

อภิรดี ศรีภิรมย์รักษ์ : การคัดแยกและแสดงลักษณะเฉพาะของยีสต์ทนร้อนเพื่อผลิตเอทานอล (ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THERMOTOLERANT YEAST FOR ETHANOL PRODUCTION)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.โชคชัย วนภู, 98 หน้า.

การศึกษายีสต์ทนร้อนเพื่อการผลิตเอทานอลเป็นไปอย่างแพร่หลาย เนื่องจากยีสต์ทนร้อนสามารถเจริญและทำให้เกิดกระบวนการหมักได้ดีในประเภทเซตร้อน วัตถุประสงค์ของการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เพื่อคัดแยกยีสต์ทนร้อนเพื่อผลิตเอทานอลและจัดจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้ โดยสามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 ได้จากหญ้าหมักจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี จากการเลี้ยงเซลล์บนอาหาร yeast extract peptone dextrose (YPD) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นรูปไข่จนถึงรูปท่อนปลายมน ขนาดเซลล์ประมาณ 2.7-4.2 x 5.6-10.1 ไมโครเมตร การเรียงตัวของเซลล์ทั้งเดี่ยวและคู่ พบการแตกหน่อของเซลล์ และมีการพัฒนาของเส้นใยเทียม สำหรับลักษณะการเจริญในอาหารเหลว เป็นแผ่นแห้งและหนาสีขาวเกาะอยู่บนบริเวณผิวหน้าของอาหารเหลว การเจริญบนอาหารแข็งโคโลนิมีความหนืดคล้ายเนยเหลว และมีสีครีม ยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้นี้ไม่สามารถสร้างสารพิษต้านทานต่อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* EC 1118 แบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรม โดยศึกษา 18S rDNA พบว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 มีความใกล้เคียงกับ *Issatchenkia* sp. 99% จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกลูโคส) และค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหาร M9 minimal medium ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในพลาสติกพบว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 74.58% โดยทฤษฎี ที่ค่าพีเอช 4.0 เมื่อใช้แอมโมเนียม ซัลเฟต และ น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และ แหล่งคาร์บอน ตามลำดับ จากนั้นศึกษาการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลที่ได้จากการศึกษาขั้นต้น พบว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งและผลิตเอทานอลได้มากที่สุดภายในเวลา 24 ชั่วโมง และการผลิตเอทานอลลดลงเมื่อให้อากาศตลอดกระบวนการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้าม เมื่อให้อากาศ ภายใน 24 ชั่วโมงการผลิตเอทานอลจะคงที่ โดยให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 76.06% โดยทฤษฎี อย่างไรก็ตาม การผลิตเอทานอลในถังหมักให้ผลการผลิตน้อยกว่าในระดับขวดพลาสติก เมื่อทดสอบการผลิตกรดอินทรีย์บางชนิดในอาหาร M9 minimal medium ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่า มีสารชนิดหนึ่งที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่

13.5 นาที ควบคุมไปกับการเจริญและการผลิต เอทานอลของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 ดังนั้นควรวิเคราะห์สารชนิดนี้ เนื่องจากยีสต์จะผลิตในปริมาณสูงมีความเข้มข้นประมาณ 40 เท่าของ กรดอะซีติก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเมทาบอลิซึมบางอย่างของยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมัก

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

APIRADEE SRIPROMRAK : ISOLATION AND CHARACTERIZATION
OF THERMOTOLERANT YEAST FOR ETHANOL PRODUCTION.

THESIS ADVISOR : ASST. PROF. CHOKCHAI WANAPU, Ph.D. 98 PP.

THERMOTOLERANT YEAST/ETHANOL PRODUCTION

Ethanol production by thermotolerant yeasts have been extensively studied, because thermotolerant yeasts are capable of growth and fermentation during the summer months in non-tropical countries as well as under tropical climates. The aim of this study was to isolate and characterize thermotolerant yeast to produce ethanol. Thermotolerant yeast strain S1 was isolated from silage sample in Suranee University of Technology farm. According to the morphological and biochemical characterization, morphology of the thermotolerant yeast strain S1 cells are ovoidal to elongate, 2.7-4.2 x 5.6-10.1 μm , single or in pairs, budding cell are present and pseudomycelium are developed. The features of the appearance of cultures when cells grown in liquid medium after 3 days at 40 °C, heavy, dry climbing pellicles are formed on the surface of liquid medium and the growth is butyrous and light cream colored on agar medium. It can grow and ferment when glucose was used as a carbon source. This yeast was not producing killer toxin against with *Saccharomyces cerevisiae* EC 1118, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Genetic analysis was determined on the basis of 18S rDNA sequence, the results showed that the S1 strain had 99% similarity to *Issatchenkia* sp. The optimization of nitrogen and carbon (glucose) sources, and pH for ethanol production at 40 °C was observed using M9 minimal medium. In shake flask experiment, the thermotolerant yeast strain S1 gave the highest ethanol concentration (74.58% theoretical yield) at pH

4.0 when ammonium sulphate (1%, w/v) and glucose (5%, w/v) were used as nitrogen and carbon sources, respectively. The optimum condition for ethanol production in shake flask experiment was also conducted in 2 L fermenter. The yeast gave the highest cell dry weight and ethanol yield within 24 hours and the ethanol production was decreased within 72 hours. In contrast to aeration for 24 hours, ethanol production was stable about 76.06% of theoretical yield. However, the ethanol production was lower than that of shake flask experiment. Additionally, the production of some organic acids using HPLC technique was investigated. High amount of an unknown compound produced during the yeast growth and its ethanol production was also detected at the retention time of 13.5 minutes. Therefore, ethanol production by thermotolerant yeast strain S1 should be considered because this yeast produces an unknown compound (amount 40x of acetic acid), this might involve in some metabolisms of the yeast during fermentation.

School of Biotechnology

Academic Year 2006

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____