



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ และการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิต
เอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสของเชื้อยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์
RMU-RB16 และ RMU-RB17

Phylogenetic Tree and Comparison of Ethanol Production at
40°C by Thermotolerant Yeast strains RMU-RB16 and RMU-RB17

กฤษฎา วดี สุวานเจริญ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2559)



รายงานการวิจัย

เรื่อง

การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ และการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิต
เอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสของเชื้อยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์
RMU-RB16 และ RMU-RB17

กุสุมาวดี ฐานเจริญ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2559)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัย เรื่อง การสร้างต้นไม้พัฒนาการ และการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสของเชื้อยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ RMU-RB16 และ RMU-RB17 เนื่องจากแหล่งพลังงานในปัจจุบันมีอยู่อย่างจำกัด โดยไบโอเอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกจากจุลินทรีย์ที่มีความน่าสนใจและการใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์ทนต่ออุณหภูมิสูงเหมาะสำหรับประเทศเขตร้อนชื้นเช่นประเทศไทยเนื่องจากมีอุณหภูมิเฉลี่ยในแต่ละวันค่อนข้างสูง นอกจากนี้ยังช่วยลดต้นทุนการผลิตในด้านการใช้น้ำเย็นในการหล่อเย็นถังหมักซึ่งระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลของจุลินทรีย์มักมีความร้อนเกิดขึ้นเสมอ รวมทั้งเป็นประโยชน์ต่อประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลทั้งในระดับห้องปฏิบัติการ กิ่งอุตสาหกรรม และระดับอุตสาหกรรมที่จะเกิดขึ้นในอนาคต

ขอขอบคุณคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามที่อำนวยความสะดวกในด้านการทำการทดลอง ขอขอบคุณคุณวิวัฒน์ฐานเจริญสำหรับกำลังใจในยามที่ต้องฝ่าฟันอุปสรรค และการเป็นที่ปรึกษาที่ดีตลอดระยะเวลาในการทำการทดลอง ขอใจนักศึกษาคณะวิศวกรรมศาสตร์ในโครงการวิจัยสำหรับส่วนหนึ่งของการเตรียมงานทดลองอย่างสุดความสามารถ

ท้ายที่สุดนี้ขอขอบพระคุณสำนักวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคามที่สนับสนุนทุนวิจัยเพื่อให้ได้มีโอกาสพัฒนาตนเองและหน่วยงานให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น รวมทั้งเผยแพร่งานวิจัยเพื่อเป็นประโยชน์ต่อบุคคลที่สนใจในด้านนี้

กุสุมาวดี ฐานเจริญ

2559

หัวข้อวิจัย การสร้างต้นไม่วิวฒนาการ และการเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตเอทานอลที่
อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสของเชื้อยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ RMU-RB16 และ RMU-RB17

ผู้ดำเนินการวิจัย นางกฤษมาวดี ฐานเจริญ
หน่วยงาน สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

ปี พ.ศ. 2559

บทคัดย่อ

การผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 ที่คัดแยกจากกล้วยสุกเน่า และผ่านการทดสอบคุณสมบัติในการทนต่ออุณหภูมิสูง โดยเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 สามารถทนต่ออุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ RMU-RB17 สามารถทนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ความสามารถในการผลิตเอทานอลในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน (น้ำตาลเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร) สภาวะการทดลองที่พีเอช 5.5 และอัตราการเขย่า 120 รอบต่อนาที พบว่า เชื้อยีสต์ RMU-RB17 มีศักยภาพที่ดีกว่าในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 22.40 (ผลได้ทางทฤษฎี 43.92%) และ 8.44 กรัมต่อลิตร (ผลได้ทางทฤษฎี 16.55%) ตามลำดับ ผลการจัดจำแนกทางโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA แสดงให้เห็นว่า เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 จัดจำแนกเป็น *Saccharomyces cerevisiae* RMU-RB16 และ RMU-RB17 จัดจำแนกเป็น *Pichia kudriavzevii* RMU-RB17 นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ยังแสดงให้เห็นว่า เชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถทนต่อน้ำตาล และเอทานอลได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการเป็นเชื้อตั้งต้นที่มีศักยภาพต่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

คำสำคัญ ไบโเอทานอล, การหมักที่อุณหภูมิสูง, ต้นไม่วิวฒนาการ, 26S rDNA, ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง

Research Title Phylogenetic Tree and Comparison of Ethanol Production at 40°C by Thermotolerant Yeast strains RMU-RB16 and RMU-RB17

Researcher Kusumawadee Thancharoen

Organization Department of Biology, Faculty of Science and Technology
Rajabhat Maha Sarakham University

Year 2016

ABSTRACT

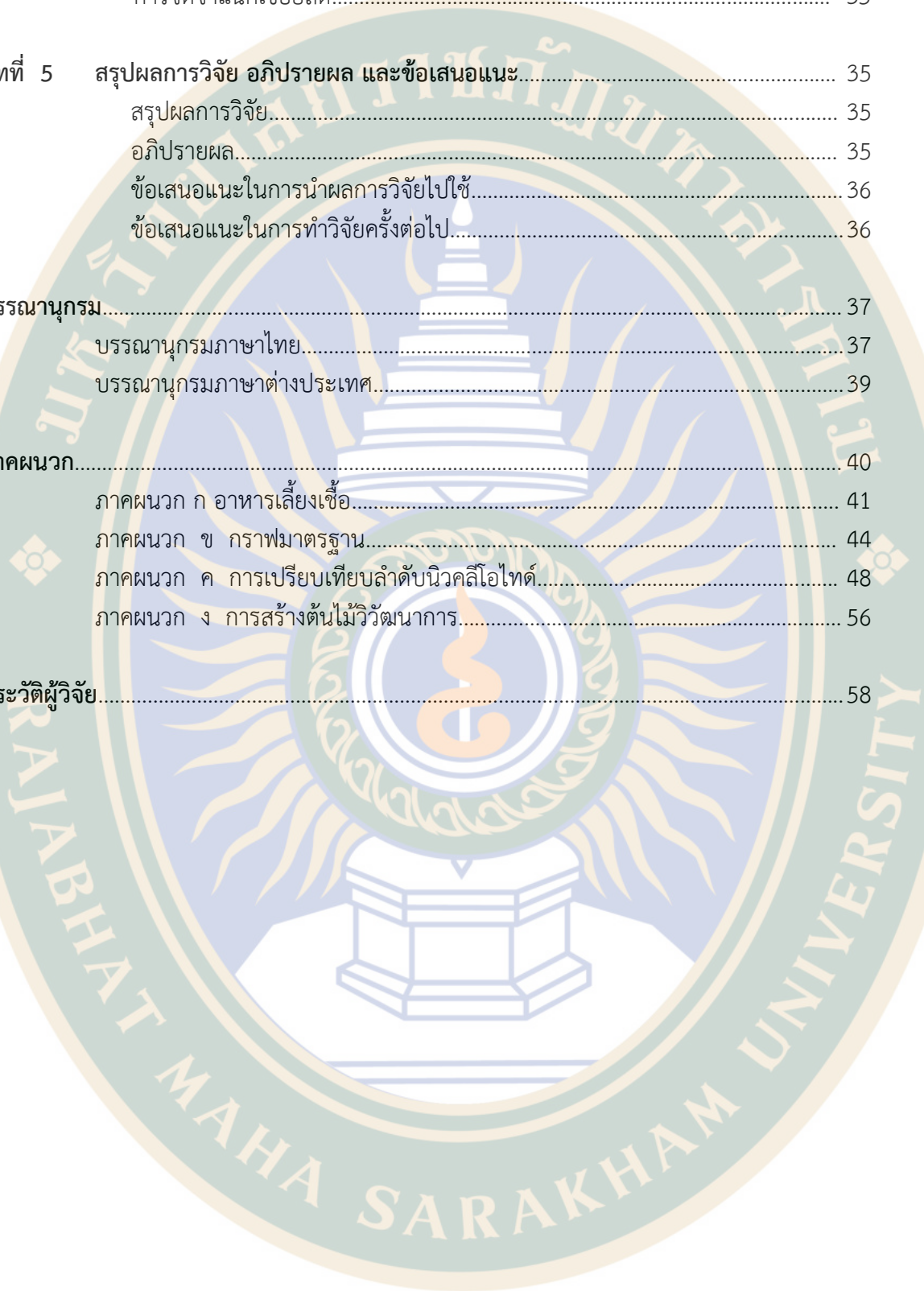
Ethanol production at elevated temperatures requires high potential thermotolerant ethanol-producing yeast. In this study, RMU-RB16 and RMU-RB17 yeasts strains capable of growth and ethanol production at high temperatures were successfully isolated from rotten banana and thermotolerant characterization. Among these isolates, the isolated thermotolerant yeast strain, which was designated as RMU-RB16 growth at 40°C and RMU-RB17 growth at 45°C. Ethanol production from synthetic medium using glucose as a carbon source (initial sugar 180 g/L) pH 5.5 and 120 rpm/min. The maximum ethanol concentrations produced by this isolated thermotolerant yeast at 37°C, and 40°C under the optimum cultural condition were 22.40, and 8.44 g/L, and theoretical yield were 43.92, and 16.55%, respectively. Molecular identification of the yeast based on the D1/D2 domain of 26S rDNA sequencing revealed that RMU-RB16 and RMU-RB17 belonged to the genus *Saccharomyces cerevisiae* RMU-RB16 and *Pichia kudriavzevii* RMU-RB17. Moreover, the study shows that although these strains have osmotolerance and tolerance to ethanol. This characteristic is an important target for enhancing the performance of industries in ethanol production.

Keywords: Bioethanol, Fermentation at High temperature, Phylogenetic tree, 26S rDNA, Thermotolerant yeast.

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ.....	ช
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญ.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ขอบเขตการวิจัย.....	2
สมมติฐานการวิจัย.....	2
คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย/(นิยามศัพท์เฉพาะ).....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
ความหมายเอทานอล.....	4
ประเภทของเอทานอล.....	4
กระบวนการผลิตเอทานอล.....	5
วัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล.....	6
ยีสต์.....	9
ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสำหรับผลิตเอทานอล.....	10
เมแทบอลิซึมการผลิตเอทานอลจากยีสต์.....	12
ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์.....	14
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	17
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	18
อุปกรณ์และสารเคมี.....	18
วิธีดำเนินการวิจัย.....	19
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	21
ลักษณะสัณฐานวิทยา และการเจริญบนอาหารแข็ง.....	21
ความทนต่อแรงกดดัน.....	23
ผลของอุณหภูมิและเวลาที่มีต่อการเจริญ.....	26

เรื่อง	หน้า
ความสามารถในการผลิตเอทานอล.....	29
การจัดจำแนกเชื้อยีสต์.....	35
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	35
สรุปผลการวิจัย.....	35
อภิปรายผล.....	35
ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้.....	36
ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป.....	36
บรรณานุกรม	37
บรรณานุกรมภาษาไทย.....	37
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ.....	39
ภาคผนวก	40
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	41
ภาคผนวก ข กราฟมาตรฐาน.....	44
ภาคผนวก ค การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์.....	48
ภาคผนวก ง การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ.....	56
ประวัติผู้วิจัย	58



สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สายพันธุ์ยีสต์ และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส.....	12
4.1	ลักษณะสัณฐานวิทยา และการเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน.....	22
4.2	ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง.....	24
4.3	ความสามารถในการเจริญที่น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ.....	25
4.4	ความสามารถในการเจริญที่เอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ.....	26
4.5	ปริมาณเอทานอล และผลได้ทางทฤษฎีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	31
4.6	ปริมาณเอทานอล และผลได้ทางทฤษฎีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....	31



สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	โครงสร้างของเอทานอล..... 5
2.2	กระบวนการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน..... 5
2.3	การหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส..... 6
2.4	การหมักเอทานอลจากแป้ง..... 7
2.5	การหมักเอทานอลจากเซลลูโลส..... 8
2.6	สรุปการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร..... 8
2.7	กระบวนการผลิตเอทานอลในเซลล์ของยีสต์..... 13
4.1	การเจริญบน YM agar plate และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์..... 23
4.2	การเจริญของเชื้อในอาหารหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส..... 27
4.3	อัตราการเจริญในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส..... 28
4.4	อัตราการเจริญในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส..... 29
4.5	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน LSU rRNA gene ของ RMU-RB16..... 33
4.6	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน LSU rRNA gene ของ RMU-RB17..... 33
4.7	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17..... 34

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญ

เอทานอลเป็นหนึ่งในพลังงานทดแทนที่รัฐบาลได้กำหนดเป้าหมายการใช้ไว้ที่ระดับ 2.4 ล้านลิตรต่อวันภายในปี พ.ศ. 2554 เอทานอลเป็นพลังงานสะอาดสามารถเผาไหม้ได้สมบูรณ์กว่าน้ำมันปิโตรเลียมจึงช่วยลดการปลดปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สู่บรรยากาศ ในขณะที่เอทานอลยังมีค่าออกเทนสูงกว่าน้ำมันปิโตรเลียม สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE ได้ (พรเทพ, 2554) การผลิตเอทานอลในประเทศไทยในปัจจุบันนั้นยังใช้เทคโนโลยีที่ซื้อมาจากต่างประเทศซึ่งรวมถึงยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตแต่การใช้เทคโนโลยีและยีสต์ผลิตเอทานอลจากต่างประเทศยังประสบปัญหาเกี่ยวกับการถ่ายทอดเทคโนโลยี และการหมักในสภาพอากาศร้อนตลอดปีของประเทศไทย โดยเฉพาะในช่วงเดือนเมษายนนั้นจะมีผลผลิตต่ำ โดยความร้อนที่สูงนั้นนอกจากจะมาจากการทำงานของสภาพอากาศร้อนแล้วในการหมักเอทานอลเมื่อมีอัตราการหมักสูงจะมีความร้อนเกิดขึ้นในอัตราที่สูงด้วย การหมัก ด้วยยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ทั่วไปซึ่งมักเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความสามารถในการผลิตของเอทานอลลดลงอย่างมากเนื่องจากการยับยั้งด้วยเอทานอลมีมากขึ้นเมื่อร่วมกับความร้อนที่สูงขึ้น แนวทางการแก้ปัญหาอย่างหนึ่ง คือการใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง ซึ่งนอกจากสามารถเจริญและหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางแล้วยังคงเจริญและหมักเอทานอลได้ ถึงแม้มีอุณหภูมิสูงขึ้น ประโยชน์ของการใช้ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรม คือ ลดการใช้ระบบหล่อเย็นซึ่งทำให้ค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลดลงเป็นผลให้ต้นทุนการผลิตโดยรวมลดลงด้วย นอกจากนี้การหมักในที่อุณหภูมิสูงยีสต์มักมีอัตราการหมักสูง ทำให้สามารถผลิต เอทานอลได้เร็ว ยิ่งไปกว่านั้นยังช่วยลดปัญหาการปะปนของจุลินทรีย์อื่นในระหว่างการหมักเอทานอล (Seki *et al.*, 1983; Limtong, 1987; Sree *et al.*, 1999) ปัจจุบันการผลิตไบโอเอทานอลในประเทศไทยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ได้ดี แต่ยังเป็นสายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง ถึงแม้ว่ามีบางโรงงานใช้ยีสต์ที่เป็น *S.cerevisiae* สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สายพันธุ์เหล่านั้นสามารถเจริญได้ คือ 40-42 องศาเซลเซียส แต่การหมักเอทานอลเกิดได้ดีที่อุณหภูมิเพียง 33-35 องศาเซลเซียส (สาวิตรี และคณะ, 2545) จากรายงานที่ผ่านมาพบยีสต์บางสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติที่ดีต่อการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง ได้แก่ *Candida spp.*, *Hansenula spp.*, *Kluyveromyces spp.*, *Pichia spp.*, *Saccharomyces spp.*, *Schizosaccharomyces spp.* และ *Torulopsis spp.* ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส (Hacking *et al.*, 1984) แต่ก็ยังขาดคุณสมบัติที่ดีอื่นๆ ในการใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม การคัดแยกและคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ไทยที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งเหมาะสมกับการผลิตไบโอเอทานอลในภูมิอากาศของประเทศไทย นอกจากนั้นการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ไทยที่เหมาะสมสำหรับวัตถุดิบที่ใช้ผลิตไบโอเอทานอลประเภทต่างๆ ยังเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยทำให้การผลิตไบโอเอทานอลมีประสิทธิภาพที่สูงขึ้น ยิ่งกว่านั้นการจัดจำแนก การรวบรวม และการเก็บรักษาสายพันธุ์ไทยที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งเหมาะสมกับการผลิตไบโอเอทานอลในภูมิอากาศของประเทศไทย และยีสต์สายพันธุ์

ไทยที่เหมาะสม สำหรับวัตถุดิบที่ใช้ผลิตไบโอเอทานอลประเภทต่างๆ ไว้ที่หน่วยเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ณ หน่วยงานใดหน่วยงานหนึ่งจะเป็นประโยชน์ สำหรับผู้ประกอบการที่สามารถเลือกนำไปพัฒนาใช้สำหรับผลิตไบโอเอทานอลต่อไป ยิ่งไปกว่านั้นข้อมูลความหลากหลายทางชีวภาพและทรัพยากรชีวภาพของยีสต์ผลิตเอทานอลเหล่านี้จะเป็นการแสดงความร่ำรวยของทรัพยากรของประเทศและง่ายต่อการเลือกไปใช้ต่อไป จากข้อดีของยีสต์ทนร้อนและระบบการหมักที่อุณหภูมิสูง ดังที่กล่าวข้างต้น ผู้วิจัยได้ทำการคัดแยกยีสต์ที่มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิสูง มีความสามารถตกตะกอน และมีความสามารถผลิตเอทานอลจากกล้วยสุกเน่า น้อยหน่าสุกเน่า และสับปะรดสุกเน่าในปี พ.ศ. 2558 พบว่ามียีสต์ที่มีความน่าสนใจ 2 สายพันธุ์ คือ รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 ดังนั้นจึงสนใจทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงในอาหารสังเคราะห์ และการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 26S rDNA เพื่อระบุยีสต์ รวมทั้งศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการกับยีสต์ที่มีการรายงานในฐานข้อมูล เพื่อการนำไปใช้ประโยชน์เป็นเชื้อตั้งต้นที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีแพร่หลายในท้องถิ่นต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และความทนต่อแรงกดดัน
2. เพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลในอาหารสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน
2. เพื่อระบุยีสต์โดยลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 26S rDNA และสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

ขอบเขตการวิจัย

ยีสต์ทนร้อนที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้คัดแยกจากกล้วยสุกเน่า จังหวัดมหาสารคาม ในปี พ.ศ. 2557 โดยผ่านการทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการคัดเลือกจากความสามารถในการผลิตเอทานอลได้โดยการสร้างปริมาณแก๊สได้สูงซึ่งเป็นการทดสอบทางอ้อม

สมมติฐานการวิจัย

ถ้ายีสต์สายพันธุ์ RMU-RB16 (ผลการจัดจำแนกโดยคุณสมบัติทางชีวเคมี เป็น *Saccharomyces cerevisiae*) และ RMU-RB17 (ผลการจัดจำแนกโดยคุณสมบัติทางชีวเคมี เป็น *Pichia kudriavzevii*) มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล ดังนั้นจะสามารถใช้สับสเตรทได้ดีเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ในปริมาณสูงโดยมีระยะเวลาในการหมักสั้น

คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย/(นิยามศัพท์เฉพาะ)

อีสต์ทอนอุณหภูมิสูง หมายถึง อีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีในอุณหภูมิปกติ (20-28 องศาเซลเซียส) และสามารถเจริญเติบโตได้ถึงอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสายพันธุ์ของอีสต์ที่ร้อนที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพมากขึ้น
2. อีสต์ที่มีศักยภาพจะเป็นสายพันธุ์ที่ดีในการต่อยอดงานวิจัยด้านการผลิตเอทานอลระดับถึงหมักต่อไป
3. ความรู้ที่ได้สามารถนำไปบูรณาการการเรียนการสอนในรายวิชาจุลชีววิทยา หรือ รายวิชาอีสต์และเทคโนโลยีของอีสต์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความหมายของเอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethylalcohol) หรือเกรนแอลกอฮอล์ (Grain alcohol) สูตรเคมี C_2H_5OH มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย มีความไวไฟและค่าออกเทนสูง (เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.8 มีค่าออกเทนสูงถึง 113) มีจุดเดือด 78.32 องศาเซลเซียส จุดเยือกแข็ง -243.1 องศาเซลเซียส สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมายเช่นผลิตอาหารและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ตัวทำละลายในอุตสาหกรรม และใช้เป็นเชื้อเพลิง (www.siamchemi.com/เอทานอล/)

2.2 ประเภทของเอทานอล (กรมการพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลัง กระทรวงพลังงาน, มปป.)

เอทานอล เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง เอทานอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน สามารถละลายทั้งในน้ำและสารละลายอินทรีย์อื่นๆ เป็นแอลกอฮอล์ที่สามารถนำมาบริโภค นอกจากนี้สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรูปเอทานอลไร้น้ำ (Anhydrous ethanol) ที่มีความบริสุทธิ์สูง (เข้มข้นร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร) หรืออาจใช้เป็น เอทานอลที่มีน้ำ (hydrous ethanol) การนำเอทานอลไปใช้นั้นสามารถนำไปใช้ได้หลายทางดังนี้

2.2.1 แอลกอฮอล์ ที่รับประทานได้โดยตรง (Portable Alcohol) ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสุราเครื่องสำอางและยา

2.2.2 แอลกอฮอล์ ที่ไม่รับประทานได้โดยตรง (Industrial Alcohol) ตัวอย่างเช่นกรดอะซิติกหรือกรดน้ำส้ม กรดมะนาว ที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมทางการแพทย์ และนอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใย และโลหะ

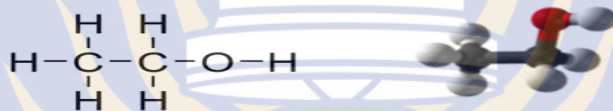
2.2.3 แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงมีความบริสุทธิ์สูง 95% หรือ 99.5-99.6% แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันนี้ สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ 3 แบบดังต่อไปนี้

2.2.3.1 แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95% ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงทดแทนน้ำมันเบนซินหรือดีเซลใช้กับเครื่องยนต์ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง

2.2.3.2 แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 99.5% - 99.6% เมื่อผสมกับน้ำมันเบนซิน จะเรียกกันว่า แก๊ซโซฮอล์ โดยที่แก๊ซโซฮอล์ 95 หมายถึง การผสมน้ำมันเบนซิน 95 กับเอทานอลในสัดส่วน 9:1 โดยที่ยังรักษาค่าออกเทนไว้ได้ในระดับเดิม สัดส่วนการผสมเอทานอลกับน้ำมันนั้น มีใช้กันอยู่ หลายประเภทในหลากหลายประเทศ E85 เป็นชื่อที่เรียก เชื้อเพลิงที่ได้จากการผสมน้ำมันกับเอทานอล โดยมีสัดส่วนของเอทานอลสูงถึง 85% และมีค่าออกเทนสูง มีใช้กันในประเทศในแถบ

บราซิล อเมริกา และยุโรป อย่างไรก็ตาม น้ำมันชนิดนี้ไม่สามารถใช้ได้กับรถยนต์รุ่นส่วนใหญ่ที่ใช้อยู่ในประเทศไทย เนื่องจากต้องเป็นรถยนต์ที่มีเครื่องยนต์ที่ทนต่อการกัดกร่อนสูงกว่าปกติ ดังนั้นในการใช้น้ำมันชนิดนี้จึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการเตรียมความพร้อมทั้งในด้านของผู้ใช้รถยนต์และรวมถึงผู้จำหน่ายน้ำมันที่ต้องคำนึงถึงกระบวนการผลิตและขั้นตอนการจัดจำหน่าย (Electricity and Industry Magazine)

2.2.3.4 เป็นสารเคมีที่ช่วยเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมัน โดยการเปลี่ยนรูปเอทานอลเป็น ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ซึ่ง MTBE เป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซินที่หลายประเทศประกาศห้ามใช้เนื่องจากก่อให้เกิดมลภาวะในอากาศที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่นๆ



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของเอทานอลแบบโซ่ตรง ประกอบด้วยโมเลกุลของ ไฮดรอกไซด์ (-OH) ที่ยึดเหนี่ยวกับอะตอมของคาร์บอน (C)

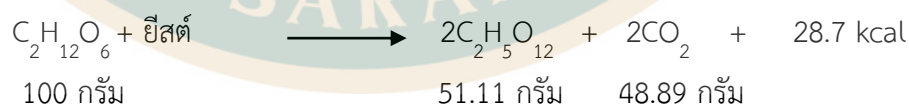
ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน (มปป.)

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล (คณะกรรมการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) และกระบวนการหมัก (fermentation)

2.3.1 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) เป็นการผลิตจากอนุพันธ์สารปิโตรเลียม เช่น เอทิลีนด้วยปฏิกิริยาการระเหยน้ำ (dehydration) เป็นต้น

2.3.2 กระบวนการหมัก (Fermentation) เป็นการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยเชื้อยีสต์ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นแรกยีสต์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) เป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยกระบวนการไกลโคไลซิสในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังสมการแสดงดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 กระบวนการหมักในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน (มปป.)

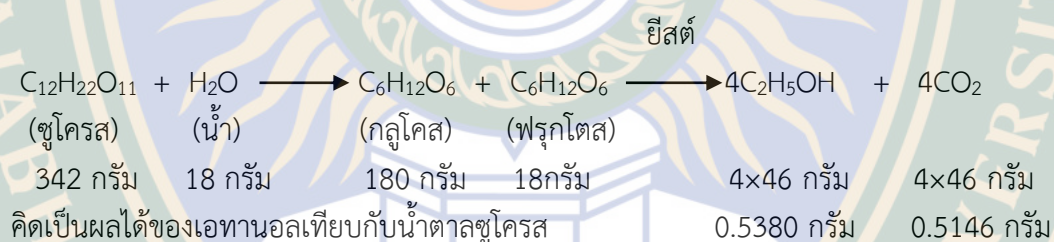
โดยตามทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 100 เปอร์เซ็นต์ จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล 48.89 และ 51.11 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่น ๆ หรือใช้ในการสร้างเซลล์ยีสต์ ทำให้ได้เอทานอลประมาณ 48% เมื่อได้เอทานอลแล้ว ขั้นตอนที่ 2 จึงเป็นการทำให้เอทานอลมีความเข้มข้น และบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยการกลั่น

2.4 วัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล

วัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบสามารถนำมาใช้ในการหมักเอทานอลโดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และอื่นๆ และประเภทสุดท้ายคือ ประเภท ลิกโนเซลลูโลสที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เช่น ข้าวฟ่าง กากอ้อย และ ชังข้าวโพด เป็นต้น

2.4.1 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล

วัตถุดิบประเภทน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และปืท น้ำตาล ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาล ฟรุกโตส ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส มีขั้นตอนดังนี้ คือ ขั้นตอนแรกน้ำตาลซูโครสเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส(Hydrolysis) ได้น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสอย่างละโมเลกุล จากนั้นน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสจะถูกยีสต์เปลี่ยนไปเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 4 โมเลกุล



ภาพที่ 2.3 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส

ที่มา: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2549)

2.4.2 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง

วัตถุดิบประเภทแป้งในการผลิต ได้แก่ มันสำปะหลัง (ทั้งหัวมันสด และหัวมันเส้น) ข้าวโพด ข้าว และเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นต้น โดยแป้งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำแป้งมาผ่านกระบวนการย่อย (Hydrolysis) ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถเข้าสู่กระบวนการ หมักเอทานอล โดยปัจจุบันจะนิยมย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า

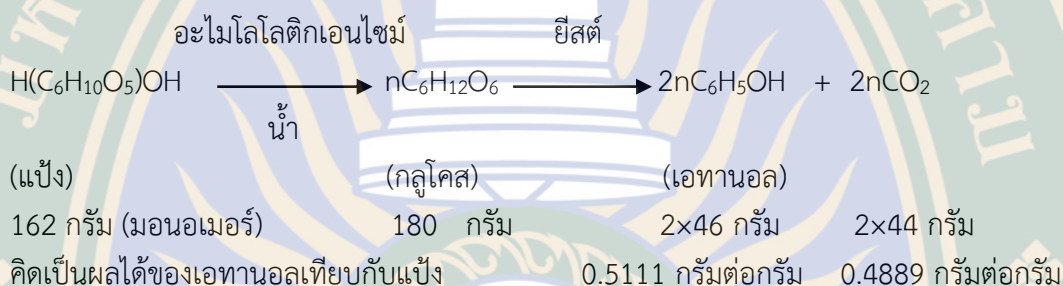
การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์จะประกอบด้วยการย่อย 2 ครั้งคือ

2.4.2.1 การย่อยแป้งครั้งแรกหรือทำให้แป้งเหลว (Liquefaction)

ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α -amylase) ย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า เด็กซ์ตริน (Dextrin)

2.4.2.2 การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายหรือการเปลี่ยนแป้งน้ำตาล (Saccharification)

ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์กลูโคสอะไมเลส (Glucoamylase) ย่อยเด็กซ์ตรินที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส ให้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งยีสต์สามารถใช้หมักเอทานอลได้ โดยกระบวนการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 2.4

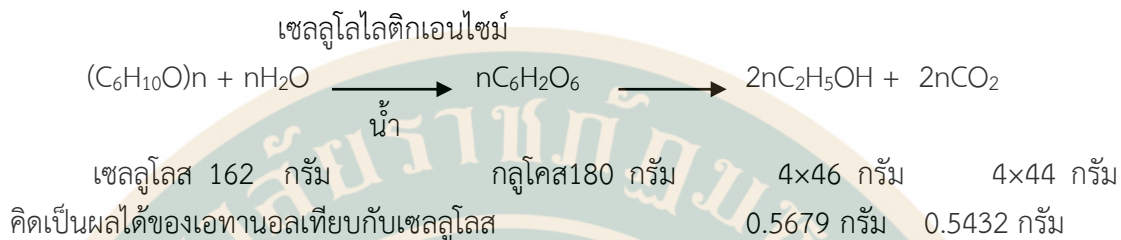


ภาพที่ 2.4 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลแป้ง

ที่มา: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2549)

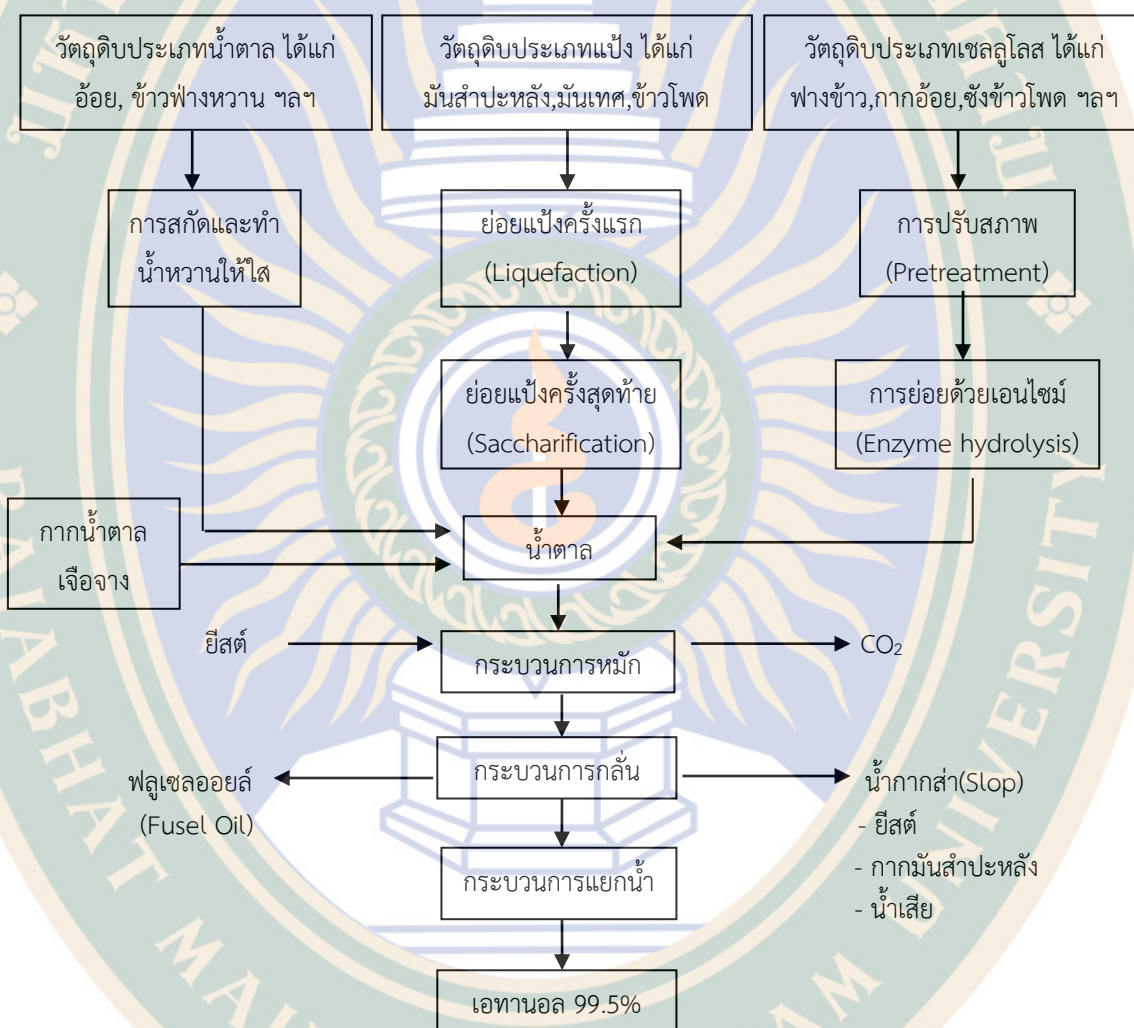
2.4.3 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ข้าวฟ่าง กากอ้อย ชังข้าวโพด และ เศษไม้ เป็นต้นวัตถุดิบประเภทนี้มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส (Cellulose), เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และ ลิกนิน (Lignin) โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึกมีลักษณะเป็น เส้นใยเหนียวและไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และอะราบินโนส (Arabinose) เป็นต้น ส่วน ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนอลโพรเพน (Phenylpropane) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก



ภาพที่ 2.5 การหมักเอทานอลจากเซลลูโลส

ที่มา : Samsuri *et al.* (2009)



ภาพที่ 2.6 สรุปการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร

ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน (มปป.)

2.5 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ซึ่งเซลล์มีทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) ที่มีรูปร่างเป็นรูปไข่ ท่อน หรือเส้นสาย (filamentous) เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย ส่วนใหญ่เซลล์ใสไม่มีสี มักจะมองเห็นนิวเคลียส (nucleus) แวกิวโอล (Vacuole) หรือกรานูล (granule) ภายในเซลล์ได้ชัดเจน ยีสต์ไม่มีรงควัตถุและไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มีการเคลื่อนไหวแบบบราวเนียน (Brownian motion) แต่น้อยกว่าเซลล์แบคทีเรีย เนื่องจากยีสต์มีขนาดใหญ่กว่าจึงเกิดแรงกระหนบน้อยกว่า ยีสต์มีการเพิ่มจำนวนและแบ่งเซลล์โดยการสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศเรียกว่าการแตกหน่อ (budding) ซึ่งมีลักษณะเป็นตุ่มเล็กๆ อกจากเซลล์แม่ (mother cell) อาจมีหน่อเดียวหรือหลายหน่อ หลังจากนั้นหน่อหรือเซลล์ลูก (daughter cell) เหล่านี้จะโตขึ้นและแยกตัวออกไปเป็นเซลล์แม่ต่อไป ยีสต์บางชนิดมีการแตกหน่อที่แตกต่างจากขั้นต้นคือเซลล์ลูกที่แตกออกมานั้น (budding yeast cell) ไม่ขาดเป็นอิสระออกจากเซลล์แม่แต่จะต่อกันเป็นสายยาวไปเรื่อยๆ โครงสร้างนี้จะคล้ายเส้นสายของเชื้อราที่เรียกว่าสายราแท้ ชนิดมีผนังกัน (septate mycelium หรือ septate hyphae) จึงเรียกรวมการแตกหน่อที่เซลล์ลูกไม่ขาดออกจากกันนี้ว่าสายราเทียม (pseudo- mycelium หรือ pseudohyphae) โครงสร้างของทั้งสายราแท้และสายราเทียมมีที่มาจากต่างกัน คือสายราเทียมเกิดจากการแตกหน่อที่ไม่ขาดออกจากกันแล้วต่อเป็นสายยาว ในขณะที่สายราแท้ (ชนิดมีผนังกัน) เกิดจากการมีโครงสร้างที่เรียกว่า septum กันแบ่งสายราแท้เป็นช่องๆ หรือเป็นห้องๆ ภายในแต่ละช่องที่กันโดย septum จะพบนิวเคลียสอยู่ 1 หรือ 2 นิวเคลียส เรียกว่า septate hyphae ส่วนสายราแท้ชนิดไม่มีผนังกันหรือ septum กันจะเรียกว่า non- septate hyphae (จอร์จรัธน์ ลีสมีทธิ, 2552)

ยีสต์มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลอย่างยาวนาน ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอลผ่านกระบวนการหมัก (fermentation) ตัวอย่างเช่น ยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นที่นิยมนำมาใช้ในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และพลังงานทางเลือกโดยเฉพาะในปัจจุบันพลังงานทางเลือกที่ผลิตได้จากยีสต์ หรือไบโอเอทานอลเป็นที่นิยมอย่างแพร่หลาย ซึ่งในปี ค.ศ. 2014 ถูกผลิตถึง 90.38 พันล้านลิตร เพิ่มขึ้นจากปี 2013 ถึง 2.7 เปอร์เซ็นต์ (Global Renewable Fuels Alliance : GRFA) และยังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงต่อไปในอนาคต การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่มีประสิทธิภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญ ในการคัดเลือกยีสต์สำหรับการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพสูง นักจุลชีววิทยาได้พิจารณาถึงคุณลักษณะที่ยีสต์ควรมีในการผลิตเอทานอล โดยอ้างอิงกับงานวิจัยการศึกษาทางสรีระ และการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์ที่ผ่านมา (Panchal, 1997)

คุณสมบัติของยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล ได้แก่

- 1) มีความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของเอทานอล
- 2) มีความสามารถในการทนต่อแรงดันออสโมติก
- 3) มีความไม่แปรผันทางพันธุกรรมของสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมัก
- 4) มีความสามารถในการทนต่อกรด
- 5) มีความสามารถในการทนต่อการหมักที่อุณหภูมิสูง
- 6) มีความเร็ว และประสิทธิภาพในการหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล

- 7) มีความง่ายต่อการขยายพันธุ์ของยีสต์ และความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งต่อยีสต์ชนิดอื่น (killer)
- 8) มีความสามารถในการทนต่อสารพิษ
- 9) มีความสามารถใช้น้ำตาลในกระบวนการหมักได้หลากหลายชนิด
- 10) สร้างความร้อนน้อยขณะอยู่ระหว่างกระบวนการหมัก

2.6 ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอล (อัยลดา และปวีณา , 2555; ปฎิพล และคณะ, 2555)

จุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกเพื่อการอยู่รอดได้แตกต่างกัน อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่สุดในด้านลบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงต้องมีกลไกพิเศษช่วยให้มีชีวิตรอด ซึ่งเกี่ยวข้องกับสิ่งสำคัญอยู่ 3 ประการ คือ ความคงตัวของเซลล์ เนื่องจากปฏิกิริยาของไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ การสร้างองค์ประกอบของเซลล์ขึ้นมาทดแทนองค์ประกอบเดิมที่เสียหายไป และการที่จุลินทรีย์นั้นทนต่ออุณหภูมิสูงอยู่ก่อนแล้วเกิดวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง การให้สารอาหารพิเศษบางชนิดสามารถช่วยให้ยีสต์เจริญที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้ เช่น การเติมกรดไขมัน อิมิตัว และเออร์โกสเตอรอลในอาหารหมัก การที่ยีสต์มีการเจริญลดลงในที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากการสังเคราะห์สเตอรอลได้น้อยลง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพบว่า สภาพการเป็นของไหลขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มลดลง การมีชีวิตรอดของยีสต์น้อยลง ทั้งนี้เพราะโปรตีนหรือองค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายที่อุณหภูมิสูงอัตราการเจริญของยีสต์ลดลงมีผลให้ชีวมวลโดยรวมลดลง เพราะฉะนั้นปริมาณโปรตีน กรดไขมันนิวคลีอิก กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก และกรดอะมิโนอิสระต่าง ๆ ภายในเซลล์จึงลดลง และการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นยังเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัวมากขึ้น ทำให้ความสามารถในการไหลผ่านของสารละลายต่างๆ รวมทั้งสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง จึงมีผลต่อการลดอัตราการหายใจของยีสต์ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิสูงเหนี่ยวนำให้ระบบการหายใจของยีสต์บกพร่อง นั่นคือไมโทคอนเดรียมีบทบาทโดยตรงต่อการทนสภาวะอุณหภูมิสูง Paul (1980) รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิมีผลต่อการใช้น้ำตาลซึ่งพบว่าเมื่อ อุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการใช้น้ำตาลลดลง เนื่องจากการดูดซึมน้ำตาลของเซลล์ลดลง เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานที่สามารถผลิตขึ้นมาทดแทนได้อยู่ตลอดเวลา จึงเป็นที่ยอมรับและเป็นที่สนใจต่อการวิจัย โดยพบว่าในระหว่างการหมักเอทานอลนั้น อุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อการผลิตเอทานอล ดังนั้นการใช้ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงจึงมีความสำคัญในการช่วยลดต้นทุนของระบบหล่อเย็นในระหว่างการหมักทำให้อัตราการหมักเร็วขึ้น และช่วยลดโอกาสการเกิดการปนเปื้อนในระหว่างการหมักได้ ซึ่งสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส และทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี

ตัวอย่างสายพันธุ์ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่มีรายงานการผลิตเอทานอล ได้แก่

2.6.1 *Saccharomyces cerevisiae*

พบทั่วไปในดิน ผลไม้ สามารถหมักน้ำตาลได้เร็ว และใช้สับสเตรทได้กว้าง เช่น น้ำตาล กลูโคส, ฟรุคโตส, กาแลกโตส, มอสโตส, ไฮโลส, อะราบิโนส, ซอร์บิทอล รวมทั้งสับสเตรทพวกแป้ง ซึ่งการใช้น้ำตาลเป็นคุณลักษณะหนึ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกในจีนัสนี้ มีอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส ความสามารถในการเจริญและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง รวมทั้งความทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ เช่น *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส และทนต่อเอทานอล (w/v) สามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยแตกหน่อรอบเซลล์ บางครั้งอาจสร้างเส้นใยเทียม สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยการสร้างแอสโคสปอร์รูปกลม หรือรูปไข่ ที่มีผนังเรียบ จำนวน 1-4 สปอร์ / แอสคัส ไม่ใช้ในเตรท ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) และไม่เกิดปฏิกิริยากับสี Diazonium blue B

2.6.2 *Kluyveromyces marxianus*

พบทั่วไปในดิน ผลไม้ และวัสดุพวกพืช สามารถหมักน้ำตาลได้เร็วและใช้สับสเตรทได้หลายชนิด ยีสต์จีนัสนี้สามารถผลิตเอนไซม์แลกเตส (lactase) มาย่อยน้ำตาลแลกโตสได้ มีความสามารถในการเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เช่น *K. marxianus* เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 52 องศาเซลเซียส และหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยการแตกหน่อรอบเซลล์ บางครั้งอาจสร้างเส้นใยเทียม สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยการสร้างแอสโคสปอร์ ผิวเรียบรูปร่างคล้ายไต รูปกลม หรือรูปไข่ จำนวน 1-16 สปอร์ / แอสคัส ไม่ใช้ในเตรท ไม่สร้างเอนไซม์ยูรีเอส (urease) และไม่เกิดปฏิกิริยากับสี Diazonium blue B

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ยีสต์ และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส

ยีสต์	เอทานอลที่ผลิตได้สูงสุด (ร้อยละโดยน้ำหนัก)
<i>Kluyveromyces fragilis</i> YKL1	4.00
<i>Kluyveromyces marxianus</i> NCYC 587	5.03
<i>Candida lusitanae</i> Y-5394	4.57
<i>Candida psuedotropicallis</i> Yca9	6.87
<i>Candida tropicalis</i> NCYC 405	3.43
<i>Saccharomyces cerevisia</i> ATCC 4132	4.39
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ysa86	6.38
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> NP3	7.58
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Y24	10.27
<i>Saccharomyces</i> sp. 1400	7.00
<i>Saccharomyces uvarum</i>	7.82
<i>Shizosacchamyces pombe</i> YSC3	2.15
<i>Hansenula polymorpha</i> ATCC 4516	1.80

ที่มา: ชุตินา (2548) อ้างถึงในปฏิพล และคณะ (2555)

2.7 เมแทบอลิซึมของการผลิตเอทานอลจากยีสต์

การหมักเอทานอล เป็นวิธีการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ โดยกลูโคสจะเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) จนได้ผลิตภัณฑ์เป็นไพรูเวต (แสดงดังในภาพที่ 2.7) จากนั้น ไพรูเวตจะสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็นอะซิติลดีไฮด์ และขั้นสุดท้ายอะซิติลดีไฮด์จะถูกรีดิวซ์เป็นเอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ ATP และน้ำ



ตอนที่หนึ่ง เป็นการสลายกลูโคสให้เป็นสองไตรออสฟอสเฟต(triose phosphate) ตอนที่หนึ่งประกอบด้วย 3 ปฏิกิริยา คือ ปฏิกิริยาที่ 1 เป็นการเปลี่ยน hexokinase หรือ glucokinase ใช้ ATP เพื่อให้เป็น glucose 6-phosphate (G6P) และปฏิกิริยาที่ 2 เปลี่ยนเป็น fructose 6-phosphate (F6P) ซึ่งจะแตกตัวเป็นสารที่มีคาร์บอนสามอะตอมสองชนิดในปฏิกิริยาที่ 3 คือ glyceraldehyde 3-phosphate (G3P) และ dihydroxyacetonephosphate (DHAP) โดยใช้ตัวเร่ง คือ เอนไซม์อัลโดเลส (aldolase)

ตอนที่สอง ปฏิกิริยาเริ่มด้วย DHAP เปลี่ยนเป็น G3P โดยใช้ตัวเร่งคือเอนไซม์ไตรออสฟอสเฟตไอโซเมอเรส (triose phosphate isomerase) ต่อจากนี้ G3P จะทำปฏิกิริยากับฟอสเฟตให้ได้ DPG ขณะเดียวกันก็ปล่อยอิเล็กตรอนให้แก่ NAD^+ ปฏิกิริยานี้จะถูกเร่งด้วย glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase DPG จะทำปฏิกิริยากับ ADP ได้ 3PG และ ATP ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ phosphoglycerate kinase ปฏิกิริยานี้สร้าง ATP โดยวิธี substrate level phosphorylation โดย 3PG จะเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น PEP ซึ่งจะให้ ATP อีกตัวหนึ่งโดยวิธี substrate level phosphorylation เช่นเดียวกัน รวมทั้งให้ไพรูเวตด้วย โดยปฏิกิริยานี้ใช้ตัวเร่ง คือ เอนไซม์ไพรูเวตไคเนส (pyruvate kinase)

ตอนที่สาม จะเป็นการเปลี่ยนไพรูเวตให้เป็นสารประกอบที่มีสาม หรือสองคาร์บอนอะตอม จะขึ้นอยู่กับว่าสิ่งมีชีวิตมีเอนไซม์ที่เหมาะสมกับการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ ในกรณีที่ขาดออกซิเจนหรือไม่สามารถใช้ออกซิเจน ไพรูเวตจะเปลี่ยนเป็นแลคเตท (lactate) โดยใช้ $NADH$ เป็นตัวให้อิเล็กตรอนใน

ปฏิกิริยาของ lactate dehydrogenase เมื่อมีออกซิเจนในไมโทคอนเดรียจะเปลี่ยนเป็น acetyl CoA โดยเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase complex จากนั้น acetyl CoA จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป โดยเอนไซม์นี้จะพบอยู่ที่ไมโทคอนเดรีย คือ α -ketoglutarate dehydrogenase complex

ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดไมโทคอนเดรียอาจสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็น acetaldehyde โดยการเร่งของ pyruvate decarboxylase ต่อจากนั้น acetaldehyde อาจจะถูกออกซิไดซ์ด้วย NAD^+ กลายเป็น Acetate หรือถูกรีดิวซ์ด้วย NADH ได้เป็นเอทานอล (ethanol) วิธีการทั้งหมดนี้เรียกว่าวิถี Embden-Meyerhof-Parnas

2.8 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์

การผลิตเอทานอลของยีสต์จะมีประสิทธิภาพสูง หรือมีประสิทธิภาพต่ำขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ที่อยู่ทั้งภายในเซลล์ยีสต์ และภายนอกเซลล์ยีสต์ โดยปัจจัยที่ส่งผลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์มีดังต่อไปนี้ (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549)

2.8.1 ธาตุอาหาร (nutrient) และ โคแฟกเตอร์ (cofactor)

ยีสต์ต้องการธาตุอาหารเพื่อการเจริญและหมักเอทานอลความต้องการของธาตุอาหารที่ใช้เพื่อการเจริญเป็นสัดส่วนกับองค์ประกอบหลัก (major component) ของเซลล์ ธาตุอาหารเหล่านั้นคือ คาร์บอน ออกซิเจน ไนโตรเจน และไฮโดรเจน นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการฟอสฟอรัส บัฟเฟอร์ โปแทสเซียม และแมงกานีส เพื่อสังเคราะห์องค์ประกอบรอง (minor component) และต้องการแมงกานีส โคบอลต์ ทองแดง เหล็ก และสารอินทรีย์บางชนิด เช่น กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก และวิตามิน ในปริมาณที่น้อยมาก (สาวิตรี ลิ้มทอง, 2549) สำหรับวัตถุดิบที่นำมาใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่จะมีธาตุอาหารต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์นอกเหนือจากคาร์โบไฮเดรต แต่วัตถุดิบบางชนิดอาจจะต้องมีการเติมธาตุอาหารบางอย่างเสริมลงไป เช่น ไนโตรเจน ซึ่งโดยทั่วไปยีสต์ใช้แอมโมเนียมไอออนได้ แม้ว่าบางชนิดต้องการกรดอะมิโนที่จำเพาะ แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนฟอสฟอรัสซึ่งปกติใส่ในรูปของฟอสเฟตเป็นไอออนที่มีความสำคัญต่อการหมัก สำหรับซัลเฟตนั้นในเซลล์ยีสต์พบมีซัลเฟตประมาณ 0.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง โดยเมไทโอนีนเป็นแหล่งซัลเฟตที่ยีสต์ชอบแต่เมไทโอนีนมีราคาแพงเกินกว่าจะใช้ในอุตสาหกรรม ส่วนซัลเฟตที่อยู่ในรูปของสารอินทรีย์ยีสต์สามารถนำไปได้เช่นกันโดยถูกรีดิวซ์เป็นเมไทโอนีนภายในเซลล์ และโดยปกติในอุตสาหกรรมจะใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ความต้องการธาตุอาหารของยีสต์ อาจเหนี่ยวนำโดยสภาพแวดล้อม เช่น ในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนจำเป็นต้องใส่เออร์โกสเตอรอลและกรดไขมันไม่อิ่มตัว ในยีสต์ซึ่งชอบเจริญที่อุณหภูมิสูงต้องการโคลีน คาร์นิทีน (carnitine) หรือลิควินเพื่อการเจริญ

2.8.2 สภาพแวดล้อม

2.8.2.1 พีเอช พีเอชเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญอย่างหนึ่งในการหมักเอทานอล

โดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากพีเอชมีผลต่ออัตราการหมัก การสร้างผลผลิตพลอยได้ ตลอดจนควบคุมเชื้อปนเปื้อนซึ่งมีผลต่อการเจริญของยีสต์ที่กำลังหมัก สำหรับการเลือกพีเอชที่จะใช้ในการหมักซึ่งไม่มีระบบควบคุมพีเอชระหว่างการหมักขึ้นอยู่กับความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ของสารอาหารสำหรับหมัก ในอาหารที่มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมควรใช้ปริมาณ 5.5 แต่ถ้าอาหารนั้นมีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์สูงพีเอชที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 4.5-4.7 ในการหมักเอทานอลเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบใช้พีเอช 4.0-5.0 แต่เมื่อใช้เมล็ดธัญพืชพีเอชที่ควรเลือกใช้จะอยู่ในช่วง 4.8-5.0 สำหรับการหมักเอทานอลโดยใช้อาหารที่มีความสามารถในการเป็นบัฟเฟอร์ต่ำบางครั้งต้องควบคุมพีเอชในระหว่างการหมักซึ่งอาจทำได้โดยการเติมแอมโมเนียเหลว พีเอชที่ *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ คือ พีเอชในช่วง 2.4-8.6 โดยมีพีเอชที่เหมาะสม (optimal pH) สำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำตาลเท่ากับ 4.5 โดยการหมักไม่เปลี่ยนแปลงในช่วงพีเอช 3.5-6.0 และพบว่าการหมักซูโครสจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชมากกว่าการหมักกลูโคส ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์อินเวอร์เทสมีการเปลี่ยนแปลงที่พีเอชต่ำมากกว่า จากรายงานวิจัยของ Fakruddin *et al.* (2013) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดต่างของยีสต์ 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *S. unisporus*, *S. cerevisiae* และ *Candida piceae* พบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถทนค่าความเป็นกรดต่างในช่วง 2.0 -10.0 ถ้าต่ำกว่า 2.0 หรือมากกว่า 10.0 จะไม่พบการเจริญของยีสต์เลย โดยยีสต์ที่เจริญได้ดีที่สุดในค่าความเป็นกรดต่าง คือ *S. unisporus* เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรดต่างเท่ากับ 6.0

2.8.2.2 ออกซิเจน มีรายงานบทบาทของออกซิเจนในการหมักเอทานอลโดยแสดงว่า

อากาศหรือออกซิเจนจำเป็นต่อการหมักเบียร์ที่ดี หน้าที่หลักของออกซิเจน คือ เป็นตัวรีบิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในลูกโซ่การหายใจ นอกจากนี้ออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็นสารส่งเสริมการเจริญ (growth factor) ของยีสต์ โดยเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันอิ่มตัวรวมทั้งกรด โอลีอิกและกรดลิโนลิก และเออร์กอสเตอรอล ซึ่งนอกจากจะช่วยส่งเสริมการเจริญภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนของยีสต์แล้วยังเพิ่มความทนของเอทานอลของยีสต์ด้วย กรดไขมันอิ่มตัวและสเตอรอลจำเป็นต่อการทำให้การหมักเอทานอลดำเนินต่อไปหลังจากการเจริญของยีสต์หยุดลงแล้วโดยเฉพาะในที่มีกลูโคส ความเข้มข้นสูง สารประกอบเหล่านี้ช่วยให้เซลล์ที่อยู่ในระยะพักตัวยังคงความมีชีวิตและกระตุ้นความสามารถในการหมัก เชื่อกันว่าเมื่อเลี้ยงในสภาพที่มีออกซิเจนเซลล์จะสร้างกรดไขมันอิ่มตัวและสเตอรอลหลายชนิดสะสมไว้ และการที่เยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์มีกรดลิโนลิกและเออร์กอสเตอรอลทำให้สภาพให้ซึมได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ต่อเอทานอลเพิ่มขึ้น ซึ่งสิ่งที่จะเกิดขึ้นตามมาคือเซลล์ยอมให้มีการขนถ่ายเอทานอลออกไปจากเซลล์นั้นก็คือถ้าสภาพซึมผ่านได้ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงขึ้นความเข้มข้นของเอทานอลภายในเซลล์จะต่ำลง แต่ถ้าเลี้ยงยีสต์ในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนยีสต์จะไม่สร้างกรดไขมันอิ่มตัวและสเตอรอลขึ้นมาเลย ดังนั้นในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนจึงจำเป็นต้องเติมสารเหล่านี้ลงไปเพื่อที่ยีสต์จะสามารถเจริญได้หลายชั่วรุ่น

2.8.2.3 คาร์บอนไดออกไซด์ ยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีออกซิเจนและไม่มี

ออกซิเจน ในที่ความดันสูงกว่าบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญและการหมักรุนแรงมาก

ขึ้น เช่นเดียวกับอาหารที่มีพีเอชต่ำและมีเอทานอลความเข้มข้นสูงคาร์บอนไดออกไซด์ดูเหมือนมีผลยับยั้งต่อปฏิกิริยาการบวกลดซีเลชั่นเท่านั้น แต่ก็พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์ เปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึมได้ และการขนส่งถูกตัวละลาย

2.8.2.4 อุณหภูมิ การผลิตเอทานอลที่มีอัตราการหมักสูงจะมีอัตราการเกิดความร้อนสูงตาม กระบวนการผลิตเอทานอลที่นิยมซึ่งในปัจจุบัน คือ กระบวนการผลิตแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SFF) ซึ่งเป็นการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง (พินดา สุริยะพันธุ์ และคณะ, 2554) การจะสามารถผลิตได้ต้องอาศัยยีสต์ทนร้อน เพื่อไม่ให้กระบวนการหยุดชะงักเนื่องจากยีสต์ตาย การผลิตที่อุณหภูมิสูงยังส่งผลให้เอทานอลระเหยออกจากระบบมากขึ้น ดังนั้นในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจึงจำเป็นต้องมีระบบหล่อเย็น เพื่อควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ จากงานทดลองของ Tofighi *et al.* (2014) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* รหัส AT-3 สามารถเจริญได้อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส โดยเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส วัดปริมาณเอทานอลที่ผลิต น้ำตาลที่ใช้ไป และมวลน้ำหนักแห้ง ถ้ามากกว่าหรือน้อยกว่า 35 องศาเซลเซียส ยีสต์จะทำกิจกรรมต่างๆได้น้อยลงอย่างเห็นได้ชัด

2.8.2.5 ความชื้น ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาพที่มีความชื้นเพียงพอ แต่หลายชนิดสามารถเจริญได้ดีในช่วงความชื้นสูง ซึ่งได้แก่ พวกออสโมฟิลิเคียสต์

2.8.2.6 ความเข้มข้นของเอทานอล เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลักของการหมัก และเมื่อมีการสะสมเอทานอลในระหว่างการหมักมากขึ้นยีสต์จะเกิดความเครียดมากขึ้น เนื่องจากเอทานอลเป็นสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ การเพิ่มขึ้นของเอทานอลจะเริ่มยับยั้งยีสต์จนกระทั่งฆ่ายีสต์ ซึ่งเอทานอลเป็นตัวยับยั้งแบบที่ไม่ต้องแข่งขัน (non-competitive inhibitor) ของอัตราการเจริญของยีสต์

2.8.2.7 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น หมายถึงความเข้มข้นของน้ำตาลและเกลือซึ่งมีผลทำให้เกิดความเครียดเนื่องจากแรงดันออสโมติก ในลักษณะปกติความเข้มข้นภายนอกจะมากกว่าภายในเซลล์ น้ำภายในเซลล์จึงมีทิศทางเคลื่อนออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์เสียสภาพหดตัวมีขนาดเล็กลง ทั้งนี้เพื่อป้องกันกิจกรรมที่มีอยู่ภายในเซลล์ให้คงอยู่ ยีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *Deharyomyces hansenii*, และ *S. cerevisiae* เมื่อเจริญในอาหารที่มีเกลือหรือน้ำตาลมากๆ จะสังเคราะห์กลีเซอรอลเพิ่มขึ้นเพื่อรักษาแรงดันออสโมซิสภายในเซลล์

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปริญญพันธ์ เพชรจรัส และเมทินี วสุนทรวัดณ์ (2556) ได้ศึกษาความสามารถในการเจริญและอุณหภูมิที่เหมาะสมของยีสต์ทนร้อนในการผลิตเอทานอล โดยนำยีสต์มาศึกษาทั้งหมด 4 ไอโซเลต ได้แก่ NK1-4, NK3-5, NK3-10 และ NK3-14 ที่คัดแยกจากลูกแป้งเหล้า และเลี้ยงใน YM broth แปรผันอุณหภูมิเป็น 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 52 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ NK1-4 มีอัตราการเจริญสูงสุด โดยปริมาณเอทานอลที่วัดได้ที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เท่ากับ 7.7, 8.0 และ 0 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ตามลำดับ

อภิชนา จันทรมั่น และคณะ (2555) เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* Sc90 ในอาหารเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 54 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.354 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส

Chamnipa *et al.* (2557) ได้ทำการคัดแยกยีสต์จากจังหวัดขอนแก่น ระยอง จันทบุรี และชลบุรี เพื่อคัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักที่อุณหภูมิสูง สามารถคัดแยกได้ 127 ไอโซเลตนำไปแปรผันอุณหภูมิที่ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส โดยเลี้ยงบนอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 160 กรัมต่อลิตร พบว่ายีสต์รหัส Rz5-1, Rz3-1, Rz8-1, S6, S10 และ S11 สามารถเจริญได้ดี และผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการตรวจสอบ ดีเอ็นเอจัดจำแนกว่าเป็น *P. kudreivzeii* ทั้งหมด โดย *P. kudreivzeii* Rz8-1 ผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด จากนั้นนำ *P. kudreivzeii* Rz8-1 ไปทดลองผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส จากไฮโดรไลสเสทชานอ้อยพบว่า ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.36 และ 0.34 กรัมต่อกรัมกากน้ำตาลตามลำดับ

Cimpeanu *et al.* (2010) คัดแยกยีสต์จากผลไม้และน้ำผลไม้ในประเทศโรมาเนีย เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการทนร้อน ผลปรากฏว่าคัดแยกได้จำนวน 45 ไอโซเลต โดย 7 ไอโซเลตถูกจัดจำแนกเป็น *S. cerevisiae* จากนั้นนำทั้ง 7 ไอโซเลต แปรผันอุณหภูมิเป็น 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ 7 ไอโซเลตทั้งหมดสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย *S. cerevisiae* F7 เจริญได้ดีที่สุด และสามารถเจริญได้เกินอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ด้านการผลิตเอทานอลพบว่าสายพันธุ์ *S. cerevisiae* F7 ผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดโดยปริมาณเอทานอลที่วัดได้เท่ากับ 15.7 เปอร์เซ็นต์ (v/v) และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมได้

Tofghi *et al.* (2014) ได้แยกยีสต์จากน้ำเสียแล้วพบว่ามียีสต์ 50 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30-45 องศาเซลเซียส และมีเพียง 3 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่เจริญดีสุดคือ AT-3 ซึ่งถูกระบุว่าเป็น *S. cerevisiae* โดยสามารถสร้างเอทานอลได้ 6.9 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่ 35 องศาเซลเซียส และ 6.85 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่ 40 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลเทียบกับทฤษฎีแล้วคิดเป็น 75 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง บ่งบอกได้ว่าเป็นยีสต์ทนร้อนที่มีประสิทธิภาพ

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

- 3.1.1.1 ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)
- 3.1.1.2 ฟลาสก์ (Flask)
- 3.1.1.3 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)
- 3.1.1.4 ปีกเกอร์ (Beaker)
- 3.1.1.5 แท่งแก้วคนสาร
- 3.1.1.6 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Microcentrifuge)
- 3.1.1.7 โถดูดความชื้น (Desicator)
- 3.1.1.8 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Analytical balance)
- 3.1.1.9 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave)
- 3.1.1.10 เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker)
- 3.1.1.11 ตู้อบความร้อนอุณหภูมิสูง (Hot air oven)
- 3.1.1.12 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- 3.1.1.13 ไมโครปิเปต (Micropipette)
- 3.1.1.14 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)

3.1.2 สารเคมี

- 3.1.2.1 ดี-กลูโคส (D-glucose)
- 3.1.2.2 ผงวุ้น (Agar)
- 3.1.2.3 เปปโตน (peptone)
- 3.1.2.4 มอลต์เอ็กซ์แทร็กต์ (Malt extract)
- 3.1.2.5 ยีสต์เอ็กซ์แทร็กต์ (Yeast extract)
- 3.1.2.6 แอลกอฮอล์ (Alcohol)
- 3.1.2.7 กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)
- 3.1.2.8 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)
- 3.1.2.9 โพแทสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 3.1.2.10 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 สายพันธุ์ยีสต์ที่ร้อน

ใช้เชื้อยีสต์ทนอุณหภูมิสูง ที่คัดแยกจากผลไม้สุกเน่า (ปี พ.ศ. 2558) จำนวน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ RMU-RB16 และ RMU-RB17 เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast extract-Malt extract (YM) agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไว้จนกว่าจะนำมาใช้ในขั้นตอนถัดไป

3.2.2 การศึกษาลักษณะสัณฐานของเชื้อ

เชื้อยีสต์ลงบนผิวหน้าอาหารวัน YM agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญของยีสต์บนผิวหน้าอาหาร และตรวจสอบรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.3 การศึกษาความทนต่อแรงกดดัน

3.2.3.1 การทนอุณหภูมิสูง (30, 35, 40 และ 45 °C)

3.2.3.2 ความสามารถในการทนต่อน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ (5, 10, 15, 20 และ 25% (w/v))

3.2.3.3 การทนต่อแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (2.5, 5, 7.5, 10, 12.5 และ 15% v/v)

3.2.4 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เชื้อโคลนของยีสต์ทนอุณหภูมิสูง จากข้อ 3.2.1 ลงในอาหาร YM broth ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 50 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (กำหนด OD เริ่มต้น = 1.0)

3.2.5 การศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

เชื้อตั้งต้นของยีสต์ที่เตรียมจากข้อ 3.2.3 ปริมาณเชื้อตั้งต้น 10 % (v/v) เติมลงในอาหารหมัก (ประกอบด้วยกลูโคส 18%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%) ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 0, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงตัวอย่างที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใส (supernatant) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคส และเอทานอล ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และวัดการเจริญที่เปลี่ยนแปลงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3.2.6 การคำนวณ

3.2.6.1 วิธีการคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ที่สำคัญของการผลิตเอทานอลแสดงดังต่อไปนี้ (ภักวีรุฬห์ ถือสมบัติ, 2551)

$$\text{ผลได้ของเอทานอล (Y}_{p/s}\text{)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัม/ลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัม/ลิตร)}}$$

$$\text{อัตราการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)} = \frac{\text{ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัม/ลิตร)}}{\text{ระยะเวลาของการหมัก (ชั่วโมง)}}$$

3.2.6.2 ผลของเอทานอลเทียบกับทฤษฎี (theoretical yield)

$$\text{ผลได้ของเอทานอลจากกระบวนการหมักเทียบทฤษฎี (\%)} = \frac{\text{ผลได้ของเอทานอล} \times 100}{0.51}$$

0.51 คือ ผลได้ของเอทานอลทางทฤษฎีเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา และการเจริญของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 บนอาหารแข็ง

ศึกษาลักษณะของโคโลนี และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Yeast extract-Malt extract (YM) agar plate และอาหารเหลว YM broth ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ลักษณะสัณฐานวิทยา แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานวิทยา และการเจริญในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน

รหัสเชื้อยีสต์	ลักษณะสัณฐานบนอาหารแข็ง		การเจริญในอาหารเหลว
	ลักษณะโคโลนี	รูปร่างเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	
RMU-RB16	<ul style="list-style-type: none">- โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.08 ± 0.03 มิลลิเมตร- รูปแบบโคโลนีกลม นูน และขอบเรียบ- ผิวหน้าเกลี้ยงเงา- โคโลนีมีสีครีม- เนื้อโคโลนีมีสีขาว	<ul style="list-style-type: none">- เซลล์มีรูปร่างกลม (Spherical)- พบการแตกหน่อ	การเจริญของเซลล์เกาะกลุ่มตกตะกอนอยู่ก้นฟลาสก์
RMU-RB17	<ul style="list-style-type: none">- โคโลนีมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.28 ± 0.14 มิลลิเมตร- รูปแบบโคโลนีกลม นูน และขอบหยัก- ผิวหน้าไม่เกลี้ยงเงา- โคโลนีมีสีขาว- เนื้อโคโลนีดำ	<ul style="list-style-type: none">- เซลล์มีรูปร่างรี (Ellisoidal)- พบการแตกหน่อ	การเจริญของเซลล์เกาะกลุ่มตกตะกอนอยู่ก้นฟลาสก์



ภาพที่ 4.1 การเจริญบน YM agar plate และรูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของยีสต์รหัส (ก-ข) RMU-RB16 และ (ค-ง) RMU-RB17

4.2 ความทนต่อแรงกดดันของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17

4.2.1 ความทนต่ออุณหภูมิ

ผลความทนต่ออุณหภูมิในอาหาร YPD broth โดยผันแปรอุณหภูมิเท่ากับ 30, 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงของยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17

รหัส เชื้อ ยีสต์	อุณหภูมิ 30 องศา เซลเซียส			อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส			อุณหภูมิ 40 องศา เซลเซียส			อุณหภูมิ 45 องศา เซลเซียส		
	เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)			เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)			เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)			เวลาในการบ่ม (ชั่วโมง)		
	24	48	72	24	48	72	24	48	72	24	48	72
RMU- RB16	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+++	-	-	-
RMU- RB17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	+	+

หมายเหตุ +++ = เจริญได้ดี (เจริญเต็มแนวเชื้อ)

++ = เจริญปานกลาง (เจริญเกือบเต็มแนวเชื้อ)

+ = เจริญได้น้อย (เจริญบางส่วนแนวเชื้อ)

- = ไม่มีการเจริญ

ผลการเจริญที่อุณหภูมิสูงของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า ยีสต์ดังกล่าวเป็นยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส การเจริญของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 จะลดลง แต่ RMU-RB17 ยังสามารถเจริญเติบโตได้ดีและที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 ไม่สามารถเจริญได้ และ RMU-RB17 ยังสามารถเจริญเติบโตได้เล็กน้อย จากรายงานยีสต์ส่วนใหญ่ในห้องปฏิบัติการ และระดับอุตสาหกรรมเจริญได้ดี เมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 20 – 30 องศาเซลเซียส แต่มีอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญของยีสต์บางสายพันธุ์ในช่วง 35 – 43 องศาเซลเซียส (Walker, 1998) โดยอุณหภูมิมิผลต่อสัณฐานวิทยา และความอยู่รอดของเซลล์ เนื่องจากอุณหภูมิสูงมีผลทำให้การแตกหน่อของยีสต์ผิดปกติ ผนังเซลล์เจริญไม่สมบูรณ์ การเพิ่มขนาดเซลล์ผิดปกติ มีปริมาณของเหลวในเซลล์เพิ่มขึ้น ความสามารถในการเลือกผ่านของสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง ทำลายพันธะไฮโดรเจนทำให้

โปรตีน และกรดนิวคลีอิกเสื่อมสภาพ ส่งผลให้กิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ยีสต์ลดลงด้วย ยับยั้งกระบวนการหายใจ และการหมัก แต่เป็นข้อดีสำหรับการหมักเอทานอล โดยพบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 25 เป็น 38 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกยับยั้งทำให้เกิดการสะสมกรดไพรูเวต และเอทานอล โดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (สาวิตรี, 2540)

4.2.2 ความทนต่อน้ำตาลกลูโคส

ทดสอบความทนต่อน้ำตาลกลูโคสในอาหาร YPD broth โดยผันแปรความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30% w/v ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการเจริญที่น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นต่างๆ ของยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17

รหัสยีสต์	ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (%)					
	5	10	15	20	25	30
RMU-RB16	+++	+++	+++	++	++	++
RMU-RB17	+++	+++	+++	++	++	++

หมายเหตุ +++ = เจริญได้ดี (เจริญเต็มแนวเขี่ยเชื้อ)

++ = เจริญปานกลาง (เจริญเกือบเต็มแนวเขี่ยเชื้อ)

+ = เจริญได้น้อย (เจริญบางส่วนของแนวเขี่ยเชื้อ)

- = ไม่มีการเจริญ

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.3 พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 20-30% ยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ปานกลาง และความเข้มข้นเท่ากับ 5-15% ยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ดี ความเข้มข้นสับสเตรทหรือแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์ และการผลิตเอทานอล การใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูงๆ ในการหมักเอทานอลมีผลช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่การใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูงๆ ก็มีข้อเสียในด้านการยับยั้งการเจริญ และการหมักเอทานอลเช่นเดียวกัน การยับยั้งนี้เกิดจากแรงดันออสโมติก ทำให้เซลล์เกิดกระบวนการพลาสโมไลซิส เมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงเท่ากับ 14% โดยน้ำหนัก และมีผลยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิสส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลง (สาวิตรี, 2540 ; Lachance , 1990 ; Panchal and Tavares , 1990)

4.2.3 ความทนต่อเอทานอล

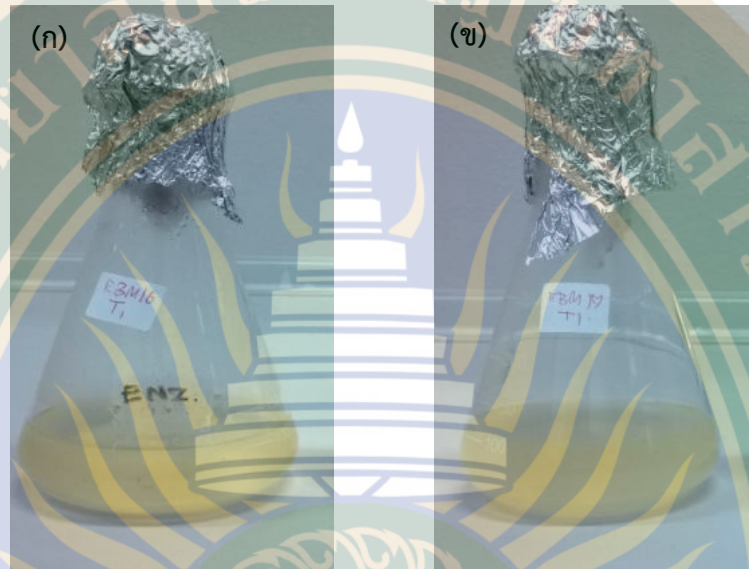
ทดสอบความทนต่อน้ำตาลกลูโคสในอาหาร YPD broth โดยผันแปรความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15 และ 16.5% v/v ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ความสามารถในการเจริญที่เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ของยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17

รหัสยีสต์	ความเข้มข้นของเอทานอล (%)						
	2.5	5	7.5	10	12.5	15	16.5
RMU-RB16	+++	+++	+++	+++	+++	++	++
RMU-RB17	+++	+++	+++	+++	+++	++	++

จากผลการทดลองในตารางที่ 4.4 พบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 16.5% ยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลต ได้แก่ RBM16 และ RBM17 สามารถเจริญได้ปานกลาง ความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับ 15% ยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลต เจริญได้ปานกลาง และความเข้มข้นเท่ากับ 2.5-12.5% ยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ดี เอทานอลมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ เนื่องจากเอทานอลส่งผลต่อสารตัวกลางในเมแทบอลิซึม (intermediately metabolism) และการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลของยีสต์ เช่น เอทานอล ทำให้ยีสต์มีอัตราการสังเคราะห์โปรตีน และอาร์เอ็นเอลดลง ลดกิจกรรมของเอนไซม์ในวัฏจักรไกลโคไลซิส (glycolytic enzymes) เพิ่มอนุมูลอิสระของออกซิเจน (oxygen free radicals) ส่งผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยโครงสร้างเซลล์ที่เป็นเป้าหมายหลักต่อการส่งผลของเอทานอล คือ เยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ยีสต์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงจึงส่งผลให้ได้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น (สุทธิชา ธรรมสิทธิรงค์, 2554)

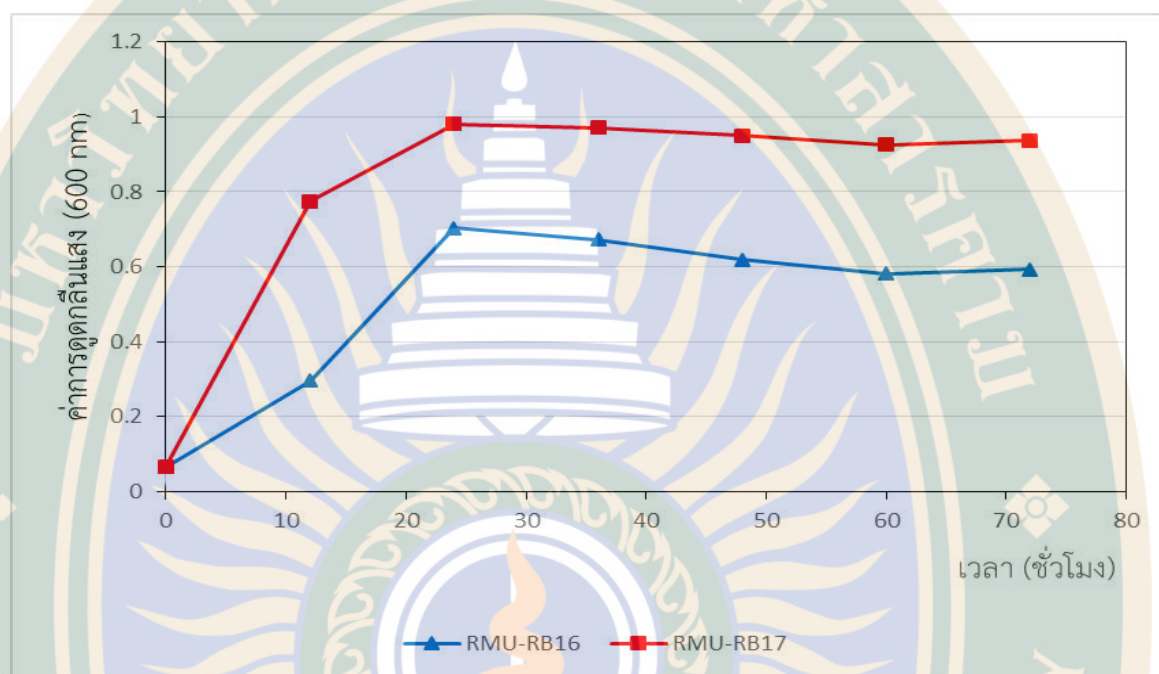
4.3 ผลการศึกษาผลของอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17



ภาพที่ 4.2 การเจริญของเชื้อยีสต์รหัส (ก) RMU-RB16 และ (ข) RMU-RB17 ในอาหารหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

4.3.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 ในอาหารเหลว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 12 รอบต่อนาที และแปรผันระยะเวลาในการบ่ม

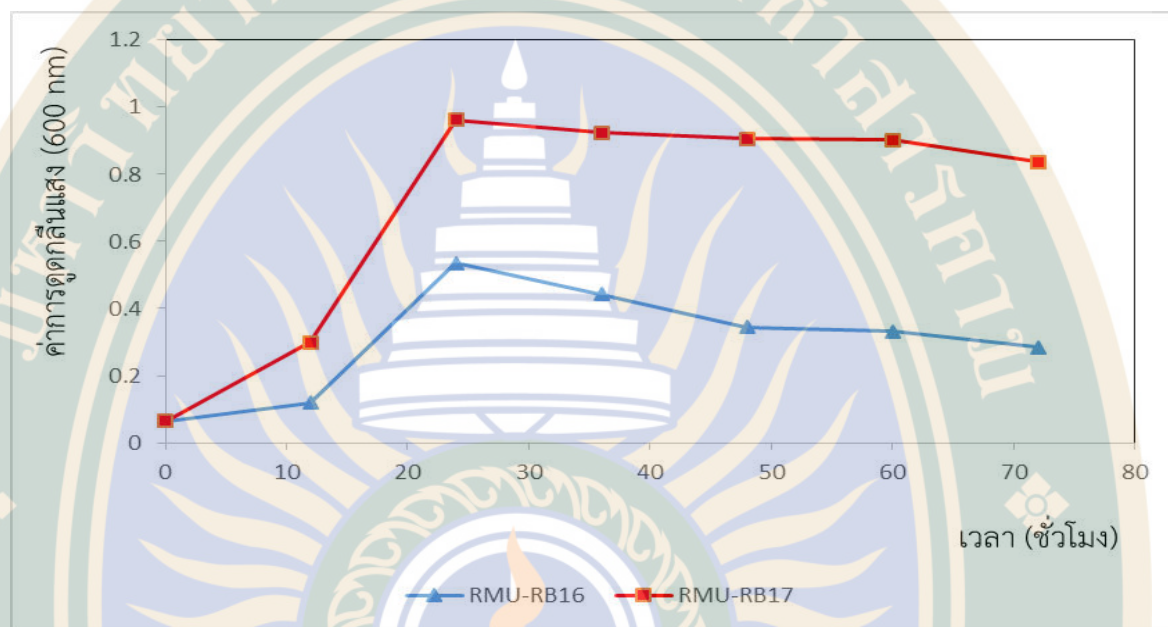


ภาพที่ 4.3 อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์รหัส ▲ RMU-RB16 และ ■ RMU-RB17 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.3 พบว่า เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 มีการเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะลือกกาลิติม (exponential phase) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และการเจริญของเชื้อเริ่มลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 72 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์จะเห็นได้ชัดเจนว่า เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB17 มีอัตราการเจริญสูงกว่า RMU-RB16 แสดงให้เห็นว่า เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB17 สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่า RMU-RB16

4.3.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17

เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 ในอาหารเหลว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 12 รอบต่อนาที และแปรผันระยะเวลาในการบ่ม



ภาพที่ 4.4 อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์รหัส ▲ RMU-RB16 และ ■ RMU-RB17 ในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.4 พบว่า เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 มีการเจริญและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเข้าสู่ระยะล็กกาทิม (exponential phase) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง และการเจริญของเชื้อเริ่มลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 72 เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์จะเห็นได้ชัดเจนว่า เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB17 มีอัตราเจริญสูงกว่า RMU-RB16 แสดงให้เห็นว่า เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB17 สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่า RMU-RB16 สอดคล้องกับผลการเจริญเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ผลจากการศึกษาแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นส่งผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 อย่างเห็นได้ชัดเจนจากภาพที่ 4.3-4.4 ถ้าอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นจะส่งผลให้เชื้อเจริญลดลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cimpeanu และคณะ (2010) ที่ได้รายงานว่าคุณสมบัติที่เพิ่มสูงขึ้นเกิน 37 องศาเซลเซียส จะส่งผลต่อการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* F7 ทำค่าดูดกลืนแสงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดคือ 37 องศาเซลเซียส อุณหภูมิมีผลต่อสัณฐานวิทยา และความอยู่รอดของเซลล์ เนื่องจากอุณหภูมิสูงมีผลทำให้การแตกหน่อของยีสต์ผิดปกติ ผนังเซลล์เจริญไม่สมบูรณ์ การเพิ่มขนาดเซลล์ผิดปกติ มีปริมาณของเหลวในเซลล์เพิ่มขึ้น ความสามารถในการเลือกผ่านของสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง ทำลายพันธะไฮโดรเจนทำให้โปรตีน และกรด

นิเวศชีวเคมีเสื่อมสภาพ ส่งผลให้กิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ยีสต์ลดลงด้วย ยับยั้งกระบวนการหายใจ และการหมัก แต่เป็นข้อดีสำหรับการหมักเอทานอล โดยพบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 25 เป็น 38 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกยับยั้งทำให้เกิดการสะสมกรดไขมัน และเอทานอล โดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) เกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (สาวตรี, 2540) ดังนั้นความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส จึงเป็นข้อดีในการใช้ยีสต์เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถลดค่าใช้จ่ายในการหล่อเย็นเพื่อระบายความร้อนของถังหมัก ลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย และเพิ่มอัตราการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลทำให้เพิ่มการผลิตเอทานอล รายงานยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงหลายสายพันธุ์ เช่น *Kluyveromyces marxianus*, *Pichia* spp., *Candida* spp. และ *Saccharomyces cerevisiae*

4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17

ศึกษาความสามารถของการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 ที่อุณหภูมิสูง โดยแปรผันอุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารหมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรของอาหารหมัก 100 มิลลิลิตร ใช้เชื้อยีสต์เริ่มต้นความหนาแน่นเซลล์ที่มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.0 ปริมาตร 10 % (v/v) อัตราเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แสดงตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเอทานอล และผลได้ทางทฤษฎีของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ยีสต์	ระยะเวลาบ่ม	เอทานอล	ผลได้ทางทฤษฎี
RMU-RB16	12	8.04	15.76
	24	10.71	21
	36	11.78	23.1
	48	12.91	25.31
	60	13.01	25.51
	72	14.4	28.24
RMU-RB17	12	10.01	19.63
	24	13.78	27.02
	36	16.44	32.24
	48	16.94	33.22
	60	18.3	35.88
	72	22.4	43.92

ตารางที่ 4.6 ปริมาณเอทานอล และผลได้ทางทฤษฎีของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ยีสต์	ระยะเวลาบ่ม	เอทานอล	ผลได้ทางทฤษฎี
RMU-RB16	12	2.89	5.66
	24	3.53	6.92
	36	4.02	7.88
	48	4.24	8.31
	60	4.7	9.22
	72	5.32	10.43
RMU-RB17	12	2.74	5.37
	24	3.27	6.41
	36	4.39	8.61
	48	6.58	12.9
	60	6.78	13.29
	72	8.44	16.55

ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลและผลได้ทางทฤษฎีแสดงให้เห็นตาราง 4.5-4.6 พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 22.40 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นผลได้ทางทฤษฎีเท่ากับ 43.92 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุดเท่ากับ 8.44 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นผลได้ทางทฤษฎีเท่ากับ 16.55 เปอร์เซ็นต์) โดยเชื้อรหีส RMU-RB17 ในขณะที่เชื้อยีสต์รหีส RMU-RB16 มีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 14.40 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นผลได้ทางทฤษฎีเท่ากับ 28.24 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.32 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นผลได้ทางทฤษฎีเท่ากับ 10.43 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่า เชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง



4.4 การจัดจำแนกเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17

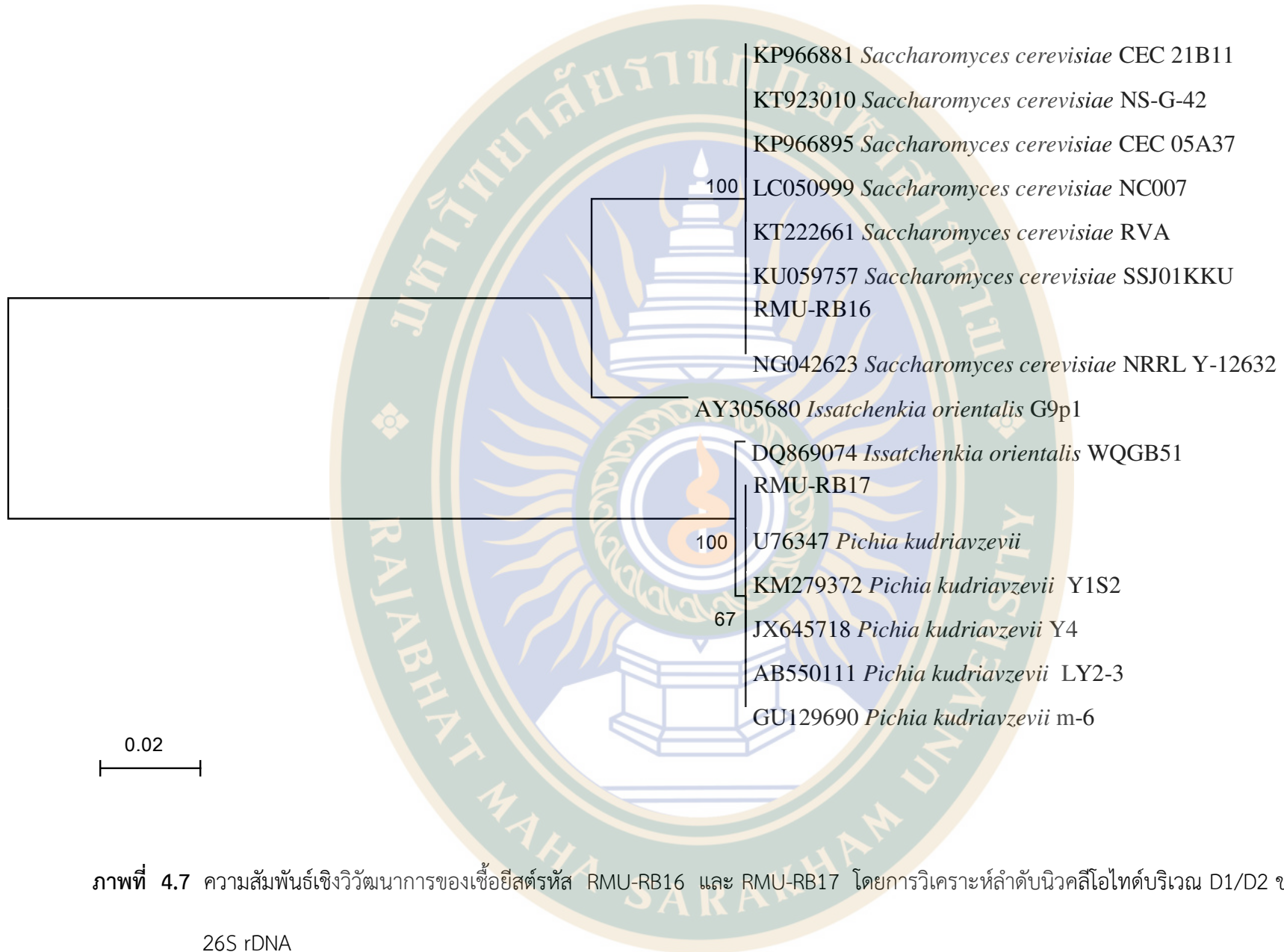
จำแนกสายพันธุ์ยีสต์โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการผันแปรสูง โดยการส่งตัวอย่างเชื้อยีสต์วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากศูนย์พันธุวิศวกรรมแห่งชาติ แสดงผลลำดับนิวคลีโอไทด์ของตัวอย่างยีสต์ในการทดลอง คือ RMU-RB16 และ RMU-RB17 ที่ได้จากเครื่องวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA Sequencer) ดังภาพที่ 4.5-4.6

```
AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTTGAAATCTGG
TACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCCCTTGTCTATGTTT
CTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCAGTTCTTTGTAAG
TGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATCCATCTAAAG
CTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAAGTTTGA
AAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTGATCAGACATGGTGTTT
TGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGCATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGT
GGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCCTCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGC
CAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAGTCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGT
CT
```

ภาพที่ 4.5 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน LSU rRNA gene ของยีสต์รหัสRMU-RB16

```
AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTG
CTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTCCCTT
GGAACAGGGCGCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTC
TGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGTGGTAAATCCATCTAAGGCTAAAT
ACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAG
AGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCA
CCGCTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGTTCTTGCTGCAGGA
GAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGG
ACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCCGCCGTCTT
```

ภาพที่ 4.6 แสดงลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน LSU rRNA gene ของยีสต์รหัสRMU-RB16



ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 และ RMU-RB17 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ

26S rDNA

ผลความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการดังภาพที่ 4.7 พบว่า เชื้อราหีส RMU-RB16 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Saccharomyces cerevisiae* จึงสามารถจัดจำแนกเป็น *Saccharomyces cerevisiae* RMU-RB16 และเชื้อราหีส RMU-RB17 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Pichia kudriavzevii* จึงสามารถจัดจำแนกเป็น *Pichia kudriavzevii* RMU-RB17



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

ผลการเจริญที่อุณหภูมิสูงของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า ยีสต์ดังกล่าวเป็นยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส การเจริญของเชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 จะลดลง แต่ RMU-RB17 ยังสามารถเจริญเติบโตได้ดี และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 ไม่สามารถเจริญได้ และ RMU-RB17 ยังสามารถเจริญเติบโตได้เล็กน้อย การเจริญที่อุณหภูมิสูงเป็นข้อดีในการใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากประเทศไทยมีภูมิอากาศแบบร้อนชื้น และในระหว่างกระบวนการหมักจะมีอุณหภูมิเพิ่มขึ้น แนวทางแก้ไขในปัจจุบันมีค่าใช้จ่ายในการใช้น้ำหล่อเย็นเพื่อรักษาระดับอุณหภูมิให้เหมาะสมกับเชื้อยีสต์ทั่วไปที่เจริญที่อุณหภูมิไม่เกิน 28 องศาเซลเซียส

ความทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 20-30% ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า สามารถเจริญได้ปานกลาง และความเข้มข้นเท่ากับ 5-15% สามารถเจริญได้ดี โดยความเข้มข้นสับสเตรทหรือแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์ และการผลิตเอทานอล การใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูงๆ ในการหมักเอทานอลมีผลช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่ไม่ต้องการ

ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 15 และ 16.5% ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ปานกลาง และความเข้มข้นเท่ากับ 2.5-12.5% ยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ดี โดยเอทานอลมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ เนื่องจากเอทานอลส่งผลต่อสารตัวกลางในเมแทบอลิซึม ทำให้ยีสต์มีอัตราการสังเคราะห์โปรตีน และอาร์เอ็นเอลดลง ลดกิจกรรมของเอนไซม์ในวัฏจักรไกลโคไลซิส ส่งผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นยีสต์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงจึงส่งผลให้ได้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 22.40 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นผลได้ทางทฤษฎีเท่ากับ 43.92 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุดเท่ากับ 8.44 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นผลได้ทางทฤษฎีเท่ากับ 16.55 เปอร์เซ็นต์) โดยเชื้อรหัส RMU-RB17 ในขณะที่เชื้อยีสต์รหัส RMU-RB16 มีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าสูงสุดเท่ากับ 14.40 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นผลได้ทางทฤษฎีเท่ากับ 28.24 เปอร์เซ็นต์) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.32 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นผลได้ทางทฤษฎีเท่ากับ 10.43 เปอร์เซ็นต์) แสดงให้เห็นว่า เชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

ผลการจัดจำแนกทางโมเลกุลโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ เชื้อรหัส RMU-RB16 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Saccharomyces cerevisiae* จึงสามารถจัดจำแนกเป็น *Saccharomyces cerevisiae* RMU-RB16 และเชื้อรหัส RMU-RB17 มีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการใกล้ชิดกับ *Pichia kudriavzevii* จึงสามารถจัดจำแนกเป็น *Pichia kudriavzevii* RMU-RB17

ข้อเสนอแนะในการนำผลการวิจัยไปใช้

ในการนำเชื้อยีสต์ทนอุณหภูมิสูงทั้ง 2 สายพันธุ์ไปใช้ประโยชน์อาจมีการทดสอบความสามารถในการเจริญโดยใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เพื่อเพิ่มมูลค่าและใช้วัตถุดิบต้นทุนต่ำที่มีแพร่หลายในท้องถิ่น

ข้อเสนอแนะในการทำวิจัยครั้งต่อไป

ทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้แหล่งคาร์บอนหลากหลายชนิด



บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงานกระทรวงพลังงาน.(มปป.). **คู่มือการพัฒนาและ**

การลงทุนผลิตพลังงานทดแทนชุดที่ 7 เชื้อเพลิงเอทานอล. หน้า 3.

คณะกรรมการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร. (2545). **พลังงานทดแทนเอทานอลและ**

ไบโอดีเซล.แปลนพริ้นท์ตั้ง : กรุงเทพฯ.

จूरिरัตน์ ลีสมิทธิ. (2552). **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทั่วไป.** พิมพ์ครั้งที่ 2. สำนักพิมพ์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ปฏิพล ชัยเทพ,ไพรัช साใจ และรัชฎาภรณ์ ปวงก้องตัน. (2555). **การผลิตเอทานอลจาก**

กากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ทนร้อน. วิทยาลัยเทคโนโลยีและสหวิทยาการ มหาวิทยาลัย

เทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

ปริญญพันธ์ เพชรจรัส และ เมทินี วสุนทรวัฒน์. (2556). **การศึกษาความสามารถในการเจริญและ**

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลด้วยยีสต์ทนร้อน.

Agricultural Sci. J., 44 (2), 225-228.

พรเทพ ถนนแก้ว และประสิทธิ์ ใจศีล. (2554). **การประยุกต์ใช้ยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces***

***cerevisiae* DBKKUY-53 ในการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลจากข้าวฟ่างหวาน.**

มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

พนิดา สุริยะพันธ์, ชมภูษ วิรุณานนท์, สุภางค์ จุฬาลักษณ์านุกูล และวรวิมล จุฬาลักษณ์านุกูล.

(2554). **การคัดแยกยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล.**

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตร. (2549) .

กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาวิตรี ลิ้มทอง. (2549). **ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 1.

กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สาวิตรี ลิ้มทอง, วิเชียร ยงมานิตชัย, ศศิวิมล ชื่นอ้อม, เหมือนเดือน พิศาลพงศ์ , นันทนา สีสุข, สมคิด

ธรรมรัตน์ , สิทธิพร สอนเสาวภาคย์ และอะเคื้อ บุญญสิริ. (2545). **การปรับปรุงการผลิต**

แอลกอฮอล์ ของโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เสนอต่อสำนักงานกองทุน สนับสนุนการวิจัย (สกว).

สุทธิชา ธรรมสิทธิรงค์ . (2554). **การคัดเลือกและปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้ทนต่ออุณหภูมิสูง และ**

เอทานอลสูงเพื่อผลิตเอทานอล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อภิขญา จันทร์มัน, สาโรจน์ ศิริคั่นสนียกุล และกิติพงษ์ รัตนภรณ์. (2558). **การหมักเอทานอลด้วย**

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc90 และ การหมักด้วยจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์

ร่วมกันในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่มีกลูโคสและไซโลส . ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะอุตสาหกรรมเกษตร; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

- Chamnipa N, Thanonkeo S, Thanonkeo P. 2014. **Isolation and selection of thermotolerant yeast for ethanol production at high temperature.** The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. 66-71.
- Cimpeanu, C., Campeanu G., Begea, M., Vladescu, M., Cornea, C.P. (2010). **Bioethanol production by new thermotolerant Romanian yeast strains.** Romanian Biotechnological Letters, 15(3), 5310-5316.
- Hacking. (1984). **Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40° C.** Applied Microbiology and Biotechnology, 19 (5), 361-363.
- Limtong, S., Kishimoto, M., Funahashi, H., Seki, T., Yoshida, T. and Tagushi, H. (1987). **Simulation and optimization of fed-batch culture for ethanol production from molasses.** Bioproc. Eng, 2, 141-147.
- Panchal C. J. and Tavares, F.C.A. (1997). **Yeast strain selection.** New York : Marcel Dekker Inc. 225-243.
- Lachance, Marc-Andre. (1990). **Yeast selection in nature.** In C.J. Panchal (ed), **Yeast strain Selection.** New York : Marcel Dekker Inc. 21-41.
- Samsuri, m., Gozon, M., prasetga, B. and Nasiuin, M. 2009. Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Bagassc for Bioethanol production. **Journal of Biotechnology Reseaech in Tropical Region.** 2(2):1-5.
- Seki, T., Myoga, S., Limtong, S., Uedono, S., Kumnuanta, J., and Taguchi, H. (1983). **Genetic construction of yeast strains for high ethanol production.** Biotechnol. Lett., 5, 351-356.

Sree Kiran, N., Sridhar, M., Rao, L. V. and Pandey, A. (1999). **Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast.** Process Biochem, 34, 115- 119.

Tofighi A, Azin M, Mazaheri Assadi M, Assadi-rad MHA, Nejadstattari T, Fallahian MR. (2010). **Inhibitory effect of high concentrations of furfural on industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae*.** Int J Environ Res., 4(1), 137-142.

Walker, G.M. (1998). **Yeast Physiology and Biotechnology.** West Sussex P019 IUD, England.

สื่ออิเล็กทรอนิกส์

Yeast physiology in ethanol production. 2009. (วันที่ทำการสืบค้น 12 September 2015). <http://www.responsiblebusing+sugar+crops?sortBy=createddate>.

เอทานอล. (วันที่ทำการสืบค้น 22 มีนาคม พ.ศ. 2559). www.siamchemi.com/เอทานอล/

เทคโนโลยีชีวภาพกับพลังงาน. ฅมาลิสา ยวอมรพิทักษ์. 2548. (วันที่ทำการสืบค้น 19 มีนาคม พ.ศ. 2559). <http://techno.msu.ac.th/bt/New%20folder/pdfdocxls/b.doc>



ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหาร Yeast Malt Broth

Yeast extract	3	กรัม
Malt extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดย ชั่งสารอาหารแต่ละชนิด แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และสำหรับการเตรียม YM agar medium ให้เติมวุ้น จำนวน 20 กรัมต่อลิตร ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

2. อาหารหมักเพื่อผลิตเอทานอล (Fermentation medium)

Glucose	180	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	1	กรัม
KH ₂ PO ₄ 7H ₂ O	1	กรัม
pH	5	
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดย ชั่งสารอาหารแต่ละชนิด แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ



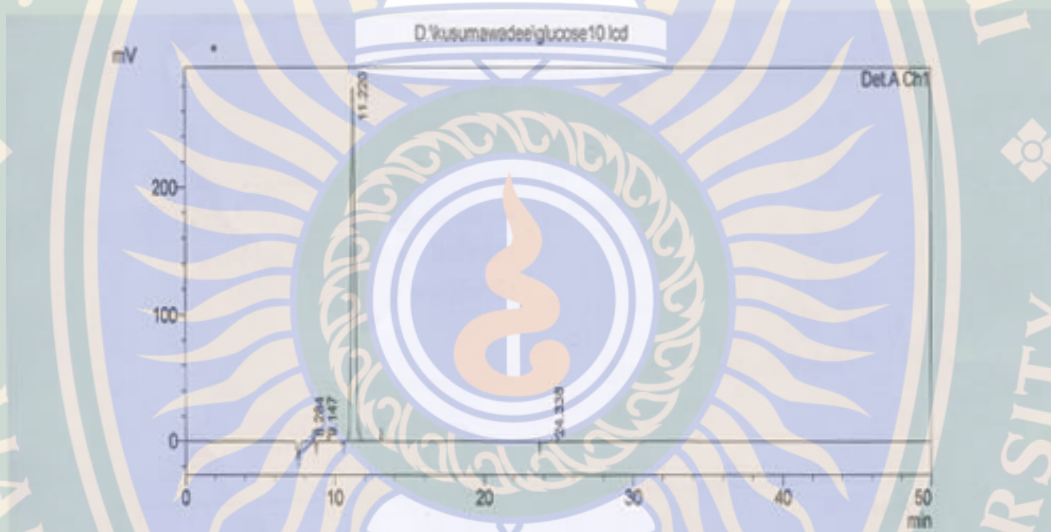
ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ข
กราฟมาตรฐานและการคำนวณ

1. การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคส และเอทานอลโดยใช้เทคนิค HPLC

การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดยใช้ Rezek RNM carbohydrate Column ขนาด 7.8x300 มิลลิลิตร (Phenomenex) ชะด้วย deionized distill water ที่อัตราการไหล (floe rate) เท่ากับ 0.4 มิลลิลิตรต่อนาที อุณหภูมิที่ใช้ในการแยกคือ 45 องศาเซลเซียส และตรวจวัดสารที่ออกจากคอลัมน์ด้วย Refractive index detector

1.1 สารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสมี retention time ประมาณ 11.22 นาที



ภาพที่ ข-1 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC

การหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสจากสารตัวอย่าง

จากกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสจะได้สมการ $y = 286658x + 4202.9$

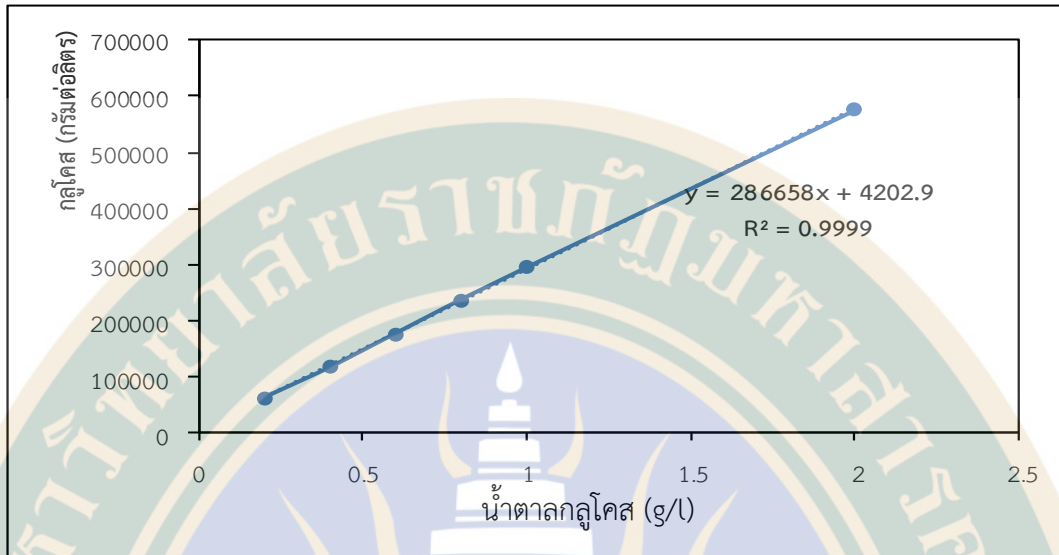
โดย y คือ พื้นที่ที่ retention time ประมาณ 11.22 นาที

X คือ ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)

สามารถคำนวณหาปริมาณกลูโคสได้ดังนี้

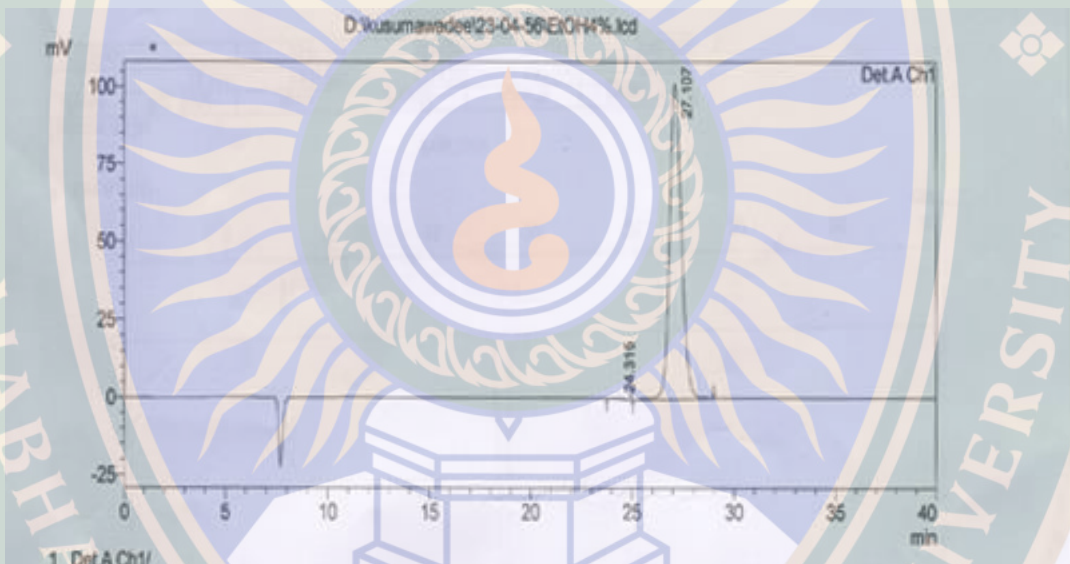
$$\text{กลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{Area} - 4202.9}{286658}$$

Area



ภาพที่ ข-2 กราฟมาตรฐานกลูโคสและสมการจากการวิเคราะห์ HPLC

1.2 สารมาตรฐานเอทานอลมี retention time ประมาณ 27.10 นาที



ภาพที่ ข-3 โครมาโตแกรมสารมาตรฐานเอทานอลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี HPLC

การหาปริมาณเอทานอลจากสารตัวอย่าง

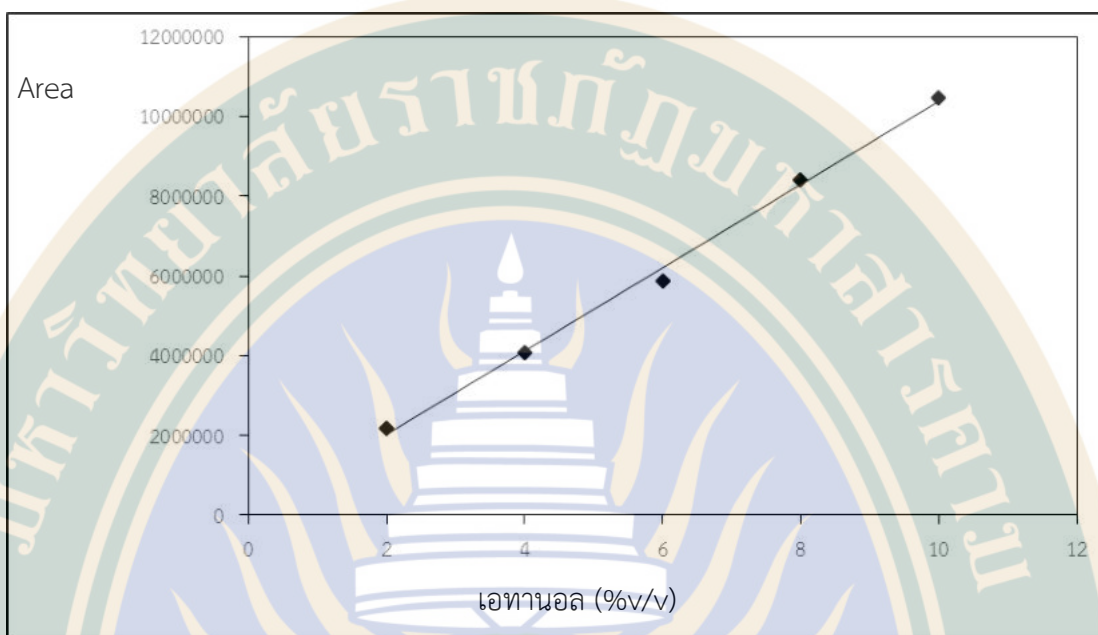
จากกราฟมาตรฐานของเอทานอลจะได้สมการ $y = 1000000x - 67069$

โดย y คือ พื้นที่ที่ retention time ประมาณ 27.10 นาที

x คือ ความเข้มข้นของเอทานอล (%v/v)

สามารถคำนวณหาปริมาณเอทานอลได้ดังนี้

$$\text{เอทานอล (\%v/v)} = \frac{\text{Area} + 67069}{1000000}$$



ภาพที่ ข-4 กราฟมาตรฐานเอทานอลและสมการจากการวิเคราะห์ HPLC

เปลี่ยนหน่วยจากร้อยละโดยปริมาตร (%v/v) เป็นกรัมต่อลิตร (g/L) ดังนี้

$$C = \frac{10Dx}{M}$$

โดย C คือ ความเข้มข้นของเอทานอล (mol/dm^3)

D คือ ความหนาแน่นของเอทานอล เท่ากับ 0.789 g/cm^3

x คือ ร้อยละโดยปริมาตร

M คือ มวลโมเลกุลเอทานอล เท่ากับ 46.07 g/mol

เปลี่ยนสมการให้หน่วยเป็นกรัมต่อลิตรได้ว่า

$$\text{ปริมาณเอทานอล (g/L)} = 10Dx$$



ภาคผนวก ค

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์





























ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์รหัส RBM16 กับฐานข้อมูลใน GenBank

>NG042623 *Saccharomyces cerevisiae* NRRL Y-12632^T 28S rRNA, partial sequence; from TYPE material

Sequence ID: [ref|NG_042623.1](#)|Length: 3284Number of Matches: 1

Range 1: 1 to 578[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1068 bits(578)	0.0()	578/578(100%)	0/578(0%)	Plus/Plus	
Query = RBM16					
Sbjct = NG042623 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> NRRL Y-12632 ^T = CBS 1171 ^T (Type strain)					
Query	1	AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT			60
Sbjct	1	AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT			60
Query	61	CTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTTGT			120
Sbjct	61	CTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTTGT			120
Query	121	CTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCCG			180
Sbjct	121	CTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCCG			180
Query	181	TTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGG			240
Sbjct	181	TTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGG			240
Query	241	TAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG			300
Sbjct	241	TAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG			300
Query	301	AAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTAAGGGAAG			360
Sbjct	301	AAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTTGTAAGGGAAG			360
Query	361	GGCATTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGC			420
Sbjct	361	GGCATTGATCAGACATGGTGTTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGC			420
Query	421	ATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCC			480
Sbjct	421	ATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCC			480
Query	481	TCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAG			540
Sbjct	481	TCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAG			540
Query	541	TCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCT			578
Sbjct	541	TCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCT			578

>KP768108 *Saccharomyces cerevisiae* isolate DEST5-D2-T4-3 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: [gb|KP768108.1](#)|Length: 924Number of Matches: 1

Range 1: 39 to 616[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1068 bits(578)	0.0()	578/578(100%)	0/578(0%)	Plus/Plus	
Query = RBM16					
Sbjct = KP768108 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> isolate DEST5-D2-T4-3					
Query	1	AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT			60
Sbjct	39	AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATTTGAAAT			98
Query	61	CTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTTGT			120
Sbjct	99	CTGGTACCTTCGGTGCCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTTGT			158
Query	121	CTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCCG			180
Sbjct	159	CTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCCG			218

Query 181 TTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGG 240
 |||||
 Sbjct 219 TTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGG 278

Query 241 TAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG 300
 |||||
 Sbjct 279 TAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG 338

Query 301 AAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG 360
 |||||
 Sbjct 339 AAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG 398

Query 361 GGCATTTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGC 420
 |||||
 Sbjct 399 GGCATTTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGC 458

Query 421 ATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCC 480
 |||||
 Sbjct 459 ATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCC 518

Query 481 TCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAG 540
 |||||
 Sbjct 519 TCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAG 578

Query 541 TCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCT 578
 |||||
 Sbjct 579 TCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCT 616

>KP768095 *Saccharomyces cerevisiae* isolate D4-1 26S ribosomal RNA gene, partial sequence

Sequence ID: gb|KP768095.1|Length: 762Number of Matches: 1

Related Information

Range 1: 8 to 585[GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1068 bits(578)	0.0()	578/578(100%)	0/578(0%)	Plus/Plus	

Query = RBM16

Sbjct = KP768095 *Saccharomyces cerevisiae* isolate D4-1

Query 1 AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTGAAAT 60
 |||||
 Sbjct 8 AAACCAACCGGGATTGCCTTAGTAACGCGAGTGAAGCGGCAAAGCTCAAATTGAAAT 67

Query 61 CTGGTACCTTCGGTGCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTTGT 120
 |||||
 Sbjct 68 CTGGTACCTTCGGTGCCGAGTTGTAATTTGGAGAGGGCAACTTTGGGGCCGTTCTTTGT 127

Query 121 CTATGTTCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCCG 180
 |||||
 Sbjct 128 CTATGTTCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTGTGGCGAGGAGTGCCG 187

Query 181 TTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGG 240
 |||||
 Sbjct 188 TTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGG 247

Query 241 TAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG 300
 |||||
 Sbjct 248 TAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGG 307

Query 301 AAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG 360
 |||||
 Sbjct 308 AAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG 367

Query 361 GGCATTTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGC 420
 |||||
 Sbjct 368 GGCATTTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGC 427

Query 421 ATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCC 480
 |||||
 Sbjct 428 ATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCC 487

Query 481 TCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAG 540
 |||||
 Sbjct 488 TCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAG 547

Query	181	TTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGG	240
Sbjct	463958	TTCTTTGTAAAGTGCCTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGG	463899
Query	241	TAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGG	300
Sbjct	463898	TAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAAGTACAGTGATGG	463839
Query	301	AAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG	360
Sbjct	463838	AAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGAGAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAG	463779
Query	361	GGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGC	420
Sbjct	463778	GGCATTGATCAGACATGGTGTGTTTGTGCCCTCTGCTCCTTGTGGGTAGGGGAATCTCGC	463719
Query	421	ATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCC	480
Sbjct	463718	ATTTCACTGGGCCAGCATCAGTTTTGGTGGCAGGATAAATCCATAGGAATGTAGCTTGCC	463659
Query	481	TCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAG	540
Sbjct	463658	TCGGTAAGTATTATAGCCTGTGGGAATACTGCCAGCTGGGACTGAGGACTGCGACGTAAG	463599
Query	541	TCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCT	578
Sbjct	463598	TCAAGGATGCTGGCATAATGGTTATATGCCGCCCGTCT	463561



ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์รหัส RBM17 กับฐานข้อมูลใน GenBank

>U76347 *Pichia kudriavzevii* CBS 5147^T 26S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length: 564 Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1042 bits(564)	0.0()	564/564(100%)	0/564(0%)	Plus/Plus	
Query = RBM17					
Sbjct = U76347 <i>Pichia kudriavzevii</i> CBS 5147^T (Type strain)					
Query	1	AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTGAAAT			60
Sbjct	1	AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTGAAAT			60
Query	61	CGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCA			120
Sbjct	61	CGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCA			120
Query	121	AGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAG			180
Sbjct	121	AGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAG			180
Query	181	TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTC			240
Sbjct	181	TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTC			240
Query	241	CATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG			300
Sbjct	241	CATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG			300
Query	301	AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATGTTGAAAGGGAAGGGTATTG			360
Sbjct	301	AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATGTTGAAAGGGAAGGGTATTG			360
Query	361	CGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGCGGGCTCTGGGCTTTCCCTG			420
Sbjct	361	CGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGCGGGCTCTGGGCTTTCCCTG			420
Query	421	GGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT			480
Sbjct	421	GGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT			480
Query	481	ATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCAGGGACCGAGGACTGCGGCGGTGTAGGTCACGGAT			540
Sbjct	481	ATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCAGGGACCGAGGACTGCGGCGGTGTAGGTCACGGAT			540
Query	541	GCTGGCAGAACGGCGCAACACCGC	564		
Sbjct	541	GCTGGCAGAACGGCGCAACACCGC	564		

>LC015298 *Pichia kudriavzevii* isolate: Y14_302, gene for 26S rRNA, partial sequence
Length: 582 Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1055 bits(571)	0.0()	571/571(100%)	0/571(0%)	Plus/Plus	
Query = RBM17					
Sbjct = LC015298 <i>Pichia kudriavzevii</i> isolate: Y14_302					
Query	1	AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTGAAAT			60
Sbjct	11	AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTGAAAT			70
Query	61	CGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCA			120
Sbjct	71	CGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCA			130
Query	121	AGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAG			180
Sbjct	131	AGTCCCTTGGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAG			190
Query	181	TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTC			240
Sbjct	191	TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTC			250

```

Query 241 CATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG 300
          |||
Sbjct 251 CATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG 310

Query 301 AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGAAGGGTATTG 360
          |||
Sbjct 311 AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGAAGGGTATTG 370

Query 361 CGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGGCTCTGGGCTTTCCTG 420
          |||
Sbjct 371 CGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGGCTCTGGGCTTTCCTG 430

Query 421 GGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT 480
          |||
Sbjct 431 GGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT 490

Query 481 ATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCAGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGAT 540
          |||
Sbjct 491 ATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCAGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGAT 550

Query 541 GCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCTCTT 571
          |||
Sbjct 551 GCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCTCTT 581

```

>LC015295 *Pichia kudriavzevii* isolate: Y14_190, gene for 26S rRNA, partial sequence
Length: 580 Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1055 bits(571)	0.0()	571/571(100%)	0/571(0%)	Plus/Plus	
Query = RBM17					
Sbjct = LC015295 <i>Pichia kudriavzevii</i> isolate: Y14_190					

```

Query 1 AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAAT 60
          |||
Sbjct 9 AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAAT 68

Query 61 CGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCA 120
          |||
Sbjct 69 CGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCA 128

Query 121 AGTCCCTTGGAACAGGGCGCCAGGAGGGTGAGAGCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAG 180
          |||
Sbjct 129 AGTCCCTTGGAACAGGGCGCCAGGAGGGTGAGAGCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAG 188

Query 181 TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTC 240
          |||
Sbjct 189 TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTC 248

Query 241 CATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG 300
          |||
Sbjct 249 CATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG 308

Query 301 AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGAAGGGTATTG 360
          |||
Sbjct 309 AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGAAGGGTATTG 368

Query 361 CGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGGCTCTGGGCTTTCCTG 420
          |||
Sbjct 369 CGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGGCTCTGGGCTTTCCTG 428

Query 421 GGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT 480
          |||
Sbjct 429 GGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT 488

Query 481 ATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCAGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGAT 540
          |||
Sbjct 489 ATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCAGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGAT 548

Query 541 GCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCTCTT 571
          |||
Sbjct 549 GCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCTCTT 579

```

>LC014798 *Pichia kudriavzevii* isolate: EF1, genes for ITS2, 26S rRNA, partial sequence
Length: 1465 Number of Matches: 1
Related Information
Range 1: 622 to 1192 [GenBankGraphics](#) Next Match Previous Match [First Match](#)

Alignment statistics for match #1

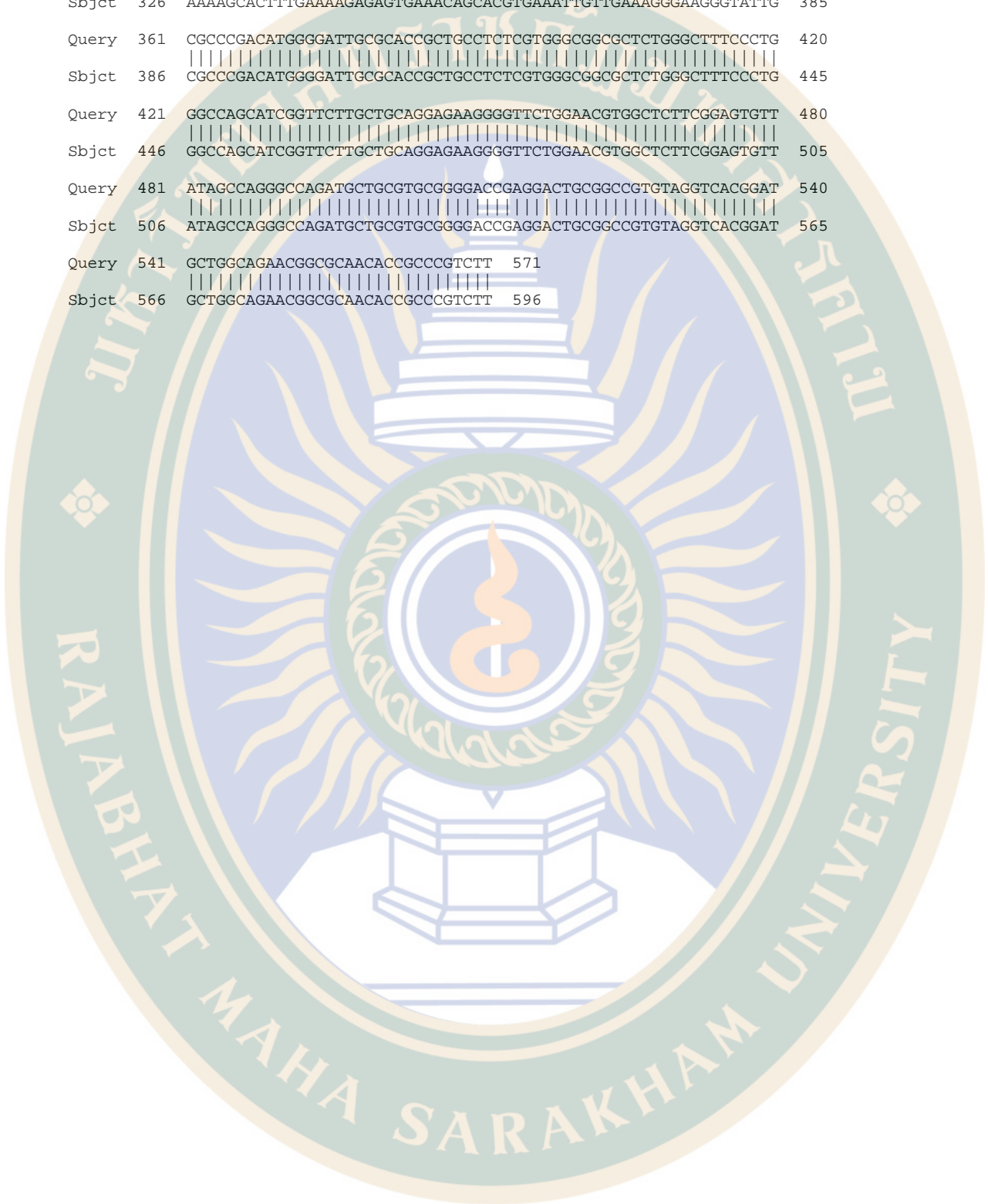
Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1055 bits(571)	0.0()	571/571(100%)	0/571(0%)	Plus/Plus	
Query = RBM17					
Sbjct = LC014798 <i>Pichia kudriavzevii</i> isolate: EF1					
Query	1	AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAAT			60
Sbjct	622	AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAAT			681
Query	61	CGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCA			120
Sbjct	682	CGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCA			741
Query	121	AGTCCCTTGGAACAGGGCGCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAG			180
Sbjct	742	AGTCCCTTGGAACAGGGCGCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAG			801
Query	181	TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTC			240
Sbjct	802	TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTC			861
Query	241	CATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG			300
Sbjct	862	CATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG			921
Query	301	AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTG			360
Sbjct	922	AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTG			981
Query	361	CGCCCCACATGGGGATTGCGCACCGCTGCTCTCGTGGCGCGCTCTGGGCTTTCCCTG			420
Sbjct	982	CGCCCCACATGGGGATTGCGCACCGCTGCTCTCGTGGCGCGCTCTGGGCTTTCCCTG			1041
Query	421	GGCCAGCATCGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT			480
Sbjct	1042	GGCCAGCATCGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT			1101
Query	481	ATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGAT			540
Sbjct	1102	ATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGAT			1161
Query	541	GCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCTCTT		571	
Sbjct	1162	GCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCTCTT		1192	

>KF811416 *Pichia kudriavzevii* strain 132/163/167/188wat 28S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length: 596 Number of Matches: 1

Alignment statistics for match #1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	Frame
1055 bits(571)	0.0()	571/571(100%)	0/571(0%)	Plus/Plus	
Query = RBM17					
Sbjct = KF811416 <i>Pichia kudriavzevii</i> strain 132/163/167/188wat					
Query	1	AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAAT			60
Sbjct	26	AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAAT			85
Query	61	CGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCA			120
Sbjct	86	CGTGCTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCA			145
Query	121	AGTCCCTTGGAACAGGGCGCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAG			180
Sbjct	146	AGTCCCTTGGAACAGGGCGCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAG			205
Query	181	TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTC			240
Sbjct	206	TGAGGCCCTTCTGACGAGTCGAGTTGTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTC			265

Query	241	CATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG	300
Sbjct	266	CATCTAAGGCTAAATACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATG	325
Query	301	AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGAAGGGTATTG	360
Sbjct	326	AAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGAAGGGTATTG	385
Query	361	CGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTCCCTG	420
Sbjct	386	CGCCCGACATGGGGATTGCGCACCGCTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTCCCTG	445
Query	421	GGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT	480
Sbjct	446	GGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGAGAAGGGGTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGT	505
Query	481	ATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGAT	540
Sbjct	506	ATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGGACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGAT	565
Query	541	GCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCTT	571
Sbjct	566	GCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCTT	596





มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

RAJABHAT MAHA SARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ง

การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

1. เรียกดูลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์จากฐานข้อมูล
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> โดยเลือก search : nucleotide และใส่ข้อมูลที่จะค้นหาเป็นชื่อทางวิทยาศาสตร์ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ตามด้วย AND cytochrome b เช่น “Homo sapiens AND cytochrome b”
2. หลังจากนั้นให้เลือก FASTA
3. หน้าจอจะแสดง nucleotide sequence ในรูปแบบ FASTA format ให้บันทึกไว้ในรูป (.text) โดยพิมพ์ชื่อ >”ชื่อ” แล้วลงมาอีกบรรทัด ใส่ nucleotide sequence และเมื่อจะใส่ชื่อของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นก็ให้เว้น 1 บรรทัดแล้วทำเช่นเดียวกัน
4. เปิดโปรแกรม BioEdit ซึ่งสามารถดาวน์โหลดได้จาก
<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>
5. เริ่ม alignment โดยเลือก File>New Alignment ที่แถบเมนู
6. หน้าต่างจะเปลี่ยนไป หลังจากนั้นเลือก File>Import>Sequence alignment file แล้วเปิดไฟล์ sequence ที่บันทึกไว้
7. Nucleotide sequence จะแสดงลงในช่องขวามือ ซึ่งตรงกับชื่อในช่องซ้ายมือ หลังจากนั้นเลือก Accessory Application>ClustalW Multiple Alignment
8. เมื่อหน้าต่างขึ้นมาให้กดปุ่ม RunClustalW แล้วโปรแกรมจะขึ้นหน้าต่าง Command ขึ้นมารอจนการ alignment เสร็จ
9. หลังจากนั้นเลือก Accessory Application>DNAmk DNA Maximum likelihood program with molecular clock จากนั้นกดปุ่ม Run Application โปรแกรมจะขึ้นหน้าต่าง Command ขึ้นมารอจนเสร็จ
10. กดย่อหน้าต่างย่อยลงไปจะพบอีกหน้าต่างที่แสดง Phylogenetic tree
11. Copy Phylogenetic tree วางลงในโปรแกรม word แล้วพิมพ์รายชื่อสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด ที่แสดงค่าเปอร์เซ็นต์ความเหมือน (% similarity) ในแต่ละกิ่งก้านของ Phylogenetic tree