สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

การคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้สารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงและความเข้มข้นของน้ำตาลสูงในการผลิตเอทานอลจากมันเทศ

(Selection of Mutant Strain of *Saccharomyces cerevisiae* by Ethyl Methane Sulfonate-Induced Mutagenesis on Thermotolerance and Osmotolerance for Bioethanol Production from Sweet Potato)

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2557
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

RCH
ว 164ก
2557

b 12695233
i

เลขหมู่
เลขทะเบียน 137615
วัน.เดือน.ปี 13 ก.ค. 2558

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title Selection of Mutant Strain of *Saccharomyces cerevisiae* by Ethyl Methane Sulfonate-Induced Mutagenesis on Thermotolerance and Osmotolerance for Bioethanol Production from Sweet Potato

Researcher Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul
Department of Biology, Faculty of Science,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

ABSTRACT

Ethanol production from sweet potato starch hydrolyzed by alpha-amylase concentration of 0.05 % and volume of 5 ml at 90 °C for 2 h and amyloglucosidase concentration of 0.015 % and volume of 20 ml at 60 °C for 4 h was carried on to compare *Saccharomyces cerevisiae* 6 strains (YRK 017 TISTR 5202 TISTR 5196 TISTR 5339 TISTR 5088 and TISTR 5596). The experiment conditions to achieve the thermotolerance yeasts were 30 37 40 42 and 45 °C and the conditions to obtain the ethanol tolerance yeasts (ethanol concentrations of 0 5 10 15 18 and 20 % (v/v)). *S.cerevisiae* 3 strains (YRK 017 TISTR 5339 and TISTR 5088) had good growth at 40 °C and ethanol concentration 15 % (v/v) were selected to the following investigation.

The mutation of *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 was studied using UV Irradiation at 254 nm, 30 watt and 40 seconds and ethyl methansulfonate (EMS) 3 % (v/v) at 110 minutes. The viability of yeast cells was estimated to be approximately 5 %. Then, the randomly selected mutant strains which could tolerate high temperature and give high ethanol production were cultured on YPD agar at various temperatures 30, 40, 42 and 45 °C and fermented on Yeast Fermentation Medium (YFM) with durham tubes. The mutant obtained from the UV irradiation was type 421 and from Ethyl methansulfonate was type 11035. It is the followed by the study of fermentation process from sweet potato powder using simultaneous saccharification and fermentation (SSF) with these mutants. Inoculum concentration was 10 % (v/v) for 72 h, at 30 °C and 40 °C. Three strains of *S. cerevisiae* (wild type strain (YRK017), mutant strain were type 421 and 11035 compared the efficiency of fermentation. The results showed that the ethanol concentrations that 3 strains produced were 15.46, 15.15 and 15.37 g/L at 30 °C, respectively. While, at 40 °C the ethanol concentrations were found at 15.39 15.35 and 15.55 g/L, respectively. These 3 yeast strains at two different temperatures could not investigate any significant difference at statistical confidence level of 95 percent.

Key words : *Saccharomyces cerevisiae*, Ethanol, Mutation, UV Irradiation, Ethyl methansulfonate, Simultaneous saccharification and fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรมและนักศึกษาระดับมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนคือสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2557

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	**1**
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**8**
2.1 เอทานอล	8
2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล	11
2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล	14
2.4 จุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอล	17
2.5 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	20
2.6 มันเทศ	22
2.7 การกลายพันธุ์	26
2.7.1 การเกิดการมิวเทชั่น	26
2.7.1.1 สิ่งก่อกลายพันทางกายภาพ	26
2.7.1.2 สิ่งก่อกลายพันทางเคมี	26
2.8 รังสีอัลตราไวโอเลต	27
2.9 สารเคมีก่อกลายพันธุ์ Ethyl methanesulfonate	28
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	**30**
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	30
3.2 วัตถุดิบ	30
3.3 สารเคมี	30
3.4 วัสดุอุปกรณ์	30
3.5 วิธีการทดลอง	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	**36**
4.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง	36
4.1.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง	36
4.1.2 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง	37
4.2 ผลการศึกษาการทนทานต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์	43
4.3 ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 โดยใช้รังสียูวี และการใช้สารเคมี	44
4.3.1 ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 โดยใช้รังสียูวี	44
4.3.2 ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* YRK 017 โดย EMS	46
4.4 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง	48
4.4.1 ผลการศึกษาการเจริญของสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยรังสียูวี และ Ethyl methanesulfonate (EMS) บนจานอาหาร YPD agar ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	48
4.4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการหมักในอาหารหมัก Yeast fermentation medium (YFM) ของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือก	52
4.2.3 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากการหมักเอทานอลด้วยอาหารหมัก Yeast Fermentation medium (YFM) ที่มีหลอดดักก๊าซที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง ในที่มืด	54
4.5 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากผงแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)	57
บทที่ 5 สรุปและการวิจัยและข้อเสนอแนะ	**62**
เอกสารอ้างอิง	**64**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารที่ได้จากการหมักเอทานอลโดยยีสต์	12
2.2	แสดงคุณค่าทางอาหารของมันเทศเนื้อขาวเปรียบเทียบกับเนื้อเหลือง	25
2.3	แสดงองค์ประกอบหลักใน 100 กรัม ของส่วนที่รับประทานได้ของพืชตระกูลหัวเปรียบเทียบกับข้าว	25
4.1	แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงบนอาหารแข็ง YPD	36
4.2	แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	37
4.3	แสดงค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ	39
4.4	แสดงค่าปริมาณเอทานอล หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ	41
4.5	แสดงการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง YPD ที่เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง YPD	43
4.6	อัตราการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์กลายที่ได้จากการฉายรังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 30 วัตต์ ที่เวลาต่างๆ	44
4.7	แสดงอัตราการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์กลายที่ได้จากการเติม EMS ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร ที่เวลาต่างๆ	46
4.8	ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	48
4.9	ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วย EMS	50
4.10	ประสิทธิภาพการสร้างก๊าซของสายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* YRK 017 โดยรังสียูวีในอาหาร YFM ที่มีหลอดดักก๊าซ หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	53
4.11	ประสิทธิภาพการสร้างก๊าซของสายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* YRK 017 โดยสารโดยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตในอาหาร YFM ที่มีหลอดดักก๊าซ หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	53
4.12	ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ *S. cerevisiae* YRK 017 สายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยรังสียูวี เมื่อหมักในอาหาร YFM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะนิ่ง	55
4.13	ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ *S. cerevisiae* YRK 017 สายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต เมื่อหมักในอาหาร YFM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง	56
4.14	ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	58
4.15	ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนและความสัมพันธ์ของขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการหมักเอทานอล	12
2.2	(a) ลักษณะโคโลนีของ *Saccharomyces cerevisiae* บนอาหารแข็ง (b) ลักษณะเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	19
2.3	แสดงลักษณะของมันเทศ	23
2.4	ช่วงของรังสีอัลตราไวโอเลต	27
4.1	แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการหมักเอทานอลในอาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C 37°C 40°C และ 42 °C	38
4.2	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลจากการหมักเอทานอลในอาหาร 38 YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมงของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C 37°C 40°C และ 42°C	40
4.3	แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	42
4.4	แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 42 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	42
4.5	อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 ภายหลังจากการฉายรังสียูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 30 วัตต์ ที่ระยะเวลาต่างๆ	45
4.6	อัตราการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* ภายหลังการเติมสารเคมีเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) ที่ระยะเวลาต่างๆ	47
4.7	เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ของ *S. cerevisiae* ระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม YRK 017 สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 เมื่อหมักในอาหาร YFM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่ง	56
4.8	การหมักเอทานอลโดยใช้สารละลายผงมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (○,●) 421 (△,▲) และ 11035 (□,■) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้สัญลักษณ์สีขาวแทนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสัญลักษณ์สีดำแทนปริมาณเอทานอล	58
4.9	ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	59
4.10	การหมักเอทานอลโดยใช้สารละลายผงมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (○,●) 421 (△,▲) และ 11035 (□,■) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยให้สัญลักษณ์สีขาวแทนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสัญลักษณ์สีดำแทนปริมาณเอทานอล	60
4.11	ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันความต้องการน้ำมันซึ่งใช้เป็นแหล่งพลังงานและเชื้อเพลิงเพิ่มมากขึ้น ทำให้น้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมมีราคาแพงและมีแนวโน้มที่จะแพงยิ่งขึ้นในอนาคตเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรทั่วโลก ประกอบกับการเจริญเติบโตของเศรษฐกิจและอุตสาหกรรมส่งผลทำให้ปริมาณความต้องการใช้พลังงานเชื้อเพลิงเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งตรงข้ามกับการมีอยู่ของแหล่งพลังงานที่นับวันยิ่งมีปริมาณลดลงและกำลังเป็นที่ขาดแคลนอย่างมาก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะคิดค้นหาทางเลือกใหม่ที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทน ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการเติบโตและพัฒนาอย่างรวดเร็วในหลายๆ ด้าน ล้วนต้องการใช้พลังงานจากน้ำมันเชื้อเพลิงทั้งสิ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาดังกล่าวทางเลือกหนึ่งที่เหมาะสมคือ ด้วยประเทศไทยเราเป็นประเทศเกษตรกรรม การนำวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้ในประเทศไทยมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเป็นพลังงานทดแทน เพื่อเป็นการช่วยลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ และยังเป็นการยกระดับราคาพืชผลทางการเกษตรให้สูงขึ้น รวมทั้งช่วยลดมลพิษทางอากาศได้อีกด้วย และหนึ่งของแหล่งพลังงานทดแทนที่ได้รับความสนใจอยู่ในขณะนี้คือไบโอเอทานอล (Bioethanol) (Hansen และคณะ, 1985)

ไบโอเอทานอล เป็นพลังงานสะอาด ไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก (กล้าณรงค์ ศรีรอต, 2545) และถือได้ว่าเป็นพลังงานหมุนเวียน (Renewable Energy) อีกประเภทหนึ่ง ที่สามารถปลูกพืชแล้วนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้เรื่อยๆ ซึ่งต่างจากน้ำมันที่เกิดจากซากฟอสซิล เมื่อนำมาใช้ก็ยิ่งหมดไปจึงทำให้เอทานอลกลายเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในปัจจุบัน เพราะนอกจากจะช่วยแก้ปัญหาเรื่องราคาน้ำมันและปริมาณนำเข้าน้ำมันดิบแล้ว ยังช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตรของประเทศได้อีกด้วย

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบได้หลายชนิด แบ่งเป็นประเภทแป้ง น้ำตาลและเศษวัสดุที่เป็นเซลลูโลส ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้แป้งจากมันเทศมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล มันเทศ (*Ipomoea batatas*) เป็นพืชตระกูลที่มีลำต้นใต้ดินชนิดหนึ่ง ที่มีองค์ประกอบของแป้งจำนวนมากสะสมไว้ภายในลำต้น ที่เรียกว่า หัว และมีองค์ประกอบอื่นๆ ดังนี้ มันเทศ 100 กรัม จะให้พลังงาน 93 กิโลแคลอรี, โปรตีน 0.6 กรัม, คาร์โบไฮเดรต 22.5 กรัม, ไขมัน 0.1 กรัม, แคลเซียม 98 มิลลิกรัม, ฟอสฟอรัส 46 มิลลิกรัม, เหล็ก 0.76 มิลลิกรัม, วิตามินบี 0.02 มิลลิกรัม, วิตามินซี 34- มิลลิกรัม, เบต้าแคโรทีน 175 ไมโครกรัม การนำมันเทศมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลนั้น จะต้องมีการอบแห้งและบดเป็นผลแป้งที่ละเอียดเสียก่อน จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลก่อนเข้าสู่การหมัก เพื่อให้เชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลในการผลิตเอทานอล เชื้อยีสต์ที่สำคัญคือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล

ในขั้นตอนการหมักสิ่งที่ถือได้ว่ามีความสำคัญ คือเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการหมักเอทานอลได้สูง ทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานในการผลิตเอทานอล การเพิ่มศักยภาพในการผลิตไบโอเอทานอลโดยเชื้อนี้ การทนอุณหภูมิสูงและสามารถผลิตเอทานอลได้สูง เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สิ่งสำคัญในการลดค่าใช้จ่ายในการทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิลดลงและลดค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวผลผลิตเอทานอล และสามารถลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ (Nevoigt, 2008., Banat, 1998., Olofsson et al., 2008) รวมทั้งสามารถใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องได้ (Gera et al., 1997) ดังนั้นสายพันธุ์ของยีสต์ที่มีคุณสมบัติเหล่านี้จะสามารถลดต้นทุนในการผลิตเอทานอลลงได้

ภาวะกดดันหรือสภาวะเครียด (stress condition) มีผลต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ยีสต์ มีผลทำให้เซลล์ยีสต์สูญเสียความมีชีวิตรวมทั้งความสามารถในการหมักลดลง (Gasch et al., 2000) การทนต่อภาวะเครียดจะมีความแตกต่างในแต่ละสายพันธุ์ ขึ้นกับชนิดของความเครียดและเวลาที่เซลล์ยีสต์ได้รับความเครียด (Garay-Arroyo et al., 2004) ภาวะเครียดบางอย่างชักนำให้มีการสร้าง heat shock protein (HSps) และมีการสร้าง trehalose ซึ่งทั้ง HSps และ trehalose ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลาย (Gasch et al., 2000) การชักนำให้มีการสร้างเอนไซม์ที่เป็น anti-oxidant ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้เซลล์ยีสต์ทนต่อภาวะเครียด (Cyme et al., 2003) สำหรับเชื้อ *S. cerevisiae* การทนต่อสภาวะเครียดต่างๆ ได้มีการศึกษากันมากมาย และพบว่าสภาวะเครียดมีผลทำให้การแสดงออกของยีนมีการเปลี่ยนแปลงโดยอาจจะชักนำหรือกดดันยีนที่จำเพาะต่อการแสดงออกในวิถีต่างๆ เช่น เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต การลดความเป็นพิษของ reactive oxygen species (ROS) การม้วนตัวของโปรตีนและการย่อยสลาย การเจริญเติบโต เมแทบอลิซึมของ RNA และการสังเคราะห์นิวคลีโอไทด์ (Gasch et al., 2000) ซึ่งทำให้เซลล์ยีสต์สามารถป้องกันและปรับตัวให้เข้ากับภาวะเครียดเหล่านี้ได้

มีวิธีการต่างๆ ในการปรับปรุงและพัฒนาให้มีการผลิตไบโอเอทานอลเพิ่มมากขึ้น เช่น การทำให้เชื้อยีสต์เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีและวิธีทางกายภาพ (Sridher et al., 2002., Rajoka et al., 2005) การ protoplast fusion (Sakanaka et al., 2001) และ genome shuffing (Shi et al., 2009) งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่สามารถทนอุณหภูมิสูง และผลิตเอทานอลได้สูง โดยนำสายพันธุ์ต่างๆ ของ *S. cerevisiae* มาทำการศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์ จากนั้นปรับปรุงสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น เช่น การตัดต่อยีน เป็นต้น วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการฉายรังสียูวี การใช้สารเคมี (Uma และ Polasa, 1990., Kirans et al., 2000) หรืออาจใช้เทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง เช่น การตัดต่อยีน เป็นต้น วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการฉายรังสียูวี (UV) เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากรังสียูวีเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า จัดเป็น physical mutagen ที่ใช้กันมากในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (บุษยา, 2542., สาวิตรี, 2539) เนื่องจาก DNA สามารถดูดซับแสงในช่วงความยาวคลื่น 254-260 นาโนเมตร ได้ดี ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่นของรังสียูวี วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้สารเคมี เช่น เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methane sulfonate, EMS) จัดเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagenic agent) ที่สำคัญและมีประสิทธิภาพสูงในการเหนี่ยวนำจุลินทรีย์ให้เกิดการกลายพันธุ์และมีคุณสมบัติที่ต้องการหากมีกระบวนการคัดเลือกที่เหมาะสม ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในอัตราสูงถึง $5x10^2 - 5x10^4$ ต่อยีน โดยไม่ทำให้เซลล์ตาย (French et al., 2006) EMS เป็นสาร alkylating agent ที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการเปลี่ยน A-T ไปเป็น G-C (French et al., 2006) การใช้สารกลายพันธุ์ชนิดนี้ใช้ในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดสและการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ *Aspergillus niger* (Lotfy et al., 2007., Khattab and Bazaraa,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2005) และใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ของ recombinant *S. cerevisiae* (Lussier, 1997) รวมทั้งสายพันธุ์กลายของ *S. cerevisiae* ที่ทนต่อยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ดี (Hapala et al., 2005)

ในการผลิตเอทานอลจากแป้งในปัจจุบันมักจะมีต้นทุนในการผลิตค่อนข้างสูง เนื่องจากขั้นตอนในระหว่างกระบวนการ ในการปรับสภาพวัตถุดิบ ขั้นตอนการย่อย เป็นต้น ด้วยเหตุนี้งานวิจัยเกี่ยวกับไบโอเอทานอลในปัจจุบันจึงได้มุ่งเน้นที่จะศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตและรูปแบบกรรมวิธีในการหมัก เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพและลดต้นทุนในการผลิต (Mielenz, 2001) โดยกระบวนการหมักที่นำเอาเอนไซม์มาใช้ร่วมกับขั้นตอนการหมัก หรือที่เรียกว่ากระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) ซึ่งเป็นกระบวนการหมักที่พัฒนามาจากกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม ซึ่งกระบวนการหมักแบบดั้งเดิมที่เรียกว่า กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separated hydrolysis fermentation, SHF) สำหรับกระบวนการหมักแบบ SSF มีข้อดี คือให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่า ใช้พลังงานในการผลิตน้อยกว่า และใช้เวลาในการผลิตสั้นกว่ากระบวนการ SHF รวมทั้งไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งเนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (product inhibition) จึงเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลมากกว่า SHF (Devantier et al., 2005) อย่างไรก็ตามกระบวนการ SSF ก็มีข้อเสีย คือ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ย่อยและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักมีสภาวะที่แตกต่างกัน (Ohgren et al., 2007)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง ความเข้มข้นน้ำตาลสูงและทนเอทานอลได้สูง จากนั้นปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกได้โดยการกลายพันธุ์ซึ่งจะใช้สารเคมีในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้เชื้อมีศักยภาพในการทนอุณหภูมิสูง ความเข้มข้นน้ำตาลสูง ทน เอทานอลได้สูงและมีศักยภาพในการผลิตเอทานอลได้สูง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถทนอุณหภูมิสูง ความเข้มข้นน้ำตาลสูง เอทานอลสูง และสามารถผลิตเอทานอลได้สูง
2. เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้สารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่คัดเลือกได้
3. ศึกษาศักยภาพในการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยกระบวนการย่อยพร้อมการหมัก (SSF) โดยใช้สายพันธุ์กลายของ *S. cerevisiae* ที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

คัดเลือกสายพันธุ์ของ *Saccharomyces cerevisiae* ชนิดต่างๆ ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง ทนต่อความเข้มข้นน้ำตาลสูง และความเข้มข้นของเอทานอลได้สูง นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาทำการกลายพันธุ์ โดยใช้สารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ จากนั้นนำสายพันธุ์กลายมาศึกษาความสามารถในการหมักเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบเป็นผงมันเทศ ใช้กระบวนการหมักแบบการย่อยเกิดขึ้นพร้อมการหมัก (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์พ่อแม่หรือสายพันธุ์ดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาสายพันธุ์ของยีสต์ที่เจริญที่อุณหภูมิสูง

โดยเชื้อยีสต์ที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆ 5-6 สายพันธุ์ นำมาเลี้ยงบนอาหาร yeast extract peptone dextrose (YEPD) ซึ่งประกอบด้วยยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร, เปปโตน 20 กรัมต่อลิตร, น้ำตาลเด็กโตรส 20 กรัมต่อลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมวุ้น 20 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.5 โดยใช้กรดซัลฟูริกเจือจาง บ่มที่อุณหภูมิ ต่างๆ ดังนี้ 30 °C 35 °C 40 °C 42 °C 44 °C 46 °C และ 50 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ขณะเดียวกันทำการหมักโดยใช้ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารหมักสูตร yeast fermentation medium (YFM) ปรับพีเอช 5.5 นำไปฆ่าเชื้อ จากนั้นเติมหัวเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 35 40 42 44 46 และ 50 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวิเคราะห์วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาการทนต่อความเข้มข้นเอทานอลสูง

โดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ร้อยละ 5-6 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหารหมักสูตร YFM โดยแปรผันความเข้มข้นของเอทานอล ดังนี้ ปรับพีเอช อาหารหมักเป็น 5.5 เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ โดยใช้วิธี DNS method (Miller, 1954) และปริมาณเอทานอลโดยใช้ gas chromatography คัดเลือกสายพันธุ์ของ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงในที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง มาใช้ในการศึกษาต่อไป

ขั้นตอนที่ 3 การกลายพันธุ์เชื้อ *S. cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิสูง และความเข้มข้นเอทานอล์สูง โดยใช้เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต

เพาะเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกมา เลี้ยงในอาหารสูตร YEPD (ประกอบด้วย 1% yeast extract, 1% peptone, 2% glucose บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เขย่าด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นับจำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มต้นให้ได้ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วย 0.1 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 7.0 จำนวน 2 ครั้ง ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นให้อยู่ในช่วง $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเติมเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร เก็บเซลล์แขวนลอยของยีสต์ทุก 10 นาที เป็นเวลา 60 นาที หยุดการกลายพันธุ์โดยการเติมสารละลายโซเดียมไทโอซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 5 ตัวอย่างเซลล์แขวนลอยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้รับสารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตที่ช่วงเวลาต่างๆ มาเจือจางที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} นำมา 0.1 มิลลิลิตร จากแต่ละระดับความเจือจางมา spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน นับจำนวนเซลล์รอดชีวิตจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 15-150 โคโลนี (Lyne, 2005) นำข้อมูลที่ได้หาเวลาที่ทำให้เซลล์รอดชีวิตเท่ากับ 0.1%

ขั้นตอนที่ 4 การคัดแยกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ทนอุณหภูมิสูง และทนความเข้มข้นของเอทานอลสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

100 ไมโครลิตร ของสารละลายยีสต์ที่ผ่านการกลายพันธุ์ เติมใน YEPG 10 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง (ไม่เขย่า) จากนั้นนำสารละลายเซลล์ยีสต์ 50 ไมโครลิตร ซึ่งมีจำนวนเซลล์ยีสต์ประมาณ $1x10^5$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมในอาหาร YEPD 100 มิลลิลิตร ซึ่งมีความเข้มข้นเอทานอล ร้อยละ 15 และ 20 ซึ่งบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 40 องศาเซลเซียส เพื่อใช้คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ทนอุณหภูมิสูงและความเข้มข้นเอทานอลสูง โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง

ขั้นตอนที่ 4 การหมักเอทานอลจากยีสต์สายพันธุ์กลาย

การหมักทำในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ใส่อาหารหมัก 100 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่มีความเข้มข้นเอทานอล บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งและปริมาณเอทานอล รวมทั้งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

ขั้นตอนที่ 6 เปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากยีสต์สายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ดั้งเดิมโดยใช้ผงมันเทศเป็นวัตถุดิบโดยใช้กระบวนการหมักแบบ SSF

นำผงมันเทศย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพร้อมกับเติมเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายและสายพันธุ์ดั้งเดิม เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้วิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ยีสต์ที่รอดชีวิต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959) และปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC

ขั้นตอนที่ 7 สรุปผลและจัดทำรายงาน

1.5 สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวคิดของโครงงานวิจัย

เอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH ประเทศที่ผลิตเอทานอลมากที่สุดของโลกในลำดับต้นๆ ได้แก่ บราซิล และประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งแนวโน้มการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ของโลกยังคงเติบโตอย่างต่อเนื่อง สำหรับประเทศในแถบเอเชีย เช่น จีน อินเดีย ให้ความสนใจในการใช้พลังงานทดแทนโดยเฉพาะเอทานอล และปัจจุบันอินเดียได้มีการส่งเสริมและพัฒนาเทคโนโลยีในการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์เพื่อใช้ภายในประเทศ อีกทั้งสามารถส่งออกเทคโนโลยีไปยังประเทศต่างๆ รวมทั้งประเทศไทย

ประเทศไทยมีความเหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันดิบ เพราะสามารถใช้ผลผลิตจากการเกษตรไม่ว่าจะเป็นแป้ง น้ำตาล หรือของเหลือทิ้งจากการเกษตรที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เปลือกไม้ ซากพืชต่างๆ มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตได้เป็นอย่างดี ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีในปริมาณมาก โดยเฉพาะมันสำปะหลังและกากน้ำตาลนิยมนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักเอทานอล เนื่องจากมันสำปะหลังมีมากในประเทศไทยและมีราคาถูก ปัจจุบันได้มีความพยายามในการหาวัตถุดิบชนิดใหม่มาใช้ทดแทนวัตถุดิบที่เคยนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมและอยู่ในเขตร้อน มันเทศเป็นพืชหัวชนิดหนึ่งที่นิยมปลูกกันทั่วไป และมีตลอดทั้งปี การนำมันเทศมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลเป็นแนวทางใหม่ในการผลิตเอทานอล ซึ่งการนำวัตถุดิบประเภทแป้งมาหมักเอทานอลจะต้องมีการนำแป้งมาผ่านการย่อยเพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล จากนั้นทำการหมักโดยจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล (Sanchez et al., 2008)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้เอนไซม์เปรียบเทียบกับเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าในการหมักไบโอเอทานอล ผลการทดลองพบว่า การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ย่อยแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยมาหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้กับการหมักแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อรา *Rhizopus oryzae*, *Amylomyces rouxii* และ *Aspergillus oryzae* โดยใช้เชื้อราแต่ละชนิดหมักในแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และหมักต่อด้วย *S. cerevisiae* YRK 017 หมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมัก พบว่าการหมักโดยใช้เอนไซม์และการหมักโดยใช้เชื้อราโดยเฉพาะเชื้อ *A. rouxii* จะให้ผลผลิตเอทานอลใกล้เคียงกัน โดยการใช้เอนไซม์ให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เชื้อราไม่มากนัก จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาต่อโดยพัฒนากระบวนการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงของยีสต์ *S. cerevisiae* เปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์อิสระในการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เอนไซม์ย่อย พบว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูปและเซลล์อิสระไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งเซลล์ยีสต์อิสระจะให้ค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดสูงกว่าการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป อาจเนื่องมาจากการใช้เทคนิคการตรึงรูปที่ไม่เหมาะสมทำให้มีการรั่วไหลของเซลล์ยีสต์ออกจากวัสดุตรึง ในงานวิจัยนี้จึงต้องการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง ความเป็นกรดสูง ความเข้มข้นน้ำตาลสูง และเอทานอลได้สูง เนื่องจากในกระบวนการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้น ความเป็นกรดเพิ่มขึ้นอันเป็นผลมาจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ยีสต์ ซึ่งภาวะเหล่านี้เป็นปัญหาในกระบวนการหมักและทำให้เซลล์ยีสต์ลดจำนวนลง เพราะทนต่อสภาวะต่างๆ เหล่านี้ไม่ได้ มีผลทำให้การผลิตเอทานอลลดลงตามไปด้วย จุลินทรีย์ที่ดีและมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงควรมีลักษณะ ดังนี้

- ให้ผลผลิตสูง
- ทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
- ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)
- มีความคงตัวต่อสภาวะต่างๆ ของการหมัก
- ทนต่อพีเอชต่ำ (acid tolerance)
- ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
- มีอัตราการหมักเอทานอลสูง
- เพิ่มจำนวน (propagation) ได้ง่าย
- ให้ความร้อนในระหว่างการหมักต่ำ
- มีความทนทานต่อสารพิษต่าง ๆ

มีการศึกษาการคัดแยกเชื้อที่ทนอุณหภูมิสูง แรงดันออสโมซิสสูง เพื่อใช้ผลิตเอทานอล เช่น Kiran Sree et al. (2000) ศึกษาการคัดแยกเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิสูง ทนแรงดันออสโมซิส และตกตะกอนได้เองเพื่อใช้ผลิตไบโอเอทานอล จากการศึกษาพบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* ที่แยกได้จากดินในประเทศอินเดียมี 2 สายพันธุ์ที่สามารถทนอุณหภูมิที่ 44 องศาเซลเซียส และทนความเข้มข้นของน้ำตาลได้สูงถึง 350 กรัมต่อลิตร เมื่อศึกษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ทนต่อสภาวะเครียดหรือสภาวะกดดัน (stress condition) ซึ่งเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอทานอลได้แล้ว ต่อมาได้ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกได้โดยใช้รังสียูวี ผลการทดลองพบว่าการกลายพันธุ์โดยใช้รังสียูวี สามารถปรับปรุงสายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดเลือกได้ โดยทนอุณหภูมิสูงขึ้น ทนเอทานอลได้สูง และทนแรงดันออสโมซิสได้สูง

การกลายพันธุ์ (mutation) คือ กระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับหน่วยที่ควบคุมลักษณะทางพันธุ์กรรม (gene) อย่างฉับพลันและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นลูกได้ (มาลินี, 2540) โดยการกลายพันธุ์สามารถเกิดได้ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) ซึ่งเกิดในความถี่ที่ต่ำประมาณ 10^{-5}-10^{-10} หรือการใช้สารชักนำให้เกิดการกลาย (induced mutation) เรียกตัวชักนำว่า mutagen ซึ่งจุดประสงค์ของการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์เพื่อเพิ่มความถี่ของการกลายพันธุ์ จึงนิยมใช้เทคนิคนี้ในการปรับปรุงสายพันธุ์พืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ให้มีลักษณะที่ต้องการโดยใช้ รังสี สารเคมี เป็นต้น

การกลายพันธุ์สามารถเกิดทั้งในระดับโครโมโซม (chromosomal mutation) และในระดับดีเอ็นเอหรือยีน (DNA or gene mutation (จุรีรัตน์, 2550) สำหรับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวี (UV ray) เป็นรังสีพลังงานต่ำ ไม่มีการแตกตัวเป็นไอออน (non-ionizing radiation) ทำให้อิเลคตรอนมีการเปลี่ยนระดับชั้นพลังงานอยู่ในชั้นของพลังงานที่สูงขึ้น (exited state) ส่งผลต่อคุณสมบัติการจับกันของเบส ส่วนใหญ่เกิดลักษณะที่เรียกว่า ไพริมีดีนไดเมอร์ (pyrimidine dimers) ซึ่งเกิดการจับกันของเบสกลุ่มไพริมีดีนที่อยู่ติดกัน (Turner, 1997) จุดนี้ให้การเปลี่ยนแปลง 2 ลักษณะ คือ ไดเมอร์ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอเปลี่ยนไป ส่งผลต่อการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) ทำเกิดการกลายพันธุ์ อีกลักษณะ คือ การกลายที่เป็นผลจากการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอแล้วผิดพลาด ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เช่นเดียวกัน (หัทยา, 2548) สำหรับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี สารก่อการกลายพันธุ์มีหลายกลุ่มตามกลไกการเข้าทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรม สำหรับเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate, EMS) เป็นสารที่เติมหมู่แอลคิล (alkyl group) ให้โมเลกุลของสารอื่น โดยสารชนิดนี้จะเติมกลุ่มเอธิลให้กับเบสในดีเอ็นเอตำแหน่งที่ 7-N และ 6-O ผลจากการกลายพันธุ์แบบนี้ คือ พบลักษณะกลายแบบแทนที่เบสชนิด transition

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะพัฒนาสายพันธุ์ของยีสต์ในการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถทนสภาวะกดดันต่างๆ เช่น อุณหภูมิสูง ความเข้มข้นน้ำตาลสูง เอทานอลสูง ขณะเดียวกันยังสามารถผลิตไบโอเอทานอลได้สูง จากนั้นนำสายพันธุ์ยีสต์ที่คัดเลือกได้มาทำการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมี เพื่อให้สายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดเลือกได้มีคุณสมบัติทนอุณหภูมิ ทนเอทานอลที่ได้จากการนำสายพันธุ์กลายมาใช้หมักผงมันเทศเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยใช้กระบวนการหมักแบบย่อยเกิดขึ้นพร้อมการหมัก (SSF)

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถปรับปรุงกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันเทศให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นโดยใช้สายพันธุ์กลายของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*

2. สามารถนำวัตถุดิบคือ มันเทศ ซึ่งมีเป็นปริมาณมากในประเทศไทยมาผลิตไบโอเอทานอลทดแทนมันสำปะหลัง และกากน้ำตาล ทำให้มันเทศมีมูลค่าสูงขึ้น และเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรผู้ปลูกมันเทศในประเทศไทยอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล (web.job.haii.or.th/wiki84new/index.php ; สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

เอทานอล (Ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุล C_2H_5OH เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และ ออกซิเจนเป็น ไฮดรอกซิลดิริเวที่ฟของไฮโดรคาร์บอนเกิดจำการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) เอทานอลบริสุทธิ์ มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย ให้เปลวไฟสีน้ำเงิน ไม่มีควัน ระเหยง่าย สามารถละลายทั้งในน้ำและสารละลายอินทรีย์อื่นๆ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 จุดเดือด 78.32 องศาเซลเซียส และมีจุดเยือกแข็ง -243.1 องศาเซลเซียส สามารถนำมาบริโภคได้ นอกจากนี้ยังสามารถน้ำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงในรูป เอทานอลไร้น้ำ (anhydrous ethanol) ที่มีความบริสุทธิ์สูง (เข้มข้นร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร) หรืออาจใช้เป็นเอทานอลที่มีน้ำ (hydrous ethanol)

เอทานอลที่ใช้กันโดยทั่วไปมี 2 ประเภทคือ เอทานอลสังเคราะห์ ซึ่งได้จากกระบวนการผลิตทางเคมี และ เอทานอลชีวภาพซึ่งได้จากการใช้จุลินทรีย์จำพวกยีสต์หมักกับวัตถุดิบจากการเกษตรเช่น วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง และเส้นใยที่เป็นผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด ในประเทศไทยวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นไบโอเอทานอลมี 3 ชนิด ตามลำดับได้แก่ มันสำปะหลัง อ้อย และ กากน้ำตาล (molasses เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำตาล) ประเทศบราซิล เป็นผู้ผลิตเอทานอลรายใหญ่ของโลก ใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ

แหล่งพลังงานที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นที่รู้จักกันดีว่าได้มาจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียมคือ น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล และยังมีแนวโน้มลดลงตามลำดับ ในทางกลับกันราคาของน้ำมันในยุคนี้เพิ่มขึ้น ดังนั้นหลายประเทศจึงพยายามหาพลังงานอื่นมาทดแทนในรูปแบบต่างๆ เช่น พลังงานลม น้ำ แสงอาทิตย์ และพลังงานชีวมวล

เอทานอล แหล่งพลังงานใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจในขณะนี้พบว่าร้อยละ 90 ได้มาจากกระบวนการหมัก (fermentations) ที่เหลือได้จากการสังเคราะห์ขึ้นมา (Synthesis) ในกระบวนการผลิตเอทานอลกระบวนการหมักเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่จุลินทรีย์จะเป็นตัวไปเปลี่ยนวัตถุดิบ (raw material) ให้กลายมาเป็น เอทานอล

$$C_6H_{12}O_6 \quad \text{--------} > \quad 2\ CH_3CH_2OH \ + \ 2\ CO_2$$

วัตถุดิบ(น้ำตาล) เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนได้ออกไซด์

ไบโอเอทานอล (Biothanol) (สุจิตรา และคณะ, 2552)

ไบโอเอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งมีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH เกิดจากการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas Pathway หรือ Glycolysis จากจุลินทรีย์ โดยการหมักพืชเพื่อเปลี่ยนแป้งจากพืชเป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปัจจุบัน พลังงานหลักที่นำมาใช้ในชีวิตประจำวันคือ น้ำมัน ซึ่งได้มาจากกระบวนการ ทางปิโตรเลียม และ ปิโตรเคมี ซึ่งแหล่งพลังงานเหล่านี้กำลังมีปริมาณลดลง และอาจหมดไปได้ใน อนาคต ผู้เกี่ยวข้องทางด้านพลังงานทั่วโลกจึงได้มีการพยายามที่จะหาแหล่งพลังงานต่างๆ มาทดแทน เช่น พลังงานลม พลังงานน้ำ แม้ว่าแหล่งพลังงานเหล่านี้สามารถนำมาทดแทนพลังงานไฟฟ้าได้ ก็ไม่สามารถนำมาทดแทนพลังงานจากน้ำมันได้ แต่ยังมีแหล่งพลังงานบางชนิดที่สามารถนำมาทดแทนแหล่งพลังงานน้ำมันได้ นั่นคือ พลังงานจากเอทานอล หรือพลังงานจากพืชชีวมวล ในบางประเทศ เช่น ประเทศบราซิล ได้มีการใช้เอทานอลเพื่อทดแทนปริมาณน้ำมันที่ใช้ ในขณะที่บางประเทศนำเอทานอลเพียงบางส่วนมาผสมกับน้ำมัน เพื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (gasohol) ซึ่ง จัดเป็นพลังงานทดแทนอีกประเภทหนึ่งที่นำจับตามอง

สำหรับประเทศไทย ปริมาณเอทานอลที่ใช้ผสมน้ำมันมีไม่เกินร้อยละ 20โดยน้ำหนัก เอทานอลที่นำมาผสมต้องมีความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 99.5 โดยน้ำหนัก และได้มาจาก กระบวนการหมักแป้ง ซึ่งได้มาจากการนำอ้อย ข้าวโพด หรือ มันสำปะหลัง มาเข้าสู่กระบวนการ หมัก ข้อเสียของกระบวนการนี้ อยู่ที่การนำเอาอ้อย ข้าวโพด และ มันสำปะหลังมาใช้ ซึ่งพืชเหล่านี้ ล้วนเป็นพืชบริโภคทั้งลิ้น ดังนั้น การผลิตเอทานอลเพื่อทดแทนน้ำมันนั้น จึงทำให้เกิดการแข่งขัน ทางด้านราคา จึงได้ทำการศึกษาวิจัยหากระบวนการเปลี่ยนพืชให้เป็นน้ำตาล ให้ง่ายและเร็วกว่าการ หมัก รวมทั้งใช้วัสดุอื่นๆ ที่มีต้นทุนต่ำ เพื่อมาทดแทนการใช้ อ้อย ข้าวโพด หรือมันสำปะหลัง โดย ศึกษาจากผลงานวิจัยที่ได้รวบรวมขึ้นในประเทศสหรัฐอเมริกา ทางด้านพืชหลายๆ ชนิดที่สามารถ นำมาหมักเพื่อให้ได้เอทานอล

การนำเอทานอลไปใช้ประโยชน์ (web.bsru.ac.th/~orapim/my_doc/renewable _energy ; ลืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

1. แอลกอฮอล์ ที่ใช้รับประทานได้โดยตรง (Portable Alcohol) ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสุรา เครื่องสำอาง และ ยา
2. แอลกอฮอล์ที่ไม่ใช้รับประทานโดยตรง (Industrial Alcohol) ตัวอย่างเช่น กรดอะซิติก หรือ กรดน้ำส้ม กรดมะนาว ที่สามารถนำไปใช้ต่อในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมทางการแพทย์ และนอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใย และ โลหะ
3. แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงบริสุทธิ์สูงร้อยละ 95 หรือ ร้อยละ 99.5 - 99.6 แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันนี้สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ 3 แบบดังนี้

1.1 แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ร้อยละ 95 ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงทดแทนน้ำมันเบนซิน หรือดีเซล ใช้กับเครื่องยนต์ ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง

1.2 แอลกอฮอล์ร้อยละ 99.5 - 99.6 เมื่อผสมกับน้ำมันเบนซิน จะเรียกกันว่า แก๊สโซฮอล์ โดยที่แก๊สโซฮอล์ 95 หมายถึง การผสมนำมันเบนซิน 95 กับเอทานอล ในสัดส่วน 9:1 โดยที่ยังรักษาค่าออกเทนไว้ได้ในระดับเดิม สัดส่วนการผสมเอทานอลกับน้ำมันนั้น มีใช้กันอยู่หลาย ประเทศ E85 เป็นเชื้อเพลิงที่ได้จากการผสมน้ำมัน กับเอทานอล โดยมีสัดส่วนของเอทานอลสูงถึงร้อยละ 85 และ มีค่าออกเทนสูง มีใช้กันในประเทศในแถบ บราซิล อเมริกา และยุโรป อย่างไรก็ตาม น้ำมันชนิดนี้ไม่สามารถใช้กับรถยนต์รุ่นส่วนใหญ่ที่ใช้ในประเทศไทย เนื่องจากต้องเป็นรถยนต์ที่มี เครื่องยนต์ที่ทนต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การกัดกร่อนสูงกว่าปกติ ดังนั้นในการใช้น้ำมันชนิดนี้จึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการ เตรียมความพร้อมทั้งในด้านของผู้ใช้รถยนต์และรวมถึงผู้จำหน่ายน้ำมันต้องคำนึงถึงกระบวนการผลิต และขั้นตอนการจัดจำหน่าย

1.3 เป็นสารเคมีที่ช่วยเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันโดยการเปลี่ยนรูป เอทานอล เป็น ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Buty Ether) ซึ่ง MTBE เป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซินที่มีหลายประเทศประกาศห้ามใช้เนื่องจากก่อให้เกิดมลภาวะในอากาศที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่นๆ

สำหรับประเทศไทยใช้สูตร E10 หรือที่เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ 95 (เอทานอลบริสุทธิ์สูงร้อยละ 10 : น้ำมันเบนซินออกเทน 91 ร้อยละ 90) มีคุณสมบัติเทียบเท่าน้ำมันเบนซินออกเทน 95 สามารถ ใช้ทดแทนกันได้โดยไม่ต้องมีการปรับแต่งเครื่องยนต์ นอกจากนี้ยังมีการวิจัยและพัฒนาน้ำมันจากพืช และแอลกอฮอล์มาใช้เป็นเชื้อเพลิงเช่น มีการทดลองผลิตน้ำมันดีโซฮอล์ ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงสำหรับ เครื่องยนต์ดีเซล โดยได้จากการผสมไบโอเอทานอลความบริสุทธิ์สูงในสัดส่วนร้อยละ 15 กับน้ำมัน ดีเซล และสารอิมัลซิไพเออร์คือ ทำให้เอทานอลผสมเข้ากับน้ำมันดีเซลโดยไม่แยกชั้น ซึ่งนำมา ทดลองใช้กับรถยนต์เครื่องยนต์ดีเซลในโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดาและได้มีการทดลองนำ น้ำมันแก๊สโซฮอล์ 91 ที่ผสมเอทานอลมากกว่าร้อยละ 20 มาใช้กับรถยนต์และรถจักรยานยนต์เบนซิน 91

ข้อดีของการใช้ไบโอเอทานอลเป็นพลังงานทดแทนมีหลายประการเช่น ช่วยลดมลพิษในสิ่งแวดล้อมจากการใช้สาร MTBE เพื่อเพิ่มค่าออกเทน เนื่องจากสาร MTBE มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมสูงทำให้เกิดมลพิษทางอากาศและปนเปื้อนในน้ำใต้ดิน หลายประเทศมีแนวโน้มจะยกเลิกการใช้สาร MTBE ผสมลงในน้ำมันเบนซิน ประเทศไทยได้กำหนดยกเลิกการนำเข้าสาร MTBE ใน พ.ศ. 2550 ช่วยให้เครื่องยนต์มีการเผาไหม้ดีขึ้นทำให้ไอเสียจากการใช้แก๊สโซฮอล์มีปริมาณแก๊สคาร์บอนมอนอกไซด์ลดลงร้อยละ 20 และปริมาณไฮโดรคาร์บอนลดลงร้อยละ 10 เมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันเบนซิน ซึ่งจะส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายในการแก้ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของประชาชน ลดปริมาณการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงและสาร MTBE จากต่างประเทศได้ประมาณ 3,000 ล้านบาทต่อ ปี มีผลทำให้ลดการขาดดุลทางการค้า ช่วยยกระดับราคาผลผลิตทางการเกษตรที่ใช้เป็นวัตถุดิบใน การผลิตเอทานอล ทำให้เกิดการลงทุนในภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมต่อเนื่องหลายสาขา นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความมั่นคงและมีเสถียรภาพด้านพลังงานของประเทศไทย

แนวความคิดการใช้เอทานอลในประเทศไทย (ศุภวรรณ์, 2551)

เอทานอลในประเทศไทยถูกพัฒนาและค้นคว้าอย่างต่อเนื่อง เหตุผลมาจาก

1. สภาวะวิกฤตน้ำมันโลก

ในสภาวะปัจจุบันประเทศไทยต้องประสบกับความเสียเปรียบทางด้านพลังงาน เนื่องจากมีการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อการขนส่งในปริมาณที่สูงมากและมีราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกมีราคาสูงและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดเวลา ส่งผลให้ประเทศไทยต้องเผชิญกับความเสียเปรียบทางด้านเศรษฐกิจ ต้องพิจารณาแหล่งพลังงานใหม่เพื่อทดแทนที่มาจากวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้เองภายในประเทศ ทำให้สามารถประหยัดส่วนที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศได้ร้อยละ 10 จากการนำเข้าน้ำมันปิโตรเลียมต่อปีประมาณ 4 แสนล้านบาท

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สภาวะโลกร้อน

ปัจจุบันสภาวะโลกร้อนหรือที่เรียกว่าสภาวะเรือนกระจก ซึ่งทั่วโลกให้ความสำคัญจากผลกระทบที่เกิดขึ้นและกำลังพยายามหาแนวทางแก้ไขที่ยั่งยืน เอทานอลเป็นพลังงานที่รักษาสิ่งแวดล้อมจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดปริมาณคาร์บอนได้ออกไซด์จากสภาวะโลกร้อน

พลังงานชีวมวลที่ผลิตจากเอทานอลมีศักยภาพสูงในการใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศโดยเอทานอลสามารถผลิตได้จากชีวมวลทางการเกษตรที่มีแป้งหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเป็นแหล่งสะสมน้ำตาลและแป้ง ได้แก่ อ้อย มันสำปะหลัง และ วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรบางชนิด วัตถุดิบเหล่านี้ได้ผ่านการวิจัยและพัฒนาด้านการเพิ่มผลผลิตมาอย่างต่อเนื่องจากหลากหลายหน่วยงาน ซึ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างยิ่ง สำหรับเทคโนโลยีในการผลิตมีอยู่มากมาย ซึ่งเป็นทั้งเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นภายในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 3 ระยะของการใช้วัตถุดิบ คือ การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลจากแป้งและเซลลูโลส ประเทศไทยสามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันและได้พัฒนาการผลิตเอทานอลอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพสูงมากในปัจจุบัน สำหรับการนำเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบนั้นยังอยู่ระหว่างการพัฒนาจากระดับเครื่องต้นแบบสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม

2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลโดยทั่วไปมีอยู่ 2 วิธี คือวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี แล ะวิธีการหมัก สำหรับการผลิตโดยวิธีทางเคมีนั้นทำโดยไฮเดรชัน (hydration) สารเอทีลีน (ethylene) ซึ่งได้จาก ปิโตรเลียม และ ก๊าซธรรมชาติ สำหรับการผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมักนั้นอาศัยเอนไซม์ภายใน เซลล์ของจุลินทรีย์ช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลงซับสเตรต ตัวอย่างเช่นเมื่อเติมยีสต์ลงใน อาหารที่มีซูโครสยีสต์ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ซึ่งเอนไซม์นั้นทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เปลี่ยนซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือกลูโคส และ ฟรุกโทส จากนั้นกลูโคส และ ฟรุกโทสจึงถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล และ คาร์บอนได้ออกไซด์ด้วยเอนไซม์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในวิถี Embden-Meyerhof-Parnas

เทคโนโลยีการหมักจัดว่าเป็นวิธีเก่าแก่ที่สุดของกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ คำว่า การหมัก มาจากคำกิริยาของภาษาลาตินที่เรียกว่า พีเวีย (fevere) แปลว่าการเดือด (to boiling) ที่เกิดจากการกระทำของยีสต์ โดยเกิดเป็นฟองปุดขึ้นมาบนสารสกัดของผลไม้หรือธัญพืชที่กำลังงอก ซึ่งการหมักดังกล่าวเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยจุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น

ชีวเคมีการหมักเอทานอลโดยยีสต์

สำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำตาลของยีสต์เกิดโดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway โดยวิถีไกลโคไสซิสนี้ไม่มีโมเลกุลของออกซิเจนเข้ามาเกี่ยวข้อง ไพรูเวทที่ได้ยีสต์จะเปลี่ยนเป็นแอซีทาลดีไฮด์ และ เอทานอล ตามลำดับ

Paturau (1969) รายงานว่าในการหมักเอทานอลนั้นยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลและสารอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 สารที่ได้จากการหมักเอทานอลโดยยีสต์

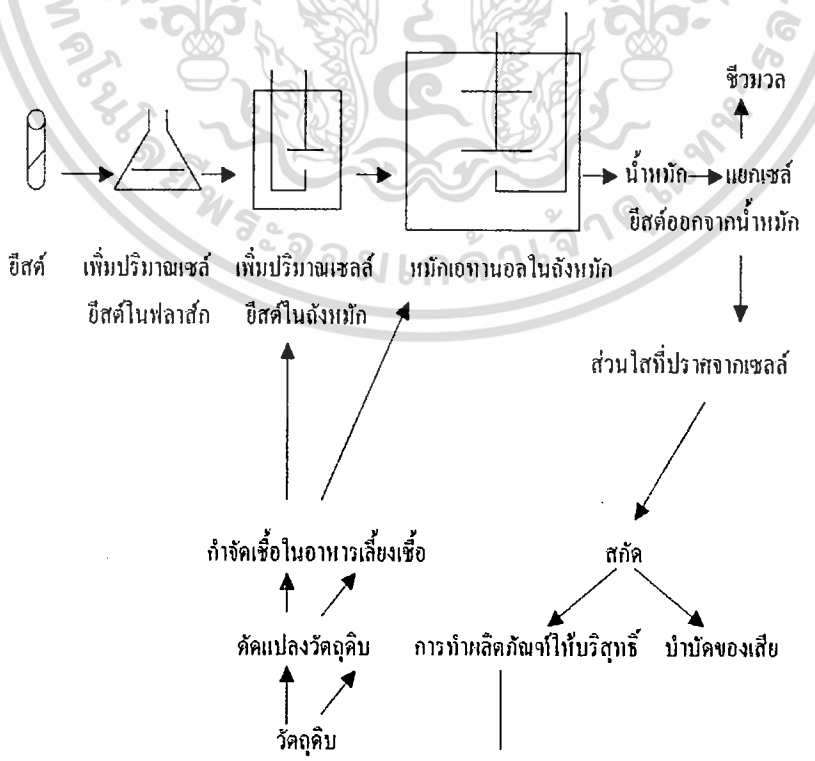
	ร้อยละ
เอทานอล	48.4
คาร์บอนไดออกไซด์	46.5
แอซีแทลดีไฮด์	0 – 0.03
กรดอะซิติก	0.05 – 0.25
กลีเซอรอล	2.5 – 3.6
กรดแล็กทิก	0 – 0.2
กรดซัคซินิก	0.5 – 0.77
น้ำมันเชื้อเพลิง	0.25 – 0.5

ที่มา: คมสัน (2553)

กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ประกอบไปด้วย 6 ขั้นตอน (Stanbury and Whitaker, 1995) คือ

1. การเตรียมอาหารที่ใช้หมัก
2. การทำให้อาหาร ถังหมัก และ อุปกรณ์ปลอดเชื้อ
3. การเพาะเชื้อ โดยปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เพาะลงในอาหารหมักต้องเหมาะสม เชื้อต้องบริสุทธิ์ และ ว่องไว (active)
4. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ
5. การสกัดผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์
6. การกำจัดของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทั้งหมด



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนและความสัมพันธ์ของขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการหมักเอทานอล
ที่มา : Stanbury และ Whitaker (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักเอทานอล

โดยทั่วไปการหมักทำได้โดยการเตรียมน้ำหมักที่มีความเข้มข้นน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ได้ร้อยละ ประมาณ 14 - 18 สารอาหารที่ต้องเตรียมเพิ่มเติมคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ประมาณ 70 - 400 กรัมต่อลิตร และมีการเติมกรดฟอสฟอริกด้วย เติมกรดซัลฟูริกเพื่อปรับความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ประมาณ 4.5 - 5.0 ป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆได้ด้วย จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ประมาณร้อยละ 5 - 8 โดยปริมาตรและสามารถหมักในสภาพจำกัดอากาศที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 - 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 - 72 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นเอทานอลประมาณร้อยละ 6-9

กระบวนการหมักที่ใช้มี 3 แบบ (สมใจ, 2537) คือ

1. การหมักแบบแบตช์ (Batch fermentation)

เป็นการหมักที่ทำในระบบปิด มีสารอาหารเริ่มต้นจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงในระบบแล้ว ไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ เพิ่มลงไปอีกจนเสร็จการหมัก

การหมักแบบนี้มีข้อดีคือ ค่าติดตั้งอุปกรณ์ถูกกว่า ไม่ต้องการการฆ่าเชื้อในถังหมักอย่างสมบูรณ์ ไม่ต้องใช้คนที่มีความเชี่ยวชาญมากในการควบคุมเครื่องระหว่างทำงาน ความเสี่ยงในการ ลงทุนต่ำ ง่ายในการเก็บรักษาวัตถุดิบ สามารถใช้กับการหมักที่ต้องการผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันได้ และโอกาสที่การหมักจะปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ต่ำ

ข้อเสียของการหมักแบบนี้ ความถี่ในการฆ่าเชื้อถังจะมีผลต่อการวัดค่าของเครื่องมือวัดต่างๆ ค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อสูง ความเสี่ยงสูงในการกลายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้หมัก ถังหมักหนึ่งถังไม่เพียงพอต่อการผลิตผลิตภัณฑ์หลายๆอย่างและผลิตภัณฑ์จะถูกแยกออกเนื่องจากปฏิกิริยาที่ไม่ต่อเนื่อง

2. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

เป็นวิธีการที่ในระหว่างการหมักมีการเติมอาหารใหม่ และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกัน ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร

ข้อดีของการหมักแบบนี้คือ ใช้พนักงานน้อย ควบคุมผลิตภัณฑ์ได้ โอกาสติดเชื้อในระหว่างการหมักต่ำ และป้องกันการเสียหายของอุปกรณ์เครื่องมือวัดในระหว่างการฆ่าเชื้อภายในถังหมักน้อย

ข้อเสีย คือวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักต้องเป็นแบบเดียวกันตลอดการหมัก ปัญหาในการ รักษาอัตราการหมักสูงๆ การใช้เครื่องควบคุมแทนคนงานมีค่าใช้จ่ายในการทำงานสูงกว่า อุปกรณ์ใน การแยกของแข็งในระหว่างการหมักมีราคาแพง

3. การหมักแบบเฟด-แบตช์ (Fed-batch fermentation)

เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะ ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก ซึ่งการหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้แก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นซึ่งถ้า ใช้มากไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจทำให้มีปัญหาในการให้ออกซิเจนโดยการ ให้ในปริมาณที่เพียงพอทำได้ยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อดีของการหมักแบบเฟด-แบตช์ อธิบายได้ดังนี้ (Roehr, 2001)

1. ให้ผลผลิตสูง ทั้งนี้เพราะไม่มีการดึงเซลล์ออกในระหว่างการหมัก
2. มีความยืดหยุ่นสูง
3. มีความเสี่ยงต่อการเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นต่ำ
4. เงื่อนไขของสภาวะต่าง ๆ มีความเหมาะสม ต่อจุลินทรีย์ เช่น การเจริญของเชื้อ

ข้อเสีย ดังนี้

1. เสียเวลากับการเติมอาหาร การให้ความร้อน การกำจัดเชื้อ การใช้ระบบหล่อเย็น และการทำความสะอาดถังหมัก
2. ต้องการกำลังคนมาก หรือต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง เช่น การใช้ระบบคอมพิวเตอร์ในการควบคุม
3. มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดการปนเปื้อน หรือการได้รับสารพิษจากคนที่เข้าไปปฏิบัติกับงาน
4. เครื่องมือได้รับความเสียหายมากจากการกำจัดเชื้อหลาย ๆ ครั้ง

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

Panchal (1990) ได้ชี้ให้เห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งปฏิกิริยาการผลิตเอทานอล ทำให้ผลิตเอทานอลได้น้อยลง ซึ่งปัจจัยหลัก ๆ ได้แก่

1. การยับยั้งการผลิตเอทานอลโดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย นั่นคือ เอทานอลทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา
2. การยับยั้งการผลิตเอทานอลโดยผลผลิตพลอยได้ (by products) เช่น กรดอินทรีย์
3. การยับยั้งโดยแรงดันออสโมซีส เนื่องจากมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง
4. การยับยั้งเนื่องจากผลของอุณหภูมิที่เพิ่มมากขึ้น
5. การยับยั้งกระบวนการหมักแต่ไปส่งเสริมการเจริญของยีสต์เนื่องจากการให้อากาศ (aeration) หรือการกวน (agitation)
6. การยับยั้งกระบวนการหมักเนื่องจากการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์ชนิดอื่น (โดยเฉพาะอย่างยิ่งการหมักในระดับอุตสาหกรรม)
7. การยับยั้งกระบวนการหมักเนื่องจากสายพันธุ์ยีสต์ที่เลือกใช้ไม่คงตัว มีการกลายพันธุ์หรือมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ มีดังนี้ (วราวุฒิ และคณะ, 2529)

1. ความเข้มข้นของเอทานอล

ยีสต์หลายชนิดมีความอ่อนแอต่อการยับยั้งด้วยเอทานอล การมีเอทานอลสะสมอยู่ในถังหมักถือว่าเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่ไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของเอทานอลเพียง 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักก็ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าลง และที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้การเจริญของจุลินทรีย์เกือบหยุดลง การเจริญของจุลินทรีย์ถูกยับยั้งด้วยเอทานอลแบบ ไม่แข่งขัน (non-competitive) ตามสมการ Michaelis-Menten (Aiba และคณะ, 1968)

อย่างไรก็ตาม Brown และ คณะ (1981) ได้ทำการศึกษาและชี้ให้เห็นว่าผลของการยับยั้งนั้นมีความซับซ้อนมาก ยิ่งไปกว่านั้นถ้ามีการเติมเอทานอลในช่วง log phase ทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพอย่างถาวร โดยทั่วไปพบว่าเอลยีสต์ (ale yeast) มีความทนต่อเอทานอลน้อยกว่าลาเกอร์ยีสต์ (lager yeast) และยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศหรือในสภาวะที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว พบว่ามีการตอบสนองต่อเอทานอลน้อย แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงช่วยส่งเสริมให้ความเป็นพิษของ เอทานอลมีมากขึ้น การผลิตเอทานอลลดลงเมื่อยีสต์อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญ ได้ และการผลิตเอทานอลมีมากขึ้นเมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะของอุณหภูมิต่ำสุดของการเจริญ เอทานอลมี ผลต่อการยับยั้งแบบไม่แข่งขันในการขนส่งกลูโคส มอลโทส แอมโมเนีย และ กรดอะมิโนต่าง ๆ ยีสต์ สายพันธุ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ปริมาณ มาก สามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง ๆ มากกว่ายีสต์สายพันธุ์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่น้อย ซึ่งคล้ายกับว่าผลของเอทานอลไปส่งเสริมให้ไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ion) ไหลผ่าน (passive flux) เยื่อหุ้มเซลล์มากขึ้น ซึ่งการไหลผ่านของไฮโดรเจนไอออนนี้ไม่ได้ผ่านทาง ATPase ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง จึงทำให้เกิดความต่างระดับของโปรตอน (proton gradient) กระจายไปทั่วเยื่อหุ้มเซลล์ จึงไปมีผลต่อการยับยั้งการขนส่งสารละลายต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าไมโทคอนเดรียมีบทบาทสำคัญต่อการทนเอทานอลของยีสต์ และยีสต์ที่มีขนาด ของเซลล์เล็กสามารถทนต่อเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ที่มีขนาดของเซลล์ใหญ่ (Panchal, 1990)

2. ความเข้มข้นของน้ำตาล

อาหารสำหรับหมักที่มีน้ำตาลสูงกว่าร้อยละ 15 การหมักเอทานอลของยีสต์จะหยุดลง ดังนั้นการใช้ยีสต์ *Socchoromyces cerevisiae* มาหมักในสภาวะเช่นนี้ จึงมีผลให้การหมักเป็นไปได้ช้า ๆ และเมื่อเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerant yeast) เช่น S. *rouxii* พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำ DAmore และคณะ (1988) ได้ศึกษาผลของแรงดันออสโมซีสต่อกระบวนการหมักของ brewing yeast *(S. cerevisiae)* ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 100, 200, 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ผลแสดงให้เห็นว่าเมื่อกลูโคสความเข้มข้นสูงขึ้นการเจริญและ การหมักของ brewing yeast ลดต่ำลง จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการเจริญ อัตราการหมัก และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลซึ่งดูจากค่าผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (theoretical ethanol yield) ลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทา นอลภายในเซลล์ได้รับความเสียหาย จึงมีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในวิถี Embden- Meyerhof-Parnas

3. สารอาหาร และ โคแฟกเตอร์ (cofactor)

สารอาหารบางอย่างอาจมีไม่เพียงพอสำหรับการหมัก ซึ่งรวมถึงแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (เช่น แอมโมเนียมไอออน) วิตามิน หรือแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น สังกะสี ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แมกนีเซียม และแคลเซียม การเติมสารอาหารให้กับยีสต์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง โดยเฉพาะเมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 16 (Rose และ Harrison, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 ไนโตรเจน

โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมไอออน ได้ซึ่งอาจเติมในรูปของได้แอมโมเนียมฟอสเฟต หรือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแอมโมเนียมไอออนนั้นจัดว่าเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งยีสต์ *Saccharomyces* spp. สามารถใช้ได้ ขณะนี้ยังไม่พบว่ามีการนำยูเรียไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตอาหารสำหรับคนอย่างเป็นการค้า แต่มีการใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง โดยยูเรีย นั้นจัดเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ยีสต์สามารถใช้ได้เช่นเดียวกันกับเกลือแอมโมเนียม

3.2 ฟอสฟอรัส

ปกติใส่ในรูปของฟอสเฟต ซึ่งเป็น ionic factor จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญ ต่อการเจริญของยีสต์ แต่ไม่ควรใส่จนมีความเข้มข้นเกินร้อยละ 4 ของน้ำหนักแห้ง

3.3 ซัลเฟอร์

ปกติในอุตสาหกรรมใช้ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับฟอสฟอรัส และความเข้มข้นที่ใส่โดยทั่วไปไม่ควรเกินร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้ง

3.4 Trace element

สำหรับ brewer's yeast ความต้องการแร่ธาตุค่อนข้างหลากหลายโดยเฉพาะพวก ที่เป็นประจุบวก (cation) ได้แก่ สังกะสี แมงกานีส แมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดง โพแทสเซียม และเหล็ก โดยที่สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ทองแดง และแมกนีเซียม ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของ เอนไซม์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแคทาไลติกเซ็นเตอร์ (catalytic centre) ที่ช่วยกระตุ้นให้ เกิดปฏิกิริยา หรืออยู่ในสภาวะที่เสถียร ส่วนโพแทสเซียมนั้นเป็นส่วนประกอบของระบบการขนส่ง สารอาหารเข้าสู่เซลล์ สำหรับแมกนีเซียมและแคลเซียมปริมาณการใส่อยู่ในช่วงกว้างแต่ในอาหารจะ ขาดธาตุทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้ เพราะถ้าขาดจะมีผลให้หมักช้า กรณีของแมกนีเซียมช่วยให้อัตราในการ ผลิตเอทานอลเหมาะสม ขณะที่แคลเซียมกระตุ้นการเจริญและมีบทบาทต่อการตกตะกอนของเซลล์ ยีสต์

3.5 วิตามิน

ความต้องการวิตามินในการเจริญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ส่วนมากbrewer's yeast มีความต้องการไบโอติน โดยไบโอตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์คาร์บอกซีเลส (carboxylase) เพื่อใช้สำหรับสังเคราะห์ลิพิดที่จำเป็น มียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ต้องการแพนโททีเนต เป็นปัจจัยการเจริญ แม้ว่าบางครั้งจะผลิตได้มากและปลดปล่อยออกมาสู่อาหาร ซึ่งแพนโททีเนตนี้เป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ เอ และมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการเมแทบอสิซึมคาร์โบไฮเดรตและลิพิด นอกจากนั้นเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ซัลเฟอร์เพื่อเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน สำหรับอินอซิทอล (inositol) มีความต้องการเป็นบางครั้งเพราะใช้เป็นองค์ประกอบของฟอสฟอลิพิด ขณะที่ไพริดอกซิน (pyridoxine) และไทอะมีน (thiamine) นั้นมีความจำเป็นต่อ brewer's top yeasts ซึ่งวิตามิน ต่างๆ เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตและ เมแทบอสิซึมของกรดอะมิโน ซึ่งการจะเติมสารอาหารใดลงไปนั้นควรคำนึงถึงผลต่อต้นทุนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สภาวะแวดล้อม

4.1 พีเอช

การที่เซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน ค่าพีเอชของโปรโตพลาสซึมภายในเซลล์นั้นไม่เหมือนกัน ยีสต์สามารถรักษาระดับพีเอชภายในเซลล์ได้ค่อนข้างดีเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชต่างกัน และยีสต์สามารถเจริญได้ค่อนข้างดีที่พีเอชระหว่าง 3.6 - 6.0 แต่พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ระหว่าง 4.5 - 5.0 สำหรับอาหารที่มีบัฟเฟอร์ต่ำ พีเอชเริ่มต้นสำหรับการหมักที่เหมาะสมควรมีค่าประมาณ 5.5 แต่อาหารที่มีบัฟเฟอร์สูงพีเอชที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 4.5 - 4.7 (สาวิตรี, 2540)

4.2 อุณหภูมิ

สำหรับยีสต์อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักจะสูงกว่าการเจริญ 5 - 10 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่สัมพันธ์กับกระบวนการทางชีวเคมีรวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ยีสต์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส โดยพบว่าเซลล์ยีสต์ในระยะที่มีการเจริญเกิดการตายได้ ถ้านำไปไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 - 60 องศาเซลเซียส ในเวลาน้อยกว่า 30 นาที สำหรับการผลิตยีสต์ขนมปง มักควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมักให้อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส

4.3 ออกซิเจน

ในกระบวนการหมักยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้โครงสร้างที่เป็นลิพิดมีเสถียรภาพ และเพื่อรักษาสภาพของกระบวนการต่างๆ ที่มีอยู่ทั่วไปในเซลล์ อย่างไรก็ตามการให้ออกซิเจนในการหมักนั้นมีผลให้การผลิตเอทานอลลดลง และทำให้ชีวมวลของเซลล์เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นเพราะออกซิเจนส่งเสริมให้เกิด Pasteur effect ในกรณีที่ใช้แบคทีเรียเป็น จุลินทรีย์ในการหมัก มีแบคทีเรียหลายชนิดที่ต้องอยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศเท่านั้น ถึงจะมีอัตราการ ผลิตเอทานอลสูง และผลิตชีวมวลของเซลล์ต่ำ

4.4 คาร์บอนไดออกไซด์

ยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนในที่ความดันสูงกว่าบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญและการหมักรุนแรงมากขึ้น เช่นเดียวกับสภาวะที่อาหารมีพีเอชต่ำ และมีความเข้มข้นของเอทานอลสูง ดูเหมือนว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการ ยับยั้งปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชันเท่านั้น แต่ก็พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของ เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมบางอย่างของเอนไซม์ เปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึม ได้ (permeability) และการขนส่งตัวถูกละลาย

2.4 จุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลที่สำคัญที่สุดคือ ยีสต์ ซึ่งสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นพลังงานเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอากาศ และสร้างเอทานอลเมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจากอากาศ(มีอากาศจำกัด) กระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยยีสต์นั้นในระดับอุตสาหกรรมมีกระบวนการผลิตแตกต่างกันไป รวมถึงยีสต์ที่ได้รับความสนใจและถูกเลือกใช้ในการหมักได้แก่ *Saccharomyces cerevisioe, S. uvoum Shizosocchoromyces pombe* และ *Kluyveromyces* species สำหรับแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ *Zymomonos mobiiis* ซึ่งการเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดใดก็ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ สำหรับ *Z. mobiiis* และ *S. cerevisiae* ต่างมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพื้นฐาน ของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

137615

การจัดการ กรณีเลือกใช้ *Z. mobiiis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงแต่มีชีวมวลต่ำ ฉะนั้นจำเป็นต้องมีความระมัดระวังในเรื่องของการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงแง่เศรษฐศาสตร์โรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจึงให้ความสนใจ *S. cerevisiae* มากกว่าอีกทั้ง *Z mobiiis* มีความทนต่อเอทานอลต่ำกว่ายีสต์ การผลิตเอทานอลในระดับโรงงานอุตสาหกรรมนั้นจุลินทรีย์ที่ เลือกมาใช้ต้องมีลักษณะเหมาะสมกับกระบวนการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต และการออกแบบ ลักษณะของกระบวนการการผลิตนั้นก็ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ถูกเลือกมาใช้ในกระบวนการหมักด้วย เช่นกัน

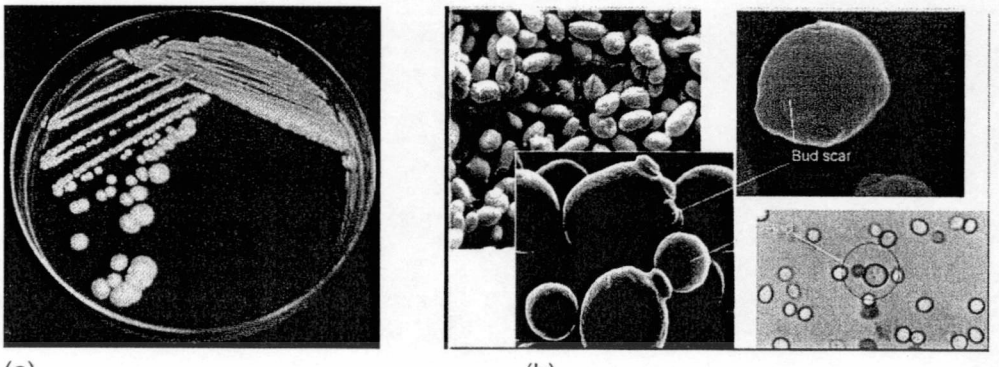
ยีสต์คือจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางเป็นเวลานานมาแล้ว ถึงกับมีผู้กล่าวไว้ว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาใช้ในการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 6,000 ก่อนคริสตศักราช ปัจจุบันได้มีการนำยีสต์มา ใช้ประโยชน์ในหลายๆด้าน ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเภสัชกรรม การแพทย์ การเกษตร และสิ่งแวดล้อม การใช้ประโยชน์ของเซลล์ยีสต์ในอุตสาหกรรมอาหาร มีบทบาทสำคัญอย่างมากและสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับเซลล์ยีสต์ได้อย่างคุ้มค่า นอกจากนี้ยีสต์ยัง สามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ การผลิต เอทานอลสำหรับใช้เป็นสารเคมีและเชื้อเพลิง เป็นต้น

ยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของรากลุ่มหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่นรูปร่างกลม ทรงรี สามเหลี่ยม รูปร่างคล้ายผลมะนาวแถบประเทศตะวันตกหรือรูปร่างยาว เป็นต้น ยีสต์จะมีการลืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการแตกหน่อ (budding) หรือลืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยวิธีการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือแบลิดิโอสปอร์ (basidiospore) ยีสต์ส่วนใหญ่จะมีการใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน มนุษย์ รู้จักนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในแง่ของกระบวนการหมัก (fermentation) โดยเซลล์ยีสต์จะมีการ เจริญเติบโตและแพร่ขยายจำนวนภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น อาหาร อุณหภูมิ และปัจจัยแวดล้อมใน กระบวนการหมักที่เหมาะสมด้วยการเปลี่ยนแปลงน้ำตาล (สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน) เป็นคาร์บอนได้ออกไซด์และแอลกอฮอล์ เซลล์ยีสต์สามารถพบได้มากมายตามธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน พืช หรือแม้กระทั้งในอากาศ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์บางชนิดจะรวมอยู่กับแมลง หรือในกระเพาะ ของสัตว์บางชนิด แหล่งที่มักพบยีสต์เจริญปะปนอยู่บ่อยๆ คือ แหล่งที่มีปริมาณความเข้มข้นของ น้ำตาลสูงๆ เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง และผลไม้ที่มีรสหวาน นอกจากนี้ยังสามารถพบยีสต์เจริญได้ในเมล็ด ธัญพืช หญ้าฟาง หรือแม้กระทั้งอาหารสัตว์ การปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ในอาหารเหล่านี้อาจก่อให้เกิดเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารอีกด้วย อย่างไรก็ตามยีสต์หลายสายพันธุ์ที่ได้ทำการพิสูจน์และ ศึกษาด้นคว้าว่ามีประโยชน์ต่อมนุษย์ แต่ยีสต์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมนั้นมีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ตัวอย่างสายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักและมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย คือ *Saccharomyces cerevisioe* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์ (Brewer's Yeast) เอทานอล และสำหรับทำขนมปัง (Baker's yeast)

Saccharomyces cerevisioe จัดอยู่ใน

Division	Ascomycotina
Class	Ascomysetes
Order	Saccharomycetales
Family	Saccharomycetaceae
Sub-family	Saccharomycetoidae
Genus	Saccharomyces
Species	cerevisioe

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(a) (b)

รูปที่ 2.2 (a) ลักษณะโคโลนี่ของ *Saccharomyces cerevisioe* บนอาหารแข็ง
(b) ลักษณะเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisioe* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนกำลังขยาย 100X

ที่มา : http://wineserver.ucdavis.edu/content.php? (สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

ในกระบวนการหมักเอทานอลจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดคือ ยีสต์ โดยเฉพาะ *S. cerevisiae* จุดเด่นของเชื้อนี้คือ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง (0 ถึง 40 องศาเซลเซียส) ทนอุณหภูมิสูงได้นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิดนอกเหนือจากน้ำตาลกลูโคส เช่นน้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย) น้ำตาลมอลโตส กาแลกโตส เป็นต้น จึงนิยมใช้หมักเพื่อผลิตเอทานอล โดยทั่วๆ ไป

การผลิตเอทานอลในระดับโรงงานอุตสาหกรรมนั้นจุลินทรีย์ที่เลือกมาใช้ต้องมีลักษณะเหมาะสมกับกระบวนการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต และการออกแบบลักษณะของกระบวนการการผลิตนั้นก็ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ถูกเลือกมาใช้ในกระบวนการหมักด้วยเช่นกัน จุลินทรีย์ที่ดี และมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงควรมีลักษณะดังนี้ (สาวิตรี, 2540; Panchal, 1990)

1. ให้ผลผลิตสูง
2. ทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
3. ทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerance)
4. มีความคงตัวภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของการหมัก
5. ทนต่อพีเอชต่ำ (acid tolerance)
6. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
7. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
8. เพิ่มจำนวน (propagation) ได้ง่าย
9. ให้ความร้อนในระหว่างการหมักต่ำ
10. การแสดงลักษณะตกตะกอนหรือไม่ตกตะกอนขึ้นอยู่กับลักษณะของกระบวนการหมักที่ผู้ผลิตต้องการ
11. มีกิจกรรมการเป็นผู้ฆ่า (killer activity)
12. นอกเหนือจากการใช้กลูโคส มีความสามารถในการใช้โพลีแซกคาไรด์
13. มีความทนทานต่อสารพิษต่าง ๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกเพื่อการอยู่รอดได้ แตกต่างกัน อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่สุดในด้านลบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงต้องมีกลไกพิเศษช่วยให้มีชีวิตรอด ซึ่งเกี่ยวข้องกับสิ่ง สำคัญอยู่ 3 ประการ คือ ความคงตัวของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาของลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ การสร้าง องค์ประกอบของเซลล์ขึ้นมาทดแทนองค์ประกอบเดิมที่เสียสภาพไป และการที่จุลินทรีย์นั้นทนต่อ อุณหภูมิสูงอยู่ก่อนแล้วเกิดวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ประมาณ 46 - 50 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่านั้นหาได้ยาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ รวมทั้งสภาวะการเจริญ เช่น อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน น้ำ ออกซิเจน ความเข้มข้นของเอทานอล และ'ปัจจัยการเจริญอื่น การให้สารอาหารพิเศษบางชนิดสามารถช่วยให้ ยีสต์เจริญที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้ เช่น การเติมกรดไขมันอิ่มตัว และเออร์โกสเตอรอลในอาหารหมัก การที่ ยีสต์มีการเจริญลดลงในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นอาจเนื่องมาจากมีการสังเคราะห์สเตอรอลได้น้อยลง (Anderson และคณะ, 1986) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพบว่าสภาพการเป็นของไหลขององค์ประกอบของ เยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มลดลง การมีชีวิตรอดของยีสต์น้อยลง ทั้งนี้เพราะโปรตีนหรือองค์ประกอบของ กรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ (Swan และ Watson, 1997)

ที่อุณหภูมิสูงอัตราการเจริญของยีสต์ลดลงมีผลให้ชีวมวลโดยรวมลดลง เพราะฉะนั้นปริมาณโปรตีน กรดไรโบนิวคลีอิก กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก และกรดอะมิโนอิสระต่าง ๆ ภายในเซลล์จึงลดลง และการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นยังเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัวมากขึ้น ทำให้ความสามารถในการไหลผ่านของสารละลายต่าง ๆ รวมทั้งสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง (Panchal,1990) จึงมีผลต่อการลดอัตราการหายใจของยีสต์ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิสูงเหนี่ยวนำให้ระบบการหายใจของยีสต์บกพร่อง นั้นคือไมโทคอนเดรียมีบทบาทโดยตรงต่อการทนสภาวะอุณหภูมิสูง (Van Uden, 1984)

ปัจจัยที่อาจเป็นไปได้ต่อการทนอุณหภูมิสูงของยีสต์คือการแสดงออกหรือไม่แสดงออกของ heat shock proteins (HSPs) ซึ่งในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิด HSPs ซึ่ง HSPs นี้เป็นตัวการในการทำให้เซลล์ยีสต์มีความทนต่ออุณหภูมิสูง ได้รายงานถึงการทำ heat shock ใน *S. cerevisiae* ว่าไม่เพียงเหนี่ยวนำให้เกิด HSPs และการทนอุณหภูมิสูงเท่านั้น แต่ยังมีส่วนช่วยให้ ยีสต์ทนต่อระดับของเอทานอลที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามยีสต์ยังไม่สามารถหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง

เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานที่สามารถผลิตขึ้นมาทดแทนได้อยู่ตลอดเวลา จึงเป็นที่ยอมรับและเป็นที่สนใจต่อการวิจัย โดยพบว่าในระหว่างการหมักเอทานอลนั้นอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อการผลิตเอทานอล ดังนั้นการใช้ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงจึงมีความสำคัญในการช่วยลดต้นทุนของระบบหล่อเย็นในระหว่างการหมัก ทำให้อัตราการหมักเร็วขึ้น และช่วยลดโอกาสการเกิดการปนเปื้อนในระหว่างการหมักได้ ซึ่งสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส และทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี (Sridhar และคณะ, 2001)

2.5 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (www.dktac.th/kruya/energy/en_else/atanol: สืบค้นวันที่ 10 กันยายน 2555)

เอทานอลเกิดจากการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas Pathway หรือ Glycolysis pathway จากจุลินทรีย์ เนื่องจากยีสต์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อผลิตเอทานอลนั้น สามารถใช้น้ำตาลทราย (ซูโครส) ได้ด้วย ฉะนั้นจึงสามารถใช้น้ำอ้อย หรือกากน้ำตาลเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุดิบสำหรับการหมักได้ ส่วนวัตถุดิบที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ถ้าย่อยแป้งก็จะได้น้ำตาล กลูโคส และหมักเป็นเอทานอลได้เช่นเดียวกันโดยเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากชีวมวลจะขึ้นอยู่ กับประเภทของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร สามารถแบ่งตามกลุ่มพืชผลทางการเกษตรที่ใช้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บทรูท ข้าวฟ่างหวาน หัวผักกาดหวาน เป็นต้น ยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการใดๆโดยวัตถุดิบเหล่านี้จะมีน้ำตาลซูโครส (Sucrose) เป็นองค์ประกอบหลัก

$$\underset{\text{Glucose}}{C_6H_{12}0_6} + \text{YEAST} \longrightarrow \underset{\text{Carbon dioxide}}{2nC0_2} + \underset{\text{Ethanol}}{2C_2H_5OH}$$

2. วัตถุดิบประเภทแป้ง

เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสจะต้องนำมาผ่านกระบวนการย่อยให้ได้น้ำตาลกลูโคส เป็นโมเลกุลเดี่ยวยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ดังสมการ

$$\underset{\text{Starch}}{H(C_6H_{10}O_5)nOH} \xrightarrow[\text{water}]{\text{Amylotytic enzymes}} \underset{\text{Glucose}}{nC_6H_{12}0_6} \xrightarrow{\text{yeast}} \underset{\text{Ethanol}}{2nCH_3CH_2OH} + \underset{\text{Carbon dioxide}}{2nC0_2}$$

วัตถุดิบประเภทแป้งได้แก่ผลผลิตทางการเกษตรเช่น พวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และ พืชประเภทหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น

3. วัตถุดิบประเภทเส้นใย

ซึ่งเป็นวัตถุประเภทลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมีเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และสารประกอบอื่นๆ

เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึก มีลักษณะเป็นเส้นใย เหนียวและไม่ละลายน้ำ

เฮมีเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และ อะราบิโนส (Arabinose) เป็นต้น จะไม่ละลายน้ำและเสถียรน้อยกว่าเซลลูโลสมาก

ลิกนิน เป็นพอลิเมอร์ของ ฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane) ทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก ดังนั้นในการนำมาผลิตเอทานอลต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบก่อน

วัสดุส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟ่างข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ชี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

วัสดุเหลือทางการเกษตรสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ โดยวัสดุเหลือทั้งทาง การเกษตรที่มีมากในประเทศไทย เช่น ผลพลอยได้จากข้าว ผลพลอยได้จากข้าวโพด และ ผลพลอยได้ จาก'ปาล์ม' น้ำมัน ซึ่งวัสดุเหลือทั้งแต่ละประเภท มีคุณสมบัติและปริมาณแตกต่างกันไปสำหรับการนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัสดุเศษเหลือจากการเกษตรไปผลิตเอทานอลนั้นมีข้อจำกัดเพราะวัสดุเศษเหลือที่น้ำหนักน้อยและพองฟูทำให้ไม่คุ้มค่าขนส่ง

แม้จะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่จะมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเป็นเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณาคือ

- วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดปี หาได้ง่าย ราคาถูก
- สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบและต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง
- พลังงานสมดุลของระบบเป็นบวก
- วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารของมนุษย์

(wwwl.mod.go.th/opsd/dedweb/energy/about/meaning% ; สืบค้นวันที่ 26 ธันวาคม 2555)

2.6 มันเทศ (Sweet Potato)

http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book (สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2555)

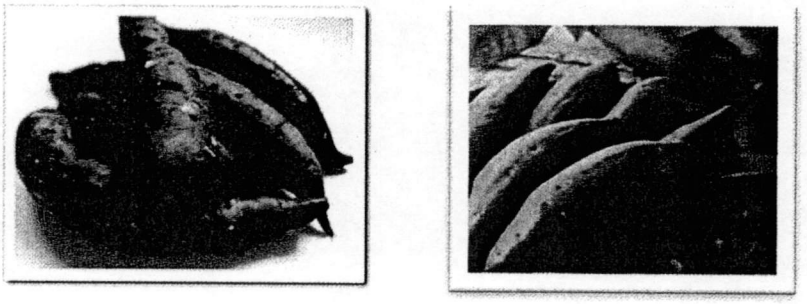
ประวัติความเป็นมา

มันเทศมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่บริเวณเขตร้อนของทวีปอเมริกา แต่มันเทศที่ปลูกกันอยู่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตริไม่มีหลักฐานแน่นอนว่ามีวิวัฒนาการมาจากพืชป่าชนิดใด ในสมัยโบราณมันเทศเป็นอาหารหลักของมนุษย์สองเขต คือ พวกอินเดียนในอเมริกากลางและบริเวณเทือกเขาแอนดิส ประเทศเปรู พวกอินเดียนทั้งสองแหล่งนี้ปลูกข้าวโพดเพื่อใช้เป็นอาหารหลัก และในขณะเดียวกันก็ปลูกมัน เทศด้วย อีกเขตหนึ่ง คือ ชนเผ่าโพลิเนเซียนที่อาศัยอยู่บนหมู่เกาะต่างๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิก และ ตอนเหนือของเกาะนิวซีแลนด์ เชื่อกันว่ามันเทศที่ชาวโพลิเนเซียนปลูกกันในสมัยก่อนนั้น นำมาจาก ทวีปอเมริกาในคริสต์ศตวรรษที่ 16 หลังจากชาวยุโรปค้นพบทวีปอเมริกา นักสำรวจชาวสเปนได้นำ มันเทศไปสู่ประเทศสเปน จากประเทศสเปนก็แพร่ต่อไปยังประเทศอื่นๆในยุโรป

ทางด้านเอเชียมันเทศก็ถูกนำมายังอินเดีย ฟิลิปปินส์ จีน และญี่ปุ่น โดยนักสำรวจสเปนและโปรตุเกส สำหรับประเทศไทยไม่มีหลักฐานบันทึกว่าได้มีการนำมันเทศเข้ามาปลูกในสมัยใดแต่เข้าใจกันว่ามีผู้นำมันเทศมาแพร่หลายในราวสมัยกรุงศรีอยุธยาเป็นราชธานี เพราะมีเรือสำเภาไปมาค้าขายระหว่างประเทศจีน พวกคนจีนคงจะได้นำติดมือมา ตามนิสัยที่ไปอยู่ที่ไหนก็หาพันธุ์พืชไปปลูกบริโภค ในปัจจุบันมันเทศปลูกกันทั่วไปในประเทศไทยเพราะมันเทศเป็นพืชที่เหมาะสมกับสภาพดิน ฟ้าอากาศของประเทศไทยอย่างยิ่ง สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผล ผลิตของหัวค่อนข้างสูง แต่ ส่วนใหญ่แหล่งปลูกเป็นจังหวัดในทางภาคกลาง จังหวัดที่ปลูกมาก ได้แก่ นครศรีธรรมราช เชียงใหม่ นครสวรรค์ พระนครศรีอยุธยา สงขลา นครปฐม เพชรบุรี ตรัง เลย และปทุมธานี โดยข้อมูลปี 2546 - 2547 ประเทศไทยมีการปลูกมันเทศ รวม 30,905 ไร่ มีปริมาณผลผลิต 56,432 ตัน เฉลี่ยผลผลิต 1.82 ตันต่อไร่ มันเทศจึงเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญเป็นอันดับที่ 5 ของโลกรองจาก ข้าว สาลี ข้าวจ้าว ข้าวโพด และ มันฝรั่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะทั่วไปของมันเทศ (www.guru.sanook.com/encyclopedia ; สืบค้นวันที่ 12 พฤศจิกายน 2555)



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของมันเทศ
ที่มา : www.hcsupply.blogspot.com/2009/02/blog-post.html (สืบค้นวันที่ 12 พฤศจิกายน 2555)

ชื่ออังกฤษ : Sweet Potato
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ipomoeo botatus L.*
ชื่อวงศ์ : Convolvulaceae

ลักษณะทางพฤษศาสตร์

มีลำต้นเป็นเถาหรือเป็นพุ่มตั้งตรง และมีจำนวนน้อย ที่เป็นประเภทไม้ยืน ต้นพืชพวกนี้อาจเจริญในที่แห้งแล้ง ในน้ำ และอาจเป็นพวกตัวเบียน (parasite) โดยทั่วไปแล้วเมื่อใบหรือลำต้นเป็นแผลพืชในวงศ์นี้จะให้น้ำยางลีขาว

ราก มันเทศมีระบบรากแบบรากฝอย ซึ่งเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูก หรือเกิดจาก ลำต้น ที่ทอดไปตามพื้นดิน รากมันเทศจะเป็นที่สะสมอาหารและใช้รับประทานได้

ใบ เป็นแบบใบเดี่ยว เกิดสลับกันบนข้อของ**ลำต้น** มีขนาดและรูปร่างต่างกัน ความแตกต่างของใบนั้นมิใช่เกิดจากพันธุ์เท่านั้น แม้แต่ในต้นเดียวกันก็อาจมีรูปร่างแตกต่างกันได้ บางใบมีขอบใบเรียบ บางใบมีใบเป็นแฉก และบางใบมีรูปร่างคล้ายหัวใจ เป็นต้น ใบมีขนเล็กน้อย และ มักจะมีลี ม่วงอยู่ตามเส้นใบ ก้านใบอาจจะยาวหรือสั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์นั้นๆ

ดอก มันเทศที่ปลูกในเขตอบอุ่นมักไม่ออกดอก ส่วนการปลูกในเขตร้อนจะออกดอกแต่มักไม่ติดเมล็ด ดอกเกิดตามมุมของใบ มีก้านข่อดอก (peduncle) แข็งแรง ซึ่งมักจะยาวกว่าก้านใบ ดอกมีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ ซึ่งโดยปกติจะแยกเป็นอิสระ ซึ่งกันและกัน หรือ อาจเชื่อมติดกันที่โคนกลีบดอก (petal) มี 5 กลีบ กลีบดอกเหล่านั้นจะเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวย (corolla tube) มีลักษณะคล้าย ดอกผักบุ้ง กลีบดอกมีลีชมพูปนม่วง มีเกสรตัวผู้ (stamen) 5 อันและแยกเป็นอิสระซึ่งกันและ กัน ก้านชูอับเกสรตัวผู้เรียกว่า ก้านอับเกสรมีความยาวไม่เท่ากัน และเชื่อมติดอยู่กับฐานของกลีบ ดอก รังไข่ มี 2 ส่วน บางดอกอาจจะมี 4 ส่วน แต่ละส่วนจะมีไข่ 1 หรือ 2 ที่รับละอองเกสรตัวผู้ (stigma) มี 2 แฉกอยู่ที่ก้าน (style) เชื่อมติดกับรังไข่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผล มีเปลือกแข็งหุ้ม มีลักษณะเป็นแคปซูล (capsule) ภายในเปลือกแข็งมีเมล็ดเล็กสีดำ ค่อนข้างแบน ด้านหนึ่งของเมล็ดเรียบ ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นเหลี่ยม ทางด้านเรียบจะเห็นรอยที่เมล็ด ติดกับผนังรังไข่เรียกว่า ไฮลัม (hilum) และมีรูเล็กๆ เรียกว่า ไมโครไพล์ (micropyle) เปลือกของ เมล็ดค่อนข้างหนา และน้ำซึมผ่านได้ยาก

หัว มันเทศลงหัวในระดับความลึกไม่เกิน 9 นิ้ว หัวมันเทศเกิดจากการขยายตัวของราก ซึ่งเนื้อเยื่อภายในรากที่เรียกว่าพาเรนไคมา (parenchyma) เป็นส่วนที่สะสมแป้ง รากที่ขยายตัวเป็น หัวขึ้นมาอาจเกิดจากรากของลำต้นที่ใช้ปลูก หรือจากรากที่เกิดจากข้อของลำตันที่เลื้อยไปตามดินก็ ได้ ดังนั้นมันเทศต้นหนึ่งๆ อาจมีหัวมากกว่า 50 หัวลักษณะหัวส่วนมากมีรูปร่างทรงกระบอก ด้านหัว ท้ายเรียวตรงกลางป่องออก สีผิวของหัวและสีของเนื้ออาจจะเป็นสีแดง เหลือง ขาว หรือสีนวล แตกต่างกันไปตามพันธุ์ ผิวอาจจะเรียบหรือขรุขระและมักจะมีรากแขนงเกิดในร่องของหัว

คุณค่าทางโภชนาการของมันเทศ

ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต เส้นใย โปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี2 ไนอาซิน โฟเลท วิตามินซี สารเริ่มต้นของสารแคโรทีนและเบต้าแคโรทีน

มันเทศ เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตชั้นดีที่ให้พลังงานโดยไม่ก่อพิษต่อร่างกายแบบอาหารที่แปรรูปจากแป้งและน้ำตาลแบบอื่นๆ หัวมันเทศชนิดหัวสีเหลืองแสดงว่าเป็นแหล่งเบต้าแคโรทีนที่ดีกิน แล้วจะได้วิตามินเอ มันเทศจึงมีส่วนช่วยบำรุงสายตา เสริมสร้างระบบคุ้มกันของร่างกายให้แข็งแกร่ง ลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ

มันเทศ เป็นพืชอาหารของมนุษย์และสัตว์ โดยใช้ทั้งหัว เถาใบ และยอดอ่อน มาประกอบอาหารทั้งคาวและหวาน เช่น มันกระปอง น้ำส้มสายชูหมักจากมันเทศ ในด้านอุตสาหกรรมมีการ สกัดแป้งมันเทศเป็นส่วนผสมของอาหารเด็ก และกาว เป็นต้น นอกจากนี้มันเทศยังใช้เป็นอาหารสัตว์ ได้หลายชนิด เช่น สุกร วัว ควาย กระต่าย เป็ด ไก่ และปลา เป็นต้น

สรรพคุณของมันเทศ

มันเทศเป็นแหล่งพลังงาน และให้วิตามินบี 2 และโฟเลทสูง รองลงมาจากผักใบเขียว มีสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีเยี่ยม มีฤทธิ์เย็น รสหวาน ส่วนที่ใช้ประโยชน์ของมันเทศ คือ หัว ต้นและใบ ซึ่งแต่ละส่วนจะให้สรรพคุณแตกต่างกัน เช่น

- หัวมันหรือส่วนยอด สามารถนำมาปรุงอาหาร ชงน้ำดื่มแก้กระหาย บำรุงม้าม ไต แก้เมาคลื่นน้ำคั้นจากหัวมันเทศใช้ทาแก้แผลไฟไหม้
- ใบมันเทศ ตำพอกฝี แก้ไขข้ออักเสบ แก้แผลไฟไหม้ แก้ผื่นคัน ตุ่มพุพอง
- ทั้งต้นและหัว มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณค่าทางอาหารของมันเทศเนื้อขาวเปรียบเทียบกับเนื้อเหลือง

ธาตุอาหาร	มันเทศเนื้อขาว (หัว, ต้ม)	มันเทศเนื้อเหลือง (หัว, ต้ม)
ความชื้น(gm)	62.3	68.1
แคโรรี่ (unit)	149	126
ไขมัน (gm)	0.4	0.6
ธาตุ C H O (gm)	35.8	29.4
เส้นใย (gm)	0.6	0.6
โปรตีน (gm)	0.6	1.0
แคลเซียม (mg)	72	66
ฟอสฟอรัส (mg)	51	58
เหล็ก (mg)	0.7	0.8
วิตามินเอ (i.u.)	10	1,025
วิตามินบี l(mg)	0.06	0.09
วิตามินบี 2 (mg)	0.03	0.04
ไนอะซิน (mg)	0.5	0.6
วิตามินซี (mg)	47	31

ที่มา : กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2530)

ตารางที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบหลักใน 100 กรัม ของส่วนที่รับประทานได้ของพืชตระกูลหัว เปรียบเทียบกับข้าว

ชนิดพืช	น้ำหนักแห้ง (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)	ส่วนของน้ำหนักแห้ง โปรตีน (%)	ไขมัน(%)	เส้นใย (%)	พลังงาน (kJ)
มัน	27	88.8	7.4	0.7	1.9	437
มันเทศ	30	85.8	5.0	1.0	3.3	479
มันฝรั่ง	20	85.0	10.0	trace	2.0	315
ข้าว	88	88.6	8.0	0.9	0.2	1,478

ที่มา : คมสัน (2553)

นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณอื่นเช่น แก้ท้องผูก ช่วยย่อยอาหาร ช่วยปรับสภาพเลือด บำรุงเลือด รวมถึงอวัยวะต่างๆ คือกระเพาะ ม้ามเป็นต้น ช่วยป้องกันโรคต่อกระจก ตาบอดกลางคืน รักษาโรคเบาหวาน แก้โรคดีซ่าน ป้องกันโรคหัวใจ และ มะเร็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 การกลายพันธุ์ (Mutation) (http://www.cdiplab.com/DNA-analysist/DNA-information.html สืบค้นวันที่ 21 กันยายน 2556)

การกลายพันธุ์ (Mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในเซลล์ที่ถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูกหลาน การกลายพันธุ์ของจีโนม (Genome mutation) อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมส่วนการกลายพันธุ์ของโครโมโซม (Chromosome mutation) อาจเกิดจากการเปลี่ยนลำดับของยีนภายในโครโมโซม เช่น การขาดหาย (Deletion) การเปลี่ยนกลับ (Inversion) การทำเป็นคู่ (Duplication) การเคลื่อนย้าย (Translocation) หรือการไม่แยกออก (Non-disjunction) ในขณะที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน (Gene mutation) หรือการกลายพันธุ์เป็นจุด (Point mutation) ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนซึ่งทำให้โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนจำเพาะเปลี่ยนไปการกลายพันธุ์แบบนี้เป็นการกลายพันธุ์ที่มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุ์กรรมของจุลินทรีย์ (Jose และ Arnold, 2005) การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไม่จำเป็นต้องสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในนิวเคลียส แต่อาจเกิดกับดีเอ็นเอที่อยู่ในออร์แกเนลอื่นๆในเซลล์ (Jacobson, 1981)

2.7.1 การเกิดการมิวเทชัน

แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด

1) มิวเทชันที่เกิดขึ้นเองในธรรมชาติ (Spontaneous mutation) อาจเกิดขึ้นเนื่องจากรังสี สารเคมี หรืออุณหภูมิในธรรมชาติ ทำให้การจับคู่ของเบสผิดไปจากเดิมส่งผลให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนไป แต่อัตราการเกิดมิวเทชันชนิดนี้จะต่ำมาก
2) การมิวเทชันที่เกิดจากการชักนำ (Induced mutation) เป็นการกลายพันธุ์ที่เกิดจากมนุษย์ใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ (Mutagen) ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ มีดังนี้

2.7.1.1 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ (Physical mutagen) ได้แก่ อุณหภูมิ และรังสีต่างๆ รังสีสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1.) รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (Ionizing radiation) รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้สูง ซึ่งมักจะทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม รังสีเหล่านี้ ได้แก่ รังสีแอลฟา เบตา แกมมา นิวตรอนซ์และรังสีเอ็กซ์

2.) รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (Non ionizing radiation) รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้ต่ำ มักจะทำให้เกิดไทมีนได้เมอร์ (Thymine dimer) หรือไซโทซีนได้เมอร์ (Cytosine dimer) รังสีประเภทนี้ ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต (UV)

2.7.1.2 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (Chemical mutagen) ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น

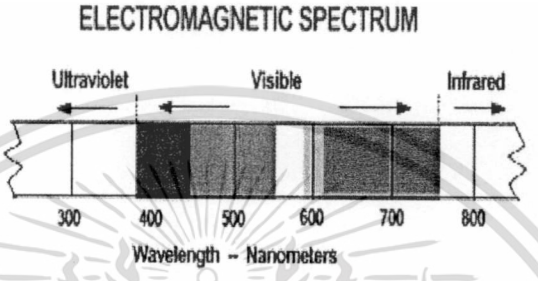
1.) สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสชนิดต่างๆของดีเอ็นเอ (Base analogues) สามารถเข้าแทนที่เบสเหล่านั้นได้ในระหว่างที่เกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสและรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป สารเคมีเหล่านี้ ได้แก่ 5-โบรโมดีออกซียูริดีน (5-Bromode-oxyuridine) 2-อะมิโนพิวรีน (2-Aminopurine)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.) สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของเบส มีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสเช่นเดียวกัน ทำให้รหัสพันธุ์กรรมเปลี่ยนแปลงไป สารเคมีเหล่านี้ได้แก่ กรดไนตรัส ไฮดรอกซิลลามีน ไนโตรเจนมัสตาด และเอธิลมีเทนซัลโฟเนต เป็นต้น

3.) สารเคมีที่ทำให้เกิดการเพิ่มและการขาดของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีผลทำให้รหัสพันธุ์กรรมเปลี่ยนแปลงไป สารเคมีเหล่านี้ ได้แก่ สีย้อม เช่น อะคริดีนออเรนจ์โพรฟลาวีน เป็นต้น

2.8 รังสีอัลตราไวโอเลต (UV)



รูปที่ 2.4 ช่วงของรังสีอัลตราไวโอเลต
ที่มา: http://ozone.tmd.go.th/uvbasic.htm สืบค้นวันที่ 21 กันยายน 2556

รังสีอัลตราไวโอเลตหรือรังสียูวีเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าที่มีความถี่ 100 ถึง 400 นาโนเมตร ซึ่งมีพลังงานสูงพอที่จะกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาเคมี ถ้ารังสียูวีที่มีความยาวคลื่น 200 นาโนเมตร มีพลังงานมากพอที่จะทำลายพันธะทางเคมีได้ อาจทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (Free radicals) ที่มีพลังงานทำให้เกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ได้อย่างต่อเนื่อง เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารที่ก่อให้เกิดสารตั้งต้นได้มากมาย รวมทั้งสามารถทำลายพันธะของออกซิเจนทำให้เกิดก๊าซโอโซน

รังสียูวีแบ่งเป็น 3 ช่วง ตามลักษณะที่มีผลกระทบทางชีวภาพ

1.) UV A ช่วงความยาวคลื่น 315-400 นาโนเมตร เป็นช่วงความยาวคลื่นที่มีพลังงานต่ำที่สุดของรังสียูวี ซึ่งจะส่งผลกระทบทำให้ผิวหนังมีสีน้ำตาล (Sun tanning) แต่เนื่องจากเป็นคลื่นที่อยู่ใกล้กับแสงที่ตามองเห็น จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Near UV

2.) UV B ช่วงความยาวคลื่น 280-315 นาโนเมตร มีพลังงานสูงขึ้นสามารถทำให้ผิวหนังไหม้เกรียมและมีหลักฐานว่าเป็นต้นเหตุของการเกิดมะเร็งผิวหนัง

3.) UV C ช่วงความยาวคลื่น 100 - 280 นาโนเมตร มีพลังงานสูงกว่ารังสียูวีสองชนิดแรก สามารถดูดกลืนได้โดยดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ เกิดเซลล์มะเร็ง และเกิดการตายของเซลล์ สมัยโบราณมีการใช้รังสียูวีฆ่าเชื้อเซลล์ที่อยู่บนผิวหนังของคนที่เป็นโรคเรื้อน ถ้ามองรังสียูวีด้วยตาเปล่าอาจทำให้เกิดการไหม้ของจอประสาทตา ทำให้ตาบอดและทำให้สารประกอบในกระจกตาขุ่นเป็นโรคต้อ

เนื่องจาก UV C สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จึงเรียกว่า Germicidal UV range รังสียูวีที่มีความยาวคลื่นน้อยกว่า 200 นาโนเมตร มีพลังงานมากพอที่จะทำลายพันธะทางเคมีและถูกดูดกลืนโดยสารประกอบ บางครั้งอาจเรียกว่า Ozone UV เพราะเป็นรังสียูวีที่สามารถกระตุ้นออกซิเจนในอากาศให้เป็นโอโซนได้ เนื่องจากรังสียูวีช่วงความยาวคลื่นนี้ถูกดูดกลืนได้โดยไอน้ำและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเจนในอากาศ ดังนั้นหากรังสียูวีที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 200 นาโนเมตร เคลื่อนที่ผ่านบรรยากาศจะถูกดูดกลืนหมด จึงต้องอาศัยตัวกลางที่เป็นสุญญากาศรังสียูวีจึงจะส่องผ่านได้จึงเรียกว่า Vacuum UV

ความยาวคลื่นที่มีประสิทธิภาพสำหรับทำให้กลายพันธุ์อยู่ในช่วง 200-300 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการกลายพันธุ์ คือ 255 นาโนเมตร เป็นค่าความยาวคลื่นที่ดีเอ็นเอดูดกลืนสูงสุด ผลที่สำคัญจากการทำงานของรังสียูวี คือ ไพริมีดีนได้เมอร์ซึ่งอาจเกิดได้ 3 แบบ คือ ระหว่างไทมีนกับไทมีน ไทมีนกับไซโทซีน และไซโทซีนกับไซโทซีน ไพริมีดีน ได้เมอร์เหล่านี้อาจจะเกิดระหว่างไพริมีดีนที่อยู่ติดกันบนดีเอ็นเอสายเดียวกันหรือคนละสาย โดยพบว่าในยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งมีองค์ประกอบของกัวนีนและไซโทซีน (C+G centent) ประมาณร้อยละ 35 มีได้เมอร์ระหว่างไทมีนสูงสุด รังสียูวีที่ความยาวคลื่นสั้นนี้อาจจะเหนี่ยวนำให้เกิดทรานซิชันของ G:C ไปเป็น A:T การกลายพันธุ์แบบกรอบเลื่อน และการขาดหาย เป็นที่รู้กันว่าหากใช้รังสียูวีที่ความยาวคลื่นสูงกว่า 260 นาโนเมตร อาจทำให้ได้เมอร์เปลี่ยนกลับเป็นโมโนเมอร์ด้วยแสงที่มองเห็นได้ ได้เมอร์ที่เกิดขึ้นทำให้มีรอยแผลขนาดใหญ่ซึ่งขัดขวางการถอดรหัสและการถ่ายแบบดีเอ็นเอ ถ้าซ่อมแซมไม่ได้เซลล์อาจตายหรือเกิดการกลายพันธุ์ระหว่างการซ่อมแซม แผลจากผลของรังสียูวีพบว่ามีไพริมีดีนได้เมอร์ที่ถูกซ่อมแซมด้วยระบบการซ่อมแซมชนิดต่างๆในเซลล์มากถึง 1,000 ได้เมอร์ นอกจากไพริมีดีนได้เมอร์แล้วรังสียูวีอาจทำให้เกิดแผลอื่นๆบนดีเอ็นเอ เช่น การเติมน้ำที่พันธะคู่ใน ไพริมีดีนซึ่งทำให้มีความผิดพลาดในระหว่างการถ่ายแบบดีเอ็นเอ ส่วนรังสียูวีชนิดคลื่นยาวซึ่งมีความยาวคลื่น 300-400 นาโนเมตร มีผลต่อการตายและการทำให้กลายพันธุ์น้อยกว่ารังสียูวีชนิดคลื่นสั้น แต่ถ้าสัมผัสนานๆในที่มีรังสีที่แทรกเข้าไประหว่างเบสในดีเอ็นเอ ซึ่งหมายถึงสารอินเตอร์คาเลติงจะทำให้มีอัตราการตายและการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น นิยมใช้รังสียูวีเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีสต์เพราะใช้ง่าย การวัดปริมาณกำหนดทำได้ง่ายและการสัมผัสกับรังสียูวีไม่เป็นอันตรายมากนัก ทำให้การปฏิบัติไม่ต้องระมัดระวังมาก สายพันธุ์กลายที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีนั้นประมาณร้อยละ 10 อาจเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่เปลี่ยนกลับ (Non-reversible) หรือสามารถเปลี่ยนกลับที่ความถี่ต่ำมาก (Jacobson, 1981; Brock, 1984; Borstel, 1990)

2.9 สารเคมีก่อกลายพันธุ์ Ethyl methanesulfonate (EMS)

Ethyl methanesulfonate หรือ EMS มีสูตรโครงสร้างทางเคมี $CH_3SO_2OC_2H_5$ มีสถานะเป็นของเหลวใสไม่มีสี ความหนาแน่น 1.203 กรัมต่อมิลลิลิตร มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 85-86 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 มิลลิลิตรปรอท น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 124 และละลายน้ำได้ประมาณร้อยละ 8 (สิรินุช, 2536) ในการทำปฏิกิริยา EMS จะถ่ายหมู่เอทิล คือ C_2H_2 ให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอในปฏิกิริยาแอลคิเลชั่น (Alkylation) โดยทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับเบสพิวรีน เบสไพริมีดีน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วยแต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาแอลคิเลชั่นจะเกิดมากที่สุดในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน ซึ่งภายหลังทำการปฏิกิริยาแล้วจะกลายเป็น 7- Ethylguanine หรือที่เรียกว่า Alkylated guanine (สิรินุช, 2536)

EMS ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดย

1) การแทนที่ของเบส (Single base substitution)

เมื่อ EMS ทำปฏิกิริยาแอลคิเลชั่นซึ่งจะเกิดมากที่สุดที่ตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน มีผลให้คุณสมบัติในการเกิดไอออไนเซชั่น (Ionization) ของเบสผิดปกติเกิดการจับคู่ที่ผิดไปจากเดิม (สิรินุช, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) การดึง (หลุด) เบสพิวรีนจากสายดีเอ็นเอ

เมื่อมีหมู่เอทิลเข้าไปจับอยู่บนตำแหน่งต่างๆในเบสพิวรีนจะทำให้พันธะที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลกับเบสถูกตัดขาด เบสจึงหลุดออกไปจากโมเลกุลของดีเอ็นเอทำให้เกิดช่องว่างขึ้น เรียก Apurinic gap ภายหลังเกิดช่องว่างแล้วเซลล์จะมีการซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดขึ้นเพื่อให้ดีเอ็นเอกลับเป็นปกติ แต่มีบ่อยครั้งที่การซ่อมแซมผิดพลาดได้เบสที่ต่างไปจากเบสเดิมทำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ Transition หรือ Transversion (สิรินุช, 2536)

3) การแตกหัก (ขาด) ของ DNA สายเดี่ยวและสายคู่

เมื่อเกิดดีพิวริเนชั่นจะทำให้น้ำตาลไม่อยู่ตัว เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ตัดขาดหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาล ทำให้สายเดี่ยวหรือสายคู่ของดีเอ็นเอขาดจากกันได้ ซึ่งนำไปสู่การหลุดหายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอและเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด (สิรินุช, 2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Sacchoromyces cerevisioe YRK 017 ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งเหล้าในประเทศไทย (วิมลักษณ์, 2549)

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5196

Socchoromyces cerevisioe TISTR 5202

Socchoromyces cerevisioe TISTR 5339

Socchoromyces cerevisioe TISTR 5088

Socchoromyces cerevisioe TISTR 5596

(จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

3.2 วัตถุดิบ

มันเทศ สายพันธุ์ที่มีเนื้อสีเหลือง ซื้อจากตลาดหัวตะเข้ ลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร

3.3 สารเคมี

1. เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95
2. สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0
4. สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *Aspergillus oryzoe* 31.2 U/mg (Sigma, Aldrich CO. Ltd)
5. สารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส จาก *Aspergillus niger* 31.2 U/mg (Sigma, Aldrich CO. Ltd)
6. DNS reagent

3.4 วัสดุอุปกรณ์

1. จานเลี้ยงเชื้อ
2. หลอดทดลอง
3. บิกเกอร์ ขนาด 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
5. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
6. กระบอกตวง ขนาด 100 มิลลิลิตร
7. ปิเปต ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
8. ตะแกรงร่อนเบอร์ 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. โถดูดความชื้น (desiccator)
10. ขวดเก็บตัวอย่าง (vial)
11. หม้อนึงความดันไอ (autoclave) รุ่น High-Pressure steam sterilizer ES-315 ยี่ห้อ TOMY
12. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) รุ่น RIOHAZARD CLASS II V6 ยี่ห้อ CLEAN
13. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น POLAR 1000 ยี่ห้อ ONTHERM
14. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น z 333K ยี่ห้อ HERMLE
15. กล้องจุลทรรศน์
16. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Helios Gamma ยี่ห้อ Thermoscientific
17. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น GC-17A ยี่ห้อ SHIMADZU

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมแป้งมันเทศ

การเตรียมวัตถุดิบโดยใช้มันเทศจากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง มาล้างน้ำทำความสะอาด ปอกเปลือก แล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นบางๆประมาณ 1 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาวางกระจายบนถาดสแตนเลส อบแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 3 วัน นำชิ้นมัน เทศที่ผ่านการอบแห้ง ทำการป่นละเอียดให้เป็นผงด้วยเครื่องบ่น แล้วนำมากรองผ่านตะแกรงร่อน ขนาดเบอร์ 35 จะได้ผงแบ่งมันเทศที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.188 มิลลิเมตรเก็บรักษาในตู้เย็น เพื่อเก็บไว้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลต่อไป

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้น

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหารแข็งเอียง YPD (ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 20 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และวุ้น 15 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ 1 - 2 ลูป ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (shaker) ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อยีสต์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้หัวเชื้อเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 (Sridhar และคณะ , 2002)

3.5.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

3.5.3.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ความเข้มข้น 0.2โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตตปริมาณ 16.4 กรัม ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และเตรียมสารละลายกรดระซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์โดยปิเปตกรดอะซิติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 11.55 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับ ปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เตรียม สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์โดยนำสารละลายโซเดียมอะซิเตตที่เตรียมได้มาปริมาตร 352 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดอะซิเตตปริมาตร 148 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้ว ปรับความเข้มข้นให้เป็น 0.05 โมลาร์ และนำไปปรับพีเอชเป็น 5.0 โดยใช้สารละลายกรดอะซิติก 0.05 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมอะซิเตต 0.05 โมลาร์

3.5.3.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ชั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 กรัม นำมาละลายในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วนำไปกรองด้วย Milipore filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ เก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.3.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

ชั่งเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.015 กรัม นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วนำไปกรองด้วย Milipore filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในสภาวะปลอดเชื้อเก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

3.5.4.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหารแข็งเอียง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ 1 - 2 ลูป ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเชื้อยีสต์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้หัวเชื้อเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืน แสงเท่ากับ 0.5 นำหัวเชื้อที่ได้มาทำการลากเชื้อ (streak plate) ลงบนจานอาหาร YPD จากนั้นนำไป บ่มอุณหภูมิต่างๆ ที่ 30 37 40 42 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของ เชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยให้เครื่องหมายเป็นบวก(+) คือมีการเจริญ และเครื่องหมายลบ(-) คือไม่มี การเจริญของเชื้อ (Kiran และคณะ , 2000) เทียบกับชุดควบคุมคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและ มีการเจริญเป็น +++

3.5.4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

เตรียมอาหารหมัก YFM (ประกอบด้วยยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2P0_4) 4 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2S0_4$) 2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgS0_4.7H_20$) 1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร pH 5.5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้น ที่ได้จากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ 30 37 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ หามวลชีวภาพ คัดเลือกสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่ผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง เพื่อศึกษาต่อไป (Kiran และคณะ, 2000)

3.5.5 ศึกษาการทนทานต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อยีสต์

เตรียมอาหารเหลว YPD ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆ ดังนี้ร้อยละ 0 5 10 15 18 และ 20 โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลว YPD ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เอทานอลผสมเป็นเนื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.5.2 ร้อยละ10โดยปริมาตร นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจนับเซลล์ยีสต์ที่ มีชีวิต โดยนำมาทำการเจือจาง (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-8} นำมาทำการ pour plate ลงบนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับโคโลนีบน'จาน'ที่มี'จำนวน 25 - 250 โคโลนี คำนวณในรูป CFU ต่อมิลลิลิตร คัดเลือกสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่สามารถเจริญได้ดีที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง เพื่อศึกษา ต่อไป (Kumar และคณะ , 2011)

3.5.6 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้รังสียูวีและการใช้สารเคมี

3.5.6.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้รังสียูวี

นำหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.5.3 มาเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5 (Sridhar และคณะ, 2002) ทำ Serial dilution โดยให้มีระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1} – 10^{-5} จากนั้นดูดสารละลายยีสต์ 0.1 มิลลิลิตร Spread ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร YPD agar ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ ทำการฉายรังสียูวีเป็นเวลา 0 10 20 30 40 50 60 70 80 และ 90 วินาที ในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ค่าความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 30 วัตต์ โดยให้จานอาหารเลี้ยงเชื้อห่างจากหลอดยูวีเป็นระยะทาง 30 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Petrea และคณะ, 2008 ; วชิราภรณ์ และคณะ, 2552) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในที่มืด นับจำนวนโคโลนีที่เจริญเพื่อหาช่วงเวลาที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 5 (Mehdikhani และคณะ, 2011)

3.5.6.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้ EMS

นำหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากขั้นตอนที่ 3.5.3 มาเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที 2 ครั้ง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5 เติมสาร EMS ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตรของสารละลายทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที เซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในที่มืด โดยเก็บเซลล์แขวนลอยของยีสต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกๆ 10 นาที และเติม Sodium thiosulphate ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ EMS (มีนตรา และคณะ, 2554) จากนั้นนำเซลล์ที่ได้จากช่วงเวลาต่างๆมาทำ Serial dilution โดยให้มีระดับความเจือจางตั้งแต่ 10^{-1}–10^{-5} แล้วดูดสารละลายยีสต์ 0.1 มิลลิลิตร นำมา Spread บนอาหาร YPD Agar ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในที่มืด นับจำนวนโคโลนีที่เจริญเพื่อหาช่วงเวลาที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 5 (มีนตรา และคณะ, 2554)

ซึ่งอัตราการรอดชีวิตสามารถคำนวณได้ดังนี้

$$\text{อัตราการรอดชีวิต (\%)} = \frac{\text{CFU/ml ที่เวลาใดๆ}}{\text{CFU/ml ที่เวลา 0 วินาที}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.7 การคัดแยกสายพันธุ์กลายให้บริสุทธิ์

ทำการสุ่มเก็บโคโลนีเดี่ยวที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD ซึ่งได้จากขั้นตอนการกลายพันธุ์โดยการใช้รังสียูวี และ EMS ในช่วงเวลาที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 5 อย่างละ 50 ไอโซเลท มาทำการแยกให้บริสุทธิ์โดยการ Streak บนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในที่มืด จากนั้นจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในที่มืด (พนิดา และคณะ, 2554)

3.5.8 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

นำสายพันธุ์กลายบริสุทธิ์ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสมา Streak บนอาหารแข็ง YPD บ่มที่ 30 40 42 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในที่มืด คัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการหมักเอทานอลด้วยอาหารหมักต่อไป

3.5.9 การหมักเอทานอลด้วยอาหารหมัก Yeast fermentation medium (YFM) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ทนอุณหภูมิสูงมา Streak บนอาหาร YPD Agar slant บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อยีสต์ 1 ลูป ใส่ลงในอาหาร YPD broth ปริมาตร 25 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในที่มืด จากนั้นนำสารละลายเชื้อยีสต์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.5 แล้วดูดมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารหมัก Yeast fermentation medium (YFM) ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร ที่มีหลอดดักก๊าซ (คมสัน, 2534) ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง ในที่มืด เลือกไอโซเลตสายพันธุ์กลายที่ให้ปริมาณฟองก๊าซมากกว่าหรือเท่ากับสายพันธุ์ควบคุม (*S. cerevisiae* YRK 017) มาทำการหมักด้วยอาหาร YFM อีกครั้ง โดยครั้งนี้ไม่ได้ใส่หลอดดักก๊าซ ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง ในที่มืด เก็บส่วนใสหลอดละ 5 มิลลิลิตร มารวมกันเพื่อนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1960) และตรวจหาปริมาณเอทานอลด้วย Gas Chromatography (Shimadzu, Japan) คัดเลือกไอโซเลตที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.10 เปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากยีสต์สายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ดั้งเดิมโดยใช้ผงมันเทศเป็นวัตถุดิบโดยใช้กระบวนการหมักเอทานอลแบบย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) (สุวภัทร และคณะ, 2555)

3.5.10.1 การเตรียมสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

เตรียมสารละลายผงมันเทศโดยชั่งผงมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้ว 480 กรัม ใส่ลงในบีกเกอร์แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 6000 มิลลิลิตร คนให้ผงมันเทศละลายแล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90–100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยในระหว่างการให้ความร้อนจะคนสารละลายผงมันเทศตลอดเวลาเพื่อไม่ให้เกิดการไหม้ นำสารละลายผงมันเทศใส่ลงในฟลาสก์ๆละ 300 มิลลิลิตร จำนวน 18 ฟลาสก์ แล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้เป็นสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (สุวภัทร และคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.10.2 กระบวนการหมัก

นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ เมื่ออุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 40 องศาเซลเซียส จึงเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ลงไปปริมาตร 40 มิลลิลิตร และเติมหัวเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ได้จากการคัดเลือกเตรียมเป็น Suspension ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 ลงไปร้อยละ 10 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง ในที่มืด เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือด้วยวิธี DNS หาปริมาณเอทานอลด้วย Gas Chromatography (สุวภัทร และคณะ, 2555)

3.5.11 วิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design ; CRD) ซึ่งมีจำนวน 3 ซ้ำ เพื่อวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p < 0.05$) โดยวิธี Duncan'new multiple range test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS Statistics version 17.0 ในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

4.1.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง

จากการนำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 มาลากเชื้อลงบนอาหารแข็ง YPD นำไป บ่มที่อุณหภูมิ 30 37 40 42 และ45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อตรวจสอบการ เจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถเจริญดีถึงดีมาก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5088 และ TISTR 5339 ยังสามารถเจริญได้ดีมาก สายพันธุ์ TISTR 5202 และ TISTR 5596 เจริญได้ดี ส่วนสายพันธุ์ TISTR 5196 เจริญได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น สำหรับที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์เจริญได้เพียงเล็กน้อย และไม่สามารถเจริญได้เลยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงบนอาหารแข็ง YPD

สายพันธุ์ของ	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)				
S. cerevisiae	30	37	40	42	45
YRK 017	+++	+++	+++	+	-
TISTR 5196	+++	++	+	+	-
TISTR 5202	+++	+++	++	+	-
TISTR 5339	+++	+++	+++	+	-
TISTR 5088	+++	+++	+++	+	-
TISTR 5596	+++	+++	++	+	-

หมายเหตุ: เทียบกับขุดควบคุมคือที่อุณหภูมิ 30 องสาเซลเซียสและมีการเจริญเป็น +++ +++

+++ = เจริญดีมาก

++ = เจริญดี

+ = เจริญเล็กน้อย

- = ไม่เจริญ

Sree และคณะ (2000) ศึกษาเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในการทนอุณหภูมิสูงทั้งหมด 4 สายพันธุ์ โดยนำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 4 สายพันธุ์คือ VS1 VS2 VS3 และ VS4 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง YEPD (yeast peptone dextrose) จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว YEPD บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหัวเชื้อจากอาหารเหลวมาลากเชื้อลงบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารแข็ง YEPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 35 40 42 44 46 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดโคโลนีดูการเจริญของเชื้อ ผลการทดลองพบว่า VS1 และ VS3 สามารถเจริญได้ถึงที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว ขณะที่ VS2 และ VS4 สามารถเจริญได้ถึงที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว แต่เจริญได้น้อยมากบนอาหารแข็ง ซึ่ง Sridhar และคณะ (2001) ได้รายงานว่าจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสขึ้น ไป จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ทนอุณหภูมิสูง (osmototerance) จากการทดลองพบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 จัดเป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง

4.1.2 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisioe* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆหลังการบ่ม 48 ชั่วโมง

จากการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ด้วยอาหารหมัก YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 37 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์หามวลชีวภาพ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล จากการทดลองวิเคราะห์หามวลชีวภาพโดยการเก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอนของเซลล์ไปอบแห้ง แล้วนำไปคำนวณหาค่ามวลชีวภาพ พบว่ามวลชีวภาพของเชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการหมักสูงขึ้น และที่อุณหภูมิการหมัก 40 องศาเซลเซียส มวลชีวภาพของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339 มีปริมาณสูงสุดคือ 1.23 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือสายพันธุ์ YRK017 และ TISTR 5088 มีมวลชีวภาพ 1.14 และ 0.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส มวลชีวภาพของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 มีปริมาณสูงสุดคือ 1.06 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือสายพันธุ์ TISTR 5339 และ TISTR 5088 มีมวลชีวภาพ0.97 และ 0.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่รูป 4.2 และรูปที่ 4.1 ซึ่งจากการทดลองพบว่า *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์คือ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 และ 42 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดเป็นสายพันธุ์ของยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง

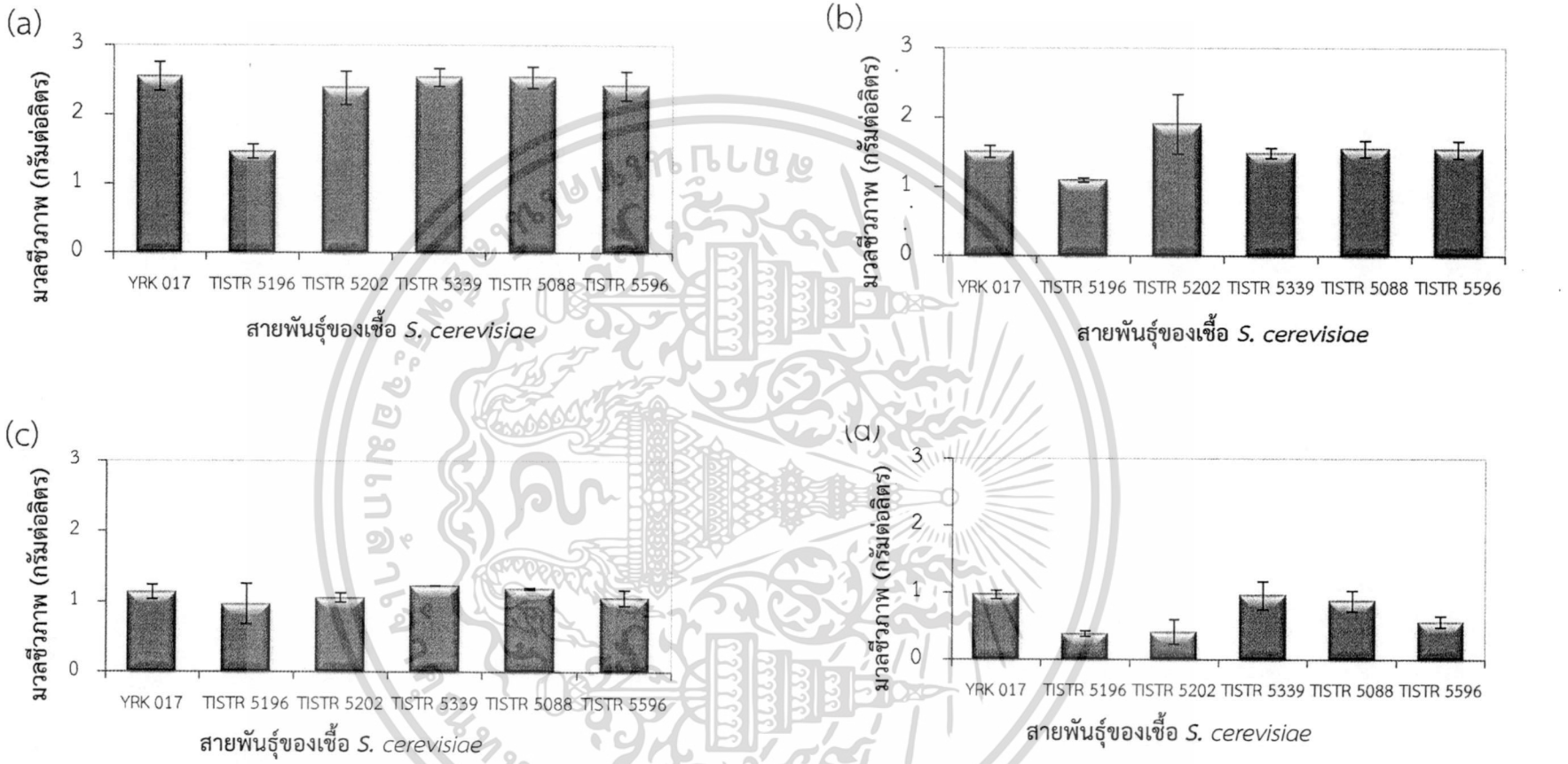
ตารางที่ 4.2 แสดงมวลชีวภาพของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร

สายพันธุ์ของ *S.cerevisiae*	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ			
	30°C	37°C	40°C	42°C
YRK 017	$2.55^{b} \pm 0.41$	$1.51^{ab} \pm 0.17$	$1.14^{a} \pm 0.20$	$1.06^{a} \pm 0.13$
TISTR 5196	$1.47^{c} \pm 0.20$	$1.10^{b} \pm 0.06$	$0.97^{a} \pm 0.57$	$0.42^{c} \pm 0.08$
TISTR 5202	$2.39^{b} \pm 0.48$	$2.92^{a} \pm 0.86$	$1.36^{a} \pm 0.13$	$0.39^{c} \pm 0.36$
TISTR 5339	$2.54^{b} \pm 0.25$	$1.49^{ab} \pm 0.15$	$1.23^{a} \pm 0.00$	$0.97^{ab} \pm 0.42$
TISTR 5088	$3.54^{a} \pm 0.31$	$1.55^{ab} \pm 0.24$	$0.99^{a} \pm 0.02$	$0.87^{b} \pm 0.30$
TISTR 5596	$2.92^{ab} \pm 0.41$	$1.54^{ab} \pm 0.25$	$1.03^{a} \pm 0.22$	$0.57^{c} \pm 0.16$

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบมวลชีวภาพ จากการหมักเอทานอลในอาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C (a) 37°C (b) 40°C (c) และ 42°C (d)

หลังจากการปั่นเหวี่ยง นำตะกอนเซลล์วิเคราะห์หามวลชีวภาพ ส่วนใสที่ได้จากการ ปั่นเหวี่ยงน้ำหมักของอาหาร YFM นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอานอล พบว่าภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหารหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* ทุกสายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ อุณหภูมิ 37 40 และ 42 องศาเซลเซียส โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *S. cerevisiae* TISTR 5596 มี ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมง คือ 3.32 3.82 3.50 และ 3.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5196 และ *S. cerevisiae* TISTR 5202 มีน้ำตาลรีดิวซ์ เหลือค่อนข้างสูงคือ 23.39 และ 12.41 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2 เมื่ออุณหภูมิ การหมักสูงขึ้นเป็น 37 40 และ 42 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเหลือมากขึ้น นั่นคือเชื้อ *S. cerevisiae* สามารถใช้น้ำตาลได้น้อยลงเมื่ออุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น โดยจะพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 101.86 78.14 และ 97.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายหลังการ หมัก 48 ชั่วโมง ขณะที่ *S. cerevisiae* TISTR 5196 *S. cerevisiae* TISTR 5202 และ *S. cerevisiae* TISTR 5596 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 134.86 117.36 และ 111.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเหลือในอาหารหมักค่อนข้างสูง

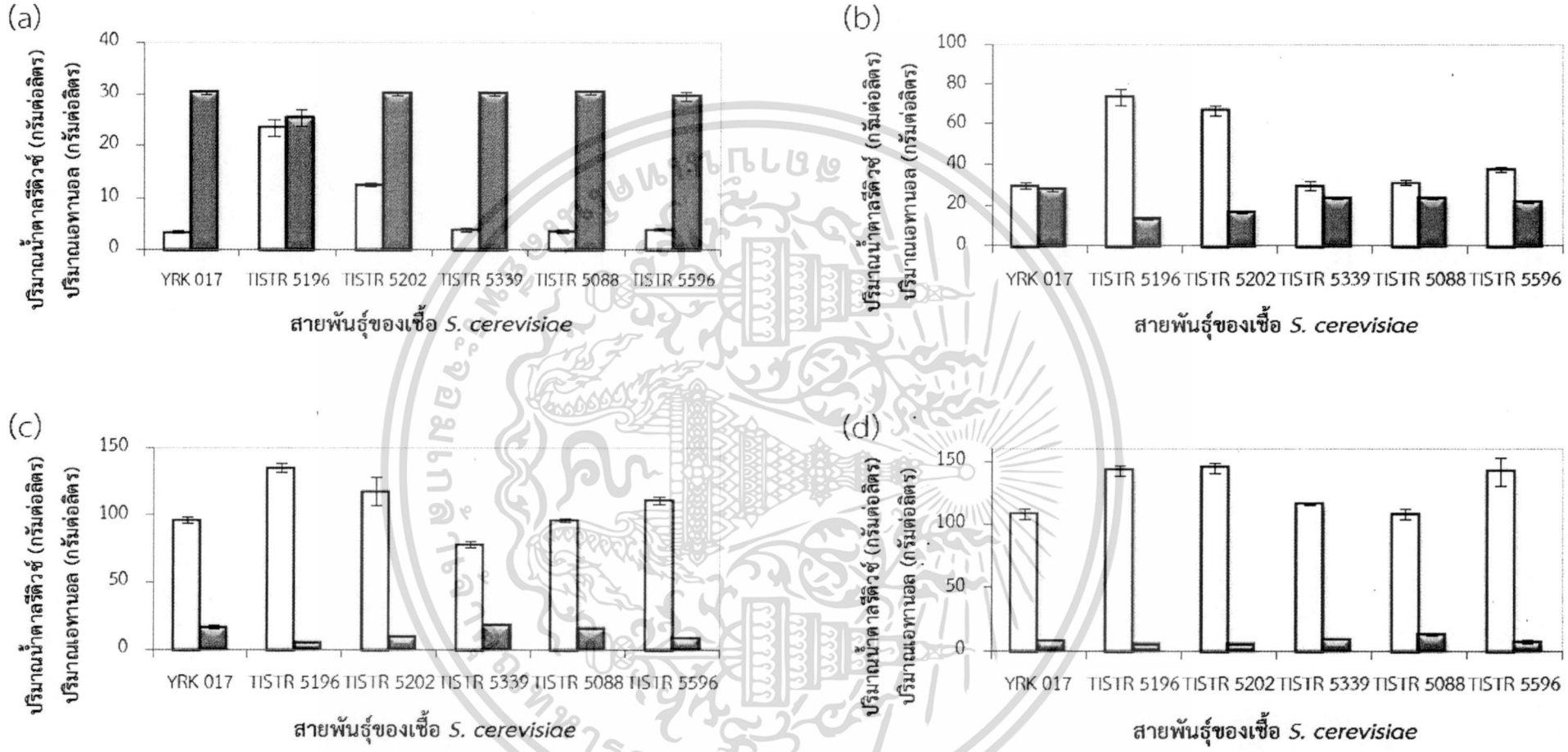
ตารางที่ 4.3 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ

สายพันธุ์ของ *S.cerevisiae*	ปริมาณน้ำตาลริดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ			
	30°C	37°C	40°C	42°C
YRK 017	$3.32^{c} \pm 0.52$	$29.79^{b} \pm 2.65$	$101.86^{bc} \pm 5.32$	$115.29^{a} \pm 8.07$
TISTR 5196	$23.39^{a} \pm 3.17$	$73.67^{a} \pm 8.10$	$134.86^{a} \pm 6.96$	$142.57^{a} \pm 9.04$
TISTR 5202	$12.41^{b} \pm 0.62$	$66.78^{a} \pm 5.28$	$117.36^{ab} \pm 21.39$	$144.79^{a} \pm 7.82$
TISTR 5339	$3.82^{c} \pm 0.72$	$29.69^{b} \pm 4.95$	$78.14^{d} \pm 4.95$	$114.29^{a} \pm 1.31$
TISTR 5088	$3.50^{c} \pm 0.79$	$31.29^{b} \pm 2.12$	$97.71^{c} \pm 3.13$	$116.21^{a} \pm 7.99$
TISTR 5596	$3.84^{c} \pm 0.55$	$37.76^{b} \pm 2.51$	$111.19^{bc} \pm 5.73$	$141.64^{a} \pm 21.77$

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(D) และปริมาณเอทานอล(D) (กรัมต่อลิตร) จากการหมักเอทานอลในอาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็น เวลา 48 ชั่วโมง ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เมื่อบ่มที่ อุณหภูมิ 30 °c *(a)* 37 °c *(b)* 40 °c *(c)* และ 42 °c (d)

สำหรับปริมาณเอทานอล พบว่าภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อ *S. cerevisiae* ทุกสายพันธุ์ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดโดยเฉพาะเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 30.21 และ 30.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่ออุณหภูมิในการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณเอทานอลที่ได้จะลดลงทุกสายพันธุ์ แสดงดังตาราง ที่ 4.4 โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ ลดลง แสดงดังรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าปริมาณเอทานอล หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ

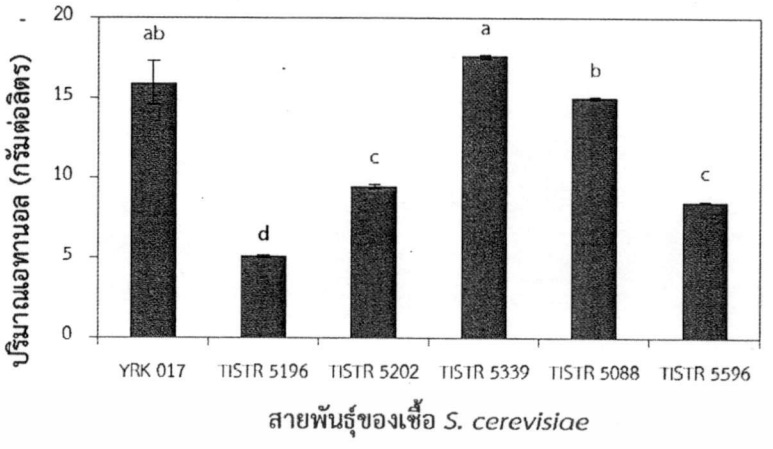
สายพันธุ์ของ	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ			
S. cerevisiae	30 °C	37 °C	40 °C	42 °C
YRK 017	$30.21^{a} \pm 0.47$	$27.78^{a} \pm 1.58$	$15.92^{ab} \pm 2.69$	$8.13^{a} \pm 0.25$
TISTR 5196	$25.30^{b} \pm 3.30$	$13.43^{d} \pm 1.55$	$5.05^{d} \pm 0.12$	$4.91^{b} \pm 0.01$
TISTR 5202	$29.93^{a} \pm 0.44$	$16.86^{c} \pm 1.08$	$9.48^{c} \pm 0.25$	$4.93^{b} \pm 0.01$
TISTR 5339	$29.92^{a} \pm 0.73$	$23.37^{b} \pm 0.61$	$17.60^{a} \pm 0.26$	$8.76^{a} \pm 0.39$
TISTR 5088	$30.19^{a} \pm 0.44$	$23.50^{b} \pm 0.55$	$14.99^{b} \pm 0.22$	$8.59^{a} \pm 0.39$
TISTR 5596	$29.44^{a} \pm 1.82$	$21.84^{b} \pm 1.26$	$8.50^{c} \pm 0.10$	$6.78^{ab} \pm 3.30$

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

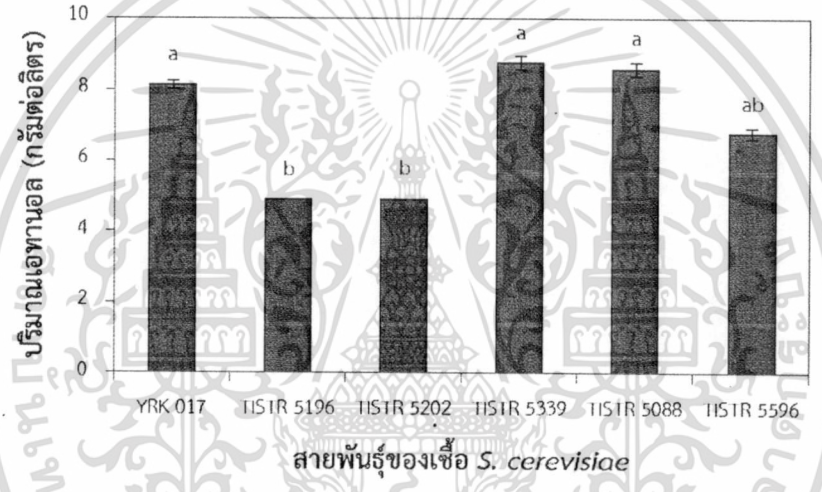
- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อพิจารณาเอทานอลในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด ของเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 40 และ 42 องศาเซลเซียส นำปริมาณเอทานอลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ 17.60 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์ YRK017 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 15.92 กรัมต่อลิตร สำหรับสายพันธุ์ TISTR 5088 ปริมาณเอทานอลที่ได้มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ TISTR 5339 แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ YRK 017 ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้คือ 14.99 กรัมต่อลิตร และสำหรับ TISTR 5202 TISTR 5596 และ TISTR 5196 ให้ปริมาณเอทานอล 9.48 8.50 และ 5.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณเอทานอลจาก 3 สายพันธุ์นี้มีความแตกต่างกันทางสถิติกับสายพันธุ์ TISTR 5339 YRK 017 และ TISTR 5088 เมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 สำหรับที่อุณหภูมิสูง 42 องศาเซลเซียส เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ปริมาณเอทานอลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสายพันธุ์ TISTR 5196 และ TISTR 5202 ดังแสดงในรูปที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 42 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

ดังนั้นจากการศึกษาการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิสูงแสดงให้ เห็นว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่สามารถเจริญและให้ผลผลิตเอทานอล ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูง 40 และ 42 องศาเซลเซียส คือ *S. cerevisiae* TISTR 5339 รองลงมาคือ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ตามลำดับ

Sree และคณะ (2000) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* VS1 VS2 VS3 และ VS4 ที่อุณหภูมิ 30 35 40 42 และ 44 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีปริมาณมวลชีวภาพที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น คือมีมวลชีวภาพ 3.0 2.5 3.2 และ 2.6 กรัมต่อลิตร เท่ากันทั้ง 2 อุณหภูมิ และ มีมวลเซลล์ต่ำสุดที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสของ VS1 VS2 VS3 และ VS4 คือ 0.8 0.4 0.9 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการผลิตเอทานอลก็เป็นไปในทางเดียวกัน คือ ผลิตได้สูงสุดที่ 30 องศาเซลเซียส คือ 66 48 75 และ 52 กรัมต่อลิตร และ ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสผลิตได้เพียง 40 20 58 และ 23 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการศึกษาจำนวนมากโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* ให้สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง ตัวอย่างเช่น D'Amore และคณะ(1989) ใช้สายพันธุ์ ทนร้อนของเชื้อที่สามารถหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 6.2 จาก กลูโคส ร้อยละ 15 แต่อย่างไรก็ตามหลังจาก 24 ชั่วโมงการมีชีวิตของสายพันธุ์นี้ลดลงอย่างเห็นได้ชัดถึงร้อยละ 57

4.2 ผลการศึกษาการทนทานต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 6 สายพันธุ์

จากการศึกษาการทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ โดยการเตรียมอาหารเหลว YPD ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอทานอลให้มีความเข้มข้นต่างๆดังนี้ร้อยละ 0 5 10 15 18 และ 20 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในอาหารเหลว YPD จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรโดยปริมาตร) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจนับเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต โดยนำมาทำการเจือจาง (serial dilution) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-8} นำมาทำการ pour plate ลงบนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับโคโลนีและคำนวณในรูป CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ลดลงเมื่อร้อยละความเข้มข้น เอทานอลเพิ่มมากขึ้น โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5196 สามารถทนเอทานอลได้เพียงร้อยละ 10 สำหรับ *S. cerevisiae* TISTR 5202 ทนต่อความเข้มข้นเอทานอลได้ถึงร้อยละ 18 และเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 สามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 15 จนถึงร้อยละ 20 แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ที่รอดชีวิตบนอาหารแข็ง YPD ที่เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต(CFU/ml) ที่เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ					
	0%	5%	10%	15%	18%	20%
YRK 017	2.40×10^{7}	1.97×10^{7}	2.35×10^{6}	3.83×10^{5}	6.40×10^{4}	7.20×10^{3}
TISTR 5196	4.90×10^{6}	4.70×10^{6}	7.13×10^{5}	-	-	-
TISTR 5202	1.09×10^{7}	5.13×10^{6}	2.08×10^{6}	1.68×10^{5}	4.20×10^{2}	-
TISTR 5339	2.69×10^{7}	2.09×10^{7}	6.90×10^{6}	1.69×10^{5}	1.26×10^{4}	3.05×10^{2}
TISTR 5088	2.49×10^{7}	2.26×10^{7}	4.13×10^{6}	4.60×10^{5}	1.73×10^{5}	3.06×10^{3}
TISTR 5596	1.95×10^{7}	1.75×10^{7}	1.07×10^{7}	1.92×10^{5}	3.90×10^{4}	5.15×10^{2}

จากการศึกษาการทนต่ออุณหภูมิสูง และทนเอทานอลความเข้มข้นสูงของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆพบว่า *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่ออุณหภูมิในการหมักได้สูง คือสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า และ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์นี้ยังสามารถทนต่อเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kumar และคณะ (2011) ศึกษาความทนต่อเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยนำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงบนอาหารเอียง YPG บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์ จากอาหารเอียงมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPG ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกันดังนี้ร้อยละ 0 2.5 5 7.5 10 12.5 และ 15 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่มทำการเจือจางเชื้อ และเลี้ยงในอาหารแข็ง YPG บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คำนวณโคโลนีเป็น CFU/ml จากการทดลองจำนวนเชื้อยีสต์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น ซึ่งเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถทนความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ถึงร้อยละ 15 สอดคล้องกับการทดลองที่ได้ซึ่งจากการทดลองที่ไม่เติมเอทานอลปริมาณจุลินทรีย์ทรีย์ที่รอดชีวิตมี 4.5 X 10^8 CFU/ml และที่ความเข้มข้นเอทานอล ร้อยละ 15 ปริมาณจุลินทรีย์ทรีย์ที่รอดชีวิตมี 6.0 X 10^6 CFU/ml

Khaing และคณะ (2008) รายงานว่า เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ KY1 และ KY3 ทนความ เข้มข้นเอทานอลได้ถึงร้อยละ 15 และเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ KY2 ทนความเข้มข้นเอทานอลได้ ถึงร้อยละ 20

4.3 ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 โดยใช้รังสียูวีและการใช้สารเคมี

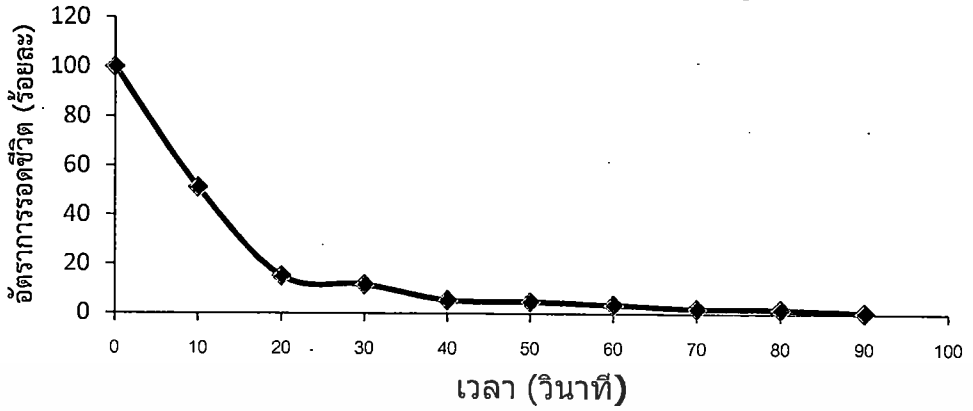
4.3.1 ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S.cerevisiae* YRK 017 โดยใช้รังสียูวี

จากผลการทดลองการนำเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 มาทำการ Spread ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร YPD agar ทำการฉายรังสียูวีเป็นเวลา 0 10 20 30 40 50 60 70 80 และ 90 วินาที ในตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) โดยหลอดยูวีมีค่าความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 30 วัตต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาคำนวณหาอัตราการรอดชีวิต (ร้อยละ) พบว่าอัตราการรอดชีวิตของเชื้อลดลงเมื่อเวลาในการฉายรังสียูวีมากขึ้น โดยที่เวลา 40 วินาที มีอัตราการรอดชีวิตที่ร้อยละ 5.35 ซึ่งใกล้เคียงกับร้อยละของอัตราการรอดชีวิตที่ต้องการ คือ ประมาณร้อยละ 5 (Mehdikhani และคณะ, 2011) แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.6 อัตราการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์กลายที่ได้จากการฉายรังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 30 วัตต์ ที่เวลาต่างๆ

เวลา (วินาที)	จำนวนโคโลนีของเชื้อต่อมิลลิลิตร	อัตราการรอดชีวิต (ร้อยละ)
0	8.6×10^6	100
10	4.4×10^6	51.16
20	1.3×10^6	15.11
30	1.0×10^6	11.63
40	4.6×10^5	5.35
50	4.1×10^5	4.77
60	3.0×10^5	3.48
70	1.7×10^5	1.98
80	1.5×10^5	1.74
90	4.5×10^4	0.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 อัตราการรอดชีวิตของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 ภายหลังจากการฉายรังสียูวี ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 30 วัตต์ ที่ระยะเวลาต่างๆ

ดังนั้น การกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีต่อเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 เวลาที่เหมาะสมในการกลายพันธุ์และทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตประมาณร้อยละ 5 อยู่ที่ 40 วินาที

Mehdikhani และคณะ (2011) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PTCC^{5269}, TTCC^{1323} และสายพันธุ์ที่แยกได้จากการหมักไวน์ในประเทศอาร์เมเนีย โดยใช้รังสีแกมมาในปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อปริมาณของรังสีแกมมาเพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้เชื้อลดจำนวนลง โดยที่ปริมาณรังสีแกมมา 10 KGy ไม่พบการเจริญใดๆของเชื้อ ซึ่งอัตราการรอดชีวิตที่ต้องการคือ ต่ำกว่าร้อยละ 10 สายพันธุ์ PTCC^{5296} และ Areni ที่ไม่ได้รับการฉายรังสีสามารถผลิตเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ได้เพียงร้อยละ 11.54 โดยปริมาตร และ 10.55 โดยปริมาตร ซึ่งการใช้รังสีแกมมาทำให้พบสายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ คือ PTCC^{5296} M_3 และ Areni M_7 ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้ที่อุณหภูมิสูงมากกว่าสายพันธุ์ควบคุม โดยผลิตเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ได้ร้อยละ 23.50 โดยปริมาตร และ 22.60 โดยปริมาตร ตามลำดับ

สุพจน์ และคณะ (2554) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* สายพันธุ์ DS50 ด้วยรังสียูวีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดกลูตามีค พบว่าอัตราการรอดชีวิตลดน้อยลงเมื่อเวลาผ่านไป ในสภาวะที่อัตราการรอดเท่ากับร้อยละ 0.01 จำนวน 100 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 20 จากจำนวนทั้งหมด 500 โคโลนี) พบว่ามีการสร้างกรดกลูตามีคที่ไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากสภาวะที่ให้อัตราการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 16 จำนวน 180 ไอโซเลท (คิดเป็นร้อยละ 36 จากจำนวนทั้งหมด 500 โคโลนี) พบสายพันธุ์กลายจำนวน 5 ไอโซเลท ที่สร้างกรดกลูตามีคได้สูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ดังนั้นสภาวะการเหนี่ยวนำที่ให้อัตราการรอดชีวิตต่ำๆ อาจไม่เหมาะสมต่อการปรับปรุงสายพันธุ์ของ DS50

Abosereh และคณะ (2006) ได้ศึกษาเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *S. boulardii* โดยใช้รังสีแกมมาเพื่อใช้เป็นยีสต์โพรไบโอติก จากนั้นนำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง YEPG (Yeast Extract Peptone Glucose agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ปริมาณรังสีแกมมาที่ใช้ คือ 1 2 3 4 และ 5 KGy พบว่าอัตราการรอดชีวิตลดลงเมื่อใช้ปริมาณรังสีแกมมาเพิ่มขึ้น โดยที่อัตราการรอดชีวิตเมื่อใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รังสีแกมมาที่ 5 KGy อยู่ที่ร้อยละ 2.67 ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของรังสี จำนวนสูงสุดของสายพันธุ์กลายซึ่งถูกชักนำโดยรังสีแกมมาที่ความเข้มข้น 4 KGy ทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงที่สุด (ร้อยละ 14.29)

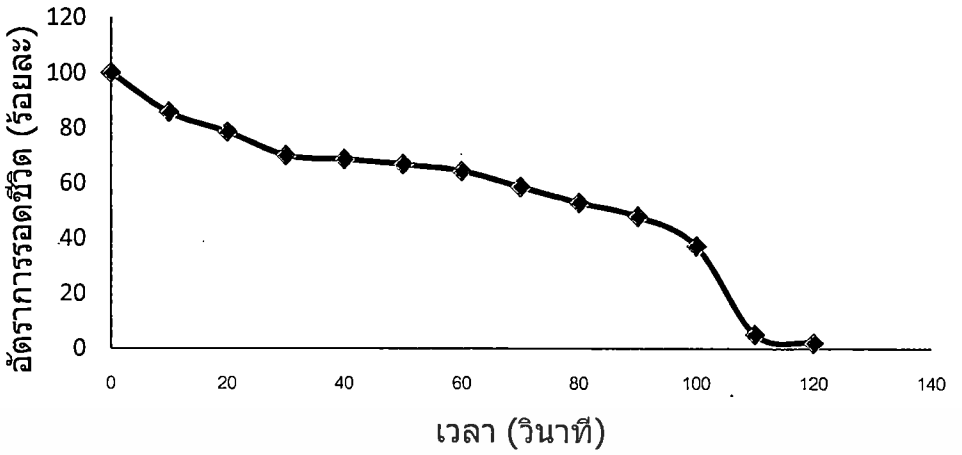
4.3.2 ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* YRK 017 โดยใช้ EMS

จากการนำเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยเติมสาร EMS ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตรของสารละลายทั้งหมด บ่มในอาหารเหลว YPD ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 นาที บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ในที่มืด โดยเก็บเซลล์แขวนลอยของยีสต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทุกๆ 10 นาที แล้วนำมาเติม Sodium thiosulphate ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยมวลต่อปริมาตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ EMS นำมาเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}–10^{-5} แล้ว Spread ลงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร YPD agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในที่มืด ดังแสดงในตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.7 อัตราการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์กลายที่ได้จากการเติม EMS ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร ที่เวลาต่างๆ

เวลา (นาที)	จำนวนโคโลนีของเชื้อต่อมิลลิลิตร	อัตราการรอดชีวิต (ร้อยละ)
0	1.4×10^7	100.00
10	1.2×10^7	85.71
20	1.1×10^7	78.57
30	9.8×10^6	70.00
40	9.6×10^6	68.57
50	9.4×10^6	66.78
60	9.0×10^6	64.29
70	8.2×10^6	58.57
80	7.4×10^6	52.86
90	6.7×10^6	47.86
100	5.2×10^6	37.14
110	7.2×10^5	5.14
120	2.9×10^5	2.07

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 อัตราการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* ภายหลังการเติม EMS ที่ระยะเวลาต่างๆ

จากรูปที่ 4.6 พบว่าอัตราการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* YRK 017 จะลดลงเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการใช้สารเคมีมากขึ้นและพบว่าที่เวลา 110 นาที เชื้อยีสต์มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 5.14 ซึ่งใกล้เคียงกับอัตราการรอดชีวิตที่ต้องการคือ ประมาณร้อยละ 5 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของมีนตรา และคณะ (2554) ที่ได้ทำการศึกษาเรื่องอัตราการอยู่รอดของยีสต์สายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) โดยยีสต์มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 3.75×10^{-6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติม EMS ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ในอาหาร YM broth เก็บเซลล์แขวนลอยของยีสต์ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่เวลา 80 100 และ 120 นาที เจือจางที่ 10^{-3} – 10^{-6} แล้วนำมา Spread บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 120 นาที สายพันธุ์กลายมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับร้อยละ 5.14

ดังนั้นการกลายพันธุ์เชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 โดยใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตเป็นเวลา 110 นาที และทำให้เชื้อมีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 5.14

หทัยรัตน์ และคณะ (2553) ศึกษาการนำสารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตไปใช้เพื่อเหนี่ยวนำยีสต์ *S. cerevisiae* ให้เกิดการกลายพันธุ์ และมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารเหลว YEPG ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที จนกระทั่งมีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^{-8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เก็บเกี่ยวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงและล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ละลายตะกอนเซลล์ที่ได้ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH 7.0 จากนั้นเติมสารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนตความเข้มข้นร้อย 3 โดยปริมาตร ลงไปและบ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที เขย่าที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที จากนั้น Spread บนอาหารแข็ง ALP ที่เติมเอทานอลลงไปในอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ความเข้มข้นตามที่ต้องการ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ *S. cerevisiae* ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่ายีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิม (Wild type) ประมาณร้อยละ 17.3 หรือประมาณ 13.74 กรัมต่อลิตร โดยการคัดเลือกใช้อาหารที่มีเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 12 เป็นองค์ประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

4.4.1 ผลการศึกษาการเจริญของสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยรังสียูวี และ EMS บนจานอาหาร YPD agar ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

หลังจากสุ่มตัวอย่างสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยรังสียูวีที่มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 5.35 มา 50 ไอโซเลต และ EMS ที่มีอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 5.14 มา 50 ไอโซเลต มาทำให้บริสุทธิ์แล้วนำมา Streak บนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 40 42 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในที่มืด ทดสอบความสามารถในการเจริญ พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ทุกๆไอโซเลตที่แยกได้จากการกลายพันธุ์โดยใช้รังสียูวี และEMS รวมทั้งสายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถเจริญได้ดี เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นการเจริญจะลดลง ตามลำดับ โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยรังสียูวีสามารถเจริญได้ทั้งหมด 50 ไอโซเลต แต่สายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดย EMS สามารถเจริญได้เพียง 23 ไอโซเลตเท่านั้น ส่วนสายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถเจริญได้น้อย ซึ่งแสดงดังตารางที่ 4.8 และ 4.9 ตามลำดับ

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสียูวี สายพันธุ์กลายของ *S. cerevisiae* YRK 017 มีความสามารถในการเจริญลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ให้ผลการทดลองทำนองเดียวกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อทุกไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญใกล้เคียงกับการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (+++) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญปานกลาง (++) และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญน้อย (+) ขณะที่การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดย EMS สายพันธุ์กลายของ *S. cerevisiae* YRK 017 มีความสามารถในการเจริญลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเช่นเดียวกัน โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บางไอโซเลทเริ่มมีการเจริญปานกลาง (++) เมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญปานกลาง (++) และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บางไอโซเลทไม่มีการเจริญ (-) ซึ่งการทดลองจะเห็นได้ว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสาร EMS ทำให้ *S. cerevisiae* YRK 017 มีการเจริญลดลงซึ่งเห็นได้ชัดกว่าการชักนำโดยรังสียูวี

ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	30	40	42	45
YRK 017	+++	+++	+	+
421	+++	+++	+	+
422	+++	+++	++	+
423	+++	+++	++	+
424	+++	+++	++	+
425	+++	+++	++	+
426	+++	+++	++	+
427	+++	+++	++	+
428	+++	+++	++	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	30	40	42	45
429	+++	++	+	+
4210	+++	+++	++	+
4211	+++	+++	++	+
4212	+++	+++	++	+
4213	+++	+++	++	+
4214	+++	+++	++	+
4215	+++	+++	++	+
4216	+++	+++	++	+
4217	+++	+++	++	+
4218	+++	+++	++	+
4219	+++	+++	++	+
4220	+++	+++	++	+
4221	+++	+++	++	+
4222	+++	+++	++	+
4223	+++	+++	++	+
4224	+++	+++	++	+
4225	+++	+++	++	+
431	+++	+++	++	+
432	+++	+++	++	+
433	+++	+++	++	+
434	+++	+++	++	+
435	+++	+++	++	+
436	+++	+++	++	+
437	+++	+++	++	+
438	+++	+++	++	+
439	+++	+++	++	+
4310	+++	+++	++	+
4311	+++	+++	++	+
4312	+++	+++	++	+
4313	+++	+++	++	+
4314	+++	+++	++	+
4315	+++	+++	++	+
4316	+++	+++	++	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	30	40	42	45
4317	+++	+++	++	+
4318	+++	+++	++	+
4319	+++	+++	++	+
4320	+++	+++	++	+
441	+++	+++	++	+
442	+++	+++	++	+
443	+++	+++	++	+
444	+++	+++	++	+
445	+++	+++	++	+

หมายเหตุ : ทดสอบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็น *S. cerevisiae* YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) ที่อุณหภูมิต่างๆ +++ = เจริญมาก , ++ = เจริญปานกลาง , + = เจริญน้อย , - = ไม่มีการเจริญ

ตารางที่ 4.9 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วย EMS บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	30	40	42	45
YRK 017	+++	+++	+	+
11031	+++	++	++	+
11032	+++	+++	++	–
11033	+++	++	+	–
11034	+++	+++	+	–
11035	+++	+++	++	+
11036	+++	++	++	–
11037	+++	++	++	–
11038	+++	++	++	–
11039	+++	+++	++	+
110310	+++	+++	++	+
110311	+++	++	++	–
110312	+++	++	+	–
110313	+++	+++	++	–
110314	+++	++	++	+
110315	+++	+++	++	–
110316	+++	+++	++	+
110317	+++	++	++	–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.9 (ต่อ) ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วย EMS บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)			
	30	40	42	45
110318	+++	+++	++	+
110319	+++	+++	++	+
110320	+++	+++	++	–
110321	+++	+++	++	–
110322	+++	+++	++	–
110323	+++	+++	++	–
110324	+++	+++	++	–
110325	+++	+++	+	+
110326	+++	+++	+	+
110327	+++	++	++	+
110328	+++	+++	++	+
110329	+++	+++	++	+
110330	+++	+++	++	+
110331	+++	+++	++	–
110332	+++	+++	–	–
110333	+++	+++	++	–
110334	+++	+++	+	–
110335	+++	+++	++	–
110336	+++	+++	++	–
110337	+++	+++	++	–
110338	+++	+++	++	–
110339	+++	+++	++	–
110340	+++	+++	++	–
11041	+++	+++	+	+
11042	+++	+++	+	–
11043	+++	+++	+	+
11044	+++	+++	+	+
11045	+++	+++	++	+
11046	+++	+++	++	+
11047	+++	+++	+	+
11048	+++	+++	+	+
11049	+++	++	++	+
110410	+++	+++	+	+

หมายเหตุ : ทดสอบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเป็น *S. cerevisiae* YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) ที่อุณหภูมิต่างๆ

+++ = เจริญมาก , ++ = เจริญปานกลาง , + = เจริญน้อย , - = ไม่มีการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Choowong และคณะ (2012) ศึกษาลักษณะและการแสดงออกของยีนของ *S. cerevisiae* ทนร้อนที่แยกได้จากผลไม้ไทย ได้แก่ กล้วย มะพร้าว น้อยหน่า องุ่น พุทรา ขนุน ลางสาด ลำไย ลองกอง มะม่วง เมลอน สับปะรด เงาะ ละมุด และแตงโมที่ได้จาก 14 จังหวัดของไทย มาทำการหาเชื้อ *S. cerevisiae* ซึ่งสายพันธุ์ที่แยกได้จะถูกนำมาวิเคราะห์ทางด้านชีวเคมีและวิเคราะห์ดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคพีซีอาร์เพื่อยืนยันว่าเป็นเชื้อ *S. cerevisiae* จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทำการทดสอบการทนอุณหภูมิโดยนำเชื้อมาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว YPD จนเชื้อเข้าสู่ระยะ Stationary ได้เป็นหัวเชื้อ นำหัวเชื้อที่ได้ไปเลี้ยงต่อในอาหารเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 42 องศาเซลเซียส สังเกตความขุ่นที่เกิดขึ้นพร้อมทั้งให้เกณฑ์ความขุ่นที่เกิดขึ้นหลังจากผ่านไป 24 ชั่วโมง จากนั้นในขั้นที่ 2 ซึ่งเป็นการคัดเลือกเบื้องต้น สายพันธุ์ *S. cerevisiae* แสดงให้เห็นว่าสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง โดยเลี้ยงเชื้อจนเข้าสู่ระยะ Exponential ในอาหารเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ได้เป็นหัวเชื้อ นำหัวเชื้อที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 แล้วไปเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ในสภาวะเขย่าที่อุณหภูมิ 30 37 และ 41 องศาเซลเซียส ทำการวัดค่า OD ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ขึ้นไป นำมาทำ Serial dilution เพื่อดูอัตราการเจริญเติบโต จากการทดลองพบว่าหลังจากการทดสอบการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 30 37 และ 41 องศาเซลเซียส มีเพียง 3 สายพันธุ์เท่านั้น คือ C3723 C3751 และ C3867 ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส

Sridhar และคณะ (2002) ศึกษาผลของรังสียูวีต่อสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* และการทนต่ออุณหภูมิสูง ทนเอทานอลและทนต่อแรงดันออสโมซิส จากการศึกษาพบว่าการใช้รังสียูวีในการกลายพันธุ์ *S. cerevisiae* ทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายผลิตมวลเซลล์จุลินทรีย์และเอทานอลสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่อุณหภูมิสูงและความเข้มข้นกลูโคสสูง โดยมวลเซลล์จุลินทรีย์ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์กลาย VS_1 และ VS_3 คือ 0.25 และ 0.20 กรัมต่อลิตร มีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงสายพันธุ์กลาย VS_1 และ VS_3 สามารถผลิตมวลเซลล์จุลินทรีย์ได้ 0.1 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากสายพันธุ์กลาย VS_1และ VS_3 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร คือ 8.20 และ 1.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นสามารถผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์กลาย VS_1และ VS_3 เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคสสูง หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณเอทานอล 5.0 และ 6.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเอทานอล 13.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้รังสียูวีสามารถนำมาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง ทนเอทานอล และทนแรงดันออสโมซิสหรือความเข้มข้นน้ำตาลสูง

4.4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการหมักในอาหารหมัก Yeast fermentation medium (YFM) ของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือก

จากการนำสายพันธุ์กลายที่ได้จากการชักนำโดยรังสียูวีและ EMS ที่ผ่านการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิสูง คัดเลือกเฉพาะไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มาทำการหมักในอาหาร YFM ที่มีปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง ในที่มืด ทำการทดลองสายพันธุ์ละ 3 ซ้ำ ตรวจดูปริมาณฟองก๊าซคาร์บอนได้ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในหลอดดักก๊าซ (Durham tube) ดังแสดงในตารางที่ 4.10 และ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ประสิทธิภาพการสร้างก๊าซของสายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* YRK 017 โดยรังสียูวีในอาหาร YFM ที่มีหลอดดักก๊าซ หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณก๊าซ (หลอด)	สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณก๊าซ (หลอด)	สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณก๊าซ (หลอด)
YRK 017	++	4217	+	439	+++
421	+++	4218	+++	4310	+++
422	+++	4219	+++	4311	+++
423	+++	4220	+++	4312	+++
424	+++	4221	+++	4313	+++
425	+++	4222	+++	4314	+++
426	+++	4223	++	4315	+++
427	++	4224	+++	4316	+++
428	+++	4225	+++	4317	+++
429	+	431	++	4318	+++
4210	+++	432	+++	4319	+++
4211	+++	433	++	4320	+++
4212	+++	434	+++	441	+++
4213	+++	435	+++	442	+
4214	+++	436	+++	443	+++
4215	+++	437	++	444	+++
4216	+++	438	+++	445	+

หมายเหตุ : ทดสอบเทียบกับชุดควบคุม (*S. cerevisiae* YRK 017) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
+++ = สร้างก๊าซสามหลอด, ++ = สร้างก๊าซสองหลอด, + = สร้างก๊าซหนึ่งหลอด,
– = ไม่สร้างก๊าซ

ตารางที่ 4.11 ประสิทธิภาพการสร้างก๊าซของสายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae* YRK 017 โดยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตในอาหาร YFM ที่มีหลอดดักก๊าซ หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณก๊าซ (หลอด)	สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณก๊าซ (หลอด)	สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณก๊าซ (หลอด)
YRK 017	++	110325	+++	11044	+
11031	+++	110326	+++	11045	+++
11035	+++	110327	+++	11046	+++
11039	+++	110328	++	11047	+
110310	++	110329	+++	11048	+++
110314	+++	110330	+++	11049	+++
110316	+++	11041	++	110410	+
110318	+++	11043	+++		

หมายเหตุ : ทดสอบเทียบกับชุดควบคุม (*S. cerevisiae* YRK 017) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส
+++ = สร้างก๊าซสามหลอด, ++ = สร้างก๊าซสองหลอด, + = สร้างก๊าซหนึ่งหลอด,
– = ไม่สร้างก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แล้วนำมาทดสอบการหมักเอทานอลด้วยอาหารหมัก Yeast fermentation medium (YFM) ที่มีหลอดดักก๊าซ เพื่อตรวจดูฟองก๊าซที่เกิดจากกระบวนการหมักเอทานอลในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์หลักคือ เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง ในที่มืด เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม พบว่าไอโซเลตที่ได้จากการชักนำโดยรังสียูวีมีการหมักและสร้างก๊าซใกล้เคียง (++) หรือมากกว่า (+++) สายพันธุ์ดั้งเดิม 46 ไอโซเลต สำหรับสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดย EMS มีการหมักและสร้างก๊าซใกล้เคียง (++) หรือมากกว่า (+++) สายพันธุ์ดั้งเดิม 19 ไอโซเลตซึ่งคัดเลือกจากหลอดที่เกิดก๊าซอย่างน้อยร้อยละ 10 ของหลอดดักก๊าซถือว่าให้ผลบวก (สุรีย์, 2553)

คมสัน (2534) ได้ศึกษาผลการตรวจสอบปริมาณก๊าซในหลอดดักก๊าซพบว่า ยีสต์ที่ผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จะสร้างก๊าซเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนเต็มหลอดในวันที่ 11 และ 18 แต่ปริมาณก๊าซที่ได้ไม่สัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ตรวจวัดได้ อย่างไรก็ตามปริมาณก๊าซในหลอดดักก๊าซยังสามารถใช้เป็นดัชนีในการแยกเชื้อที่ผลิตเอทานอลสูงออกจากเชื้อที่ผลิตเอทานอลต่ำได้ โดยคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ให้ปริมาณฟองก๊าซมาก เพราะจะให้เอทานอลมากตามไปด้วย แต่วิธีนี้ก็ยังมีข้อจำกัด คือ หากในกรณีที่มีฟองก๊าซมากจะไม่สามารถแยกความแตกต่างได้อย่างชัดเจน

4.4.3 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากการหมักเอทานอลด้วยอาหารหมัก Yeast fermentation medium (YFM) ที่มีหลอดดักก๊าซ บ่มอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง ในที่มืด

หลังจากทดสอบการทดสอบการหมักเอทานอลด้วยอาหารหมัก (YFM) โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร ที่มีหลอดดักก๊าซ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่ง ในที่มืด จากนั้นเลือกตัวอย่างที่ให้ปริมาณฟองก๊าซมากกว่า (+++) หรือเท่ากับสายพันธุ์ควบคุม (++) ซึ่งก็คือ *S. cerevisiae* YRK 017 มาทำการหมักด้วยอาหาร YFM ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ไม่มีหลอดดักก๊าซ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง ในที่มืด ทำการเก็บส่วนใสหลอดละ 5 มิลลิลิตร มารวมกันเพื่อนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้นำไปวิเคราะห์หาค่าปริมาณเอทานอลโดยการใช้เครื่อง Gas Chromatography และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการหมักโดยใช้วิธี DNS พบว่าสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยรังสียูวีสายพันธุ์ 421 ผลิตเอทานอลสูงสุด 12.70 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 113.52 กรัมต่อลิตร สำหรับสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต สายพันธุ์ 11035 มีปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.67 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 117.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตเอทานอลสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยสายพันธุ์ดั้งเดิมสามารถผลิตเอทานอลได้เพียง 10.38 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 130.56 กรัมต่อลิตร ดังตารางที่ 4.12 และ 4.13 ในรูปที่ 4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

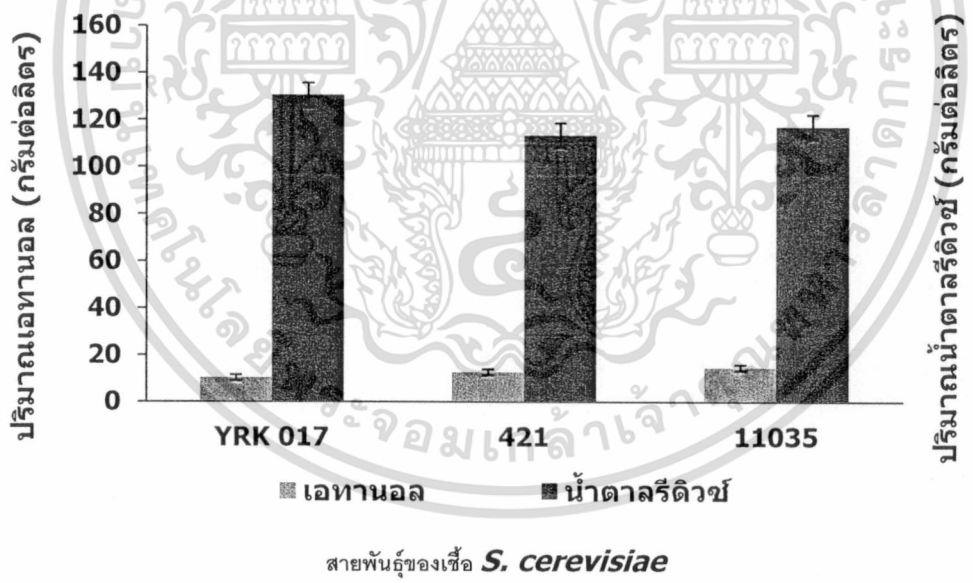
ตารางที่ 4.12 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ *S. cerevisiae* YRK 017 สายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยรังสียูวี เมื่อหมักในอาหาร YFM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะนิ่ง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
YRK 017	10.38	130.56	4225	9.83	102.00
421	12.70	113.52	431	8.88	139.80
422	10.47	117.12	432	9.67	106.56
423	10.78	75.40	433	8.93	145.80
424	11.44	113.28	434	9.19	120.00
425	11.17	118.08	435	8.63	136.80
426	11.97	99.12	436	9.55	90.00
427	9.95	106.80	437	9.45	105.60
428	7.89	134.70	438	9.03	110.40
4210	10.03	104.88	439	8.71	134.70
4211	11.30	110.64	4310	8.65	136.50
4212	7.89	125.10	4311	9.76	114.96
4213	11.11	105.12	4312	10.09	105.60
4214	10.02	119.28	4313	8.40	127.80
4215	10.18	117.84	4314	9.68	115.68
4216	9.73	108.48	4315	9.64	119.28
4217	10.88	126.40	4316	12.09	88.08
4218	10.57	79.92	4317	10.09	108.96
4219	9.63	97.68	4318	9.67	130.56
4220	9.77	96.48	4319	9.26	131.52
4221	9.36	98.64	4320	8.10	127.80
4222	10.93	136.80	441	8.85	116.10
4223	9.57	99.36	443	9.59	102.72
4224	7.89	123.60	444	10.06	105.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ *S. cerevisiae* YRK 017 สายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต เมื่อหมักในอาหาร YFM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
YRK 017	10.38	130.56	110327	12.72	93.12
11031	12.45	105.12	110328	9.24	106.56
11035	14.67	117.20	110329	12.33	99.12
11039	9.91	113.04	110330	12.12	106.32
110310	9.04	106.55	11041	9.66	106.56
110314	11.94	73.20	11043	9.92	103.20
110316	12.28	102.72	11045	11.39	88.56
110318	10.23	125.04	11046	13.27	93.60
110325	12.27	113.76	11048	9.23	112.80
110326	10.33	118.32	11049	10.00	125.00



รูปที่ 4.7 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ *S. cerevisiae* ระหว่างสายพันธุ์ดั้งเดิม YRK 017 สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 เมื่อหมักในอาหาร YFM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Takashi และคณะ (2010) ได้ทำการศึกษาเรื่องการชักนำ *Pichia stipitis* NBRC 1687 ให้เกิดการกลายพันธุ์โดยรังสียูวี เพื่อให้ผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น และนำมาคัดเลือกตามธรรมชาติเพื่อให้ทนต่อปริมาณเอทานอลได้เพิ่มขึ้น จากการศึกษาพบว่าเมื่อทดสอบการหมักลิกโนเซลลูโลส สายพันธุ์กลาย PXF58 สามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นร้อยละ 4.3 จากน้ำตาลไซโลสร้อยละ 11.4 เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ผลิตได้ร้อยละ 3.1 เท่านั้น นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรักโตสได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม

Teerapatr และคณะ (2007) ศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอลโดยใช้เทคนิคการสุ่มการกลายพันธุ์ โดยนำ *S. cerevisiae* TISTR 5596 และ TISTR 5606 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสียูวี และ EMS นำมาทดสอบความสามารถในการทนต่อกลูโคสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 15 20 25 และ 30 โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส จากการทดสอบพบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยรังสียูวี คือ สายพันธุ์ MT44 สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าสายพันธุ์ TISTR 5596 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยได้ผลผลิตสูงสุดถึงร้อยละ 7.75 เมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยมวลต่อปริมาตร สำหรับสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต มีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่เมื่อทำการทดสอบการทนต่ออุณหภูมิสูงพบว่าสายพันธุ์กลายทั้งสองวิธีไม่มีค่าที่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม

Rajni และ Krishna (2012) ได้ทำการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ของยีสต์ที่เป็นลูกผสมให้มีความทนต่อสภาวะเครียด ทั้งการทนต่อเอทานอล การทนต่ออุณหภูมิสูง และการทนต่อสารยับยั้งในการหมักเอทานอล โดยใช้เชื้อยีสต์จำนวน 2 สายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* NCIM-3090 และ *P. tannophilus* NCIM-3502 มาเลี้ยงรวมกันและทำการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้ EMS MNNG และการฉายรังสียูวีทั้งในระยะใกล้และไกลได้สายพันธุ์กลาย RPRT90 ที่แสดงให้เห็นว่ามีการทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงถึงร้อยละ 10 สายพันธุ์กลายนี้ยังแสดงให้เห็นว่าสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง 39-40 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาหมักในอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลส ในสภาวะที่อุณหภูมิสูงและมีการเติมสารยับยั้งเข้าไป พบว่าสายพันธุ์นี้ได้ผลิตเอทานอลได้สูงสุดถึง 7.93 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคสที่ผสมไซโลส ใช้น้ำตาลไป 162.42 กรัมต่อลิตร จากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร ทำการวัดน้ำตาลที่ได้ในระหว่างการหมักโดยใช้วิธี DNS

4.5 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากผงแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

การศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยวิธีการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก (SSF) จากเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์กลาย 421 และ 11035 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม คือ *S. cerevisiae* YRK 017 จากการทดลองนำสารละลายผงมันเทศ มาย่อยด้วยสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.05 น้ำหนักโดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที รอให้อุณหภูมิลงจนถึงประมาณ 40 องศาเซลเซียส เติมสารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.015 น้ำหนักโดยปริมาตร ลงไปพร้อมหัวเชื้อยีสต์ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 แล้วนำมาหมักที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง ในที่มืด โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงและเก็บส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้และหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสายพันธุ์กลาย เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม

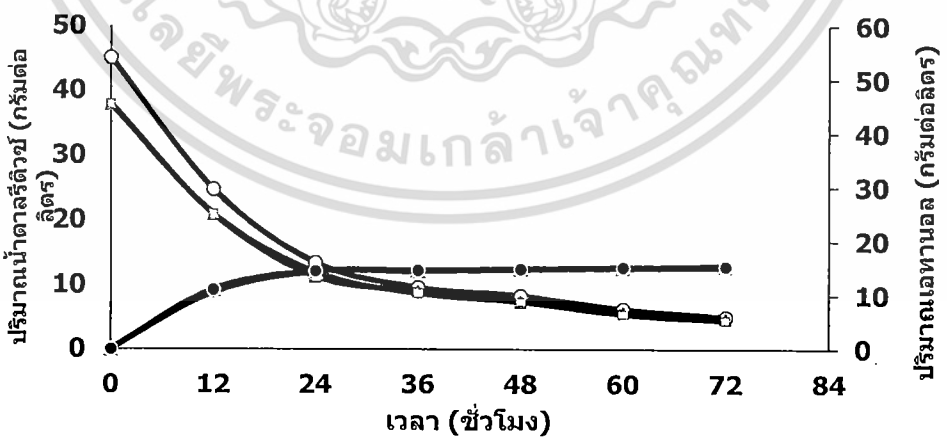
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae* YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 สามารถเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ได้ 15.46 15.15 และ15.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สายพันธุ์ดั้งเดิม สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการหมัก 72 ชั่วโมง 4.99 5.71 และ 5.39 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าทั้งสามสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจะเห็นได้ว่าสายพันธุ์กลายผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม แสดงดังตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.8 และ 4.9

ตารางที่ 4.14 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

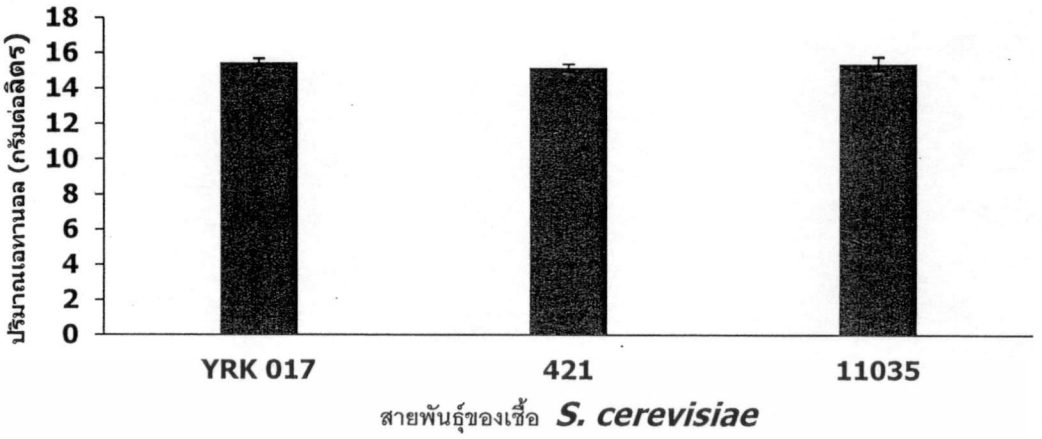
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	YRK 017	421	11035	YRK 017	421	11035
0	0.00 ^{a} ± 0.00	0.00 ^{a} ± 0.00	0.00 ^{a} ± 0.00	45.80 ^{a} ± 0.36	45.37 ^{a} ± 0.55	45.47 ^{a} ± 0.80
12	11.12 ^{a} ± 0.09	10.52 ^{a} ± 0.64	11.06 ^{a} ± 0.35	24.74 ^{a} ± 0.59	25.04 ^{a} ± 0.21	25.14 ^{a} ± 1.17
24	14.37 ^{a} ± 0.04	14.39 ^{a} ± 0.13	14.53 ^{a} ± 0.05	13.42 ^{a} ± 0.42	13.49 ^{a} ± 0.11	14.31 ^{b} ± 0.43
36	14.62 ^{a} ± 0.08	14.52 ^{a} ± 0.80	14.66 ^{a} ± 1.24	9.58 ^{c} ± 0.05	10.84 ^{a} ± 0.06	10.40 ^{b} ± 0.27
48	14.91 ^{a} ± 0.11	14.82 ^{a} ± 0.06	14.87 ^{a} ± 0.11	8.29 ^{b} ± 0.09	8.83 ^{a} ± 0.02	8.81 ^{a} ± 0.15
60	15.14 ^{a} ± 0.07	15.09 ^{a} ± 0.04	15.19 ^{a} ± 0.12	6.23 ^{b} ± 0.25	6.83 ^{a} ± 0.10	6.51 ^{b} ± 0.05
72	15.46 ^{a} ± 0.21	15.15 ^{a} ± 0.20	15.37 ^{a} ± 0.37	4.99 ^{b} ± 0.16	5.71 ^{a} ± 0.11	5.39 ^{a} ± 0.23

หมายเหตุ เมื่อพิจารณาในแถวแนวนอนของแต่ละปัจจัย
- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.8 การหมักเอทานอลโดยใช้สารละลายผงมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) โดย *S. cerevisiae* YRK 017 (○ ,●) 421(△ ,▲) และ 11035 (□ ,■) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้สัญลักษณ์สีขาวแทนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสัญลักษณ์สีดำแทนปริมาณเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศ โดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การหมักเอทานอลจากผงมันเทศ ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 หมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า สายพันธุ์ดั้งเดิม YRK 017 สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 สามารถผลิตเอทานอล ได้ 15.39 15.35 และ 15.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของสายพันธุ์ดั้งเดิม YRK 017 สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการหมักในชั่วโมงที่ 72 เป็น 4.73 5.63 และ 4.85 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณเอทานอลของทั้งสามสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.15 และรูปที่ 4.10 และ 4.11

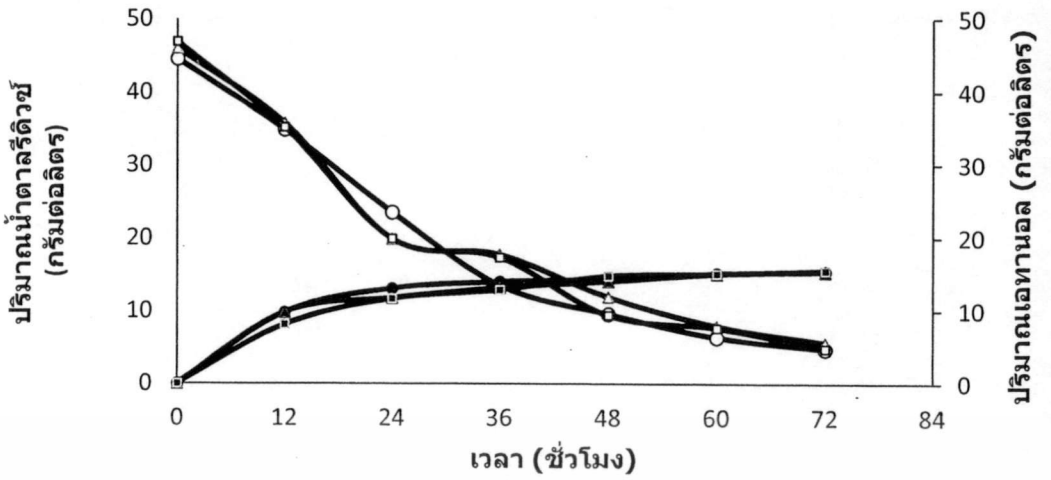
ตารางที่ 4.15 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศ โดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	YRK 017	421	11035	YRK 017	421	11035
0	0.00 ^{a} ± 0.00	0.00 ^{a} ± 0.00	0.00 ^{a} ± 0.00	44.57 ^{a} ± 2.00	46.06 ^{a} ± 1.65	46.91 ^{a} ± 2.25
12	9.75 ^{a} ± 0.07	9.78 ^{a} ± 0.10	8.11 ^{a} ± 2.84	34.86 ^{a} ± 1.05	35.74 ^{a} ± 0.24	35.19 ^{a} ± 0.30
24	13.05 ^{a} ± 0.18	11.76 ^{a} ± 0.06	11.69 ^{a} ± 1.92	23.48 ^{a} ± 0.29	19.86 ^{a} ± 0.30	19.89 ^{a} ± 6.94
36	13.97 ^{a} ± 0.87	13.17 ^{a} ± 0.17	12.89 ^{a} ± 1.18	13.46 ^{a} ± 0.27	17.69 ^{a} ± 0.38	17.30 ^{a} ± 5.56
48	14.37 ^{a} ± 0.04	14.34 ^{a} ± 0.04	14.40 ^{a} ±0.03	9.54 ^{b} ± 0.11	11.89 ^{a} ± 0.02	9.39 ^{c} ± 0.06
60	15.13 ^{a} ± 0.12	15.05 ^{a} ± 0.02	15.30 ^{a} ±0.44	6.33 ^{a} ± 0.60	7.90 ^{a} ± 0.03	7.64 ^{a} ± 1.51
72	15.39 ^{a} ± 0.09	15.35 ^{a} ± 0.55	15.55 ^{a} ± 0.08	4.73 ^{b} ± 0.10	5.63 ^{a} ± 0.17	4.85 ^{b} ± 0.09

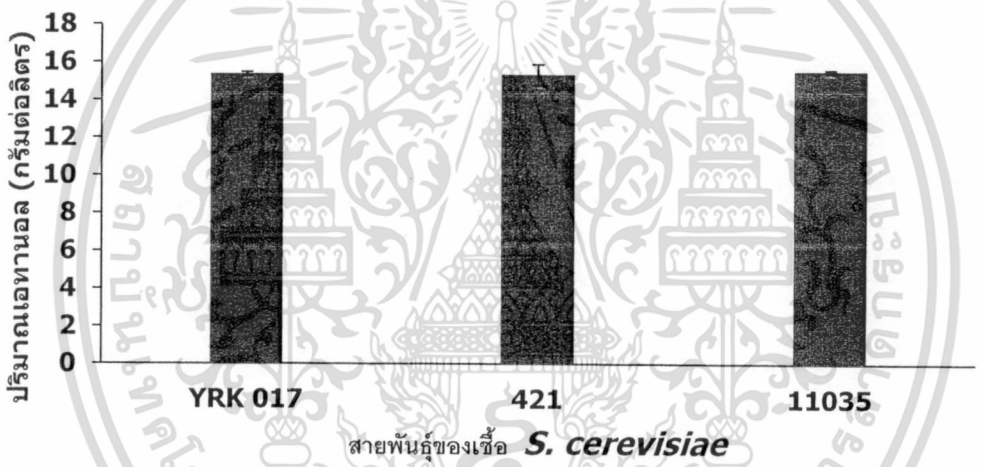
หมายเหตุ เมื่อพิจารณาในแถวแนวนอนของแต่ละปัจจัย

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การหมักเอทานอลโดยใช้สารละลายผงมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) โดย *S. cerevisiae* YRK 017 (○ ,●) 421 (△ ,▲) และ 11035 (□ ,■) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยให้สัญลักษณ์สีขาวแทนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และสัญลักษณ์สีดำแทนปริมาณเอทานอล



รูปที่ 4.11 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศ โดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ของเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 พบว่าการหมักเอทานอลของสายพันธุ์กลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สายพันธุ์กลาย 421 และ 11035 ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่สายพันธุ์ *S. cerevisiae* YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) ให้ปริมาณเอทานอลต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เกวลิน และคณะ (2554) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก โดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *S. cerevisiae* YRK 017 ทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าการใช้สารละลายมันเทศที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เรื่อยๆตลอดระยะเวลาของการหมัก ส่วนปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 16.73 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดเป็น 0.28 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด จากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณเอทานอลจะค่อนข้างคงที่หรือลดลงเล็กน้อย และที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง จะให้ปริมาณเอทานอล 16.22 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลทั้งหมดเป็น 0.41 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลทั้งหมด

คมสัน (2534) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัตราไวโอเลตในยีสต์ *Pa. tannophilus* NRRL Y-2460 พบว่ารังสีอัตราไวโอเลตมีผลต่ออัตราการใช้เอทานอลในยีสต์ กล่าวคือ จากที่ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมที่เคยใช้เอทานอลได้กลายเป็นใช้ไม่ได้ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้ยังคงมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม บนอาหาร NO_3-Xylitol agar ซึ่งอาจเกิดจากจำนวนเชื้อสายพันธุ์กลายที่นำมาทดสอบมีน้อย ดังนั้นโอกาสที่จะพบลักษณะการกลายพันธุ์ที่เจริญได้เร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงน้อย และเมื่อนำเชื้อกลายพันธุ์ T-L-25 มาหมักในอาหาร X-YMP broth ที่อุณหภูมิ ต่างๆพบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเป็น 6.8 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 25 28 32 35 และ 37 องศาเซลเซียส ผลิตเอทานอลได้ 6.25 6.43 5.88 5.40 และ 5.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

Teerapatr และคณะ (2007) ได้ทำการศึกษาการปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการหมักเอทานอลโดยใช้เทคนิคการสุ่มการกลายพันธุ์ โดยนำ *S. cerevisiae* TISTR 5596 และ TISTR 5606 มาชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสียูวี และ EMS ทดสอบความสามารถในการทนต่อกลูโคสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 15 20 25 และ 30 โดยมวลต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 30 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส จากการทดสอบพบว่าสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยรังสียูวี คือ สายพันธุ์ MT44 สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าสายพันธุ์ TISTR 5596 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยได้ผลผลิตสูงสุดถึงร้อยละ 7.75 เมื่อใช้กลูโคสที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 โดยมวลต่อปริมาตร ส่วนสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดย EMS มีอัตราการเจริญที่ต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม แต่เมื่อทำการทดสอบการทนต่ออุณหภูมิสูงพบว่าสายพันธุ์กลายทั้งสองวิธีมีค่าไม่แตกต่างจากสายพันธุ์ดั้งเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง เมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้อาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร พบว่าภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อ *S. cerevisiae* ทุกสายพันธุ์ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เมื่ออุณหภูมิในการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณที่เอทานอลที่ได้จะลดลงทุกสายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 17.60 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ *S. cerevisiae* YRK 017 และ TISTR 5088 ตามลำดับ เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 8.76 กรัมต่อลิตร จากนั้นได้ทำการศึกษาการทนต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อที่ความเข้มข้นเอทานอลต่างๆ พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 สามารถทนเอทานอลได้ถึงร้อยละ 20 ปริมาตรโดยปริมาตร

จากการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 โดยวิธีใช้รังสียูวีและวิธีใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS) เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่สามารถทนอุณหภูมิสูงและสามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม จากการศึกษาการหาระยะเวลาในการฉายรังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 30 วัตต์ เพื่อชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 พบว่าที่ระยะเวลา 40 วินาที มีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 5.35 (ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 5) และจากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดย EMS ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร พบว่าที่เวลา 110 นาที เชื้อสายพันธุ์กลายมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ร้อยละ 5.14 (ซึ่งอยู่ในช่วงประมาณร้อยละ 5) จึงเลือกช่วงระยะเวลาดังกล่าวมาใช้ในการศึกษา

จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ได้จากรังสียูวี 50 ไอโซเลท และ EMS 50 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง พบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยการฉายรังสียูวีสามารถทนอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้ทุกไอโซเลท ส่วนสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดย EMS สามารถเจริญได้เพียง 23 ไอโซเลตเท่านั้น และสายพันธุ์ดั้งเดิม YRK 017 สามารถเจริญได้น้อยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อนำไปทำการทดสอบหมักเอทานอลเพื่อทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์กลายที่ให้ผลผลิตเอทานอลที่มากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่อุณหภูมิสูง ซึ่งทำการหมักในอาหาร YFM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยในอาหารหมักมีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร พบว่าสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยรังสียูวี สายพันธุ์ 421 และสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดย EMS สายพันธุ์ 11035 ให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 12.70 และ 14.67 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 113.52 และ 117.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสายพันธุ์ดั้งเดิม YRK 017 สามารถผลิตเอทานอลได้เพียง 10.38 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 130.56 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการนำสายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 มาทำการหมักเอทานอลจากผงมันเทศแบบการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม *S. cerevisiae* YRK 017 โดยหมักเป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae* สายพันธุ์ดั้งเดิม YRK 017 สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 ให้ปริมาณเอทานอลเป็น 15.46 15.15 และ 15.37 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เป็น 4.99 5.71 และ 5.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีการผลิตเอทานอลเป็น 15.39 15.35 และ 15.55 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 4.73 5.63 และ 4.85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อนำปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae* สายพันธุ์ดั้งเดิม YRK 017 สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่อเปรียบเทียบการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 หมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่สายพันธุ์ดั้งเดิม คือ *S. cerevisiae* YRK 017 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะน้อยกว่าการหมักที่ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2549. การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เกวลิน ศรีบรรพต ชัชฎา วุฒิโชคดำรงค์ และสาโรจน์ สระกลาง. 2554. การผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

คมสัน พิระภัทรสุริยา. 2534. การคัดเลือกและกลายพันธุ์ยีสต์เพื่อการผลิตเอธานอลจากน้ำตาลไซโลส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประสิทธิ์ ใจศิล. 2549. รายงานความก้าวหน้าเรื่องการผลิตข้าวฟ่างหวานเพื่ออุตสาหกรรมผลิตเอทานอลในเชิงพาณิชย์. ศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

ปุณวิทย์ วัฒนวิทย์. 2540. ผลของสารเคมีเอทิลมีเทนซัลโฟเนทต่อการเกิดแคลลัสและต้นจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดและอับละอองเรณูของข้าวขาวดอกมะลิ 105. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พรเทพ ถนนแก้ว. 2555. การประยุกต์ใช้ยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* DBKKUY-53 ในการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลจากข้าวฟ่างหวาน. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยขอนแก่น

พนิดา สุริยะพันธ์. 2554. การคัดแยกยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มีนตรา พรหมเล็ก วรุชดา มะลิซ้อน และ สุชามา อิสมาแอล. 2554. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อยีสต์ที่ผ่านการชักนำโดยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate) เพื่อเพิ่มการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน. หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิมลักษณ์ รัตนปรีดากุล. 2549. การศึกษาเชื้อราและเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าเปรียบเทียบกับยีสต์บริสุทธิ์ในการผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วชิราภรณ์ ผิวล่อง. 2552. การเพิ่มความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Xanthophyllomyces dendrorhous* โดยนิวตรอนร่วมกับอัลตราไวโอเลต.การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิวเคลียร์ ครั้งที่ 11. กลุ่มวิจัยและพัฒนานิวเคลียร์ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศกุนตลา ภู่เจริญ. 2551. ประสิทธิภาพพลังงานในการผลิตเอทานอลโดยใช้มันสำปะหลังและกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการจัดการพลังงาน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2536. การกลายพันธุ์ของพืช. หจก.ฟันนี่พับลิชชิ่ง, กรุงเทพมหานคร. 190 น.

สุพจน์ น้อยสกุล. 2554. การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* สายพันธุ์ DS50 ด้วยแสงยูวีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดกลูตามีค. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุภารัตน์ เรืองมณีไพฑูรย์ สมจิตร นิยมไทย มัณฑนา ร่วมรักษ์ และสมยศ จรรยาวิลาส. 2526. การใช้มันเทศทำผลิตภัณอาหารสำเร็จรูปและกึ่งสำเร็จรูป. สถาบันค้นคว้าและวิจัยผลิตภัณฑ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุรีย์ นานาสมบัติ. 2553. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สุวภัทร เจียมทวีทรัพย์ สุกพัฒน์ ผลิตภัณฑ์ และโสมวิสา ทองปลอด. 2555. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิและเอทานอลสูง เพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ. หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หทัยรัตน์ ธาตุไชย พรเทพ ถนนแก้ว และสุดารัตน์ ถนนแก้ว. 2553. การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลด้วยสารเอทธิลมีเทนซัลโฟเนต. วารสารศูนย์บริการวิชาการมหาวิทยาลัยขอนแก่น. ปีที่ 18, ฉบับที่ 1, หน้า 37-41

Abosereh, N.A., Soliman, E.A.M., and Abd El-Khalek, B.A. 2006. Mutation Induction for genetic improvement of *Saccharomyces boulardii* which used as probiotic yeast. Res. J. Agr.Biol. Sci., Vol. 2 No. 6, pp. 478-482.

Borstel, R.C. 1990. Mutagenesis principles and strategies applied to yeast. pp. 353 – 365. In. Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (eds). Yeast Technology. Spinger-verlag, Berlin.

Brock, T.D. 1984. Biotechnology. A Textbook of Industial Microbiology. Science Tech, Madison.

Brown, S.W. and Oliver, S.G .1981. The effect of temperature on the ethanol tolerance of the yeast *Saccharomyces uvarum.* Biological Laboratory, University of Kent at Canterbury, Kent CT2 7Nj, U.K.

Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A. and Alfani, F. 2004. Effect of Inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. Biotechnol. Prog. 20, pp. 200–206.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Choowong, A., Suthee, B., Preeyaporn, K., Minetaka, S., Pornpon, S., Yoshinobu, K., Thipa, A., Satoshi, H. and Chuenchit, B. 2012. Characterization and gene expression proflies of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* isolates from Thai fruits. JBB. Vol. 114 No. 2, pp.144-149

Dehkordi, M.M., Nahvi, I., Esfahani, H.Z., Ghaedi, K., Tavassoli, M. and Akada, R. 2008. Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate – induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. JBB. Vol. 105 No. 4, pp. 403-408

Jacobson, G.K. 1981. Mutation. pp. 279-304. In Rehm, H.J. and Reed, G. (eds). Biotechnology. A comprehensive Treatis in 8 Volumes. Vol. 1 Microbial Fundamental. Verlag Chemie Weinheim.

Jakel, M. 2005. Gas chromatography determination of ethanol in wine by head-space gas chromatography. Department of Agro-Industry. Faculty of Food and Agricultural Technology. Pibulsongkram Rajabhat University.

Jose, L.A. and Arnold, L.D. 2005. Genetic improvement of processes yielding microbial products. Wliey online Library, FEMS Microbiology Reviews .Vol. 30, No. 2

Kiran, S.N., Sridha, M., Suresh, K., Banat, I.M., Venkateswar, R.L. 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating, *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Bioresource Technology 72, pp. 43–46.

Leontina, P. 2008. Characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* stains obtained by UV mutagenesis. Innovative Romanian Food Biotechnology Vol.2 , pp. 40-47

Mehdikhani, P., Bari, M.R. and Hovsepyan, H. 2011. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* for high tolerance of ethanol concentration and temperature. AJMR, Vol. 5 No. 18, pp. 2654-2660

Miller, GL. 1960. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, pp. 426–428

Panchal, C.J. and Tavares, F.C.A. 1990. Yeast strain selection for fuel ethanol production. In Panchal, C.J. (ed.), Yeast strain selection, pp. 225-243. New York Marcel Dekker Inc.

Petrea, L. 2008. Characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by UV mutagenesis. Innovative Romanian Food Biotechnology, Vol. 2, pp. 40-47.

Rajni, K., Krishna, P. 2012. Improvement of multiple stress tolerance in yeast stain by sequential mutagenesis for enchanced bioethanol production. JBB, Vol. 114 No. 6, pp. 622-629.

Soderstrom, J., Galbe, M., Zacch, I.G., 2005. Separate versus simultaneous saccharification and fermentation of two-step steam pretreated softwood for ethanol production. J. Wood Chem. Technol. Vol. 25 No. 3, pp. 187–202.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sridhar, M., Kiran, S., Venkateswar. and Rao, N.L. 2001. Effect of UV radiation on thermotolerance ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. Bioresource Technology. 83, pp. 199 - 202.

Naghmeh, H., David, A.L., and Ahmed, F. 2012. A mutated yeast strain with enhanced ethanol production efficiency and stress tolerance. Ajb., Vol. 2 No. 2, pp.100–115.

Takashi, W., Itsuki, W., Mami, Y., Akira, A. and Toshihide, N. 2010. A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO).

Teerapatr, S., Podjana, C., Suthkamol, S., Wandeem, Y., Ladda, W., Bancha, M. and Montree, W. 2007. Strain improvement of ethanol fermenting yeast using random mutagenesis technique. Biotechnology Department, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR).

Thapat, S., Shabbir, H. and Gheewala. 2009. Environmental sustainability assessment of bio-ethanol production in Thailand. Energy 34, pp.1933–1946.

Tork, S., Hegazy, W.K., El-kawokgy, T.M.A. and El Gebaly, O.G.A. 2009. Induction of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strain(s) using different mutation methods. AJB., Vol.1 No. 1, pp. 29-36.

Watson, K. 1982. Unsaturated fatty acid not ergosterol is essential for high ethanol production in *Saccharomyces*. Biotechnology Letter 4, pp. 397-402.

Winston, F. 2008. EMS and UV mutagenesis in yeast. Current Protocols in Molecular Biology, pp. 13.3 B.1-13.3 B.5.

Swanson, K.M.J., Busta, F.F., Peterson, E.H., Johnson, M.G. 1992. Colony count methods. In : Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C., pp. 75-95.

[Online]. Available : http://nstda.or.th/rural/public/100%20articles-stkc/57.pdf (สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)

[Online]. Available : http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book /book.php?book =5& chap=5&page=t5-5-infodetail01.html (สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)

[Online]. Available : http://th.wikipedia.org/wiki/มันเทศ (สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online]. Available : http://th.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces _cerevisiae (สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)

[Online]. Available : http://wiki.yeastgenome.org/index.php/File:Yeast_life_cycle.png (สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)

[Online]. Available : http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/introducingmicrobes/fungi (สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)

[Online]. Available : http://water-pacific.com/index.php/2010-08-14-10-07-37 (สืบค้นวันที่ 12 กันยายน 2556)

[Online]. Available : http://www.thaiethanol.com (สืบค้นวันที่ 12 กันยายน 2556)

[Online]. Available : http://www.thaiethanol.com/th/2013 -04-06-13-53-49/production-process-ethanol.html (สืบค้นวันที่ 12 กันยายน 2556)

[Online]. Available : http://www.thai-explore.net/documents/vdo_1337_512.docx (สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2556)

[Online]. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Eutrombicula_batatas (สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2556)

[Online]. Available : http://www.healthyenrich.com/ลดความอ้วนด้วยมันเทศ (สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2556)

[Online]. Available : http://www.agriculturesource.com/p-yam-sweet-potato-887988.html (สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2556)

[Online]. Available : http://www.cdiplab.com/DNA-analysist/DNA-information .html (สืบค้นวันที่ 21 กันยายน 2556)

[Online]. Available : http://ozone.tmd.go.th/uvbasic.htm (สืบค้นวันที่ 21 กันยายน 2556

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้