สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม วิทยานิพนธ์ งานวิจัย
M 121577
VHS 123127

รายงานการวิจัย
เรื่อง

การคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากผลไม้พื้นบ้านเพื่อการผลิตเอทานอล
ISOLATION OF THERMOTOLERANT YEASTS ISOLATED FROM LOCAL FRUITS FOR ETHANOL PRODUCTION

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กัลยาณี เจริญโสภารัตน์

สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
รับรับ..... 15 W.A. 2560
วันลงทะเบียน.....
เลขทะเบียน..... ทส. 249772
เลขเรียกหนังสือ..... 579.56 กาาา7ก 2559
ค.2

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
2559

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ปีงบประมาณ 2558)

หัวข้อวิจัย การคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากผลไม้พื้นบ้านเพื่อการผลิตเอทานอล
ผู้ดำเนินการวิจัย กัลยาณี เจริญโสภารัตน์
หน่วยงาน สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
ปี พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยก คัดเลือก และจำแนกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ทนร้อนจากแหล่งธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิสูง โดยประชากรและกลุ่มตัวอย่างคือตัวอย่างผลไม้พื้นบ้าน 11 ชนิด ได้แก่ มะเฟือง ตะขบ พุทรา หมากเบน มะเม่า เสาวรส ฟักข้าว ลูกหม่อน กล้วยนวล มะขามเทศ และลูกยอ โดยใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนเชื้อ และใช้โปรแกรมทางด้านสถิติในการบอกความแตกต่างของแต่ละการทดลอง ผลการวิจัยมีดังนี้ ในการคัดแยกเชื้อสามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลท โดยเชื้อยีสต์ที่ คัดแยกได้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้สามารถเจริญได้ทั้งสิ้น 30 ไอโซเลท และ 26 ไอโซเลท ตามลำดับ มีเพียง 10 ไอโซเลท ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้เป็นเชื้อยีสต์ทนร้อนหรือเจริญเติบโตได้ในสภาวะอุณภูมิสูง จากนั้นนำเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหารสังเคราะห์ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร พบว่าเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้สามารถหมักเอทานอลได้ทั้งสิ้น 34 ไอโซเลท มีความเข้มข้นของเอทานอล (P) ที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 4.99-34.90 กรัมต่อลิตร ซึ่งเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้สายพันธุ์ Y-22 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด ผลได้ ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.38±0.00 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ไป และอัตราการผลิต (Q_p) เท่ากับ 0.48±0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลการวิจัยชี้ให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 มีศักยภาพที่ใช้ในการผลิต เอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้ และเมื่อนำเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ (สายพันธุ์ Y-22) ไปจำแนกสายพันธุ์โดยใช้วิธีตรวจสอบรหัสทางพันธุกรรม พบว่าเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 ที่คัดแยกได้เป็นเชื้อ *Pichia kudriavzevii*

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Research Title	Isolation of thermotolerant yeasts isolated from local fruits for ethanol production
Researcher	Kanlayani Charoensopharat
Organization	Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Maha Sarakham University
Year	2015

ABSTRACT

The aim of this research is isolation of thermotolerant yeasts isolated from local fruits for ethanol production. In this work, isolation and screening of thermotolerant yeasts capable of producing ethanol from edible local fruits were investigated. Eleven edible local fruits (Carambora, Calabura, Jujube, Governor's plum, Thai blueberry, passion fruit, Sping bitter cucumber, White mulberry, Elephant banana, Manila tamarind, and Noni) were collected and subjected to the isolation and screening of thermotolerant yeasts by using enrichment culture technique. Thermotolerant yeasts are capable of growth and fermentation at high temperatures, which have several advantages such as reduce cost for cooling system, reduce risk of contamination of mesophilic microorganisms and increase the speed of catalytic reactions related to fermentation. Statically method used for determine the difference of all experiments. As the results, thirty five isolates of yeasts were obtained. There isolated of yeasts grew well at 40 and 45°C of 30 and 26, respectively. Among them, only ten isolates were able to grow at temperature up to 50°C indicating that these isolation yeasts are thermotolerant yeasts. The investigation for ethanol producing strains was conducted at 37°C. The results showed that 34 isolated yeasts can produce ethanol (the ethanol concentration (*P*) in the range of 4.99-34.90 g/l). The highest ethanol (the ethanol concentration of 34.90±0.16 g/l, yield ($Y_{p/s}$) 0.38±0.00 g/l and productivity (Q_p) of 0.48±0.00 g/l/h were achieved from thermotolerant yeast Y-22 has potential for ethanol production at high temperature. The preliminary data can be used to improve the ethanol fermentation process at high temperature for high performance in further. The selected yeast strain was closely related to *Pichia kudriavzevii*.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่อง “การคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากผลไม้พื้นบ้านเพื่อการผลิตเอทานอล” ได้รับทุนอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม สำหรับสภานที่และเครื่องมือสำหรับทำงานวิจัย และขอบคุณศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือวิเคราะห์ทางด้านเคมีขั้นสูง

กัลยาณี เจริญโสภารัตน์

มกราคม 2559

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตการศึกษางานวิจัย	2
1.4 สมมติฐานของการศึกษางานวิจัย	2
1.5 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย	2
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ยีสต์	4
2.2 เอทานอล	11
2.3 ผลไม้ที่นำมาคัดแยกเชื้อยีสต์	13
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	20
2.5 กรอบแนวคิดในการวิจัย	22
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
3.1 เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ	23
3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล	23
3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล	27
3.4 สรุปผล เขียนรายงานการวิจัยและเผยแพร่ผลงานวิจัย	27
3.5 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล	27
3.6 ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย	28

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย	29
4.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์จากผลไม้พื้นบ้าน	29
4.2 ทดสอบความสามารถในการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	37
4.3 ทดสอบความสามารถในการหมักของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวสูตร YM	39
4.4 การศึกษารูปแบบการเจริญของยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ในอาหารสูตร YM	41
4.5 ทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้	41
4.6 การจำแนกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้	43
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ	45
5.1 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล	45
5.2 ข้อเสนอแนะ	45
บรรณานุกรม	46
บรรณานุกรมภาษาไทย	46
บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ	48
ภาคผนวก	51
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารและสารเคมี	52
ภาคผนวก ข วิธีการคัดแยกยีสต์ทนร้อน	54
ภาคผนวก ค กราฟสารละลายมาตรฐาน	58
ภาคผนวก ง ผลงานวิจัยภายใต้งานวิจัยเรื่อง “การคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากผลไม้พื้นบ้านเพื่อการผลิตเอทานอล” ที่ได้รับการเผยแพร่	60
ประวัติผู้วิจัย	63

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากผลไม้พื้นบ้าน	29
4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	37
4.3 การผลิตเอทานอลของเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวสูตร YM	39

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 มะเฟือง (*Averrhoa carambola* Linn.)	13
2.2 ตะขบ (*Muntingia calabura* Linn.)	13
2.3 พุทรา (*Ziziphus mauritiana* Lam.)	14
2.4 หมากเบน (*Flacourtia indica* Zoll. & Moritzi)	15
2.5 มะเม่า หรือ หมากเม่า (*Antidesma ghaesembilla* Gaertn.)	16
2.6 เสาวรส (*Passiflora laurifolia* Linn.)	16
2.7 ฟักข้าว (*Momordica cochinchinensis* Spreng)	17
2.8 ลูกหม่อน (*Morus* Spp.)	18
2.9 กล้วยนวล (*Ensete glaucum* (Roxb. Cheesman)	18
2.10 มะขามเทศ (*Pithecellobium Dulce* Benth.)	19
2.11 ลูกยอ (*Morinda citrifolia* Linn.)	20
4.1 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 1) Y-1, 2) Y-2, 3) Y-3, 4) Y-4 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า	31
4.2 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 5) Y-5, 6) Y-6, 7) Y-7, 8) Y-8, 9) Y-9, 10) Y-10 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า	32
4.3 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 11) Y-11, 12) Y-12, 13) Y-13, 14) Y-14, 15) Y-15, และ 16) Y-16 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า	33
4.4 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 17) Y-17, 18) Y-18, 19) Y-19, 20) Y-20, 21) Y-21 และ 22) Y-22 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า	34
4.5 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 23) Y-23, 24) Y-24, 25) Y-25, 26) Y-26, 27) Y-27 และ 28) Y-28 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า	35

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.6	ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 29) Y-29, 30) Y-30, 31) Y-31, 32) Y-32ม 33) Y-33, 34) Y-34 และ 35) Y-35 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหาร สูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า	36
4.7	รูปแบบการเจริญของเชื้อยีสต์ Y-22 ในอาหารเหลวสูตร YM โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Haemacytometer	41
4.8	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อในระหว่างการหมัก	42
4.9	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมัก	42
4.10	การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอลในระหว่างการหมัก	43
4.11	ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน LSU rRNA gene ของเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22	43
4.12	Phylogenetic tree สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 domain ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทนร้อน Y-22 และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนหรือใกล้เคียงที่สุด สำหรับ phylogenetic tree ใช้ neighbor-joining method ตัวเลขของจำนวนแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของ bootstrap sampling จาก 1000 sampling	44
ค.1	กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเอทานอล (เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร)	59
ค.2	กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร)	59

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

จากปัญหาราคาน้ำมันในตลาดโลกที่มีความผันผวนและมีแนวโน้มที่จะปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องในอนาคต และประเทศไทยต้องสูญเสียเงินตราต่างประเทศในการนำเข้าน้ำมันซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความมั่นคงทางเศรษฐกิจและสังคมในประเทศ จากเหตุผลดังกล่าวข้างต้นรัฐบาลจึงกำหนดนโยบายและยุทธศาสตร์พัฒนาและส่งเสริมการผลิต การใช้ ตลอดจนการวิจัยและพัฒนาพลังงานทดแทนและพลังงานทางเลือกโดยตั้งเป้าหมายให้สามารถทดแทนเชื้อเพลิงฟอสซิลได้อย่างน้อยร้อยละ 25 ภายใน 10 ปี (Ministry of energy, 2007) เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญแหล่งหนึ่งที่หลายประเทศให้การยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากมีข้อดีหลายประการ เช่น สามารถเผาไหม้ได้อย่างสมบูรณ์จึงช่วยลดมลพิษทางอากาศเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม และช่วยเพิ่มค่าออกเทนเมื่อนำมาผสมกับน้ำมันเบนซินหรือดีเซลที่เรียกว่า แก๊สโซฮอล์หรือ ดีโซฮอล์ การผลิตเอทานอลโดยทั่วไปมีอยู่ 2 กระบวนการ คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี และกระบวนการหมักทางชีวภาพ สำหรับการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นทำโดยไฮเดรชัน (Hydration) สารเอทีลีน (Ethylene) ซึ่งได้จากปิโตรเลียม และก๊าซธรรมชาติ และการหมักเอทานอลโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพโดยใช้เอนไซม์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้เป็นตัวช่วยที่ทำให้เกิดปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลงสารตั้งต้นหรือวัตถุดิบ วัตถุดิบที่ใช้ในกระบวนการหมักมีหลายชนิด เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด กากน้ำตาล และข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น

โดยทั่วไปเอทานอลที่ผลิตโดยกระบวนการหมักทางชีวภาพนิยมใช้เชื้อใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เนื่องจากสามารถผลิตเอทานอลได้สูงและเป็นที่ยอมรับในเรื่องความปลอดภัย (GRAS) แต่ *S. cerevisiae* ก็มีข้อจำกัดในเรื่องสภาวะอุณหภูมิในการเจริญและผลิตเอทานอล กล่าวคือ *S. cerevisiae* ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีในสภาวะการหมักที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส (Walker, 1998; Kiran et al., 2000) ในทางปฏิบัติแล้วการหมักเพื่อผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมหรือในถังหมักขนาดใหญ่จะมีการสะสมความร้อนที่เกิดจากกระบวนการ เมตาบอลิซึมของเซลล์ในระหว่างการเจริญและเปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายเป็นสารผลิตภัณฑ์ส่งผลให้อุณหภูมิในถังหมักเพิ่มสูงขึ้นและอาจสูงถึง 40 องศาเซลเซียส (Kiran et al., 2000) ส่งผลเสียต่อระบบการหมัก ทำให้การเจริญและกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์ยีสต์ลดลง ทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลงไปด้วย ดังนั้นโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงต้องใช้ระบบหล่อเย็น (cooling system) เพื่อช่วยควบคุมอุณหภูมิในระหว่างการหมักให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ ทำให้สิ้นเปลืองพลังงานและทำให้ต้นทุนในการผลิตเอทานอลเพิ่มสูงขึ้น

ดังนั้นการใช้ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีในสภาวะอุณหภูมิสูงจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถลดการใช้พลังงานและทำให้ต้นทุนการผลิตลดต่ำลงไปด้วย นอกจากนี้ยังมีข้อได้เปรียบในด้านอื่นๆ อีกหลายประการ เช่น อัตราการหมักเอทานอลเกิดขึ้นได้เร็วเมื่อเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิต่ำ และระบบการหมักในสภาวะอุณหภูมิสูงยังช่วยลดปัญหาเรื่องการปนเปื้อน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และที่ระดับอุณหภูมิสูงเอทานอลที่เกิดขึ้นในระบบสามารถระเหยทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวโดยอาศัยระบบที่เรียกว่า continuous stripping (Kiran et al., 2000)

เชื้อยีสต์สามารถพบได้ทั่วไปจากหลายแหล่งในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ บางชนิดพบในแมลงหรือแม้แต่ในกระเพาะของสัตว์ หรือพบในส่วนต่างๆ ของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำหวานของดอกไม้ ผิวของผลไม้ ผลไม้ที่สุกงอมหรือผลไม้ที่เกิดการหมัก การคัดแยกเชื้อยีสต์จากพื้นที่และแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย น่าจะสามารถรวบรวมเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้จำนวนมาก จากนั้นนำยีสต์ที่คัดแยกได้มาทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง เหมาะแก่การผลิตเอทานอลในสภาวะของภูมิประเทศที่มีอุณหภูมิโดยเฉลี่ยสูงเกือบตลอดทั้งปีอย่างเช่นประเทศไทย ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ประกอบการทุกระดับที่มีความต้องการใช้เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้เพื่อนำไปพัฒนาศักยภาพในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกและคัดเลือกเชื้อยีสต์ทนร้อนจากผลไม้พื้นบ้านที่สามารถผลิตเอทานอลได้

1.2.2 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ภายใต้สภาวะการหมักที่อุณหภูมิสูง

1.2.3 เพื่อจำแนกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ทนร้อนจากผลไม้พื้นบ้านที่สามารถผลิตเอทานอลได้

1.3 ขอบเขตการวิจัย

1.3.1 ตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อยีสต์ทนร้อน คือ ผลไม้พื้นบ้านอีสาน ได้แก่ มะเฟือง ตะขบ พุทรา หมากเบน มะเม่า เสาวรส ฟักข้าว ลูกหม่อน กล้วยนวล มะขามเทศ และลูกยอ

1.3.2 ใช้เทคนิคการเพิ่มจำนวนเชื้อเพื่อคัดแยกเชื้อยีสต์ทนร้อนจากผลไม้พื้นบ้าน

1.3.3 วิธีเก็บรักษาเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้

1.3.4 ศึกษาการผลิตเอาทนอลจากเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารสังเคราะห์

1.3.5 ศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในงานวิจัย/(นิยามศัพท์เฉพาะ)

1.4.1 ผลไม้พื้นบ้านอีสาน คือ ผลไม้ที่มีอยู่ทั่วไปในภาคอีสาน

1.4.2 เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดหนึ่งที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี สามารถติดไฟได้ ให้เปลวไฟสีน้ำเงินไม่มีควัน ระเหยง่าย ละลายได้ดีในน้ำ และสารอินทรีย์อื่นๆ เช่น เมทิลแอลกอฮอล์ อีเทอร์ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และคลอโรฟอร์ม เป็นต้นให้ค่าพลังงานความร้อน (calorific value) โดยการเผาไหม้ประมาณ 64,000 บีทียูต่อกิโลกรัม (สาวิตรี, 2540)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

1.4.3 ยีสต์ทนร้อน เป็นจุลินทรีย์ มีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปร่างกลม รี สามเหลี่ยม รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง เป็นต้น ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยวิธีการแตกหน่อ พบทั่วไปในธรรมชาติ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 เชื้อยีสต์ทนร้อนที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลในสภาวะอุณหภูมิสูงและทราบสายพันธุ์ของเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้

1.5.2 ได้ข้อมูลพื้นฐานการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติในระดับห้องปฏิบัติการสำหรับใช้เป็นแนวทางในการผลิตเอทานอลในระดับขยายส่วนหรือโรงงานอุตสาหกรรมในอนาคต

1.5.3 สามารถนำข้อมูลที่ได้ไปเผยแพร่ในเวทีระดับชาติและ/หรือนานาชาติ ทั้งในรูปแบบของการเข้าร่วมประชุมวิชาการและการตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและ/หรือนานาชาติ เพื่อสร้างชื่อเสียงให้กับหน่วยงานหรือองค์กรที่นักวิจัยสังกัด

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยีสต์

ยีสต์ เป็นจุลินทรีย์ที่กระจายอยู่ในธรรมชาติ เช่น ดิน อากาศ ทางเดินลำไส้ของสัตว์ ใบไม้ ดอกไม้ และแมลงบางชนิด เป็นต้น ยีสต์ส่วนใหญ่มีบทบาทในอุตสาหกรรมอาหาร เพราะสามารถผลิตเอนไซม์ซึ่งทำให้เกิดปฏิกิริยาเคมีที่ต้องการได้ เช่น การฟูของขนมปัง การผลิตแอลกอฮอล์ กลีเซอรอล หรือ เอนไซม์อินเวอร์เทส และสามารถใช้สังเคราะห์วิตามินกลุ่มบีได้ ส่วนยีสต์ที่ให้โทษก็มีหลายชนิด ได้แก่ ยีสต์ที่ทำให้อาหารและผลิตภัณฑ์ต่างๆ เกิดการเสื่อมเสีย เช่น ทำให้อาหารหมักดอง เนื้อสัตว์ ขนมปัง น้ำผลไม้ น้ำเชื่อม น้ำผึ้ง ไวน์ เบียร์ มีสี กลิ่น รสเปลี่ยนแปลงไป นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดก็ทำให้เกิดโรคกับคน พืช และสัตว์ด้วย (บวรศักดิ์, 2536)

2.1.1 ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงหรือยีสต์ทนร้อน

ความทนต่ออุณหภูมิสูงของยีสต์และจุลินทรีย์อื่นเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ เช่น *Saccharomyces* สายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strain) ให้เซลล์ปริมาณสูงสุด และมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ช่วง 28-35 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่สูงที่สุด (maximal temperature) สำหรับการเจริญประมาณ 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิสูงสุดซึ่งเชื้อเจริญได้ดีนี้จะสูงขึ้นเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีสารอาหารสมบูรณ์ ส่วนยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic yeast) ก็มักจะมีระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimal tamperature) สำหรับการเจริญที่เจริญ 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นยังมียีสต์ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant yeast) ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางแต่ทนได้เมื่อเลี้ยงหรืออยู่ในที่อุณหภูมิสูง สำหรับการหมักเอทานอล พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักจะสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส และเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 25 เป็น 38 องศาเซลเซียส เมแทบอลิซึมของยีสต์ในที่มีออกซิเจนจะเบนไปทางการหมัก เนื่องจากเกิดการทำให้ เอนไซม์ที่สำคัญสำหรับออกซิเดชัน ไม่ว่องไวต่อปฏิกิริยาก่อผลให้เกิดการสะสมของไพรูเวตและเอทานอล มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มเป็น 40 องศาเซลเซียส อัตราการหมักเอทานอลในช่วงแรกจะเพิ่มทั้งนี้อาจเนื่องจากกิจกรรมของแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเกิดได้สูงสุดที่อุณหภูมิใกล้เคียง 40 องศาเซลเซียส การเจริญของยีสต์ทนอุณหภูมิสูงไม่เพียงขึ้นอยู่กับพันธุกรรมของยีสต์เท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งสภาวะของการหมักโดยการที่อุณหภูมิสูงยีสต์มีอัตราการเจริญลดลงมีผลให้ชีวมวลทั้งหมดลดลงเป็นผลให้โปรตีน อาร์เอ็นเอ ดีเอ็นเอ และกรดอะมิโนอิสระในเซลล์ลดลง ยิ่งไปกว่านั้นอุณหภูมิสูงเพิ่มความแข็งแกร่งของเยื่อหุ้มเซลล์เช่นเดียวกับอิทธิพลของแรงดันออสโมซีสเป็นผลให้ตัวซึมผ่านของตัวถูกละลายและสารอาหารที่จำเป็นเข้าสู่เซลล์ลดลง นอกจากนั้นที่อุณหภูมิสูงกิจกรรมการหายใจลดลงมากมีรายงานที่แสดงว่าอุณหภูมิสูงเหนี่ยวนำให้ยีสต์ขาดความสามารถในการหายใจทำให้เกิดสายพันธุ์เพอะทีต (petite strain) หรือสายพันธุ์กลายที่ขาดความสามารถในการหายใจ (respiratory deficient mutant) และปรากฏการณ์นี้เกิดได้จากเอทานอลเช่นกัน ซึ่งผลที่เกิดขึ้นในลักษณะนี้แสดงว่า ไมโทคอนเดรียมี

บทบาทเกี่ยวกับความทนอุณหภูมิสูงและทนเอทานอล ปัจจัยที่อาจแสดงบทบาทสำคัญในการกำหนดความทนอุณหภูมิสูงของยีสต์ คือการมีหรือการไม่มีโปรตีนช็อกด้วยความร้อน (heat shock proteins, HSPs) โดยพบว่าถ้าสัมผัสกับอุณหภูมิสูงสั้นๆ จะเหนี่ยวนำให้มีการสร้างโปรตีนช็อกด้วยความร้อนชุดหนึ่งที่คาดว่าเกี่ยวข้องต่อความทนต่อความเสียหายในเซลล์ยีสต์ที่เกิดจากอุณหภูมิสูง และมีหลายชนิดของโปรตีนช็อกด้วยความร้อนที่สัมพันธ์กับปัจจัยที่ทำให้เกิดความเค้นอื่นๆ เช่น

เอทานอล และแรงดันออสโมซิส อย่างไรก็ตามยีสต์ไม่สามารถหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากมีรายงานระหว่างความสัมพันธ์ของโปรตีนช็อกด้วยความร้อนกับความทนความร้อนดังกล่าว จึงมีนักวิจัยที่พยายามปรับปรุงพันธุกรรมให้ยีสต์ทนความร้อนได้สูงขึ้นโดยการโคลนยีน HSP และนำกลับเข้าไปในเซลล์ยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลางแต่ยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก ซึ่งมีข้อคิดเห็นว่าเป็นเพราะยีน HSP เหล่านี้มีการควบคุมที่ซับซ้อน นอกจากนั้นยีนเหล่านี้ไม่ใช่ยีนใหม่แต่เป็นยีนที่ปกติมีการแสดงออกที่ระดับต่ำ และภายใต้สภาวะความเค้นซึ่งรวมทั้งความร้อน แรงดันออสโมซิส เอทานอล การที่สารอาหารและไอออนโลหะมีผลให้มีการแสดงออกของยีน HSP ที่ระดับสูงกว่าปกติมากและเนื่องจากความทนความร้อนเป็นลักษณะที่ควบคุมโดยพันธุกรรมดังนั้นจึงอาจจัดการพันธุกรรมได้ในบางระดับ (Pachal and Tavares, 1990)

การหมักเอทานอลที่มีอุณหภูมิสูงจะมีความร้อนเกิดขึ้นในอัตราที่สูง การหมักด้วยยีสต์ที่ใช้ทั่วไปซึ่งมักเป็นยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความสามารถในการหมักเอทานอลจะลดลงอย่างมากเนื่องจากการยับยั้งด้วยเอทานอลมีมากขึ้น แนวทางการแก้ไขปัญหานี้อย่างหนึ่งคือการใช้ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงหรือยีสต์ทนร้อน

ประโยชน์ของการใช้ยีสต์ทนร้อนสำหรับการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรม คือ ลดการใช้ระบบหล่อเย็นทำให้ค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลดลงเป็นผลให้ต้นทุนการผลิตลดลง นอกจากนั้นการหมักที่อุณหภูมิสูงยีสต์มักมีอัตราการหมักสูงทำให้สามารถผลิตเอทานอลสูงทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้เร็วและยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้ออื่น (Seki et al., 1983; Limtong , 1987; Singh et al., 1998; Sree et al., 1999) ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอล *Kluyveromyces fragilis* หลายสายพันธุ์สามารถหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง 42-45 องศาเซลเซียส และสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิดทั้ง ซูโครส กลูโคส ฟรุกโทส และแลกโทส (Brady et al., 1996; Barron et al., 1997; Boyle et al., 1997; Gough et al., 1997; Bollok et al., 2000; Fattah et al., 2000; Meehan et al., 2000; Krishna et al., 2001) นอกจากนั้นยังพบ *S. cerevisiae* บางสายพันธุ์ที่หมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง 40-42 องศาเซลเซียส (Sree et al., 1999; Krishna et al., 2001) ส่วนยีสต์ชนิดอื่นที่มีรายงานว่าหมักเอทานอลได้ในที่ที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส เช่น *Schizoaccharomyces pombe Candida lusitaniae C. tropicalis C. pseudotropicalis และ Hansenula polymorpha* (Pachal and Tavares, 1990)

ลักษณะของยีสต์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอลมีหลายประการ (Kosaric et al., 1983; Panchal and Tavares, 1990; Walker, 1998) เช่น

1. ให้ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) สูง
2. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
3. มีความทนเอทานอล (ethanol tolerance)

มหาวิทยาลัยราชภัฏราชนครินทร์ RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4. มีความทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
5. มีความทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerance)
6. มีความสามารถในการจับกลุ่มตกตะกอน (flocculation) ซึ่งขึ้นอยู่กับกระบวนการว่าต้องการลักษณะการจับกลุ่มตกตะกอนนี้หรือไม่
7. ทนกรดความเป็นกรดด่าง (acid tolerance)
8. มีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย
9. ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะต่างๆ ของการหมัก
10. ใช้สารตั้งต้นได้หลายชนิด
11. สร้างเมแทบอไลต์อื่นในระดับต่ำ เช่น กรดอินทรีย์ กลีเซอรอล ไฮฟเออร์แอลกอฮอล์ (higher alcohol) เอสเทอร์ และอัลดีไฮด์
12. ไม่มีการกดดัน (repression) การใช้น้ำตาลอื่นเมื่ออยู่ในที่ที่มีกลูโคส
13. มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งหรือย่อยเซลลูโลสเมื่อต้องการหมักโดยการใช้แป้งหรือเซลลูโลสเป็นสารตั้งต้น
14. มีอัตราการเจริญสูงแต่ให้ผลผลิตเซลล์ต่ำ เพื่อให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนเซื้ออย่างรวดเร็วสำหรับการผลิตเอทานอล
15. เซลล์มีความมีชีวิตสูง
16. ทนต่อสารพิษและการยับยั้งการเจริญ
17. ทนการปนเปื้อนของแบคทีเรีย
18. มีลักษณะเป็นคิลเลอร์ (killer) มีฤทธิ์ในการฆ่า
19. เพิ่มจำนวนง่าย
20. ให้ความร้อนระหว่างการหมักน้อย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การผลิตเอทานอลโดยทั่วไปนั้นจำเป็นต้องอาศัยยีสต์เป็นสำคัญในกระบวนการหมัก *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์หลักที่เกี่ยวข้อง และมีความสำคัญในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจาก *S. cerevisiae* เจริญได้รวดเร็วมีความคงทนต่อเอทานอล และทำให้ผลิตเอทานอลปริมาณสูง (วราวุฒิ, 2538) สามารถใช้น้ำตาลได้อย่างกว้างขวาง ตัวอย่างเช่น น้ำตาลกลูโคส ซูโคส ฟรุกโทส กาแลโทส มอลโทส แลกโทส ไซโลส อะราบิโนส และ ซอร์บิทอล (Kiran et al., 2000) และมอลโทไทรโอส (สาวิตรี, 2540) รวมทั้งสารตั้งต้นจำพวกแป้งต่างๆ ด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า *S. diastaticus* และ *S. uvarum* (*carlsbergensis*) สามารถใช้แป้งหรือเด็กซ์ทินและเมลไบโอสได้ ตามลำดับ (Spencer et al., 1997) ส่วนแบคทีเรียที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงมีเพียงสายพันธุ์เดียว คือ *Zymomonas mobilis* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส และผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* (Benschoter and Ingram, 1986)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการคัดแยกเชื้อยีสต์ทนร้อน

ปัจจุบันหลายประเทศในโลกมีความต้องการเอทานอลเพื่อใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิง และเป็นเครื่องดื่มสำหรับบริโภค ในประเทศเขตร้อน เช่น อินเดีย อียิปต์ การหมักเอทานอลหมักทำที่อุณหภูมิของสภาพแวดล้อม ซึ่งมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 37 องศาเซลเซียส (Kiran et al., 2000) ทำให้อุณหภูมิในระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นอีก กระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งโดยความร้อน การคัดแยกยีสต์ที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก ซึ่งรายงานการคัดแยกยีสต์ทนร้อนมีดังนี้

Hacking et al. (1984) นำยีสต์ 55 สายพันธุ์ จากศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์เพื่อมาคัดเลือกยีสต์ทนความร้อนเพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่ามี 8 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอทานอลได้มากกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ภายในระยะเวลา 62-78 ชั่วโมง ทั้งหมดจัดอยู่ในจีนัส *Candida Kluyveromyces* และ *Saccharomyces* spp.

Anderson et al. (1986) คัดแยกยีสต์ทนร้อนจากตัวอย่างที่เก็บในระหว่างการผลิตน้ำตาล ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้ยีสต์ทนร้อน 35 สายพันธุ์ พบยีสต์ *K. marxianus var. marxianus* 14 สายพันธุ์ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้สูงกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดยปริมาตร) ภายในเวลา 24 ชั่วโมง โดยเมื่อนำเอาเชื้อที่แยกได้มาผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงที่ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อรอดชีวิตมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ *K. marxianus var. Marxianus* CBS712 และ *K. marxianus var. Marxianus* CBS397 ที่ใช้เปรียบเทียบ มีเชื้อรอดชีวิตเพียง 30-50 เปอร์เซ็นต์

Banat et al. (1992) แยกยีสต์จากวัตถุดิบและของเสียที่ได้จากโรงกลั่นสุราในประเทศอินเดียพบยีสต์ *K. marxianus* IMB 5 สายพันธุ์ (IMB1-IMB5) สามารถเจริญบนจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 52 องศาเซลเซียส เมื่อนำยีสต์ดังกล่าวมาทดสอบการผลิตเอทานอล พบว่า *K. marxianus* ทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถผลิตเอทานอลได้ 5.0-5.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักโดปริมาตร) และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.86-0.99 ต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียสและมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.86-0.99 ต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส

กนกวรรณ และคณะ (2546) คัดแยกและคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์จากผลไม้ในจังหวัดนครปฐมและจังหวัดสุพรรณบุรี ในช่วงระหว่างเดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2545 ถึงเดือนกุมภาพันธ์ พ.ศ. 2456 โดยเก็บตัวอย่างผลไม้ 71 ตัวอย่าง แยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งสิ้น 71 ไอโซเลท นำไปทดสอบการผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อยีสต์ทั้ง 71 ไอโซเลท สามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ จากนั้นนำไปผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้น้ำตาลมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอน คัดเลือกเชื้อที่ผลิตแอลกอฮอล์สูงสุดได้ 5 ไอโซเลท และนำไปทดสอบโดยการหมักในน้ำอุ่น พบว่าเชื้อยีสต์รหัส RNF2 RNF12 RNF45 RNF54 และ RNF70 ให้ปริมาณแอลกอฮอล์ 4.5 8.7 7.4 4.3 และ 8.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ *S. cerevisiae* var. *carlsbergensis* ซึ่งเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้ 9.1 เปอร์เซ็นต์

ชุติมา (2548)คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง จากยีสต์จำนวน 91ไอโซเลท โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่มีเอทานอล บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

และ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่หมักเอทานอลได้สูงที่อุณหภูมิ คือ M30 AM12 TJ1 TJ3 และ Sc90 พบว่ามีเพียง 6 สายพันธุ์ ที่สามารถหมักเอทานอลความเข้มข้นสูงที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส คือ DMKU 3-1042 DMKU 3-306 DMKU 3-118 DMKU 3-p1042 DMKU 3-p106 และ *S. cerevisiae* Sc90 เชื้อยีสต์สายพันธุ์ DMKU3-1042 ภายหลังจัดจำแนกเป็นเชื้อ *K. marxianus*

นิภาพร และชลันธร (2550) เก็บตัวอย่างผลไม่จากแหล่งต่างๆ มาทำการแยกเชื้อยีสต์ให้บริสุทธิ์ ซึ่งแยกเชื้อยีสต์ได้ 10 ไอโซเลท และพบว่าเชื้อยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ระดับอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ลักษณะโคโลนีเซลล์มีสีขาวและขอบมีความมันวาว ขนาดแตกต่างกัน ส่วนการสร้างเส้นใยพบว่าตัวอย่างเชื้อยีสต์ทุกตัวอย่างไม่มีการสร้างเส้นใยในอาหารวุ้น เชื้อยีสต์สายพันธุ์ My8 สามารถผลิตแอลกอฮอล์สูงที่สุดเฉลี่ย 11.30 เปอร์เซ็นต์ และในด้านการยอมรับของผู้ทดสอบชิมนั้นพบว่าเชื้อยีสต์สายพันธุ์ My8 มีความแตกต่างกันทางสถิติในด้าน สี กลิ่น และความชอบรวม แต่ไวน์ที่หมักด้วยเชื้อยีสต์สายพันธ์ My5 มีการยอมรับในด้านรสชาติต่ำที่สุด

พนิดา และคณะ (2554) วิจัยนี้เพื่อคัดกรองยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสในการผลิตเอทานอลได้โดยใช้อาหาร Yeast malt extract medium ที่อุณหภูมิ 35 37 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส สามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อนได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลท และมี 7 ไอโซเลท ที่สามารถใช้ไซโลสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ยีสต์ไอโซเลท SKN 2-1 คัดแยกได้จากตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บได้จากโรงงานน้ำตาลครบุรี จังหวัดนครราชสีมา สามารถผลิตเอทานอล ได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส การผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเท่ากับ 0.66 และ 0.87 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 7.67 และ 10.10 เปอร์เซ็นต์ ของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ โดยใช้ฟางข้าวที่ประกอบด้วยเซลลูโลส 37.67 ± 0.31 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 33.36 ± 1.96 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 4.12 ± 0.36 เปอร์เซ็นต์ เป็นวัตถุดิบ จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน 26S rDNA ของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท 2-1 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์มีความใกล้เคียงกับยีสต์สายพันธุ์ *Ogataea polymorpha* 99.83 เปอร์เซ็นต์ โดยมีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน 1 ตำแหน่ง

ณภัทรชนก (2555) คัดเลือกยีสต์ทนร้อนและศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิต เอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากแป้งมันสำปะหลัง สามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อนได้ 97 สายพันธุ์ จาก 69 ตัวอย่างด้วยเทคนิคการเพิ่มจำนวนในอาหารเหลวที่เติมเอทานอล 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส คัดเลือกหาสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง โดยการหมักเอทานอลที่ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว 16 เปอร์เซ็นต์ glucose-YP และอาหารเหลวไฮโดรไลเสตของแป้งมันสำปะหลัง ได้สายพันธุ์ DMKU-ET15 เมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมการหมักเอทานอลโดยใช้สายพันธุ์ DMKU 3-ET15 ในอาหารเหลวไฮโดรไลเสตของแป้งในฟลาสก์ บ่มบนเครื่องเขย่า พบว่าเมื่อหมักเอทานอลในอาหารเหลวไฮโดรไลเสตของแป้งที่ปรับให้มีกลูโคส เริ่มต้น 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้เอทานอลสูงสุด 7.86 เปอร์เซ็นต์โดย

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

น้ำหนัก ที่เวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับอัตราการผลิตเอทานอล 3.28 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลผลิตการหมักเท่ากับ 85.5 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี

ชุติกาญจน์, (2556) คัดแยกเชื้อยีสต์จากผลไม้ชนิดเปลือกบาง เช่น องุ่น ฝรั่ง ชมพู่ โดยเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร Yeast Peptone Dextrose (YPD) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล การผลิตสารหอมระเหย และการทำขนมปัง เมื่อหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีสต์ที่คัดเลือกด้วยไพร์เมอร์ ITS4 และ ITS5 พบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้จากผลองุ่นเขียว คือ *Hanseniaspora uvarum, Metschikowia pulcherrima* และ *Candida* sp. และยีสต์จากผลฝรั่ง คือ *Cryptococcus flavescens* นอกจากนี้พบยีสต์ที่ยังไม่ทราบชนิดอีกจำนวน 7 สายพันธุ์ จากคุณลักษณะของยีสต์ที่คัดแยกได้ พบว่า *H. uvarum* สามารถผลิตสารหอมระเหยประเภทกลิ่นผลไม้ได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น *M. pulcherrima* สามารถผลิตรงควัตถุสีแดงเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร YPD และ *H. uvarum* เมื่อทดสอบในการผลิตขนมปัง พบว่าสามารถทำให้ขนมปังมีสีขาว ส่วนการผลิตเอทานอลของยีสต์ทั้ง 4 ชนิด ในอาหารที่มีน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *H. uvarum* ให้ปริมาณเอทานอล 2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แต่ทนต่อความเข้มข้นเอทานอลในระหว่างการหมักได้ไม่เกิน 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และยีสต์ทุกสายพันธุ์ที่คัดแยกในงานวิจัยนี้ไม่สามารถจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส เมื่อทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร YPD

2.1.2 ลักษณะทั่วไปของยีสต์

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรฟังไจ (Kingdom Fungi) เช่น เดียวกับเชื้อรา แต่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular) การสืบพันธุ์ของยีสต์มีทั้งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

- การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้แก่ การแตกหน่อ (budding) การแบ่งตัว (fission) การแตกหน่อและการแบ่งตัวเกิดร่วมกัน (bud-fission) และยีสต์บางชนิดอาจมีการสร้างคอนิเดีย (conidia)

- การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศมี 2 พวก คือ พวกที่สร้าง ascospore และพวกที่สร้าง badiospore ซึ่งสปอร์ทั้งสองชนิดนี้เกิดขึ้นจากการรวมตัวของนิวเคลียส และตามด้วยการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโอซีส (meiosis) (ศศิธร, 2543)

ยีสต์ มีองค์ประกอบภายในเซลล์ที่อุดมไปด้วยแหล่งของสารอาหารที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน คาร์โบไฮเดรต วิตามินบีรวม เกลือแร่ และไขมัน ซึ่งโปรตีนจากยีสต์มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายอย่างครบถ้วนโดยเฉพาะไลซีนมีอยู่ในปริมาณสูง (Reed and Nagodawithana, 1991)

2.1.3 สรีรวิทยาของยีสต์ (phyology of yeasts)

ในยีสต์พบว่ามีปฏิกิริยาทางสรีรวิทยาแตกต่างกันเช่นเดียวกับสัณฐานวิทยาและกลไกการสืบพันธุ์ การย่อยสลายน้ำตาล เช่น กลูโคสอาจเกิดในลักษณะไม่ใช้ออกซิเจน (กระบวนการหมัก) หรือแบบใช้ออกซิเจน (การหายใจ) กระบวนการที่เป็นแบบฉบับ (typical) มากที่สุด คือ การย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนหรือกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งผลผลิตสุดท้ายจะได้

เอทิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาพที่มีออกซิเจนในกระบวนการหายใจจะเกิดออกซิเดชันอย่างสมบูรณ์จนได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แต่ถ้าเกิดออกซิเดชันไม่สมบูรณ์จะได้กรดและสารตัวกลางอื่นๆ ผลผลิตที่มีความสำคัญได้แก่ แอลกอฮอล์ กรดเอสเทอร์ กลีเซอรอล และอัลดีไฮด์ ก่อนที่ยีสต์จะเกิดกระบวนการหมักนั้นสารในโมเลกุลใหญ่ เช่น พอลิแซ็กคาไรด์ จะต้องถูกย่อยด้วยเอนไซม์ ชนิดของเอนไซม์ไฮโดรเลสแตกต่างไปตามจีนัสและสปีชีส์ของยีสต์ซึ่งใช้คุณสมบัตินี้ในการแยกความแตกต่างของแต่ละสปีชีส์ได้ นอกจากนี้ยีสต์ยังมีเอนไซม์อื่นๆ เช่น แลกเทส อินเวอร์เทส และคาตาเลส ซึ่งมีความสำคัญทางการค้าในทำนองเดียวกันในกระบวนการหายใจยังมีความแตกต่างของสารประกอบที่จะถูกย่อยโดยยีสต์ชนิดต่างๆ ยีสต์บางชนิดสามารถใช้เพนโทส พอลิแซ็กคาไรด์ (แป้ง) น้ำตาลแอลกอฮอล์ (แมนนิทอล ซอร์บิทอล) กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก และสารอินทรีย์อื่นๆ

ยีสต์ได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อนำไปสร้างโปรตีน และยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียไอออนได้ ความสามารถในการใช้ไนเตรตไนไตรท์และความสามารถในการดึงหมู่อะมิโนออกจากกรดอะมิโน ช่วยแยกความแตกต่างของยีสต์แต่ละสายพันธุ์หรือแต่ละสปีชีส์ได้

ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปของซัลเฟต หรือสารอินทรีย์ซัลเฟอร์ เช่น ซีสเทอีน หรือ เมทิโอนีน แร่ธาตุอื่นๆ ที่ยีสต์ต้องการเพื่อการเจริญ ได้แก่ โพแทสเซียม แมกนีเซียม โซเดียม สารที่ต้องการในปริมาณเล็กน้อย คือ โบรอน ทองแดง สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ไอโอดีน และโมลิบดีเนียม เพื่อให้ยีสต์เจริญเติบโตมากที่สุด

ยีสต์พวกที่ชอบแรงดันออสโมซิสสูง (osmophilic yeasts) สามารถเจริญอยู่ในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูงๆ ได้โดยมีความขึ้นจำกัด ยีสต์สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0-47 องศาเซลเซียส บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ที่ 20-30 องศาเซลเซียส ยีสต์ที่ก่อโรคเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปยีสต์เจริญดีที่สุดในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างระหว่าง 3.5-3.8 ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.1.4 นิเวศวิทยาของยีสต์ (ecology of yeasts)

ยีสต์พบทั่วไปในธรรมชาติ ทั้งในดิน น้ำ หรือในส่วนต่างๆ ของพืช ยีสต์บางชนิดอาจพบอยู่กับแมลงหรือแม้แต่ในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แพร่กระจายไปโดยกระแสลมและอาศัยแมลงพาไป ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์อาศัยอยู่บนสารอินทรีย์ที่ตายแล้วบางชนิดเป็นปรสิตอาศัยโฮสต์ที่มีชีวิตก่อโรคให้แก่ คน สัตว์ และพืชได้

แหล่งที่พบยีสต์ได้บ่อยๆ คือ แหล่งที่มีน้ำตาลเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวาน มีองค์ประกอบของสารอินทรีย์ และมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์แต่ละชนิด เช่น ยีสต์พวก *Saccharomyces* เจริญได้ดีในที่ที่มีน้ำตาล เช่น น้ำหวานของดอกไม้ตามผิวของผลไม้ ผลไม้ที่สุกงอม ในน้ำผลไม้ที่เกิดการหมัก เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบยีสต์ได้ในผักดอง ผลไม้ดองและอาหารหมัก (สาวิตรี, 2549)

2.2 เอทานอล

เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนชนิดหนึ่งที่มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี สามารถติดไฟได้ ให้เปลวไฟสีน้ำเงินไม่มีควัน ระเหยง่าย ละลายได้ดีในน้ำ และสารอินทรีย์อื่นๆ เช่น เมทิลแอลกอฮอล์ อีเทอร์ คาร์บอนเตตระคลอไรด์ และคลอโรฟอร์ม เป็นต้น ให้ค่าพลังงานความร้อน (calorific value) โดยการเผาไหม้ประมาณ 64,000 บีทียูต่อกิโลกรัม (สาวิตรี, 2540)

2.2.1 คุณสมบัติของเอทานอล

เอทานอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุล C_2H_5OH ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน เอทานอลมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 และจัดเป็นโมเลกุลที่มีขั้วจึงสามารถละลายน้ำได้ โดยหนึ่งโมเลกุลจะประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หนึ่งหมู่ มีจุดเดือด 78.4 องศาเซลเซียส จุดเยือกแข็ง -112.3 องศาเซลเซียสและมีค่าความถ่วงจำเพาะ 0.7851 ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส

เนื่องจากเอทานอลมีจุดเยือกแข็งต่ำจึงสามารถนำมาใช้เป็นของไหลในเทอร์โมมิเตอร์สำหรับอุณหภูมิที่ต่ำกว่า -40 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นจุดเยือกแข็งของ mercury และนำมาใช้ประโยชน์สำหรับงานอื่นๆ ที่ต้องการอุณหภูมิต่ำ เช่น antifreeze ใน automobile adiator นอกจากนี้ยังใช้เป็นตัวทำลายสี ยา และแลคเกอร์ ใช้เช็ดทำความสะอาดบาดแผล และใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถนำมาผสมในน้ำมันเบนซินซึ่งจะช่วยเพิ่มค่าออกเทนได้ เรียกว่า แก๊สโซฮอล์

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

2.2.2.1 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

เป็นการใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์เอทานอลโดยนำเอาเอธิลีนซึ่งเป็นก๊าซที่เป็นผลพลอยได้จากการกลั่นน้ำมันดิบมาทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถัน จะได้สารผสมเอธิลซัลเฟต นอกจากนี้ยังอาจสังเคราะห์ได้โดยการนำเอาเอธิลีนมาทำปฏิกิริยาไฮเดรชันโดยมีกรดฟอสฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในสมการที่ (1) (วิมล, 2526) เอทานอลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีเรียกว่า “เอทานอลสังเคราะห์”

$$\underset{\text{(เอธิลีน)}}{CH_2=CH_2+H_2O} \longrightarrow \underset{\text{(เอทานอล)}}{CH_3CH_2OH} \qquad (1)$$

2.2.2.2 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการหมัก

เป็นกระบวนการทางชีวเคมีในการผลิตเอทานอล วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบทางการเกษตร เอทานอลที่ได้เรียกว่า "ไบโอเอทานอล" การหมักเอทานอลที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ มีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมี (สุมณฑา, 2545) การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักมี 2 ขั้นตอนสำคัญ คือ ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทแป้งและวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล ขั้นตอนที่อาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในสมการที่ (2)

$$\underset{\text{(แป้ง)}}{C_6H_{10}O_5} + H_2O \longrightarrow \underset{\text{(น้ำตาล)}}{C_6H_{12}O_6} \qquad (2)$$

ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลโดยยีสต์หรือแบคทีเรียโดยกระบวนการไกลโคไลซิส ในสภาวะไม่มีออกซิเจนดังสมการที่ (3)

$$\underset{\text{(น้ำตาล)}}{C_2H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{(คาร์บอนไดออกไซด์)}}{2CO_2} + \underset{\text{(เอทานอล)}}{2C_2H_5OH} + 28.7\ \text{kcal} \qquad (3)$$

จากสมการเคมี (2) (3) พบว่าแป้ง 90 กรัม จะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม จากนั้นเชื้อยีสต์หรือแบคทีเรียจะหมักน้ำตาลกลูโคสเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล 51.1 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัมโดยน้ำหนัก แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลที่จะสามารถนำมาผลิตเอทานอลใช้ได้จริงมีเพียง 95 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น และน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือยีสต์หรือแบคทีเรียจะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อสร้างพลังงานและผลิตภัณฑ์พลอยได้ (by Product) อื่นๆ เช่น อะซิติก กรดแลกติก และกลีเซอรอล เป็นต้น (สาวิตรี, 2549)

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.3 ผลไม้พื้นบ้านที่นำมาคัดแยกเชื้อยีสต์

ผลไม้พื้นบ้านที่นำมาคัดแยกเชื้อยีสต์ทนร้อน ได้แก่ มะเฟือง ตะขบ พุทรา หมากเบน มะเม่า เสาวรส ฟักข้าว ลูกหม่อน กล้วยนวล มะขามเทศ และลูกยอ

ภาพที่ 2.1 มะเฟือง (*Averrhoa carambola* Linn.)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น: เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 3-5 เมตร ลำต้นสีน้ำตาลดำ ผิวขรุขระ

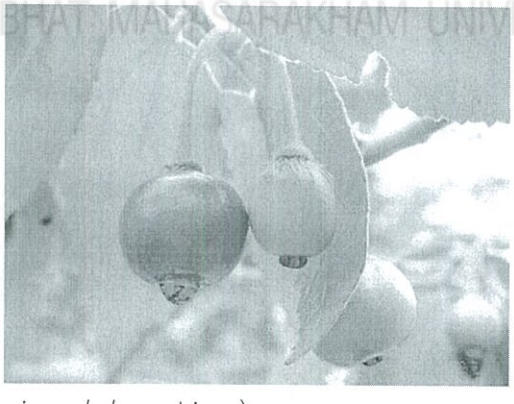
ใบ: ประกอบแบบขนนก ใบย่อยรูปขอบขนาน แถบใบหอก

ดอก: ช่อขนาดเล็ก ดอกสีชมพู

ผล: ผลสด อวบน้ำ มีสันโดยรอบ ผ่าตามขวางจะเป็นรูปดาว ผลดิบสีเขียว ผลสุกเหลือง

เมล็ด: สีดำยาวเรียว 0.5 เซนติเมตร (อร่าม และคณะ, 2548)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 2.2 ตะขบ (*Muntingia calabura* Linn.)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น: เป็นไม้ต้น สูง 5–7 เมตร เปลือกสีเทา กิ่งแผ่สาขาขนานกับพื้นดิน ตามกิ่งมีขนปกคลุม ขนนุ่ม และปลายเป็นตุ่ม ยอดอ่อนเมื่อจับดู

ใบ: ใบเดี่ยว เรียงสลับแบบทแยงกัน รูปขอบขนานแกมรูปไข่ ปลายใบเรียวแหลม โคนใบข้างหนึ่งมนข้างหนึ่งแหลม ขอบใบหยัก มีขนปกคลุมหนาแน่น เส้นใบ มี 3–5 เส้น ด้านบนสีเขียว ด้านล่างสีนวล ก้านใบยาว 0.2–0.6 เซนติเมตร มีขน โคนก้านเป็นปม

ดอก: ออกเดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ เหนือง่ามใบ ก้านดอกยาวถึง 1.5–1.6 เซนติเมตร มีขน กลีบรองกลีบดอก 5 กลีบ ไม่ติดกัน สีเขียว รูปหอก กว้างประมาณ 3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 10–12 มิลลิเมตร ปลายแหลมเป็นหางยาว โคนกลีบตัด ด้านนอกมีขน ด้านในเกลี้ยงกลีบดอก 5 กลีบ สีขาว รูปไข่กลับป้อมๆ ย่นเกลี้ยง กว้างประมาณ 9 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 11 มิลลิเมตร เกสรผู้จำนวนมากที่ก้านเกสรจะมีความยาวประมาณ 5–6.5 มิลลิเมตร เกลี้ยง เกสรเมียก้านเกสรสั้น

ผล: กลม ผิวบางเรียบ เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.75-1.5 เซนติเมตร สุกสีแดง,รสหวาน กินได้ เมล็ดเล็กๆ จำนวนมาก (อร่าม และคณะ, 2548)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 2.3 พุทรา (*Ziziphus mauritiana* Lam.)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น: เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง สูง 5-10 เมตร เปลือกลำต้นมีร่องเล็กๆ ตามยาวลำต้น ยอดอ่อนมีขนปกคลุมเล็กน้อย บริเวณข้อกิ่งมีหนาม 2 อัน เจริญมาจากหูใบ ต้นแก่สีเทา-น้ำตาล

ใบ: ใบเดี่ยว เรียงตัวแบบสลับ ก้านใบ ยาว 5-10 มิลลิเมตร โคนก้านใบมีหูใบ 2 อัน รูปสามเหลี่ยม เมื่อใบกางเต็มที่หูใบเปลี่ยนเป็นหนาม หนามโค้งกลับ (recurved) หนามยาว 3-8 มิลลิเมตร ใบรูปไข่หรือรูปรี โคนใบมนหรือ oblique ปลายใบมนหรือมีติ่งแหลมเล็ก ขอบใบเรียบ ผิวใบมีขน

ดอก: ดอกช่อ cymose เกิดที่ซอกใบ ช่อละ 3-21 ดอก ก้านช่อดอกยาว 2-10 มิลลิเมตร ก้านดอกย่อยยาว 3-8 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางดอกบาน 5-6 มิลลิเมตร กลีบเลี้ยง 5

กลีบ สีเขียว โคน กลีบติดกันปลายแยกเป็น 5 แฉก แต่ละแฉก รูปไข่ปลายแหลม กว้าง 1-1.5 มิลลิเมตร ยาว 1.5-2 มิลลิเมตร

ผล: ผลสดแบบ drupe รูปกลมหรือรูปไข่ เส้นผ่าศูนย์กลางผล 1-2 เซนติเมตร เมล็ดจำนวน 1 เมล็ด

เมล็ด: รูปร่างกลมเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1 เซนติเมตร เมื่อสุกสีเหลือง กินได้ บางชนิดผลกลมปลายแหลมคล้ายผลละมุดไทย บางชนิดมีรสหวานสนิท บางชนิดก็เปรี้ยว และฝาดโดยมากที่เกิดเองในป่ามีรสเปรี้ยว (อร่าม และคณะ, 2548)

ภาพที่ 2.4 หมากเบน (*Flacourtia indica* Zoll. & Moritzi)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น: เป็นไม้ยืนต้นขนาดกลาง ลำต้น สูง 8-15 เมตร มีหนามแหลมยาวออกตามลำต้น ยาว 6-8 เซนติเมตร เรือนยอดเป็นทรงพุ่มสูง

ใบ: ใบเดี่ยว เรียงแบบสลับตรงข้ามหรือเป็นวงรอบข้อ แผ่นใบเรียบรูปใบหอก ผิวใบเรียบมัน ขอบใบหยักมนถี่ ปลายใบเรียวแหลม โคนใบสอบเรียว ใบกว้าง 3-4 เซนติเมตร ยาว 9-12 เซนติเมตร เส้นใบแตกแบบขนนก เส้นกลางใบเห็นชัดเจน

ดอก: ดอกเดี่ยว ขนาดเล็ก ออกตามซอกใบหรือปลายยอด ดอกสีขาว

ผล: ผลเดี่ยว ทรงกลม ผิวเปลือกเรียบแวว เมื่อผลสุกเนื้อในมีสีน้ำตาลแดง เมล็ดขนาดเล็กจำนวนมาก (ไกรสร, 2550)

ภาพที่ 2.5 มะเม่า หรือ หมากเม่า (*Antidesma ghaesembilla* Gaertn.)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

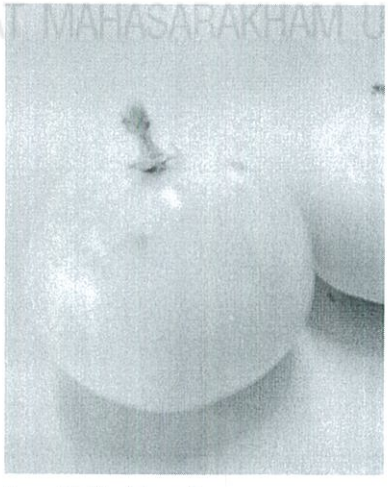
ต้น:เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูง 3-6 เมตร แตกกิ่งก้านสาขาเป็นพุ่มทึบ กิ่งอ่อนยอดอ่อน มีขน

ใบ: ใบเดี่ยวรูปไข่ หรือรูปวงรี กว้างประมาณ 3-5 เซนติเมตร ยาวประมาณ 5-7 เซนติเมตร ผิวใบก้านบนเกลี้ยงหรือมีขนเล็กน้อย ด้านล่างมีขนสั้นๆ ใบอ่อนสีน้ำตาล ใบแก่สีเขียว

ดอก: ออกเป็นช่อตามปลายกิ่ง ประกอบด้วยดอกย่อยจำนวนมาก

ผล: ผลติดเป็นพวง ขนาดประมาณ 4-5 มิลลิเมตร เมื่ออ่อนสีเขียว เปลี่ยนเป็นสีดำเมื่อสุก (อมรา, 2545)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 2.6 เสาวรส (*Passiflora laurifolia* Linn.)

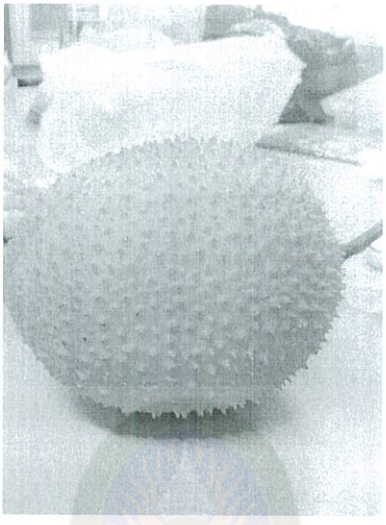
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น: เป็นไม้เถาเลื้อยเนื้อแข็ง อายุหลายปี สามารถเลื้อยได้ไกลถึง 10 เมตร

ใบ: ใบเดี่ยว รูปไข่แกมขอบขนาน ออกสลับกัน ปลายใบแหลม โคนใบมน

ดอก: ดอกออกเดี่ยว ห้อยลงตามซอกใบ กลีบดอก สีม่วง กลีบเลี้ยงสีเขียว มีรยางค์เรียงเป็นวง 2-3 ชั้น สีม่วงเข้ม ส่วนปลายมีสีขาว มีกลิ่นหอมมาก

ผล: กลมหรือรูปไข่ มีเมล็ดจำนวนมาก เมื่อสุกจะมีสีเหลืองอมเขียว ผลรับประทานได้ ออกดอกตลอดปี ขยายพันธุ์โดยการเพาะเมล็ด ตอนกิ่ง (อร่าม และคณะ, 2548)



ภาพที่ 2.7 ฟักข้าว *(Momordica cochinchinensis* Spreng)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น: เป็นไม้เถาเลื้อย มีมือเกาะยึดไปกับต้นไม้ใหญ่ เถาสีข้าวเข้มลักษณะสี่เหลี่ยม

ใบ: เป็นใบเดี่ยว รูปหัวใจปลายใบแหลม โคนใบโค้งมนและเว้าเข้าหาก้านใบขอบใบทั้ง 2 ข้างเว้าเข้าหาเส้นกลางใบ เป็นสามแสก แผ่นใบเรียบ เป็นมันสีเขียวเข้ม ขนาดเท่าฝ่ามือ

ดอก: เป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ คล้ายดอกตำลึง มีกลีบดอก 5 กลีบ สีเขียวอมเหลือง

ผล: ทรงกลมรี กว้าง 8-10 เซนติเมตร มีหนามรอบๆ ผล ผลอ่อนสีเขียวและเปลี่ยนเป็นสีส้มแดง (อร่าม และคณะ, 2548)

ภาพที่ 2.8 ลูกหม่อน (*Morus* Spp.)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

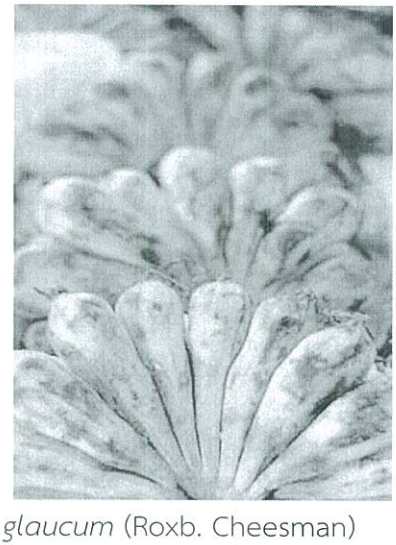
ต้น: เป็นไม้พุ่มขนาดกลาง อายุหลายปี ลำต้นตั้งตรง

ใบ: เป็นใบเดี่ยว ออกสลับ ก้านใบยาว มีทั้งชนิดขอบใบเว้าหยักลึก และขอบใบเป็นจัก กว้าง 8-14 เซนติเมตร ยาว 12-16 เซนติเมตร ผิวใบสากคาย

ดอก: ออกปลายยอดกลุ่มเล็กๆ ดอกช่อรูปทรงกระบอกที่ซอกใบ แยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน กลีบรวมสีขาวหม่น

ผล: เป็นผลรวมรูปทรงกระบอก ผลอ่อนสีเขียว ลูกสีแดง รสหวานอมเปรี้ยว (อร่ามและคณะ, 2548)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ 2.9 กล้วยนวล (*Ensete glaucum* (Roxb. Cheesman)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น: มีเหง้าอยู่ระดับดิน และมีกาบใบห่อซ้อนกันเป็นลำต้นเทียม สูง 3-4 เมตร โคนลำต้นใหญ่เส้นผ่าศูนย์กลาง 40-50 เซนติเมตร กาบต้นสีเขียวมีนวลหนา ไม่แตกหน่อ

ใบ: เป็นใบเดี่ยว มีก้านสีเขียวและมีร่องเปิด แผ่นใบกว้าง 30-60 เซนติเมตร ยาว 60-120 เซนติเมตร สีเขียวเข้ม ท้องใบมีนวลหนา ขอบใบขนาน

ดอก: ดอกช่อโค้งลง มีใบประดับสีเขียวซ้อนกันหลายใบ

ผล: ทรงกลมยาว 6-8 เซนติเมตร ข้างผลมีเหลี่อมเล็กน้อย

เมล็ด: เมล็ดทรงกลมสีดำ ผิวเรียบเป็นมัน ขนาดโตเท่านิ้วก้อย (อร่าม และคณะ, 2548)

ภาพที่ 2.10 มะขามเทศ (*Pithecellobium Dulce* Benth.)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น: เป็นไม้ยืนต้น ความสูง 5-10 เมตร ลำต้นขรุขระสีน้ำตาล มีหนามเป็นคู่ทั้งต้นและกิ่ง

ใบ: ออกเป็นกลุ่มตามกิ่ง เรียงสลับ ใบรูปไข่กลมออกเป็นคู่ ขนาดเท่าเล็บมือ แผ่นใบเรียบสีเขียวออกฟ้า ขอบใบเรียบ ก้านใบเล็กและยาว 2-3 เซนติเมตร

ดอก: เป็นช่อตามกิ่งก้านช่อดอกยาวประมาณ 15-30 เซนติเมตร ออกดอกเป็นกลุ่ม สีครีม มีก้านเกสรเป็นพู่เล็กๆ เมื่อดอกบาน

ผล: เป็นฝักยาวโค้งงอเข้าหากัน สีเขียวอ่อนภายในมีเมล็ดเรียงแถวเดี่ยว เนื้อหุ้มเมล็ดหนาสีขาวเมื่อสุขแก่มีสีชมพูหรือแดง รสฝาดมัน และฝักด้านในจะอ้าออก ภายในเนื้อผลมีเมล็ดรูปกลมแบนสีดำ ขนาด 0.5-0.7 เซนติเมตร (กัญจนา และคณะ, 2542)

ดอก: ดอกออกเป็นช่อกระจุกที่ซอกใบดอกย่อย มี 3-15 ดอก (อร่าม และคณะ, 2548)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 2.11 ลูกยอ (*Morinda citrifolia* Linn.)

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้น: เป็นไม้ยืนต้นขนาดเล็กแตกกิ่งก้านสาขาไม่มากนัก ผิวของลำต้นเป็นสีน้ำตาลเทาๆเกลี้ยง ลำต้นสูงประมาณ 1-6 เมตร

ใบ: ใบเดี่ยว ออกเรียงกันเป็นคู่ๆ ไปตามข้อต้น ใบเป็นรูปมนรี ปลายและโคนแหลม ขอบใบเป็นคลื่น ผิวใบเป็นมัน สีเขียว ขนาดใบกว้างประมาณ 2.5-7 นิ้ว ยาว 6-12 นิ้ว ก้านใบยาว 0.5 นิ้ว

ดอก: ออกเป็นช่อตามง่ามใบ ช่อดอกยาว 1-1.5 นิ้ว สีขาวขนาดเล็ก โคนกลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นรูปท่อ ปลายดอกแยกเป็น 5 กลีบ ยาว 4.5-5 มิลลิเมตร กลีบดอกนอกเรียบ แต่ด้านในมีขนหนาแน่นเฉพาะส่วนบน

ผล: เป็นรูปกลมหรือรูปรี ผิวเป็นตุ่มๆรอบๆผล ผลอ่อนสีเขียว พอแก่มีสีขาวอมเขียวหรือออกเหลือง ภายในมี 1 เมล็ด (กัญจนา และคณะ, 2542)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วัชรา และสุภัตรา (2546) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากชานอ้อย และผักตบชวาด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชานอ้อยจะมีปริมาณสูงกว่าที่ได้จากผักตบชวา โดยชานอ้อยมีค่าความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุด เมื่อใช้ระยะเวลาการหมัก 4 วัน คือ 0.966 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่า 80.499 กรัมต่อกิโลกรัม และผักตบชวามีค่าความเข้มข้นสูงที่สุด เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 3 วัน คือ 0.428 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่า 40.803 กรัมต่อกิโลกรัม เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักชานอ้อยและผักตบชวา ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี *T-Test* (แบบ Independence) พบว่า ปริมาณเอทานอลของชานอ้อยและผักตบชวาแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 และเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการหมักชานอ้อยและผักตบชวา ในแต่ละวันโดยวิเคราะห์ทางสถิติด้วยวิธี *F-Test* (One Way Analysis of Variance) พบว่ามีปริมาณเอทานอลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ 0.01

สุดารัตน์ (2555) ศึกษาการคัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้แป้งในการเจริญ จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ประเภทแป้งทั้งหมด 30 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ที่สามารถย่อยแป้งได้ทั้งหมด 102 ไอโซเลท แต่มีเพียง 6 ไอโซเลท ได้แก่ SE 2-1 SE 3-2 SE 6-6 SE 10-5 SE11-2 และ SE11-4 ที่

สำนักวิทยบริการฯ มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม วิทยานิพนธ์ งานวิจัย

จะสามารถผลิตเอทานอลจากแป้งได้ โดยสามารถผลิตเอทานอล 5เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกันประมาณ 2 เปอร์เซ็นต์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการคัดเลือก SE2-1 มาใช้ในการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งเนื่องจากเชื้อยีสต์ SE2-1 สามารถตกตะกอนได้ดีกว่าเชื้อยีสต์ไอโซเลทอื่นเพื่อให้ง่ายต่อการแยกเชื้อยีสต์ออกจากกระบวนการผลิตเอทานอล จากผลการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์สามารถผลิตเอทานอลจากแป้งได้ เท่ากับ 1.60 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) หรือ 44.20 เปอร์เซ็นต์ ของค่าผลผลิตทางทฤษฎีและมีการเจริญช้าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสระหว่างเชื้อยีสต์ย่อยแป้ง SE 2-1 และเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลและการเจริญได้ดีกว่ายีสต์ SE 2-1 โดยผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 7.40 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ขณะที่เชื้อยีสต์ย่อยแป้ง SE 2-1 ผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 6.6 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากการทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ SE2-1 ที่แยกจะสามารถได้จากผลิตภัณฑ์แป้งสามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและใช้ในการผลิตเอทานอลได้ ในขั้นตอนเดียวแต่สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่ต่ำ ดังนั้นจึงต้องมีการศึกษาต่อในด้านสภาวะในการเลี้ยงเพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอลให้เพิ่มขึ้นและการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์

ปริญญพันธุ์ และเมทินี (2556) ศึกษาความสามารถในการเจริญและศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยที่ยีสต์ทนร้อน ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า คือ NK1-4 NK3-5 NK3-10 และ NK3-14 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร YM broth เพื่อศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ โดยบ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 52 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ NK1-4 มีอัตราการเจริญสูงสุด โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) เท่ากับ 0.1356 0.1354 และ 0.0922 ต่อชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 35 และ40 องศาเซลเซียสตามลำดับจากนั้นนำยีสต์ NK1-4 มาศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้อาหารที่เตรียมจากกากน้ำตาล โดยแปรผันอุณหภูมิในการหมักเป็น 30 35 และ 40 องศาเซลเซียสจากผลการทดลองพบว่า ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้เร็วและสูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีปริมาณเอทานอลสูงสุดในวันที่ 8 ของการหมัก โดยวัดปริมาณเอทานอลได้เท่ากับ 8.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

ชุติมา (2551)การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากยีสต์จำนวน 267 สายพันธุ์ ที่แยกใหม่จากอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมเอทานอล พบว่ามียีสต์ 33 สายพันธุ์ที่สามารถหมักเอทานอลในอาหารเหลวจากมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดด่างของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และในจำนวนนี้พบว่ามี 4 สายพันธุ์ ที่คงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลได้สูง ได้แก่ PBB511-1 TM512-2 CPY514-1 และ TG514-2 ซึ่งหมักเอทานอลได้เท่ากับ 26.22 26.20 23.59 และ 22.51 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

นฤมล (2549) แยกยีสต์ทนร้อนจากผลไม้ ดอกไม้ ใบไม้ ดิน และผลปาล์ม จำนวน 145 ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถแยกยีสต์ทนร้อนได้ 70 ไอโซเลท ในจำนวนนี้ 6 ไอโซเลท เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบการหมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครส พบ 3 ไอโซเลท (MIY1 MIY48 และ MIY57) หมักน้ำตาลทั้ง 2ชนิดเป็นเอทานอลได้รวดเร็วภายใน 24ชั่วโมง เจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และจะสามารถเจริญได้ดีที่ 40

249772

องศาเซลเซียส เมื่อคัดเลือกจากความสามารถในการผลิตเอาทานอลจากอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 15 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลต MIY1 และ MIY57 ผลิตเอทานอลได้สูงกว่า 4.0 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)

พจมาลย์ (2555) งานวิจัยนี้ศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล โดยทั่วไป ได้แก่ ยีสต์ *S. cerevisie* สายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจะลดลงอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ประเทศไทยมีอุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่ฤดูร้อนจะมีอุณหภูมิสูงประมาณ 30-40 องศาเซลเซียส ดังนั้นการใช้ยีสต์ทนร้อนซึ่งเจริญและหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง แต่ยังคงเจริญและหมักเอทานอลได้ถึงแม้มีอุณหภูมิสูงขึ้น (Limtong, 1987) จึงน่าจะเหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลในประเทศไทย ได้มีการแยกยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยเทคนิคการเพิ่มจำนวนเชื้อในอาหารน้ำอ้อยที่เติมเอทานอล 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิสูง 40-45 องศาเซลเซียส

พนิดา และคณะ (2554) วัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่อย่างมากมาย ซึ่งมีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบ เมื่อย่อยสลายจะได้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสตามลำดับ ซึ่งน้ำตาลทั้งสองชนิดเป็นสารตั้งต้นที่ดีในการผลิตเอทานอล กระบวนการในการผลิตเอทานอลที่นิยมใช้คือ กระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) แต่อย่างไรก็ตาม กระบวนการนี้ต้องใช้จุลินทรีย์ที่สามารถหมักวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อคัดแยกยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการใช้ไซโลสในการผลิตเอทานอลได้ ซึ่งจากการทดลองสามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อนได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท และมี 12 ไอโซเลท (60 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารตั้งต้นและเปลี่ยนเป็นเอทานอล ซึ่งยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SBK 3-2 สามารถผลิต เอทานอลได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ (0.43 กรัมต่อลิตร)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

2.5 กรอบแนวคิดในการวิจัย

เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาตินำจะมีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอลในสภาวะอุณหภูมิสูง และสามารถนำเอาเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีในสภาวะอุณหภูมิสูง เป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถทำให้อุตสาหกรรมการผลิตบิวทานอลลดการใช้พลังงานและทำให้ต้นทุนการผลิตลดต่ำลง นอกจากนี้ยังมีข้อได้เปรียบในด้านอื่นๆ อีกหลายประการ เช่น อัตราการหมักเอทานอลเกิดขึ้นได้เร็วเมื่อเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิต่ำ และระบบการหมักในสภาวะอุณหภูมิสูงยังช่วยลดปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และที่ระดับอุณหภูมิสูงเอทานอลที่เกิดขึ้นในระบบสามารถระเหยทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวโดยอาศัยระบบที่เรียกว่า continuous stripping

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เครื่องมืออุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบ

3.1.1 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
3.1.2 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)
3.1.3 หม้อนึ่งไอน้ำความดันสูง (Autoclave)
3.1.4 เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter)
3.1.5 ตู้อบ (Hot air oven)
3.1.6 เครื่องชั่งละเอียด (Analytical Balance)
3.1.7 เครื่องเขย่า (Vortex mixer)
3.1.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
3.1.9 เครื่องปั่น (Mixer)
3.1.10 เครื่องวัดค่าของแข็งละลาย (^{o}Brix) (Hand refractometer)
3.1.11 เครื่องโครมาโทกราฟชนิดของเหลวประสิทธิภาพสูง
(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)
3.1.12 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟ (Gas Chromatography, GC)
3.1.13 กล้องจุลทรรศน์
3.1.14 เครื่องแก้วต่างๆ
3.1.15 อุปกรณ์ตรวจนับเซลล์ (Haemacytometer)
3.1.16 สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)
3.1.17 สารสกัดจากมอลท์ (Malt extract)
3.1.18 เปปโตน (Peptone)
3.1.20 ผงวุ้น (Agar)
3.1.21 เอทานอลสัมบูรณ์
3.1.22 กรดซัลฟิวริก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2 วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

3.2.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์

ทำการเก็บรวบรวมตัวอย่างในเขตอำเภอเมือง จ.มหาสารคามและจังหวัดใกล้เคียง เพื่อนำมาทำการคัดแยกเชื้อยีสต์ ตัวอย่างผลไม้พื้นบ้าน 13 ชนิดที่นำมาทดลอง ได้แก่ มะเฟือง ตะขบ พุทรา หมากเบน มะเม่า เสาวรส ฟักข้าว ลูกหม่อน กล้วยนวล มะขามเทศ และลูกยอ ทำการคัดแยกเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยวิธี enrichment technique ดัดแปลงวิธีการของ Limtong et al. (2007) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ yeast extract malt extract medium (YM) ที่มีการเติมเอทานอล 4 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ที่ค่า pH เท่ากับ 4.5 นำตัวอย่างมาบดหรือคลุกเคล้า

ให้เข้ากันปริมาณ 1 กรัม (ของแข็ง) หรือ 1 มิลลิลิตร (ของเหลว) ใส่ตัวอย่างในอาหารเหลวสูตร YM บ่มภายใต้สภาวะเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อนาน 48-72 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบการเจริญเของเชื้อที่อุณหภูมิสูงโดยทำการดูดสารละลายไปทำการเจือจางลำดับส่วนให้อยู่ในช่วง 10^{-2}-10^{-4} แล้วนำไปเกลี่ยบนอาหารแข็งสูตร YM บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนสังเกตุเห็นโคโลนี ทำการคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี สี ขนาดและความมันวาว แล้วนำไปขีดลากบนอาหารแข็งสูตรเดิมเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ และบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขี่ยโคโลนีเดี่ยวที่ได้และนำไปส่องดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เชื้อยีสต์บริสุทธิ์ที่คัดแยกได้นำไปเก็บรักษาบนอาหารแข็งสูตร YM (slant agar) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สำหรับการเก็บรักษาระยะสั้น) และเก็บรักษาใน 40 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) glycerol ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (สำหรับการเก็บรักษาระยะยาว)

3.2.2 ทดสอบการหมักในอาหารเหลวสูตร YM

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้มาขีดลากบนอาหารแข็งสูตร YM (slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเขี่ยเชื้อที่ได้ปริมาณเต็มลูปลงในหลอดอาหารเหลวสูตร YM ที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้ ทำทั้งหมดทุกเชื้อ เชื้อละ 3 ซ้ำ บ่มหลอดอาหารที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24-72 ชั่วโมง สังเกตุแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊สแต่ละหลอด

3.2.3 ทดสอบความสามารถในการทนร้อนของเชื้อที่คัดเลือกได้ที่อุณหภูมิต่างๆ

ทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้มาขีดลากบนอาหารแข็งสูตร YM (slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ทำการเขี่ยเชื้อที่ได้ปริมาณเต็มลูปลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกล้าเชื้อเริ่มต้น 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส ทำการเก็บตัวอย่าง 5 มิลลิลิตรทุกๆ 2 ชั่วโมง เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างไปศึกษาการเจริญของเซลล์โดยการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

ทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้มาขีดลากบนอาหารแข็งสูตร YM (slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ทำการเขี่ยเชื้อที่ได้ปริมาณเต็มลูปลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เลี้ยงเซลล์

จนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะ log phase ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที ละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย NaCl ที่มีความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นคำนวณจำนวนเซลล์ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 1×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมกล้าเชื้อลงในอาหารเหลวสูตร YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 16 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 34 37 40 และ 43 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่ง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ทุกๆ ระยะ เป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์

- ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC
- การเจริญของเซลล์โดยวิธีการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer
- ค่าความเป็นกรดด่าง ด้วย pH meter
- ค่าของแข็งละลาย (^{o}Brix) ด้วย Hand refractometer

3.2.5 การจำแนกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

3.2.5.1 การสกัด gDNA จากเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

ดัดแปลงวิธีการของ Harju et al. (2004) เพื่อทำการสกัด gDNA จากเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้โดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ได้ในอาหารเหลวสูตร YM ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงโดยเครื่อง microcentrifuge ที่ความเร็ว 7,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที ละลายตะกอนเซลล์ในสารละลาย lysis buffer ที่ประกอบด้วย Triton X-100 ความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) SDS 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร), สารละลาย NaCl ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ สารละลาย Tris-HCl (pH 8.0) ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย EDTA (pH 8.0) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ นำเอาหลอดไมโครทิวป์ที่มีสารละลายไปแช่ในตู้ -80 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที (หรือจนกว่าสารละลายจะแข็งตัวอย่างสมบูรณ์) จากนั้นนำหลอดไมโครทิวป์ไปบ่มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ทำขั้นตอนในการแช่แข็งและบ่มที่อุณหภูมิสูงซ้ำอีกครั้ง จากนั้นนำเอาหลอดไมโครทิวป์ไปทำการ vortex อย่างแรง นาน 30 วินาที เติมสารคลอโรฟอร์มปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครทิวป์ จากนั้นทำการ vortexนาน 2 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที นาน 3 นาที ทำการดูดเอาสารที่อยู่ชั้นบนมาใส่ในหลอดไมโครทิวป์หลอดใหม่ เติมสารเอทานอลบริสุทธิ์ที่แช่เย็นปริมาตร 400 ไมโครลิตร นำเอาหลอด ไมโครทิวป์ไปแช่ในตู้ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดไมโครทิวป์ไปทำการปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้องที่ความเร็วรอบ 15,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนที่เป็นตะกอน DNA ทำการล้างตะกอน DNA ด้วยสารละลายเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เทสารละลายเอทานอลทิ้งโดยระวังอย่าให้ตะกอน DNA หลุดออกมาด้วย ทำให้ตะกอน DNA แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นละลายตะกอน DNA ด้วยสารละลาย TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ซึ่งสารละลาย TE ประกอบด้วย

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

สารละลาย Tris ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และสารละลาย EDTA (pH 8.0) ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ ทำการกำจัด RNA โดยบ่มสารละลาย DNA ที่มีการเติม RNaseA ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง

3.2.5.2 แอมพลิฟิเคชั่น PCR บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA

บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA ถูกแอมพลิไฟล์จาก gDNA โดยการทำ PCR โดยใช้ forward primer NL-1 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG) และ reverse primer NL-4 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G) (O'Donnell, 1993) ด้วย *Taq* PCR core kit (QIAGEN, Germany) ปฏิกิริยา PCR ประกอบด้วย gDNA ปริมาตร 1 ไมโครลิตร, dNTP mix, 10x PCR buffer, primer แต่ละชนิด ความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร, *Taq* DNA polymerase ความเข้มข้น 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร ปริมาตรรวมของปฏิกิริยาจะถูกปรับให้เป็น 50 ไมโครลิตร ด้วยน้ำที่ปราศจาก RNase สภาวะในการทำ PCR เป็นดังนี้ อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 5 นาที จำนวน 1 รอบ ตามด้วย อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 1 นาที และ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 2 นาที จำนวน 35 รอบ จากนั้นเป็นการ extension ครั้งสุดท้ายที่ อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 นาที จำนวน 1 รอบ

3.2.5.3 การทำให้ผลิตภัณฑ์ PCR จากอะกาโรสเจลบริสุทธิ์

หลังจากการแอมพลิไฟล์ PCR ด้วย specific primers ผลิตภัณฑ์ PCR จะถูกนำมาแยกบนอะกาโรสเจล ด้วยวิธีการอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสโดยใช้อะกาโรสเจล ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ในสารละลาย 1X TAE buffer ชิ้นส่วนของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ต้องการจะถูกตัดออกจากเจลภายใต้แสงยูวี และทำให้ชิ้นผลิตภัณฑ์ PCR บริสุทธิ์โดยใช้ชุดสำเร็จรูป NucleoSpin® Extract II (Machery-nagel, Germany) ชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR จะถูกนำไปหาลำดับเบสโดยส่งไปวิเคราะห์ที่ First BASE Laboratories Sdn Bhd (Seri Kembangan, Selangor Darul Ehsan, Malaysia) และการวิเคราะห์ homology จะทำการวิเคราะห์โดยใช้ Blast program

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.2.5.4 การวิเคราะห์ลำดับเบส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จะใช้วิธี dideoxy-mediated chain termintion method (Sanger et al., 1977) ลำดับของนิวคลีโอไทด์จะถูกวิเคราะห์โดยใช้ standard Blast system ในฐานข้อมูล GenBank และ align โดยใช้ ClustalW method ทำการสร้างต้นไม้วิวัฒนาการโดยใช้วิธี neighbor-joining method ด้วยการทำซ้ำ 1000 bootstrap โดยใช้โปรแกรม MEGA เวอร์ชั่น 4.0

3.3 การวิเคราะห์ข้อมูล

วิธีคำนวณค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ที่สำคัญของการผลิตเอทานอล แสดงดังต่อไปนี้

1) ผลได้ของเอทานอล ($Y_{p/s}$)

ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้)

$$= \frac{\text{ความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ความเข้มข้นน้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)}}$$

2) อัตราผลผลิตเอทานอล (Q_p)

อัตราผลผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$$= \frac{\text{ความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ระยะเวลาของการหมัก (ชั่วโมง)}}$$

3) ผลได้ของเอทานอลเทียบกับทฤษฎี (Theoretical yield)

ผลได้เอทานอลจากการกระบวนการหมักเทียบกับทฤษฎี (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{Y_{p/s} \times 100}{0.51}$$

เมื่อ $Y_{p/s}$ คือ ผลได้ของเอทานอล (กรัมของเอทานอลที่ผลิตได้ต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้)

0.51 คือ ผลได้ของเอทานอลทางทฤษฎีเมื่อเทียบกับการใช้น้ำตาลกลูโคส

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

3.4 สรุปผล เขียนรายงานการวิจัยและเผยแพร่ผลงานวิจัย

3.5 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

1. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

2. ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.6 ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

กิจกรรม	ระยะเวลา											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1. ศึกษาข้อมูลวิจัยและทบทวนบทความทางวิชาการต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการวิจัย	←	→										
2. เก็บรวบรวมตัวอย่างเพื่อใช้ในการคัดแยกเชื้อยีสต์		←	→									
3. คัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างที่เก็บรวบรวมมาได้		←	—	→								
4. ทดสอบการหมักของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวสูตร YM				←	→							
5. ทดสอบความสามารถในการทนร้อนของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ที่อุณหภูมิต่างๆ						←	→					
6. ทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้								←	→			
7. จำแนกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้										←	→	
8. การวิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล เขียนรายงานการวิจัย และเผยแพร่ผลงานวิจัย											←	→

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์จากผลไม้พื้นบ้าน

คัดแยกเชื้อยีสต์จากผลไม้พื้นบ้าน 11 ชนิด (มะเฟือง ตะขบ พุทรา หมากเบน มะเม่า เสาวรส ฟักข้าว ลูกหม่อน กล้วยนวล มะขามเทศ และลูกยอ) โดยสังเกตุลักษณะสัญฐานวิทยาของยีสต์ ได้แก่ สี รูปร่าง ลักษณะขอบและความมันวาวของโคโลนี จากผลการทดลองพบว่าสามารถคัดแยกเชื้อที่มีลักษณะที่ต้องการได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากผลไม้พื้นบ้าน

ชนิดตัวอย่าง	รหัสสายพันธุ์	ลักษณะของโคโลนี			
		สี	รูปร่าง	ขอบ	ความมันวาว
ลูกหม่อน	Y-1	ครีม	กลม	หยัก	ไม่วาว
ลูกหม่อน	Y-2	ครีม	กลม	เรียบ	วาว
ลูกหม่อน	Y-3	ครีม	กลม	หยัก	ไม่วาว
ลูกหม่อน	Y-4	ครีม	กลมนูน	เรียบ	วาว
ลูกหม่อน	Y-5	ครีม	กลมนูน	เรียบ	ไม่วาว
ลูกหม่อน	Y-6	ครีม	กลมนูน	หยัก	ไม่วาว
ลูกหม่อน	Y-7	ครีม	กลม	เรียบ	ไม่วาว
พุทรา	Y-8	ครีม	กลม	เรียบ	ไม่วาว
พุทรา	Y-9	ขาว	กลม	หยัก	วาว
ฟักข้าว	Y-10	ครีม	กลม	หยัก	ไม่วาว
มะเฟือง	Y-11	ขาว	กลม	เรียบ	ไม่วาว
เสาวรส	Y-12	ใส	กลม	หยัก	ไม่วาว
ตะขบ	Y-13	ครีม	กลม	หยัก	ไม่วาว
พุทรา	Y-14	ขาว	กลม	หยัก	ไม่วาว

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

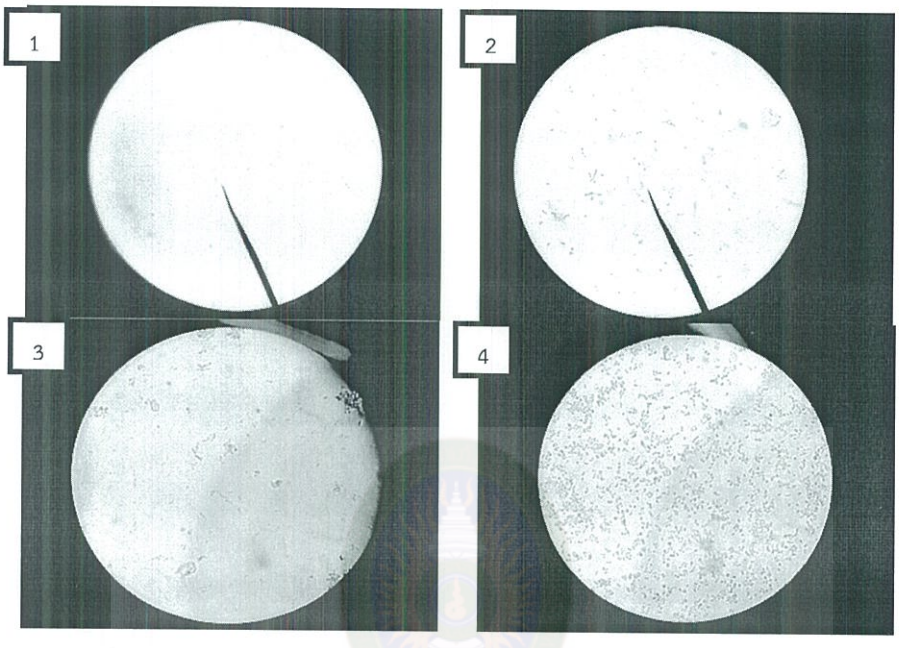
ตารางที่ 4.1 เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากผลไม้พื้นบ้าน (ต่อ)

ชนิดตัวอย่าง	รหัสสายพันธุ์	ลักษณะของโคโลนี			
		สี	รูปร่าง	ขอบ	ความมันวาว
พุทรา	Y-15	ครีม	กลม	หยัก	ไม่วาว
ตะขบ	Y-16	ครีม	กลมนูน	หยัก	ไม่วาว
ตะขบ	Y-17	ครีม	กลมนูน	เรียบ	ไม่วาว
พุทรา	Y-18	ขาว	กลมนูน	เรียบ	ไม่วาว
พุทรา	Y-19	ครีม	กลมนูน	หยัก	ไม่วาว
หมากเบน	Y-20	ครีม	กลมนูน	หยัก	ไม่วาว
มะเม่า	Y-21	ครีม	กลมนูน	หยัก	ไม่วาว
มะเม่า	Y-22	ครีม	กลมนูน	หยัก	ไม่วาว
หมากเบน	Y-23	ครีม	กลม	เรียบ	วาว
หมากเบน	Y-24	ครีม	กลม	หยัก	ไม่วาว
มะเฟือง	Y-25	ครีม ขอบใส	กลม	เรียบ	ไม่วาว
ลูกยอ	Y-26	ครีม	กลม	เรียบ	วาว
ลูกยอ	Y-27	ครีม	กลม	หยัก	ไม่วาว
มะขามเทศ	Y-28	ครีม	กลม	เรียบ	ไม่วาว
ลูกยอ	Y-29	ครีม	กลม	เรียบ	วาว
หมากเบน	Y-30	ครีม	กลม	หยัก	ไม่วาว
กล้วยนวล	Y-31	ครีม	กลม	หยัก	ไม่วาว
กล้วยนวล	Y-32	ครีม	กลมนูน	เรียบ	วาว
มะเม่า	Y-33	ครีม	กลม	หยัก	วาว
ลูกยอ	Y-34	ครีม	กลมนูน	หยัก	วาว
กล้วยนวล	Y-35	ครีม	กลมนูน	หยัก	วาว

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

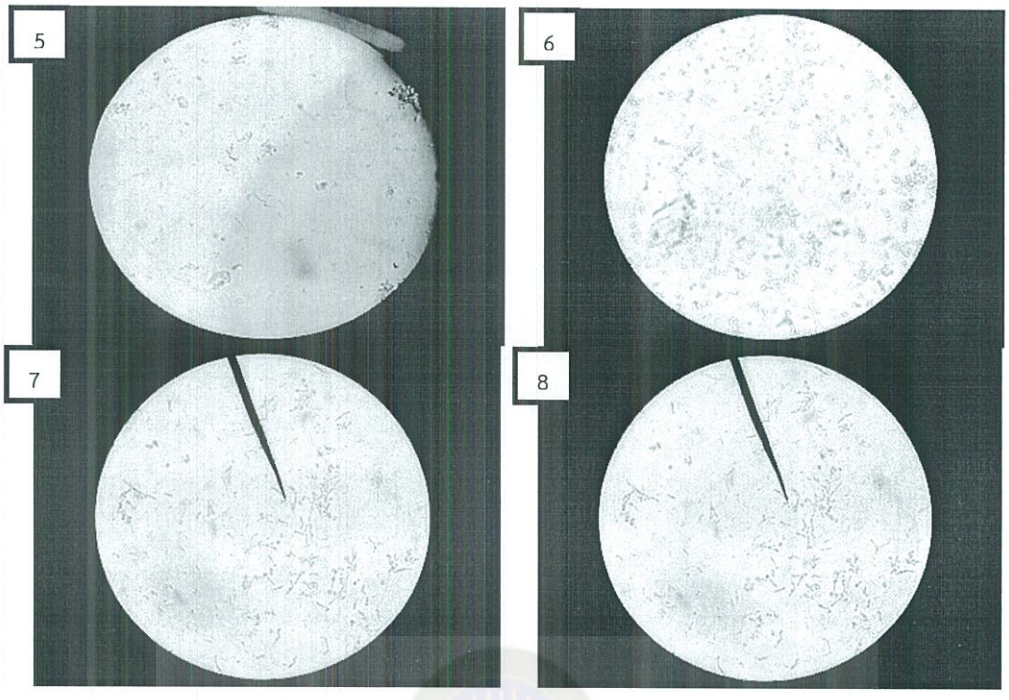
เชื้อยีสต์สามารถพบได้ทั่วไปจากหลายแหล่งในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ หรือพบในส่วนต่างๆ ของพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งในส่วนที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ผลไม้พื้นบ้านในเขตภาคอีสานสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาพอากาศที่มีอุณหภูมิเฉลี่ยค่อนข้างสูงเกือบตลอดทั้งปี และบางชนิดมีรสหวาน จากลักษณะเด่นข้างต้นทำให้ผลไม้พื้นบ้านอาจจะเป็นแหล่งที่สามารถพบเชื้อยีสต์ทนร้อนได้ เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้มีทั้งหมด 35 ไอโซเลท ส่วนใหญ่มีสีครีม รูปร่างค่อนข้างกลม และไม่ค่อยมีความมันวาว

เมื่อสังเกตลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า เชื้อยีสต์มีรูปร่างค่อนข้างกลม (ภาพที่ 4.1-4.6) โดยชนิดตัวอย่างผลไม้ ลูกหม่อน สามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ได้มากกว่าตัวอย่างชนิดอื่น แยกได้ 7 ไอโซเลท คิดเป็น 2.45 เปอร์เซ็นต์ ของจำนวนไอโซเลทที่แยกได้



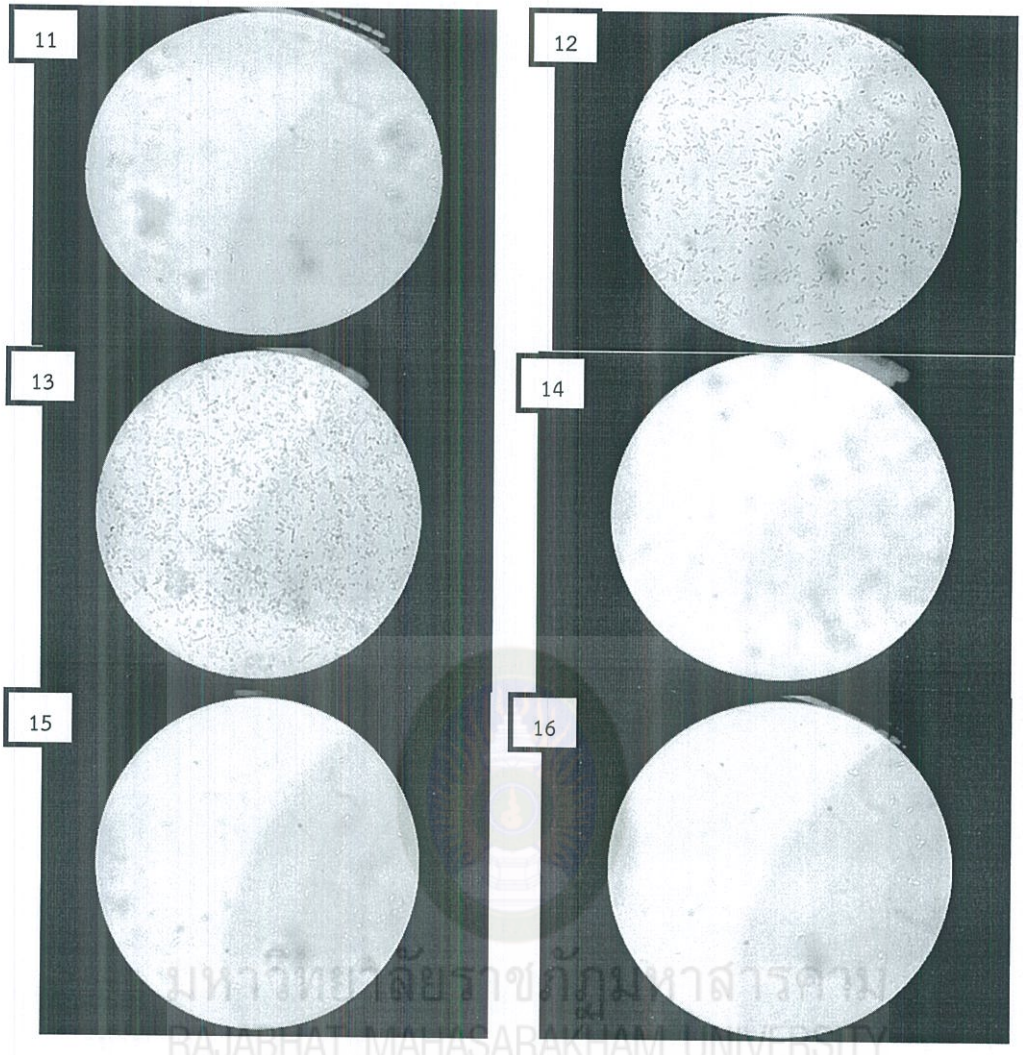
ภาพที่ 4.1 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 1) Y-1, 2) Y-2, 3) Y-3, 4) Y-4 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



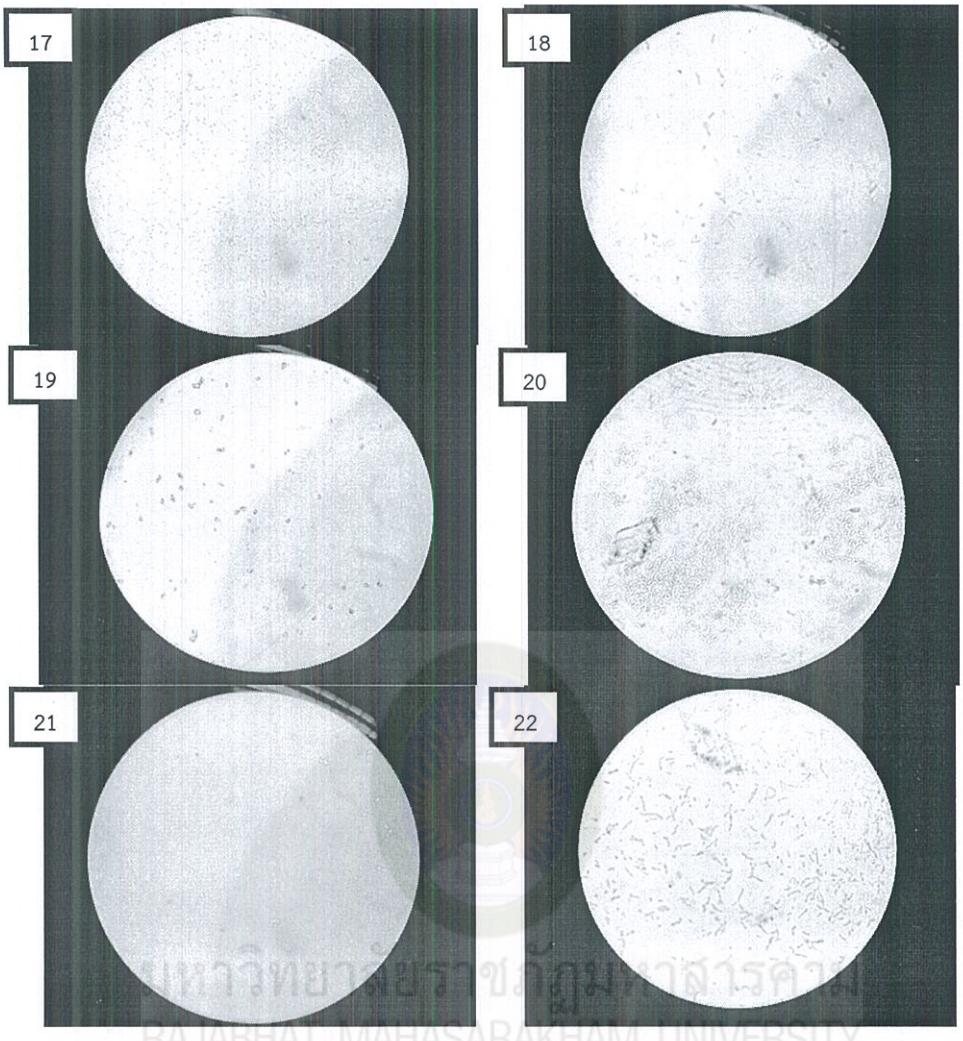
ภาพที่ 4.2 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 5) Y-5, 6) Y-6, 7) Y-7, 8) Y-8, 9) Y-9, 10) Y-10 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



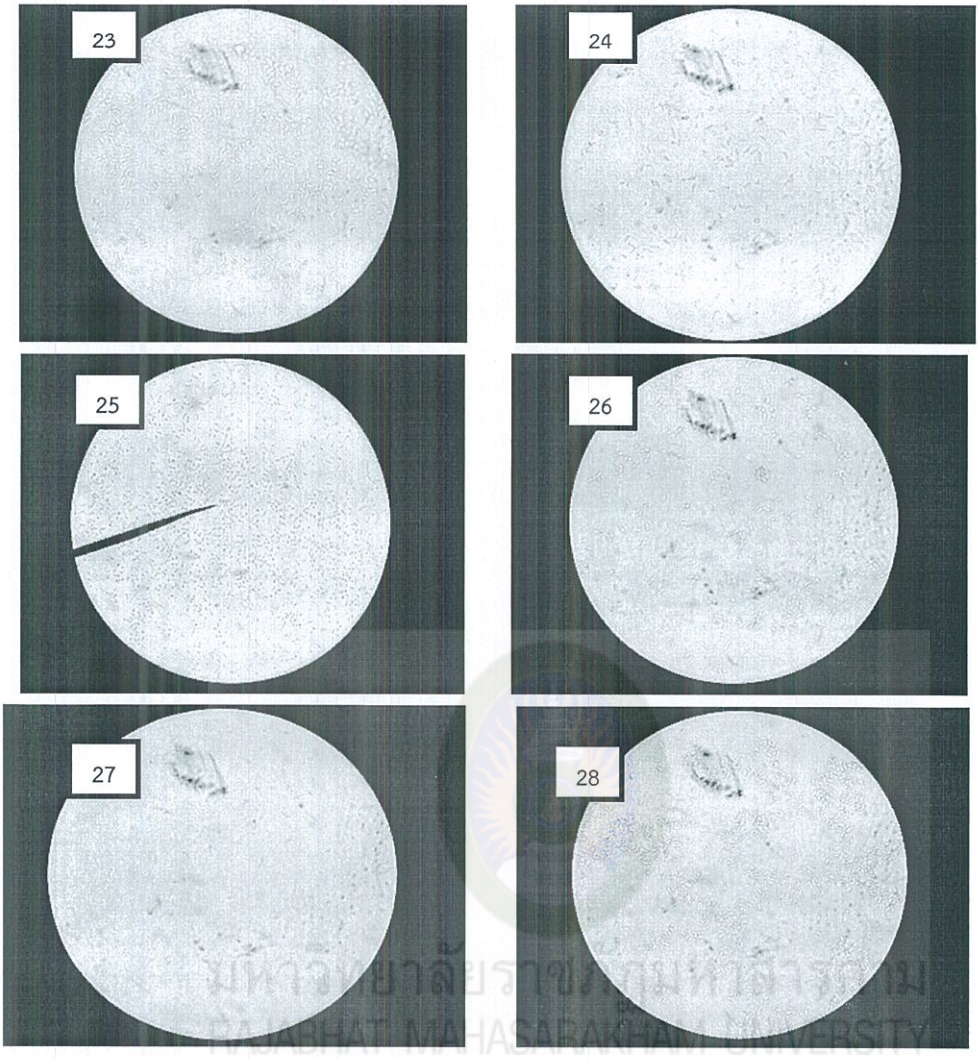
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.3 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 11) Y-11, 12) Y-12, 13) Y-13, 14) Y-14, 15) Y-15, และ 16) Y-16 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า



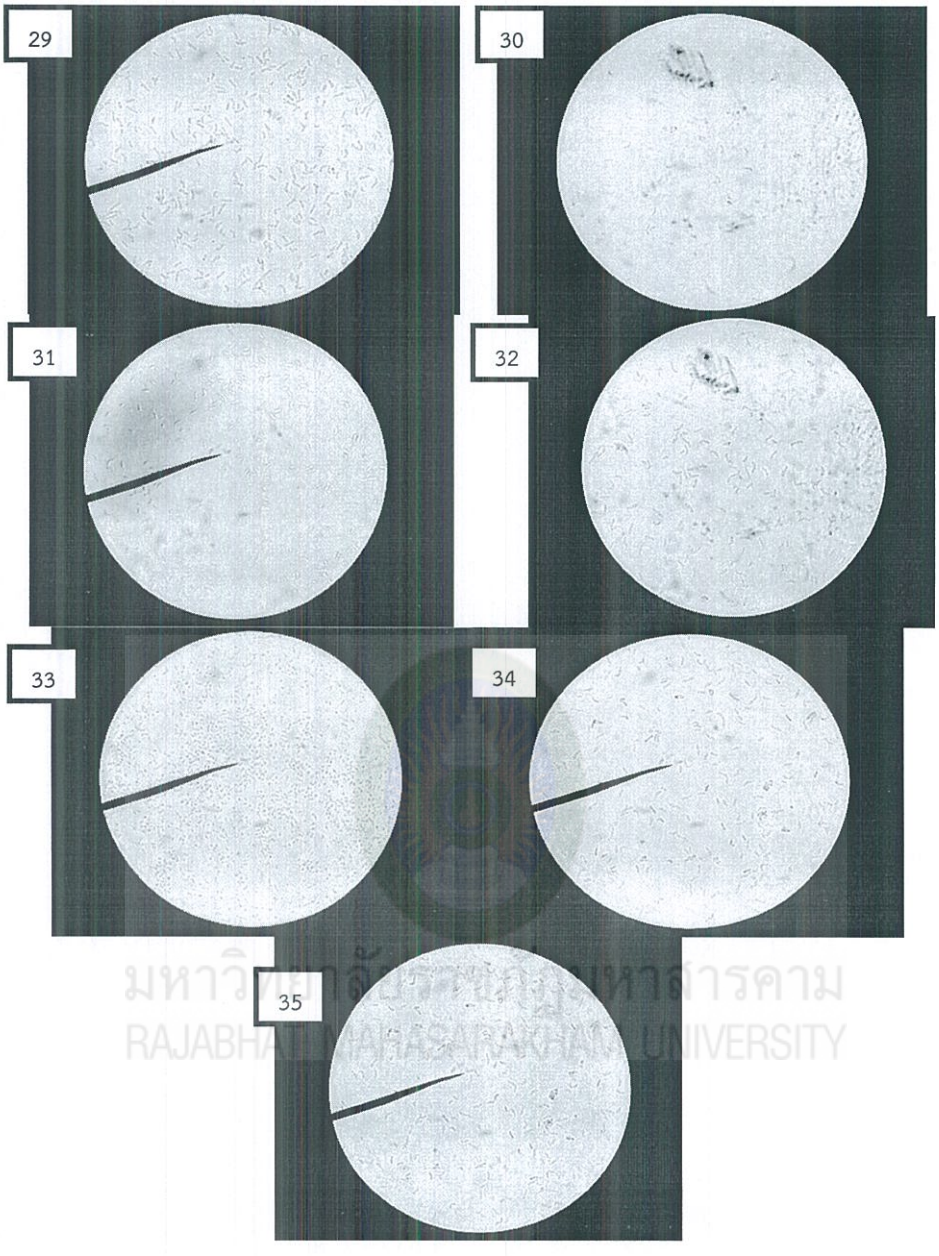
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.4 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 17) Y-17, 18) Y-18, 19) Y-19, 20) Y-20, 21) Y-21 และ 22) Y-22 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า



ภาพที่ 4.5 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 23) Y-23, 24) Y-24, 25) Y-25, 26) Y-26, 27) Y-27 และ 28) Y-28 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อใน อาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
RAJABHAT PHRANAKHON SI AYUTTHAYA UNIVERSITY

ภาพที่ 4.6 ลักษณะของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 29) Y-29, 30) Y-30, 31) Y-31, 32) Y-32, 33) Y-33, 34) Y-34 และ 35) Y-35 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อลงในอาหารสูตร YM เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขนาดขยายภาพเท่ากับ 400 เท่า

4.2 ทดสอบความสามารถในการเจริญของยีสต์ที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

ผลการศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ทั้ง 35 ไอโซเลท ที่อุณหภูมิ 40 45 และ 50 องศาเซลเซียส แสดงในตารางที่ 4.2 เชื้อยีสต์เกือบทุกไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และมีเพียง 10 ไอโซเลท (Y-9, Y-11, Y-25, Y-26, Y-27, Y-28, Y-29, Y-33, Y-34 และ Y-35) ที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
รหัสสายพันธุ์	40 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส	50 องศาเซลเซียส
Y-1	+++	+	-
Y-2	+	+	-
Y-3	+	+	-
Y-4	+++	+	-
Y-5	+++	+	-
Y-6	+	+	-
Y-7	+++	+	-
Y-8	+++	+	-
Y-9	+++	+	-
Y-10	+++	+	-
Y-11	+++	++	++
Y-12	+++	-	-
Y-13	+++	++	-
Y-14	+++	++	-
Y-15	-	-	-
Y-16	++	++	-

*หมายเหตุ +++ หมายถึง เจริญเติบโตดีมาก, ++ หมายถึง เจริญเติบโตดี, + หมายถึง ไม่ค่อยเจริญเติบโต และ – หมายถึง ไม่เจริญเติบโต

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.2 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		
	40 องศาเซลเซียส	45 องศาเซลเซียส	50 องศาเซลเซียส
Y-17	-	-	-
Y-18	-	-	-
Y-19	+++	+++	-
Y-20	+	-	-
Y-21	+++	+	-
Y-22	+++	+	-
Y-23	+++	-	-
Y-24	+	-	-
Y-25	+++	++	++
Y-26	+++	++	++
Y-27	+++	++	++
Y-28	+	+	+
Y-29	+++	+++	++
Y-30	+++	++	-
Y-31	+++	+	-
Y-33	+++	+++	+
Y-34	+++	++	++
Y-35	+++	+++	++

*หมายเหตุ +++ หมายถึง เจริญเติบโตดีมาก, ++ หมายถึง เจริญเติบโตดี, + หมายถึง ไม่ค่อยเจริญเติบโต และ – หมายถึง ไม่เจริญเติบโต

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

4.3 ทดสอบความสามารถในการหมักของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวสูตร YM

ผลการทดสอบความสามารถในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล แสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่าเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้เกือบทุกไอโซเลทสามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีเพียง 1 ไอโซเลทเท่านั้นที่ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ (Y-5) เชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ เชื้อยีสต์ Y-22 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 34.90 ± 0.16 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้เอทานอล เท่ากับ 0.38 ± 0.00 ดังนั้นเชื้อยีสต์ Y-22 จึงถูกคัดเลือกเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

ตารางที่ 4.3 การผลิตเอทานอลของเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวสูตร YM

รหัสสายพันธุ์	P (กรัมต่อลิตร)	$Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม)	Q_p (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	เวลา (ชั่วโมง)
Y-1	$32.26 \pm 0.36^{t, u}$	$0.36 \pm 0.00^{l, m, n}$	$0.45 \pm 0.01^{q,r}$	72
Y-2	26.84 ± 0.23^{n}	$0.36 \pm 0.00^{m, n, 0}$	0.37 ± 0.00^{l}	72
Y-3	9.01 ± 0.13^{c}	0.22 ± 0.00^{f}	0.13 ± 0.00^{c}	72
Y-4	30.69 ± 0.23^{f}	0.34 ± 0.00^{j}	0.43 ± 0.00^{p}	72
Y-5	ND^{a}	ND^{a}	ND^{a}	72
Y-6	19.26 ± 0.12^{j}	0.32 ± 0.00^{i}	0.27 ± 0.00^{i}	72
Y-7	24.73 ± 0.38^{m}	$0.35 \pm 0.01^{k, l ,m}$	0.34 ± 0.01^{k}	72
Y-8	$34.36 \pm 0.28^{w, x}$	$0.34 \pm 0.00^{j, k l}$	0.48 ± 0.00^{t}	72
Y-9	23.89 ± 0.16^{l}	$0.34 \pm 0.00^{j, k}$	0.33 ± 0.00^{j}	72
Y-10	32.86 ± 0.28^{v}	$0.36 \pm 0.00^{m,n, o}$	$0.46 \pm 0.00^{r, s}$	72
Y-11	32.89 ± 0.02^{v}	0.43 ± 0.00^{q}	0.46 ± 0.00^{s}	72
Y-12	$32.67 \pm 0.33^{n, v}$	$0.37 \pm 0.00^{n, o}$	$0.45 \pm 0.00^{r, s}$	72
Y-13	29.04 ± 0.11^{p}	$0.36 \pm 0.00^{l, m, n}$	$0.40 \pm 0.00^{n, o}$	72
Y-14	$31.73 \pm 0.24^{s,t}$	$0.36 \pm 0.00^{n,o}$	0.44 ± 0.00^{q}	72
Y-15	10.70 ± 0.18^{d}	0.24 ± 0.00^{g}	0.15 ± 0.00^{d}	72

P, ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร); Q_p, อัตราการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

$^{a-x}$ ตัวอักษรที่เหมือนกันภายในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันโดยวิธีการทดสอบแบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ผลการทดลองแสดงค่า ± SD

ND, ไม่สามารถตรวจสอบได้

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ตารางที่ 4.3 การผลิตเอทานอลของเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวสูตร YM (ต่อ)

รหัสสายพันธุ์	P (กรัมต่อลิตร)	$Y_{p/s}$ (กรัมต่อกรัม)	Q_p (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	เวลา (ชั่วโมง)
Y-17	34.33 ± 0.01 ^{w}	0.34 ± 0.00 $^{j, k}$	0.48 ± 0.00 ^{t}	72
Y-18	12.65 ± 0.42 ^{e}	0.27 ± 0.01 ^{h}	0.18 ± 0.01 ^{e}	72
Y-19	34.16 ± 0.23 ^{w}	0.34 ±0.00 $^{j, k}$	0.47 ± 0.00 ^{t}	72
Y-20	4.99 ± 0.23 ^{b}	0.14 ± 0.00 ^{b}	0.07 ± 0.00 ^{b}	72
Y-21	24.33 ± 0.38 $^{l, m}$	0.35 ± 0.01 $^{l, m, n}$	0.34 ± 0.01 $^{j, k}$	72
Y-22	34.90 ± 0.16 ^{x}	0.38 ± 0.00 ^{p}	0.48 ± 0.00 ^{t}	72
Y-23	30.75 ± 0.36 ^{r}	0.37 ± 0.00 $^{n, o}$	0.43 ± 0.01 ^{p}	72
Y-24	27.78 ± 0.33 ^{o}	0.37 ± 0.00 $^{n, o}$	0.39 ± 0.00 $^{l, m}$	72
Y-25	31.60 ± 0.28 ^{s}	0.38 ± 0.00 ^{p}	0.44 ± 0.00 ^{q}	72
Y-26	29.76 ± 0.02 ^{q}	0.37 ± 0.0 $^{o, p}$	0.41 ± 0.00 ^{o}	72
Y-27	15.73 ± 0.08 ^{f}	0.16 ± 0.00 ^{c}	0.22 ± 0.00 ^{f}	72
Y-28	16.92 ± 0.16 $^{g, h}$	0.17 ± 0.00 $^{c, d}$	0.24 ± 0.00 $^{g, h}$	72
Y-29	17.54 ± 0.36 ^{i}	0.18 ± 0.00 ^{d}	0.24 ± 0.01 ^{h}	72
Y-30	19.50 ± 0.33 $^{j, k}$	0.19± 0.00 ^{e}	0.27 ± 0.00 ^{i}	72
Y-31	17.60 ± 0.23 ^{i}	0.18 ± 0.00 ^{d}	0.24 ± 0.00 ^{h}	72
Y-32	17.22 ± 0.32 ^{i}	0.17 ± 0.00 $^{c, d}$	0.24 ± 0.00 $^{g, h}$	72
Y-33	17.53 ± 0.32 ^{i}	0.17 ± 0.00 ^{d}	0.24 ± 0.00 ^{h}	72
Y-34	16.45 ± 0.16 ^{g}	0.16 ± 0.00 $^{c, d}$	0.23 ± 0.00 $^{f, g}$	72
Y-35	19.89 ± 0.12 ^{k}	0.20 ± 0.00 ^{e}	0.28 ± 0.00 ^{i}	72

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

P, ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร); Q_p, อัตราการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

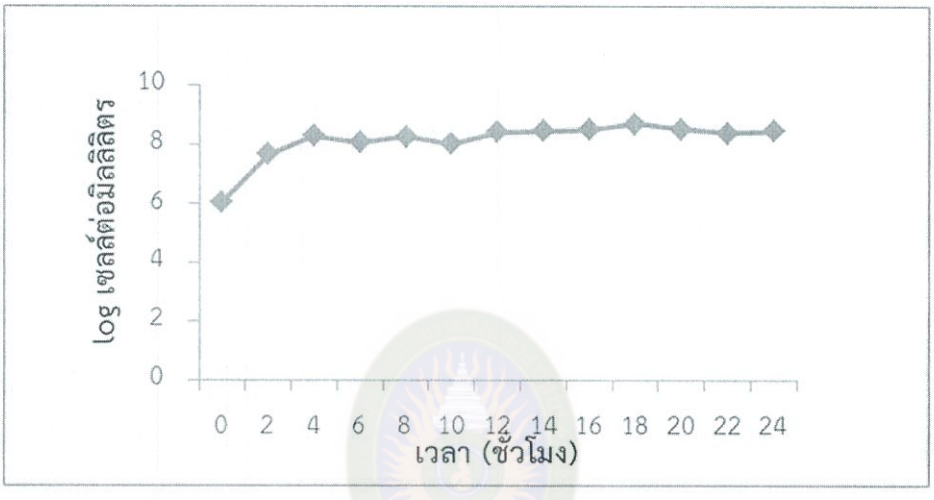
$^{a-x}$ ตัวอักษรที่เหมือนกันภายในคอลัมน์เดียวกัน ไม่มีความแตกต่างกันโดยวิธีการทดสอบแบบ Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 0.05

ผลการทดลองแสดงค่า ± SD

ND, ไม่สามารถตรวจสอบได้

4.4 การศึกษารูปแบบการเจริญของยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ในอาหารสูตร YM

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ Y-22 ในอาหารสูตร YM และติดตามผลการเจริญเติบโตโดยวิธีการนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Haemacytometer พบว่า เชื้อยีสต์ Y-22 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารสูตร YM มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ถึง ชั่วโมงที่ 4 เป็นระยะที่เชื้อยีสต์ Y-22 มีการเจริญเติบโตสูงสุด (log phase) หลังชั่วโมงที่ 12 เป็นระยะที่เชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตคงที่และหลังจากนั้นการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์เริ่มลดลง (ภาพที่ 4.7)



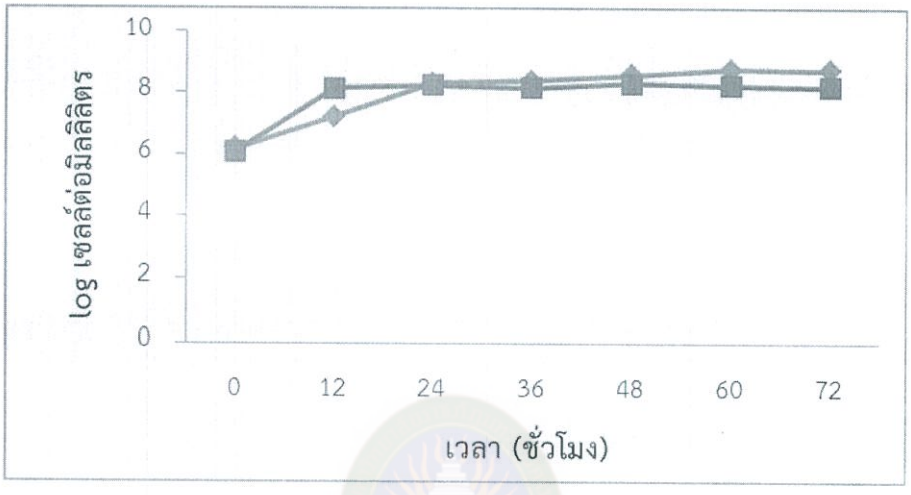
ภาพที่ 4.7 รูปแบบการเจริญของเชื้อยีสต์ Y-22 ในอาหารเหลวสูตร YM โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ Haemacytometer

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม

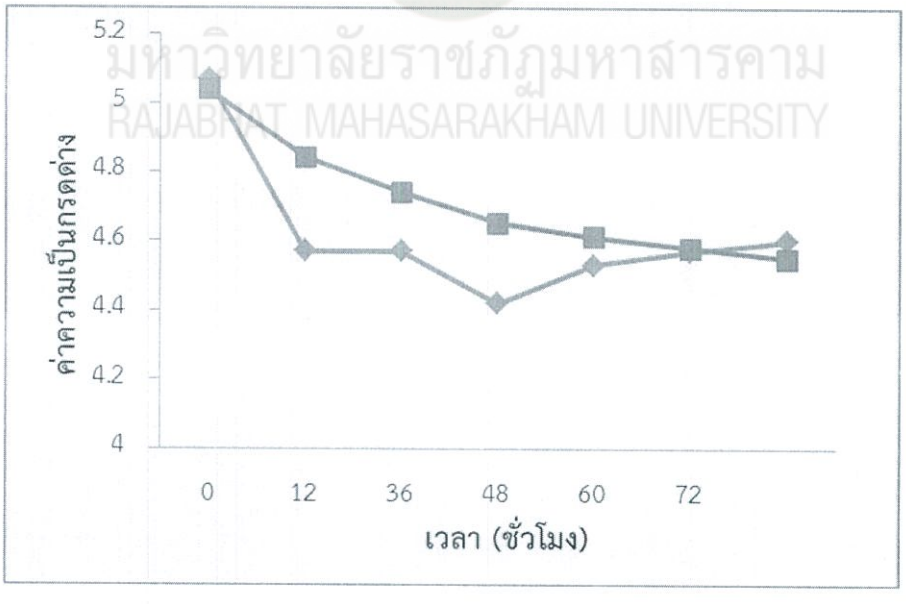
4.5 ทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

เมื่อนำเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ คือ Y-22 ไปทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลในอาหารเหลวสูตร YM โดยกำหนดให้มีค่าความเป็นกรดด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1×10^{6} เซลล์ต่อมิลิลิตร หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และติดตามการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก พบว่าเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่องและเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 จากนั้นการเจริญของเชื้อยีสต์จะเริ่มคงที่ที่ชั่วโมงที่ 36-72 (ภาพที่ 4.8) ค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมักอยู่ในช่วง 5.04–4.55 และความเข้มข้นของเอทานอลในระหว่างกระบวนการหมักค่อยๆ เพิ่มขึ้น และค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 34.90 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.9) ผลได้ของเอทานอลมีค่าเท่ากับ 0.38 และมีอัตราผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.48 ในขณะที่เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบการเจริญเติบโตสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.07-4.60 และมีความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 47.86 ± 0.39 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4.10) ผลได้ของเอทานอลมีค่าเท่ากับ 0.48 ± 0.00 และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.66 ± 0.01 จากการทดสอบพบว่าเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลต่ำกว่าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบ ทั้งนี้เนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลในการทดลองนี้

อาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 ดังนั้นควรมีการศึกษาเพื่อจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ Y-22 เพื่อระบุสายพันธุ์ที่แน่นอนอาจจะทำให้ได้ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อสายพันธุ์ชนิดนั้น และทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมทั้งต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 ต่อไป

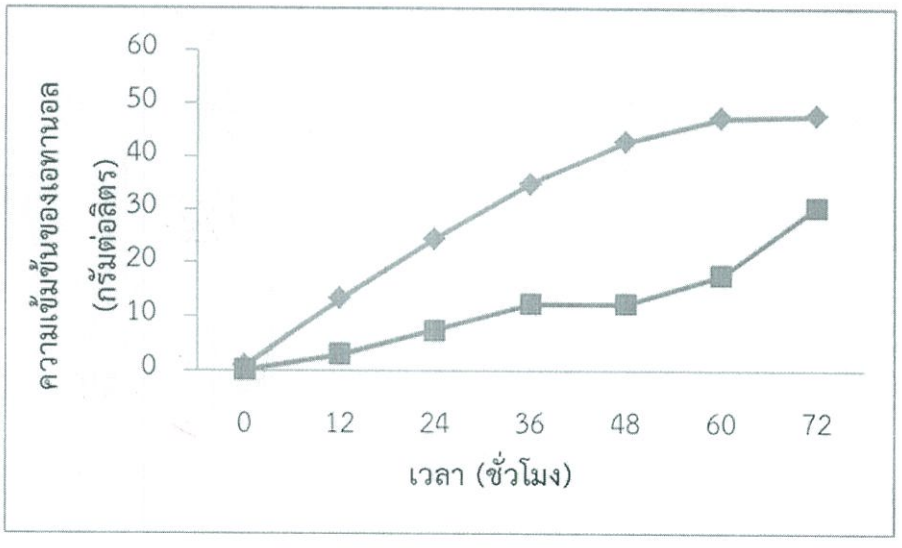


ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อในระหว่างการหมัก: ■ เชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22, ◆ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างในระหว่างการหมัก: ■ เชื้อยีสต์ทนร้อนY-22, ◆ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048



ภาพที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอลในระหว่างการหมัก: ■ เชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22, ◆ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048

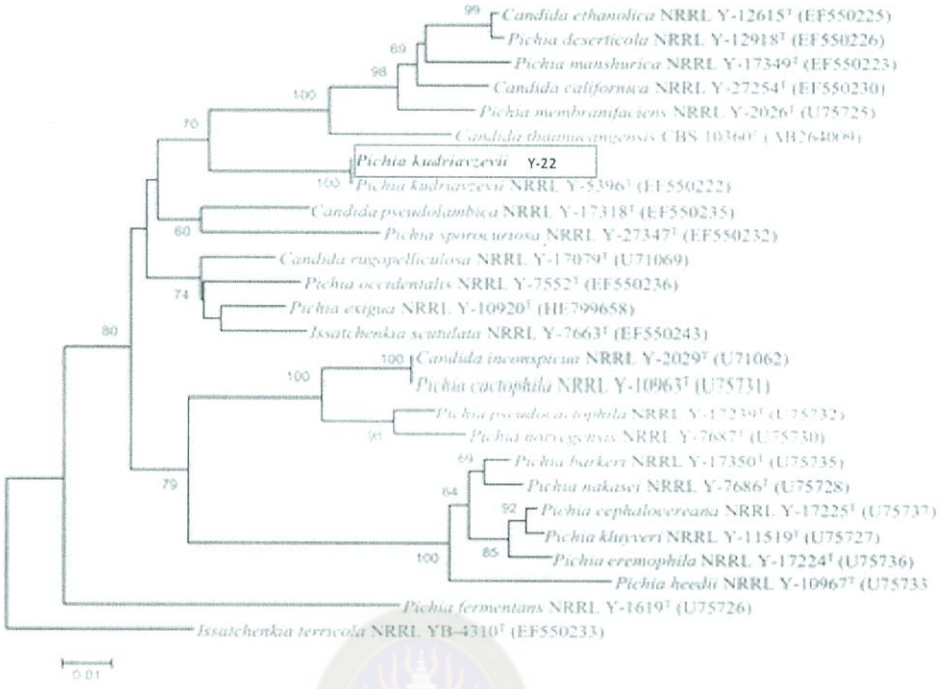
4.6 การจำแนกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

นำเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้ (สายพันธุ์ Y-22) ไปจำแนกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้โดยใช้วิธีตรวจสอบรหัสทางพันธุกรรม พบว่าเมื่อเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 (ภาพที่ 4.11) ของเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 กับฐานข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ใน GenBank พบว่าเหมือนกับ Type strain ของ *Pichia kudriavzevii* NRRL Y-5396T (EF550222) 100 เปอร์เซ็นต์ จึงจำแนกเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 เป็น *Pichia kudriavzevi* (ภาพที่ 4.12)

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

>RMU Y-22_ 570 nucleotides
AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAGCGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAGATTTGAAATCGTG
CTTTGCGGCACGAGTTGTAGATTGCAGGTTGGAGTCTGTGTGGAAGGCGGTGTCCAAGTCCCTT
GGAACAGGGCGCCCAGGAGGGTGAGAGCCCCGTGGGATGCCGGCGGAAGCAGTGAGGCCCTTC
TGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCCAAGCGGGTGGTAAATTCCATCTAAGGCTAAAT
ACTGGCGAGAGACCGATAGCGAACAAGTACTGTGAAGGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAG
AGTGAAACAGCACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGTATTGCGCCCGACATGGGGATTGCGCA
CCGCTGCCTCTCGTGGGCGGCGCTCTGGGCTTTCCCTGGGCCAGCATCGGTTCTTGCTGCAGGA
GAAGGGGTTCTGGAACGTGGCTCTTCGGAGTGTTATAGCCAGGGCCAGATGCTGCGTGCGGGG
ACCGAGGACTGCGGCCGTGTAGGTCACGGATGCTGGCAGAACGGCGCAACACCGCCCGTCT

ภาพที่ 4.11 ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 บน LSU rRNA gene ของเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22



ภาพที่ 4.12 Phylogenetic tree สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 domain ของ LSU rRNA gene แสดงตำแหน่งของยีสต์ทนร้อน Y-22 และสปีชีส์ที่มีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนหรือใกล้เคียงที่สุด สำหรับ phylogenetic tree ใช้ neighbor-joining method ตัวเลขของจำนวนแสดงค่าเปอร์เซ็นต์ของ bootstrap sampling จาก 1000 sampling

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล

ผลไม้พื้นบ้าน 11 ชนิด (มะเฟือง ตะขบ พุทรา หมากเบน มะเม่า เสาวรส ฟักข้าว ลูกหม่อน กล้วยนวล มะขามเทศ และลูกยอ) สามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลท เชื้อยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ Y-22 คัดแยกได้จากมะเม่า ลักษณะของโคโลนี กลมนูน ขอบหยัก มีสีครีม ไม่มันวาว และเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเซลล์มีลักษณะค่อนข้างกลมรี เชื้อยีสต์สายพันธุ์ Y-22 สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีงานวิจัยหลายฉบับที่ได้ทำการศึกษาการคัดแยกเชื้อยีสต์ทนร้อนเพื่อการผลิตเอทานอล โดยอุณหภูมิที่ใช้ศึกษาจะอยู่ในช่วง 35–52 องศาเซลเซียส (Hacking et al., 1984; Aderson et al., 1968; Banat et al., 1992; พนิดา, 2554) ชี้ให้เห็นว่าเชื้อยีสต์ Y-22 ที่คัดแยกได้เป็นเชื้อยีสต์ทนร้อน และเมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 34.90 ± 0.16 กรัมต่อลิตร ผลได้ของเอทานอลเท่ากับ 0.38 ± 0.00 กรัมต่อกรัม และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.48 ± 0.00 เมื่อนำมาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TTSTR 5048 พบว่าเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้น้อยกว่า ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลในการทดลองนี้ อาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 เมื่อนำเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ (สายพันธุ์ Y-22) ไปจำแนกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้โดยใช้วิธีตรวจสอบรหัสทางพันธุกรรม พบว่าเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้เป็นเชื้อ *Pichia kudriavzevii*

5.2 ข้อเสนอแนะ

- ควรมีการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทนร้อน Y-22 ต่อไป

- เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้จากงานวิจัยนี้ มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง เหมาะแก่การผลิตเอทานอลในสภาวะของภูมิประเทศที่มีอุณหภูมิโดยเฉลี่ยสูงเกือบตลอดทั้งปี อย่างเช่นประเทศไทย ซึ่งน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับผู้ประกอบการทุกระดับที่มีความต้องการใช้เชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ เพื่อนำไปพัฒนาศักยภาพในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

บรรณานุกรมภาษาไทย

กนกวรรณ วรวัฒนานนท์, น้ำฝน บุญวิลัย และสุพรรษา ทองสุข. 2546. **การแยกและการคัดแยกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์จากผลไม้.** วิทยานิพนธ์ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต, สถาบันราชภัฏนครปฐม.

กระทรวงพลังงาน. 2550. **ปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความมั่นคงทางเศรษฐกิจและสังคมประเทศ.** (16 ตุลาคม 2550). Available from: URL: http:// www. Old1energy.go.th/q=th/executive.

กัญจนา ดีวิเศษ, ศักดิ์ชัย โปรดธนาสาร, จิราภรณ์ ภิญโญชูโต และไฉน น้อยแสง. 2542. **ผักพื้นบ้านภาคกลาง.** องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก, กรุงเทพมหานคร.

ไกรสร ศรีไตรรัตน์. 2550. **ไม้ป่ากินได้ในหุบเขาลำพญา.** มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา, ยะลา

ชุติกาญจน์ สิริวัฒนวิมลชัย, ธันย์ชนก ร่วมกระโทก, ณัฐพร ชำนินาวากุล, วิภาพร โพธิ์ จำศีล และกมลชัย ชะเอม. 2555. **การคัดแยกและคุณลักษณะของยีสต์จากผลไม้และการใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหาร.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาตรีวิทยา ศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพและผลิตภัณฑ์การเกษตร คณะเทคโนโลยี และนวัตกรรมผลิตภัณฑ์การเกษตร, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

ชุติมา ศรีงิ้ว. 2548. **การผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ทนอุณหภูมิสูง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ณภัทรชนก ยวงสอาด. 2548. **การคัดเลือกยีสต์ทนร้อนและการหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากแป้งมันสำปะหลัง.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นิภาพร อามัสสา และชลันธร วิชาศิลป์. 2550. **การคัดแยกเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการบ่มไวน์เม่าสกลนคร.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร

นฤมล โตอ่อน. 2548. **ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนและประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

บวรศักดิ์ ลีนานนท์. 2536. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ.

ปัญญาวัฒน์ สันติเวส และคณะ. 2538. **ผักพื้นบ้าน.** สถาบันการแพทย์แผนไทยกรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, กรุงเทพมหานคร.

ปริญญพันธุ์ เพชรจรัส และเมทินี สุนทราวัฒน์. 2556. **การศึกษาความสามารถในการเจริญและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลด้วยยีสต์ทนร้อน.** วิทยานิพนธ์, วิทยาศาสตร์เกษตร. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรธานี.

มหาวิทยาลัยราชภัฏสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

พจมาลย์ พิมพขันธ์. 2555. **การผลิตไบโอเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดยยีสต์ทนร้อน *Kluyreromyces marxianus* DMKU 3-1042.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พนิดา สุริยะพันธ์, ชมภูนุช วิรุณานนท์, สุภางค์ จุฬาลักษณานุกูล และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2554. **การคัดกรองยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. 2538. **ผักพื้นบ้าน: ความหมายและภูมิปัญญาชนของสามัญชนไทย.** สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข.

วรวุฒิ ครูส่ง. 2538. **จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร.** โอ.เอส. พริ้นติ้งเฮาส์. กรุงเทพมหานคร.

วัชรา หงเวียง และสุภัตรา สิงห์ชนะ. 2555. **การผลิตเอทานอลจากชานอ้อยและผักตบชวา.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาตรี วิทยาศาตร์บัณฑิต, สถาบันราชภัฏมหาสารคาม, มหาสารคาม.

วิมล วิริยะวิทย์. 2526. **ความก้าวหน้าของอุตสาหกรรมไทย.** กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม.

สุมณฑา วัตนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. **ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ.** มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

สุดารัตน์ แซ่โจว. 2555. **การแยกและคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งเพื่อผลิตเอทานอล.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาโท วิทยาศาสตร์บัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ศศิธร จินดามรกฎ. 2543. **การพิสูจน์ความเหมือนเพื่อระบุชื่อ การเก็บรักษา และการผลิตสารประกอบโพลีออลของยีสต์ทนเค็มที่แยกได้ในประเทศไทย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรา ทีปะปาล. 2545. **พืชป่ากินได้ในสรวง – ขี้เหล็ก.** พิพิธภัณฑ์พืชอุทยานธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, เชียงใหม่.

อร่าม คุ้มกลาง, ณรงค์ ผลวงศ์, รัตนา คุ้มกลาง, สุดารัตน์ สกุลคู, นิภาพร บุญศักดาพร, ศกร คุณวุฒิฤทธิรณ, กาญจนา รุติพจน์, ราตรี พระนคร, ทิสรัตน์ พรหมขันธ์, เสกสรร วงศ์ศิริ, สุบรรณ์ ทุมมา, สุเธียร นามวงศ์, พัชรี มงคลวัย, พาขวัญ สารคล่อง, วินัย แสงแก้ว, อุบลรัตน์ สังฆมณี, พิเชษฐ์ เวชยิฐาน. 2548. **ผักพื้นบ้านภาคอีสาน.** ศูนย์พัฒนาตำราแพทย์แผนไทย, นนทบุรี.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

บรรณานุกรมภาษาต่างประเทศ

Anderson, P.J., McNeil, K., & Watson, K. 1986. High-efficiency carbohydrate formentation to ethanol al temperatures above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. *Marxianus* isolated from sugar mills. Appl. Environ. Microbiol. 5: 1314-1320.

Albrecht, C.F., Stander, M.A., Grobbelaar, M.C., Colling, J., Kossmann, J., Hills, P.N., & Makunga, N.P. 2012. LC-MS-based metabolomics assists with quality assessment and traceability of wild and cultivated plants of *Sutherlandia frutescens* (Fabaceae). S Afr J Bot. 82: 33-45.

Banat, I.M., Nigam, P., & Marchant, R. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. World J. Microbiol. Biotechnol. 8: 259-235.

Barron, N., Marchant, R., McHale, L., & Mchale, A.P. 1995. Studies on the use of a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus* in simultaneous saccharification and ethanol fermention from cellulose. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 518-520.

Benschoter, A.S., & Ingram, L.O. 1986. Thermal tolerance of *Zymomonas mobilis* : Temperature-induced changes in membrane composition. Appl. Environ. Microbiol. 51: 1278-1284.

Bollok, M., Reczey, K., & Zacchi, G. 2000. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated spruce to ethanol. Appl. Biochem. Biotechnol. 84-86: 69-80.

Boyle, M., Barron, N., & McHale, A.P. 1997. Simultaneous saccharification and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Biotechnol. Lett. 19: 49-51.

Brady, D., Nigram, P., Marchant, R., Mchale, L., & Mchale, A.P. 1996. Ethanol production at 45°C by *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in magnetically responsive alginate matrices. Biotechnol. Lett. 18: 1213-1216.

Fattah, A., Fadil, W.R.M., Nigam, P., & Banal, I.M. 2000. Isolation of thermotolerant ethanologenic yeast and use of selected strains in industrial scale fermentation in an Engyptial distillery. Biotechnol. Bioeng. 68: 531-535.

Gough, S., Brady, D., Nigam, P., Marchant, R., & Mchale, A.P. 1997. Production of ethanol from molasses at 45°C using alginate-immobilized *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Bioprocess Eng. 16: 389-392.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Hacking, A.J., Taylor, T.W.F., & Hanas, C.M. 1984. **Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40°C.** Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 361-363.

Harju, S., Fedosyuk, H., & Peterson, K.R. (2004). **Rapid isolation of yeast genomic DNA: Bust n' Grab.** BMC Biotechnol. 4:8.

Kiran, S.N., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I.M., & Venkateswar, R.L. 2000. **Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production.** Bioresour. Technol. 72: 43-46.

Kosaric, N., Wieczorek, A.G., Cosentino, P., & Magee, R.J. 1983. **Ethanol fermentation. PP.** In H. Dellweg (ed). Biotechnology. Vol. 3. Verlag Chemie, Weinheim.

Krishna, S.H., Reddy, T.J., & Chowdary, G.V. 2001. **Simultaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic waste to ethanol using a thermotolelant yeast.** Bioresour. Technol. 77: 193-196.

Limtong, S.W., Yongmanitchai, P., & Tantirungkij, M. 1987. **Hybridization of halotolerant Yeast for alcohol fermentation.** PP. 163-171.

Meehan, C., Banat, I.M., McMullan, G., Nigam, P., Smyth, F., & Marchant, R. 2000. **Decolorization of Remazol Black-B using a thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* IMB3.** Environ. Int. 26: 75-79.

Ministry of energy. (2007). **Government energy policy.** Bangkok: Thailand. Government_link02. Retrieved September 21, 2014, from http://www.energy.go.th/?q=en/

O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In D.R. Reynolds & J.W. Taylor (Eds.). **The fungal holomorph: mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics.** (pp. 225-233). Wallingford: CAB International.

Panchal, C.J. & Tavares, F.C.A. 1990. **Yeast strain selection for ethanol production.** In C.J. panchal (ed), New York.

Phaff, H.J., & Mrak, E.M. 1968. **The life of Yeasts.** Massachusetts: Harvard University Press.

Reed, G., & Nagodawithana, T.W. 1991. **Yeast Technology.** 2nd (ed). Published by Van Nostrand Reinhold, New York.

Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A.R. (1977). **DNA sequencing with chain terminating-inhibitor.** Proc Nalt Acad Sci USA. 74: 5463-5467.

Seki, T., Myoga, S., Limtong, S., Uedono, S., Kummnuata, J., & Taguchi, H. 1983. **Genetic construction of yeast strain for high ethanol production.** Biotechnol. Lett. 5: 351-356.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Singh, D., Banat, I.M., Nigam, P., & Merchant, R. 1998. **Industrial scale distillery. Biotechnol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 in an Indian distillery.** Biotechnol. Lett. 20: 753-755.

Spencer, J.F.T., & Spencer, D.M. 1997. **Ecology: where yeast live. PP. 31-58.** In J.F.T. Spencer and D.M. Spencer (eds). Yeast in Natural and Artificial Habitats. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Sree, N.K., Sridhar, M., Rao, L.V., & Pandey, A. 1999. **Ethanol in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast.** Proc Biochem. 34: 115-119.

Walker, G.M. 1998. **Yeast Physiology and Biotechnology**. John Wiley and Son, Chichester.

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารและสารเคมี

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ก-1. อาหาร Yeast Malt Broth (YM)

Yeat extract	3	กรัม
Mait extract	3	กรัม
D-glucose	20	กรัม
Peptone	5	กรัม
Absolute ethanol	4	เปอร์เซ็นต์
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

1. ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นพร้อมคนด้วยแท่งแก้วจนสารละลาย
2. นำไปปรับค่าความเป็นกรดด่าง ให้ได้ 4.5
3. เทใส่ขวดเก็บอาหารแล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก-2. อาหาร Yeast Malt Agar (YM agar)

Yeat extract	3	กรัม
Mait extract	3	กรัม
D-glucose	20	กรัม
Peptone	5	กรัม
Absolute ethanol	4	เปอร์เซ็นต์
Agar	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

วิธีการเตรียม

1. ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นพร้อมคนด้วยแท่งแก้วจนสารละลาย
2. นำไปปรับความเป็นกรดด่างให้ได้ 4.5
3. เทใส่ขวดเก็บอาหารแล้วนำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำอาหารมาเทใส่จานเพาะเลี้ยง

ภาคผนวก ข
วิธีการคัดแยกยีสต์ทนร้อน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ข-1. วิธีการคัดแยกยีสต์ยีสต์ทนร้อน

1. นำตัวอย่างที่เลือกมาทำการบดคลุกเคล้าให้เข้ากัน
2. แล้วนำมาชั่งน้ำหนัก 1 กรัม (ของแข็ง) หรือ 1 มิลลิลิตร (ของแข็ง)
3. นำมาใส่ลงในอาหาร YM
4. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่า 150 ความเร็วรอบต่อชั่วโมง นาน 18-24 ชั่วโมง
5. ดูดสารละลายมา 1 มิลลิลิตร นำไปทำการเจือจางโดยใช้ 10^{-2}-10^{-4}
6. แล้วดูดสายละลายมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยเชื้อบนอาหารสูตร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสังเกตเห็นโคโลนีที่เกิดขึ้น
7. เลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างกัน ได้แก่ ลักษณะของโคโลนี สี ขนาด ความมันวาว
8. นำเชื้อที่ได้มาทำการขีดลากบนอาหาร YM agar โดยทำการขีดซ้ำ 2-3 ซ้ำ
9. เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้บนอาหารแข็งสูตร YM (slant agar) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สำหรับการเก็บรักษาระยะสั้น) ถ่ายเชื้อลงสู้อาหารใหม่ทุกๆ 1 เดือน และเก็บรักษาใน 40 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) กลีเซอรอล ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (สำหรับการเก็บรักษาระยะยาว)

ข-2. ทดสอบการหมักในอาหารเหลวสูตร YM

1. นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้มาขีดลากบนอาหารแข็งสูตร YM (slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง
2. ทำการเขี่ยเชื้อปริมาณเต็มลูปลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิได้ ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ทำการดูดตัวอย่างลงในอาหาร YM ที่มีการเติม D-glucose 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปเขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง
4. นำตัวอย่างมาดูดลงในอาหารสูตร YM ที่ใส่หลอดดักแก๊สไว้ ทำทั้งหมดทุกเชื้อ เชื้อละ 2 ซ้ำ
5. นำหลอดทดลองมาบ่มที่อุณหภูมิ 30 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เป็นเวลานาน 24 60 และ 72 ชั่วโมง จะสังเกตได้ว่าแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊สแต่ละหลอด บันทึกผลทดลอง

6. เก็บตัวอย่างเชื้อใส่หลอดไมโครทิวบ์ แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบ 10 นาที เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล และปริมาณเอทานอล ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และเครื่อง Gas Chromatography (GC)

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ข-3. ทดสอบความสามารถในการทนร้อนของเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้ที่อุณหภูมิต่างๆ

1. ทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้มาขีดลากบนอาหารสูตร YM (slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง
2. ทำการเขี่ยเชื้อที่ได้ปริมาณเต็มลูปลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ดูดตัวอย่างลงในอาหาร YM ที่มีการเติม D-Glucose 5 เปอร์เซ็นต์นำไปเขย่าเป็นเวลา 18 ชั่วโมง
4. ดูดตัวอย่างลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที
5. ทำการเก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 2 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง โดยนำตัวอย่างไปศึกษาการเจริญของเซลล์โดยการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ข-4. ทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงของเชื้อยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้

1. ทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยนำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ Y-22 และเชื้อ *S. cerevsiae* TISTR 5048 นำมาขีดลากบนอาหารแข็งสูตร YM (slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง
2. ทำการเขี่ยเชื้อที่ได้ปริมาณเต็มลูปลงในอาหารเหลวสูตร YM ที่มีปริมาตร 20 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเขย่าโดยใช้เครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
3. ดูดตัวอย่างลงในอาหารสูตร YM ที่มีการเติม D-glucose 5 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเขย่าเลี้ยงเซลล์จนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะ log phase
4. การนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นคำนวณจำนวนเซลล์ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร
5. ดูดตัวอย่างลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 350 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ (โดยปริมาตร) ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะนิ่ง
6. ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงที่มีความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลานาน 10 นาที เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมงเป็นเวลานาน 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์หา

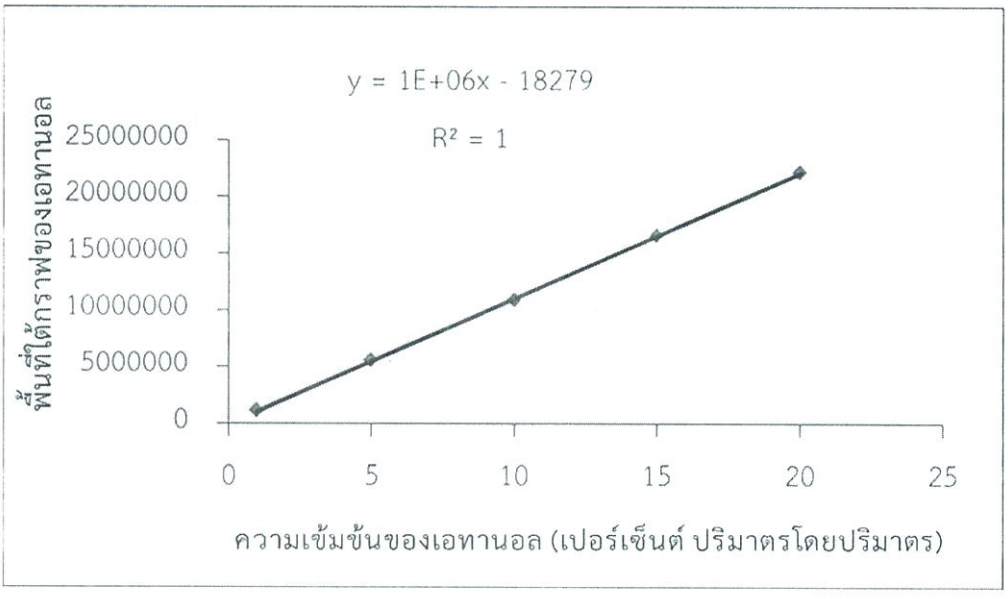
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

- ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) และ Gas Chromatography (GC)
- การเจริญของเซลล์โดยวิธีการนับเซลล์ด้วย Haemacytometer
- ค่าความเป็นกรดด่างด้วย pH meter

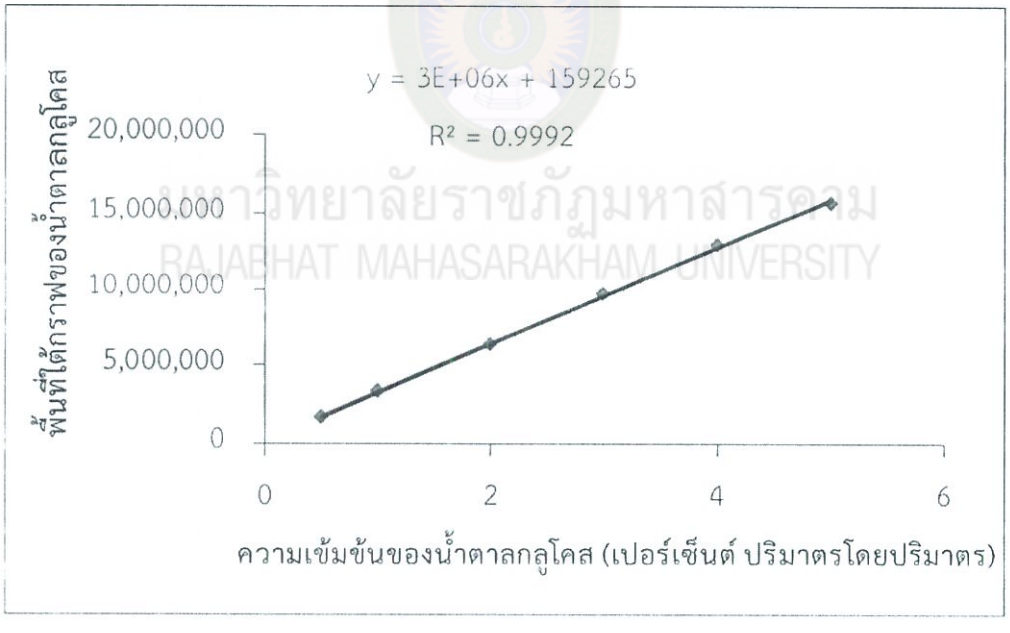
มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาคผนวก ค
กราฟสารละลายมาตรฐาน

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY



ภาพที่ ค.1 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของเอทานอล (เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร)



มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ภาพที่ ค.2 กราฟมาตรฐานความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรโดยปริมาตร)

ภาคผนวก ง

ผลงานวิจัยภายใต้งานวิจัยเรื่อง “การคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากผลไม้พื้นบ้านเพื่อการผลิตเอทานอล” ที่ได้รับการเผยแพร่

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

CONFERENCE PROCEEDINGS

ICERE 2015

International Conference on Environment and Renewable Energy

20-21 May 2015
Vienna, Austria

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

ISBN-13: 978-1512221473
ISBN-10: 1512221473

ISOLATION AND SCREENING OF THERMOTOLERANT YEASTS FOR ETHANOL PRODUCTION FROM EDIBLE LOCAL FRUITS IN THAILAND

Kanlayani Charoensopharat[1,4*], Theeraphan Chumroenphat[2] and Pornthap Thanonkeo[3]
[1] *Department of Biology, Rajabhat Maha Sarakham University, Maha Sarakham, Thailand*
[2] *Laboratory Equipment Center, Mahasarakham University, Maha Sarakham, Thailand*
[3] *Department of Biotechnology, Khon Kaen University, Khon Kaen, Thailand*
[4] *Corresponding author: Chkanlayani@gmail.com*

Abstract

Thermotolerant yeasts are capable of growth and fermentation at high temperatures, which have several advantages such as reduce cost for cooling system, reduce risk of contamination of mesophilic microorganisms and increase the speed of catalytic reactions related to fermentation. In this work, isolation and screening of thermotolerant yeasts capable of producing ethanol from edible local fruits in Thailand were investigated. Various sources of samples such as Carambola, Calabura, Jujube, Governor's plum, Mamao, Passion fruit, Spring Bitter Cucumber, White mulberry, Myrabolan wood, Elephant banana, Manila tamarind, Jackal Jujube, and Noni were collected from the Northeastern Thailand including Maha Sarakham, Kalasin, Khon Kaen, Udon Thani, and subjected to the isolation and screening of thermotolerant yeasts by using enrichment culture technique. As the results, thirty five isolates of yeast were obtained and they were maintained on YM agar. Among these isolates, only ten isolates were able to grow at temperature up to 50°C indicating that these isolated yeasts are thermotolerant yeasts. According to the invention, a preliminary investigation for ethanol producing strains was conducted. The results showed that all ten isolates can produce ethanol at 40°C, however the highest ethanol concentration (about 10 g/l) was obtained from strain RMU Y-12. In order to improve the ethanol production capacity by the isolated yeasts, further study on fermentation optimization is needed and this is now under investigation.

ประวัติผู้วิจัย

1. **ชื่อ** นางสาวกัลยาณี **สกุล** เจริญโสภารัตน์
2. **หมายเลขบัตรประจำตัวประชาชน (13 หลัก)** 3 4017 00444 67 1
3. **ตำแหน่งทางวิชาการ** อาจารย์
4. **ตำแหน่งทางบริหาร** ไม่มี
5. **สังกัด** สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
6. **ประวัติการศึกษา**

ระดับการศึกษา	คุณวุฒิ	สาขาวิชา	ชื่อสถาบันการศึกษาที่สำเร็จการศึกษา	ปีที่จบการศึกษา
ปริญญาเอก	ปร.ด.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2558
ปริญญาโท	วท.ม.	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	2549
ปริญญาตรี	วท.บ. (เกียรตินิยม อันดับ 2)	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	2546

7. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
   - เทคโนโลยีการหมัก
   - เทคโนโลยีพันธุวิศวกรรม
   - เทคโนโลยีทางด้านพืช

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

งานวิจัยและผลงานวิจัยที่ได้รับการเผยแพร่

ผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ

Kanlayani Charoensopharat, Pornthap Thanonkeo, Sudarat Thanonkeo and Mamoru Yamada. 2015. Ethanol production from Jerusalem artichoke tubers at high temperature by newly isolated thermotolerant inulin utilizing yeast *Kluyveromyces marxianus* using consolidated bioprocessing. Antonie van Leeuwenhoek. 108: 173-190.

Kanlayani Charoensopharat, Petcharat Thummabenjapone, Pisan Sirithorn and Sompong Thammasirirak. 2008. Antibacterial substance produced by *Streptomyces* sp. No. 87. African Journal of Biotechnology. 7(9): 1362-1368.

Kanlayani Charoensopharat, Nuntipa Aukkanit, Sudarat Thanonkeo, Weerasak Saksirirat, Pornthap Thanonkeo and Kouichi Akiyama. 2007. Target disruption of a G protein α subunit gene results in reduced growth and pathogenicity in *Rhizoctonia solani*. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 24: 345-351.

การนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ

Kanlayani Charoensopharat, Kitipong Wechgama and Theeraphan Chumroenphat. 2015. Analysis of vitamin C content of edible flowers from Maha Sarakham province in Northeasthern Thailand. Abstract: The 6th International Conference on Fermentation and Technology for value added agricultual products. July 29th-31st, 2015, Centara Hotel & convention cetre, Khon Kaen, Thailand. (The Second Place Poster Presentation Award)

Kanlayani Charoensopharat, Theeraphan Chumroenphat and Pornthap Thanonkeo. 2015. Isolation and screening of thermotolerant yeasts for ethanol production from edible local fruits in Thailand. Abstract: International Conference on Environment and Renewable energy. May 20th-21nd, 2015, Grand Hotel Wien, Vienna, Austria.

Kanlayani Charoensopharat, Sudarat Thanonkeo, Mamoru Yamada and Pornthap Thanonkeo. 2013. The batch ethanol production from Jerusalem artichoke juice by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DBKKU Y-102. An abstract published in The Proceeding of Abstract of The 5th International Conference on Fermentation

มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

Technology for Value Added Agriculture Products, 21st-23rd August 2013, Centara Hotel and Convention Centre, Khon Kean, Thailand.

Kanlayani Charoensopharat, Sudarat Thanonkeo and Pornthap Thanonkeo. 2012. Bioethanol production from Jerusalem artichoke tubers juice by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DBKKU Y-102. An abstract published in The Proceeding of Abstract of The 15th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Innovative Biotechnology for a Green world and Beyond, 16th – 21st September, 2012, EXCO, Daegu, Korea.

Kanlayani Charoensopharat, Sudarat Thanonkeo, Mamoru Yamada and Pornthap Thanonkeo. 2011. Selection of thermotolerant yeasts for bioethanol production from Jerusalem artichoke juice. An abstract published in The proceeding of Abstract of The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agriculture Products, 29th -31st August 2011, Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand.

Kanlayani Charoensopharat, Sudarat Thanonkeo and Pornthap Thanonkeo. 2010. Isolation and characterization of thermotolerant yeasts for bioethanol production from Jerusalem artichoke. An abstract published in The proceeding of The 14th International Biotechnology Symposium and Exhibition, Biotechnology for the Sustainability of Human Society, 14th-18th September 2010, Palacongressi, Rimini, Italy.

Kanlayani Charoensopharat, Siriporn Lunprom, Nuntipa Aukkanit, Weerasak Saksirirat, Sudarat Thanonkeo, Kouichi Akiyama and Pornthap Thanonkeo. 2007. Target disruption of a G protein alpha subunit gene and its affect on growth and pathogenicity in *Rhizoctonia solani*. Proceeding of The 6th Asian Crop Science Association Conference and the 2nd International Conference on Rice for the Future. 5-9 November 2007, Queen Sirikit National Convention Center Bangkok, Thailand.

Kanlayani Charoensopharat, Siriporn Lunprom, Nuntipa Aukkanit, Weerasak Saksirirat, Sudarat Thanonkeo and Pornthap Thanonkeo. 2005. Biological function of G protein beta subunit gene in *Rhizoctonia solani.* Abstract: International Conference on BioThailand 2005: TSB Annual Meeting: International Biotechnology; The Era of Bionanotechnology. November 2nd-5th, 2005, Queen Sirikit National Convention Center, Bangkok, Thailand.

มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY

การนำเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับชาติ

Kanlayani Charoensopharat, Sudarat Thanonkeo and Pornthap Thanonkeo. 2012. Isolation and characterization of thermotolerant yeast capable of producing bioethanol from Jerusalem artichoke juice (*Helianthus tuberosus* L.). An abstract published in the proceeding of Commission on Education Congress V: University Staff Development Consortium, 14th -16th November 2012, The Ambassador City Jomtien, Pattaya, Thailand.

Kanlayani Charoensopharat, Pornthap Thanonkeo and Sudarat Thanonkeo. 2009. Isolation of thermotolerant yeast for ethanol production from Jerusalem artichoke. An abstract published in the proceeding of Commission on Education Congress II: University Staff Development Consortium, 27th -29th August 2009, Dusit Thani Pattaya, Pattaya, Thailand.

วิทยานิพนธ์

Kanlayani Charoensopharat. 2014. Isolation and characterization of thermotolerant yeast capable of producing bioethanol from Jerusalem artichoke juice. The degree of doctor of philosophy Thesis of Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen.

Kanlayani Charoensopharat. 2007. Biological function analysis of G protein α and β subunit genes in *Rhizoctonia solani.* Master Thesis of Graduate School, Khon Kaen University, Khon Kaen.

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร
RAJABHAT MAHASARAKHAM UNIVERSITY