

การคัดกรองยีสต์ทนร้อนเพื่อการผลิตเอทานอลชีวภาพ



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย  
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
กันยายน 2559

# การคัดกรองยีสต์ทนร้อนเพื่อการผลิตเอทานอลชีวภาพ

เพชร สัตยวรรณ

วิทยานิพนธ์นี้เสนอต่อมหาวิทยาลัยเชียงใหม่เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright © by Chiang Mai University  
All rights reserved

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

กันยายน 2559

## การคัดกรองยีสต์ทนร้อนเพื่อการผลิตเอทานอลชีวภาพ

พชร สัตยวรรธน

วิทยานิพนธ์นี้ได้รับการพิจารณาอนุมัติให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร  
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์

คณะกรรมการสอบ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ ..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร. สิทธิสิน บวรสมบัติ) (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สกุนณี บวรสมบัติ)

..... กรรมการ ..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สกุนณี บวรสมบัติ) (อาจารย์ ดร. เนตรชนก รอดรัมย์)

..... กรรมการ ..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(อาจารย์ ดร. เนตรชนก รอดรัมย์) (ดร. ธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ)

..... กรรมการ  
(ดร.ธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ)

5 กันยายน 2559

© ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเชียงใหม่



แต่  
ผู้เป็นแรงบันดาลใจ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบคุณท่านอาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์. ดร. สกุนณี บวรสมบัติ เป็นอย่างสูงที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะแนวทาง ช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ ตลอดทั้งตรวจแก้วิทยานิพนธ์ให้ถูกต้อง จนข้าพเจ้าสามารถทำงานสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี และอาจารย์ ดร. เนตรชนก รอดศรีศรี และ ดร. ธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่คอยชี้แนะแนวทางอันเป็นประโยชน์ตลอดมา

ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สิทธิสิน บวรสมบัติ ที่กรุณาร่วมเป็นกรรมการตรวจสอบ และแก้ไข งานวิจัยนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ Assistant Professor Dr. David Hodge ที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางงานวิจัย และความรู้อันเป็นประโยชน์อย่างสูง รวมทั้งคอยช่วยเหลือในเรื่องต่างๆ

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ในห้องปฏิบัติการของ Assistant Professor Dr. David Hodge, Faculty of Engineering, Michigan State University ประเทศสหรัฐอเมริกาและห้องปฏิบัติการ SCB2806

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อำนวยความสะดวกด้านสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ โครงการพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.) ที่สนับสนุนเงินทุนในการศึกษาครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อคุณแม่และครอบครัว ที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนทางการศึกษาและในทุกๆ ด้านด้วยดีเสมอมา

พชร สัตยวรรธน

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดกรองยีสต์ทนร้อนเพื่อการผลิตเอทานอลชีวภาพ	
ผู้เขียน	นางสาวเพชร ลัตยวรรธน์	
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยาประยุกต์)	
คณะกรรมการที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สกุนณี บวรสมบัติ อาจารย์ ดร. เนตรชนก รอดศรีศรี ดร. ธิดารัตน์ นิ่มเชื้อ	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

### บทคัดย่อ

การใช้เอทานอลเพื่อเป็นพลังงานชีวภาพเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั่วโลก กระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพที่อุณหภูมิสูงถือว่ามีค่าสำคัญ เนื่องจากสามารถลดค่าใช้จ่ายที่ใช้ในการรักษาอุณหภูมิขณะหมักจากการใช้ระบบหล่อเย็นและช่วยลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นในระบบ แต่ยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลในปัจจุบันไม่สามารถทนความร้อนได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดกรองหาเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอล และสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ดังกล่าว โดยพบว่า สามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40°C จากตัวอย่างผลไม้ ดิน ลูกแป้ง น้ำหมัก และขยะเปลือกผลไม้และเศษใบไม้หมัก ได้จำนวน 55 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกเชื้อ 12 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่อุณหภูมิ 40°C และมีลักษณะทางสัณฐานที่หลากหลายนแตกต่างกันในกลุ่มตัวอย่างเดียวกัน มาทำการศึกษาลักษณะสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก โดยพบว่ายีสต์ 11 ไอโซเลทมีการผลิตฟองแก๊สมากและมีการสร้างฝ้าขาว แต่มีเพียง 1 ไอโซเลทที่เกิดการจับกลุ่มในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 40 และ 42°C คือ LP3 นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูง และอาหารที่มีความเข้มข้นของเอทานอลต่างๆกัน โดยวิธี Spot test พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีที่ 42°C และเชื้อ 11 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสสูงถึง 30% (w/v) อีกทั้งเชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีเอทานอล 10% (v/v) จากนั้นคัดเลือกเชื้อ 3 ไอโซเลท คือ LP3, LC2 และ OW1/1 มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเปรียบเทียบกับเชื้อควบคุม *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red (ER) พบว่าเชื้อ LC2, LP3 , OW1/1 และ ER

สามารถผลิตเอทานอลได้ 1.5, 2 , 1.67 และ 2.5% ตามลำดับ จากนั้นทำการคัดเลือกเชื้อ 2 ไอโซเลทคือ LP3 และ OW1/1 ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงมาทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลที่ 40 และ 42°C เปรียบเทียบกับเชื้อ ER พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอทานอลสูงสุดจากน้ำตาลกลูโคส 12% ได้เท่ากับ 49.3, 53.2 และ 52.0 g/L ที่ 40°C ตามลำดับ และ 36.4, 37.1 และ 26.0 g/L ที่ 42°C ตามลำดับ และพบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทสามารถผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาลกลูโคสและแมนโนส แต่ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาลกาแลคโตส ไซโลส และซูโครส จากนั้นศึกษาการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทและเชื้อควบคุมโดยการคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific Growth Rate) เมื่อบ่มที่ 30, 40 และ 42°C พบว่าเชื้อ LP3 มีค่าที่สามารถคำนวณได้สูงที่สุดจากทั้ง 3 อุณหภูมิ และคัดเลือกเชื้อ 1 ไอโซเลทคือ OW1/1 เนื่องจากสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด ทำการเลี้ยงเชื้อร่วมกับ ER โดยพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ ER เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเติมเชื้อ OW1/1 ให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงที่สุดที่ 71.1 g/L นำเชื้อ OW1/1 มาศึกษาความสามารถในการหมักในถังหมักขนาด 8 ลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ลิตร เปรียบเทียบกับเชื้อ ER พบว่าเชื้อ OW1/1 และ ER สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้ 3.4 และ 6.2% ตามลำดับ โดยผลการระบุเชื้อพบว่า เชื้อ LP3 สามารถระบุชนิดได้เป็น *Candida glabrata* ที่ความเหมือน 99.0% และเชื้อ OW1/1 สามารถระบุชนิดของเชื้อได้คือ *Pichia kudriavzevii* ที่ความเหมือน 100%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

<b>Thesis Title</b>	Screening of Thermotolerant Yeasts for Bioethanol Production	
<b>Author</b>	Miss Pachara Sattayawat	
<b>Degree</b>	Master of Science (Applied Microbiology)	
<b>Advisory Committee</b>	Asst. Prof. Dr. Sakunnee Bovonsombut	Advisor
	Lect. Dr. Nadchanok Rodrussamee	Co-advisor
	Dr. Thidarat Nimchua	Co-advisor

## ABSTRACT

The interest in bioethanol is increasing rapidly due to its several advantages as bio-fuel. The ethanol production at high temperature is very impressive since the process could reduce the cost of cooling system and contaminations during fermentation. The aims of this study are to screen thermotolerant yeasts that could produce ethanol at high temperature as well as to identify and study the optimal conditions for ethanol production of the isolated yeast strains. Fifty-five thermotolerant yeasts were isolated from 15 samples of fruit, soil, loog-pang, fermented fruit juice and organic waste. All of the isolates were tested for their ability to produce ethanol at 40°C and 12 isolates were selected for further study. Most of 12 isolates exhibit high level of foam and biofilm on surface of media, however, only one of them showed flocculation. Spot test on YPD agar indicated that most of the isolates could grow at 42°C, tolerate up to 30% (w/v) of glucose and could still grow on YPD agar with 10% (v/v) ethanol. LP3, LC2 and OW1/1 were selected for the next step based on desirable characteristics. All three isolates showed to produce low ethanol from molasses media when compared with *Saccharomyces cerevisiae*; Ethanol Red (ER) and LC2 produced the lowest ethanol yield. LP3 and OW1/1 were studied further, the ethanol production at 40°C in YPD broth with 12% glucose compared with ER showed 49.3, 53.2 and 52.0 g/L of ethanol, respectively for LP3, OW1/1 and ER, in contrast, the result at 42°C showed LP3 and OW1/1 could produce ethanol higher than ER at 36.4, 37.1 and 26.0 g/L, respectively. LP3 and OW1/1 could produce ethanol from glucose and mannose. Specific growth rates were calculated from LP3, OW1/1 and ER when

culturing at 30, 40 and 42°C, it was found that LP3 showed the highest growth rate among the three of them in every temperature tested. Co-culture fermentation of OW1/1 and ER indicated that the treatment that ER was inoculated before OW1/1 for 24 hours showed the highest ethanol produced. Moreover, OW1/1 produced 3.4% of ethanol, in contrast of ER which could produce 6.2% of ethanol when incubated in 8-litre fermenter with 5-litre working volume. Finally, LP3 and OW1/1 were identified as *Candida glabrata* with 99.0% identity and *Pichia kudriavzevii* with 100% identity, respectively.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

# สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ง
บทคัดย่อภาษาไทย	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ช
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฐ
รายการสัญลักษณ์	ฑ
บทที่ 1 บทนำและวัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	3
2.1 เอทานอลชีวภาพ	3
2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	4
2.3 ยีสต์และการคัดเลือกยีสต์เพื่อนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ	6
2.4 การระบุชนิดของเชื้อยีสต์	11
2.5 การศึกษายีสต์ทนร้อนในการหมักเอทานอล	12
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	13
3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ	13
3.2 สารเคมี	13
3.3 วัสดุอุปกรณ์	13
3.4 เครื่องมือ	14
3.5 วิธีการวิจัย	14

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	21
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย	45
บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย	51
เอกสารอ้างอิง	54
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	63
ภาคผนวก ข สารเคมี	65
ภาคผนวก ค ตารางผลการทดลอง	66
ประวัติผู้เขียน	79

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติของเอทานอล	3
ตารางที่ 4.1 ไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่างต่างๆ	21
ตารางที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง YPD ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	22
ตารางที่ 4.3 ปริมาณเอทานอลที่วัดได้จาก Ebuillometer ของเชื้อ 55 ไอโซเลท	25
ตารางที่ 4.4 คุณสมบัติบางประการของเชื้อที่คัดเลือก เปรียบเทียบกับเชื้อควบคุม ER	26
ตารางที่ 4.5 ค่าพารามิเตอร์ที่สามารถคำนวณได้ ที่ 40°C	35
ตารางที่ 4.6 ค่าพารามิเตอร์ที่สามารถคำนวณได้ 42°C	37
ตารางที่ 4.7 ค่าพารามิเตอร์ที่สามารถคำนวณได้จากอาหารน้ำตาลกลูโคสและ แมนโนส	39
ตารางที่ 4.8 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 42°C	39
ตารางที่ 4.9 ค่าพารามิเตอร์ที่สามารถคำนวณได้ จากการศึกษาการเลี้ยงเชื้อร่วม	43
ตารางที่ 4.10 แสดงผลการระบุเชื้อ	44
ตารางที่ 7.1 จำนวนเชื้อยีสต์ ปริมาณน้ำตาล และปริมาณเอทานอลในอาหารเหลวจากน้ำตาล	66
ตารางที่ 7.2 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล ที่ 40°C	67
ตารางที่ 7.3 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล ที่ 42°C	68
ตารางที่ 7.4 ค่าที่ได้จากการคำนวณประสิทธิภาพในการหมักของเชื้อที่ 40 และ 42°C	69
ตารางที่ 7.5 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล ในอาหารเหลว YP ที่มีน้ำตาลต่างชนิดกัน	69
ตารางที่ 7.6 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 30°C	72

## สารบัญตาราง (ต่อ)

	หน้า
ตารางที่ 7.7 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 40°C	72
ตารางที่ 7.8 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 42°C	73
ตารางที่ 7.9 ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 30°C	73
ตารางที่ 7.10 ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 40°C	75
ตารางที่ 7.11 ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 42°C	76
ตารางที่ 7.12 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล ในการเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดร่วมกัน	77
ตารางที่ 7.13 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณน้ำตาล และปริมาณเอทานอล ในการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร	78

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1 เอนไซม์และสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลจากกลูโคส	9
ภาพที่ 4.1 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 40 และ 42°C โดยวิธี Spot test	28
ภาพที่ 4.2 ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง YP ที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 และ 20% โดยวิธี Spot test	29
ภาพที่ 4.3 ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง YP ที่มีน้ำตาล 30% โดยวิธี Spot test	30
ภาพที่ 4.4 ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่มีเอทานอล 5 และ 10% โดยวิธี Spot test	31
ภาพที่ 4.5 ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่มีเอทานอล 12 และ 15% โดยวิธี Spot test	32
ภาพที่ 4.6 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารกากน้ำตาล ที่ 40°C	33
ภาพที่ 4.7 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 12% ที่ 40°C	34
ภาพที่ 4.8 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 12% ที่ 42°C	36
ภาพที่ 4.9 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YP ของน้ำตาลต่างชนิดกัน ที่ 40°C	37
ภาพที่ 4.10 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ LP3, OW1/1 และ ER ในอาหารเหลว YPD ที่ 30, 40 และ 42°C	40
ภาพที่ 4.11 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาล กลูโคส 20% ที่ 40°C เมื่อเลี้ยงร่วมกับเชื้อควบคุม	42
ภาพที่ 4.12 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาล กลูโคส 20% ในถังหมักขนาด 5 ลิตร	43

## รายการสัญลักษณ์

CFU/ml	Colony Forming Units per millitre
cm	เซนติเมตร
ml	มิลลิลิตร
$\mu$ l	ไมโครลิตร
OD	Optical Density
nm	นาโนเมตร
g/L	กรัมต่อลิตร
$^{\circ}$ C	องศาเซลเซียส
rpm	รอบต่อนาที
W/V	น้ำหนักต่อปริมาตร
V/V	ปริมาตรต่อปริมาตร
%	เปอร์เซ็นต์
TSS	Total Soluble Solid

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

# บทที่ 1

## บทนำและวัตถุประสงค์

เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนที่มีการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วทั่วโลก (Badger, 2002) เนื่องจากปัญหาการขาดแคลนพลังงานเชื้อเพลิงปิโตรเลียม ภาวะมลพิษและการสะสมตัวของคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศ ในขณะที่การเผาไหม้เอทานอลจะมีการปล่อยแก๊สเรือนกระจกในปริมาณน้อย (Prasad *et al.*, 2007) การผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิงในประเทศไทย จะใช้วัตถุดิบจากกากน้ำตาลและมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่หาง่าย ราคาถูก ที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลสูง โดยเอทานอลบริสุทธิ์ที่ผลิตได้จะถูกนำไปผสมกับน้ำมันเบนซินที่อัตราส่วนต่างกันเป็นน้ำมันแก๊สโซฮอล์ (Rakin *et al.*, 2009; Tanimura *et al.*, 2012)

ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วง 25-30°C และสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง (Lin and Tanaka, 2006) อย่างไรก็ตามในกระบวนการหมักจะมีความร้อนเกิดขึ้นในถังหมัก อีกทั้งสภาพอากาศของประเทศในเขตร้อน เช่น ประเทศไทย จะมีอุณหภูมิสูงในตอนกลางวัน อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 40°C (Hacking *et al.*, 1984) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิตลอดการหมักให้อยู่ในช่วง 30-35°C ซึ่งเป็นช่วงที่ยีสต์สามารถเจริญและทำงานได้ดี ทำให้มีค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้ในการรักษาอุณหภูมิลดลงโดยระบบหล่อเย็น (cooling) ดังนั้นยีสต์ที่นำมาใช้ผลิตเอทานอลจึงควรมีคุณสมบัติที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีในช่วงอุณหภูมิสูง (Limtong *et al.*, 2007) การค้นหายีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่มีประสิทธิภาพในการเจริญและหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่สามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการหมักจากการใช้ระบบหล่อเย็น และยังสามารถช่วยลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ที่จะเข้ามาในระบบ รวมถึงช่วยเพิ่มผลผลิตเอทานอลในระบบการหมักที่อุณหภูมิสูงได้

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าจะมียีสต์เพียงไม่กี่ชนิดที่มีความสามารถในการหมักและเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40°C แต่มีการรายงานว่า พบยีสต์ที่มีความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงถึง 45-52°C และผลิตเอทานอลที่ 45-50°C ได้ คือ *Kluyveromyces marxianus* IMB1, IMB2, IMB3, IMB4 และ IMB5 (Banat *et al.*, 1992) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีจุดประสงค์ในการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มี

ความสามารถในการเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 40°C เพื่อนำไปใช้และพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลในสภาวะอุณหภูมิที่สูงและเหมาะสมกับสภาพภูมิอากาศของประเทศในเขตร้อน รวมทั้งในประเทศไทย อีกทั้งศึกษาสภาวะการเจริญของเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากเชื้อดังกล่าวในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

### วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกหา yeast ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงมากกว่าหรือเท่ากับ 40°C ได้
2. เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวโมเลกุล รวมไปถึงการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ yeast ที่คัดเลือกได้
3. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงอย่างน้อย 40°C ด้วย yeast ที่คัดเลือกได้



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## บทที่ 2

### ทบทวนเอกสาร

#### 2.1 เอทานอลชีวภาพ

##### 2.1.1 ความสำคัญและคุณสมบัติของเอทานอลชีวภาพ

เอทานอลชีวภาพเป็นค่าที่ใช้กล่าวถึงเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ที่ผลิตขึ้นโดยการหมักของจุลินทรีย์ (microbial fermentation) ซึ่งแตกต่างกับแอลกอฮอล์ที่ผลิตขึ้นโดยวิธีเคมี (chemical synthesis) ซึ่งเกิดจากกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ของเอทิลีนโดยวิธีการผลิตเอทานอลทางเคมีคิดเป็นร้อยละ 5 ของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลกเท่านั้น เอทานอลชีวภาพ (ตาราง 2.1) ถูกนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพในการคมนาคมขนส่งอย่างแพร่หลาย โดยในการผลิตจะผ่านขั้นตอนการหมักน้ำตาลที่ได้จากวัตถุดิบตั้งต้น (feedstock) จากนั้นทำการกลั่นเอทานอลให้อยู่ในรูปของเหลวที่มีความบริสุทธิ์สูง และนำไปใช้ในการเผาไหม้เพื่อผลิตเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์ต่างๆ ซึ่งสามารถใช้ได้โดยตรงหรือนำไปผสมกับเชื้อเพลิงชนิดอื่นๆ ได้ (Ballesteros *et al.*, 2004; Walker, 2011)

ตาราง 2.1 คุณสมบัติของเอทานอล

Parameter	คุณสมบัติ
สูตรโมเลกุล (Molecular formula)	$C_2H_5OH$
มวลโมเลกุล (Molecular mass)	46.07 g/mol
ลักษณะภายนอก (Appearance)	ของเหลวไม่มีสี (ที่อุณหภูมิ $-117^{\circ}C$ - $-78^{\circ}C$ )
การละลายน้ำ (Water solubility)	ละลายได้ดี
ความหนาแน่น (Density)	0.789 kg/L
จุดเดือด (Boiling temperature)	$78.5^{\circ}C$ ( $173^{\circ}F$ )
จุดเยือกแข็ง (Freezing point)	$-117^{\circ}C$
จุดวาบไฟ (Flash point)	$12.8^{\circ}C$
จุดติดไฟ (Ignition temperature)	$425^{\circ}C$
Explosion limit	ขั้นต่ำ 3.5% (v/v) ขึ้นสูง 19% (v/v)

ตาราง 2.1 (ต่อ)

Parameter	คุณสมบัติ
ความดันไอ (Vapor pressure)	50 mmHg
ความร้อนจำเพาะ (Specific heat)	Kcal/Kg 60°C
ความเป็นกรด (Acidity; pKa)	15.9
ความหนืด (Viscosity)	1.200 mPa s (20°C)
Refractive index	1.36 ที่ 25°C
เลขออกเทน (Octane number)	99

มีการรายงานว่า การเผาไหม้ของเอทานอลชีวภาพปริมาณ 18.5 ลิตร สามารถลดการปลดปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) ได้เทียบเท่ากับการปลดปล่อยแก๊สจากรถยนต์ถึง 1.2 ลิตร ซึ่งการขนส่งบนท้องถนนในปัจจุบันปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจกถึง 20% ของปริมาณแก๊สทั้งหมด การใช้เชื้อเพลิงจากเอทานอลชีวภาพมีความยั่งยืนและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมสูง เมื่อเทียบกับการใช้พลังงานจากฟอสซิลซึ่งมีการปลดปล่อยแก๊สเรือนกระจก โดยเฉพาะแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) มาก เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของภาวะบรรยากาศโลก (Walker, 2011)

ในปัจจุบันนี้เอทานอลชีวภาพได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากพลังงานเชื้อเพลิงจากฟอสซิลถูกใช้หมดไปเรื่อยๆอย่างรวดเร็วและยังส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทำให้พลังงานจากเอทานอลจัดเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความสนใจมากขึ้น จนนำไปสู่การเพิ่มขึ้นของการผลิตเอทานอลทั่วโลก (Bai *et al.*, 2008)

## 2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

ชีวมวลหรือ biomass เป็นวัตถุดิบที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตพลังงานมากถึง 10% ของพลังงานที่มีการใช้ในปัจจุบันทั้งหมด ทั้งนี้เชื้อเพลิงชีวภาพได้รับความสนใจมากในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา (Eisentraut, 2010) โดยสามารถแบ่งการผลิตเชื้อเพลิงจากเอทานอลเป็นช่วงๆคือ การผลิตเอทานอลในช่วงแรก (first-generation bioethanol) นิยมใช้การหมักน้ำตาลที่ได้จากวัตถุดิบจากการเกษตร โดยเฉพาะกลุ่มข้าวโพดและอ้อย (Argueso *et al.*, 2009) ในการผลิตเอทานอลในช่วงที่สอง (second-generation bioethanol) จะใช้วัตถุดิบที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งเป็นการเพิ่มมูลค่าของวัสดุดังกล่าวให้แก่เกษตรกร (Eisentraut, 2010)

## 2.2.1 วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลได้โดยตรง

### 1) อ้อย

อ้อย เป็นพืชวัตถุดิบหลักที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ไม่ว่าจะเป็นในรูปแบบของน้ำอ้อย (sugar cane juice) หรือกากน้ำตาล (molasses) ทั้งนี้ 79% ของการผลิตเอทานอลในประเทศบราซิลจากน้ำอ้อย และนอกจากนั้นเป็นการใช้วัตถุดิบจากกากน้ำตาล (Sanchez and Cardona, 2008)

### 2) กากน้ำตาล

กากน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลในขั้นตอนการ repeat crystallization ซึ่งวัตถุดิบตั้งต้นที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล เนื่องจากกากน้ำตาลมีคาร์โบไฮเดรต หรือน้ำตาลอยู่ในรูปที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ผลิตเอทานอลได้ทันทีโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ pretreatment โดย 75% ของกากน้ำตาลในโลกมาจากอ้อยที่มีการปลูกกันมากในประเทศเขตร้อน เอเชียหรืออเมริกาใต้ ในขณะที่การผลิตเอทานอลอีก 25% ที่เหลือมาจากผักกาดฝรั่ง (sugar beet) ที่มีการปลูกกันมากในประเทศเขตอบอุ่น ยุโรปและอเมริกาเหนือ (Abubaker *et al.*, 2012; Mukhtar *et al.*, 2010) กากน้ำตาลที่ผลิตได้จากโรงงานผลิตน้ำตาลจากอ้อย (cane molasses) ประกอบด้วยน้ำตาล ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส โดยจะมีน้ำตาลรวมทั้งหมดไม่น้อยกว่า 46% ในขณะที่กากน้ำตาลที่ได้จากผักกาดฝรั่ง (beet molasses) จะมีน้ำตาลราฟิโนสเพิ่มเติมอยู่ด้วย ซึ่งน้ำตาลราฟิโนสจัดเป็น ไตรแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคสและกาแลกโตส และมีน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลไม่น้อยกว่า 48% (Abe *et al.*, 2012; Curtin 1983) นอกจากนี้ในประเทศบราซิลมีการนำน้ำอ้อยและกากน้ำตาลมาผสมกันในอัตราส่วนต่างๆเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล โดยสามารถผลิตเอทานอลได้ 8-11% (v/v) ภายในเวลา 6-11 ชั่วโมง ที่ 32-35°C หลังจากการหมักเสร็จสิ้นแล้ว ยีสต์จะถูกเก็บเพื่อนำมาใช้ใหม่ (recycle) โดยการปั่นเหวี่ยง จากนั้นล้างด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจาง pH 2.0-2.5 เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง เพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรีย และนำเซลล์ไปล้างในถังหมักอีกครั้งเพื่อเริ่มกระบวนการหมักต่อไป ซึ่งในช่วงฤดูการผลิตเอทานอลจะมีการเก็บเซลล์เพื่อนำมาใช้ใหม่ 2 ครั้งต่อวัน ตลอด 200-250 วันต่อปี (Wheals *et al.*, 1999)

## 2.2.2 วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลที่ต้องมีกระบวนการอื่นเข้ามาช่วย

วัตถุดิบเหล่านี้ได้แก่วัตถุดิบที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบมาก เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง

### 1) มันสำปะหลัง

มันสำปะหลังถูกจัดเป็นพืชอุตสาหกรรมในประเทศไทย เนื่องจากมันสำปะหลังเป็นพืชที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดินที่ไม่อุดมสมบูรณ์ และให้ผลผลิตมากต่อพื้นที่ ทำให้ต้นทุนการผลิต

น้อยเมื่อเทียบกับพืชชนิดอื่นๆ ทนแล้งได้ดี และเจริญได้ในดินที่มีสภาพเป็นกรด ดังนั้นในประเทศไทยจึงมีการใช้มันสำปะหลังในการผลิตเอทานอลชีวภาพ (Kaewkrajay *et al.*, 2014)

## 2) ข้าวโพด

การผลิตเอทานอลในประเทศสหรัฐอเมริกาเกือบทั้งหมดใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบตั้งต้น เนื่องจากข้าวโพดเป็นพืชที่อุดมไปด้วยคาร์โบไฮเดรต จึงเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตแป้งข้าวโพด ทั้งนี้ประมาณ 70-72% ของแกนข้าวโพดเป็นสารกลุ่มคาร์โบไฮเดรตที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ โดยข้าวโพดจะถูกนำไปบดเพื่อให้ได้แป้งข้าวโพด จากนั้นทำการเปลี่ยนแป้งข้าวโพดเป็นน้ำตาล ซึ่งมักจะอาศัยเอนไซม์ และนำไปผลิตเอทานอลชีวภาพต่อไป (Bothast and Schlicher, 2005; Sanchez and Cardona, 2008)

## 3) วัสดุคอกโนเซลลูโลส

ตัวอย่างของวัสดุในกลุ่มนี้ เช่น ช้างข้าวโพด เส้นใยข้าวโพด ชานอ้อย หรือฟางข้าว ซึ่งจัดเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีราคาถูก ในประเทศญี่ปุ่น พบว่า 75% ของฟางข้าวจัดเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่ไม่มีการนำไปใช้ต่ออย่างมีประสิทธิภาพ จึงเป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่มีปริมาณมากและสามารถนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลได้ (Tanimura *et al.*, 2012)

## 2.3 ยีสต์และการคัดเลือกยีสต์เพื่อนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ

ยีสต์ จัดเป็นฟังไจ (Fungi) ที่เป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) มีลักษณะรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาว เป็นต้น มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ (budding) พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น ในดิน ในน้ำ หรือส่วนต่างๆของพืช แต่แหล่งที่พบยีสต์ได้บ่อย คือแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น ผลไม้ที่มีรสหวาน ปัจจุบันยีสต์ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเมทาบอลิซึมของยีสต์ เช่น เอนไซม์ วิตามิน แคลโรทีนอยด์ กรดซิตริก และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) เป็นต้น รวมทั้งในอุตสาหกรรมอาหารหลายประเภท อย่างไรก็ตามยีสต์จัดเป็นสาเหตุหนึ่งในการทำให้อาหารบางชนิดเน่าเสียด้วย (Kurtzman *et al.*, 2010)

ยีสต์ทนร้อน (thermotolerant yeast) คือ ยีสต์ที่มีอุณหภูมิในการเจริญได้ดีที่สุด (optimum temperature) ตั้งแต่ 40°C ขึ้นไป ในกรณีของ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถเจริญได้ในช่วง 35-41°C (Koedrich *et al.*, 2008) ทั้งนี้ในโรงงานที่ใช้วัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตเอทานอลเป็นกากน้ำตาล โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อนมักพบปัญหาในการผลิตเอทานอล *S. cerevisiae* ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ที่มีอุณหภูมิในการเจริญในช่วง 32°C±2 เมื่ออุณหภูมิการหมักสูงขึ้นจะทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลง โดยเฉพาะเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40°C (Mukhtar *et al.*, 2010)

### 2.3.1 กลุ่ม Saccharomyces

ยีสต์ในกลุ่ม Saccharomyces โดยเฉพาะ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีการนำมาใช้มากที่สุด ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล โดยจัดเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่มีความทนต่อเอทานอลสูงเมื่อเทียบกับแบคทีเรีย (Oslo and Hahn-Hagerdal, 1996) นอกจากนี้ *S. cerevisiae* ยังมีความสามารถในการหมักน้ำตาล 6 คาร์บอน (hexose sugar) ได้ดี โดยสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสที่ได้จากอ้อย รวมทั้งสามารถใช้ฟรุกโตสได้ ทนกรดและทนต่อสภาวะอื่นๆ ที่มักเกิดขึ้นในกระบวนการหมักได้ดี และมีประสิทธิภาพในการหมักสูง ง่ายต่อการเก็บรักษาและขนส่ง โดยเฉพาะในระดับการค้า (commercial scale) รวมถึงยังมีข้อมูลทั้งในด้านสรีรวิทยา อนุพันธุศาสตร์และพันธุศาสตร์ต่างๆ จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่างๆ ได้ง่าย (Demeke *et al.*, 2013)

*S. cerevisiae* ทนร้อน สามารถผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพที่อุณหภูมิสูง ถือว่าเป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่เป็นที่ต้องการ โดยเฉพาะในประเทศเขตร้อน

อย่างไรก็ตาม แม้จะมีการศึกษาในแง่กระบวนการผลิตเอทานอลจาก *S. cerevisiae* กันอย่างแพร่หลายแต่ยังพบว่า ความเข้าใจในวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) เป็นองค์ความรู้ที่สำคัญที่จะช่วยพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลได้ โดยในยีสต์จะใช้วิถี glycolysis (Embden-Meyerhof-Parnas หรือ EMP pathway) ในการผลิตเอทานอลที่เริ่มจากการเปลี่ยน 1 โมเลกุลของกลูโคสให้เป็น 2 โมเลกุลของไพรูเวต (ภาพ 2.1) (Madigan *et al.*, 2000)

นอกจากนี้ประโยชน์ของการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่มีการใช้กันโดยทั่วไป จะสามารถลดค่าใช้จ่ายในการรักษาอุณหภูมิ โดยเฉพาะในระดับการผลิตใหญ่ (large scale) ลดอัตราการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ อีกทั้งยังเพิ่มอัตราการใช้น้ำตาลและผลิตเอทานอลของยีสต์ (Mukhtar *et al.*, 2010)

Ethanol Red เป็นยีสต์ *S. cerevisiae* ทางการค้าที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรมจากบริษัท Fermentis ประเทศฝรั่งเศส โดย Ethanol Red ใช้ผลิตเอทานอลชีวภาพที่อุณหภูมิสูง นิยมใช้ในประเทศแถบอเมริกาเหนือและยุโรป โดยวิธีการผลิตเอทานอลที่เหมาะสมแก่การใช้ Ethanol Red ในการผลิตมากที่สุด คือการหมักแบบ Very High Gravity (VHG) เนื่องจากเป็นเชื้อที่สามารถทนต่อเอทานอลในปริมาณสูงได้ดี ใช้เวลาในการหมักน้อยแต่ได้ปริมาณเอทานอลมาก และสามารถคงความมีชีวิตอยู่ของเซลล์ได้หลังจากการหมัก เพื่อสามารถนำเซลล์ไปใช้ในการหมักแบบต่อเนื่องได้ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของ Ethanol Red จะอยู่ในช่วง 30-40°C ในขณะที่ประเทศบราซิลจะใช้ยีสต์สายพันธุ์ PE-2 และประเทศญี่ปุ่นใช้ยีสต์สายพันธุ์ Kyokai No. 7 ในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง (Felix *et al.*, 2014; Fermentis Product sheet, 2016)

การทดสอบความสามารถในการทนต่อความดันออสโมติกของเชื้อ Ethanol Red ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่างกัน พบว่าสามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้อัตราการเจริญเติบโตในระดับเดียวกับในสภาวะปกติ อย่างไรก็ตาม พบว่าเชื้อสายพันธุ์ Ethanol Red ไม่สามารถใช้และหมักน้ำตาล 5 คาร์บอน (pentose) ที่มักพบเจือจางอยู่ใน pretreated hydrolysate ให้เกิดเป็นเอทานอลได้ (Groves, 2009)

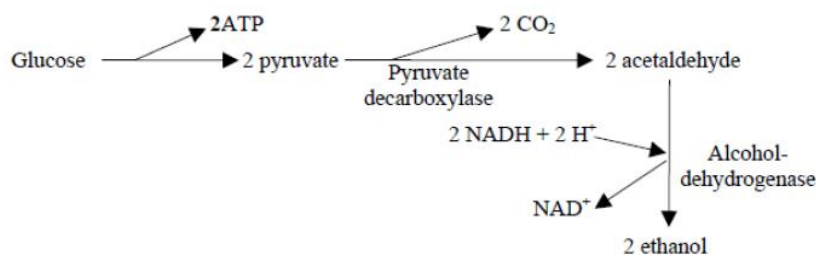
การคัดเลือกเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่สามารถหมักน้ำตาลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35°C และให้ผลผลิตเอทานอลที่สูงจึงเป็นเรื่องสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล (Edgardo *et al.*, 2008)

### 2.3.2 กลุ่ม Non-Saccharomyces

*Kluyveromyces marxianus* เป็นยีสต์ในกลุ่ม homothallic hemiascomycete ที่สามารถคัดแยกได้ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยยีสต์ชนิดนี้จัดเป็นยีสต์ในกลุ่มทนร้อน (thermotolerant) และสามารถผลิตเอนไซม์ inulinase ในการย่อยน้ำตาลอินนูลินได้ มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว ซึ่งแตกต่างจากเชื้อในจินัสเดียวกัน เช่น *Kluyveromyces lactis* ซึ่งทำให้เชื้อ *K. marxianus* มีความสามารถในการหมักน้ำตาลแลคโตสและอินนูลินเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอลได้ เชื้อดังกล่าวจึงเป็นยีสต์อีกชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจอย่างมากต่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะจากอุตสาหกรรมที่มีการใช้วัตถุดิบในกลุ่มลิกโนเซลลูโลสที่มีราคาไม่แพง และมีองค์ประกอบของน้ำตาลหลากหลายชนิด การศึกษาในด้านอนุพันธุศาสตร์ของ *K. marxianus* ยังมีไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามมีการนำเชื้อนี้ไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล อีกทั้งยังมีรายงานว่า เชื้อชนิดนี้มีความสามารถในการย่อยสลายสารพิษในสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (bioremediation application) คุณสมบัติของ *K. marxianus* ที่กล่าวมาแล้วข้างต้น สามารถพบได้ในเชื้อหลายสายพันธุ์ของ *K. marxianus* แต่ยังไม่มีการรายงานถึงความหลากหลายในแต่ละสายพันธุ์เท่าที่ควร ในการประยุกต์ใช้เชื้อ *K. marxianus* จึงมุ่งเน้นไปที่การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลแลคโตสและอินนูลิน สามารถหมักน้ำตาลไซโลสเพื่อให้ได้เอทานอลได้อีกด้วย เชื้อยีสต์ *K. marxianus* จัดว่ามีการใช้กันมานานในอุตสาหกรรม เนื่องจากเป็นเชื้อที่มีความปลอดภัยระดับ GRAS (Generally Regarded As Safe) ซึ่งมีความเหมาะสมในการใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และยา *K. marxianus* สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบ เช่น whey และอินนูลิน และมีช่วงอุณหภูมิในการเจริญกว้างตั้งแต่ 4-45°C (Lane *et al.*, 2011; Raimondi *et al.*, 2013)

### 2.3.3 วัฏจักรและกลไกการผลิตเอทานอลของยีสต์

ยีสต์ถูกนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมัก โดยยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารและเปลี่ยนเป็นเอทานอล โดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยในกระบวนการนี้อาศัยเอนไซม์สำคัญ 2 ชนิดคือ pyruvate decarboxylase และ alcohol dehydrogenase



ภาพ 2.1 เอนไซม์และสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลจากกลูโคส

ที่มา Norr *et al.*, 2003

ในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของยีสต์ น้ำตาลกลูโคส 100 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 51.11 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) 48.89 กรัม นอกจากนี้ยังมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้นอีก 28.7 กิโลแคลอรี (Kcal) แสดงได้ดังสมการ



ผลผลิตที่ได้จริง (yield) สามารถคำนวณได้จาก ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้/ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป โดยผลผลิตที่ควรได้ทางทฤษฎี (theoretical yield) มีค่าเท่ากับ 0.511 ต่อ 1 กรัม น้ำตาลที่ใช้ไป (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000; Yadav *et al.*, 2011)

### 2.3.4 ความสามารถของยีสต์ในการทนความเครียดที่จะเกิดขึ้นระหว่างการหมัก

ความท้าทายที่สำคัญในการผลิตเอทานอลชีวภาพจากวัตถุดิบตั้งต้นที่เป็นชีวมวล คือ การพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีตัวยับยั้งได้ดี ซึ่งตัวยับยั้งมักเกิดขึ้นในขั้นตอนของการผลิตเอทานอล เช่น การมีแรงดันออสโมติกสูง เนื่องจากปริมาณน้ำตาลในวัตถุดิบตั้งต้นมาก การมีความเข้มข้นของเอทานอลในถังหมักสูง และอุณหภูมิที่สูงขึ้นระหว่างการหมัก (>40°C) (Caspeta and Nielsen, 2015)

### 2.3.5 ลักษณะที่เหมาะสมของยีสต์ในการผลิตเอทานอล

ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิและความเข้มข้นของเอทานอลสูงจัดเป็นปัจจัยสำคัญในการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมได้มากขึ้น ทั้งนี้การมีความเข้มข้นของเซลล์สูง (high cell densities) การนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ (cell recycling) และความเข้มข้นของเอทานอลในปริมาณสูง ล้วนแล้วแต่ทำให้การเจริญของเซลล์ยีสต์ลดลง ซึ่งเมื่อการเจริญของยีสต์ลดลงจะทำให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น (ประมาณ 90-92% ของน้ำตาลตามทฤษฎีจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล) อย่างไรก็ตาม ยีสต์สายพันธุ์ธรรมชาติที่ไม่ผ่านการคัดต่อทางพันธุกรรม มักไม่สามารถทนต่อสภาวะดังกล่าวได้ และแสดงลักษณะที่ไม่เหมาะสมแก่การนำไปใช้ในการหมักหรือผลิตเอทานอล เช่น การผลิตฟองในปริมาณที่มากเกินไปในระหว่างการหมักเกิดการตกตะกอนในถังหมัก และใช้เวลาในการหมักนาน รวมทั้งมีน้ำตาลเหลืออยู่ภายในถังหมักหลังจากการหมักแล้ว (Basso *et al.*, 2008) ลักษณะของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจึงกล่าวได้ดังนี้

#### 1) Foam-producing yeast

เชื้อยีสต์ที่มีการผลิตฟองมากในระหว่างการหมัก จะทำให้ไม่สามารถใช้ประสิทธิภาพของถังหมักได้อย่างเต็มที่ อีกทั้งยังต้องอาศัยสารในกลุ่ม antifoam เพื่อลดปริมาณฟองแก๊สในถังหมัก จึงทำให้มีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น (Silva *et al.*, 2006) และไม่เหมาะแก่การนำมาใช้เพื่อผลิตเอทานอล

#### 2) Flocculation

การเกิดการจับกลุ่มของเซลล์มีทั้งข้อดีและข้อเสียในเชิงอุตสาหกรรม โดยพบว่าอัตราการตกตะกอนของเชื้อจะทำให้การผลิตเอทานอลในระดับโรงงานเป็นไปได้ไม่ดีและให้ปริมาณเอทานอลน้อย และมีรายงานว่าในกระบวนการระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในประเทศบราซิล การผลิตเอทานอลจะมีประสิทธิภาพมากกว่าเมื่อใช้เชื้อที่ไม่มีการตกตะกอนหรือไม่มีการจับกันเป็นกลุ่ม (homogeneous yeast suspension) อย่างไรก็ตาม ระหว่างการหมักในโรงงานขนาดเล็กของประเทศบราซิลจะมีการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำโดยไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยงเพื่อตกตะกอน ดังนั้นเชื้อยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการตกตะกอนจึงเป็นที่ต้องการ เพื่อลดขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงในการผลิตเอทานอล

นอกจากนั้นการเกิดการสร้างฟองแก๊สของเชื้อในระหว่างการหมักจะทำให้เกิดการลอยตัวของเซลล์ยีสต์ (yeast flotation) ซึ่งเมื่อรวมกับปรากฏการณ์การจับกลุ่มของเซลล์ยีสต์แล้ว จะลดความสามารถในการสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อของเซลล์ และจะส่งผลให้ระยะเวลาที่ใช้ในการหมักเพิ่มขึ้น และมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือในถังหมักมากขึ้นเมื่อเสร็จกระบวนการหมัก เนื่องจากเชื้อไม่สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างเต็มที่ โดยเชื้อยีสต์ที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาไม่เรียบ (rough) มักจะมีการสร้าง pseudohypha ในระหว่างการเจริญ (pseudohyphal growth) และมักมีการตกตะกอนในถังหมักระหว่างการหมัก (Silva *et al.*, 2006)

### 3) Osmotic tolerant

เนื่องจากการหมักเอทานอลชีวภาพในระดับอุตสาหกรรม มักใช้วัตถุดิบตั้งต้นที่มีความเข้มข้น และประกอบด้วยน้ำตาลที่มีความหลากหลายและปริมาณมาก ดังนั้นอีกหนึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของยีสต์คือ ความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นน้ำตาลสูงๆ (high osmolyte concentrations) (Hohmann, 2002; Hohmann *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2010)

### 4) Ethanol tolerance

ความเป็นพิษของเอทานอลและแอลกอฮอล์ประเภทอื่นจัดเป็นปัจจัยจำกัดในการผลิตเอทานอล โดยเฉพาะในระดับอุตสาหกรรม (Felix *et al.*, 2014) เนื่องจากเอทานอลจัดเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด โดยมีการรายงานว่าเอทานอลสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อ mitochondrial DNA ในเซลล์ของยีสต์ และสามารถทำให้เอนไซม์บางชนิดไม่ทำงาน เช่น hexokinase และ dehydrogenase อย่างไรก็ตามเชื้อ *S. cerevisiae* บางสายพันธุ์สามารถปรับตัวให้ทนต่อเอทานอลในปริมาณสูงได้ (You *et al.*, 2003)

### 5) Glucose repression

Glucose repression หรืออาจถูกเรียกว่า carbon catabolite repression หรือ glucose effect เป็นกระบวนการนี้มักพบในจุลินทรีย์ เกิดขึ้นเมื่อในสภาพแวดล้อมมีน้ำตาลที่เชื้อสามารถใช้ได้อย่างน้อย 2 ชนิดโดยหนึ่งในนั้นเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเมื่อมีน้ำตาลกลูโคสอยู่ด้วยนั้นจะทำให้เชื้อผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยน้ำตาลชนิดอื่นน้อยลง หรือไม่ผลิตเลย เพื่อให้เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสจนหมดก่อน (Gancedo, 1998) ดังนั้นยีสต์ที่เหมาะสมกับการนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบตั้งต้นที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลากหลายจึงไม่ควรมีปรากฏการณ์ glucose repression กับน้ำตาลชนิดอื่นๆ

## 2.4 การระบุชนิดของเชื้อยีสต์

การระบุชนิดของยีสต์ประกอบด้วยการศึกษาลักษณะภายนอก เช่น ลักษณะทางสัณฐานวิทยา และปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Kurtzman and Robnett, 1998) อย่างไรก็ตามวิธีที่สามารถระบุชนิดของเชื้อได้โดยตรง คือ การใช้ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 บนยีน rRNA ของยีสต์ เพื่อนำไปเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ซึ่งจะทำให้สามารถระบุชนิดของเชื้อยีสต์ที่มีในระดับสปีชีส์ และสามารถใช้ในการสร้างแผนภาพทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ได้ นอกจากนี้ลำดับเบสบริเวณ Internal Transcribed Spacer (ITS) ยังสามารถนำมาใช้ในการระบุสปีชีส์ของเชื้อยีสต์และเราได้เช่นกัน ทั้งนี้ยังสามารถออกแบบ Polymerase Chain Reaction (PCR) primers หรือ hybridization probes ที่จำเพาะเจาะจงกับเชื้อยีสต์และนำมาใช้เพื่อความรวดเร็วในการระบุชนิดของเชื้อได้ด้วย (Fell *et al.*, 2000)

## 2.5 การศึกษายีสต์ทนร้อนในการหมักเอทานอล

Auesukaree และคณะ ได้ทำการคัดแยกยีสต์ *S. cerevisiae* ทนร้อนจากตัวอย่างผลไม้ในประเทศไทย โดยพบว่า 3 ไอโซเลทคือ C3723, C3751 และ C3867 สามารถเจริญได้ดีจนถึงอุณหภูมิ 41°C (Auesukaree *et al.*, 2012)

Limtong และคณะ ได้ทำการคัดแยกเชื้อ *K. marxianus* DMKU 3-1042 และพบว่าเชื้อ *K. marxianus* สายพันธุ์ที่แยกได้ สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงทั้งที่ 40 และ 45°C และพบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุดที่ 37°C คือ 8.7% (w/v) และ ที่ 40°C คือ 6.78% (w/v) จากอาหารที่ใช้ น้ำอ้อยเป็นองค์ประกอบสำคัญ (sugar cane juice medium) โดยมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 22% และศึกษาการเลี้ยงเชื้อแบบกะ (batch culture) ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าได้ปริมาณเอทานอลน้อย ทั้งนี้การเพิ่มปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใส่ลงไป ในถังหมักและการเพิ่มปริมาณอากาศภายในถังหมักสามารถแก้ปัญหาได้ (Limtong *et al.*, 2007)

ในงานวิจัยของ Tanimura และคณะในปี 2012 พบว่าสามารถแยกเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* สายพันธุ์ ATY839 ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าที่เคยมีรายงานไว้ และพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้ สามารถผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาลกลูโคสและไซโลส ทั้งนี้เชื้อสายพันธุ์ ATY839 สามารถผลิตเอทานอลได้ถึงที่อุณหภูมิ 37°C จากน้ำตาลกลูโคสและไซโลสอย่างละ 2% โดยค่าผลผลิต (yield) ที่ได้เทียบกับที่ควรได้ตามทฤษฎี พบว่าเชื้อที่สามารถแยกได้ให้ค่าผลผลิตทางทฤษฎีสูงสุด คือ 71.6% หลังจากการบ่ม 24 ชั่วโมง ดังนั้น Tanimura จึงสรุปว่าเชื้อสายพันธุ์ ATY839 ที่แยกได้สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีที่สุดของเชื้อในกลุ่ม *C. shehatae* ทั้งหมด (Tanimura *et al.*, 2012)

ในงานวิจัยของ Chamnipa และคณะได้ทำการคัดแยกยีสต์ทนร้อนในประเทศไทย และพบเชื้อ *Pichia kudriavzevii* Rz8-1 ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ดีทั้งที่ 37 และ 40°C โดยให้ค่าผลผลิต (yield) เท่ากับ 0.36 และ 0.34 ตามลำดับ (Chamnipa *et al.*, 2014)

อภิรดี (2549) ทำการคัดแยกยีสต์ทนร้อน *Pichia kudriavzevii* และศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ อีกทั้งศึกษาการหมักของเชื้อในระดับถังหมัก 2 ลิตรและพบว่าเชื้อให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 76.06% โดยทฤษฎีเมื่อทำการหมักแบบให้อากาศ

## บทที่ 3

### อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

#### 3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 3.1.1 Yeast extract (ยี่ห้อ DIFCO)
- 3.1.2 Malt extract (ยี่ห้อ DIFCO)
- 3.1.3 Peptone (ยี่ห้อ DIFCO)
- 3.1.4 Glucose (ยี่ห้อ JT Baker)
- 3.1.5 Mannose (ยี่ห้อ JT Baker)
- 3.1.6 Galactose (ยี่ห้อ JT Baker)
- 3.1.7 Xylose (ยี่ห้อ JT Baker)
- 3.1.8 Sucrose (ยี่ห้อ JT Baker)

#### 3.2 สารเคมี (ภาคผนวก ข)

- 3.2.1 Chloramphenicol (ยี่ห้อ Sigma-Aldrich)
- 3.2.2 Sodium Propionate (ยี่ห้อ Sigma-Aldrich)

#### 3.3 วัสดุและอุปกรณ์

- 3.3.1 ช้อนตักสาร
- 3.3.2 ฝ้ายขาวบาง
- 3.3.3 ถุงมือยาง
- 3.3.4 ห่วงถ่ายเชื้อ
- 3.3.5 สำลี
- 3.3.6 Beaker ขนาด 100, 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.3.7 Cylinder ขนาด 10, 100, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- 3.3.8 Duran ขนาด 200, 500 1000 และ 2000 มิลลิลิตร

- 3.3.9 Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 3.3.10 Fermentation lock
- 3.3.11 Filter ขนาด 0.22 ไมโครเมตร
- 3.3.12 HPLC vial tube
- 3.3.13 Micropipette ขนาด 1-20, 50-200 และ 200-1000 ไมโครลิตร
- 3.3.14 Pipette tip ขนาด 20, 200, 1,000 และ 10,000 ไมโครลิตร
- 3.3.15 Petri dish
- 3.3.16 Test tube ขนาด 16x150 และ 18x150 มิลลิเมตร
- 3.3.17 Slide และ cover slip
- 3.3.18 Spreader
- 3.3.19 Syringe 5 มิลลิลิตร

### 3.4 เครื่องมือ

- 3.4.1 เครื่องเขย่าแบบหมุนวน (Mettler, Germany)
- 3.4.2 Autoclave (Tomy, SX-700, Japan)
- 3.4.3 Centrifuge (Hettich, Germany)
- 3.4.4 Ebuillometer (Dujardin-salleron, France)
- 3.4.5 Gel Documentation (Syngene, USA)
- 3.4.6 High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ThermoFisher Scientific, USA)
- 3.4.7 Polymerase Chain Reaction (PCR) (Biorad, USA)
- 3.4.8 Refractometer (Atago, Germany)
- 3.4.9 Spectrophotometer (Thermo Spectronic, GENESYS 20, USA)

### 3.5 วิธีการวิจัย

#### 1. การคัดเลือกเชื้อยีสต์ทนร้อน

- 1.1 เก็บตัวอย่างดิน ลูกแป้ง น้ำหมักชีวภาพ ผลไม้และขยะประเภทเปลือกผลไม้และเศษใบไม้หมัก
- 1.2 นำตัวอย่าง 5 กรัม มาทำการเพิ่มปริมาณเชื้อ (enrichment) ในอาหารเหลว YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีส่วนผสมของ 0.2% sodium propionate, 0.01% chloramphenicol และ

4% ethanol ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงใน เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า 150 rpm

- 1.3 ทำการเจือจางด้วยวิธี ten-fold serial dilution เลือกความเจือจางที่  $10^{-2}$ - $10^{-6}$  (ทั้งนี้ขึ้นกับ ชนิดของตัวอย่าง) มาทำการกระจาย (spread plate) บนอาหารแข็ง YM (YM + 1.5% agar) บ่มที่ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 1.4 ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ให้บริสุทธิ์และตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อดังกล่าวภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อยืนยันว่าเชื้อที่คัดแยกได้คือยีสต์ และศึกษาลักษณะ สัณฐานวิทยาของโคโลนีเชื้อที่แยกได้ทั้งหมด
- 1.5 ทดสอบความสามารถในการทนร้อนเบื้องต้นของเชื้อ โดยทำการ streak plate บนอาหาร แข็ง YPD และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการศึกษากา รเจริญของเชื้อบนอาหารดังกล่าว

## 2. การทดสอบการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C

- 2.1 นำเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้อ 1 มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD 15 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 2.2 จากนั้นนำเชื้อที่ได้ใส่ลงในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 12% (w/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยให้ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm ตั้งต้นเท่ากับ 0.1 บ่มที่ 40°C เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มแบบเขย่า 150 rpm จากนั้นนำไปบ่มที่ 40°C จนครบ 48 ชั่วโมง
- 2.3 ตรวจสอบการเจริญโดยวัดความเข้มข้น โดยอาศัยเครื่อง Spectrophotometer ที่ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
- 2.4 วัดปริมาณเอทานอลด้วย Ebuillometer

## 3. ศึกษาคุณสมบัติบางประการที่มีผลในการผลิตเอทานอล

- 3.1 คัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอทานอลได้ดี นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งแบบเขย่าที่ 150 rpm และแบบคงที่
- 3.2 ศึกษาลักษณะต่างๆ คือ การผลิตฟองแก๊ส (foam formation) การเกิดฝ้าที่ผิวหน้า และการ จับกลุ่มกันเป็นก้อนของเชื้อ (flocculation)
- 3.3 บันทึกผลการทดลอง

#### 4. การทดสอบลักษณะที่สำคัญบางประการของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้

##### 4.1 การเจริญในแหล่งคาร์บอน

4.1.1 นำเชื้อที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 40°C จนมีค่า OD<sub>600</sub> ประมาณ 1.0

4.1.2 จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้มาเจือจางลงครั้งละ 10 เท่า ทั้งหมด 5 ครั้ง (10<sup>-1</sup>-10<sup>-4</sup> เท่า) แล้วนำเอาหัวเชื้อที่ทำให้เจือจางแล้วในแต่ละความเข้มข้น (3 ไมโครลิตร) มาเปิดลงบนอาหารแข็ง YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 10, 20 และ 30% (w/v) บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 2 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อทุกวัน

##### 4.2 การเจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลต่างกัน ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ

4.1 แต่เปลี่ยนเป็น YPD ที่มีเอทานอลความเข้มข้น 5, 10, 12 และ 15% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

##### 4.3 การเจริญในอุณหภูมิสูง ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 4.1 แต่ใช้อุณหภูมิที่ 40 และ 42°C

#### 5. การศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาล

5.1 คัดเลือกเชื้อยีสต์ 3 ไอโซเลทจากเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด เปรียบเทียบกับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red (ER)

5.2 เลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5.3 นำเชื้อที่ได้ใส่ลงในอาหารเหลวกากน้ำตาล (กากน้ำตาลละลายในน้ำกลั่น + 0.06% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) ที่มีค่า TSS เท่ากับ 12°Brix ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยให้ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm ตั้งต้นเท่ากับ 0.1 บ่มที่ 40°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มแบบเขย่า 150 rpm บ่มที่ 40°C

5.4 เก็บตัวอย่างทุกๆ 48 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมง

5.5 นับจำนวนเซลล์ โดยการทำให้ spreader plate technique

5.6 วัดปริมาณเอทานอลด้วย Ebulliometer

#### 6. การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C และ 42°C

6.1 คัดเลือกเชื้อยีสต์ 2 ไอโซเลทจากเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด เปรียบเทียบกับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red (ER)

6.2 เลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 40 และ 42°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- 6.3 นำเชื้อที่ได้ใส่ลงในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 120 g/L ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยให้ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm ตั้งต้นเท่ากับ 0.1 โดยใช้ fermentation lock ในการปิดฟลาส บ่มที่ 40 และ 42°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มแบบเขย่า 150 rpm
- 6.4 เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง
- 6.5 ตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้เพื่อทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลและเอทานอลโดยอาศัย High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
- 6.6 ตรวจสอบการเจริญโดยวัดความเข้มข้น โดยอาศัยเครื่อง Spectrophotometer ที่ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
- 7. การศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว**
- 7.1 เชื้อที่คัดเลือกแล้ว 2 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 7.2 นำเชื้อที่ได้ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YP ที่มีน้ำตาลแต่ละชนิด 20 g/L คือ กลูโคส (YPD) แมนโนส (YPMan) ซาโลส (YPXyl) กาแลกโตส (YPGal) และ ซูโครส (YPSuc) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยให้ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm ตั้งต้นเท่ากับ 0.1 บ่มที่ 40°C ในเครื่องบ่มแบบเขย่า 150 rpm
- 7.3 เก็บตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- 7.4 ตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้เพื่อทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลและเอทานอลโดย HPLC
- 7.5 ตรวจสอบการเจริญโดยวัดความเข้มข้น โดยอาศัยเครื่อง Spectrophotometer ที่ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
- 8. การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวและคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ (ดัดแปลงจาก Auesukaree *et al.*, 2012)**
- 8.1 นำเชื้อที่คัดเลือกแล้ว 2 ไอโซเลทและเชื้อควบคุม ER มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30, 40 หรือ 42°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

- 8.2 นำเชื้อที่ได้ใส่ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใน Erlenmayer flask ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยให้ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm ตั้งต้นเท่ากับ 0.1 บ่มที่ 30, 40 หรือ 42°C ในเครื่องบ่มแบบเขย่า 150 rpm
- 8.3 เก็บตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตรทุกๆ 90 นาที เพื่อวัดการเจริญ และทุกๆ 3 ชั่วโมง เพื่อวัดปริมาณเอทานอลและน้ำตาล
- 8.4 ตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้เพื่อทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลและเอทานอลโดยอาศัย HPLC
- 8.5 ตรวจสอบการเจริญโดยวัดความเข้มข้น โดยอาศัยเครื่อง Spectrophotometer ที่ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank
9. การทดสอบเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ ร่วมกับเชื้อควบคุมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 20%
- 9.1 คัดเลือกเชื้อ 1 ไอโซเลท เพื่อนำมาทำการทดสอบร่วมกับเชื้อ ER ซึ่งมีความสามารถในการทนต่อเอทานอลในปริมาณสูง
- 9.2 นำเชื้อที่ได้รับการคัดเลือกและเชื้อ ER มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 9.3 แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุดคือ
- 9.3.1 ใส่เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้และเชื้อ ER พร้อมกันที่ชั่วโมงที่ 0 อย่างละเท่าๆกัน โดยให้ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm ตั้งต้นเท่ากับ 0.1
- 9.3.2 ใส่เชื้อ ER ได้ชั่วโมงที่ 0 ให้ได้ OD ตั้งต้นเท่ากับ 0.1 และเติม เชื้อยีสต์ที่คัดเลือก ที่มีค่า OD เท่ากับ 1 ลงไป 1 มิลลิลิตรเมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง
- 9.3.3 ใส่เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ชั่วโมงที่ 0 ให้ได้ OD ตั้งต้นเท่ากับ 0.1 และเติมเชื้อ ER ที่มีค่า OD เท่ากับ 1 ลงไป 1 มิลลิลิตร เมื่อบ่มครบ 24 ชั่วโมง
- 9.4 บ่มที่ 40°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ในเครื่องบ่มแบบเขย่า 150 rpm เก็บตัวอย่างปริมาณ 1 มิลลิลิตรที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง
- 9.5 ตกตะกอนเซลล์โดยปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เก็บสารละลายส่วนใสไว้เพื่อทำการตรวจสอบปริมาณน้ำตาลและเอทานอลโดยอาศัย HPLC
- 9.6 ตรวจสอบการเจริญโดยวัดความเข้มข้น โดยอาศัยเครื่อง Spectrophotometer ที่ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

## 10. การศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในถังหมักระดับ 5 ลิตร

- 10.1 นำเชื้อที่คัดเลือกแล้ว 2 ไอโซเลทและเชื้อควบคุม ER มาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 10.2 นำเชื้อที่ได้ใส่ลงในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20% (w/v) ปริมาตร 5 ลิตร ในถังหมัก ขนาด 8 ลิตร โดยให้ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm ตั้งต้นเท่ากับ 0.3 บ่มที่ 40°C เป็นเวลา 96 ชั่วโมง และเก็บตัวอย่าง 50 มิลลิลิตรที่เวลา 0, 24, 48, 72, 96 ชั่วโมง
- 10.3 วัดปริมาณเอทานอลด้วย Ebuillometer
- 10.4 ตรวจสอบการเจริญโดยวัดความเข้มข้น โดยอาศัยเครื่อง Spectrophotometer ที่ค่า Optical Density (OD) ที่ 600 nm โดยใช้น้ำกลั่นเป็น blank

## 11. การระบุเชื้อที่คัดแยกได้โดยใช้เทคนิคทางอนุพันธุศาสตร์

- 11.1 นำเชื้อตัวอย่างมาสกัดดีเอ็นเอ
  1. เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YPD 3 มิลลิลิตร เป็นเวลา 18 ชั่วโมง
  2. ถ่ายใส่หลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 8,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที
  3. เทสารละลายส่วนใสทิ้ง และนำตะกอนเซลล์มาละลายใน lysis buffer 200  $\mu$ l
  4. นำหลอดที่มีเซลล์ใน lysis buffer ไปแช่ใน -20°C จนเซลล์ถูกแช่แข็ง
  5. นำมาจุ่มในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 1 นาที
  6. ทำซ้ำข้อ 4-5 อีก 1 ครั้ง
  7. Vortex อย่างแรงเป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นใส่ Chloroform ปริมาตร 200  $\mu$ l แล้ว vortex เป็นเวลา 2 นาที
  8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 6 นาที
  9. คูดเก็บเฉพาะสารละลายส่วนใส ถ่ายโอนไปหลอดใหม่ ที่มีเอทานอล 100% ปริมาตร 400  $\mu$ l ทิ้งไว้ 5 นาที
  10. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
  11. เทสารละลายส่วนใสทิ้ง จากนั้นล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วย เอทานอล 70% ปริมาตร 500  $\mu$ l
  12. ปั่นเหวี่ยงที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง
  13. ทิ้งไว้ให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้ง
  14. ละลายด้วย TE buffer 20  $\mu$ l

## 11.2 ทำการเพิ่มจำนวนชิ้นดีเอ็นเอที่ใช้ในการจัดจำแนกชนิดของเชื้อ โดยเทคนิค PCR

### Normal PCR Reaction

dH <sub>2</sub> O	38 µl
5X PS buffer	5 µl
2.5 mM dNTP	2 µl
Primer F (10 pmol/ µl)	1 µl
Primer R (10 pmol/ µl)	1 µl
DNA template	1 µl
DNA polymerase	2 µl
Mg <sup>2+</sup> buffer	1 µl

### PCR condition

94°C	2 นาที	} 30 cycles
94°C	30 วินาที	
50°C	30 วินาที	
72°C	1 นาที	
72°C	7 นาที	
4°C	∞	

## 11.3 ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มจำนวนยีน (PCR products) ที่ได้มีความบริสุทธิ์โดยใช้

### Vivantis PCR Clean-Up

1. ปรับปริมาตรของ PCR product ที่ได้ให้มีปริมาตรเท่ากับ 100 µl
2. เติม DB buffer อีก 100 µl จากนั้นผสมให้เข้ากันโดย vortex หรือกลับหลอด
3. นำสารทั้งหมดใส่ลงในคอลัมน์ที่มาพร้อมกับชุด kit
4. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา
5. ล้าง column อีกครั้งด้วย Wash buffer 650 µl และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นทิ้งส่วนที่ผ่านคอลัมน์ออกมา
6. ปั่นเหวี่ยงคอลัมน์อีก 1 ครั้งที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที
7. ย้ายคอลัมน์ใส่ในหลอด centrifuge tube ใหม่ เติม Elution buffer 50 µl และตั้งทิ้งไว้ 2 นาที
8. ปั่นเหวี่ยงคอลัมน์อีก 1 ครั้งที่ 10,000 g เป็นเวลา 1 นาที เก็บสารละลายที่ผ่านแผ่นกรองเพื่อทำการหาลำดับเบสดีเอ็นเอต่อไป

## 11.4 นำดีเอ็นเอที่ได้ไปทำการหาลำดับเบส

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 1. การคัดเลือกเชื้อยีสต์ทนร้อน

การคัดเลือกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่างคือ มังคุด องุ่น สับปะรด ลิ้นจี่ ข้าวโพด ลองกอง ดินบริเวณน้ำตก ลูกแป้งหมักเหล้า น้ำหมักกระเจี๊ยบ น้ำหมักมะยม และตัวอย่างการหมักขยะ เปลือกผลไม้และเศษใบไม้ พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีหลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งหมด 55 ไอโซเลท และมีแหล่งที่มาตามตาราง 4.1

ตาราง 4.1 ไอโซเลทที่แยกได้จากตัวอย่าง 15 ชนิด

แหล่งที่มา	ไอโซเลท
<b>ผลไม้</b>	
- มังคุด	MGT1, MGT2
- องุ่น	G1
- สับปะรด	PA1, PA2, PA3, PA4, PPA1, PPA2
- ลิ้นจี่	LC1, LC2, LC3, LC4, LC5
- ข้าวโพด	CORN1, CORN2
- ลองกอง	LG1, LG2
<b>ดิน</b>	
- ดินบริเวณน้ำตกห้วยแก้ว อ.เมือง จ. เชียงใหม่	HK1/1, HK1/2, HK1/3, HK2/1, HK2/2, HK2/3, HK2/4, HK2/5
- ดินบริเวณน้ำตกมณฑาธาร อ.เมือง จ. เชียงใหม่	MT1/1, MT1/2, MT2/2, MT2/4
<b>ลูกแป้ง</b>	
- ลูกแป้งหมักเหล้า อ. เมือง จ.ลำปาง	LP2, LP3, LP4, LP5, LP6
- ลูกแป้งหมักเหล้า อ.เด่นชัย จ.แพร่	DC6/1, DC6/2, DC6/3, DC6/4, DC6/5

ตาราง 4.1 (ต่อ)

แหล่งที่มา	ไอโซเลท
<b>น้ำหมัก</b>	
- น้ำหมักกระเจี๊ยบ	KJ
- น้ำหมักมะขม	MY1
<b>ขยะ</b>	
- ตัวอย่างการหมักเปลือกผลไม้และเศษใบไม้	OW1, OW2, OW3, OW4, OW5, OW6, OW7, OW1/1, OW1/2, OW1/3, OW2/1, OW2/2, OW2/3

ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีของเชื้อทั้งหมด 55 ไอโซเลท หลังจากบ่มบนอาหารแข็ง YPD ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบลักษณะโคโลนีของเชื้อ ดังตาราง 4.2

ตาราง 4.2 ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง YPD ที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ขนาด (size)	ผิวหน้า (surface)	รูปร่าง (form)	ขอบ (margin)	การยกตัว (elevation)
MGT1	0.2x0.2	smooth	circular	entire	convex
MGT2	0.7x0.9	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
G1	0.6x0.8	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
PA1	0.2x0.2	smooth	circular	entire	convex
PA2	0.2x0.2	smooth	circular	entire	convex
PA3	0.2x0.2	smooth	circular	entire	convex
PA4	0.2x0.2	smooth	circular	entire	convex
PPA1	0.2x0.2	smooth	circular	entire	convex
PPA2	0.1x0.1	smooth	circular	entire	convex
LC1	0.5x0.8	rough	irregular	undulate	umbonate
LC2	0.5x0.6	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
LC3	0.5x0.6	rough	irregular	undulate	umbonate
LC4	0.8x0.9	rough	irregular	undulate	umbonate
LC5	0.5x0.6	rough	irregular	undulate	umbonate

ตาราง 4.2 (ต่อ)

ไอโซเลท	ขนาด (size)	ผิวหน้า (surface)	รูปร่าง (form)	ขอบ (margin)	การยกตัว (elevation)
CORN1	0.6x0.7	rough	irregular	undulate	umbonate
CORN2	0.2x0.2	smooth	circular	entire	convex
LG1	0.5x0.8	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
LG2	0.6x0.8	rough	irregular	undulate	flat
HK1/1	0.5x0.6	rough	irregular	undulate	flat
HK1/2	0.6x0.7	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
HK1/3	0.5x0.7	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
HK2/1	0.1x0.1	smooth	circular	entire	convex
HK2/2	0.8x0.9	concentrically ringed	irregular	undulate	flat
HK2/3	0.8x0.9	rough	irregular	undulate	flat
HK2/4	0.7x0.9	concentrically ringed	irregular	undulate	flat
HK2/5	0.5x0.8	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
MT1/1	0.6x0.8	rough	irregular	undulate	flat
MT1/2	0.5x0.8	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	flat
MT2/2	0.3x0.3	smooth	circular	entire	convex
MT2/4	0.3x0.3	smooth	circular	entire	convex
LP2	0.1x0.1	smooth	circular	entire	convex
LP3	0.2x0.2	smooth	circular	entire	convex
LP4	0.1x0.1	smooth	circular	entire	convex
LP5	0.3x0.3	smooth	circular	entire	convex
LP6	0.1x0.2	smooth	circular	entire	convex
DC6/1	0.8x1	concentrically ringed	irregular	undulate	flat
DC6/2	0.6x0.6	concentrically ringed	irregular	undulate	flat
DC6/3	0.5x0.8	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
DC6/4	0.1x0.1	rough	circular	undulate	flat
DC6/5	0.1x0.2	rough	irregular	undulate	raise

ตาราง 4.2 (ต่อ)

ไอโซเลท	ขนาด (size)	ผิวหน้า (surface)	รูปร่าง (form)	ขอบ (margin)	การยกตัว (elevation)
KJ	0.1x0.1	smooth	circular	entire	convex
MY1	0.5x0.6	rough	irregular	undulate	raise
OW1	0.4x0.5	rough	irregular	undulate	umbonate
OW2	0.5x0.8	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
OW3	0.4x0.5	rough	irregular	undulate	raise
OW4	0.8x0.9	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	flat
OW5	0.4x0.5	rough	irregular	undulate	raise
OW6	0.4x0.6	rough	irregular	undulate	umbonate
OW7	0.1x0.1	smooth	circular	entire	convex
OW1/1	0.8x0.8	rough	irregular	undulate	flat
OW1/2	0.9x1	concentrically ringed	irregular	undulate	flat
OW1/3	0.5x0.7	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
OW2/1	0.4x0.7	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
OW2/2	0.6x0.8	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate
OW2/3	0.8x1	rough, rugose in the middle	irregular	undulate	umbonate

นอกจากนั้น จากการศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งและบ่มที่ 40 และ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำมาตรวจสอบการเจริญพบว่า เชื้อทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีที่ 40°C ในขณะที่ มีเพียง 6 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ดีที่ 45°C คือ PA1, PA2, PA3, PA4, PPA1 และ PPA2 ซึ่งทั้งหมดแยกได้จากแหล่งเดียวกันคือ สับปะรด

## 2. การทดสอบการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C

การทดสอบการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C โดยทำการบ่มในเครื่องบ่มแบบเขย่า เป็นเวลา 9 ชั่วโมง จากนั้นนำไปบ่มแบบคงที่จนครบ 48 ชั่วโมง และวัดปริมาณเอทานอลที่เชื้อผลิตได้เป็น โดยใช้ Ebuillometer พบว่า จากทั้งหมด 55 ไอโซเลท ปริมาณเอทานอลที่ชั่วโมง 48 สูงสุดคือ 5.2%จาก 8 ไอโซเลทคือ OW6, OW1/1, OW2/1, LC2, LC4, LC5 LG1 และ DC6/2 (ตาราง 4.3)

ตาราง 4.3 ปริมาณเอทานอลของเชื้อ 55 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ปริมาณเอทานอล (%)	ไอโซเลท	ปริมาณเอทานอล (%)
MGT1	2.4	MT2/2	4.8
MGT2	4.8	MT2/4	4.8
G1	5	LP2	2.6
PA1	3	LP3	5
PA2	1.7	LP4	0.8
PA3	1.8	LP5	3
PA4	1.9	LP6	0.4
PPA1	2.6	DC6/1	4.8
PPA2	0.8	DC6/2	5.2
LC1	0	DC6/3	4.8
LC2	5.2	DC6/4	4.8
LC3	4.6	DC6/5	4.6
LC4	5.2	KJ	2.6
LC5	5.2	MY1	5
CORN1	5	OW1	5
CORN2	2.4	OW2	5
LG1	5.2	OW3	4.3
LG2	3.8	OW4	4.6
HK1/1	5	OW5	3.8
HK1/2	4.8	OW6	5.2
HK1/3	4.6	OW7	1.4
HK2/1	4.5	OW1/1	5.2
HK2/2	4.6	OW1/2	4.8
HK2/3	5	OW1/3	4.8
HK2/4	4.6	OW2/1	5.2
HK2/5	5	OW2/2	4.8

ตาราง 4.3 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณเอทานอล (%)	ไอโซเลท	ปริมาณเอทานอล (%)
MT1/1	5	OW2/3	4.6
MT1/2	5		

จากเชื้อ 55 ไอโซเลท มีเชื้อ 19 ไอโซเลทที่สามารถผลิตเอทานอลได้ในเกณฑ์ดี คือช่วงระหว่าง 5-5.2% และจากการคัดเลือกโดยอาศัยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เป็นเกณฑ์ เทียบกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ โดยคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงและมีลักษณะทางสัณฐานที่หลากหลายและแตกต่างกันในกลุ่มตัวอย่างทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลทเพื่อนำไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

### 3. ศึกษาคุณสมบัติบางประการที่มีผลในการผลิตเอทานอล

นำเชื้อยีสต์ 12 ไอโซเลทมาศึกษาลักษณะต่างๆ (ตาราง 4.4) โดยพบว่า เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตฟองแก๊สในระหว่างการหมักเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เชื้อที่คัดเลือกมาทั้ง 12 ไอโซเลทมีการสร้างฟองแก๊ส ทั้งนี้มี 2 ไอโซเลทที่ผลิตฟองแก๊สในปริมาณน้อย คือ LC2 และ LP3 แต่ยังคงพบว่ามีฟองแก๊สในปริมาณมากกว่าเชื้อควบคุม Ethanol Red (ER) ที่มีการสร้างฟองแก๊สเพียงเล็กน้อย โดยการสร้างฟองแก๊สนี้สามารถสังเกตได้จากการบ่มทั้งแบบเขย่าและแบบคงที่

เมื่อศึกษาการสร้างฝ้าที่ผิวหน้าที่อุณหภูมิ 40°C พบว่า เชื้อ 11 ไอโซเลทมีการสร้างฝ้าที่ผิวหน้า ยกเว้นเชื้อ LP3 ที่ไม่พบการผลิตฝ้า เช่นเดียวกับเชื้อควบคุม ER

เมื่อสังเกตการเกาะกลุ่มของเซลล์ (flocculation) เมื่อบ่มเชื้อทั้งที่อุณหภูมิ 40 และ 42°C พบว่า เชื้อที่มีการเกาะกลุ่มกันคือ LP3 ซึ่งมีระดับการเกาะกลุ่มกันที่ 42°C สูงกว่าที่ 40°C โดยสามารถสังเกตได้เมื่อทำการบ่มแบบเขย่า

ตาราง 4.4 คุณสมบัติบางประการของเชื้อที่คัดเลือกจากข้อ 2 เปรียบเทียบกับเชื้อควบคุม Ethanol Red เมื่อบ่มเชื้อในอาหารเหลว YPD บ่มที่สภาวะคงที่<sup>a</sup> และสภาวะเขย่า<sup>b</sup>

ไอโซเลท	ปริมาณฟองจากการเขย่า <sup>ab</sup>	การมีฝ้าที่ผิวหน้า <sup>a</sup>	การจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ที่ 40°C <sup>b</sup>	การจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ที่ 42°C <sup>b</sup>
G1	++++	+	-	-
LC2	++	+	-	-

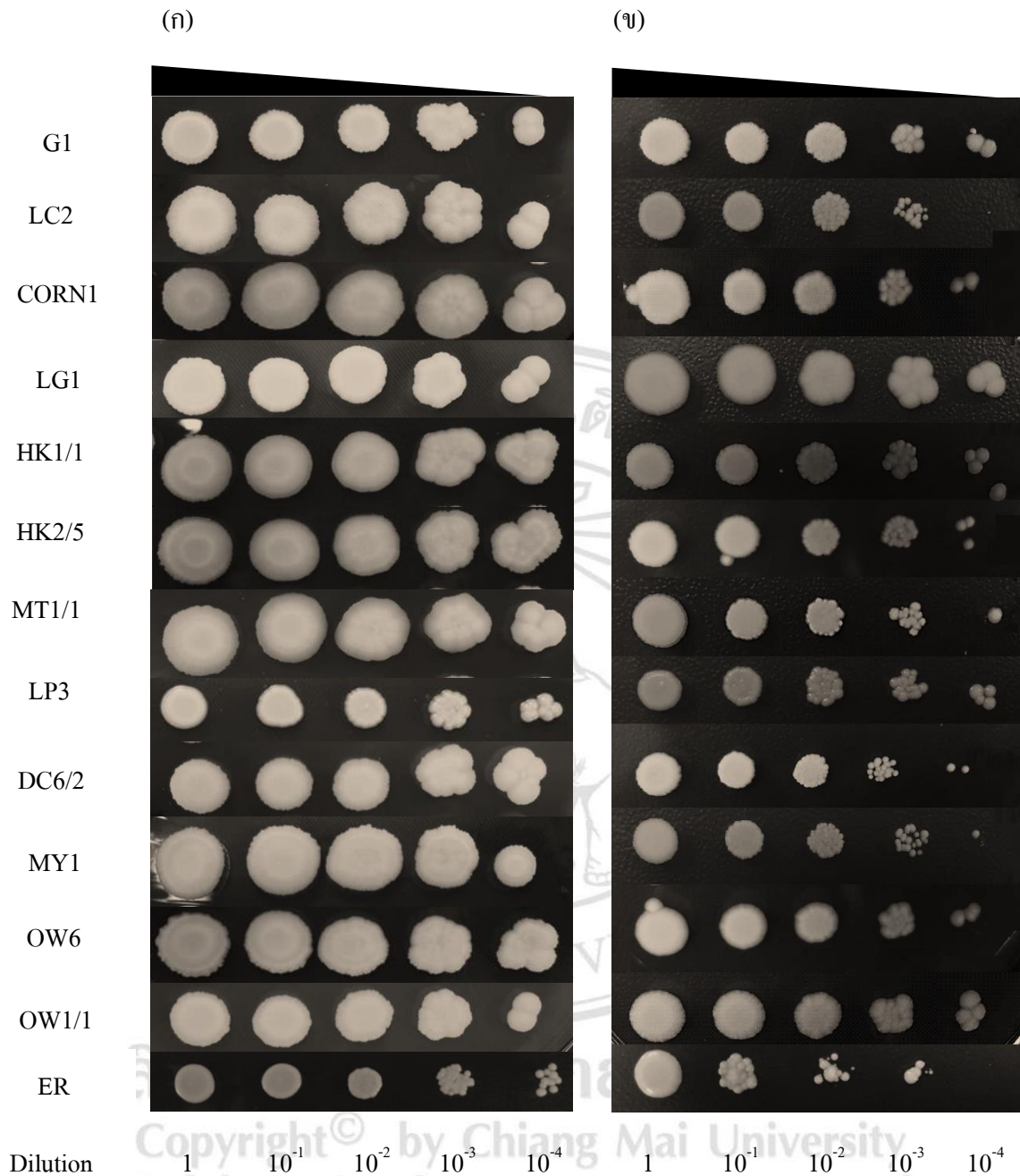
ตาราง 4.4 (ต่อ)

ไอโซเลท	ปริมาณฟอง จากการเขย่า <sup>ab</sup>	การมีฝ้าที่ ผิวหน้า <sup>a</sup>	การจับตัวเป็นก้อน ของเซลล์ที่ 40°C <sup>b</sup>	การจับตัวเป็นก้อน ของเซลล์ที่ 42°C <sup>b</sup>
CORN1	++++	+	-	-
LG1	++++	+	-	-
HK1/1	++++	+	-	-
HK2/5	++++	+	-	-
MT1/1	+++	+	-	-
LP3	++	-	+	++
DC6/2	+++	+	-	-
MY1	+++	+	-	-
OW6	+++	+	-	-
OW1/1	++++	+	-	-
Ethanol Red (ER)	+	-	+	+

#### 4. การทดสอบลักษณะที่สำคัญบางประการของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้

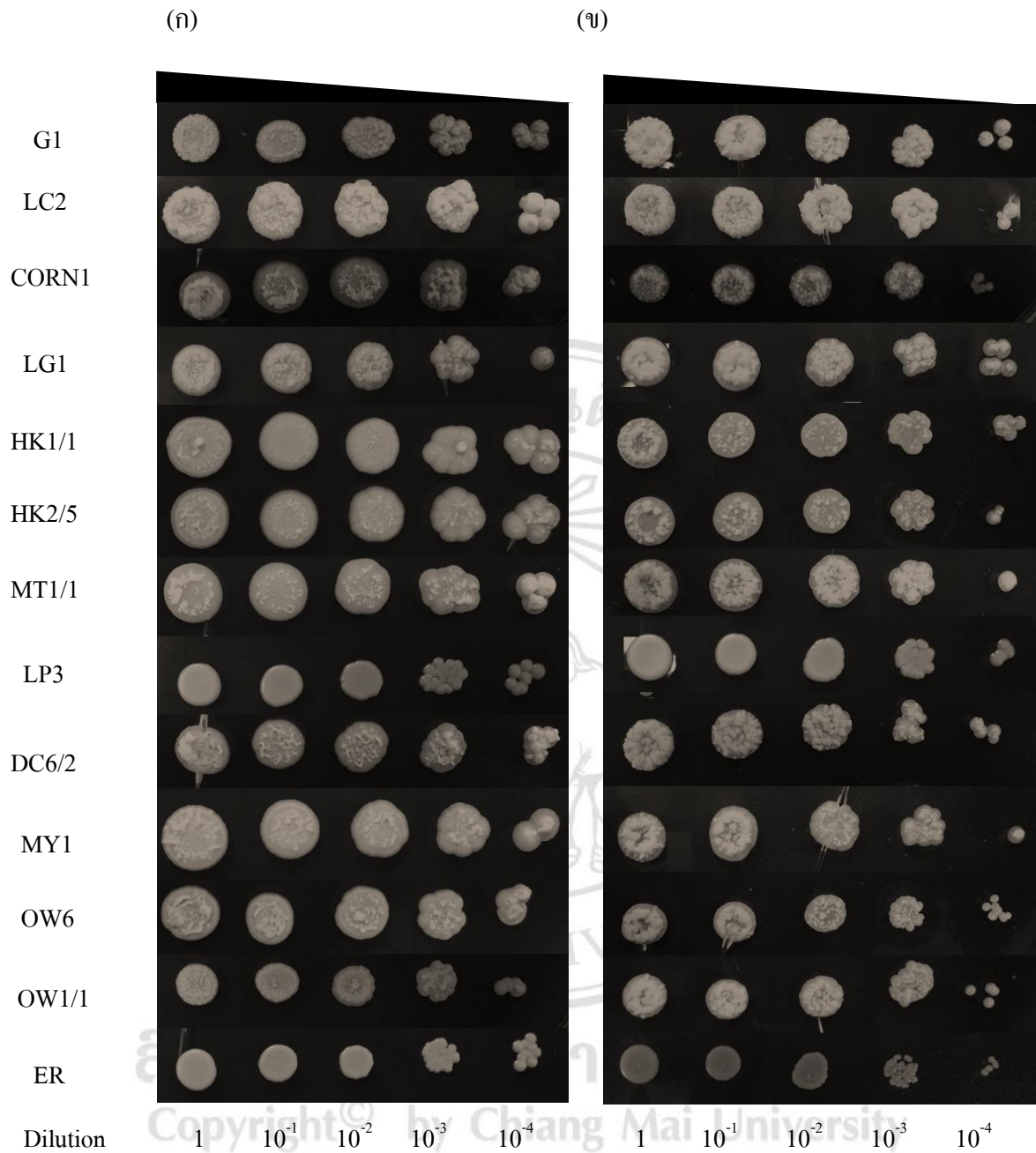
ผลการทดสอบการเจริญ โดยเทคนิค spot test บนอาหารแข็ง YPD และบ่มที่ 40 และ 42°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับเชื้อ ER พบว่า เชื้อทุกไอโซเลทที่แยกได้สามารถเจริญได้ดีทั้งที่ 40°C เช่นเดียวกับเชื้อควบคุม ที่ 42°C เชื้อทุกไอโซเลทยังคงสามารถเจริญเติบโตได้ดี ถึงแม้ว่าขนาดของโคโลนีแต่ละไอโซเลทจะเล็กลง (ภาพ 4.1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved



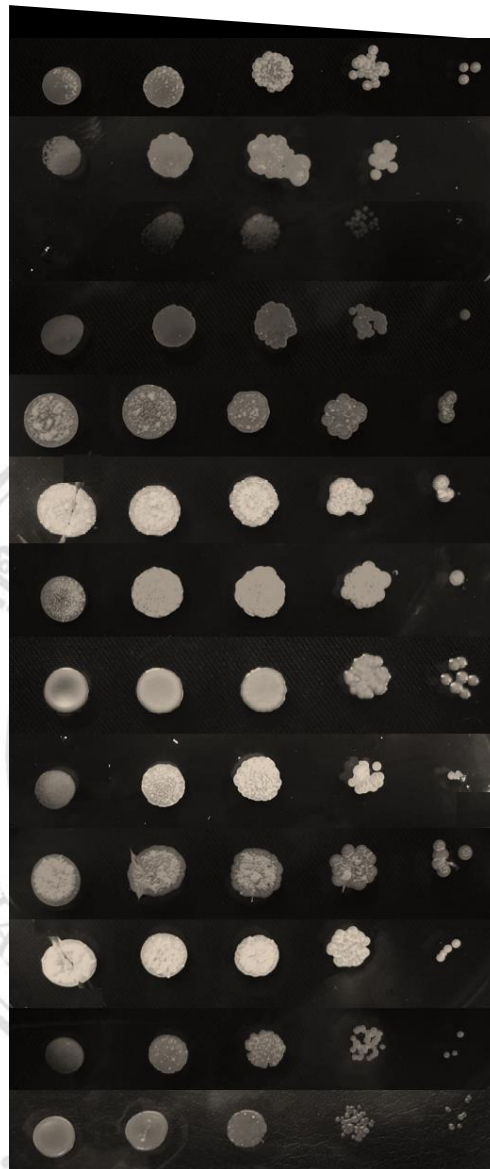
ภาพ 4.1 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ (ก): 40°C ; (ข): 42°C โดยวิธี Spot test หลังบ่ม 48 ชั่วโมง

เมื่อทดสอบกับอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 10, 20 และ 30% (w/v) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้ง 12 ไอโซเลท รวมทั้ง ER สามารถเจริญเติบโตได้ดี แต่แสดงลักษณะโคโลนีขรุขระชัดเจนขึ้นเมื่อมีการเพิ่มปริมาณน้ำตาลที่ 10 และ 20% โดยอย่างไรก็ตามที่ 30% เชื้อสามารถเจริญได้แต่ไม่มีการสร้างโคโลนีหยาบที่ชัดเจน โดยเชื้อ CORN1 พบการเจริญของเชื้อลดลงอย่างเห็นได้ชัด (ภาพ 4.2 และ 4.3)



ภาพ 4.2 ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง YP ที่มีน้ำตาลกลูโคส (ก): 10% ; (ข): 20% โดยวิธี Spot test หลังบ่ม 48 ชั่วโมง

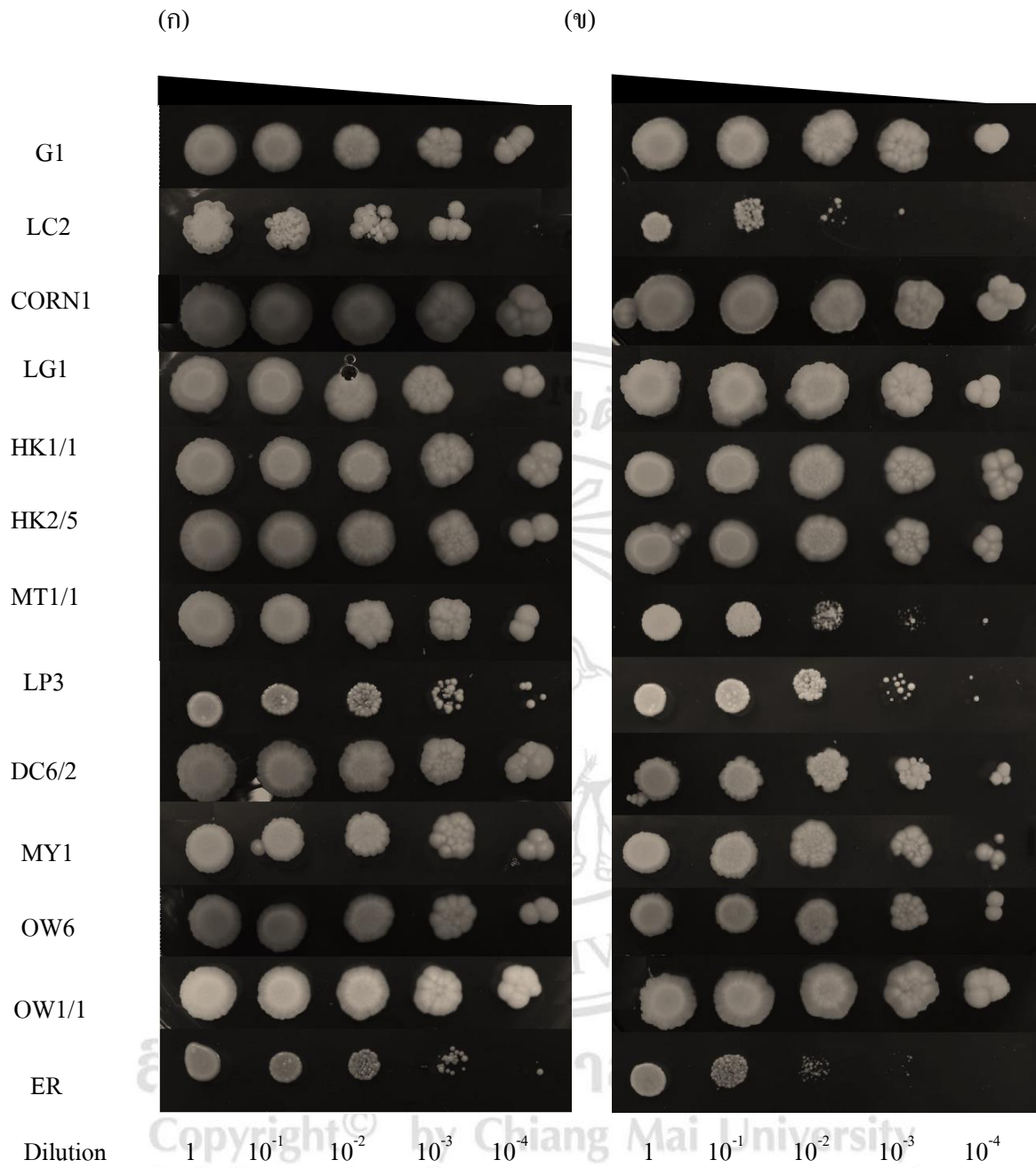
G1  
 LC2  
 CORN1  
 LG1  
 HK1/1  
 HK2/5  
 MT1/1  
 LP3  
 DC6/2  
 MY1  
 OW6  
 OW1/1  
 ER



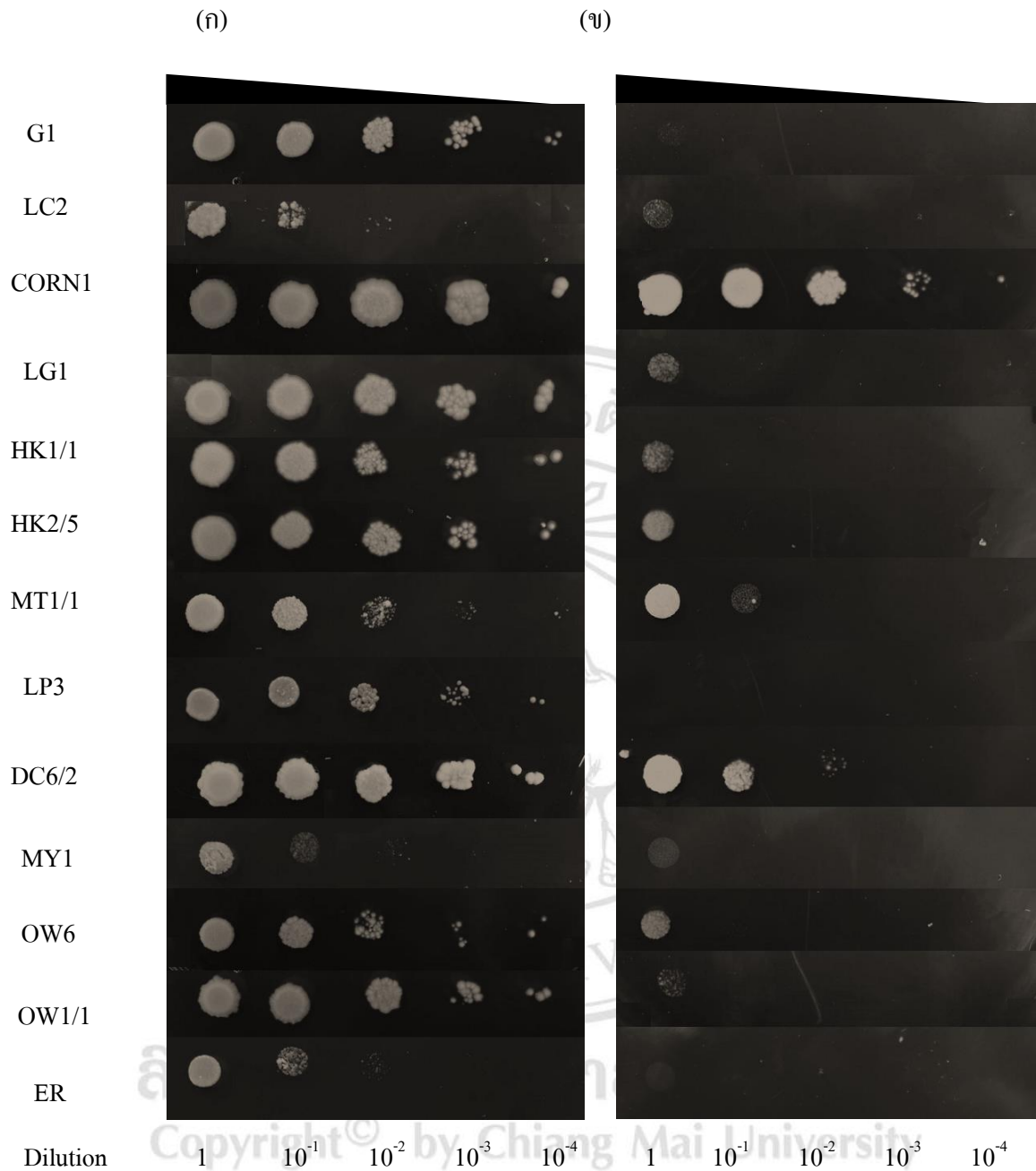
Dilution                    1    10<sup>-1</sup>    10<sup>-2</sup>    10<sup>-3</sup>    10<sup>-4</sup>

ภาพ 4.3 ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง YP ที่มีน้ำตาลกลูโคส 30% โดยวิธี Spot test หลังบ่ม 48 ชั่วโมง

บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของเอทานอลที่ 5, 10, 12 และ 15% (v/v) พบว่าถึงแม้การเจริญเติบโตของเชื้อลดลงเมื่อดูจากขนาดโคโลนีแต่ถือว่าเชื้อส่วนใหญ่ยังสามารถเจริญเติบโตได้จนถึงที่ 10% เอทานอล ถึงแม้ว่าเชื้อไอโซเลท LC2, MT1/1 และ LP3 รวมทั้งเชื้อควบคุม ER จะมีการเจริญที่ลดลงชัดเจนที่เอทานอล 10% และเมื่อเพิ่มเอทานอลที่ 12 และ 15% พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีการเจริญที่ลดลงอย่างชัดเจน เชื้อ CORN1 พบความสามารถในการเจริญดีที่สุดที่เอทานอล 15% (v/v) (ภาพ 4.4 และ 4.5)



ภาพ 4.4 ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่มีเอทานอล (ก): 5% ; (ข): 10% โดยวิธี Spot test หลังบ่ม 48 ชั่วโมง

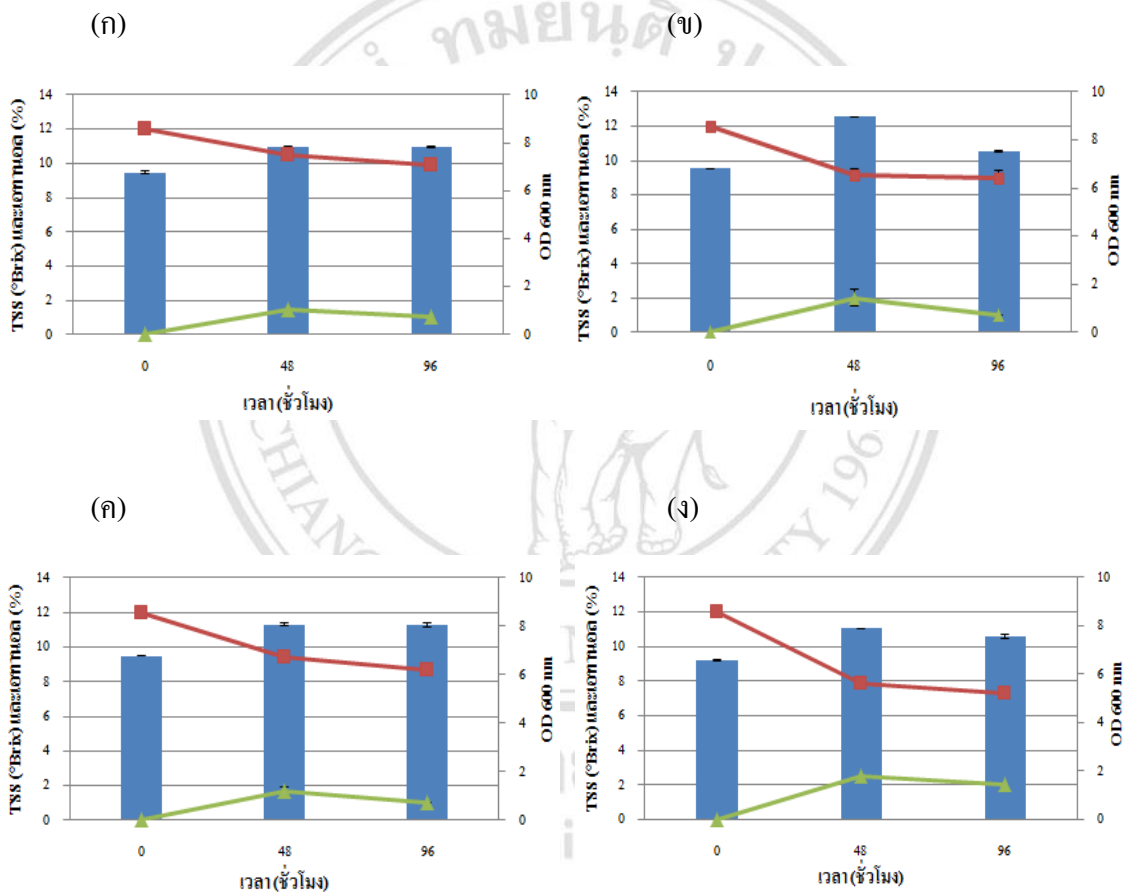


ภาพ 4.5 ความสามารถในการเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่มีเอทานอล (ก): 12% ; (ข): 15% โดยวิธี Spot test หลังบ่ม 48 ชั่วโมง

จากนั้นคัดเลือกเชื้อยีสต์ 3 ไอโซเลทเพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาล คือเชื้อ LC2, LP3 และ OW1/1 เปรียบเทียบกับเชื้อควบคุมคือ ER เนื่องจากความสามารถในการผลิตเอทานอล และคุณสมบัติที่ต่างกัันคือ เชื้อ LC2 ผลิตฟองแก๊สน้อย เชื้อ LP3 ไม่มีการผลิตฟองแก๊สและเกิดการจับตัวเป็นก้อนของเซลล์ และ OW1/1 มีการผลิตฟองแก๊สมาก

## 5. การศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาล

คัดแยกเชื้อยีสต์ 3 ไอโซเลทจาก 12 ไอโซเลท คือ LC2, LP3 และ OW1/1 มาศึกษาความสามารถในการใช้อาหารกากน้ำตาลในการผลิตเอทานอลเปรียบเทียบกับเชื้อควบคุม ER โดยใช้กากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 12 °Brix เวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0, 48 และ 96 พบว่า เชื้อควบคุม ER สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ 2.5% เชื้อ LP3 สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้ 2% เชื้อ OW1/1 สามารถผลิตเอทานอลได้ 1.67% และเชื้อ LC2 ผลิตเอทานอลได้น้อยที่สุดที่ 1.5% โดยปริมาณเอทานอลสูงสุดที่วัดได้ วัดได้จากชั่วโมงที่ 48 ในทุกตัวอย่าง (ภาพ 4.6)



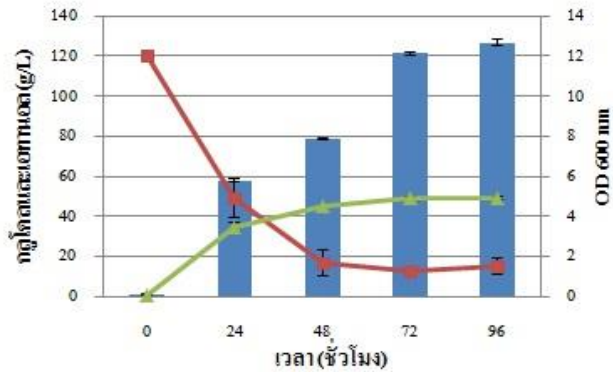
ภาพ 4.6 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารกากน้ำตาล ที่ 40°C (ก): LC2 ; (ข): LP3 ; (ค): OW1/1 ; (ง): ER จำนวนเซลล์, ■ กลูโคส, ▲ เอทานอล

## 6. การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C และ 42°C

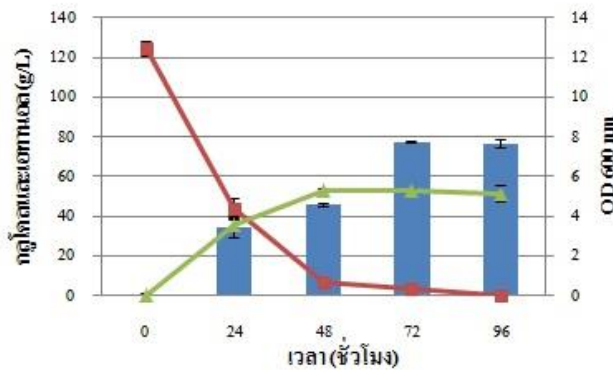
ผลการทดลองพบว่า เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่ 40°C โดยเชื้อไอโซเลท LP3 ได้เอทานอลสูงสุด 49.3 g/L (ภาพ 4.7 ก) ที่ชั่วโมงที่ 96 และเชื้อไอโซเลท OW1/1 ได้เอทานอล

สูงสุด 53.2 g/L (ภาพ 4.7 ข) ที่ชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่เชื้อ ER สามารถผลิตเอทานอลได้ 52.0 g/L (ภาพ 4.7 ค) ชั่วโมงที่ 48

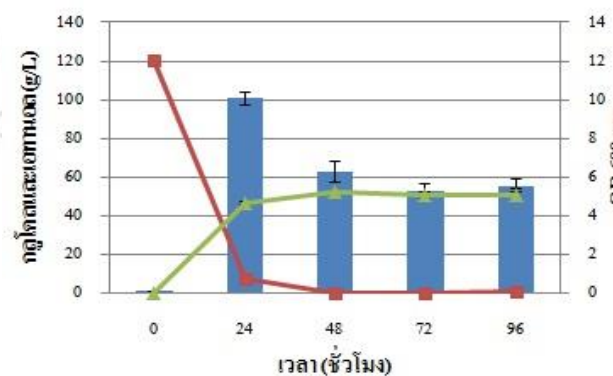
(ก)



(ข)



(ค)



ภาพ 4.7 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 120 g/L ที่ 40°C (ก): LP3 ; (ข): OW1/1 ; (ค): ■ ER OD 600 nm, ■ กลูโคส, ▲ เอทานอล

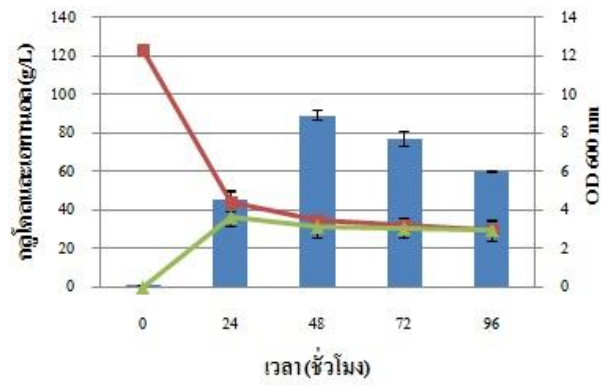
จากปริมาณเอทานอลที่ได้ สามารถนำมาคำนวณค่า parameter ต่างๆ ได้ คือ ค่าผลผลิต (yield), ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตทางทฤษฎี (%theoretical yield) และ productivity ดังตาราง 4.5

ตาราง 4.5 ค่าพารามิเตอร์ที่สามารถคำนวณได้ ที่ 40°C

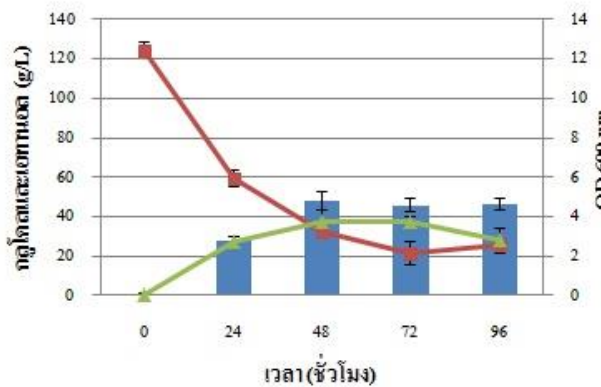
ไอโซเลท	Yield	%Theoretical Yield	Productivity (g/L/h)
LP3	0.46(96h)	89.90	0.51
OW1/1	0.45(48h)	87.85	1.10
Ethanol Red	0.42(48h)	82.94	1.08

จากผลการทดสอบความสามารถในการเจริญและผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ 2 ไอโซเลทคือ LP3 และ OW1/1 เปรียบเทียบกับเชื้อควบคุม ER ที่ 42°C พบว่าเชื้อไอโซเลท LP3 ได้เอทานอลสูงสุดที่ 36.4g/L (ภาพ 4.8 ก) ที่ชั่วโมงที่ 24 และเชื้อไอโซเลท OW1/1 ได้เอทานอลสูงสุด 37.1 g/L (ภาพ 4.8 ข) ที่ชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่เชื้อ ER สามารถผลิตเอทานอลได้ 26.0 g/L (ภาพ 4.8 ค) ชั่วโมงที่ 48

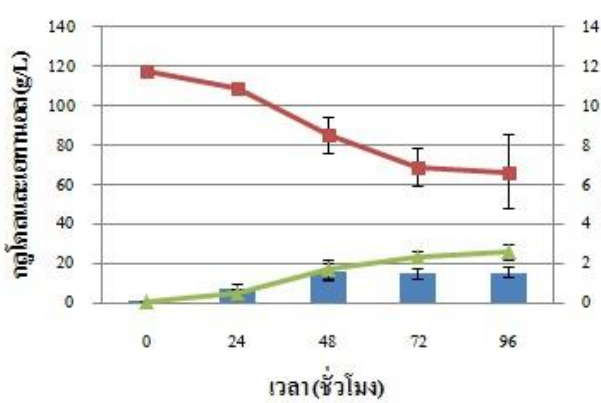
(ก)



(ข)



(ค)



ภาพ 4.8 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 120 g/L ที่ 42°C (ก): LP3 ; (ข): OW1/1 ; (ค): ER ■ OD 600 nm, ■ กลูโคส, ▲ เอทานอล

จากปริมาณเอทานอลที่ได้ สามารถนำมาคำนวณค่า parameter ต่างๆ ได้ คือ ค่าผลผลิต (yield), ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตทางทฤษฎี (%theoretical yield) และ productivity ดังตาราง 4.6

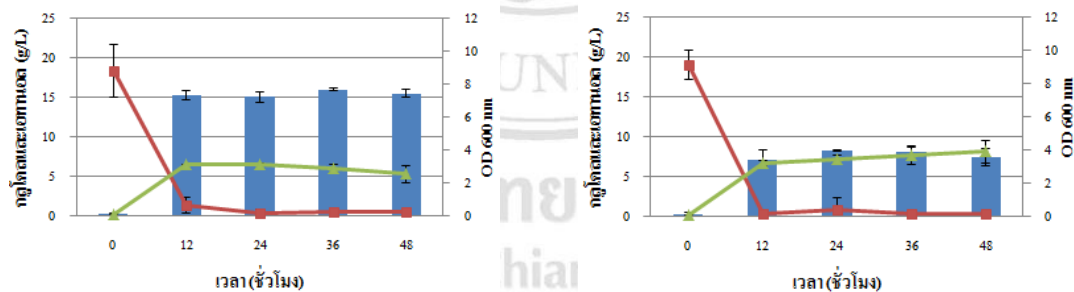
ตาราง 4.6 ค่าพารามิเตอร์ที่สามารถคำนวณได้ 42°C

ไอโซเลท	Yield	%Theoretical Yield	Productivity (g/L/h)
LP3	0.46(24h)	89.98	1.52
OW1/1	0.41(48h)	79.92	0.77
Ethanol Red	0.50(96h)	98.07	0.27

## 7. การศึกษาการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลว

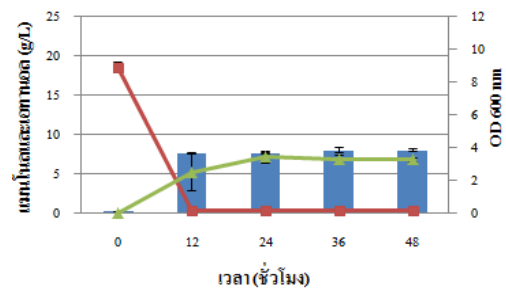
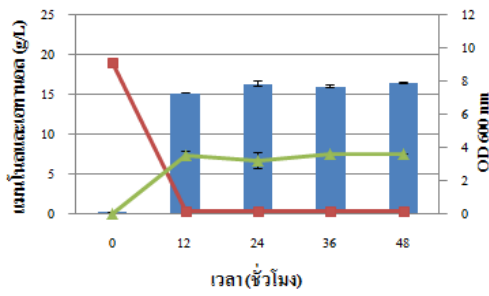
ผลการทดลองเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว YP ที่มีน้ำตาลแต่ละชนิด 20 g/L คือ กลูโคส แมนโนส กาแลกโตส ไซโลส และซูโครส พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทให้ผลการทดลองเหมือนกันคือ เชื้อทั้งสองสามารถสามารถใช้และผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาล กลูโคส (ภาพ 4.9 ก) และแมนโนส (ภาพ 4.9 ข) แต่ไม่สามารถใช้หรือผลิตเอทานอลจากน้ำตาล ไซโลส (ภาพ 4.9 ค) กาแลกโตส (ภาพ 4.9 ง) และซูโครส (ภาพ 4.9 จ) ได้ โดยเชื้อ LP3 สามารถผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาลกลูโคสและแมนโนสสูงสุดได้เท่ากับ 6.7 และ 7.6 g/L ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ OW1/1 สามารถผลิตได้ 8.2 และ 7.2 g/L ตามลำดับ

(ก) กลูโคส

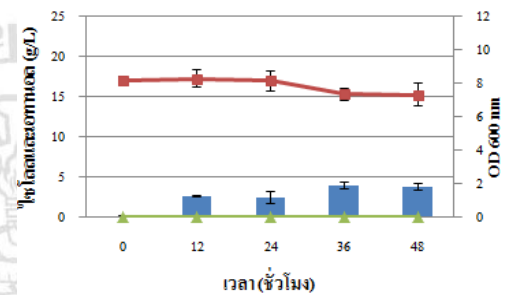
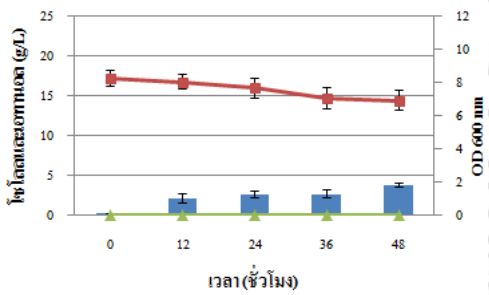


ภาพ 4.9 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YP ที่มีน้ำตาลต่างชนิดกันที่ 40°C (ซ้าย): LP3 ; (ขวา): OW1/1 ■ OD 600 nm, ■ น้ำตาลชนิดต่างๆ, ■ เอทานอล

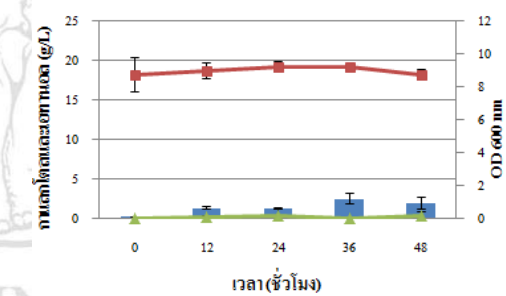
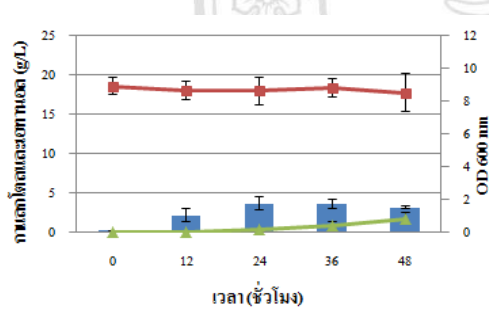
(ข) แมนโนส



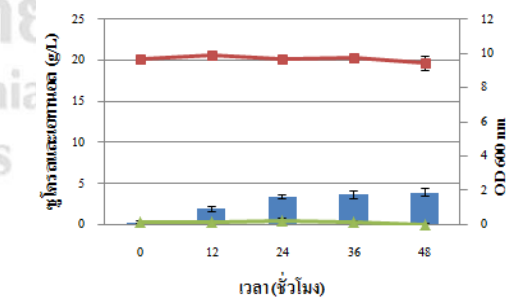
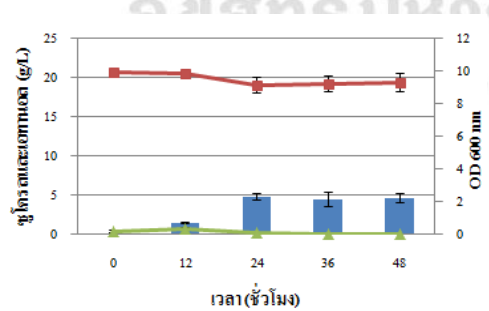
(ค) โซโลส



(ง) กาแลกโตส



(จ) ซูโครส



ภาพ 4.9 (ต่อ) การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YP ที่มีน้ำตาลต่างชนิดกันที่ 40°C (ซ้าย): LP3 ; (ขวา): OW1/1 ■ OD 600 nm, ■ น้ำตาลชนิดต่างๆ, ▲ เอทานอล

จากปริมาณเอทานอลที่ได้ สามารถนำมาคำนวณค่า parameter ต่างๆ ได้ คือ ค่าผลผลิต (yield), ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตทางทฤษฎี (%theoretical yield) และ productivity ดังตาราง 4.7

ตาราง 4.7 ค่าพารามิเตอร์ที่สามารถคำนวณได้จากอาหารน้ำตาลกลูโคสและแมนโนส

ไอโซเลท	น้ำตาลกลูโคส		
	Yield	%Theoretical Yield	Productivity (g/L/h)
LP3	0.39(12h)	75.41	0.54
OW1/1	0.44(48h)	85.50	0.17
ไอโซเลท	น้ำตาลแมนโนส		
LP3	0.41(12h)	80.11	0.61
OW1/1	0.39(24h)	76.74	0.30

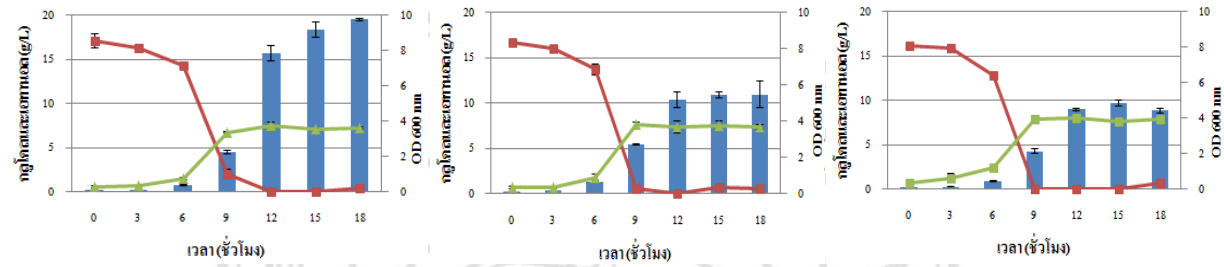
#### 8. การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลวและคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะ

การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่แยกได้ทั้ง 2 ไอโซเลท เปรียบเทียบกับเชื้อ ER ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40 และ 42°C โดยอาศัยการคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) ที่ได้ จากค่า OD ที่วัดได้ทุกๆ 1.5 ชั่วโมงจากการเลี้ยงเชื้อ พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 และ 40°C อัตราการเจริญจำเพาะ ที่คำนวณได้ระหว่างเชื้อ OW1/1 และ ER ไม่มีความแตกต่างกันมาก แต่ที่ 42°C เชื้อ OW1/1 มีค่าที่คำนวณได้มากกว่าอย่างเห็นได้ชัด อย่างไรก็ตามค่าที่คำนวณได้ของเชื้อ LP3 มีค่าสูงที่สุดทั้ง 3 อุณหภูมิ (ตาราง 4.8 และภาพ 4.10)

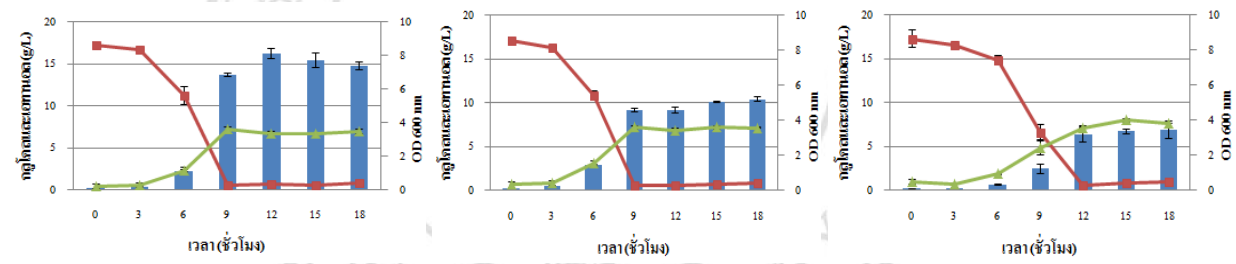
ตาราง 4.8 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 42°C

ไอโซเลท	30°C	40°C	42°C
LP3	0.54	0.63	0.57
OW1/1	0.46	0.45	0.47
Ethanol Red	0.47	0.42	0.31

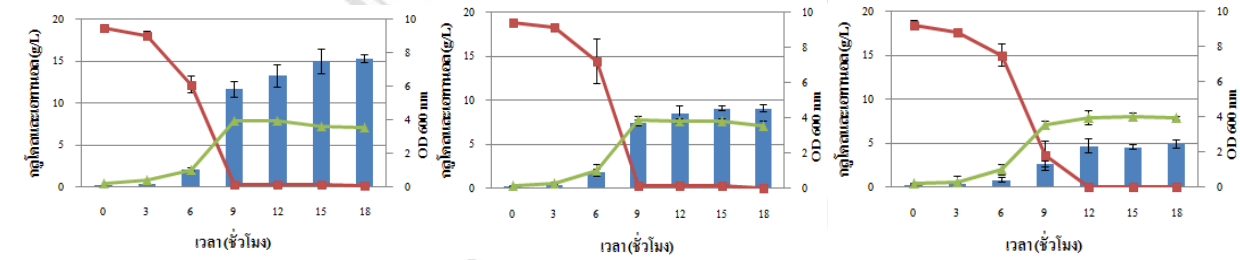
(ก)



(ข)



(ค)



ภาพ 4.10 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ LP3 (ซ้าย), OW1/1 (กลาง), ER (ขวา) ในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาล 2% บ่มที่ (ก): 30°C ; (ข): 40°C ; (ค): 42°C

## 9. การทดสอบเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ ร่วมกับเชื้อควบคุมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 20%

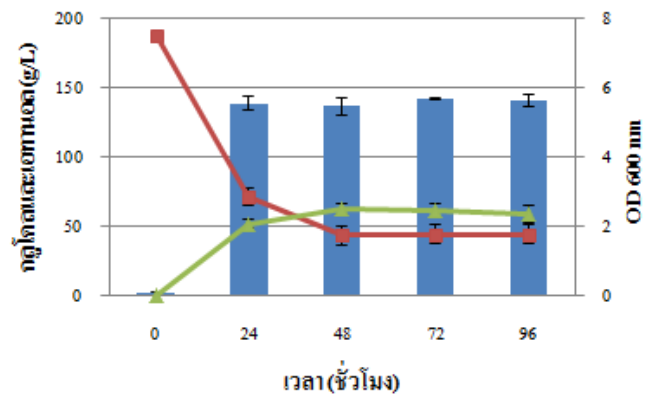
เมื่อนำเชื้อ OW1/1 ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดมาทำการทดลองเลี้ยงร่วมกับเชื้อ ER ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีและมีการรายงานว่าสามารถทนต่อเอทานอลในปริมาณที่ค่อนข้างสูงได้ (Felix *et al.*, 2014) โดยการทดลองแบ่งเป็น 3 สภาวะคือ

- 1) เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดคือ OW1/1 และ ER พร้อมกันที่ชั่วโมงที่ 0
- 2) เมื่อเลี้ยงเชื้อ ER ก่อนที่ชั่วโมงที่ 0 และหลังจากนั้น 24 ชั่วโมงเติมเชื้อ OW1/1 ลงในฟลาสหมัก
- 3) เมื่อเลี้ยงเชื้อ OW1/1 ก่อนที่ชั่วโมงที่ 0 และหลังจากนั้น 24 ชั่วโมงเติมเชื้อ ER ลงในฟลาสหมัก

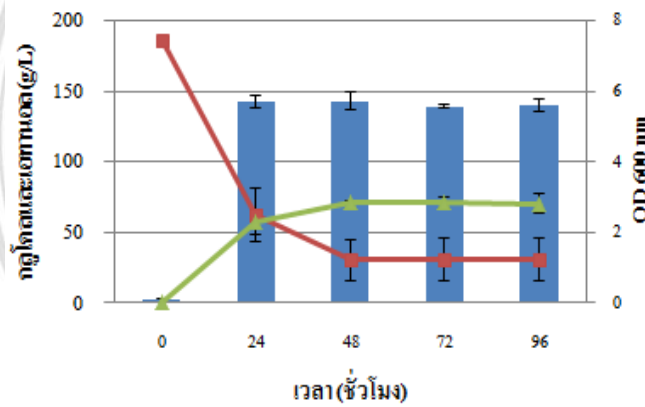
ผลการทดลองพบว่า เมื่อดูจากปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ในแต่ละสภาวะ สภาวะที่เลี้ยงเชื้อ ER เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเติมเชื้อ OW1/1 พบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงที่สุดที่ 71.1 g/L ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับเมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันที่ชั่วโมงที่ 0 ที่สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้ 67.4 g/L และสภาวะที่เลี้ยงเชื้อ OW1/1 ก่อนเติมเชื้อ ER ที่ชั่วโมงที่ 24 โดยสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 63.3 g/L (ภาพ 4.11)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

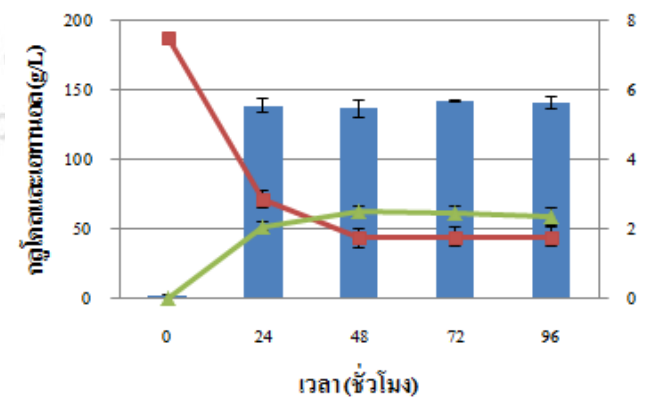
(ก)



(ข)



(ค)



ภาพ 4.11 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20% ที่ 40°C (ก): สภาวะที่ 1 ; (ข): สภาวะที่ 2 ; (ค): สภาวะที่ 3 — OD 600 nm, —■— กลูโคส, —▲— เอทานอล

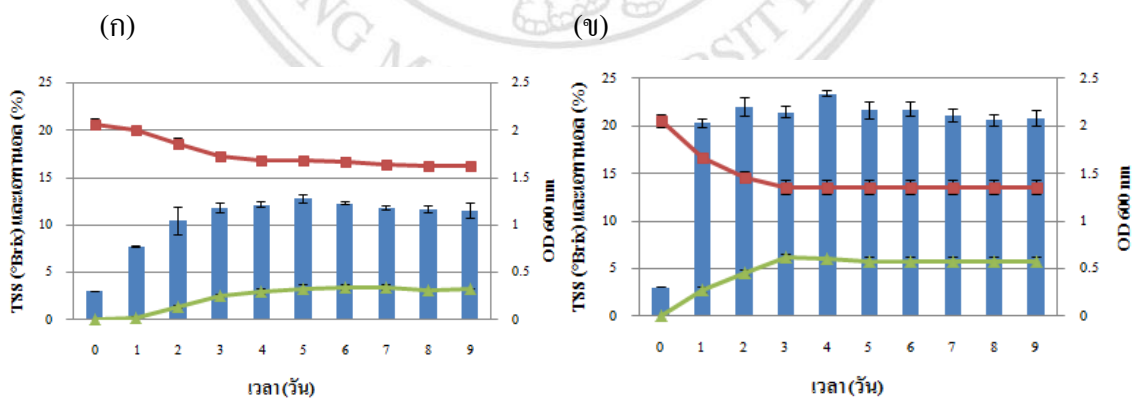
จากปริมาณเอทานอลที่ได้ สามารถนำมาคำนวณค่า parameter ต่างๆ ได้ คือ ค่าผลผลิต (yield), ค่าเปอร์เซ็นต์ผลผลิตทางทฤษฎี (%theoretical yield) และ productivity ดังตาราง 4.9

ตาราง 4.9 ค่าพารามิเตอร์ที่สามารถคำนวณได้ จากการศึกษการเลี้ยงเชื้อร่วมกับเชื้อควบคุม

สถานะ	Yield	%Theoretical Yield	Productivity (g/L/h)
1	0.44(48h)	86.48	1.40
2	0.46(48h)	89.60	1.48
3	0.44(48h)	86.99	1.32

10. การทดสอบเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ในถังหมักขนาด 8 ลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี น้ำตาลกลูโคส 20%

เมื่อเลี้ยงเชื้อ OW1/1 และเชื้อควบคุม ER ในถังหมักขนาด 8 ลิตร และใช้อาหาร YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20% ปริมาตร 5 ลิตร โดยให้เชื้อตั้งต้นภายในถังหมักมีจำนวน  $1.7 \times 10^7$  CFU/ml สำหรับเชื้อ OW1/1 และ  $8 \times 10^6$  CFU/ml สำหรับเชื้อ ER ซึ่งจะมีค่า OD เท่ากับ 0.3 โดยพบว่าเชื้อ ER สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า OW1/1 คือได้ค่าเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 6.2% (ภาพ 4.12 ข) และ 3.4% (ภาพ 4.12 ก) ตามลำดับ โดย ER สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้ในวันที่ 3 ในขณะที่ OW1/1 ผลิตเอทานอลสูงสุดได้วันที่ 6



ภาพ 4.12 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20% ในถังหมักขนาด 5 ลิตร (ก): OW1/1 ; (ข): ER ■ OD 600 nm, ■ กลูโคส, ▲ เอทานอล

## 11. การระบุเชื้อที่คัดแยกได้โดยใช้เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์

จากการระบุชนิดของเชื้อ 2 ไอโซเลท โดยการใส่ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน D1/D2 ของยีน LSU rDNA (the large subunit ribosomal RNA) และทำการ BLAST เทียบกับฐานข้อมูลได้ผลดังตาราง 4.10 โดยพบว่าเชื้อ LP3 สามารถระบุชนิดของเชื้อได้คือ *Candida glabrata* และเชื้อ OW1/1 สามารถระบุชนิดของเชื้อได้คือ *Pichia kudriavzevii*

ตาราง 4.10 แสดงผลการระบุเชื้อ

ไอโซเลท	ผลการระบุเชื้อ	Percent identity
LP3	<i>Candida glabrata</i>	99.0
OW1/1	<i>Pichia kudriavzevii</i>	100



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## บทที่ 5

### อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากเชื้อจำนวน 55 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 12% (w/v) เป็นองค์ประกอบ ที่อุณหภูมิ 40°C พบว่ามียีสต์จำนวน 54 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ในปริมาณตั้งแต่ 0.8-5.2% โดยเชื้อที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดจำนวน 8 ไอโซเลท (OW6, OW1/1, OW2/1, LC2, LC4, LC5, LG1 และ DC6/2) สามารถแยกได้จากตัวอย่างผลไม้ ลูกแพ้ง ขยะจำพวกเปลือกผลไม้และใบไม้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Auesukaree และคณะ (2012) ที่สามารถแยกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอทานอลได้ดีที่ 41°C จากตัวอย่างผลไม้ในประเทศไทย

เมื่อศึกษาลักษณะทางสรีระวิทยาของเชื้อ 12 ไอโซเลทที่คัดเลือกมาทำการศึกษาต่อโดยอาศัยความสามารถในการผลิตเอทานอลและลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีการสร้างโคมในปริมาณมาก และมีการสร้างฝ้าที่บริเวณผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเกิดการลอยตัวของเซลล์ (floatation) ยกเว้น ไอโซเลท LP3 ซึ่งเป็นเพียงไอโซเลทเดียวที่เกิดการจับกลุ่มกัน (flocculation) ระหว่างการหมัก โดยลักษณะการลอยตัวของเซลล์และการตกตะกอนจะทำให้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้น เนื่องจากเซลล์มีการสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื่อน้อย และจะส่งผลให้น้ำตาลเหลือในถังหมักเป็นปริมาณมาก แต่อย่างไรก็ตามคุณลักษณะนี้มีผลดีสำหรับการหมักแบบต่อเนื่อง เนื่องจากสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ง่ายในขั้นตอน Cell recycling (Basso *et al.*, 2008)

จากการทดสอบความสามารถในการทนอุณหภูมิ 40 และ 42°C พบว่าเชื้อทั้ง 12 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 42°C เมื่อเทียบกับการเจริญของเชื้อควบคุม ER ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเชื้อที่คัดแยกได้ดังกล่าวมีแนวโน้มที่จะพัฒนาไปใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิสูง เช่น ประเทศไทยได้ นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อ 11 ไอโซเลท จาก 12 ไอโซเลทที่ทำการศึกษาทดสอบ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 30% (w/v) เป็นองค์ประกอบ และเชื้อส่วนใหญ่สามารถเจริญบนอาหารที่มีเอทานอลเป็นองค์ประกอบที่ความเข้มข้น 10% (v/v) ได้ ยกเว้นเชื้อ LC2, MT1/1 และ LP3 รวมทั้งเชื้อควบคุม ER ที่พบการเจริญของเชื้อลดลงชัดเจนที่ความเข้มข้นเอทานอล 10% (w/v) โดยทั่วไปแล้วยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะมีความสามารถในการทนต่อเอทานอลที่แตกต่างกัน

ไป ในงานวิจัยของ Costa *et al* (2014) ศึกษาความสามารถในการทนต่อเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* LBM-1, CAT-1 และ PE-2 และเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* UFV-3, ATCC 8554 และ CCT 4086 ซึ่งทั้งหมดเป็นเชื้อทางการค้าที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงในปัจจุบัน พบว่าที่ 37°C เชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีที่ความเข้มข้นเอทานอล 8% (v/v) ในขณะที่เชื้อ *K. marxianus* ทั้ง 3 สายพันธุ์เจริญได้เพียงที่ความเข้มข้นเอทานอล 4% (v/v) เท่านั้น ที่ 42°C เชื้อทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบสามารถเจริญได้ดีถึงความเข้มข้นเอทานอล 4% (v/v) เท่านั้น จะเห็นว่าเชื้อที่คัดแยกได้ทั้งหมดในงานวิจัยนี้สามารถเจริญเติบโตที่ความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่า เมื่อเทียบกับงานวิจัยของ Costa *et al* ทั้งนี้ความสามารถในการเจริญที่ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลสูงจะทำให้เชื้อมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้ดี (Basso *et al.*, 2008) ในประเทศไทย Charoensuk *et al* (2013) คัดแยกยีสต์ทนร้อนและพบยีสต์ที่สามารถทนเอทานอลได้สูงถึง 15% (w/v) โดยสามารถระบุชนิดของเชื้อได้เป็น *Pichia kudriavzevii*

โดยปกติแล้ว กระบวนการหมักเอทานอลโดยยีสต์จะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดในปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อคิดเป็นหน่วย % (w/v) หรือ % (v/v) ซึ่งเป็นผลผลิตเอทานอลร้อยละโดยทฤษฎี (อภิศรี, 2549) แต่จากผลการทดลอง เมื่อนำไอโซเลท LC2, LP3 และ OW1/1 มาเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายอยู่ (Total Soluble Solid, TSS) เท่ากับ 12°Brix พบว่า เชื้อ LC2, LP3 และ OW1/1 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเพียง 1.50 2.00 และ 1.67% (w/v) ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นผลผลิตร้อยละ 24.46, 32.61 และ 27.23 โดยทฤษฎีเท่านั้น ในขณะที่เชื้อควบคุม ER ผลิตได้ 2.50% (w/v) หรือ ผลผลิตร้อยละ 40.77 โดยทฤษฎี ซึ่งถือว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จากเชื้อทั้ง 3 ค่อนข้างต่ำ เมื่อเทียบกับเชื้อควบคุม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อยีสต์ดังกล่าวมีความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในอาหารกากน้ำตาลได้ในปริมาณต่ำ (Curtin, 1983) โดยมีรายงานว่าเชื้อทนร้อน *P. kudriavzevii* ที่คัดแยกได้ในประเทศไทยไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสในการผลิตเอทานอลได้ (Charoensuk *et al.*, 2013) ซึ่งดูได้จากปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่หลังกระบวนการหมัก (ภาพ 4.6) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากากน้ำตาลอาจจะไม่ใช่แหล่งอาหารที่มีความเหมาะสมในการเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวเพื่อผลิตเอทานอล ดังนั้นการหาแหล่งของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากยีสต์ที่คัดเลือกมาได้นี้ รวมไปถึงการศึกษาปัจจัยที่จำเป็นต่อกระบวนการหมัก อาทิ ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ และรูปแบบการหมัก (แบบกะ แบบกึ่งกะ และแบบต่อเนื่อง) จึงมีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักที่คณะผู้วิจัยต้องการต่อยอดเพื่อพัฒนาตัวเชื้อดังกล่าวไปใช้ในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงต่อไป

ผลการระบุชนิดของเชื้อ 2 ไอโซเลทที่ผลิตเอทานอลได้สูงจากกากน้ำตาล โดยการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน D1/D2 ของยีน LSU rDNA (the large subunit ribosomal RNA) และทำการ BLAST เทียบกับฐานข้อมูล โดยพบว่าเชื้อ LP3 สามารถระบุชนิดของเชื้อได้คือ *Candida glabrata* ที่ค่าความเหมือน 99.0% และเชื้อ OW1/1 สามารถระบุชนิดของเชื้อได้คือ *Pichia kudriavzevii* ที่ค่าความเหมือน 100%

เมื่อนำเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท คือ LP3 และ OW1/1 มาทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 และ 42°C เปรียบเทียบกับเชื้อควบคุม *S. cerevisiae* Ethanol Red (ER) ซึ่งเป็นเชื้อทางการค้าจากบริษัท Leaf Technology ประเทศสหรัฐอเมริกา จากผลการทดลอง พบว่าที่อุณหภูมิ 40°C เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถผลิตเอทานอลได้ดี โดยเชื้อ LP3 ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 49.3 g/L ที่ชั่วโมงที่ 96 และเชื้อไอโซเลท OW1/1 ได้เอทานอลสูงสุด 53.2 g/L ที่ชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่เชื้อ ER สามารถผลิตเอทานอลได้ 52.0 g/L ชั่วโมงที่ 48 และสามารถคำนวณค่าผลผลิต (yield) และผลผลิตร้อยละทางทฤษฎีของเชื้อ LP3, OW1/1 และ ER ได้เท่ากับ 0.46, 0.45 และ 0.42 g/g และ 89.90, 87.85 และ 82.94 ตามลำดับ ในขณะที่อุณหภูมิ 42°C เชื้อไอโซเลท LP3 และ OW1/1 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ 36.4 และ 37.1 g/L ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าเชื้อ ER ที่ให้ผลิตเอทานอลเพียง 26.0 g/L เท่านั้น และสามารถคำนวณค่าผลผลิต (yield) และผลผลิตร้อยละทางทฤษฎีของเชื้อ LP3, OW1/1 และ ER ได้เท่ากับ 0.46, 0.41 และ 0.50 g/g และ 89.98, 79.92 และ 98.07 ตามลำดับ นอกจากนี้ เชื้อ OW1/1 ที่พบว่าเป็นเชื้อที่ให้ปริมาณผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดยังสามารถให้ค่าผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงซึ่งสั้นกว่าเชื้อ ER ที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง ดังนั้น การหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อที่แยกมาได้นี้จึงมีศักยภาพในการลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการลง เนื่องจากกระบวนการหมักสั้นขึ้น ทำให้ช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการเดินถังหมักและลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ จากการหมักที่ใช้เวลานาน ซึ่งถือว่าเป็นข้อได้เปรียบเชิงอุตสาหกรรม หากมีการนำเชื้อที่คัดแยกได้ไปใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Buddiwong *et al* (2014) ที่สามารถแยกเชื้อ *P. kudriavzevii* ในประเทศไทยที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C โดยให้ค่าผลผลิต (yield) อยู่ในช่วง 0.33-0.36 g/g ที่ 40°C ในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 16% (w/v) ได้ ซึ่งค่าที่ได้้น้อยกว่าที่ได้จากงานวิจัยนี้ รวมทั้งเชื้อที่ Buddiwong *et al* คัดแยกได้มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดที่ 37°C โดยให้ค่าผลผลิต (yield) อยู่ในช่วง 0.37-0.40 g/g ในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 16% (w/v)

จากการศึกษาพบว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลท LP3 และ OW1/1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นส่วนประกอบในกากน้ำตาลได้ แต่ไม่สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสได้ ซึ่งเป็นน้ำตาลอีกชนิดหนึ่งที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในกากน้ำตาล ดังนั้นจึงทำการศึกษาความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ เพื่อใช้ในการเลือกวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตเอทานอลต่อไป โดยพบว่าเชื้อสามารถใช้น้ำตาลแมนโนสในการผลิตเอทานอลได้ดี อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทไม่สามารถใช้น้ำตาลกาแลคโตสและไซโลส ในการผลิตเอทานอลได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่า เชื้อยีสต์ *C. glabrata* สามารถผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาลกลูโคส ส่วนเชื้อ *P. kudriavzevii* สามารถผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส (Fidel *et al.*, 1999; Jutakanoke *et al.*, 2014)

อัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) ที่คำนวณได้ของเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทกับเชื้อควบคุม ER ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม *S. cerevisiae* พบว่าเชื้อ LP3 ให้ค่าการเจริญที่สูงสุดทั้งที่อุณหภูมิ 30, 40 และ 42°C ทั้งนี้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสามารถใช้เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อได้ โดยค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่สูงกว่าแสดงว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีกว่า ค่าที่คำนวณได้จากงานวิจัยนี้ถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่สูง เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยของ Auesukaree *et al* (2012) ซึ่งทำการคัดแยกเชื้อ *S. cerevisiae* ทนร้อน และศึกษาการเจริญโดยอาศัยอัตราการเจริญจำเพาะ ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 41°C โดยค่าที่คำนวณได้อยู่ในช่วง 0.12-0.39 ซึ่งอยู่ในช่วงน้อยกว่าค่าที่คำนวณได้จากการทดลองนี้ที่อยู่ในช่วง 0.31-0.63 ถึงแม้ช่วงอุณหภูมิที่ใช้จะแตกต่างกันเล็กน้อย โดยวิธีที่ใช้ในการศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะของงานวิจัยนี้และงานวิจัยของ Auesukaree *et al* อาศัยค่า OD 600 nm ในการวัดการเจริญในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% (w/v) เช่นเดียวกัน

เมื่อศึกษาการเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดร่วมกัน (Co-culture fermentation) พบว่าสภาวะที่เลี้ยงเชื้อ ER เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเติมเชื้อ OW1/1 พบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงที่สุดที่ 71.1 g/L ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับเมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันที่ชั่วโมงที่ 0 ที่สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้ 67.4 g/L และสภาวะที่เลี้ยงเชื้อ OW1/1 ก่อนเติมเชื้อ ER ที่ชั่วโมงที่ 24 โดยสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 63.3 g/L ให้ค่าผลผลิต (yield) เท่ากับ 0.44, 0.46 และ 0.44 g/g ตามลำดับ และผลผลิตร้อยละทางทฤษฎีเท่ากับ 86.48, 89.60 และ 86.99 ตามลำดับ และค่า productivity เท่ากับ 1.40, 1.48 และ 1.32 (g/L/h) ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ค่าผลผลิต (yield) ที่ได้จากทั้ง 3 สภาวะ แตกต่างจากการเลี้ยงเชื้อเพียงชนิดเดียวที่ 40°C เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ทั้งนี้อาจเปลี่ยนเชื้อที่นำมาใช้ร่วมจาก ER เป็นเชื้อทนร้อนชนิดอื่นที่สามารถทนเอทานอลได้ที่มีความเข้มข้นสูงกว่า ER ซึ่งจากการทดลองนี้ เชื้อ ER สามารถเจริญได้ดีที่ปริมาณเอทานอล 5% เท่านั้น เนื่องจากผลการทดลองพบว่าสภาวะที่ให้ผลผลิตเอทานอล

มากที่สุดคือสภาวะที่ลงเชื้อ ER ก่อน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อ OW1/1 สามารถทนเอทานอลได้ดีกว่าเชื้อ ER และผลิตเอทานอลต่อไปได้เมื่อปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น

จากการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 8 ลิตร พบว่า ER สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า OW1/1 คือได้ค่าเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 6.2 และ 3.4% ตามลำดับ โดย ER สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้ในวันที่ 3 ในขณะที่ OW1/1 ผลิตเอทานอลสูงสุดได้วันที่ 6 จะเห็นว่าเอทานอลที่เชื้อทั้ง 2 ชนิดผลิตได้ มีปริมาณน้อยกว่าเอทานอลที่คาดว่าจะได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคส 20% (w/v) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหลายปัจจัย เช่น ในการหมักเอทานอล อากาศเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างมากในการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ นอกจากนั้น ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่ใส่ลงไปถังหมักยังมีส่วนสำคัญ ซึ่งจะช่วยให้การหมักเกิดเร็วขึ้น และลดการตายของเซลล์ในช่วงเริ่มต้น หลังจากการลงเชื้อ รวมทั้งยังพบว่าปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ inoculum size ที่เพิ่มขึ้น และปริมาณ methanol และ aldehyde ในถังหมักจะลดลงต่ำสุดเมื่อ inoculum size เท่ากับ 30% (Arshad *et al.*, 2008) ซึ่งในงานวิจัยของ Yuangsaad *et al.* (2013) ได้ทำการหมักเอทานอลในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยใช้เชื้อ *P. kudriavzevii* และพบว่าเมื่อให้อากาศในถังหมักที่ 0.1 vvm และกวนที่ 300 rpm พบว่าเชื้อให้ผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎีถึง 79.9%

จากผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ของเชื้อ LP3 พบว่าตรงกับเชื้อ *C. glabrata* เป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ *C. albicans* ที่จัดเป็นเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic pathogen) ในมนุษย์จึงมักไม่มีการนำมาผลิตเอทานอลในเชิงอุตสาหกรรม (Tam *et al.*, 2015) ในขณะที่เชื้อ OW1/1 ซึ่งสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อได้เป็นเชื้อ *P. kudriavzevii* ที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากสามารถแยกได้ทั่วไปจากลูกแป้ง และยังพบว่ามีการศึกษาการหมักเอทานอลของเชื้ออย่างแพร่หลาย (Kaewkrajay *et al.*, 2014) อีกทั้ง Kitagawa *et al.* (2010) ที่สามารถแยกเชื้อ *P. kudriavzevii* MF-121 ได้ และพบว่าเชื้อมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากวัสดุกลุ่มลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากมีความทนต่อความเข้มข้นกรดและเอทานอลสูง

ในการนำยีสต์ที่คัดแยกได้ไอโซเลท OW1/1 ที่ระบุชนิดได้เป็น *P. kudriavzevii* ไปใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับถังหมักควรจะมีการให้อากาศแก่ถังหมักและมีการกวนอาหารภายในถังหมักเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอลในปริมาณที่มากขึ้นและเมื่อศึกษาจากความสามารถในการใช้น้ำตาลของเชื้อที่คัดแยกได้ พบว่าเชื้อเหมาะสมกับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบตั้งต้นประเภทที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบมาก (starch crops) ซึ่งเป็นแหล่งของน้ำตาลกลูโคส เช่น มันสำปะหลัง ที่ประเทศไทยสามารถผลิตได้ในปริมาณมาก (Kaewkrajay *et al.*, 2014) ดังนั้นยีสต์ *P. kudriavzevii* ที่คัดแยกได้จัด

ว่าเป็นยีสต์ที่ร้อนที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอลที่ดี และสามารถพัฒนาต่อยอดในอุตสาหกรรม  
การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้



**ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่**  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัย

จากการทดลองคัดแยกยีสต์ จากตัวอย่างทั้ง 15 ตัวอย่าง พบเชื้อยีสต์ 55 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีที่ 40°C และเมื่อนำเชื้อทั้ง 55 ไอโซเลทมาศึกษาความสามารถในการเจริญที่ 40 และ 45°C พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ 40°C ในขณะที่ที่ 45°C มีเพียงเชื้อ 6 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถเจริญได้ดี คือ PA1, PA2, PA3, PA4, PPA1 และ PPA2 จากการทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลในอาหารน้ำตาล YP ที่มีน้ำตาลกลูโคส 12% พบว่าเชื้อสามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้เท่ากับ 5.2%

เมื่อคัดเลือกเชื้อจำนวน 12 ไอโซเลท คือ HK1/1, HK2/5, OW6, OW1/1, MT1/1, G1, LP3, CORN1, LC2, LG1, MY1 และ DC6/2 มาศึกษาลักษณะที่สำคัญอื่นๆ คือ ความสามารถในการผลิตฟองแก๊ส (foam formation) การเกิดฝ้าที่ผิวหน้า และการจับกลุ่มกันของเซลล์ในระหว่างการหมัก (flocculation) ผลการทดลองพบว่าเชื้อส่วนใหญ่มีการผลิตโฟมมากและมีการสร้างฝ้าขาวขุ่น LP3 ซึ่งยังเป็นเพียงไอโซเลทเดียวที่เกิดการจับกลุ่มในระหว่างการหมักทั้งที่อุณหภูมิ 40 และ 42°C

การทดสอบการเจริญของเชื้อทั้ง 12 ไอโซเลท โดยเทคนิค spot test บนอาหารแข็ง YPD และบ่มที่ 40 และ 42°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อทุกไอโซเลทที่แยกได้สามารถเจริญได้ดีที่ 40°C เช่นเดียวกับเชื้อควบคุม ที่ 42°C และเมื่อทดสอบกับอาหารความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงที่ 10, 20 และ 30% และบ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้ง 12 ไอโซเลท รวมทั้ง Ethanol Red สามารถเจริญเติบโตได้ดี แต่แสดงลักษณะผิวโคโลนีขรุขระชัดเจนขึ้นเมื่อมีการเพิ่มปริมาณน้ำตาลที่ 10 และ 20% (w/v) อย่างไรก็ตามที่ 30% (w/v) เชื้อสามารถเจริญได้แต่ไม่มีการสร้างโคโลนีขรุขระที่ชัดเจน ในขณะที่มี 1 ไอโซเลทคือ CORN1 มีการเจริญลดลงอย่างเห็นได้ชัด

เมื่อศึกษาความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีเอทานอลแตกต่างกัน พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ยังสามารถเจริญเติบโตได้ถึงที่ 10% เอทานอล ถึงแม้ว่าเชื้อไอโซเลท LC2, MT1/1 และ LP3 รวมทั้งเชื้อควบคุม ER จะมีการเจริญที่ลดลงชัดเจนที่เอทานอล 10% ทั้งนี้เชื้อที่สามารถเจริญได้ดีที่สุด คือ เชื้อ CORN1

จากเชื้อ 12 ไอโซเลท คัดเลือกเชื้อ 3 ไอโซเลท คือ LP3, LC2 และ OW1/1 มาศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลจากอาหารจากน้ำตาล 12 °Brix เทียบกับเชื้อ ER พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40°C บ่มที่ 150 rpm เชื้อสามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้เท่ากับ 1.5, 2.00 และ 1.67% สำหรับเชื้อ LC2, LP3 และ OW1/1 ตามลำดับ แต่เชื้อที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดคือเชื้อ ER ที่ 2.50%

จากนั้นคัดเลือกเชื้อ 2 ไอโซเลท คือ LP3 และ OW1/1 เพื่อนำมาศึกษาการเจริญ การใช้น้ำตาล และความสามารถในการผลิตเอทานอลที่ 40°C ผลการทดลองพบว่า เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลท สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่ 40°C โดยเชื้อไอโซเลท LP3 ได้เอทานอลสูงสุด 49.3 g/L ที่ชั่วโมงที่ 96 และเชื้อไอโซเลท OW1/1 ได้เอทานอลสูงสุด 53.2 g/L ที่ชั่วโมงที่ 48 ส่วนเชื้อที่นำมาใช้เป็นเชื้อควบคุมคือ Ethanol Red สามารถผลิตเอทานอลได้ 52.0 g/L ชั่วโมงที่ 48 และสามารถคำนวณหาค่าผลผลิต (yield) ของเชื้อ LP3, OW1/1 และ Ethanol Red ได้เท่ากับ 0.46, 0.45 และ 0.42 g/g ตามลำดับ และผลผลิตร้อยละทางทฤษฎีเท่ากับ 89.90, 87.85 และ 82.94 ตามลำดับ และค่า productivity เท่ากับ 0.51, 1.10 และ 1.08 (g/L/h) ตามลำดับ

เมื่อศึกษาเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทที่ 42°C พบว่าเชื้อไอโซเลท LP3 ได้เอทานอลสูงสุดที่ 36.4 g/L ที่ชั่วโมงที่ 24 และเชื้อไอโซเลท OW1/1 ได้เอทานอลสูงสุด 37.1 g/L ที่ชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่เชื้อ Ethanol Red สามารถผลิตเอทานอลได้ 26.0 g/L ชั่วโมงที่ 48 และสามารถคำนวณหาค่าผลผลิต (yield) ของเชื้อ LP3, OW1/1 และ Ethanol Red ได้เท่ากับ 0.46, 0.41 และ 0.50 g/g ตามลำดับ และผลผลิตร้อยละทางทฤษฎีเท่ากับ 89.98, 79.92 และ 98.07 ตามลำดับ และค่า productivity เท่ากับ 1.52, 0.77 และ 0.27 (g/L/h) ตามลำดับ

ผลการศึกษาความสามารถในการใช้และผลิตเอทานอลจากน้ำตาลแต่ละชนิดเปรียบเทียบกัน คือ กลูโคส แมนโนส ไชโลส กาแลกโตส และซูโครส ในอาหาร YP ที่มีส่วนผสมของน้ำตาลแต่ละชนิด 20 g/L พบว่าเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทให้ผลการทดลองเหมือนกันคือ เชื้อทั้งสองสามารถสามารถใช้และผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาล กลูโคส และแมนโนส แต่ไม่สามารถใช้หรือผลิตเอทานอลจากน้ำตาล ไชโลส กาแลกโตส และซูโครสได้ โดยเชื้อ LP3 สามารถผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาลกลูโคส และแมนโนสสูงสุดได้เท่ากับ 6.7 และ 7.6 g/L ตามลำดับ ให้ค่าผลผลิต (yield) เท่ากับ 0.39 และ 0.44 g/g ตามลำดับ และผลผลิตร้อยละทางทฤษฎีเท่ากับ 75.41 และ 85.50 ตามลำดับ และค่า productivity เท่ากับ 0.54 และ 0.17 (g/L/h) ตามลำดับ ในขณะที่เชื้อ OW1/1 สามารถผลิตได้ 8.2 และ 7.2 g/L ตามลำดับ ให้ผลผลิต (yield) เท่ากับ 0.41 และ 0.39 g/g ตามลำดับ และผลผลิตร้อยละทางทฤษฎีเท่ากับ 80.11 และ 76.74 ตามลำดับ และค่า productivity เท่ากับ 0.61 และ 0.30 (g/L/h) ตามลำดับ

การศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่แยกได้ทั้ง 2 ชนิดเปรียบเทียบกับเชื้อ Ethanol Red ที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30, 40 และ 42°C โดยอาศัยการคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (Specific growth rate) ที่ได้จากค่า OD ผลการทดลองที่ 30°C พบว่าสามารถคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะของ LP3, OW1/1 และ Ethanol Red ได้เท่ากับ 0.54, 0.46 และ 0.47 ตามลำดับ ในขณะที่ที่ 40°C ได้ค่าเท่ากับ 0.63, 0.45 และ 0.42 ตามลำดับ และที่ 42°C ได้ค่าเท่ากับ 0.57, 0.47 และ 0.31 ตามลำดับ

การทดสอบเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ ร่วมกับเชื้อควบคุมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 200 g/L โดยเลือกเชื้อไอโซเลท OW1/1 มาเลี้ยงร่วมกับ Ethanol Red พบว่า สภาพที่เลี้ยงเชื้อ Ethanol Red เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเติมเชื้อ OW1/1 พบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงที่สุดที่ 71.1 g/L ซึ่งมากกว่าเมื่อเทียบกับเมื่อเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดพร้อมกันที่ชั่วโมงที่ 0 ที่สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้ 67.4 g/L และสภาพที่เลี้ยงเชื้อ OW1/1 ก่อนเติมเชื้อ ER ที่ชั่วโมงที่ 24 โดยสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 63.3 g/L ให้ค่าผลผลิต (yield) เท่ากับ 0.44, 0.46 และ 0.44 g/g ตามลำดับ และผลผลิตร้อยละทางทฤษฎีเท่ากับ 86.48, 89.60 และ 86.99 ตามลำดับ และค่า productivity เท่ากับ 1.40, 1.48 และ 1.32 (g/L/h) ตามลำดับ

เชื้อ OW1/1 ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาศึกษาความสามารถในการหมักในถังหมักขนาด 8 ลิตรโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20% ปริมาตร 5 ลิตร บ่มที่ 40°C พบว่าเชื้อ OW1/1 ผลิตเอทานอลได้น้อยกว่าเชื้อควบคุม ER โดยผลิตเอทานอลสูงสุดที่ 3.4 และ 6.2% ตามลำดับ

ผลการระบุเชื้อยีสต์ พบว่าเชื้อยีสต์ LP3 สามารถระบุชนิดได้คือ *Candida glabrata* ที่ค่าความเหมือน 99.0% และเชื้อไอโซเลทสามารถระบุชนิดได้เป็น *Pichia kudriavzevii* ที่ค่าความเหมือน 100%

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## เอกสารอ้างอิง

- (อภิรดี, 2549) อภิรดี ศรีภิรมย์รักษ์ การคัดแยกและแสดงลักษณะเฉพาะของยีสต์ทนร้อน เพื่อผลิตเอทานอล วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี พ.ศ. 2549
- (Abe *et al.*, 2012) Abe, T., Horiuchi, K., Kikuchi, H., Aritsuka, T., Takata, Y., Fukushi, E., Fukushi, Y., Kawabata, J., Ueno, K., Onodera, S. and Shiomi, N., “Structural Confirmation of Oligosaccharides Newly Isolated from Sugar Beet Molasses,” *Chemistry Central Journal*, 2012, 6, 89.
- (Abubaker *et al.*, 2012) Abubaker, H.O., Sulieman, A. and Elamin, H.B., “Utilization of *Schizosaccharomyces pombe* for Production of Ethanol from Cane Molasses,” *Journal of Microbiology Research*, 2012, 2(2), 36-40.
- (Alamri *et al.*, 2015) Alamri, S.A., Hashem, M., Alrumman, S.A. and Al-Qahtani, M.A., “Enhancement of Bio-Ethanol Production from Date Molasses by Non-Conventional Yeasts,” *Research Journal of Microbiology*, 2015, 10(3), 114-125.
- (Argueso *et al.*, 2009) Argueso, J.L., Carazzolle, M.F., Mieczkowski, P.A., Duarte, F.M., Netto, O.V., Missawa, S.K., Galzerani, F., Costa, G.G., Vidal, R.O., Noronha, M.F., Dominska, M., Andrietta, M.G., Andrietta, S.R., Cunha, A.F., Gomes, L.H., Tavares, F.C., Alcarde, A.R., Dietrich, F.S., McCusker, J.H., Petes, T.D. and Pereira, G.A., “Genome Structure of a *Saccharomyces cerevisiae* Strain Widely Used in Bioethanol Production,” *Genome Research*, 2009, 19, 2258-2270.
- (Arshad *et al.*, 2008) Arshad, M., Khan, Z. M., Khalil-Ur-Rehman, K., Shah, F. A. and Rajoka, M. I., “Optimization of Process Variables for Minimization of By-product Formation During Fermentation of Blackstrap Molasses to Ethanol at Industrial Scale,” *Letters in Applied Microbiology*, 2008, 47, 410-414.

- (Auesukaree *et al.*, 2012) Auesukaree, C., Koedrith, P., Saenpayavai, P., Asvarak, T., Benjaphokee, S., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Harashima, S., and Boonchird, C., "Characterization and Gene Expression Profiles of Thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* Isolates from Thai Fruits," *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 114, 144-149.
- (Badger, 2002) Badger, P.C. Ethanol from Cellulose: a General Review. In: Janick J, Whipkey A, Alexandria, VA: ASHS Press, pp. 17-21, 2002, ISBN: 097075655.
- (Bai *et al.*, 2008) Bai, F.W., Anderson, W.A. and Moo-Young, M., "Ethanol Fermentation Technologies from Sugar and Starch Feedstocks," *Biotechnology Advances*, 2008, 26, 89-105.
- (Ballesteros *et al.*, 2004) Ballesteros, M., Oliva, J.M., Negro, M.J., Manzanares, P. and Ballesteros, I., "Ethanol from Lignocellulosic Materials by a Simultaneous Saccharification and Fermentation Process (SFS) with *Kluyveromyces marxianus* CECT 10875," *Process Biochemistry*, 2004, 39, 1843-1848.
- (Banat *et al.*, 1992) Banat, I.M., Nigam, P. and Marchant, R., "Isolation of Thermotolerant, Fermentative Yeasts Growing at 52°C and Producing Ethanol at 45°C and 50°C," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 1992, 8, 259-263.
- (Basso *et al.*, 2004) Basso, L.C., Paulilo, S.C.L., Rodrigues, D.A., Basso, T.O., Amorin, A.V. and Walker, G.M., "Aluminium Toxicity Towards Yeast Fermentation and the Protective Effect of Magnesium," *International Congress on Yeasts-Yeasts in Science and Biotechnology: The Quest for Sustainable Development*, Book of Abstracts, Rio de Janeiro, 2004, pp 14.
- (Basso *et al.*, 2008) Basso, L.C., Amorim, H.V., Oliveira, A.J. and Lopes, M.L., "Yeast Selection for Fuel Ethanol Production in Brazil," *FEMS Yeast Research*, 2008, 8, 1155-1163.
- (Bothast and Schlicher, 2005) Bothast, R. J. and Schlicher, M. A., "Biotechnological Processes for Conversion of Corn into Ethanol" *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2005, 67, 19-25.

- (Buddiwong *et al.*, 2014) Buddiwong, S., Thanonkeo, S., Phetsom, J., Jaisit, P., and Thanonkeo, P., "Screening of Thermotolerant Yeast Isolated from Sugarcane Plantations in Notheastern Part of Thailand," *KKU Research Journal*, 2014, 19, 217-223.
- (Calm, 1980) Calm, C.T., "Effect of Inorganic Nitrogen Sources," *Biotechnology Letter*, 1980, 2, 111-116.
- (Caspeta and Nielsen, 2015) Caspeta, L. and Nielsen, C., "Thermotolerant Yeast Strains Adapted by Laboratory Evolution Show Trade-Off at Ancestral Temperatures and Preadaptation to Other Stresses," *mbio*, 2015, 6, 1-9.
- (Chamnipa *et al.*, 2014) Chamnipa, N., Thanonkeo, S. and Thanonkeo, P., "Isolation and Selection of Thermotolerant Yeast for Ethanol Production at High Temperature," *The 26<sup>th</sup> Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference*, Thailand, 2014, 65-71.
- (Charoensuk *et al.*, 2013) Charoensuk, K., Lauhkitikul, S., Wasikadilok, N., Sumana, B., Thanonkeo, P. and Yamada, M., "Screening and Isolation of Thermotolerant Yeast for Ethanol Fermentation," *Rajamangala University of Technology Tawan-ok International Conference*, Thailand, 2013, 1-4.
- (Chi and Arneborg, 1999) Chi, Z. and Arneborg, N., "Relation between Lipid Composition, Frequency of Ethanol-Induced Respiratory Deficient Mutants, and Ethanol Tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*," *Journal of Applied Microbiology*, 1999, 86, 1047-1052.
- (Conway, 1992) Conway, T., "The Entner-Doudoroff Pathway: History, Physiology and Molecular Biology," *FEMS Microbiology Review*, 1992, 103, 1-28.
- (Costa *et al.*, 2014) Costa, D.A., de Souza, C., Costa, P., Rodrigues, M., Santos, A., Lopes, M., Genier, H., Silveira, W. and Fietto, L., "Physiological Characterization of Thermotolerant Yeast for Cellulosic Ethanol Production," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98, 3829-3840.
- (Curtin, 1983) Curtin, L.V. *Molasses- General Considerations*, National Feed Ingredients Association, 1983.

- (Demeke *et al.*, 2013) Demeke, M.M., Dietz, H., Li, Y., Foulquié-Moreno, M.R., Mutturi, S., Deprez, S., Den Abt, T., Bonini, B.M., Liden, G., Dumortier, F., Verplaetse, A., Boles, E. and Thevelein, J.M., “Development of a D-Xylose Fermenting and Inhibitor Tolerant Industrial *Saccharomyces cerevisiae* Strain with High Performance in Lignocellulose Hydrolysates Using Metabolic and Evolutionary Engineering,” *Biotechnology for Biofuels*, 2013, 6, 89.
- (Edgardo *et al.*, 2008) Edgardo, A., Carolina, P., Manuel, R., Juanita, F. and Jaimea, B., “Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production,” *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 43, 120-123.
- (Eisentraut, 2010) Eisentraut, A., “Sustainable Production of Second Generation Biofuels Potential and Perspectives in Major Economies and Developing Countries,” *International Energy Agency*, 2010, 1-16.
- (Felix *et al.*, 2014) Felix, H. Lam, A. G., Gerald, R. F. and Stephanopoulos, G., “Engineering Alcohol Tolerance in Yeast,” *SCIENCE sciencemag.org*, 2014, 346, 71-75.
- (Fell *et al.*, 2000) Fell, J.W., Boekhout, T., Fonseca, A., Scorzetti, G. and Tallman, A.S., “Biodiversity and Systematics of Basidiomycetous Yeasts as Determined by Large-Subunit rDNA D1/D2 Domain Sequence Analysis,” *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2000, 50, 1351-1371.
- (Fermentis product sheet, 2016) Fermentis “Online Publication,” [http://www.fermentis.com/wp-content/uploads/2012/06/EthanolRED\\_EN.pdf](http://www.fermentis.com/wp-content/uploads/2012/06/EthanolRED_EN.pdf), 31 January 2016.
- (Fidel, *et al.*, 1999) Fidel, P.L., Vazquez, J.A. and Sobel, J.D., “*Candida glabrata*: Review of Epidemiology, Pathogenesis, and Clinical Disease with Comparison to *C. albicans*,” *Clinical Microbiology Review*, 1999, 12(1), 80-96.
- (Gancedo, 1998) Gancedo, J. M., “Yeast Carbon Catabolite Repression,” *Microbiology and Molecular Biology Review*, 1998, 1092-2172, 334-361.

- (Groves, 2009) Groves, S.L., "Optimization of Ethanol Production by Yeasts from Lignocellulosic Feedstocks," Dissertations, Master's Theses and Master's Reports, Michigan Technological University, 2009.
- (Hacking *et al.*, 1984) Hacking, A. J., Taylor, I. W. F. and Hanas, C. M., "Selection of Yeast Able to Produce Ethanol from Glucose at 40°C," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1984, 19, 361-363.
- (Hohmann, 2002) Hohmann, S., "Osmotic Stress Signaling and Osmoadaptation in yeasts," *Microbiology Molecular Biology Review*, 2002, 66(2), 300-372.
- (Hohmann *et al.*, 2007) Hohmann, S., Krantz, M. and Nordlander, B., "Yeast Osmoregulation," *Methods Enzymology*, 2007, 428, 29-45.
- (Jutakanoke *et al.*, 2014) Jutakanoke, R., Tanasupawat, S. and Akaracharanya, A., "Characterization and Ethanol Fermentation of *Pichia* and *Torulaspora* Strains," *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2014, 4, 52-56.
- (Kaewkrajay *et al.*, 2014) Kaewkrajaya, C., Dethoupb, T. and Limtong, S., "Ethanol Production from Cassava Using a Newly Isolated Thermotolerant Yeast Strain," *ScienceAsia* 40, 2014, 268-277.
- (Keo-oudone *et al.*, 2016) Keo-oudone, C., Nitiyon, S., Sotitham, P., Tani, A., Lertwattanasakul, N., Yuangsaard, N., Bounphanmy, S., Limtong, S. and Yamada, M., "Isolation and Characterization of Thermotolerant Ethanol-fermenting Yeasts from Laos and Application of Whole-cell Matrix-assisted Laser Desorption/ionization Time-of-flight Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) Analysis for their Quick Identification," *African Journal of Biotechnology*, 2016, 15(6), 153-164.
- (Kim *et al.*, 2010) Kim, J.H., Block, D.E. and Mills, D.D., "Simultaneous Consumption of Pentose and Hexose Sugars: an Optimal Microbial Phenotype for Efficient Fermentation of Lignocellulosic Biomass," *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2010, 88, 1077-1085.
- (Kitagawa *et al.*, 2010) Kitagawa, T., Tokuhira, K., Sugiyama, H., Kohda, K., Isono, N., Hisamatsu, M., Takahashi, H. and Imaeda, T., "Construction of a Betaglucosidase Expression System Using the Multistress-Tolerant Yeast

- Issatchenkia orientalis*,” Applied Microbiology and Biotechnology, 2010, 87, 1841-1853.
- (Koedrith *et al.*, 2008) Koedrith, P., Dubois, E., Scherens, B., Jacobs, E., Boonchird, C. and Messenguy, F., “Identification and Characterization of a Thermotolerant Yeast Strain Isolated from Banana Leaves,” ScienceAsia, 2008, 34, 147-152.
- (Kurtzman and Robnett, 1998) Kurtzman, C. and Robnett, C. J., “Identification and Phylogeny of Ascomycetous Yeasts from Analysis of Nuclear Large Subunit (26s) Ribosomal DNA Partial Sequences,” Antonie van Leeuwenhoek, 1998, 73, 331-371.
- (Kurtzman *et al.*, 2010) Kurtzman, C., Fell, J.W. and Boekhout, T., *The Yeasts: A Taxonomic Study*, Elsevier, 2010, ISBN: 978-0-444-52149-1.
- (Lane *et al.*, 2011) Lane, M., Burke, N., Karreman, R., Wolfe, K.H., O’Byrne, C. P. and Morrissey, J.P., “Physiological and Metabolic Diversity in the Yeast *Kluyveromyces marxianus*,” Antonie van Leeuwenhoek, 2011, 507-519.
- (Limtong *et al.*, 2007) Limtong, S., Sringiew, C. and Yongmanitchai, W., “Production of Fuel Ethanol at High Temperature from Sugar Cane Juice by a Newly Isolated *Kluyveromyces marxianus*,” Bioresource Technology, 2007, 98(17), 3367-3374.
- (Lin and Tanaka, 2006) Lin, Y. and Tanaka, S., “Ethanol Fermentation from Biomass Resources: Current State and Prospects,” Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 69, 627-642.
- (Lo and Dranginis, 1998) Lo, W.S. and Dranginis, A.M., “The Cell Surface Flocculin Flo11 is Required for Pseudohyphae Formation and Invasion by *Saccharomyces cerevisiae*,” Molecular Biology Cell, 1998, 9, 161-171.
- (Madigan *et al.*, 2000) Madigan, M.T., Martinko, J., Parker, M. *Brock biology of microbiology*, 9th ed., NJ: Prentice-Hall, 2000, ISBN: 0-13-081922-0.
- (Mukhtar *et al.*, 2010) Mukhtar, K., Asgher, M., Afghan, S., Hussain, K. and Zia-ul-Hussnain, S., “Comparative Study on Two Commercial Strains of *Saccharomyces cerevisiae* for Optimum Ethanol Production on Industrial Scale,” Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, 1-5.

- (Norr *et al.*, 2003) Norr, A.A., Hameed, A., Bhatti, K.P., and Tunio, S.A., "Bio-ethanol Fermentation by the Bioconversion of Sugar from Dates by *Saccharomyces cerevisiae* Strain ASN-3 and HA-4," *Biotechnology*, 2003, 2(1), 8-17.
- (Oberoi *et al.*, 2012) Oberoi, H.S., Babbar, N., Sandhu, S.K., Dhaliwal, S.S., Kaur, U., Chadha, B.S. and Bhargava, V.K., "Ethanol Production from Alkali-Treated Rice Straw via Simultaneous Saccharification and Fermentation Using Newly Isolated Thermotolerant *Pichia kudriavzevii* HOP-1," *Journal of India Microbiology Biotechnology*, 2012, 39, 557-566.
- (Osho, 2005) Osho, A., "Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice," *African Journal of Biotechnology*, 2005, 4, 660-662.
- (Olson and Hahn-Hagerdal, 1996) Olson, L. and Hahn-Hagerdal, B., "Fermentation of Lignocellulosic Hydrolysates for Ethanol Production," *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18, 312-331.
- (Prasad *et al.*, 2007) Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H.C., "Ethanol as an Alternative Fuel from Agricultural, Industrial and Urban Residues," *Resources Conservation and Recycling*, 2007, 50, 1-39.
- (Raimondi *et al.*, 2013) Raimondi, S., Zanni, E., Amaretti, A., Palleschi, C., Uccelletti, D. and Rossi, M., "Thermal Adaptability of *Kluyveromyces marxianus* in Recombinant Protein Production," *Microbial Cell Factories*, 2013, 12, 34.
- (Rakin *et al.*, 2009) Rakin, M., Mojovic, L., Nikolic, S. and Nedovic, "Bioethanol production by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* var. *ellipsoideus* cells," *African journal of biotechnology*, 2009, 8, 464-471.
- (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2000) Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Doneche, B. and Lonvaud, A., *Handbook of enology (Vol.1): the microbiology of wine and vinifications.*, 2<sup>nd</sup> ed., Chichester John Wiley & Sons, 2000, pp. 454, ISBN: 0-470-01034-7.

- (Sanchez and Cardona, 2008) Sanchez, S.J. and Cardona, C.A., "Trends in Biotechnological Production of Fuel Ethanol From Different Feedstocks," *Bioresource Technology*, 2008, 99, 5270-5295.
- (Silva *et al.*, 2006) Silva, C.L.C., Rosa, C.A. and Oliveira, E.S., "Studies on the Kinetic Parameters for Alcoholic Fermentation by Flocculent *Saccharomyces cerevisiae* Strains and Non-hydrogen Sulfideproducing Strains," *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2006, 22, 857-863.
- (Silva *et al.*, 2013) Silva, R., Batistote, M. and Cereda, M.P., "Alcoholic Fermentation by the Wild Yeasts under Thermal, Osmotic and Ethanol Stress," *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 2013, 56, 161-169.
- (Smith *et al.*, 2010) Smith, D.A., Morgan, B.A. and Quinn, J., "Stress Signalling to Fungal Stress-activated Protein Kinase Pathways," *FEMS Microbiology Letter*, 2010, 306(1), 1-8.
- (Tam *et al.*, 2015) Tam, P., Gee, K., Piechocinski, M. and Macreadie, I., "*Candida glabrata*, Friend and Foe," *Journal of Fungi*, 2015, 1, 277-292.
- (Tanimura *et al.*, 2012) Tanimura, A., Nakamura, T., Watanabe, I., Ogawa, J., and Shimal, J., "Isolation of a Novel Strain of *Candida shehatae* for Ethanol Production at Elevated Temperature," *SpringerOpen Journal*, 2012, 1, 27.
- (Walker, 2011) Walker, G.M., "125th Anniversary Review: Fuel Alcohol: Current Production and Future Challenges," *Journal of the Institute of Brewing*, 2011, 3-22.
- (Wheals *et al.*, 1999) Wheals, A.E., Basso, L.C., Alves, D.M.G. and Amorim, H.V., "Fuel Ethanol after 25 Years," *Trends in Biotechnology*, 1999, 17, 482-487.
- (Yadav *et al.*, 2011) Yadav, K. S., Naseeruddin, S., Prashanthi, G. S., Sateesh, L. and Rao, L.V., "Bioethanol Fermentation of Concentrated Rice Straw Hydrolysate Using Co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipites*," *Bioresource Technology*, 2011, 102, 6473-6478.
- (You *et al.*, 2003) You, K.M., Rosenfield, C.L. and Knipple, D.C., "Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is Dependent on Cellular Oleic Acid Content," *Applied and Environmental Microbiology*, 2003, 69, 1499-1503.

(Yuangsaad *et al.*, 2013) Yuangsaad, N., Yongmanitchai, W., Yamada, M. and Limtong, S.,  
“Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *P. kudriazevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate,” *Antonie Van Leeuwenhoek*, 2013, 3, 577-588.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ภาคผนวก ก

### อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 1. Yeast Extract-Malt Extract agar (YM agar) อาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Yeast extract 3 กรัม

Malt extract 3 กรัม

Peptone 5 กรัม

Glucose 10 กรัม

Distilled water 1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH 5.5 กรณีอาหารแข็งเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร นิ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: YM broth ส่วนผสมเหมือน YM agar แต่ไม่เติมวุ้น

#### 2. Yeast Extract-Peptone-Dextrose agar (YPD agar) อาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Yeast extract 10 กรัม

Peptone 20 กรัม

Glucose 20 กรัม

Distilled water 1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นกรณีอาหารแข็งเติมวุ้น 15 กรัมต่อลิตร นิ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

หมายเหตุ: YPD broth ส่วนผสมเหมือน YPD agar แต่ไม่เติมวุ้น

#### 3. Yeast Extract-Peptone-Xylose broth (YPXyl broth) อาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Yeast extract 10 กรัม

Peptone 20 กรัม

Xylose 20 กรัม

Distilled water 1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นิ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

4. **Yeast Extract-Peptone-Galactose broth (YPGal broth)** อาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Galactose	20 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

5. **Yeast Extract-Peptone-Mannose broth (YPMann broth)** อาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Mannose	20 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

6. **Yeast Extract-Peptone-Sucrose broth (YPSuc broth)** อาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

Yeast extract	10 กรัม
Peptone	20 กรัม
Sucrose	20 กรัม
Distilled water	1,000 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ภาคผนวก ข

### สารเคมี

**1. 1% Chloramphenicol stock** ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Chloramphenicol 0.01 กรัม

เอทานอล 1 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมและทำการฆ่าเชื้อด้วยการกรองผ่านตัวกรอง

**2. 20% Sodium Propionate stock** ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Sodium Propionate 2 กรัม

Distilled water 10 มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมและทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงผลการวิจัย

ตาราง 7.1 จำนวนเชื้อยีสต์ (log CFU/ml) ปริมาณน้ำตาล (°Brix) และปริมาณเอทานอล (%) ในอาหารเหลวจากน้ำตาล

เชื้อไอโซเลท LC2			
เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (log CFU/ml)	ปริมาณของแข็ง (°Brix)	ปริมาณเอทานอล (%)
0	5.9x10 <sup>6</sup> ±0.04	12.00±0.00	0.00±0.00
48	6.3x10 <sup>7</sup> ±0.03	10.53±0.12	1.50±0.00
96	6.9x10 <sup>7</sup> ±0.03	9.93±0.12	1.00±0.00
เชื้อไอโซเลท LP3			
เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (log CFU/ml)	ปริมาณของแข็ง (°Brix)	ปริมาณเอทานอล (%)
0	6.3x10 <sup>6</sup> ±0.01	12.00±0.00	0.00±0.00
48	9.4x10 <sup>8</sup> ±0.01	9.20±0.35	2.00±0.50
96	3.2x10 <sup>7</sup> ±0.02	9.00±0.40	1.00±0.00
เชื้อควบคุม OW1/1			
เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (log CFU/ml)	ปริมาณของแข็ง (°Brix)	ปริมาณเอทานอล (%)
0	6x10 <sup>6</sup> ±0.01	12.00±0.00	0.00±0.00
48	1.2x10 <sup>8</sup> ±0.07	9.40±0.35	1.67±0.29
96	1.1x10 <sup>8</sup> ±0.07	8.70±0.31	1.00±0.00
เชื้อ Ethanol Red			
เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ (log CFU/ml)	ปริมาณของแข็ง (°Brix)	ปริมาณเอทานอล (%)
0	3.7x10 <sup>6</sup> ±0.03	12.00±0.00	0.00±0.00
48	7.7x10 <sup>7</sup> ±0.01	7.87±0.35	2.50±0.00
96	3.6x10 <sup>7</sup> ±0.07	7.33±0.12	2.00±0.00

ตาราง 7.2 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล (g/L) ในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาล 120 g/L ที่ 40°C

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท LP3		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	0.10±0.00	120.00±0.00	0.45±0.07
24	5.78±0.07	49.00±9.90	34.85±2.33
48	7.86±0.01	16.50±6.36	45.15±0.07
72	12.13±0.10	13.00±1.41	49.00±0.70
96	12.68±0.14	15.00±4.24	49.25±0.63
เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท OW1/1		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	0.10±0.00	124.50±3.53	0.00±0.00
24	3.44±0.52	43.50±4.95	36.00±1.84
48	4.57±0.07	7.00±0.00	53.00±0.99
72	7.71±0.04	3.50±0.70	53.15±0.35
96	7.65±0.18	0.50±0.70	51.50±4.24
เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อควบคุม Ethanol Red		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	0.10±0.00	120.16±0.30	0.00±0.00
24	10.06±0.33	7.47±0.00	46.49±0.91
48	6.27±0.55	0.24±0.10	52.01±0.63
72	5.27±0.38	0.19±0.26	50.84±1.49
96	5.56±0.31	0.56±0.71	50.57±3.65

ตาราง 7.3 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล (g/L) ในอาหารเหลว YPD ที่มีน้ำตาล 120 g/L ที่ 42°C

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท LP3		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	0.10±0.00	123.57±1.08	0.00±0.00
24	4.59±0.32	44.40±5.60	36.40±5.17
48	8.93±0.28	34.63±0.65	31.37±6.25
72	7.69±0.36	32.20±0.95	30.63±4.99
96	5.98±0.05	29.90±3.90	29.40±5.47
เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท OW1/1		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	0.10±0.00	124.73±3.56	0.00±0.00
24	2.76±0.21	59.37±4.19	27.37±2.23
48	4.78±0.44	32.63±1.53	37.13±6.36
72	4.57±0.31	21.43±6.05	37.03±2.88
96	4.60±0.29	25.53±2.35	28.10±6.34
เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อควบคุม Ethanol Red		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	0.10±0.00	117.60±1.31	0.90±0.10
24	0.71±0.27	109.30±2.18	5.37±1.26
48	1.59±0.42	85.13±9.33	17.03±4.69
72	1.51±0.25	68.63±9.51	23.40±2.43
96	1.54±0.27	66.50±18.92	26.00±3.94

ตาราง 7.4 แสดงค่าที่ได้จากการคำนวณประสิทธิภาพในการหมัก (%) ของเชื้อที่ 40 และ 42°C

เวลา (ชั่วโมง)	40°C			42°C		
	LP3	OW1/1	ER	LP3	OW1/1	ER
24	56.83	56.59	75.72	57.65	42.94	8.93
48	73.63	83.31	84.70	49.68	58.26	28.34
72	79.91	83.54	82.80	48.51	58.10	38.94
96	80.32	80.95	82.37	46.56	44.09	43.27

ตาราง 7.5 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล (g/L) ในอาหารเหลว YP ที่มีน้ำตาลต่างชนิดกันที่ 40°C

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลกลูโคส					
	เชื้อไอโซเลท LP3			เชื้อไอโซเลท OW1/1		
	OD 600 nm	ปริมาณ น้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทา- นอล (g/L)	OD 600 nm	ปริมาณ น้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทา- นอล (g/L)
0	0.11±0.00	18.35±3.32	0.16±0.23	0.12±0.01	19.10±1.84	0.20±0.28
12	7.34±0.28	1.37±0.96	6.50±0.13	3.45±0.58	0.41±0.13	6.70±0.28
24	7.25±0.31	0.37±0.52	6.54±0.22	4.02±0.04	0.97±1.37	7.20±0.57
36	7.68±0.08	0.62±0.02	6.07±0.53	3.91±0.28	0.46±0.23	7.75±1.20
48	7.47±0.21	0.53±0.05	5.35±1.06	3.57±0.52	0.45±0.21	8.15±1.34

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

ตาราง 7.5 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลแมนโนส					
	เชื้อไอโซเลท LP3			เชื้อไอโซเลท OW1/1		
	OD 600 nm	ปริมาณ น้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทา- นอล (g/L)	OD 600 nm	ปริมาณ น้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทา- นอล (g/L)
0	0.11±0.01	18.99±0.30	0.05±0.07	0.11±0.01	18.58±0.73	0.00±0.00
12	7.29±0.00	0.41±0.12	7.34±0.48	3.64±0.04	0.35±0.07	5.15±2.33
24	7.87±0.18	0.38±0.17	6.71±0.98	3.70±0.04	0.37±0.18	7.15±0.78
36	7.68±0.08	0.39±0.15	7.61±0.00	3.87±0.19	0.31±0.13	6.90±0.57
48	7.91±0.01	0.39±0.15	7.51±0.00	3.86±0.08	0.31±0.13	6.85±0.21

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลกาแลกโตส					
	เชื้อไอโซเลท LP3			เชื้อไอโซเลท OW1/1		
	OD 600 nm	ปริมาณ น้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทา- นอล (g/L)	OD 600 nm	ปริมาณ น้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทา- นอล (g/L)
0	0.11±0.01	18.64±1.12	0.00±0.00	0.12±0.00	18.26±2.13	0.03±0.06
12	1.06±0.43	18.04±1.18	0.00±0.00	0.66±0.07	18.68±1.10	0.15±0.26
24	1.78±0.41	18.01±1.75	0.34±0.04	0.65±0.03	19.23±0.68	0.43±0.75
36	1.74±0.28	18.42±1.14	0.84±0.59	1.22±0.35	19.18±0.12	0.00±0.00
48	1.54±0.07	17.81±2.48	1.79±0.80	0.92±0.35	18.28±0.71	0.35±0.61

Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

ตาราง 7.5 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลไซโลส					
	เชื้อไอโซเลท LP3			เชื้อไอโซเลท OW1/1		
	OD 600 nm	ปริมาณ น้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทา- นอล (g/L)	OD 600 nm	ปริมาณ น้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทา- นอล (g/L)
0	0.11±0.00	17.25±0.96	0.00±0.00	0.10±0.02	17.13±0.43	0.00±0.00
12	1.04±0.27	16.81±0.89	0.00±0.00	1.26±0.06	17.29±1.12	0.00±0.00
24	1.27±0.23	16.00±1.25	0.00±0.00	1.17±0.39	16.98±1.21	0.00±0.00
36	1.30±0.23	14.67±1.36	0.00±0.00	1.89±0.19	15.33±0.78	0.00±0.00
48	1.82±0.10	14.47±1.25	0.00±0.00	1.85±0.22	15.30±1.37	0.00±0.00

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลซูโครส					
	เชื้อไอโซเลท LP3			เชื้อไอโซเลท OW1/1		
	OD 600 nm	ปริมาณ น้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทา- นอล (g/L)	OD 600 nm	ปริมาณ น้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทา- นอล (g/L)
0	0.10±0.00	20.77±0.33	0.41±0.11	0.10±0.01	20.18±0.07	0.24±0.21
12	0.73±0.05	20.64±0.32	0.80±0.10	0.90±0.14	20.65±0.34	0.24±0.11
24	2.30±0.21	19.07±0.99	0.18±0.07	1.65±0.12	20.12±0.13	0.52±0.22
36	2.13±0.44	19.24±1.01	0.11±0.02	1.75±0.24	20.34±0.33	0.33±0.19
48	2.20±0.29	19.40±1.14	0.04±0.08	1.87±0.22	19.61±0.83	0.05±0.09

Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

ตาราง 7.6 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 30°C

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท LP3	เชื้อไอโซเลท OW1/1	เชื้อ Ethanol Red
0	0.11±0.00	0.09±0.00	0.09±0.00
3	0.12±0.00	0.17±0.01	0.14±0.00
6	0.39±0.02	0.65±0.01	0.44±0.02
7.5	1.11±0.04	1.28±0.06	1.31±0.03
9	2.25±0.07	2.73±0.04	2.15±0.11
10.5	7.49±0.18	5.09±0.16	4.28±0.13
12	7.86±0.41	5.19±0.042	4.51±0.07
13.5	7.99±0.27	5.29±0.31	4.41±0.27
15	9.20±0.44	5.47±0.17	4.85±0.19
18	9.78±0.06	5.48±0.72	4.45±0.13

ตาราง 7.7 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 40°C

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท LP3	เชื้อไอโซเลท OW1/1	เชื้อ Ethanol Red
0	0.11±0.00	0.10±0.01	0.10±0.00
3	0.17±0.01	0.25±0.02	0.13±0.01
6	1.14±0.06	1.44±0.07	0.33±0.03
7.5	3.48±0.06	2.92±0.06	0.86±0.01
9	6.86±0.08	4.59±0.09	1.23±0.27
10.5	8.17±0.14	4.60±0.19	3.21±0.38
12	8.13±0.30	4.59±0.17	3.21±0.47
13.5	7.76±0.37	5.08±0.14	3.41±0.32
15	7.70±0.44	5.06±0.02	3.39±0.13
18	7.39±0.25	5.21±0.13	3.45±0.49

ตาราง 7.8 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 42°C

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท LP3	เชื้อไอโซเลท OW1/1	เชื้อ Ethanol Red
0	0.11±0.00	0.10±0.00	0.11±0.00
3	0.20±0.00	0.22±0.03	0.22±0.00
6	1.08±0.10	0.95±0.30	0.41±0.14
7.5	2.95±0.35	1.62±0.30	0.66±0.29
9	5.85±0.47	3.73±0.87	1.30±0.18
10.5	6.34±1.03	4.31±0.04	2.07±0.15
12	6.62±0.68	4.27±0.15	2.34±0.39
13.5	6.90±0.26	4.35±0.07	2.73±0.07
15	7.50±0.72	4.55±0.12	2.29±0.11
18	7.65±0.25	4.54±0.05	2.46±0.21

ตาราง 7.9 ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล (g/L) เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 30°C

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท LP3	
	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	17.12±0.74	0.57±0.07
3	16.31±0.15	0.69±0.04
6	14.27±0.36	1.47±0.16
9	2.06±0.55	6.75±0.07
12	0.00±0.00	7.47±0.48
15	0.00±0.00	7.13±0.18
18	0.50±0.13	7.25±0.17

ตาราง 7.9 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท OW1/1	
	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	16.70±0.18	0.68±0.12
3	16.07±0.26	0.66±0.05
6	13.74±0.62	1.84±0.32
9	0.62±0.17	7.63±0.34
12	0.00±0.00	7.37±0.68
15	0.72±0.18	7.52±0.55
18	0.61±0.02	7.35±0.23
เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อ Ethanol Red	
	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	16.23±0.08	0.77±0.04
3	15.91±0.03	1.28±0.46
6	12.83±0.39	2.47±0.21
9	0.00±0.00	7.96±0.29
12	0.00±0.00	8.01±0.19
15	0.00±0.00	7.65±0.27
18	0.72±0.09	7.88±0.13

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 Copyright© by Chiang Mai University  
 All rights reserved

ตาราง 7.10 ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล (g/L) เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 40°C

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท LP3	
	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	17.26±0.43	0.41±0.26
3	16.69±0.18	0.62±0.20
6	11.21±1.05	2.28±0.48
9	0.63±0.17	7.19±0.32
12	0.71±0.13	6.74±0.21
15	0.64±0.07	6.68±0.09
18	0.91±0.15	6.99±0.24
เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท OW1/1	
	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	17.11±0.45	0.68±0.35
3	16.32±0.14	0.85±0.25
6	10.84±0.51	3.14±0.23
9	0.62±0.11	7.18±0.20
12	0.63±0.11	6.86±0.22
15	0.75±0.06	7.22±0.21
18	0.88±0.03	7.13±0.08
เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อ Ethanol Red	
	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	17.30±1.00	0.93±0.28
3	16.57±0.19	0.76±0.03
6	14.89±0.51	1.86±0.05
9	6.61±0.08	4.87±0.81
12	0.56±0.02	7.16±0.06
15	0.83±0.13	8.00±0.22
18	1.02±0.06	7.65±0.06

ตาราง 7.11 ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล (g/L) เพื่อนำไปคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ที่ 42°C

เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท LP3	
	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	18.95±0.28	0.41±0.17
3	18.07±0.53	0.80±0.14
6	12.25±1.02	2.01±1.67
9	0.34±0.06	7.94±0.06
12	0.31±0.27	7.97±0.34
15	0.34±0.03	7.25±0.81
18	0.13±0.15	7.17±0.15
เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อไอโซเลท OW1/1	
	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	18.80±0.49	0.29±0.02
3	18.27±0.45	0.61±0.11
6	14.50±2.52	2.06±0.71
9	0.26±0.29	7.72±0.15
12	0.35±0.02	7.68±0.29
15	0.34±0.05	7.61±0.36
18	0.10±0.17	7.08±0.52
เวลา (ชั่วโมง)	เชื้อ Ethanol Red	
	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	18.51±0.50	0.39±0.06
3	17.65±0.17	0.63±0.56
6	15.03±1.29	2.01±0.61
9	3.59±1.68	7.05±0.44
12	0.00±0.00	7.90±0.78
15	0.02±0.03	8.07±0.39
18	0.00±0.00	7.89±0.23

ตาราง 7.12 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ปริมาณน้ำตาลและปริมาณเอทานอล (g/L) ใน การเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดร่วมกัน (Co-culture fermentation)

เวลา (ชั่วโมง)	สภาวะ 1 เมื่อใส่เชื้อทั้ง 2 ชนิดพร้อมกัน		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	0.10±0.00	189.43±2.37	0.60±1.04
24	6.36±0.07	58.76±15.36	59.21±6.18
48	6.51±0.26	34.03±7.83	67.43±0.83
72	6.56±0.23	34.70±8.07	67.43±0.38
96	6.57±0.20	34.57±7.27	67.02±0.86
เวลา (ชั่วโมง)	สภาวะ 2 เมื่อใส่เชื้อ Ethanol Red ก่อน		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	0.11±0.00	185.97±1.44	0.40±0.35
24	5.70±0.19	62.68±19.03	56.93±8.80
48	5.73±0.26	30.21±14.80	70.90±1.26
72	5.57±0.03	30.60±14.85	71.10±3.54
96	5.59±0.17	30.37±15.04	70.46±6.68
เวลา (ชั่วโมง)	สภาวะ 3 เมื่อใส่เชื้อ OW1/1 ก่อน		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	ปริมาณเอทานอล (g/L)
0	0.11±0.00	187.27±1.75	0.37±0.13
24	5.55±0.19	71.13±6.32	52.14±3.61
48	5.48±0.26	43.85±7.04	63.34±3.79
72	5.69±0.03	44.57±7.18	61.40±4.90
96	5.63±0.17	44.57±7.29	58.92±5.92

ตาราง 7.13 จำนวนเชื้อยีสต์ (log CFU/ml) ปริมาณน้ำตาล ( $^{\circ}$ Brix) และปริมาณเอทานอล (%) ในการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เวลา (วัน)	เชื้อโอโซเลท OW1/1		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล ( $^{\circ}$ Brix)	ปริมาณเอทานอล (%)
0	0.30±0.00	20.60±0.57	0.00±0.00
1	0.77±0.01	20.00±0.00	0.15±0.21
2	1.04±0.15	18.60±0.57	1.30±0.14
3	1.17±0.05	17.30±0.42	2.50±0.14
4	1.21±0.03	16.80±0.28	3.00±0.28
5	1.27±0.05	16.80±0.28	3.30±0.42
6	1.23±0.01	16.70±0.42	3.40±0.28
7	1.18±0.03	16.40±0.28	3.40±0.28
8	1.16±0.04	16.25±0.21	3.10±0.14
9	1.15±0.08	16.20±0.28	3.20±0.00
เวลา (วัน)	เชื้อ Ethanol Red		
	OD 600 nm	ปริมาณน้ำตาล ( $^{\circ}$ Brix)	ปริมาณเอทานอล (%)
0	0.30±0.00	20.50±0.71	0.00±0.00
1	2.03±0.04	16.70±0.42	2.80±0.28
2	2.20±0.10	14.60±0.57	4.60±0.28
3	2.14±0.06	13.50±0.71	6.20±0.28
4	2.34±0.03	13.50±0.71	6.00±0.00
5	2.16±0.09	13.50±0.71	5.70±0.42
6	2.17±0.08	13.50±0.71	5.70±0.42
7	2.11±0.07	13.50±0.71	5.70±0.42
8	2.06±0.06	13.50±0.71	5.70±0.42
9	2.08±0.08	13.50±0.71	5.70±0.42

## ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล นางสาว พชร สัตยวรรณ

วัน เดือน ปี เกิด 12 สิงหาคม 2535

ประวัติการศึกษา ปีการศึกษา 2559 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ปีการศึกษา 2556 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
ปีการศึกษา 2552 มัธยมศึกษาจากโรงเรียนนารีรัตน์จังหวัดแพร่ จ.แพร่

ทุนการศึกษา ระหว่างปีการศึกษา 2553-ปัจจุบัน ทุนพัฒนาและส่งเสริมผู้มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (พสวท.)

ผลงานตีพิมพ์ Sattayawat, P., Nimchua, T., Rodrussamee, N. and Bovonsombut, S., "Screening of Thermotolerant Yeasts for Bioethanol Production," The 3rd National Meeting on Biodiversity Management in Thailand, Nan, Thailand, 2016, 1-7.

