูกหีบชุดแรก	1
19	น้ำจากลูกหีบชุดแรก	3
20	น้ำอ้อย	1
21	กากอ้อยจากลูกหีบ	-
รวม	21	16

ตารางที่ 4–5ตัวอย่างที่เก็บจากโรงงานน้ำตาลสระบุรีทั้งหมด 22 ตัวอย่างและจำนวนยีสต์ที่แยกได้

ตัวอย่างที่	ชนิดตัวอย่าง	จำนวนเชื้อที่แยกได้ (40 องศาเซลเซียส)
1	น้ำทิ้งจากร่องน้ำ	-
2	โคลนบริเวณร่องน้ำ	-
3	กากน้ำตาล 1	-
4	กากอ้อย	-
5	แอ่งน้ำเน่าบริเวณโรงงาน	1
6	กากน้ำตาล 2	-
7	กากน้ำตาล 3	-
8	น้ำวนในระบบ	-
9	น้ำทิ้งบริเวณท่อระบายน้ำ	2
10	น้ำทิ้งบริเวณท่อระบายน้ำ	2
11	น้ำทิ้งจากร่องน้ำ	2
12	น้ำอ้อย	-
13	ท่อระบายน้ำจากหม้อปั่น	-
14	น้ำอ้อย	1
15	ท่อระบายน้ำจากหม้อปั่น	3
16	กากน้ำตาล 4	2
17	น้ำอ้อยจากลูกหีบ	1
18	น้ำบริเวณร่องน้ำ (ร้อน)	-
19	น้ำอ้อยจากลูกหีบ 2	2
20	น้ำทิ้งบริเวณลูกหีบ 1	2
21	น้ำบริเวณพื้นในโรงงาน	1
22	น้ำในร่องน้ำร้อน	1
23	โคลนที่พื้นโรงงาน	1
รวม	23	23

ตารางที่ 4–6 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริษัทไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สปีชีส์ที่แยกได้	จำนวน (สายพันธุ์)	ตัวแทน/Genbank Accession no. (LSU D1/D2)	สปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว (Genbank accession no.), DNA sequence Identity (%)
Pichia manshurica	5	G30-2-1-2 (LC170423)	*Pichia manshurica* (EF550223) (99.8%)
Candida ethanolica	6	G30-2-2-1 (LC170424)	*Candida ethanolica* (U71073) (100%)
Saccharomyces cerevisiae	13	G30-2-2-2 (LC170425)	Saccharomyces cerevisiae (AY048154) (100%)
Pichia kudriavzevii	3	G30-2-4-3 (LC170426)	*Pichia kudriavzevii* (EF550222) (99.6%)
Kluyveromyces marxianus	2	G30-2-16-2 (LC170427)	*Kluyveromyces marxianus* (U94924) (100%)

ตารางที่ 4–7 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริษัทไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สปีชีส์ที่แยกได้	จำนวน (สายพันธุ์)	ตัวแทน/Genbank Accession no. (LSU D1/D2)	สปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว (Genbank accession no.), DNA sequence Identity (%)
Pichia kudriavzevii	8	G40-2-1-1 (LC170428)	*Pichia kudriavzevii* (EF550222) (100%)
Ogataea polymorpha	7	G40-2-2-1 (LC170429)	*Ogataea polymorpha* (EU011622) (99.8%)
Saccharomyces cerevisiae	4	G40-2-3-3 (LC170430)	*Saccharomyces cerevisiae* (AY048154) (100%)
Kluyveromyces marxianus	4	G40-2-3-4 (LC170474)	*Kluyveromyces marxianus* (U94924) (99.8%)
Candida nivariensis	1	G40-2-7-1 (LC170431)	*Candida nivariensis* (AY627305) (100%)
Schizasaccharomyces pombe	1	G40-2-10-2 (LC170432)	*Schizasaccharomyces pombe* (AY048171) (100%)

ตารางที่ 4–8 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริษัทน้ำตาลครบุรีจำกัดมหาชนที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สปีชีส์ที่แยกได้	จำนวน (สายพันธุ์)	ตัวแทน/Genbank Accession no. (LSU D1/D2)	สปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว (Genbank accession no.), DNA sequence Identity (%)
Saccharomyces cerevisiae	7	G40-6-2-2 (LC170433)	*Saccharomyces cerevisiae* (AY048154) (100%)
Ogataea polymorpha	10	G40-6-7 (LC170434)	*Ogataea polymorpha* (EU011622) (100%)
Kluyveromyces marxianus	3	G40-6-11 (LC170435)	*Kluyveromyces marxianus* (U94924) (99.8%)

ตารางที่ 4–9ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากโรงงานน้ำตาลราชสีมาที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สปีชีส์ที่แยกได้	จำนวน (สายพันธุ์)	ตัวแทน/Genbank Accession no. (LSU D1/D2)	สปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว (Genbank accession no.), DNA sequence Identity (%)
Pichia kudriavzevii	2	G40-9-1 (LC170436)	*Pichia kudriavzevii* (EF550222) (100%)
Ogataea polymorpha	3	G40-9-3 (LC170437)	*Ogataea polymorpha* (EU011622) (99.4%)
Pichia manshurica	3	G40-9-5-1 (LC170438)	*Pichia manshurica* (EF550223) (100%)
Kluyveromyces marxianus	3	G40-9-7-2 (LC170439)	*Kluyveromyces marxianus* (U94924) (99.8%)
Saccharomyces cerevisiae	4	G40-9-10-3 (LC170440)	*Saccharomyces cerevisiae* (AY048154) (100%)

ตารางที่ 4–10 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริษัทอุตสาหกรรมน้ำตาลทีเอ็นจำกัดที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สปีชีส์ที่แยกได้	จำนวน (สายพันธุ์)	ตัวแทน/Genbank Accession no.(LSU D1/D2)	สปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว (Genbank accession no.), DNA sequence Identity (%)
Ogataea polymorpha	5	G40-10-2 (LC170441)	*Ogataea polymorpha* (EU011622) (99.4%)
Kluyveromyces marxianus	7	G40-10-4-2 (LC170442)	*Kluyveromyces marxianus* (U94924) (99.8%)
Saccharomyces cerevisiae	2	G40-10-13-1 (LC170443)	*Saccharomyces cerevisiae* (AY048154) (100%)
Pichia kudriavzevii	1	G40-10-19-1 (LC170444)	*Pichia kudriavzevii* (EF550222) (100%)
Pichia manshurica	1	G40-10-19-3 (LC170445)	*Pichia manshurica* (EF550223) (99.8%)

ตารางที่ 4–11 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากบริษัทน้ำตาลสระบุรีจำกัดที่อุณภูมิ 40 องศาเซลเซียส

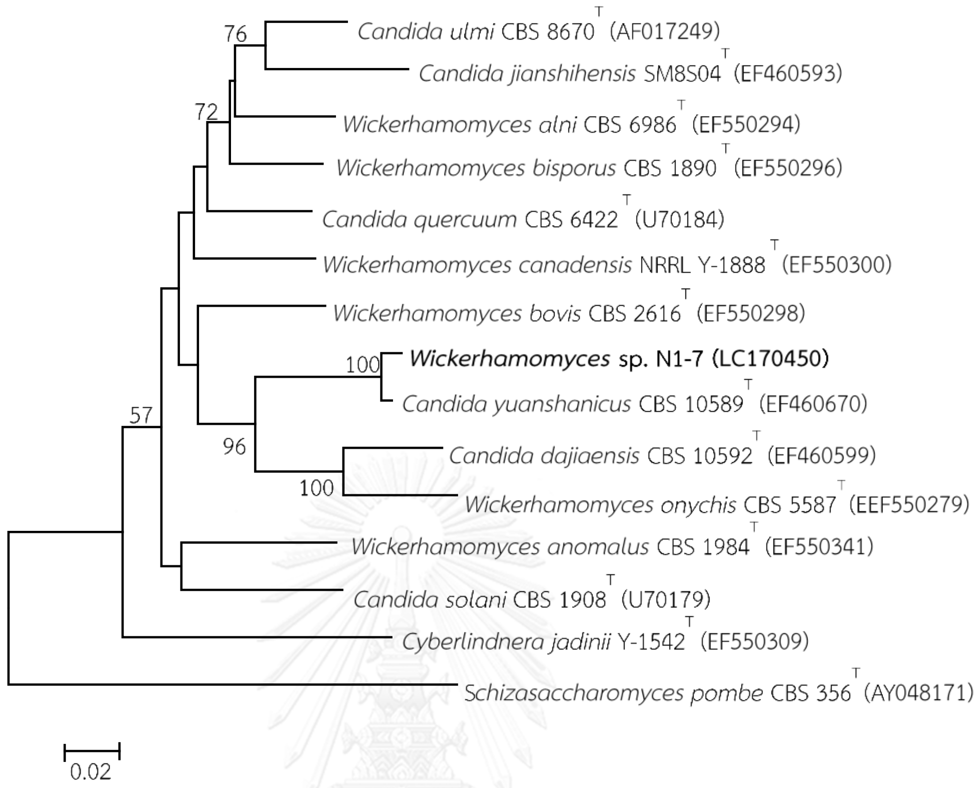
สปีชีส์ที่แยกได้	จำนวน (สายพันธุ์)	ตัวแทน/Genbank Accession no.(LSU D1/D2)	สปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว (Genbank accession no.), DNA sequence Identity (%)
Kluyveromyces marxianus	8	G40-11-5 (LC170446)	*Kluyveromyces marxianus* (U94924) (99.1%)
Saccharomyces cerevisiae	10	G40-11-19-1 (LC170447)	*Saccharomyces cerevisiae* (AY048154) (99.6%)
Pichia manshurica	2	G40-11-19-2 (LC170448)	*Pichia manshurica* (EF550223) (99.5%)
Ogataea polymorpha	3	G40-11-11-1 (LC170449)	*Ogataea polymorpha* (EU011622) (99.5%)

4.1.2 ผลการคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญจากป่าพรุหนองจำรุง

ตัวอย่างดินและน้ำจากป่าพรุหนองจำรุง ต.ซากพง อ.แกลง จ.ระยอง ทั้งหมด 59 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ทั้งหมด 27 ไอโซเลต เมื่อนำมาระบุชื่อเชื้อตามข้อมูลลำดับดีเอ็นเอตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แบ่งเป็น 7 จีนัส 9 สปีชีส์ คือ *Candida sojae, Candida maltose, Meyerozyma caribbica, Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus*, *Candida pseudolambica, Cyberlindnera subsufficiens, Zygoascus hellenicus* var. *hellenicus, Blastobotrys raffinofermentans* และ *Zygoascus meyerae* (ตารางที่ 4-12) จากผลการระบุชื่อเชื้อพบว่า *C. sojae* เป็นยีสต์ที่พบมากที่สุดคิดเป็น 51.9% ของยีสต์ที่แยกได้จากป่าพรุทั้งหมด นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์ N1-7 อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่จัดอยู่ใน *Wickerhamomyces* Clade มีความใกล้เคียงกับสปีชีส์ *Candida yuanshanicus* มากที่สุด โดยมี %identity ของตำแหน่ง D1/D2 ระหว่างยีสต์ที่คาดว่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ *Wickerhamomyces* sp. N1-7 และ *C. yuanshanicus* เท่ากับ 98.0% และมีความแตกต่างของ Nucleotide substitution เท่ากับ 8 หรือเท่ากับ 1.4% sequence Divergence และแตกต่างจาก *Wickerhamomyces rabaulensis* เท่ากับ 89% identity มี 57 nucleotides substitution และ 9.7% sequence Divergence โดยทั่วไปการพิจารณาว่ายีสต์ที่คัดแยกได้นั้นเป็นยีสต์สปีชีส์ใด สามารถทำได้โดยการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของยีสต์ที่ไม่ทราบสปีชีส์นั้นกับฐานข้อมูลออนไลน์ที่ปรากฏอยู่ในเวปไซต์ DNA DataBank of Japan (DDBJ) European Molecular Biology Laboratory (EMBL) และ GenBank at NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTn ลำดับดีเอ็นเอของยีสต์ไม่ทราบสปีชีส์กับของยีสต์ที่นำมาเปรียบเทียบมีความแตกต่างกันน้อยกว่าหรือเท่ากับ 3 nucleotides substitution แสดงว่ายีสต์ทั้งสองชนิดเป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกัน แต่ถ้าหากลำดับเอ็นเอของยีสต์ทั้งสองชนิดนั้นมีความแตกต่างกันมากกว่าหรือเท่ากับ 6 nuclrotides substitution (1% divergence) แสดงว่ายีสต์สองชนิดนั้นเป็นยีสต์ต่างชนิดกัน (Fell et al., 2000) จากแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการของ *Wickerhamomyces* sp. N1-7 และยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียงพบว่า *Wickerhamomyces* sp. N1-7 แยกออกจาก *C. yuanshanicus* อย่างชัดเจนโดยค่า Bootstrap เท่ากับ 100% (รูปที่ 4-1)

ตารางที่ 4–12 ผลการระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากป่าพรุหนองจำรุง

สปีชีส์ที่แยกได้	จำนวน (สายพันธุ์)	ตัวแทน/Genbank Accession no. (LSU D1/D2)	สปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว (Genbank accession no.), DNA sequence Identity (%)
Candida sojae	14	N1-1 (LC170451)	*Candida sojae* (U71070) (99.5%)
Candida maltosa	2	N2-1-1 (LC170452)	*Candida moltosa* (U45745) (99.6%)
Meyerozyma caribbica	2	N8-1 (LC170453)	*Meyerozyma caribbica* (EU348786) (100%)
Schwanniomyces polymorphus var. *africanus*	3	N3-1-1 (LC170454)	*Schwanniomyces polymorphus* var. *africanus* (AB054994) (100%)
Candida pseudolambica	1	N5-4 (LC170455)	*Candida pseudolambica* (U71063) (99.5%)
Cyberlindnera subsufficiens	1	N5-13 (LC170456)	*Cyberlindnera subsufficiens* (U75960) (99.5%)
Zygoascus hellenicus var. *hellenicus*	1	N6-1 (LC170457)	*Zygoascus hellenicus* var. *hellenicus* (AY447006) (100%)
Blastobotrys raffinofermentans	1	N8-3 (LC170458)	*Blastobotrys raffinosifermentans* (DQ442698) (99.5%)
Zygoascus meyerae	1	N2-5 *(LC170459)*	*Zygoascus meyerae (AY447006) (99.8%)*
Wickerhamomyces sp.	1	N1-7 (*LC170450)*	*Candida yuanshanicus (EF460670) (98.0%)*

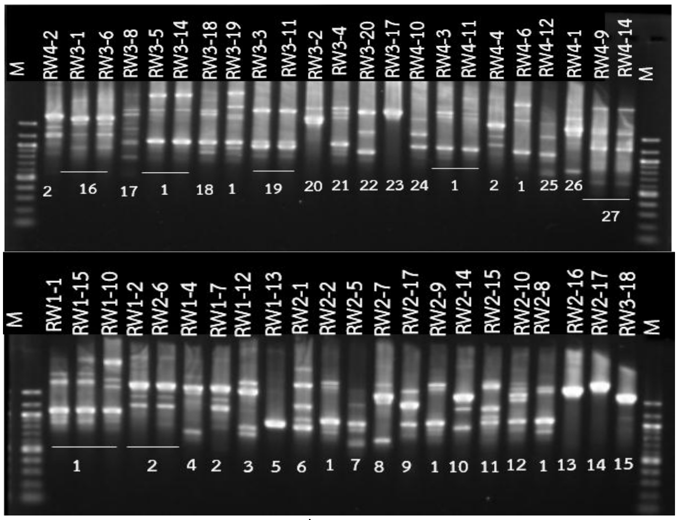


รูปที่ 4–1แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ Wickerhamomyces sp. N1-7 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งของแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงผลของค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number และกำหนดให้ Schizasaccharomyces pombe เป็น out group

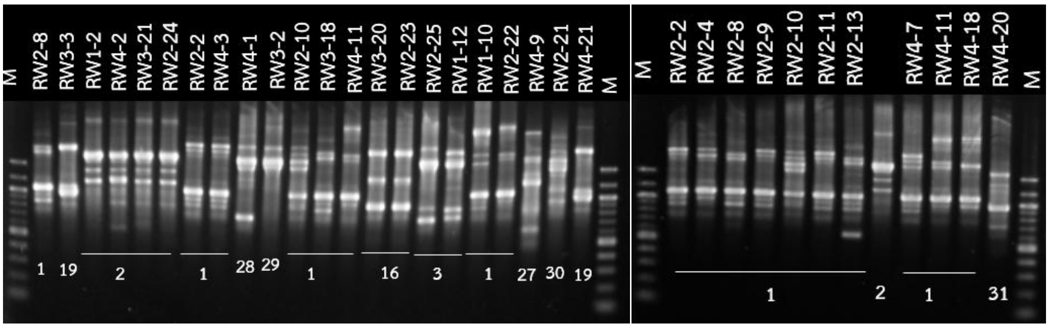
4.1.3 ผลการคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญจากตัวอย่างแมลง

จากตัวอย่างแมลงทั้งหมด 14 ตัวอย่าง แบ่งออกเป็นด้วงงวงมะพร้าว 8 ตัวอย่าง และแมลงกุดจี่ยักษ์ 6 ตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ทั้งหมด 178 ไอโซเลต โดยแบ่งเป็นยีสต์ที่แยกจากด้วงงวงมะพร้าว 82 ไอโซเลต และยีสต์ที่แยกจากแมลงกุดจี่ยักษ์ 96 ไอโซเลต ผลจากทดสอบความสามารถใช้น้ำตาลไซโลสเพื่อการเจริญโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งพบว่ายีสต์ส่วนใหญ่ที่แยกได้ (167 ไอโซเลต) สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียวเพื่อการเจริญได้

ผลจากการจัดกลุ่มตามรูปแบบของ PCR finger print ยีสต์ที่แยกจากด้วงงวงมะพร้าวสามารถจัดกลุ่มได้ 31 รูปแบบ (รูปที่ 4-2) เมื่อเลือกตัวแทนของยีสต์จากแต่ละรูปแบบ PCR finger print มาพิสูจน์เอกลักษณ์ของด้วยลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA พบว่าเป็นยีสต์ทั้งหมด 6 จีนัส 15 สปีชีส์ คือ *Candida sorboxylosa, C. tropicalis, Candida akabanensis, Candida stellimalicola, Candida boidinii, Candida intermedia, Cyberlindnera jadinii, C. ethanolica*, *Ogataea thermomethanolica, Zygoascus hellenicus, Candida psuedointermedia, Candida quercitrusa, Hanseniaspora thailandica, Hanseniaspora opuntiae* และ *Trichosporon mycotoxinivorans* ยีสต์ที่พบมากที่สุดคือ *C. sorboxylosa* (26 สายพันธุ์) คิดเป็น 30% ของยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้ นอกจากนี้ยังพบว่าจากจำนวนยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมด สายพันธุ์ RW2-7, RW2-10, RW3-2, RW2-21, RW2-23, RW4-9, RW4-14 และ RW4-19 อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่อย่างน้อย 6 สปีชีส์ ซึ่งจัดอยู่ในจีนัส *Cyberlindnera, Candida* และ *Ogataea* (ตารางที่ 4-13)



รูปที่ 4–2 รูปแบบ PCR finger print ของยีสต์ที่แยกได้จากด้วงงวงมะพร้าว

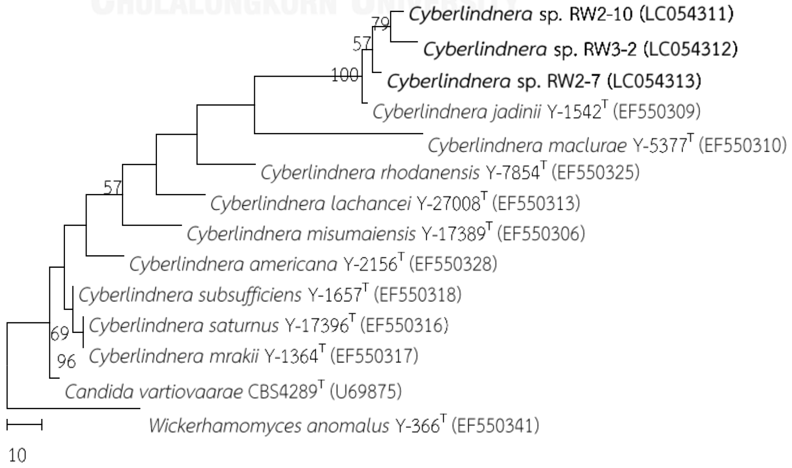


รูปที่ 4-2 (ต่อ) รูปแบบ PCR finger print ของยีสต์ที่แยกได้จากด้วงงวงมะพร้าวโดยเทคนิคพีซีอาร์ด้วยไมโครแซทเทิลไลท์ไพร์เมอร์จีทีจีไฟฟ์

สายพันธุ์ RW2-7, RW2-10 และ RW3-2 คาดว่าจะเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ในจีนัส *Cyberlindnera* โดยสายพันธุ์ RW2-7, RW2-10 และ RW3-2 มีความใกล้เคียงกับสปีชีส์ *Cyberlindnera jadinii* มากที่สุด เมื่อเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU ด้วยโปรแกรม BLASTn homology search ระหว่างยีสต์สายพันธุ์ RW2-7, RW2-10, RW3-2 และ *Cy. jadinii* พบว่าลำดับดีเอ็นเอตำแหน่ง D1/D2 ของไอโซลเลต RW2-7 แตกต่างจาก *Cy. jadinii* เท่ากับ 6 nucleotides substitution หรือ 1.04% sequence divergence (99% identity) ลำดับดีเอ็นเอตำแหน่ง D1/D2 ของสายพันธุ์ RW 2-10 แตกต่างจาก *Cy. jadinii* เท่ากับ 8 nucleotides substitution หรือ 1.38% sequence divergence (98% identity) และ ลำดับดีเอ็นเอตำแหน่ง D1/D2 ของสายพันธุ์ RW 3-2 แตกต่างจาก *Cy. jadinii* เท่ากับ 18 nucleotides substitution หรือ 3.12% sequence divergence (98% identity) จึงทำให้สันนิษฐานได้ว่าสายพันธุ์ RW2-7, RW2-10 และ RW3-2 เป็นยีสต์ต่างสปีชีส์กับ *Cy. jadinii* และคาดว่าทั้งสามสายพันธุ์อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ และจากแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการชนิด Maximum parsimony (Maximum parsimony phylogenetic tree) พบว่ายีสต์ทั้งสามสายพันธุ์แยกออกจาก *Cy. jadinii* อย่างชัดเจน โดยมีค่า Bootstrap เท่ากับ 100% และแบ่งเป็น 2 sub branches คือสายพันธุ์ RW3-2 และ RW2-7 (รูปที่ 4-3) เมื่อเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์พบว่ายีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ไม่ใช่ยีสต์สปีชีส์เดียวกัน เนื่องจากยีสต์แต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันของดีเอ็นเอมากกว่า 6 nucleotides substitution โดยสายพันธุ์ RW2-7 แตกต่างจากสายพันธุ์ RW2-10 เท่ากับ 9 nucleotides substitution (1.56% sequence divergence, 98% identity) และแตกต่างจากสายพันธุ์ RW3-2 เท่ากับ 9 nucleotides substitution (2.77% sequence divergence, 97% similarity) ไอโซเลต RW2-10 แตกต่างจากสายพันธุ์ RW3-2 เท่ากับ 8 nucleotides substitution (1.38% sequence divergence, 98% identity) จากแผนภูมิต้นไม้

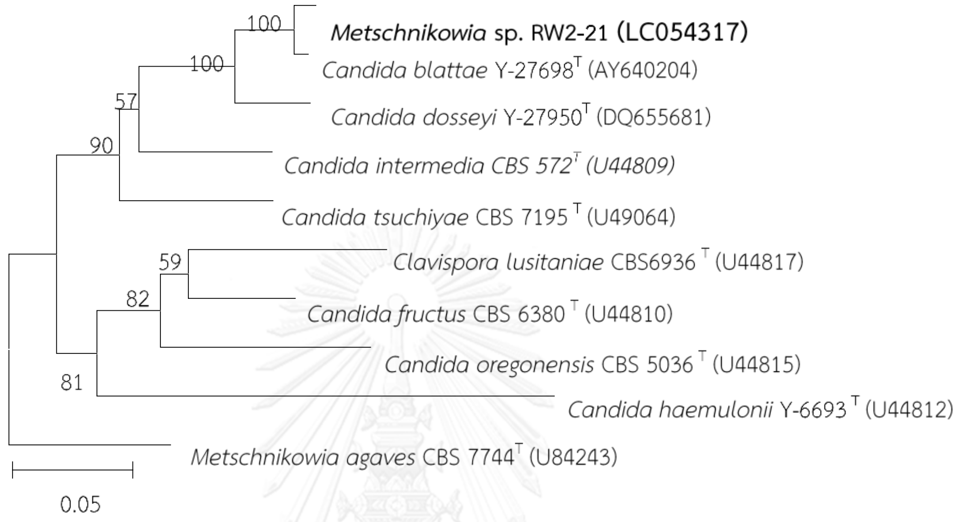
เชิงวิวัฒนาการ (รูปที่ 4-3) พบว่ายีสต์ทั้งสามสายพันธุ์แยกออกจากกันอย่างชัดเจนด้วยค่า Bootstrap มากกว่า 57%

สายพันธุ์ RW2-21 และ สายพันธุ์ RW2-23 คาดว่าอาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่อยู่ใน *Metschnikowia* clade โดยสายพันธุ์ RW2-21 มีความใกล้เคียงกับ *Candida blattae* มากที่สุด ส่วนสายพันธุ์ RW2-23 มีความใกล้เคียงกับ *Candida wancherniae* มากที่สุด ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของสายพันธุ์ RW2-21 และ *C. blattae* มีความแตกต่างกันเท่ากับ 9 nucleotides substitution (1.75% sequence divergence, 98% identity) จากแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการชนิด Neighbor-joining พบว่าสายพันธุ์ RW2-21 แยกออกจาก *C. blattae* อย่างชัดเจนโดยมีค่า Bootstrap เท่ากับ 100% (รูปที่ 4-4) ความแตกต่างของลำดับดีเอ็นที่ตำแหน่ง D1/D2 ระหว่างสายพันธุ์ RW2-23 และ *C. wancherniae* เท่ากับ 23 nucleotides substitution (4.21% sequence divergence, 96% identity) จากแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการด้วยวิธี Neighbor-joining พบว่าสายพันธุ์ RW2-23 แยกออกจาก *C. wancherniae* อย่างชัดเจนโดยมีค่า Bootstrap เท่ากับ 71% (รูปที่ 4-5) ยีสต์หลายสปีชีส์ในกลุ่ม *Metschnikowia* Clade ถูกจัดเป็นยีสต์ที่มีความสัมพันธ์กับแมลงที่อาศัยอยู่ในดอกไม้ หรือเป็นยีสต์ที่อาศัยอยู่ในดอกไม้ตัวอย่างเช่น *Metschnikowia aberdeeniae* อยู่ร่วมกับแมลงที่อยู่ในดอก morning glory ในบริเวณ equatorial Africa(Lachnace et al., 2006b) *Metschnikowia arizonensis* พบอยู่ร่วมกับด้วงในวงศ์ Nitidulidae (Lachance & Bowles, 2002) และ *Metschnikowia reukaufii* สามารถพบได้จากเกสรดอกไม้หลายชนิด (Pitt & Miller, 1968) เป็นต้น



รูปที่ 4–3 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum parsimony โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและ

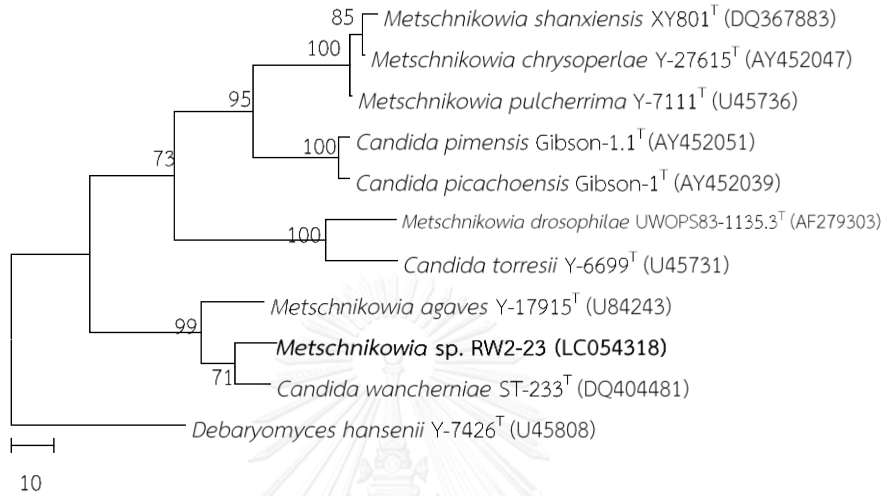
ความสัมพันธ์ของ Cyberlindnera sp., RW2-7, RW2-10 และ RW3-2 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งของแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number และกำหนดให้ Wickerhamomyces anomalus เป็น out group



รูปที่ 4–4 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ Metschnikowia sp., RW2-21 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งของแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number และกำหนดให้ Metschnikowia agaves เป็น out group

จากผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของสายพันธุ์ RW4-9, RW4-14 และ RW4-19 ด้วยโปรแกรม BLASTn homology search พบว่าทั้งสามสายพันธุ์อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ที่อยู่ใน *Ogataea* clade เนื่องจากลำดับดีเอ็นเอของทั้งสามสายพันธุ์ มีความแตกต่างจากยีสต์ในสปีชีส์ใกล้เคียงมากกว่า 6 โดยมี *Candida cylindracea* เป็นยีสต์ที่มีความใกล้เคียงกับทั้งสามสายพันธุ์นี้มากที่สุด โดยลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 แตกต่างจาก *Candida cylindracea* เท่ากับ 9 nucleotides substitution (1.60% DNA sequence divergence, 98% identity) จากแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการชนิด Neighbor-joining แสดงให้เห็นว่ายีสต์ทั้งสามไอโซเลตแยกออกจาก *Candida cylindracea* และสปีชีส์ใกล้เคียงอื่นๆอย่างชัดเจนด้วยค่า Bootstrap

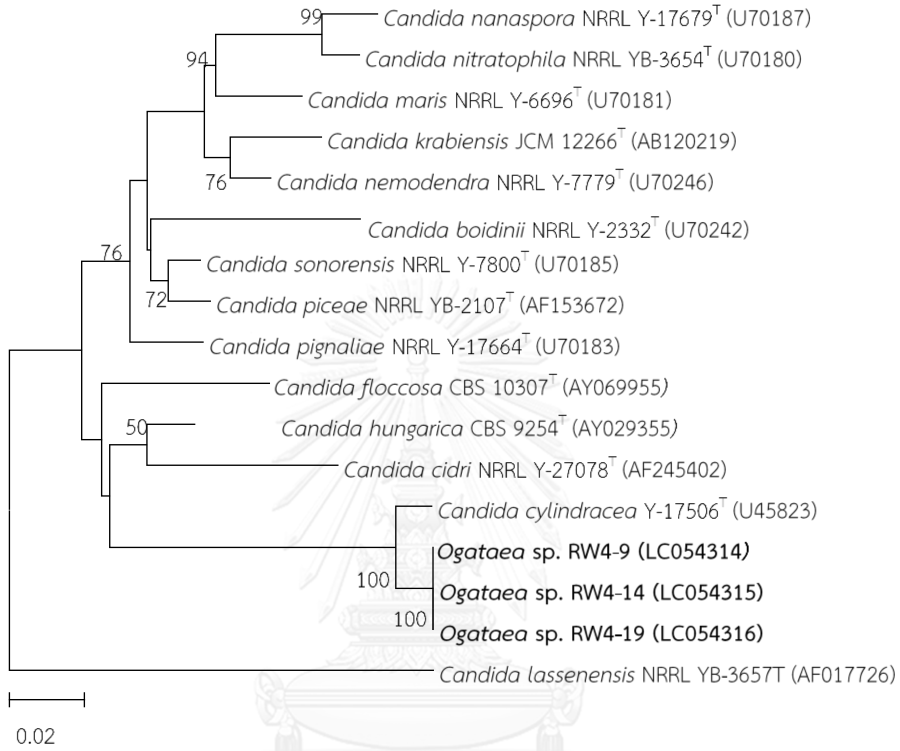
เท่ากับ 100% (รูปที่ 4-6) และเมื่อเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์พบว่าเป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกัน (100% identity)



รูปที่ 4–5แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ Metschnikowia sp., RW2-23 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งของแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number และกำหนดให้ Debaryomyces hansenii เป็น out group

Abe และคณะ (2010) ศึกษายีสต์ที่อาศัยร่วมกับด้วงงวงมะพร้าวในจังหวัดคาโงะชิมะ ประเทศญี่ปุ่น โดยคัดแยกยีสต์จากชิ้นส่วนของต้นปาล์มที่ถูกด้วงงวงมะพร้าวทำลาย ตัวอ่อนด้วงงวงมะพร้าว ดักแด้ และตัวเต็มวัย พบว่ายีสต์ที่อาศัยร่วมกับด้วงงวงมะพร้าวและต้นปาล์มที่ถูกทำลายคือยีสต์ในสปีชีส์ *Candida tropicalis, Candida ethanolica, Candida guilliermondii* และ *Candida utilis* เนื่องจากด้วงงวงมะพร้าวเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีถิ่นกำเนิดในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ จึงทำให้พบด้วงงวงมะพร้าวในเขตอากาศร้อนมากกว่าเขตอากาศหนาว ตั้งแต่ปีค.ศ. 1970 เริ่มมีการแพร่ระบาดของด้วงงวงมะพร้าวไปยังภูมิภาคอื่นๆของโลกตั้งแต่ เอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เอเชียตะวันออก เอเชียตะวันตก อเมริกาเหนือ และยุโรป เนื่องจากการซื้อขายต้นปาล์ม โดยทั่วไปด้วงงวงมะพร้าวมักจะตายหรือมีกิจกรรมลดลงในช่วงที่มีอุณหภูมิต่ำ ในขณะที่ด้วงงวงมะพร้าวทำลายเนื้อเยื่อต้นปาล์มเพื่อสร้างโพรงสำหรับอยู่อาศัยส่งผลให้เกิดการแพร่กระจายของยีสต์สู่เนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย

การเจริญเติบโตและการหมักน้ำตาลของยีสต์ในโพรงที่อยู่อาศัยของด้วงงวงมะพร้าวทำให้อุณหภูมิภายในโพรงเพิ่มสูงขึ้นและเหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของด้วงงวงมะพร้าว ดังนั้นจึงทำให้ด้วงงวงมะพร้าวมีชีวิตรอดได้ในช่วงที่อุณหภูมิลดต่ำ (Abe et al., 2010)



รูปที่ 4–6 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ Ogataea sp., RW4-9, RW4-14 และ RW4-19 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งของแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number และกำหนดให้ Candida lassenensis เป็น out group

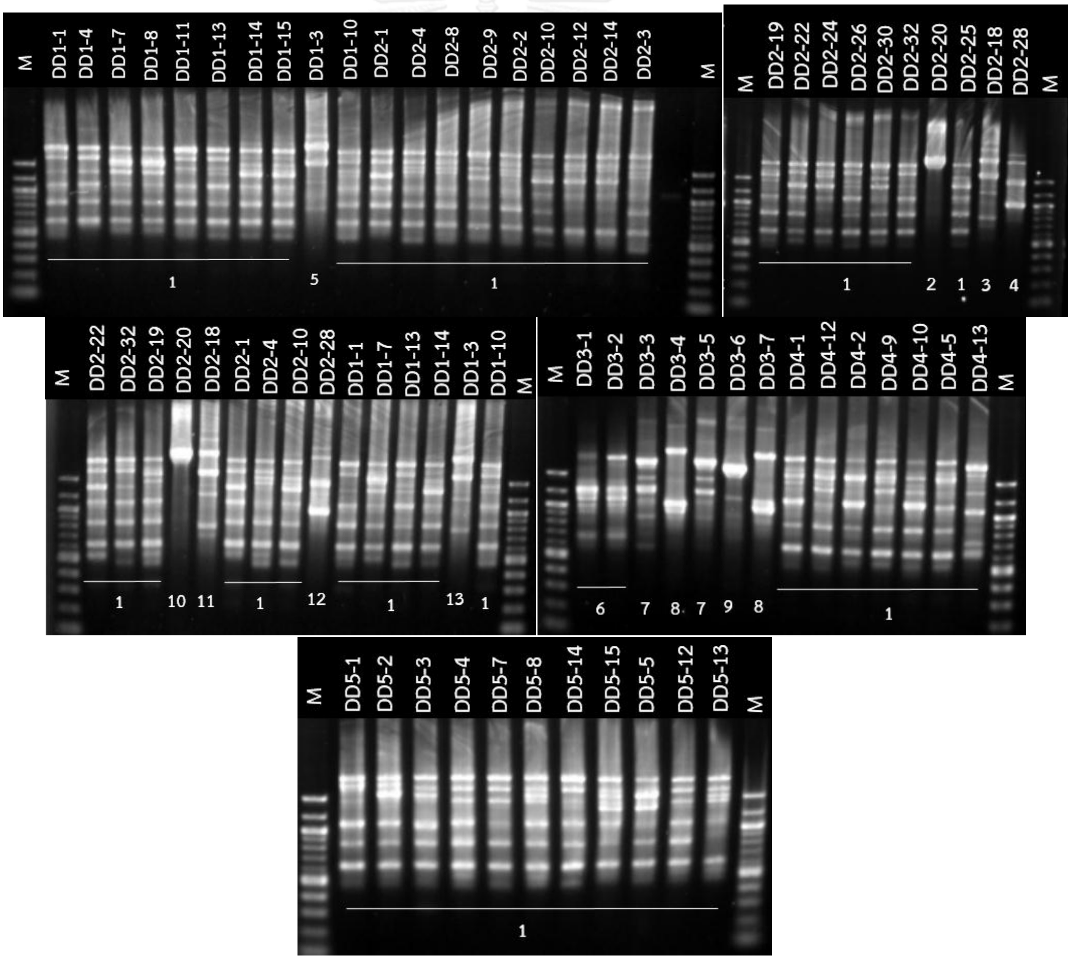
ตารางที่ 4–13 การระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากด้วงงวงมะพร้าว (Rhynchophorus ferrugineus)

สปีชีส์ที่แยกได้	จำนวน (สายพันธุ์)	ตัวแทน/Genbank Accession no. (LSU D1/D2)	สปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว (Genbank accession no.), DNA sequence Identity (%)
Candida sorboxylosa	26	RW4-7 (LC054319)	*Candida sorboxylosa* (U62314) (99.5%)
Candida tropicalis	22	RW1-2 (LC170460)	*Candida tropicalis* (U45749) (100%)
Cadida akabanensis	2	RW3-1 (LC170461)	*Candida akabanensis* (EU100744) (99.8%)
Candida stellimalicola	6	RW3-3 (LC170462)	*Candida stellimalicola* (EF550286) (100.0%)
Candida boidinii	5	RW4-12 (LC170463)	*Candida boidinii* (U70242) (100.0%)
Candida intermedia	2	RW4-8 (LC170464)	*Candida intermedia* (U44809) (99.6%)
Cyberlindnera jadinii	3	RW1-4 (LC170465)	*Cyberlindnera jadinii* (EF550309) (99.8%)
*Cyberlindner*a sp.	1	RW3-2 (LC054312)	*Cyberlindnera jadinii* (EF550309) (98.0)
Cyberlindnera sp.	1	RW2-7 (LC054313)	*Cyberlindnera jadinii* (EF550309) (99.0%)
Cyberlindnera sp.	1	RW2-10 (LC054311)	*Cyberlindnera jadini*i (EF550309) (98.0%)
Metschnikowia sp.	1	RW2-21 (LC054317)	*Candida blattae* (AY640204) (98.0%)
Metschnikowia sp.	1	RW2-23 (LC054318)	*Candida wancherniae* (DQ404481) (96.0%)
Ogataea sp.	3	RW4-14 (LC054315)	*Candida cylindracea* (U45823) (96.0%)
Candida ethanolica	1	RW1-13 (LC170466)	*Candida ethanolica* (U71073) (99.0%)
Ogataea thermomethanolica	1	RW2-14 (LC170467)	*Ogataea thermomethanolica* (AB200285) (99.0%)

ตารางที่ 4-13 (ต่อ) การระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากด้วงงวงมะร้าว (*Rhynchophorus ferrugineus*)

สปีชีส์ที่แยกได้	จำนวน (สายพันธุ์)	ตัวแทน/Genbank Accession no.(LSU D1/D2)	สปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว (Genbank accession no.), DNA sequence Identity (%)
Zygoascus hellenicus	1	RW2-16 (LC170468)	*Zygoascus hellenicus* (DQ438216) (99.0%)
Candida psuedointermedia	1	RW2-17 (LC170469)	*Candida pseudointermedia* (U44809) (99.0%)
Candida quercitrusa	1	RW2-18 (LC170470)	*Candida quercitrusa* (U45831) (99.0%)
Hanseniaspora thailandica	1	RW3-8 (LC170471)	*Hanseniaspora thailandica* (DQ404527) (100.0%)
Hanseniaspora opuntiae	1	RW3-17 (LC170472)	*Hanseniaspora opuntiae* (AJ512453) (99.0%)
Trichosporon mycotoxinivorans	2	RW2-15 (LC170473)	*Apiotrichum mycotoxinivorans* (AJ601388) (100.0%)

ยีสต์ที่คัดแยกได้จากแมลงกุดจี่ยักษ์ทั้งหมด 96 ไอโซเลตสามารถจัดกลุ่มตามรูปแบบของ PCR finger print ได้ 13 รูปแบบ (รูปที่ 4-7) เมื่อเลือกตัวแทนของยีสต์จากแต่ละรูปแบบ PCR finger print มาพิสูจน์เอกลักษณ์ของด้วยลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA พบว่ามียีสต์ทั้งหมด 5 จีนัส และอย่างน้อย 8 สปีชีส์คือ *Candida glabrata, C. tropicalis, Candida stellimalicola, Candida orthopsilosis, Galactomyces* sp., *Trichosporon* sp., *Saccharomycetes* sp. และ *Kurtzmaniella* sp. จากการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ด้วยลำดับดีเอ็นเอพบว่ายีสต์ส่วนใหญ่ที่แยกได้อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ (85 สายพันธุ์) ใน *Brassicae* clade จีนัส *Trichosporon* ซึ่งคัดแยกได้จากแมลงกุดจี่ยักษ์ 5 ตัวอย่างจากทั้งหมด 6 ตัวอย่าง นอกจากนั้นยังพบยีสต์ที่อาจจะเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ในจีนัส *Galactomyces* sp. (2 สายพันธุ์) *Saccharomycetes* sp. (1 สายพันธุ์) และ *Kurtzmaniella* sp. (1 สายพันธุ์) (ตารางที่ 4-14)



รูปที่ 4–7 รูปแบบ PCR finger print ของยีสต์ที่แยกได้จากแมลงกุดจี่ยักษ์โดยเทคนิคพีซีอาร์ ด้วยไมโครแซทเทิลไลท์ไพร์เมอร์จีทีจีไฟฟ์ (microsatellite primer $(GTG)_5$)

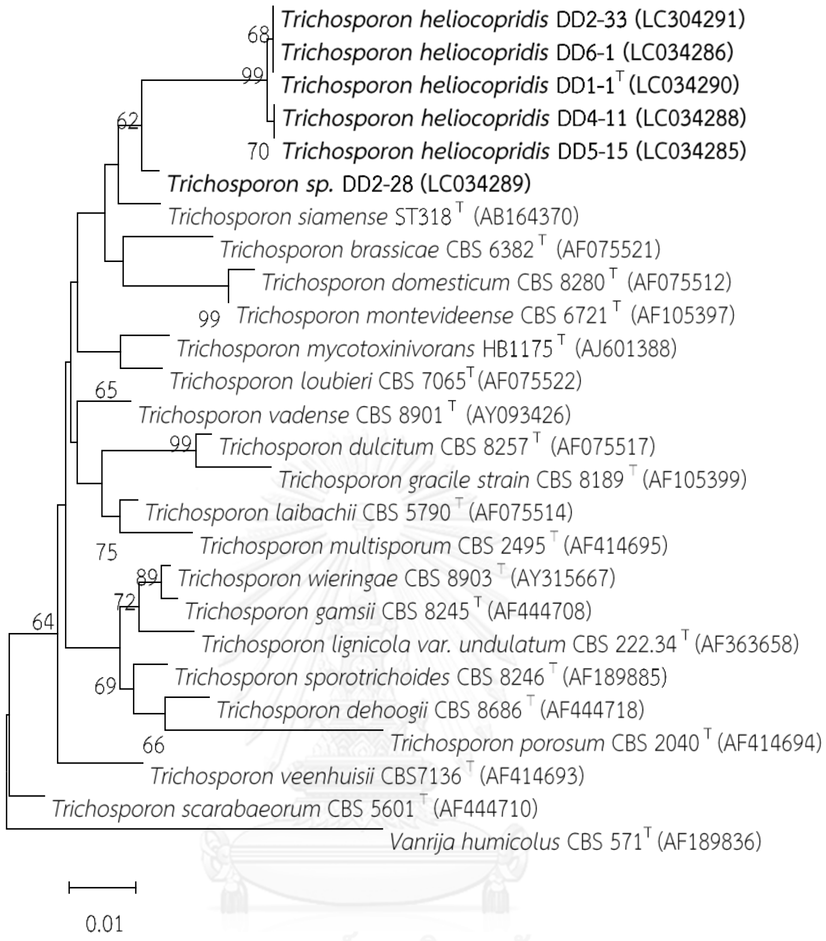
จากการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA ของยีสต์ 96 สายพันธุ์ ที่แยกได้พบว่ายีสต์ 85 สายพันธุ์อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ในจีนัส *Trichosporon* และ 84 สายพันธุ์จาก 85 สายพันธุ์เป็นยีสต์สปีชีส์เดียวกันเนื่องจากมีความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 น้อยกว่า 3 nucleotides substitution ยกเว้นสายพันธุ์ DD2-28 ที่มีลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 แตกต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ (84 สายพันธุ์) เท่ากับ 12 nucleotides substitution หรือ 2.0 % sequence divergence (95% identity) จากการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของยีสต์ที่อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ในจีนัส *Trichosporon* กับฐานข้อมูลออนไลน์ที่ปรากฏอยู่ในเวปไซต์ DNA DataBank of Japan (DDBJ) European Molecular Biology Laboratory (EMBL) และ GenBank at NCBI โดยใช้โปรแกรม BLASTn พบว่ายีสต์ที่อาจเป็นสปีชีส์ใหม่ (84 สายพันธุ์) มีความใกล้เคียงกับ *Trichosporon veenhuisii* มากที่สุดโดยมีความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอของตำแหน่ง D1/D2 เท่ากับ 17 nucleotides substitution หรือ 2.86% sequence divergence (94% identity) ส่วนสายพันธุ์ DD2-28 มีความใกล้เคียงกับสปีชีส์ *Trichosporon siamense* มากที่สุด โดยมีความแตกต่างของลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 เท่ากับ 6 nucleotides substitution หรือ 1% sequence divergence (99% identity) คัดเลือกสายพันธุ์ DD1-1, DD2-33, DD4-11, DD5-15 และ DD6-1 เป็นตัวแทนของยีสต์สปีชีส์ใหม่ 84 สายพันธุ์ ผลการสร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการชนิด Neighbor-joining ของลำดับดีเอ็นเอตำแหน่ง D1/D2 ของยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์และสปีชีส์ใกล้เคียงพบว่าสายพันธุ์ DD1-1, DD2-33, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ DD2-28 จับกลุ่มอยู่กับ *T. siamense* และมีสปีชีส์ใกล้เคียงคือ *Trichosporon brassicae, Trichosporon domesticum* และ *Trichosporon montevideense* แต่มีค่า Bootstrap น้อยกว่า 50% (รูปที่ 4-8) เนื่องจากลำดับดีเอ็นเอของสายพันธุ์ DD1, DD2-33, DD4-11, DD5-15, DD6-1, DD2-28 และสปีชีส์ใกล้เคียงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงสร้างต้นไม้เชิงวิวัฒนาการชนิด Maximum pasimony ของลำดับดีเอ็นเอตำแหน่ง D1/D2 และ ITS ของทั้ง 6 สายพันธุ์และสปีชีส์ใกล้เคียงพบว่าสายพันธุ์ DD1-1, DD2-33, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ DD2-28 แยกออกจากสปีชีส์อื่นๆที่อยู่ใกล้เคียงอย่างชัดเจน และตำแหน่งของสายพันธุ์ DD2-28 บนต้นไม้เชิงวิวัฒนาการอยู่ใกล้เคียงสายพันธุ์ DD1-1, DD2-33, DD4-11, DD5-15 และ DD6-1 ด้วยค่า Bootstrap เท่ากับ 59% (รูปที่ 4-9)

จากผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของยีสต์สายพันธุ์ DD3-1 และ DD3-2 ด้วยโปรแกรม BLASTn homology search พบว่าทั้งสองสายพันธุ์อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ในจีนัส *Galactomyces* โดยมี *Galactomyces geotrichum* เป็นสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงกับทั้งสอง

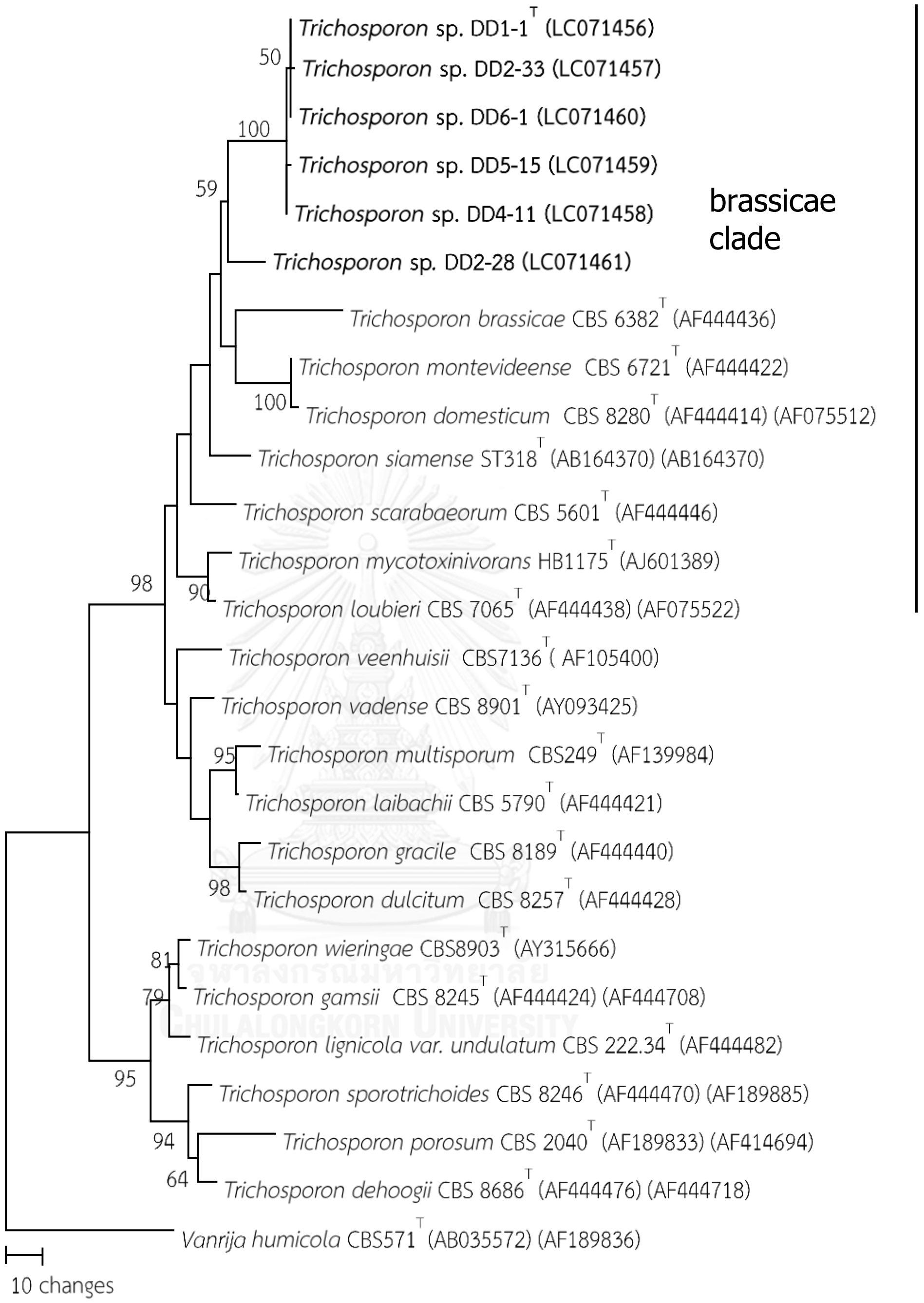
สายพันธุ์นี้มากที่สุดลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 มีความแตกต่างเท่ากับ 11 nucleotides substitution (2.01% sequence divergence, 97% identity)

จากผลการเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของสายพันธุ์ DD6-2 ด้วยโปรแกรม BLASTn homology search พบว่าสายพันธุ์ DD6-2 อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่โดยมี *Schwaniomyces occidentalis* เป็นสปีชีส์ที่มีความใกล้เคียงมากที่สุด ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 มีความแตกต่างเท่ากับ 38 nucleotides substitution (8.62% sequence divergence, 87% identity) แต่จากการสร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการระหว่างสายพันธุ์ DD6-2 กับยีสต์สปีชีส์อื่นๆในจีนัส *Schwaniomyces*, *Meyerozyma* และ *Debaryomyces* โดยกำหนดให้ *Pachysolen tannophilus* เป็น out group พบว่าสายพันธุ์ DD6-2 ไม่จับกลุ่มกับยีสต์ชนิดใดและแตกกิ่งห่างจากยีสต์อื่นๆในต้นไม้เชิงวิวัฒนาการ (รูปที่ 4-10) และเมื่อสร้างแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาของสายพันธุ์ DD6-2 กับ type species ของแต่ละจีนัสในไฟลัม Acomycota พบว่าตำแหน่งของสายพันธุ์ DD6-2 ไม่รวมกลุ่มกับยีสต์จีนัสใดจึงสันนิษฐานว่าสายพันธุ์ DD6-2 อาจเป็นยีสต์จีนัสใหม่ในคลาส Saccharomycetes

บทบาทของยีสต์ที่อาศัยอยู่ร่วมกับแมลงยังไม่ทราบแน่ชัดแต่สันนิษฐานว่ายีสต์อาจช่วยเพิ่มคุณค่าสารอาหาร หรือปรับปรุงคุณภาพของอาหารให้แก่แมลงโดยการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นแหล่งอาหารของแมลง ทำให้แมลงได้รับคาร์โบไฮเดรต เพิ่มปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็น และวิตามินบางชนิด นอกจากนี้ยังช่วยกำจัดสารพิษที่อยู่ในพืชทำให้แมลงสามารถกินพืชนั้นเป็นอาหารได้ ช่วยส่งเสริมให้เกิดภาวะที่เหมาะสมแก่การอยู่อาศัยของแมลง การใช้น้ำตาลของยีสต์ภายในลำไส้ของแมลงส่งเสริมให้เกิดภาวะ anaerobic ภายในลำไส้ของแมลงและเกื้อหนุนต่อการเจริญของ bacterial community ภายในลำไส้ของแมลง ส่วนยีสต์ได้รับผลประโยชน์คือแมลงช่วยแพร่กระจายยีสต์ไปยังแหล่งอาหารแหล่งใหม่ (*Abe et al.*, 2010; *Nardi et al.*, 2006; *Suh & Zhou*, 2011; *Vega & Dowd*, 2005) ชนิดของแมลงและพืชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความหลากหลายของยีสต์ที่อยู่อาศัยร่วมด้วย ยีสต์หลายสปีชีส์อยู่ร่วมแบบจำเพาะกับแมลงบางชนิด*(Berkov et al., 2007)* และ (*Gujjari et al.*, 2011) ตัวอย่างเช่น *Scffersomyces* spp. อยู่ร่วมกับ แมลงในวงศ์ *Passalidae* (Urbina & Blackwell, 2012) *Ambrosiozyma kamigamensis* และ *Ambrosiozyma neoplatypodis* อยู่ร่วมกับมอดแอมโบรเซีย (*Platypus quercivorus*) (*Endoh et al.*, 2007) *Metschnikowia bowlesiae* อยู่ร่วมกับแมลงปีกแข็ง nitidulid (*Conotelus mexicanus* และ *Prosopeus subaeneus*) (*Lachance & Fedor*, 2014)เป็นต้น

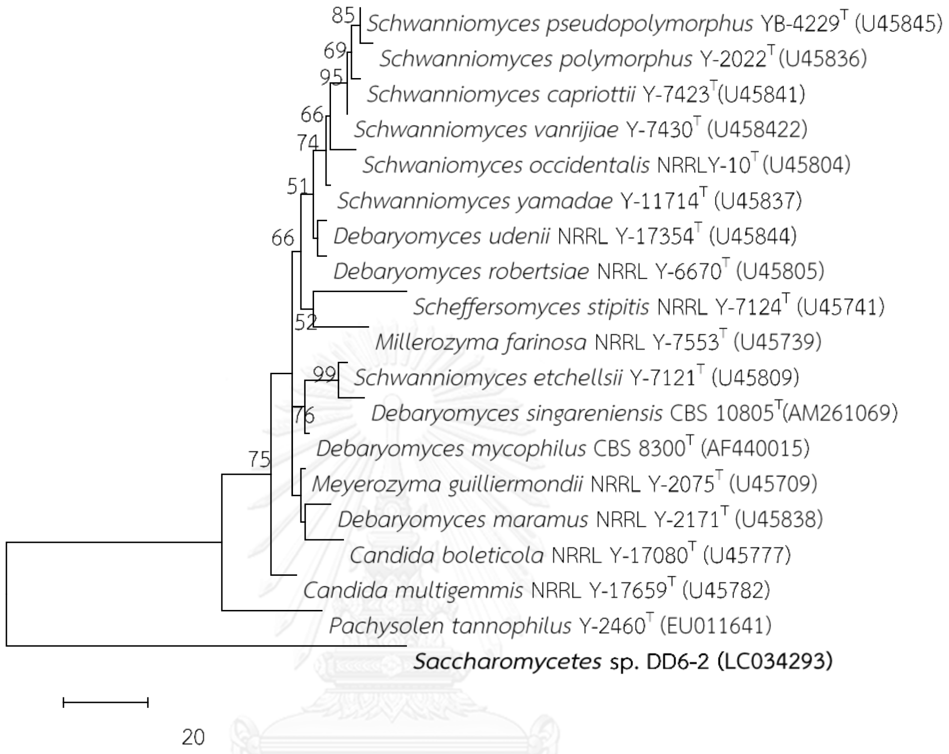


รูปที่ 4–8 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ Tricosporon sp., DD1-1, DD2-33, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ DD2-28 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งของแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number และกำหนดให้ Vanrija humicolus เป็น out group



รูปที่ 4–9แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Maximum parsimony โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA และ ITS แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ Tricosporon sp., DD1-1, DD2-33, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ DD2-28 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งของแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่

ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number ซ้าย (ITS) ขวา (D1/D2) และกำหนดให้ Vanrija humicolus เป็น out group



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4–10 แผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนาการจากผลการวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการด้วยวิธี Neighbor-joining โดยใช้ลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA แสดงตำแหน่งและความสัมพันธ์ของ Saccharomycetes sp., DD6-2 กับยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง ตัวเลขบริเวณกิ่งของแผนภูมิต้นไม้เชิงวิวัฒนการคือค่าเปอร์เซ็นต์ Bootstrap โดยเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอทั้งหมด 1000 ครั้ง (ไม่แสดงค่า Bootstrap ที่ต่ำกว่า 50%) ตัวเลขในวงเล็บคือ Genbank accession number

ตารางที่ 4–14 การระบุชื่อยีสต์ที่คัดแยกได้จากแมลงกุดจี่ยักษ์ (Heliocopridis bucephalus Farbricius)

สปีชีส์ที่แยกได้	จำนวน (สายพันธุ์)	ตัวแทน/Genbank Accession no. (LSU D1/D2)	สปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว (Genbank accession no.), DNA sequence Identity (%)
Trichosporon heliocopridis sp. nov.	84	DD1-1 (LC034290)	*Trichosporon veenhuisii* (AF105400) (94.1%)
Candida glabrata	2	DD2-20 (LC089705)	*Candida glabrata* (U44808) (99.8%)
Galactomyces sp.	2	DD3-1 (LC089706)	*Galactomyces geotrichum* (U40118) (97.6%)
Candida tropicalis	2	DD3-3 (LC089707)	*Candida tropicalis* (U45749) (100%)
Candida stellimalicola	2	DD3-4 (LC089708)	*Candida stellimalicola* (U84234) (100%)
Trichosporon sp.	1	DD2-28 (LC034289)	*Trichosporon siamense* (AB164370) (99.0%)
Saccharomycetes sp.	1	DD6-2 (LC034293)	-*
Candida orthopsilosis	1	DD4-13 (LC089709)	*Candida orthopsilosis* (FJ746056) (99.6%)
Kurtzmaniella sp.	1	DD3-6 (LC089710)	*Candida quercitrusa* (U45831) (99.1%)

* Identity น้อยกว่า 90% เมื่อเปรียบเทียบกับสปีชีส์ที่มีการรายงานแล้ว

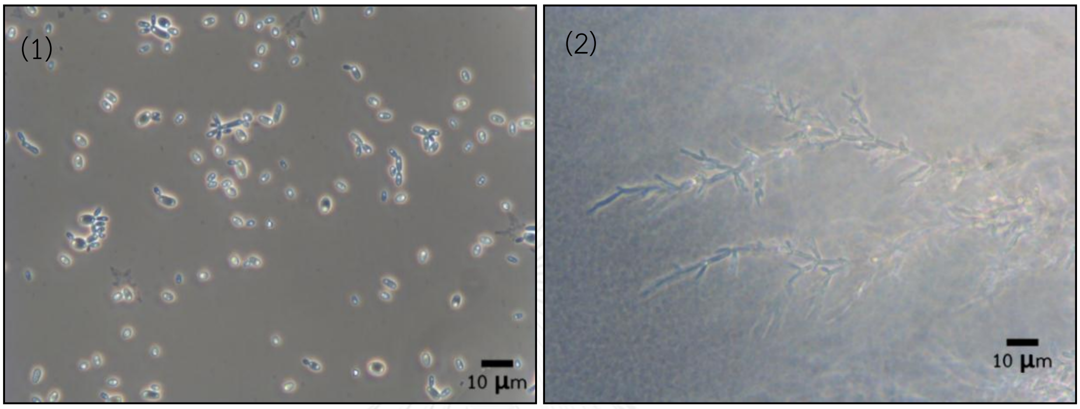
4.2 ผลการศึกษาลักษณะสัณฐานและสรีรวิทยาของยีสต์สปีชีส์ใหม่

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ด้วยข้อมูลลำดับดีเอ็นเอที่ตำแหน่ง D1/D2 ของ LSU rRNA คาดว่า 53.30% ของยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้ (97 สายพันธุ์) อาจเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาลักษณะสัณฐานและสรีรวิทยาเพื่อนำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ Type strain ของสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับยีสต์ซึ่งคาดว่าจะเป็นสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้ ซึ่งผลที่ได้จะนำไปใช้เป็นหลักฐานในการยืนยันผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของยีสต์ด้วยข้อมูลลำดับดีเอ็นเอต่อไป ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้คัดเลือกยีสต์สปีชีส์ใหม่ทั้งหมด 13 สายพันธุ์คือ *Cylindnera* sp. RW2-7, *Cylindnera* sp. RW2-10 *Cylindnera* sp. RW3-2, *Candida* sp. RW2-21, *Candida* sp. RW2-23, *Candida* sp. RW4-9, *Candida* sp. RW4-14, *Candida* sp. RW4-19, *Tricosporon* sp. DD1-1, *Tricosporon* sp. DD2-3, *Tricosporon* sp. DD4-11, *Tricosporon* sp. DD5-15 และ *Saccharomycetes* sp DD6-2 ไปศึกษาลักษณะสัณฐานและสรีรวิทยาได้แก่ ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง ลักษณะเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual cell) การสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual cell reproduction) ความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ 50 ชนิดเพื่อการเจริญเติบโต ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆเพื่อการเจริญเติบโต ความสามารถเจริญในอาหารปราศจากวิตามิน (Vitamin free medium) บนอาหารแข็งที่มีแรงดันออสโมติกสูง และ ที่อุณหภูมิต่างๆ ความสามารถย่อยอาร์บูติน (β-glucosidae activity) ความสามารถผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคส ความสามารถย่อยยูเรีย (urease activit) ความสามารถย่อยเจลลาติน (proteolytic activity) ความสามารถทนต่อไซโคลเฮซิไมด์ (Cycloheximide resistance) และทนกรดแอซิติกเข้มข้น 1% ตลอดจนทดสอบการทำปฏิกิริยากับสี Diazonium Blue B

4.2.1 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Cylindnera* sp. RW2-7

Cylindnera sp. RW2-7 ที่เจริญในอาหารเหลว 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) malt extract ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 72 ชม. ลักษณะเซลล์เดี่ยวเป็นทรงรูปไข่ กลมรี ขนาด 2-6 x 4-8 ไมครอน แบ่งตัวโดยการแตกหน่อหลายตำแหน่ง (multilateral budding) โคโลนีบนอาหารแข็งสีขาว มันวาว เนื้อสัมผัสเหมือนเนย ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ เมื่อบ่มภายใต้ภาวะไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 7 วัน สร้าง pseudohyphae (รูปที่ 4-11) ไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) malt extract ที่อุณหภูมิ 15 และ 20 องศาเซลเซียสนาน 8 สัปดาห์ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ เจริญได้ดีใน glucose, sucrose,

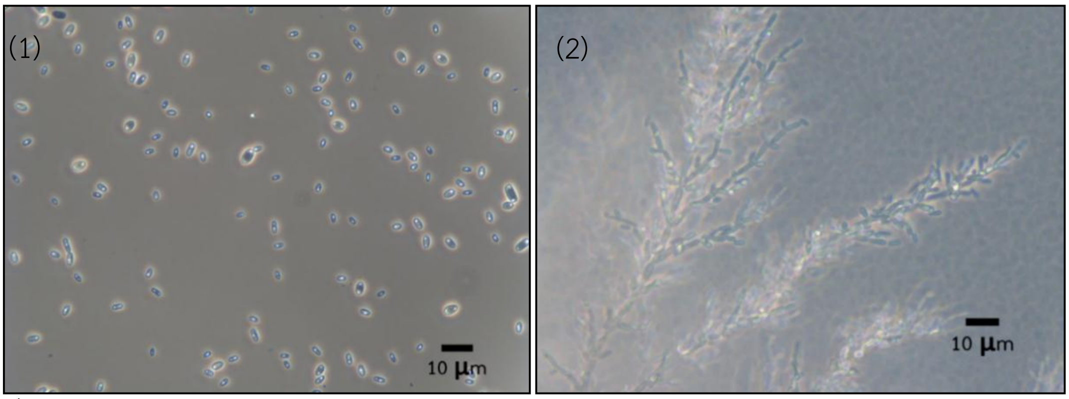
maltose, cellobiose, raffinose, melezitose, ethanol, glycerol และ xylo-oligosaccharide สามารถใช้ ammonium sulfate, potassium nitrate, sodium nitrite, ethylamine hydrochloride, lysine hydrochloride และ cadaverine dihydrochloride เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 – 35 องศาเซลเซียส ไม่ต้องการวิตามินเพื่อการเจริญเติบโต และสามารถย่อยอาร์บูตินได้ (ตารางที่ 4-15, ตารางที่ 4-16, ตารางที่ 4-17 และ ตารางที่ 4-18)



รูปที่ 4–11ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae (2) ของ Cylindenera sp. RW2-7

4.2.2 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Cylindnera* sp. RW2-10

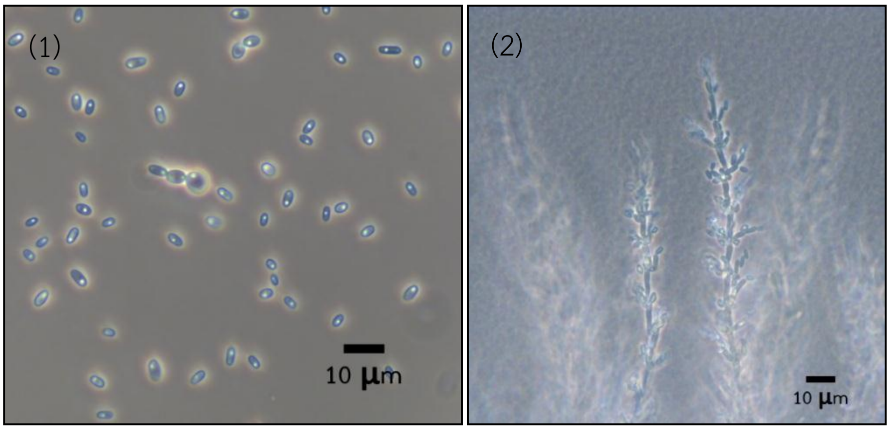
Cylindnera sp. RW2-10 ที่เจริญในอาหารเหลว 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) malt extract ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 72 ชม. ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวทรงรูปไข่ กลมรี ขนาดเท่ากับ 2-6 x 2-10 ไมครอน แบ่งตัวโดยการแตกหน่อขั้วเดียว (monopolar budding) ลักษณะโคโลนี สีขาว มันวาว เนื้อสัมผัสเหมือนเนย ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ เพาะเลี้ยงบนอาหาร morphology agar ภายใต้ภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 7 วัน สร้าง pseudohyphae (รูปที่ 4-12) การเจริญบนอาหารแข็ง 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) malt extract ที่อุณหภูมิ 15 และ 20 องศาเซลเซียส 8 สัปดาห์ไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ เจริญได้ดีใน glucose, L-sorbose, maltose, trehalose, raffinose, ethanol, glycerol และ xylitol สามารถใช้ ammonium sulfate, potassium nitrate, sodium nitrite, ethylamine hydrochloride, lysine hydrochloride, cadaverine dihydrochloride และ D-glucosamine เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 – 35 องศาเซลเซียส ไม่ต้องการวิตามินเพื่อการเจริญเติบโต และสามารถย่อยอาร์บูตินได้ (ตารางที่ 4-15, ตารางที่ 4-16, ตารางที่ 4-17 และ ตารางที่ 4-18)



รูปที่ 4–12 ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae (2) ของ Cylindnera sp. RW2-10

4.2.3 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Cylindnera* sp. RW3-2

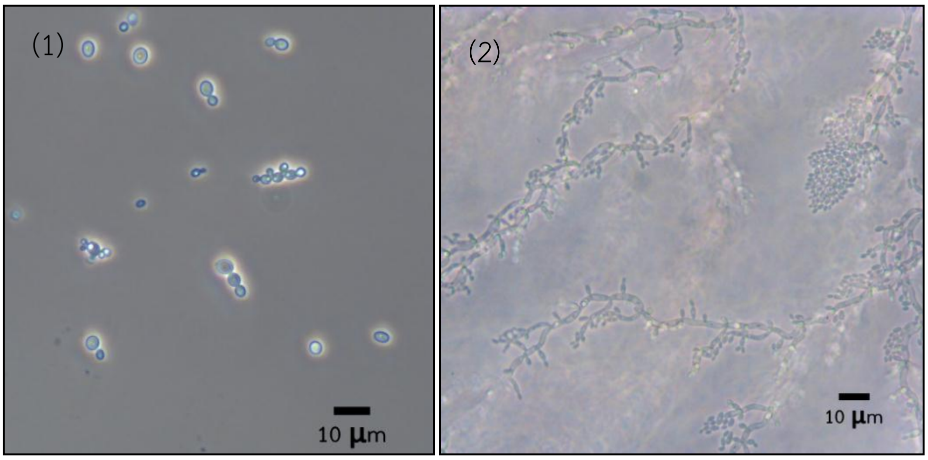
Cylindnera sp. RW3-2 ที่เจริญในอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 72 ชม. ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวทรงรูปไข่ กลมรี ขนาด 2-4 x 4-10 ไมครอน แบ่งตัวโดยการแตกหน่อขั้วเดียว (monopolar budding) กษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) malt extract ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 72 ชม. สีขาว มันวาว เนื้อสัมผัสเหมือนเนย ผิวหน้าเรียบ ขอบเรียบ การเจริญบนอาหารmorphology agar ภายใต้ภาวะไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 7 วัน สร้าง pseudohyphae (รูปที่ 4-13) การเจริญบนอาหารแข็ง 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) malt extract ที่อุณหภูมิ 15 และ 20 องศาเซลเซียสนาน 8 สัปดาห์ ไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ เจริญได้ดีใน glucose, l-sorbose, maltose, trehalose, raffinose, ethanol, glycerol และ xylitol สามารถใช้ ammonium sulfate, potassium nitrate, sodium nitrite, ethylamine hydrochloride, lysine hydrochloride, cadaverine dihydrochloride และ D-glucosamine เป็นแหล่งไนโตรเจน เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 – 37 องศาเซลเซียส ไม่ต้องการวิตามินเพื่อการเจริญ สามารถย่อยอาร์บูตินได้ (ตารางที่ 4-15, ตารางที่ 4-16, ตารางที่ 4-17 และ ตารางที่ 4-18)



รูปที่ 4–13ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae และ blastoconidia (2) ของ Cynlindnera sp. RW3-2

4.3.4 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Metschnikowia* sp. RW2-21

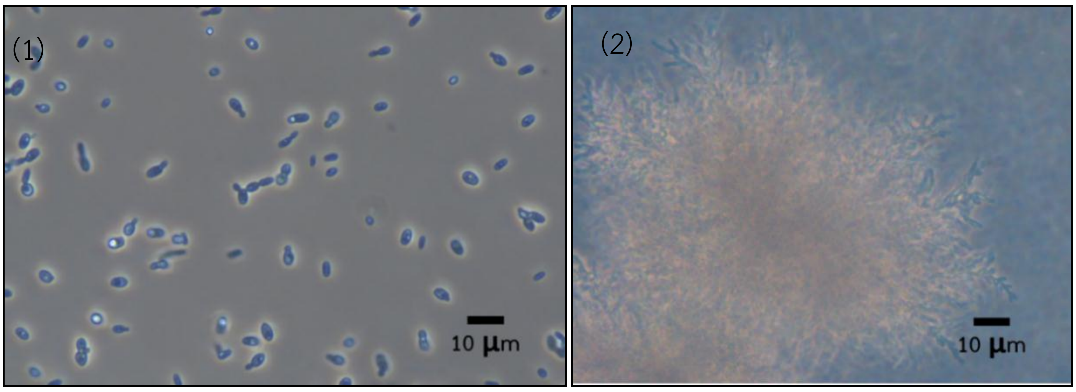
Metschnikowia sp. RW2-21 ที่เจริญในอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 72 ชม. เซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวรูปทรงกลม หรือกลมรี และพบเซลล์เรียงต่อกันเป็นสายโซ่ ขนาด 2-6 x 2-8 ไมครอน แบ่งตัวโดยการแตกหน่อหลายตำแหน่ง (multilateral budding) ลักษณะโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) malt extract ที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียส 2 สัปดาห์ สีขาว มันวาว เนื้อสัมผัสเหมือนเนย ผิวหน้าและขอบเรียบ การเจริญบนอาหาร cornmeal agar ภายใต้ภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสนาน 7 วัน สร้าง pseudohyphae (รูปที่ 4-14) การเจริญบนอาหารแข็ง YCB และ YCBS agar ที่อุณหภูมิ 15 และ 20 องศาเซลเซียสนาน 8 สัปดาห์ ไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ เจริญได้ดีใน glucose, galactose, L-sorbose, sucrose, maltose, cellobiose, trehalose, raffinose, melezitose, D-xylose, ribose, ethanol, glycerol, ribitol, D-mannitol, D-glucitol, α-methyl-D-glucoside, salicin, glucono-δ-lactone, 2-keto-gluconic acid, succinic acid, citric acid, D-gluconic acidม D-glucosamine, quinic acid, *N*-acetyl-D-glucosamine และ xylo-oligosaccharide สามารถใช้ ammonium sulfate, ethylamine hydrochloride, lysine hydrochloride และ cadaverine dihydrochloride เป็นแหล่งไนโตรเจน เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 – 37 องศาเซลเซียส สามารถทน 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) cyclohexamide ต้องการวิตามินเพื่อการเจริญเติบโต สามารถย่อยอาร์บูติน (ตารางที่ 4-15, ตารางที่ 4-16, ตารางที่ 4-17 และ ตารางที่ 4-18)



รูปที่ 4–14ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae และ blastoconidia (2) ของ Metschnikowia sp. RW2-21

4.3.5 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Metschnikowia* sp. RW2-23

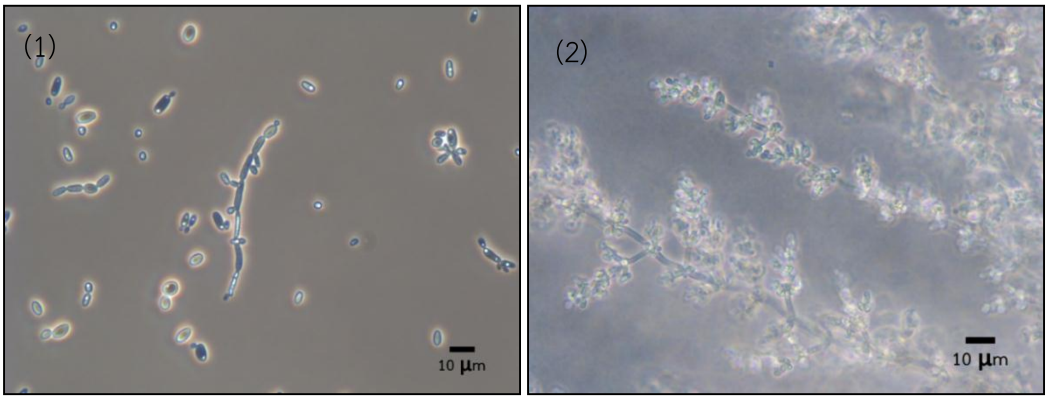
Metschnikowia sp. RW2-23 ที่เจริญในอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 72 ชม. ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวรูปทรงกลม หรือกลมรี ขนาด 2-6 x 3-8 ไมครอน แบ่งตัวโดยการแตกหน่อหลายตำแหน่ง (multilateral budding) ลักษณะโคโลนีเมื่อเจริญบนอาหารแข็ง 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) malt extract ที่อุณหภูมิ 17 องศาเซลเซียสนาน 2 สัปดาห์ สีขาว มันวาว เนื้อสัมผัสเหมือนเนย ผิวหน้าและขอบเรียบ การเจริญบนอาหาร cornmeal agar ภายใต้ภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 7 วัน สร้าง pseudohyphae (รูปที่ 4-15) การเจริญบนอาหารแข็ง YCB และ YCBS agar ที่อุณหภูมิ 15 และ 20 องศาเซลเซียสนาน8 สัปดาห์ ไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ เจริญได้ดีใน glucose, ethanol, glycerol, D-mannitol, lactic acid และ succinic acid สามารถใช้ ammonium sulfate, ethylamine hydrochloride, lysine hydrochloride และ cadaverine dihydrochloride เป็นแหล่งไนโตรเจน เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 – 37 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 4-15, ตารางที่ 4-16, ตารางที่ 4-17 และ ตารางที่ 4-18)



รูปที่ 4–15ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae (2) ของ Metschnikowia sp. RW2-23

4.3.6 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Ogataea* sp. RW4-9 RW4-14 และ RW4-19

Ogataea sp. RW4-9 RW4-14 และ RW4-19 ที่เจริญในอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 7 วัน ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวรูปทรงกลม หรือกลมรี และพบเซลล์เรียงต่อกันเป็นสายโซ่ ขนาด 2-6 x 2-12 ไมครอน แบ่งตัวโดยการแตกหน่อหลายตำแหน่ง (multilateral budding) การเจริญบนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 10 วัน ลักษณะโคโลนีสีขาว มันวาว เนื้อสัมผัสเหมือนเนย ผิวหน้าเรียบ ขอบหยักและมี psuedohyphae รอบขอบ การเจริญบนอาหารแข็ง cornmeal ภายใต้ภาวะมีและไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 7 วัน สร้าง pseudohyphae การเจริญบนอาหารแข็ง 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) malt extract ที่อุณหภูมิ i15 และ 20 องศาเซลเซียสนาน 8 สัปดาห์ไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ(รูปที่ 4-16) สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ เจริญได้ดีใน glucose, galactose, L-sorbose, ethanol, glycerol, D-mannitol, D-glucitol, Glucono-δ-lactone, 2-keto-gluconic acid, succinic acid, citric acid, D-gluconic acid, propylene glycol และ butane-2,3-diol สามารถใช้ ammonium sulfate, ethylamine, hydrochloride, lysine hydrochloride และ cadaverine dihydrochloride เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 – 37 องศาเซลเซียส สามารถทน 0.01% และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) cyclohexamide ต้องการวิตามินเพื่อการเจริญเติบโต เฉพาะสายพันธุ์ RW4-14 สามารถย่อยอาร์บูตินได้ (ตารางที่ 4-15, ตารางที่ 4-16, ตารางที่ 4-17 และ ตารางที่ 4-18)

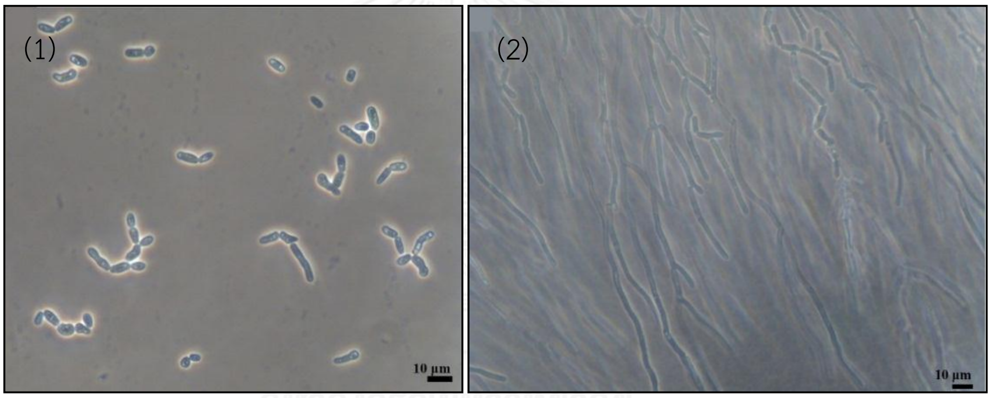


รูปที่ 4–16ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae และ blastoconidia (2) ของ Ogataea sp. RW4-14

4.3.7 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Trichosporon* sp. DD1-1 DD2-23 DD4-11 DD5-15 และ DD6-1

Trichosporon sp. DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15 และ DD6-1 ที่เจริญในอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 72 ชม. เซลล์ลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวรูปทรงกลม หรือกลมรี และพบเซลล์เรียงต่อกันเป็นสายโซ่ ขนาด 1-4 x 2-22 ไมครอน แบ่งตัวโดยการแตกหน่อหลายตำแหน่ง (multilateral budding) การเจริญบนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 72 ชม ลักษณะโคโลนีสีขาว ขอบหยักและมีเส้นใยบริเวณขอบ การเจริญบนอาหารแข็ง cornmeal ภายใต้ภาวะไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 72ชม. สร้าง pseudohyphae และ arthroconidia (รูปที่ 4-17) การเจริญบนอาหารแข็ง YM และ corn meal ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 6 สัปดาห์ ไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ เจริญได้ดีใน glucose sucrose, trehalose, xylose, ethanol, glycerol, D-mannitol, salicin, 2-keto-gluconic acid, 5-keto-gluconic acid, succinic acid, citric acid, D-gluconic acid, inositol, D-gluconic acid, N-acetyl-D-glucosamine และ butane-2,3-diol สามารถใช้ ammonium sulfate, ethylamine, hydrochloride, lysine hydrochloride, cadaverine dihydrochloride และ tryptophan เป็นแหล่งไนโตรเจน เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 – 37 องศาเซลเซียส สามารถทน 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) cyclohexamide ต้องการวิตามินเพื่อการเจริญ ไม่สามารถย่อยยูเรีย (ตารางที่ 4-20, ตารางที่ 4-21, ตารางที่ 4-22 และ ตารางที่ 4-23)

สายพันธุ์ DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15 และ DD6-1 มีลักษณะทางสรีระวิทยาที่แตกต่างจากสปีชีส์ใกล้เคียงได้แก่ *T. brassicae, T. montevideense, T. domesticum, T. siamense* และ *T. scarabaeorum* อย่างชัดเจน โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ไม่สามารถย่อยสลายสลายยูเรีย (ตารางที่ 4-19) ซึ่งความความสามารถในการย่อยสลายยูเรียนี้เป็นหนึ่งในลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกยีสต์ในไฟลัม Basidiomycota ออกจาก ไฟลัม Ascomycota มียีสต์เพียงไม่กี่สปีชีส์ในไฟลัม Basidiomycota ที่มีรายงานว่าไม่สามารถย่อยสลายยูเรียได้นั่นคือ *Filobasidium elegans* และ *Sporobolomyces clavatus* ยังไม่เคยมีการรายงานว่ามียีสต์สปีชีส์ใดในจีนัส *Trichosporon* ไม่สามารถย่อยยูเรียได้ ดังนั้นจากหลักฐานทั้งหมดที่กล่าวมา ผู้วิจัยจึงได้เสนอตั้งชื่อยีสต์สปีชีส์ใหม่นี้ว่า *Trichosporon heliocopridis* sp. nov. และตีพิมพ์ในวารสาร International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology ปีค.ศ. 2016 (Kunthiphun et al., 2016)



รูปที่ 4–17 ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อ (1), ลักษณะ pseudohyphae (2) ของ *Trichosporon* sp. DD1-1

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4–15 ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆของ Cyberlindnera sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; Metschnikowia sp.RW2-21, RW2-23 และ Ogataea sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19

No.	Carbon source	*Cyberlindnera sp.*			*Metschnikowia sp.*		*Ogataea sp.*		
		RW2-7	RW2-10	RW3-2	RW2-21	RW2-23	RW4-9	RW4-14	RW4-19
1	D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Galactose	-	-	-	+	-	+	+	+
3	L-sorbose	-	l	-	+	-	+	+	+
4	Sucrose	+	s	+	+	-	-	-	-
5	Maltose	+	+	s	+	-	-	-	-
6	Cellobiose	+	w	s	+	-	-	-	-
7	Trehalose	s	+	s	+	-	-	-	-
8	Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-
10	Raffinose	+	+	+	+	-	-	-	-
11	Melezitose	+	w	s	+	-	-	-	-
12	Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-
13	Soluble starch	-	-	-	-	-	-	-	-
14	D-xylose	w	w	w	+	w	w	w/-	-

ตารางที่ 4-15 (ต่อ) ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆของ *Cyberlindnera* sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; *Metschnikowia* sp.RW2-21, RW2-23 และ *Ogataea* sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19

No.	Carbon source	*Cyberlindnera* sp.			*Metschnikowia* sp.		*Ogataea* sp.		
		RW2-7	RW2-10	RW3-2	RW2-21	RW2-23	RW4-9	RW4-14	RW4-19
15	L-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
16	D-arabinose	-	-	-	w	w	-	-	w
17	D-ribose	-	-	-	+	-	-	-	-
18	L-rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
19	ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+
20	Glycerol	+	+	+	+	+	+	+	+
21	Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-
22	Ribitol	-	-	-	+	-	-	-	-
23	Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-
24	D-manitol	s	s	s	+	+	+	+	+
25	D-glucitol	s	s	s	+	s	+	+	+
26	a-methyl-D-glucoside	s	s	s	+	-	-	-	-
27	Salicin	s	s	w	+	-	-	-	-
28	Glucono-d-lactone	s	s	w	+	s	+	+	+

ตารางที่ 4-15 (ต่อ) ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆของ *Cyberlindnera* sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; *Metschnikowia* sp.RW2-21, RW2-23 และ *Ogataea* sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19

No.	Carbon source	*Cyberlindnera* sp.			*Metschnikowia* sp.		*Ogataea* sp.		
		RW2-7	RW2-10	RW3-2	RW2-21	RW2-23	RW4-9	RW4-14	RW4-19
29	2-keto-gluconic acid	-	-	-	+	-	+	+	+
30	5-keto-gluconic acid	-	-	-	-	-	s	+	s
31	DL-lactic acid	s	s	s	-	+	+	+	s
32	Succinic acid	s	s	s	+	+	+	+	+
33	Citric acid	s	s	s	+	-	+	+	+
34	Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
35	D-glucuronic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
36	D-galacturonic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-
38	D-gluconic acid	w	s	-	+	s	+	+	+
39	D-glucosamine	-	w	-	+	-	-	-	-
40	D-glucurono lactone	-	-	-	-	-	-	-	-
41	L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-
42	Quinic acid	-	-	-	+	-	-	-	-

ตารางที่ 4-15 (ต่อ) ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆของ *Cyberlindnera* sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; *Metschnikowia* sp.RW2-21, RW2-23 และ *Ogataea* sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19

No.	Carbon source	*Cyberlindnera* sp.			*Metschnikowia* sp.		*Ogataea* sp.		
		RW2-7	RW2-10	RW3-2	RW2-21	RW2-23	RW4-9	RW4-14	RW4-19
43	Saccharic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
44	Propylene glycol	w	-	-	-	-	+	+	+
45	Xylitol	-	+	-	s	-	s	s	s
46	*N*-acetyl-D-glucosamine	-	-	-	+	-	-	-	-
47	Butane-2,3-diol	w	-	-	-	-	+	+	+
48	Xylo-oligosaccharide	+	s	+	+	-	-	-	-
49	n-decane	-	-	-	-	-	-	-	-
50	n-hexadecane	-	-	-	s	-	-	-	-

+, Positive;l, latent; s, slow; w, weak; -, Negative; n, not determined

ตารางที่ 4–16 ความสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆของ Cyberlindnera sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; Metschnikowia sp.RW2-21, RW2-23 และ Ogataea sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19

No.	Nitrogen	*Cyberlindnera* sp.			*Metschnikowia* sp.		*Ogataea* sp.		
		RW2-7	RW2-10	RW3-2	RW2-21	RW2-23	RW4-9	RW4-14	RW4-19
0	Base (YCB only)	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Ammonium sulfate	+	+	+	+	+	+	+	+
2	Potassium nitrate	+	+	+	-	-	-	-	-
3	Sodium nitrite	+	+	+	-	-	-	-	-
4	Etylamine hydrochloride	+	+	+	+	+	+	+	+
5	Lysine hydrochloride	+	+	+	+	+	+	+	+
6	Cadaverine dihydrochloride	+	+	+	+	+	+	+	+
7	Creatine	-	-	-	-	-	-	-	-
8	Creatinine	-	-	-	-	-	-	-	-
9	D-glucosamine	w	+	w	w	w	w	w	w
10	Imidazole	-	-	-	-	-	-	-	-
11	D-tryptophan	-	-	-	-	-	-	-	-

+, Positive;l, latent; s, slow; w, weak; -, Negative; n, not determined

ตารางที่ 4–17 ความสามารถในการเจริญโตที่อุณหภูมิต่างๆของ Cyberlindnera sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; Metschnikowia sp.RW2-21, RW2-23 และ Ogataea sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19

No.	Temperature (°C)	*Cyberlindnera* sp.			*Metschnikowia* sp.		*Ogataea* sp.		
		RW2-7	RW2-10	RW3-2	RW2-21	RW2-23	RW4-9	RW4-14	RW4-19
1	25	+	+	+	+	+	+	+	+
2	30	+	+	+	+	+	+	+	+
3	35	+	+	+	+	+	+	+	+
4	37	+	+	+	+	+	+	+	+
5	40	-	-	-	-	-	-	-	-

+, Positive;l, latent; s, slow; w, weak; -, Negative; n, not determined

ตารางที่ 4–18 ลักษณะสรีระวิทยาอื่นๆ ของ Cyberlindnera sp. ไอโซเลต RW2-7, RW2-10, RW3-20; Metschnikowia sp.RW2-21, RW2-23 และ Ogataea sp. RW4-9, RW4-14 และ RW4-19

No.	other physiology	*Cyberlindnera* sp.			*Metschnikowia* sp.		*Ogataea* sp.		
		RW2-7	RW2-10	RW3-2	RW2-21	RW2-23	RW4-9	RW4-14	RW4-19
1	0.01% Cyclohexamide	-	-	-	+	-	+	+	+
2	0.1% Cyclohexamide	-	-	-	-	-	+	+	+
3	10% Nacl	-	-	-	-	-	-	-	-
4	16% Nacl	-	-	-	-	-	-	-	-
5	Vitamin free	+	+	+	s	-	w	w	w
6	Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-	-	-	-
7	Acid production	-	w	w	w	w	-	-	-
8	1% Acetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-
9	50% Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-
10	60% Glucose	-	-	-		-	-	-	-
11	Arbutin splitting	+	+	+	+	-	-	+	-
12	Urease	-	-	-	-	-	-	-	-

+, Positive;l, latent; s, slow; w, weak; -, Negative; n, not determined

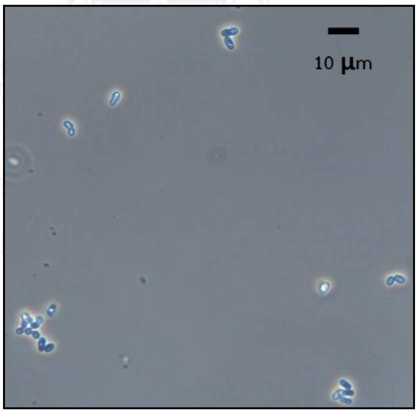
ตารางที่ 4–19 แสดงลักษณะสรีระวิทยาของ Trichosporon heliocopridis DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15 และ DD6-1 ที่แตกต่างจากยีสต์สปีชีส์ใกล้เคียง

Characteristics	Species*					
	1	2	3	4	5	6
Assimilation of:						
Cellobiose	-	-	+	+	+	+
Lactose	l (-)	-	+	+	+	+
Melezitose	-	-	v	+	+	-
Ribitol	-	-	v	v	+	+
L-Rhamnose	-	-	-	-	+	-
Methyl-α- D-glucoside	-	-	+	+	+	-
Salicin	+	-	v	v	-†	-
Saccharic acid	-	n	n	n	+†	n
Growth at 37 °C	+	+	v	+	-	-
Urease activity	-	+	+	+	+	+

*, 1, *Trichosporon heliocopridis* sp. nov.; 2, *Trichosporon brassicae*(Nakase, 1971); 3, *Trichospron montevideense*(Sugita, 2011); 4, *Trichosporon domesticum*(Sugita et al., 1995); 5, *Trichosporon siamense(Nakase et al., 2006);* 6, *Trichosporon scarabaeorum*(Middelhoven et al., 2000). +, positive; -, negative; l, latent; v, variable; n, not determined; †,ผู้วิจัยเป็นคน

4.3.8 ลักษณะสัณฐานและสรีระวิทยาของ *Saccharomycetes* sp. DD6-2

Saccharomycetes sp. DD6-2 ที่เจริญในอาหารเหลว YM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 72 ชม. ลักษณะเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวรูปทรงกลม หรือกลมรี และพบเซลล์เรียงต่อกันเป็นสายโซ่ ขนาด 1.5-3 x 2-4 ไมครอน แบ่งตัวโดยการแตกหน่อหลายตำแหน่ง (multilateral budding) การเจริญบนอาหารแข็ง YM ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 72 ชม ลักษณะโคโลนีสีขาวมันวาว ผิวหน้าและขอบเรียบ การเจริญบนอาหารแข็ง cornmeal ภายใต้ภาวะมีและไม่มีออกซิเจนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส 72 ชม. ไม่สร้าง pseudohyphae (รูปที่ 4-18) การเจริญบนอาหารแข็ง YM อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสนาน 8 สัปดาห์ ไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ เจริญได้ดีใน glucose, galactose, sorbose, glycerol, D-mannitol, D-glucitol, Glucono-δ lactone, succinic acid และ D-gluconic acid สามารถใช้ ammonium sulfate, ethylamine hydrochloride, lysine hydrochloride, cadaverine dihydrochloride และ tryptophan เป็นแหล่งไนโตรเจน เจริญได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25 – 37 องศาเซลเซียส สามารถทน 0.01% และ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) cyclohexamide ย่อยเจลาตินได้ ผลิตกรดจากน้ำตาลกลูโคสได้ ไม่สามารถย่อยยูเรีย (ตารางที่ 4-20, ตารางที่ 4-21, ตารางที่ 4-22 และ ตารางที่ 4-23)



รูปที่ 4–18 ลักษณะเซลล์และการแตกหน่อของไอโซเลต DD6-2

ตารางที่ 4–20 ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของ Trichosporon heliocopridis DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ Saccharomycetes sp. DD6-2

No.	Carbon source	*Trichosporon heliocopridis*					*Saccharomycetes* sp.
		DD1-1	DD2-23	DD4-11	DD5-15	DD6-1	DD6-2
1	D-glucose	+	+	+	+	+	+
2	Galactose	+	+s	+s	+	w	l
3	L-sorbose	+S	+s	+s	+s	+s	l
4	Sucrose	+	+	+	+	+	-
5	Maltose	w	w	w	w	+s	-
6	Cellobiose	w	w	w	w	w	-
7	Trehalose	+	+	+	+	+	-
8	Lactose	w	+	+	-	+	-
9	Melibiose	-	-	-	-	-	-
10	Raffinose	w	+	w	w	w	-
11	Melezitose	-	-	-	-	-	-
12	Inulin	-	-	-	-	-	-
13	Soluble starch	w	w	w	w	w	-
14	D-xylose	-	s	w	l	w	-

ตารางที่ 4-20 (ต่อ) ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของ *Trichosporon heliocopridis* DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ *Saccharomycetes* sp. DD6-2

No.	Carbon source	*Trichosporon heliocopridis*					*Saccharomycetes* sp.
		DD1-1	DD2-23	DD4-11	DD5-15	DD6-1	DD6-2
15	L-arabinose	-	-	-	-	-	-
16	D-arabinose	w	+s	+s	+s	w	-
17	D-ribose	+	+	+	+	+	-
18	L-rhamnose	-	-	-	-	-	-
19	ethanol	+	+	+	+	+	+s
20	Glycerol	+	+	+	+	+	+
21	Erythritol	-	-	-	-	-	-
22	Ribitol	w	+s	w	w	+s	-
23	Galactitol	-	-	-	-	-	-
24	D-manitol	+	+s	+s	+	+s	+
25	D-glucitol	+	+	+s	+s	+s	+
26	a-methyl-D-glucoside	w	w	w	w	-	-
27	Salicin	+	+	+	+	+	w
28	Glucono-d-lactone	-	w	-	-	-	+

ตารางที่ 4-20 (ต่อ) ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของ *Trichosporon heliocopridis* DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ *Saccharomycetes* sp. DD6-2

No.	Carbon source	*Trichosporon heliocopridis*					*Saccharomycetes* sp.
		DD1-1	DD2-23	DD4-11	DD5-15	DD6-1	DD6-2
29	2-keto-gluconic acid	+	+	+	+	+	-
30	5-keto-gluconic acid	+	+	+	+	w	-
31	DL-lactic acid	-	-	-	-	-	-
32	Succinic acid	+	+	+	+	+	+
33	Citric acid	+	+	+	+	+	-
34	Inositol	+s	+	+	+	+	-
35	D-glucuronic acid	-	-	-	-	-	-
36	D-galacturonic acid	-	-	-	-	-	-
37	Methanol	-	-	-	-	-	-
38	D-gluconic acid	+	+	+	w	+	+
39	D-glucosamine	w	w	w	w	w	w
40	D-glucurono lactone	-	-	-	-	-	-
41	L-arabitol	-	-	-	-	-	-
42	Quinic acid	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 4-20 (ต่อ) ความสามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ของ *Trichosporon heliocopridis* DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ *Saccharomycetes* sp. DD6-2

No.	Carbon source	*Trichosporon heliocopridis*					*Saccharomycetes* sp.
		DD1-1	DD2-23	DD4-11	DD5-15	DD6-1	DD6-2
43	Saccharic acid	-	-	-	-	-	-
44	Propylene glycol	+	w	+s	+s	+s	-
45	Xylitol	w	w	w	w	+l	-
46	*N*-acetyl-D-glucosamine	+	+	+	+	+	-
47	Butane-2,3-diol	+	+	+s	+s	+	-
48	Xylo-oligosaccharide	-	-	-	-	-	-
49	n-decane	w	w	w	w	-z	+s
50	n-hexadecane	w	w	w	w	w	+s

+, Positive;l, latent; s, slow; w, weak; -, Negative; n, not determined

ตารางที่ 4–21 ความสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆของ Trichosporon heliocopridis DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15, DD6-1 และ Saccharomycetes sp. DD6-2

No.	Nitrogen	*Trichosporon heliocopridis*					*Saccharomycetes* sp.
		DD1-1	DD2-23	DD4-11	DD5-15	DD6-1	DD6-2
0	Base (YCB only)	-	-	-	-	-	-
1	Ammonium sulfate	+	+	+	+	+	+
2	Potassium nitrate	-	-	-	-	-	-
3	Sodium nitrite	-	-	-	-	-	-
4	Etylamine hydrochloride	+	+	+	+	+	w
5	Lysine hydrochloride	+	+	+	+	+	-
6	Cadaverine dihydrochloride	+	+	+	+	+	-
7	Creatine	-	-	-	-	-	-
8	Creatinine	-	-	-	-	-	-
9	D-glucosamine	-	-	-	-	-	-
10	Imidazole	-	-	-	-	-	-
11	D-tryptophan	+	+	+	+	+	-

+, Positive;l, latent; s, slow; w, weak; -, Negative; n, not determined

ตารางที่ 4–22 ความสามารถในการเจริญโตที่อุณหภูมิต่างๆของ Trichosporon heliocopridis DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15,DD6-1 และ Saccharomycetes sp. DD6-2

No.	Temperature (°C)	*Trichosporon heliocopridis*					*Saccharomycetes* sp.
		DD1-1	DD2-23	DD4-11	DD5-15	DD6-1	DD6-2
1	25	+	+	+	+	+	+
2	30	+	+	+	+	+	+
3	35	+	+	+	+	+	+
4	37	+	+	+	+	+	+
5	40	-	-	-	-	-	-

+, Positive;l, latent; s, slow; w, weak; -, Negative; n, not determined

ตารางที่ 4–23 ลักษณะสรีระวิทยาของ Trichosporon heliocopridis DD1-1, DD2-23, DD4-11, DD5-15,DD6-1 และ Saccharomycetes sp. DD6-2

No.	other physiology	*Trichosporon heliocopridis*					*Saccharomycetes* sp.
		DD1-1	DD2-23	DD4-11	DD5-15	DD6-1	DD6-2
1	0.01% Cyclohexamide	+	+	+	+	+	+
2	0.1% Cyclohexamide	w	w	-	-	w	+
3	10% Nacl	-	-	-	-	-	-
4	16% Nacl	-	-	-	-	-	-
5	Vitamin free	w	w	w	w	w	-
6	Gelatin liquefaction	-	-	-	-	-	+
7	Acid production	-	+	+	-	-	+
8	1% Acetic acid	-	-	-	-	-	+
9	50% Glucose	-	-	-	-	-	-
10	60% Glucose	-	-	-	-	-	-
11	Arbutin splitting	-	-	-	-	-	-
12	Urease	-	-	-	-	-	+
13	DBB test	+	+	+	+	+	-

+. Positive:l. latent: s. slow: w. weak: -. Negative: n. not determined

4.4. ผลการทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของยีสต์ที่คัดแยกได้

4.4.1 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้

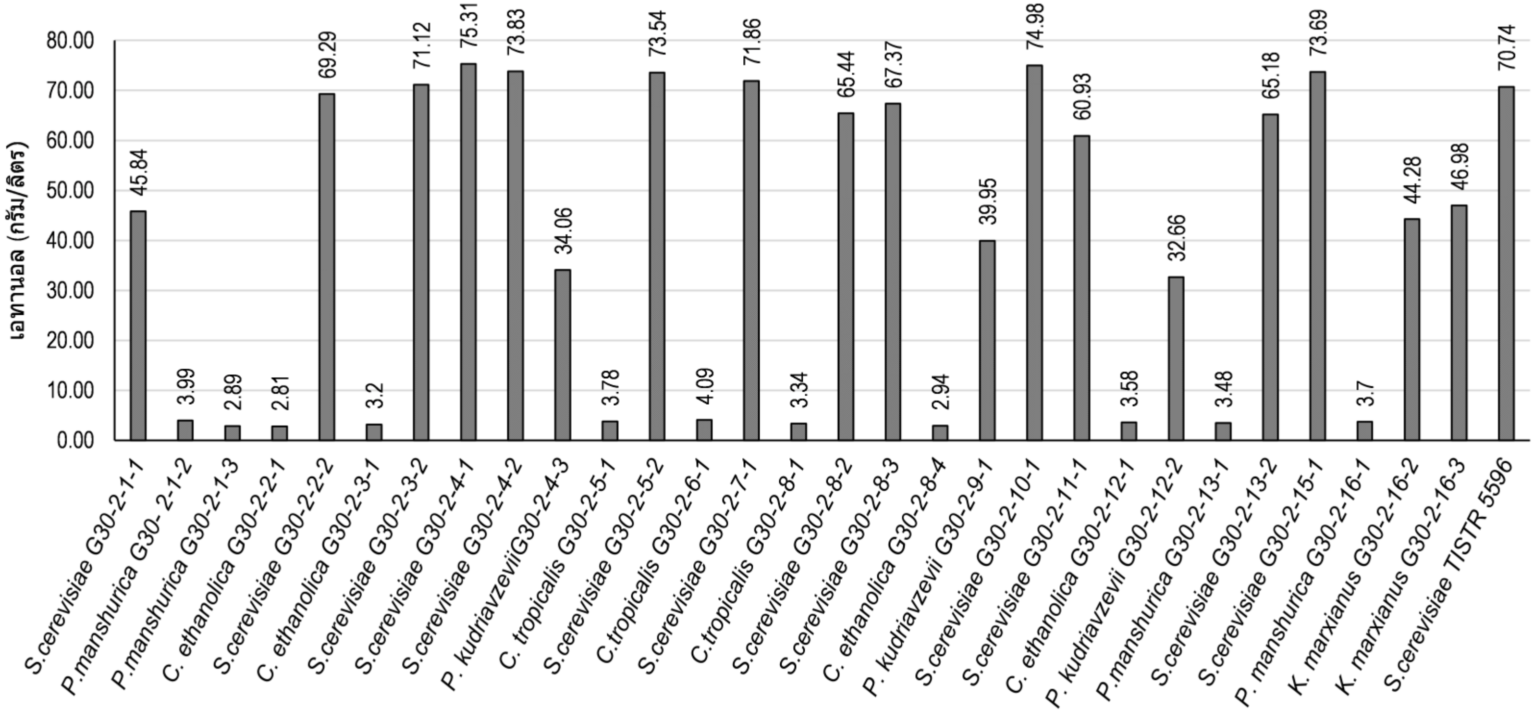
4.4.1.1 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากยีสต์ทั้งหมดจำนวน 306 สายพันธุ์ (strain) ที่คัดแยกได้ (ผลจากข้อ 4.1.1 และ 4.1.3) เลือกมาทดสอบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจำนวน 29 สายพันธุ์ ที่แยกจากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม (อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และ 93 สายพันธุ์ในไฟลัม Ascomycota ที่แยกจากแมลง เนื่องจากยีสต์ในไฟลัม Basidiomycota ส่วนใหญ่มีประสิทธิภาพในการหมักน้ำตาลต่ำ (Kurtzman et al., 2011) การทดสอบยีสต์ที่แยกจากโรงงานน้ำตาลและยีสต์ที่แยกจากแมลงใช้อาหารเหลว fermentation medium ที่ประกอบด้วยกลูโคสเข้มข้น 15 และ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 30 เซลเซียส 48 ชม. ภายใต้ภาวะกำจัดออกซิเจนโดยการปิดจุกสำลีและพันแผ่นพาราฟิล์มรอบจุกสำลีให้แน่น จากการทดสอบพบว่ายีสต์ 28 สายพันธุ์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรม สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสได้ แต่มีเพียง 7 สายพันธุ์ที่สามารถหมักเอทานอลได้มากกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 (70.74 กรัม/ลิตร, 0.47 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) โดย *S. cerevisiae* G30-2-4-1 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเท่ากับ 75.31 กรัม/ลิตร (0.50 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) (รูปที่ 4-19) ส่วนยีสต์ที่แยกได้จากแมลงไม่มีสายพันธุ์ใดสามารถหมักเอทานอลได้มากกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 (46.62 กรัม/ลิตร, 0.47 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) (รูปที่ 4-20)

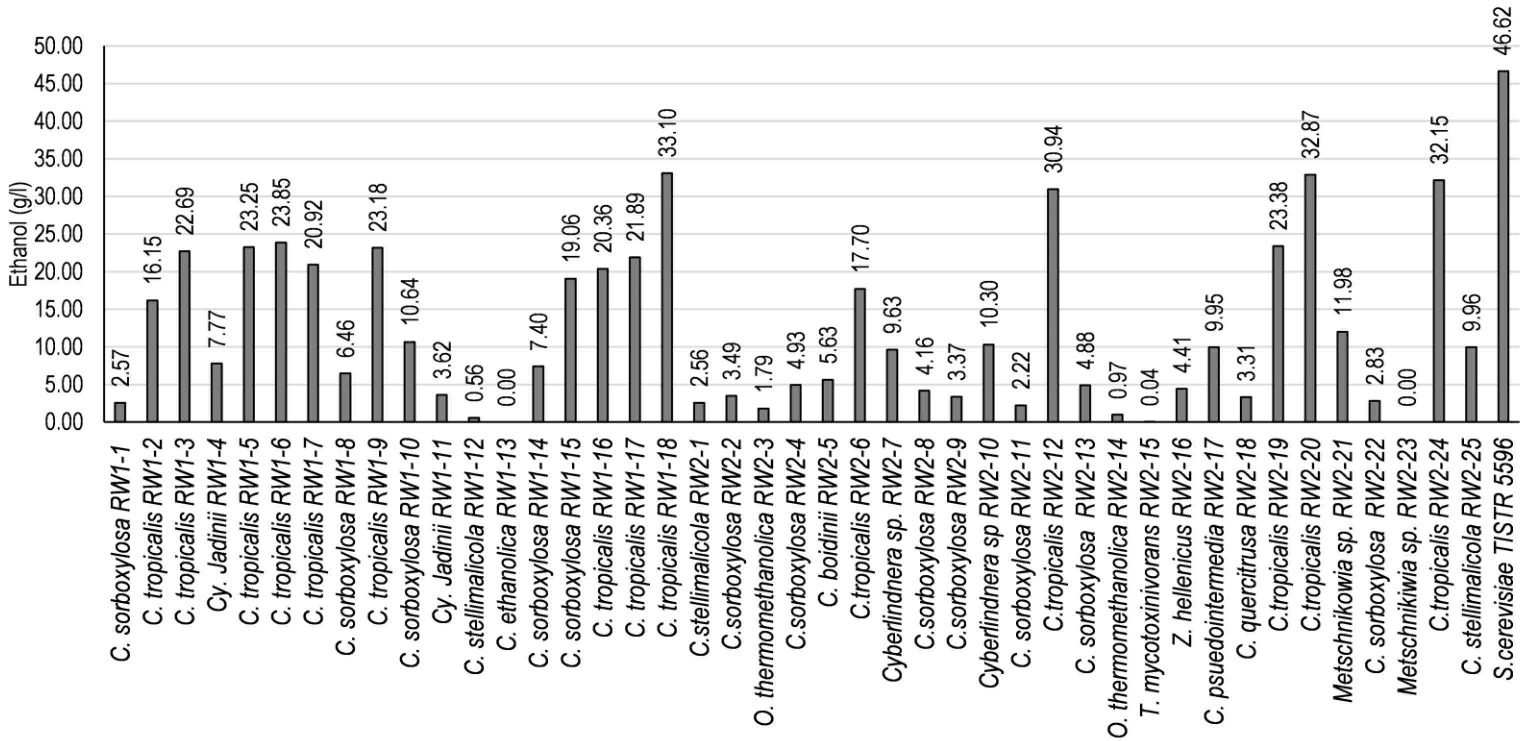
4.4.1.2 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากยีสต์ทั้งหมด 99 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จากโรงงานน้ำตาลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากข้อ 4.1.1 ที่นำมาทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสโดยใช้อาหารเหลว fermentation medium ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน (ตามวิธีข้อ 4.4.1.1) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดสอบพบว่ายีสต์ 34 สายพันธุ์จาก 99 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่า 33.18 กรัม/ลิตร (0.25 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) พบว่า *S. cerevisiae, K. marxianu, O. polymorpha* และ *P. manshurica* เป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4-21, รูปที่ 4-22, รูปที่ 4-23, รูปที่ 4-24 และรูปที่ 4-25) โดย *S. cerevisiae* G40-6-2-2 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 62.74 กรัม/ลิตร หรือ 0.42 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส (รูปที่ 4-22)

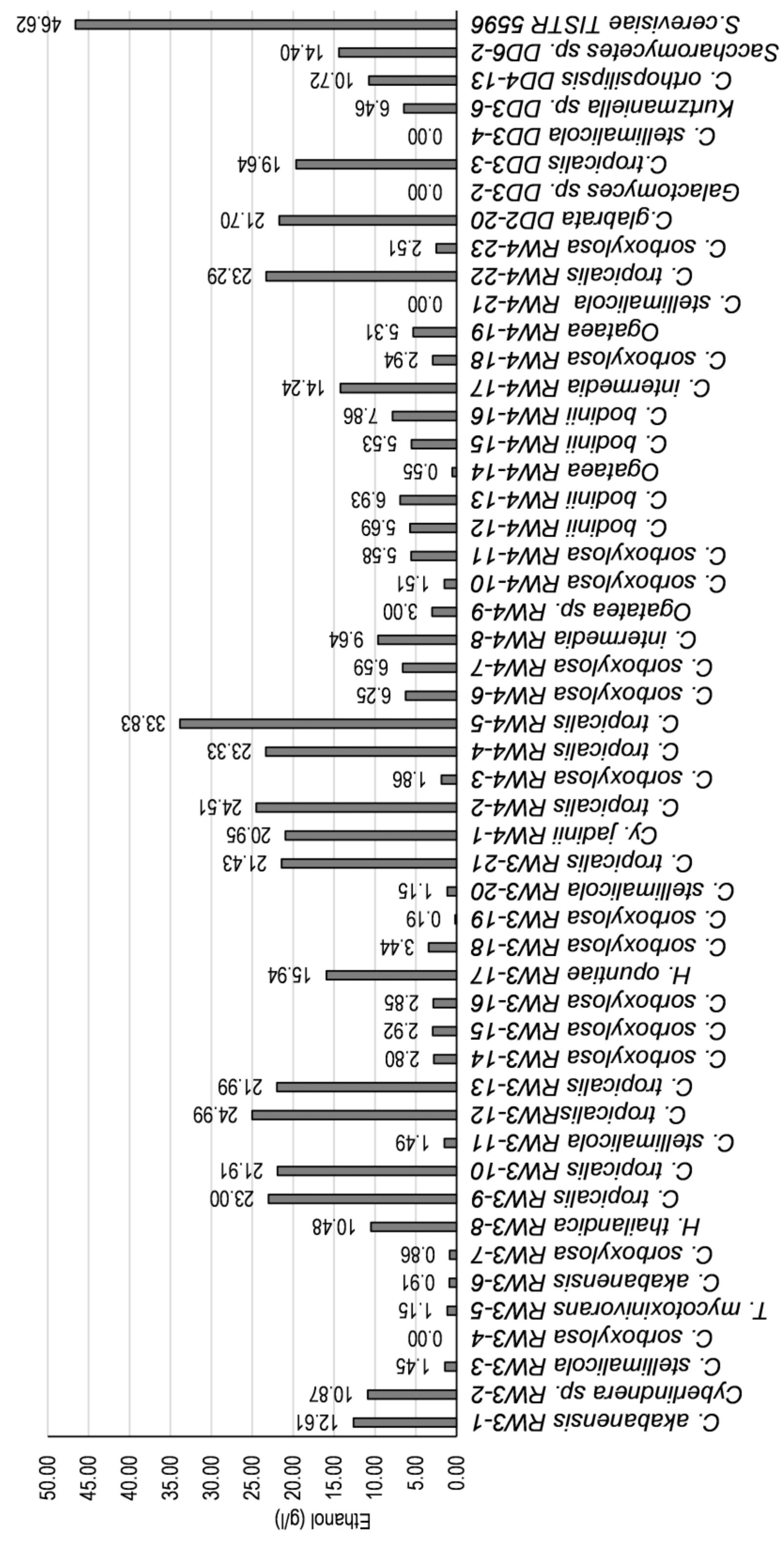
เริ่มมีการรายงานการค้นพบยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนสำหรับการหมักเอทานอลตั้งแต่ทศวรรต 1980 การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนมีข้อดีคือ ใช้พลังงานในการรักษาระบบหล่อเย็นของถังหมักน้อยกว่าการ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ปกติมีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส และสามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ไม่พึงประสงค์ในระบบการหมักได้ (Hacking et al., 1984) ในปีค.ศ. 1984 Hacking และคณะรายงานว่ายีสต์ 55 สายพันธุ์มีเพียง 8 สายพันธุ์ที่สามารถเจริญและหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลได้สูงสามอันดับแรกภายใน 63 ชั่วโมงคือ *K. marxianus, S. cerevisiae* และ *C.utilis* ให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.48 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส, 0.45 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส และ 0.24 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส ตามลำดับ ในปีค.ศ. 1989 D'Amore และคณะรายงานว่า *S. cerevisiae, K. marxianus* และ *K. lactis* สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.43 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส, 0.27 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส และ 0.13 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคสตามลำดับ ปีค.ศ. 2000 Sree และคณะรายงานว่าอุณหภูมิสูงสุดที่ *S. cerevisiae* VS3 ซึ่งแยกได้จากการดินโรงงานไฟฟ้าในประเทศอินเดีย สามารถเจริญได้และหมักเอทานอลได้เท่ากับ 42 และ 40 องศาเซลเซียส โดยสามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ 40 องศาเซลเซียสได้เท่ากับ 0.31 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส ปีค.ศ. 2009 Kumar และคณะ รายงานว่า *Kluyveromyces* sp. IIPE453 สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 0.41 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส ปีค.ศ. 2011 Kwon และคณะรายงานว่า *P. krudriavzevii* IPE 100 สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 42 และ 45 องศาเซลเซียสได้เท่ากับ 0.43 และ 0.24 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส ตามลำดับ



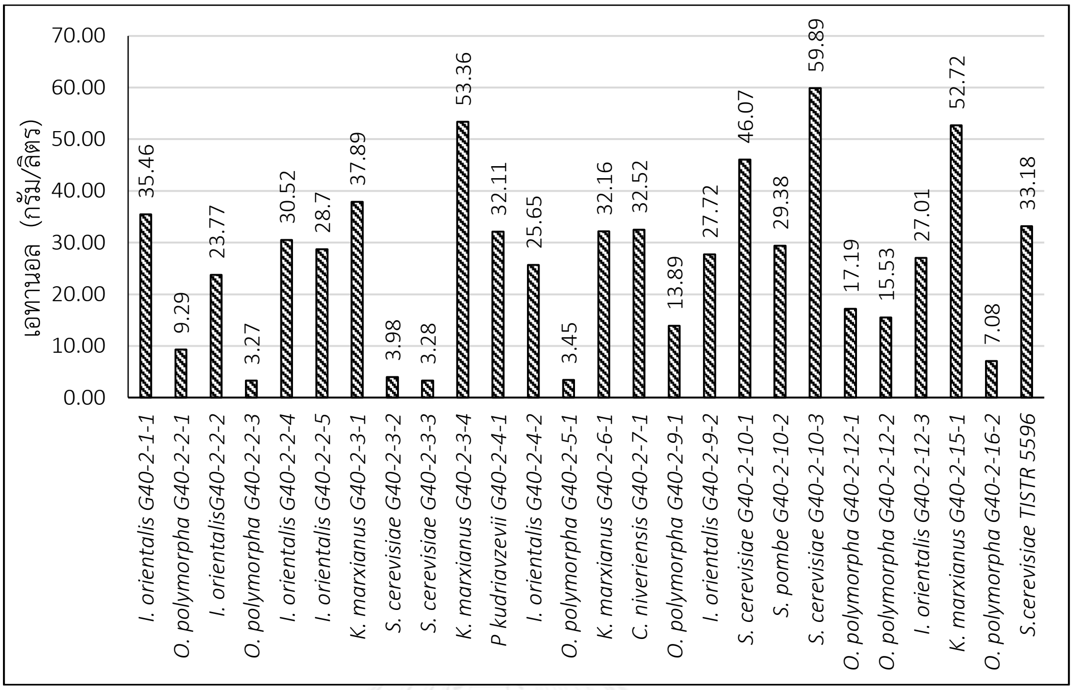
รูปที่ 4–19 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



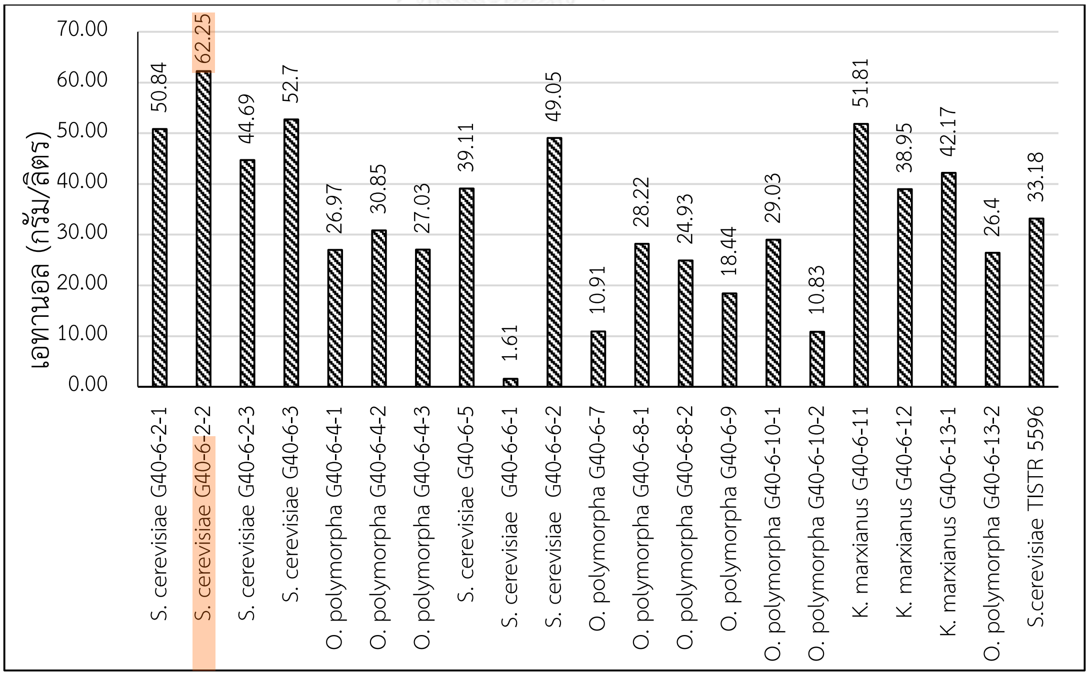
รูปที่ 4–20 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากแมลงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



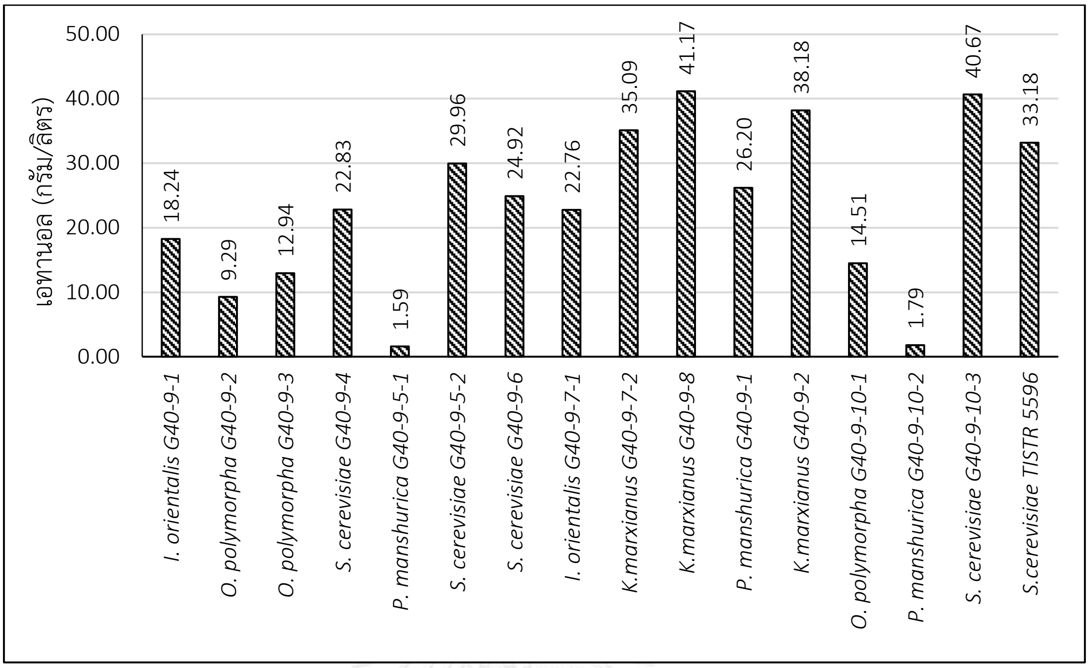
รูปที่ 4-20 (ต่อ) ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากแมลงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



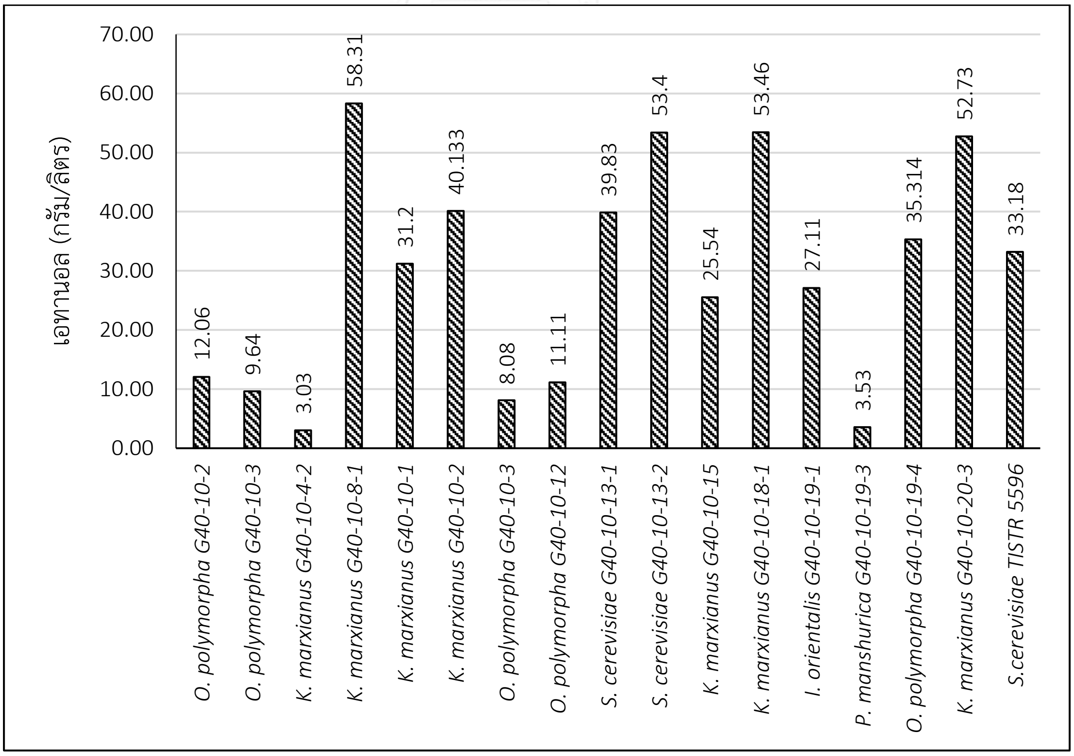
รูปที่ 4–21 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลไทยเพิ่มพูนอุตสาหกรรมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



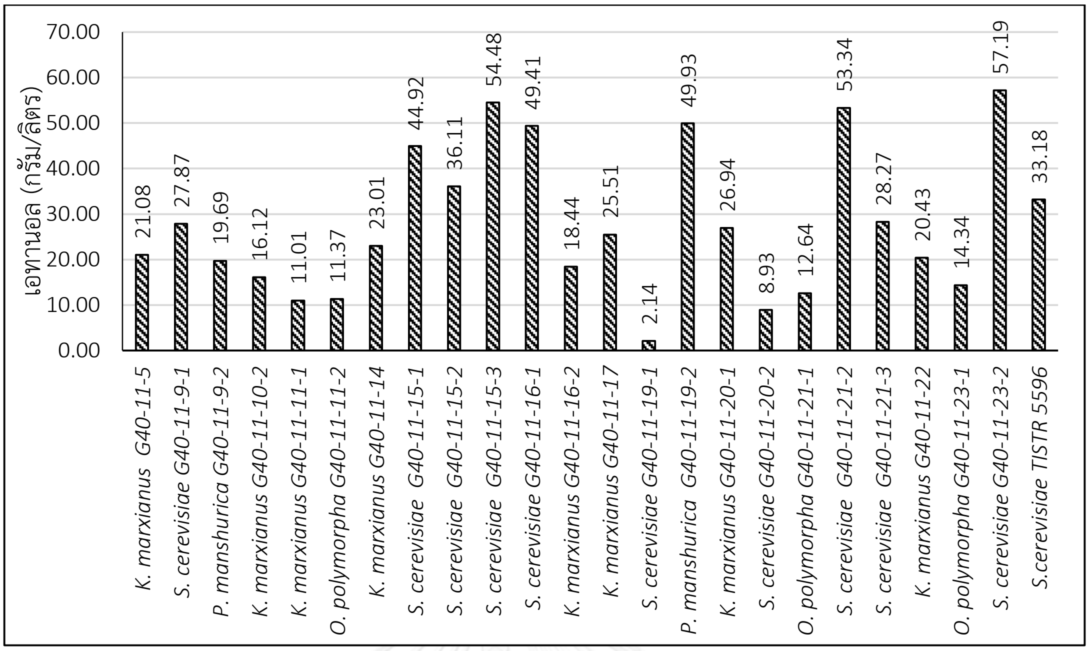
รูปที่ 4–22 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลครบุรีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4–23 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลราชสีมาที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



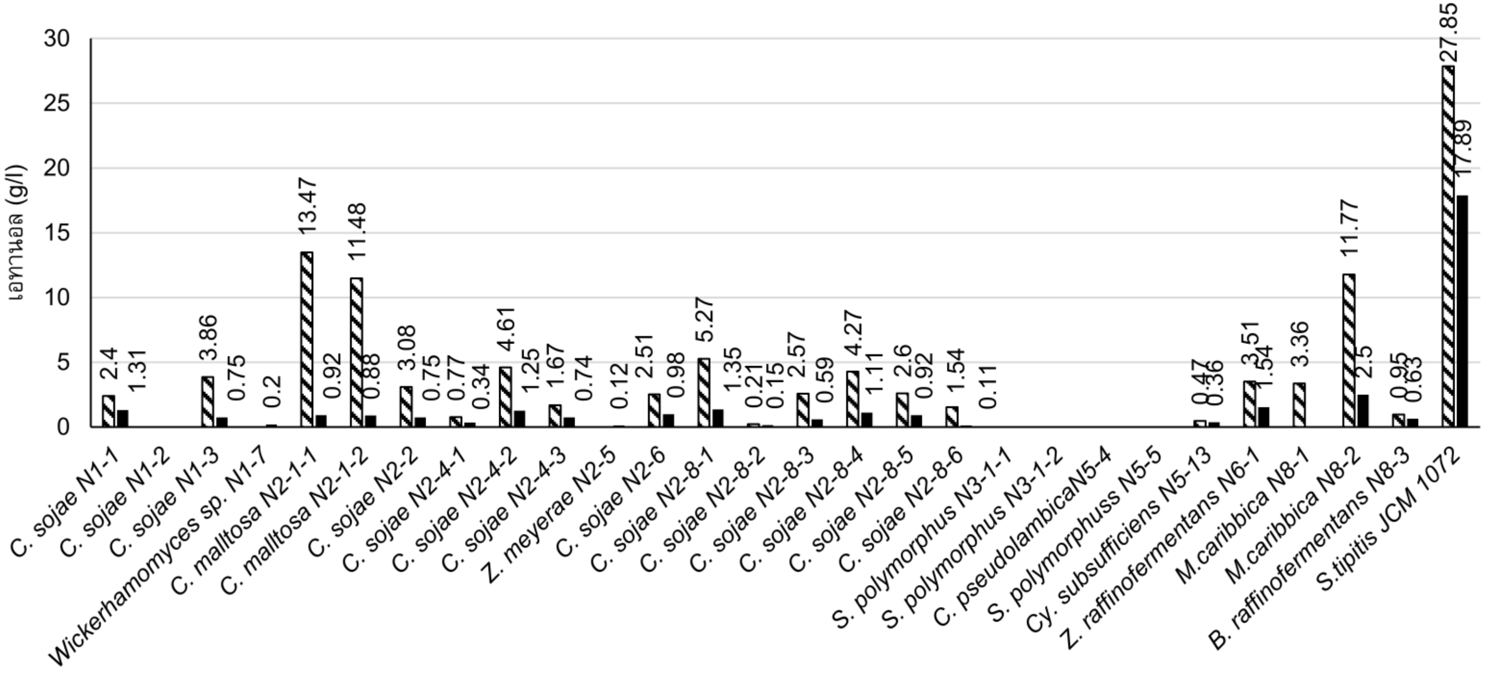
รูปที่ 4–24 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลทีเอ็นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



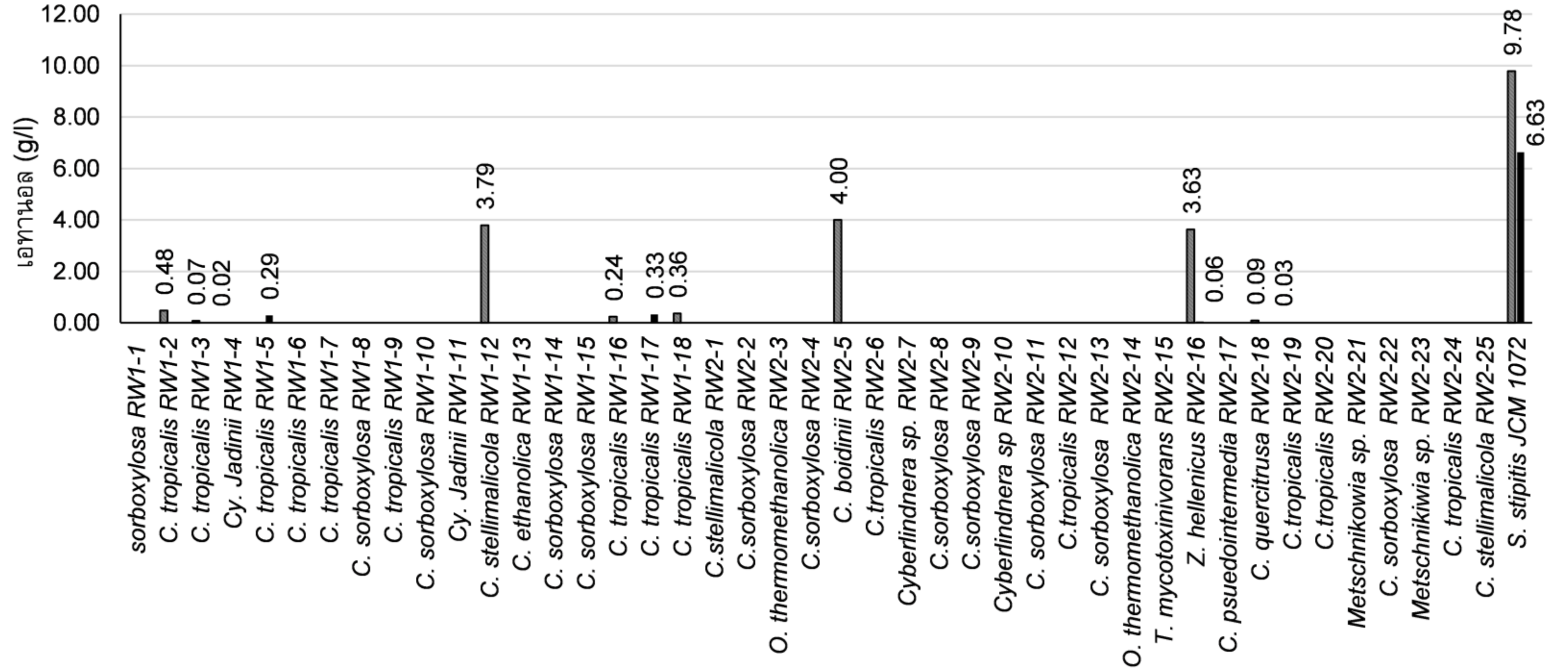
รูปที่ 4–25 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ที่แยกได้จากโรงงานน้ำตาลสระบุรีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

4.4.2 ผลการทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์ที่แยกได้

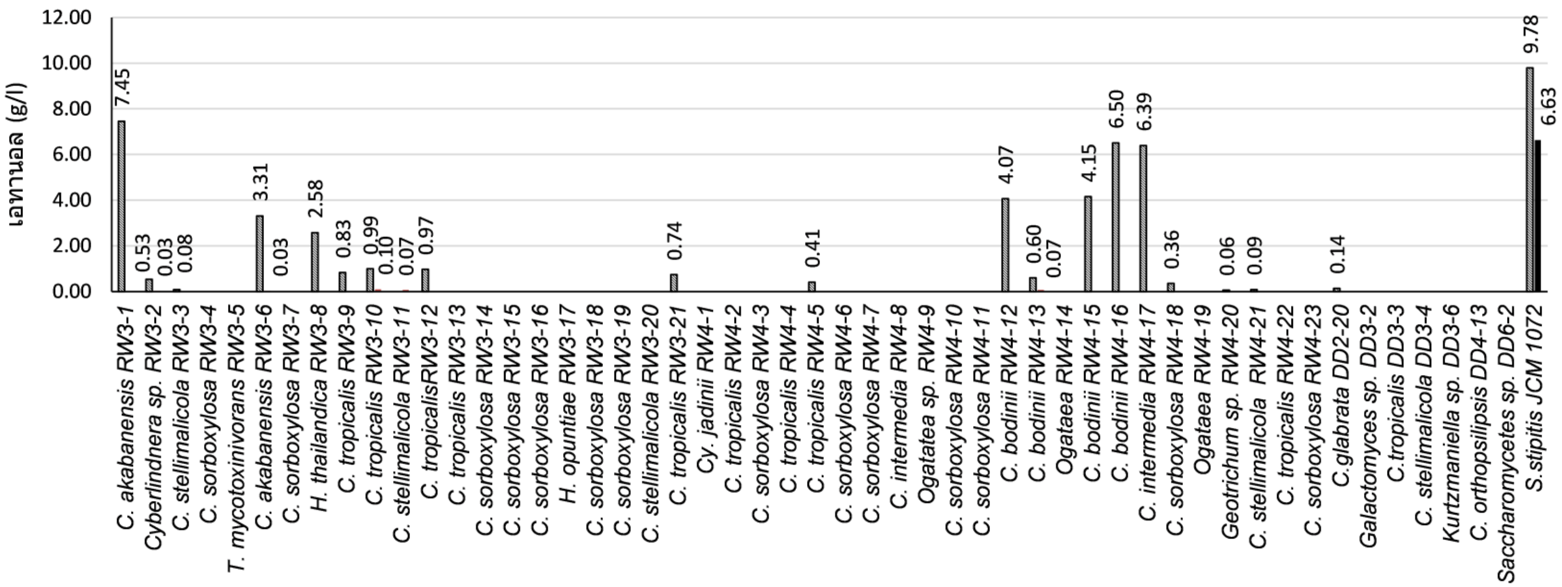
ผลการทดสอบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสของยีตส์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนที่แยกได้จากป่าพรุจำนวน 27 สายพันธุ์ (ข้อ 4.1.2) และจากแมลงจำนวน 93 สายพันธุ์ (ข้อ 4.1.3) ภายใต้ภาวะให้และจำกัดออกซิเจนโดยใช้อาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สำหรับยีสต์ที่แยกจากป่าพรุ ใช้อาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเข้มข้น 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สำหรับยีสต์ที่แยกจากแมลง พบว่ายีสต์ที่แยกจากป่าพรุจำนวน 19 และ 16 สายพันธุ์สามารถหมักเอทานอลภายใต้ภาวะให้ออกซิเจนและจำกัดออกซิเจนตามลำดับแต่ไม่มีสายพันธุ์ใดผลิตเอทานอลสูงกว่า *S. stipites* JCM 1072 27.85 กรัม/ลิตร (0.2 กรัมเอทานอล/กรัมไซโลส) ภายใต้ภาวะให้ออกซิเจนและ 17.89 กรัม/ลิตร (0.12 กรัมเอทานอล/กรัมไซโลส) ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน ยีสต์ที่แยกจากแมลงจำนวน 22 และ 2 สายพันธุ์สามารถผลิตเอทานอลภายใต้ภาวะให้ออกซิเจนและจำกัดออกซิเจนตามลำดับแต่ไม่มีสายพันธุ์ใดสามารถผลิตเอทานอลสูงกกว่า *S. stipitis* JCM 1072 9.78 กรัม/ลิตร หรือ 0.2 กรัมเอทานอล/กรัมไซโลส ภายใต้ภาวะให้ออกซิเจนและ 6.63 กรัม/ลิตร หรือ 0.12 กรัมเอทานอล/กรัมไซโลส ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน (รูปที่ 4-26 และ รูปที่ 4-27)



รูปที่ 4–26 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์ที่แยกได้จากป่าพรุภายใต้ภาวะให้ออกซิเจน (▧) และ ภาวะจำกัดออกซิเจน (■)



รูปที่ 4–27 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์ที่แยกได้จากแมลงภายใต้ภาวะให้ออกซิเจน (◩) และ ภาวะจำกัดออกซิเจน (■)

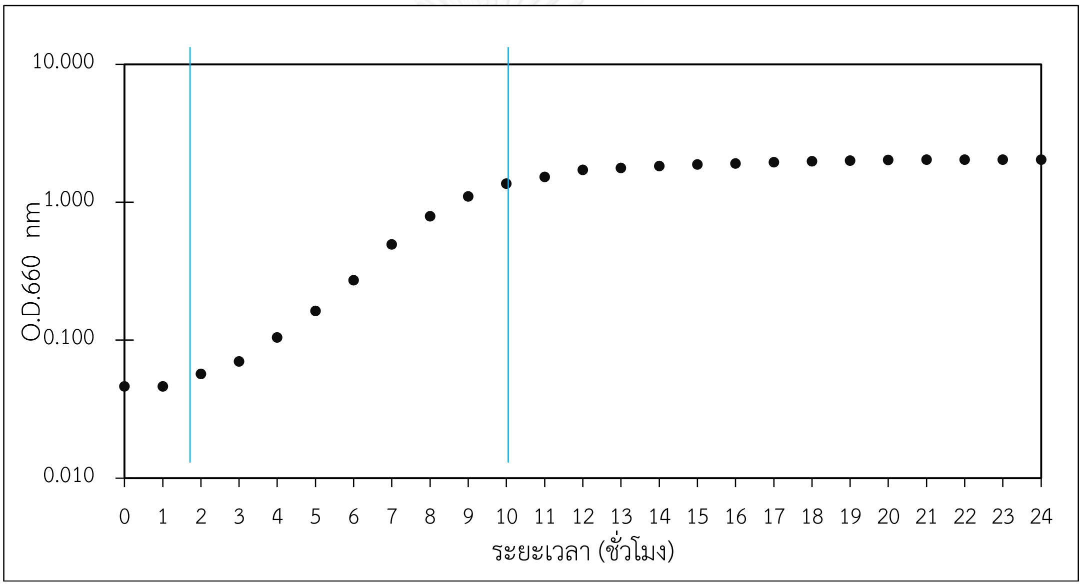


รูปที่ 4- 27 (ต่อ) ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสของยีสต์ที่แยกได้จากแมลงภายใต้ภาวะให้ออกซิเจน (▧) และภาวะจำกัดออกซิเจน (■)

4.5 ผลการหาภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสโดย *S.cerevisiae* G40-6-2-2

4.5.1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นและระยะเวลา (growth curve)

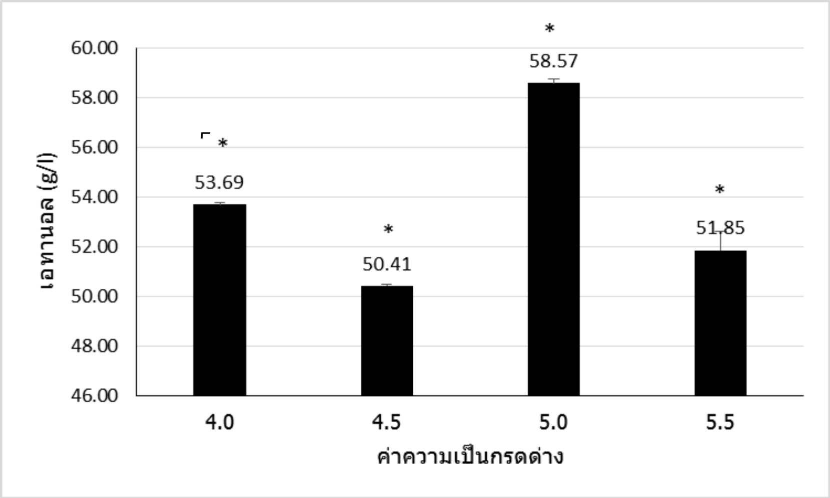
การเจริญของ *S. cerevesiae* G40-6-2-2 ที่ปรับค่าความขุ่นเริ่มต้นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตรเป็น 0.05 ชั่วโมงที่ 0 – 2 เป็นการเจริญในระยะ lag phase ชั่วโมงที่ 2-9 เป็นการเจริญระยะ log phase และชั่วโมงที่ 10 เป็นการเจริญระยะ late log phase (ค่าความขุ่นเท่ากับ 1.366) กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นและระยะเวลาของ *S. cerevesiae* G40-6-2-2 (รูปที่ 4-28)



รูปที่ 4–28 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นและระยะเวลาของ S.cerevesiae G40-6-2-2

4.5.2 ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล

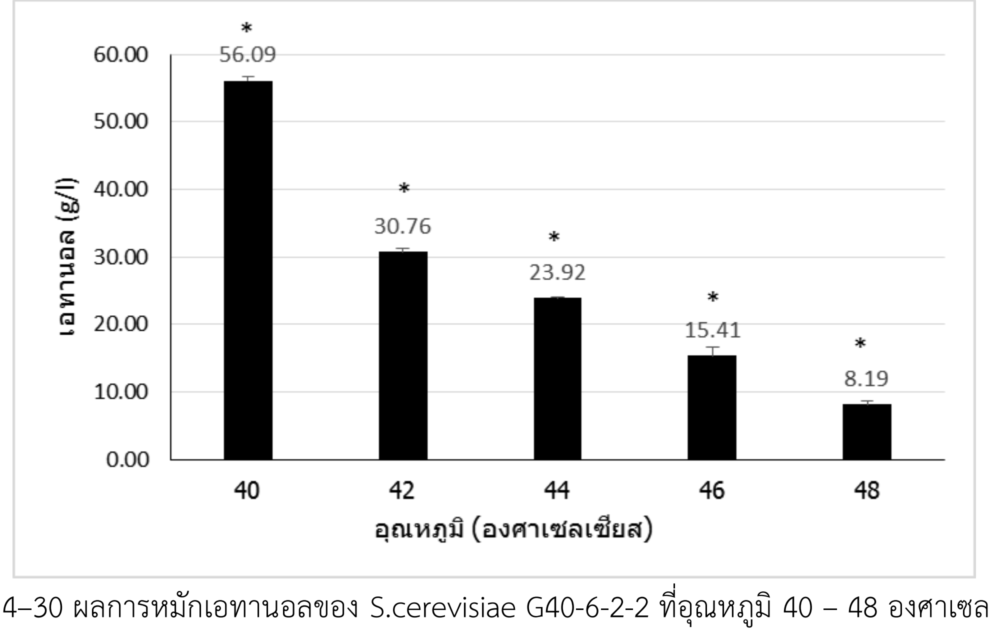
ผลการแปรผันค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเหลว fermentation medium เป็น 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจน *S. cerevisiae* G40-6-2-2 หมักเอทานอลดีที่สุดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 (53.82 กรัม/ลิตร) (รูปที่ 4-29)



รูปที่ 4–29 ผลของค่าความเป็นกรดด่างต่อประสิทธิผลการหมักเอทานอลของ S.cerevisiae G40-6-2-2 *ข้อมูลมีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

4.5.3 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

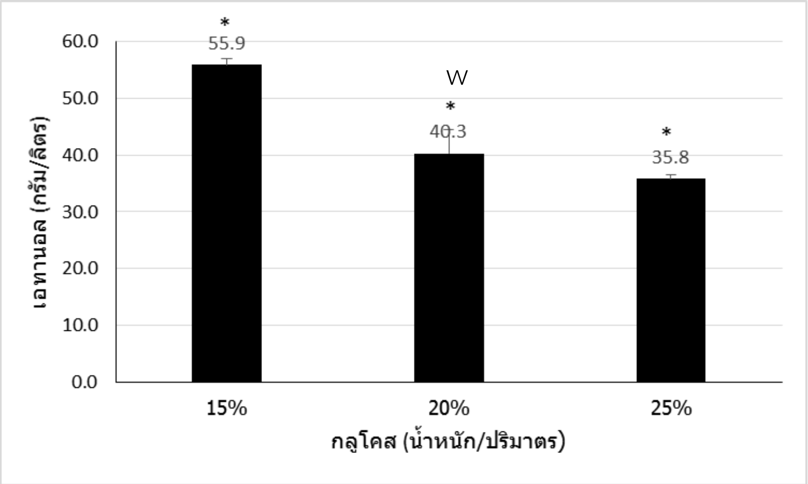
ผลการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 ในอาหารเหลว fermentation medium ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.0 ภายใต้ภาวะจำกัดออกซิเจนที่แปรผันอุณหภูมิเท่ากับ 40, 42, 44, 46 และ 48 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง พบว่าอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ความสามารถในการหมักเอทานอลของ *S. ceresivisiae* G40-6-2-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ลดลงจาก 56.09 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเป็น 8.19 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4-30)



รูปที่ 4–30 ผลการหมักเอทานอลของ S.cerevisiae G40-6-2-2 ที่อุณหภูมิ 40 – 48 องศาเซลเซียส *ข้อมูลมีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

4.5.4 ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลในน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นสูง

ผลการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 ในอาหารเหลว fermentation medium ที่แปรผันความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 15% (น้ำหนัก/ปริมตร), 20% (น้ำหนัก/ปริมตร) และ 25% (น้ำหนัก/ปริมตร) ค่าความกรดด่างเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในภาวะจำกัดออกซิเจน 48 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นทำให้การผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เอทานอลที่ผลิตได้ลดลงจาก 55.9 กรัม/ลิตร ที่ความเข้มข้มกลูโคส 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เป็น 35.8 กรัม/ลิตร ที่ความเข้มข้นกลูโคส 25% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (รูปที่ 4-31)



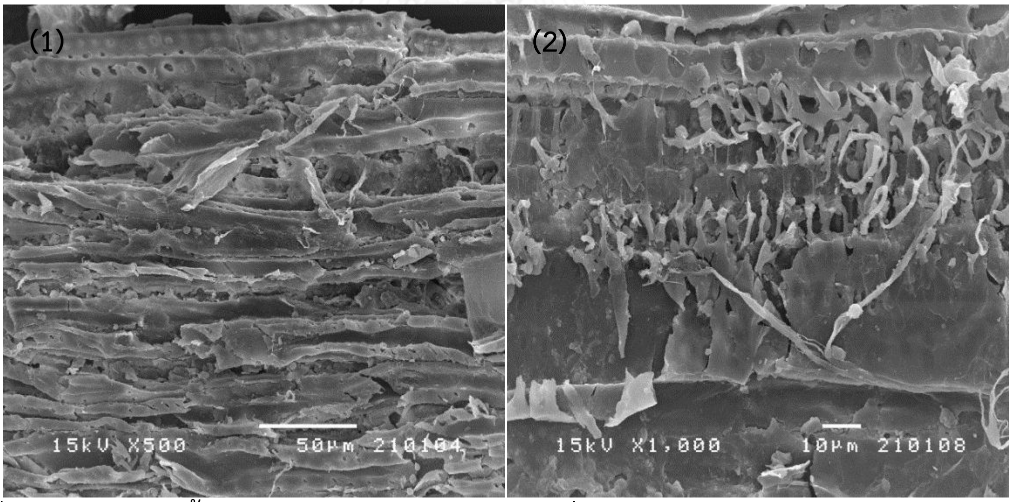
รูปที่ 4–31 ผลของความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารเหลว ferementation medium ต่อประสิทธิผลการหมักเอทานอลของ S. cerevisiae G40-6-2-2 *ข้อมูลมีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

4.6 ผลการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการตรึงเซลล์

4.6.1 ลักษณะของกากใยหัวมันสำปะหลัง

กากใยหัวมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งหลังจากกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง (มันเส้น) มีลักษณะเป็นของแข็งสีน้ำตาลขนาด 100 – 1000 ไมครอน มีความชื้น 73.57% ความเป็นกรดด่าง 3.87 จากการศึกษาลักษณะพื้นผิวของกากใยหัวมันสำปะหลังด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดพบว่าลักษณะพื้นผิวของกากใยหัวมันสำปะหลังมีลักษณะขรุขระและมีรูพรุน (รูปที่ 4-32) จากการศึกษาดัชนีการดูดซับน้ำพบว่ากากใยหัวมันสำปะหลังมีดัชนีการดูดซับน้ำเท่ากับ 5.93±0.22 กรัมน้ำ/กรัมกากใยหัวมันสำปะหลัง ความสามารถในการตรึงเซลล์กับกากใยหัวมันสำปะหลังเท่ากับ 0.16 ± 0.02 กรัมเซลล์แห้ง/กรัมกากใยหัวมันสำปะหลัง วัสดุสำหรับ

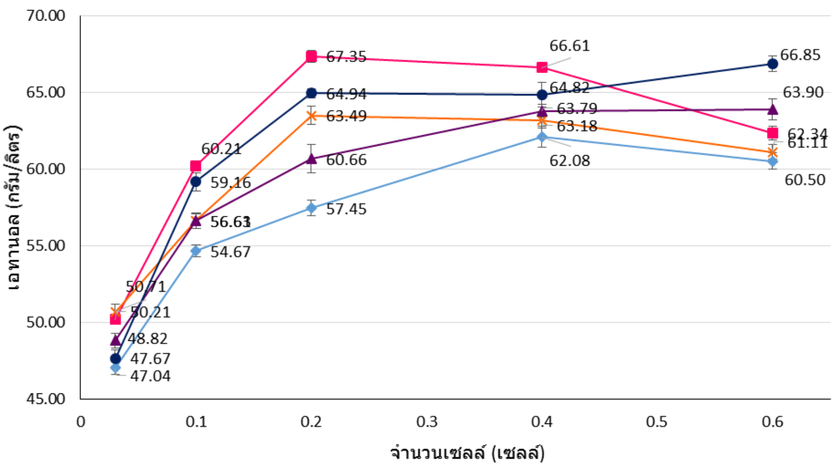
นำไปใช้ในการตรึงเซลล์ควรมีพื้นผิวที่มีความขรุขระและมีรูพรุนสูงเนื่องจากมีพื้นที่ผิวให้เซลล์ยึดเกาะในกระบวนการตรึงเซลล์มากกว่าวัสดุที่มีความขรุขระและรูพรุนต่ำ ซึ่งวัสดุที่มีพื้นผิวที่ขรุขระหรือมีรูพรุนสูงจะทำหน้าที่ในการป้องกันเซลล์ยีสต์ไม่ให้หลุดออกจากวัสดุตรึงเซลล์และรักษาปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงให้คงที่ตลอดระยะเวลาของการหมักเอทานอล (Vučurović & Razmovski, 2012; Yu et al., 2010) ในการเลือกวัสดุสำหรับการตรึงเซลล์นอกจากคำนึงถึงลักษณะพื้นผิวและรูพรุนของวัสดุที่ทำให้จุลินทรีย์เกาะได้ยังควรคำนึงความสามารถในการดูดซับน้ำของวัสดุนั้นด้วย เนื่องจากจุลินทรีย์จะเจริญบนพื้นผิวของวัสดุใดได้นั้นจะขึ้นอยู่กับความชื้นที่มีอยู่ในวัสดุนั้น การวัดดัชนีการดูดซับน้ำคือการวัดปริมาณน้ำที่วัสดุตรึงเซลล์สามารถดูดซับได้ วัสดุตรึงเซลล์ที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ควรมีค่าดัชนีการดูดซับน้ำสูง(Vučurović & Razmovski, 2012) จากการเปรียบเทียบดัชนีการดูดซับน้ำระหว่างกากใยหัวมันสำปะหลังซึ่งใช้ในงานวิจัยนี้กับวัสดุตรึงเซลล์จากของเหลือทิ้งทางการเกษตรชนิดอื่นๆ พบว่าดัชนีการดูดซับน้ำของกากใยหัวมันสำปะหลังมีค่าสูงกว่า เปลือกพีแคน เปลือกพิสตาชิโอ เปลือกข้าวสาลี กากแอปเปิ้ล กากถั่ว ใบของต้นครีโอโซท (Orzua et al., 2009) กากใยต้นโซโทล ซังข้าวโพด และ ลำต้นของต้นแคนเดลิลลา (Flores-Maltos et al., 2014)



รูปที่ 4–32 ลักษณะพื้นผิวของกากใยหัวมันสำปะหลังที่กำลังขยาย 500 เท่า (1) กำลังขยาย 1000 เท่า (2)

4.6.2 อัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างเซลล์กับกากใยหัวมันสำปะหลังสำหรับการตรึงเซลล์ด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง

ผลการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 ในอาหาร fermentation medium โดยแปรผันปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1x10^{9}$, $6.1x10^{9}$, $1.37x10^{10}$, $2.62x10^{10}$, $3.93x10^{10}$ เซลล์ และแปรผันปริมาณกากใยหัวมันสำปะหลังเริ่มต้น 0, 0.6, 1.2, 2.4 และ 4.8 กรัม (น้ำหนักแห้ง) พบว่าเซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังผลิตเอทานอลได้สูงกว่าเซลล์อิสระอย่างมีนัยสำคัญ การตรึงเซลล์แบบดูดซับเซลล์จะเกาะกับวัสดุตรึงเซลล์ด้วยแรงแวนเดอร์วาลล์หรือแรงไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างประจุลบบนผนังเซลล์ยีสต์กับประจุบวกบนตัวดูดซับซึ่งเซลล์ที่ถูกตรึงนั้นจะถูกป้องกันจากความเครียดต่างๆในระหว่างการหมักเช่น ความเข้มข้นเอทานอลที่เพิ่มขึ้น อุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น จึงทำให้ผลผลิตเอทานอลจากเซลล์ตรึงมากกว่าเซลล์อิสระ (Bai et al., 2008; Genisheva et al., 2014) อัตราส่วนระหว่างเซลล์เริ่มต้นต่อกากใยหัวมันสำปะหลังที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญคือ จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $1.37x10^{10}$ เซลล์ (0.2 กรัมน้ำหนักแห้ง) ต่อกากใยหัวมันสำปะหลัง 1.2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 67.35±0.40 กรัม/ลิตร และเมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น$3.93x10^{10}$ เซลล์ และเพิ่มกากใยหัวมันสำปะหลังเป็น 4.8 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ได้ผลผลิตเอทานอล 66.85±0.49 กรัม/ลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงที่สุด (ตารางที่ 4-24 และ รูปที่ 4-33) เลือกอัตราส่วนระหว่างเซลล์เริ่มต้นต่อกากใยหัวมันสำปะหลัง $1.37x10^{10}$ เซลล์ ต่อกากใยหัวมันสำปะหลัง 1.2 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 4–33 ผลการแปรผันปริมาณเซลล์เริ่มต้นและปริมาณกากใยหัวมันสำปะหลังต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ ปริมาณกากใยหัวมันสำปะหลัง 0 กรัมน้ำหนักแห้ง (◆) 0.6 กรัมน้ำหนักแห้ง (x) 1.2 กรัมน้ำหนักแห้ง (■) 2.4 กรัมน้ำหนักแห้ง (▲) 4.8 กรัมน้ำหนักแห้ง (●)

ตารางที่ 4–24 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable:Ethanol

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	2780.265[a]	24	115.844	422.759	.000
Intercept	263132.237	1	263132.237	960266.538	.000
CRF	227.485	4	56.871	207.544	.000
Cell	2401.395	4	600.349	2190.894	.000
CRF * Cell	151.385	16	9.462	34.529	.000
Error	13.701	50	.274		
Total	265926.203	75			
Corrected Total	2793.966	74			

a. R Squared = .995 (Adjusted R Squared = .993)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

4.6.3 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเซลล์ตรึงบนกากใยหัวมันสำปะหลัง เซลล์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และ เซลล์ตรึงบนกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต

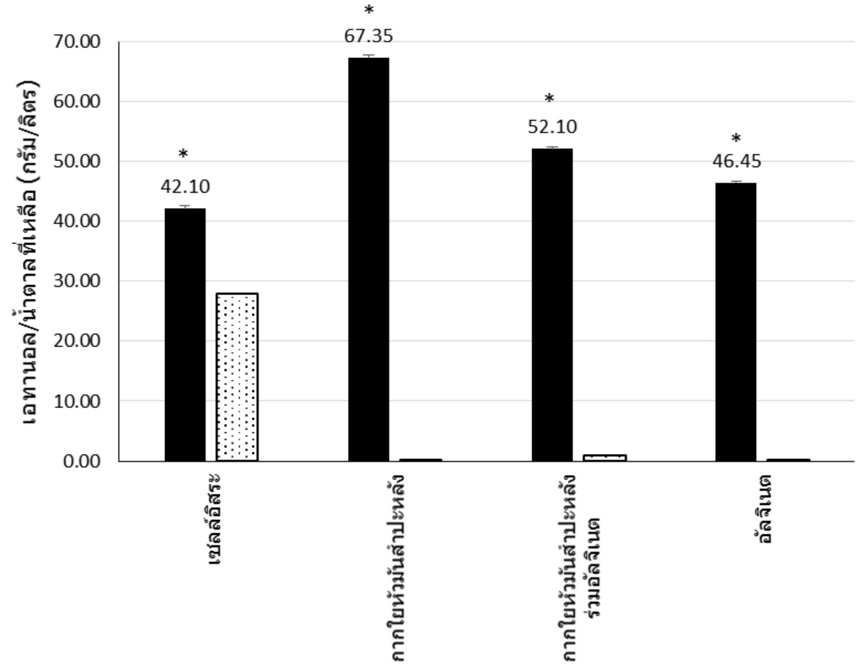
ผลการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงบนกากใยหัวมันสำปะหลัง (ผลจากข้อ 4.6.2) เซลล์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต และ เซลล์ตรึงบนกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลอัลจิเนต พบว่าจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงประมาณ 1.32×10^{10} เซลล์ (ตารางที่ 4-25) ผลผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงแต่ละวิธีเท่ากับ 67.35±0.53 กรัม/ลิตร (0.45 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) 46.45±0.18 กรัม/ลิตร (0.31 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) และ 52.10±0.40 กรัม/ลิตร (0.35 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) ตามลำดับ และเซลล์ตรึงสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกกว่าเซลล์อิสระ (42.10 กรัม/ลิตร) (0.28 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4-34) ในขณะหมักเอทานอลยีสต์เผชิญกับปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการหมักเอทานอลได้แก่ความเข้มข้นเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ค่าความเป็นกรด และอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ปัจจัยเหล่านี้ทำให้ยีสต์มีการเจริญลดลงจึงส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ผลิตได้ลดลงตามไปด้วย การตรึงเซลล์เป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยป้องกันเซลล์ยีสต์

จากปัจจัยต่างๆที่มีผลยับยั้งการผลิตเอทานอลจึงส่งผลให้ผลผลิต เอทานอลที่ได้จากเซลล์ตรึงเพิ่มสูงขึ้นกว่าเซลล์อิสระ (Arumugam & Ponnusami, 2015; Vučurović et al., 2008; Yan et al., 2012) จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้โดยเซลล์ตรึงเพิ่มขึ้น 10.33% - 59.97% เมื่อเปรียบเทียบกับประสิทธิผลการผลิตเอทานอลของเซลล์อิสระและทุกวิธีการที่ใช้ตรึงเซลล์สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 ให้สูงขึ้น เซลล์ที่ถูกตรึงแบบดักจับ (entrapment) มีข้อดีคือสามารถรักษาจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงไว้ให้คงที่ตลอดระยะการหมักและช่วยให้สามารถเก็บเกี่ยวเซลล์ออกจากน้ำหมักและนำไปใช้ซ้ำได้ง่ายแต่เซลล์ที่ถูกตรึงแบบดักจับมีข้อเสียที่สำคัญคือการถ่ายเทสับสเตรตและเอทานอลระหว่างเซลล์ภายในเม็ดเจลกับสิ่งแวดล้อมเกิดขึ้นอย่างจำกัด (Groboillot et al., 1994; Iqbal & Saeed, 2005; Kumakura et al., 1992) เพื่อลดข้อจำกัดในการถ่ายเทสับสเตรตและเอทานอลระหว่างเซลล์ภายในเม็ดเจลกับสิ่งแวดล้อม วัสดุที่นำมาใช้ในการตรึงเซลล์ควรมีรูพรุนขนาดใหญ่เนื่องจากการถ่ายเทสับสเตรตและเอทานอลระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อมของวัสดุตรึงเซลล์ที่มีรูพรุนขนาดใหญ่เกิดขึ้นได้ดีกว่าวัสดุตรึงเซลล์ที่มีรูพรุนขนาดเล็ก (Yu et al., 2010) งานวิจัยนี้ผู้ทดลองได้พยายามลดข้อจำกัดในการถ่ายเทสับสเตรตและเอทานอลระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อมภายในเม็ดเจลของเซลล์ที่ถูกตรึงแบบดักจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนตโดยการตรึงเซลล์ด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุตรึงเซลล์แบบดูดซับ (adsorption) ร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนตเพื่อเพิ่มพื้นที่รูพรุนภายในเม็ดเจล ผลการทดลองพบว่าการตรึงเซลล์ด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนตส่งผลให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเพียงอย่างเดียว ผลผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตเท่ากับ 46.45±0.18 กรัม/ลิตร เพิ่มเป็น 52.10±0.40 กรัม/ลิตรเมื่อหมักโดยเซลล์ตรึงด้วยกากในหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต (รูปที่ 4-34) ในปีค.ศ. 1992 Kumura และคณะศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วย hydroxyethyl methacrylate (HEMA) ซึ่งเป็นวัสดุตรึงเซลล์แบบดักจับร่วมกับวัสดุตรึงเซลล์แบบดูดซับได้แก่ ดินคานูมะ (kanuma earth) และ ถ่านกัมมันต์ (activated carbon) ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.1-1 มิลลิเมตร และ 0.15-0.07 มิลลิเมตร ตามลำดับ พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วย HEMA ร่วมกับดินคานูมะมีอัตราการเจริญและอัตราการผลิตเอทานอลสูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วย HEMA ร่วมกับถ่านกัมมันต์ เซลล์ที่ถูกตรึงด้วย HEMA เพียงอย่างเดียว และเซลล์อิสระที่ไม่ถูกตรึง เนื่องจากขนาดของรูพรุนในเม็ดเจลผสมระหว่าง HEMA และ ดินคานูมะมีขนาดใหญ่ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้อย่างอิสระ แต่เซลล์ที่ถูกตรึงด้วย HEMA ร่วมกับถ่านกัมมันต์กลับให้ผลผลิตเอทานอลต่ำกว่าเซลล์อิสระเนื่องจากเซลล์ถูกดักจับอย่างแน่นหนาภายในเม็ดเจลผสมระหว่าง HEMA และ ถ่านกัมมันต์ ทำให้ยีสต์ที่ถูกตรึงไม่สามารถเจริญได้ ต่อมาในปีค.ศ. 2011 Inal

และ Yigitoglu ศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต ร่วมกับ *N*-Vinyl-2pyrrolidone พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตร่วมกับ *N*-Vinyl-2pyrrolidone สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียว ต่อมาในปี ค.ศ. 2015 Tian และคณะ ศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยต้นข้าวโพดบดละเอียดร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนลได้รายงานว่าต้นข้าวโพดที่เติมเข้าไป ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเม็ดเจลอัลจิเนตส่งผลให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น นอกจากงานวิจัยที่กล่าวมายังมีการศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของยีสต์ที่ถูกตรึงวัสดุตรึงเซลล์แบบดูดซับชนิดอื่นๆร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต ได้แก่ ใยบวบ (Phisalaphong et al., 2007) ต้นข้าวโพด (Razmovski และ Vučurović 2011) MCM-41 mesoporous zeolite (Zheng et al., 2012) และ เซลลูโลสจากแบคทีเรีย (Kirdponpattara & Phisalaphong, 2013) ทุกงานวิจัยที่กล่าวมาล้วนพบว่าการตรึงเซลล์ด้วยวัสดุตรึงเซลล์แบบดูดซับร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนตทำให้พื้นที่รูพรุนภายในเม็ดเจลเพิ่มขึ้น เซลล์ที่ถูกกักภายในเม็ดเจลจึงมีอัตราการเจริญและอัตราการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ถูกตรึงแคลเซียมด้วยอัลจิเนตเพียงอย่างเดียว และสามารถรักษาปริมาณเซลล์ให้คงที่ตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล

จากการเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่เซลล์ตรึงทั้งสามแบบผลิตได้พบว่าเซลล์ที่ถูกตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียวผลิเอทานอลได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญ (67.35±0.53 กรัม/ลิตร หรือ 0.45 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) สูงกว่าเซลล์อิสระที่ไม่ถูกตรึง 59.97% และเพิ่มขึ้น 29.27% เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ถูกตรึงกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต (รูปที่ 4-34) ยีสต์ถูกดูดซับบนพื้นผิวของวัสดุตรึงเซลล์โดยการยึดเหนี่ยวด้วยไฟฟ้าสถิตย์ระหว่างประจุบวกของวัสดุตรึงเซลล์กับประจุลบของผนังเซลล์ยีสต์ซึ่งเป็นแรงยึดอย่างอ่อนจึงทำให้เซลล์สามารถหลุดออกจากวัสดุตรึงเซลล์ได้ง่ายหากมีปัจจัยอื่นมารบกวนเช่นการกวนผสม ค่าความเป็นกรดด่าง ไอออนนิกในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ อายุของเซลล์เป็นต้น (Genisheva et al., 2014; Iqbal & Saeed, 2005; Kolot, 1980) และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิผลการผลิตเอทานอลของเซลล์ตรึงแบบดูดซับและการเซลล์ตรึงแบบดักจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนตพบว่า การตรึงเซลล์ตรึงแบบดูดซับมีข้อดีคือเซลล์ไม่ต้องเผชิญกับข้อจำกัดในการถ่ายเทสับสเตรตและเอทานอลระหว่างเซลล์กับสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเซลล์สัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อโดยตรง ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้อย่างอิสระ นอกจากนั้นเมื่อเซลล์ตรึงหลุดออกจากพื้นผิวของวัสดุตรึงเซลล์เซลล์ใหม่หรือเซลล์อายุน้อยกว่าสามารถเกาะจับแทนที่บริเวณพื้นผิวที่ ว่างบนวัสดุเซลล์ได้ (Bai et al., 2008; Braschler et al., 2005) จากการศึกษาของ Singh และคณะ (ค.ศ. 2013) รายงานว่าการตรึงเซลล์แบบดูดซับด้วยชานอ้อยให้ผลการผลิตเอทานอลสูง

กว่าการตรึงเซลล์แบบดักจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนตและ agar-agar งานวิจัยนี้เลือกการตรึงเซลล์ด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังไปแล้วจึงนำไปใช้ในการทดลองถัดไป



รูปที่ 4–34 ผลการหมักเอทานอลของ S. cerevisiae G40-6-2-2 ที่ถูกตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง กากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต และ แคลเซียมอัลจิเนต ■ เอทานอล ☐ น้ำตาลที่เหลือ *ข้อมูลมีความแตกต่างที่ระดับความเชื่อมั่นเท่ากับ 95%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ตารางที่ 4–25 จำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงโดยวิธีการตรึงเซลล์แบบต่างๆ

วิธีการตรึงเซลล์	จำนวนเซลล์เริ่มต้น (เซลล์)	เซลล์ที่ไม่ถูกตรึง (เซลล์)	เซลล์ที่ถูกตรึง (เซลล์)
เซลล์อิสระที่ไม่ถูกตรึง	$1.31 \times 10^{10} \pm 1.93 \times 10^{8}$	-	-
เซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง	$1.37 \times 10^{10} \pm 1.27 \times 10^{8}$	$5.54 \times 10^{8} \pm 2.27 \times 10^{8}$	$1.31 \times 10^{10} \pm 2.27 \times 10^{8}$
เซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต	$1.37 \times 10^{10} \pm 1.27 \times 10^{8}$	$3.55 \times 10^{8} \pm 6.97 \times 10^{7}$	$1.33 \times 10^{10} \pm 6.97 \times 10^{7}$
เซลล์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต	$1.37 \times 10^{10} \pm 1.27 \times 10^{8}$	$2.90 \times 10^{8} \pm 3.30 \times 10^{7}$	$1.34 \times 10^{10} \pm 3.30 \times 10^{7}$

4.6.4 ผลการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยเซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง

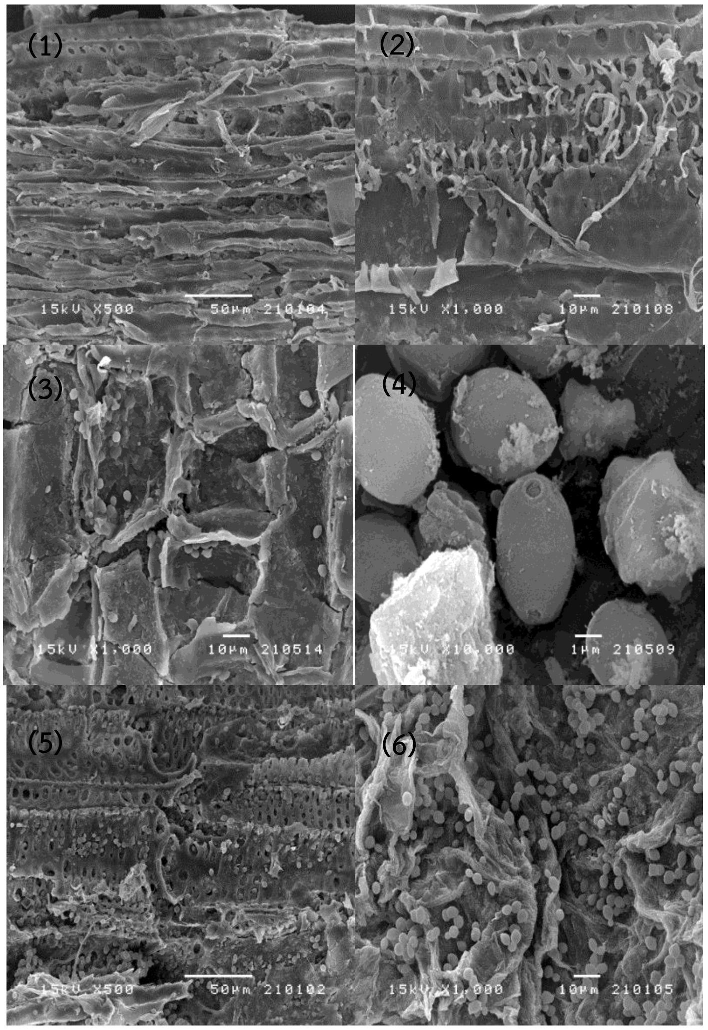
ผลการหมักเอทานอลของเซลล์ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 ที่ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังจากกากน้ำตาลผลการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 24% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ 26% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าประสิทธิผลในการผลิตเอทานอลของเซลลตรึงสูงกว่าของเซลล์อิสระที่ไม่ถูกตรึงอย่างมีนัยสำคัญ ความเข้นข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้นส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของ *S. ceresiae* G40-6-2-2 ลดลงทั้งในเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ และยีสต์ใช้เวลาในการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 4-36) ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของยีสต์แปรผกผันกับความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่สูงขึ้นเนื่องจากความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้แรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ในเซลล์เพิ่มขึ้นและความชื้นที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ (water activity) ลดลง ส่งผลให้ยีสต์เจริญได้ช้าลง (Bajaj et al., 2003; Fadel et al., 2013)

ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นและเวลาที่เซลล์ตรึง *S. cerevisie* G40-6-2-2 ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญคือ ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่เวลา 48 ชั่วโมง 82.15±0.48 กรัม/ลิตร หรือ 0.41±0.002 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่เวลา 72 82.71±0.91 กรัม/ลิตร หรือ 0.38±0.003 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด และ 100 ชั่วโมง 85.03±1.10 กรัม/ลิตร หรือ 0.38±0.003 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่เวลา 48 ชั่วโมง ให้อัตราการผลิตเอทานอล (ethanol productivity) สูงที่สุดคือ 1.71 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง (รูปที่ 4-36)

การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงนิยมใช้ *K. marxianus* เนื่องจากสามารถเจริญและหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (Dasgupt et al., 2014; Hacking et al., 1984; Limtong et al., 2007) แต่ *S. cerevisiae* สามารถทนต่อเอทานอลและทนต่อตัวยับยั้งต่างๆในระหว่างการหมักได้ดีกว่า *K. marxiamus* (Costa et al., 2014; Ranulfo et al., 2003) Banat และคณะ (1992) หมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสด้วย *K. marxianus* IMB5 และ *S. cerevisiae* IDY พบว่าได้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.37 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด และ 0.38 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมดตามลำดับ *S. cerevisiae* SIIC สายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลประเทศอียิปต์ ผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลที่อุณหภูมิ

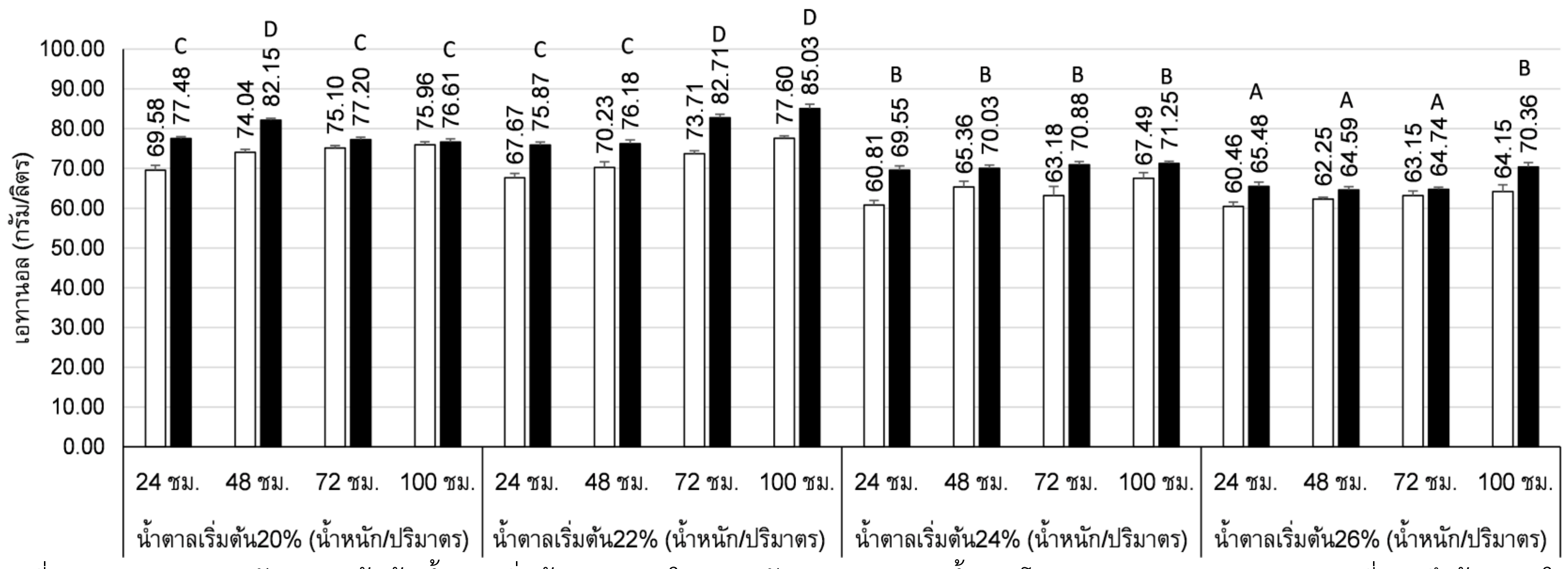
40 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.39 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด (Abdel-Fattah et al., 2000)

ผลการศึกษาลักษณะของกากใยหัวมันสำปะหลังก่อนและหลังการหมักภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่ากากใยหัวมันสำปะหลังก่อนการหมักมีลักษณะพื้นผิวขรุขระและมีรูพรุน มีเซลล์ยีสต์ซึ่งทำหน้าที่หมักเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังติดอยู่ด้วย หลังจากการตรึงเซลล์ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 แบบเกาะติดกับกากใยหัวมันสำปะหลังและหมักเอทานอล 48 ชั่วโมง พบจำนวนเซลล์ยีสต์ซึ่งเกาะบนพื้นผิวและในรูพรุนของกากใยหัวมันสำปะหลังเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4-35) จากผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในอาหาร molasses medium ที่เติมกากใยหัวมันสำปะหลังพบปริมาณกรดอะมิโนกลูตามิก ไกลซีน ฮิสทิดีน ลิวซีน ไลซีน โพรลีน เซอรีน ทรีโอนีน และ ไทโรซีนมากกว่าอาหาร molasses medium ที่ไม่เติมกากใยหัวมันสำปะหลัง (ตารางที่ 4-26) มีการรายงานการปลดปล่อยสารอาหารหรือแร่ธาตุจากวัสดุตรึงธรรมชาติบางชนิดเพิ่มแก่อาหารหมักในระหว่างการหมักเอทานอลดังนี้ ในปีค.ศ. 2007 Kopsahelis และคณะ รายงานว่าการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลด้วย *S. cerevisiae* ที่ตรึงด้วยกากมอลต์ที่เหลือจากการผลิตเบียร์ (Brewer’s spent grain) ได้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น เนื่องจากกากมอลต์ที่เหลือจากการผลิตเบียร์เพิ่มปริมาณสารอาหารแก่กากน้ำตาลนอกจากช่วยปกป้องเซลล์ตรึงจากความเครียดในระหว่างการหมักเอทานอล ต่อมาในปีค.ศ. 2012 Razmovski และ Vučurović รายงานว่าต้นข้าวโพดที่ใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์แบบดูดซับเพิ่มปริมาณโปรตีนและแร่ธาตุแก่อาหารหมักกากน้ำตาล ทำให้เซลล์ *S. cerevisiae* ที่ถูกตรึงด้วยต้นข้าวโพดหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลที่เติมต้นข้าวโพดได้ผลผลิตเอทานอลมากกว่าอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมต้นข้าวโพด การเติมสารสกัดยีสต์ (Jones & Ingledew, 1994) สารสกัดยีสต์ร่วมกับเปปโทน (Laopaiboon et al., 2009) กรดอะมิโน (Albers et al., 1996; Casey et al., 1984; Thomas & Ingledew, 1990) และ corn steep liquor (Li et al., 2011) เป็นแหล่งไนโตรเจนทำให้ประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* เพิ่มขึ้นเนื่องจากยีสต์สามารถใช้น้ำตาลได้มากขึ้นและทนต่อความเข้มข้นเอทานอลได้เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นยังช่วยให้กลีเซอรอลซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการหมักเอทานอลมีปริมาณลดลง



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4–35 ลักษณะของกากใยหัวมันสำปะหลังก่อนการตรึงเซลล์ ที่กำลังขยาย 500 เท่า (1) กำลังขยาย 1000 เท่า (2) เซลล์ยีสต์ที่ติดมากับกากใยหัวมันปะหลังที่กำลังขยาย 1000 เท่า (3) และ 10000 เท่า (4) จำนวนเซลล์ยีสต์ดูดซับบนกากใยหัวมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นหลังการหมักเอทานอล 48 ชั่วโมงที่กำลังขยาย 500 เท่า (5) กำลังขยาย 1000 เท่า (6)



รูปที่ 4–36 ผลการแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นและเวลาในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลโดย S.cerevisiae G40-6-2-2 ที่ถูกตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง (1.2 กรัมน้ำหนักแห้ง) □ เซลล์อิสระ และ ■ เซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลัง A B C และ D คือกลุ่มของปริมาณเอทานอลที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ค่าความเชื่อมั่น 95%

ตารางที่ 4–26 ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในอาหาร molasses medium ที่เติมและไม่เติมกากใยหัวมันสำปะหลัง (5% น้ำหนัก/ปริมาตร) (ALS Laboratory group (Thailand) CO., LTD.)

กรดอะมิโน (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	กากน้ำตาล (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	กากน้ำตาลที่เติมกากใยหัวมันสำปะหลัง (มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)
Alanine	164	163
Arginine	ND	ND
Aspartic Acid	832	524
Cystine	ND	ND
Glutamic Acid	283	340
Glycine	51.5	100
Histidine	13.3	66.0
Hydroxylysine	ND	ND
Hydroxyproline	ND	ND
Isoleucine	59.4	44.1
Leucine	55.4	93.3
Lysine	18.6	112
Methionine	96.6	57.2
Phenylalanine	33.6	51.6
Proline	60.6	65.8
Serine	49.0	171
Threonine	47.7	57
Tryptophan	ND	ND
Tyrosine	122	274
Valine	113	88.2

ND; not detected

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5.
สรุปผลการทดลอง

ยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 333 สายพันธุ์ แบ่งเป็นยีสต์ที่คัดแยกจากโรงงานน้ำตาลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจำนวน 29 สายพันธุ์ ได้แก่ *Pichia manshurica* (5 สายพันธุ์) *Candida ethanolica* (6 สายพันธุ์) *Saccharomyces cerevisiae* (13 สายพันธุ์) *Pichia krudriavzevii* (2 สายพันธุ์) ยีสต์ที่คัดแยกจากโรงงานน้ำตาลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสจำนวน 99 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae* (40 สายพันธุ์) *P. krudriavzevii* (16 สายพันธุ์) *P. manshurica* (9 สายพันธุ์) *Kluyveromyces marxianus* (27 สายพันธุ์) *Ogataea polymorpha* (28 สายพันธุ์) *C. ethanolica* (6 สายพันธุ์) *C. nivariensis* (1 สายพันธุ์) และ *Schizosaccharomyces pombe* (1 สายพันธุ์) ยีสต์ที่คัดแยกจากป่าพรุจำนวน 27 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. sojae* (14 สายพันธุ์) *C. maltosa* (2 สายพันธุ์) *Meyerozyma caribbica* (2 สายพันธุ์) *Schwanniomyces polymorphus* (3 สายพันธุ์) *C. pseudolambica* (1 สายพันธุ์) *Cyberlindnera subsuffucuens* (1 สายพันธุ์) *Zygoascus meyerae* (1 สายพันธุ์) *Wickerhamomyces sp.* (1 สายพันธุ์) ยีสต์ที่คัดแยกจากด้วงงวงมะพร้าวจำนวน 82 สายพันธุ์ ได้แก่ *C. sorboxylosa* (26 สายพันธุ์) *C.tropicalis* (22 สายพันธุ์) *C. akabaensis* (2 สายพันธุ์) *C. stellimalicola* (6 สายพันธุ์) *C. boidinii* (5 สายพันธุ์) *C. intermedia* (2 สายพันธุ์) *Cyberlindnera jadinii* (3 สายพันธุ์) *Ogataea sp.* (3 สายพันธุ์) *Cyberlindnera* sp. (3 สายพันธุ์) *Metschnikowia* sp. (2 สายพันธุ์) *C. ethanolica* (1 สายพันธุ์) *Ogataea thermomethanolica* (1 สายพันธุ์) *Zygoascus hellenicus* (1 สายพันธุ์) *C. pseudointemedia* (1 สายพันธุ์) *C. quercitrusa* (1 สายพันธุ์) *Hanseniaspora thailandica* (1 สายพันธุ์) *Hanseniaspora opuntiael* (1 สายพันธุ์) และ *Trichosporon mycotoxinivorans* (1 สายพันธุ์) จากแมลงกุดจี่ยักษ์จำนวน 96 สายพันธุ์ ได้แก่ *Trichosporon heliocopridis* sp. nov. (84 สายพันธุ์) *C. glabrata* (2 สายพันธุ์) *Galactomyces geotrichum* (2 สายพันธุ์) *C. tropicalis* (2 สายพันธุ์) *C. stellimalicola* (2 สายพันธุ์) *Trichosporon* sp. (1 สายพันธุ์) *Saccharomycetes* sp. (1 สายพันธุ์) *C. orthopsilosis* (1 สายพันธุ์) และ *Kurtmaniella* sp. (1 สายพันธุ์) จากยีสต์ที่แยกได้ทั้งหมดพบว่า *S. cerevisiae* เป็นสปีชีส์ที่พบมากที่สุดจากผลการคัดแยกจากโรงงานน้ำตาลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส *C. sojae* เป็นสปีชีส์ที่พบมากที่สุดจากการคัดแยกจากป่าพรุ *C. sorboxylosa* เป็นสปีชีส์ที่

พบมากที่สุดจากการคัดแยกจากด้วงงวงมะพร้าว และ ยีสต์สปีชีส์ใหม่ *T. heliocopridis* sp. nov. ถูกพบมากที่สุดจากการคัดแยกจากแมลงกุดจี่ยักษ์

ผลการหมักเอทานอลของยีสต์ที่คัดแยกได้พบว่ามียีสต์ 7 สายพันธุ์สามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสได้มากกว่ายีสต์สายพันธุ์ควบคุม *S. cerevisiae* TISTR 5596 (70.74 กรัม/ลิตร, 0.47 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) โดย *S. cerevisiae* G30-2-4-1 หมักเอทานอลได้สูงที่สุดเท่ากับ 75.31 กรัม/ลิตร (0.50 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มียีสต์ 34 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่า 33.18 กรัม/ลิตร หรือ 0.25 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส และพบว่า *S. cerevisiae* G40-6-2-2 ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเท่ากับ 62.74 กรัม/ลิตร (0.42 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส) ไม่มียีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสสายพันธุ์ใดสามารถหมักเอทานอลได้มากกว่ายีสต์สายพันธุ์ควบคุม *S. stipitis* JCM 10742 ทั้งในภาวะให้ออกซิเจน (0.2 กรัมเอทานอล/กรัมไซโลส) และในภาวะที่จำกัดออกซิเจน (0.12 กรัมเอทานอล/กรัมไซโลส) ผลการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 การเจริญ late log phase คือ 10 ชั่วโมง ค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น 5.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผลการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 ด้วยกระบวนการตรึงเซลล์พบว่าเอทานอลที่ผลิตได้จากเซลล์ตรึงด้วยอัลจิเนต (46.46 ± 0.18กรัม/ลิตร,) สูงกว่าเซลล์อิสระ (42.10 ± 0.61 กรัมต่อลิตร) คิดเป็น 10.37% เมื่อตรึงเซลล์แบบดูดซับด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังก่อนแล้วจึงนำไปตรึงแบบดักจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนต (เซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต) พบเอทานอลที่ได้ (52.10 ± 0.40 กรัม/ลิตร) 12.14% สูงกว่าเอทานอลที่ผลิตโดยเซลล์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนต แต่เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้จากเซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังและเซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต พบว่าเซลล์ตรึงแบบดูดซับด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังให้ปริมาณเอทานอล (67.35 ± 0.53 กรัม/ลิตร) 29.27% สูงกว่าเซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับแคลเซียมอัลจิเนต ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ตรึงด้วยแคลเซียมอัลจิเนตการแลกเปลี่ยนสับสเตรต เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ ระหว่างเซลล์ภายในเม็ดเจลและสิ่งแวดล้อมถูกจำกัด การตรึงเซลล์ซึ่งดูดซับด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังแบบดักจับด้วยแคลซียมอัลจิเนต (เซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังร่วมกับอัลจิเนต) ช่วยทำให้ข้อจำกัดข้างต้นของเซลล์ภายในเม็ดเจลลดลงได้เพราะเซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังทำให้มีช่องว่างภายในเม็ดเจลมากขึ้น อย่างไรก็ตามผลผลิตเอทานอลที่ได้ยังต่ำกว่าของเซลล์ตรึงแบบดูดซับด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังเพียงอย่างเดียว ทั้งนี้เพราะแม้จะไม่สามารถควบคุมจำนวนเซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมักเอทานอลไว้ได้ทั้งหมดได้ แต่เมื่อเซลล์หลุดออกจากกากใยหัวมันสำปะหลัง เซลล์ใหม่ที่ระยะการ

เจริญซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงกว่าสามารถมาเกาะแบบดูดซับกับกากใยหัวมันสำปะหลังแทนที่ได้ ภาวะที่เหมาะสมที่สุดของการหมักเอทานอลโดยเซลล์ตรึงด้วยกากใยหัวมันสำปะหลังคือ 1.37×10^{10} เซลล์ ต่อกากใยหัวมันสำปะหลัง1.2 กรัมน้ำหนักแห้ง ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลพบว่า *S. cerevisiae* G40-6-2-2 หมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมดเท่ากับ 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จนถึง 26% (น้ำหนัก/ปริมาตร)ได้ ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นที่ให้ปริมาณเอทานอลได้สูงที่สุดเท่ากับ 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่เวลา 48 ชั่วโมง ผลิตเอทานอล 82.15±0.48 กรัม/ลิตร หรือ 0.41 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลทั้งหมด ให้อัตราการผลิตเอทานอล 1.71 กรัมเอทานอล/ลิตร/ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนในอาหาร molasses medium ที่เติมและไม่เติมกากใยหัวมันสำปะหลัง (5% น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่าอาหาร molasses medium ที่เติมกากใยหัวมันสำปะหลังมีกรดอะมิโนในเพิ่มขึ้น กากใยหัวมันสำปะหลังนอกจากช่วยป้องกันเซลล์จากความเครียดที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักแล้ว เซลล์ยีสตที่เกาะติดอยู่กับกากใยหัวมันสำปะหลังยังกลายเป็นแหล่งกรดอะมิโนสำหรับการเจริญและเพิ่มความทนทานต่อเอทานอลของ *S. cerevisiae* G40-6-2-2 ที่ถูกนำมาตรึงด้วยกากใยมันสำปะหลังส่งผลให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

รายการอ้างอิง

Abdel-Fattah, W.R., Fadil, M., Nigam, P., Banat, I.M. 2000. Isolation of thermotolerant ethanologenic yeasts and use of selected strains in industrial scale fermentation in an egyptian distillery. *Biotechnology and Bioebgineering*, 68, 531-535.

Abe , F., Ohkusu, M., Kubo, T., Kawamoto, S., Sone , K., Hata, K. 2010. Isolation of yeasts from palm tissues damaged by the red palm weevil and their possible effect on the weevil overwintering. *Mycoscience*, 51, 215–223.

Aksu, Z., Dönmez, G. 2003. A comparative study on the biosorption characteristics of some yeasts for Remazol Blue reactive dye. *Chemosphere*, 50, 1075-1083.

Albers, E., Larsson, C., Lidén, G., Niklasson, C., Gustafsson, L. 1996. Influence of the Nitrogen Source on *Saccharomyces cerevisiae* Anaerobic Growth and Product Formation. *Applied Environment and Microbiology*, 3187–3195.

Anderson, P.J., Mcneil, K.E., Watson, K. 1988. Isolation and identification of thermotolerant yeasts from australian sugar cane mills. *Journal of General Microbiology*, 134, 1691-1698.

Anderson, P.A., Conway, H.F., Pfeifer, V.F., Griffin, E. 1969. Gelatinization of corn grits by roll and extrusion cooking. *Cereal Sci. Today*(14), 11 – 12.

Arcay-Ledezma, G.J., Slaughter, J.C. 1984. The response of *Saccharomyces cerevisiae* to fermentation under carbon dioxide pressure. *Journal of the Institute of Brewing*, 90, 81-84.

Ariyajaroenwong, P., Laopaiboon, P., Laopaiboon, L. 20015. Capability of sweet sorghum stalks as supporting materials for yeast immobilization to produce ethanol under various fermentation process. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 49, 79–84.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Arshad, M., Ahmed, S., Zia, M., Rajoka, M.I. 2014. Kinetics and thermodynamics of ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* MLD10 using molasses. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 172, 2455–2464.

Arumugam, A., Ponnusami, V. 2015. Ethanol production from cashew apple juice using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells on silica gel matrix synthesized from sugarcane leaf ash. *Chemical Engineering Communications*, 202, 709–717.

Babike, M., Abdel-Banat, A., Hoshida, H., Ano, A., Nonklang, S., Akada, R. 2010. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become uperior to the traditional process using mesophilic yeast? *Applied Microbiology Biotechnology*, 85, 861–867.

Baeyens, J., Kang, Q., Appels, L., Dewil, R., Lv, Y., Tan, T. 2015. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*, 47, 60-68.

Bai, F.W., Anderson, W.A., Moo-Young, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnology Advances*, 26, 89-105.

Bajaj, B.K., Taank, V., Thakur, R.L. 2003. Characterization of yeasts for ethanolic fermentation of molasses with high sugar concentrations. *Journal of Scientific and Industrial Research*, 62, 1079-1085.

Balat, M., Balat, H. 2009. Recent trends in global production and utilization of bio-ethanol fuel. *Applied energy*, 86, 2273 – 2282.

Banat, I.M., Nigam , P., Marchant , R. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52 C and producing ethanol at 45 C and 50 C. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 8, 259-263.

Banerjee, N., Bhatnagar, R., Viswanatha, L. 1981. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 11(4), 226-228.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Barnett, J.A. 2004. A history of research on yeasts 8: taxonomy. *Yeast*, 21, 1141–1193.

Beacven , M.J., Charpentier, C., Rose, A.H. 1982. Production and tolerance of ethanol in regulation to phospholipid fatty-acyl composition in *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 451. *Journal of General Microbiology*, 128, 1447-1455.

Behera, S., Mohanty, R., Ray, R. 2011. Ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in *Luffa cylindrica* L. sponge discs. *Applied Energy*, 88, 212–215.

Berkov, A., Feinstein, J., Small, J.J., Nkamany, M. 2007. Yeast isolated form neotropical wood-boring beetles in SE Peru. *Biotropica*, 39, 530-538.

Bonner, T.I., Brenner, D.J., Neufeld, B.R., Britten, R.J. 1973. Reduction in the rate of DNA reassociation by sequence divergence. *Journal of Molecular Biology*, 81, 123–135.

Botha, A. 2011. The importance and ecology of yeasts in soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 43, 1-8.

Boulton, C. 2000. Trehalose, glycogen and sterol. in: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, (Ed.) K.A. Smart, Blackwell Science. Oxford, U.K., pp. 10-19.

Braschler, T., Johnn, R., Heul, M., Metref, L., Renuad, P. 2005. Gentle cell trapping and release on a microfluidic chip by in situ alginate hydrogel formation. *Lab Chip*, 5, 553-559.

Brat, D., Boles, E., Wiedemann, B. 2009. Functional expression of a bacterial xylose isomerase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and enviromental microbiology*, 75, 2304–2311.

Britten, R.J., Graham, D.E., Neufeld, N.R. 1974. Analysis of repeating DNA sequences by reassociation. in: *Methods in Enzymology*, (Eds.) L. Grossman, K. Moldave Vol. 29, Academic Press. New York, pp. 363–418.

Cadete, R.M., Melo, M.A., Dussan, K.J., Rodrigues, R., Silva, S., Zilli, J.E., Vital, M.J.S., Gomes, F.C., Lachance, M., Rosa, C. 2012. Diversity and physiological

characterization of D-xylose fermenting yeasts isolated from the brazilian Amazonian forest. *Plos one*, 7(8), 1-11.

Cardona, C.A., Sanchez, O.J. 2007. Fuel ethanol production: Process design trends and integration opportunities. *Bioresource Technology*, 98, 2415–2457.

Casey, G.P., Ingledew, W.M. 1976. Ethanol tolerance in yeasts. *CRC Critical review in microbiology*, 13, 219-281.

Casey, P.G., Carol, A.M., Ingledew, W.M. 1984. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability, and alcohol production. *Applied Environment and Microbiology*, 639-646.

Chandel, A.K., Chan, E.S., Rudravaram, R., Narasu , L.M., Rao, L.V., Ravindra, P. 2007. Economics and environmental impact of bioethanol production technologies: an appraisal. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 2(1), 14-32.

Chandrasena, G., Keerthipala, A.P., Walker, G.M. 2006. Isolation and characterisation of Sri Lankan yeast germplasm and its evaluation for alcohol production. *Journal of Institute of Brewing*, 112(4), 302–307.

Chapman, R.L. 2003. Candida infections in the neonate. *Current opinion in Pediatrics*, 15, 97–102.

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(2), 120-124.

Costa, D.A., de Souza, C.J.A., Costa, P.S., Rodrigues, M., dos Santos, A., Lopes, M., Geiner, S., Silveira, W., Fietto, L. 2014. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(8), 3829–3840.

Dale, M.C., Eagger, A., Okos , M.R. 1994. Osmotic inhibition of free and immobilized *K. marxianus* anaerobic growth and ethanol productivity in whey permeate concentrate. *Process Biochemistry*, 29, 535-544.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

D'Amore, T., Celotto, G., Russell, I., Stewart, G.G. 1989. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. *Enzyme and Microbial Technology*, 11(7), 411-416.

Dasgupt, D., Ghosh, G., Ghosh, D., Suman, S., Khan, R., Agrawal, D., Adhikari, D. 2014. Ethanol fermentation from molasses at high temperature by thermotolerant yeast *Kluyveromyces* sp. IIPE4 5 3 and energy assessment for recovery. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 2019–2029.

Dasgupta, D., Ghosh, P., Ghosh, D., Suman, S.K., Khan, R., Agrawal, D., Adhikari, D.K. 2 0 1 4 . Ethanol fermentation from molasses at high temperature by thermotolerant yeast *Kluyveromyces* sp. IIPE453 and energy assessment for recovery. *Bioprocess and Biosystems Engineering*.

De Barros Lopes, M.S., Rainiere, S., Henschje, P.A., Langridge, P. 1 9 9 9 . AFLP fingerprinting for analysis of yeast genetic variation. *International Journal of Systematic of Bacteriology*, 49, 915–924.

Depraetere , S.A., Winderickx, J., Delvaux, F.R. 2 0 0 3 . Evaluation of the oxygen requirement of lager and ale yeast strains by preoxygenation. *Master Brewers Association of the America Technical Quarterly*, 40, 283–289.

Duarte, W.F., Amorim, J.C., Schwan, R.F. 2 0 1 3 . The effect of co-culturing non-Saccharomyces yeasts with *S. cerevisiae* on the ugar cane spirit (cachaca) fermentation process. *Antonie van Leeuwenhoek*, 103(1), 175–194.

Edgardo, A., Carolinaa, P., Manuel, R., Juanitaa, F., Jaime, B. 2 0 0 8 . Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology*, 43, 120–123.

Eiadpum, A., Limtong, S., Phisalaphong, M. 2 0 1 2 . High-temperature ethanol fermentation by immobilized coculture of *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 114(3), 325-329.

Endoh, R., Suzuki, M., Benno, Y. 2007. *Ambrosiozyma kamigamensis* sp. nov. and *A. neoplatypodis* sp. nov., two new ascomycetous yeasts from ambrosia beetle galleries. *Antonie van Leeuwenhoek*, 94, 365–376.

Endoh, R., Suzuki, M., Benno, Y., Futai, K. 2008. Candida kashinagacola sp. nov., C. psuedovanderkliftii sp. nov. and C. vanderkliftii sp. nov. three new yeasts from ambrosia beetle associated source. *Antonie van Leeuwenhoek*, 98, 389-402.

Fadel, M., Keera , A., Mouafi, F., Kahil, T. 2013. High level ethanol from sugar cane molasses by a new thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* strain in industrial scale. *Biotechnology Research International*.

Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G., Statzell-Tallman , A. 2000. Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts as determined by large-subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 1351–1371.

Flores-Maltos, D.A., Mussatto, S.I., Esquivel, J.C.C., Buenrostro, J.J., Rodriguez, R., Teixeira, J.A., Aguilar, C.N. 2014. Typical Mexican agroindustrial residues as supports for solid state fermentation. *American Journal of Agricultural and Biological Sciences*, 9, 289-293.

Gadanho, M., Almeida , J., Sampaio, J.P. 2003. Assessment of yeast diversity in a marine environment in the south of Portugal by microsatellite-primed PCR. *Antonie van Leeuwenhoek* 84, 217–227.

Genisheva, Z., Teixeira, J.A., Oliveira, J.M. 2014. Immobilized cell systems for batch and continuous winemaking. *Trends in Food Science and Technology*, 40(1), 33–47.

Graves, T., Narendranath, N.V., Dawson, K., Power, R. 2000. Effect of pH and lactic or acetic acid on ethanol productivity by Saccharomyces cerevisiae in corn mash. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 33, 469–474.

Groboillot, A., Boadi, D.K., Poncelet, D., Neufeld, R.J. 1994. Immobilization of cells for application in the food industry. *Critical Reviews in Biotechnology*, 14, 75-107.

Gujjari, P., Suh, S.O., Lee, C.F., Zhou, J.J. 2011. *Trichosporon xylopini* sp. nov., a hemicellulose-degrading yeast isolated from the wood-inhabiting beetle *Xylopinus saperdioides*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 2538-2542.

Ha, S.J., Kim, S.R., Choi, J.H., ParkYon, M.S., Jin, Y.S. 2011. Xylitol does not inhibit xylose fermentation by engineered *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylA as severely as it inhibits xylose isomerase reaction in vitro. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 77-84.

Hack, C.J., Marchant, R. 1998. Characterisation of a novel thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* var *marxianus*: development of an ethanol fermentation process. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 20, 323-327.

Hacking, A.J., Taylor, I.W.F., Hanas, C.M. 1984. Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40 °C. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19, 361.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Hahn-hägerdal, B., Galbel, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Liden, G., Zacchi, G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *TRENDS in Biotechnology*, 24(12), 549-556.

Hahn-hägerdal, B., Karhumaa, K., Fonseca, C., Spencer-martins, I., Gorwa-grauslund, M.F. 2007. Towards industrial pentose-fermenting yeast strains. *Applied Microbiology Biotechnology*, 74, 937–953.

Hammond, J.R.M. 2000. Yeast growth and nutrition. in: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, (Ed.) K.A. Smart, Blackwell Science. Oxford, U.K., pp. 77–85.

Inal, M., YĬgitǑglu, M. 2011. Production of bioethanol by immobilized Saccharomyces cerevisiae onto modified sodium alginate gel. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 86, 1548–1555.

Iqbal, M., Saeed, A. 2005. Novel method for cell immobilization and its application for production of organic acid. *Letters in Applied Microbiology*, 40, 178-182.

Ishizaki, H., Hasumi, K. 2013. Ethanol Production from Biomass. in: *Research Approaches to Sustainable Biomass Systems*, Elsevier Inc. Amterdam, pp. 243-257.

John, E.H. 1998. Ethanol-induced water stress in yeast. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 85, 125–137.

Jones, A.M., Ingledew, W.M. 1994. Fuel ethanol production: appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation. *Process Biochemistry*, 29, 483-488.

Jones, R.P., Greenfield, P.F. 1982. Review effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technolology*, 4, 210-223.

Jones, R.P., Greenfield, P.F. 1986. Role of water activity in ethanol fermentations. *Biotechnology and Bioengineering*, 28, 29–40.

Jones, R.P., Pamment , N., Greenfield, P.F. 1981. Alcohol fermentation by yeasts: The effect of environmental and other variables. *Process Biochemistry*, 16, 42-49.

Kirdponpattara, S., Phisalaphong, M. 2013. Bacterial cellulose–alginate composite sponge as a yeast cell carrier for ethanol production. *Biochemical Engineering Journal*, 77, 103-109.

Kolot, F.B. 1980. New trends in yeast technology immobilized cells. *Process Biochem*, 10, 2-8.

Kopsahelis, N., Agouridis, N., Bekatorou, A., Kanellaki, M. 2007. Comparative study of spent grains and delignified spent grains as yeast supports for alcohol production from molasses. *Bioresource Technology*, 98, 1440–1447.

Kourkoutas, Y., Bekatorou, A., Banat, I.M., Marchant, R., Koutinas, A.A. 2004. Immobilization technologies and support materials suitable inalcohol beverages production: a review. *Food Microbiology* 21, 377–397.

Kumakura, M., Yoshida, M., Asano, M. 1992. Preparation of Immobilized yeast cells with porous substrates. *Process Biochemistry*, 27(4), 225-229.

Kumar, R.S., Shankar, T., Anandapandian , K.T.K. 2011. Characterization of alcohol resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Toddy. *International Research Journal of Microbiology*, 2(10), 399-405.

Kumar, S., Singh, S.P., Mishra, I.M., Adhikari, D.K. 2009. Ethanol and xylitol production from glucose and xylose at high temperature by Kluyveromyces sp. IIPE453. *Journal of Industrial Microbiology and Bitechnology*, 36, 1483–1489.

Kunthiphun, S., Endoh, R., Takashima, M., Ohkuma, M., Tanasupawat, S., Akaracharanya, A. 2016. *Trichosporon heliocopridis* sp. nov., a urease-negative basidiomycetous yeast associated with dung beetles (*Heliocopris bucephalus* Fabricius). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66, 1180–1186.

Kurtman, C.P., Fell, J.W. 2006. Yeast systematics and phylogeny – implications of molecular identification methods for studies in ecology. in: *The yeast Hand Book*, (Eds.) C. Rosa, G. Péter Vol. 2, Spinger-Verlag. Berlin.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. 2011a. Definition, classification and nomenclature of the yeasts. in: *The yeast a Taxonomic study*, (Eds.) C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, Vol. 1, Elsevier. London, pp. 3-5.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. 2011b. Gene sequence analyses and other DNA-based methods for yeast species recognition. in: *The yeast a taxonomic study*, (Eds.) C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, Vol. 2, Elsvier. London, pp. 135-144.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T. 2011. *The Yeasts, a Taxonomic Study*. Elsevier, London.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Robert, V. 2011c. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. in: *The yeast a*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Taxonomic study, (Eds.) C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, Elsvier. London, pp. 90-107.

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* 73, 331–371.

Kwon , Y.J., Ma, A.Z., Li, Q., Wang, F., Zhuang, G.Q., Liu, C.Z. 2011. Effect of lignocellulosic inhibitory compounds on growth and ethanol fermentation of newly-isolated thermotolerant *Issatchenkia orientalis*. *Bioresource Technology*, 102, 8099–8104.

Lachance, M.A. 2006. Yeast Biodiversity: How Many and How Much? in: *The Yeast Handbook*, (Eds.) C. Rosa, G. Péter, Springer-Verlag. Berlin, pp. 1-9.

Lachance, M.A., Bowles, J.M. 2002. *Metschnikowia arizonensis* and *Metschnikowia dekortorum*, two new large-spored yeast species associated with floricolous beetles. *FEMS Yeast Res.*, 2(2), 81-6.

Lachance, M.A., Fedor, A.N. 2014. Catching speciation in the act: *Metschnikowia bowlesiae* sp. nov., a yeast species found in nitidulid beetles of Hawaii and Belize. *Antonie van Leeuwenhoek*, 105, 541–550.

Lachnace, M.A., Anderson, T.M., Starmer, W.T. 2006. A new subclade of haplontic *Metschnikowia* species associated with insects of morning glory flowers in Africa and description of *Metschnikowia aberdeeniae* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56, 1141–1145.

Laopaiboon, L., Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., Laopaiboon, P. 2009. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technology*, 100, 4176–4182.

Li, X., Parka, A., Estrelaa, R., Kim, S.R., Jin, Y.S., Cate, J.H.D. 2016. Comparison of xylose fermentation by two high-performance engineered strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Reports*, 9, 53-56.

Li, Y., Gao, K., Tian, S., Zhang, S., Yang, Z. 2011. Evulotion of *Saccaromyces cerevisiae* Y5 for ethanol production from enzymatic hydrolysate of non-detoxified steam-exploted corn stover. *Bioresource Technology*, 102(22), 10548–10552.

Limtong, S., Sringiew, C., Yongmanitchai, W. 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, 98, 3367–3374.

Liu, E., Hu, Y. 2010. Construction of a xylose-fermenting *Saccharomyces cerevisiae* strain by combined approaches of genetic engineering, chemical mutagenesis and evolutionary adaptation. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 204–210.

Liu, X.Z., Wang, Q.M., Groenewald, M., Bai, F.Y., Boekhout, T. 2015. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. *Study in Mycology* 81, 1–26.

Matsushika, A., Sawayama, S. 2010. Efect of initial cell concentration on ethanol production by flocculent *Saccharomyces cerevisiae* ith xylose-fermenting ability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 162(7), 1952–1960.

McMillan, J.D. 1993. Xylose fermentation to ethanol: a review. National Technical Information Service U.S.Departmentof Commerce.

Meinita, M.D.N., Hong, Y., Jeong, G. 2011. Detoxification of acidic catalyzed hydrolysate of Kappaphycus alvarezii (cottonii). *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 35, 93–98.

Middelhoven, W.J., Scorzetti, G., Fell, J.W. 2000. *Trichosporon veenhuisii* sp. nov., an alkane-assimilating anamorphic basidiomycetous yeast. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50, 381–387.

Milintawisamai, N., Niamsanit, S., Ngasan, C., Maungmontri, C., Buttapeng, W., Kotrsri, R., Pliansinchai, A., Weerathaworn, P. 2009. Efficacy of dimethyl benzyl ammonium chloride and microbial contamination studies in a modern sugarcane milling unit in Thailand. *Sugar Tech*, **11**(2), 208-212.

Morano, K.A., Grant, C.M., Moye-Rowley , W.S. 2012. The Response to Heat Shock and Oxidative Stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 190(4), 1157-1195.

Mussatto, S.I., Teixeira , J.A. 2010. Lignocellulose as raw material in fermentation processes. in: *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*, (Ed.) A. Méndez-Vilas, Formatex. Badajoz, Spain, pp. 897-907.

Nakase, T. 1971. New species of yeasts found in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 17, 409–419.

Nakase, T., Jindamorakot, S., Sugita, T., Am-in, S., Kawasaki, H., Potacharoen, W., Tanticharoen, M. 2006. *Trichosporon siamense* sp. nov. isolated frominsect frass in Thailand. *Mycoscience*, 106–109.

Nakase, T., Komagata, K. 1968. Taxonomic significance of base composition of yeast DNA. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 14, 345–357.

Nardi , J.B., Bee, C.M., Miller , L.A., Nguyen, N.H., Suh, S.O., Blackwell, M. 2006. Communities of microbes that inhabit the changing hindgut landscape of a subsocial beetle. *Arthropod Structure & Development*, 35, 57-68.

Narendranath, N.V., Thomas, K.C., Ingledew, W.M. 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 26(3), 171-7.

Nguyen, H.P., Le, H.D., Le, V.V. 2015. Effect of ethanol stress on fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on *Nypa fruticans* leaf sheath pieces. *Food Technology and Biotechnology*, 53(1), 96–101.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Nguyen , T.L.T., Gheewala, S.H. 2008. Life cycle assessment of fuel ethanol from cane molasses in Thailand. *International Journal of Life Cycle Assessment*, 13, 301–311.

Nikolića, S., Mojović, L., Rakin, M., Pejin, D. 2009. Bioethanol production from corn meal by simultaneous enzymatic saccharification and fermentation with immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Fuel*, 88(9), 1602-1607.

Norton, J.S., Krauss, R.W. 1971. The inhibition of cell division in *Saccharomyces cerevisiae (*Meyen) by carbon dioxide. *Plant and Cell Physiology*, 13, 139-149.

Ok, T., Hashinaga, F. 1997. Identification of sugar-tolerant yeasts isolated from high-sugar fermented vegetable extracts. *Journal of General and Applied Microbiology*, 43, 39–47.

Olbrich, H. 1963. *The molasses*. Biotechnologie-Kempe GmbH (2006), Berlin.

Oliva-Neto, P., Dorta, C., Carvalho, A., Gomes de Lima, V., Fernandes da Silva, D. 2013. The Brazilian technology of fuel ethanol fermentation – yeast inhibition factors and new perspectives to improve the technology. in: *Material and process for energy: communicating current research and technological development*, (Ed.) A. Mendez-Vilas, Formatex. Badajoz, Spain, pp. 371-379.

Onsøyen, E. 2001. Alginate production, composition, physicochemical properties, physiological effects, safety, and food applications. in: *Handbook of Dietary Fiber*, (Eds.) S.S. Cho, M.L. Dreher, CRC Press. New York, pp. 659-675.

Orzua, M.C., Mussatto, S.I., Contreras-Esquivel, J.C., Rodriquez , R., Garza, H.D., Teixeira, J.A., Aguila, C.N. 2009. Exploitation of agro industrial wastes as immobilization carrier for solid-state fermentation. *Industrial Crops and Products*, 30, 24-27.

Pacheco, A.M., Gondim, D.R., Gonçalves, L.R.B. 2010. Ethanol production by fermentation using immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* in cashew apple bagasse. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 161, 209–217.

Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technology*, 74(1), 25–33.

Pandey, K., Agarwal, P.K. 1993. Effect of EDTA, potassium ferrocyanide, and sodium potassium tartarate on the production of ethanol from molasses by *Saccharomyces cerevisiae Enzyme Microbial Technology*, 15, 887-898.

Paturau, V.M. 1982. Byproduct of the cane sugar industry. *Sugar series*, 2, 167-193.

Phisalaphong, M., Budiraharjo, R., Bangrak, P., Mongkolkajit, J., Limtong, S. 2007. Alginate-loofa as carrier matrix for ethanol production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 104, 214–217.

Pitt, J.I., Miller, M.W. 1968. Sporulation in *Candida pulcherrima, Candida reukaufii* and *Chlamydozyma species:their* relationships with *Metschnikowia. Mycologia*, 60, 663–685.

Plessas, S., Bekatorou, A., Koutinas, A.A., Soupioni, M., Banat, I.M., Marchant, R. 2007. Use of *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized on orange peel as biocatalyst for alcoholic fermentation. *Bioresource Technology*, 98, 860–865.

Polakovic, M., Bryjak, J. 2003. Modelling of potato starch saccharification by an *Aspergillus niger* glucoamylase. *Biochemical Engineering Journal*, 18, 57-63.

Prillinger, H., Lopandic, K., Suzuki, M., Kock, J.L.K., Boekhout, T. 2011. Chemotaxonomy of yeasts. in: *The yeast a Taxonomic study*, (Eds.) C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, Elsvier. London, pp. 129-136.

Ranulfo, M., Rigo, M., Joekes, I. 2003. Ethanol fermentation of a diluted molasses medium by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chrysotile. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 46(4), 751-757.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Raspor, P., Zupan, J. 2006. Yeasts in extreme environments. in: *The Yeast Handbook*, (Eds.) C. Rosa, G. Péter Springer-Verlag. Berlin, pp. 371-417.

Rattanapan, A., Limtong, S., Phisalaphong, M. 2011. Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations of blackstrap molasses using immobilized yeast cells on thin-shell silk cocoons. *Applied Energy*, 88, 4400–4404.

Razmovski, R., Vučurović, V. 2012. Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. *Fuel*, 92, 1-8.

Razmovski, R., Vučurović, V.M. 2011. Ethanol production from sugar beet molasses by S. cerevisiae entrapped in an alginate–maize stem ground tissue matrix. *Enzyme and Microbial Technology*, 48, 378-385.

Richter, K.M., Haslbeck, M., Buchner, J. 2010. The heat shock response: life on the verge of death. *Molecular Cell*, 40(2), 253-266.

Rowley, A., Johnston, G.C., Butler, B., Werner-Washburne, M., Singer, R.A. 1993. Heat shock-mediated cell cycle blockage and G1 cyclin expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 13(2), 1034-1041.

Ruyters, S., Mukherjee , V., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M., Willems, K.A., Lievens , B. 2015. Assessing the potential of wild yeasts for bioethanol production. *Journal of Industry Microbiology and Biotechnology*, 42(1), 39–48.

Sanchez, O.J., Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99(13), 5270–5295.

Sarkar, N., Ghosh, S.K., Ban, S., Aikat, K. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: an overview. *Renewable Energy*, 37(1), 19-27.

Sarris, D., Papanikolaou, S. 2015. Biotechnological production of ethanol: Biochemistry, processes and technologies. *Engineering in life science*, 1–23.

Sawatdisawanee, Y. 2015. Biofuel status and policy.

Shehata, A.M.E.-T. 1960. Yeasts isolated from sugar cane and its juice during the production of Aguardente de Cana. *Applied Microbiology*, 8(2), 73–75.

Silalertruksa, T., Gheewala, S.H. 2009. Environmental sustainability assessment of bio-ethanol production in Thailand. *Energy*, 34, 1933–1946.

Simon, S.A., Gutknecht, J. 1980. Solubility of carbondioxide in lipid bilayer membranes and organic solvents. *Journal of Biochemistry*, 596(3), 352-358.

Singh, A., Sharma, P., Saran, A.K., Singh, N., Bishnoi, N.R. 2013. Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. *Renewable Energy*, 50, 488-493.

Sorapipatana, C., Yoosin, S. 2011. Life cycle cost of ethanol production from cassava in Thailand. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 15(2), 1343–1349.

Sree, K.N., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I.M., Rao, L.V. 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioresource Technology*, 72(1), 43-46.

Starmer, W.T., Lachance, M.-A. 2011. Yeast Ecology. in: *The Yeasts, a Taxonomic Study*, (Eds.) C.P. Kurtzman, F.W. Jack, T. Boekhout, Vol. 1, Elsevier. London, pp. 65-83.

Stender, H., Kurtzman, C.P., Hyldig-Nielsen, J.J., Sørensen, D., Broomer, A., Oliveira, K., Perry-O'Keefe, H., Sage, A., Young, B., Coull, J. 2001. Identification of *Dekkera bruxellensis* (Brettanomyces) from wine by fluorescence in situ hybridization using peptide nucleic acid probes. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(2), 938–941.

Strehaiano, P., Ramon-Portugal, F., Taillandier, P. 2006. Yeasts as biocatalysts. in: *The yeast hand book, Yeasts in Food and Beverage*, (Eds.) A. Querol, G. Fleet, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. Germany, pp. 243-283.

Sugita, T. 2011. *Trichosporon behrend* (1890). in: *In The Yeasts: a Taxonomic study*, (Eds.) C.P. Kurtzman, J.W. Fell, T. Boekhout, Vol. 3 , Elsevier. London, pp. 2015–2061.

Sugita, T., Nishikawa, A., Shinoda, T., Yoshida, K., Ando, M. 1995. A new species *Trichosporon domesticum*, isolated from the house of a summer-type hypersensitivity pneumonitis patient in Japan. *The Journal of General and Applied Microbiology*, 41(5), 429–436.

Suh, S., Marshall, C.J., McHugh, J.V., Blackwell, M. 2013. Wood ingestion by passalid beetles in the presence of xylose-fermenting gut yeasts. *Molecular Ecology* 12, 3137–3145.

Suh, S.O., Zhou, J.J. 2011. *Kazachstania intestinalis* sp nov, an ascosporogenous yeast from the gut of passalid beetle *Odontotaenius disjunctus*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100, 109-115.

Taherzadeh, M.J., Karimi, K. 2011. Fermentation inhibitors in ethanol processes and different strategies to reduce their effects. in: *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, Elsevier Inc. Amterdam, pp. 287-311.

Takeshige, A., Ouchi, K. 1995. Factors affecting the ethanol productivity of yeast in molasses. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(5), 449-452.

Thomas, K.C., Ingledew, W.M. 1990. Fuel alcohol production: effects of free amino nitrogen on fermentation of very-high-gravity wheat mashes. *Applie Environment and Microbiology*, 2046-2050.

Thomas, V., Kwong, A. 2001. Ethanol as a lead replacement: phasing out leaded gasoline in Africa. *Energy Policy*, 29(13), 1133–1143.

Tian, S., Wang, Z., Wang, Z., Wang, X., Zhao, R. 2015. Effect of adding corn stalk residue pretreated by laser on immobilized yeast. *Bioresources*, 10(4), 8498-8504.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Turner, P., Mamo, G., Karlsson, N.E. 2007. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microbial Cell Factories*, 6(9), 1-23.

Urbina, H., Blackwell, M. 2012. Multilocus phylogenetic study of the *Scheffersomyces* yeast clade and molecular characterization of the N-terminal region of xylose reductase. *PloS ONE*, 7(2), e39128.

Urbina, H., Frank, R., Blackwell, M. 2013. *Scheffersomyces cryptocercus*: a new xylose-fermenting yeast associated with the gut of wood roaches and new combinations in the Sugiyamaella yeast clade. *Mycologia*, 105(3), 650–660.

Vaughan-Martini, A., Kurtzman, C.P. 1985. Deoxyribonucleic acid relatedness among species of the genus *Saccharomyces* sensu stricto. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 35(4), 508–511.

Vega , F.E., Dowd, P.F. 2005. The role of yeasts as insect endosymbionts. in: *Insect fungal associations, ecology and evolution*, (Eds.) F.E. Vega, M. Blackwell, Oxford University Press. New York, pp. 211-243.

Verduyn, C., Zomerdijk , T.P.L., Van Dijken, J.P., Scheffers, W.A. 1984. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspension with an enzyme electrode. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19(3), 181–185.

Verica, M., Branko, B., Viktor, N. 2010. Immobilized cells. in: *Encyclopedia of Industrial Biotechnology: Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology*, (Ed.) M.C. Flickinger, John Wiley & Sons, Inc. New jersey, pp. 2899-2916.

Vohra, M., Manwar, J., Manmode, R., Padgilwar, S., Patil, S. 2014. Bioethanol production: feedstock and current technologies. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(1), 573–584.

Vučurović, V., Razmovski, R., Rebić , M. 2008. A corn stem as biomaterial for *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilization for the ethanol production. *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly*, 4, 235–238

Vučurović, V.M., Razmovski, R.N. 2012. Sugar beet pulp as support for *Saccharomyces cerivisiae* immoblization in bioethanol production. *Industrial Crops and Products*, 39(1), 128-134.

Willaert, R.G. 2011. Cell immobilization and its applications in biotechnology: current trends and future prospects. in: *Fermentation Microbiology and Biotechnology*, (Eds.) E.M.T. El-Mansi, C.F.A. Bryce, A.L. Demain, A.R. Allman, CRC Press Taylor & Francis Group. New York, pp. 313-367.

Yan, S., Chen, X., Wu, J., Wang, P. 2012. Ethanol production from concentrated food waste hydrolysates with yeast cells immobilized on corn stalk. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 94(3), 829–838.

Yi, Y., Neufeld, R., Poncelet, D. 2004. Immobilized of cells in polysaccharide gels. in: *Polysaccharides structural Diversity and Functional Versatility*, (Ed.) S. Dumitriu, Marcel Dekker. New York, pp. 867-892.

Yu, J., Yue, G., Zhong, J., Zhang, X., Tan, T. 2010. Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* to modified bagasse for ethanol production. *Renewable Energy*, 35(6), 1130-1134.

Yuangsaard, K., Yongmanitchai, W., Yamada, M., Limtong, S. 2013. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. *Antonie van Leeuwenhoek* 103, 577–588.

Zech , M., Gorisch , H. 1995. Invertase from *Saccharomyces cerevisiae*: reversible ativation by components of industrial molasses media. *Ezyme and Microbial Technology*, 17, 41-46.

Zhang, C.M., Jiang, L., Mao, Z.G., Zhang, J.H., Tang, L. 2011. Efects of propionic acid and pH on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* in cassava mash. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 165(3-4), 883–89.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Zhao, J., Wang, Z., Wang, M., He, Q., Zhang, H. 2008. The inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* cells by acetic acid quantified by electrochemistry and fluorescence. *Bioelectrochemistry*, 72(2), 117–121.

Zheng, C., Sun, X., Li, L., Guan, N. 2012. Scaling up of ethanol production from sugar molasses using yeast immobilized with alginate-based MCM-41 mesoporous zeolite composite carrier. *Bioresource Technology*, 115, 208-214.

Zhu, Y. 2007. Immobilized cell fermentation for production of chemicals and fuels. in: *Bioprocessing for value-added products from renewable resources*, (Ed.) S.T. Yang, Elsevier Science Publisher. Amsterdam, pp. 373-396.

รายการอ้างอิงภาษาไทย

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2557. คู่มือการพัฒนาและการลงทุนผลิตพลังงานทดแทนชุดที่ 7 เชื้อเพลิงเอทานอล. กระทรวงพลังงาน, กรุงเทพมหานคร.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2555. โครงการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสเชิงพาณิชย์. กรัมพลังงาน.

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. 2552. การศึกษาความเป็นไปได้ของการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง. ส่วนบริหารและจัดการข้อมูลและปรึกษาแนะนำสำนักบริหารยุทธศาสตร์.

กระทรวงพลังงาน. 2558. แผนพัฒนาพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือก พ.ศ. 2558 - 2579. in: กรมพัฒนาพลังทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน.

ธนาคารแห่งประเทศไทย. 2558. รายงานสถานการณ์ราคาเอทานอลของไทย ไตรมาส 4/2558. in: ธนาคารแห่งประเทศไทย, ธนาคารแห่งประเทศไทย.

พงษ์พรรณี, ภ. 2557. องค์ประกอบของสารอาหารและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อย. ภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทน. 2556. องค์ประกอบทางเคมีของหัวมันสำปะหลัง. in: สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทน.

ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Molasses fermentation medium

แอมโมเนียมซัลเฟต	1.3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.7	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร
ค่าความเป็นกรดด่าง	5.0	(ปรับด้วยกรดซัลฟูริก)
กากน้ำตาล	555	กรัม (น้ำตาลเริ่มต้น 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร))
กากน้ำตาล	611	กรัม (น้ำตาลเริ่มต้น 22% (น้ำหนัก/ปริมาตร))
กากน้ำตาล	666	กรัม (น้ำตาลเริ่มต้น 24% (น้ำหนัก/ปริมาตร))
กากน้ำตาล	722	กรัม (น้ำตาลเริ่มต้น 26% (น้ำหนัก/ปริมาตร))

2. อาหารแข็ง 5% Malt extract (Wickerham 1951)

สารสกัดมอลต์	50	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

3. อาหารแข็ง 5% Cornmeal

Cornmeal Agar (Wako, Japan)	50	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

4. อาหารแข็ง Restricted growth (RG) (Herman 1971a)

สารสกัดยีสต์	0.2	กรัม
เปปโตน	0.2	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

5. **Morphology Agar (Wickerham 1951)**

Morphology Agar (Becton, USA)	34.75	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

6. **อาหารเหลว Yeast carbon base**

Yeast carbon base (Becton, USA)	6.7	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

7. **อาหารแข็ง Yeast Carbon Base Ammonium sulfate**

Yeast Carbon Base (Difco, USA)	6.7	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	0.1	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

8. **อาหารทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอน**

ความเข้มข้นน้ำตาลแต่ละชนิดเท่ากับ 0.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในสารละลาย Yease carbon base (difco, USA) ความเข้มข้น 1 เท่าปริมาตร 10 มิลลิลิตร

สารประกอบคาร์บอน	ชนิด
D-glucose	
Galactose	
L-sorbose	
Sucrose	
Maltose	
Cellobiose	Hexose-based carbon sources
Trehalose	
Lactose	
Melibiose	
Raffinose	
Melezitose	
Inulin	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Soluble starch	
D-xylose L-arabinose D-arabinose D-ribose L-rhamnose	Pentose
Ethanol	Simple alcohol
Methanol	
สารประกอบคาร์บอน	ชนิด
Glycerol	polyols
Erythritol	
Ribitol	
Galactitol	
D-manitol	
D-glucitol	
L-arabitol	
Xylitol	
Inositol	
α-methyl-D-glucoside	Amines
Salicin	
D-glucosamine	
D-glucurono lactone	
N-acetyl-D-glucosamine	
Glucono-δ-lactone	
2-keto-gluconic acid	Acid
5-keto-gluconic acid	
DL-lactic acid	

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Succinic acid	
Citric acid	
Quinic acid	
Saccharic acid	
D-glucuronic acid	
D-galacturonic acid	
D-gluconic acid	
n-decane	Hydrocarbon
n-hexadecane	
สารประกอบคาร์บอน	ชนิด
Propylene glycol	Other
Butane-2,3-diol	
Xylo-oligosaccharide	

9. อาหารทดสอบการใช้แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนแต่ละชนิดประกอบด้วย

โพแทสเซียมไนเตรต	0.78	กรัม
โซเดียมไนไทรต์	0.26	กรัม
เอทธิลอะมีน	0.64	กรัม
คาดาเวอร์รีน	0.68	กรัม
แอลไลซีน	0.56	กรัม
แอมโมเนียม ซัลเฟต	0.51	กรัม
ครีเอทีน	0.38	กรัม
ครีเอทินีน	0.29	กรัม
ดีกลูโคซามีน	1.68	กรัม
อิมิดาโซล	0.26	กรัม
ดีทริปโตเฟน	0.79	กรัม
Yease carbon base	11.7	กรัม
วุ้นผง	20	กรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

น้ำกลั่น	1000	ลิตร

10. อาหาร Molasses medium (ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัม/ลิตร)

กากน้ำตาล	555	กรัม
น้ำกลั่น	998	มิลลิตร
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.7	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.5	กรัม

กากน้ำตาลผสมกับน้ำกลั่นแล้วปั่นแยกตะกอนจากนั้นเติมสารอาหารอื่นๆในส่วนใสที่แยกได้ ปรับค่าความเป็นกรดด่างด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข.
การเตรียมสารเคมี

1. Lysis solution

ยาตาเลส	300	มิลลิกรัม
ยาตาเลสบัฟเฟอร์	30	มิลลิลิตร
อาร์เอ็นเอสเอ	30	ไมโครลิตร

2. **ยาตาเลสบัฟเฟอร์**

โซเดียมคลอไรด์	23.2	กรัม
สารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตความเข้มข้น 1 โมลาร์	5	มิลลิลิตร
สารละลายอีดีทีเอเข้มข้น 5 โมลาร์ (ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8)	10	มิลลิลิตร
ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ	500	มิลิลิตร

3. **สารละลายเอสดีเอสเข้มข้น 8% (น้ำหนัก/ปริมาตร)**

สารละลายเอสดีเอสเข้มข้น 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	4	มิลลิลิตร
ทีอีเอ็นบัฟเฟอร์	6	มิลิลิตร
โปรตีเนสเค (300 U)	10	มิลลิกรัม

4. **ทีอีเอ็นบัฟเฟอร์**

สารละลายทริส-เอชซีแอลความเข้มข้น 1 โมลาร์ (ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8)	2	มิลลิลิตร
สารละลายอีดีทีเอเข้มข้น 0.5 โมลาร์ (ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 8)	400	ไมโครลิตร
โซเดียมคลอไรด์	1.2	กรัม

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ค.
การวิเคราะห์น้ำตาล

1. วิเคราะหน้ำตาลรีดิวซโดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1992)

1.1 สารเคมี

Alkaline Copper Reagent

$Na_2HPO_4.12H_2O$	71	กรัม
$KNaC_4H_4O_6.5H_2O$ (Rochelle salt)	40	กรัม
NaOH เข้มข้น 1N	100	มิลลิลิตร
$CuSO_4.5H_2O$g เข้มข้น 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร)	80	มิลลิลิตร
(ละลาย 8 กรัม $CuSO_4.5H_2O$ ในน้ำกลั่น 80 มล.)		
Na_2SO_4	180	กรัม

(ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนไดปริมาตร 1,000 มิลลิตร)

Nelson’s Reagent

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

(ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลันจนไดปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

1.2 วิธีการ

1.2.1 เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเขมขนระหว่าง 20-200 มิลลิกรัม กรัม/มิลลิลิตร หรือตัวอย่างที่ต้องการวัดที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม

1.2.2 เติม Alkaline Copper Reagent 1 มิลลิลิตร ผสมใหเขากันแล้วตมในน้ำเดือด 15 นาที จากนั้นทำใหเย็นทันที

1.2.3 เติม Nelson’s reagent 1 มิลลิลิตร ผสมใหเขากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

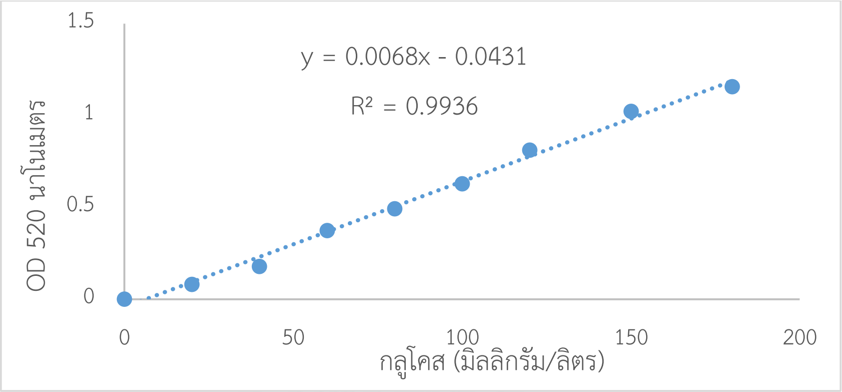
1.2.4 เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ผสมใหเขากัน วัดคาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

การเกิดสีน้ำเงินม่วงของโมลิบดินัมบลู (molybdenum blue) เกิดจาก

$2Cu^{2+}$ + reducing sugar --------▶ CuO_2

$Cu_2O + H_2SO_4$ --------▶ $2Cu^{+}$

$2Cu^{+} + MoO_4^{2+}$ --------▶ $2Cu^{2+}$ + molybdenum blue



รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นระหว่าง 20–200 มิลลิกรัม/ลิตร

2. วิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol-sulfuric (Dubois และคณะ, 1956)

2.1 สารเคมี

ฟีนอล 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร)

กรดซัลฟูริก

2.2 วิธีการ

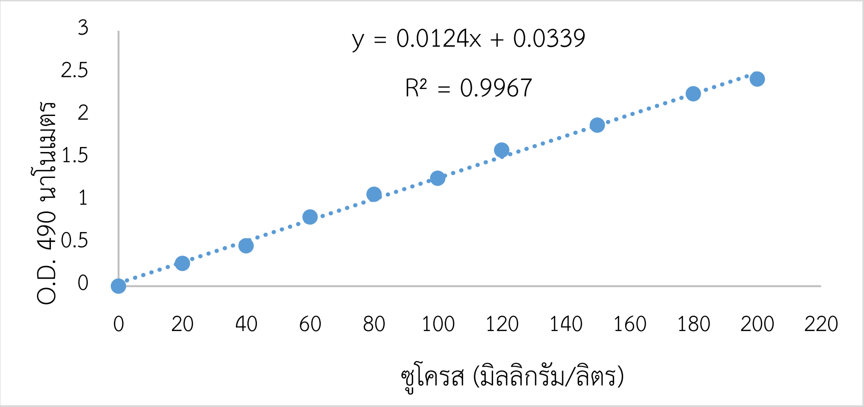
2.2.1 เตรียมสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ความเขมขนระหว่าง 20-200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสม

2.2.2 เติมฟีนอล 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 1 มิลลิลิตร ผสมใหเขากัน

2.2.3 เติมกรดซัลฟูริก 5 มิลลิลิตร ผสมใหข้ากันบ่มที่อุณหภูมิห้องนาน 30 นาที

2.2.4 ผสมใหเขากัน วัดคาการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นระหว่าง 20–200 มิลลิกรัม/ลิตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ นางสาวสินีนาถ กันธิพรรณ์

วัน เดือน ปี เกิด 27 ธันวาคม 2530

ภูมิลำเนา จังหวัดเชียงราย

อีเมลล์ sineenathk@yahoo.com

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2535-2542 ระดับประถมศึกษา โรงเรียนสันติวิทยา จังหวัดเชียงราย

พ.ศ. 2543-2545 ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนจุฬาภรณ์ราชวิทยาลัย เชียงราย

พ.ศ. 2546-2548 ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสามัคคีวิทยาคม จังหวัดเชียงราย (แผนกวิทย์-คณิต)

พ.ศ. 2549-2552 ระดับปริญญาตรี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (วทบ. เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2553-ปัจจุบัน ระดับปริญญาเอก จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (สาขาจุลชีววิทยา)

ทุนการศึกษาและวิจัย

โครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก (คปก.)

ทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

การนำเสนอผลงาน/ผลงานตีพิมพ์วารสารวิชาการ

พ.ศ. 2555 นำเสนอผลงานวิชาการที่งานประชุมวิชาการ The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference is organized jointly by the Thai Society for Biotechnology (TSB) จังหวัดอุบลราชธานี

พ.ศ. 2557 นำเสนอผลงานวิชาการที่งานประชุมวิชาการ Internation Mycology congress 10th (IMC 10) จังหวัดกรุงเทพมหานคร

พ.ศ. 2557 นำเสนอผลงานวิชาการที่งานประชุมวิชาการ The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference is organized jointly by the Thai Society for Biotechnology (TSB) จังหวัดเชียงราย

พ.ศ. 2558 นำเสนอผลงานวิชาการที่งานประชุมวิชาการ RGJ.-Ph.D. congress XVI 2015 จังหวัดชลบุรี

พ.ศ. 2558 ตีพิมพ์ผลงานวิชาการในวาราสารนานาชาติ International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (impact factor 2.4) หัวข้อ Trichosporon heliocopridis sp. nov., a urease-negative basidiomycetous yeast associated with dung beetles (Heliocopris bucephalus Fabricius)

พ.ศ. 2559 นำเสนอผลงานวิชาการที่งานประชุมวิชาการนานาชาติ the 14th International Congress on Yeasts (ICY14) เมืองเฮียวโกะ ประเทศญี่ปุ่น

พ.ศ. 2559 ตีพิมพ์ผลงานวิชาการในวารสารนานาชาติ Bioresources (impact factor 1.3) หัวข้อ Waste Cassava Tuber Fibers as an Immobilization Carrier of Saccharomyces cerevisiae for Ethanol Production