รหัสโครงการ SUT1-104-41-24-01

รายงานการวิจัย

การเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม

(Bioconversion of Cassava Starch to Nutrient Sources for *Rhizobium*)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง

สาขาวิชาจุลชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง

2. ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2541

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ธันวาคม 2545

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณที่เป็นค่าใช้จ่าย พร้อมเครื่องมือและห้องปฏิบัติการ ในการดำเนินการวิจัย ขอขอบคุณแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ทั้งที่เป็นหน่วยงานภายในประเทศไทยและต่างประเทศ ที่ให้ความอนุเคราะห์สายพันธุ์จุลินทรีย์เพื่อการทดสอบความสามารถในการผลิตแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม และสายพันธุ์ไรโซเบียมสำหรับทดสอบความสามารถในการเจริญในแหล่งอาหารที่ผลิตได้ โครงการวิจัยนี้ยังมี นายเชิดชาย บุรมย์ นักศึกษาช่วยงานวิจัย ที่มีส่วนช่วยให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงด้วยดี

บทคัดย่อ

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ร่วมกับรากของพืชตระกูลถั่วและช่วยตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศ ซึ่งเป็นประโยชน์มากด้านธาตุอาหารไนโตรเจนกับพืชอาศัย ปัจจุบันมีการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมเพื่อการปลูกพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ต้องการกลีเซอรอลหรือแมนนิทอลเป็นแหล่งอาหารหลัก และไม่สามารถใช้ทั้งกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลที่แบคทีเรียโดยทั่วไปนำไปใช้ได้ง่าย และซูโครส ในอาหารเลี้ยงไรโซเบียมส่วนใหญ่มีแมนนิทอลเป็นส่วนประกอบ ซึ่งทั้งกลีเซอรอลและแมนนิทอลมีมูลค่าสูงกว่ากลูโคสประมาณ 12-20 เท่า ทำให้มีต้นทุนสูงในการผลิตหัวเชื้อ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตแหล่งอาหารที่มีกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัตถุดิบมูลค่าต่ำโดยจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ เพื่อนำไปเลี้ยงไรโซเบียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญช้า ซึ่งอาจช่วยลดต้นทุนในการผลิตหัวเชื้อได้ จากการคัดเลือกยีสต์จำนวน 147 ไอโซเลท ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ และ 19 สายพันธุ์ จากแหล่งเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ด้านความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและแมนนิทอลจากกลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง สามารถเลือกยีสต์ไอโซเลท KAY1 ซึ่งแยกจากผลกระเจี๊ยบสดได้ ยีสต์ไอโซเลทนี้สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีและผลิตแมนนิทอลสะสมภายในเซลล์ในปริมาณสูงสุดคือ 1.23-1.48 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเลี้ยงยีสต์นั้นในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมตามผลการศึกษาที่ได้ในระดับห้องปฏิบัติการ (ปริมาตรอาหารที่ใช้ในการผลิตสูงสุดเท่ากับ 500 มิลลิลิตร) คือ อาหารที่มีเพียงส่วนประกอบของ แป้งมันสำปะหลังในปริมาณ 2.0 เปอร์เซ็นต์ Yeast extract 0.3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียม-ซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ โมโนโปรแทสเซียมฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 โดยใช้เชื้อเริ่มต้น (10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ) ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน การให้ความร้อนต่อเซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารแป้ง ช่วยส่งเสริมความสามารถในการผลิตแมนนิทอล ให้ได้ปริมาณเพิ่มขึ้นอีก 10.5 เปอร์เซ็นต์ และใช้เวลาเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดเพียง 3 วัน เมื่อนำไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญช้า คือ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 11O และ *Bradyrhizobium* sp. THA 5 มาเลี้ยงในอาหารที่มีแมนนิทอลซึ่งเตรียมได้จากเซลล์ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 พบว่าไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดี มีจำนวนเซลล์สูงถึง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (โดยเฉลี่ย) ซึ่งได้ผลทำนองเดียวกับการเลี้ยงแบคทีเรียดังกล่าวในอาหารที่เตรียมโดยใช้แมนนิทอลที่ผลิตเป็นการค้า และจากการศึกษาเพื่อจัดจำแนกชนิดของยีสต์ พบว่ายีสต์ไอโซเลท KAY1 จัดอยู่ในสกุล *Rhodotorula* นอกจากนี้ยังได้ข้อมูลและเก็บรวบรวมสายพันธุ์ของยีสต์อีกหลายสายพันธุ์ (ไอโซเลท) ที่มีความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลทั้งจากกลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง จากการคัดเลือกเชื้อในเบื้องต้น เพื่อการศึกษาต่อไป

Abstract

Rhizobia are effective nitrogen-fixing bacteria in symbiosis with legumes. Rhizobial inoculants are currently produced for growing several economic legumes. The utilization of carbon compounds by rhizobia varied with their species and strains. Most slow-growing rhizobia cannot use the simple sugar, glucose, as well as sucrose. Glycerol and mannitol, particularly mannitol, are mainly used for the cultivation of these slow-growing rhizobia. Prices of these carbohydrate compounds are about 12-20 times more expensive than glucose. Consequently, the production of these legume inoculants is costly. This study aims to produce nutrient sources containing glycerol and/or mannitol by the microbial conversion of cassava starch, a cheap raw material, for *Rhizobium* cultivation. The rhizobial inoculant production cost might be reduced. A total of 147 yeast isolates from natural habitat and 19 yeast strains from culture collections were screened for their glycerol and mannitol production capabilities using both glucose and cassava starch as carbon sources. The yeast isolate KAY1 isolated from rozelle fruit was selected. It could efficiently utilize cassava starch and accumulate mannitol in its cell. The maximum yield of mannitol was 1.23-1.48 grams per litre of cultured medium in the laboratory scale (500-mililitre working volume) when the yeast was cultivated in its suitable medium (at the initial pH of 6.0) on the rotary shaker (200 rpm) at 30°C for 4 days. And two percents of inoculum size containing approximate 10^6 cells per millilitre were applied. The suitable production medium composed of 2.0, 0.3, 0.5, 0.05, and 0.1% of cassava starch, yeast extract, ammonium sulphate, magnesium sulphate, and monopotassium phosphate respectively. When KAY1 cells were heated at 45°C for 20 minutes prior to inoculating into the starch production medium, the mannitol accumulation in yeast cells increased 10.5% higher than untreated cells within 3 days of cultivation. When cultured two slow-growing rhizobium strains, *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 and *Bradyrhizobium* sp. THA 5, in the medium containing mannitol prepared from crude KAY1 cell lysate, both *Bradyrhizobium* strains gave their good growth of about 10^8 cells per mililitre. The similar result was achieved when the same composition of rhizobial medium was prepared using commercial grade mannitol. Yeast isolate KAY1 was identified as belonging to the genus *Rhodotorula.* Several yeast strains (isolates) basically tested and selected according to their starch utilization and glycerol and/or mannitol production are also kept for further investigation.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ..... ก

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ค

สารบัญ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญภาพ ..... ช

บทที่ 1 บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 8

ขอบเขตของการวิจัย 8

ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย 9

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย..... 10

การศึกษาการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม..... 11

การแยกและรวบรวมจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการศึกษา..... 11

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังและผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล..... 12

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก..... 15

การทดลองผลิตแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยใช้สภาวะที่เหมาะสม..... 16

การใช้วิธีทางเคมีและกายภาพเพื่อส่งเสริมการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล..... 16

การผลิตแหล่งอาหารจากแป้งมันสำปะหลังและทดลองใช้เลี้ยงไรโซเบียม..... 18

การวิเคราะห์ชนิดของยีสต์ที่แยกได้..... 18

บทที่ 3 ผลการวิจัย

จุลินทรีย์ที่รวบรวมได้..... 20

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังและผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล..... 21

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง..... 21

หน้า

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล..... 22
การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจาก
แป้งมันสำปะหลัง..... 34
การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลของจุลินทรีย์
ที่คัดเลือก..... 34
การทดลองผลิตแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยใช้สภาวะ
ที่เหมาะสม..... 40
การใช้วิธีทางเคมีและกายภาพเพื่อส่งเสริมการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล..... 42
การผลิตแหล่งอาหารจากแป้งมันสำปะหลังและทดลองใช้เลี้ยงไรโซเบียม..... 47
การวิเคราะห์ชนิดของยีสต์ที่แยกได้..... 50
บทที่ 4 บทสรุป
สรุปผลการวิจัย 58
ข้อเสนอแนะ 61
บรรณานุกรม 62
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก สีย้อมจุลินทรีย์..... 66
ภาคผนวก ข น้ำยาเคมีและวิธีการวิเคราะห์..... 66
ภาคผนวก ค อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์..... 70
ประวัติผู้วิจัย..... 74
เอกสารแนบ..... 84

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 ยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง..... 6
ตารางที่ 1.2 มันสำปะหลังของประเทศไทย: เนื้อที่ ผลผลิต ผลผลิตต่อไร่ ราคา และมูลค่าของผลผลิตตามราคาที่เกษตรกรขายได้ ปี พ.ศ. 2536-2545..... 7
ตารางที่ 3.1 ความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของยีสต์ จากปฏิกิริยาของแป้งกับไอโอดีน เมื่อเลี้ยงยีสต์ให้เจริญบนอาหาร Starch agar ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน..... 24
ตารางที่ 3.2 กลีเซอรอลและแมนนิทอล ที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultured medium) และในเซลล์ (Cell lysate) ของยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ โดยใช้เทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth ที่เติมกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน 29
ตารางที่ 3.3 กลีเซอรอลและแมนนิทอล ที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ของยีสต์จากแหล่งเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิค TLC เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหาร YEPD broth ที่เติมกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน..... 32
ตารางที่ 3.4 เปรียบเทียบชนิดและส่วนประกอบของอาหารที่เตรียมเพื่อทดลองเลี้ยง *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 และ *Bradyrhizobium* sp. THA 5..... 48
ตารางที่ 3.5 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 และ *Bradyrhizobium* sp. THA 5 ในอาหาร Yeast extract-mannitol broth (YMB) และ อาหารที่เตรียมจาก Crude cell lysate ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 ที่เจริญใน Starch medium 49
ตารางที่ 3.6 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยีสต์ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกเพื่อวิเคราะห์ชนิด..... 50
ตารางที่ 3.7 คุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์เพื่อการระบุชนิด..... 54
ตารางที่ 3.8 ชนิดของยีสต์ที่สามารถระบุได้ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการ..... 57

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 3.1 TLC chromatogram ของการวิเคราะห์หากลีเซอรอลและแมนนิทอล ภายหลังการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน..... 25

รูปที่ 3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอลใน Cell lysate และ Cultured medium ด้วย Glycerol Test Kit ภายหลังการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร YEPD broth ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน..... 33

รูปที่ 3.3 ผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลัง (ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร Starch broth ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์และแมนนิทอล ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน..... 36

รูปที่ 3.4 ผลของปริมาณ Yeast extract (ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร Starch broth ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์และแมนนิทอล ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน..... 37

รูปที่ 3.5 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size; 2, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์และแมนนิทอล ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน..... 38

รูปที่ 3.6 กราฟการเจริญ (Growth curve) ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกันในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน..... 39

รูปที่ 3.7 การผลิตแมนนิทอลของยีสต์ไอโซเลท KAY1 ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน..... 41

รูปที่ 3.8 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนต (ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์และแมนนิทอล ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน..... 43

หน้า

รูปที่ 3.9 ผลของโซเดียมคลอไรด์ (ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์และแมนนิทอล ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน.... 44

รูปที่ 3.10 ผลของ Heat-shock treatment ที่ 45°ซ. เป็นเวลา 0, 20, 40 และ 60 นาที ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์และแมนนิทอล ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน..... 45

รูปที่ 3.11 การผลิตแมนนิทอลโดยยีสต์ไอโซเลท KAY1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนประกอบ เมื่อใช้เซลล์ของเชื้อเริ่มต้นที่ผ่าน Heat-shock treatment ที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 20 นาที และเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน..... 46

รูปที่ 3.12 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของยีสต์ไอโซเลท Y69, KAY1, PIY2, PUY4, LIY2, COY1, และ FAY2 จากกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง..... 52

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไรโซเบียมเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่พบได้ในปมรากของพืชตระกูลถั่วและในดิน แบคทีเรียและพืชตระกูลถั่วอยู่ร่วมกันอย่างให้ประโยชน์ซึ่งกันและกัน (Symbiosis) กล่าวคือไรโซเบียมมีบทบาทสำคัญในการตรึงไนโตรเจนจากอากาศให้กับพืชตระกูลถั่วในรูปของสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน และพืชให้แหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานแก่แบคทีเรีย ไรโซเบียมเป็นสิ่งมีชีวิตที่ใช้คาร์โบไฮเดรทเป็นแหล่งของคาร์บอนและแหล่งของพลังงานในการเจริญทุกสภาวะ แต่ใช้สารที่เป็นแหล่งของไนโตรเจนแตกต่างกัน ซึ่งถ้าเจริญอยู่ในปมของรากพืชตระกูลถั่ว จะได้รับไนโตรเจนจากอากาศ และถ้าเจริญอย่างอิสระเช่นในดินและในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ ไม่สามารถใช้ไนโตรเจนจากอากาศได้ มักใช้สารอนินทรีย์ไนโตรเจน ไรโซเบียมยังเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจน (Obligate aerobes) เป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิในช่วง 25-30°ซ. และความเป็นกรด-ด่าง (pH) 6.0-7.0 ไม่สร้างสปอร์ และเคลื่อนที่ได้ด้วย Flagella (1-6 เส้น) รูปร่างเซลล์ของไรโซเบียมที่พบมีทั้งลักษณะเซลล์เป็นท่อน (Rod) ซึ่งเมื่อย้อมสีแบบแกรม จัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียแกรมลบ (Gram-negative bacteria) โดยปกติมีขนาดของเซลล์ 0.5-0.9x1.2-3.0 ไมโครเมตร และเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ซึ่งเรียกว่าลักษณะ Bacteroid คือมีทั้ง X-, Y-, Club-, Pear- และ Star-shapes ที่มักพบเมื่อเจริญในปมรากของพืชตระกูลถั่ว (Alexander, 1997; Tate, 2000)

ไรโซเบียมมีความจำเพาะต่อพืชตระกูลถั่ว จึงทำให้มีการจัดจำแนกชนิดของไรโซเบียมตามกลุ่มของพืชตระกูลถั่วที่เกิดปม (Fred *et al.*, 1932; Breed *et al*, 1975 อ้างอิงใน สมศักดิ์ วังใน, 2541, หน้า 17-24) ในปัจจุบันมีการใช้ไรโซเบียมช่วยในการปลูกพืชตระกูลถั่วให้ได้ผลผลิตในปริมาณสูง (กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน, 2535)

อัตราการเจริญของไรโซเบียมเป็นสมบัติทางสรีระอีกประการหนึ่ง ที่ใช้ในการจำแนกกลุ่มของแบคทีเรียดังกล่าว ซึ่งจำแนกได้เป็น 2 กลุ่มหลัก คือ *กลุ่มไรโซเบียมที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว (Fast-growing rhizobia)* เป็นไรโซเบียมที่ใช้เวลาในการแบ่งเซลล์หนึ่งครั้ง (Generation time) ในช่วง 2-4 ชั่วโมง โดยเฉลี่ย 3.21 ชั่วโมง และมักผลิตกรดเมื่อมีการเจริญในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์หรือในดิน และ *กลุ่มไรโซเบียมที่เจริญช้า (Slow-growing rhizobia)* ซึ่งใช้เวลาในการแบ่งเซลล์หนึ่งครั้ง นาน 6-8 ชั่วโมง โดยเฉลี่ย 6.09 ชั่วโมง และมักผลิตด่างเมื่อมีการเจริญในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์หรือในดิน (Norris, 1965; Vincent, 1982) กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน (2535) ได้กล่าวถึงชนิดของไรโซเบียมที่จัดกลุ่มตามอัตรา

การเจริญและความจำเพาะกับพืชตระกูลถั่วที่ไรโซเบียมเข้าอยู่อาศัยและมีการเพาะปลูกในประเทศไทย คือ *(1) กลุ่มไรโซเบียมที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว* ได้แก่ *Rhizobium leguminosarum* biovar. *phaseoli* เข้าอยู่อาศัยในถั่วแดงหลวงหรือถั่วปี่นโตหรือถั่วแขก (ฝัก) (*Phaseolus vulgaris* L.) *Rhizobium leguminosarum* biovar. *viceae* เข้าอยู่อาศัยในถั่วฝักยาว (*Vigna sinensis* L. Savi ex Hassk) และถั่วปากอ้าหรือถั่วเลนส์ (*Vicia faba* L.) และ *Rhizobium fredii* เข้าอยู่อาศัยในถั่วเหลือง (*Glycine max* L. Merr.) เป็นต้น และ *(2) กลุ่มไรโซเบียมที่เจริญช้า* ได้แก่ *Bradyrhizobium japonicum* เข้าอยู่อาศัยในถั่วเหลือง (*Glycine max* L. Merr.) และ *Bradyrhizobium* sp. (vigna) เข้าอยู่อาศัยในถั่วเขียว (*Vigna radiata* L. Wilezek) ถั่วลิสง (*Arachis hypogaea* L.) และถั่วฝักยาว (*Vigna sinensis* L. Savi ex Hassk) เป็นต้น

ไรโซเบียมยังมีความสามารถในการใช้ชนิดของสารประกอบคาร์บอนที่แตกต่างกันขึ้นกับชนิด (Species) และสายพันธุ์ (Strain) ของแบคทีเรีย (Stowers and Elkan, 1984; Graham, 1964) ได้มีรายงานความสามารถในการใช้ชนิดของแหล่งคาร์บอนในการเจริญของไรโซเบียมสองกลุ่ม คือ กลุ่มไรโซเบียมที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว สามารถใช้แหล่งคาร์บอนทั้งที่เป็น Hexoses, Pentoses, Disaccharides, Trisaccharides และ Organic acids ในการเจริญ และกลุ่มไรโซเบียมที่เจริญช้า ซึ่งไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็น Disaccharides, Trisaccharides และ Organic acids ได้ แต่ใช้แมนนิทอล (Mannitol) กลีเซอรอล (Glycerol) และกลูโคเนท (Gluconate) ได้ดี (Stower, 1985)

ซูโครส (Sucrose) เป็นแหล่งคาร์บอนที่มีราคาถูกและสามารถใช้เลี้ยงไรโซเบียมที่เจริญได้อย่างรวดเร็วได้ดี (Balatti *et al.*, 1987) สำหรับ *Bradyrhizobium* ซึ่งเป็นพวกที่เจริญช้า ไม่สามารถใช้ซูโครสได้ (Stowers and Elkan, 1984) เนื่องจากไม่มีเอนไซม์ Invertase (Graham, 1964; Martinez-de Drets and Arias, 1972) แต่ใช้แมนนิทอลซึ่งมีราคาสูงกว่าได้ดี ซึ่งไรโซเบียมทั้งกลุ่มที่เจริญได้เร็วและกลุ่มที่เจริญได้ช้าใช้แมนนิทอลได้ สายพันธุ์ที่แตกต่างกันของ *Bradyrhizobium* ที่เจริญช้านี้ ยังมีความแตกต่างกันในการใช้ชนิดของแหล่งคาร์บอน เช่น *Bradyrhizobium* สายพันธุ์ CB 756 ใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีที่สุดสำหรับการเจริญ และสามารถใช้กลูโคส (Glucose) และฟรุคโทส (Fructose) ได้บ้าง (Lie *et al.*, 1991) Balatti *et al.* (1987) ยังได้รายงานการใช้กลีเซอรอลสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนของ *Bradyrhizobium japonicum* ซึ่งจำเพาะต่อถั่วเหลือง (Soybean)

Lie *et al.* (1991) ได้นำซูโครสมาเลี้ยง Slow-growing *Bradyrhizobium* สายพันธุ์ CB 756 โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* S1 (ex CBS1241) เพื่อเปลี่ยนซูโครสเป็นกลีเซอรอลและสร้างเซลล์ก่อนการเลี้ยงไรโซเบียม ผลผลิตจากการเจริญของยีสต์นั้นมีทั้งกลีเซอรอลและเซลล์ยีสต์ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่ดีมากสำหรับ *Bradyrhizobium* CB 756

ยีสต์หลายสายพันธุ์ (Strain) ในหลายสกุล (Genus) ได้แก่ *Candida*, *Hansenula*, *Lipomyces* *Rhodotorula* และ *Saccharomyces* เป็นต้น สามารถสะสมไขมันรวมถึงกลีเซอรอลไว้ภายในเซลล์ เมื่อ

เจริญในอาหารที่มีสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลูโคส (Glucose) หรือแลคโทส (Lactose) ในปริมาณสูงเมื่อเทียบกับปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่มีในอาหารนั้น ซึ่งโดยปกติอัตราส่วนของ คาร์บอน:ไนโตรเจน ประมาณ 30:1 (Ratledge, 1990)

Kluyveromyces marxianus NRRLY-665 สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ถึง 9.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เมื่อเลี้ยงโดยใช้แลคโทสในหางนม (Whey) ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 และถ้าเติม Sulfite ลงไปในกระบวนการหมักที่ดำเนินถึงขั้น Complex acetaldehyde ก่อนที่จะเปลี่ยนเป็นเอทธานอล ทำให้ได้ผลผลิตกลีเซอรอลสูงถึง 21 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 อุณหภูมิ 20°ซ. และความดัน <50 มิลลิเมตรปรอท (Rapin and Marison, 1994)

Saccharomyces cerevisiae BAW-6 (*Shochu* yeast) เป็นสายพันธุ์ที่สามารถผลิตกลีเซอรอลจากกลูโคสได้ในปริมาณสูงเช่นกัน (ปริมาณกลีเซอรอล 0.91 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่เติมกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์) และสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ (Mutant) ของเชื้อดังกล่าวในลักษณะ Salt-tolerant mutant (สายพันธุ์ที่ทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ถึง 18 เปอร์เซ็นต์ จากสายพันธุ์เดิมที่ไม่เจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ในปริมาณสูงกว่า 12 เปอร์เซ็นต์) สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ในปริมาณที่สูงขึ้น (ปริมาณกลีเซอรอลเพิ่มจาก 0.91 กรัมต่อลิตร เป็น 1.19 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่เติมกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์) และยังคงสมบัติของสายพันธุ์ที่เหมาะสำหรับใช้ในการผลิต *Shochu* ซึ่งกลีเซอรอลนี้เป็น Osmoregulatory component ที่ช่วยให้เซลล์คงอยู่และเจริญได้ดีในสภาพที่มีความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาลสูง (Omori *et al.*, 1995)

Groleau *et al.* (1995) ได้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอทธานอล (Ethanol) และสารในกลุ่ม Polyols คือ กลีเซอรอล (Glycerol) อะราบิทอล (Arabitol) และแมนนิทอล (Mannitol) ของยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* ATCC 12572 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตผลผลิตดังกล่าวในระดับอุตสาหกรรม พบว่าเมื่อเลี้ยงยีสต์ในถังปฏิกิริยา ขนาดบรรจุ 2 ลิตร และบรรจุอาหารเหลว 1.57 ลิตร ใส่เชื้อเริ่มต้นอายุ 3 วันในปริมาณ 13 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35°ซ. มีอัตราการกวน (Agitation rate) 500 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 108 ชั่วโมง ยีสต์สามารถใช้กลูโคสได้ 70.7 กรัม และให้ผลผลิต เอทธานอล กลีเซอรอล และอะราบิทอลรวมกับแมนนิทอล ในปริมาณ 30.0, 8.5 และ 11.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Torulopsis versatilis และ *Torolopsis anomala* เป็นยีสต์ที่มีรายงานด้านความสามารถในการผลิตแมนนิทอลจากใช้น้ำตาล ซึ่งประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำตาลที่ใช้เปลี่ยนเป็นแมนนิทอล (Onishi and Suzuki, 1968)

Heat-shock treatment เป็นวิธีการหนึ่งที่มีรายงานการใช้เพื่อส่งเสริมหรือเพิ่มการผลิตกลีเซอรอลของยีสต์ ตัวอย่างเช่น Omori *et al.* (1996) สามารถเพิ่มการผลิตกลีเซอรอลของ *Shochu*

yeast (*Saccharomyces cerevisiae* BAW-6) โดย Heat-shock เซลล์ยีสต์ที่เจริญถึง Stationary phase ที่อุณหภูมิ 45 หรือ 50°ซ. เป็นเวลา 10 นาที ทำให้ยีสต์สามารถผลิตกลีเซอรอลได้ปริมาณมากขึ้นอีก 8-10 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่มีผลกับกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์ Shochu, Sake และไวน์ ที่ผลิตโดยใช้ยีสต์ดังกล่าว เพื่อปรับปรุงคุณภาพของผลิตภัณฑ์

Kajiwara *et al.* (2000) ใช้วิธี Heat-shock treatment เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* Ko (*Shochu* yeast) ที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีผลในการกระตุ้นกิจกรรมของ NAD^+-Dependent glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH) ให้สูงขึ้น แต่การเจริญของเซลล์ (Heat-shock-treated cells) ช้าลงกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ผ่าน Heat-shock treatment (Control cells) และการใช้ Heat-shock-treated cells ทำให้ได้ผลผลิตของกลีเซอรอลสูงขึ้นอีก 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Control cells ผลิตกลีเซอรอลได้ปริมาณสูงสุด 1.49 กรัมต่อลิตร เมื่อเจริญในอาหารเหลวที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์

นอกจากกลีเซอรอลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีสำหรับไรโซเบียมแล้ว พวก Fast-growing soybean rhizobia บางสายพันธุ์ และ Slow-growing *Bradyrhizobium* บางสายพันธุ์ ยังมีความสามารถในการใช้เอทธานอลเป็นแหล่งของคาร์บอนและแหล่งของพลังงานในการเจริญอีกด้วย เช่น *Rhizobium fredii* USDA 191 และ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเอทธานอล 3.0 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Sadowsky and Bohlool, 1986)

เห็นได้ว่าทั้งกลีเซอรอลและแมนนิทอลซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนที่สำคัญสำหรับการเจริญของไรโซเบียมที่มีความสำคัญกับพืชเศรษฐกิจเป็นผลผลิตของจุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์ที่เจริญในอาหารที่มีแหล่งของคาร์บอนเป็นพวก Monosaccharides และ Disaccharides ซึ่งจัดได้ว่าเป็นสารที่มีมูลค่าสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่ง Monosaccharides และถ้าสามารถหาสารประกอบที่เป็นแหล่งของคาร์บอนที่มีมูลค่าต่ำกว่าสารข้างต้น เพื่อผลิตทั้งกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล น่าจะให้ผลที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ แป้งมันสำปะหลังที่ผลิตในประเทศไทยเป็นทางเลือกหนึ่งของสารประกอบซึ่งมีมูลค่าต่ำที่สามารถใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนสำหรับการเจริญของยีสต์

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชหัวที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรทปริมาณสูง โดยเฉลี่ยในหัวมันสำปะหลังสดจะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรท 30-35 เปอร์เซ็นต์ โปรตีน (Crude protein) 1-2 เปอร์เซ็นต์ เส้นใย 2 เปอร์เซ็นต์ น้ำ 60-65 เปอร์เซ็นต์ แร่ธาตุและวิตามินในปริมาณต่ำ (Jackson, 1976) คาร์โบไฮเดรทที่อยู่ในหัวมันสำปะหลังสดประกอบด้วยแป้ง (มี Amylose 16-18 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือเป็น Amylopectin) น้ำตาล (ซูโครส กลูโคส มอลโทส และฟลุคโทส ปริมาณ 71.03, 12.84, 2.98 และ 7.98 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ทั้งหมด ตามลำดับ) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และเซลลูโลส (Cellulose) โดยแป้งเป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ประมาณ 80

เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งมีมากกว่าในข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวฟ่าง ข้าวบาร์เล่ย์ ข้าวโอ๊ต ยกเว้นข้าวเจ้า (Jackson, 1976; Grace, 1977; Menezes, 1978)

Amylose ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันเป็นลูกโซ่แถวยาวด้วย α-(1→4) Glucosidic bond ไม่มีการแตกแขนง และมีความยาวประมาณ 1,100-4,400 หน่วยของกลูโคส ส่วน Amylopectin ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสที่ต่อกันเป็นลูกโซ่ด้วย α-(1→4) Glucosidic bond ซึ่งมีการแตกแขนงทุก 25 หน่วยของกลูโคสตรงตำแหน่งที่แตกแขนงจะต่อกันด้วย α-(1→6) Glucosidic bond นอกจากนี้ยังพบหน่วยของกลูโคสต่อกันแบบ α-(1→3) Glucosidic linkage อีกด้วย น้ำหนักโมเลกุลของ Amylopectin สูงถึงหนึ่งล้าน (Reed, 1975)

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลคือ Amylase ซึ่งแบ่งได้เป็นสองประเภทตามตำแหน่งของการย่อยแป้งคือ Endoamylase ย่อยแป้งแบบสุ่มที่ตำแหน่ง α-(1→4) ทำให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars, กลูโคสและมอลโทส) และ Dextrin ซึ่งเป็นลูกโซ่กลูโคสขนาดต่างๆกัน เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ α-Amylase หรือ Amylo-(1-4) dextrinase และอีกประเภทคือ Exoamylase ย่อยแป้งจากปลาย Non-reducing ที่ตำแหน่ง α-(1→4), α-(1→6) และ α-(1→3) ได้ดีเท่าๆ กัน ทำให้ได้กลูโคส เอนไซม์ประเภทนี้ได้แก่ β-Amylase หรือ Amylo-(1-4) maltosidase และ Glucoamylase หรือ Amylo-(1-4, 1-6) glucosidase (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2534)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิต Amylase ได้ดี ได้แก่ แบคทีเรีย ตัวอย่างเช่น *Bacillus megaterium*, *B. stearothermophilus*, *B. subtilis* (Yamane and Marua, 1974) รา เช่น *Aspergillus awamori*, *A. niger*, *A. oryzae*, *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus* sp., *Cephalosporium eichhorniae* (Takahashi *et al.*, 1978; Ueda *et al.*, 1981; Wang *et al.*, 1984; Charoensiri *et al.*, 1990) และยีสต์ เช่น *Endomycopsis* sp., *Hansenula* sp. (Ko, 1972; Sukhumavasi *et al.*, 1975), *Schwanniomyces alluvius* และ *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus* (Laluce *et al.*, 1988) De Mot (1990) ได้รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับความสามารถในการใช้แป้งของยีสต์ โดยที่มียีสต์หลายชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้หลายประเภทดังตัวอย่างที่ระบุในตารางที่ 1.1

เมื่อคำนึงถึงการผลิตมันสำปะหลัง กล่าวได้ว่ามันสำปะหลังเป็นผลผลิตทางการเกษตรของประเทศไทยชนิดหนึ่งที่ผลิตได้ในปริมาณมาก กำลังการผลิตหัวมันสำปะหลังของประเทศไม่ต่ำกว่า 15 ล้านตันต่อปี และมีราคาต่ำ โดยเฉลี่ย 0.86 บาทต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 1.2) ซึ่งปัจจุบันปัญหาเกี่ยวกับการแปรรูปมันสำปะหลังเป็นเรื่องที่มีผู้ให้ความสนใจมากขึ้น และในอดีตสามารถแปรรูปหัวมันสดเหล่านี้ไปเป็นมันเส้นหรืออัดเม็ด เพื่อส่งออกเป็นอาหารสัตว์ในกลุ่มประเทศประชาคมยุโรป

ตารางที่ 1.1 ยีสต์ที่สร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง

ชนิด (Species) ของยีสต์	ชนิดของเอนไซม์	ตำแหน่งที่พบเอนไซม์	คุณลักษณะทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์
Candida tropicalis	Glucoamylase	Extracellular location	ยังพบ Intracellular amylase ที่มี Glycosyltransferase activity อีกด้วย
Cryptococcus flavus	α-Amylase	Extracellular location	ย่อย Cross-linking amylose
Cryptococcus luteolus	α-Amylase	Extracellular location	ย่อย Cross-linking amylose
Debaryomyces polymorphus		Cell-associated periplasmic location	มีกิจกรรมของสองเอนไซม์คือ α-Amylase และ Glucoamylase ร่วมกันและพบว่าไม่แยกจากกัน
Pichia anomala		Cell-associated periplasmic location	มีกิจกรรมของสองเอนไซม์ซึ่งพอจะวิเคราะห์ได้ว่าเป็น Glucoamylases
Pichia burtonii	α-Amylase	Extracellular location	มีทั้ง Extracellular glucoamylase และ α-Amylase ที่เป็น Partially cell-associated enzyme
Rhodotorula ingeniosa	α-Amylase	Extracellular location	พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ส่วนใหญ่อยู่กับเซลล์
Rhodosporidium sp.	Glucoamylase	Extracellular location	เอนไซม์สามารถย่อยแป้งดิบได้
Saccharomycopsis fibuligera (*Endomyces fibuligera* หรือ *Endomycopsis fibuligera*)	Glucoamylase	Extracellular location	เป็น Glycoprotein
Sporobolomyces holsaticus		Extracellular location	คาดว่าเป็น Glucoamylase
Trichosporon pullulans	α-Amylase และ Glucoamylases	Extracellular location	α-Amylase ย่อย β-Cyclodextrin และมี Glucoamylases ซึ่งเป็น Glycoproteins ที่มี Debranching activity

ที่มา: De Mot (1990)

ตารางที่ 1.2 มันสำปะหลังของประเทศไทย: เนื้อที่ ผลผลิต ผลผลิตต่อไร่ ราคา และมูลค่าของผลผลิตตามราคาที่เกษตรกรขายได้ ปี พ.ศ. 2536-2545

ปี (พ.ศ.)	เนื้อที่เพาะปลูก (1,000 ไร่)	เนื้อที่เก็บเกี่ยว (1,000 ไร่)	ผลผลิต (1,000 ตัน)	ผลผลิตต่อไร่ (กิโลกรัม)	ราคาที่เกษตรกรขายได้ (บาทต่อกิโลกรัม)	มูลค่าของผลผลิตตามราคาที่เกษตรกรขายได้ (ล้านบาท)
2536	9,100	8,988	20,203	2,248	0.66	13,334
2537	8,817	8,642	19,091	2,209	0.58	11,073
2538	8,093	7,782	16,217	2,084	1.15	18,650
2539	7,885	7,676	17,388	2,265	0.98	17,040
2540	7,907	7,690	18,084	2,352	0.71	12,840
2541	6,694	6,527	15,591	2,389	1.26	19,645
2542	7,200	6,659	16,507	2,479	0.91	15,021
2543	7,406	7,068	19,064	2,697	0.63	12,010
2544	6,918	6,558	18,396	2,805	0.69	12,693
2545	6,224	6,176	16,868	2,731	1.05	17,711

ที่มา: สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2545)

ประมาณ 70% ของผลผลิตทั้งหมด แต่ในปัจจุบันนี้เป็นที่ทราบกันดีว่ากลุ่มประเทศประชาคมยุโรปได้เปลี่ยนนโยบายเกษตรร่วม (Commom Agricultural Policy: CAP) ลดปริมาณการนำเข้าพืชผลและธัญญพืชคงเหลือแต่เฉพาะโควต้าที่จำเป็นเท่านั้น (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2538) ทำให้ประเทศผู้ผลิตต้องนำหัวมันที่ผลิตได้มาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นๆ ที่มีมูลค่าทัดเทียมหรือมากกว่าการแปรรูปเป็นมันเส้นหรือมันอัดเม็ดเช่นเดิมมากขึ้น เพื่อรักษาเสถียรภาพของตลาดและรายได้ของชาวไร่ไว้เช่นเดิมหรือดีกว่าเดิม ซึ่งการลดปริมาณการผลิตหรือลดเนื้อที่เพาะปลูกในประเทศไทยเป็นเรื่องระยะยาวและทำได้ค่อนข้างยาก (กล้าณรงค์ ศรีรอด, 2538) ดังนั้นการนำเอาแป้งมันสำปะหลังมาใช้เพื่อผลิตเป็นอาหารเลี้ยงไรโซเบียม โดยการเปลี่ยนทางชีวภาพของแป้งเป็นน้ำตาลโดยจุลินทรีย์หรือเอนไซม์และเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล และอาจมีเอทธานอลอยู่บ้างโดยการหมักของยีสต์ เพื่อใช้ผลผลิตที่ได้จากการหมักทั้งหมด (รวมทั้งเซลล์ยีสต์) เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งที่อาจช่วยเพิ่มการใช้ผลิตผลมันสำปะหลังของประเทศ

การปลูกพืชตระกูลถั่วให้ได้ผลผลิตในปริมาณสูง สามารถกระทำได้โดยการใช้ปุ๋ยหรือหัวเชื้อไรโซเบียม ซึ่งในปัจจุบันมีการผลิตหัวเชื้อในระดับอุตสาหกรรม สายพันธุ์ของไรโซเบียมมีความสามารถในการใช้สารประกอบคาร์บอนแตกต่างกันและมีความจำเพาะต่อพืชตระกูลถั่วตามที่ได้กล่าวถึงในข้างต้น และโดยทั่วไปในอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียมมีสารประกอบคาร์โบไฮเดรทที่เป็นส่วนประกอบหลัก ได้แก่ ซูโครส (Sucrose) แมนนิทอล (Mannitol) กลีเซอรอล (Glycerol) อะราบิโนส (Arabinose) และ แลคโทส (Lactose) (Stowers, 1985; Balatti *et al.*, 1987) ซึ่งราคาของสารประกอบดังกล่าวแตกต่างกันและมีผลต่อค่าใช้จ่ายในการศึกษาไรโซเบียมและต้นทุนการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียม ซึ่งในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมในระดับการค้านั้นใช้ มักใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรทสองชนิดคือ แมนนิทอล และ ซูโครส เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญของจุลินทรีย์ ซึ่งแมนนิทอลมีราคาสูงกว่าซูโครสมาก (สูงกว่าอย่างน้อย 20 เท่า) แต่ก็จำเป็นมากที่ต้องใช้เมื่อเลี้ยงไรโซเบียมที่เจริญช้า ในสกุล *Bradyrhizobium* เนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่สามารถใช้ซูโครส แต่สามารถใช้กลีเซอรอลและแมนนิทอล ซึ่งเป็นอนุพันธุ์ (Derivatives) ของ Monosaccharides และจัดอยู่ในกลุ่ม Sugar alcohols ได้ และที่สำคัญหัวเชื้อหรือปุ๋ยไรโซเบียมที่ผลิตเป็นหลักในประเทศไทยมีความจำเพาะต่อ ถั่วเหลือง (Soybean) ถั่วเขียว (Mungbean) และ ถั่วลิสง (Peanut) ซึ่งเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศ เป็นกลุ่มไรโซเบียมที่เจริญช้า จึงจำเป็นต้องใช้กลีเซอรอลหรือแมนนิทอลเป็นแหล่งอาหารสำคัญในการเลี้ยง และในการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมต้องเลี้ยงแบคทีเรียในปริมาณมาก (Mass culture) จึงต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากด้วย ซึ่งมีผลกับต้นทุนการผลิต ดังนั้นการศึกษาถึงการเปลี่ยนทางชีวภาพของแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุเกษตรมูลค่าต่ำให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม จึงมีแนวโน้มสูงที่จะช่วยให้ต้นทุนการผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมต่ำลงและยังลดค่าใช้จ่ายในการศึกษาจุลินทรีย์ในกลุ่มไรโซเบียมอีกด้วย

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อให้ได้แหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียมจากการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ

3. ขอบเขตของการวิจัย

รวบรวมสายพันธุ์ของยีสต์ทั้งจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์และจากการแยกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคสและผลผลิตแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอล คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยแป้งและผลผลิตแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอล เพื่อศึกษาสภาวะและช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตแหล่งอาหารเป้าหมาย ในระดับห้องปฏิบัติการ (Laboratory scale) เก็บเกี่ยวผลผลิตที่ได้จากการผลิตเพื่อทดลองเลี้ยงไรโซเบียมที่มีความ

จำเพาะต่อพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ให้ได้เซลล์ของไรโซเบียมในปริมาณสูง และวิเคราะห์ชนิดของยีสต์ที่คัดเลือกได้ในกรณีที่เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

4. ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย

แหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียมซึ่งเป็นผลจากการวิจัยครั้งนี้ มีทั้งแหล่งของคาร์บอนที่จำเป็นสำหรับการเจริญและ Growth factors จากเซลล์ยีสต์ที่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย และผลิตด้วยวิธีการที่ง่ายและต้นทุนการผลิตต่ำจากการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ซึ่งอาจเพิ่มการใช้ประโยชน์มันสำปะหลังของประเทศไทยให้มากขึ้น จากการวิจัยนี้ยังได้ข้อมูลของการผลิตแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียมในระดับห้องปฏิบัติการ ที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตในระดับสูงขึ้น (ปริมาณมากขึ้น) ต่อไป ซึ่งหน่วยงานทั้งของรัฐและเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงไรโซเบียมกลุ่มที่ต้องการแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอลในการเจริญ เพื่อการศึกษาการผลิตและการใช้ปุ๋ยไรโซเบียม สามารถนำผลการวิจัยนี้ไปใช้ประโยชน์ได้ นอกจากนี้ยังได้จุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์หลายชนิด (สายพันธุ์) ซึ่งแยกได้จากแหล่งธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้งมันสำปะหลังและผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียมนี้ ใช้สถานที่ปฏิบัติงานวิจัยคือ ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา (อาคารเครื่องมือ 2) และห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ (อาคารเครื่องมือ 3) ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งใช้วัสดุและอุปกรณ์หลัก และมีวิธีดำเนินการวิจัย ดังนี้

1. อุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย

1.1 ครุภัณฑ์

ครุภัณฑ์หลักที่ใช้มีดังต่อไปนี้ หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) ตู้อบไอร้อน (Hot air oven) ตู้เขี่ยเชื้อ (จุลินทรีย์) (Laminar flow hood) ตู้บ่มเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ (Incubator) อุณหภูมิ 25, 30, 35, 37 และ 40°ซ. ตู้เก็บเชื้อ อุณหภูมิ 4°ซ. ตู้แช่แข็ง (Freezer) อุณหภูมิ –20°ซ. เครื่องชั่งละเอียด (Analytical balance) เครื่องชั่งหยาบ (Pan balance) เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) เครื่องนับโคโลนี (Colony counter) กล้องจุลทรรศน์ชนิดที่ใช้แสง (Light microscope) พร้อมกล้องถ่ายภาพ อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker) เครื่องเป่าลมร้อนและลมเย็นเพื่อทำแห้ง (Dryer) เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) Haemacytometer High-performance liquid chromatograph (HPLC) Hot plate Microcentrifuge Micropipette Refrigerated centrifuge และ Spectrophotometer

1.2 วัสดุ

วัสดุที่ใช้มีดังต่อไปนี้ เครื่องแก้วและวัสดุพื้นฐานสำหรับปฏิบัติการจุลชีววิทยาและปฏิบัติการชีวเคมี ขวดรูปชมพู่ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร และ 1 ลิตร หลอดทดสอบสำหรับเก็บจุลินทรีย์และทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ฟิล์มถ่ายภาพ กระดาษกรอง เยื่อกรอง (Membrane filter ที่มีขนาดช่องกรอง 0.2 และ 0.45 ไมโครเมตร) แผ่นแก้วสไลด์ Centrifuge tubes Microcentrifuge tubes Micropipette tips Thin–Layer Chormatograph (TLC) tank TLC plates ไนโตรเจนเหลว อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ และสารเคมีสำหรับวิเคราะห์หา กลีเซอรอล แมนนิทอล แป้ง น้ำตาลรีดิวส์ โปรตีน และชนิดของยีสต์ทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี

2. การศึกษาการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม

2.1 การแยกและรวบรวมจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการศึกษา

รวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทั้ง จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ และจากการแยกจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม จุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ในการศึกษา มีดังนี้

2.1.1 ไรโซเบียม

รวบรวมสายพันธุ์ของไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการผลิตปุ๋ยไรโซเบียม สำหรับใช้ในประเทศไทย จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ เลี้ยงและเก็บรักษาแบคทีเรียตามข้อมูลของแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์

2.1.2 จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม

จุลินทรีย์ที่ต้องการเพื่อใช้ผลิตแหล่งอาหารในการศึกษาครั้งนี้อยู่ในกลุ่มยีสต์ เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มีการรายงานทั้งสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างเอนไซม์เพื่อย่อยแป้ง (Laluce *et al.*, 1988; De Mot, 1990) และสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มในการผลิตแมนนิทอลและกลีเซอรอลโดยอาศัยข้อมูลจากแหล่งอ้างอิง (Onishi and Suzuki, 1968; Ratledge, 1990; Lie *et al.*, 1991; Rapin and Marison, 1994; Groleau *et al.*, 1995; Omori *et al.*, 1995; Kajiwara *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นแหล่งของคาร์บอนที่จำเป็นสำหรับการเจริญของไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการเพิ่มผลผลิตของพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ รวมทั้งเซลล์ของยีสต์ก็มีส่วนประกอบที่มีคุณค่าทางอาหารอย่างยิ่งสำหรับการเจริญของไรโซเบียม และถ้าสามารถหาหรือคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีสมบัติครบถ้วนตามวัตถุประสงค์จะทำให้ลดขั้นตอนการผลิตแหล่งอาหารโดยตรงจากวัตถุดิบแป้ง ทำให้ได้กระบวนการผลิตที่ง่ายและส่งผลถึงการลดต้นทุนการผลิตอีกด้วย

ยีสต์ที่ใช้ศึกษา รวบรวมจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ และจากการแยกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งในการแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติ มีขั้นตอนดังนี้

1) รวบรวมตัวอย่างที่เป็นถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของยีสต์ ได้แก่ ผลไม้สด ผลไม้ดอง เครื่องดื่มที่มีน้ำตาล และผลิตผลทางการเกษตรและของเสีย (วัสดุเหลือทิ้ง) ประเภทแป้ง เป็นต้น

2) เจือจางตัวอย่างปริมาณ 10 กรัม ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ให้ได้ความเจือจางในระดับที่เหมาะสม เพื่อแยกยีสต์โดยใช้อาหาร Malt extract-yeast extract (MY) agar (ภาคผนวก ค 4) ตามวิธีการของ Yarrow (1998)

3) เลือกเก็บยีสต์ที่มีสัณฐานวิทยาของโคโลนีที่แตกต่างกัน และแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยวิธี Cross streak โดยใช้อาหาร MY agar จากนั้นเก็บรักษาการมีชีวิตของเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ. ตามวิธีการของ Yarrow (1998)

2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังและผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล

เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนด้านความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังและผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลของจุลินทรีย์ที่รวบรวมได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งจุลินทรีย์บางชนิดอาจย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีแต่ไม่สามารถผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล จุลินทรีย์บางชนิดอาจไม่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังได้ดีแต่สามารถผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลได้ในปริมาณสูงจากการใช้น้ำตาล ดังที่มีตัวอย่างตามรายงานการศึกษา (Rapin and Marison, 1994; Omori *et al.*, 1995; Groleau *et al.*, 1995) และจุลินทรีย์บางชนิดอาจย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีและสามารถผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลได้ในปริมาณสูงโดยตรงจากแป้ง ซึ่งถ้ามุ่งที่จะผลิตสารให้ได้ปริมาณสูงจากแป้งอาจจำเป็นต้องใช้เชื้อผสม (Mixed cultures) โดยมีเชื้อที่เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลและมีเชื้อที่เปลี่ยนน้ำตาลเป็นสารที่ต้องการในกระบวนการผลิตสาร ซึ่งได้ผลผลิตสูงกว่ากระบวนการผลิตโดยใช้เชื้อเดียว จึงแบ่งการดำเนินการศึกษาเพื่อคัดเลือกเชื้อ เป็น 3 ขั้นตอน คือ ศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง ศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลโดยใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน และศึกษาจุลินทรีย์ที่สามารถใช้ทั้งแป้งมันสำปะหลังและผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล ซึ่งการดำเนินงานของขั้นตอนที่สามนี้อาศัยผลที่ได้จากสองขั้นตอนแรก

2.2.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง

นำเชื้อบริสุทธิ์ (Pure culture) ของยีสต์ที่รวบรวมได้ทั้งจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์และจากการแยกเชื้อจากแหล่งธรรมชาติ มาทดสอบความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังเพื่อคัดเลือกเชื้อตามขั้นตอน ดังนี้

ก) การทดสอบความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังของจุลินทรีย์โดยใช้อาหารแข็ง

เตรียมยีสต์ที่เจริญบน MY agar อายุ 48 ชั่วโมง จากนั้นย้ายเชื้อแบบ Point inoculation ลงบนผิวหน้าอาหาร Starch agar (ภาคผนวก ค 6) ที่มีแป้งมันสำปะหลัง (Cassava starch) 1 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งของคาร์บอน ที่บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อ ทำการทดลองสองซ้ำ บ่มให้ยีสต์เจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นตรวจหาแป้งที่เหลือรอบโคโลนีของยีสต์ที่เจริญด้วยสารละลายไอโอดีน (ภาคผนวก ข 1) แป้งที่เหลือจะทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนและเห็นเป็นสีน้ำเงินม่วง (Plummer, 1971) วัดความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีซึ่งเป็นบริเวณที่มีการย่อยแป้งโดย Extracellular enzyme ของยีสต์ เปรียบเทียบความกว้างของโคโลนีและ Clear zone ของยีสต์แต่ละ

สายพันธุ์ เลือกยีสต์สายพันธุ์ที่ความสามารถสูงในการย่อยแป้งเมื่อเจริญบนอาหารแข็งไปทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งในอาหารเหลว

ข) การทดสอบความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลังของจุลินทรีย์โดยใช้อาหารเหลว

เตรียมยีสต์อายุ 48 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารผิวเอียง Starch agar บรรจุในหลอดทดสอบแล้วจึงเตรียม Suspension ของเซลล์ยีสต์ใน Sodium-phosphate buffer (ภาคผนวก ข 3) ปลอดเชื้อ โดยใช้น้ำเกลือปริมาตร 3 มิลลิลิตร ต่อเชื้อ (ต่อหลอด) ปิเปต Suspension ของเชื้อ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว Starch broth (ภาคผนวก ค 6 ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ (ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร) เลี้ยงให้ยีสต์เจริญบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน วัดการเจริญโดยตรวจนับจำนวนเซลล์ของยีสต์ที่เจริญโดย Spread plate method และใช้อาหาร MY agar (ภาคผนวก ค 4) บันทึกค่า Colony forming unit (CFU) โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์ และปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อนั้น กรองส่วนใส (Supernatant) ผ่านเยื่อกรอง (ขนาดของช่องกรอง 0.45 ไมโครเมตร) จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) ในส่วนใสด้วย DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959) (ภาคผนวก ข 4) และหาปริมาณแป้งที่เหลือจากปฏิกิริยาของสารละลายไอโอดีนและวัดความเข้มของสี (ค่าการดูดกลืนแสง) ที่ความยาวช่วงคลื่น 580 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer (Plummer, 1971; Gales, 1990)

2.2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล

เตรียมยีสต์อายุ 48 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหารผิวเอียง Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) agar (ภาคผนวก ค 9) ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ บรรจุในหลอดทดสอบ เขี่ยเชื้อที่เตรียมได้ 1 ลูปเต็ม (Loopful) ใส่ลงในอาหาร YEPD broth (ภาคผนวก ค 9) ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 8 มิลลิลิตร บ่มให้เชื้อเจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน (Omori *et al.*, 1995) จากนั้นวิเคราะห์หากลีเซอรอลและแมนนิทอลทั้งที่สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ยีสต์ โดยปั่นแยกเซลล์ยีสต์ออกจากอาหารเหลวที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บทั้งส่วนใส (Supernatant) และเซลล์ยีสต์ ล้างเซลล์หนึ่งครั้งด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อและเตรียม Suspension ของเซลล์ใน Sodium-phosphate buffer (ภาคผนวก ข 3) ปลอดเชื้อ 1 มิลลิลิตร เพื่อเตรียม Cell lysate ตามวิธีการที่คณะผู้วิจัยได้ทดลองพัฒนาขึ้นใช้ในช่วงแรกของการดำเนินงานของโครงการวิจัยนี้ โดยแช่ Suspension ของเซลล์ในไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196°ซ.) เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนทั้งหมดที่ผ่านการแช่แข็ง ออกมาแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 70°ซ. เป็นเวลา 10 นาที ในลักษณะ Freeze-Thaw ซ้ำกันจำนวน 4 รอบ จากนั้นปั่นแยกกากเซลล์ออกด้วย Microcentrifuge ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 5 นาที และเก็บส่วนใสซึ่งเป็น Cell lysate สามารถเก็บตัวอย่างส่วนใสทั้ง Cultured medium

และ Cell lysate ไว้ที่อุณหภูมิ -20°ซ. ในระหว่างรอการวิเคราะห์ นำทั้งอาหาร YEPD ที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ (Cultured broth) และ Cell lysate มาวิเคราะห์หากลีเซอรอลและแมนนิทอล ด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC) (Lajunen *et al.*, 1980; Jork *et al.*, 1990) โดยใช้ Mobile phase คือ 1-Butanol-Acetone-Water (5:4:1) และ TLC plate คือ Slicagel 60 F 254 (MERCK Art. 5554, MERCK, Germany) และตรวจหากลีเซอรอลและแมนนิทอลจาก TLC chromatogram ตามวิธีการในภาคผนวก ข 4 จากนั้นนำตัวอย่างส่วนใส (Cultured broth และ Cell lysate) ที่พบว่ามีกลีเซอรอลจากการวิเคราะห์ด้วย TLC มาตรวจวัดปริมาณกลีเซอรอลในเบื้องต้น ด้วย Glycerol Test Kit (Boehringer Mannheim, Germany) เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น สำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์

2.2.3 การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลัง

เลือกสายพันธุ์ของยีสต์เพื่อศึกษาในขั้นตอนนี้โดยอาศัยผลที่ได้จากการศึกษาข้อ 2.2.1 และ 2.2.2 และดำเนินการศึกษาดังนี้

ก) การเตรียมเชื้อเริ่มต้น (Inoculum)

ย้ายยีสต์ที่คัดเลือกอายุ 48 ชั่วโมง ซึ่งเจริญบนอาหารผิวเอียง Starch agar (ภาคผนวก ค 6 ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์) จำนวน 1 ลูปเต็ม ลงในอาหารเหลว Starch broth (ภาคผนวก ค 6 ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในหลอด เลี้ยงให้ยีสต์เจริญบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 2 วัน นับจำนวนเซลล์ของยีสต์ที่เจริญด้วย Haemacytometer ปรับจำนวนเซลล์เริ่มต้นให้ได้ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วย Starch broth ชนิดเดียวกัน

ข) การผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลัง

ใส่เชื้อเริ่มต้นที่เตรียมได้ (ข้อ ก) ปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเหลว Starch broth (ภาคผนวก ค 6 ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ (ขนาดบรรจุ 250 มิลลิลิตร) เลี้ยงให้ยีสต์เจริญบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน

ค) การวิเคราะห์ผล

นำอาหารเหลวที่มียีสต์เจริญมาวิเคราะห์ผล ดังนี้

1) วัดการเจริญของยีสต์ โดยตรวจนับจำนวนเซลล์ของยีสต์ที่เจริญโดย Spread plate method และใช้อาหาร MY agar (ภาคผนวก ค 4) บันทึกค่า Colony forming unit (CFU) โดยถือว่า 1 CFU เจริญมาจาก 1 เซลล์

2) วัดความเป็นกรด-ด่างของอาหาร ด้วย pH meter (Mettler Delta 320, Mettler Toledo Ltd., England)

3) วิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) โดยปั่นแยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ เก็บเซลล์ที่ได้เพื่อเตรียม Cell lysate ตามวิธีการที่ระบุในข้อ 2.2.2 และเก็บส่วนใส (Supernatant) เพื่อกรองผ่านเยื่อกรอง (ขนาดของช่องกรอง 0.45 ไมโครเมตร) เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) ด้วย DNS reagent ตามวิธีของ Miller (1959) (ภาคผนวก ข 5) รวมทั้งวัดกิจกรรมของ Amylase ตามวิธีของ Bernfeld (1951) และ Tan *et al.* (1984)

4) วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในส่วนใส (Supernatant) ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ ตามวิธีของ Lowry *et al.* (1951) (ภาคผนวก ข 6)

5) ปริมาณแป้งที่เหลือจากปฏิกิริยาของสารละลายไอโอดีนและวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวช่วงคลื่น 580 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer (Plummer, 1971; Gales, 1990)

6) วิเคราะห์หาปริมาณของกลีเซอรอลและแมนนิทอล ทั้งใน Cell lysate และ Cultured medium (ที่ผ่านการเตรียมตามกระบวนการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.2) ด้วยเทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) ด้วยเครื่อง HPLC (SpectraSYSTEM® Thermo Separation Product Inc., U.S.A.) ที่มี Rezex RCU-USP Sugar Alcohols Column (Phenomenex) และ Refractometer RI-1530 Detector (Jasco, Japan)

เลือกสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลได้ในปริมาณสูงในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

เพื่อให้ได้กระบวนการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยยีสต์ที่คัดเลือก ที่มีประสิทธิภาพ จึงศึกษาถึงชนิดและปริมาณของสารอาหารที่เป็นส่วนประกอบของ Starch broth (ภาคผนวก ค 6) ที่เหมาะสม และปริมาณยีสต์เริ่มต้น (Inoculum size) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเป้าหมาย

2.3.1 ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

ทดลองเลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกใน Starch broth ที่เติมแป้งมันสำปะหลังในปริมาณ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) โดยเตรียมเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล และการวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.2.3

2.3.2 ชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ทดลองใช้เลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือก คือ แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย และใช้ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด และใช้ปริมาณของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมจากการศึกษาข้อ 2.3.1 โดยเตรียมเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล และการวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.2.3

2.3.3 ปริมาณ Yeast extract ที่เหมาะสม

เลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกใน Starch broth ที่เติมแป้งมันสำปะหลังและแหล่งไนโตรเจนในปริมาณที่เหมาะสม โดยทดลองเติม Yeast extract ปริมาณ 0, 0.1, 0.3, 0.5 และ 0.7 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล และการวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.2.3

2.3.4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) ที่เหมาะสม

ทดลองเลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1, 2, 3, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ใน Starch broth ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง แหล่งไนโตรเจน และ Yeast extract ในปริมาณที่เหมาะสม และเตรียมเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล และการวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.2.3

2.4 การทดลองผลิตแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยใช้สภาวะที่เหมาะสม

เลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกใน Starch broth ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง แหล่งไนโตรเจน และ Yeast extract ในปริมาณที่เหมาะสม และใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม เพื่อผลิตแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอลในช่วงเวลาที่ให้ผลผลิตสูงสุด ซึ่งการศึกษาในขั้นตอนนี้ มีการเพิ่มปริมาณการผลิตจากปริมาตร 50 มิลลิลิตร เป็น 500 มิลลิลิตร และเตรียมเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล และการวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.2.3 โดยเลี้ยงยีสต์เป็นเวลา 7 วัน และเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ผลทุกวัน เพื่อหาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่ได้ผลผลิตสูงสุด

2.5 การใช้วิธีทางเคมีและกายภาพเพื่อส่งเสริมการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล

เพื่อส่งเสริมหรือเพิ่มปริมาณการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลของยีสต์ที่คัดเลือกได้ จึงทดลองใช้ปัจจัยทั้งทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของยีสต์ ในด้านเพิ่มการ

สะสมสารที่ต้องการในปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งวิธีการที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ การใช้สารแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) เพื่อควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้ Salt-stress condition ในสภาวะที่จุลินทรีย์เจริญ และ Heat-shock treatment กับเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล

2.5.1 การเติมสารแคลเซียมคาร์บอเนต

แคลเซียมคาร์บอเนต จัดได้ว่าเป็น Buffering agent ที่มีผลกับความคงตัวของเอนไซม์ (Enzyme stability) ของจุลินทรีย์เมื่อเจริญในสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างหรืออุณหภูมิสูงมากหรือต่ำมากกว่าสภาวะที่จุลินทรีย์เจริญได้ดีที่สุด และได้มีการนำสารนี้มาใช้เพื่อส่งเสริมการสร้างกลีเซอรอลของยีสต์ (Lie *et al.*, 1991) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ ใช้วิธีเติมแคลเซียมคาร์บอเนตที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) ลงใน Starch broth ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง แหล่งไนโตรเจน และ Yeast extract ในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อหาประสิทธิภาพและความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมในการส่งเสริมการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ ในช่วงเวลาที่ให้ผลผลิตสูงสุด (จากการศึกษาข้อ 2.4) โดยใช้ปริมาตรอาหาร Starch broth เท่ากับ 50 มิลลิลิตร และเตรียมเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล และการวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.2.3

2.5.2 การใช้ Salt-stress condition

เลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกใน Starch broth ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง แหล่งไนโตรเจน และ Yeast extract ในปริมาณที่เหมาะสม และเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ในปริมาณ 0, 3, 5 และ 7% เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เพื่อศึกษาการส่งเสริมการผลิตแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอลในช่วงเวลาที่ให้ผลผลิตสูงสุด (จากการศึกษาข้อ 2.4) โดยใช้ปริมาตรอาหาร Starch broth เท่ากับ 50 มิลลิลิตร และเตรียมเชื้อเริ่มต้น เลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล และการวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.2.3

2.5.3 การใช้ Heat-shock treatment กับเซลล์ยีสต์

เลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกใน Starch broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์โดยปั่นแยกที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และเตรียม Suspension ของเซลล์ยีสต์ใน Sodium-phosphate buffer (ภาคผนวก ข 3) ปลอดเชื้อ โดยปรับให้มีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นย้าย Suspension ของเซลล์ยีสต์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบ (150x12 มิลลิเมตร) และนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลาแตกต่างกันคือ 0, 20, 40 และ 60 นาที เพื่อหาช่วงเวลาที่

เหมาะสม แล้วทำให้เย็นทันทีในอ่างน้ำเย็น (อ่างน้ำแข็ง) และใช้เซลล์ที่ผ่านความร้อนนี้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอล โดยเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารในอาหาร Starch broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสม (จากการศึกษาข้อ 2.3) และการวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.2.3

เมื่อได้วิธีการที่เหมาะสม ซึ่งอาจเป็นวิธีทางเคมีหรือกายภาพ เพื่อส่งเสริมหรือเพิ่มปริมาณการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลของยีสต์ที่คัดเลือกได้แล้ว จึงทดลองเพิ่มปริมาณการผลิตจากปริมาตรอาหาร Starch broth 50 มิลลิลิตร เป็น 500 มิลลิลิตร และเลี้ยงยีสต์เป็นเวลา 7 วัน พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ผล (เช่นเดียวกับที่ระบุในข้อ 2.2.3) ทุกวัน เพื่อหาระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่ได้ผลผลิตสูงสุด

2.6 การผลิตแหล่งอาหารจากแป้งมันสำปะหลังและทดลองใช้เลี้ยงไรโซเบียม

2.6.1 การผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล

ผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยยีสต์ที่คัดเลือก โดยใช้อาหาร Starch broth ที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสม (จากการศึกษาข้อ 2.3) ในปริมาณที่ให้ผลผลิตที่มีความเข้มข้นของสารกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลที่เพียงพอสำหรับใช้เตรียมอาหารเลี้ยงไรโซเบียม เมื่อเทียบตามสูตรอาหารมาตรฐานที่ใช้เลี้ยงไรโซเบียมสายพันธุ์ที่รวบรวมได้ เลี้ยงยีสต์เป็นเวลานานเท่าที่ให้ผลผลิตสูงสุด (จากการศึกษาข้อ 2.4 และ 2.5) เก็บเกี่ยวผลผลิตที่ได้ วิเคราะห์หาปริมาณของกลีเซอรอลและแมนนิทอลด้วยเทคนิค HPLC ตามข้อ 2.2.3 และนำผลผลิตที่ได้ไปเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม

2.6.2 การเลี้ยงไรโซเบียมโดยใช้สารอาหารที่ผลิตได้

นำไรโซเบียมที่มีประสิทธิภาพในการปลูกพืชตระกูลถั่วของประเทศไทย มาทดลองเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการเตรียมโดยใช้แหล่งอาหารที่ผลิตจากแป้งมันสำปะหลังโดยจุลินทรีย์ (ยีสต์) ที่คัดเลือก วัดการเจริญของไรโซเบียม โดยหาจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียด้วยวิธี Spread plate ตามวิธีมาตรฐานทางจุลชีววิทยา เปรียบเทียบกับการเลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐาน (Stowers, 1985; Elkan, 1987; Atlas and Park, 1997)

2.7 การวิเคราะห์ชนิดของยีสต์ที่แยกได้

กรณีเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังและ/หรือผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล ไอโซเลทที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติหรือสายพันธุ์ที่ยังไม่ได้ระบุชนิด จำเป็น

ต้องวิเคราะห์ชนิดของยีสต์ ซึ่งในการศึกษานี้มีการวิเคราะห์ชนิดของยีสต์โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของยีสต์ ตาม Barnett *et al.* (1990) และ Kurtzman and Fell (1998) ซึ่งลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่สำคัญที่ศึกษาคือสัณฐานวิทยาของเซลล์ ได้แก่ Vegetative cell, Budding cell และการสร้าง Pseudo-mycelium จากการเลี้ยงยีสต์บน MY agar (ภาคผนวก ค 4) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง (Light microscope) และใช้ Lactophenol-cotton blue เป็น Mounting fluid รวมทั้งศึกษาการสร้าง Ascospore เมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการสร้าง Ascospore คือ Acetate agar (ภาคผนวก ค 1) และ Glucose-peptone-yeast extract (GPY) agar (ภาคผนวก ค 3) จากนั้นย้อมสีโครงสร้างของยีสต์ด้วย Malachite green (สีย้อม Spore) (ภาคผนวก ก 1) และ Carbol fuchsin (สีย้อมเซลล์) (ภาคผนวก ก 2) และตรวจสอบลักษณะของ Spore และเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง

สมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์ที่ศึกษา เพื่อการจัดจำแนกและระบุชนิด คือ ความสามารถในการเฟอร์เมนต์ (Fermentation) แหล่งของคาร์บอน (น้ำตาล) คือ Cellobiose, D-Galactose, D-Glucose, Lactose, Maltose, Melibiose, Raffinose, Sucrose, α,α-Trehalose และ D-Xylose ใน Fermentation basal medium (ภาคผนวก ค 2) และตรวจผลการสร้างกรดในอาหาร โดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง การนำเข้า (Assimilation) แหล่งของคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญ แหล่งของคาร์บอนที่นำมาทดสอบ D-Arabinose, Cellobiose, D-Galactose, D-Gluconate, D-Glucose, Lactose, Maltose, D-Mannitol, Melizitose, Melibiose, Raffinose, L-Rhamnose, D-Ribose, Salicin, Soluble starch, Sucrose, α,α-Trehalose และ D-Xylose การย่อย (Hydrolysis) ยูเรีย โดยใช้อาหาร Urea R broth (ภาคผนวก ค 7) โดยตรวจผลการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีเหลืองไปเป็นสีแดงหรือชมพู ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายยูเรีย และการใช้ไนเตรทโดยใช้อาหาร Nitrate broth (ภาคผนวก ค 5) โดยตรวจหาไนไตรท์ (ภาคผนวก ข 7) และก๊าซไนโตรเจนที่เกิดขึ้น และการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 37 และ 40°ซ. โดยใช้อาหาร Glucose-peptone-yeast extract (GPY) broth (ภาคผนวก ค 3)

บทที่ 3
ผลการวิจัย

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม มีดังนี้

1. จุลินทรีย์ที่รวบรวมได้

1.1 ไรโซเบียม

สายพันธุ์ของไรโซเบียมที่รวบรวมได้ มีความจำเพาะต่อถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 (U.S. Department of Agriculture, Beltsville, Md, U.S.A.) และ *Bradyrhizobium* sp. THA 5 (กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ ประเทศไทย) ซึ่งเก็บรักษาพันธุ์ใน Stock cultures ของห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี โดยใช้อาหาร Yeast extract-mannitol agar (YMA) (ภาคผนวก ค 8) สำหรับเลี้ยง *Bradyrhizobium* ทั้งสองสายพันธุ์และเก็บแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4°ซ.

1.2 ยีสต์

ยีสต์ที่มีรายงานถึงความสามารถในการย่อยแป้งและมีแนวโน้มในการผลิตแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอล จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ ดังนี้

1) หน่วยบริการเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ได้ยีสต์จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Hansenula anomala* TISTR 5082, *Hansenula anomala* TISTR 5113, *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5270, *Rhodotorula rubra* TISTR 5067 และ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033

2) Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ประเทศเยอรมนี

ได้ยีสต์ 1 สายพันธุ์ คือ *Endomyces fibuligera* DSM 70554

3) สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้ยีสต์จำนวน 13 สายพันธุ์ คือ *Candida famata*, *Candida krusei*, *Candida tropicalis*, *Candida utilis*, *Geotricum candidum*, *Saccharomyces cerevesiae* 4 สายพันธุ์ และ ยีสต์ไอโซเลท Y24, Y60, Y64 และ Y69

4) ยีสต์ที่แยกจากแหล่งธรรมชาติ

ตัวอย่างจากแหล่งธรรมชาติที่นำมาแยกยีสต์ ได้แก่ ผลไม้สด ผลไม้ดอง เครื่องดื่มที่มีน้ำตาล และผลิตผลทางการเกษตรและของเสีย (วัสดุเหลือทิ้ง) ประเภทแป้ง รวมทั้งสิ้น 47 ตัวอย่าง ซึ่งสามารถแยกและเลือกเก็บโคโลนีของยีสต์ได้จำนวน 147 ไอโซเลท (Isolate) เพื่อทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง และ/หรือผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลต่อไป

2. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังและผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล

2.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลัง

จากการคัดเลือกยีสต์จำนวน 166 ไอโซเลท (147 ไอโซเลท แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ และ 19 สายพันธุ์ จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์) ด้านความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลัง พบว่ามียีสต์ที่แยกจากแหล่งธรรมชาติจำนวน 21 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) และจากแหล่งเก็บเชื้อ 2 สายพันธุ์ (*Endomyces fibuligera* DSM 70554 และ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033) และ 1 ไอโซเลท (Y69) ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ เมื่อทดสอบโดยใช้ Starch agar ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นวัดความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของยีสต์ที่เจริญ ที่เกิดจากปฏิกิริยาของแป้งกับไอโอดีน ซึ่งยีสต์ไอโซเลท Y69 ให้บริเวณใสที่มีความกว้างมากที่สุด (เส้นผ่าศูนย์กลาง 3.0 เซนติเมตร) *Endomyces fibuligera* DSM 70554 ให้บริเวณใสที่มีความกว้างรองลงมา (เส้นผ่าศูนย์กลาง 2.7 เซนติเมตร) แต่มีขนาดของโคโลนีใหญ่กว่า Y69 มากกว่า 1 เท่า (ตารางที่ 3.1) สำหรับยีสต์จำนวน 21 ไอโซเลท ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาตินั้น ไอโซเลท KAY1, SOY6 และ SOY7 มีความสามารถสูงสุดในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้ 2.5, 2.5 และ 2.3 เซนติเมตร ตามลำดับ

เมื่อนำยีสต์ทั้ง 24 สายพันธุ์ (ไอโซเลท) ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลัง เมื่อเลี้ยงบนอาหารวุ้น (อาหารแข็ง) ไปทดลองเลี้ยงใน Starch broth ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ทุกสายพันธุ์ยังคงความสามารถในการย่อยแป้งที่สอดคล้องกับการเจริญบนอาหารแข็ง ซึ่งเมื่อเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน พบการเจริญของยีสต์อยู่ในช่วง 10^7-10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ใกล้เคียงกัน พบปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อยู่ในช่วง 120-540 มิลลิกรัมต่อลิตร (ไอโซเลท Y69 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงสุด คือ 540

มิลลิกรัมต่อลิตร และ ไอโซเลท AFY4 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ต่ำสุด คือ 120 มิลลิกรัมต่อลิตร) และมีปริมาณแป้งคงเหลือ อยู่ในช่วง 1.4-2.0 กรัมต่อลิตร เมื่อจัดลำดับไอโซเลทตามความสามารถสูงในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง (จากปริมาณแป้งคงเหลือน้อยและปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สูงที่สะสมในอาหาร Starch broth) ของยีสต์ 10 ลำดับแรก ได้ดังนี้ ไอโซเลท Y69 > *Endomyces fibuligera* DSM 70554 > KAY1 > SOY7 > SOY6 > *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 > PUY4 > AFY5 > LLY3 > AFY4 ยีสต์ไอโซเลท Y69 แยกได้จากหัวมันสำปะหลังและเก็บรักษาไว้ใน Stock cultures ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ไอโซเลท KAY1 แยกได้จากผลกระเจี๊ยบสด ไอโซเลท SOY6 และ SOY7 แยกได้จากผลมะขามป้อมสด ไอโซเลท PUY4 แยกได้จากผลพุทรา ไอโซเลท AFY4 และ AFY5 แยกได้จากผลมะยมดอง และ ไอโซเลท LLY3 แยกได้จากพริกหยวก สำหรับ *Endomyces fibuligera* DSM 70554 และ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 ได้จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งสามารถใช้เป็นเชื้ออ้างอิงได้ เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีรายงานความสามารถในการย่อยแป้งอยู่แล้ว และอาจมีประโยชน์ในการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลัง ทั้งในกระบวนการผลิตที่ใช้เชื้อผสมในลักษณะ Symba yeast process (Jarl, 1969) ในกรณีที่ยีสต์ย่อยแป้งได้เท่านั้น และที่ใช้เชื้อเดียว ในกรณีที่ยีสต์สามารถผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากการเจริญในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน

2.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล

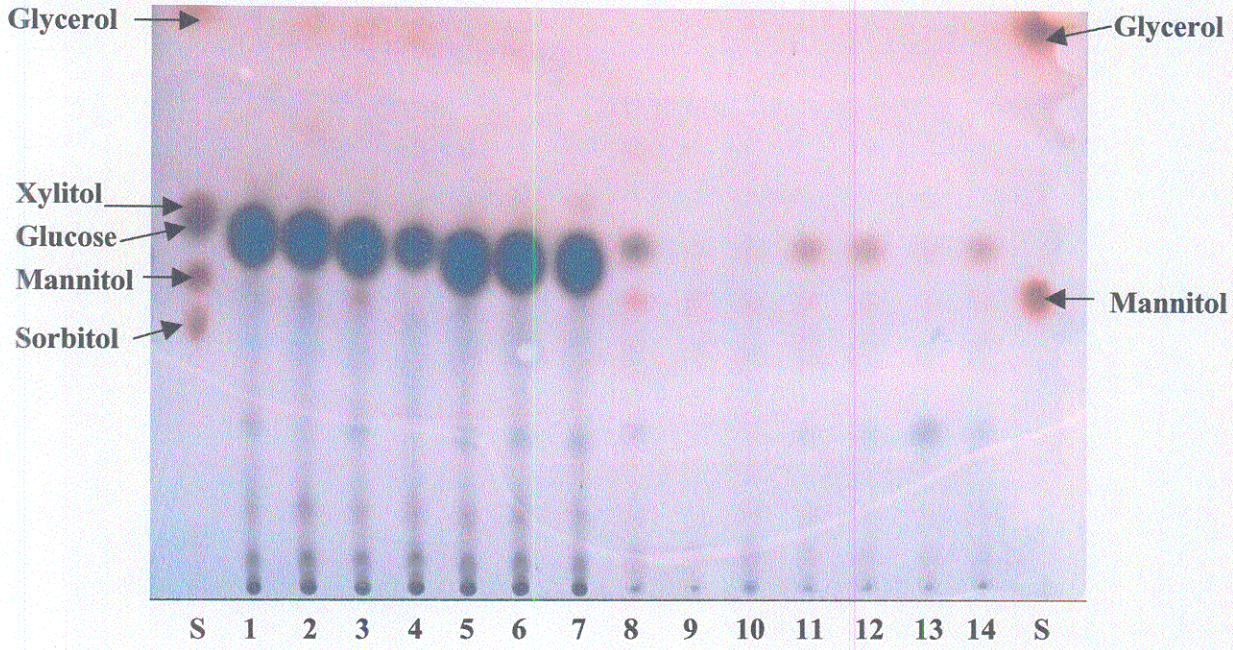
เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและแมนนิทอลจากน้ำตาลของยีสต์จำนวน 166 ไอโซเลท โดยใช้อาหาร YEPD ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ (Omori *et. al.*, 1995) ก่อนที่จะทดสอบโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหาร ซึ่งคาดหวังว่ายีสต์บางสายพันธุ์อาจไม่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังแต่สามารถผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากน้ำตาลได้ และวิเคราะห์หากลีเซอรอลและแมนนิทอลจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultured medium) และที่สะสมภายในเซลล์ (Cell lysate) โดยใช้เทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) และใช้สารมาตรฐาน (ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) คือ กลูโคส (Glucose) กลีเซอรอล (Glycerol) แมนนิทอล (Mannitol) ซอร์บิทอล (Sorbitol) และ ไซลิทอล (Xylitol) เนื่องจากมีรายงานการสะสม Sugars alcohol หลายชนิดจากกิจกรรมของยีสต์ (Shallenberger, 1993; Christain, 1994; Voet, 1995) ซึ่งสารมาตรฐานที่ใช้มีค่า Rf โดยเฉลี่ยที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ เท่ากับ 0.433, 0.741, 0.406, 0.350 และ 0.464 ตามลำดับ (รูปที่ 3.1) พบว่ายีสต์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติจำนวน 116 ไอโซเลท ให้ผลบวกคือผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ (ตารางที่ 3.2 และตัวอย่างผลการทดสอบในรูปที่ 3.1) ซึ่งมียีสต์ 16 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ด้วย (ตารางที่ 3.1 และ 3.2) ยีสต์จำนวน 103 จาก 116 ไอโซเลท ผลิตกลีเซอรอลและสะสมอยู่ในอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่สามารถตรวจพบได้ (ตารางที่ 3.2) ยีสต์ 10 ไอโซเลท สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อและแมนนิทอลในเซลล์ ยีสต์ 1 ไอโซเลท (PIY2 แยกได้จากผลสับปะรด) สะสมกลีเซอรอลและแมนนิทอลทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ ยีสต์ 2 ไอโซเลท (KAY1 แยกได้จากผลกระเจี๊ยบสด และ WAY6 แยกได้จากของเสียจากการผลิตอาหาร) สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อและแมนนิทอลในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ สำหรับผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและแมนนิทอลจากน้ำตาลของยีสต์ที่รวบรวมจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์นั้นพบว่า *Endomyces fibuligera* DSM 70554 ที่ย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีนั้น ไม่มีการสะสมทั้งกลีเซอรอลและแมนนิทอล แต่ไอโซเลท Y69 และ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 ที่ย่อยแป้งได้ดีเช่นกัน มีการสะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ตรวจพบได้ ยีสต์อีก 12 สายพันธุ์ สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ตรวจพบได้และมียีสต์เพียง 2 สายพันธุ์ คือ *Rhodotorula rubra* TISTR 5067 และไอโซเลท Y60 มีการสะสมแมนนิทอลภายในเซลล์ ไอโซเลท Y60 ยังสะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ตรวจพบได้บ้างอีกด้วย (ตารางที่ 3.3)

เมื่อคัดเลือกผลผลิตจากยีสต์จากการวิเคราะห์ด้วย TLC มาวิเคราะห์หาปริมาณของกลีเซอรอลด้วย Glycerol Test Kit (Boehringer Mannheim, Germany) เพื่อช่วยในการคัดเลือกเชื้อในเบื้องต้น พบว่ายีสต์สามารถผลิตกลีเซอรอลสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในปริมาณในช่วง 0.02-4.64 กรัมต่อลิตร (ตัวอย่างในรูปที่ 3.2) และพบว่าจากการใช้ TLC ที่ตรวจไม่พบกลีเซอรอลใน Cell lysate ของยีสต์บางไอโซเลท แต่สามารถตรวจพบได้เมื่อใช้ Glycerol Test Kit ยีสต์ไอโซเลท LIY2 ที่แยกได้จากฝักถั่วฝักยาวและไม่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลัง สามารถผลิตกลีเซอรอลสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ปริมาณสูงสุด (4.64 กรัมต่อลิตร) ไอโซเลท COY1 แยกได้จากเครื่องดื่มโกโก้ ซึ่งไม่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังเช่นกัน แต่สามารถผลิตกลีเซอรอลสะสมในเซลล์ได้ปริมาณสูงสุด (0.48 กรัมต่อลิตร) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ไอโซเลท PIY2 ไม่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ แต่สามารถผลิตกลีเซอรอลสะสมทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ ได้ในปริมาณ 1.48 และ 1.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท KAY1 สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ และสามารถผลิตกลีเซอรอลสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ปริมาณ 0.51 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3.1 ความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีของยีสต์ จากปฏิกิริยาของแป้งกับไอโอดีน เมื่อเลี้ยงยีสต์ให้เจริญบนอาหาร Starch agar ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน

ลำดับที่	สายพันธุ์ของยีสต์/ยีสต์ไอโซเลท	ความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) รอบโคโลนีจากปฏิกิริยาของแป้งกับไอโอดีน (เซนติเมตร)	
		เส้นผ่าศูนย์กลาง	รัศมีจากขอบของโคโลนี
1	*Endomyces fibuligera* DSM 70554	2.7	<0.1
2	*Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033	2.5	0.9
3	Y69	3.0	1.2
4	SOY6	2.5	0.7
5	SOY7	2.3	0.5
6	KAY1	2.5	0.7
7	PUY2	0.7	0.1
8	PUY4	1.2	0.3
9	DRY1	1.2	0.2
10	OAY1	1.5	0.1
11	OAY2	0.6	<0.1
12	OAY3	0.6	0.2
13	APY3	1.2	0.2
14	AFY4	1.5	0.1
15	AFY5	1.4	0.1
16	SPY2	0.9	0.15
17	SYY1	0.8	0.1
18	SYY2	0.9	<0.1
19	SYY3	1.2	0.15
20	HUY3	0.8	<0.1
21	HUY4	0.6	<0.1
22	LLY2	1.3	<0.1
23	LLY3	1.6	<0.1
24	STR4	0.9	<0.1

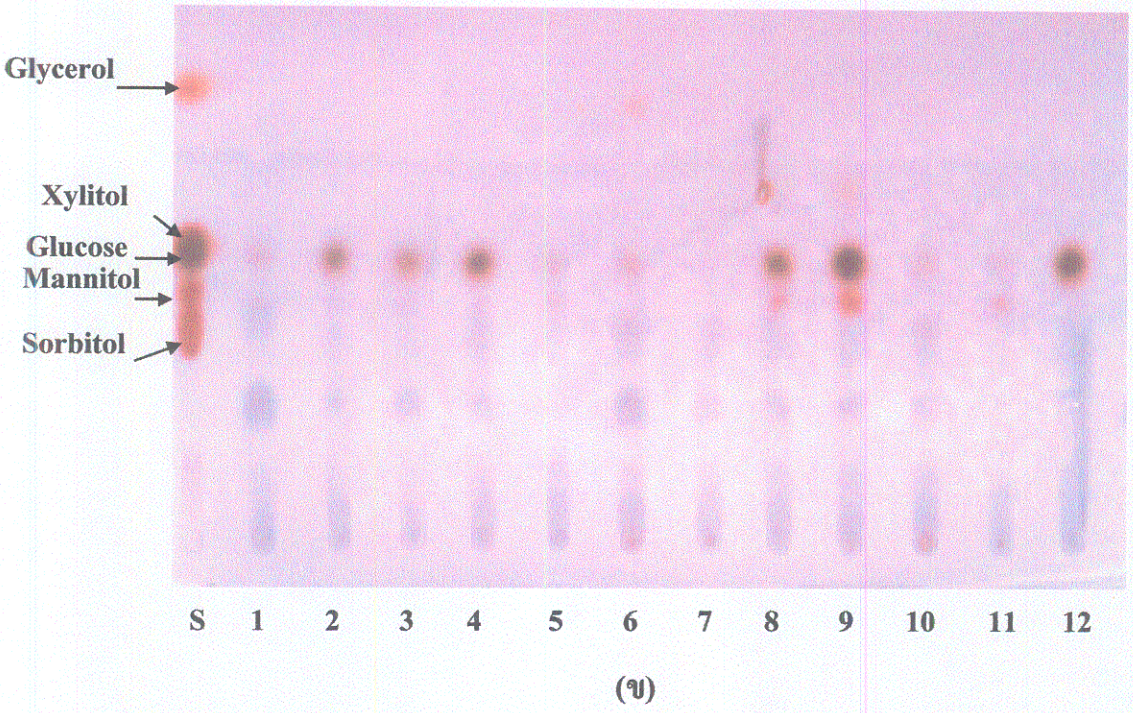


(ก)

รูปที่ 3.1 TLC chromatogram ของการวิเคราะห์หากลีเซอรอล (Glycerol) และแมนนิทอล (Mannitol) ภายหลังการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน

(ก) กลีเซอรอลและแมนนิทอลที่สะสมในเซลล์ยีสต์ (Cell lysate) และในอาหาร YEPD broth จากการเลี้ยงยีสต์

ช่อง (Lane): S, สารละลายผสมของสารมาตรฐาน; 2-7: กลีเซอรอลและแมนนิทอลที่สะสมในอาหาร YEPD broth; 8-14: กลีเซอรอลและแมนนิทอลที่สะสมในเซลล์ยีสต์; 1, YEPD broth; 2, KAY1; 3, PIY2; 4, PUY4; 5, WAY6; 6, AFY4; 7, *Rhodotorula rubra* TISTR 5067; 8, KAY1; 9, PIY2; 10, PUY4; 11, WAY6; 12, AFY4; 13, *Rhodotorula rubra* TISTR 5067; และ 14, LLY3

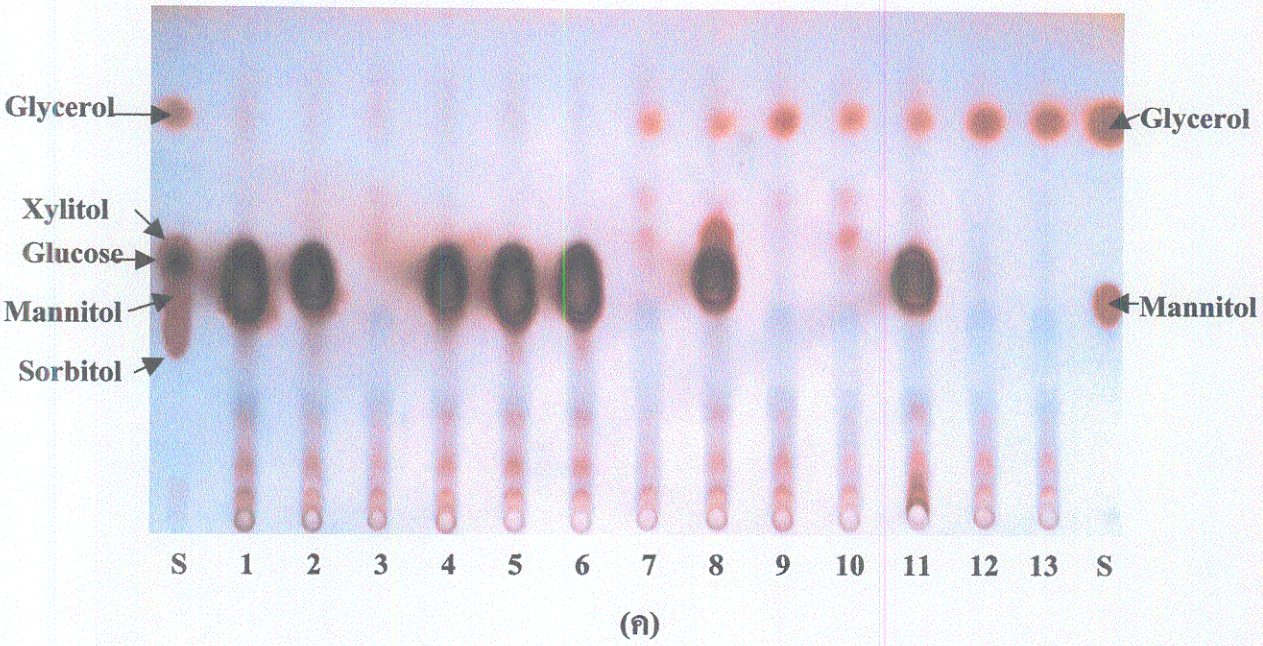


(ข)

รูปที่ 3.1 *(ต่อ)* TLC chromatogram ของการวิเคราะห์หากลีเซอรอล (Glycerol) และแมนนิทอล (Mannitol) ภายหลังการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน

(ข) กลีเซอรอลและแมนนิทอลที่สะสมในเซลล์ยีสต์ (Cell lysate)

ช่อง (Lane): S, สารละลายผสมของสารมาตรฐาน; 1, *Rhodotorula rubra* TISTR 5067; 2, AFY4; 3, LLY3; 4, AFY5; 5, PUY4; 6, SLY1; 7, TAY7; 8, WAY1; 9, KAY1; 10, TAY9; 11, PIY2; และ 12, Y60

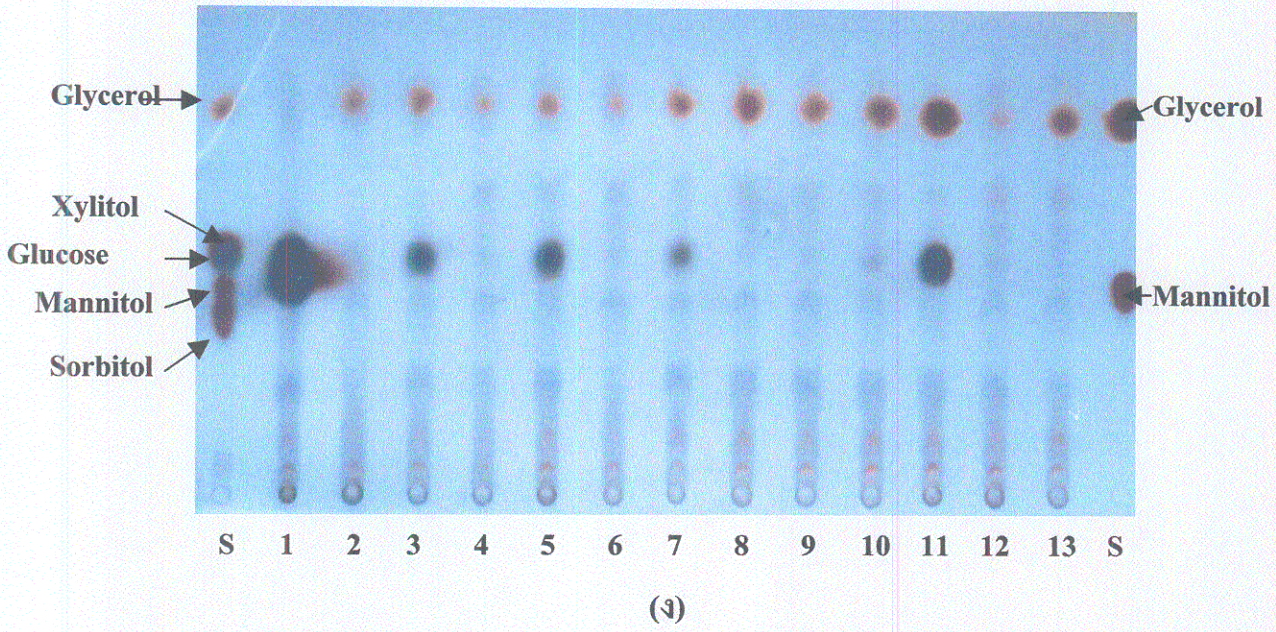


(ค)

รูปที่ 3.1 *(ต่อ)* TLC chromatogram ของการวิเคราะห์หากลีเซอรอล (Glycerol) และแมนนิทอล (Mannitol) ภายหลังการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน

(ค) กลีเซอรอลและแมนนิทอลในอาหาร YEPD broth จากการเลี้ยงยีสต์

ช่อง (Lane): S, สารละลายผสมของสารมาตรฐาน; 1, YEPD broth; 2, ยีสต์ไอโซเลท MLY2; 3, AFY1; 4, OAY1; 5, SOY1; 6, SOY5; 7, SOY2; 8, LLY1; 9, LAY1; 10, TAY3; 11, TAY4; 12, *Saccharomyces cerevisiae* strain 1; และ 13, *Saccharomyces cerevisiae* strain 2



รูปที่ 3.1 *(ต่อ)* TLC chromatogram ของการวิเคราะห์หากลีเซอรอล (Glycerol) และแมนนิทอล (Mannitol) ภายหลังการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน

(ง) กลีเซอรอลและแมนนิทอลในอาหาร YEPD broth จากการเลี้ยงยีสต์

ช่อง (Lane): S, สารละลายผสมของสารมาตรฐาน; 1, YEPD broth; 2, ยีสต์ไอโซเลท RIY1; 3, ORY1; 4, ORY2; 5, AMY1; 6, AMY2; 7, CIY1; 8, TAY9; 9, APY6; 10, FAY1; 11, LIY2; 12, *Hansenula anomala* TISTR 5082; และ 13, *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5270

ตารางที่ 3.2 กลีเซอรอล (Glycerol) และแมนนิทอล (Mannitol) ที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultured medium) และ ในเซลล์ (Cell lysate) ของยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ โดยใช้เทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth ที่เติมกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน

ลำดับที่	ยีสต์ไอโซเลท	Cultured medium		Cell lysate		ลำดับที่	ยีสต์ไอโซเลท	Cultured medium		Cell lysate	
		Glycerol	Mannitol	Glycerol	Mannitol			Glycerol	Mannitol	Glycerol	Mannitol
	Standard	++++	++++	++++	++++		Standard	++++	++++	++++	++++
1	AFY1	+	-	-	-	24	DRY1	+++	-	-	-
2	AFY2	+++	-	-	-	25	FAY1	++++	-	-	-
3	AFY3	+++	-	-	-	26	FAY2	++++	-	-	-
4	AFY4	++	-	-	++	27	FAY3	+++	-	-	-
5	AFY5	++	-	-	++	28	FAY4	++	-	-	-
6	AMY1	+++	-	-	-	29	GFY1	+++	-	-	-
7	AMY2	+++	-	-	-	30	GRY2	+++	-	-	-
8	APY1	+++	-	-	-	31	GRY3	+++	-	-	-
9	APY2	+++	-	-	-	32	HUY1	+	-	-	-
10	APY3	+++	-	-	-	33	HUY2	+++	-	-	-
11	APY5	++	-	-	-	34	HUY3	+++	-	-	-
12	APY6	++++	-	-	-	35	HUY4	+++	-	-	-
13	BAY3	+++	-	-	-	36	KAY1	+	+	-	+++
14	BLY1	+	-	-	-	37	LAY1	++	-	-	-
15	BLY2	++++	-	-	-	38	LIY1	+	-	-	-
16	BLY3	+++	-	-	-	39	LIY2	++++	-	-	-
17	BLY4	+++	-	-	-	40	LIY3	+++	-	-	-
18	CAY1	++	-	-	-	41	LIY4	+++	-	-	-
19	COY1	++++	-	-	-	42	LIY5	++	-	-	-
20	CIY1	++++	-	-	-	43	LLY1	++	-	-	-
21	CNY1	++	-	-	-	44	LLY2	++	-	-	-
22	CNY2	+++	-	-	-	45	LLY3	++	-	-	++
23	CMY1	+++	-	-	-	46	LLY4	+++	-	-	-

++++ = สีน้ำตาลเข้มของผลบวกและจางลงตามจำนวนเครื่องหมาย +++, ++ และ + ตามลำดับ

- = ผลลบ

ตารางที่ 3.2 *(ต่อ)*

ลำดับที่	ยีสต์ไอโซเลท	Cultured medium		Cell lysate		ลำดับที่	ยีสต์ไอโซเลท	Cultured medium		Cell lysate	
		Glycerol	Mannitol	Glycerol	Mannitol			Glycerol	Mannitol	Glycerol	Mannitol
	Standard	++++	++++	++++	++++		Standard	++++	++++	++++	++++
47	MAY1	+++	-	-	-	72	PUY1	++	-	-	-
48	MAY2	+++	-	-	-	73	PUY2	++	-	-	-
49	MEY1	+++	-	-	-	74	PUY3	+++	-	-	-
50	MEY2	+++	-	-	-	75	PUY4	+++	-	+	++
51	MEY4	+++	-	-	-	76	RIY1	+++	-	-	-
52	MEY3	+++	-	-	-	77	RIY3	+++	-	-	-
53	MLY1	++	-	-	-	78	SAY1	+++	-	-	-
54	MLY2	+	-	-	-	79	SCY1	+++	-	-	-
55	MLY3	+++	-	-	-	80	SLY1	+++	-	+	++
56	OAY1	+	-	-	-	81	SLY2	+++	-	-	+
57	OAY2	+++	-	-	-	82	SOY1	+	-	-	-
58	OAY3	+++	-	-	-	83	SOY2	++	-	-	-
59	OAY4	+	-	-	-	84	SOY3	+++	-	-	-
60	ORY1	+++	-	-	-	85	SOY4	++	-	-	-
61	ORY2	+++	-	-	-	86	SOY5	+	-	-	-
62	ORY3	+++	-	-	-	87	SPY1	+++	-	-	-
63	ORY4	+++	-	-	-	88	SMY1	+++	-	-	-
64	PAY1	++	-	-	-	89	SMY3	+	-	-	+
65	PAY2	+++	-	-	-	90	STY1	+++	-	-	-
66	PIY1	+++	-	-	-	91	STY4	+++	-	-	-
67	PIY2	++	++	+++	++	92	SUY1	+++	-	-	-
68	PIY3	+++	-	-	-	93	SUY2	+	-	-	-
69	POY1	+	-	-	-	94	SWY1	++++	-	-	-
70	POY2	++	-	-	-	95	SWY2	+++	-	-	-
71	POY3	+++	-	-	-	96	SWY3	+++	-	-	-

++++ = สีน้ำตาลเข้มของผลบวกและจางลงตามจำนวนเครื่องหมาย +++, ++ และ + ตามลำดับ

- = ผลลบ

ตารางที่ 3.2 *(ต่อ)*

ลำดับที่	ยีสต์ไอโซเลท	Cultured medium		Cell lysate		ลำดับที่	ยีสต์ไอโซเลท	Cultured medium		Cell lysate	
		Glycerol	Mannitol	Glycerol	Mannitol			Glycerol	Mannitol	Glycerol	Mannitol
	Standard	++++	++++	++++	++++		Standard	++++	++++	++++	++++
97	SWY4	++	-	-	-	107	TAY7	+++	-	-	++
98	SYY1	+++	-	-	-	108	TAY8	+++	-	-	-
99	SYY2	+++	-	-	-	109	TAY9	++++	-	-	++
100	SYY3	++	-	-	-	110	WAY1	++	-	-	-
101	TAY1	+	-	-	++	111	WAY2	++	-	-	-
102	TAY2	+++	-	-	-	112	WAY3	++	-	-	-
103	TAY3	++	-	-	-	113	WAY4	+	-	-	-
104	TAY4	++	-	-	-	114	WAY6	+	++	-	++
105	TAY5	+++	-	-	-	115	VEY1	+++	-	-	-
106	TAY6	+	-	-	-	116	YOY1	+	-	-	-

++++ = สีน้ำตาลเข้มของผลบวกและจางลงตามจำนวนเครื่องหมาย +++, ++ และ + ตามลำดับ

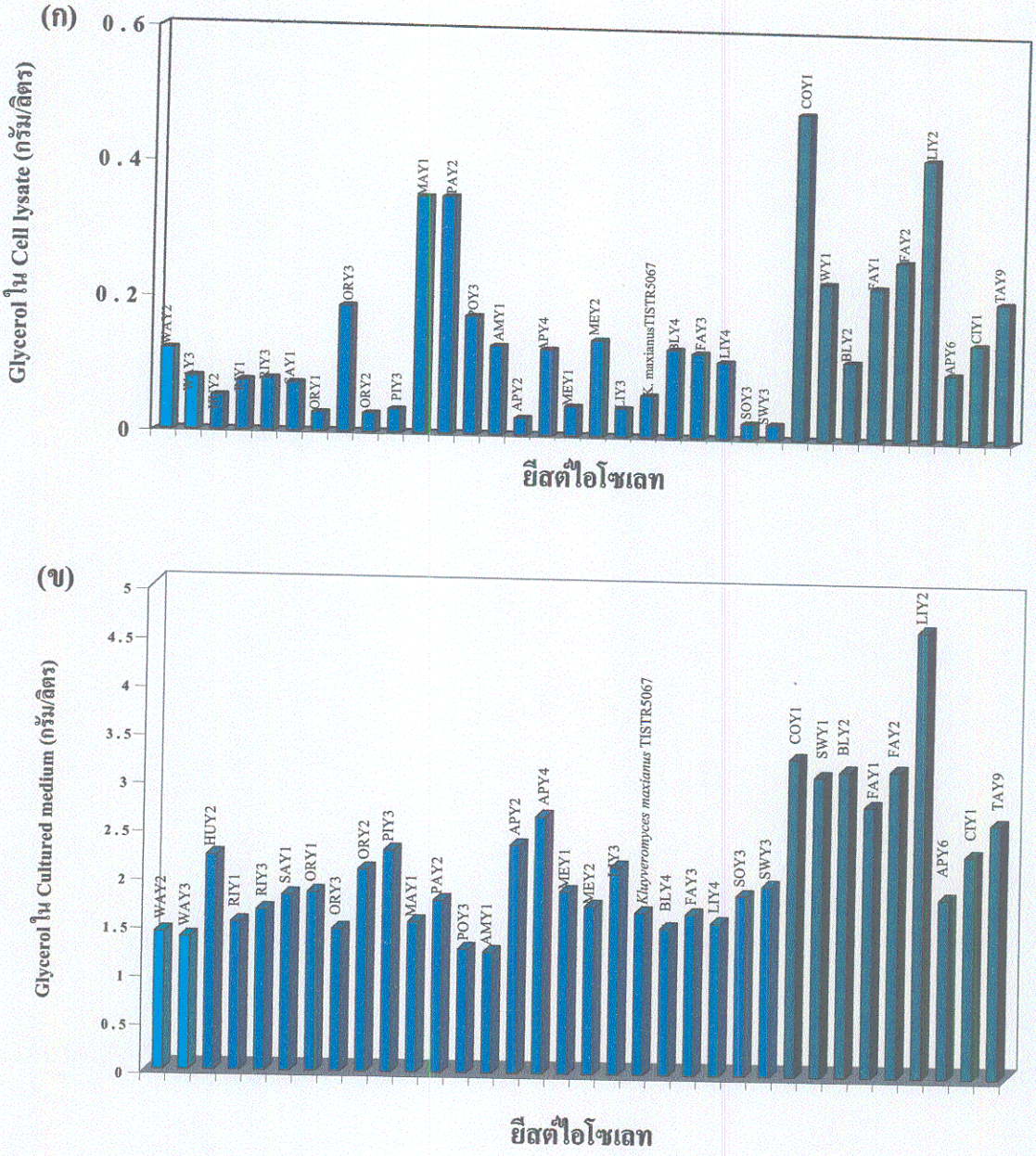
- = ผลลบ

ตารางที่ 3.3 กลีเซอรอล (Glycerol) และแมนนิทอล (Mannitol) ที่ตรวจพบในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultured medium) และในเซลล์ (Cell lysate) ของยีสต์จากแหล่งเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ โดยใช้เทคนิค Thin-layer chromatography (TLC) เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth ที่เติมกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน

ลำดับที่	สายพันธุ์ยีสต์	Cultured medium		Cell lysate	
		Glycerol	Mannitol	Glycerol	Mannitol
1	*Endomyces fibuligera* DSM 70554	-	-	-	-
2	*Hansenula anomala* TISTR 5082	+++	-	-	-
3	*Hansenula anomala* TISTR 5113	-	-	-	-
4	*Kluyveromyces marxianus* TISTR 5270	+++	-	-	-
5	*Rhodotorula rubra* TISTR 5067	-	-	-	+
6	*Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033	+	-	-	-
7	*Candida famata*	++	-	-	-
8	*Candida krusei*	++	-	-	-
9	*Candida tropicalis*	++	-	-	-
10	*Candida utilis*	++	-	-	-
11	*Geotricum candidum*	-	-	-	-
12	*Saccharomyces cerevisiae* 4 strains	+++, ++	-	-	-
13	Y64	+++	-	-	-
14	Y24	-	-	-	-
15	Y60	+	-	-	+
16	Y69	+++	-	-	-

++++ = สีน้ำตาลเข้มของผลบวกและจางลงตามจำนวนเครื่องหมาย +++, ++ และ + ตามลำดับ

- = ผลลบ



รูปที่ 3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกลีเซอรอล (Glycerol) ใน (ก) Cell lysate และ (ข) Cultured medium (สีฟ้า น้ำเงิน และเขียว แทนความเข้มของผลบวกบน TLC chromatogram +2, +3, และ +4 ตามลำดับ) ด้วย Glycerol Test Kit ภายหลังการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน

2.3 การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลัง

จากผลการศึกษาในข้อ 2.1 และ 2.2 ข้างต้น ได้คัดเลือกเชื้อยีสต์มาทดสอบความสามารถในผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลัง จำนวน 5 ไอโซเลท คือ KAY1, PUY4, AFY4, AFY5 และ LLY3 พบว่ายีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท เจริญได้ดีใน Starch broth (ปริมาณเซลล์โดยเฉลี่ย $5.0x10^7$ CFU ต่อมิลลิลิตร) และพบว่าไอโซเลท KAY1 เท่านั้นที่สามารถผลิตแมนนิทอลซึ่งตรวจพบใน Cell lysate ในปริมาณ 1.12 กรัมต่อลิตร จากการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน และจากการตรวจหากิจกรรมของ Amylase ของยีสต์ KAY1 พบกิจกรรมของเอนไซม์ (Total activity) เท่ากับ 68.80 หน่วย (Unit) และ Specific activity เท่ากับ 170.76 หน่วยต่อมิลลิกรัม โดยที่ 1 หน่วยของเอนไซม์ คือปริมาณของเอนไซม์ที่ย่อยแป้งเป็นมอลโทส (Maltose) 1 ไมโครโมล (μmole) ต่อ 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.9

3. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือก

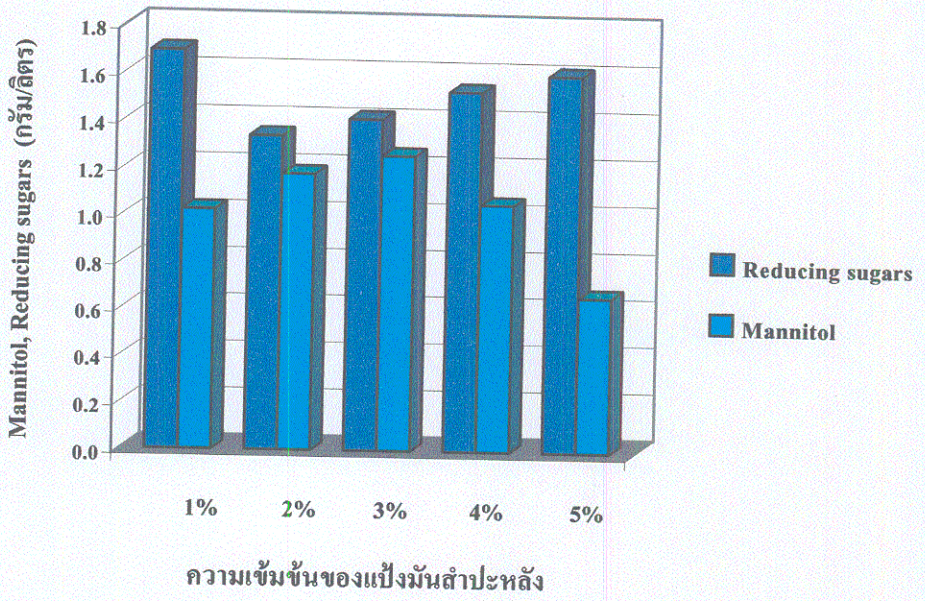
ยีสต์ไอโซเลท KAY1 เป็นจุลินทรีย์ที่ได้คัดเลือกมาศึกษาในขั้นตอนนี้ และเพื่อให้ได้กระบวนการผลิตแมนนิทอลของยีสต์จากแป้งมันสำปะหลังที่มีประสิทธิภาพ จึงศึกษาถึงชนิดและปริมาณของสารอาหารที่เป็นส่วนประกอบของ Starch broth (ภาคผนวก ค 6) ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารเป้าหมาย ซึ่งพบว่าปริมาณแป้งมันสำปะหลัง 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลที่สูงใกล้เคียงกัน (รูปที่ 3.3) ซึ่งเมื่อเติมแป้งมันสำปะหลัง 3 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแมนนิทอล พบว่ามีปริมาณแป้งคงเหลือที่มากพอที่จะทำให้เกิดความหนืดในขณะเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อการวิเคราะห์แมนนิทอล ซึ่งเป็นอุปสรรคกับผู้วิจัยในการเตรียม Cell lysate และมีวัตถุดิบเหลือทิ้งปริมาณมากด้วย จึงเลือกเติมแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ ลงใน Starch broth จากนั้นได้ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรีย และปริมาณของแหล่งของไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าการใช้ยูเรียไม่ส่งเสริมการเจริญของยีสต์ ซึ่งให้ผลการเจริญของยีสต์ต่ำกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตในความเข้มข้นที่เท่ากันถึง 100 เท่า โดยเฉลี่ย และไม่พบการสะสมแมนนิทอล แต่เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งของไนโตรเจน ยีสต์สามารถเจริญได้ดีเช่นเดียวกับผลที่ได้จากการศึกษาข้อ 2.3 ข้างต้น และพบการสะสมแมนนิทอลภายในเซลล์ ปริมาณแมนนิทอลสูงสุดที่ตรวจพบเท่ากับ 1.21 กรัมต่อลิตร เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

เมื่อใช้ Starch broth ที่เติมปริมาณของแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนหลักที่เหมาะสมแล้วเติม Yeast extract ปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ได้ผลผลิตที่ต้องการสูงสุดคือ 1.24 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 3.4) จากผลการทดลองขั้นตอนนี้ เห็นได้ว่า Yeast extract มีผลต่อการสะสมแมนนิทอลภายใน

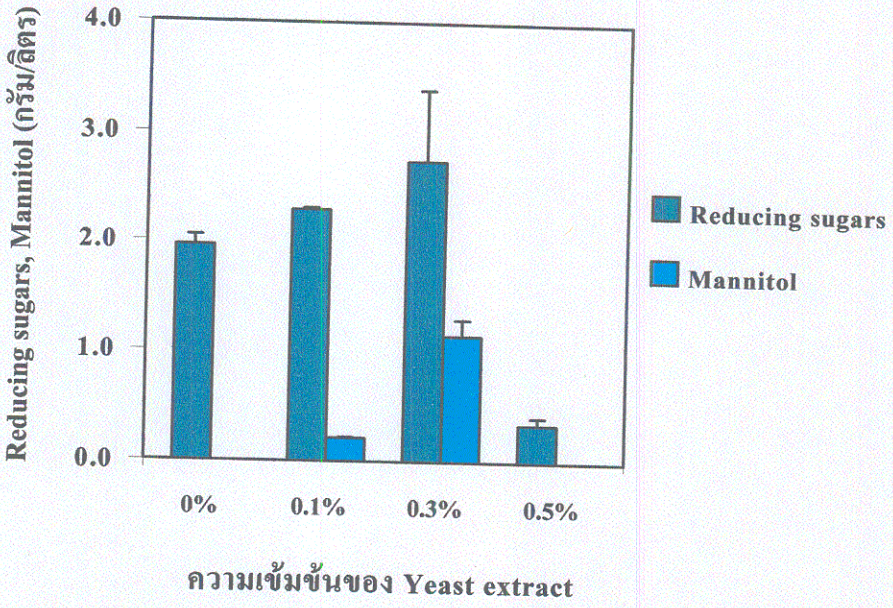
เซลล์ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 มาก ซึ่งไม่พบการสะสมแมนนิทอลเลยเมื่อไม่เติม Yeast extract หรือเติม Yeast extract ในความเข้มข้นสูงถึง 0.5 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3.4)

จากการศึกษาถึงปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) ที่เหมาะสม พบว่า Inoculum size ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีจำนวนเซลล์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (โดยประมาณ) ให้ผลการสะสมแมนนิทอลภายในเซลล์ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 ในปริมาณมากที่สุด คือ 1.48 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 3.5) และเมื่อเปรียบเทียบการเลี้ยงยีสต์ดังกล่าวใน Starch broth ด้วย Inoculum size ที่ต่างกัน พบว่าได้แบบแผนของการเจริญทำนองเดียวกัน (รูปที่ 3.6) ซึ่งการเจริญของยีสต์ KAY1 เริ่มเข้าสู่ Stationary phase ในวันที่ 5 ของการเลี้ยงเชื้อ

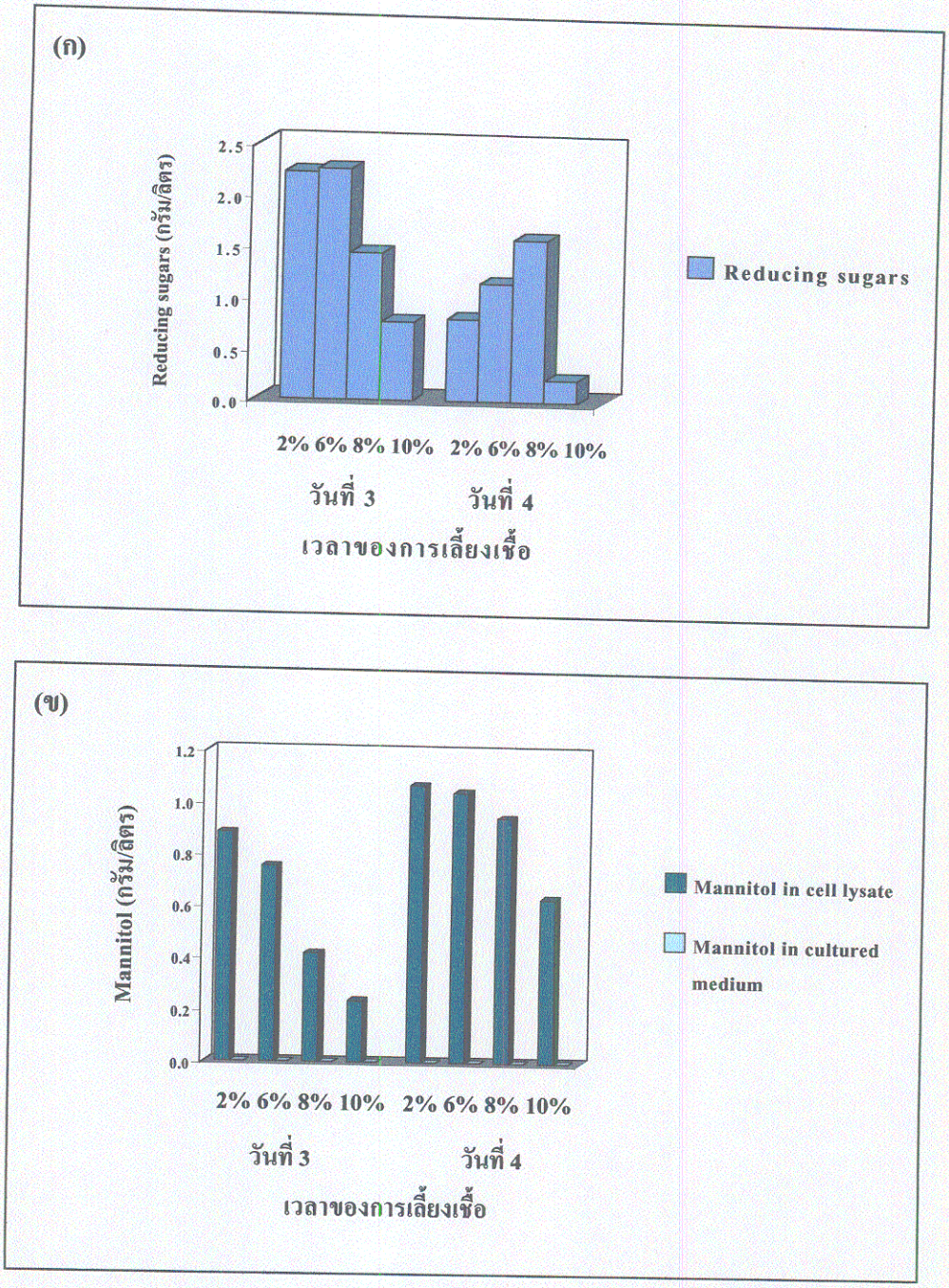
กล่าวโดยสรุปได้ว่าสภาวะที่เหมาะสมบางสภาวะในเบื้องต้นของการเลี้ยงยีสต์ไอโซเลท KAY1 เพื่อการผลิตแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลังในระดับห้องปฏิบัติการ (ปริมาณการผลิต 50 มิลลิลิตร) มีดังนี้ อาหาร Starch broth ที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสม คือ แป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) Yeast extract 0.3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต $[(NH_4)_2SO_4]$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.05 เปอร์เซ็นต์ และ โมโนโปรแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6.0 และปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) ที่มีจำนวนเซลล์ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (โดยประมาณ) ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ โดยเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน ปริมาณแมนนิทอลสูงสุดที่ผลิตได้คือ 1.48 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ



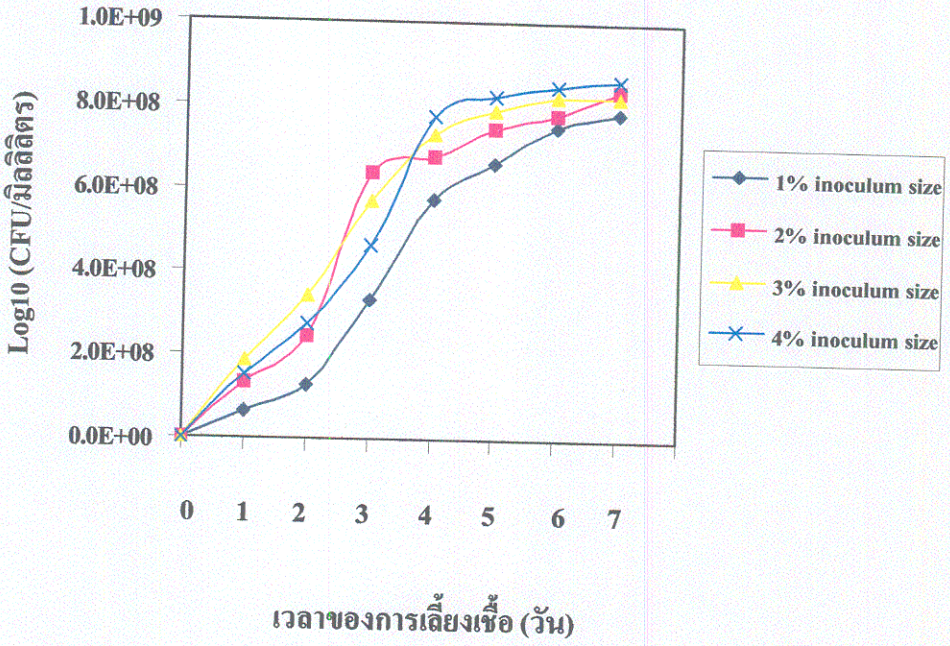
รูปที่ 3.3 ผลของปริมาณแป้งมันสำปะหลัง (ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร Starch broth ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) และ แมนนิทอล (Mannitol) ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 3.4 ผลของปริมาณ Yeast extract (ความเข้มข้น 0, 0.1, 0.3 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) ที่เป็นส่วนประกอบของอาหาร Starch broth ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ ต่อการผลิตน้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) และแมนนิทอล (Mannitol) ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน



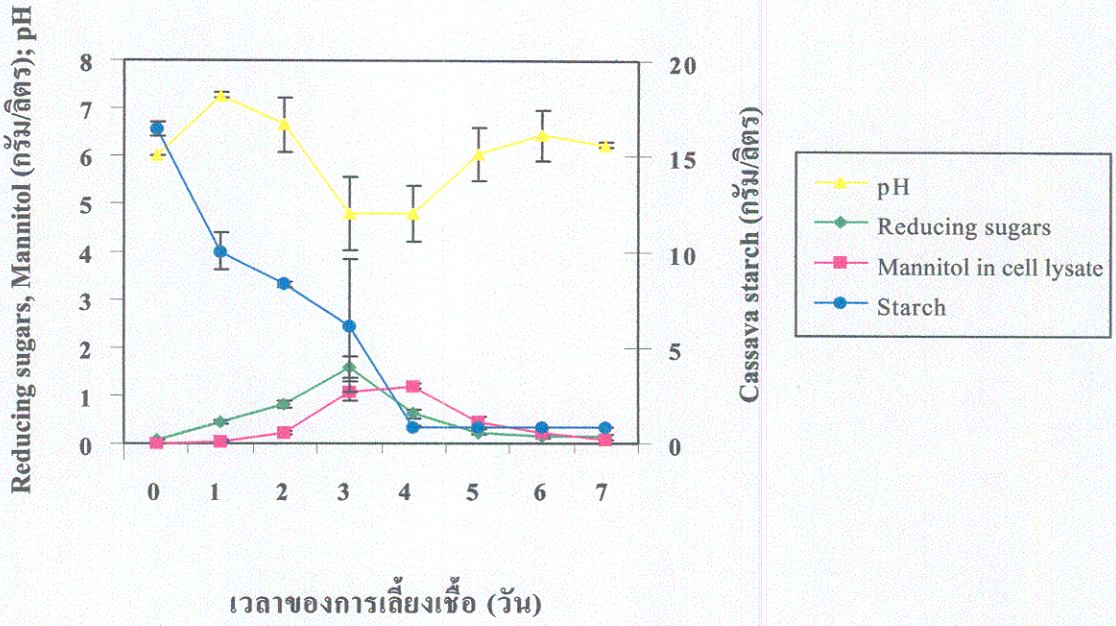
รูปที่ 3.5 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size; 2, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร) ต่อการผลิต (ก) น้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) และ (ข) แมนนิทอล (Mannitol) ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 3.6 กราฟการเจริญ (Growth curve) ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงยีสต์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) แตกต่างกันในอาหาร Starch broth ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน

4. การทดลองผลิตแมนนิทอลและ/หรือกลีเซอรอลของจุลินทรีย์ที่คัดเลือกโดยใช้สภาวะที่เหมาะสม

จุลินทรีย์ที่คัดเลือกมาศึกษาในขั้นตอนนี้ยังคงเป็นยีสต์ไอโซเลท KAY1 ซึ่งมีความสามารถในการสะสมเฉพาะแมนนิทอลภายในเซลล์ในปริมาณสูงที่สามารถตรวจพบได้ เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งอาหารหลัก และเมื่อทดลองเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตแมนนิทอลในสภาวะของการเลี้ยงที่เหมาะในเบื้องต้นตามที่ได้ศึกษา (ข้อ 3) เป็นเวลา 7 วัน โดยเพิ่มปริมาณการผลิตจากปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร เป็น 500 มิลลิลิตร พบว่ายีสต์สามารถผลิตแมนนิทอลที่สะสมภายในเซลล์ได้ปริมาณสูงสุด คือ 1.23 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3.7) ปริมาณแป้ง มันสำปะหลังในอาหาร Starch broth ก็ลดลงอย่างมากในช่วง 4 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ พบการสะสมน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณสูงสุด ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีความสอดคล้องกับสภาพที่มีแรงดันออสโมติกสูงที่กระตุ้นให้เกิดการสะสม Sugars alcohol ของยีสต์ (Omori *et al.*, 1995) และความเป็นกรด-ด่างลดลงต่ำที่สุด (pH 4.3) ในวันที่ 3 และ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และสูงขึ้นในระดับใกล้เคียงกับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหาร (pH 6.0) ในวันที่ 5 และค่อนข้างคงที่ในระดับดังกล่าวจนถึงวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3.7)

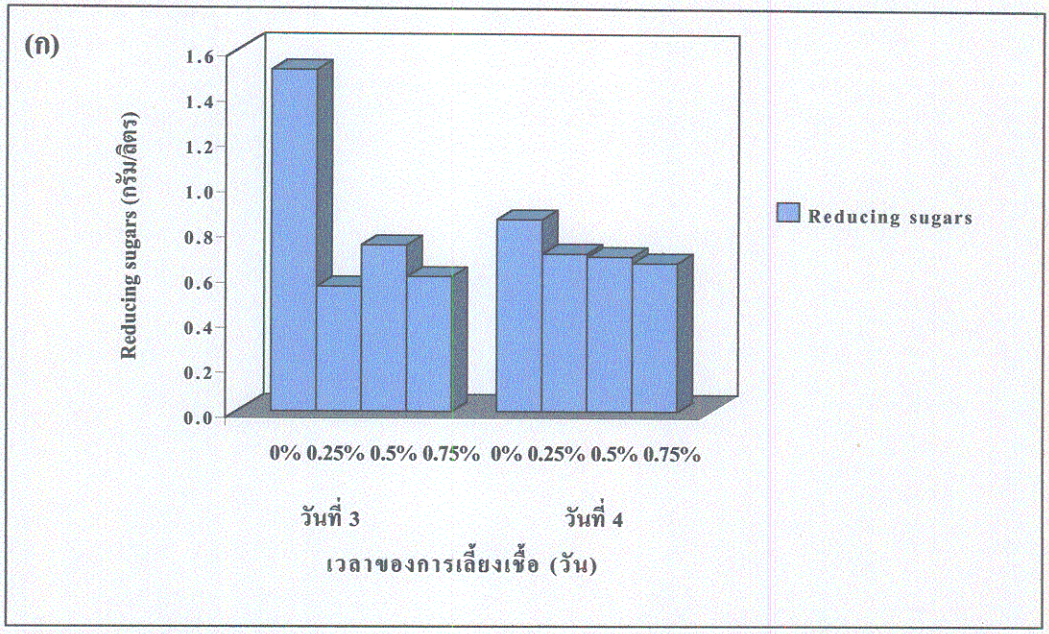


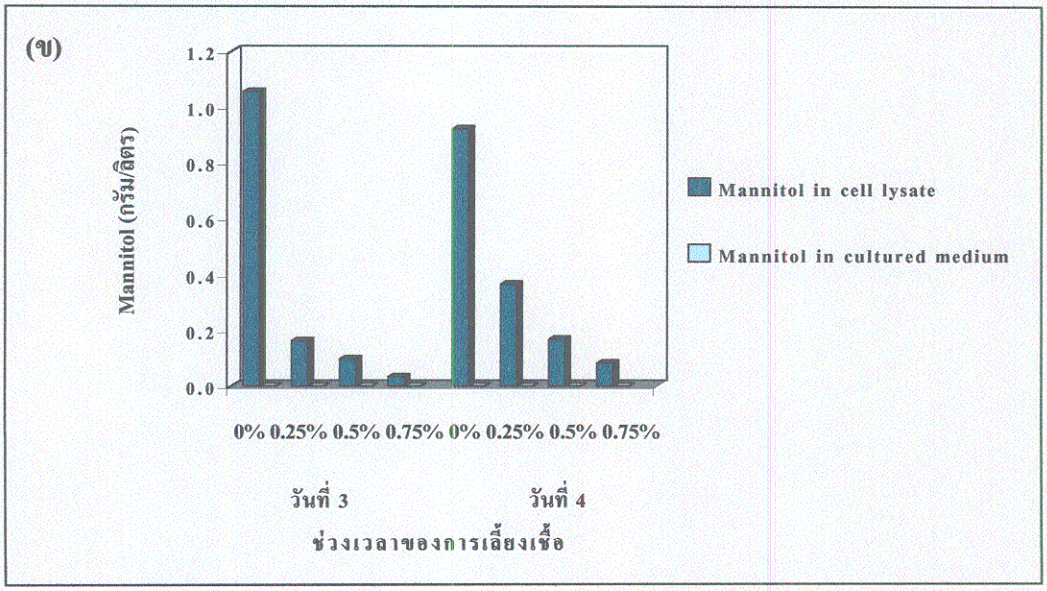
รูปที่ 3.7 การผลิตแมนนิทอล (Mannitol) ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 ในอาหารเหลวที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (Inoculum size) 2 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน

5. การใช้วิธีทางเคมีและกายภาพเพื่อส่งเสริมการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล

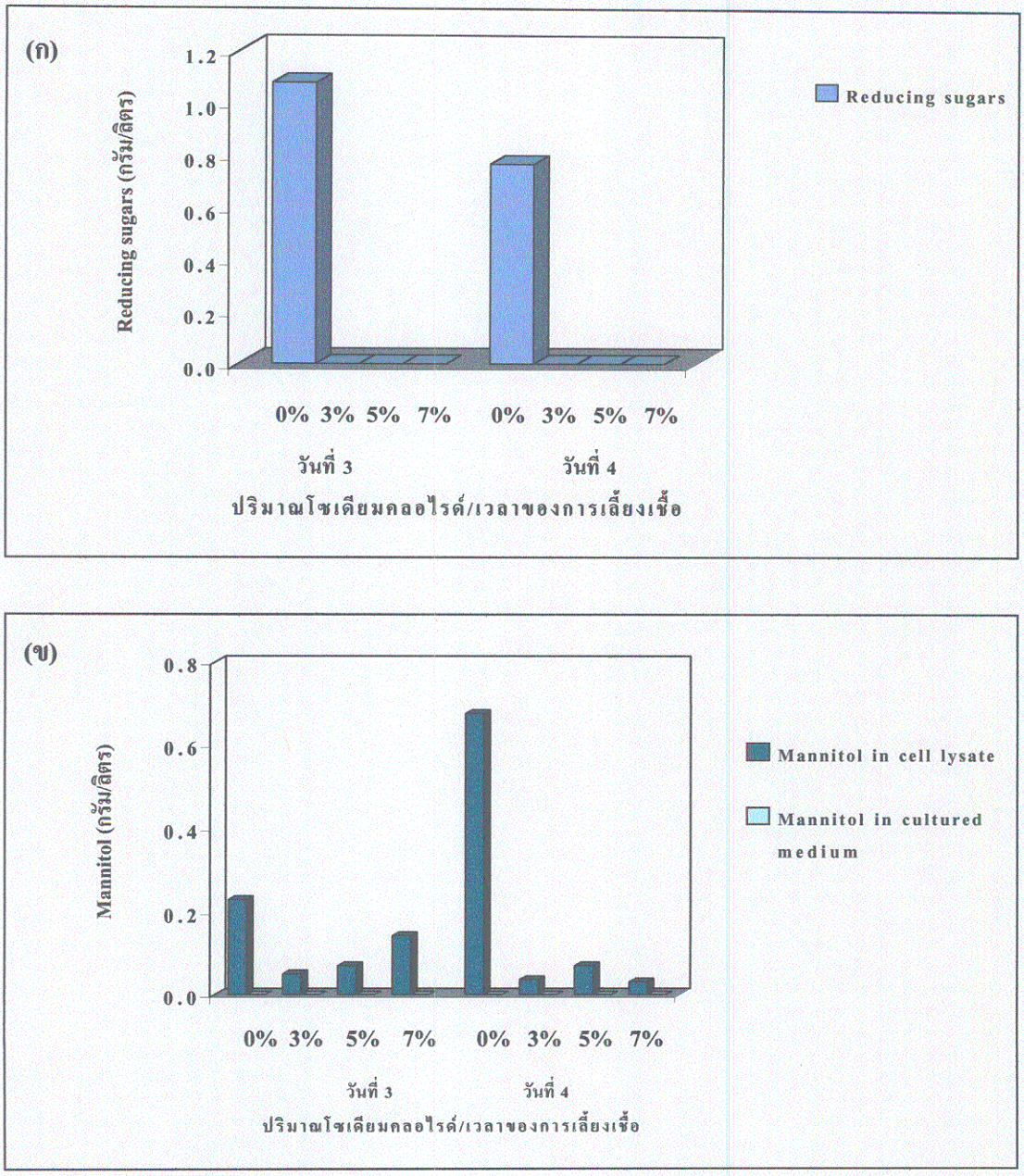
เนื่องจากยีสต์ที่คัดเลือกได้คือ ไอโซเลท KAY1 ซึ่งมีความสามารถในการสะสมแมนนิทอลภายในเซลล์เมื่อเจริญในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ดังนั้นเพื่อส่งเสริมหรือเพิ่มปริมาณการผลิตแมนนิทอลของยีสต์ KAY1 จึงทดลองใช้ปัจจัยทั้งทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของยีสต์ ในด้านเพิ่มการสะสมสารที่ต้องการในปริมาณที่สูงขึ้น ซึ่งวิธีการที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ การใช้สารแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) เพื่อควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ การใช้ Salt-stress condition ในสภาวะที่ยีสต์เจริญ และ Heat-shock treatment กับเซลล์ของยีสต์ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตแมนนิทอล พบว่า Heat-shock treatment กับเซลล์ของยีสต์ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตแมนนิทอล ให้ผลในการส่งเสริมการผลิตแมนนิทอลของยีสต์ KAY1 ได้ดีกว่าทั้งการใช้สารแคลเซียมคาร์บอเนตเพื่อควบคุมระดับความเป็นกรด-ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และการใช้ Salt-stress condition ในสภาวะที่ยีสต์เจริญ ซึ่งสองวิธีการหลังนี้ไม่ส่งเสริมการผลิตแมนนิทอลของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เลย (รูปที่ 3.8, 3.9 และ 3.10) และเมื่อใช้วิธี Heat-shock treatment กับเซลล์ของยีสต์ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตแมนนิทอล ที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 20 นาที มีผลให้เกิดการสะสมแมนนิทอลภายในเซลล์ในปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1.64 กรัมต่อลิตร ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ ที่มีปริมาณการผลิต 50 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.10)

เมื่อเพิ่มปริมาณการผลิตแมนนิทอลของยีสต์ไอโซเลท KAY1 จากปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 มิลลิลิตร เป็น 500 มิลลิลิตร โดยใช้เซลล์ของยีสต์ซึ่งใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นที่ผ่าน Heat-shock treatment ที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 20 นาที พบว่ายีสต์สามารถผลิตแมนนิทอลและสะสมภายในเซลล์ได้ปริมาณสูงสุด คือ 1.36 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3.11) ปริมาณแป้งมันสำปะหลังในอาหาร Starch broth ก็ลดลงอย่างมากในช่วง 2 วันแรกของการเลี้ยงเชื้อ พบการสะสมน้ำตาลรีดิวส์ในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณสูงสุด ในวันที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ และความเป็นกรด-ด่างลดลงต่ำ (pH 5.0 และ 4.8) ในวันที่ 3 และ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ และสูงขึ้นในระดับใกล้เคียงกับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหาร (pH 6.0) ในวันที่ 5 และค่อนข้างคงที่ในระดับดังกล่าวจนถึงวันที่ 7 ของการเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 3.11)

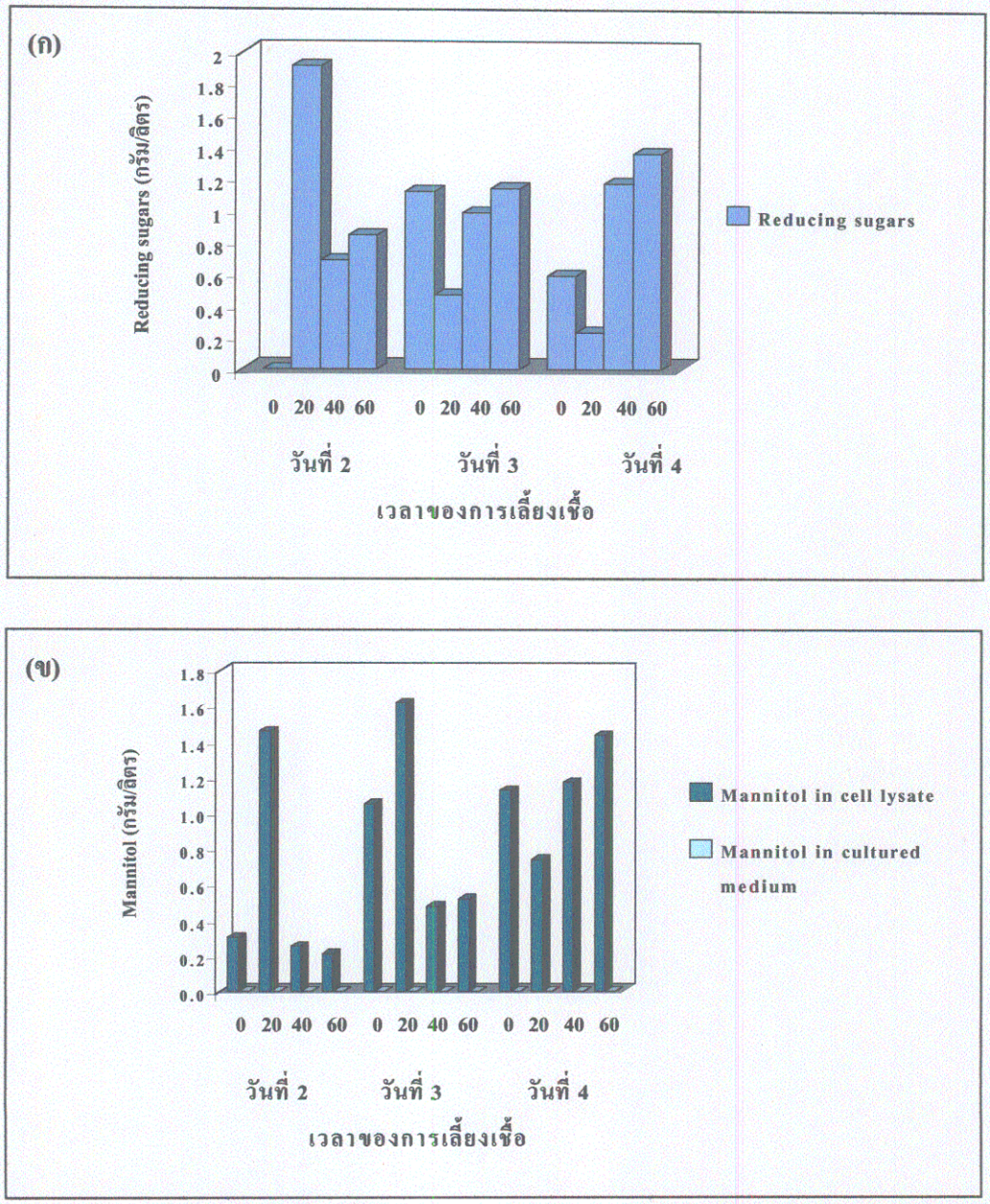




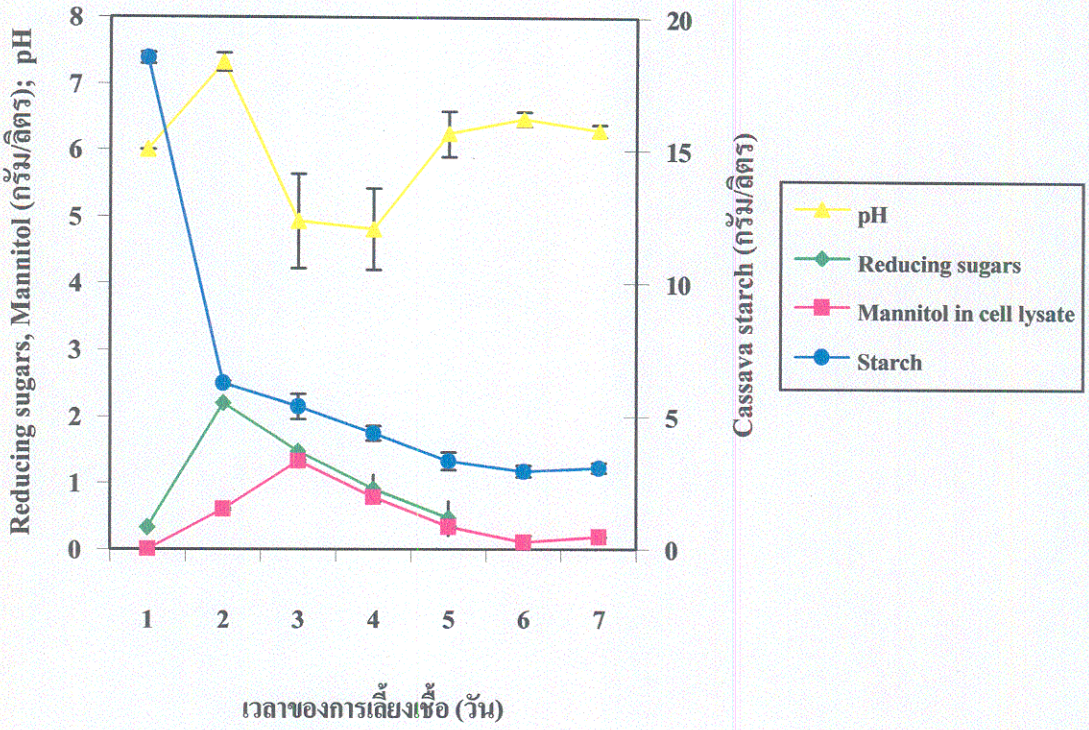
รูปที่ 3.8 ผลของแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) (ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการผลิต (ก) น้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) และ (ข) แมนนิทอล (Mannitol) ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 3.9 ผลของโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) (ความเข้มข้น 0, 3, 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร) ต่อการผลิต (**ก**) น้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) และ (**ข**) แมนนิทอล (Mannitol) ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 3.10 ผลของ Heat-shock treatment ที่ 45°ซ. เป็นเวลา 0, 20, 40 และ 60 นาที ต่อการผลิต (ก) น้ำตาลรีดิวส์ (Reducing sugars) และ (ข) แมนนิทอล (Mannitol) ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน



รูปที่ 3.11 การผลิตแมนนิทอล (Mannitol) โดยยีสต์ไอโซเลท KAY1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ เป็นส่วนประกอบ เมื่อใช้เซลล์ของเชื้อเริ่มต้นที่ผ่าน Heat-shock treatment ที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 20 นาที และเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 7 วัน

6. การผลิตแหล่งอาหารจากแป้งมันสำปะหลังและทดลองใช้เลี้ยงไรโซเบียม

แหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียมผลิตจากยีสต์ไอโซเลท KAY1 ใน Starch broth ที่ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ Yeast extract 0.3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 0.5 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.05 เปอร์เซ็นต์ และโมโนโปรแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6.0 โดยใช้เซลล์ของยีสต์ซึ่งใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นที่ผ่าน Heat-shock treatment ที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 20 นาที ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรการผลิตรวมทั้งสิ้น 5,000 มิลลิลิตร และเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นเก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์เพื่อเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม (ตารางที่ 3.4) โดยใช้อาหาร Yeast extract-mannitol broth (YMB) (ตารางที่ 3.4) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบการเจริญของไรโซเบียมสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบ คือ ไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญช้า 2 สายพันธุ์ (*Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 และ *Bradyrhizobium* sp. THA 5) ซึ่งมีความจำเพาะกับ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง ซึ่งเมื่อนำไรโซเบียมดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารที่มีแมนนิทอลซึ่งเตรียมได้จากเซลล์ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 ในลักษณะ Crude cell lysate (ตารางที่ 3.4) ที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 6 วัน โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีจำนวนเซลล์ 10^6 เซลล์ (CFU) ต่อมิลลิลิตร(โดยประมาณ) และ Inoculum size 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 และ *Bradyrhizobium* sp. THA 5 สามารถเจริญได้จำนวนเซลล์สูงถึง $6.0x10^8$ และ $9.2x10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร (โดยเฉลี่ย) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.5) ซึ่งได้ผลดีใกล้เคียงกับการเลี้ยงไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์ในอาหาร YMB ที่เตรียมโดยใช้แมนนิทอลที่ผลิตเป็นการค้า (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.4 เปรียบเทียบชนิดและส่วนประกอบของอาหารที่เตรียมเพื่อทดลองเลี้ยง *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 และ *Bradyrhizobium* sp. THA 5

ชนิดของอาหาร/ ส่วนประกอบ (กรัม)	Starch medium[1]	Yeast extract-mannitol broth (YMB)[2]	New medium[3]
Mannitol	-	5.0	6.0 (ใน Crude cell lysate)
Yeast extract	3.0	0.5	-
$(NH_4)_2SO_4$	5.0	-	-
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	0.2	-
K_2HPO_4	-	0.5	0.5
KH_2PO_4	1.0	-	-
Sodium chloride	-	0.1	0.1
Cassava starch	20.0	-	-
น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	1,000	1,000	1,000
pH เริ่มต้น	6.0	6.8	6.8

1 = อาหารที่ใช้ผลิตแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม (แมนนิทอล) โดยยีสต์ไอโซเลท KAY1

2 = อาหารมาตรฐานสำหรับเลี้ยง *Bradyrhizobium* spp.

3 = อาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียมที่เตรียมจาก Crude cell lysate ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 ที่เจริญใน Starch medium

ตารางที่ 3.5 เปรียบเทียบการเจริญของ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 และ *Bradyrhizobium* sp. THA 5 ในอาหาร Yeast extract-mannitol broth (YMB) และ อาหารที่เตรียมจาก Crude cell lysate ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 ที่เจริญใน Starch medium

ชนิดของอาหาร	การเจริญของไรโซเบียม (CFU/มิลลิลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงเชื้อ							
	Bradyrhizobium japonicum USDA 110				*Bradyrhizobium* sp. THA 5			
	0 วัน	2 วัน	4 วัน	6 วัน	0 วัน	2 วัน	4 วัน	6 วัน
Yeast extract-mannitol broth (YMB)[1]	$1.0x10^7$	$1.3x10^7$	$4.6x10^8$	$9.3x10^8$	$1.0x10^7$	$1.3x10^7$	$5.5x10^8$	$1.3x10^9$
New medium[2]	$1.0x10^7$	$1.1x10^7$	$3.5x10^8$	$6.0x10^8$	$1.0x10^7$	$1.1x10^7$	$2.2x10^8$	$9.2x10^8$

1 = อาหารมาตรฐานสำหรับเลี้ยง *Bradyrhizobium* spp.

2 = อาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียมที่เตรียมจาก Crude cell lysate ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 ที่เจริญใน Starch medium

7. การวิเคราะห์ชนิดของยีสต์ที่แยกได้

ได้เลือกยีสต์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ จำนวน 7 ไอโซเลท คือ Y69, KAY1, PIY2, PUY4, COY1, LIY2 และ FAY2 (ตารางที่ 3.6) เพื่อจัดจำแนกและวิเคราะห์ชนิดโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของยีสต์ ตาม Barnett *et al.* (1990) และ Kurtzman and Fell (1998) ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 3.12 และตารางที่ 3.7 และ 3.8

ตารางที่ 3.6 ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับยีสต์ไอโซเลทที่ได้คัดเลือกเพื่อวิเคราะห์ชนิด

ยีสต์ไอโซเลท	แหล่งของยีสต์	ความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง	ความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล	
			จากกลูโคส[1]	จากแป้งมันสำปะหลัง[2]
Y69	หัวมันสำปะหลังและเก็บรักษาไว้ใน Stock cultures ของห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	+	สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ (1.85 กรัมต่อลิตร)	-
KAY1	ผลกระเจี๊ยบสด	+	สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.51 กรัมต่อลิตร) และสะสมแมนนิทอลทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์	สะสมแมนนิทอลในเซลล์ (1.12 กรัมต่อลิตร)
PIY2	ผลสับปะรด	-	สะสมกลีเซอรอลทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ (1.48 และ	-

+ = ให้ผลบวก - = ให้ผลลบ

1 = อาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth (ภาคผนวก ค 9) ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์

2 = อาหาร Starch broth (ภาคผนวก ค 6) ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.6 *(ต่อ)*

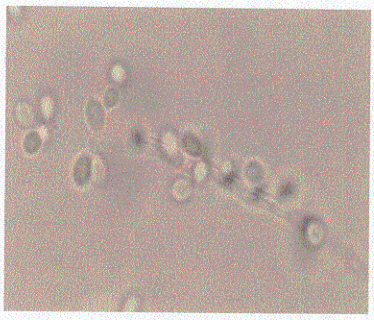
ยีสต์ไอโซเลท	แหล่งของยีสต์	ความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง	ความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล	
			จากกลูโคส[1]	จากแป้งมันสำปะหลัง[2]
PIY2 (ต่อ)			1.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และสะสมแมนนิทอลทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์	
PUY4	ผลพุทรา	+	สะสมกลีเซอรอลทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ (1.46 และ 0.11 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) และสะสมแมนนิทอลในเซลล์	-
COY1	เครื่องดื่มโกโก้	-	สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ (3.21 และ 0.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ)	-
LIY2	ฝักถั่วฝักยาว	-	สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ (4.64 กรัมต่อลิตร)	-
FAY2	ผลฝรั่งสด	-	สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ (3.21 และ 0.23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ)	-

+ = ให้ผลบวก - = ให้ผลลบ

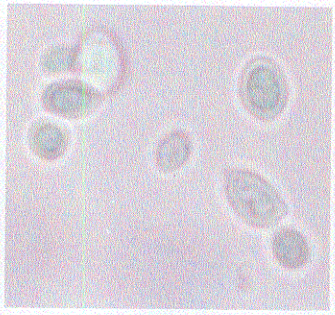
1 = อาหาร Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth (ภาคผนวก ค 9) ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์

2 = อาหาร Starch broth (ภาคผนวก ค 6) ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์

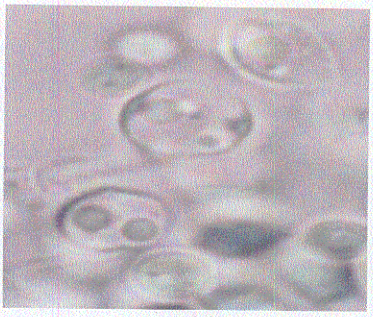
ก



(1)

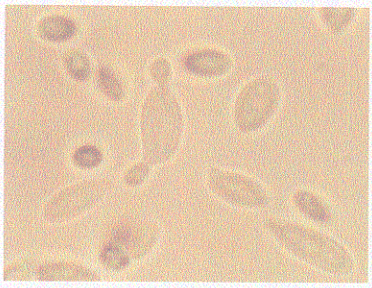


(2)

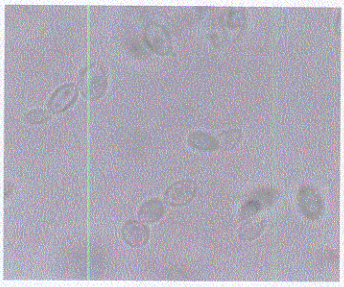


(3)

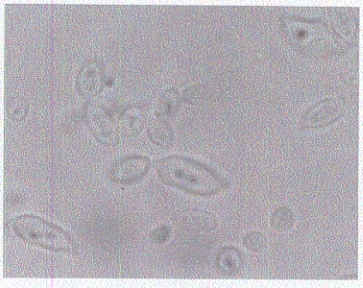
ข



(1)

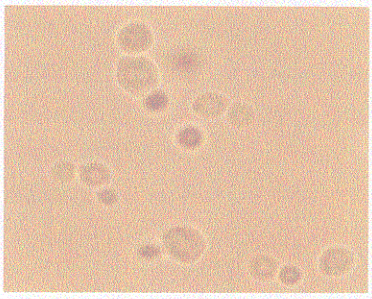


(2)

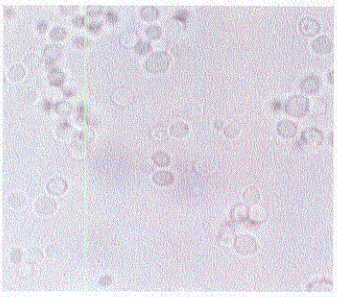


(3)

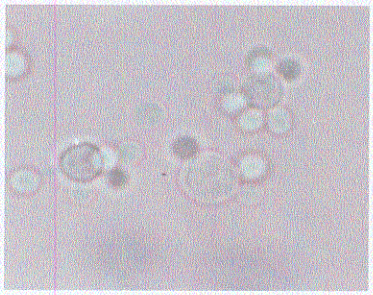
ค



(1)



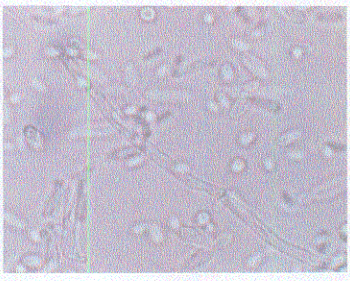
(2)



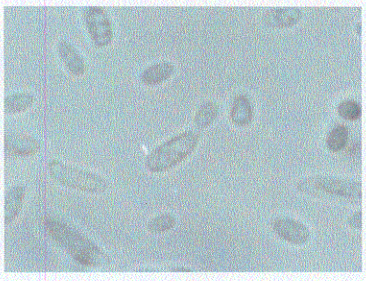
(3)

ง

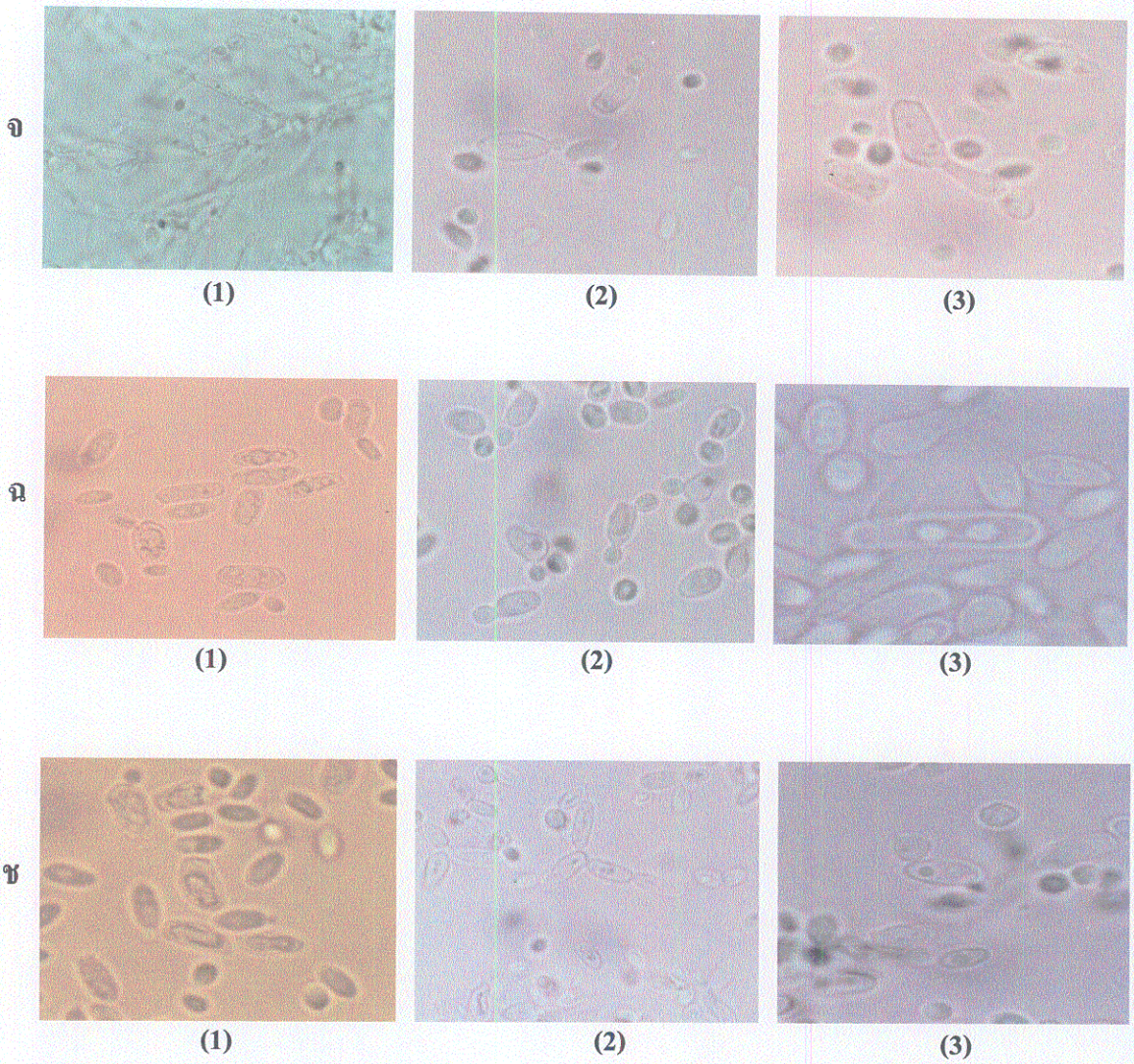
(1)



(2)



(3)



รูปที่ 3.12 สัณฐานวิทยาของเซลล์ของยีสต์ จากกล้องจุลทรรศน์ที่ใช้แสง เมื่อใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100 เท่า

(ก) ไอโซเลท Y69 **(ข)** ไอโซเลท KAY1 **(ค)** ไอโซเลท PIY2 **(ง)** ไอโซเลท PUY4 **(จ)** ไอโซเลท LIY2 **(ฉ)** ไอโซเลท COY1 และ **(ช)** ไอโซเลท FAY2

ทุกไอโซเลทเจริญที่ 25°ซ.

(1) Vegetative/Budding cells (และ Pseudomycelium) เจริญบน MY agar เป็นเวลา 3 วัน

(2) Vegetative/Budding cells เจริญบน MY agar เป็นเวลา 5 สัปดาห์ และ

(3) Vegetative cells และ Asci ที่มี Ascospores เมื่อเจริญบน Acetate agar เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ตารางที่ 3.7 คุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์เพื่อการระบุชนิด

ยีสต์ไอโซเลท ข้อมูลจาก Kurtzman and Fell (1998)

ชนิดของยีสต์ / คุณลักษณะ	1. Y69	2. KAY1	3. PIY2	4. PUY4	5. LIY2	6. COY1	7. FAY2	8. *Kluyveromyces maxianus*	9. *Saccharomycopsis fibuligera*	10. *Rhodotorula glutinis*	11. *Zygosaccharomyces bailii*	12. *Candida guilliermondii*	13. *Pichia cactophilla*	14. *Pichia kluyverri* var. *eremophila*	15. *Pichia membranifaciens*	16. *Pichia toletana*	17. *Pichia pastoris*
Fermentation (C-source)																	
Cellobiose	S	-	-	ws	-	-	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D-Galactose	-	-	-	ws	-	-	-	+	-	-	-	+/w	-	-	-	-	-
D-Glucose	+/w	-	+	+	+/w	+/w	+/w	+	+/w	-	+	+	w/-	+	w/-	ws	+
Lactose	-	-	-	+	-	-	-	V	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	-	-	w/-	w/-	-	w/-	-	+/w	-	-	w/-	-	-	-	-	-
Melibiose	-	-	-	+	-	-	-	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Raffinose	-	-	-	ws	-	-	-	+	w/-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sucrose	+	-	S	+	-	-	w/-	+	+/w	-	V	+	-	-	-	-	-
α, α-Trehalose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	w/-	w/-	-	-	-	-	-
D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	N	N	N	-	N	N	N	N	N	N
Assimilation (C- source)																	
L-Arabinose	-	+	-	-	w/-	-	-	V	-	V	-	-	-	-	-	-	-
Celllobiose	w/-	-	-	+	w/-	-	-	V	+	V	-	+	-	-	-	+	-
D-Galactose	+	-	-	+	w/-	-	-	+	-	V	V	+	-	-	-	-	-

+ = Positive - = Negative V = Variable N = No data

+/w = Weak or positive w/- = Weak or negative ws = Weak or slow S = Slow

ตารางที่ 3.7 *(ต่อ)*

ยีสต์ไอโซเลท ข้อมูลจาก Kurtzman and Fell (1998)

ชนิดของยีสต์ / คุณลักษณะ	1. Y69	2. KAY1	3. PIY2	4. PUY4	5. LIY2	6. COY1	7. FAY2	8. *Kluyveromyces maxianus*	9. *Saccharomycopsis fibuligera*	10. *Rhodotorula glutinis*	11. *Zygosaccharomyces bailii*	12. *Candida guilliermondii*	13. *Pichia cactophilla*	14. *Pichia kluyerri* var. *eremophila*	15. *Pichia membranifaciens*	16. *Pichia toletana*	17. *Pichia pastoris*
Assimilation (C-source)																	
D-Gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	+/w	+	-	V	-	-	-	V	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	w/-	-	-	-	-	-	-	v	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Maltose	+	+	-	w/-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-
D-Mannitol	-	-	-	-	-	+	-	V	V	V	+	+	-	-	-	+	+
Melezitose	-	+	-	-	-	+	-	-	V	+	-	-	-	-	-	V	-
Melibiose	-	w/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	-	-	-	+	V	V	-	+	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	w/-	-	-	-	V	-	-	-	-	-	V	+
D-Ribose	-	w/-	w/-	-	w/-	w/-	+	-	-	V	-	V	-	-	-	-	-
Salicin	-	-	-	-	-	+	w/-	V	+	+/w	-	+	-	-	-	+	-
Soluble starch	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	-	+	w/-	+	+	+	V	+	-	-	-	+	-
α, α-Trehalose	-	w/-	w/-	+	-	-	+	V	V	+	+/w	+	-	-	-	+	+
D-Xylose	w/-	+	-	w/-	-	+	+	+	-	V	-	-	+/w	V	V	+	V

+ = Positive **- = Negative** **V = Variable** **N = No data**

+/w = Weak or positive **w/- = Weak or negative** **ws = Weak or slow** **S = Slow**

ตารางที่ 3.7 *(ต่อ)*

ยีสต์ไอโซเลท **ข้อมูลจาก Kurtzman and Fell (1998)**

ชนิดของยีสต์ / คุณลักษณะ	1. Y69	2. KAY1	3. PIY2	4. PUY4	5. LIY2	6. COY1	7. FAY2	8. *Kluyveromyces marxianus*	9. *Saccharomycopsis fibuligera*	10. *Rhodotorula glutinis*	11. *Zygosaccharomyces bailii*	12. *Candida guilliermondii*	13. *Pichia cactophilla*	14. *Pichia kluyerri* var. *eremophila*	15. *Pichia membranifaciens*	16. *Pichia toletana*	17. *Pichia pastoris*
Assimilation (N-source)																	
Nitrate	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Urea hydrolysis	-	+	-	-	-	-	-	N	N	+	-	-	-	-	-	-	-
คุณลักษณะอื่นๆ																	
Growth at 25°ซ.	+	+	+	+	+	+	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Growth at 30°ซ.	+	+	+	+	+	+	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Growth at 35°ซ.	+	+	+	+	+	+	+	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
Growth at 37°ซ.	+	+	+	+	+	+	+	+	+/w	+	V	+	+	+	V	-	+/w
Growth at 40°ซ.	+	-	+/w	+/w	+	+/w	+/w	N	N	N	N	N	N	V	N	-	N
Sediment	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	N	+	N	N	N	N	N
Pellicle	-	-	-	+	+	+	+	+	V	-	-	+	+	+	+	+	-
Pseudo-mycelium formation	+	+	-	+	+	+	-	+	N	+	-	+	+	+	+	+	-
Ascospore formation	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+

+ = Positive **- = Negative** **V = Variable** **N = No data**

+/w = Weak or positive **w/- = Weak or negative** **ws = Weak or slow** **S = Slow**

ตารางที่ 3.8 ชนิดของยีสต์ที่สามารถระบุได้ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางสรีรวิทยาบางประการ

ยีสต์ไอโซเลท	ผลการระบุชนิด
Y69	จัดอยู่ในสกุล (Genus) *Saccharomycopsis* และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิด *Saccharomycopsis fibuligera*
KAY1	จัดอยู่ในสกุล *Rhodotorula* และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิด *Rhodotorula glutinis*
PIY2	จัดอยู่ในสกุล *Zygosaccharomyces* และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิด *Zygosaccharomyces bailii*
PUY4	จัดอยู่ในสกุล *Candida* และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิด *Candida guiliermondii*
LIY2	จัดอยู่ในสกุล *Pichia* และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิด *Pichia cactophilla*
COY1	จัดอยู่ในสกุล *Pichia* และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิด *Pichia kluyveri* หรือ *Pichia membranifaciens* หรือ *Pichia toletana*
FAY2	จัดอยู่ในสกุล *Pichia* และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิด *Pichia pastoris*

บทที่ 4
บทสรุป

1. สรุปผลการวิจัย

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังโดยกระบวนการทางชีวภาพให้เป็นแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม โดยเน้นแหล่งอาหารที่มีสารกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอล ซึ่งเป็นประโยชน์ทั้งการเลี้ยงไรโซเบียมเพื่อการศึกษาและการผลิตหัวเชื้อหรือปุ๋ยไรโซเบียมสำหรับใช้ในการปลูกพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย และการใช้ประโยชน์แป้งมันสำปะหลัง ไรโซเบียมหลายสายพันธุ์ใช้กลีเซอรอลและแมนนิทอลเป็นแหล่งอาหารหลักและไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและซูโครสที่แบคทีเรียโดยทั่วไปมักนำไปใช้ได้ง่าย โดยเฉพาะอย่างยิ่งไรโซ-เบียมกลุ่มที่เจริญช้า (Slow-growing rhizobia) ซึ่งมีพืชอาศัยเป็นพืชตระกูลถั่วที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งในอาหารเลี้ยงไรโซเบียมส่วนใหญ่มีแมนนิทอลเป็นส่วนประกอบ ทั้งแมนนิทอล (และกลีเซอรอล) มีมูลค่าสูงกว่ากลูโคสประมาณ 12-20 เท่า ทำให้มีต้นทุนสูงในการเลี้ยงเชื้อ ผลจากการศึกษาครั้งนี้จึงอาจช่วยลดต้นทุนในการเลี้ยงและผลิตหัวเชื้อไรโซเบียมได้ จากการคัดเลือกยีสต์จำนวน 166 ไอโซเลท (147 ไอโซเลท แยกได้จากแหล่งธรรมชาติ และ 19 สายพันธุ์ จากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์) ด้านความสามารถในการใช้แป้งมันสำปะหลัง พบว่ามียีสต์ที่แยกจากแหล่งธรรมชาติจำนวน 21 ไอโซเลท (โดยเฉพาะอย่างยิ่งไอโซเลท KAY1 แยกได้จากผลกระเจี๊ยบสด และ SOY6 และ SOY7 แยกได้จากผลมะขามป้อมสด) และจากแหล่งเก็บเชื้อ 2 สายพันธุ์ (*Endomyces fibuligera* DSM 70554 และ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033) และ 1 ไอโซเลท (Y69) ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้และได้ดี เมื่อทดสอบโดยใช้ Starch medium ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 3 วัน

เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและแมนนิทอลจากน้ำตาลของยีสต์จำนวน 166 ไอโซเลท โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง คือ Yeast extract-peptone-dextrose (YEPD) broth ที่ประกอบด้วยกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ ทริปโตน (Tryptone) 2 เปอร์เซ็นต์ และ Yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 5.5 และเลี้ยงยีสต์เพื่อคัดเลือกที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน ก่อนที่จะทดสอบโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ซึ่งคาดหวังว่ายีสต์บางสายพันธุ์อาจไม่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังแต่สามารถผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากน้ำตาลได้ และวิเคราะห์หากลีเซอรอลและแมนนิทอลจากอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultured medium) และที่สะสมภายในเซลล์ (Cell lysate) โดยใช้เทคนิค Thin-layer chromatography (TLC)

พบว่ายีสต์ที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติจำนวน 116 ไอโซเลท ให้ผลบวกคือผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลจากกลูโคสได้ ซึ่งมียีสต์ 16 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ด้วย ยีสต์จำนวน 103 จาก 116 ไอโซเลท ผลิตกลีเซอรอลและสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถตรวจพบได้ ยีสต์ 10 ไอโซเลท สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อและแมนนิทอลในเซลล์ ยีสต์ 1 ไอโซเลท (PIY2 แยกได้จากผลสับปะรด) สะสมกลีเซอรอลและแมนนิทอลทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ ยีสต์ 2 ไอโซเลท (KAY1 แยกได้จากผลกระเจี๊ยบสด และ WAY6 แยกได้จากของเสียจากการผลิตอาหาร) สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อและแมนนิทอลในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ สำหรับผลการทดสอบความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและแมนนิทอลจากน้ำตาลของยีสต์ที่รวบรวมจากแหล่งเก็บเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์นั้น พบว่า *Endomyces fibuligera* DSM 70554 ที่ย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ดีนั้น ไม่สามารถผลิตทั้งกลีเซอรอลและแมนนิทอล แต่ไอโซเลท Y69 และ *Saccharomycopsis fibuligera* TISTR 5033 ที่ย่อยแป้งได้ดีเช่นกัน มีการสะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ตรวจพบได้ ยีสต์อีก 12 สายพันธุ์ สะสมกลีเซอรอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ตรวจพบได้ และมียีสต์เพียง 2 สายพันธุ์ คือ *Rhodotorula rubra* TISTR 5067 และ ไอโซเลท Y60 มีการสะสมแมนนิทอลภายในเซลล์ ไอโซเลท Y60 ยังสะสมแมนนิทอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ตรวจพบได้บ้างอีกด้วย

เมื่อคัดเลือกผลผลิตจากยีสต์จากการวิเคราะห์ด้วย TLC มาวิเคราะห์หาปริมาณของกลีเซอรอลด้วย Glycerol Test Kit (Boehringer Mannheim) เพื่อช่วยในการคัดเลือกเชื้อในเบื้องต้น พบว่ายีสต์สามารถผลิตกลีเซอรอลสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ที่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ในปริมาณในช่วง 0.02-4.64 กรัมต่อลิตร และพบว่าจากการใช้ TLC ตรวจไม่พบกลีเซอรอลใน Cell lysate ของยีสต์บางไอโซเลท แต่สามารถตรวจพบได้เมื่อใช้ Glycerol Test Kit ยีสต์ไอโซเลท LIY2 ที่แยกได้จากฝักถั่วฝักยาวและไม่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ แต่สามารถผลิตกลีเซอรอลสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ปริมาณสูงสุด (4.64 กรัมต่อลิตร) ไอโซเลท COY1 แยกได้จากเครื่องดื่มโกโก้ ซึ่งไม่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ แต่สามารถผลิตกลีเซอรอลสะสมในเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณสูงสุด (0.48 กรัมต่อลิตร) ไอโซเลท PIY2 ไม่สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ แต่สามารถผลิตกลีเซอรอลสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อและในเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ในปริมาณ 1.48 และ 1.52 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลท KAY1 สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ และสามารถผลิตกลีเซอรอลสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ปริมาณ 0.51 กรัมต่อลิตร

ยีสต์ไอโซเลท KAY1 ซึ่งแยกได้จากผลกระเจี๊ยบสดและสามารถผลิตกลีเซอรอล (สะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ) และแมนนิทอล (สะสมภายในเซลล์) เมื่อเจริญในอาหาร YEPD ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นไอโซเดียวที่ได้คัดเลือกเมื่อทดสอบสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและแมนนิทอลจาก

แป้งมันสำปะหลัง ไอโซเลท KAY1 สามารถย่อยแป้งได้ดีและผลิตเฉพาะแมนนิทอลสะสมภายในเซลล์ที่สามารถตรวจพบได้ เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน จากการศึกษาสภาวะบางสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแมนนิทอลจากแป้งมันสำปะหลังของไอโซเลท KAY1 ในระดับห้องปฏิบัติการ (ปริมาณการผลิต 50-500 มิลลิลิตร) ได้ผลสรุปคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง 2 เปอร์เซ็นต์ Yeast extract 0.3 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต [$(NH_4)_2SO_4$] 0.5 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.05 เปอร์เซ็นต์ และโมโนโปรแทสเซียมฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6.0 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยประมาณ) ในปริมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ และเลี้ยงยีสต์บนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30°ซ. เป็นเวลา 4 วัน ปริมาณแมนนิทอลสูงสุดที่ผลิตได้คือ 1.23-1.48 กรัมต่อลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ การให้ความร้อนต่อเซลล์ยีสต์ (Heat-shock treatment) ที่อุณหภูมิ 45°ซ. เป็นเวลา 20 นาที ก่อนนำไปเลี้ยงในอาหารแป้งมันสำปะหลัง ช่วยส่งเสริมความสามารถในการผลิตแมนนิทอล ให้ได้ปริมาณสูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 1.36-1.64 กรัมต่อลิตร ในวันที่ 3 ของการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำไรโซเบียมกลุ่มที่เจริญช้า คือ *Bradyrhizobium japonicum* USDA 110 และ *Bradyrhizobium* sp. THA 5 ซึ่งมีความจำเพาะกับ ถั่วเหลือง ถั่วเขียว และถั่วลิสง มาทดลองเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 6 วัน ในอาหารที่มีแมนนิทอลซึ่งเตรียมได้จากเซลล์ของยีสต์ไอโซเลท KAY1 ในลักษณะ Crude cell lysate ตามส่วนประกอบ ดังนี้ แมนนิทอล (ใน Crude cell lysate) 0.6 เปอร์เซ็นต์ ไดโปรแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.05 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6.8 พบว่าไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์สามารถเจริญได้จำนวนเซลล์สูงถึง $6.0x10^8$ และ $9.2x10^8$ CFU ต่อมิลลิลิตร (โดยเฉลี่ย) ตามลำดับ ซึ่งได้ผลดีใกล้เคียงกับการเลี้ยงไรโซเบียมทั้งสองสายพันธุ์นั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้แมนนิทอลที่ผลิตเป็นการค้า คือ Yeast extract-mannitol broth (YMB) ซึ่งประกอบด้วย แมนนิทอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ Yeast extract 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 0.02 เปอร์เซ็นต์ ไดโปรแทสเซียมฟอสเฟต (K_2HPO_4) 0.05 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 0.01 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น เท่ากับ 6.8

จากการศึกษาเพื่อระบุและจัดจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดเลือกเก็บไว้ เพื่อผลิตหรือมีแนวโน้มที่จะใช้ประโยชน์ในการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลซึ่งเป็นแหล่งอาหารหลักสำหรับเลี้ยงไรโซเบียม พบว่ายีสต์ไอโซเลท KAY1 จัดอยู่ในสกุล *Rhodotorula* และมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นชนิด *Rhodotorula glutinis* ส่วนยีสต์อีก 6 ไอโซเลท คือ Y69, PIY2 และ PUY4 จัดอยู่ในสกุล *Saccharomycopsis*, *Zygosaccharomyces* และ *Candida* ตามลำดับ และอีก 3 ไอโซเลท คือ LIY2,

COY1 และ FAY2 จัดอยู่ในสกุล *Pichia* แต่ต่าง Species กัน คือมีความใกล้เคียงกับ *Pichia cactophilla, Pichia kluyveri* หรือ *Pichia membranifaciens* หรือ *Pichia toletana* และ *Pichia pastoris* ตามลำดับ

2. ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยนี้ได้ข้อมูลของการผลิตแหล่งอาหารสำหรับเลี้ยงไรโซเบียมที่มีทั้งแหล่งของคาร์บอนที่จำเป็นสำหรับการเจริญและ Growth factors จากเซลล์ยีสต์ที่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียในระดับห้องปฏิบัติการด้วยวิธีการที่ง่ายและต้นทุนการผลิตต่ำจากการใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบ ที่สามารถใช้เป็นแนวทางในการผลิตในระดับสูงขึ้น (ปริมาณมากขึ้น) ต่อไป การปรับสายพันธุ์ของยีสต์และกระบวนการผลิตในอนาคต จะช่วยให้ได้การผลิตที่มีประสิทธิภาพสูงขึ้น อีกทั้ง Cell lysate ที่ผลิตได้ยังอาจใช้ทดแทน Yeast extract (ที่มาจากการผลิตเป็นการค้า) ในอาหาร Starch medium ได้ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการเลี้ยงไรโซเบียมกลุ่มที่ต้องการแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดแมนนิทอลในการเจริญ เพื่อการศึกษา การผลิตและการใช้ปุ๋ยไรโซเบียม และยังอาจเป็นประโยชน์ในการเลี้ยงจุลินทรีย์กลุ่มอื่นที่ต้องการแหล่งอาหารหลักเช่นเดียวกันอีกด้วย นอกจากนี้ยังได้จุลินทรีย์ในกลุ่มยีสต์หลายชนิด (สายพันธุ์/ไอโซเลท) ซึ่งแยกได้จากแหล่งธรรมชาติที่มีความสามารถในการผลิตกลีเซอรอลและ/หรือแมนนิทอลทั้งจากกลูโคสและแป้งมันสำปะหลัง จากการคัดเลือกเชื้อในเบื้องต้น ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อไปได้ ซึ่งประโยชน์ประการหนึ่งที่มีแนวโน้มถึงความเป็นไปได้คือการผลิตสารแมนนิทอลและกลีเซอรอลเพื่อใช้ในรูปของสารบริสุทธิ์

บรรณานุกรม

กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2538. การแปรรูปมันสำปะหลังเพื่อสิ่งแวดล้อม. *อาหาร Food.* **25**(4): 231-237.

กลุ่มงานวิจัยจุลินทรีย์ดิน. 2535. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรปุ๋ยชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร: กองปฐพีวิทยา กรมวิชาการเกษตร.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2534. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 2. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สมศักดิ์ วังใน. 2541. การตรึงไนโตรเจน: ไรโซเบียม-พืชตระกูลถั่ว (หน้า 17-24). กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2545. สถิติการเกษตรของประเทศไทยปีเพาะปลูก 2544/45. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Alexander, M. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. New York: John Wiley & Sons.

Atlas, R.M., and L.C. Parks. 1997. *Handbook of Microbiological Media*, pp.1191. 2nd Edition. Boca Raton: CRC Press.

Balatti, A.P., L.A. Mazza, and E. Moretti. 1987. Aeration requirements of *Rhizobium* cultures. *MIRCEN-Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. **3**: 227-234.

Barnett, J.A., R.W. Payne, and D. Yarrow. 1990. *Yeast: Characteristics and Identification*. 2nd Edition. Cambridge: Cambridge University Press.

Bernfeld, P. 1951. Enzymes of starch degradation and synthesis. *Advances in Enzymology*. **12**: 380-424.

Charoensiri, K., C. De-Eknamkul, A. Assavanig, S. Varavinit, and A. Bhumiratana. 1990. Biomass protein produced from cassava using *Cephalosporium eichhorniae* 152 grown in an air-lift fermentor. *Microbial Utilization of Renewable Resource*. **7**: 330-335.

Christian, G.D. 1994. *Analytical Chemistry*. 5th Edition. New York: John Wiley & Sons.

De Mot, R. 1990. Conversion of starch by yeasts. *In* H. Verachtert, and R. De Mot (eds.). *Yeast Biotechnology and Biocatalysis*, pp. 163-222. New York: Marcel Dekker Inc.

Elkan, G.H. 1987. Symbiotic Nitrogen Fixation Technology. New York: Marcel Dekker Inc

Gales, P.W. 1990. Malt beverages and brewing materials. *In* K. Helrich (ed.). *Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*, pp. 708-715. 15th Edition. Arlington: The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Grace, M.R. 1977. Cassava Processing . Rome: FAO Consultant, pp. 90-100.

Graham, P.H. 1964. Studies on the utilization of carbohydrates and Kreb's cycle intermediates by rhizobia, using an agar plate method. *Antonie Van Leeuwenhoek Journal of Microbiology and Serology*. **30**: 68-72.

Groleau, D., P. Chevaller, and T.H. Yuen. 1995. Production of polyols and ethanol by the osmophillic yeast *Zygosacchromyces rouxii*. *Biotechnology Letters*. **17**(3): 315-320.

Hesseltine, C.W., M. Smith, and B. Bradie. 1963. Investigation of tempeh and Indonesian food. *Development in Industrial Microbiology*. **4**: 275-287.

Jackson, E.A. 1976. Brazil: National Alcohol Programme. *Process Biochemistry*. **11**(6): 29-30.

Jarl, K. 1969. Symba yeast process. *Food Technology*. **23**: 1009-1012.

Jork, H., W. Funk, W. Fischer, and H. Wimner. 1990. *Thin-Layer Chromatography*. New York: VCH Verlagsgesellschaft mbH.

Kajiwara, Y., K. Orawa, H. Takashita, and T. Omori. 2000. Enhanced glycerol production in *Shochu* yeast by heat-shock treatment is due to prolonged transcription of GPD1. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. **90**(1): 121-123.

Kurtzman, C.P., and J.W. Fell (eds.). 1998. *The Yeasts: A Taxonomics Study*. 4th Edition. Amsterdam: Elsevier.

Lajunen, K., S. Purokoski, and E. Pitkanen. 1980. Qualititive thin-layer chromatographic separation of 1, 5-anhydroglucitol in the presence of other carbohydrates on silica gel impregnated with borate buffer. *Journal of Chromatography*. **187**: 455-457.

Laluce, C., M.C. Bertolini, J.R. Ernandes, A.V. Martini, and A. Martini. 1988. New amylolytic yeast strains for starch and dextrin fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*. **54**(10): 2447-2451.

Lie, T.A., M. Muilenburg, N.H. Hiep, and K. Ayhan. 1991. Cultivation of *Bradyrhizobium* CB756 on sucrose prefermented by yeast. *Canadian Journal of Microbiology*. **38**: 569-572.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, N.J. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. **193**: 265-275.

Martinez-de Drets, G., and A. Arias. 1972. Enzymematic basis for differentiation of *Rhizobium* into fast- and slow-growing groups. *Journal of Bacteriology*. **109**: 467-470.

McClary, D.O., W.L. Nulty, and G.R. Miller. 1959. Effect of potassium versus sodium in the sporulation of *Saccharomyces*. *Journal of Bacteriology*. **78**: 362-368.

Takahashi, T., Y. Tsuchida, and M. Irie. 1978. Purification and some properties of three forms of glucoamylase from a *Rhizopus* sp. *Journal of Biochemistry*. **84**: 1183-1194

Tan, K.H., L.B. Febguson, and C. Cariton. 1984. Conversion of cassava starch to biomass, carbohydrate, and acids by *Aspergillus niger*. *Journal of Applied Biochemistry*. **6**: 80-90.

Tate, R.L. 2000. *Soil Microbiology*. 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Ueda, S., C.T. Zenin, D.A. Montriro, and Y.K. Park. 1981. Production of ethanol from raw cassava starch by a non-conventional fermentation method. *Biotechnology and Bioengineering*. **22**: 291-299.

Vincent, J.M. 1982. Nature and basic properties of the rhizobia. *In* J.M. Vincent (ed.). *Nitrogen Fixation in Legumes*, pp. 5-12. Sydney: Academic Press.

Voet, D., and J.G. Voet. 1995. *Biochemistry*. 2nd Edition. New York: John Wiley & Sons.

Wang, H.L., E.W. Swain, and C.W. Hesseltine. 1984. Glucoamylase of *Amylomyces rouxii*. *Journal of Food Science*. **49**(4): 1210-1211.

Yamane, K., and B. Maruo. 1974. Properties of thermosensitive extracellular α-amylase of *B. subtilis*. *Journal of Bacteriology*. **120**: 792-798.

Yarrow, D. 1998. Methods for the isolation, maintenance and identification of yeasts. *In* C.P. Kurtzman, and J.W. Fell (eds.). *The Yeasts: A Taxonomics Study*, pp. 77-87. 4th Edition. Amsterdam: Elsevier.

ภาคผนวก

ก. สีย้อมจุลินทรีย์

1. Carbol fuchsin (Ziehl-Neelson's Carbon fuchsin)

Basic fuchsin	0.3	กรัม
Ethanol (95%)	10.0	มิลลิลิตร
ละลายให้เข้ากันแล้วจึงเติม		
Phenol (5% Aqueous solution)	100.0	มิลลิลิตร

2. Malachite green

Malachite green	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร
ละลายสีในน้ำกลั่น ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนใช้ทุกครั้ง		

ข. น้ำยาเคมีและวิธีการวิเคราะห์

1. Iodine solution

Potassium iodide	6.60	กรัม
Iodine	0.66	กรัม
น้ำกลั่น	165.00	มิลลิลิตร

ละลายสาร Potassium iodine 6.6 กรัม และสาร Iodine 0.66 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณ 165 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ เติมน้ำทีละน้อยจนสาร Iodine ละลายหมด เก็บไว้ในขวดสีชา

2. Lactohenol-cotton blue

Lactic acid	20.0	มิลลิลิตร
Phenol crystal	20.0	กรัม
Glycerol	40.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	20.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสีน้ำตาล และเติม 0.05 กรัม ของ Cotton blue หรือ Methylene blue

3. Sodium-phosphate buffer

เตรียมได้จากการผสมสารละลาย A และ B ตาม pH ที่ต้องการ

สารละลาย **A**: 0.2M Monobasic sodium phosphate ($NaH_2PO_4.12H_2O$ = 31.2 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

สารละลาย **B**: 0.2M Dibasic sodium phosphate ($Na_2HPO_4.7H_2O$ หรือ $Na_2HPO_4.12H_2O$ = 53.65 กรัม หรือ 71.7 กรัม ตามลำดับ ในน้ำกลั่น 1 ลิตร

A (มิลลิลิตร)	**B** (มิลลิลิตร)	**pH**	**A** (มิลลิลิตร)	**A** (มิลลิลิตร)	**pH**
93.5	6.5	5.7	45.0	55.0	6.9
92.0	8.0	5.8	39.0	61.0	7.0
90.0	10.0	5.9	33.0	67.0	7.1
87.7	12.3	6.0	28.0	72.0	7.2
85.0	15.0	6.1	23.0	77.0	7.3
81.5	18.5	6.2	19.0	81.0	7.4
77.5	22.5	6.3	16.0	84.0	7.5
73.5	26.5	6.4	13.0	87.0	7.6
68.5	31.5	6.5	10.0	90.0	7.7
62.5	37.5	6.6	8.5	91.5	7.8
56.5	43.5	6.7	7.0	93.0	7.9
51.0	49.0	6.8	5.3	94.7	8.0

4. สารเคมีและการวิเคราะห์หาน้ำตาลและ Sugar alcohols จาก Chromatogram (Thin layer chromatograph, TLC)

Dipping solution I: เตรียม Saturated-aqueous silver nitrate และใช้สารละลายอิ่มตัวดังกล่าว 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร ด้วย Acetone เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เพื่อละลายตะกอนที่อาจเกิดขึ้น เขย่าเพื่อผสมสารละลายให้เข้ากัน

ควรเตรียม Dipping solution I ใหม่อยู่เสมอเมื่อทำการทดลองในแต่ละครั้ง

Dipping solution II: ละลาย Sodium hydroxide pellet ปริมาณ 2 กรัมในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ใช้ความร้อนช่วยให้สารละลายได้ดี ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วย Methanol

สามารถเก็บ Dipping solution II ไว้ใช้ได้ไม่ควรเกิน 5 วัน

วิธีการวิเคราะห์: นำแผ่น Chromatogram ที่ผ่านการแยกสารด้วย Mobile phase ออกจาก TLC tank ทำให้แห้งด้วยเครื่องเป่าลมเย็น (Dryer) จุ่มแผ่น Chromatogram ที่แห้งลงใน Dipping solution I เป็นเวลา 1 วินาที จากนั้นทำให้แผ่น Chromatogram แห้งโดยใช้ลมเย็นจากเครื่องเป่า แล้วจึงนำไปจุ่มใน Dipping solution II นาน 1 วินาที และนำไปอบที่อุณหภูมิ 90-100°ซ. เป็นเวลา 1-2 นาที ตรวจหาตำแหน่งที่มีสีน้ำตาลบนแผ่น Chromatogram และเทียบค่า Rf กับสารมาตรฐานบนแผ่น Chromatogram เดียวกัน

5. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลริดิวส์ (Reducing sugars) โดยใช้ Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent (Miller, 1959)

Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent:

3, 5-Dinitrosalicylic acid	10.0	กรัม
Sodium hydroxide	19.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,416.0	มิลลิลิตร
ละลายส่วนผสมข้างต้นทั้งหมดให้เข้ากันแล้วเติม		
Potassium sodium tartate	306.0	กรัม
Phenol (หลอมเลวที่ 50°ซ.)	7.6	กรัม
Sodium metabisulfite	8.3	กรัม

เก็บ DNS reagent ที่เตรียมได้ในขวดสีน้ำตาล

การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลริดิวส์:

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลริดิวส์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 10 นาที ทำให้เย็นโดยแช่ในอ่างน้ำเย็น แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปเทียบหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์จากกราฟมาตรฐานของกลูโคส

6. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้ Folin phenol reagent (Folin-Ciocalteu reagent) (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมีที่ใช้:

ก) Alkaline copper solution:
ใช้ Na_2CO_3 (ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร) $CuSO_4.5H_2O$ (ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์) และ Sodium potassium tartrate (ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์) ในอัตราส่วน 100:1:1 เตรียมเมื่อต้องการใช้

ข) 1 N Folin phenol reagent (Folin-Ciocalteu reagent)

ค) สารละลายมาตรฐานของ Bovine serum albumin (BSA) ที่ความเข้มข้น 100-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

วิธีการวิเคราะห์:

ปิเปตตัวอย่างที่ต้องการหาโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร (ควรมีความเข้มข้นของโปรตีน 20-160 ไมโครกรัมต่อ 0.5 มิลลิลิตร เติม Alkaline copper solution 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 40°ซ. เป็นเวลา 15 นาที เติม 1N Folin phenol reagent 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว บ่มที่อุณหภูมิห้อง ต่ออีก 30 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างชัดเจน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวช่วงคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วย Spectrophotometer นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณโปรตีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐานของ BSA

7. สารละลายที่ใช้ทดสอบหาไนไตรท์ (Nitrite)

Reagent I: ละลาย Sulfanilic acid ปริมาณ 0.8 กรัม และ Acetic acid 30 กรัม ในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ระวังอย่างให้สารสัมผัสผิวหนัง และอย่าหายใจไอของสาร

Reagent II: ละลาย N, N-Dimethyl-1-naphthylamine 0.6 กรัม และ Acetic acid 30 กรัม ในน้ำกลั่น 70 มิลลิลิตร ระวังอย่างให้สารสัมผัสผิวหนัง และอย่าหายใจไอของสาร

วิธีการวิเคราะห์: ใส่ Reagent I และ Reagent II ชนิดละ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารที่จุลินทรีย์เจริญและต้องการหาไนไตรท์ที่เปลี่ยนแปลงจากไนเตรท ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เขย่าหลอดให้สารผสมกัน ซึ่งถ้ามีไนไตรท์จะปรากฏสีแดงภายในเวลา 2-3 นาที และถ้าอาหารไม่เปลี่ยนเป็นสีแดง (ผลลบ) ให้เติม Zinc powder ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งถ้าไนเตรทยังเหลืออยู่จะให้สีแดงเกิดขึ้น

ค. อาหารเลี้ยงจุลินทรีย์

1. Acetate agar 2 (McClary *et al.* 1959)

Glucose	1.0	กรัม
Potassium chloride	1.8	กรัม
Sodium acetate trihydrate	8.2	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 6.0 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ความร้อนช่วยให้ส่วนผสมละลาย และทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

2. Fermentation basal medium (Yarrow, 1998)

Yeast extract	4.5	กรัม
Peptone	7.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 6.0 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน เติม Bromothymol blue stock solution (Bromothymol blue stock solution ประกอบด้วย Bromothymol blue 50 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร) ปริมาณ 4 มิลลิลิตรต่อ Fermentation basal medium 100 มิลลิลิตร และทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

สำหรับน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนที่นำมาทดสอบ ทำให้ปลอดเชื้อด้วยการกรอง โดยใช้เยื่อกรอง (Membrane filter) แล้วจึงเติมใน Fermentation basal medium ตามความเข้มข้นที่ต้องการ

3. Glucose-peptone-yeast extract (GPY) agar

Glucose	40.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Agar	20.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ความร้อนช่วยให้ส่วนผสมละลาย และทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

4. Malt extract-yeast extract (MY) broth

Malt extract	3.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 5.0 ที่อุณหภูมิห้อง

กรณี Malt extract-yeast extract (MY) agar ให้เติม Agar 15.0 กรัม ละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันโดยใช้ความร้อนช่วย และทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

5. Nitrate broth

Potassium nitrate	1.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Dipotassium phosphate	0.5	กรัม
Calcium chloride	0.5	กรัม
Magnesium carbonate	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 6.0 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ความร้อนช่วยให้ส่วนผสมละลาย และทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

6. Starch broth ดัดแปลงจาก Hesseltine *et al.* (1963)

Yeast extract	3.0	กรัม
Ammonium sulphate	5.0	กรัม
Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
Monopotassium phosphate	1.0	กรัม
Cassava starch	10.0	กรัม

น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 6.0 ที่อุณหภูมิห้อง

กรณี Starch agar ให้เติม Agar 15.0 กรัม ละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใช้ความร้อนช่วยให้ส่วนผสมละลาย และทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

7. Urea R broth

Yeast extract	0.1	กรัม
Monopotassium phosphate	0.091	กรัม
Disodium phosphate	0.095	กรัม
Urea	20.0	กรัม
Phenol red	0.01	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 6.0 ที่อุณหภูมิห้อง

ละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ความร้อนช่วยให้ส่วนผสมละลาย และทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

8. Yeast extract-mannitol broth (YMB)

Mannitol	5.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Magnesium sulphate ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
Dipotassium phosphate	0.5	กรัม
Sodium chloride	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

pH 6.8 ที่อุณหภูมิห้อง

กรณี Yeast extract-mannitol agar (YMA) ให้เติม Agar 15.0 กรัม ละลายส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ความร้อนช่วยให้ส่วนผสมละลาย และทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121°ซ. เป็นเวลา 15 นาที

ประวัติผู้วิจัย

1. **ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรีลักษณ์ รอดทอง**
   SUREELAK RODTONG

ที่อยู่ : สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ (044) 22 4297
โทรสาร (044) 22 4185
E-mail sureelak@ccs.sut.ac.th

ประวัติการศึกษา :

ปี พ.ศ. ที่จบ	คุณวุฒิ	ชื่อสถานศึกษา
2524	วท.บ. (ชีววิทยา เลือกจุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
2527	วท.ม. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
2533	Postgraduate Diploma in Science (Biotechnology) with credit	University of Otago, New Zealand
2536	Ph.D. (Microbiology)	University of Otago, New Zealand

ประสบการณ์การทำงาน :

พฤษภาคม 2527-พฤษภาคม 2537	อาจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น
พฤษภาคม 2537-เมษายน 2539	อาจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ตุลาคม 2542-กันยายน 2543	หัวหน้าสถานวิจัย สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
พฤศจิกายน 2542-กันยายน 2543	เลขานุการ คณะกรรมการประจำสำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
เมษายน 2539-ปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานทางวิชาการ : งานวิจัยบางส่วน (วารสาร/การประชุมวิชาการ)

สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2531. การผลิตเบต้า-คาโรทีนโดยยีสต์ (*Rhodotorula pallida*). *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.* **16**: 53-56.

สิรินทรเทพ เต้าประยูร วิภาพร ศรีพรหมษา และ **สุรีลักษณ์ รอดทอง**. 2530. ผักตบชวาและยีสต์โปรตีนสูงสำหรับเป็นอาหารสัตว์. *วารสารวิทยาศาสตร์ มข.* **15**: 53-57.

Rodtong, S., P. Sunthornandh, B. Yongsmith, and L. Maksongsri. 1985. Selection of antibacterial antibiotic-producing actinomycetes from Thai soils. *Microbial Utilization of Renewable Resources*. **4**: 327-334.

Rodtong, S., and G. W. Tannock. 1993. Differentiation of *Lactobacillus* strains by ribotyping. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(10): 3480-3484.

Rodtong, S., G. W. Tannock, and K. H. Wilson. 1993. Nucleotide sequence of the 16S ribosomal RNA gene of *Lactobacillus reuteri* DSM 20016. The Nucleotide Sequence Databank (GenBank [USA]). Accession No. L23507.

Rodtong, S., S. Dobbinson, S. Thode-Andersen, M. A. McConnell, and G. W. Tannock. 1993. Derivation of DNA probes for the enumeration of a specific strain of *Lactobacillus acidophilus* in piglet digestive tract samples. *Applied and Environmental Microbiology*. **59**(11): 3871-3877.

Rodtong, S., A. Hewson, J. Lynch, and S. De Grandis. 1997. Direct polymerase chain reaction detection of *Staphylococcus aureus* and *Streptococcus agalactiae* in raw milk. *Abstracts of The 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar, 19-21 November 1997, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 187.

Rodtong, S., A. Hewson, J. Lynch, and S. De Grandis. 1997. Polymerase chain reaction detection of coagulase gene of mastitic *Staphylococcus aureus* in Ontario, Canada. *Abstracts of The 2nd JSPS-NRCT-DOST-LIPI-VCC Seminar, 19-21 November 1997, Nakhon Ratchasima, Thailand*: 186.

Rodtong, S., N. Teaumroong, and P. Chooklay. 1998. A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-rawieng Plant Genetics Forest. *Proceedings of The Asia-Pacific Mycological Conference on Biodiversity and Biotechnology, 6-9 July 1998, Hua Hin, Thailand*: 281-284.

Rodtong, S., C. Burom, N. Teaumroong, and N. Boonkerd. 1999. Glycerol and mannitol production from yeasts for *Rhizobium* inoculum cultivation. *Abstracts of The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18 November 1999, Phuket, Thailand*: 208.

Rodtong, S., S. Thienhirun, and A.J.S. Whalley. 2000. New and interesting *Xylariaceae* from Tup Lan National Park. *Abstracts of The Tropical Mycology 2000, 25-29 April 2000, Liverpool, U.K.*: 30.

Rodtong, S., and N. Teaumroong. 2000. Edible mushrooms in dry dipterocarp forest of Tup Lan National Park in Thailand. *Abstracts of The Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 105.

Rodtong, S., P. Krubphachaya, and N. Teaumroong. 2000. *Lactobacillus* strains in natural Thai silage for applying as silage inoculants and probiotics. *Abstracts of The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 1-3 November 2000, Kanchanaburi, Thailand*: 77 (P-AB-13).

Rodtong, S., C. Wanapu, and A. Ishizaki. 2000. Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. *Abstracts of The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology, 1-3 November 2000, Kanchanaburi, Thailand*: 52 (O-IB-1).

Rodtong, S., and A. Ishizaki. 2000. Microbial conversion of cassava starch to L-lactic acid without carbon dioxide accumulation. *The first Regional Conference on Energy Technology Towards a Clean Environment, 1-2 December 2000, Chiang Mai, Thailand*: P14-EN039.

Rodtong, S. 2001. Bacterial strains for the direct production of L-lactic acid from cassava and sago starch. *Proceedings of The International Symposium on "Diversity and Optimum Utilization of Biological Resources in the Torrid and Subtropical Zones", 2 June 2001, Kyushu, Japan*: 4-8.

Rodtong, S. 2001. Detection and sequence analysis of the gene encoding L-lactate dehydrogenase from starch-utilizing bacteria. *Abstracts of The BioThailand 2001: From Research to Market, 7-10 November 2001, Bangkok, Thailand*: 227 (P-Micro-Genetic-13).

Rodtong, S., J. Sansit, P. Chimsoongnern, K. Vechklang, and A. Ishizaki. 2001. Strain improvement of starch-utilizing bacteria by mutagenesis to enhance L-lactic acid production. *Abstracts of The BioThailand 2001: From Research to Market, 7-10 November 2001, Bangkok, Thailand*: 226 (P-Micro-Genetic-12).

Rodtong, S., and W. Suksombat. 2002. Silage production and silage lactobacillus survival in the digestive tract of dairy cows. *Full Papers of The 14th Annual Meeting of The Thai Society for Biotechnology, 12-15 November 2002, Khon Kaen, Thailand*: O-AB12, 6 pp.

Chumkhunthod, P., **S. Rodtong**, N. Teaumroong, and N. Boonkerd. 2001. Bioconversion of cassava roots to high protein product for animal feed. *Thai Journal of Biotechnology*. **3**(1): 17-25.

Green, D. H., G. D. Lewis, **S. Rodtong**, and M. W. Loutit. 1991. Detection of faecal pollution in water by an *Escherichia coli uid*A gene probe. *Journal of Microbiological Methods*. **13**: 207-214.

Reynolds, C., M. Donovan, **S. Rodtong**, and A.J.S. Whalley. 2000. Characterisation of fungal and other lectins: an overview. *Abstracts of The Tropical Mycology 2000, 25-29 April 2000, Liverpool, U.K.*: 8.

Tannock, G. W., A. Tilsala-Timisjarvi, **S. Rodtong**, J. Ng, K. Munro, and T. Alatossava. 1999. Identification of *Lactobacillus* isolates from the gastrointestinal tract, silage, and yoghurt by 16S-23S rRNA gene intergenic spacer region sequence comparisons. *Applied and Environmental Microbiology*. **65**(9): 4264-4267.

Teaumroong, N., M. Manassila, N. Boonkerd, and **S. Rodtong**. 2000. ITS-RFLP analyses of edible mushrooms in genera *Russula* and *Boletus* collected from North Eastern part of Thailand. *Abstracts of The Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 115.

Walter, J., G. W. Tannock, A. Tilsala-Timisjarvi, **S. Rodtong**, D. M. Loach, and K. Munro. 2000. Detection and identification of gastrointestinal *Lactobacillus* species using denaturing gradient gel electrophoresis and species-specific PCR primers. *Applied and Environmental Microbiology*. **66**(1): 297-303.

2. รองศาสตราจารย์ ดร. หนึ่ง เตียอำรุง
NEUNG TEAUMROONG

NATIONALITY	: Thai
SEX	: Male
DATE AND PLACE OF BIRTH	: July 21 1965, Bangkok
POSITION	: Head of Research Department Institute of Agicultural Technology (April 1999-present:Associate Professor)
ADDRESS	: School of Biotechnology Institute of Agricultural Technology Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima, THAILAND 30000 E-mail : neung@ccs.sut.ac.th Fax : 66-44-224150, 216345

EDUCATION

1987	B.Sc.	Microbiology, Chiang Mai University, Chiang Mai, Thailand
1989	M.Sc.	Industrial Microbiology, Chulalongkorn University, Thailand
1990	Dipl.	Microbiology and Biotechnology, University of Tokyo, Japan
1993	Dr.rer.nat	Microbiology and Molecular Biology, University of Innsbruck, Austria

CURRENT RESEARCH

: Development of Detection System for Soil Bacteria by Using DNA Direct Extraction Method
: Application of Primer-Based Technology to Fingerprint the Genomes of Rhizobia
: Study of Rhizobial Behavior By Using the Molecular Genetics Approaches
: Biodiversity of N_2-Fixing Microorganisms and VAM in Thailand
: Biodiversity of Wild Mushrooms in North-East Area of Thailand
: Mannitol Production for Rhizobium Cultivation from Agricultural Waste

RESEARCH FUNDING

: Monbusho (1993-1994)
"Breeding of Nitrogen Fixing Bacteria in Southeast Asia "
: International Atomic Energy Agency (IAEA) (1993-1995)
"Using Molecular Biology Techniques to Detect Rhizobium in Thailand"
: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand (JSPS-NRCT) (1995-1998)
"Rhizobial Strain Improevment and on Farm Management for High N_2 Fixation in Forage Legumes"
: Biodiversity Research&Training Program (BRT)(1996-1999)
"Population Changes in N_2-Fixing Microorganisms as Affected by Changing in Ecosystem Process"
: HRH Princess Sirindhorn Plant Conservation Project (1996-2000)
"Mushroon Diversity in Tub-Lan National Park"
: Suranaree University of Technology (1993-1997)
"Using Gus Gene for Studying Rhizobial Behavior in Ecosystem"
"Development of Detection System for Soil Bacteria Using DNA Probe Technique"
"DNA Fingerprint of Wild Edible Mushrooms in Northeastern Part of Thailand"
: Japan Society Promotion of Science and National Research Council of Thailand

(JSPS-NRCT) (2000-2003)
"Development of techniqe for nitrogen fixing and phosphorus uptake microorganisms in legumes by using molecular genetics approaches."

PUBLICATIONS

Teaumroong, N., and S. Pichayangura. (1989). Detection of Polysaccharides from some Mushrooms. J. of Microbial Utilization of Renewable Resources. Vol.6, P.126-128.

Chung, S.-Y., Yokoyama, K., Gomo, M., Teaumroong, N., Ishii, M., Igarashi, Y., and Kodama, T. (1994). Purification and some properties of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase from a thermophilic hydrogen-oxidizing bacterium, *Pseudomonas hydrogenothermophila* strain TH-1. J. Ferment. Bioeng., 78, 469-47.

Teaumroong, N., Y. Murooka and N. Boonkerd. (1995) Acid Tolerance and Antibiotic Resistance of Some Strains of *Bradyrhizobium* applied in Thailand. Suranaree J. Sci. Technol Vol.2, P. 75-80.

Teaumroong, N., N. Boonkerd and Y. Murooka. (1995) Application of primer based technology to fingerprint the genomes of *Bradyrhizobium* spp. Used in Thailand :In Processding of the 10th International Congress on Nitrogen fixation, St. Petersburg, Russia May 28-June 3, p. 741.

Teaumroong N. and N. Boonkerd (1996). Iron Element, Siderophores and Microbes. Suranaree J. Sci.Technol. 3:95-100.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1996). Symbiotic Relationship Between Rhizobia and Legumes in Molecular Genetic Aspect. Suranaree J. Sci. Technol. 3:15-20

Teaumroong, N., N. Boonkerd and K. Haselwandter (1996) Effect of the iron sources on the siderophore produced from *Bacillus polymyxa*. Suranaree J. Sci. Technol. 3:133-137

Boonkerd N., N. Teaumroong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong and A. Nantagij. 1996. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in Thailand; Isolation of forage legume rhizobia. Annual Report of IC Biotech. 19:839-844.

Teaumroong N, K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. 1997. Rhizobial strain improvement and on-fram management for high N_2 fixation in forage legumes; Screening of high effective rhizobial strains. Annual Report of IC Biotech. 20:955-962.

Teaumroong, N.,C. Schuarzer, B. Auer and K. Haselwandter. 1997. A non-radioactive DNA probe for detecting dicyandiamide - degrading soil bacteria. Biology and Fertility of Soils.25,159 - 161.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd. (1998). Using reporter gene system to monitor applied *Bradyrhizobium* in Thailand. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 660

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Effect of inoculation methods on nodulation, N_2 fixation and yield of soybeans under field condition. In Proceeding of the 11th International Congress on Nitrogen fixation, Institute Pasteur, Paris, France, July 2-25, 1997. p. 631

Teaumroong, N., K. Teamtisong, M. Manassila and N. Boonkerd.(1998). Preliminary Study of The Competition and Persistence of Applied *Bradyrhizobia* Strains Using Reporter Gene in Soil. Suranaree J. Sci. Technol 5:18-23.

Teaumroong, N. and N. Boonkerd (1998). Detection of *Bradyrhizobium* spp. and *B. japonicum* in Thailand by Primer-Based Technology and Direct DNA Extraction. Plants and Soil. 204:127-134.

Boonkerd, N., N. Teaumroong and G. Hardarson (1998). Nitrogen Fixation (^{15}N Dilution) in Soybean as Affected by Inoculation Methods : In Asian Network on Microbial Researches. Gadjah Mada University (GMU), The Institute of Physical and Chemical Research (RIKEN) Science and Technology Agency, Japan. P. 165-171.

Rodtong, S., N. Teaumroong and P. Chooklay (1998). A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest: In proceeding of the Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 july 1999, Hua-Hin, Thailand. P.281-284.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, A. Nantagij. and N. Boonkerd. (1999). Strain selection and characterization of rhizobia isolated from forage legumes grown in Thailand. Annual Report of IC Biotech.

Teaumroong N., K. Teamtaisong, A. Nantagij, P. Wadisirisuk, S. Kotepong, and N. Boonkerd. (2000). Diversification of some forage legumes rhizobia isolated in Thailand. In:Proceeding of the 12th International congress on nitrogen fixation [F.O. Pedrosa et al. (eds.)], Foz do Iguacu, Parana, Brazil. September 12-17, 1999.Kluwer Academic Publishers. p.196

Teaumroong, N., M. Manassila, N. Boonkerd, and S. Rodtong. 2000. ITS-RFLP analyses of Edible mushrooms in genera Russula and Boletus collected from North Easter part of Thailand. *Abstracts of the Asian Mycological Congress 2000, 9-13 July 2000, Hong Kong Sar, China*: 115.

INSTRUCTIONAL EXPERTISE

- Applied Microbiology
- Man and Environment
- Environmental Microbiology
- Agricultural Biotechnology
- Biosafety
- Food Microbiology
- Fermented Food Products
- Molecular Biology and Recombinant DNA Technology

PROFESSIONAL SOCIETIES

: Thai Society of Biotechnology
: Thai Inventor Association

SELECTED PAPER PRESENTATION

- NRCT; NUS; DOST-JSPS. Joint Seminar on Biotechnology. December 22-24 1988, Chiang Mai University. (**Oral presentation:** in "Detection of Polysaccharides From Some Edible Mushrooms.")
- International Symposium on Microbial Ecology (ISME-6), September 6-11, 1992. Barcelona, Spain. (**Poster presentation** in "DNA Direct Extraction from Soil to Detect DCD-Degrading Soil Bacterium.")
- The 3rd FAO/IAEA Research co-ordination meeting on " Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of *Rhizobium*". (**Oral presentation** in " Using Molecular Biology to Detect Rhizobia in Agro-Ecosystem"). University de Geneve, Geneva, Switzerland. August 15-19, 1994.
- 10th International Congress on Nitrogen Fixation. ST. Petersburg, Russia. May 28-June 3, 1995. (**Poster presentation**: in "Application of Primer-Based Technology to Fingerprint the Genomes of *Bradyrhizobium* spp. in Thailand")
- Biotechnology Research and Applications for Sustainable Development (BRASD). Central Plaza Hotel, Bangkok, Thailand. August 7-10, 1996. (**Oral presentation** : in "Using Molecular Biology Techniques to Fingerprint the Genomes and Study Behavior of *Bradyrhizobium* in Agro-Ecosystem.")
- Research co-ordination meeting on "Enhancing Soil Fertility and Crop Production by Better Management of Rhizobium" (FAO/IAEA). 2-6 Sep. 1996, UN, Vienna, Austria (**Oral presentation** : "The Detection System to Monitor Applied *Bradyrhizobium* in Soil")
- Project of JSPS-NRCT "Seminear on Cooperative research of biotechnology between Thailand and Japan". Nov. 27, 1996. (**Oral presentation** : in "Application of Reporter Gene System to Detect Rhizobial Behavior.")
- 11th International Congress on Nitrogen Fixation. 20-25 Jul.1997 Institue Pasteur, Paris (**Poster presentation**: in "Using Gus Reporter Gene to Detect Applied *Bradyrhizobium* in the Field and Effect of Inoculantion Methods on Nodulation, N_2 fixation and Yield of Soybeans Under Field Condition.")
- Asia-Pacific Mycological Conference on "Biodiversity and Biotechnology" 6-9 Junly 1998. Hua-Hin, Thailand. (**Poster presentation** : in "A preliminary study on the diversity of macrofungi in Nong-Rawieng plant genetic forest.")

3. ศาสตราจารย์ ดร. นันทกร บุญเกิด
NANTAKORN BOONKERD

Address : School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000

EDUCATION :

Ph.D. Soil Microbiology 1981-Texas A&M University, USA. Dissertation: Survival and Effectiveness Stability of Cowpea Rhizobium as Affected by Soil Temperature and Moisuture.

M.S. Soil Microbiology 1972-University of Maryland, USA. Thesis : Influence of *Rhizobium japonicum* Strains and Inoculation Methods in *Rhizobium* Free and *Rhizobium* Established Soils.

B.S. Soil Science 1966-Kasetsart University Thailand. Thesis : Decomposition of Municipal waste : II. Gaseous Ammonia Loss at Elevated Temperature.

EMPLOYMENT :

1993-Present Director, Institute of Research and Development, Suranaree University of Technology

1966-1993 Department of Agricuture, Bangkok, Thailand.

1985-present Director of Biological Nitrogen Fixation Resource Center for South and Southeast Asia. Chief of Soil Microbiology Research Group and Research Leader in BNF. Responsible for researches in biological nitrogen fixation, especially in rhizobia and inoculant production.

1981-1985 Research Leader in *Rhizobium* and *Frankia.* Supervisor in industrial rhizobial inoculant production and quality control. Develope large scale inoculant production (200 tons/year) as well as small scale production.

1879-1981 Graduate Research Assistant study for Ph.D. at Texas A&M University College Station, Texas.

1973-1979 Research Leader in *Rhizobium* and inoculant production.

1970-1973 FAO Fellowship study for M.S. at Univetsity of Maryland, USA.

1966-1973 Research Leader in the use of *Rhizobium* to increase yield of economic legumes and green manuring legumes.

RESEARCH GRANTS AWARDED :

USAID-Collabrative Research Support Program (CRSP) in peanut rhizobia, 1983-1988.

Methods to culture, maintain, and propagate *Azolla* under troical conditions, 1985-1988. Awarded by BOSTID, US national Academy of Sciences.

The enhancement of the biological nitrogen fixation by genetic engineering technique. NCGEB, 1985-1988

Screening with nuclear and other techniques for yield and N_2 fixation in mungbean. IAEA 1986-1987.

Molecular indentification of *Frankiae* using cross inoculation group specific DNA sequences. PSTC 1987-1989.

Increasing biological nitrogen fixation of peanuts in developing countries. US-ISRAEL CDR Program, 1987-1990.

Indentification of *Rhizobium* strains by genetic engineering for enhancement of N_2 fixation and inoculant production. NCGEB 1987-1989.

Exploitation of new technologies to monitor the survival and nodulating effectiveness of *Bradyrhizobium japonicum* inoculant strains of soybean. Commission of the European Communities. 1989-1993.

Ecologically based models for prediction of legume inoculation requirement. USAID-PSTC 1989-1992.

On-farm optimization of biological nitrogen fixation of grain legumes. Commission of the European Communities. 1990-1993.

Screening with nuclera and other techniques for yield and N_2 fixation in grain legumes. IAEA 1990-1994.

Breeding of nitrogen-fixing bacteria in southeast asia. Monbusho International Scientific Research Program. 1994-1997.

CONSULTANCIES :

Rhizobial inoculant production in Burma, USAID. July 2-8, 1985.

Biologycal nitrogen fixation traning course in Bangladesh, Winrock International. February 14-21, 1986 and February 14-19, 1987.

Rhizobial inoculant production in Indonesia, Eurindo Combine Pt., April 20-30, 1986.

ACIAR Project on micronutrient enhancing nitrogen fixation. Australia Goverment. February 19-21, 1986.
Biotechnology. Faculty of Tecnology, Khon Kaen University, 1986.

Rhizobial inoculant production in Chiang Mai, Thailand. Appropriate Technology International, January 4-April 30, 1987.

Rhizobial technology and design field experiments to assess N_2 fixation in soybean using N-15 techniques to the Democratic People's Republic of Korea. IAEA, February 1-March 2, 1990.

Rhizobial technology and inoculant production to Anambra State University of Technology, Enugu, Nigeria. IAEA, April 1-21, 1990.

Rhizobial technology and design field experiments to assess N_2 fixation in soybean using N-15 techniques to the Democratic People's Republic of Korea. IAEA, July 11-Auguust 3, 1991.

Increased yield and N_2 fixation in beans and soybeans to Kawanda Research Station, Uganda IAEA, November 18-December 23, 1991.

Review of ACIAR Project 8829 : Biological nitrogen fixation by soybean in rotation with rice, Indonesia. April 26-30, 1993.

Financial and envionmental impact of use of biologically fixed nitrogen for soybean production in the People's Republic of China. June 28-July 14, 1993.

ANSAB Research Grant on Biofertilizer Production, Philippines, Sir-Lanka, India, June 1-15, 1993.

BNF Technology and ^{15}N technique for measuring N_2 fixation to the Mongolian National Agricultural University by IAEA from August 25 to September 15, 1994.

Nuclear techniques to improve agricultural production : Inoculant Production to BINA, Bangladesh, by IAEA from January 12-22, 1995.

Isotope and nuclear techniques in crop production : Biological nitrogen fixation, to MAS Myanma by INEA from January 24-February 8, 1995.

Nuclear techniques to improve agricultural production : Inoculant Production to BINA, Bangkok, by IAEA from July 1-15, 1996.

ADVISORY COMMITTEES AND SUPERVISOR OF MS AND PhD STUDENTS AT :

- Biochemistry Department, Chulaongkorn University
- Microbiology Department, Kasetsart University
- Agronomy Department, Kasetsart University
- Soil Sciences Department, Kasetsart University
- Botany Department, Kasetsart University
- Forestry Department, Kasetsart University
- Faculty of Environmemt and Natural Resources, Mahidol University
- Biology Department, Srinakarinwirote University at Prasarnmit

OTHER EXPERIENCES :

Organizing International Training Course and Workshops :

- NifTAL International Training Course on Legume Rhizobium Technology. November 1-December 10, 1982.
- FAO International Training Course on Blue Green Algae, February 3-25, 1983.
- NifTAL-BNFRC International Training Course on Inoculant Production, March 28, 1985.
- IAEA-Research Coordination Meeting on Improving Yield and N_2 Fixation in Grain Legumes, November 17-21, 1986.
- FAO-NifTAL International Training Course on Rhizobial Technology and Inoclant Production, March 2-27, 1987.
- EC-ASEAN Workshop on Biological Nitrogwn Fixation, May 23-26, 1988.
- FAO-NifTAL-BNFRC International Training Course on Rhizobial Technology and Inoclant Utilization, March 6-31, 1989.

เอกสารแนบ

ผลงานวิจัยในส่วนที่เกี่ยวข้อง ที่ได้นำเสนอในที่ประชุมวิชาการ

Rodtong, S., C. Burom, N. Teaumroong, and N. Boonkerd. 1999. Glycerol and mannitol production from yeasts for *Rhizobium* inoculum cultivation. *Abstracts of The 5th Asia-Pacific Biochemical Engineering Conference 1999, 15-18 November 1999, Phuket, Thailand*: 208.

P-IB11

Glycerol and mannitol production from yeasts for *Rhizobium* inoculum cultivation

S. Rodtong[1], C. Burom[2], N. Teaumroong[2] and N. Boonkerd[2]
[1]School of Microbiology, Institute of Sciences and [2]School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, THAILAND

For mass cultivation of root-nodule bacteria used as legume inoculants, it is essential to have low cost and high quality of nutrient sources. Bradyrhizobia, the symbiont of many tropical legumes, including soybean, are able to use only glycerol and mannitol which are costlier than other carbon sources such as glucose. The purpose of this research is to produce glycerol and mannitol by converting carbohydrates from agricultural products by microorganisms, especially yeasts. Rhizobium growth factors can be obtained from yeast cells. Thus the crude products from yeasts could be directly utilized for the mass culture. To screen yeast strains which are able to produce either glycerol or mannitol from glucose, 100 yeast strains isolated from various sources and 1 type culture strains were tested. The production of glycerol and mannitol was detected on both culture filtrate and cell extracts. In primary screening step, qualitative assay of glycerol and mannitol produced was performed by TLC technique. It was found that 9 out of 101 isolate produced high amount of glycerol in culture broth by compared with colour intensity of standard glycerol on chromatogram. Only a type culture strain, *Kluyveromyces maxianus* also produced high amout of glycerol in it culture filtrate. Ten isolates produced both of glycerol and mannitol when cell extracts were tested. The quantitative assay of both glycerol and mannitol has been detected by HPLC-based technique. When using cassava starch as the carbon source on the growth medium, four yeast isolates which accumulated both glycerol and mannitol in their cells were able to digest and utilize the carbon source. Attempt to produce low cost of nutrient sources for *Bradyrhizobium* cultivation was underway.