SUT3-304-49-24-14

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทนร้อน

Increasing Efficiency of Alcoholic Production by Thermotolerant Yeasts

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

SUT3-304-49-24-14

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทนร้อน

Increasing Efficiency of Alcoholic Production by Thermotolerant Yeasts

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผศ.ดร. โชคชัย วนภู

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

กระผมขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.) ที่สนับสนุนทุนวิจัยของนักศึกษาบัณฑิตศึกษาระดับปริญญาโท ขอขอบคุณ นางสาวอภิรดี ศรีภิรมย์รักษ์ นายฐปณวัชร์ หมื่นแจ้ง และนางสาวภัทรพร พลชนะ ที่ช่วยทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผศ. ดร. โชคชัย วนภู

บทคัดย่อ

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์ทนร้อน

การผลิตแอลกอฮอล์ / กระบวนการหมัก / ยีสต์ทนร้อน / *Issatchenkia orientalis*

ในปัจจุบัน เอทานอลเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญเป็นอย่างมาก ซึ่งโดยหลักจะใช้เป็นแหล่งของพลังงานทดแทนน้ำมันที่มาจากฟอสซิล เนื่องจากยีสต์ทนร้อนสามารถเจริญและทำให้เกิดกระบวนการหมักได้ดีในประเทศเขตร้อน วัตถุประสงค์ของการศึกษาครั้งนี้ เพื่อคัดแยกยีสต์ทนร้อนเพื่อผลิตเอทานอลและจัดจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้ โดยสามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อน *I. orientalis* S1 ได้จากหญ้าหมักจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี จากการเลี้ยงเซลล์บนอาหาร yeast extract peptone dextrose (YPD) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นรูปไข่จนถึงรูปท่อนปลายมน ขนาดเซลล์ประมาณ 2.7-4.2 x 5.6-10.1 ไมโครเมตร การเรียงตัวของเซลล์ทั้งเดี่ยวและคู่ พบการแตกหน่อของเซลล์ และมีการพัฒนาของเส้นใยเทียม สำหรับลักษณะการเจริญในอาหารเหลว เป็นแผ่นแห้งและหนาสีขาวเกาะอยู่บนบริเวณผิวหน้าของอาหารเหลว การเจริญบนอาหารแข็งโคโลนีมีความหนืดคล้ายเนยเหลว และมีสีครีม ยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้นี้ไม่สามารถสร้างสารพิษต้านทานต่อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* EC 1118 แบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรม โดยศึกษา 18S rDNA พบว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1 มีความใกล้เคียงกับ *I. orientalis* 98% จากการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ *I. orientalis* S1 ในอาหาร enrich medium การใช้แหล่งคาร์บอนโดยยีสต์ *I. orientalis* S1 ซึ่งทำการเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM พบว่า *I. orientalis* S1 เจริญได้น้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ซูโครส แลคโตส กลีเซอรอล แมนนิทอล มอลโตส แป้งมันสำปะหลังและแป้งมันฝรั่ง เป็นแหล่งคาร์บอน แต่เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดี และใช้แหล่งคาร์บอนทั้งสองชนิดเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลสำหรับการทดลองใน flask จากทดลองการเลี้ยงยีสต์ *I. orientalis* S1 ใน flask พบว่าการผลิตเอทานอลสูงสุดเมื่อทำการการเลี้ยงยีสต์โดยใช้ความเข้มข้นของกลูโคสที่ 100 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่ทำการเติม 2 กรัมต่อลิตรแอมโมเนียมซัลเฟต ทำการเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (μ = 0.205 ± 0.008 ต่อชั่วโมง Q_p = 2.328 ± 0.040 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง, Y_{ps} = 0.511 ±

0.009 กรัมต่อกรัม และความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด = 55.877 ± 0.962 กรัมต่อลิตร) จากนั้นศึกษาการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร ซึ่งทำการศึกษาอัตราการให้อากาศและความเร็วในการกวน พบว่า การกวนที่ความเร็ว 500 รอบต่อนาทีและไม่มีการให้อากาศ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรและทำการเติม 2 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต ที่ 40 องศาเซลเซียส ให้ผลสูงสุดของ μ (0.370 ± 0.009 ต่อชั่วโมง) Q_p (1.886 ± 0.056 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) Y_{ps} (0.516 ± 0.026 กรัมต่อกรัม) และความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ 49.991 ± 1.495 กรัมต่อลิตร จากนั้นได้ทำการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งพบว่าผลิตได้น้อยกว่าในถังขนาด 2 ลิตร (μ = 0.355 ± 0.012 ต่อชั่วโมง Q_p = 1.335 ± 0.104 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Y_{ps} = 0.431 ± 0.005 กรัมต่อกรัม และความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด = 42.434 ± 1.699 กรัมต่อลิตร) นอกจากนี้ ได้ทำการพัฒนาการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้ระบบแบบ fed-batch โดยทำการเติมน้ำตาลกลูโคสเพื่อเพิ่มการผลิตเอทานอล พบว่าการเติมน้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลกลูโคส 350 กรัม ปริมาตร 1 ลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมงและ 400 กรัม ปริมาตร 1 ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากเริ่มต้นการหมัก ให้ผลสูงสุดของการผลิตเอทานอล (Q_p = 1.716 ± 0.150 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง Y_{ps} = 0.506 ± 0.011 กรัมต่อกรัม และความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด = 77.810 ± 1.879 กรัมต่อลิตร)

ABSTRACT

Increasing Efficiency of Alcoholic Production by Thermotolerant Yeasts

Ethanol production / fermentation / thermotolerant yeast / *Issatchenkia orientalis*

Now a day, ethanol is important industrial chemical mainly using in biofuel replaces vanish fossil fuels. Because of the thermotolerant yeast are capable of growth and fermentation during the summer months in non-tropical countries as well as under tropical climate. Therefore, this study focuses on isolation and characterization thermotolerant yeast to produce ethanol. Thermotolerant yeast strain *I. orientalis* S1 was isolated from silage sample in Suranee University of Technology farm. According to the morphological and biochemical characterization, morphology of the thermotolerant yeast strain *I. orientalis* S1 cells is ovoidal to elongate, 2.7-4.2 x 5.6-10.1 μm, single or in pair, budding cell are present and pseudomycelium are developed. The features of the appearance of cultures when cells grown in liquid medium after 3 days at 40 °C, heavy, dry climbing pellicles are formed on the surface of liquid medium and the growth is butyrous and light cream colored on agar medium. It can grow and ferment when glucose was used as a carbon source. This yeast did not produce killer toxin against with *Saccharomyces cerevisiae* EC 1118, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Genetic analysis was determined on the basis of 18S rDNA analysis, the results showed the *I. orientalis* S1 strain has 99% similarity to *I. orientalis* The optimum conditions for growth and ethanol production of thermotolerant *I. orientalis* S1 was determined in enrich medium. The utilization of carbon sources by *Issatchenkia* sp. S1 was varied with sort of carbons supplemented in YM medium. *I. orientalis* S1 showed weakly grown in YM medium with sucrose, lactose, glycerol, manitol, maltose, cassava starch or potato starch as carbon source. When either glucose or fructose was used as carbon source in YM medium, the better growth of *I. orientalis* S1 was performed. Glucose and fructose were used for determining the optimal concentration for growth and ethanol production in flask experiments. The cultivation of *I. orientalis* S1 in flask experiment found that when cultured *I. orientalis* S1 in YM medium supplemented with 100 g/L of glucose and 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$ under shaking condition at 200 rpm and incubation at 40 °C showed the highest ethanol production (μ = 0.205 ± 0.008 h^{-1}, Q_p = 2.328 ±

0.040 g/L/h, Y_{ps} = 0.511 ± 0.009 g/g and maximum ethanol concentration = 55.877 ± 0.962 g/L). In 2 L fermenter experiment, aeration rate and agitation speed were varied. The agitation speed at 500 rpm with no aeration in YM medium with 100 g/L and 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$ at 40 °C showed the highest of μ (0.370 ± 0.009 h^{-1}), Q_p (1.886 ± 0.056 g/L/h), Y_{ps} (0.516 ± 0.026 g/g) and ethanol concentration (49.991 ± 1.495 g/L). The ethanol production by *I. orientalis* S1 was scale up to 10 L fermenter. The results in 10 L batch culture were lower than that of 2 L fermenter (μ = 0.355 ± 0.012 h^{-1}, Q_p = 1.335 ± 0.104 g/L/h, Y_{ps} = 0.431 ± 0.005 g/g and maximum ethanol concentration = 42.434 ± 1.699 g/L). Furthermore, the ethanol production by *I. orientalis* S1 in 10 L fermenter was improved by fed-batch operation by adding glucose for increasing the production of ethanol. A liter of both glucose syrup at 350 g and 400 g were added at 12 h and 24 h after fermentation showed the highest ethanol production (Q_p = 1.716 ± 0.150 g/L/h, Y_{ps} = 0.506 ± 0.011 g/g and maximum ethanol concentration = 77.810 ± 1.879 g/L). Additionally, the production of some organic acids detected by using HPLC technique was investigated in 10 L batch fermentation. Oxaloacetic acid (OAA) is major organic acid produced during log phase and reduced when glucose depleted. The highest concentration of OAA was 3.035 ± 0.252 g/L at 30 h after fermentation.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ.....ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง
สารบัญ.....ฉ
บทที่1 บทนำ
1.1 ความสำคัญของงานวิจัย.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....7
1.3 สมมุติฐานของการทดลอง.....7
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของการศึกษา.....7
1.5 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....7
บทที่ 2 ทบทวนงานวิจัย
2.1 ลักษณะของยีสต์และยีสต์ทนร้อน.....8
2.2 อนุกรมวิธานของยีสต์.....11
2.3 สารพิษจากยีสต์นักฆ่า.....16
2.4 กระบวนการผลิตเอทานอล.....19
2.5 ผลกระทบจากสารอาหารและค่า pH ในการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน.....21
บทที่ 3 การคัดแยกและแสดงลักษณะเฉพาะของยีสต์ทนร้อนเพื่อผลิตเอทานอล
3.1 วิธีการทดลอง.....26
การคัดแยกยีสต์ทนร้อน.....26
การคัดเลือกยีสต์ทนร้อนโดยอาศัยความสามารถในการผลิตเอทานอล.....26
การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์.....26
การตรวจสอบความสามารถในการเป็นยีสต์นักฆ่า.....27
การตรวจสอบความสามารถของยีสต์ทนร้อนในการทนเอทานอล.....27
วิธีการจัดจำแนกยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้.....27
การตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล.....31
การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....32

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....34
การคัดแยกและการคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่สามารถผลิตเอทานอลได้.....34
อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1.....34
การจัดจำแนกยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1.....35
การวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1.....41
การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล.....42
การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร.....50
3.3 สรุปผลการทดลอง.....57
บทที่ 4 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ทนร้อน *I. orientalis* S1
4.1 วิธีการทดลอง.....58
การทดสอบการเจริญของ *I. orientalis* S1 สำหรับการเตรียมหัวเชื้อ.....58
วิธีการวิเคราะห์.....58
การทดสอบหาแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสำหรับการหมัก.....59
การหาปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส และ ฟรุกโตส ที่เหมาะสมสำหรับการ ผลิตเอทานอล ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า.....59
การศึกษาผลของเขย่าต่อการผลิตเอทานอล.....60
การหาปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส และ ฟรุกโตส ที่เหมาะสมสำหรับการ ผลิตเอทานอล ในสภาวะที่มีการเขย่า.....60
ลำดับของการใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส.....61
ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอทานอล.....61
การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ batch.....62
การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ batch.....63
การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ fed-batch.....63
4.2 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....65
การทดสอบการเจริญของ *I. orientalis* S1 สำหรับการเตรียมหัวเชื้อ.....65
การทดสอบหาแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสำหรับการหมัก.....65

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสต่อการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า.....66
ผลของการเขย่าต่อการผลิตเอทานอล.....70
ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสต่อการผลิตเอทานอลในสภาวะที่มีการเขย่า.....73
ลำดับของการใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส.....77
ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอทานอล.....78
การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ batch.....82
การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ batch.....86
การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ fed-batch.....87
4.3 สรุปผลการทดลอง.....93
เอกสารอ้างอิง.....94
ภาคผนวก.....102
ประวัติผู้วิจัย.....104

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญของงานวิจัย

จากวิกฤตการณ์ของราคาน้ำมันในปัจจุบันทำให้มีการวิจัยและพัฒนาพลังงานในรูปแบบอื่นๆ มากขึ้น โดยเฉพาะกลุ่มประเทศที่ไม่มีทรัพยากรน้ำมันแต่มีความสามารถการเกษตรสูงอย่างไทย ก็เริ่มมีการผลิตก๊าซโซฮอล์ (Gasohol) ซึ่งเป็นส่วนผสมระหว่างน้ำมันเบนซินกับเอทานอล (ethanol) ในอัตราส่วน 90:10 หรือ 95:5 เอทานอลที่ใช้ได้มาจากการหมักกากน้ำตาลหรือแป้งมันสำปะหลัง ดังนั้นกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จึงต้องมีประสิทธิภาพเพื่อให้คุ้มต้นทุนการผลิต และจากปัญหาการผลิตสุราชุมชนที่ได้รับการเปิดเสรีแต่ผู้ผลิตไม่สามารถผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีมาตรฐานได้ ซึ่งทั้งสองส่วนนี้ต้องการกระบวนการหมักที่ให้ประสิทธิภาพสูงเพื่อให้คุ้มค่า

ในปัจจุบันแอลกอฮอล์ในรูปแบบเอทานอลมีบทบาทสำคัญในการเป็นแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงทดแทน (Alfenore และคณะ, 2002) โดยวิธีการผลิตเอทานอลสามารถกระทำได้ 2 วิธี ได้แก่

1) การสังเคราะห์โดยวิธีทางเคมี (chemical synthesis) วิธีนี้อาศัยปฏิกิริยาการเติมน้ำ (hydration) เข้าสู่โมเลกุลของเอธิลีน (ethylene, C_2H_4)
2) การสังเคราะห์โดยสิ่งมีชีวิต (biosynthesis) สิ่งมีชีวิตที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตเอทานอลได้แก่ ยีสต์ เมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจากอากาศยีสต์จะทำให้เกิดกระบวนการหมักน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เพื่อผลิตเอทานอลผ่านทางวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) สำหรับปฏิกิริยาการผลิตเอทานอลสามารถสรุปได้ดังสมการต่อไปนี้

$$\underset{\text{กลูโคส}}{C_6H_{12}O_6} + 2ADP + 2Pi \xrightarrow{\text{ยีสต์}} \underset{\text{เอทานอล}}{2\,C_2H_5OH} + 2\,CO_2 + 2ATP + 2H_2O$$

ประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงที่ใช้ในภาคขนส่งเกือบทั้งหมด ทำให้สูญเสียเงินตราไปต่างประเทศเป็นจำนวนมากกว่าปีละ 2 แสนล้านบาท ซึ่งมีมูลค่ามากกว่ารายได้จากการส่งออกข้าว มันสำปะหลัง ยางพารา น้ำมันปาล์ม และน้ำตาลทรายรวมกัน ประกอบกับแนวโน้มราคาน้ำมันเชื้อเพลิงมีแต่จะสูงขึ้น โดยที่ประเทศไทยแทบไม่มีอำนาจต่อรองใดๆ เลย เพราะเราเป็นตลาดนำเข้าน้ำมันส่วนย่อยไม่ถึงร้อยละ 1 ของตลาดโลก วิกฤติการณ์ด้านพลังงานโดยเฉพาะราคาน้ำมันใน

ตลาดโลก ได้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องมาโดยตลอด สาเหตุหลักๆ มาจากการเกิดความขัดแย้งของประเทศต่าง ๆ ในภาคตะวันออกกลางซึ่งเป็นแหล่งน้ำมันสำคัญของโลก สิ่งเหล่านี้มีผลกระทบต่อประเทศไทยเป็นอุปสรรคของรัฐบาลในการแก้ปัญหาเศรษฐกิจ

การใช้น้ำมันปิโตรเลียมซึ่งมีปริมาณจำกัด อาจจะหมดไปในเร็ววันนี้ ทำให้ประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกต้องเสาะแสวงหาแหล่งเชื้อเพลิงและพลังงานจากทรัพยากรภายในประเทศเพื่อทดแทนการนำเข้า เช่น การใช้ถ่านหิน พลังงานนิวเคลียร์ ก๊าซธรรมชาติ เป็นต้น สำหรับประเทศไทยเรามีแหล่งพลังงานดังกล่าวในปริมาณที่ค่อนข้างจำกัด และในสัดส่วนที่ไม่เหมาะสม เช่น การผลิตไฟฟ้าในปัจจุบันต้องใช้ก๊าซธรรมชาติถึงร้อยละ 70 ทำให้ขาดเสถียรภาพด้านพลังงานของประเทศ อย่างไรก็ตาม ไทยเรายังมีแหล่งพลังงานที่สามารถผลิตได้เอง คือ พลังงานทดแทนจากพืชเกษตร ประกอบกับปัญหาราคาพืชผลทางการเกษตรตกต่ำอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะพืชผลที่ต้องพึ่งพาตลาดต่างประเทศ เช่น ข้าว ซึ่งสามารถผลิตได้ประมาณ 27 ล้านตันต่อปี จากที่นา 78 ล้านไร่ มันสำปะหลังมีพื้นที่ปลูกประมาณ 7 ล้านไร่ ซึ่งส่วนใหญ่จะปลูกในภาคตะวันออกเฉียงเหนือและตะวันออก โดยมีจังหวัดนครราชสีมาปลูกมากเป็นอันดับหนึ่ง ทั้งประเทศจะสามารถผลิตหัวสดได้ประมาณ 19 ล้านตันต่อปี ราคาขายอยู่ในระดับ 0.80-1.20 บาทต่อกิโลกรัมตามเปอร์เซ็นต์แป้ง อ้อยก็มีสภาพไม่ต่างกัน ปีนี้จะมีผลผลิตออกมากกว่า 50 ล้านตัน จากพื้นที่ปลูกประมาณ 6 ล้านไร่ ชาวไร่อ้อยกำลังรอการประกันราคาจากรัฐบาลแทนระบบการแบ่งปันผลประโยชน์เดิมที่ใช้อยู่

พืชสามชนิดที่กล่าวมานั้น ประเทศไทยเป็นผู้ส่งออกสู่ตลาดโลกในอันดับต้นๆ แต่ปัญหาราคาพืชผลทางการเกษตรตกต่ำยังคงอยู่ต่อไป คำตอบที่จะสามารถช่วยแก้ปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นนั่นคือการใช้เชื้อเพลิงเอทานอล ซึ่งได้จากการนำเอาพืชผลทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล ข้าว ข้าวโพด มาแปรรูปด้วยการย่อยสลาย การหมัก และการกลั่น แล้วนำเอาเอทานอลที่ได้มาผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงปิโตรเลียม หากนำไปผสมกับเบนซินเรียกว่า ก๊าซโซฮอล์ หากนำมาผสมกับน้ำมันดีเซลเรียกว่า ดีโซฮอล์ (Desohol) หรือใช้โดยตรง (Neat Ethanol) ซึ่งมีตัวอย่างในต่างประเทศ ทั้งในประเทศบราซิล สหรัฐอเมริกา และประเทศกลุ่มประชาคมยุโรป การใช้เชื้อเพลิงเอทานอลส่งผลให้ลดมลภาวะทางอากาศ โดยเฉพาะคาร์บอนมอนอกไซด์ และสารประกอบไฮโดรคาร์บอน ที่เผาไหม้ไม่หมดซึ่งออกมาจากท่อไอเสียรถยนต์ และยังช่วยลดจำนวนก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศที่มีผลกระทบโดยตรงต่อสภาวะเรือนกระจก (Green House Effect)

จากการศึกษาสถานภาพของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตน้ำมันก๊าซโซฮอล์ ซึ่งดำเนินการโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประกอบกับแผนยุทธศาสตร์มันสำปะหลังและแผนพัฒนาการผลิตอ้อยปี 2545-2549 ของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ และในการประชุมคณะกรรมการนโยบาย

พลังงานแห่งชาติ เมื่อวันที่ 18 เมษายน 2545 และการประชุมคณะรัฐมนตรีเมื่อ 14 พฤษภาคม 2545 ได้มีมติรับทราบตามข้อสรุปในด้านวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล ดังนี้

1. พืชที่เหมาะสมสำหรับการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลมากที่สุดคือ มันสำปะหลัง ซึ่งมีปริมาณส่วนเกินของตลาดประมาณ 4 ล้านตัน ต่อปี สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 2 ล้านลิตร ต่อวัน
2. กากน้ำตาลสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลได้เฉพาะส่วนที่เหลือจากการบริโภค ซึ่งมีประมาณ 0.8 ล้านตัน ต่อปี ผลิตเอทานอลได้ประมาณ 600,000 ลิตร ต่อวัน
3. การใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบผลิตเอทานอลไม่เหมาะสม เพราะปริมาณการผลิตอ้อยยังไม่เพียงพอกับความต้องการของอุตสาหกรรมน้ำตาล

สำหรับกากน้ำตาล (molasses) เป็นผลิตภัณฑ์เหลือจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากพืชที่ให้ความหวาน เช่น อ้อย หัวบีทชนิดหวาน (sugarbeet) เป็นต้น ปริมาณการผลิตของกากน้ำตาลทั่วโลกประมาณ 125-130 ล้านตันต่อปี ประมาณ 2 ใน3 ได้มากจากอ้อยและที่เหลือประมาณ 25% ได้มาจากหัวบีทชนิดหวาน กากน้ำตาลจะนำไปใช้เป็นสารอาหารสำหรับการหมักหลายชนิด ที่เหลือจะนำไปเป็นอาหารทั้งคนและสัตว์ กากน้ำตาลประมาณ 75% ผลิตจากประเทศสหรัฐอเมริกาและเอเชีย กากน้ำตาลเป็นน้ำตาลที่ไม่สามารถตกผลึกได้ ของแข็งที่ไม่ใช่น้ำตาล และสารเคมีต่างๆ ทั้งอินทรีย์และอนินทรีย์ในน้ำ

โดยกากน้ำตาลจะได้จากกระบวนการมีปริมาณมากถึงกว่า 33% ของวัตถุดั้งต้น กากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยจะมีน้ำตาลสูงถึง 48% เมื่อเทียบกับกากน้ำตาลจากหัวบีทจะไม่มีน้ำตาลเลย จึงทำให้กากน้ำตาลที่ได้จากอ้อยซึ่งมีอยู่เป็นจำนวนมากและราคาถูก สามารถนำมาใช้เป็นสารอาหารสำหรับการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในกระบวนการหมักเอทานอลได้โดยตรง ซึ่งต่างจากมันสำปะหลังที่ต้องผ่านกระบวนการ Saccharification เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อน นอกจากนี้กากน้ำตาลยังมีสารอาหารอื่นๆที่จำเป็นต่อการหมัก เช่น ไนโตรเจนอีกประมาณ 1% และแร่ธาตุๆอีกจำนวนมาก (http://www.suga-lik.com/molasses/ composition. html)

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นแสดงให้เห็นว่า ประเทศไทยมีศักยภาพในด้านวัตถุดิบอย่างเพียงพอที่สามารถผลิตเอทานอลได้เกือบ 3 ล้านลิตรต่อวัน โดยไม่มีการขยายพื้นที่เพาะปลูก ซึ่งมากเกินความต้องการใช้เอทานอลในระยะแรกที่คาดว่าจะไม่เกิน 1 ล้านลิตรต่อวัน

สำนักคุณภาพน้ำมันเชื้อเพลิง กรมธุรกิจพลังงาน (กรมทะเบียนการค้า) ได้รายงานไว้ว่า อทานอลเป็นสาร Oxygenated ชนิดหนึ่งซึ่งสามารถใช้ทดแทน Methyl Tertiary Buthyl (MTBE) ได้

ในปัจจุบันน้ำมันเบนซินออกเทน 95 มีสาร MTBE ผสมในปริมาณร้อยละ 5.5-11.0 โดยปริมาตร การนำเอาเอทานอลผสมในน้ำมันเบนซินจะทำให้คุณสมบัติของน้ำมันเบนซินเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม คือ ค่าความดันไอสูงขึ้นประมาณ 1 psi หรือ 6.9 kpa เมื่อใช้เอทานอลร้อยละ 10 ค่าอุณหภูมิการกลั่นที่ปริมาตรร้อยละ 50 ลดลง คุณสมบัติในการรวมตัวกับน้ำลดต่ำลงและจะทำให้การใช้น้ำมันเชื้อเพลิงสิ้นเปลืองมากขึ้น (1-2%) เนื่องจากมีค่า Heating Value ต่ำ

น้ำมันก๊าซโซฮอล์ คือ น้ำมันเบนซินผสมเอทานอล (ใช้ความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 ขึ้นไป) สำหรับประเทศไทย กรมทะเบียนการค้าได้กำหนดคุณภาพของน้ำมันก๊าซโซฮอล์ แยกออกจากน้ำมันเบนซิน มีค่าความดันไอไม่สูงกว่า 65 กิโลปาสคาล (kpa) อุณหภูมิการกลั่นที่ปริมาตรร้อยละ 50 ไม่ต่ำกว่า 65 และไม่สูงกว่า 110 องศาเซลเซียส และให้มีการผสมเอทานอลได้ในปริมาณร้อยละ 10-12 โดยปริมาตร ในปี 2544 ประเทศไทยมีการใช้เบนซินออกเทน 95 ในปริมาณ 3,000 ล้านลิตร ต้องนำเข้า MTBE ในปริมาณ 187.464 ล้านลิตร โดยมีราคาเฉลี่ยประมาณ 11.44 บาท ต่อลิตร ดังนั้น หากใช้เอทานอลทดแทน MTBE ได้ทั้งหมด สามารถประหยัดเงินได้ประมาณ 2,144 ล้านบาท แต่ต้องผลิตเอทานอลได้ไม่น้อยกว่าปีละ 300 ล้านลิตร จึงจะเพียงพอกับความต้องการ ปัจจุบันมีผู้ผลิตและจำหน่ายเอทานอลเพียงสองราย ได้แก่ โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา และโรงงานต้นแบบของสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ส่วนผู้ค้าน้ำมันก๊าซโซฮอล์ ได้แก่ บริษัท ปตท. จำกัด (มหาชน) และ บางจากปิโตรเลียม จำกัด (มหาชน) โดยมีปริมาณจำหน่ายเพียงเดือนละ 100,000 ลิตร เท่านั้นเนื่องจากปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ยังไม่มากนัก สมาคมอุตสาหกรรมยานยนต์ไทย ในปี 2544 ได้สำรวจข้อมูลรถยนต์ต่าง ๆ ที่สามารถใช้ก๊าซโซฮอล์เป็นเชื้อเพลิงตามข้อกำหนดคุณภาพของน้ำมันเบนซินออกเทน 95 ประกาศเดิม (ก่อนประกาศฉบับ 21 ตุลาคม 2545) พบว่า เฉพาะรถยนต์รุ่นเก่าที่ใช้ระบบคาร์บูเรเตอร์ไม่สามารถใช้ก๊าซโซฮอล์เป็นเชื้อเพลิงแทนเบนซินออกเทน 95 ได้

สำหรับน้ำมันดีโซฮอล์ ซึ่งหมายถึง น้ำมันดีเซลผสมแอลกอฮอล์ ในการผสมน้ำมันดีโซฮอล์อาจจะใช้เอทานอลความบริสุทธิ์ร้อยละ 95 (Hydrated Ethanol) หรือสูงกว่าร้อยละ 99 (Anhydrous Ethanol) ผสมกับน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว แต่ต้องมีการผสมสารเติมแต่งประเภท Emulsifier เพื่อช่วยให้เอทานอลละลายเป็นเนื้อเดียวกับน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว การผสมเอทานอลในน้ำมันดีเซลหมุนเร็วทำให้คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำมันดีเซลหมุนเร็วเปลี่ยนไปบ้าง ที่สำคัญได้แก่ ค่าซีเทนนัมเบอร์ (Cetane Number) ลดลง และจุดวาบไฟของน้ำมันดีโซฮอล์มีค่าต่ำกว่าน้ำมันดีเซลหมุนเร็ว ดังนั้น จึงต้องชดเชยค่าซีเทนนัมเบอร์โดยการเติมสารเติมแต่งประเภทเพิ่มซีเทน (Cetane Improver) ลงไปเพื่อเพิ่มค่าซีเทนนัมเบอร์และต้องเติมสารเติมแต่งป้องกันการกัดกร่อน (Corrosion Inhibitor) เพื่อป้องกันหัวฉีดเชื้อเพลิงกัดกร่อน สถาบันวิจัยและพัฒนา ปตท. ได้ทดสอบการใช้น้ำมันดีโซฮอล์กับรถโดยสาร ขสมก. พบว่า สามารถลดควันดำได้ประมาณร้อยละ 30-40 แต่สิ้นเปลืองน้ำมันเชื้อเพลิงมากขึ้น

ประมาณร้อยละ 7-9 อนึ่งกรมธุรกิจพลังงาน (กรมทะเบียนการค้า) ยังไม่ได้ออกประกาศกำหนดคุณภาพของน้ำมันดีโซฮอล์ (ข้อมูล ณ วันที่ 25 ตุลาคม 2545)

ตามที่กล่าวมาแล้ว เอทานอล (ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) ที่ผลิตจากพืช เช่น มันสำปะหลัง อ้อย และกากน้ำตาล ในกระบวนการผลิต หากใช้วัตถุดิบประเภทแป้ง และเซลลูโลส จะต้องนำมาย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อน โดยการใช้กรด แบคทีเรีย หรือเอ็นไซม์ ส่วนวัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลสามารถนำมาหมักกับเชื้อยีสต์ได้เลย ใช้เวลาในการหมักประมาณ 3-4 วัน (กรณีเป็นการหมักแบบชั่วคราว หากหมักแบบต่อเนื่องจะใช้เวลาน้อยกว่านี้) จะได้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร จากนั้นนำไปกลั่นแยกแบบลำดับส่วน จะได้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยปริมาตร ในกรณีที่ต้องนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงผสมก๊าซโซฮอล์ และดีโซฮอล์ จะต้องแยกส่วนน้ำออกอีกประมาณร้อยละ 5 โดยปริมาตร โดยวิธีการกลั่นกับสารตัวที่สาม หรือแยกด้วยเครื่องโมเลกคูลาซีฟ (molecular sieve) หรือเครื่องแยกระบบเมมเบรน

แอลกอฮอล์ประเภทเครื่องดื่ม

การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์หรือสุราชุมชนในปัจจุบัน มักมี 3 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

ก) กลุ่มผลิตสุราแช่จากธัญญาพืช เช่น สาโท อุ จะประกอบด้วย 2 กระบวนการ คือ

1. Saccharification process คือ การเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส ด้วยเชื้อรา ยีสต์ หรือแบคทีเรียที่มีเอนไซม์จำพวก amylase และ glucoamylase
2. Fermentation process คือ การหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากกระบวนการแรกให้เป็นแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol, C_2H_5OH) นิยมใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นหลัก

ข) กลุ่มผลิตสุราแช่ประเภทไวน์จากผลไม้ จะมีเพียงขั้นตอนเดียว คือ การหมักน้ำตาลจากผลไม้ให้เป็นแอลกอฮอล์ ด้วยเชื้อยีสต์เป็นหลัก นอกจากนี้ผลไม้บางชนิดอาจมีกรดมาลิกในปริมาณมาก เช่น องุ่น จำเป็นต้องกำจัดหรือลดปริมาณลงด้วยการเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ชนิดอื่น เช่น กรดแลคติก ที่มีความหอมและนุ่มมากกว่า เรียกกระบวนการนี้ว่า Malolactic fermentation หรือการหมักครั้งที่สอง โดยอาศัยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

ค) กลุ่มผลิตสุรากลั่น การกลั่นสุรา หมายถึง การกลั่นแยกเอทิลแอลกอฮอล์ ออกจากน้ำหมักหรือส่าเหล้า (สาโท หรือ ไวน์ หรือ ส่าเหล้าจากกากน้ำตาล) โดยอาศัยจุดเดือดและความดันไอของแอลกอฮอล์กับสารระเหยที่แตกต่างกัน ซึ่งแอลกอฮอล์และสารระเหยต่างๆจะถูกสร้างขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก สารระเหยต่างๆเหล่านี้มักมีพิษต่อผู้บริโภค ได้แก่ เอสเตอร์ อัลดีไฮด์ ฟูเซลออยล์ เป็นต้น โดยการกลั่นจะสามารถแยกสารพิษออกได้ แต่ก็มีสารระเหยบางอย่าง เช่น เอส เตอร์อาจมี

หลงเหลือได้โดยจะมีกลิ่นเฉพาะในแต่ละชนิดซึ่งเป็นเอกลักษณ์ที่ค่านิยมในการบริโภคสุรา แอลกอฮอล์ที่ได้จะมีความบริสุทธิ์มากน้อยเพียงใดจะขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น วัตถุดิบที่นำมากลั่น (น้ำหมักหรือส่าเหล้า) วิธีการกลั่น และชนิดของหม้อกลั่น หรือชนิดของชุดอุปกรณ์การกลั่น เป็นต้น

ยีสต์ที่ใช้ในการหมัก (Yeast in Fermentation Process)

โดยปกติแล้วสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์เพื่อการผลิตเอทานอลจะมีค่าความเป็นกรดเบส (pH) ที่ 3.5 ถึง 6.0 ภายใต้อุณหภูมิ 28 ถึง 30 องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิสูงขึ้นประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจะลดลงอย่างรวดเร็ว ในปี 2001 Roehr ศึกษาคุณสมบัติการใช้ยีสต์ทนร้อน (thermotolerant yeast) ในการผลิตเอทานอล สามารถอธิบายได้โดยสังเขป ดังนี้

- ยีสต์ทนร้อนจะทำให้เกิดกิจกรรมการย่อยสลายน้ำตาลอย่างรวดเร็ว พร้อมๆ กับทำให้เกิดอัตราการหมักและผลิตเอทานอลได้มากขึ้น
- เมื่ออุณหภูมิในกระบวนการหมักสูงขึ้นปริมาณออกซิเจนและก๊าซอื่นๆ ที่ละลายอยู่ในน้ำหมักจะลดปริมาณลง อย่างไรก็ตามปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ปราศจากอากาศ
- ความหนืดของน้ำหมักจะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เป็นการประหยัดพลังงานในการกวนน้ำหมัก
- ในระหว่างที่ยีสต์กำลังทำให้เกิดการหมักจะมีความร้อนเกิดขึ้น ดังนั้นกระบวนการหมักที่อุณหภูมิสูงจะประหยัดพลังงานในการทำให้ระบบมีอุณหภูมิลดลง
- โอกาสในการที่จะเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ลดลง

ปัจจุบันผู้ผลิตแอลกอฮอล์นิยมใช้ ยีสต์สายพันธุ์ Sc90 และยีสต์ทำไวน์ เช่น K1V-1116, EC1118, 71B-1122, Premier Cuvee เป็นต้น อย่างไรก็ตามเชื้อยีสต์เหล่านี้ไม่สามารถเจริญได้ดีนักในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 32°ซ อีกทั้งหลายสายพันธุ์ไม่มีความสามารถในการสร้าง killer toxin จึงทำให้อาจมีเชื้ออื่นๆ ปนเปื้อนในกระบวนการผลิตได้ง่ายกว่าสายพันธุ์ที่มียีน killer toxin

ด้วยเหตุนี้เองการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ จึงศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ทนร้อนซึ่งสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 40 องศาเซลเซียสตามรายงานการวิจัยของ Slapack และคณะ (1987) และหาสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดต่อการหมัก เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์สูงสุด

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

2.1 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์ในกระบวนการผลิตเอทานอล

2.2 เพื่อศึกษากลไกการทำงานและหาค่าจลพลศาสตร์ของการหมักแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อยีสต์ทนร้อนในสภาวะต่างๆ

2.3 เพื่อทดสอบหาความสามารถในการผลิต killer toxin

2.4 เพื่อวิเคราะห์หาสารปนเปื้อนที่เป็นโทษต่อสุขภาพในระหว่างการหมัก

3. สมมุติฐานของการทดลอง

การผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ควรจะให้เอทานอลในปริมาณสูงที่อุณหภูมิสูง

4. ขอบเขตและข้อจำกัดของการศึกษา

4.1 คัดเลือกเชื้อยีสต์ทนร้อนจากแหล่งน้ำร้อน เช่น บ่อน้ำร้อนธรรมชาติ ระบบบำบัดน้ำทิ้งในโรงงานอุตสาหกรรม แล้วศึกษาประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์ ในกระบวนการผลิตเอทานอล

4.2 ศึกษากลไกการทำงานและหาค่าจลพลศาสตร์ของการหมักแอลกอฮอล์ด้วยเชื้อยีสต์ทนร้อนแบบ batch และ fed-batch ในสภาวะต่างๆ เช่น ประเภทของน้ำตาล อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมัก ความสามารถทนทานต่อความเข้มข้นของน้ำตาล pH ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิต ค่าจำเพาะต่างๆตามหลักจลพลศาสตร์ของหารหมัก เป็นต้น

4.3 ทดสอบหาความสามารถในการผลิต killer toxin เพื่อใช้ป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ

4.4 วิเคราะห์หาสารปนเปื้อนที่เป็นโทษต่อสุขภาพในระหว่างการหมัก เช่น ฟูเซลออยล์ เอทิลคาร์บาเมต เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ เมทิลแอลกอฮอล์ เป็นต้น

5. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ควรจะคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่มีประสิทธิภาพดีในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล

บทที่ 2
ทบทวนงานวิจัย

1. ลักษณะของยีสต์และยีสต์ทนร้อน

1.1 ยีสต์

ยีสต์จัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจ (fungi) ในกลุ่มแอสโคมัยซีตัส (ascomycetous) หรือเบสิดิโอมัยซีตัส (basidiomycetous) ซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) หรือการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองเซลล์ (fission) และหากมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะไม่พบฟรุตติ้ บอดี้ (fruiting body) (Boekhout และ Kurtzman, 1996)

ในการแสดงลักษณะเฉพาะของยีสต์นั้นจะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งในการแบ่งแยกยีสต์ออกจากเชื้อรา โดยการจัดจำแนกยีสต์ในเบื้องต้นมักจะเป็นการทดสอบทางสัณฐานวิทยาร่วมกับการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายและดูดซึมแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน ในปัจจุบันการทดสอบดังกล่าวนี้สามารถกระทำได้อย่างสะดวกและรวดเร็วด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป เรียกว่า Analytical Profile Index (API) (BioMérieux, ประเทศฝรั่งเศส) หรืออาจใช้ระบบการวิเคราะห์โดยคอมพิวเตอร์แบบอัตโนมัติ เรียกว่า ระบบ BCCM/Allev 2.00 (Louvain-la-Neuve, ประเทศเบลเยี่ยม) โดยทั่วไปจะเป็นการทดสอบความสามารถในการย่อยสลายและดูดซึมและการทำให้เกิดปฏิกิริยาการหมักน้ำตาลต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกาแลคโตส น้ำตาลแลคโตส น้ำตาลซูโครส น้ำตาลราฟฟิโนส น้ำตาลทรีฮาโลส และน้ำตาลไซโลส

ยีสต์มีประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ การผลิตเป็น biomass และผลผลิตต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึม ได้แก่ เอนไซม์ วิตามิน โพลีแซคคาร์ไรด์ แคโรทีนอยด์ แอลกอฮอล์ในกลุ่มโพลีไฮดริค (polyhydric alcohols) ไขมัน ไกลโคลิปิด กรดซิตริก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารประกอบอื่นๆ ที่เกิดจากการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์ ตารางที่ 1 แสดงสายพันธุ์ของยีสต์และประโยชน์ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก อาหาร และเครื่องดื่ม (Jacobson และ Jolly, 1989)

ประเภทของอุตสาหกรรม	สายพันธุ์ยีสต์
สุรา	*Saccharomyces cerevisiae*
ขนมปัง	*S. cerevisiae, S. exiguus, S. rosei*
สารให้ความหวานแทนน้ำตาล	*Candida diddensiae*
อิมัลซิไฟเออร์	*C. lipolytica*
เอทานอล	*S. cerevisiae*
อาหารสัตว์	*Phaffia rhodozyma*
โปรตีนเซลล์เดียว	*C. utilis*
การหมักแลคโตสและผลิตภัณฑ์นม	*C. pseudotropicalis, Kluyveromyces fragilis, K. lactis*

1.2 ยีสต์ทนร้อน

อุณหภูมิเป็นปัจจัยแวดล้อมที่สำคัญอย่างหนึ่งซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์ เมื่อใช้ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถแบ่งยีสต์ออกเป็น 3 กลุ่ม (Arthur และ Watson, 1976) ดังนี้

- ยีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic yeast) มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญตั้งแต่ 2 ถึง 20 องศาเซลเซียส
- ยีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeast) มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญตั้งแต่ 5 ถึง 35 องศาเซลเซียส
- ยีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (thermoophilic yeast) มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญตั้งแต่ 28 ถึง 45 องศาเซลเซียส

ในแต่ละช่วงอุณหภูมิของการเจริญจะแบ่งแยกได้เป็น อุณหภูมิต่ำสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ เรียกว่า minimum growth temperature (T_{min}) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ เรียกว่า optimum growth temperature (T_{opt}) อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ เรียกว่า maximum growth temperature (T_{max})

สำหรับยีสต์ทนร้อน (thermotolerant yeast) จะมีช่วงอุณหภูมิในการเจริญตั้งแต่ 8 ถึง 42 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ (T_{opt}) สูงกว่ายีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง แต่ต่ำกว่ายีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามกฎเกณฑ์นี้อาจมีข้อยกเว้นในยีสต์บางสายพันธุ์

เช่น *C. macedoniensis* (T_{min} 5 องศาเซลเซียส และ T_{max} 45 องศาเซลเซียส) *S. guttulata* (T_{min} 34 องศาเซลเซียส และ T_{max} 42 องศาเซลเซียส) ดังนั้นยีสต์ทนร้อนที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจึงหมายถึงยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และ/หรือ ที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การทดสอบความสามารถของยีสต์ทนร้อนในการเจริญและการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 ถึง 45 องศาเซลเซียส (Hacking และคณะ, 1984)

สายพันธุ์	จำนวนยีสต์ (สายพันธุ์)			
	การเจริญที่ 37 °ซ	ปริมาณเอทานอลมากกว่า 50% ที่ 37 °ซ	ปริมาณเอทานอลมากกว่า 50% ที่ 40 °ซ	การเจริญและการผลิตเอทานอลที่ 45 °ซ
Candida	15	5	4	1
Hansenula	7	1	0	0
Kluyveromyces	12	8	5	5
Pichia	4	0	0	0
Saccharomyces	14	13	3	0
Schizosaccharomyces	2	1	0	0
Torulopsis	1	0	0	0

1.3 ผลกระทบต่อองค์ประกอบของเซลล์ยีสต์ทนร้อนเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ

ความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมเป็นสิ่งที่ควรพิจารณาเป็นอย่างยิ่ง แต่อย่างไรก็ตามกลไกต่างๆ ยังไม่ปรากฏแน่ชัด (Arthur และ Watson, 1976) ในกรณีของการเจริญและการเกิดกระบวนการหมักที่อุณหภูมิสูงนั้นองค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์ควรจะคงอยู่และทำหน้าที่ได้ดีอย่างปกติ ในปี 1990 Kocková-Kratochvílová ศึกษาพบว่ายีสต์ในกลุ่มที่เจริญที่อุณหภูมิสูงจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นในที่สามารถทนต่อความร้อนได้ ในทางตรงกันข้ามเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์ในกลุ่มที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำจะเสื่อมสลายเมื่ออุณหภูมิสูง องค์ประกอบที่สำคัญที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีผลในการทนต่ออุณหภูมิคือ กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ยีสต์ที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำจะพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นจำนวนมาก สำหรับตัวอย่างของสายพันธุ์ยีสต์และกรดไขมันที่พบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 กรดไขมันที่พบเป็นองค์ประกอบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ในยีสต์ที่เจริญที่อุณหภูมิต่ำ ยีสต์ที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลาง ยีสต์ทนร้อน และยีสต์ที่เจริญที่อุณหภูมิสูง (Arthur และ Watson, 1976)

กลุ่มของยีสต์	สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณของกรดไขมันทั้งหมด (ร้อยละ)								
		กรดไขมันอิ่มตัว				กรดไขมันไม่อิ่มตัว[a]				
		$< C_{14}$	C_{14}	C_{16}	C_{18}	$C_{14:1}$	$C_{16:1}$	$C_{18:1}$	$C_{18:2}$	$C_{18:3}$
ยีสต์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ	*Lucosporidium frigidum*	1±1[b]	2±1	6±1	Tr[c]	Tr	Tr	11±1	27±2	53±2
ยีสต์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง	*C. lipolytica*	2±1	3±1	6±1	1±1	3±1	20±2	44±5	21±4	Tr
ยีสต์ทนร้อน	*C. parapsilosis*	2±1	2±1	18±1	6±1	Tr	3±1	53±2	16±1	Tr
	S. telluris	3±1	3±1	12±1	3±1	Tr	3±1	58±2	17±1	Tr
ยีสต์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง	*Torulopsis bovina*	3±1	16±1	9±1	4±1	3±1	42±1	24±3	-	-
	C. sloofii	4±1	26±1	6±1	4±1	3±1	34±1	23±3	-	-

[a] ปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (ร้อยละของโมโนอีน+2[ร้อยละของไดอีน]+3[ร้อยละของไตรอีน])/100.

[b] ±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานสำหรับ 4-6 ค่า

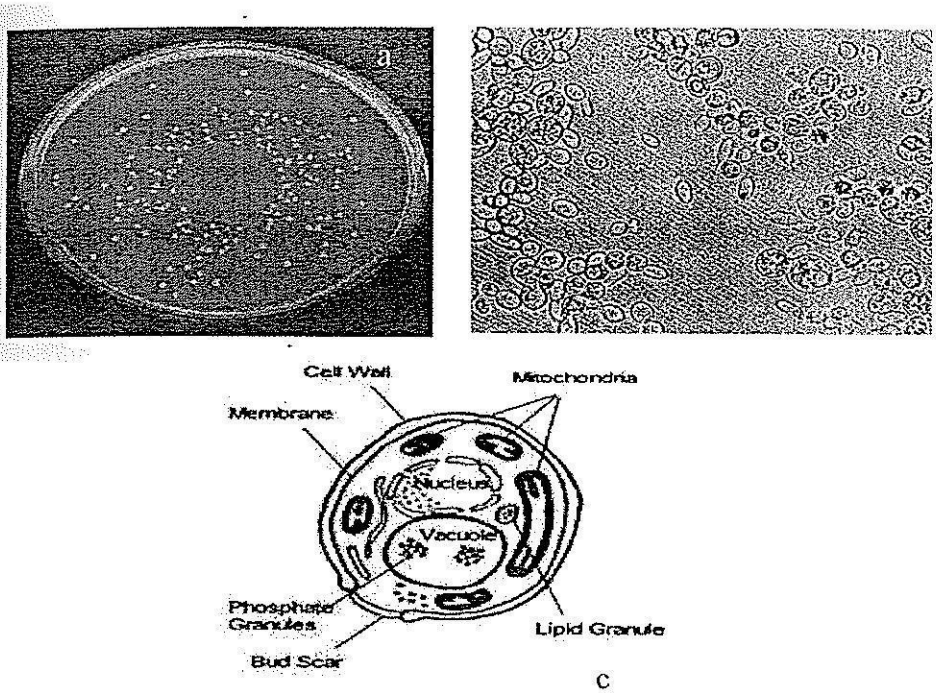
[c] Tr = น้อยกว่า 1%

2. อนุกรมวิธานของยีสต์

การจัดหมวดหมู่ของยีสต์จะอาศัยจากลักษณะรูปร่างของเซลล์ ความสามารถในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ลักษณะทางสรีรวิทยา เช่น กลไกการเกิดกระบวนการเมทาบอลิซึม หรือความต้องการธาตุอาหาร และการทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมี

ยีสต์จัดอยู่ในกลุ่มของฟังไจ (fungi) มีโครงสร้างซับซ้อนและขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรีย โดยทั่วไปแล้วยีสต์จะมีรูปร่างเป็นรูปไข่ เป็นเซลล์เดี่ยว ขนาดประมาณ 8 x 5 ไมโครเมตร เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญจะเกิดการแบ่งเซลล์ทุกๆ 1 ถึง 3 ชั่วโมง (Wayman และ Parekh, 1990)

โดยปกติแล้วเซลล์ยีสต์จะเป็นเซลล์ที่ไม่มีสี แต่เมื่อเลี้ยงให้เจริญบนอาหารแข็งยีสต์จะเจริญให้เห็นเป็นโคโลนี บางครั้งโคโลนีเหล่านั้นอาจมีสีขาว สีครีม หรือในบางครั้งอาจมีสีน้ำตาล (รูปที่ 1) ในปี 1962 Alexopoulos ศึกษาพบว่าลักษณะทางสรีรวิทยามีความสำคัญอย่างมากในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาความสามารถในการสืบพันธุ์



รูปที่ 1 ลักษณะเซลล์ยีสต์ ; a) โคโลนีของยีสต์ *S. cerevisiae* บนอาหารแข็ง (www, 2005), b) ลักษณะเซลล์ *S. cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (400x)(www, 2006) และ c) องค์ประกอบภายในเซลล์ยีสต์ (www, 2002)

การสืบพันธุ์ของยีสต์

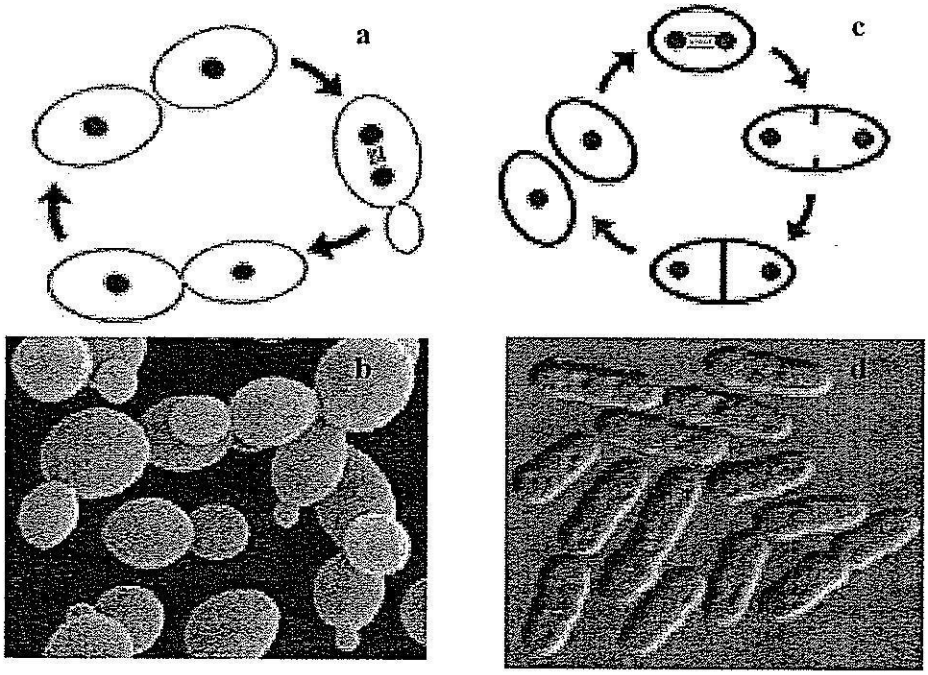
1. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (Asexual reproduction)

หากอาศัยความสามารถในการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในการจัดจำแนกยีสต์แล้ว Alexopoulos (1962) สามารถจัดกลุ่มยีสต์ได้เป็น 2 กลุ่ม ดังนี้

- ยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding yeasts) ยีสต์ในกลุ่มนี้จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ ซึ่งจะเริ่มต้นจากการส่งสปินเดิลโพลบอดี (SPB) พร้อมๆ กับการส่งท่อไซโทพลาสมิกไมโครทูบูลออกจากนิวเคลียสไปสู่เซลล์ใหม่ ซึ่งสามารถมองเห็นเยื่อหุ้มนิวเคลียสได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ไมโครทูบูลดังกล่าวจะชี้ออกไปที่ผนังเซลล์ที่ใกล้กับแวคิวโอลมากที่สุด ที่ผิวนอกของเซลล์จะมีส่วนที่ยื่นออกไปเป็นตุ่มเล็กๆ ซึ่งเกิดจากผนังเซลล์ตรงบริเวณนั้นอ่อนแอลง จากนั้นจะเกิดการแบ่งนิวเคลียสไปสู่หน่อใหม่ (bud) รวมถึงไมโทคอนเดรียและแวคิวโอลขนาดเล็กๆ จะเกิดขึ้นด้วย เมื่อเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิส นิวเคลียสจากเซลล์แม่จะถูกดึงออกไปไกลที่สุดจากนั้นเซลล์แม่กับเซลล์ลูกจึงแยกออกจากกัน ดังรูปที่ 2 การแบ่งนิวเคลียสนี้จะ

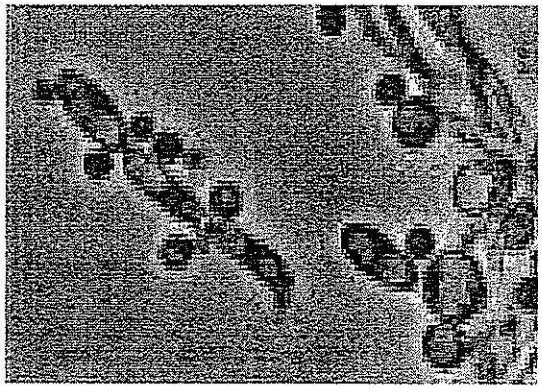
เกิดขึ้นหลังจากการแบ่งผนังเซลล์แล้ว เมื่อเซลล์แม่และเซลล์ลูกแยกออกจากกันจะมีรอยการแตกหน่อ (bud scar) เป็นวงแหวนไคทินติดอยู่ที่เซลล์แม่ แต่อย่างไรก็ตามยีสต์บางสายพันธุ์เมื่อเกิดการแตกหน่อแล้ว เซลล์ลูกอาจไม่แยกออกจากเซลล์แม่ทำให้เกิดการเรียงเซลล์เป็นเส้นสาย เรียกว่า เส้นใยเทียม (pseudomycelium) ดังรูปที่ 3

- ยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์โดยการแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์ (fission yeasts) การสืบพันธุ์ในลักษณะนี้จะเริ่มจากเซลล์แม่ขยายขนาดยาวขึ้น ตามด้วยการแบ่งนิวเคลียส จากนั้นจะเกิดการสร้างผนังกั้นบางๆ (septum) ขึ้นบริเวณกลางเซลล์ หลังจากนั้นเมื่อผนังกั้นมีความหนามากขึ้น เซลล์แม่และเซลล์ลูกจึงแยกออกจากกัน (Conti และ Naylor, 1959)



รูปที่ 2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ; a) ยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อ (budding yeasts) การสร้างเซลล์ใหม่จะเกิดขึ้นที่ขั้วของเซลล์ เมื่อเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโตซิสแล้วจะเกิดการแบ่งนิวเคลียสจากเซลล์แม่ไปสู่เซลล์ลูก แล้วจึงเกิดการแบ่งส่วนประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ จากนั้นเซลล์แม่และเซลล์ลูกจึงแยกออกจากกัน (www, 2005), b) เซลล์ของ *S. cerevisiae* ในขณะที่เกิดการแบ่งเซลล์โดยการแตกหน่อ (www, 2003) และ c) ยีสต์ที่มีการสืบพันธุ์โดยการแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์ (fission yeasts) หลังจากที่เกิดการแบ่งนิวเคลียสแล้ว เซลล์จะขยายขนาดและเกิดการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งในขั้นตอนนี้จะทำให้เกิดการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองเซลล์อย่างเท่าๆ กัน(www, 2005) และ d) เซลล์ของ

Schizosaccharomyces pombe ในขณะที่มีการสืบพันธุ์โดยการแบ่งจากหนึ่งเป็นสองเซลล์ (www, 2003)

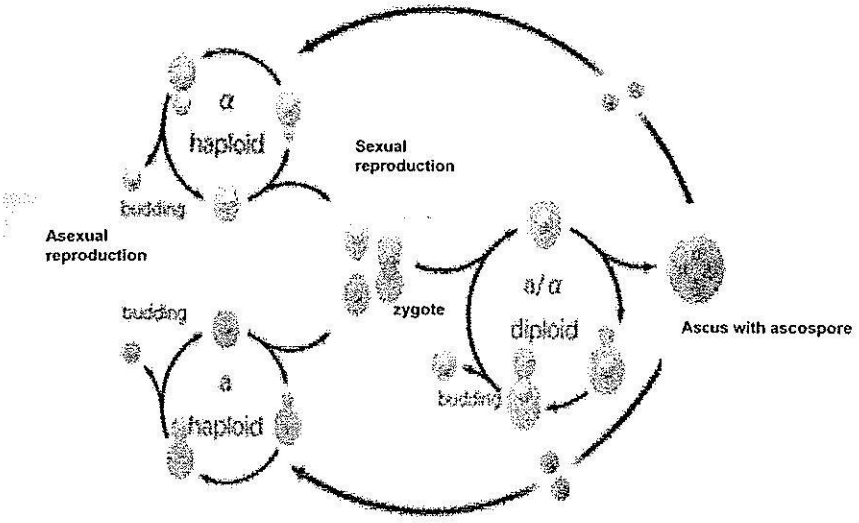


รูปที่ 3 เส้นใยเทียม (pseudomycelium) (www, 2005)

2. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Sexual reproduction)

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศในยีสต์เกิดจากการผสมกันของแอสโคสปอร์ 2 แอสโคสปอร์ หากเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมไปด้วยธาตุอาหาร เช่น ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลมาก จะทำให้แอสโคสปอร์งอกออกมาได้ใหม่ โดยการทำให้ผนังแอสคัสแตกแล้วจึงเริ่มต้นการแบ่งเซลล์ ใน *S. cerevisiae* วงชีวิตในระยะแฮพลอยด์จะมีปัจจัยควบคุมเพศหรือเมทติงไทพ์ (mating type) เป็น a กับ α ภายในถุงแอสคัสจะประกอบด้วยแอสโคสปอร์แบบ a และ α อย่างละ 2 แอสโคสปอร์ดังแสดงในรูปที่ 4 แอสโคสปอร์ที่มีเมทติงไทพ์เป็น a จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เรียกว่า ปัจจัยควบคุมเพศ a (sexual factor a) หรือเมทติงไทพ์ a (mating type a, *MAT*a) เป็นเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 12 ชนิดในทำนองเดียวกับแอสโคสปอร์ที่มีเมทติงไทพ์เป็น α ก็จะสร้างปัจจัยควบคุมเพศ α (sexual factor α) หรือเมทติงไทพ์ α (mating type α, *MAT*α) โดยเป็นสายเพปไทด์ที่มีกรดอะมิโน 13 ชนิด หากปัจจัยควบคุมเพศสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบใดก็จะระงับการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์อีกแบบหนึ่งได้ เช่น ปัจจัยควบคุมเพศ a จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบ *MAT*a ในขณะเดียวกันเซลล์สืบพันธุ์นี้จะระงับการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์แบบ *MAT*α เหตุการณ์นี้เกิดขึ้นในระยะ G1 เมื่อเซลล์แบบแฮพลอยด์ที่เป็นเมทติงไทพ์เดียวกันมาผสมกันได้เป็นเซลล์แบบดิพลอยด์ เซลล์นี้จะสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อไปอีกหลายรุ่น เมื่อถึงระยะที่เหมาะสมก็จะเจริญเป็นแอสคัส มีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซิสได้ 4 นิวเคลียส ซึ่งต่อไปจะเจริญไปเป็นแอสโคสปอร์ได้ 4 แอสโคสปอร์ เมื่อปล่อยแอสโคสปอร์ออกมาสามารถเจริญและสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศโดยการแตกหน่อได้ ซึ่งเป็นช่วงของวงชีวิตในระยะแฮพลอยด์ ต่อไปจึงเป็นการสืบพันธุ์แบบ

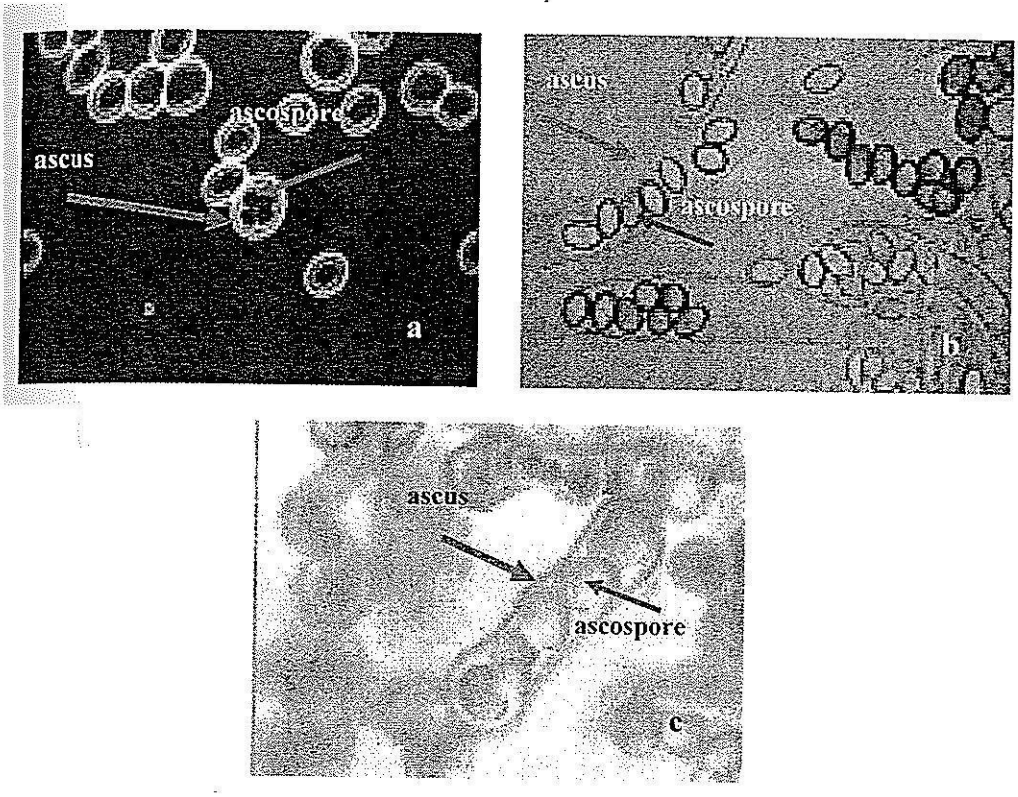
มีเพศโดยการผสมกันระหว่างเมทติงไทพ์ (a/α) แล้วจึงเจริญเข้าสู่ช่วงชีวิตระยะดิพลอยด์ต่อไป (Glazer และ Nikaido, 1995)



รูปที่ 4 วงจรการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศของยีสต์ (www, 2005)

รูปร่างลักษณะของแอสโคสปอร์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ใช้ในการจัดจำแนกสายพันธุ์ยีสต์ โดยปกติแล้วแอสโคสปอร์มักจะมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ซึ่งพบได้ในยีสต์ *Debaryomyces, Saccharomyces, Schizosaccharomyces*, และ *Saccharomycodes* ดังแสดงในรูปที่ 5 แต่ในยีสต์บางสายพันธุ์จะสร้างแอสโคสปอร์ที่มีลักษณะพิเศษ เช่น แอสโคสปอร์ของ *Pichia* และ ยีสต์บางชนิดในกลุ่มของ *Hansenula* จะมีรูปทรงคล้ายหมวก (hat-shaped) นอกจากนี้ *Hansenula* ชนิดอื่นๆ จะพบแอสโคสปอร์ที่มีลักษณะค่อนข้างกลมมีวงแหวนคล้ายดาวเสาร์ (planet Saturn) (Alexopolos และคณะ, 1996)

อย่างไรก็ตาม การจัดจำแนกสายพันธุ์ของยีสต์ โดยศึกษาจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการทดสอบด้วยวิธีทางชีวเคมีนั้นเป็นวิธีการจัดจำแนกอย่างง่าย ในบางกรณีที่ต้องการจัดจำแนกยีสต์สายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันมาก อาจต้องใช้การวิเคราะห์ในระดับโมเลกุลร่วมด้วย (Recek และคณะ, 2002) โดยวิธีการดังกล่าวนี้จะเป็นการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA, rRNA) เนื่องจากเป็นบริเวณที่ลำดับเบสมีความอนุรักษ์สูง (conserve region) ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสตามกาลเวลา (Nishimura และ Mikata, 2000) ตัวอย่างเช่น การจัดจำแนกยีสต์ชนิดหนึ่งโดยศึกษาจากลักษณะของแอสโคสปอร์ Kurtzman และ Robnett (1994) พบว่าแอสโคสปอร์ของยีสต์ชนิดนี้จะมีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วแดง จึงจัดให้อยู่ในกลุ่ม *Wingea* แต่เมื่อวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วนของไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ ยีสต์ในกลุ่มนี้จะถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มเดียวกันกับ *Debaryomyces*



รูปที่ 5 ลักษณะของแอสโคสปอร์; a) แอสโคสปอร์ของ *S. cerevisiae*, b) แอสโคสปอร์ของ *Ascobolus stercorarius* จะประกอบด้วยแอสโคสปอร์จำนวน 8 แอสโคสปอร์ต่อ 1 ถุงแอสคัส และ c) แอสโคสปอร์ของ *Sch. octosporus* (www, 2005)

ในปัจจุบันการจัดจำแนกยีสต์ในระดับโมเลกุลนิยมใช้การวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน 18S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (18S rDNA) (James และคณะ, 1994; Cai และคณะ, 1996; James และคณะ, 1997) อินเทอร์นอล ทรานสไครบ์สเปซเซอร์ ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (internal transcribed spacer rDNA, ITS rDNA) (James และคณะ, 1996) และ 26S ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (26S rDNA) (Kurtzman และ Robnett, 1995 และ 1998)

3. สารพิษจากยีสต์นักฆ่า (Yeast killer toxin)

สารพิษจากยีสต์นักฆ่าเป็นสารในกลุ่มของโปรตีน โดยจะมีฤทธิ์ในการฆ่ายีสต์อื่นๆ ที่ไม่สามารถทนต่อสารพิษได้ การออกฤทธิ์ของสารพิษนี้มีความคล้ายคลึงกับแบคทีริโอซินซึ่งผลิตจากแบคทีเรีย (Lowes และคณะ, 2000)

หากแบ่งกลุ่มยีสต์ตามความสามารถในการสร้างสารพิษ (toxin) จะแบ่งได้ 3 กลุ่ม (Ribéreau-Gayon และคณะ, 2000) ดังนี้

1) ยีสต์นักฆ่า (killer strain, K) ยีสต์สายพันธุ์นี้สามารถสร้างสารพิษเพื่อฆ่ายีสต์อื่นที่ไม่สามารถทนต่อสารพิษนี้ได้ แต่ยีสต์นักฆ่านี้อาจถูกฆ่าได้โดยสารพิษที่ผลิตจากยีสต์นักฆ่าสายพันธุ์อื่นได้
2) ยีสต์สายพันธุ์อ่อนแอ (sensitive strain, S) ยีสต์ในกลุ่มนี้ไม่สามารถทนต่อสารพิษที่ผลิตจากยีสต์นักฆ่าได้
3) ยีสต์สายพันธุ์ที่เป็นกลาง (neutral strain, N) ยีสต์ในกลุ่มนี้จะไม่สร้างสารพิษที่จะฆ่ายีสต์อื่นๆ แต่จะทนต่อสารพิษที่ผลิตจากยีสต์นักฆ่าได้

ในปัจจุบันพบยีสต์ที่สามารถผลิตสารพิษกว่า 80 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 4 (Wickner, 1985; Bruenn, 1986; Young และ Yagiu, 1987)

ตารางที่ 4 ยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษ

สายพันธุ์ยีสต์	อ้างอิง	สายพันธุ์ยีสต์	อ้างอิง
Candida albicans	Rogers และ Bevan (1978)	*C. dattila*	Choi และคณะ (1990)
C. glabrata	Sriprakash และ Batum (1984)	*C. guilliermondii*	Polonelli และคณะ (1987)
C. holmii	Nagornaya และคณะ (1989)	*C. krusei*	Lehmann และคณะ (1987a)
C. maltosa	Polonelli และคณะ (1987)	*C. neodendra*	Suzuki และคณะ (1989)
C. parapsilosis	Zekhnov และคณะ (1989)	*C. pseudotropicalis*	Polonelli และคณะ (1987)
C. sonorensis	Starmer และคณะ (1987)	*C. valida*	Yokomori และคณะ (1988)
C. versatilis	Vaughan-Martini และคณะ (1988)	*Cryptococcus albidus*	Young และ Yagiu (1978)
Cryp. Laurentii	Vaughan-Martini และคณะ (1988)	*Cryp. podzolicu*	Starmer และคณะ. (1987)
Cystofilobasidium bisporidii	Golubev และ Kuznetsova (1989)	*Debaryomyces carsonii*	Golubev (1991) Golubev (1990)
D. polymorphus	Polonelli และคณะ (1987)	*D. vanrijiae*	Vaughan-Martini และคณะ (1988)

ตารางที่ 4 ยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษ(ต่อ)

สายพันธุ์ยีสต์	อ้างอิง	สายพันธุ์ยีสต์	อ้างอิง
Filobasidium capsuligenum	Zekhnov และคณะ (1989) Golubev และ Kuznetsova (1991) Rosini และ Cantini (1987)	*Hanseniaspora uvarum*	Radler และคณะ (1990)
Kluyveromyces aestuarii	Vaughan-Martini และ Rosini (1989)	*K. japonica*	Starmer และคณะ (1987)
Kluy. lactis	Stark และคณะ (1990)	*Kluy. dobzhanskii*	Vaughan-Martini และ Rosini (1989)
Kluy. marxianus	Lehmann และคณะ (1987b)	*Kluy. Lodderae*	Vaughan-Martini และ Rosini (1989)
Kluy. phaffii	Vaughan-Martini และ Rosini (1989)	*Pichia acaciae*	Worsham และ Bolen (1990)
Kluy. wikenii	Rosini และ Cantini (1987)	*Kluy. wickerhamii*	Vaughan-Martini และ Rosini (1989)
P. amethionina	Starmer และคณะ (1987)	*Metschnikowia pulcherrima*	Vustin และคณะ (1990)
P. antillensis	Starmer และคณะ (1987)	*P. anomala*	Sawant และคณะ (1989)
P. cactophila	Starmer และคณะ (1987)	*P. bimundalis*	Polonelli และคณะ (1987)
P. canadensis	Lehmann และคณะ (1987a)	*P. cactophila*	Starmer และคณะ (1987)
P. fabianii	Polonelli และคณะ (1987)	*P. ciferrii*	Nomoto และคณะ (1984)
P. holstii	Polonelli และคณะ (1987)	*P. guilliermondii*	Zekhnov และคณะ (1989)
P. jadinii	Vaughan-Martini และคณะ (1988)	*P. inositovora*	Hayman และ Bolen (1990)
P. kluyveri	Zorg และคณะ (1988)	*P. farinosa*	Suzuki และ Nikkuni (1989)
P. mexicana	Starmer และคณะ (1987)	*P. membranifaciens*	Golubev และ Blagodaskaya (1993)
P. ohmeri	Zekhnov และคณะ (1989)	*P. minuta* var. *nonfermentans*	Polonelli และคณะ (1987)
		P. opuntiae	Starmer และคณะ (1987)

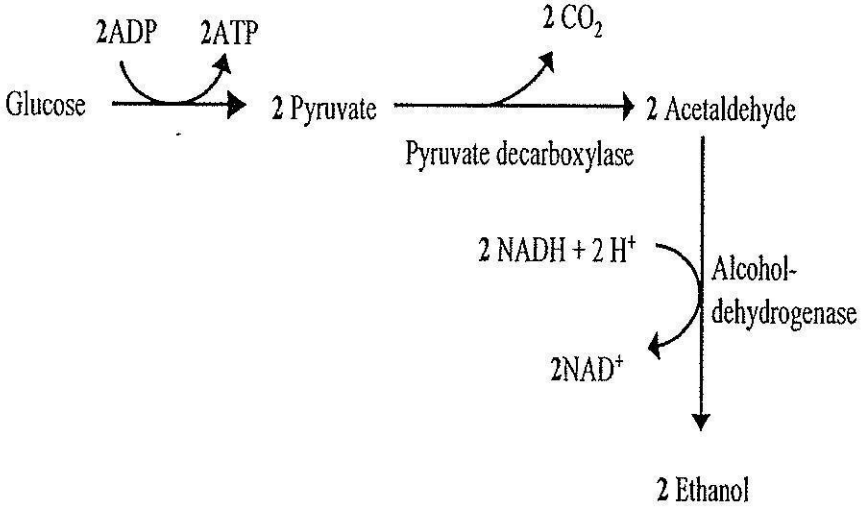
ตารางที่ 4 ยีสต์สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างสารพิษ(ต่อ)

สายพันธุ์ยีสต์	อ้างอิง	สายพันธุ์ยีสต์	อ้างอิง
P. petersonii	Nomoto และคณะ (1984)	*P. pini*	Zekhnov และคณะ (1989)
P. quercuum	Zekhnov และคณะ (1989)	*P. spartinae*	Polonelli และคณะ (1987)
P: thermotolerans	Ganter และ Starmer (1992)	*Rhodotorula fujisanensis*	Golubev (1992a)
R. glutinis	Golubev (1989)	*R. mucilaginosa*	Golubev และ Churkina (1990)
R. pallida	Golubev (1992b)	*Saccharomyces cerevisiae*	Bussey และคณะ (1990)
S. paradoxus	Naumov (1985)	*S. unisporus*	Nagornaya และคณะ (1989)
Sporidiobolus johnsonii	Golubev และ Tsiomenko (1985)	*Spor. pararoseus*	Golubev และคณะ (1988)
Trichosporon capitatum	Morace และคณะ (1983/84)	*Williopsis californica*	Vustin และคณะ (1988a)
W. pratensis	Vustin และคณะ (1988b)	*W. saturnus*	Ohta และคณะ (1984)
W. beijerinckii	Vustin และคณะ (1988a)	*W. saturnus* var. *mrakii*	Yamamoto และคณะ (1988)
W. saturnus var. *sagentensis*	Lehmann และคณะ (1987b)	*W. saturnus* var. *Subsufficiens*	Vustin และคณะ (1988a)

4. กระบวนการผลิตเอทานอล

ยีสต์มีความสามารถในการหมักน้ำตาลเพื่อให้ได้เป็นเอทานอลซึ่งนับว่ามีความสำคัญมากในอุตสาหกรรม ยีสต์ที่นิยมใช้ในการหมักน้ำตาล ได้แก่ *S. cerevisiae*, *S. uvarum* (*carlsbergensis*), *Sch. pombe*, และ *Kluyveromyces* sp. ยีสต์สามารถย่อยสลายกลูโคสให้เป็นเอทานอลโดยผ่านทางวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) แสดงได้จากรูปที่ 6 ปฏิกิริยารวมจากการย่อยสลายกลูโคส 1 โมเลกุลจะได้ผลผลิตเป็นเอทานอล, คาร์บอนไดออกไซด์ และ พลังงานในรูป ATP อย่างละ 2 โมเลกุล ในทางทฤษฎีแล้วการหมักกลูโคส 1 กรัมจะได้เอทานอลประมาณ 51% โดยปริมาตร แต่ในทางปฏิบัติมักจะได้เอทานอลไม่เกิน 90-95% เมื่อเทียบกับค่าที่คำนวณได้จากทฤษฎี แสดงว่าในการกระบวนการหมักจะต้องมีการเติมสารอาหารบางอย่างเพื่อส่งเสริมกระบวนการหมักของยีสต์ ในปี 2001 Roehr รายงานว่า

ผลผลิตข้างเคียงจากวิถีไกลโคไลซิสมักเป็นกลีเซอรอลซึ่งจะใช้สารตั้งต้นในปริมาณ 4-5% ถ้าสามารถกำจัดปฏิกิริยานี้ออกไปจะทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นถึง 2.7% โดยปริมาตร



รูปที่ 6 การย่อยสลายกลูโคสโดยวิถีไกลโคไลซิสได้ผลผลิตเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์

4.1 ยีสต์ทนร้อนกับการผลิตเอทานอล

ในปัจจุบันการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ทนร้อนมีการศึกษากันไม่แพร่หลายมากนัก ยีสต์ทนร้อนสามารถเจริญและเกิดกระบวนการหมักได้ในช่วงฤดูร้อนและประเทศเขตร้อน (Ueno และคณะ, 2001) จึงช่วยลดค่าใช้จ่ายในการควบคุมอุณหภูมิการหมักและการกลั่นลงได้ อย่างไรก็ตามในประเทศเขตร้อนมักจะใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้กันในอุตสาหกรรมการหมัก ซึ่งยีสต์กลุ่มนี้จะไม่มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงได้ Anderson และคณะ (1986) รายงานว่า เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นในช่วงฤดูร้อนประกอบกับความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักจะยับยั้งยีสต์ไม่ให้เกิดกระบวนการหมักได้ โดยปกติแล้วยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeasts) จะสามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 28 ถึง 38 องศาเซลเซียส ดังนั้นในระหว่างที่เกิดกระบวนการหมักจึงมักควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 30 ถึง 35 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามยีสต์ที่มีความสามารถที่จะเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสยังมีรายงานไม่มากนัก Sree และคณะ (1999) พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น เอทานอลจะลดลงอย่างมากเนื่องจากเกิดการยับยั้งกระบวนการหมัก แต่จากการศึกษาของ Anderson และคณะ (1986) และ Ueno และคณะ (2003) ศึกษาพบว่ายีสต์ทนร้อนสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่า 6% ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 ผลกระทบของเอทานอลต่อกระบวนการหมักของยีสต์

ข้อจำกัดหนึ่งของการผลิตเอทานอลคือ ความสามารถของยีสต์ในการทนต่อปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นจากกระบวนการหมัก เนื่องจากเอทานอลจะยับยั้งกระบวนการหมักซึ่งจะทำให้ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ในปริมาณไม่มากนัก ความสามารถในการผลิตเอทานอลจะแปรผันไปตามสายพันธุ์ของยีสต์ โดยยีสต์จะสามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดถึง 20% โดยปริมาตร ในปี 1980 Navarro ศึกษาความสามารถในการทนต่อเอทานอลที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ยีสต์ พบว่าเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อัตราการผลิตเอทานอลจะเร็วกว่าการขับเอทานอลจากในเซลล์ออกมาภายนอก ซึ่งสอดคล้องกับ Navarro และ Durand (1978) ในการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการสะสมเอทานอลภายในเซลล์ของ *S. uvarum* โดยพบว่า การเจริญของยีสต์นี้จะหยุดพักเมื่อความเข้มข้นภายในเซลล์มีปริมาณมากขึ้น ซึ่งการสะสมเอทานอลดังกล่าวนี้จะสัมพันธ์กับอุณหภูมิที่เพิ่งสูงขึ้น

เอทานอลจะมีความสามารถในการทำลายหรือเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งการทนต่อเอทานอลจะขึ้นอยู่กับปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวและชนิดของกรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (Wayman และ Rarekh, 1990)

5. ผลกระทบจากสารอาหารและค่าความเป็นกรดด่าง ในการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน

5.1 สารอาหาร

ยีสต์เจริญได้ในอาหารที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต เพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและสร้างส่วนประกอบต่างๆ ของเซลล์ที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ส่วนไนโตรเจนจะใช้สำหรับการสังเคราะห์โปรตีน นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุและปัจจัยการเจริญบางชนิดซึ่งต้องการในปริมาณน้อย โดยส่วนใหญ่แล้วกิจกรรมในการย่อยสลายสารต่างๆ เพื่อให้ยีสต์ใช้ในการเจริญนั้น อุณหภูมิจะมีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากเมื่ออุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) อัตราการเจริญและปริมาณออกซิเจนจะลดลง ทำให้องค์ประกอบต่างๆ ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป Slapack และคณะ (1987) และ Thomas และคณะ (2002) รายงานว่าในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด ยีสต์จะต้องการสารอาหารเสริมเพื่อใช้ในการเจริญ ซึ่งการเพิ่มอุณหภูมิไม่ได้มีผลในการยับยั้งการรับสารอาหารแต่กลับมีผลกับระดับของเอนไซม์ต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญ

Helena da Cruz และคณะ (2003) รายงานว่าไนโตรเจนและคาร์บอนเป็นสารอาหารหลักที่ใช้ในการหมักซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลายสารต่างๆ ของยีสต์ หากมีการเติมสารอาหารเสริมในกลุ่มสารประกอบไนโตรเจน เช่น เปปโตน (peptone) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลมอลโตสหรือกลูโคสจะช่วยให้ปริมาณเซลล์และการผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้น ในยีสต์ *S.*

diastaticus หากมีการเพิ่มสารอาหารเป็นสองเท่า ยีสต์จะผลิตเอทานอลได้ถึง 9.1% โดยน้ำหนัก (Amore และคณะ, 2002)

หากทำการเพิ่มอุณหภูมิการหมักจาก 40 องศาเซลเซียสไปเป็น 45 องศาเซลเซียส จะทำให้อัตราการใช้กลูโคสและการผลิตเอทานอลลดลง ยีสต์หลายสายพันธุ์เจริญได้ดีเมื่อมีกรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการวิตามินบางชนิดเช่น ไบโอติน (biotin), ไทอามีน (thiamine), ไพริดอกซีน (pyridoxine), แคลเซียม แพนโทธีเนท (calcium pantothenate) และ อิโนซิทอล (inositol) เพื่อส่งเสริมให้เกิดอัตราการเจริญและอัตราการหมักสูงสุด (Wayman และ Parekh, 1990) นอกจากนี้การเติมแมกนีเซียมลงในอาหารหมักจะช่วยส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ในวิถีไกลโคไลซิส ซึ่งจะทำได้ปริมาณเซลล์เพิ่มและเอทานอลเพิ่มมากขึ้นอีกด้วย (Amore และคณะ, 2002)

5.2 ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)

ปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (ค่าความเป็นกรดด่าง, pH) มีบทบาทสำคัญในการควบคุมปริมาณแบคทีเรียปนเปื้อนในอุตสหกรรมการหมัก การเจริญของยีสต์ อัตราการการหมัก และการสร้างผลผลิตข้างเคียง (by product) โดยส่วนใหญ่แล้วที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 ถึง 4.7 จะเป็นช่วงที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล แต่ถ้าค่าความเป็นกรดด่าง สูงขึ้นยีสต์จะผลิตกลีเซอรอลและกรดอินทรีย์แทนที่จะเป็นเอทานอล (Wayman และ Parekh, 1990)

ในอาหารหมักที่มีค่าความเป็นกรดด่าง ประมาณ 3.0 ค่าความเป็นกรดด่าง ภายในเซลล์ *S. cerevisiae* จะอยู่ในช่วง 5.5 ถึง 5.7 หรือในอาหารหมักที่มีค่าความเป็นกรดด่าง อยู่ในช่วง 6.0 ถึง 10.0 ค่าความเป็นกรดด่าง ภายในเซลล์จะอยู่ในช่วง 5.9 ถึง 6.75 ดังนั้นหากความแตกต่างระหว่างค่าความเป็นกรดด่าง ภายในเซลล์กับภายนอกเซลล์มีค่ามากจะทำให้เซลล์เกิดความเครียดเนื่องจากยีสต์จะต้องทำให้ค่าความเป็นกรดด่าง ภายในเซลล์มีค่าพอเหมาะเพื่อที่ให้เซลล์ดำรงชีวิตอยู่ได้ นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดด่าง ยังมีบทบาทในการย่อยสลายกลูโคสเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลอีกด้วย โดย Thomas และคณะ (2002) รายงานว่า การย่อยสลายกลูโคสจะมีค่ามากที่สุดที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 และไม่จำเป็นต้องเติมสารอาหารเสริมใดๆ ลงในอาหารหมัก

Win และคณะ (1996) ได้ศึกษาค่าจนลพลศาสตร์ของการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ในถังหมักชนิด batch พบว่าการเลี้ยงด้วยน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากย่อยแป้งมันสำปะหลังจะได้เซลล์มากกว่าการเลี้ยงด้วยกากน้ำตาลถึง 20% และเมื่อหมักแบบ fed-batch พบว่าน้ำตาลกลูโคสยังได้ yield ของเซลล์สูงกว่าและวิธีนี้ก็ได้ yield สูงกว่าการเลี้ยงแบบ batch เช่นกัน อย่างไรก็ตามคณะของ Win ศึกษาเฉพาะการผลิตเซลล์ไม่ได้ศึกษาการผลิตแอลกอฮอล์ Shimoda และคณะ (1997) ได้ศึกษาการทำก้อน

แป้งหัวเชื้อ koji เพื่อผลิตสาเกชนิด *Shochu* ในสภาวะที่มีกรดซิตริก (citric acid) พบว่ากรดซิตริกที่ความเข้มข้น 0.25%จะสามารถเร่งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus kawachii* และทำให้กระบวนการผลิตสาเกเร็วมากยิ่งขึ้น นอกจากการใช้กากน้ำตาลและธัญญาพืชแล้ว การใช้มันฝรั่งนึ่งก็สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 0.28 กรัมแอลกอฮอล์/กรัมแป้ง ในถังหมักโดยใช้เชื้อ *Aspergillus awamori* (Kobayashi et al., 1998) อย่างไรก็ตามการใช้มันฝรั่งเป็นสารตั้งต้นมักมีลิกนินปะปนมาจึงทำให้เกิดเมธานอลบ้างเล็กน้อย นอกจากการใช้เชื้อรากลุ่ม *Aspergillus* spp. แล้ว Rosenblitt และคณะ (2000) ได้ใช้เชื้อรา *Monascus purpureus* ที่สามารถผลิตสีแดงได้มาหมักข้าวแบบ solid substrate เพื่อศึกษาหาความสมดุลและวิเคราะห์ของการใช้คาร์โบไฮเดรตและออกซิเจนในการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์

ด้วยคุณสมบัติของยีสต์ทั่วไปที่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ 25-30°ซ จึงมีนักวิทยาศาสตร์ที่พยายามคัดแยกเชื้อยีสต์ชนิดทนร้อน Szczodrak และ Targonski (1988) ได้ทำการแยกยีสต์ได้ 58 สายพันธุ์ ประกอบด้วย 12 genera ที่สามารถเจริญได้ในอุณหภูมิสูงกว่า 40°ซ และพบว่า *Kluyveromyces* สามารถเจริญได้ที่ 46°ซ สามารถหมักให้เอทานอลได้โดยใช้แป้งแต่ปริมาณเอทานอลที่ได้ต่ำมาก ไม่เหมาะสำหรับเชิงพาณิชย์ ต่อมา Kadar และคณะ (2004) ได้นำเชื้อยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* มาทดลองใหม่กับขยะจากโรงงานกระดาษ เพื่อใช้ย่อยแป้งให้เป็นเอทานอล พบว่าให้ yield เอทานอลเพิ่มเป็น 0.31-0.34 กรัมต่อกรัม และผลิตเอทานอลได้เพียง 1.2-1.8% (w/v) ที่อุณหภูมิ 40°ซ ซึ่งยังให้ปริมาณเอทานอลน้อยมาก

D'Amore และคณะ (1989) ได้แยกพบเชื้อยีสต์ *Saccaromyces diastaticus* ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 40°ซ สามารถให้เอทานอลถึง 6.4% เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส 15% ให้เอทานอลสูงสุดที่ 7.0% เมื่อเพิ่มน้ำตาลเป็น 20% ที่อุณหภูมิ 40°ซ ต่อมา Peres และ Laluce (1998) ได้ทดสอบความสามารถในการทนต่อเอทานอลโดยเลี้ยงเซลล์ยีสต์ที่อ้างว่าทนร้อน (แต่ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 30°ซ) ในอาหารที่มีน้ำตาลซูโคสและเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ พบว่ายีสต์ที่แยกที่นั้นสามารถทนเอทานอลได้สูงถึง 16.5-20.3% เมื่อมีการเติมเอทานอลเริ่มต้นไป 8% ในขณะที่นักวิจัยของประเทศอินเดียสามารถแยกเชื้อยีสต์จากดินบริเวณโรงไฟฟ้าของประเทศและระบุว่าเป็น *S. cerevisiae* (แต่ไม่มีผลการทดลองการใช้น้ำตาลและลักษณะทางพันธุกรรมประกอบ) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 44°ซ และให้เอทานอลสูงถึง 6.0-7.5% Sree และคณะ (2000)

ในปี 2002-2003 Ueno และคณะ สามารถแยกเชื้อยีสต์ที่สามารถทนต่อความร้อนได้ 8 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้ 3 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42-45°ซ และมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ 35-37°ซ และทนอุณหภูมิสูงสุดที่ 48-50°ซ และมีค่า productivity ของการผลิตเอทานอลประมาณ 72.1% ต่อ 24 ชั่วโมง (Ueno et. al., 2001) ต่อมาได้ทดสอบหาค่าจลพลศาสตร์พบว่าสามารถให้เอทานอล 6.6%

(w/v) ที่ 40°ซ และมีค่าอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด (maximum rate of ethanol production) เท่ากับ 9.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้วิเคราะห์ลักษณะทางพันธุกรรมโดยใช้ small subunit (SSU) rDNA และ 18s rRNA แล้วทำ phylogenetic analysis พบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ RND13 มีลักษณะอยู่ระหว่าง *Candida glabrata* และ *Kluveromyces delphensis* และสายพันธุ์ RND14 เป็น *Pichia fermentans* ซึ่งมีความใกล้ชิดกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* นอกจากนั้นนักวิจัยกลุ่มนี้ยังได้ทดสอบการหมักในอาหารที่มีกากน้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานหลักซึ่งให้เอทานอลที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละสายพันธุ์

นอกจากคุณสมบัติในการผลิตแอลกอฮอล์ของยีสต์แล้ว ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมที่ดีควรต้องมียีนควบคุมการสร้าง killer toxin เพื่อใช้ทำลายเซลล์อื่นๆที่อาจปนเปื้อนในการกระบวนการผลิต killer toxin ในยีสต์สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภทตามลักษณะ (Magliani et. al., 1997) คือ

1) dsRNA ที่อัดแน่นคล้านไวรัส พบมากในยีสต์ *S. cerevisiae, Hansniaspora uvarum, Zygosaccharomyces bailii* และ *Phaffia rhodozyma* ยีสต์เหล่านี้สามารถผลิตพิษในรูปของโปรตีนคู่ (dimmer) ขนาด 11-22 kDa ที่มีฤทธิ์ทำลาย glucan และระบบการลำเรียงอิออนที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียหรือยีสต์ด้วยกันได้ พิษเหล่านี้ ได้แก่ K1, K2, K28 เป็นต้น

2) พลาสมิด (plasmids) พบมากในยีสต์ *Kluyveromyces lactis, Pichia* sp. ยีสต์เหล่านี้สามารถผลิตพิษในรูปของโปรตีนขนาดใหญ่ 100-200 kDa ที่มีฤทธิ์ทำลาย chitin ที่ผนังเซลล์ของยีสต์ด้วยกันได้ พลาสมิดเหล่านี้ ได้แก่ pKL1, L2, pPin1 เป็นต้น

3) ยีนนิวเคลียร์ (nuclear genes) พบบนโครโมโซมของยีสต์ทั่วๆไป เช่น *S. cerevisia*, *Pichia* sp., *Williopsis* sp. เป็นต้น สามารถผลิตพิษในรูปของโปรตีนเดี่ยวๆหรือคู่ ขนาด 10-80 kDa ที่มีฤทธิ์ทำลายผนังเซลล์ของยีสต์หรือแบคทีเรียอย่างหลากหลาย ยีนเหล่านี้ได้แก่ KHR, KHS, SMK1 เป็นต้น

ด้านงานวิจัยเกี่ยวกับการปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตด้วยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม เริ่มมีมากขึ้นเรื่อยๆ อาทิเช่น Janse และ Pretorius (1995) ได้ทำการโคลนนิ่ง 3 ยีน ได้แก่ ยีน α-amylase จากเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* ยีน glucoamylase จาก *S. cerevisiae* var. *diastaticus* และยีน pullulanse จากเชื้อ *Klebsiella pneumoniae* ลงในยีสต์ *S. cerevisiae* พบว่าโคลนยีสต์ใหม่นี้สามารถใช้แป้งได้โดยตรงพร้อมกับสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ด้วย Ma และคณะ (2000) ได้ใช้โคลนยีสต์ที่มียีน glucoamylase และ isoamylase ของ *Aspergillus awamori* และ *Pseudomonas amyloderamosa* ตามลำดับ ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน alcohol dehydrogenase พบว่าโคลนยีสต์ที่ได้สามารถย่อยแป้งได้มากกว่า 95% พร้อมๆกับสามารถให้แอลกอฮอล์ด้วยยีสต์เพียงสายพันธุ์เดียว

Giordano และคณะ (2000) สามารถตรึงยีสต์ *S. cerevisiae* และเอนไซม์ glucoamylase ใน pectin และเจล alginate พบว่าสามารถหมักแป้งแล้วให้แอลกอฮอล์ได้ดีพอควร

บทที่ 3

การคัดแยกและแสดงลักษณะเฉพาะของยีสต์ทนร้อนเพื่อผลิตเอทานอล
ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF THERMOTOLERANT YEAST FOR ETHANOL PRODUCTION

3.1 วิธีการวิจัย

1 การคัดแยกยีสต์ทนร้อน

ยีสต์ทนร้อนสามารถคัดแยกได้จากหญ้าหมัก (silage) ที่ได้จากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีในเดือนมีนาคม 2548 โดยทำการคัดแยกยีสต์ทนร้อนโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract-malt extract (YM) แบบเข็ง ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 (Kreger-van Rij, 1984) และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนแล้วจึงคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ที่เกิดขึ้นเพื่อตรวจสอบลักษณะของเซลล์ยีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

2 การคัดเลือกยีสต์ทนร้อนโดยอาศัยความสามารถในการผลิตเอทานอล

จากวิธีการของ Sree และคณะ (2000) และ Ueno และคณะ (2001) การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลโดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract peptone dextrose (YPD) แบบเหลว ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 5.5 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 N ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจะบรรจุในหลอดทดลองที่ภายในมีหลอดดักก๊าซ (durham tube) หลังจากเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จึงตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลโดยสังเกตจากคาร์บอนไดออกไซด์ที่สะสมภายในหลอดดักก๊าซ แล้วหาปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้โดยวิธีแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) ผ่านคอลัมน์ PE-1 (AutoSystem XL, Perkin Elmer, U.S.A.) ปริมาณเอทานอลคำนวณจากพื้นที่ของกราฟตัวอย่างเทียบกับค่าเอทานอลมาตรฐาน

3 การทดสอบอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์

เพาะเลี้ยงยีสต์ในขวดรูปชมพู่ฝาเกลียวขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM 150 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 37, 40, 42 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นตรวจสอบค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่เพิ่มขึ้นจะแปรผันตรงกับปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เพิ่มขึ้น

4 การตรวจสอบความสามารถในการเป็นยีสต์นักฆ่า

ยีสต์นักฆ่าสามารถตรวจสอบได้โดยใช้วิธี streak-plate agar diffusion assay (Comitini และคณะ 2004) โดยทดสอบกับยีสต์สายพันธุ์อ่อนแอ *S. cerevisiae* EC 1118, แบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ละลายให้เข้ากันในอาหาร malt agar ที่ปรับค่าความเป็นกรดด่างเป็น 4.4 ด้วย ซิเตรท ฟอสเฟส บัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ จากนั้นนำยีสต์นักฆ่า *S. cerevisiae* K1-V1116 และยีสต์ทนร้อนที่ต้องการทดสอบขีดลากบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการผลิตสารพิษโดยดูจากบริเวณใส (clear zone) ซึ่งเกิดจากการสร้างสารพิษยับยั้งยีสต์สายพันธุ์อ่อนแอหรือแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบกับยีสต์นักฆ่า

5 การตรวจสอบความสามารถของยีสต์ทนร้อนในการทนเอทานอล

วิธีการทดสอบนี้ดัดแปลงจาก Osho (2005) โดยนำอาหาร YPD ปริมาตร 40 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น หลังจากนั้นเติมเอทานอล (absolute ethanol) 1 มิลลิลิตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยแปรผันความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วง 5 ถึง 25% โดยปริมาตร หลังจากเติมหัวเชื้อยีสต์ทนร้อนลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร บันทึกปริมาณเซลล์เริ่มต้น จากนั้นจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบกำหนดจึงวัดปริมาณเซลล์อีกครั้ง บันทึกปริมาณเซลล์ที่เวลาสุดท้ายเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของเอทานอลที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

6 วิธีการจัดจำแนกยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

6.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากวิธีการจัดจำแนกยีสต์โดย Kreger-van Rij (1984) และ Kurtzman และ Fell (1997) จึงศึกษาลักษณะของเซลล์ยีสต์และการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งในอาหารแข็งและอาหารเหลว

6.1.1 การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง

ศึกษาลักษณะการเจริญของยีสต์บนอาหารแข็ง YPD โดยขีดลากสารละลายของยีสต์ทนร้อนบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน บันทึกลักษณะ

ของโคโลนีที่เกิดขึ้นโดยสังเกตจากสี พื้นผิวและขอบของโคโลนี นอกจากนี้ยังศึกษาลักษณะของสปอร์และการสร้างเส้นใยเทียม ดังนี้

6.1.1.1 ลักษณะการสร้างสปอร์

การศึกษาลักษณะการสร้างสปอร์ดัดแปลงจากวิธีการของ Kurtzman และคณะ (2005) โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้ยีสต์เจริญ หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบการสร้างสปอร์ทุกๆ 1 สัปดาห์เป็นเวลา 3 สัปดาห์ การตรวจสอบสปอร์ใช้วิธีของ Kreger-van Rij (1984) โดยตรึงเซลล์ยีสต์บนสไลด์ด้วยความร้อน (heat-fixed) หยดสีย้อม carbon-fuchsine ลงบนสไลด์ แล้วนำไปอังบนไอน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ล้างสีย้อมออกด้วยกรดไฮโดรคลอริก 1% เจือจางในเอทานอลเข้มข้น 95% จากนั้นล้างด้วยน้ำประปาทันที ย้อมด้วยสี methylene blue ความเข้มข้น 1% แล้วบันทึกลักษณะสปอร์ที่เกิดขึ้น ซึ่งสังเกตได้จากการติดสีโดยสปอร์จะย้อมติดสีแดงของ carbon-fuchsine และเซลล์ยีสต์จะย้อมติดสีน้ำเงินของ methylene blue

6.1.1.2 การสร้างเส้นใยเทียม

การสร้างเส้นใยเทียมสามารถศึกษาโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อให้เจริญบนสไลด์ตามวิธีของ Kreger-van Rij (1984) เตรียมโดยวางสไลด์บนแท่งแก้วรูปตัวยู (U-shaped glass-rod) บรรจุในจานเลี้ยงเชื้อแล้วทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อนแห้งที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำสไลด์ที่ปลอดเชื้อแล้วดังกล่าวจุ่มลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD ที่หลอมเหลวทันที แล้วนำไปวางบนแท่งแก้วรูปตัวยูตามเดิม รอจนกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อบนสไลด์แข็งตัวจึงขีดลากยีสต์ทนร้อนบนผิวหน้าอาหาร แล้วปิดทับรอยขีดด้วยกระจกปิดสไลด์ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในจานเลี้ยงเชื้อเล็กน้อยเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน ตรวจสอบการสร้างเส้นใยเทียมโดยสังเกตได้จากการเจริญของยีสต์บริเวณขอบของกระจกปิดสไลด์ก่อนนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

6.1.2 การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

เพาะเลี้ยงยีสต์ทนร้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ศึกษารูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM)

6.2 การตรวจสอบทางชีวเคมี

การศึกษาในขั้นนี้สามารถตรวจสอบด้วยชุดทดสอบ API Candida strip (bioMérieux®sa, France) ซึ่งชุดทดสอบนี้ประกอบด้วยสารตั้งต้นที่ปราศจากน้ำจำนวน 10 ชนิดแบ่งเป็นการตรวจสอบได้ 12 วิธีประกอบด้วยการทดสอบความสามารถในการสร้างกรดจากน้ำตาลและการสร้างเอนไซม์ โดยปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นภายในเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สังเกตปฏิกิริยาได้จากการเกิดสี แล้ววิเคราะห์ผลที่เกิดขึ้นโดยใช้โปรแกรม APILAB Plus software (version 2.0)

6.3 การวิเคราะห์ในระดับโมเลกุล

6.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ (genomic DNA)

ขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอจากยีสต์ทนร้อนมีดังนี้

- เพาะเลี้ยงยีสต์ทนร้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD จากนั้นเก็บเซลล์โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000×g เป็นเวลา 5 นาที
- ล้างตะกอนของยีสต์ 2 ครั้งด้วยบัฟเฟอร์ TEN (TE buffer และ 0.1 M NaCl) ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000×g เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บตะกอนไว้ใช้ในขั้นต่อไป
- เติมน้ำตาลซูโคสความเข้มข้น 20% โดยปริมาตรในบัฟเฟอร์ TEN ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ตามด้วย SDS ความเข้มข้น 10% โดยน้ำหนัก ปริมาณ 100 ไมโครลิตร และ lysozyme (2.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาณ 20 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- เติม NaCl ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ปริมาณ 75 ไมโครลิตร และ phenol: chloroform: isoamyl alcohol ในอัตราส่วน 25: 24: 1 ปริมาณ 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000×g เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำสองครั้ง
- นำส่วนใสด้านบนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงซึ่งมีดีเอ็นเอของยีสต์ทนร้อนใส่ในหลอดทดลองใหม่ จากนั้นจึงตกตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้ isopropanol ที่แช่เย็นแล้ว โดยใช้ปริมาณเท่ากับส่วนใสที่เก็บได้ แล้วจึงเติม sodium acetate ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาณ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex นำไปบ่มที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- แยกดีเอ็นเอของยีสต์ทนร้อนโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,000×g เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนดีเอ็นเอโดยใช้เอทานอลความเข้มข้น 70% โดยปริมาตรทิ้ง

ไว้ให้ตะกอนดีเอ็นเอแห้งแล้วจึงละลายในบัฟเฟอร์ TE ที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ RNase ในอัตราส่วน 1:10 เก็บดีเอ็นเอที่ได้ในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

6.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR amplification)

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีสต์ทนร้อนในส่วน 18S rDNA ด้วยไพรเมอร์ NS1 (5'-GTAGTCATATGCTTGTCTC-3'), NS2 (5'-GGCTGCTGGCAC CAGACTTGC-3') และITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3'), ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3') (White และคณะ, 1990) โดยใช้ส่วนผสมคือเอนไซม์ *Taq* polymerase 2.5 U (Promega, U.S.A.), $MgCl_2$ 1.5 มิลลิโมลาร์, dNTPs 0.2 มิลลิโมลาร์และไพรเมอร์อย่างละ 500 นาโนโมลาร์

ทำปฏิกิริยาโดย DNA Thermal cycle มีสภาวะดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 initial denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

ขั้นตอนที่ 2 denaturation อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 3 annealing อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที

ขั้นตอนที่ 4 extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที

ขั้นตอนที่ 5 ทำซ้ำขั้นตอนที่ (2)-(4) เป็นจำนวน 35 รอบ

ขั้นตอนที่ 6 final extension อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ขั้นตอนที่ 7 อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส คงที่ตลอด

นำผลผลิต PCR ที่ได้แยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ agarose gel ความเข้มข้น 1% ผสมกับ ethidium bromide 2.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำชิ้นดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วไปทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ Wizard® SV Gel และ PCR Clean-Up System (Promega, USA) และวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอโดย Macrogen (Macrogen, Inc., Korea) แล้วเปรียบเทียบลำดับดีเอ็นเอที่ได้ด้วยการเปรียบเทียบจาก BLAST

6.3.3 การวิเคราะห์ลำดับดีเอ็นเอ

เมื่อได้ลำดับดีเอ็นเอแล้วจึงนำมาเปรียบเทียบกับ GenBank ด้วยโปรแกรม BLAST และ FASTA จัดกลุ่ม (alignments) ลำดับดีเอ็นเอที่ได้โดยใช้โปรแกรม MUSCEL (version 3.7) จากนั้นหาระยะทางในระดับยีนจากค่า maximum parsimony โดยวิธี bootstrap จาก PHYLIP (Felstein 1993) สร้างแผนภาพของดีเอ็นเอโดยใช้โปรแกรม TREEVIEW (Page 1996)

7 การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

7.1 แหล่งไนโตรเจน

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ M9 minimal medium (Sambrook และ Russell, 2001) ซึ่งมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 5 โดยแปรผันปริมาณและชนิดของไนโตรเจนเพื่อตรวจสอบความเหมาะสมในการเจริญของยีสต์เพื่อผลิตเอทานอล

แหล่งไนโตรเจนที่ต้องการทดสอบมี 5 ชนิด ได้แก่ sodium nitrate ($NaNO_3$), ammonium chloride (NH_4Cl), ammonium sulphate [$(NH_4)_2SO_4$], diammonium hydrogen phosphate [$(NH_4)_2HPO_4$] และ ammonium dihydrogen phosphate ($NH_4H_2PO_4$) โดยแทนที่ไนโตรเจนใน 5X M9 salts ซึ่งจะแปรผันความเข้มข้นของไนโตรเจนแต่ละชนิดตั้งแต่ 0 ถึง 25 กรัมต่อลิตร

หลังจากเติมหัวเชื้อยีสต์ทนร้อนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 minimal medium แล้ว วัดปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เวลาเริ่มต้นโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการเจริญของยีสต์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (Norrell และ Messley, 1997; Ueno และคณะ, 2001) และการผลิตเอทานอล (ดังขั้นตอนที่ 2) ทุก 6 ชั่วโมงในวันแรก จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงภายในวันที่สอง และวันสุดท้ายเก็บภายในเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบของอาหาร M9 minimal medium (Sambrook และ Russell, 2001)

ส่วนประกอบในปริมาตร 1 ลิตร	
5X M9 salts	200 มิลลิลิตร
1M $MgSO_4$	2 มิลลิลิตร
20% สารละลายกลูโคส	20 มิลลิลิตร
1M $CaCl_2$	0.1 มิลลิลิตร
5X M9 salts (ส่วนประกอบในปริมาตร 1 ลิตร)	
$Na_2HPO_4.7H_2O$	64 กรัม
KH_2PO_4	15 กรัม
NaCl	2.5 กรัม
NH_4Cl	5 กรัม

7.2 ปริมาณกลูโคส

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่นเดียวกับขั้นตอนที่ 7.1 โดยเตรียมกลูโคสที่ความเข้มข้น 0 ถึง 25% โดยปริมาตร และเติม $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ และเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการเจริญของยีสต์ การผลิตเอทานอลตามวิธีการข้างต้นหลังจากนั้นจึงเลือกความเข้มข้นของกลูโคสที่ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเพื่อใช้ในการตรวจสอบขั้นต่อไป

7.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

เลี้ยงยีสต์ทนร้อนในอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 minimal medium โดยเติมกลูโคสความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ในการตรวจสอบค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจะแปรผันค่าความเป็นกรดด่างในช่วงระหว่าง 2.0 ถึง 8.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 N (Thomas และคณะ, 2002) แล้วตรวจสอบการเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอลตามวิธีการข้างต้น และเลือกสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอลเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร

8 การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ M9 minimal medium ตามสูตรอาหารที่เหมาะสม (จากขั้นตอนที่ 7) ปริมาตร 1.5 ลิตร เติมลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์ทนร้อนที่เตรียมโดยเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD 150 มิลลิลิตร ที่บ่มในสภาวะที่มีอากาศและอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 N และโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 N โดยใช้การกวน ความเร็ว 200 rpm และควบคุมอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน ในการผลิตเอทานอลนี้แบ่งการทดลองเป็น 2 ชุดตามสภาวะการให้อากาศ

- ให้อากาศ 0.5 vvm ภายใน 24 ชั่วโมงแรก
- ให้อากาศ 0.5 vvm ตลอดระยะเวลาการหมัก

เก็บตัวอย่างตลอดระยะเวลาการหมักเพื่อวิเคราะห์การเจริญของยีสต์ การผลิตเอทานอล ค่ากรดที่ไตเตรดได้ (titrable acidity, TA) และการผลิตกรดอินทรีย์บางชนิด

ค่ากรดที่ไตเตรดได้ (titrable acidity, TA) สามารถตรวจสอบได้โดยการไตเตรดกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 N ที่ค่าพีเอช 8.2 ค่ากรดที่ได้มีหน่วยเป็น จำนวนกรัมต่อลิตรของกรดทาร์ทาริก (Ough และ Amerine, 1986) ซึ่งคำนวณค่ากรดได้จากสมการดังนี้

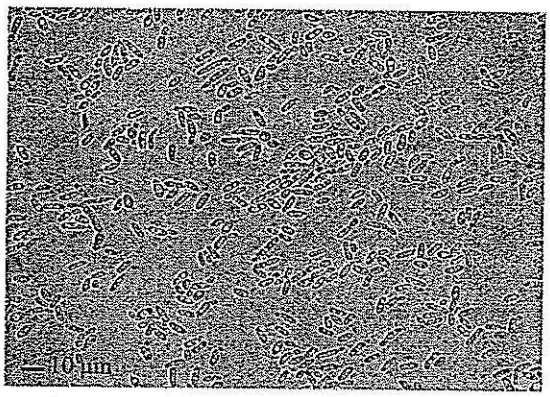
$$\text{ค่ากรดที่ไตเตรดได้} = \frac{\text{ปริมาณเบส (ml)} \times \text{ความเข้มข้นของเบส (N)} \times 0.075 \times 1000}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (ml)}}$$

การตรวจสอบการผลิตกรดอินทรีย์บางชนิด ศึกษาโดยวิธี high performance liquid chromatographic (HPLC) ผ่านคอลัมน์ Phenomenex® Rezex ROA organic acid column (300 x 7.8 nm) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ใช้ UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตรเป็นตัวตรวจจับ (detector) โดยมี H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.01 N ในการพาสารตัวอย่างให้เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (mobile phase) โดยมีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที (www, 1999)

3.2 ผลและอภิปรายผลการทดลอง

1 การคัดแยกและการคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่สามารถผลิตเอทานอลได้

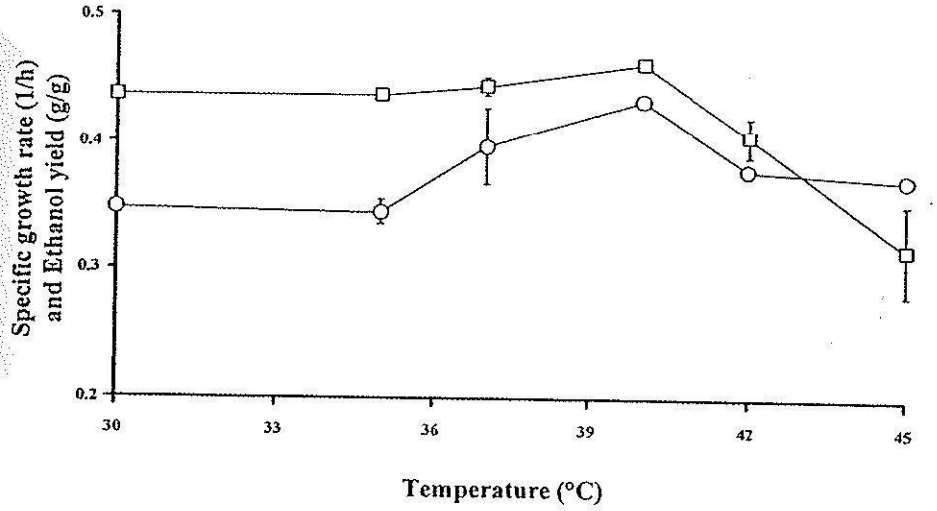
คัดแยกยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 ได้จากหญ้าหมัก เมื่อทำการศึกษาลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงได้ดังรูปที่ 7



รูปที่ 7 ลักษณะของเซลล์ยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

2 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1

การศึกษาผลของอุณหภูมิในการเจริญของยีสต์ ดังแสดงในรูปที่ 8 พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะลดอัตราการเจริญของยีสต์ แต่ในการศึกษาครั้งนี้เลือกอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากการศึกษาของ Laluce และคณะ (1987) พบว่ายีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักจะมีอัตราการเจริญลดลงเมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 33 ถึง 35 องศาเซลเซียส นอกจากนี้การหมักที่อุณหภูมิสูงยังช่วยในการประหยัดพลังงานในการทำความเย็นและลดอัตราเสี่ยงในการเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์บางชนิดอีกด้วย

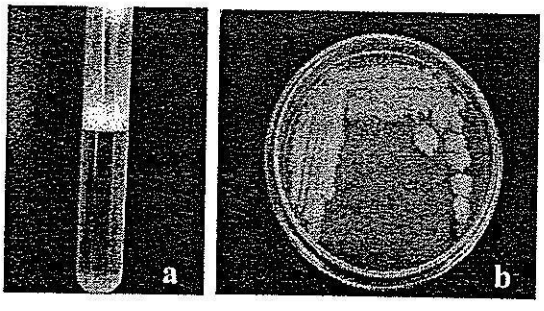


รูปที่ 8 อัตราการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM บ่มที่อุณหภูมิตั้งแต่ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน

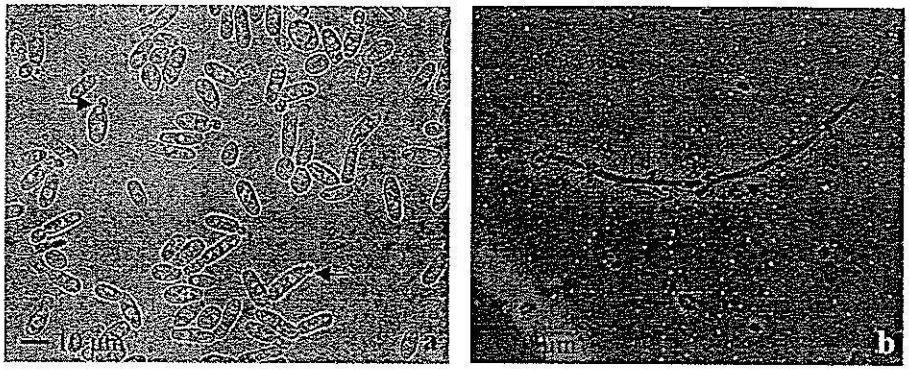
3 การจัดจำแนกยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1

3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา

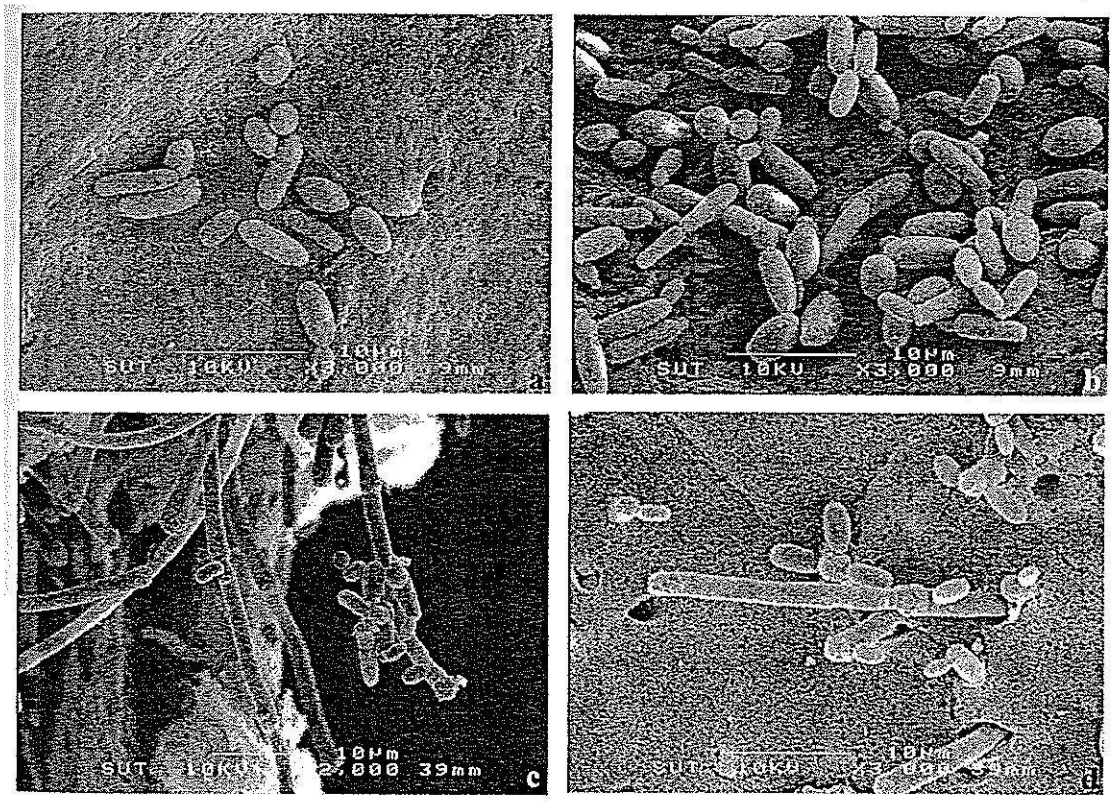
หลังจากเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารแข็งและอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันวัน พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นรูปไข่จนถึงรูปท่อนปลายมน ขนาดเซลล์ประมาณ 2.7-4.2 x 5.6-10.1 ไมโครเมตร การเรียงตัวของเซลล์ทั้งเดี่ยวและคู่ พบการแตกหน่อของเซลล์ และมีการพัฒนาของเส้นใยเทียม สำหรับลักษณะการเจริญในอาหารเหลว เป็นแผ่นแห้งและหนาสีขาวเกาะอยู่บนบริเวณผิวหน้าของอาหารเหลว การเจริญบนอาหารแข็งโคโลนีมีความหนืดคล้ายเนยเหลว และมีสีครีม นอกจากนี้ในการตรวจสอบการสร้างสปอร์ (ascospore) สามารถพบสปอร์จำนวน 1 ถึง 2 สปอร์ภายในถุงหุ้มสปอร์ (ascus) ดังแสดงในรูปที่ 9 ถึง 12



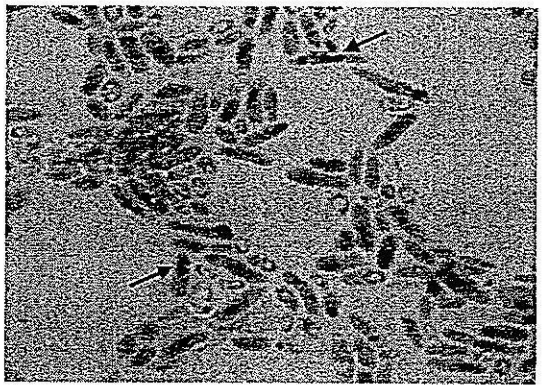
รูปที่ 9 การเจริญของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1; a) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD และ b) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน



รูปที่ 10 ลักษณะเซลล์ของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์; a) เซลล์ยีสต์ที่กำลังแตกหน่อ กำลังขยาย 1000 เท่า และ b) การสร้างเส้นใยเทียม กำลังขยาย 400 เท่า



รูปที่ 11 ลักษณะของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด; a) เซลล์ปกติ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YPD; b) เซลล์ที่กำลังแตกหน่อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD และ c), d) การสร้างเส้นใยเทียม (Scale bars = 10 ไมโครเมตร)



รูปที่ 12 ลักษณะสปอร์ของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 (ลูกศรชี้)

เมื่อศึกษาความสามารถในเมทาบอลิซึมสารต่างๆ ซึ่งทดสอบโดยชุดตรวจสอบ API Candida strip ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 6 ยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 สามารถใช้ได้เฉพาะน้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดเท่านั้น ซึ่งตรงกับคุณสมบัติของ *Candida krusei* โดยยีสต์สายพันธุ์นี้เป็น anamorphic form ของยีสต์ *Issatchenkia orientalis* เนื่องจากยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์นี้มีลำดับดีเอ็นเอเหมือนกันอย่างมีนัยสำคัญ (93-100%) (Kurtzman และคณะ, 1980) โดยปกติแล้วยีสต์ดังกล่าวสามารถคัดแยกได้ตามธรรมชาติจากแหล่งที่อยู่อาศัยของมนุษย์และสัตว์ (Kurtzman และ Fell, 1997)

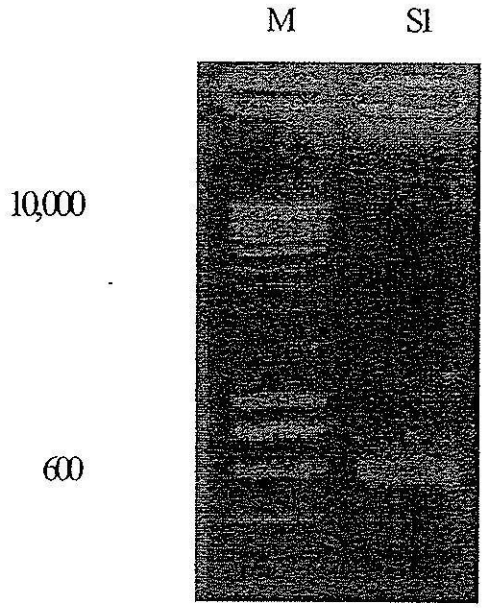
ตารางที่ 6 การทดสอบความสามารถทางชีวเคมีของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1

สารตั้งต้น	สายพันธุ์อ้างอิง (*Candida krusei*)	ยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1
การผลิตกรดจากน้ำตาล		
1. Glucose	+	+
2. Galactose	-	-
3. Saccharose	-	-
4. Trehalose	-	-
5. Raffinose	-	-
การผลิตเอนไซม์		
6. beta-Maltosidase	-	-
7. alpha-Amylase	-	-
8. beta-Xylosidase	-	-
9. beta-Glucuronidase	-	-
10. Urease	-	-
11. N-Acetyl-beta-glucosaminidase	-	-
12. beta-Galactosidase	-	-

สัญลักษณ์: +, ให้ผลบวก; -, ให้ผลลบ

3.2 การวิเคราะห์ในระดับโมเลกุล

เมื่อศึกษาลักษณะในโมเลกุลของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 โดยวิเคราะห์จาก 18S rDNA โดยการใช้ไพรเมอร์ NS1, NS2 และ ITS1, ITS4 เป็นไพรเมอร์ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในหลอดทดลอง (PCR amplification) ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่ได้มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 13



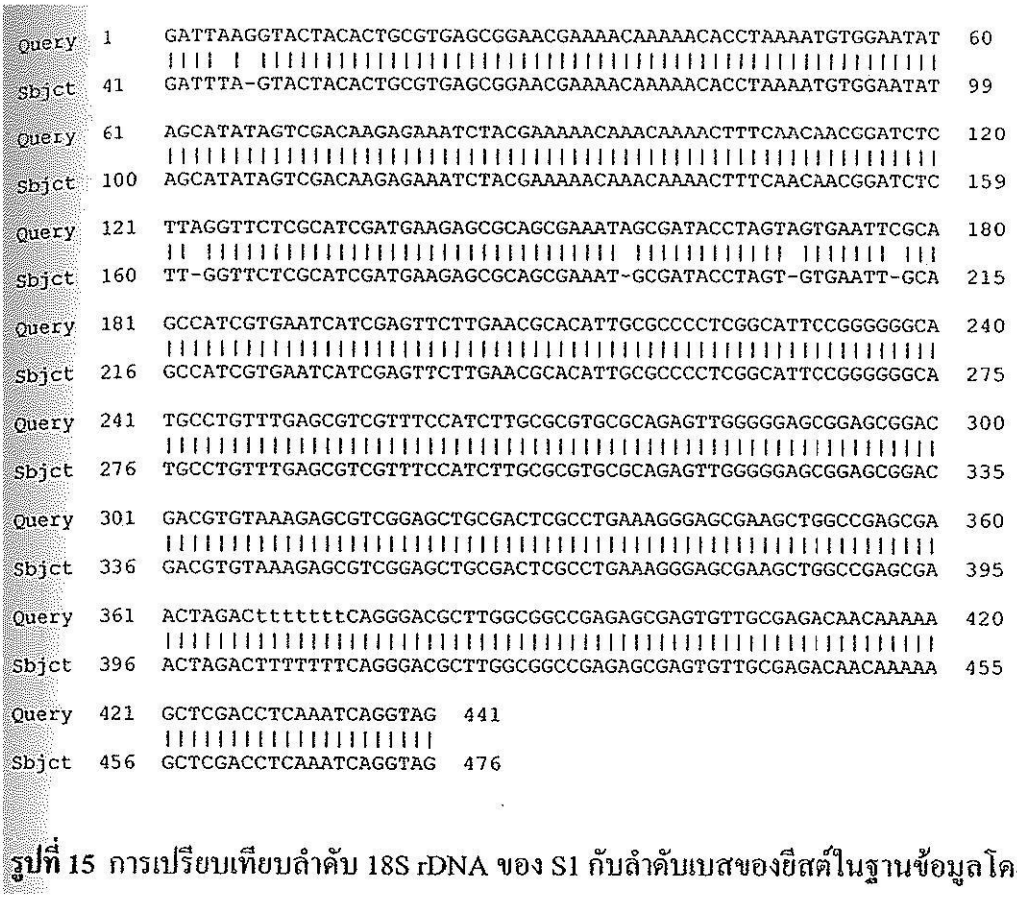
รูปที่ 13 ผลผลิต PCR ในส่วน 18S rDNA จากการแยกด้วยกระแสไฟฟ้า โดยใช้ agarose gel

3.3 การวิเคราะห์ลำดับ18S rDNA

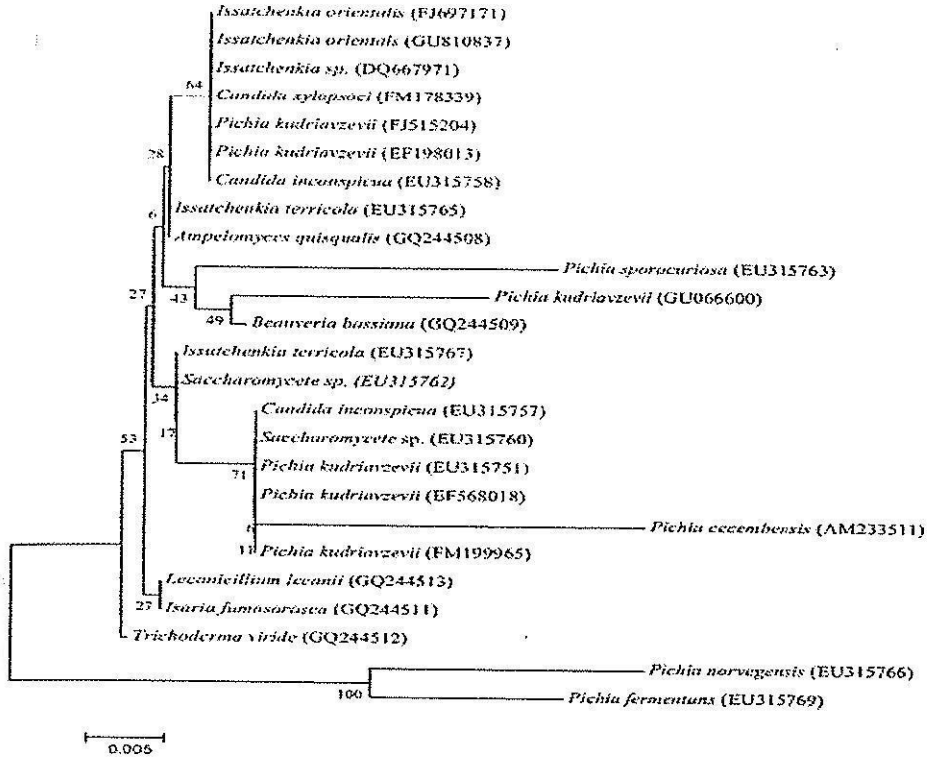
ดีเอ็นเอที่เพิ่มปริมาณเป็นเพียงบางส่วนของลำดับ 18S rDNA เท่านั้น โดยลำดับดีเอ็นเอที่ได้ (Accession Number GU810837) ดังแสดงไว้ในรูปที่ 14 และภาคผนวก เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับดีเอ็นเอของยีสต์ในฐานข้อมูล (GenBank database) พบว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 มีความคล้ายคลึงกับ *Issatchenkia orientalis* ถึง 98 % (รูปที่ 14-16)

1 gattaaggta ctacactgcg tgagcggaac gaaaacaaaa acacctaaaa tgtggaatat
61 agcatatagt cgacaagaga aatctacgaa aaacaaacaa aactttcaac aacggatctc
121 ttaggttctc gcatcgatga agagcgcagc gaaatagcga tacctagtag tgaattcgca
181 gccatcgtga atcatcgagt tcttgaacgc acattgcgcc cctcggcatt ccgggggggca
241 tgcctgtttg agcgtcgttt ccatcttgcg cgtgcgcaga gttgggggag cggagcggac
301 gacgtgtaaa gagcgtcgga gctgcgactc gcctgaaagg gagcgaagct ggccgagcga
361 actagacttt ttttcaggga cgcttggcgg ccgagagcga gtgttgcgag acaacaaaaa
421 gctcgacctc aaatcaggta g

รูปที่ 14 ลำดับบางส่วนใน 18S rDNA ของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1



รูปที่ 15 การเปรียบเทียบลำดับ 18S rDNA ของ S1 กับลำดับเบสของยีสต์ในฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Baisc Local Alignment Search Tool (BLAST, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)



รูปที่ 16 ความสัมพันธ์ในระดับโมเลกุล (phylogenetic relationship)ของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1

4 การวิเคราะห์คุณสมบัติบางประการของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1

4.1 ความสามารถในการเป็นยีสต์นักฆ่า

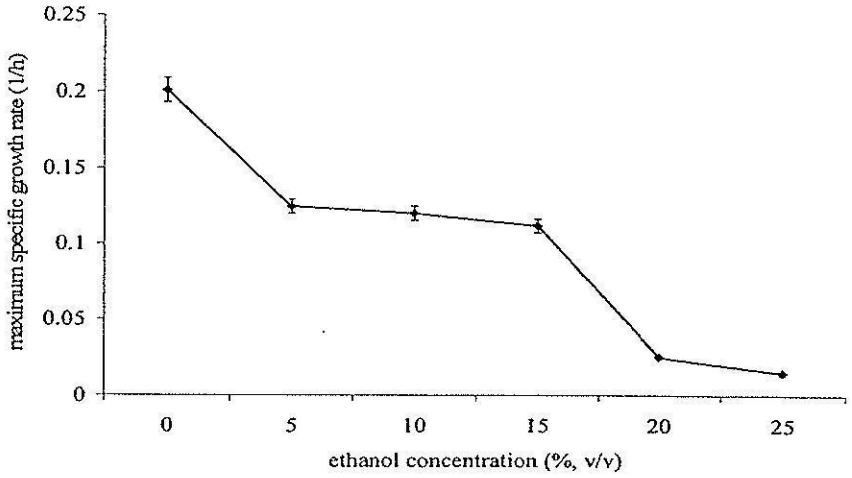
จากการทดสอบความสามารถในการผลิตสารพิษของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1 ในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* EC 1118 และแบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 โดยเปรียบเทียบกับยีสต์สายพันธุ์นักฆ่า *S. cerevisiae* K1-V1116 พบว่ายีสต์ทนร้อนดังกล่าวไม่สามารถผลิตสารพิษเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบได้ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลจากตารางที่ 6 ได้แสดงให้เห็นว่า *I. orientalis* S1 ไม่สามารถผลิตสารพิษได้

4.2 ความสามารถในการทนต่อเอทานอล

เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญสูงสุดกับการเพิ่มปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลจาก 5 ถึง 25% โดยปริมาตร โดยการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่เติมเอทานอลในอาหาร

เลี้ยงเชื้อ) ดังแสดงในรูปที่ 17 พบว่า ยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1 สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลที่ได้นำมาทดสอบ แต่อัตราการเจริญสูงสุดมีค่ามากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอลเข้มข้น 5% โดยปริมาตรและมีค่าน้อยที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเอทานอล 25% โดยปริมาตร นอกจากนี้อัตราการเจริญในช่วง 5 ถึง 15% โดยปริมาตร และ 20 ถึง 25% โดยปริมาตร มีความแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย

ซึ่งความสามารถในการทนเอทานอลของยีสต์มีผลดีในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม (Ekunsanmi และ Odunfa, 1990) นอกจากนี้การทนเอทานอลในยีสต์บางสายพันธุ์ยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก ซึ่งความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและการทนเอทานอลขึ้นอยู่กับสภาวะการดำรงชีวิตของยีสต์ในธรรมชาติ (Torija และคณะ, 2003)



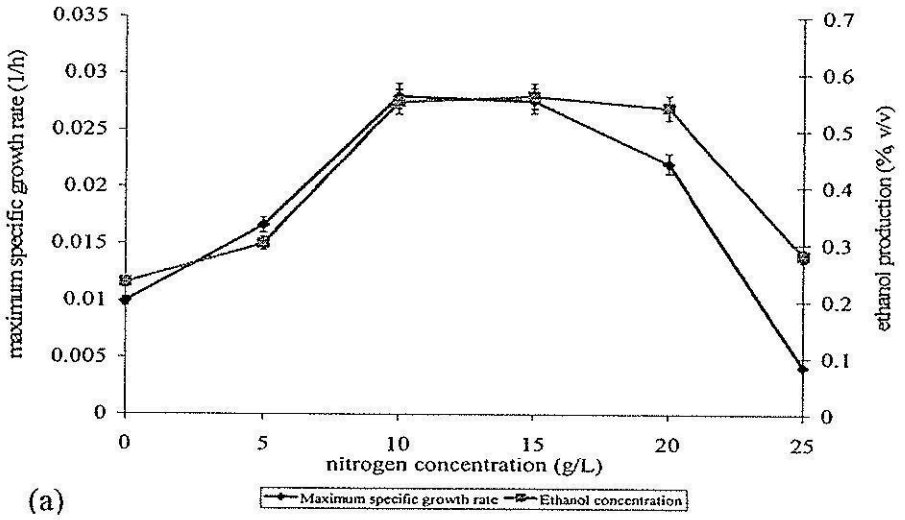
รูปที่ 17 อัตราการเจริญสูงสุดของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่มีปริมาตร เอทานอล ตั้งแต่ 0 ถึง 25% โดยปริมาตร

5 การทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

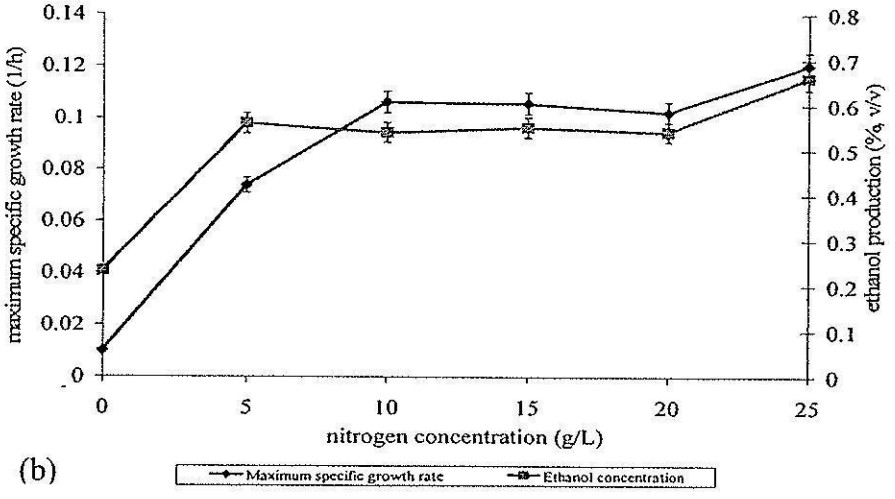
5.1 แหล่งไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่ยีสต์จำเป็นต้องใช้ในการเจริญเพื่อให้เกิดการผลิตเอทานอล ในการศึกษาครั้งนี้ มีจุดประสงค์เพื่อหาปริมาณและแหล่งไนโตรเจนที่ยีสต์สามารถใช้ในการผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณมากที่สุด แหล่งไนโตรเจนที่ใช้เป็นอนินทรีย์ไนโตรเจน (inorganic nitrogen) 5 ชนิด ได้แก่ $NaNO_3$, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$ และ $NH_4H_2PO_4$ ซึ่งมีปริมาณตั้งแต่ 0 ถึง 25

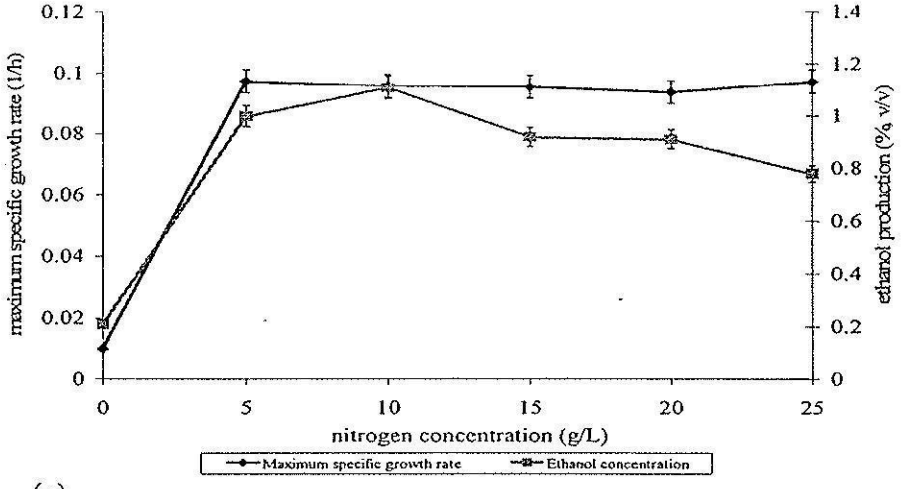
กรัมต่อลิตร จากผลการศึกษาพบว่ายีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดเมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 10 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 18 และ 19 อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญของยีสต์ไม่มีความสัมพันธ์กับการผลิตเอทานอล โดยยีสต์จะมีอัตราการเจริญมากที่สุดเมื่อใช้ $NH_4H_2PO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน และมีอัตราการเจริญลดลงเมื่อใช้ NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$ และ $NaNO_3$ ตามลำดับ



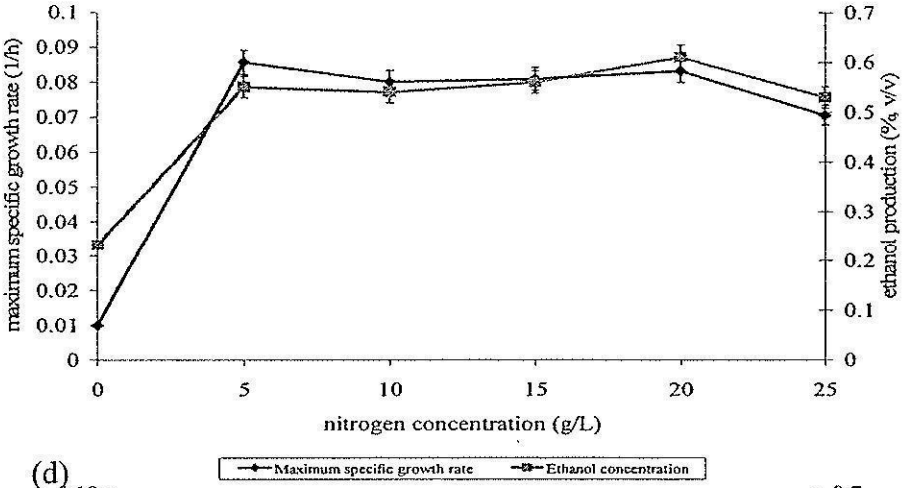
(a)



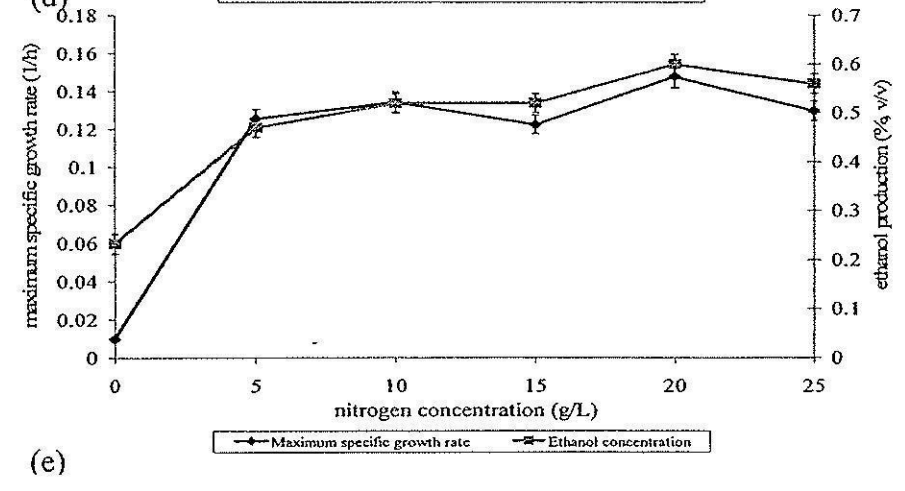
(b)



(c)

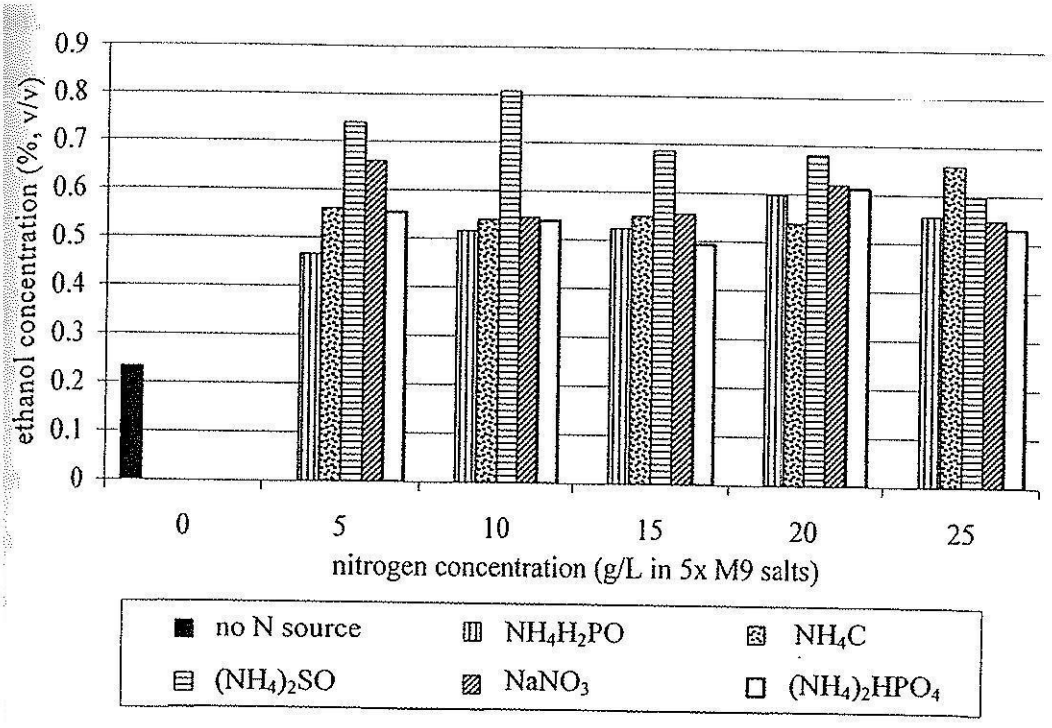


(d)



(e)

รูปที่ 18 การผลิตเอทานอลในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ โดยยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วันในอาหาร M9 minimal medium, กลูโคส 1% โดยปริมาตร หัวเชื้อเริ่มต้น 10%, pH 5.5; a) $NaNO_3$, b) NH_4Cl, c) $(NH_4)_2SO_4$, d) $(NH_4)_2HPO_4$ และ e) $NH_4H_2PO_4$



รูปที่ 19 การผลิตเอทานอลในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ เมื่อเลี้ยงให้เจริญในอาหาร M9 minimal medium , ความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 1% โดยปริมาตร, ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

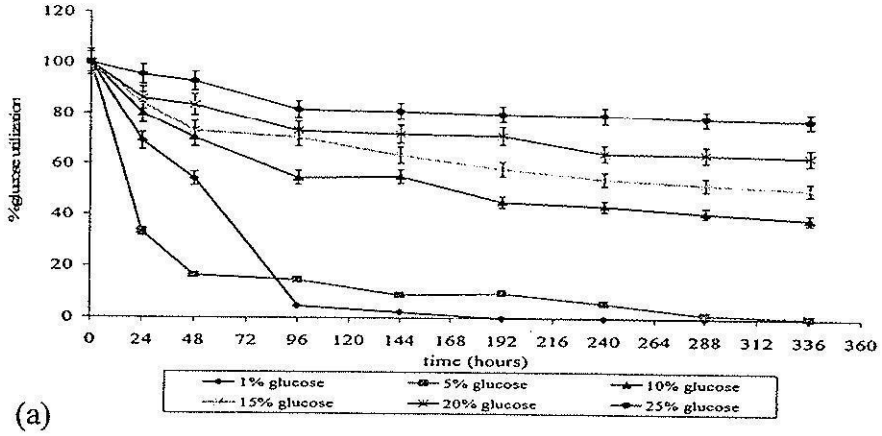
โดยปกติแล้วยีสต์สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีส่วนผสมของแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งนอกจากจะเป็นแหล่งไนโตรเจนแล้วยีสต์ยังสามารถใช้ประโยชน์จากซัลเฟอร์ได้อีกด้วย (Walker, 1998) นอกจากนี้ยีสต์บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในแหล่งอาหารที่มีไนเตรตเป็นส่วนผสม ในกรณีนี้จะพบการใช้ไนเตรตในปริมาณต่ำเนื่องจากไนเตรตมีความเป็นพิษต่อยีสต์ และจากรายงานของ Rose (1987) พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้น ต่ำกว่า 6.0 จะเกิดกรดไนตรัส (nitrous acid) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์เช่นกัน จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการใช้ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจนส่งผลให้กิจกรรมการผลิตเอทานอลลดลง ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับ Isono และ Hoshino (2000) อย่างไรก็ตามยีสต์จะเจริญได้ดีในอาหารอินทรีย์ เช่น peptone, yeast extract, wort เป็นต้น และถึงแม้ว่ายีสต์จะสามารถใช้เกลือแอมโมเนียมบางชนิดเช่น แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมฟอสเฟต และแอมโมเนียมไนเตรตได้ แต่เกลือแอมโมเนียมของกรดอินทรีย์จะมีประสิทธิภาพดีกว่าเนื่องจากเมื่อเกิดการย่อยสลายของเกลือแอมโมเนียมของกรดอินทรีย์จะทำให้เกิดกรดอ่อนซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้อีกทางหนึ่ง ส่วนการย่อยสลายของเกลือแอมโมเนียมของกรด อนินทรีย์นั้นจะทำให้

ค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ (Kocková-Kratochvílová, 1990)

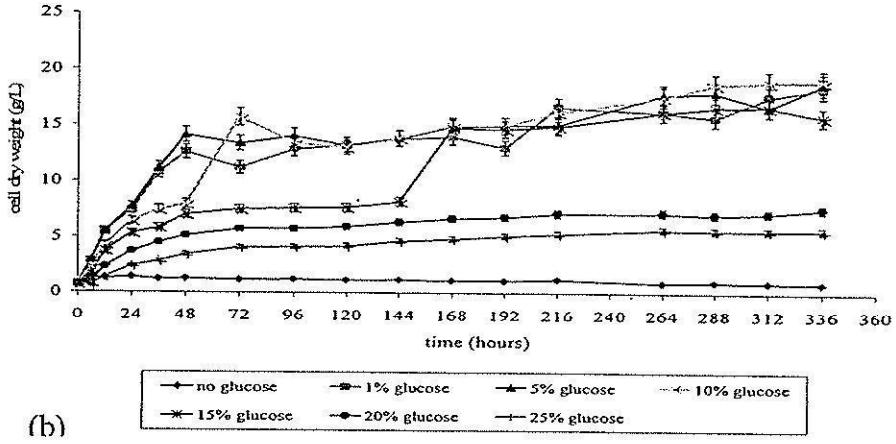
5.2 ปริมาณกลูโคส

การศึกษาปริมาณกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยการแปรผันความเข้มข้นของกลูโคสตั้งแต่ 0 ถึง 25 % โดยปริมาตร เมื่อเลี้ยงในอาหาร M9 minimal medium ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 และใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน แสดงได้ดังรูปที่ 20 และการอัตราการเจริญของยีสต์และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้แสดงดังรูปที่ 21 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งปริมาณของกลูโคสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ 5% โดยปริมาตร เนื่องจากให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด และเมื่อมีปริมาณกลูโคสมากกว่า 5% โดยปริมาตรปริมาณเอทานอลที่ได้จะลดลงซึ่งสัมพันธ์กับอัตราการเจริญของยีสต์

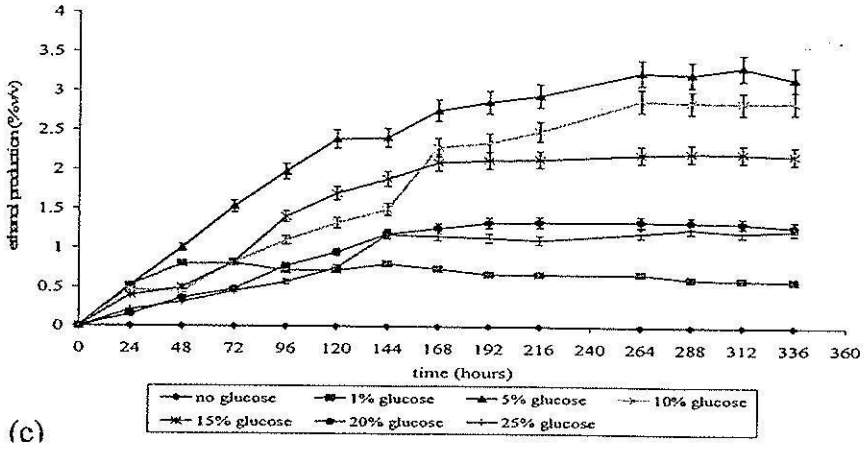
จากผลการศึกษาได้แสดงว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสเพิ่มขึ้นจะยับยั้งการผลิตเอทานอลต่อยีสต์ทนร้อน *I. orientalis* S1 ในปี 1979 Ghose และ Tyagi รายงานว่า กลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอลได้ เนื่องจากเกิดแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งในการผลิตเอทานอล



(a)

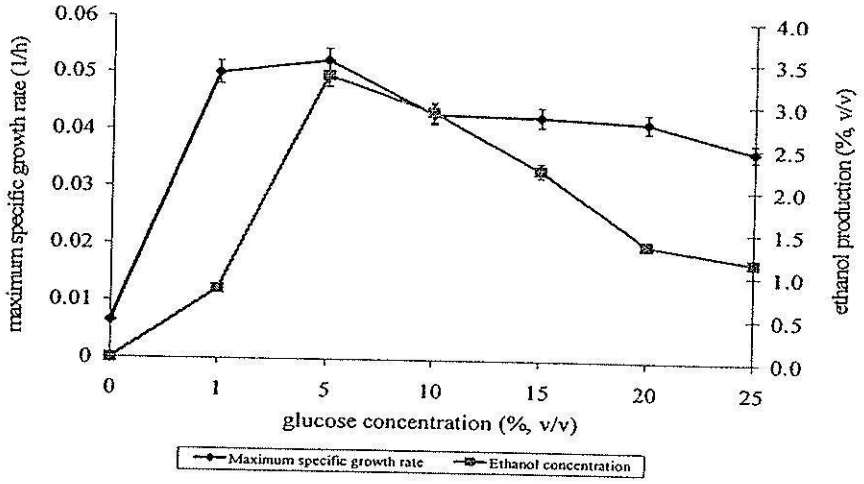


(b)



(c)

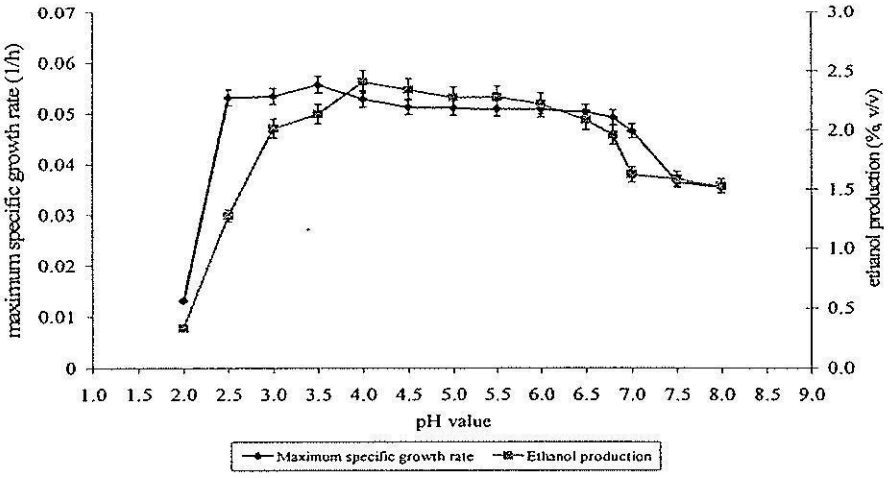
รูปที่ 20 การใช้กลูโคส การเจริญของยีสต์ และการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1 ในอาหาร M9 minimal medium เมื่อแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส, $(NH_4)_2SO_4$, ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 5%, ค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 336 ชั่วโมง a) ความเข้มข้นของกลูโคส b) การเจริญของยีสต์ และ c) การผลิตเอทานอล



รูปที่ 21 ผลของกลูโคสต่อการอัตราการเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอลในอาหาร M9 minimal medium เมื่อใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน

5.3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

เมื่อศึกษาการผลิตเอทานอลโดยแปรผันค่าความเป็นกรดด่างในอาหาร M9 minimal medium ที่มีแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม พบว่าอัตราการเจริญของยีสต์มีค่าใกล้เคียงกันในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่าง อยู่ในช่วง 2.5 ถึง 6.8 แต่เมื่อค่าความเป็นกรดด่างสูงขึ้น อัตราการเจริญของยีสต์จะลดลง อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้แสดงว่าค่าความเป็นกรดด่างมีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล โดยค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล อยู่ในช่วง 4.0 ถึง 6.5 และค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 เป็นค่าที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอล ดังแสดงในรูปที่ 22



รูปที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญสูงสุดและการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1 เมื่อแปรผันค่าพีเอช ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหาร M9 minimal medium โดยมี กลูโคส 5% โดยปริมาตร และ $(NH_4)_2SO_4$ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ใช้หัวเชื้อเริ่มต้น 5 %

โดยปกติแล้วยีสต์จัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่ชอบความเป็นกรด (acidophilic organism) ดังนั้นยีสต์จึงสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์อยู่ในช่วง 4.0 ถึง 6.0 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจน และสายพันธุ์ของยีสต์ ซึ่งเมื่อค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมจะทำให้โปรตีนที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงเอนไซม์และโปรตีนที่ทำหน้าที่ขนส่งสารทำงานได้ดีขึ้น (Narendranath และ Power, 2005) ในระหว่างการเจริญยีสต์จำเป็นที่จะต้องรักษาค่าความเป็นกรดด่างที่อยู่ภายในเซลล์ให้คงที่ เพื่อให้เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเมทาบอลิซึมทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อค่าความเป็นกรดด่างภายนอกเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม ยีสต์จำเป็นที่ต้องใช้พลังงานในการปั๊มไฮโดรเจนไอออนเข้าหรือออกจากเซลล์เพื่อทำให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์คงที่ (Narendranath และคณะ, 2001 และ Thomas และคณะ, 2002) และหากค่าความเป็นกรดด่างภายนอกเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากช่วงค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมมากจนเอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ยีสต์จึงไม่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ ซึ่งสัมพันธ์กับรูปที่ 22 โดยการผลิตเอทานอลลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดด่าง ต่ำกว่า 4.0 และสูงกว่า 6.5

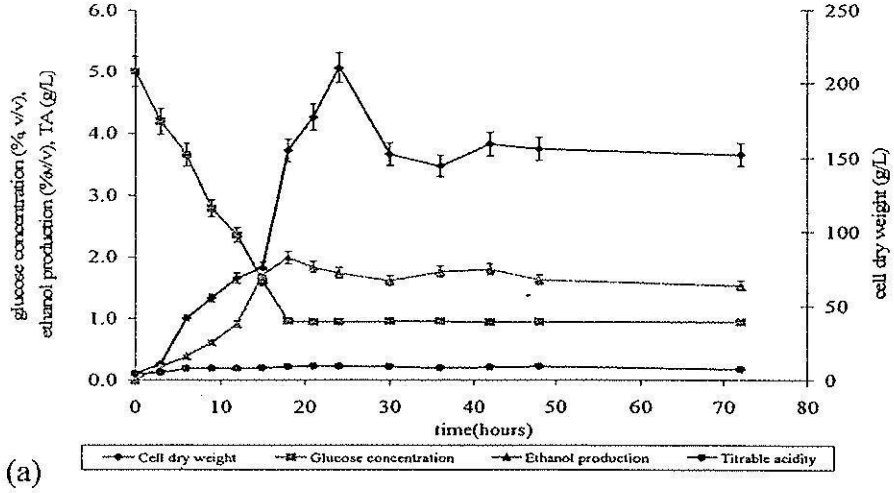
เมื่อเปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญสูงสุด (maximum specific growth rate, μ_{max}) จากรูปที่ 18, 21 และ 22 พบว่าอัตราการเจริญจากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อกลูโคสและค่าความเป็นกรด

ต่างมีค่าต่ำกว่า การศึกษาความเหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน เนื่องจากความแตกต่างของปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น โดยในการศึกษาความเหมาะสมของแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 10% ค่าอัตราการเจริญสูงสุดมีค่าเป็น 0.01 ถึง 0.1 ต่อชั่วโมง ส่วนการศึกษาอื่นๆ ใช้ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นเป็น 5% ค่าอัตราการเจริญสูงสุดมีค่าเป็น 0.005 ถึง 0.05 ต่อชั่วโมง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อกลูโคสและค่าความเป็นกรดด่าง มีค่าสูงกว่าเนื่องจากมีความเข้มข้นของกลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในปริมาณมากกว่า

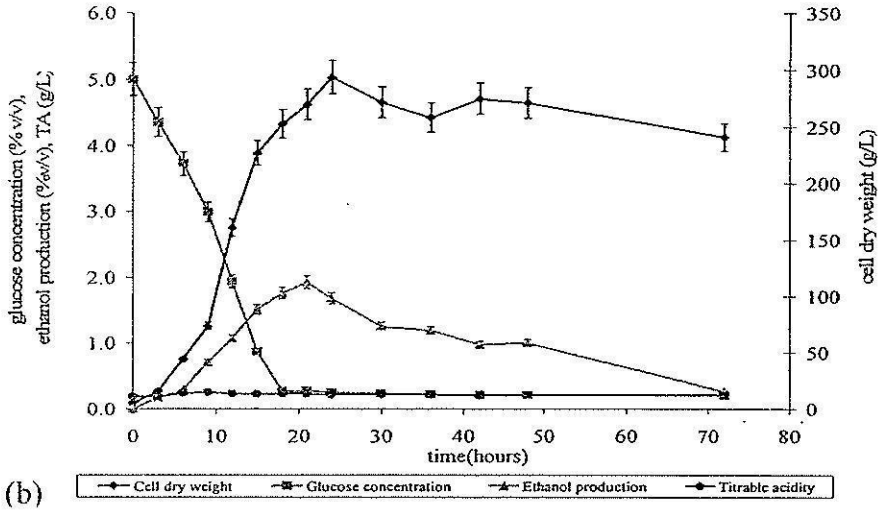
6 การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร

เมื่อศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน *I. orientalis* S1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตรแบบใช้อาหารหมักครั้งเดียว (batch fermentation) ในอาหาร M9 minimal medium ปริมาตร 1.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ค่าพีเอช 4.0 ความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 5 % โดยปริมาตร และ $(NH_4)_2SO_4$ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ

การวิเคราะห์ค่าต่างๆ ในระหว่างกระบวนการหมัก คือ การบริโภคกลูโคส การผลิตเอทานอล ปริมาณเซลล์ยีสต์ และค่าของกรดที่สามารถไตเตรดได้ (titrable acidity, TA) โดยค่าที่ได้นี้แตกต่างกันตามเวลาการให้อากาศ แสดงดังรูปที่ 23 จากรูปที่ 23a เมื่อให้อากาศในการหมักเพียง 24 ชั่วโมงพบว่ากระบวนการหมักแบ่งได้เป็น 2 ช่วง ช่วงแรกการเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้นควบคู่ไปกับการผลิตเอทานอลและการบริโภคกลูโคส ช่วงที่สองการเจริญของยีสต์และการบริโภคกลูโคสลดลงในขณะที่การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามกับรูปที่ 23b เมื่อให้อากาศในการหมักตลอดระยะเวลาการหมักแบ่งกระบวนการหมักได้เป็นสองช่วงเช่นเดียวกัน ช่วงแรกให้ผลคล้ายคลึงกันกับการให้อากาศในการหมัก 24 ชั่วโมง แต่ในช่วงที่สองเมื่อการเจริญของยีสต์และการบริโภคกลูโคสหยุดลงเป็นผลการผลิตเอทานอลลดลงด้วย ทั้งนี้ในกรณีที่มีอากาศ เมื่อไม่มีกลูโคสและการสะสมเอทานอลเพิ่มขึ้น เอทานอลจะถูกย่อยสลายเปลี่ยนเป็นสารตั้งต้นในการเจริญของยีสต์ การเปลี่ยนแปลงลักษณะนี้เรียกว่า diauxic shift (Pronk และคณะ, 1996) แต่อย่างไรก็ตามค่าของกรดที่สามารถไตเตรดได้ไม่แตกต่างกันตามระยะเวลาการให้อากาศ



(a)



(b)

รูปที่ 23 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส การผลิตเอทานอล การเจริญของยีสต์และค่าของกรดที่ไตเตรดได้ในระหว่างกระบวนการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราการให้อากาศ 5 vvm อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที ปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้น 10%; a) ให้อากาศ 24 ชั่วโมง, และ b) ให้อากาศ 72 ชั่วโมง

Wayman และ Parekh (1990) รายงานว่า การผลิตเอทานอลเป็นกระบวนการที่ต้องการอากาศในช่วงแรกของกระบวนการหมัก เนื่องจากปริมาณออกซิเจนมีความสำคัญในการกระตุ้นการเจริญของหัวเชื้อ แต่ในกรณีที่มีแหล่งอาหารไม่เพียงพอ ปริมาณออกซิเจนจะจำกัดการเจริญของยีสต์ได้ โดยปกติแล้วในระหว่างที่เกิดการหมัก เมื่อปริมาณออกซิเจนลดลงการเจริญของยีสต์จะช้าลงเช่นกัน ในระหว่างนี้กระบวนการเมทาบอลิซึมของยีสต์จะเปลี่ยนจากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจนไป

เป็นกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ และการผลิตแอลกอฮอล์จะเกิดขึ้นจนกระทั่งปริมาณสารตั้งต้นหมดหรือจนกว่าปริมาณเอทานอลจะเป็นสิ่งที่ยับยั้งกิจกรรมของยีสต์เอง

ค่าจลนศาสตร์ (kinetic parameter) ในขวดรูปชมพู่และในถังหมักขนาด 2 ลิตรแสดงในตารางที่ 7 อัตราการเจริญของยีสต์ในขวดรูปชมพู่ต่ำกว่าในถังหมัก อาจเนื่องจากปริมาณหัวเชื้อเริ่มต้นและการให้อากาศ ในถังหมักเมื่อให้อากาศ 24 ชั่วโมง อัตราการเจริญสูงสุดมีค่าต่ำแต่เอทานอลที่ผลิตได้มีค่าสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการให้อากาศตลอดการกระบวนการหมักทั้งนี้เนื่องจากอากาศมีผลต่อการผลิตเอทานอล อย่างไรก็ตามช่วงเวลาที่มีปริมาณเอทานอลสูงที่สุดคือช่วง 18 ถึง 21 ชั่วโมง ซึ่งพบได้ทั้งสองช่วงของการให้อากาศ (รูปที่ 23)

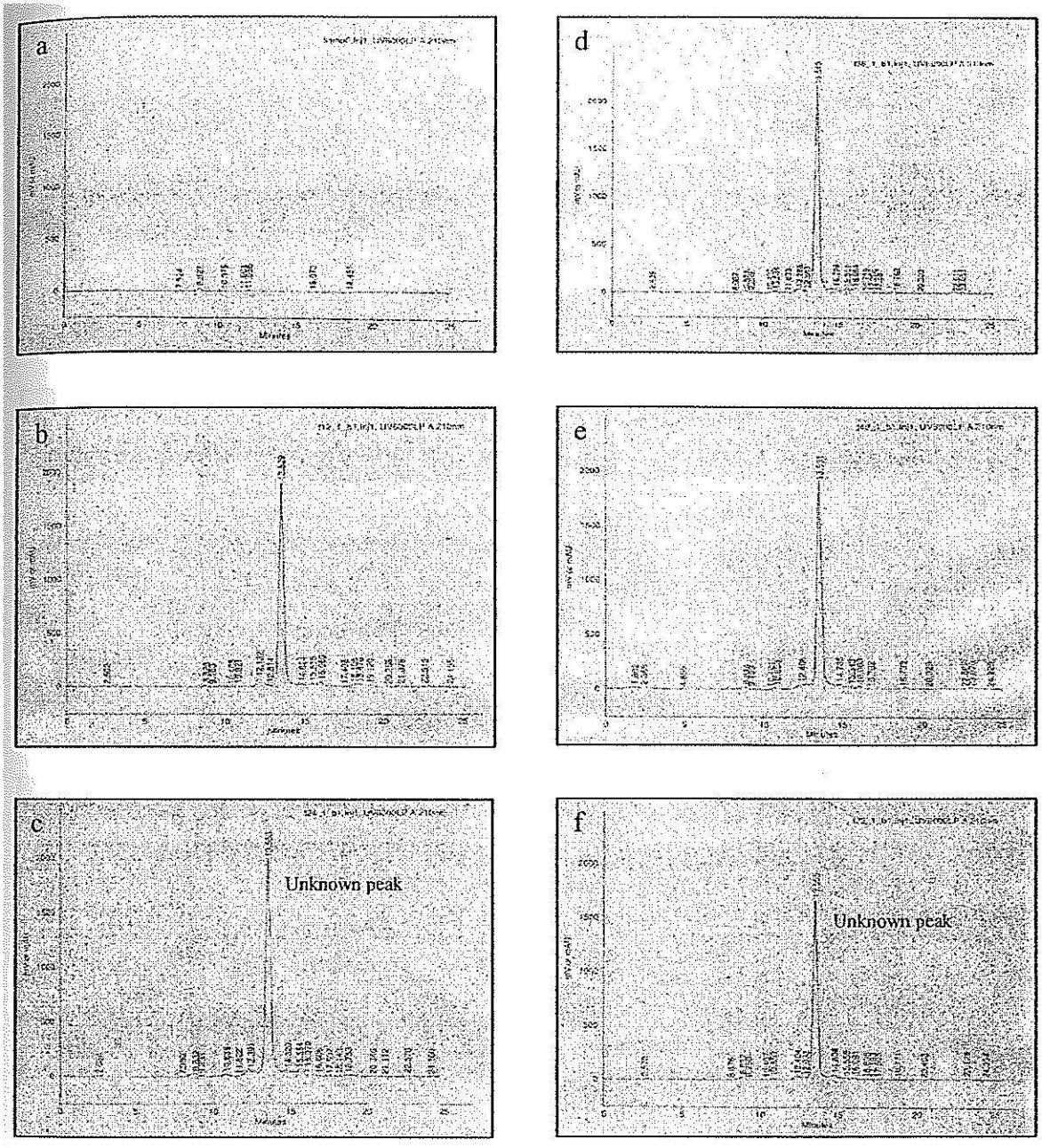
จากการศึกษาผลผลิตของเอทานอล (ethanol yield) ตามทฤษฎี ของ Hughes และคณะ (1984) พบว่าเมื่อทำการหมักในขวดรูปชมพู่โดยใช้อาหาร glucose medium (ประกอบด้วย กลูโคส, yeast extract, NaCl, $CaCl_2$, KH_2PO_4, $FeCl_3$, $MgSO_4.7H_2O$ และ NH_4Cl) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส *K. marxianus* สามารถผลิตเอทานอลได้ 92.2% โดยทฤษฎี ในขณะที่ Anderson และคณะ(1986) พบว่า *K. marxianus* var. *marxianus* สามารถผลิตเอทานอลได้ 85 ถึง 90 % โดยทฤษฎี ที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 7 ค่าจลนศาสตร์ในการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน *I. orientalis* S1 ในขวดรูปชมพู่และในถังหมัก (แปรผันการเวลาการให้อากาศ) ในอาหาร M9 minimal medium ปริมาณกลูโคส 5% โดยปริมาตร และ $(NH_4)_2SO_4$ 10 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

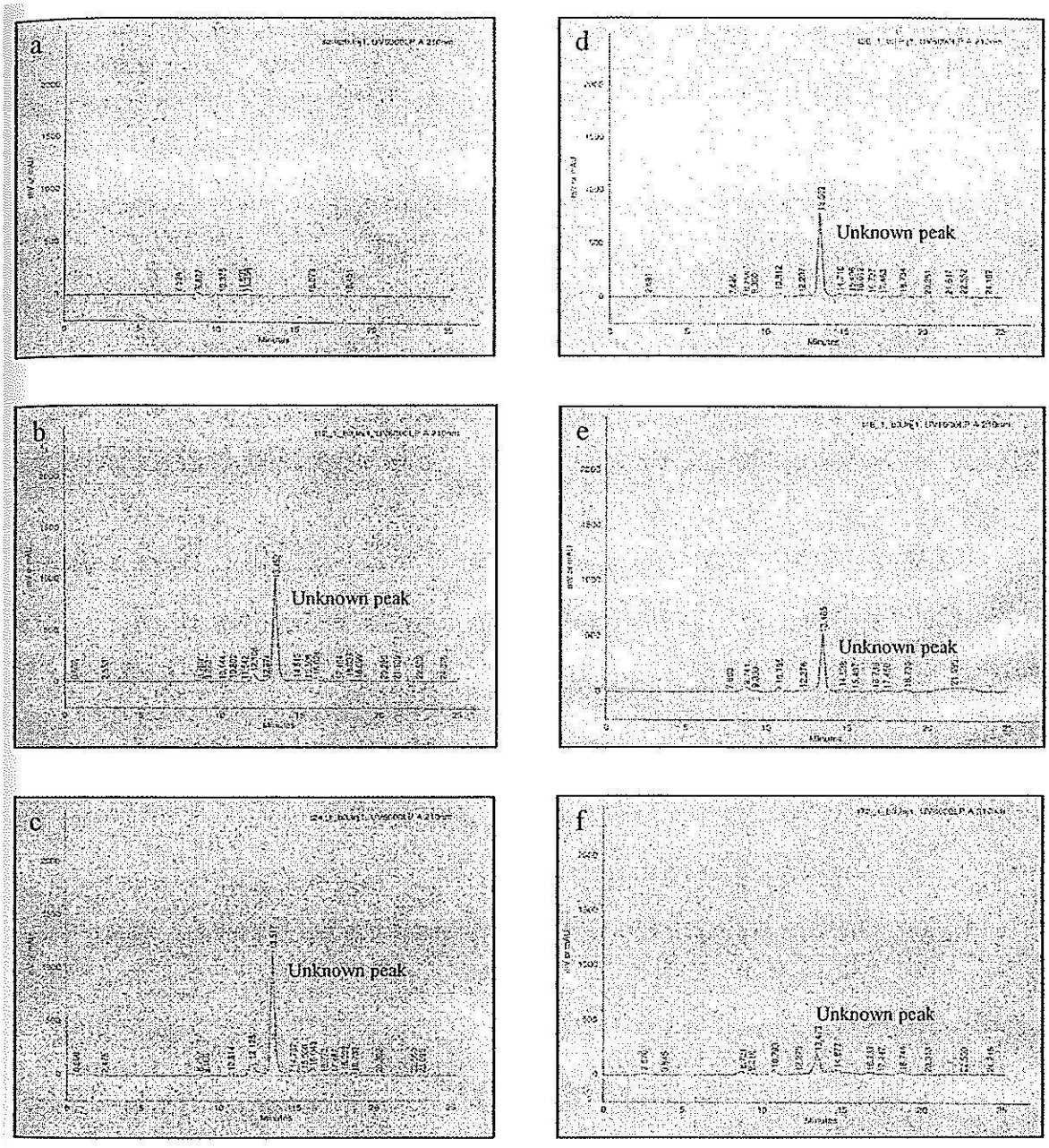
ค่าจลนศาสตร์	ขวดรูปชมพู่	ระยะเวลาให้อากาศ (ชั่วโมง)	
		24	72
อัตราการเจริญสูงสุด, μ_{max} (ต่อชั่วโมง, h^{-1})	0.0528	0.1484	0.1634
ผลผลิตเอทานอลสูงสุด (กรัม/กรัม)	0.3804	0.3879	0.3223
ผลผลิตเอทานอลสูงสุด (% โดยทฤษฎี)	74.58	76.06	63.20
อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด (กรัม/กรัม/ชั่วโมง)	0.00113	0.0216	0.0153
การผลิตสูงสุดโดยปริมาตร (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	0.057	0.872	0.725
การผลิตโดยปริมาตร (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	0.057	0.168	0.0296
ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	336	72	72

ในกระบวนการหมักดังรูปที่ 7 พบว่าในระหว่างที่เกิดการหมักกลูโคสจะมีการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล นอกจากนี้ยังพบสารอื่นในปริมาณต่ำๆ เช่น กลีเซอรอล กรดอะซี

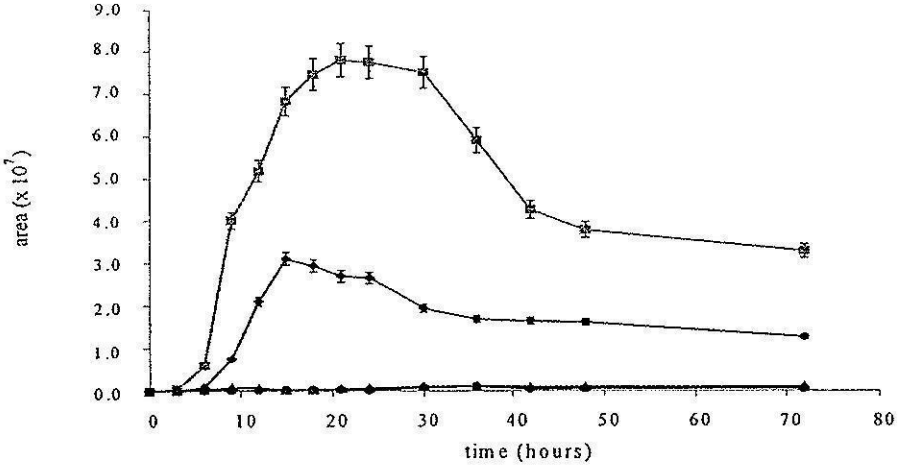
ติก กรดแลคติก กรดซักซินิค อะซีตอลดีไฮด์ และเฟอฟูรอล (Glazer และ Nikaido, 1995) ดังนั้นในการศึกษาการผลิตเอทานอลในถังหมักจึงตรวจสอบกรดอินทรีย์บางชนิดด้วยวิธี HPLC โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน กรดอินทรีย์ดังกล่าวได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซีติก กรดซักซินิค กรดทาร์ทาริก กรดมาลิก และกรดฟูมาริก จากการผลิตเอทานอลในครั้งนี้พบสารที่ไม่สามารถระบุชนิดได้ที่เวลา 13.5 นาที (รูปที่ 24 - 26) โดยสารนี้มีปริมาณ 40 เท่าของกรดอะซีติก ซึ่งสารนี้อาจเป็นสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของยีสต์ในระหว่างที่เกิดการหมัก



รูปที่ 24 การตรวจสอบสารโดย HPLC ที่เวลา 13.5 นาที เมื่อผลิตเอทานอลในถังหมักในอาหาร M9 minimal medium ใช้กลูโคส 5% โดยปริมาตร $(NH_4)_2SO_4$ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง โดยให้อากาศเพียง 24 ชั่วโมงแรก; a) 0 ชั่วโมง, b) 12 ชั่วโมง, c) 24 ชั่วโมง, d) 36 ชั่วโมง, e) 48 ชั่วโมง, และ f) 72 ชั่วโมง



รูปที่ 25 การตรวจสอบสารโดย HPLC ที่เวลา 13.5 นาที เมื่อผลิตเอทานอลในถังหมักในอาหาร M9 minimal medium ใช้กลูโคส 5% โดยปริมาตร $(NH_4)_2SO_4$ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้อากาศตลอดระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง; a) 0 ชั่วโมง, b) 12 ชั่วโมง, c) 24 ชั่วโมง, d) 36 ชั่วโมง, e) 48 ชั่วโมง, และ f) 72 ชั่วโมง



รูปที่ 26 การตรวจสอบสารโดย HPLC เมื่อเปรียบเทียบกับกรดอะซีติก; ให้อากาศ 24 ชั่วโมง (-■-), ให้อากาศตลอดระยะเวลาการหมัก (-◆-), กรดอะซีติกเมื่อให้อากาศ 24 ชั่วโมง (-▲-), กรดอะซีติกเมื่อให้อากาศตลอดระยะเวลาการหมัก (-●-)

3.3 สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกยีสต์ทนร้อน *I. orientalis* S1 จากหญ้าหมักจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี จากการเลี้ยงเซลล์บนอาหาร yeast extract peptone dextrose (YPD) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นรูปไข่จนถึงรูปท่อนปลายมน ขนาดเซลล์ประมาณ 2.7-4.2 x 5.6-10.1 ไมโครเมตร การเรียงตัวของเซลล์ทั้งเดี่ยวและคู่ พบการแตกหน่อของเซลล์ และมีการพัฒนาของเส้นใยเทียม สำหรับลักษณะการเจริญในอาหารเหลว เป็นแผ่นแห้งและหนาสีขาวเกาะอยู่บนบริเวณผิวหน้าของอาหารเหลว การเจริญบนอาหารแข็งโคโลนีมีความหนืดคล้ายเนยเหลว และมีสีครีม

ยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้นี้ไม่สามารถสร้างสารพิษต้านทานต่อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* EC 1118 แบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรม โดยศึกษา 18S rDNA พบว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1 มีความใกล้เคียงกับ *I. orientalis* 98%

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกลูโคส) และค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหาร M9 minimal medium ปริมาตร 125 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่พบว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 74.58% โดยทฤษฎี ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.0 เมื่อใช้แอมโมเนียม ซัลเฟต และ น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และ แหล่งคาร์บอน ตามลำดับ จากนั้นศึกษาการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต เอทานอลที่ได้จากการศึกษาขั้นต้น พบว่ายีสต์ทนร้อน *I. orientalis* S1 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งและผลิตเอทานอลได้มากที่สุดภายในเวลา 24 ชั่วโมง และการผลิตเอทานอลลดลงเมื่อให้อากาศตลอดกระบวนการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในทางตรงกันข้าม เมื่อให้อากาศ ภายใน 24 ชั่วโมงการผลิตเอทานอลจะคงที่ โดยให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 76.06% โดยทฤษฎี อย่างไรก็ตามการผลิตเอทานอลในถังหมักให้ผลการผลิตน้อยกว่าในระดับขวดรูปชมพู่

เมื่อทดสอบการผลิตกรดอินทรีย์บางชนิดในอาหาร M9 minimal medium ด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) พบว่า มีสารชนิดหนึ่งที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้เกิดขึ้นในช่วงเวลาที่ 13.5 นาที ควบคู่ไปกับการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *I. orientalis* S1 ดังนั้นควรวิเคราะห์สารชนิดนี้ เนื่องจากยีสต์จะผลิตในปริมาณสูงมีความเข้มข้นประมาณ 40 เท่าของกรดอะซีติก ซึ่งอาจเป็นผลมาจากเมทาบอลิซึมบางอย่างของยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมัก

บทที่ 4

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ทนร้อน *I. orientalis* S1

INCREASING EFFICIENCY OF ETHANOL PRODUCTION BY THERMOTOLERANT *I. ORIENTALIS* S1

4.1 วิธีการวิจัย

1 การทดสอบการเจริญของ *I. orientalis* S1 สำหรับการเตรียมหัวเชื้อ

นำยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *I. orientalis* S1 มาเลี้ยงในอาหาร YM แบบเหลว ซึ่งประกอบไปด้วย glucose 10 กรัม/ลิตร, peptone 5 กรัม/ลิตร, yeast extract 3 กรัม/ลิตร และ malt extract 3 กรัม/ลิตร จากนั้นนำอาหารปริมาตร 10 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาหนึ่งวัน เมื่อครบกำหนดนำมา streak-plate ในอาหาร YM แบบแข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลาสองวัน

การเตรียมหัวเชื้อและการทดสอบการเจริญเริ่มโดย การเลือกโคโลนีในอาหารแข็ง มาเลี้ยงต่อในอาหาร YM ปริมาตร 150 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 200 rpm เป็นเวลา 3 วัน เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการเจริญของยีสต์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร

2 วิธีการวิเคราะห์

2.1 การวิเคราะห์การเจริญและมวลเซลล์

การวัดการเจริญของเซลล์ยีสต์ วัดโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้อาหาร YM เป็น blank

การวัดมวลเซลล์ วัดโดยนำอาหารที่มีเซลล์ยีสต์เจริญอยู่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรอง cellulose acetate (13mm, 0.45μm, Whatman, England) แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำ deionized แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา หนึ่งวัน การวิเคราะห์มวลเซลล์จะคำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)

2.2 การวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส

ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC รุ่น AS3000 and RI-1530 detector (Jasco, Japan) ใช้คอลัมท์ขนาด 300 X 7.8 มิลลิเมตรแบบ Phenomenex® Rezex RPM-Monosaccharide column ใช้น้ำ deionized เป็นตัวทำละลายเคลื่อนที่อัตรา 0.6 มิลลิลิตร/นาที

2.3 การวิเคราะห์เอทานอล และการวิเคราะห์หาสารปนเปื้อน

ทำการวิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC รุ่น AutoSystem XL, Perkin Elmer, U.S.A คอลัมท์แบบ capillary PE-1 ที่อุณหภูมิ 250 และ 300 องศาเซลเซียส โดยใช้ก๊าซฮีเลียม เป็น carrier gas การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลของตัวอย่างจะเทียบจากกราฟของ สารมาตรฐานเอทานอล

การวิเคราะห์หาสารปนเปื้อนในตัวอย่าง จะทำการวิเคราะห์หาสารกลุ่ม ฟูเซลออยล์ เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ และเมทิลแอลกอฮอล์ โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน

3 การทดสอบหาแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสำหรับการหมัก

แหล่งอาหารคาร์บอนที่ใช้ในการศึกษาได้แก่ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโคส แลคโตส มอลโตส กลีเซอรอล แมนนิทอล แป้งมันสำปะหลัง และแป้งมันสำปะหลัง ปริมาณที่ใช้ คือ 10 กรัม/ลิตร ในอาหาร YM โดยมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6

เติมหัวเชื้อที่บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในอาหาร YM ที่มีการเติมแหล่งอาหารคาร์บอนแต่ละชนิด ปริมาตร 9.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่บรรจุหลอด Durham สำหรับดักก๊าซที่เกิดจากขบวนการหมัก ตามวิธีการของ Ueno และคณะ (2001) หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นจึงวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ และปริมาณก๊าซที่ผลิตได้จากการหมัก

4 การหาปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส และ ฟรุกโตส ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า

เตรียมกลูโคส และฟรุกโตส ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 กรัม/ลิตร ซึ่งใช้เป็น carbon source ในอาหาร YM

เตรียมหัวเชื้อยีสต์โดยการเลี้ยงในอาหาร YM บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหาร YM ปริมาตร 142.5 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส และฟรุกโตส ต่างๆกันในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้น

ตรวจสอบการเจริญของยีสต์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร การวัดปริมาณการใช้กลูโคสและฟรุกโตส วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ส่วนการผลิตเอทานอล วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC

5 การศึกษาผลของเขย่าต่อการผลิตเอทานอล

เตรียมกลูโคส ที่ความเข้มข้น 50 กรัม/ลิตร และฟรุกโตส ที่ความเข้มข้น 100 กรัม/ลิตรในอาหาร YM

เตรียมหัวเชื้อยีสต์โดยการเลี้ยงในอาหาร YM บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหาร YM ปริมาตร 142.5 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 50 กรัม/ลิตร และฟรุกโตส 100 กรัม/ลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm หลังจากนั้นตรวจสอบการเจริญของยีสต์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร การวัดปริมาณการใช้กลูโคสและฟรุกโตส วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ส่วนการผลิตเอทานอล วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC เปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีการเขย่า

6 การหาปริมาณความเข้มข้นของกลูโคส และ ฟรุกโตส ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล ในสภาวะที่มีการเขย่า

เตรียมกลูโคส และฟรุกโตส ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100 และ 150 กรัม/ลิตร ซึ่งใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ในอาหาร YM

เตรียมหัวเชื้อยีสต์โดยการเลี้ยงในอาหาร YM บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

นำหัวเชื้อที่เตรียมได้ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร เติมลงในอาหาร YM ปริมาตร 142.5 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส และฟรุกโตส ต่างๆกันในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm หลังจากนั้นตรวจสอบการเจริญของยีสต์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร การวัดปริมาณการใช้กลูโคสและฟรุกโตส วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ส่วนการผลิตเอทานอล วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC

7 ลำดับของการใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส

เตรียมกลูโคส และฟรุกโตส ที่ความเข้มข้น 25 กรัม/ลิตร ในอาหาร YM ซึ่งใช้เป็น carbon source ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm หลังจากนั้นตรวจสอบการเจริญของยีสต์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร การวัดปริมาณการใช้กลูโคสและฟรุกโตส วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง HPLC ส่วนการผลิตเอทานอล วิเคราะห์โดยใช้เครื่อง GC

8 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอทานอล

ทำการศึกษาผลของ yeast extract, malt extract, peptone และ แอมโมเนียมซัลเฟต ดังตารางที่ 8 โดยเติมกลูโคส ความเข้มข้น 100 กรัม/ลิตร ซึ่งใช้เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 rpm

Table 8 แสดงชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่ใช้สำหรับการศึกษาผลของความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 โดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่ 100 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

Trial	Peptone (g/L)	Yeast extract (g/L)	Malt extract (g/L)	$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)
1	0	0	0	0
2	0	0	0	2.0
3	0	0	1.5	2.0
4	0	0	3.0	2.0
5	0	1.5	0	2.0
6	0	1.5	1.5	2.0
7	0	3.0	0	2.0
8	0	3.0	3.0	2.0
9	2.5	0	0	2.0
10	2.5	0	1.5	2.0
11	2.5	1.5	0	2.0
12	2.5	1.5	1.5	0
13	2.5	1.5	1.5	2.0
14	5.0	0	0	2.0
15	5.0	0	3.0	2.0
16	5.0	3.0	0	2.0
17	5.0	3.0	3.0	0
18	5.0	3.0	3.0	2.0

9 การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ batch

ในการศึกษาการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร อาหารที่มีส่วนประกอบของแหล่งอาหารคาร์บอนและแหล่งอาหารไนโตรเจนจะทำการเตรียมโดยใช้ผลจากในหัวข้อ 6 และ 8 ถังหมักที่ใช้ในการทดลองรุ่น micro DCU-300 and Biostat® B (B. Braun Biotech international, Germany) ซึ่งใช้ปริมาตรของอาหารที่ 1.0 ลิตร ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5% ทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 48 ชั่วโมง และในระหว่างการทดลอง ค่าพีเอชจะถูกควบคุมที่ 4.0 ด้วย 1.0 M HCl และ 1.0 M NaOH

9.1 ผลของการให้อากาศ

การศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอทานอลจะทำโดยการเติมอากาศเข้าไปในถังหมัก โดยทำการศึกษาที่อัตรา 0, 0.2 และ 1.0 vvm โดยควบคุมอัตราการกวนที่ 100 รอบ/นาที

9.2 ผลของอัตราเร็วรอบในการกวน

การศึกษาผลของอัตราเร็วรอบในการกวนต่อการผลิตเอทานอลจะทำการศึกษาที่ความเร็วรอบของการกวนที่ 100, 200, 300, 400 และ 500 รอบต่อนาที

10 การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ batch

ในการศึกษาการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร อาหารที่มีส่วนประกอบของแหล่งอาหารคาร์บอนและแหล่งอาหารไนโตรเจนจะทำการเตรียมโดยใช้ผลจากในหัวข้อ 9 ถังหมักที่ใช้ในการทดลองรุ่น micro DCU-300 and Biostat® B (B. Braun Biotech international, Germany) ซึ่งใช้ปริมาตรของอาหารที่ 6.0 ลิตร ควบคุมการกวนตามข้อมูลที่ได้ในหัวข้อ 9.2 ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5% ทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง และในระหว่างการทดลอง ค่าความเป็นกรดด่าง จะถูกควบคุมที่ 4.0 ด้วย 1.0 M HCl และ 1.0 M NaOH

11 การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ fed-batch

ในการศึกษาการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร อาหารที่มีส่วนประกอบของแหล่งอาหารคาร์บอนและแหล่งอาหารไนโตรเจนจะทำการเตรียมโดยใช้ผลจากในหัวข้อ 9 ถังหมักที่ใช้ในการทดลองรุ่น micro DCU-300 and Biostat® B (B. Braun Biotech international, Germany) ซึ่งใช้ปริมาตรของอาหารที่ 6.0 ลิตร ควบคุมการกวนตามข้อมูลที่ได้ในหัวข้อ 9.2 ใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่ 5% ทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง และในระหว่างการทดลอง ค่าความเป็นกรดด่างจะถูกควบคุมที่ 4.0 ด้วย 1.0 M HCl และ 1.0 M NaOH และทำการเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปในถังหมักดังนี้

11.1 Fed-batch A

เติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นที่ 350 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร เติมชั่วโมงที่ 28

11.2 Fed-batch B

เติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นที่ 350 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร เติมชั่วโมงที่ 28 และ 400 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร เติมชั่วโมงที่ 52

11.3 Fed-batch C

เติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นที่ 350 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร เติมชั่วโมงที่ 12

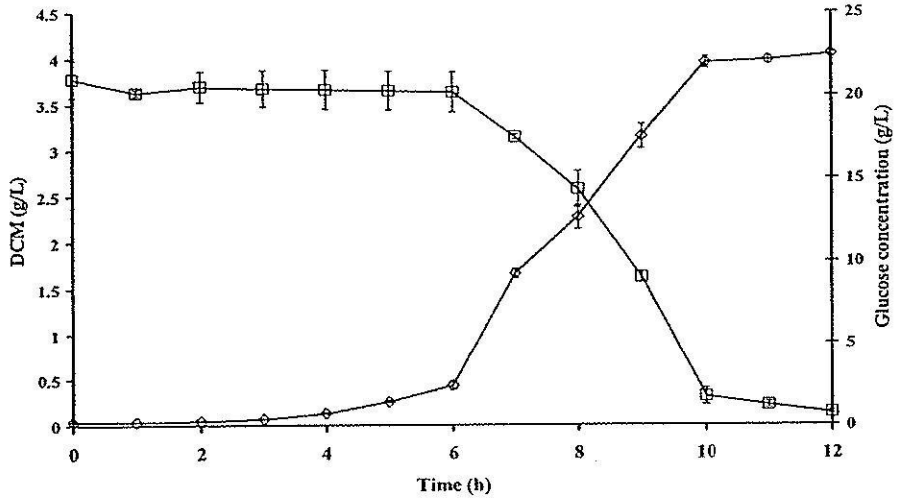
11.4 Fed-batch D

เติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นที่ 350 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร เติมชั่วโมงที่ 12 และ 400 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร เติมชั่วโมงที่ 24

4.2 ผลและอภิปรายผลการทดลอง

1 การทดสอบการเจริญของ *I. orientalis* S1 สำหรับการเตรียมหัวเชื้อ

ผลของการทดสอบหาเวลาที่เหมาะสมของการเจริญของหัวเชื้อยีสต์ แสดงดังใน รูปที่ 27 พบว่าเวลาที่เชื้อยีสต์มีความเหมาะสมที่ใช้เป็นหัวเชื้อจะอยู่ในช่วงเวลา 8 ถึง 9 ชั่วโมงหลังจากเริ่มการเลี้ยงเซลล์ ดังนั้น การเลี้ยงเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ในอาหารเหลว YM เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อสำหรับการทำการทดลองจะทำการบ่มเชื้อเป็นเวลา 8 ชั่วโมง



รูปที่ 27 การเจริญและการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อยีสต์ *I. orientalis S1* ในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที; ⊟ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร) and ⟡ DMC (กรัมต่อลิตร).

2 การทดสอบหาแหล่งอาหารคาร์บอนที่เหมาะสำหรับการหมัก

ผลของการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ในแหล่งอาหารคาร์บอนทั้ง 9 ชนิดที่ทำการเติมแทนน้ำตาลกลูโคสในอาหาร YM และทำการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แสดงในตารางที่ 9 พบว่าเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 สามารถเจริญได้ดี เมื่อใช้กลูโคสหรือฟรุกโตสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และผลิตก๊าซที่มาจากกระบวนการหมักออกมาเป็นจำนวนมาก ซึ่งถูกกักเอาไว้ในหลอด Durham นอกจากนี้ยังมีการผลิตกรดอินทรีย์บางชนิดออกมา เนื่องจากมีการลดลงของค่าความเป็นกรดด่าง จาก 6.0 เป็น 4.5 หลังจากหมักเป็นเวลา 2 วัน อย่างไรก็ตาม พบว่าเชื้อยีสต์เจริญได้น้อยมากในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลซูโครส แลคโตส กลีเซอรอล แมนนิทอล มอลโตส แป้งมันสำปะหลังและแป้งมันฝรั่ง เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และค่าความเป็นกรดด่าง ของอาหาร หลังจากทำการหมักเป็น

เวลา 2 วัน ไม่มีการเปลี่ยนแปลง ไม่มีการผลิตก๊าซในหลอด Durham

ตารางที่ 9 ผลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร YM ที่เติมแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆ ในหลอดทดลองที่มีหลอด Durham อยู่ภายใน ทำการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

แหล่งอาหารคาร์บอน	ความขุ่น	ก๊าซจากการหมัก	pH
Glycerol	+	-	6.0
Glucose	+++	+	4.5
Fructose	+++	+	4.5
Mannitol	+	-	6.0
Maltose	+	-	6.0
Lactose	+	-	6.0
Sucrose	+	-	6.0
Potato starch	+	-	6.0
Cassava starch	+	-	6.0

+, positive; - , negative

3 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสต่อการผลิตเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า

จากผลการทดลองก่อนหน้านี้ พบว่าน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตสมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนเพื่อการเจริญและการกระบวนการหมัก ในการทดลองนี้ต้องการที่จะศึกษาผลขอความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งสองชนิดต่อการผลิตเอทานอลโดยทำการทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟลุกโตสที่ความเข้มข้น 0-250 กรัมต่อลิตร ในอาหาร YM ที่ค่าความเป็นกรดด่าง เริ่มต้น 6.0 อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

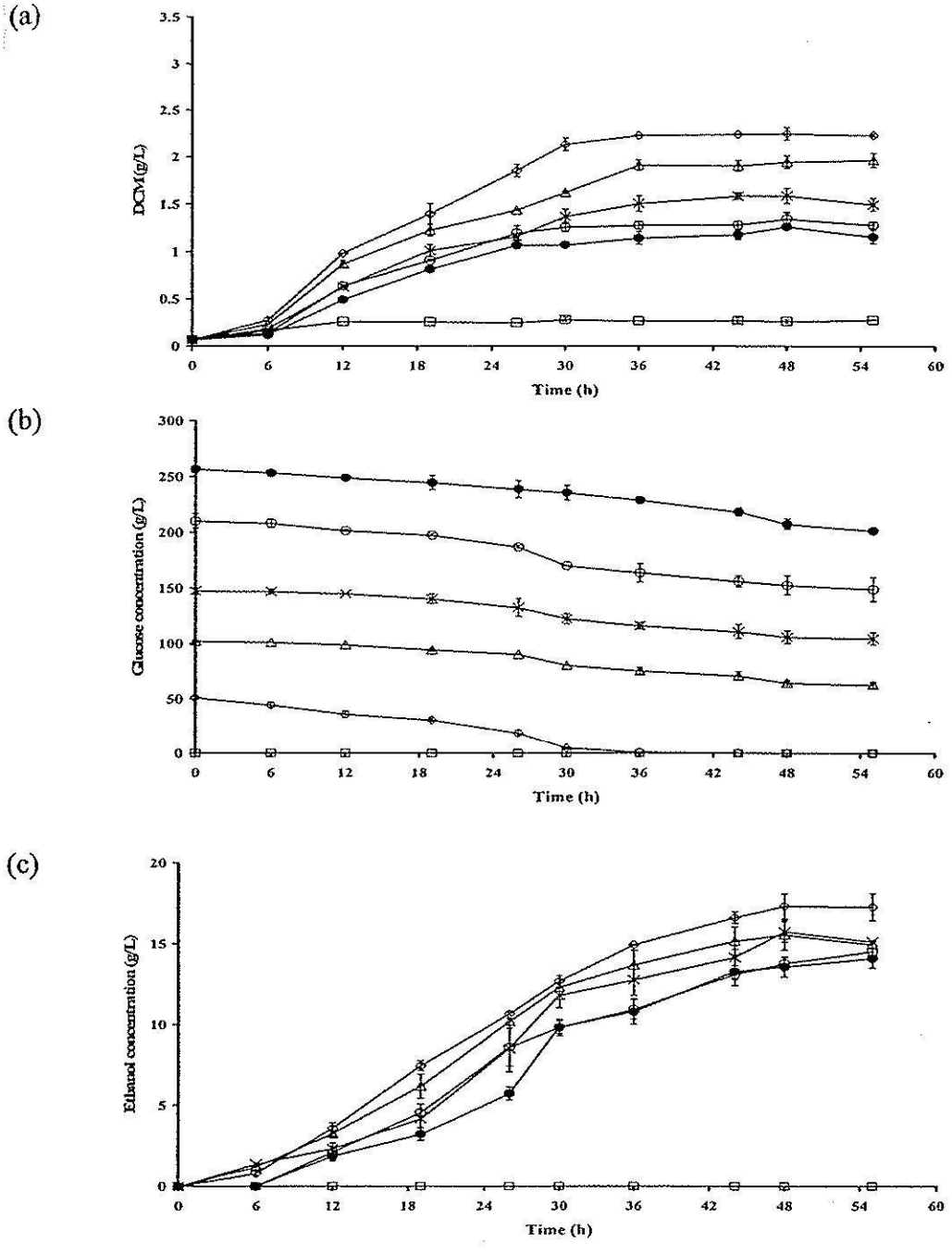
ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเจริญ การใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล ที่ทำการศึกษาภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าแสดงในรูปที่ 28 พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส ที่ 50 กรัมต่อลิตร จะได้อัตราการเจริญจำเพาะของสูงสุด (ตารางที่ 10) และการใช้น้ำตาลกลูโคสของยีสต์ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส ที่ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้หมดภายในเวลา 48 ชม. ของการเพาะเลี้ยง อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่สูงกว่า 50 กรัมต่อลิตร (100-250 กรัมต่อ

ลิตร) พบว่าอัตราการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 (รูปที่ 28b) นอกจากนี้ การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 สามารถผลิตได้สูงสุด เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลกลูโคส ที่ 50 กรัมต่อลิตรเช่นกัน และการผลิตของเอทานอลและการเจริญของยีสต์จะลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงกว่า 50 กรัมต่อลิตร

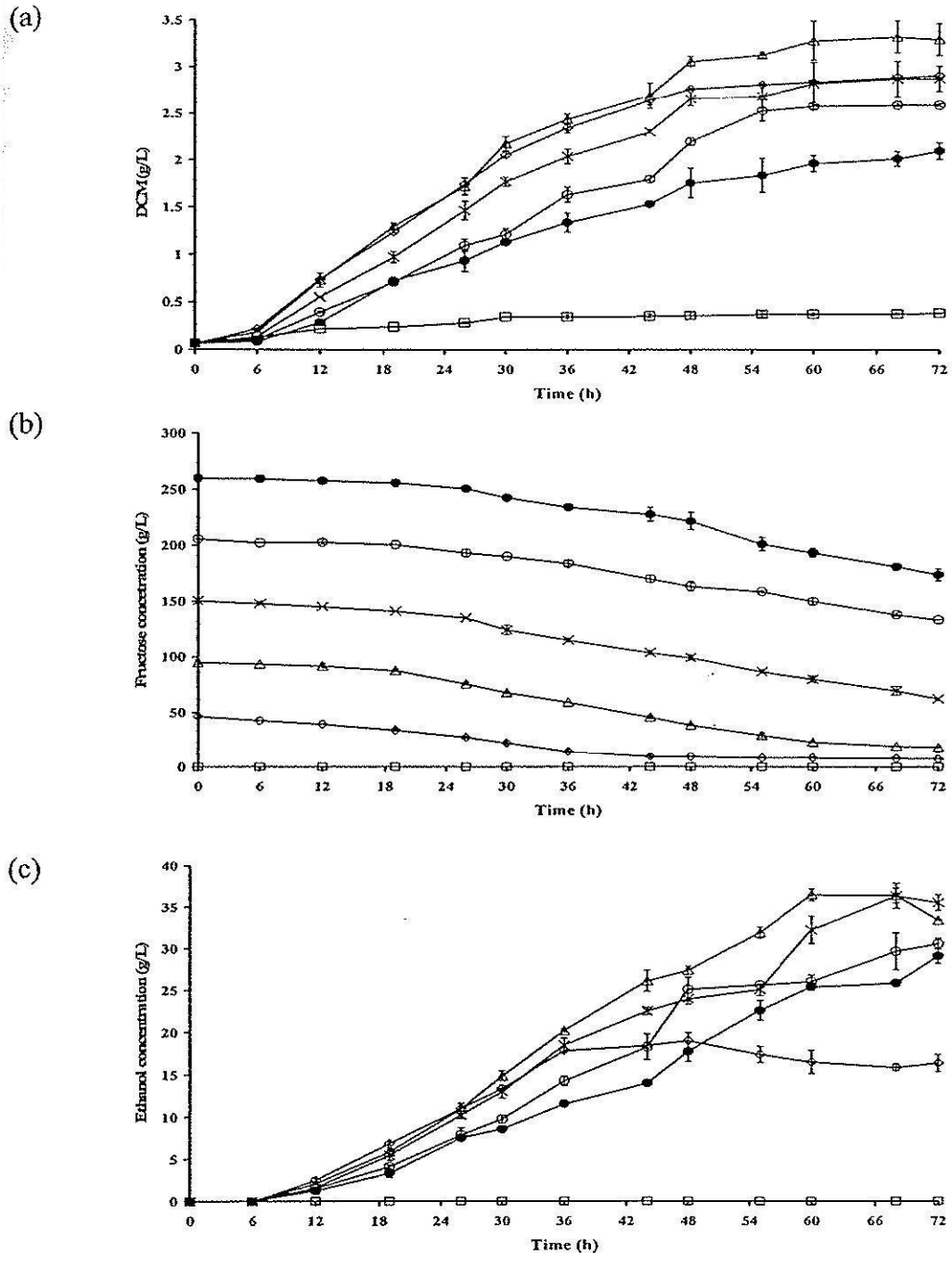
ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสต่อการเจริญ การใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล ที่ทำการศึกษาภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่าแสดงในรูปที่ 29 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลฟรกโตสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนมีค่าสูงสุดเมื่อทำการเลี้ยงที่ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสที่ 50 และ 100 กรัมต่อลิตร และค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสสูงขึ้น (ตารางที่ 10) จากการทดลองยังพบว่าเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ไม่สามารถใช้น้ำตาลฟรุกโตสได้หมด โดยหลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุด ยังมีน้ำตาลฟรุกโตสเหลืออยู่ในอาหาร 8 กรัมต่อลิตรจาก 50 กรัมต่อลิตร และ 18 กรัมต่อลิตรจาก 100 กรัมต่อลิตร ดังในรูปที่ 29b การผลิตเอทานอลและการเจริญจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาล ฟรุกโตสสูงกว่า 100 กรัมต่อลิตร

จากผลการทดลอง เมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลที่ระดับสูงจะมีผลยับยังการเจริญและการผลิตเอทานอล ซึ่งเป็นผลจากการออสโมซิสของน้ำ (Bajpai and Margaritis, 1987) Ghose and Tyagi (1979) พบว่า เมื่อมีความเข้มของน้ำตาลกลูโคสที่ระดับสูงในอาหารจะมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์และกระบวนการการผลิตเอทานอล ซึ่งมีผลเกี่ยวเนื่องจากแรงดันออสโมติกที่สูง ผลของการยับยั้งนี้เป็นปัญหาหลักสำหรับกระบวนการการผลิตเอทานอล

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการหมักระหว่างน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส พบว่าอัตราหมักของน้ำตาลทั้งสองชนิดแตกต่างกัน ความแตกต่างของอัตราการหมักนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่อาจจะเป็นเพราะกระบวนการการนำน้ำตาลผ่านผนังเซลล์ ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการเมทาโบลิซึมของน้ำตาลเฮกโซส จากนั้นน้ำตาลจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการฟอสโฟลิเลชันโดยน้ำตาลแต่ละชนิดจะถูกฟอสโฟลิเลสแตกต่างกัน เช่น hexokinases Hxk1 และ Hxk2 สามารถฟอสโฟลิเลสกลูโคสและฟรุกโตสได้ แต่มีประสิทธิภาพในการฟอสโฟลิเลสที่แตกต่างกัน และ glucokinase Glk1 สามารถฟอสโฟลิเลสได้เพียงกลูโคสเท่านั้น ไม่สามารถฟอสโฟลิเลส ฟรุกโตสได้ (Entian, 1997)



รูปที่ 28 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ปริมาตร 150 มล. ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ 0-250 กรัมต่อลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ใช้หัวเชื้อที่ 5% ค่า pH เริ่มต้นที่ 6.0 และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส: (a) การเจริญ *I. orientalis* S1 (b) การใช้น้ำตาลกลูโคส และ (c) การผลิตเอทานอล; 0 g/L (⊟), 50 g/L (◇), 100 g/L △, 150 g/L ✳, 200 g/L ⊖ and 250 g/L ● ของน้ำตาลกลูโคส



รูปที่ 29 การเจริญ การใช้น้ำตาลฟรุกโตส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ปริมาตร 150 มล. ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสที่ 0-250 กรัมต่อลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ใช้หัวเชื้อที่ 5% ค่า pH เริ่มต้นที่ 6.0 และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส: (a) การเจริญ *I. orientalis* S1 (b) การใช้น้ำตาลกลูโคส และ (c) การผลิตเอทานอล; 0 g/L(⊞), 50 g/L (◇), 100 g/L-△, 150 g/L-✳, 200 g/L-○ and 250 g/L -● ของน้ำตาลฟรุกโตส

ตารางที่ 10 ค่า yield ของเอทานอล (g/g), อัตราการผลิตเอทานอล (g/L/h) และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *I. orientalis* S1ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร YM 150 มล. ที่มี 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 กรัมต่อลิตร ของน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลฟรุกโตสในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส

ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัม/ลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ค่า yield ของเอทานอล (กรัม/กรัม)
กลูโคส			
0	0.116 ± 0.001^{b}	0^{a}	0^{a}
50	0.221 ± 0.004^{g}	0.410 ± 0.003^{d}	0.339 ± 0.023^{cd}
100	0.216 ± 0.001^{g}	0.392 ± 0.008^{d}	0.397 ± 0.020^{ef}
150	0.186 ± 0.003^{c}	0.327 ± 0.056^{c}	0.370 ± 0.037^{de}
200	0.185 ± 0.006^{c}	0.330 ± 0.045^{c}	0.281 ± 0.017^{b}
250	0.143 ± 0.004^{d}	0.220 ± 0.015^{b}	0.304 ± 0.039^{bc}
ฟรุกโตส			
0	0.103 ± 0.007^{a}	0^{a}	0^{a}
50	0.202 ± 0.005^{f}	0.497 ± 0.007^{e}	0.492 ± 0.016^{f}
100	0.202 ± 0.016^{f}	0.563 ± 0.005^{f}	0.477 ± 0.001^{f}
150	0.174 ± 0.005^{e}	0.515 ± 0.005^{ef}	0.412 ± 0.001^{ef}
200	0.133 ± 0.002^{cd}	0.398 ± 0.018^{d}	0.425 ± 0.010^{e}
250	0.122 ± 0.006^{bc}	0.323 ± 0.011^{c}	0.339 ± 0.018^{cd}

Values followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

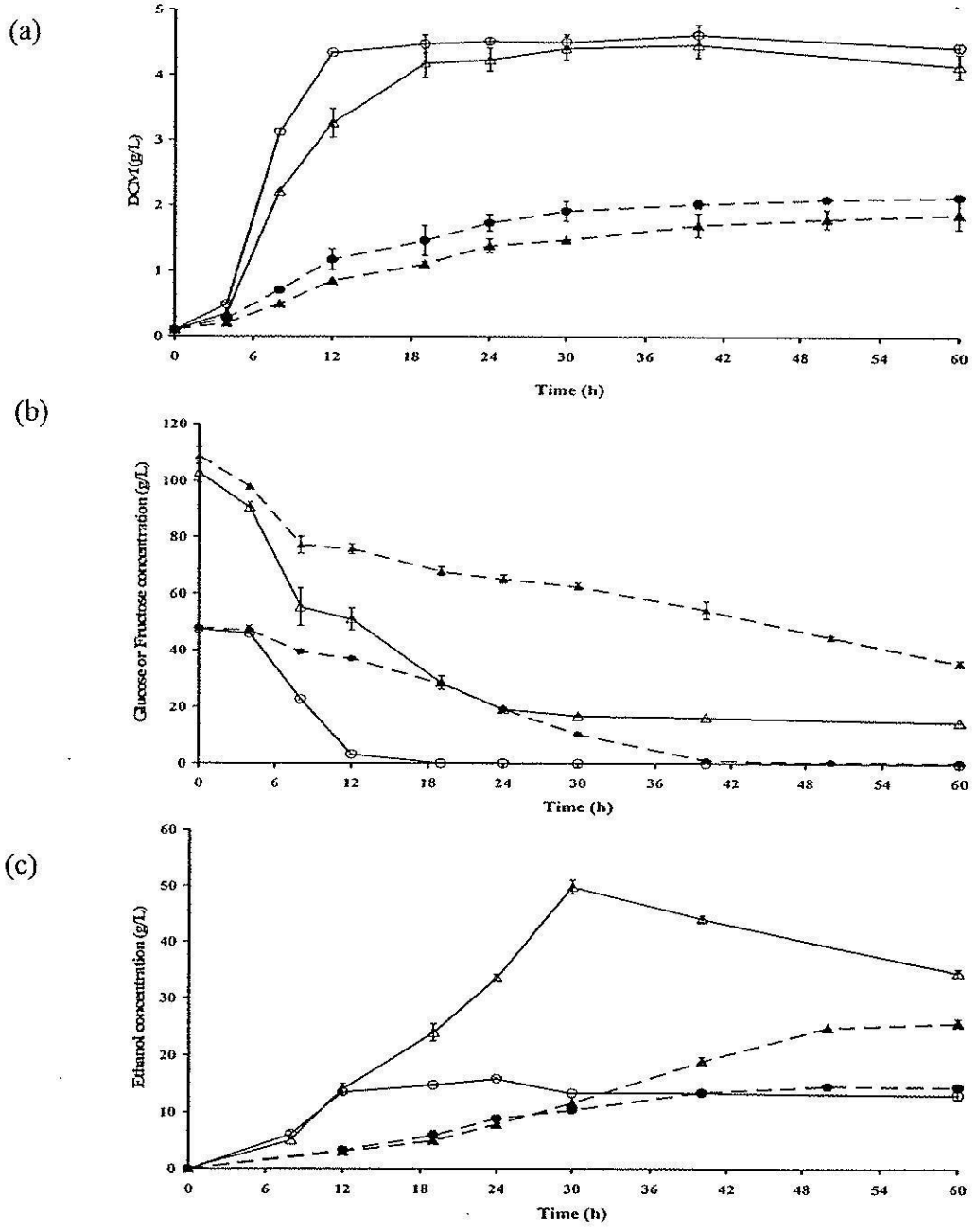
4 ผลของการเขย่าต่อการผลิตเอทานอล

จากผลการทดลองก่อนหน้า พบว่าเชื้อ *I. orientalis* S1 สามารถผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส โดยความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 50 กรัม/ลิตร ส่วนน้ำตาลฟรุกโตสอยู่ที่ 100 กรัม/ลิตร สำหรับการทดลองผลของการเขย่าต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ *I. orientalis* S1 จะทำการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหาร YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัม/ลิตร และอาหาร YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส 100 กรัม/ลิตร ด้วยสภาวะที่มีการเขย่า ผลของการทดลองแสดงดังในรูปที่ 30 จะเห็นได้ว่า น้ำตาลกลูโคสถูกใช้หมดไปอย่าง

รวดเร็วและหมดภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากเริ่มการหมัก และพบว่าอัตราการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะที่มีการเขย่าเพิ่มขึ้น 3.06 เท่า เมื่อเทียบกับไม่ได้เขย่า ในสภาวะที่มีการเขย่า เชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 มีความสามารถในการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอลสูงขึ้น ซึ่งถ้ามีปริมาณของน้ำตาลในอาหารมากขึ้นอาจจะสามารถเพิ่มความสามารถในผลิตเอทานอลได้ จากรูป 29c พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลฟรุกโตสที่ 60 ชั่วโมงลดลงถึง 30.7% เมื่อเทียบกับชั่วโมงที่ 30 ทั้งนี้ เนื่องมาจาก หลังจากชั่วโมงที่ 30 ของกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณของน้ำตาลมีน้อยมาก จึงทำให้เมทาโบลิซึมของยีสต์เปลี่ยนไป ซึ่งผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจากกระบวนการหมัก (เอทานอล) จะถูกใช้เป็นแหล่งอาหารทดแทนได้ และถูกใช้ไปถ้ามีออกซิเจน การเปลี่ยนกระบวนการเมทาโบลิซึมนี้ เรียกว่า diauxic shift (Pronk *et al.*, 1996)

การเขย่ามีผลที่สำคัญต่อการทำให้ส่วนกระกอบต่างๆ ของอาหารผสมเป็นเนื้อเดียวกันและทำให้เซลล์ของยีสต์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ (Doran, 1997; Walker, 1998) จึงมีผลทำให้อัตราการเจริญ อัตราการใช้น้ำตาล และอัตราการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ในสภาวะที่มีการเขย่าสูงกว่าสภาวะที่ไม่มีการเขย่าเป็นอย่างมาก (รูปที่ 30)

อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่มีการเขย่าพบว่ามีลักษณะทางกายภาพของเซลล์ยีสต์ *I. orientalis* S1 แตกต่างกับเซลล์ที่อยู่ในสภาวะไม่เขย่า ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า พบว่าเซลล์ของยีสต์ *I. orientalis* S1 จะพบการสร้าง psudomycelium และมีขนาดของเซลล์ขนาดใหญ่กว่าในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า ในสภาวะที่มีการเขย่าไม่พบว่ามีการสร้าง psudomycelium และมีปริมาณของเซลล์มากกว่าในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า นอกจากนี้ การเปลี่ยนทางกายภาพของเซลล์ยีสต์ *I. orientalis* S1 เนื่องจากการเขย่าอาจจะยังมีผลต่อกิจกรรมของเซลล์และการผลิตเอทานอลด้วยเช่นกัน



รูปที่ 30 การเจริญ การใช้น้ำตาลฟรุกโตส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ปริมาตร 150 มล. ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร และในอาหาร YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส 100 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ใช้หัวเชื้อที่ 5% ค่า pH เริ่มต้นที่ 6.0 และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส: (a) การเจริญของเชื้อ *I.orientalis* S1 (b) การใช้น้ำตาลกลูโคส และ (c) การผลิตเอทานอล; —●— ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่มีการเขย่า, - -⊖- - ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า, —▲— ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสในสภาวะที่มีการเขย่า และ - -△- - ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า

Table 11 ค่า yield ของเอทานอล (g/g), อัตราการผลิตเอทานอล (g/L/h) และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *I. orientalis* S1ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร YM 150 มล. ที่มี 50 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสและอาหาร YM ที่มีน้ำตาลฟรุกโตส 100 กรัม/ลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 รอบ/นาที

สภาวะ	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ค่า yield ของเอทานอล (กรัม/กรัม)
Static			
50 g/L glucose	0.216 ± 0.011^{b}	0.370 ± 0.029^{a}	0.333 ± 0.002^{ab}
100 g/L fructose	0.183 ± 0.001^{a}	0.328 ± 0.023^{a}	0.360 ± 0.022^{b}
Shaking			
50 g/L glucose	0.349 ± 0.001^{d}	1.130 ± 0.051^{b}	0.319 ± 0.010^{a}
100 g/L fructose	0.309 ± 0.003^{c}	1.398 ± 0.026^{c}	0.484 ± 0.006^{c}

Values followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

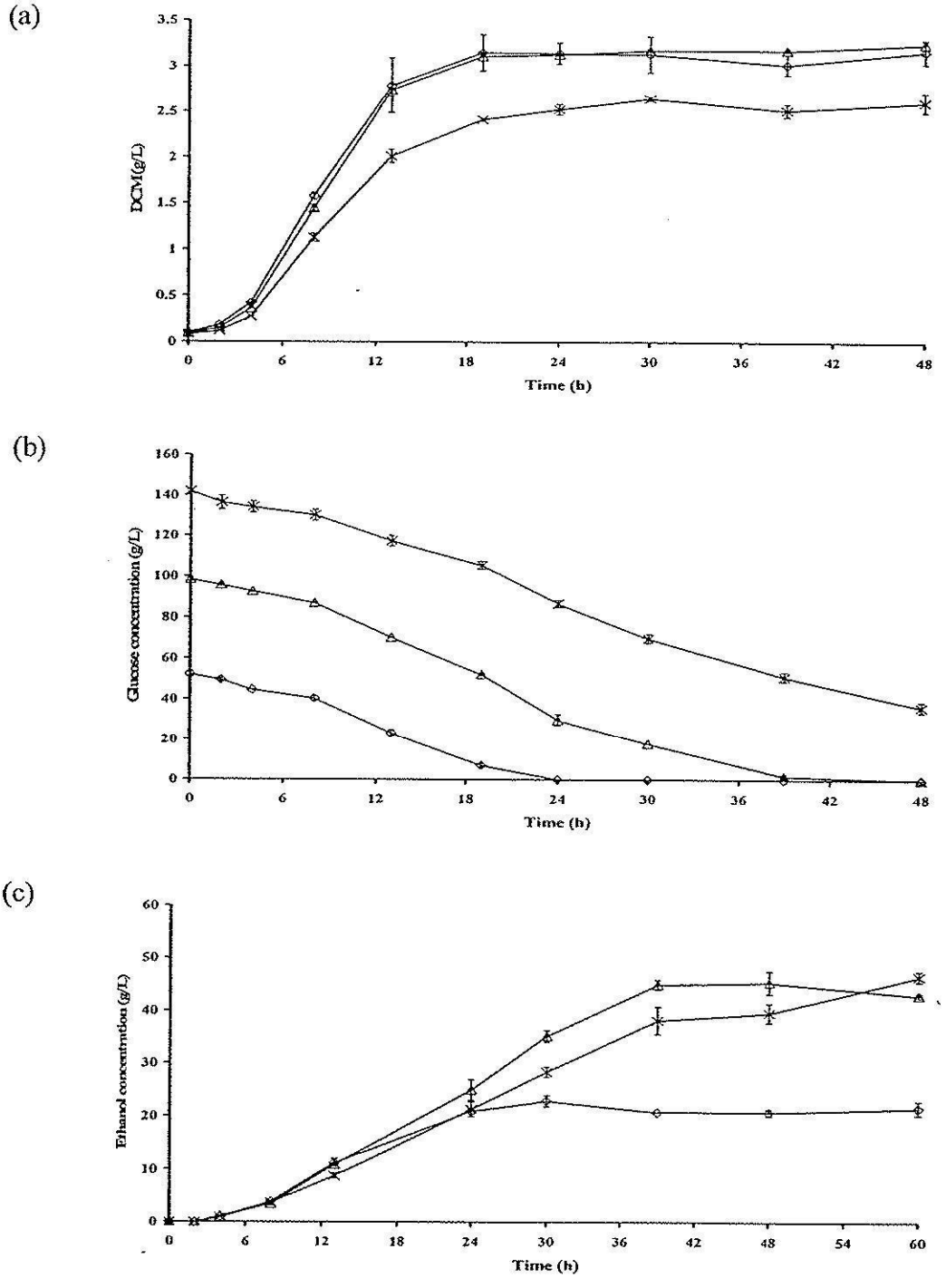
5 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสต่อการผลิตเอทานอลในสภาวะที่มีการเขย่า

จากตารางที่ 11 พบว่าสภาวะที่มีการเขย่ามีผลเป็นอย่างมากต่อการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารลดลงอย่างรวดเร็วและดูเหมือนว่ายังสามารถใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงกว่าในการทดลองก่อนหน้าได้ ดั้งนั้นจึงมีการทำการทดลองหาความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ในสภาวะที่มีการเขย่า

ผลของการเจริญ การใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอลแสดงดังในรูปที่ 31 และ 32 การเจริญของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 50 กรัม/ลิตรให้ผลเหมือนกับอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม/ลิตร และอัตราการเจริญลดลงเมื่อน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 กรัม/ลิตร ในการผลิตเอทานอล พบว่าอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดในอาหาร YM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 100 กรัม/ลิตร (1.189 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง, ตารางที่ 12) นอกจากนี้ ผลของการทดสอบในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลฟรุกโตสก็ให้ผลเช่นเดียวกับอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการเจริญ อัตราการผลิตเอทานอล และค่า yield ของเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ในสภาวะที่มีการเขย่า (ตารางที่ 12) กับในสภาวะที่ไม่มีการเขย่า

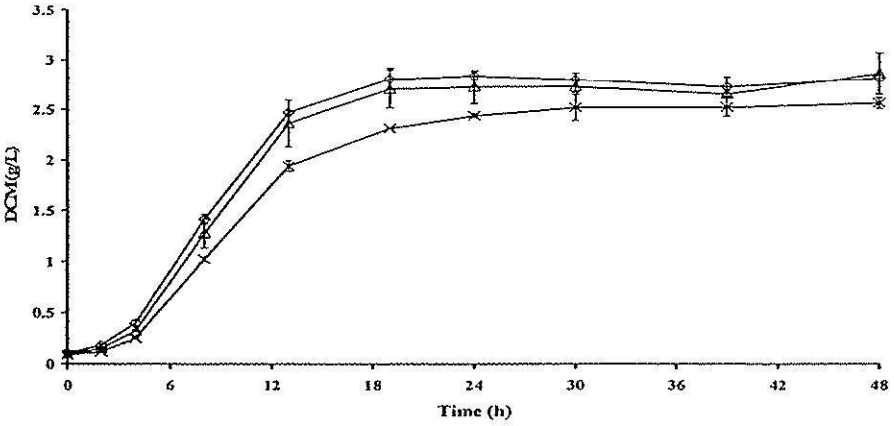
(ตารางที่ 10) พบว่าค่าต่างๆ เพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากทั้งในอาหาร YM ที่ใช้กลูโคสและอาหาร YM ที่ใช้ฟรุกโตส

อย่างไรก็ตาม การเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอลนั้นสามารถถูกยับยั้งได้ เนื่องมาจากผลของความดันออสโมติก และ/หรือความเข้มข้นของน้ำตาลในระดับสูงในอาหาร (Ghose and Tyagi, 1979)

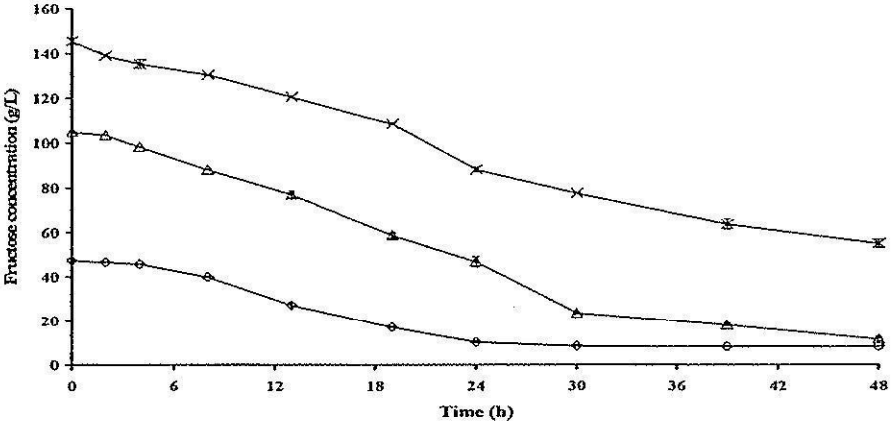


รูปที่ 31 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ปริมาตร 150 มล. ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ใสภาวะที่มีการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ใช้หัวเชื้อที่ 5% ค่า pH เริ่มต้นที่ 6.0 และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส: (a) การเจริญของเชื้อ *I. orientalis* S1 (b) การใช้น้ำตาลกลูโคส และ (c) การผลิตเอทานอล; ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ ◇ 50 กรัม/ลิตร, △ 100 กรัม/ลิตร และ ✳ 150 กรัม/ลิตร

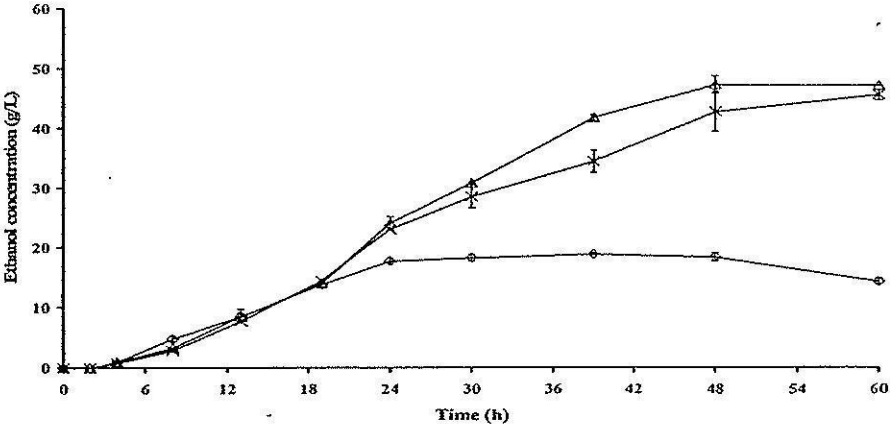
(a)



(b)



(c)



รูปที่ 32 การเจริญ การใช้น้ำตาลฟรุกโตส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ปริมาตร 150 มล. ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตส 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ใสภาวะที่มีการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ใช้หัวเชื้อที่ 5% ค่า pH เริ่มต้นที่ 6.0 และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส: (a) การเจริญของเชื้อ *I. orientalis* S1 (b) การใช้น้ำตาลฟรุกโตส และ (c) การผลิตเอทานอล; ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสที่ ◇ 50 กรัม/ลิตร, △ 100 กรัม/ลิตร และ ✳ 150 กรัม/ลิตร

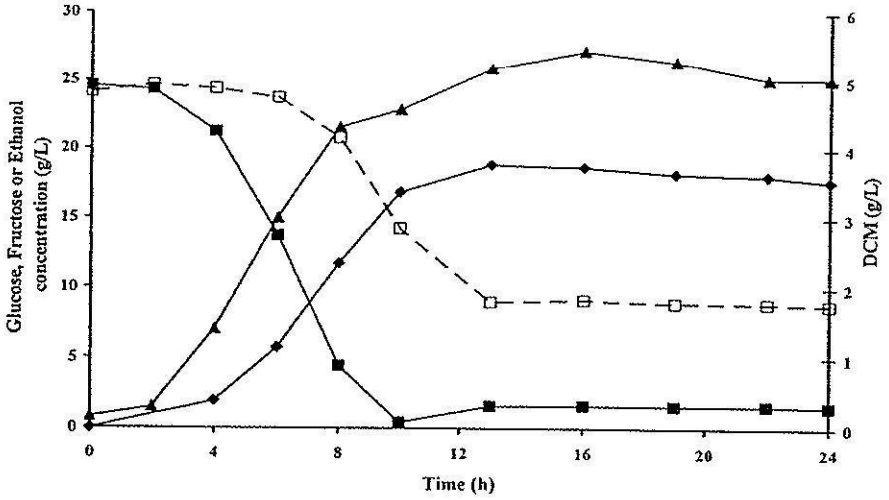
Table 12 ค่า yield ของเอทานอล (g/g), อัตราการผลิตเอทานอล (g/L/h) และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *I. orientalis* S1ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร YM 150 มล. ที่มี 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคส และอาหาร YM ที่มี 50, 100 และ 150 กรัม/ลิตร ของน้ำตาลฟรุกโตส ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มที่ 40 องศาเซลเซียสและเขย่าที่ 200 รอบ/นาที

ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัม/ลิตร)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ค่า yield ของเอทานอล (กรัม/กรัม)
Glucose			
50	0.355 ± 0.001^{ab}	0.999 ± 0.033^{b}	0.442 ± 0.003^{ab}
100	0.372 ± 0.001^{b}	1.189 ± 0.097^{d}	0.464 ± 0.024^{abc}
150	0.372 ± 0.008^{b}	1.019 ± 0.070^{bc}	0.422 ± 0.026^{a}
Fructose			
50	0.337 ± 0.001^{a}	0.832 ± 0.029^{a}	0.482 ± 0.001^{bc}
100	0.353 ± 0.017^{ab}	1.168 ± 0.086^{cd}	0.506 ± 0.009^{c}
150	0.356 ± 0.003^{ab}	1.111 ± 0.010^{bcd}	0.473 ± 0.039^{abc}

Values followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

6 ลำดับของการใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส

จากผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 33 พบว่า เมื่อทำการเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีทั้งน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส เชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นลำดับแรก และสามารถใช้กลูโคสในอาหารได้ดีกว่าฟรุกโตส จากรูปที่ 33 จะเห็นได้ว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลฟรุกโตสนั้นเหลืออยู่ในระดับที่ค่อนข้างสูง เมื่อเทียบกับกลูโคส สำหรับสาเหตุของเชื้อที่เลือกใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นลำดับแรกนั้น ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน ซึ่งได้มีการพยายามที่จะศึกษาไปถึงลักษณะพื้นฐานทางกายภาพและโมเลกุลที่แตกต่างกันของน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส (Berthels *et al.*, 2008; Guillaume *et al.*, 2007).



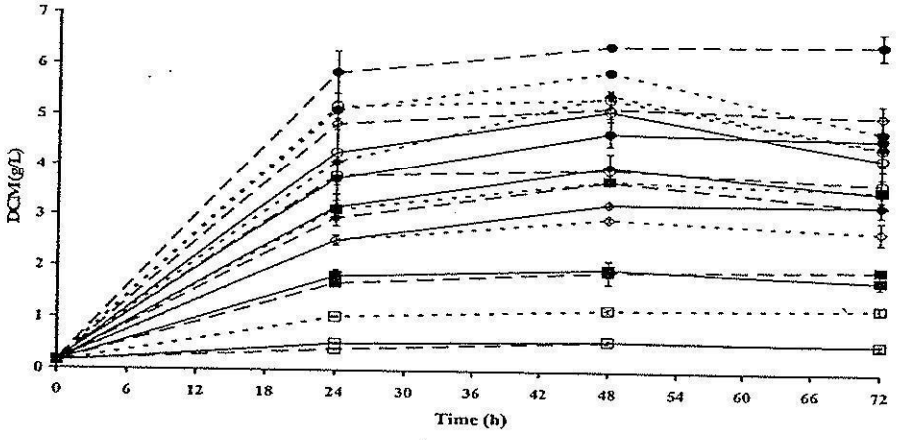
รูปที่ 33 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ปริมาตร 150 มล. ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของน้ำตาลฟฟรุกโตส 25 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ใสภาวะที่มีการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ใช้หัวเชื้อที่ 5% ค่าพีเอชเริ่มต้นที่ 6.0 และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส; —▲— การเจริญของเชื้อ *I. orientalis* S1, —■— การใช้น้ำตาลกลูโคส, -□- การใช้น้ำตาลฟรุกโตส และ —◆— การผลิตเอทานอล

7 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตเอทานอล

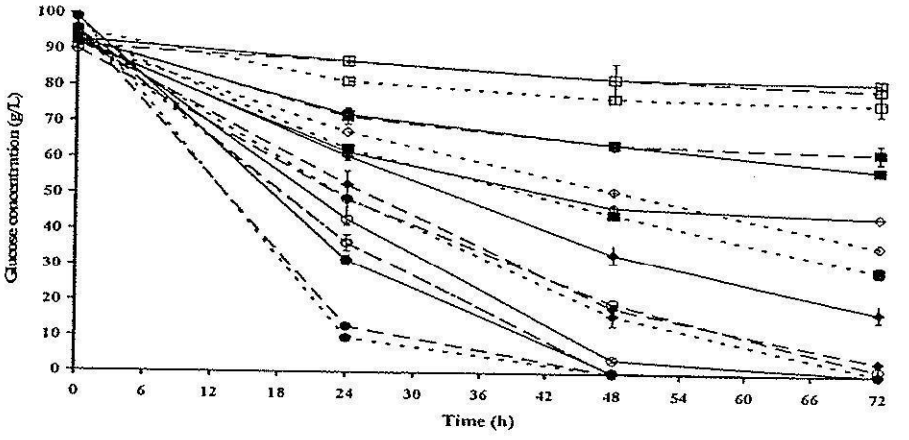
การศึกษาผลของความเข้มข้นและสัดส่วนของแหล่งไนโตรเจนจะทำการศึกษาดังที่ออกแบบการศึกษาดังในตารางที่ 8 ผลของชนิดและสัดส่วนของแหล่งไนโตรเจนแสดงดังในรูปที่ 34 และตารางที่ 13 อัตราการเจริญ อัตราการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 มีความสัมพันธ์กับชนิดและสัดส่วนของแหล่งไนโตรเจน และแม้ว่าจะไม่มีแหล่งไนโตเจน (trial 1) เชื้อยิสต์ *I. orientalis* S1 ก็สามารถเจริญได้ แต่ต่ำมาก ไม่มีการผลิตเอทานอล และมีอัตราการใช้น้ำตาลที่ต่ำมากเช่นกัน จากการทดลองยังพบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน (trial 2, 2.0 กรัม/ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต) ไม่มีผลในการกระตุ้นการเจริญของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการขาดแร่ธาตุและสารอาหารบางชนิด และ/หรือสารกระตุ้นการเจริญบางอย่าง เมื่อทำการเติมyeast extract, malt extract และ/หรือ peptone ลงไปในอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงยีสต์ พบว่าการเจริญ อัตราการใช้น้ำตาล และการผลิตเทานอลเพิ่มขึ้นตามปริมาณและชนิดที่ทำการเติม ดังนั้น การเติมแหล่งของไนโตรเจนที่เป็นอินทรีย์ ได้แก่ yeast extract, malt extract และ/หรือ peptone ลงไปในอาหารนั้น เป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์และการผลิตเอทานอลใน

อาหาร enrich จากการทดลองพบว่า เมื่อทำการเติมแหล่งของไนโตรเจนตามสูตรของอาหาร YM ดังใน trial ที่ 17 จะให้ค่าการเจริญสูงสุด (รูปที่ 34a และ ตารางที่ 13) อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการเพิ่มแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปในอาหาร YM (trial 18) พบว่าอัตราการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นถึง 1.4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับ trial 17 การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปในอาหารนั้น ช่วยให้ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนสูงขึ้นและมีผลในการกระตุ้นอัตราการผลิตเอทานอลของเชื้อ *I. orientalis* S1 แหล่งของไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนนั้น มีความสำคัญเป็นอย่างมากในกระบวนการหมักของเชื้อจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรม ซึ่งจะมีผลทั้งต่อการเจริญและผลผลิตของเชื้อ และอาจจะมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเมทาโบลิซึมของเชื้อจุลินทรีย์ (Peter *et al.*, 2006; Júnior *et al.*, 2008).

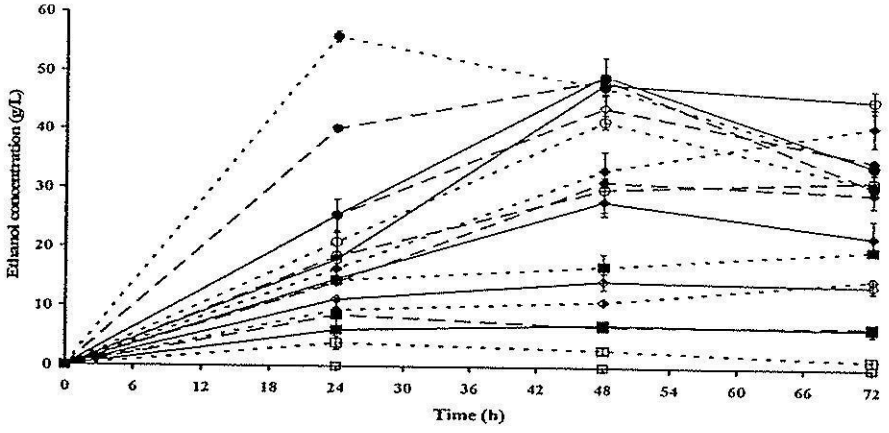
(a)



(b)



(c)



รูปที่ 34 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ปริมาตร 150 มล. ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มล. ใสภาวะที่มีการเขย่าที่ 200 รอบ/นาที ใช้หัวเชื้อที่ 5% ค่า พีเอชเริ่มต้นที่ 6.0 และบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส: (a) การเจริญของเชื้อ *I. orientalis* S1 (b) การใช้น้ำตาลกลูโคส และ (c) การผลิตเอทานอล; trail 1, trail 2, trail 3, trail 4, trail 5, trail 6, trail 7, trail 8, trail 9, trail 10, trail 11, trail 12, trail 13, trail 14, trail 15, trail 16, trail 17 and trail 18.

Table 13 ค่า yield ของเอทานอล (g/g), อัตราการผลิตเอทานอล (g/L/h) และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *I. orientalis* S1ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร YM ปริมาตร 150 มล. ที่มีน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตรของ ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ 200 รอบ/นาที

Trail	แหล่งอาหารไนโตรเจน	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ค่า yield ของเอทานอล (กรัม/กรัม)
1	No	0.015 ± 0.001^{a}	0^{a}	0^{a}
2	2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.011 ± 0.001^{a}	0^{a}	0^{a}
3	1.5 g/L malt extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.037 ± 0.001^{b}	0.162 ± 0.027^{b}	0.202 ± 0.047^{b}
4	3.0 g/L malt extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.069 ± 0.005^{c}	0.253 ± 0.024^{bc}	0.203 ± 0.010^{b}
5	1.5 g/L yeast extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.064 ± 0.003^{c}	0.357 ± 0.044^{cd}	0.280 ± 0.098^{c}
6	1.5 g/L yeast extract 1.5 g/L malt extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.124 ± 0.007^{d}	0.599 ± 0.003^{d}	0.307 ± 0.019^{cd}
7	3.0 g/L yeast extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.098 ± 0.004^{d}	0.392 ± 0.005^{d}	0.269 ± 0.007^{cd}
8	3.0 g/L yeast extract 3.0 g/L malt extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.195 ± 0.002^{fg}	1.056 ± 0.034^{fg}	0.463 ± 0.026^{de}
9	2.5 g/L peptone 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.098 ± 0.004^{c}	0.392 ± 0.005^{c}	0.269 ± 0.007^{cd}
10	2.5 g/L peptone 1.5 g/L malt extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.126 ± 0.010^{h}	0.610 ± 0.041^{h}	0.375 ± 0.009^{fg}
11	2.5 g/L peptone 1.5 g/L yeast extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.117 ± 0.007^{e}	0.587 ± 0.009^{e}	0.355 ± 0.022^{e}
12	2.5 g/L peptone 1.5 g/L yeast extract 1.5 g/L malt extract	0.164 ± 0.027^{h}	0.683 ± 0.035^{g}	0.438 ± 0.118^{f}

13	2.5 g/L peptone 1.5 g/L yeast extract 1.5 g/L malt extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.171 ± 0.004^{dc}	0.749 ± 0.016^{c}	0.502 ± 0.002^{dc}
14	5.0 g/L peptone 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.151 ± 0.001^{f}	0.770 ± 0.012^{b}	0.357 ± 0.013^{g}
15	5.0 g/L peptone 3.0 g/L malt extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.208 ± 0.012^{fg}	0.871 ± 0.018^{ef}	0.445 ± 0.065^{f}
16	5.0 g/L peptone 3.0 g/L yeast extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.148 ± 0.005^{i}	1.060 ± 0.112^{i}	0.499 ± 0.028^{g}
17	5.0 g/L peptone 3.0 g/L yeast extract 3.0 g/L maltextract	0.237 ± 0.017^{g}	1.671 ± 0.035^{f}	0.510 ± 0.027^{g}
18	5.0 g/L peptone 3.0 g/L yeast extract 3.0 g/L malt extract 2.0 g/L $(NH_4)_2SO_4$	0.205 ± 0.008^{h}	2.328 ± 0.040^{j}	0.511 ± 0.009^{g}

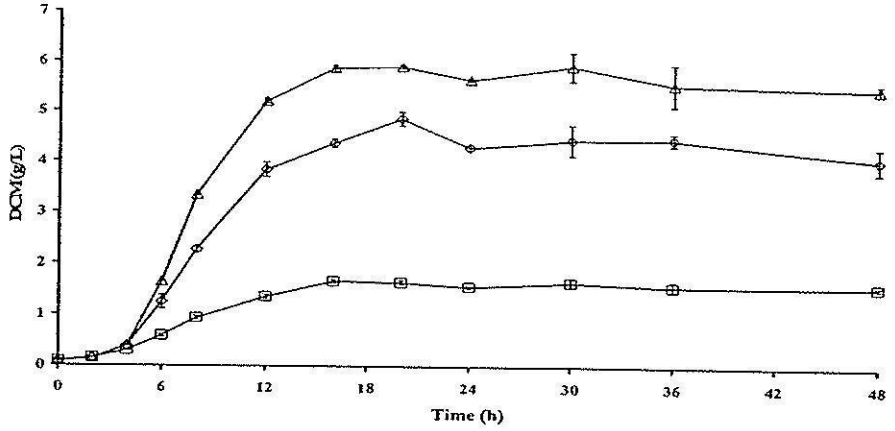
Values followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

8 การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร แบบ batch

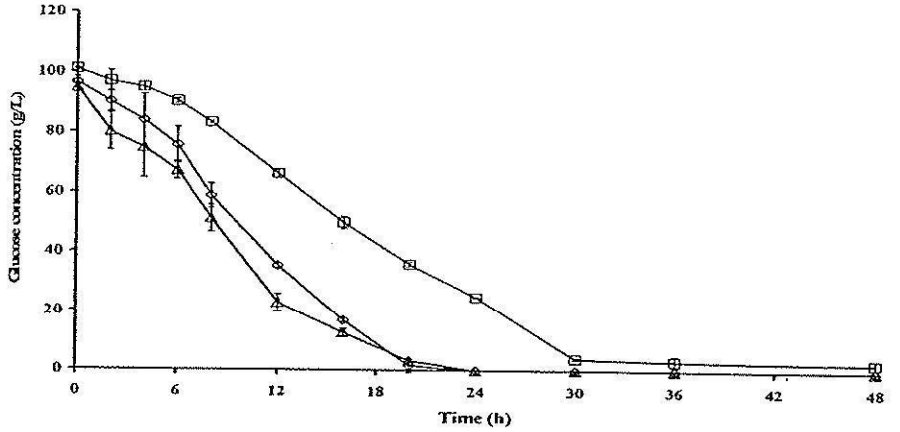
8.1 ผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอทานอล

การเจริญ การใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักที่อัตราการให้อากาศต่างๆ แสดงในรูปที่ 35 พบว่า เมื่อให้อากาศที่อัตรา 1 vvm เชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 จะให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ (รูปที่ 35a) และค่าการเจริญจำเพาะ (ตารางที่ 14) สูงสุด การเติมอากาศเข้าไปในถังหมักจะช่วยกระตุ้นการเจริญของเชื้อยีสต์ แต่ในทางตรงกันข้าม ทำให้การผลิตเอทานอลลดลง จากการทดลอง เมื่อไม่ให้อากาศเข้าไปในถังหมัก ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้ในอาหารและค่า yield ของเอทานอลจะให้ค่าสูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 35c และตารางที่ 14 นอกจากนี้ เมื่อมีการให้อากาศเข้าไปในถังหมัก พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารจะลดลงหลังจากน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ในอาหารหมดลง ซึ่งมีสาเหตุมาจากกระบวนการ diauxic shift ที่เกิดขึ้นของยีสต์ โดยยีสต์จะใช้เอทานอลเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนทดแทนน้ำตาลที่ขาดแคลน (Pronk *et al.*, 1996)

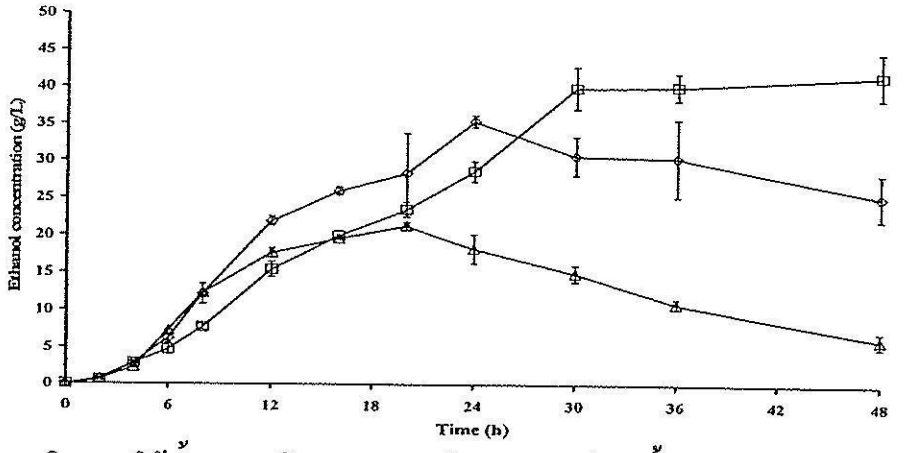
(a)



(b)



(c)



รูปที่ 35 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ปริมาตร 1 ลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และ 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ทำการกวนที่ 100 รอบ/นาที ใช้หัวเชื้อที่ 5% ควบคุมค่าพีเอชที่ 4.0 และควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส: (a) การเจริญของเชื้อ *I. orientalis* S1 (b) การใช้น้ำตาลกลูโคส และ (c) การผลิตเอทานอล; อัตราการให้อากาศที่ ⊞ 0 vvm, ◇ 0.2 vvm, and △ 1.0 vvm

Table 14 ค่า yield ของเอทานอล (g/g), อัตราการผลิตเอทานอล (g/L/h) และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *I. orientalis* S1ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร YM ปริมาตร 1 ลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม/ลิตร และ 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ ของ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ทำการให้อากาศที่อัตราต่างๆ ทำการกวนที่ 100 รอบ/นาที ควบคุมค่าพีเอชที่ 4.0 และควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส

อัตราการให้อากาศ (vvm)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ค่า yield ของเอทานอล (กรัม/กรัม)
0	0.297 ± 0.001^a	1.194 ± 0.058^b	0.437 ± 0.007^c
0.2	0.430 ± 0.004^b	1.476 ± 0.034^c	0.368 ± 0.016^b
1.0	0.482 ± 0.002^c	1.065 ± 0.025^a	0.225 ± 0.002^a

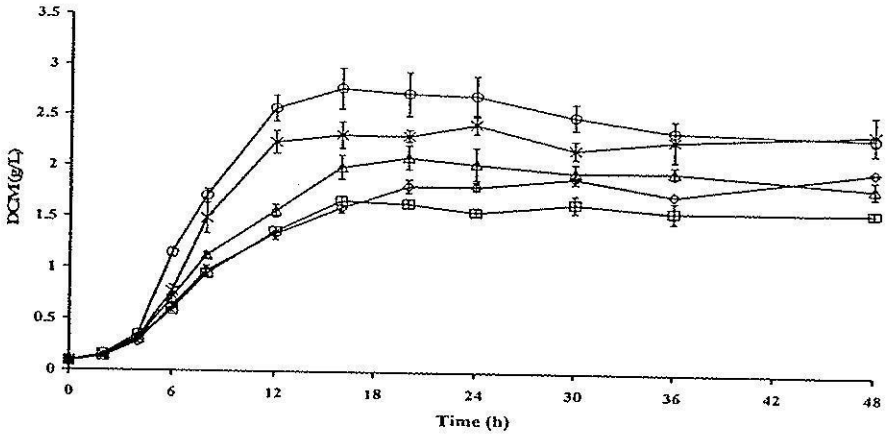
Values followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

8.2 ผลของอัตราเร็วในการกวนต่อการผลิตเอทานอล

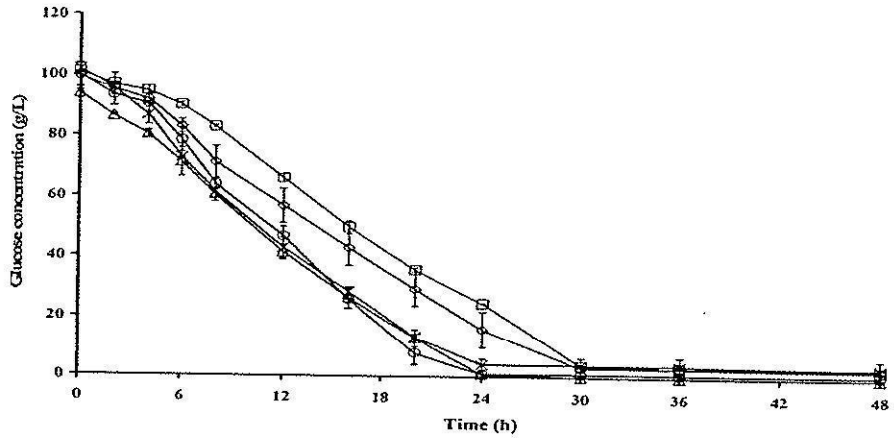
จากการศึกษาพบว่า การเพิ่มอัตราเร็วในการกวนที่มีผลทำให้การเจริญ อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลสูงขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 36 และตารางที่ 14 การกวนที่อัตราเร็ว 500 รอบ/นาทีให้ค่าของอัตราการผลิตเอทานอลที่สูงสุด (1.886 ± 0.056 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) และให้ค่า yield ของเอทานอลที่ 0.516 ± 0.026 กรัม/กรัม เนื่องจากมีข้อจำกัดของเครื่องมือ จึงไม่สามารถทำการศึกษาที่ความเร็วของการกวนที่สูงกว่านี้ได้

Kongkiattikajorn *et al.* (2007) รายงานว่า การกวนมีผลโดยตรงต่อปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในอาหารเหลว และยังมีผลทำให้เกิดการผสมเป็นเนื้อเดียวกันของส่วนประกอบต่างที่มีอยู่ในอาหารและมีผลต่อกระบวนการถ่ายเทมวลของสารต่างๆ การกวนจะช่วยให้กระบวนการหมักเกิดได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น และยังช่วยให้เกิดการถ่ายเทความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักได้ดีขึ้น นอกจากนี้ แรงเฉือนที่เกิดขึ้นจากการกวนยังมีผลต่อลักษณะทางกายภาพของเชื้อจุลินทรีย์ อัตราการเจริญ และกระบวนการสร้างผลผลิต รวมถึงอาจจะทำลายโครงสร้างของเซลล์ได้เช่นกัน (Mittal, 1992)

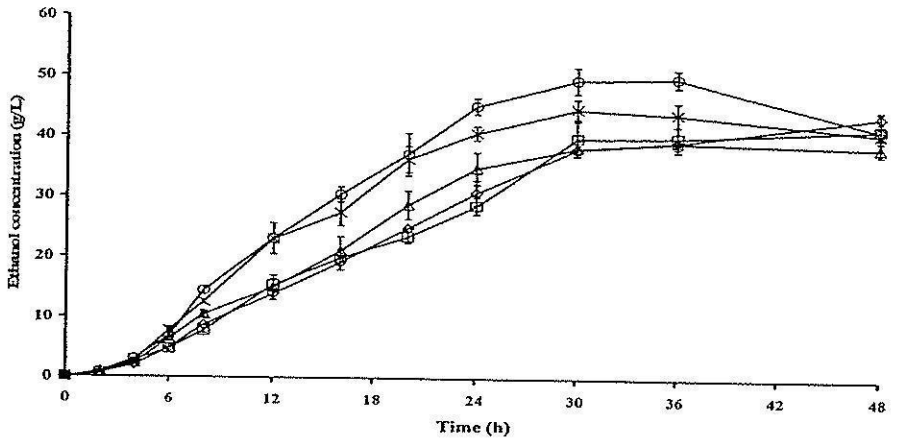
(a)



(b)



(c)



รูปที่ 36 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ปริมาตร 1 ลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และ 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ใช้หัวเชื้อที่ 5% ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 และควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส: (a) การเจริญของเชื้อ *I. orientalis* S1 (b) การใช้น้ำตาลกลูโคส และ (c) การผลิตเอทานอล; ; ความเร็วในการกวน ⊟ 100 รอบ/นาที, ◇ 200 รอบ/นาที, △ 300 รอบ/นาที, ✳ 400 รอบ/นาที และ ○ 500 รอบ/นาที

ตารางที่ 15 ค่า yield ของเอทานอล (g/g), อัตราการผลิตเอทานอล (g/L/h) และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *I. orientalis* S1ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร YM ปริมาตร 1 ลิตร ที่มีน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม/ลิตร และ 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ ของ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ที่ทำการกวนที่ความเร็วรอบต่างๆ ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 และควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส

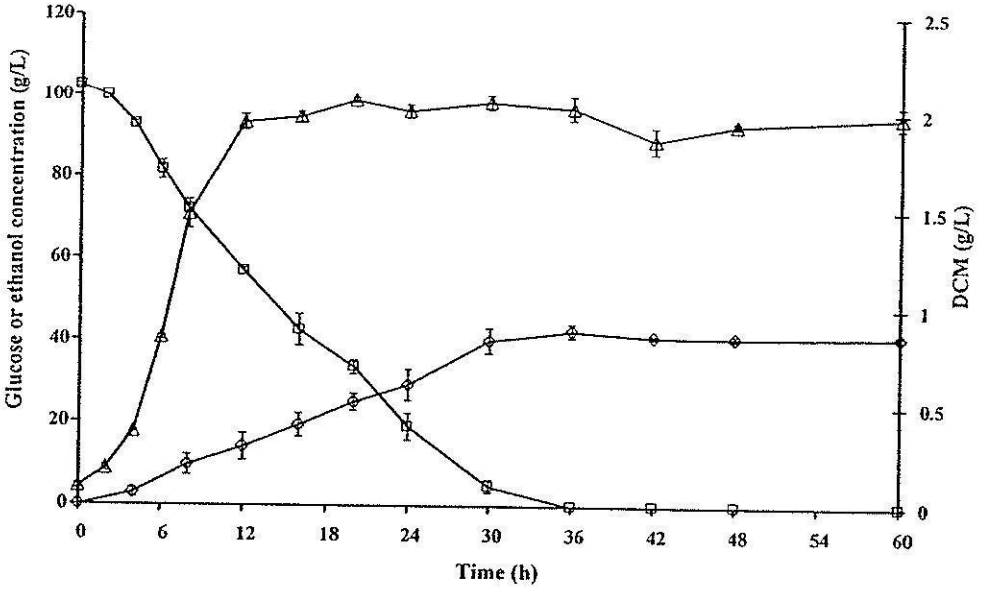
อัตราการให้อากาศ (rpm)	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ค่า yield ของเอทานอล (กรัม/กรัม)
100	0.297 ± 0.001^{a}	1.194 ± 0.058^{a}	0.437 ± 0.007^{a}
200	0.314 ± 0.010^{a}	1.286 ± 0.086^{ab}	0.455 ± 0.033^{a}
300	0.340 ± 0.007^{b}	1.454 ± 0.112^{b}	0.425 ± 0.001^{a}
400	0.368 ± 0.012^{c}	1.699 ± 0.048^{c}	0.464 ± 0.011^{a}
500	0.370 ± 0.009^{c}	1.886 ± 0.056^{c}	0.516 ± 0.026^{b}

Values followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

9 การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ batch

ผลของการเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 หมักขนาด 10 ลิตร แสดงดังในรูปที่ 37 พบว่าเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 เจริญอย่างรวดเร็วและเข้าสู่ช่วง stationary หลังจากชั่วโมงที่ 12 ส่วนการผลิตเอทานอลจะเริ่มลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 30 เนื่องจากขาดน้ำตาลกลูโคส โดยได้ความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารสูงสุดอยู่ที่ 4.780 ± 1.490 กรัม/ลิตร

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบค่าการเจริญจำเพาะ อัตราการผลิตเอทานอล และค่า yield ของเอทานอลของการหมักในถังหมักขนาด 10 ลิตร กับถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าในถังหมักขนาด 10 ลิตรให้ค่าทางจลศาสตร์ต่ำกว่าในถังหมักขนาด 2 ลิตร (ตารางที่ 14 และตารางที่ 16) ผลของการขยายขนาดของถังหมักต่อกระบวนการหมัก เป็นสิ่งที่มีความซับซ้อนและไม่สามารถทำนายได้อย่างแม่นยำ โดยส่วนใหญ่พบว่าค่า yield ของเซลล์ และผลผลิตที่เกี่ยวเนื่องกับการเจริญจะลดลง เมื่อทำการขยายขนาดของถังหมักภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน (Hewitt and Nienow, 2007)



รูปที่ 37 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ปริมาตร 6 ลิตร ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และ 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ใช้หัวเชื้อที่ 5% ควบคุมค่าพีเอชที่ 4.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และการกวนที่ 500 รอบ/นาที : ⊟ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร), ◇ ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร) และ △ DCM (กรัม/ลิตร)

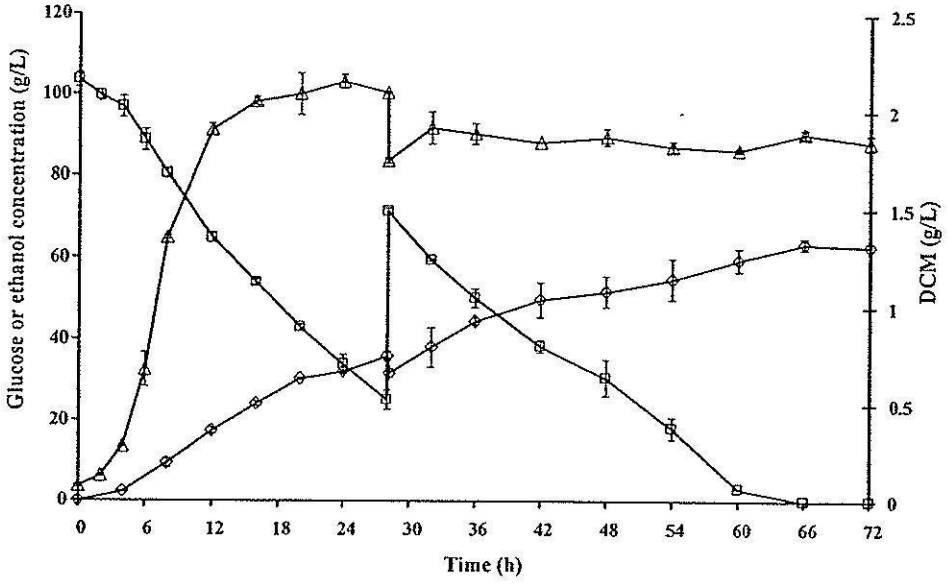
10 การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ fed-batch

ในการทำการหมักแบบ fed-batch ในถังหมักขนาด 10 ลิตร เพื่อเพิ่มการเพิ่มการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 โดยทำการเลี้ยงที่สภาวะเหมือนกับที่ใช้เลี้ยงแบบ batch จากนั้นก็จะทำการเติมน้ำเชื่อมที่มีความเข้มข้นสูงของน้ำตาลกลูโคสเข้าไปในถังหมักเพื่อเพิ่มแหล่งอาหารคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

10.1 Fed-batch A

จากผลการทดลองแบบ batch ในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่าน้ำตาลกลูโคสจะถูกใช้จนหมดภายในเวลา 30 ชั่วโมงหลังจากเริ่มการหมัก ในการทดลองของ Fed-batch A น้ำตาลกลูโคสปริมาณ 350 กรัมในปริมาตร 1 ลิตร ถูกเติมลงไปในถังหมักก่อนที่น้ำตาลในถังหมักหมด ซึ่งจะเติมในชั่วโมงที่ 28 โดยการเติมน้ำตาลกลูโคสลงไปนั้น จะให้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเพิ่มขึ้นประมาณ 50 กรัมต่อลิตร ผลของการทดลองของ fed-batch A แสดงดังในรูปที่ 38 พบว่าการเติมกลูโคสสามารถเพิ่มการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ได้มากขึ้น โดยมีความเข้มข้น

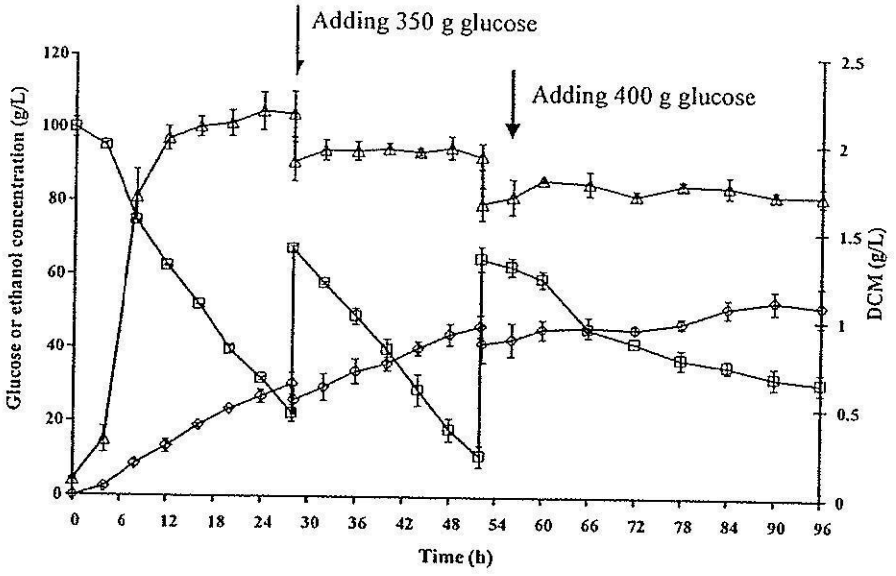
สูงสุดอยู่ที่ 63.60 ±1.45 กรัม/ลิตร หรือ เพิ่มขึ้น1.6 เท่า เมื่อเทียบกับการผลิตเอทานอลแบบ batch ในถังหมักขนาด 10 ลิตร



รูปที่ 38 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และ 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ fed-batch ใช้หัวเชื้อที่ 5% ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และการกวนที่ 500 รอบ/นาที และทำการเติมน้ำเชื่อมกลูโคส 350 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 28 : ⊟ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร), ⟡ ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร) และ △ DCM (กรัม/ลิตร)

10.2 Fed-batch B

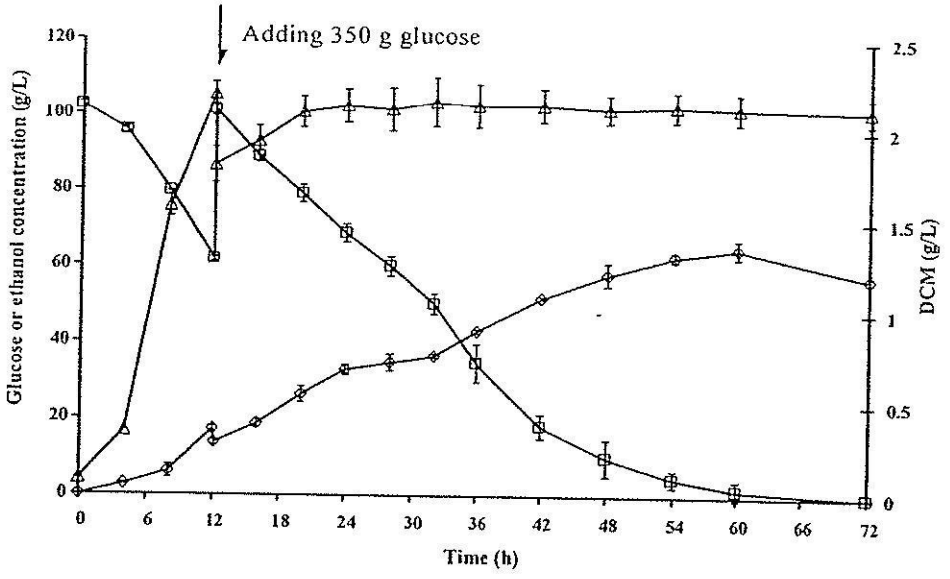
จากผลการทดลองของ fed-batch A การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเมื่อทำการเติมน้ำเชื่อมของน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลกลูโคสจะถูกใช้หมดภายใน 66 ชั่วโมงของกระบวนการหมัก ดังนั้น จึงคาดว่าการผลิตเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอีก ถ้ามีการเติมน้ำเชื่อมเพิ่มขึ้น ในการทดลอง Fed-batch B จะทำการเติมน้ำเชื่อมกลูโคสลงไป 2 ครั้ง ครั้งแรก เติม 350 กรัมของน้ำตาลกลูโคส ปริมาตร 1 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 28 ครั้งที่ 2 เติม 400 กรัม ของน้ำตาลกลูโคส ปริมาตร 1 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 52 ผลของ Fed-batch B แสดงในรูปที่ 39 พบว่า หลังจากการเติมน้ำตาลกลูโคสครั้งที่ 2 การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย ทั้งนี้อาจจะมีผลมาจากอายุของเชื้อยีสต์ และระยะการเจริญที่อยู่ในช่วงของ stationary ซึ่งเชื้อยีสต์มีความสามารถในการผลิตเอทานอลค่อนข้างต่ำ



รูปที่ 39 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และ 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ fed-batch ใช้หัวเชื้อที่ 5% ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และการกวนที่ 500 รอบ/นาที และทำการเติมน้ำเชื่อมกลูโคส 350 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 28 และ 400 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 52; ⊟ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร), ◇ ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร) และ △ DCM (กรัม/ลิตร)

10.3 Fed-batch C

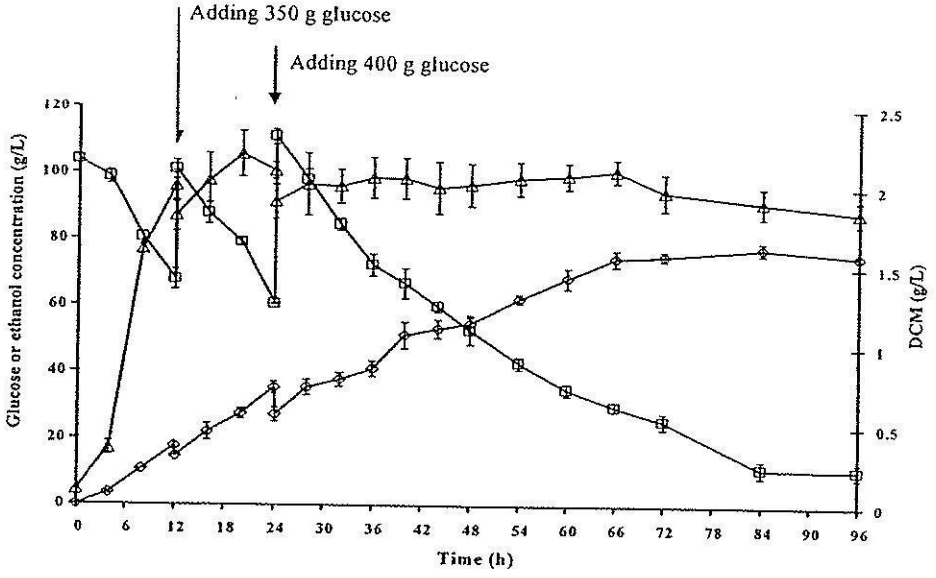
จากผลการทดลองของ Fed-bacth B เพื่อเพิ่มการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ช่วงเวลาของการเติมน้ำตาลกลูโคสได้เปลี่ยนมาเติมในช่วงการเจริญของเชื้อในช่วง exponential โดยจะทำการเติม 350 กรัมของน้ำตาลกลูโคสปริมาตร 1 ลิตรที่ชั่วโมงที่ 12 ผลของการทดลองแสดงในรูปที่ 40 เมื่อทำการเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอลของ Fed-batch C กับ A และ B พบว่า อัตราการผลิตเอทานอลของ Fed-batch C สูงขึ้นเป็น 1.33 ± 0.069 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง จาก 1.28 ± 0.04 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ใน Fed-batch A และ 1.04 ± 0.12 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ใน Fed-batch B (ตารางที่ 16) จากผลการทดลอง การเติมน้ำตาลกลูโคสในช่วงการเจริญ exponential สามารถช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตเอทานอลได้



รูปที่ 40 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และ 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ fed-batch ใช้หัวเชื้อที่ 5% ควบคุมค่าความเป็นกรดค่างที่ 4.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และการกวนที่ 500 รอบ/นาที และทำการเติมน้ำเชื่อมกลูโคส 350 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 : ⊟ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร), ◇ ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร) และ △ DCM (กรัม/ลิตร)

10.4 Fed-batch D

จากการทดลองใน Fed-batch C พบว่า เชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ใช้น้ำตาลกลูโคสไปอย่างรวดเร็วหลังจากการเติมน้ำตาลกลูโคสในชั่วโมงที่ 12 (350 กรัม กลูโคส ในปริมาตร 1 ลิตร) และเพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตเอทานอล จึงได้ทำการเติมน้ำตาลในช่วง exponential ครั้งที่ 2 โดยเติมทำการเติม 400 กรัม/ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 ผลของการทดลองแสดงดังในรูปที่ 41 พบว่า ใน Fed-batch D มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง อยู่ที่ 77.81 ± 1.88 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ ยังให้ค่าของอัตราการผลิตเอทานอล และค่า yield สูงอีกด้วย (ตารางที่ 16)



รูปที่ 41 การเจริญ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *I. orientalis* S1 ในอาหาร YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และ 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร แบบ fed-batch ใช้หัวเชื้อที่ 5% ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และการกวนที่ 500 รอบ/นาที และทำการเติมน้ำเชื่อมกลูโคส 350 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 และ 400 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24; ⊞ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร), ◇ ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร) และ △ DCM (กรัม/ลิตร)

Table 16 ค่า yield ของเอทานอล (g/g), อัตราการผลิตเอทนนอล (g/L/h) และอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *I. orientalis* S1 ที่ทำการเลี้ยงในถังหมักขนาด 10 ลิตรแบบ fed-batch ใช้หัวเชื้อที่ 5% ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างที่ 4.0 ควบคุมอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส และการกวนที่ 500 รอบ/นาที ที่มีน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม/ลิตร และ 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$

ชุดการทดลอง	อัตราการเจริญจำเพาะ (h^{-1})	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ค่า yield ของเอทานอล (กรัม/กรัม)
Batch	0.355 ± 0.012^{a}	1.335 ± 0.104^{f}	0.431 ± 0.005^{bcd}
Fed-batch A			
I. 0-28 h	0.371 ± 0.016^{a}	1.283 ± 0.040^{ef}	0.458 ± 0.018^{cd}
II. 28-72 h		0.914 ± 0.116^{bc}	0.508 ± 0.001^{d}
Fed-batch B			
I. 0-28 h	0.366 ± 0.001^{a}	1.084 ± 0.108^{cd}	0.393 ± 0.063^{abc}
II. 28-52 h		0.846 ± 0.035^{b}	0.324 ± 0.033^{a}
III. 52-96 h		0.314 ± 0.049^{a}	0.360 ± 0.079^{ab}
Fed-batch C			
I. 0-12 h	0.363 ± 0.002^{a}	1.427 ± 0.068^{f}	0.412 ± 0.009^{bc}
II. 12-72 h		1.068 ± 0.036^{cd}	0.507 ± 0.010^{d}
Fed-batch D			
I. 0-12 h	0.357 ± 0.005^{a}	1.474 ± 0.079^{f}	0.490 ± 0.001^{d}
II. 12-24 h		1.716 ± 0.150^{g}	0.506 ± 0.011^{d}
III. 24-96 h		1.132 ± 0.005^{de}	0.507 ± 0.001^{d}

Values followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

4.3 สรุปผลการทดลอง

เชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 สามารถเจริญได้ดีในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน แต่เจริญได้ไม่ดีเมื่อใช้น้ำตาลซูโครส แลคโตส กลีเซอรอล แมนนิทอล มอลโตส แป้งมันสำปะหลัง และแป้งมันฝรั่ง เป็นแหล่งคาร์บอน เมื่อทำการหมักขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ในสภาวะที่มีการเขย่า พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโตสที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 อยู่ที่ 100 กรัม/ลิตร ในอาหาร YM โดยเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนจะให้ค่าการเจริญที่ 0.352 h^{-1}, ค่า yield ของเอทานอลที่ 0.464 กรัม/กรัม และอัตราการผลิตเอทานอลที่ 1.189 g/L/h ส่วนเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนจะให้ค่าการเจริญที่ 0.526 h^{-1}, ค่า yield ของเอทานอลที่ 0.506 กรัม/กรัม และอัตราการการผลิตเอทานอลที่ 1.168 g/L/h และเมื่อทำการเติม 2 กรัม/ลิตร $(NH_4)_2SO_4$ ลงในอาหาร YM ที่มีกลูโคส 100 กรัม/ลิตร สามารถเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอลมากขึ้น 1.4 เท่า หรืออยู่ที่ 2.328 g/L/h

ในการทดสอบการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *I. orientalis* S1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร พบว่าในสภาวะที่ไม่มีอากาศและทำการกวนที่ 500 รอบ/นาที จะให้อัตราการเจริญจำเพาะที่ 0.37 h^{-1}, ค่า yield ของเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 0.516 กรัม/กรัม และอัตราการผลิตเอทานอลที่ 1.886 g/L/h

ในการทำการหมับแบบ fed-batch ในถังหมักขนาด 10 ลิตร พบว่า เมื่อทำการเติมน้ำเชื่อมกลูโคสลงไปในถังหมัก โดยเติม 350 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 และ 400 กรัม/ลิตร ปริมาตร 1 ลิตร ที่ชั่วโมงที่ 24 ให้ผลที่สูงสุดของค่าอัตราการเจริญที่ 0.357 h^{-1}, ค่า yield ของเอทานอลสูงสุดอยู่ที่ 0.506 กรัม/กรัม และอัตราการผลิตเอทานอลที่ 1.716 g/L/h

นอกจากนี้ จากการวิเคราะห์หาสารปนเปื้อน โดยวิธี GC พบว่า ไม่พบสารปนเปื้อนในกลุ่มฟูเซลออยล์ เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ และเมทิลแอลกอฮอล์

เอกสารอ้างอิง

Alexopoulos, C.J. (1962). Sub-class hemiascomycetidae the yeast and leaf-curl fungi. In **Introductory Mycology**. Second Edition. Japan: Toppan Printing Company. pp. 241-258.

Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S.E., Uribelarrea, J.L., Goma, G., and Benbadis, L. (2002). Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 60: 67-72.

Amore, T.D., Celotto, G., Russell, I., and Stewart, G.G. (2002). Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40 °C. **Enzyme and Microbial Technology**. 11(7): 411-416.

Anderson, P.J., McNeil, K., and Watson, K. (1986). High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at the temperature above 40 °C by *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* isolated from sugar mills. **Journal of Applied and Environmental Microbiology**. 51(6): 1314-1320.

Arthur, H. and Watson, K. (1976). Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. **Journal of Bacteriology**. Oct: 58-68.

Available: http://petruccilibrary.csufresno.edu

Available: http://www.bath.ac.uk

Available: http://www.cdb.riken.go.jp

Available: http://www.lip.sas.fr

Available: http://www.mycolog.com

Available: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

Available: http://www.supware.dk/phepdf/Rezex.pdf

Available: http://www.theartisan.net

Available: http://www.users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/Biologypages/Y/Yeast.mating. gif

Bajpai, P. and Margaritis, A. (1987). Kinetics of ethanol production by immobilized *Kluyveromyces marxianus* cells at varying sugar concentration of Jerusalem artichoke juice. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 26: 447-449.

Berthels, N. J., Cordero Otero, R. R., Bauer, F. F., Pretorius, I.S. and Thevelein, J. M. (2008). Correlation between glucose/fructose discrepancy and hexokinase kinetic properties in different *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 77: 1083-1091.

Boekhout, T. and Kurtzman, C.P. (1996). Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. **Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook**. Springer-Verlag: Heidelberg. 1-99 pp.

Bruenn, J. (1986). The killer system of *Saccharomyces cerevisiae* and other yeast. In **Fungal Virology**. Boca Raton: CRC Press. pp. 85-108.

Conti, S.F. and Naylor, H.B. (1959). Electron microscopy of ultrathin section of *Schizosaccharomyces octosporus*. I. cell division. **Journal of Bacteriology**. 78: 868-877.

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

Devlin, T.M. (2006). **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation**. A John Wiley & Sons, INC., Publication, Canada.

Doran, P. M. (1997). **Bioprocess Engineering Principles**. Academic Press. New York.

Ekunsanmi, T.J. and Odunfa, S.A. (1990). Ethanol tolerance, sugar tolerance and invertase activities of some yeasts strains isolated from steep water of fermenting cassava tubers. **Journal of Applied Bacteriology**. 69: 672-675.

Entian, K.-D. (1997). **Sugar phosphorylation in yeast**. In F. K.Zimmerman and K.-D. Entian (ed.), Yeast sugar metabolism. Technomic Publishing Company. Lancaster. PA. 67–79.

Ghose, T.K. and Tyagi, R.D. (1979). Rapid ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. 1. Batch versus continuous systems. **Biotechnology and Bioengineering**. 21: 1387-1401.

Giordano, R.L., Hirano, P.C., Goncalves, L.R. and Netto, W.S. (2000) Study of biocatalyst to produce ethanol from starch. Coimmobilization of glucoamylase and yeast in gel. Appl. Biochem. Biotechnol, 84-86: 643-54.

Glazer, A.N. and Nikido, H. (1995). Microbial diversity. In **Microbial Biotechnology: Fundamental of Applied Microbiology**. New York: Freeman and Company. pp. 76-87.

Guillaume, C., Delobel,P., Sablayrolles, J. and Blondin, B. (2007). Molecular Basis of Fructose Utilization by the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a Mutated HXT3 Allele Enhances Fructose Fermentation. **Applied and Envitonmental Microbiology**. 73: 2432–2439.

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

Hayman, G.T. and Bolen, P.L. (1990). Linear DNA plasmids of *Pichia inositovora* are associated with a novel killer toxin activity. **Yeast**. 6 (specific issue): 5548.

Helena da Cruz, S., Batistote, M., and Ernandes, J.R. (2003). Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of nitrogen source on yeast growth and fermentation. **Journal of Industrial and Brewing**. 109(4): 349-355.

Hewitt, C., Nienow, A. (2007). The scale-up of microbial batch and fed-batch fermentation processes. **Journal of Biotechnology**. 131S :S135–S136.

Hughes, D.B., Tudroszen, N.J. and Moye, C.J. (1984). The effects of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnology Letters**. 6(1): 1-6.

Isono, Y. and Hoshino, A. (2000). Production of ethanol using granulated yeast cells prepared by a spray dryer. **Journal of General and Applied Microbiology**. 46: 231-234.

Jacobson, G.K. and Jolly, S.O, (1989). Yeasts, molds and algae. **Biotechnology**. 7: 279-314.

James, S.A., Cai, J., Roberts, I.N. and Collins, M.D. (1997). A phylogenetic analysis of the genus *Saccharomyces* based on 18S rRNA gene sequences: description of *Saccharomyces kunashirensis* sp. nov. and *Saccharomyces martiniae* sp. nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 47: 453-460.

James, S.A., Collins, M.D. and Roberts, I.N. (1994). Genetic interrelationships amongspecies of the genus *Zygosaccharomyces* as revealed by small-subunit rRNA gene sequences. **Yeast**. 10: 871-881.

James, S.A., Collins, M.D. and Roberts, I.N. (1996). Use of an rRNA internal transcribed spacer region to distinguish phylogenetically closely related species of the genera *Zygosaccharocyces* and *Torulaspora*. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 46: 189-194.

Janse, B.J. and Pretorius, I.S. (1995) One-step enzymatic hydrolysis of starch using a recombinant strain of *Saccharomyces cerevisiae* producing alpha-amylase, glucoamylase and pullulanase. Appl. Microbiol. Biotechnol. 42(6): 878-83.

Júnior, M.M., Batistote, M. and Ernandes J.R. (2008). Glucose and Fructose Fermentation by Wine Yeasts in Media Containing Structurally Complex Nitrogen Sources . **Journal of the Institute of Brewing**. 114(3):199–204

Kadar, Zs., Szengyel, Zs. And Reczey, K. (2004) Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. Industrial Crops and Products 20:103-110.

Kobayashi, F., Sawada, T., Nakamura, Y., Ohnaga, M., Godliving, M. and Ushiyama, T. (1998) Saccharification and alcohol fermentation in starch solution of steam-exploded potato. Appl. Biochem. Biotechnol. 69(3): 177-89.

Kocková-Kratochvílová, A. (1990). **Yeasts and Yeast-like Organisms**. New york: VCH Publishers. 528 pp.

Kongkiattikajorn, J., Rodmui, A. and Dandusitapun, Y. (2007). Effect of Agitation Rate on Batch Fermentation of Mixture Culture of Yeasts during Ethanol Production from Mixed Glucose and Xylose. **Thai Journal of Biotechnology**, July, 1-4 pp.

Kreger-Van Rij, N.J.W. (1984). **The Yeast a Taxonomic Study**. New York: Elsevier Science Publishing Company. 1082 pp.

Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (1998). **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Fourth Edition. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company. 1055 pp.

Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (1994). Synonymy of the yeast genera *Wingea* and *Debaryomyces*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 66: 337-342.

Kurtzman, C.P. and Robnett, C.J. (1995). Molecular relationships among hyphal ascomycetous yeasts and yeastlike taxa. **Canadian Journal of Botany**. 73: S824-S830.

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

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., Ward, J.M., Bravton, C., Gorelic, P. and Walsh, T.M. (2005). Multigene phylogenetic analysis of pathogenic *Candida* species in the *Kazachstania*

(*Arxiozyma*) *telluris* complex and description of their ascosporic states as *Kazachstania bovina* sp. nov., *K. heterogenica* sp. nov., *K. pintolopesii* sp. nov., and *K. slooffiae* sp. nov. **Journal of Clinical Microbiology**. 43(1): 101-111.

Kurtzman, C.P., Smiley, M.J. and Johnson, C.J. (1980). Emendation of the genus *Issatchenkia* Kudriavzev and comparison of species by deoxyribonucleic acid reassociation, mating reaction, and ascospore ultrastructure. **International Journal of Systematic Bacteriology**. 30: 503-513.

Laluce, C., Bertolini, M.C., Hernandes, J., Martini, A. and Vaughan Martini, A.E. (1987). Screening survey for yeasts that ferment sucrose at relatively high temperature. **Annuals of Microbiology**. 37: 151-159.

Lehmann, P.F., Cowan, L.E., Jones, R.M. and Ferencak, W.J. (1987a). Use of killer fungi and antifungal chemicals in characterization of yeast species and biotypes. **Transactions of the British Mycological Society**. 88: 199-206.

Lowes, K.F., Shearman, C.A., Payne, J., McKenzie, D., Archer, D.B., Merry, R.J., and Gasson, M.J. (2000). Prevention of yeast spoilage in feed and food by the yeast mycocin HMK. **Applied and Environmental Microbiology**. 66(3): 1066-1076.

Ma, Y.J., Lin, L.L., Chien, H.R. and Hsu, W.H. (2000) Efficient utilization of starch by a recombinant strain *Saccharomyces cerevisiae* producing glucoamylase and isoamylase. Biotechol. Appl. Biochem. 31: 55-9.

Magliani, W., Conti, S., Gerloni, M., Bertolotti, D. and Polonelli, L. (1997) Yeast killer systems. Clinical Micro. Rev. 10: 369-400.

Mittal, G.S. (1992) **Food biotechnology: techniques and applications**. Lancaster: Technomic Publishing Co.,. New York.

Mukhopadhyay, B., Purwantinie, E., Kerder C.L. and Wolfe, R.S. (2001). Oxaloacetate Synthesis in the Methanarchaeon *Methanosarcina barkeri*: Pyruvate Carboxylase Genes and a Putative *Escherichia coli*-Type Bifunctional Biotin Protein Ligase Gene *(bpl/birA)* Exhibit a Unique Organization. **Journal of Bacteriology**. June: 3804-3810.

Narendranath, N.V. and Power, R. (2005). Relationship between pH and medium dissolved solids in terms of growth and metabolism of *Lactobacilli* and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production. **Applied and Environmental Microbiology**. 71(5): 2239-2243.

Narendranath, N.V., Thomas, K.C. and Ingledew, W.M. (2001). Acetic acid and lactic acid inhibition of growth of *Saccharomyces cerevisiae* by different mechanism. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. 59: 187-194.

Navarro, J.M. (1980). Alcoholic fermentation: influence of the culture conditions on inhibition by ethanol. **Cellular and Molecular Biology**. 26(2): 241-246.

Navarro, J.M. and Durand, G. (1978). Alcohol fermentation: effect of temperature on ethanol accumulation within yeast cells. **Annual Microbiology**. 129(2): 215-224.

Nishimura, K. and Mikata, K. (2000). Two distinct 18S rRNA secondary structures in *Dipodascus* (Hemiascomycetes). **Microbiology**. 146: 1045–1051.

Ough, C.S. and Amerine, M.A. (1986). Acidity and individual acids. In **Methods for Analysis of Musts and Wines**. United States of America: John Wiley & Sons. pp. 50-52.

Peres, M.F.S. and Laluce, C. (1998) Ethanol tolerance of thermotolerant cultivated on mixtures of sucrose and ethanol. J. Ferment. Engineer. 85: 388-397.

Peter, G. J., Düring, L. and Ahmed, A. (2006). Carbon catabolite repression regulates amino acid permeases in *Saccharomyces cerevisiae* via TOR signaling pathway. **The Journal of Biological Chemistry**. 281: 5546-5552.

Pronk, J.T. *et al.* (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. 12: 1607-1633.

Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Doneche, B. and Lonvaud, A. (2000). **Handbook of Enology (Vol.1): The Microbiology of Wine and Vinifications**. Chichester: John Wiley & Sons. 454 pp.

Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Doneche, B., and Lonvaud, A. (2000). **Handbook of Enology (Vol.1): The Microbiology of Wine and Vinifications**. Chichester: John Wiley & Sons. 454 pp.

Roehr, M. (2001). **The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications.** Chichester: Wiley-VCH. 232 pp.

Rose, A.H. (1987). Responses to the chemical environment. In Rose, A.H. and Harrison, J.S. **The Yeast**. London: Academic Press. pp. 15-20.

Rosenblitt, A., Agosin, E., Delgado, J. and Perez-Correa, R. (2000) Solid substrate fermentation of *Monascus purpureus*: growth, carbo balance, and consistency analysis. Biotechnol. Prog. 16(2): 152-62.

Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001). **Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Vol.3).** Third edition. New York: Cold Spring Harbor. pp. A2.2.

Shimoda, M., Takashita, H., Omori, N., Omori, T. and Wada, H. (1997) Shortening of shochu-koji production time using barley steeped in a restricted amount of water containing citric acid. J. Ferment. Bioeng. 83(5): 496-498.

Slapack, G.E., Russell, I., and Stewart, G.G. (1987). **Thermophilic Microbes in Ethanol Production.** Boca Raton: CRC Press. 186 pp.

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

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

Szczodrak, J. and Targonski, Z. (1988) Selection of thermotolerant yeast strains for simultaneous saccharification and fermentation of cellulose. Biotechnol. Bioeng. 31: 300-303.

Thomas, K.C., Hynes, S.H. and Ingledew, W.M. (2002). Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. **Applied and Environmental Microbiology**. 68: 1616-1623.

Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M.,Guillamon, J.M., and Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. **International Journal of Food Microbiology**. 80: 47-53.

Ueno, R., Hamada-Sato, N., and Urano, N. (2003). Fermentation of molasses by several yeasts from hot spring drain and phylogeny of the unique isolate producing ethanol at 55^{0}C. **Journal of Tokyo University of Fisheries**. 90: 23-30.

Ueno, R., Urano, N., and Kimura, S. (2001). Characterization of thermotolerant, fermentative yeasts from hot spring drainage. **Fisheries Science**. 67: 138-145.

Walker, G.M. (1998). **Yeast Physiology and Biotechnology**. Chichester: John Wiley & Sons. 349 pp.

Wayman, M. and Parekh, S.R. (1990). Microbiology of fermentation catalysts. In **Biotechnology of Biomass Conversion**. Milton Keynes: Open university press. pp. 75-100.

White, T.J., Bruns, T., Lee, S., and Taylor, J. (1990). **PCR Protocals: A Guide to Methods and Applications**. Orlando: Academic Press.

Wickner, R.B. (1985). Killer yeasts. In **Current Topics in Medical Mycology, Volumn 1**. New york: Springer. pp. 286-312.

Win, S.S., Impoolsup, A. and Noomhorm, A. (1996) Growth kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch cultivation using sugarcane molasses and glucose syrup from cassava starch. J. Ind. Microbiol. 16(2):117-23.

Young, T.W. and Yagiu, M. (1987). A comparison of the killer character in different yeasts and its classification. **Antonie van Leeuwenhoek**. 44: 59-77.

ภาคผนวก

GenBank: GU810837.1

Pichia kudriavzevii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence

LOCUS GU810837 441 bp DNA linear PLN 07-APR-2010

DEFINITION Pichia kudriavzevii 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence.

ACCESSION GU810837

VERSION GU810837.1 GI:293337771

KEYWORDS .

SOURCE Pichia kudriavzevii (Issatchenkia orientalis)

ORGANISM Pichia kudriavzevii

Eukaryota; Fungi; Dikarya; Ascomycota; Saccharomyceta; Saccharomycotina; Saccharomycetes; Saccharomycetales; Saccharomycetaceae; Pichia.

REFERENCE 1 (bases 1 to 441)

AUTHORS Wanapu,C., Sripiromrak,A., Muaenjang,T. and Ponchana,P.

TITLE Influence of cultural conditions on thermotolerant yeast, Issatchenkia orientalis S1, for ethanol production

JOURNAL Unpublished

REFERENCE 2 (bases 1 to 441)

AUTHORS Wanapu,C., Sripiromrak,A., Muaenjang,T. and Ponchana,P.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (12-FEB-2010) School of Biotechnology, Suranaree Univ. Technology, University Ave., Muang, Nakhonratchasima 30000, Thailand

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..441

/organism="Pichia kudriavzevii"

/mol_type="genomic DNA"

/isolation_source="agricultural farm silage"

/db_xref="taxon:4909"

/country="Thailand"

/PCR_primers="fwd_name: ITS1, fwd_seq: tccgtaggtgaacctgcgg, rev_name: ITS4, rev_seq: tcctccgcttattgatatgc"

misc_RNA <1..>441

/note="contains 18S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA, internal transcribed spacer 2, and 28S ribosomal RNA"

ORIGIN

1 gattaaggta ctacactgcg tgagcggaac gaaaacaaaa acacctaaaa tgtggaatat

61 agcatatagt cgacaagaga aatctacgaa aaacaaacaa aactttcaac aacggatctc

121 ttaggttctc gcatcgatga agagcgcagc gaaatagcga tacctagtag tgaattcgca

181 gccatcgtga atcatcgagt tcttgaacgc acattgcgcc cctcggcatt ccgggggggca

241 tgcctgtttg agcgtcgttt ccatcttgcg cgtgcgcaga gttgggggag cggagcggac

301 gacgtgtaaa gagcgtcgga gctgcgactc gcctgaaagg gagcgaagct ggccgagcga

361 actagacttt ttttcaggga cgcttggcgg ccgagagcga gtgttgcgag acaacaaaaa

421 gctcgacctc aaatcaggta g

Scientific Publication:

Intapruk, C., Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S. (1984) Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. Mahidol University Annual Research Abstracts 11, 297.

Intapruk, C. (1984) in Manual for international laboratory workshop "Genetic engineering techniques in tropical diseases research" to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195-204.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradubkul, S. and Panyim, S. (1984) Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. Microbial utilization of renewable resources. 4, 210-213.

Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S. (1985) Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. Mahidol University Annual Research Abstracts, 12, 250.

Intapruk, C. (1985) in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172-188.

Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradabkul, S., Sertsrivanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y. (1985) Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. Ann. Ist. Super. Sanita. 21, 299-305.

Sriroongrueng, W. and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemias (in Thai). Songkla Med J. 6, 428-435.

Intapruk C, Higashimura N, Yamamoto K, Okada N, Shinmyo A and Takano M (1991) Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. Gene 98: 237-241.

Intapruk C, Yamamoto K, Fujiyama K, Shinmyo A and Takano M (1993) Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. J Ferment Bioeng 75: 166-172.

Shinmyo A, Fujiyama K, Kawaoka A and **Intapruk C** (1993) Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. *In*: KG Welinder, SK Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology. Univ Geneva, Switzerland, pp 222-228.

Intapruk C, Yamamoto K, Sekine M, Shinmyo A and Takano M (1994) Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 13: 123-129.

Intapruk C, Takano M and Shinmyo A (1994) Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 104: 285-286.

Wanapu C and Shinmyo A (1996) *cis*-Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high-salt stress. Ann New York Acad Sci. 782 (12): 107-114.

Rodtong, S.; **Wanapu, C.** and Ishizaki, A. (2000) Starch-utilizing bacteria for L-lactic acid production. The 12th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 52.

Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste.The 3rd National Symposium on Graduate Research.633-634.

Sripo, T., Phongdara, A., **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002)Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. J. Biotech. 95, 171-179.

Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.** (2003) Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cereviseae* K1-V1116 in tamarind wine. Suranaree J. Sci. Technol. 10: 147-151.

Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2004) Effect of β-glucosidase enzyme in Saccharomyces cerevisiae strains on aroma production mango (Chok-anan) wine fermentation. Thai J. Biotech. (accepted).