

การคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสจาก

แหล่งธรรมชาติภายในประเทศไทย

ISOLATION OF CELLULASE OR LIPASE PRODUCING  
YEAST FROM NATURAL RESOURCE IN THAILAND



โครงการพิเศษเล่มนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ISOLATION OF CELLULASE OR LIPASE PRODUCING  
YEAST FROM NATURAL RESOURCE IN THAILAND



A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF  
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE  
(INDUSTRIAL MICROBIOLOGY)

DEPARTMENT OF BIOLOGY, FACULTY OF SCIENCE  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

ACADEMIC YEAR 2017

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ การคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสจากแหล่งธรรมชาติภายในประเทศไทย  
Isolation of cellulose or lipase producing yeast from natural resource in Thailand

ชื่อนักศึกษา นางสาววริศรา ฮาบเจริญ รหัสนักศึกษา 56051063  
นางสาวกรรณก จุฑาพงศ์ รหัสนักศึกษา 57050790  
นางสาวกรรณิการ์ ชัตตร รหัสนักศึกษา 57050791

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2560

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงการพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม) ประจำปีการศึกษา 2560.

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ดวงกมล เรือนงาม ประธานกรรมการ	ดวงกมล เรือนงาม
อ.ธนาวัต ก่ออานันต์ กรรมการ	ธนาวัต ก่ออานันต์
ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	สมพิศ สอนโยธา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์  
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามเผยแพร่ต่อสาธารณะและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการพิเศษ	การคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสจากแหล่งธรรมชาติภายในประเทศไทย		
ชื่อนักศึกษา	นางสาววิศรดา	ชวบเจริญ	รหัสนักศึกษา 56051063
	นางสาวกรรณก	จุฑาพงศ์	รหัสนักศึกษา 57050790
	นางสาววรรณิการ์	ชัตดร	รหัสนักศึกษา 57050791
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2560		
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา		

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ภายในประเทศไทย พบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ได้จำนวน 145 ไอโซเลท จากตัวอย่างธรรมชาติจำนวน 57 ตัวอย่าง และสามารถจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้จำนวน 26 กลุ่ม จากนั้นนำยีสต์ทั้งหมดที่คัดแยกได้มาทำการทดสอบคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสบนอาหารแข็ง พบว่ามียีสต์เพียง 34 ไอโซเลทที่สามารถสร้างบริเวณใสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี carboxymethylcellulose (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอน และมียีสต์ถึง 144 ไอโซเลทที่สามารถสร้างบริเวณใสเมื่อเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี tributyrin เป็นแหล่งไขมัน นอกจากนี้ยังได้ตรวจสอบกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว พบว่ายีสต์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase สูงที่สุด 3 อันดับแรกคือไอโซเลท PW1 ไอโซเลท M1 และ ไอโซเลท KK1 โดยมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ  $3.872 \pm 0.05$ ,  $3.295 \pm 0.11$  และ  $2.208 \pm 0.20$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ ในขณะที่ยีสต์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ extracellular lipase สูงที่สุด 3 อันดับแรก คือ ไอโซเลทไอโซเลท BN1 ไอโซเลท WH7 และ ไอโซเลท S1 ซึ่งมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ  $481.480 \pm 52.38$ ,  $314.140 \pm 0.00$  และ  $295.400 \pm 37.98$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

**คำสำคัญ :** การคัดแยกยีสต์, เอนไซม์เซลลูเลส, เอนไซม์ไลเปส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<b>Title</b>	Isolation of Cellulase or Lipase Producing Yeast from Natural Resource in Thailand		
<b>Students</b>	Miss Warissara	huabcharoen	Student ID 56051063
	Miss Kornkanok	Juthapong	Student ID 57050790
	Miss Kannika	Chaddon	Student ID 57050791
<b>Degree</b>	Bachelor of Science (Industrial Microbiology)		
<b>Department</b>	Biology		
<b>Faculty</b>	Science		
<b>University</b>	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)		
<b>Academic Year</b>	2017		
<b>Advisor</b>	Asst.Prof.Dr.Somphit Sornyotha		

### Abstract

The objective of this study was to isolate and select yeasts with potential to product cellulase or lipase from different natural samples in Thailand. A total of 145 yeasts belonging to 26 groups by morphological study, isolated from 57 natural samples, were screened for their cellulase or lipase producing ability. For cellulase producing ability, the results found that only 34 isolated yeasts were able to produce clear zone on medium containing carboxymethylcellulose (CMC) as the carbon source. The specific activity of CMCase was also studied. The results showed that the first three isolates, designated as PW1, M1 and KK1, were able to exhibit the highest specific CMCase activity. The specific activity of CMCase from the isolate PW1, M1 and KK1 were  $3.872 \pm 0.05$ ,  $3.295 \pm 0.11$  and  $2.208 \pm 0.20$  U/mg of protein, respectively. For lipase producing ability, the results found that 144 isolated yeasts were able to produce clear zone on medium containing tributyrin as a lipid source. The specific activity of extracellular lipase was also investigated. The results showed that the first three isolates, designated as BN1 SW1 and BS1, were able to exhibit the highest specific enzyme activity. The specific activity of extracellular lipase from the isolate BN1 WH7 and S1 were  $481.480 \pm 52.38$ ,  $314.140 \pm 0.00$  and  $295.400 \pm 37.98$  U/mg of protein, respectively.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Keywords :** Yeast isolation, Cellulase, Lipase

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการพิเศษฉบับนี้จะสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีไม่ได้หากไม่ได้รับการช่วยเหลือจาก ผศ.ดร.สมพิศ สอนโยธา ซึ่งเป็นทั้งอาจารย์ที่ปรึกษาและกรรมการให้แก่ผู้ทำการวิจัย อาจารย์ได้แนะนำ ชี้แนวทางและเคร่งครัดต่อผู้ทำการวิจัยให้มีความกระตือรือร้นและรับผิดชอบต่อหน้าที่มาโดยตลอดซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการศึกษางานวิจัยนี้เป็นอย่างมาก นอกจากนี้ยังตรวจทานโครงการพิเศษฉบับนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ดวงกมล เรืองงาม ที่กรุณาได้รับเป็นประธานกรรมการ และอาจารย์ธนาวัต ก่ออานันต์ ที่กรุณาได้รับเป็นกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ ในการตรวจสอบ ให้คำแนะนำ และปรับปรุงให้โครงการพิเศษฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

และขอขอบพระคุณการสนับสนุนและความช่วยเหลือจากหลายฝ่าย ที่ได้กรุณาชี้แนะ ให้กำลังใจ และให้คำแนะนำ ตลอดจนช่วยอำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือและอุปกรณ์ในการดำเนินการทดลอง ผู้ทำการวิจัยขอขอบพระคุณทุกท่าน

วาริสรา ฮวบเจริญ  
กรกนก จุฑาพงศ์  
กรรณิการ์ ชัดตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	ข
กิตติกรรมประกาศ .....	ค
สารบัญ .....	ง
สารบัญตาราง .....	ช
สารบัญรูป .....	ซ
<b>บทที่ 1 บทนำ</b> .....	<b>1</b>
1.1 ที่มาและความสำคัญ .....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย .....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	4
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b> .....	<b>5</b>
2.1 ยีสต์ .....	5
2.1.1 การจัดจำแนกยีสต์ .....	6
2.1.2 แหล่งที่อยู่อาศัยของยีสต์ .....	15
2.1.2.1 ชั้นบรรยากาศ .....	15
2.1.2.2 แหล่งน้ำ .....	15
2.1.2.3 ภาวพื้นดิน .....	15
2.1.3 การสืบพันธุ์ .....	16
2.1.3.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแบบแตกหน่อ .....	16
2.1.3.2 การสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ .....	17
2.1.3.3 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ Ascomycetous .....	18
2.1.3.4 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ Basidiomycetous .....	19
2.2 เชลลูโลส .....	20
2.2.1 การย่อยสลายเชลลูโลส .....	22
2.2.1.1 การย่อยสลายเชลลูโลสด้วยวิธีทางกายภาพ .....	22
2.2.1.2 การย่อยสลายเชลลูโลสด้วยวิธีทางเคมี .....	22
2.2.1.3 การย่อยสลายเชลลูโลสโดยใช้เอนไซม์ .....	23
2.3 เอนไซม์เชลลูเลส .....	24
2.2.2 ชนิดของเชลลูเลส .....	30
2.2.2.1 เอ็นโดกลูโคเนส .....	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.2.2 เซลโลไบโอไฮโดรเลส .....	30
2.2.2.3 เบต้ากลูโคซิเดส .....	30
2.4 ลิพิดและไขมัน .....	31
2.4.1 จำแนกประเภทของลิพิด .....	31
2.4.2 กรดไขมัน (fatty acids) .....	32
2.4.3 คุณสมบัติของกรดไขมัน .....	32
2.4.4 การจำแนกชนิดของกรดไขมัน .....	34
2.4.5 สารประกอบเอซิลกลีเซอไรด์ (acylglyceride) .....	36
2.5 เอนไซม์ไลเปส .....	37
2.5.1 การแบ่งประเภทของเอนไซม์ไลเปส .....	41
2.5.1.1 แบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุล .....	41
2.5.1.2 แบ่งโดยอาศัยรูปแบบในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ .....	41
2.6 การประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส .....	43
2.6.1 อุตสาหกรรมสิ่งทอ .....	43
2.6.2 อุตสาหกรรมสารซักล้าง .....	43
2.6.3 อุตสาหกรรมอาหาร .....	43
2.6.4 อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม .....	44
2.6.5 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ .....	44
2.6.6 ด้านพลังงาน .....	44
2.7 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส .....	45
2.7.1 ด้านอาหาร .....	45
2.7.2 ด้านการแพทย์และยา .....	45
2.7.3 ด้านเครื่องสำอาง .....	45
2.7.4 อุตสาหกรรมสารซักล้าง .....	46
2.7.5 ด้านพลังงาน .....	46
2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย .....</b>	<b>51</b>
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ .....	51
3.2 สารเคมี .....	52
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ .....	54
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย .....	56
3.4.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ภายในประเทศไทย .....	56
3.4.2 การคัดแยกยีสต์ .....	56
3.4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา .....	56
3.4.4 การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส .....	57
3.4.5 การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส .....	57
3.4.6 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ .....	58
3.4.7 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ที่คัดเลือกได้ .....	60
3.4.8 การวัดปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยง .....	61
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล .....</b>	<b>62</b>
4.1 การคัดแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติ .....	62
4.2 การคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ .....	69
4.3 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว .....	73
4.4 การคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ .....	76
4.5 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว .....	82
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ .....</b>	<b>85</b>
5.1 สรุปผลการวิจัย .....	85
5.2 ข้อเสนอแนะ .....	86
เอกสารอ้างอิง .....	87
ภาคผนวก .....	102
ภาคผนวก ก .....	103
ภาคผนวก ข .....	107
ภาคผนวก ค .....	109

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ .....	26
ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ .....	29
ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ .....	38
ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสเชื้อของยีสต์ที่คัดแยกจากแหล่ง ธรรมชาติ .....	62
ตารางที่ 4.2 แสดงสกุลยีสต์ จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสเชื้อของยีสต์ที่คัดแยกจากแหล่ง ธรรมชาติ .....	67
ตารางที่ 4.3 แสดงแหล่งตัวอย่าง รหัสเชื้อ และจำนวนไอโซเลทของยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ เซลลูเลสจากแหล่งธรรมชาติ .....	71
ตารางที่ 4.4 แสดงรหัสเชื้อ กิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เซลลูเลสที่ผลิตโดยยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ .....	73
ตารางที่ 4.5 แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลท และรหัสเชื้อของยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส จากแหล่งธรรมชาติ .....	77
ตารางที่ 4.6 แสดงรหัสเชื้อ กิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ไลเปสที่ผลิตโดยยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ .....	82
ตารางที่ ค.1 แสดงรูปบริเวณไฮรอปโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 34 ไอโซเลท .....	109
ตารางที่ ค.2 แสดงรูปบริเวณไฮรอปโคโลนีของยีสต์จำนวน 8 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง มากกว่าหรือเท่ากับ 2 เซนติเมตร .....	115

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2.1 เซลล์ยีสต์ .....	5
รูปที่ 2.2 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อของยีสต์ Basidiomycetous .....	17
รูปที่ 2.3 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ของ <i>Schizosaccharomyces</i> .....	18
รูปที่ 2.4 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบแบบอาศัยเพศของยีสต์ Ascomycetous .....	18
รูปที่ 2.5 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ Basidiomycetous .....	19
รูปที่ 2.7 การฟอร์มตัวของกรดไขมันในรูปแบบของไมเซลล์ (micelle) .....	33
รูปที่ 2.8 เปรียบเทียบโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว และแสดงการเกิดรูปแบบของ cis และ trans ของกรดโอเลอิก .....	35
รูปที่ 4.1 แสดงจำนวนไฮโดรเจนของยีสต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณไฮโดรเจนที่เกิดจากการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อย Carboxymethylcellulose .....	70
รูปที่ 4.2 รูปที่ 4.2 แสดงจำนวนไฮโดรเจนของยีสต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณไฮโดรเจนที่เกิดจากการผลิตเอนไซม์ไลเปสมาย่อย tributyrin.....	81
รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร .....	107
รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร .....	108

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

การเพิ่มขึ้นของประชากรในช่วงศตวรรษที่ผ่านมานำไปสู่การใช้พลังงานที่เพิ่มขึ้นทั่วโลก โดยแหล่งพลังงานส่วนใหญ่นั้นมาจากเชื้อเพลิงฟอสซิลซึ่งเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้แล้วหมดไปไม่สามารถสร้างขึ้นมาทดแทนใหม่ได้ จากความต้องการเชื้อเพลิงฟอสซิลที่เพิ่มมากขึ้นอาจทำให้ปริมาณเชื้อเพลิงสำรองของโลกนั้นลดลงและยังทำให้มูลค่าของเชื้อเพลิงสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นทั่วโลกจึงหันมาให้ความสนใจในการมองหาแหล่งพลังงานทางเลือกอื่นที่ไม่ใช่ปิโตรเลียมและหนึ่งในนั้นก็คือเชื้อเพลิงเหลวจากชีวภาพโดยเฉพาะไบโอเอทานอลและไบโอดีเซลที่กำลังได้รับความสำคัญมากในปัจจุบัน ซึ่งผลพลอยได้จากการพัฒนาเชื้อเพลิงชีวภาพนอกจากจะสามารถจัดหาแหล่งพลังงานใหม่และพลังงานหมุนเวียนได้ ยังทำให้เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจ สามารถลดความยากจนและการว่างงานได้อีกด้วย (Byadgi และ Kalburgi, 2016)

เอนไซม์เซลลูเลส (EC 3.2.1) คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายเซลลูโลสขนาดใหญ่ให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถนำไปหมักและผลิตเป็นเชื้อเพลิงเหลวได้ โดยเอนไซม์นี้จะเข้าไปย่อยที่พันธะ  $\beta$ -(1,4)-glycosidic ในโครงสร้างของเซลลูโลสและได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคส ซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลโดยอาศัยการหมักด้วยยีสต์ได้ ซึ่งเซลลูโลสสามารถพบได้ทั้งในวัสดุ lignocellulosic เช่น อ้อย ข้าวโพด ฟางข้าว และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบได้ในเศษกระดาษ และ ขยะอุตสาหกรรม เป็นต้น (Byadgi และ Kalburgi, 2016) ซึ่งวัตถุดิบต่างๆ เหล่านี้ เป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย จึงเหมาะสำหรับการนำมาผลิตไบโอเอทานอล รวมทั้งการใช้เอนไซม์ในกระบวนการย่อยสลายทำให้ไม่เกิดสารพิษ (Kitagawa และ คณะ, 2011) สภาวะการย่อยไม่รุนแรง และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม จากเหตุผลที่กล่าวมานี้จึงเป็นข้อได้เปรียบของการนำเอนไซม์มาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล (Juturu และ Wu, 2014)

เอนไซม์ไลเปส (EC 3.1.1.3) คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลให้เป็นกรดไขมันอิสระ กลีเซอรอล และ ในบางครั้งอาจพบไดเอซิลกลีเซอรอล และ มอนอเอซิลกลีเซอรอลเป็นสารตัวกลางระหว่างการสร้างปฏิกิริยา ซึ่งเกิดที่บริเวณ interface ระหว่างน้ำกับน้ำมัน เอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งปฏิกิริยาได้หลายปฏิกิริยา เช่น hydrolysis, interesterification, esterification, alcoholysis และ aminolysis เป็นต้น และไลเปสก็เป็นเอนไซม์อีกชนิดหนึ่งที่ได้ถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ที่มีความสำคัญเกี่ยวกับการนำมาประยุกต์ใช้ทางด้านพลังงาน โดยไลเปสจะถูกนำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยา transesterification (Papagorgi และ คณะ, 2013) และปฏิกิริยา hydroesterification ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซล โดยสามารถใช้สารตั้งต้นทั้งจากน้ำมันพืช (Othman และ คณะ, 2017) น้ำมันที่ไม่ใช่บริโภค

น้ำมันที่ใช้แล้ว ไชมันส์ตว์ (Pourzolfaghar และคณะ, 2016) และน้ำมันจากจุลินทรีย์ เช่น สาหร่าย และยีสต์ เป็นต้น (Baskar และ Aiswarya, 2016) ทำให้ไบโอดีเซลจึงจัดเป็นพลังงานทดแทนที่สามารถผลิตขึ้นใหม่ได้ นอกจากนี้การใช้เอนไซม์ยังทำให้ไม่เกิดสารยับยั้งที่เป็นพิษต่อผลผลิต ได้พลังงานสะอาดเนื่องจากเกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ (Kumar และคณะ, 2017) และให้ค่ากิจกรรมและผลผลิตสูง จากที่กล่าวมานี้จึงทำให้การใช้เอนไซม์ไลเปสในการผลิตไบโอดีเซลมีข้อได้เปรียบมากกว่าการใช้กระบวนการผลิตทางเคมี (Pope และคณะ, 2015)

ในปัจจุบันได้มีการค้นพบยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ เช่น *Rhodotorula glutinis* มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 0.649 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Rani และคณะ, 2015) *Cystobasidium oligophagum* JRC1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase exoglucanase และ  $\beta$ -glucosidase เท่ากับ 2.27 1.26 และ 0.98 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (Vyas และ Chhabra, 2017) และ *Trichosporon cutaneum* G31 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 7.9 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน เป็นต้น (Stevens และ Payne, 1977) และตัวอย่างของยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ เช่น *Cystobasidium oligophagum* JRC1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ intracellular lipase และ extracellular lipase เท่ากับ 2.16 และ 2.88 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (Vyas และ Chhabra, 2017) *Candida cylindracea* มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 65 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Rua และคณะ, 1993) *Candida rugosa* มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ 12.2 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Öztürk, 2001) เป็นต้น นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น น้ำตาลกลูโคส ฟรักโทส ซูโครส อะราบินอส และ ซิโลส เป็นต้น (Techaparin และคณะ, 2017) สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้และผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูง เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ในขณะที่แบคทีเรียสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณต่ำและอาจเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายในกระบวนการหมักและระหว่าง การเจริญจะมีการสร้างสารพิษออกมาทำให้เอทานอลที่ได้มีสารพิษมากเกินไป (Spyridon และคณะ, 2016) และในการใช้ราที่มีลักษณะเป็นเส้นสาย เมื่อราเจริญเติบโตเส้นใยที่แผ่กระจายส่งผลให้อาหาร หนืดและการละลายของออกซิเจนลดลง เนื่องจากความต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตเมื่อ ออกซิเจนไม่เพียงพอจึงทำให้ราเจริญเติบโตได้ไม่ดีและความสามารถในการผลิตเอนไซม์ลดลง (Geoffry และ Achur, 2018) ดังนั้นยีสต์จึงมีความได้เปรียบกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นในการนำมาใช้ผลิต เอนไซม์

จากเหตุผลข้างต้นที่กล่าวมาแล้วนั้นทำให้เห็นว่าการนำเอนไซม์มาใช้ในกระบวนการผลิต ไบโอดีเซลและไบโอดีเซลนั้นนอกจากจะช่วยลดการใช้สารเคมียังเป็นวิธีการที่ไม่ก่อให้เกิดสารพิษ และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นจากความหลากหลายทางชีวภาพในประเทศไทยจึงทำให้ โครงการพิเศษนี้สนใจที่จะคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสจากแหล่งต่างๆ

ภายในประเทศไทย เพื่อที่จะสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบสำคัญในการผลิตไบโอดีเซล หรือไบโอดีเซลในอนาคตต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่บนสื่อออนไลน์  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสได้จากแหล่งธรรมชาติต่างๆ ภายในประเทศ
- 1.2.2 เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของยีสต์ที่คัดแยกได้
- 1.2.3 เพื่อศึกษากิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตโดยยีสต์ที่คัดแยกได้

## 1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 1.3.1 ทำการคัดแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติ เช่น ดิน น้ำ ผลไม้ ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหาร Yeast Malt Agar ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และ Kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (Pantelides และคณะ, 2015)
- 1.3.2 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ทั้งลักษณะของโคโลนี ได้แก่ รูปร่าง ขอบ การยกตัว ผิวหน้า และสี โดยนำยีสต์มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Yeast Malt Agar รวมทั้งศึกษารูปร่าง การแบ่งตัว (fission) การแตกหน่อ (budding) และลักษณะเส้นสายของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Singh และคณะ, 2013)
- 1.3.3 ตรวจสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสที่ยีสต์ผลิตได้บนอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบการผลิตเอนไซม์โดยเอนไซม์เซลลูเลสจะมีการเติม Carboxymethylcellulose (CMC) เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน และเอนไซม์ไลเปสจะมีการเติม tributyrin เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอน จากนั้นสังเกตการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ (Vyas และ Chhabra, 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 1.3.4 ศึกษากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสของยีสต์ที่คัดแยกได้ในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับผลิตเอนไซม์ โดยมีการเติมแหล่งคาร์บอนเช่นเดียวกับในอาหารแข็งที่ใช้สำหรับทดสอบการผลิตเอนไซม์ สำหรับเอนไซม์เซลลูเลสตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยการวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นด้วยวิธี DNS และเอนไซม์ไลเปสตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โดยใช้วิธีการไทเทรตที่ใช้ฟีนอล์ฟทาลินเป็นอินดิเคเตอร์รวมทั้งวัดปริมาณโปรตีนเพื่อนำค่ากิจกรรมเอนไซม์และปริมาตรโปรตีนไปคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ (อารี, 2559)

#### 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสจากแหล่งธรรมชาติต่างๆภายในประเทศ
- 1.4.2 สามารถนำเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสที่ผลิตจากยีสต์คัดแยกได้ไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตไบโอเอทานอลหรือไบโอดีเซล

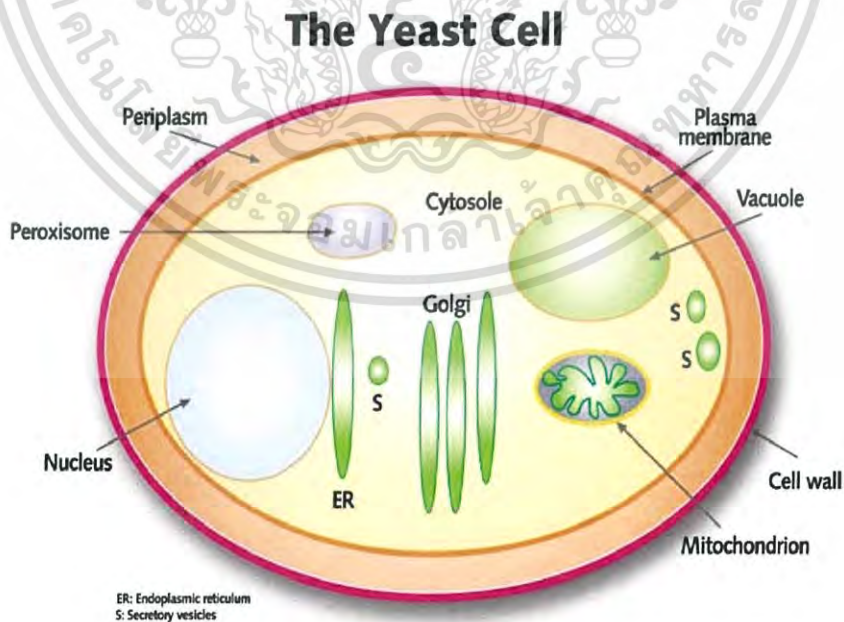
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ยีสต์

ยีสต์ เป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวประเภทยูคาริโอต (Nandy และ Srivastava, 2018) จัดอยู่ในไฟลัม Ascomycota และ Basidiomycota ซึ่งอยู่ในอาณาจักรฟังไจ ที่ประกอบด้วย รา เห็ดและยีสต์ มีนิวเคลียส เยื่อหุ้มนิวเคลียส ผนังเซลล์ กอลจิคอมเพล็กซ์ ไมโทคอนเดรีย เอ็นโดพลาสมิกเรติคูลัม เวสิเคิล แวกิวโอล และ ไซโทสเกเลตอนซึ่งเป็นส่วนที่สำคัญอีกส่วนหนึ่ง แสดงดังรูปที่ 2.1 โดยทั่วไปขนาดเซลล์ของยีสต์ คือ  $5 \times 10$  ไมโครเมตร วิธีการสืบพันธุ์หลักๆ คือ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ เช่น การแตกหน่อ การแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์สามารถคัดแยกและระบุสปีชีส์ของยีสต์ได้โดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ภูมิคุ้มกันวิทยาและอนุชีววิทยา แหล่งที่อยู่โดยธรรมชาติของยีสต์อาจเป็น ดิน น้ำ พืชพรรณไม้ สัตว์ และแมลง (Montes และคณะ, 2016; Shurson, 2017) ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องการอินทรีย์สารจากสิ่งมีชีวิตอื่นๆโดยต้องใช้สารอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตเป็นแหล่งอาหารและพลังงาน ยีสต์จะนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์โดยการสร้างเอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีน คาร์โบไฮเดรต หรือ ไขมัน ปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์เพื่อไปย่อยสลายสารประกอบอินทรีย์ จากนั้น จะทำการดูดซึมกรดอะมิโน น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และ กรดไขมันอิสระผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ (Shurson, 2017)



รูปที่ 2.1 เซลล์ยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดและแก้ไขเอกสารฉบับนี้  
ที่มา: Montes และคณะ, 2016 ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 การจัดจำแนกยีสต์ แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1. Ascosporeogenous yeast 2. Basidiosporeogenous yeast และ 3. Imperfect yeast

1. Ascosporeogenous yeast จัดอยู่ในชั้น Hemiascomycetes ของไฟลัม Ascomycota มีการสร้างพืดติงบอดีและเส้นใยที่เรียกว่า ascogenous hypha ในชั้น Hemiascomycetes สามารถจัดจำแนกยีสต์ได้ 2 วงศ์ของอันดับ Endomycetales คือ Saccharomycetaceae และ Spermophthoraceae ซึ่งสามารถจำแนกความแตกต่างของทั้ง 2 วงศ์จากรูปร่างของ ascospore โดยสปอร์ของ Spermophthoraceae มีรูปร่างทรงเข็ม ต่างจากสปอร์ของ Saccharomycetaceae ที่เป็นรูปร่างทรงอื่น และ Saccharomycetaceae เป็นเซลล์เดี่ยวจึงแตกต่างจากอีก 2 วงศ์ในอันดับ Endomycetales คือ Ascoideaceae และ Endomycetaceae

1.1 ยีสต์ของวงศ์ Saccharomycetaceae มีสมาชิกจำนวน 4 วงศ์ย่อย คือ 1. Schizosaccharomycetoideae 2. Saccharomycetoideae 3. Lipomycetoideae และ 4. Nadsonioideae

1.1.1 ยีสต์ของวงศ์ย่อย Schizosaccharomycetoideae นั้นมีเพียงสกุลเดียว คือ สกุล *Schizosaccharomyces* ซึ่งมีการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ อาจได้เป็นยีสต์เซลล์เดี่ยวหรือเป็นยีสต์เส้นใยแท้จริงที่มีผนังกันซึ่งส่วนปลายของเส้นใยนั้นจะหลุดเป็นท่อนๆ โดยเรียกแต่ละท่อนว่า อาร์โธรสปอร์ การที่ไม่มีการแตกหน่อในยีสต์สกุลนี้ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างออกจากยีสต์สกุลอื่นได้

ยีสต์ของสกุล *Schizosaccharomyces* ไม่มีโคตินภายในผนังเซลล์ เมื่อผนังเซลล์แก่จะพบร่องรอยการแตกหน่อมากมาย ภายใน ascus จะมีสปอร์ 4 – 8 สปอร์ โดยสปอร์จะมีรูปร่างทรงกลมหรือรูปร่างทรงไข่ ซึ่งยีสต์สปีชีส์ *Schizosaccharomyces pombe* และสปีชีส์ *Schizosaccharomyces malidevorans* เป็นสปีชีส์ที่มีสปอร์จำนวน 4 สปอร์ภายใน 1 ascus และยีสต์สปีชีส์ *Schizosaccharomyces octosporus* และสปีชีส์ *Schizosaccharomyces japonicas* เป็นสปีชีส์ที่มีจำนวนสปอร์ 8 สปอร์ภายใน 1 ascus

1.1.2 ยีสต์ของวงศ์ย่อย Saccharomycetoideae มีสมาชิกจำนวน 26 สกุล โดยมี 6 สกุล ที่มีลักษณะเป็นยีสต์เซลล์เดี่ยว และเป็นยีสต์ที่สร้างกลุ่มเส้นใยที่แท้จริง ได้แก่ยีสต์ของสกุล *Saccharomycopsis* *Guilliermondella* *Ambrosiozyma* *Arthroascus* *Stephanosascus* และ *Yarrowia* ซึ่งแตกต่างจากยีสต์ของสกุล *Pichia* และสกุล *Hansenula* ที่มีลักษณะการสร้างเส้นใยแท้จริง ยกเว้นสปีชีส์ *Pichia burtonii* ที่มีการสร้างกลุ่มเส้นใยที่แท้จริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.2.1 ยีสต์ของสกุล *Saccharomycopsis* มีพลาสมาเดสมาตาอยู่บนผนังกันของเส้นใย และมีสมาชิกจำนวน 6 สปีชีส์

ยีสต์สปีชีส์ *Saccharomycopsis crataegensis* นั้นมีเส้นใยแบบ heterothallic ที่เกิดจากการรวมตัวของเส้นใยที่เกิดจากต่างสปอร์กัน ซึ่งแตกต่างจากสายพันธุ์อื่นๆที่มีเส้นใยแบบ homothallic ที่เกิดจากการรวมตัวของเส้นใยที่เกิดจากสปอร์เดียวกัน

ยีสต์สปีชีส์ *Saccharomycopsis capsularis* จะเกิดการรวมตัวระหว่างรูปแบบการสร้างเซลล์เส้นใย หรือ การสร้างเซลล์เส้นใยและบลาสโตสปอร์ ซึ่งจะมีการสร้างผนังใหม่กันระหว่าง 2 เซลล์ โดยทั้ง 2 เซลล์อาจจะกลับไปเข้าสู่ asci หรือกลายเป็นหน่อก่อนที่จะกลับเข้าสู่ asci

ยีสต์สปีชีส์ *Saccharomycopsis fibuligera*, *Saccharomycopsis vini*, *Saccharomycopsis crataegensis* จะเกิดการคอนจูเกชัน และอาจเกิดการคอนจูเกชันขึ้นในยีสต์สปีชีส์ *Saccharomycopsis synnaedendra* แต่จะไม่อาจเกิดการคอนจูเกชันขึ้นในยีสต์สปีชีส์ *Saccharomycopsis malanga* ซึ่งการรวมตัวทั้งรูปแบบเซลล์เส้นใย หรือ เซลล์เส้นใยที่รวมกับบลาสโตสปอร์นั้นจะเปลี่ยนเป็นหน่อและกลับไปเข้าสู่ asci ในรูปแบบของไซโกต

1.1.2.2 ยีสต์ของสกุล *Guilliermondella* มีแอสโคสปอร์รูปร่างทรงกลมหรือรูปร่างทรงไข่ ขั้วที่ผนังเซลล์ทั้ง 2 ขั้วมีความหนาทำให้รูปทรงของสปอร์คล้ายคลึงกับรูปจันทร์เสี้ยว เช่นเดียวกับกับสปีชีส์ของยีสต์สกุล *Saccharomycopsis* ที่จะเกิดการรวมของเซลล์เส้นใยและแยกกันโดยการสร้างผนังกันก่อนที่จะกลับเข้าสู่ asci นอกจากนี้ยังมีพลาสมาเดสมาตาอยู่บนผนังกันของเส้นใย ซึ่งทำให้สกุล *Guilliermondella* นั้นมีความคล้ายคลึงกับสกุล *Saccharomycopsis*

1.1.2.3 ยีสต์ของสกุล *Stephanoascus* มีสมาชิกเพียงสปีชีส์เดียว คือ สปีชีส์ *Stephanoascus ciferrii* ซึ่งมีพลาสมาเดสมาตาอยู่บนผนังกันของเส้นใย มีการสร้างเส้นใยแบบ heterothallic และ เกิดการรวมตัวกันของเซลล์เส้นใยก่อนที่จะกลายเป็น ascus โดย ascus มีรูปร่างทรงกลม เมื่อแอสโคสปอร์ยังโตไม่เต็มที่จะมีรูปร่าง ค่อนข้างแบนและมีรูปร่างทรงแท่ง ในขณะที่แอสโคสปอร์ที่โตเต็มวัยผนังจะบวมเพียง 1 ด้านและสปอร์ที่โตเต็มวัยจะมีรูปร่างลักษณะเป็นครึ่งวงกลม

1.1.2.4 ยีสต์ของสกุล *Ambrosiozyma* จะมีรูที่ตรงกลางของผนังกันเส้นใย มีสมาชิกจำนวน 4 สปีชีส์ โดยทั้ง 4 สปีชีส์ จะมีสปอร์รูปร่างทรงแท่ง ยีสต์สปีชีส์ *Ambrosiozyma monospora* นั้นคล้ายกับสปีชีส์ *Ambrosiozyma cicatricosa* ทั้งในด้าน

สัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา โดยสปีชีส์ *Ambrosiozyma cicatricosa* เด่นในการสร้างบลาสโตสปอร์  
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า  
ที่สามารถสร้างหน่อให้ต่อกันเป็นเส้นสาย เกิดการยึดตัวของขั้วและพบรอยการแตกหน่อหลายรอย  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และสปิซีส์ *Ambrosiozyma platypodis* ยังคล้ายกับสปิซีส์ *Ambrosiozyma philentoma* แต่แตกต่างที่สปิซีส์ *Ambrosiozyma platypodis* สามารถดูดซึมไนเตรทได้ดีกว่า

1.1.2.4 ยีสต์ของสกุล *Yarrowia* มีสมาชิกคือสปิซีส์ *Saccharomycopsis lipolytica* โดยมีสปิซีส์ดั้งเดิมคือสปิซีส์ *Endomycopsis lipolytica* ซึ่งสปิซีส์ *Saccharomycopsis lipolytica* นั้นเป็นระยะผสมพันธุ์แบบอาศัยเพศในสายพันธุ์ *Candida lipolytica* ซึ่งถูกค้นพบการผสมพันธุ์ของสายพันธุ์นี้ได้ในระยะหลัง นอกจากนั้นยีสต์สปิซีส์ *Saccharomycopsis lipolytica* ยังมีแอสโคสปอร์หลากหลายรูปทรง

1.1.2.5 ยีสต์ของสกุล *Arthroascus* มีสมาชิกเพียง 1 สปิซีส์ คือ สปิซีส์ *Arthroascus javanensis* เกิดการแตกหน่อในลักษณะ Broad-based budding (เซลล์ใหม่ที่ได้จากการแตกหน่อ ซึ่งอาจติดอยู่กับเซลล์เดิมในระยะแรกแต่จะแยกหลุดออกไปในที่สุด ส่วนที่ติดกันระหว่างเซลล์นั้นมีความกว้าง จึงดูคล้ายกับว่ามีผนังกันอยู่) และกลุ่มเส้นใยที่แท้จริงอาจหลุดออกกลับเข้าสู่ออร์โธรสปอร์ อาจมีการปรากฏร่องรอยของการแตกหน่อหลายรอยขึ้นที่ขั้วของเซลล์ ascus ซึ่งเกิดจากการคอบนูก่ขึ้นระหว่างเซลล์ที่แยกกันหรือเซลล์ที่เชื่อมต่อกัน โดยเซลล์ที่รวมกันอยู่จะเข้าสู่ ascus จากนั้นเซลล์จะบวมขึ้น ซึ่งสปอร์จะมีรูปร่างทรงกลมหรือค่อนข้างแบน

1.1.2.5 ยีสต์ของสกุล *Pichia* มีสมาชิกจำนวน 56 สมาชิก ซึ่งถือว่าเป็นสกุลยีสต์ที่ใหญ่ที่สุดใน Ascosporogenous มีความหลากหลายทั้งด้านสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยา เช่น การมีหรือไม่มีการสร้างกลุ่มเส้นใยที่แท้จริงและกลุ่มเส้นใยที่ไม่แท้จริง รูปทรงของแอสโคสปอร์ การมีเส้นใยแบบ heterothallic และ homothallic โดยยีสต์ของสกุล *Pichia* จะแตกต่างจากยีสต์ของสกุล *Hansenula* เนื่องจากยีสต์ของสกุล *Pichia* ไม่สามารถดูดซึมไนเตรทได้ ซึ่งยีสต์สกุล *Pichia* มีแอสโคสปอร์รูปร่างทรงหมวกหรือทรงดาวเสาร์ และในบางสปิซีส์ของสกุล *Pichia* เช่น สปิซีส์ *Pichia carsonii* และสปิซีส์ *Pichia etchellsii* ที่มีสปอร์รูปร่างทรงกลม ผิวเรียบ เป็นต้น

สปิซีส์ *Pichia ohmeri* มีการสร้างกลุ่มเส้นใยที่ไม่แท้จริง มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด และมีเส้นใยแบบ heterothallic อย่างไรก็ตามผนังกันเส้นใยที่แท้จริงนั้นไม่มีพลาสโมเดสมาตา ทำให้แยกความแตกต่างจากยีสต์ของสกุล *Saccharomycopsis* ได้

สปิซีส์ *Pichia burtonii* จะสร้างเส้นใยที่แท้จริงจากนั้นจะหลุดเข้าสู่ออร์โธรสปอร์ซึ่งผนังกันไม่มีพลาสโมเดสมาตา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.2.5 ยีสต์ของสกุล *Hansenula* มีรูปร่างเซลล์เป็นรูปร่างทรงกลมหรือทรงดาวเสาร์ แอสโคสปอร์มีลักษณะเป็นครึ่งวงกลมและสามารถดูดซึมไนโตรเจนได้ ยีสต์ของสกุล *Hansenula* มีความคล้ายคลึงกับยีสต์ของสกุล *Pichia* มีการสร้างเส้นใยแบบ heterothallic และ homothallic อาจมีหรือไม่มีการสร้างกลุ่มเส้นใยที่แท้จริงและกลุ่มเส้นใยที่ไม่แท้จริง ผันกันภายในเส้นใยที่แท้จริงของสกุล *Hansenula* นั้นไม่มีพลาสโมเดสมาตาหรือรูตรงกลางผนังกันเส้นใย แอสโคสปอร์อาจมีสีชมพูหรือแดง ในบางสปีชีส์ เช่น สปีชีส์ *hansenula capsulata* และสปีชีส์ *Hansenula holstii* มีการสร้างแคปซูล และบางสายพันธุ์สามารถดูดซึมเมทานอลได้

1.1.3 ยีสต์ของวงศ์ย่อย Lipomycetoideae มีสมาชิกคือยีสต์ของสกุล *Lipomyces* มีลักษณะการสร้าง ascus 3 ลักษณะ คือ 1. หน่อที่กำลังเจริญในเซลล์อาจเข้าสู่ ascus 2. หน่อที่กำลังเจริญอาจเกิดการคอนจูเกตกับเซลล์อื่นและเข้าสู่ ascus 3. หลังจากเซลล์แม่สร้างเซลล์ลูกเข้าสู่ ascus แล้ว เซลล์แม่อาจจะเข้าสู่ ascus ด้วย โดยแอสโคสปอร์มีสี่เหลี่ยมอำพันและภายใน 1 ascus อาจมีสปอร์จำนวน 2 – 30 สปอร์หรือมากกว่า โดยสปอร์อาจหลุดหรือไม่หลุดออกจาก ascus

1.1.4 ยีสต์ของวงศ์ย่อย Nadsonioideae มีสมาชิกจำนวน 4 สกุล

1.1.4.1 ยีสต์ของสกุล *Nadsonia* ซึ่งเป็นสกุลที่มีการกล่าวไว้ว่าพบการแตกหน่อเป็นครั้งแรก โดยยีสต์ของสกุล *Nadsonia* มีการสร้าง ascus จากการเกิดคอนจูเกชันระหว่างเซลล์แม่และหน่อ ซึ่งแอสโคสปอร์อาจเกิดในเซลล์แม่หรือในหน่อ และสปอร์มีรูปร่างทรงกลม ผิวขรุขระสีน้ำตาล มีสปอร์จำนวน 1 – 2 สปอร์ต่อ 1 ascus โดยสปอร์จะไม่หลุดออกจาก ascus

1.1.4.2 ยีสต์ของสกุล *Hanseniaspora* มีการแตกหน่อแบบ 2 ขั้ว ซึ่งจากการศึกษาลำดับดีเอ็นเอของสกุลนี้ พบว่ามีสมาชิกจำนวน 6 สปีชีส์ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกัน แต่รูปร่างของแอสโคสปอร์ของทั้ง 6 สปีชีส์นั้นแตกต่างกันโดยยีสต์สปีชีส์ *Hanseniaspora guilliermondii* มีสปอร์รูปร่างทรงกลม มีสปอร์จำนวน 4 สปอร์ต่อ 1 ascus สปีชีส์ *Hanseniaspora valbyensis* มีสปอร์รูปร่างทรงกลม มีสปอร์จำนวน 2 สปอร์ต่อ 1 ascus

สปีชีส์ *Hanseniaspora uvarum* และสปีชีส์ *Hanseniaspora occidentalis* มีสปอร์รูปร่างทรงกลมส่วนมากมีสปอร์จำนวน 1 สปอร์ต่อ 1 ascus โดยสปอร์จะไม่หลุดออกจาก ascus

สปีชีส์ *Hanseniaspora osmophila* และสปีชีส์ *Hanseniaspora vineae* มีสปอร์มีรูปร่างทรงกลม ผิวขรุขระ มีสปอร์จำนวน 1 สปอร์ต่อ 1 ascus โดยสปอร์จะไม่หลุดออกจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.4.3 ยีสต์ของสกุล *Saccharomycodes* มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ *Saccharomycodes ludwigii* ซึ่งมีแอสโคสปอร์รูปร่างทรงกลมและมีสปอร์จำนวน 4 สปอร์ต่อ 1 ascus

1.1.4.2 ยีสต์ของสกุล *Wickerhamia* มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ *Wickerhamia fluorescens* ซึ่งมีแอสโคสปอร์รูปร่างทรงหมวกและมีสปอร์จำนวน 1 สปอร์ต่อ 1 ascus โดยสปอร์จะหลุดออกจาก ascus

1.2 ยีสต์ของวงศ์ Spermophthoraceae มีสมาชิกจำนวน 3 สกุล โดยยีสต์ของวงศ์ Spermophthoraceae มีแอสโคสปอร์ลักษณะรูปร่างทรงเข็ม โดย ascus จะมีขนาดใหญ่กว่า เซลล์ปกติ

1.2.1 ยีสต์ของสกุล *Coccidiascus* มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ *Coccidiascus legeri* ซึ่งเป็นปรสิตในลำไส้ในของสปีชีส์ *Drosophila* จะเกิดการสร้างแอสโคสปอร์รูปทรงกระสวยมีจำนวน 8 สปอร์

1.2.2 ยีสต์ของสกุล *Nematospora* สมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ *Nematospora coryli* ซึ่งเป็นสปีชีส์ที่เป็นปรสิตในพืชผักผลไม้ เช่น มะเขือเทศและเมล็ดเฮเซลนัต จะอาศัยแมลงในการเคลื่อนย้ายถิ่น จะสร้างสปอร์จำนวน 8 สปอร์ต่อ 1 ascus และปล่อยสปอร์ออกจาก ascus สปีชีส์ *Nematospora coryli* มีการสร้างกลุ่มเส้นใยที่แท้จริงที่มีผนังกันและสร้างกลุ่มเส้นใยที่ไม่แท้จริง

1.2.3 ยีสต์ของสกุล *Metschnikowia* มีแอสโคสปอร์ลักษณะรูปร่างทรงเข็ม มีสปอร์จำนวน 1 – 2 ต่อ 1 ascus พบ asci ที่มีแอสโคสปอร์รูปร่างทรงเข็มในสปีชีส์ *Metschnikowia pulcherrima* และสปีชีส์ *Metschnikowia reukaufii* โดยสปีชีส์ *Metschnikowia pulcherrima* คัดแยกได้จากผลไม้และดอกไม้และมีการสร้างคลาโมโดสปอร์ ซึ่งสปีชีส์ *Metschnikowia reukaufii* มีความคล้ายคลึงกับสปีชีส์ *Metschnikowia pulcherrima* แต่ในสปีชีส์ *Metschnikowia reukaufii* มีการเปลี่ยนรูปร่างของคลาโมโดสปอร์จากรูปไข่เป็นรูปทรงกระบอกและคัดแยกได้น้ำหวานของเกสรดอกไม้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Basidiosporogenous yeast ยีสต์เหล่านี้มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด ส่วนมากมีวงจรชีวิตแบบต้องผสมกับสปอร์อื่นที่เข้ากันได้ (heterothallic) จำแนกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1. Teliospore-forming yeasts 2. Filobasidiaceae และ 3. *Sterigmatosporidium*

จาก 3 กลุ่มที่กล่าวถึงในขั้นต้นของ Basidiosporogenous yeast ในวงศ์ Tremellaceae และ Sirobasidiaceae ของตระกูล Tremellales นั้นอาจมีระยะ haploid ซึ่งเซลล์ที่ผสมกันของยีสต์ในขั้นนี้ที่อาจเกิดจากการคอนจูเกตและสร้างเส้นใยที่เรียกเส้นใย dikaryotic mycelium และสร้างเบสิดิโอคาร์ป เบสิดิอียและเบสิดิโอสปอร์

2.1. Teliospore-forming yeasts มีสมาชิกจำนวน 3 สกุล ได้แก่สกุล *Sporidiobolus* *Rhodosporidium* และสกุล *Leucosporidium*

2.1.2 ยีสต์ของสกุล *Sporidiobolus* เป็นเพียงสกุลเดียวที่สร้างบอริสโตสปอร์และมีสมาชิกจำนวน 4 สปีชีส์ สปีชีส์ *Sporidiobolus johnsonii* และสปีชีส์ *Sporidiobolus ruinenii* มีวงจรชีวิตแบบไม่ต้องผสมกับสปอร์อื่น (homothallic) และในสปีชีส์ *Sporidiobolus pararoseus* และสปีชีส์ *Sporidiobolus salmonicolor* มีวงจรชีวิตแบบต้องผสมกับสปอร์อื่นที่เข้ากันได้ (heterothallic) ทั้ง 4 สปีชีส์ นั้นมีการสร้างเส้นใย dikaryotic mycelium กับข้อต่อยึดอย่าง clamp connection และสร้างเทลิโอสปอร์

2.1.2 ยีสต์ของสกุล *Rhodosporidium* มีสมาชิกจำนวน 9 สปีชีส์ โดยสปีชีส์ *Rhodosporidium toruloides* อาจมีทั้งวงจรชีวิตแบบต้องผสมและไม่ต้องผสมกับสปอร์อื่น จากนั้นจะสร้างเส้นใย dikaryotic mycelium กับข้อต่อยึดอย่าง clamp connection และพัฒนาเป็นเซลล์เดี่ยว และอีก 8 สปีชีส์มีวงจรชีวิตแบบต้องผสมกับสปอร์อื่น ยีสต์ของสกุล *Rhodotorula* และสกุล *Cryptococcus* มีระยะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศแต่มีเพียงสปีชีส์ *Cryptococcus infirmominiatus* ที่สามารถเข้าคู่กับสปีชีส์ *Rhodotorula infirmominiatum* ได้ ถึงแม้ว่ายีสต์ของสกุล *Rhodotorula* และสกุล *Rhodosporidium* จะมีความคล้ายคลึงกันแต่ก็ไม่สามารถเข้าคู่กันได้

สปีชีส์ *Rhodosporidium toruloides* *Rhodosporidium sphaerocarpum* และสปีชีส์ *Rhodosporidium diobovatum* มีโครโมโซมแบบ haploid ซึ่งคล้ายคลึงกับสปีชีส์ *Rhodotorula glutinis* และในอีก 3 สปีชีส์ของสกุล *Rhodosporidium* สามารถจำแนกความแตกต่างได้จากรูปทรงของเทลิโอสปอร์

2.1.3 ยีสต์ของสกุล *Leucosporidium* มีสมาชิกจำนวน 6 สปีชีส์ โดยสปีชีส์ *Leucosporidium scottii* และสปีชีส์ *Leucosporidium antarcticum* มีวงจรชีวิตแบบต้องผสมกับสปอร์อื่น ในสปีชีส์ *Leucosporidium scottii* มีการเข้าคู่แบบ tetrapolar multiallelic mating type และสปีชีส์ *Leucosporidium antarcticum* มีการเข้าคู่แบบ bipolar mating type หลังจากเกิดการรวมกันของเซลล์ที่เข้ากันได้แล้วจะเกิดสร้างเส้นใย dikaryotic mycelium กับข้อต่อยึดอย่าง clamp connection และสร้างเทลิโอสปอร์

อีก 4 สปีชีส์ของสกุล *Leucosporidium* สามารถสร้างสปอร์ได้เอง โดยจะสร้างกลุ่มเส้นใยที่ปราศจาก clamp connection และจะมีการสร้างเทลิโอสปอร์ 1 – 2 สปอร์ บนโครงสร้างเมตาเบลิเตียม

2.2. Filobasidiaceae มีจำนวนสมาชิก 2 สกุล คือ สกุล *Filobasidium* และสกุล *Filobasidiella*

2.2.1 ยีสต์ของสกุล *Filobasidium* มีสมาชิกคือสปีชีส์ *Filobasidium floriforme* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับสปีชีส์ *Cryptococcus albidus* แต่ไม่สามารถเข้าคู่กันได้ และค้นพบว่าในสปีชีส์ *Filobasidium capsuligenum* สามารถเข้าคู่ได้กับสปีชีส์ *Torulopsis capsuligenum* ได้นอกจากนั้นสปีชีส์ *Filobasidium uniguttulatum* ของสกุล *Filobasidium* นั้นยังสามารถเข้าคู่ได้กับสปีชีส์ *Cryptococcus uniguttulatus* ได้

2.2.2 ยีสต์ของสกุล *Filobasidiella* มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์คือสปีชีส์ *Filobasidiella neoformans* ซึ่งในสปีชีส์นี้มีสมาชิกจำนวน 2 พันธุ์ คือ พันธุ์ *neoformans* และพันธุ์ *bacillispora* โดยทั้ง 2 พันธุ์มีรูปทรงเบสิติโอสปอร์และลักษณะทางกายภาพที่ต่างกัน

2.3. *Sterigmatosporidium* มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ *Sterigmatosporidium polymorphum* มีวงจรชีวิตแบบต้องผสมกับสปอร์อื่นและมีการสร้างเส้นใย dikaryotic mycelium กับ clamp connection โดยคลาโมโดสปอร์มี 2 รูปทรง คือ รูปทรงกลมและรูปทรงไข่ ในเส้นใย dikaryotic ของสปีชีส์นี้มีรูตรงกลางผนังกันเส้นใยทำให้จำแนกความต่างกับ Teliospore-forming yeasts ได้

3. Imperfect yeast ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยยีสต์ที่ไม่สร้างแอสโคสปอร์และเบสิติโอสปอร์ ซึ่งยีสต์กลุ่มนี้มีความแตกต่างเพียงเรื่องความสามารถในการสร้างสปอร์ที่อาศัยเพศ สปีชีส์ที่มีการสร้างสปอร์จะมีการสืบพันธุ์แบบ Teleomorph และสปีชีส์ที่ไม่มีการสร้างสปอร์จะมีการสืบพันธุ์แบบ Anamorph

ในกลุ่มของ Imperfect yeast อาจเป็น ascomycetous หรือ basidiomycetous โดยการแบ่งแยกสกุลในกลุ่ม Imperfect yeast นั้นจะแบ่งจากลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพบางประการ เช่น การผลิตกรดและการดูดซึมอิโนซิทอล ในกลุ่มของ ascomycetous yeast มีสมาชิกจำนวน 8 สกุล โดย 3 สกุลที่มีการแตกหน่อ 2 ขั้ว คือสกุล *Kloeckera Eeniella* และสกุล *Schizoblastosporion*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ของสกุล *Kloeckera* มีจำนวนสมาชิก 6 สปีชีส์ ซึ่งมีระยะอาศัยเพศของยีสต์สกุล *Hanseniaspora* และยีสต์สกุล *Kloeckera* และสามารถผลิตกรดได้จากกลูโคส ทำให้จำแนกความแตกต่างกับยีสต์ของสกุล *Eeniella* ได้

ยีสต์ของสกุล *Eeniella* มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ *Eeniella nana* ซึ่งมีความคล้ายคลึงกับสปีชีส์ของสกุล *Brettanomyces* และสกุล *Trigonopsis* มีลักษณะเซลล์เป็นรูปร่างทรงสามเหลี่ยม หน่อมีรูปร่างทรงรี

ยีสต์ของสกุล *Sympodiomyces* มีสมาชิกคือสปีชีส์ *Trigonopsis variabilis* ที่หน่อจะงอกออกมาที่ปลายเส้นใยโคนดิโอฟอร์ หลังจากสร้างหน่อแรกแล้วเส้นใยโคนดิโอฟอร์จะเจริญและสร้างหน่อถัดไป มีการสร้างกลุ่มเส้นใยที่แท้จริงที่อาจมีการสร้างผนังกัน

Ascomycetous yeast มี 2 สกุลที่สร้างกลุ่มเส้นใยราที่แท้จริงคือสกุล *Oosporidium* และสกุล *Aciculoconidium*

ยีสต์ของสกุล *Oosporidium* มีสมาชิกเพียง 1 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ *Oosporidium margaritifera* ซึ่งจะเกิดการแตกหน่อในลักษณะ Broad-based budding และมีการสร้างเส้นใยที่แท้จริงที่มีผนังกัน แต่ไม่มีการสร้างอาร์โธรสปอร์

ยีสต์ของสกุล *Aciculoconidium* มีการสร้างอาร์โธรสปอร์และเบสิดิโอสปอร์รูปร่างทรงเข็ม ยีสต์ของสกุล *Brettanomyces* สามารถผลิตกรดอะซิติกได้จากกลูโคส โดยสมาชิก 2 ใน 9 สปีชีส์ของสกุล *Brettanomyces* นั้นมีระยะอาศัยเพศในสกุล *Dekkera*

Basidiomycetous yeast มีสมาชิกจำนวน 8 สกุล ยีสต์ของสกุล *Bullera* และสกุล *Sporobolomyces* สามารถจำแนกความแตกต่างได้จากการสร้างบอลลิสโตสปอร์

ยีสต์ของสกุล *Sporobolomyces* มีสมาชิกจำนวน 7 สปีชีส์ ซึ่งมี 2 สปีชีส์ที่มีระยะอาศัยเพศในสกุล *Sporidiobolus* และในบางสปีชีส์มีการสร้างกลุ่มเส้นใยที่แท้จริง

ยีสต์ของสกุล *Bullera* มีสมาชิกจำนวน 6 สปีชีส์ ไม่พบระยะอาศัยเพศแต่มีโครโมโซมแบบ haploid ยีสต์สปีชีส์ *Sirobasidium magnum* ของตระกูล Tremellales นั้นตรงกับยีสต์ของสกุล *Buller*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ของสกุล *Sterigmatomyces* มีการสร้างหน่อบน stalks ของเซลล์แม่ โดย stalks มีความยาวหลากหลายขนาด ตั้งแต่ 0.5 – 26 ไมโครเมตร โดยในสกุล *Sterigmatomyces* และสกุล *Fellomyces* สามารถจำแนกความแตกต่างของทั้ง 2 สกุลได้จากบริเวณของหน่อที่แยกจากเซลล์แม่ที่เกิดบน stalks โดยสกุล *Sterigmatomyces* จะอยู่ที่บริเวณตรงกลาง ส่วนสกุล *Fellomyces* จะอยู่บริเวณปลายของ stalks

ยีสต์ของสกุล *Malassezia* มีการแตกหน่อแบบขั้วเดียว มีสมาชิกจำนวน 2 สปีชีส์ คือ สปีชีส์ *Malassezia furfur* คัดแยกได้จากผิวหนังที่มีการติดเชื้อมนุษย์และเลือดสัตว์ สปีชีส์นี้มีการสร้างเส้นใยที่ก่อให้เกิดโรคเกลื้อนนอกจากนั้นยังต้องการน้ำมันหรือกรดไขมันในแหล่งอาหาร

แต่ในสปีชีส์ *Malassezia pachydermatis* สามารถเจริญได้โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารเหล่านี้

ยีสต์ของสกุล *Rhodotorula* ในกลุ่ม Basidiomycetous yeast มีลักษณะที่สำคัญคือไม่สามารถดูดซึมอินซูลินได้ ทำให้สามารถจำแนกความแตกต่างกับสกุล *Rhodotorula* จากสกุล *Cryptococcus* ได้ โดยสมาชิก 1 ใน 8 สปีชีส์ของสกุล *Rhodotorula* คือสปีชีส์ *Rhodotorula glutinis* ซึ่งมีระยะอาศัยเพศในสกุล *Rhodospiridium* และสปีชีส์เดี่ยวในสกุล *Phaffia* คือสปีชีส์ *Phaffia rhodozyma* อาจมีการสร้างคลาไมโดสปอร์และไม่สามารถดูดซึมอินซูลินได้ ทุกสปีชีส์ของสกุล *Cryptococcus* เป็น basidiomycetous yeast ทั้งหมดยกเว้นสปีชีส์ *Cryptococcus melibiosum* ที่เป็น ascomycetous yeast

ยีสต์ของสกุล *Cryptococcus* มีระยะอาศัยเพศในสกุล *Filobasidium* *Filobasidiella* และสกุล *Rhodospiridium* สกุล *Trichosporon* และสกุล *Candida* ในกลุ่มของ Imperfect yeast นั้นทั้ง 2 สกุลเป็น ascomycetous และ basidiomycetous yeast โดยสกุล *Trichosporon* มีการแตกหน่อ สร้างกลุ่มเส้นใยที่แท้จริงและสร้างอาร์โรสปอร์

ยีสต์ของสกุล *Trichosporon* ใน ascomycetous yeast อาจจะมีระยะอาศัยเพศในหลายสกุล เช่น สกุล *Pichia* และสกุล *Endomyces* เป็นต้น ทุกสปีชีส์ของสกุล *Candida* มีระยะอาศัยเพศในหลายสกุล อย่างเช่น สกุล *Citeromyces* *Clavispora* *Debaryomyces* *Hansenula* *Issatchenkia* *Kluyveromyces* *Metschnikowia* *Pichia* *Saccharomyces* *Saccharomycopsis* *Stephanoascus* *Torulaspora* *Wickerhamiella* *Filobasidium* และสกุล *Leucosporidium* สปีชีส์ของสกุล *Candida* ส่วนมากเป็น ascomycetous yeast และมีอีก 25 สปีชีส์ที่เป็น basidiomycetous yeast (Rose และ Harrison, 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.1.2 แหล่งที่อยู่อาศัยของยีสต์** ที่อยู่อาศัยเมื่อแบ่งตามประเภทของขอบเขตแหล่งชีวภาพ สามารถแบ่งออกเป็น ชั้นบรรยากาศ แหล่งน้ำ หรือภาคพื้นดิน ซึ่งรวมถึง พืช สัตว์ และราต่างๆ หรือในแหล่งที่มีการสะสมของน้ำตาล ตัวอย่างเช่น ผลไม้เน่าเสีย ใบไม้ ก้าน ราก และเกสรดอกไม้ เป็นต้น (Shurson, 2017) หรืออาจพบในลำไส้และของเสียของแมลงหรือสัตว์อื่นๆ นอกจากนั้นหากแบ่งตามแหล่งชีวภาพนั้นจะประกอบด้วย ชั้นผิวดิน ชั้นใต้ดิน ปากแม่น้ำ ทะเล และน้ำแข็ง (Starmer และ Lachance, 2010)

**2.1.2.1 ชั้นบรรยากาศ** ยีสต์เคยถูกค้นพบจากบนชั้นบรรยากาศ ซึ่งอาศัยนอกชั้นบรรยากาศโลกเป็นแหล่งรวมหรือเป็นพื้นที่ในการเจริญและสืบพันธุ์ ตัวอย่างเช่น red yeasts ที่ถูกค้นพบบนชั้น stratosphere บางงานวิจัยพบว่ายีสต์บางสายพันธุ์สามารถสืบพันธุ์ในอากาศ การที่พบยีสต์ในชั้นบรรยากาศนั้นเป็นไปได้โดยไม่ต้องสงสัย เนื่องจากโดยทั่วไปการแพร่พันธุ์ของยีสต์ ascomycetous จะอาศัยตัวนำพาอย่างเช่น แมลง ในการย้ายแหล่งที่อยู่ แต่ในขณะที่ยีสต์ basidiomycetous อาจใช้แมลง หรือใช้ ballistoconidia ในการแพร่พันธุ์ออกไปในชั้นบรรยากาศ ดังนั้นการแพร่กระจายพันธุ์ในยีสต์ basidiomycetous มากกว่าในยีสต์ ascomycetous (Starmer และ Lachance, 2010)

**2.1.2.2 แหล่งน้ำ** ยีสต์สามารถเอาชีวิตรอดในน้ำได้อย่างยอดเยี่ยม โดยในปี 1972 *Rhodotorula rubra* ถูกเคลื่อนย้ายออกไปนอกอวกาศในภารกิจ Apollo 17 โดยเซลล์ถูกเก็บในน้ำปราศจากเชื้อและถูกนำกลับเข้ามาในอีก 27 ปีให้หลัง ซึ่งพบว่าเซลล์ยังคงเจริญได้ นอกจากนี้เคยมีการคัดแยก *Rhodotorula* จากหินอัคนีในน้ำลึก 200 – 400 เมตร ในทะเล Baltic และ จากแกนกลางธารน้ำแข็งลึกที่ Greenland ณ ความลึกที่ 2000 เมตร จากผืนธารน้ำแข็ง ซึ่งยีสต์ในน้ำแข็งนี้สามารถดำรงชีวิตรอดภายใต้ น้ำแข็งที่มีสภาวะรุนแรงมากกว่า 140,000 ปี (Starmer และ Lachance, 2010)

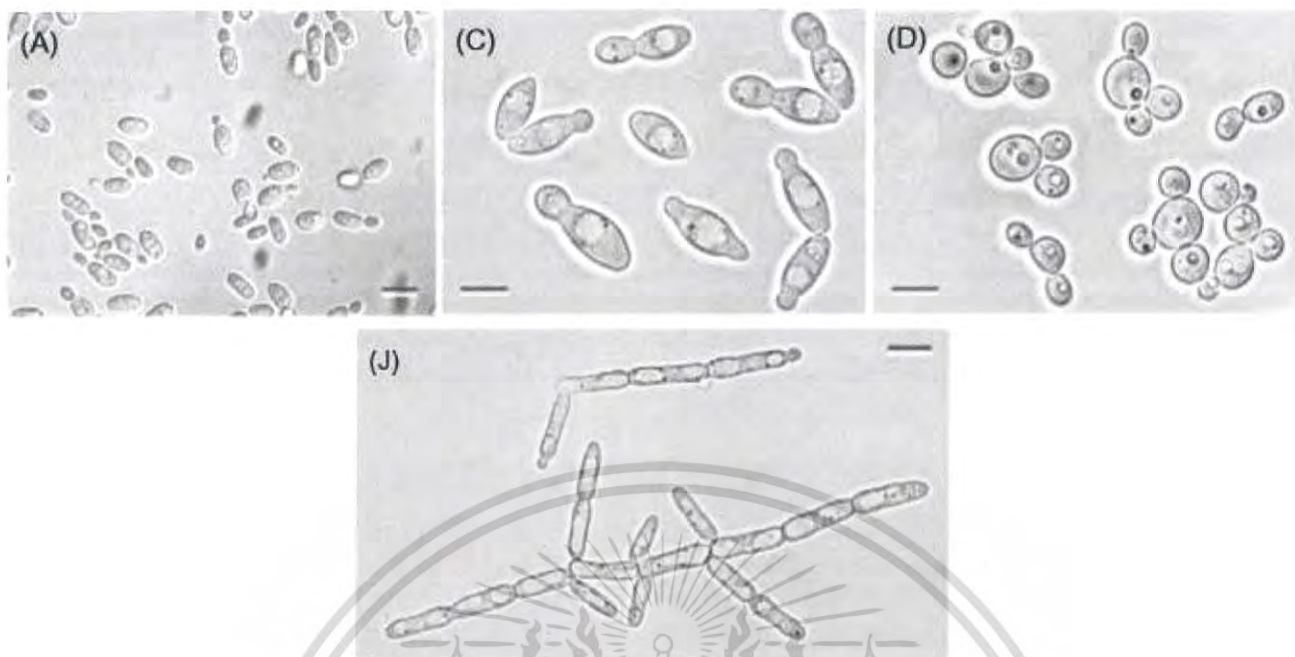
**2.1.2.3 ภาคพื้นดิน** พื้นดิน พืช เนื้อเยื่อ (ก้าน ดอก และผล) เป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารประกอบอินทรีย์และความชุ่มชื้น ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่ดีที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์ นอกจากนั้นน้ำในใบ ราก ดอก และลำต้นของต้นไม้ยังเป็นแหล่งที่อยู่ที่ดีของยีสต์ ยีสต์หลายชนิดสามารถพบได้ทั้งในพืชที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต และยังฟังพาลมและแมลงในการย้ายถิ่นและแพร่พันธุ์ (Starmer และ Lachance, 2010) นอกจากนั้นยังมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อปรับตัวหาแหล่งอาหารใหม่และขยายพันธุ์ต่อไป ในบริเวณเขตอบอุ่น ฤดูหลักของการขยายพันธุ์ คือ ช่วงหน้าร้อนจนถึงช่วงปลายฝน ในขณะที่เขตกึ่งโซนร้อน หรือ โซนร้อน จะมีการขยายพันธุ์ตลอดทั้งปี การปรับตัวและการรักษาชีวิตของยีสต์นั้นคือส่วนหนึ่งของวัฏจักรชีวิต ยีสต์จะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว โดยใช้แหล่งอาหารและเพิ่มจำนวนจากเซลล์ตั้งต้น ทำให้ยีสต์สามารถเติบโตได้อย่างรวดเร็ว ภายใน 1 – 2 ชั่วโมง ซึ่งขึ้นอยู่กับปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อมของแต่ละพื้นที่ โดยยีสต์จะเกิดการปรับตัวเมื่อยีสต์นั้นอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมเพื่อเอาชีวิตรอด (Becze, 1956)

ยีสต์สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เมื่อเจริญในสภาวะที่มีอากาศ ยีสต์จะเปลี่ยนออกซิเจนและน้ำตาลให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และพลังงาน โดยผ่านกระบวนการสร้างแบบใช้ออกซิเจน และเมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ เช่น ในการผลิตเครื่องดื่มและการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอล ยีสต์จะมีประสิทธิภาพในการเจริญน้อยลงเมื่ออยู่ในกระบวนการเหล่านี้ น้ำตาลจะถูกเปลี่ยนเป็นสารตัวกลาง ไดเอทานอลเป็นผลผลิต และได้คาร์บอนไดออกไซด์และ กลีเซอรอลเป็นผลพลอยได้ (Bekatorou และคณะ, 2006)

2.1.3 การสืบพันธุ์ แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ 1. การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งจะประกอบด้วย การสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบแตกหน่อและการสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ 2. การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศซึ่งพบในยีสต์ 2 กลุ่ม ได้แก่ 1. ยีสต์ Ascomycetous 2. ยีสต์ Basidiomycetous

2.1.3.1 การสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบแตกหน่อ นั้นอาจเกิดขึ้นได้ทั้งในยีสต์เซลล์เดี่ยว และยีสต์เส้นใย โดยหน่อจะเกิดจากการพัฒนาของรอยูนหรือส่วนที่งอกออกมาบนผิวของเซลล์ ขนาดของเซลล์ตั้งต้นจะยังคงเท่าเดิมหรือเล็กลงเล็กน้อยในขณะที่กำลังสร้างหน่อ ซึ่งหน่อก็จะมี การเพิ่มขนาดเพื่อให้กลายเป็นเซลล์ใหม่ (Robert, 2011) บริเวณของการแตกหน่อ นั้นผนังเซลล์ของยีสต์จะบางและยืดหยุ่น จากนั้นจะเริ่มโป่งออกเป็นทรงกลมเล็กๆ เรียกว่า หน่อหรือต้นกล้า โดยหน่อ นั้นจะโตขึ้นเรื่อยๆจนมีขนาดเท่ากับเซลล์ตั้งต้นและเซลล์ตั้งต้นจะกระตุ้นกระบวนการแตกหน่อต่อไป โดยระหว่างนั้นจะเกิดการแบ่งนิวเคลียส และส่วนต่างๆจากเซลล์ตั้งต้นให้กับเซลล์ลูก ส่งผ่านช่องทางเล็กๆระหว่างเซลล์ เมื่อกระบวนการเสร็จสมบูรณ์เซลล์จะหลุดเป็นอิสระจากกัน โดยทั้ง 2 เซลล์จะมีขนาดเซลล์และการเจริญเติบโตเต็มที่เท่ากัน ยกเว้นผนังเซลล์ ซึ่งเซลล์ลูกผนังเซลล์จะยังอ่อนกว่าเซลล์ตั้งต้น เมื่อเซลล์ลูกเกิดที่ขั้วของเซลล์แม่ขั้วใดขั้วหนึ่ง เรียกว่า polar เซลล์ลูกเกิดที่ทั้ง 2 ขั้วของเซลล์แม่ เรียกว่า bipolar และเซลล์ลูกเกิดที่หลายๆส่วนของเซลล์แม่ เรียกว่า multilateral ในขณะที่เซลล์กำลังจะแยกออกจากกัน ก็สามารถทำการแบ่งเซลล์ในเวลาเดียวได้อีก ทำให้มีการเพิ่มจำนวนแบบทวีคูณในขณะที่ยังเกาะกันเป็นกลุ่มคล้ายต้นไม้ บางกรณีบางหน่อที่มีขนาดเท่ากับเซลล์ตั้งต้น แต่เจริญเป็นรูปทรงยาวรีหรือรูปทรงยาวกลายเป็นเส้นใยเทียม (Becze, 1956) แสดงดังรูปที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



### รูปที่ 2.2 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อของยีสต์ Basidiomycetous

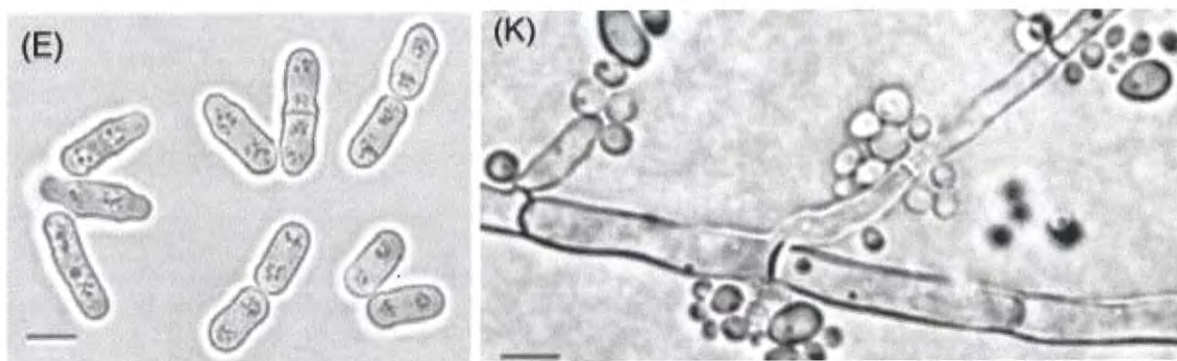
(A) Polar budding ของ *Cryptococcus mycelialis*, (C) Bipolar budding ของ *Hanseniaspora osmophila*, (D) Multilateral budding ของ *Pichia nakasei*, (J) Pseudohyphae ของ *Metschnikowia gruessii*

ที่มา: Robert, 2011

#### 2.1.3.2 การสืบพันธุ์ไม่อาศัยเพศแบบแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ เป็นรูปแบบการ

สืบพันธุ์ที่คล้ายกับการสืบพันธุ์ของแบคทีเรีย เซลล์ที่มีรูปทรงไข่หรือทรงกระบอก โดยมีการเจริญขยายความยาวออกมาจากแกนกลางเซลล์จนมีความยาวจากเดิมเป็น 2 เท่า ขณะที่กำลังโตออกไปในแนวยาว นิวเคลียสจะทำการแบ่งตัวและย้ายเข้าสู่เซลล์ทั้ง 2 เซลล์ ณ กลางเซลล์ทั้ง 2 เซลล์จะมีการสร้างผนังเซลล์กันเพื่อแบ่งเซลล์ตั้งต้นออกเป็นเซลล์ลูก 2 เซลล์เท่าๆกัน บางครั้งเซลล์ตั้งต้นอาจจะแบ่งนิวเคลียสก่อนที่จะสร้างผนังเซลล์กันเสร็จ และแบ่งออกเป็นเซลล์ใหม่ เซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้น 2 - 3 เซลล์หรือมากกว่านั้นจะอยู่รวมกันก่อนที่จะแยกออกไปเป็นเซลล์เดี่ยว ถ้าเซลล์ยืดยาวออกหลายครั้งและแต่ละเซลล์อยู่รวมกันในลักษณะปลายต่อปลายเหมือนเส้นด้าย จัดว่าเป็นลักษณะเส้นใยแท้ เมื่อเจริญเต็มที่เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม บางครั้งเส้นใยอาจเปลี่ยนเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับอาจารย์ใช้ในการเรียนการสอน ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.3 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบแบ่งตัวออกเป็น 2 เซลล์ของ *Schizosaccharomyces*

(E) Fission ของ *Schizosaccharomyces pombe*, (K) True (septate) hypha ของ *Candida ontarioensis*

ที่มา: Robert, 2011

2.1.3.3 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ Ascomycetous ระยะไม่โอซิสจะมีการสร้าง ascospore โครโมโซมแบบ haploid อยู่ในถุง ascus ยีสต์ Ascomycetous อาจมีการสืบพันธุ์ในลักษณะ homothallic หรือ heterothallic และมีโครโมโซมแบบ diploid หรือ haploid แต่บางครั้งก็เป็นได้ทั้งแบบ diploid และ haploid ในระยะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ แสดงดังรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบแบบอาศัยเพศของยีสต์ Ascomycetous

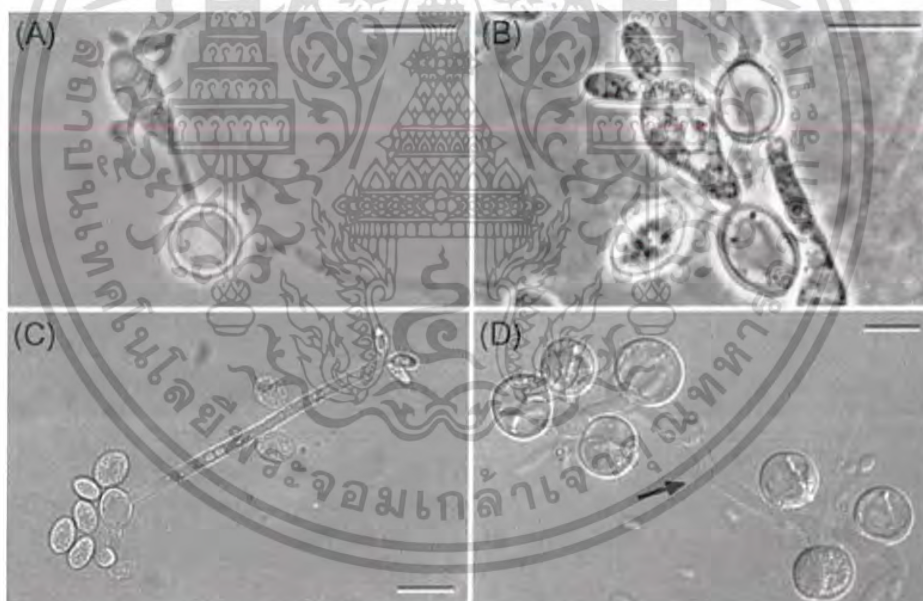
(A) Ascospores ทรงกลมที่อยู่ในถุง ascus ของ *Saccharomyces paradoxus*, (B) ascospores ทรงกลมและทรงหมวกที่อยู่ในถุง ascus ของ *Pichia membranifaciens*, (F) ascospores ทรงกลมผิวขรุขระ ที่อยู่ในถุง ascus ของ *Citeromyces siamensis*

ที่มา: Robert, 2011

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.4 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ Basidiomycetous อาจมีการสร้างระยะ budding haplophase, dikaryotic hyphal phase หรือ self-sporulating diplophase โดยในระยะ Septate dikaryotic hyphae จะมีการสร้าง clamp connection ซึ่งเป็นสัญลักษณ์ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ Basidiomycetous ซึ่งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ Basidiomycetous นั้นอาจจะมีการสืบพันธุ์ในลักษณะ homothallic หรือ heterothallic ใน heterothallic สามารถเป็น bipolar หรือ tetrapolar และหลังจากมีการเข้าคู่กันของเซลล์ก็จะมีการสร้าง dikaryotic hyphae ซึ่ง dikaryotic hyphae มีรูปร่างพองใหญ่ อุดมไปด้วยไขมัน clamped cells ในระยะ karyogamy จะมีลักษณะเรียงในแนวขวางคล้ายกำแพงหนา จึงเรียกเซลล์นี้ว่า probasidia

ใน homothallism ประกอบด้วย primary และ secondary homothallism ซึ่งสามารถพบ homothallic หรือ self-fertile ใน primary homothallism มี 1 นิวเคลียส และไม่มี clamp connections แต่ใน secondary homothallism จะพบ dikaryotic และมี clamp connections (Robert, 2011) แสดงดังรูปที่ 2.5



รูปที่ 2.5 ลักษณะการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศของยีสต์ Basidiomycetous

(A) Basidiospores บน basidium ที่มีผนังกันในแนวขวาง โดยสร้างจาก teliospore ของ *Sporidiobolus ruineniae*, (B) Basidiospores บน metabasidium ที่ไม่มีผนังกันโดยสร้างจาก teliospore ของ *Mrakia frigida*, (C) Basidiospores (ด้านขวาบน) บน elongated basidium ที่เกิดจาก cell bud mating ของ *Xanthophylomyces dendrorhous*, (D) Clamp connections บน hyphae โดยสร้างจาก teliospores ของ *Kwoniella mangroviensis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ที่มา: Robert, 2011  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2 เซลลูโลส

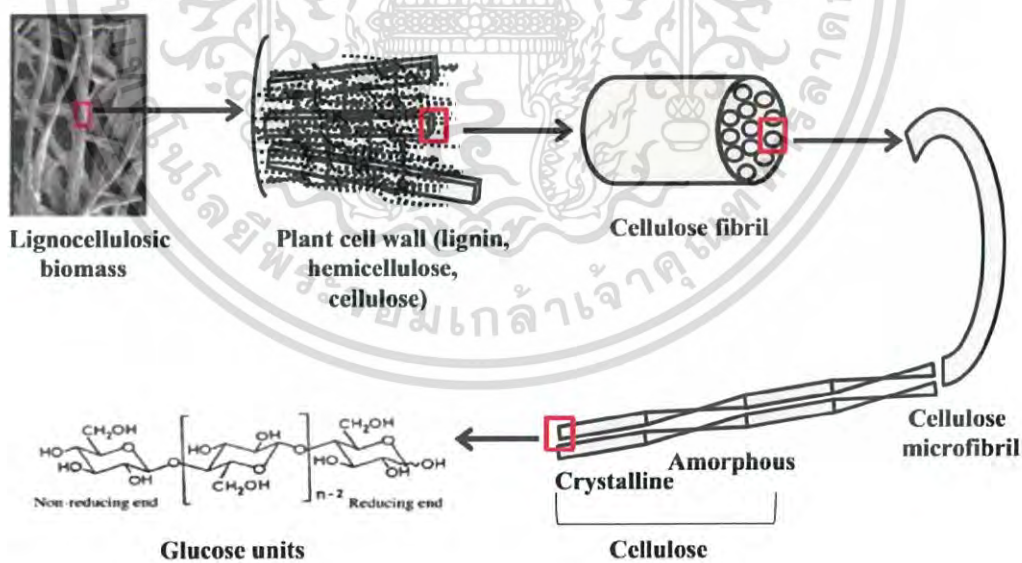
เซลลูโลส คือ ผลผลิตขั้นปฐมภูมิของการสังเคราะห์แสงในระบบนิเวศบนบกและเป็นผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ในระบบนิเวศ เป็นตัวช่วยลดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นบรรยากาศของโลก (Zhang และคณะ, 2006) แสดงดังรูปที่ 2.6 โครงสร้างของเซลลูโลส ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตเชิงซ้อน (homopolysaccharide) มีหน่วยย่อยคือ D-anhydro glucopyranose ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 glycosidic มีรูปแบบการเรียงตัวเป็นสายตรงที่ไม่มี การแตกแขนง (unbranched polymer) โดยจำนวนหน่วยย่อยที่มาต่อกันจะแตกต่างกันไปตามชนิดของพืช พบตั้งแต่ 200 ถึง 15,000 หน่วย โดยทั่วไปปริมาณเซลลูโลสในไม้เนื้อแข็งจะมีมากกว่าในไม้เนื้ออ่อน และยังมีความแตกต่างกันตามอายุของพืช การเปลี่ยนแปลงของผนังเซลล์ และชนิดของพืช เซลลูโลสพบมากที่บริเวณ secondary cell wall ประมาณร้อยละ 50 ของปริมาณเซลลูโลสทั้งหมด และที่บริเวณ primary cell wall ประมาณร้อยละ 10 ถึง 20 ของปริมาณเซลลูโลสทั้งหมด ในส่วนของ secondary cell wall นอกจากเซลลูโลสแล้วยังพบสารประกอบคาร์โบไฮเดรตชนิดอื่นที่เป็นองค์ประกอบร่วมของผนังเซลล์พืช ได้แก่ เฮมิเซลลูโลส และ เพคติน รวมทั้งลิกนิน หากพิจารณาภาพเป็นรูปแบบสามมิติของสาย  $\beta$ -1,4 linked glucopyranose พบว่ากลุ่มไฮดรอกซิล (-OH group) ไฮดรอกซีเมทิล (-CH<sub>2</sub>OH group) และพันธะ glycosidic จะอยู่ในแนวระนาบเดียวกัน พบว่าหน่วยย่อย D-anhydro glucopyranose ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นแบบ chair form มีประมาณร้อยละ 2 ของหน่วยย่อยที่อยู่ในรูป boat หรือ skew form และเนื่องจากสายของกลูแคน (glucan) นี้มีผิวหน้าส่วนใหญ่เป็นไฮโดรเจนอะตอม จึงทำให้สายกลูแคน (glucan) มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และการต่อกันด้วยพันธะ  $\beta$ -1,4 glycosidic จึงเกิดแรงทำให้สายกลูแคน (glucan) มีการหมุนบิด (rotate) ตัวได้ 180 องศารอบแกน ทำให้แต่ละสายมีรูปร่างลักษณะที่เปรียบเสมือนแผ่นริบบิ้น (flat ribbin) และสายกลูแคน (glucan) แต่ละสายจะมาเรียงต่อกันเป็นไมโครไฟบริล (microfibril) เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างกลุ่มไฮดรอกซิล (-OH group) ของคาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนในวงแหวนของโมเลกุลหน่วยย่อยในสายถัดไป นอกจากนี้ยังพบพันธะไฮโดรเจนของคาร์บอนตำแหน่งที่สองในหน่วยย่อยของสายที่หนึ่งกับคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 ของหน่วยย่อยในอีกสายหนึ่งด้วย สายของ  $\beta$ -1,4 linked glucan ที่ขนานกันและยึดกันอยู่ด้วยพันธะไฮโดรเจนจำนวนมาก ซึ่งมีส่วนช่วยทำให้โครงสร้างของเซลลูโลสซับซ้อนและยากต่อการย่อยสลายมากยิ่งขึ้น (Nisizawa, 1973)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลโดยใช้วิธีการ X-ray diffraction พบการจัดเรียงตัว 2 แบบ ได้แก่ การจัดเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบเรียกว่า crystalline ซึ่งมีปริมาณร้อยละ 50 - 90 ของเซลลูโลสทั้งหมด ส่วนที่เหลือเป็นการจัดเรียงของไมโครไฟบริลที่มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบเรียกว่า amorphous (Fan และ Lee, 1983) การจัดเรียงตัวที่แตกต่างกันของไมโครไฟบริลมีผลต่อการเข้าทำปฏิกิริยาของเอนไซม์ ทำให้อัตราในการย่อยสลายเซลลูโลสในแต่ละบริเวณมีความแตกต่างกัน โดยส่วนที่เป็น amorphous จะถูกย่อยสลายได้ง่ายกว่าส่วนที่เป็น crystalline จากข้อมูลข้างต้นสามารถจัดจำแนกโครงสร้างของเซลลูโลสได้ 3 แบบดังนี้

1. Fringe micelle ประกอบด้วยส่วนที่เป็น crystalline และส่วนที่เป็น amorphous
2. โครงสร้างของเซลลูโลสที่ม้วนหรือพับไปตามแกนของเส้นใยเซลลูโลส
3. โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นริบบิ้นและม้วนเป็นเกลียว (Goksoyr และ Eriksen, 1980)

จากลักษณะโครงสร้างของเซลลูโลสทำให้เส้นใยเซลลูโลสละลายน้ำได้ยาก ดังนั้นในการนำชีวมวลมาใช้สำหรับผลิตไบโอเอทานอล จึงต้องมีการทำให้ขนาดของชีวมวลเล็กลงแล้วจึงแยกเอาเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกด้วยการให้ความร้อนด้วยไอน้ำเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างให้ย่อยง่ายขึ้น และนำมาทำปฏิกิริยากับกรดหรือเอนไซม์เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลแล้วจึงนำเข้าสู่กระบวนการหมักจนได้แอลกอฮอล์



รูปที่ 2.6 โครงสร้างของเส้นใยเซลลูโลส

ที่มา: Kuhad และคณะ, 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.2.1 การย่อยสลายเซลลูโลส

เซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น การนำเซลลูโลสไปใช้ในอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษและกระดาษ อุตสาหกรรมสิ่งทอ และ การผลิตไบโอเอทานอล เป็นต้น สำหรับเซลลูโลสที่นำไปใช้ในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอล ต้องนำเซลลูโลสไปย่อยสลายให้มีโมเลกุลเล็กลงหรือย่อยจนได้เป็นน้ำตาลกลูโคสเพื่อที่จะนำไปใช้ในกระบวนการต่างๆต่อไป สำหรับการย่อยสลายเซลลูโลสทำได้หลายวิธี เช่น การย่อยสลายด้วยวิธีทางเคมี การย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์ และการย่อยสลายด้วยวิธีทางกายภาพ (Sun และ Cheng, 2002)

### 2.2.1.1 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธีทางกายภาพ

เป็นกระบวนการลดขนาดอนุภาคของวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อให้ง่ายต่อการนำไปย่อยสลายและเพิ่มอัตราส่วนของพื้นผิวต่อปริมาตร ซึ่งทำได้โดยการสับ โม่ หรือ การบด การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพนี้จะใช้ก่อนกระบวนการหมักเพื่อให้ได้ขนาดอนุภาคที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ (Harmsen และคณะ, 2010)

2.2.1.2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยวิธีทางเคมี แบ่งเป็น 2 วิธี ได้แก่ 1. การย่อยด้วยกรด 2. การย่อยด้วยด่าง

2.2.1.2.1 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยกรด (acid hydrolysis) มีวิธีการ 2 ขั้นตอน คือ ในขั้นแรกจะใช้กรดเข้าไปทำลายโครงสร้างของเซลลูโลส โดยที่กรดจะเป็น swelling agent ทำให้เซลลูโลสพองตัว และในขั้นตอนที่ 2 เป็นการเติมน้ำเพื่อเจือจางความเป็นกรดลงจากนั้นให้ความร้อน เซลลูโลสจะถูกตัดเป็นโมเลกุลเล็กๆซึ่งก็คือน้ำตาล กรดที่นิยมใช้ ได้แก่ กรดซัลฟูริกเข้มข้นร้อยละ 72 โดยมวลต่อปริมาตร กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 41 โดยมวลต่อปริมาตร และ กรดฟอสฟอริกเข้มข้นร้อยละ 80 โดยมวลต่อปริมาตร แต่การย่อยสลายด้วยกรดไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากปฏิกิริยาการย่อยไม่มีความจำเพาะเจาะจง ในบางครั้งก่อให้เกิดปฏิกิริยาอื่นๆ เช่น ปฏิกิริยาการตั้งน้ำ ปฏิกิริยาการย่อยสลายน้ำตาลเกิดเป็นผลิตภัณฑ์อื่นเป็นต้น และกรดที่ใช้ยังกัดกร่อนอุปกรณ์ต่างๆ นอกจากนี้ระหว่างการทำปฏิกิริยาจะมีสารพิษเกิดขึ้น ได้แก่ สารประกอบเฟอร์ฟูรัล (furfural) และอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรัล (furfural) การแก้ปัญหาโดยการปรับสภาพให้เป็นกลางและการกำจัดสารพิษที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการมีผลให้เสียเวลาและค่าใช้จ่าย (Chen, 2007)

2.2.1.2.2 การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยด่าง (alkaline pretreatment) เพื่อทำลายโครงสร้างของลิกนินทำให้ปฏิกิริยาการย่อยสลายได้ผลิตภัณฑ์เป็นโพลีแซคคาไรด์และยังเป็นการนำหมู่อะซิetyl (acetyl) ออกและแทนที่ด้วยกรดยูโรนิกในโครงสร้างของเอมิเซลลูโลส (Chang

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า และ Holtzapple, 2000) ต่างที่นิยมใช้ได้แก่ โซเดียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ และ โซเดียมซัลไฟด์ เป็นต้น การใช้ด่างในการปรับสภาพนั้น จะช่วย

ทำลายลิกนินได้ดีเนื่องจากลิกนินละลายในต่าง แต่จะทำให้โครงสร้างของลิกนินเกิดการเปลี่ยนแปลงได้น้ำตาลในปริมาณน้อยและใช้เวลามาก (Chang และ Holtzaple, 2000)

### 2.2.1.3 การย่อยสลายเซลลูโลสโดยใช้เอนไซม์

ปฏิกิริยาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์จะเกิดขึ้นอย่างช้าๆแต่เป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะเจาะจง ซึ่งเอนไซม์จะไม่ทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ปะปนมา ผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงมีความบริสุทธิ์สูง และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นไม่รุนแรง ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้จึงไม่ถูกทำปฏิกิริยาต่อไป โดยเอนไซม์เซลลูเลส คือ เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสที่พันธะ  $\beta$  - 1, 4 glycosidic โดย ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดที่ทำงานร่วมกัน ได้แก่ เอนไซม์เอ็นโดกลูโคเนส (EC 3.2.1.4) เซลโลไบโอดีโรเลส (ย่อยสลายทางด้านปลายอนรีติวซิงซูการ์) (EC 3.2.1.74) และ เซลโลไบโอดีโรเลส (ย่อยสลายทางด้านปลายรีติวซิงซูการ์) (EC 3.2.1.91) และ  $\beta$ -กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) (Arantes และคณะ, 2010)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 เอนไซม์เซลลูเลส

เซลลูเลส (EC 3.2.1) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในหลากหลายอุตสาหกรรม ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จากจุลินทรีย์ เช่น แอคติโนมัยซีท (Ariffin และคณะ, 2006) แบคทีเรีย รา (Juturu และ Wu, 2014) และยีสต์ (Fujita และคณะ, 2004) เซลลูเลสมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการย่อยเซลลูโลสให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยเซลลูเลสจะย่อยบริเวณพันธะ  $\beta$  - 1,4 linkages ที่เชื่อมต่อยู่ในสายเซลลูโลส โดยธรรมชาติแล้วเอนไซม์เซลลูเลสจะประกอบด้วย เอ็นโดกลูโคเนส (EC 3.2.1.4) เซลโลไบโอไฮโดรเลส (ย่อยสลายทางด้านปลายอนรีติวซิงซูการ์) (EC 3.2.1.74) และ เซลโลไบโอไฮโดรเลส (ย่อยสลายทางด้านปลายปลายรีติวซิงซูการ์) (EC 3.2.1.91) และ  $\beta$ -กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) (Behera และ Ray, 2016) และ  $\beta$ -กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) ซึ่งต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์เซลลูเลสทั้ง 3 ชนิดจึงจะทำให้สามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้สำเร็จ (Srivastava และคณะ, 2017) เซลโลไบโอเอส คือ ผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการสลายของเอนไซม์เซลโลไบโอไฮโดรเลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่หายากมาก แต่เซลโลไบโอเอสเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์สูง เมื่อเอนไซม์  $\beta$ -กลูโคซิเดส สลายเซลโลไบโอเอสได้ กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์ ส่งผลให้เซลโลไบโอเอสเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์มีปริมาณลดลงและได้น้ำตาลที่ใช้ในการหมักเพิ่มขึ้น (Holtzapfle และคณะ, 1990) และมีการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าโครงสร้างเป็นไกลโคโปรตีนที่ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในอัตราส่วนแบบ 1 ต่อ 1 และมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 30,000 - 60,000 ดาลตัน สามารถละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการโคแฟกเตอร์ในการทำปฏิกิริยา ซึ่งเอนไซม์เซลลูเลสที่ได้มาจากจุลินทรีย์นั้นจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำปฏิกิริยาอยู่ที่ 50 องศาเซลเซียส ยกเว้นในจุลินทรีย์บางชนิดที่ทนร้อนได้ นอกจากนี้เอนไซม์เซลลูเลสยังสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงและทนต่อความเป็นกรดต่างได้ในช่วงพีเอช 4.8 - 8.0 สามารถเก็บเอนไซม์ไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 และ 4 องศาเซลเซียสได้เป็นเวลาหลายปี หรืออาจเก็บโดยวิธีแช่แข็ง (freeze dry) หรือตกตะกอนด้วยอะซิโตนหรือเอทานอล โดยจะไม่ทำให้เกิดการสูญเสียคุณสมบัติของเอนไซม์ (พรเทพ, 2538)

เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่มีราคาค่อนข้างสูงและยังเป็นเอนไซม์สำคัญที่ช่วยลดต้นทุนให้แก่อุตสาหกรรมพลังงานและเคมีชีวภาพ ซึ่งเซลลูเลสเป็นกลยุทธ์พื้นฐานที่จะทำให้กระบวนการการผลิตของอุตสาหกรรมพลังงานและเคมีชีวภาพประหยัดมากขึ้น เช่น ใช้เอนไซม์กับวัตถุดิบที่มีราคาถูก ใช้เอนไซม์กับกระบวนการที่มีความเสถียรและจำเพาะสูงได้ และใช้เอนไซม์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะสูงกับวัตถุดิบที่เป็นของแข็ง (Zhang และคณะ, 2006) เซลลูเลสสามารถนำไปใช้ได้หลากหลายอุตสาหกรรม เช่น อาหาร สิ่งทอ นอกจากนี้ยังนำเซลลูเลสมาใช้ในการหมักชีวมวลให้ได้เป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ หากแต่ในกรณีที่เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์เป็นปัญหาที่ร้ายแรงในกระบวนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำขึ้นเพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่ควรนำข้อมูลไปใช้โดยไม่ผ่านการอนุญาต  
ไม่ว่าในรูปแบบใดก็ตาม การเกิดภาวะติดขัดข้อบกพร่องที่ร้ายแรงในกระบวนการหมักไปโอเอทานอล เบ็คทีเรียจะใช้

เข้าไปใช้สารอาหารที่สำคัญต่อกระบวนการผลิต และส่งผลให้เกิดผลิตผลนั้นเป็นพิษไปด้วย (Spyridon และคณะ, 2016) เนื่องจากเซลลูเลสสามารถนำไปใช้ได้หลากหลายอุตสาหกรรม จึงถูกจัดให้เป็นเอนไซม์ที่มีความโดดเด่นสำหรับกลุ่มนักวิจัยและพัฒนาโดยนักวิชาการและกลุ่มอุตสาหกรรม (Khoshnevisan และคณะ, 2017) ในตารางที่ 2.1 แสดงตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติ เช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์สายพันธุ์ปกติที่สามารถผลิตเอนไซม์ Exoglucanase Endoglucanase และ  $\beta$ -glucosidase ได้ และตารางที่ 2.2 แสดงข้อมูลตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ เช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์ ที่มีการนำยีนของจุลินทรีย์เหล่านี้มาทำการปรับปรุงสายพันธุ์ให้กับจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่เป็นสายพันธุ์ปกติเพื่อให้เกิดการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส เช่น Exoglucanase Endoglucanase และ  $\beta$ -glucosidase โดยรวบรวมข้อมูลจากหลายๆงานวิจัย



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

ชนิดจุลินทรีย์	ชื่อ	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมจำเพาะของ เอนไซม์เซลลูเลส (หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ที่มา
แบคทีเรีย	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> DL-3	Endoglucanase	100.0±8.6	Lee และคณะ (2008)
	<i>Bacillus</i> sp. CDB30	Endoglucanase	9.3	Shaikh และคณะ (2013)
	<i>Pseudomonas</i> sp. CDB27	Endoglucanase	6.97	
	<i>Bacillus pumilus</i> EB3	Endoglucanase	1.77	Ariffin และคณะ (2006)
รา	<i>Trichoderma viride</i> CSI32	Endoglucanase	16.1	Stevens และ Payne (1977)
	<i>Trichoderma viride</i> CSI2	Endoglucanase	12.9	
	<i>Myrothecium verrucaria</i> IMI4554I	Endoglucanase	9.7	
	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Endoglucanase	4.51	Chi และคณะ (2009)
	<i>Trichoderma</i> sp. FD4	Endoglucanase	1.23±0.01	Ja'afaru (2013)
	<i>Trichoderma viride</i> FD18	Endoglucanase	0.85±0.04	
	<i>Aspergillus ustus</i> FS48	Endoglucanase	0.65±0.01	

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

ชนิดจุลินทรีย์	ชื่อ	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมจำเพาะของ เอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ที่มา
ยีสต์	<i>Cryptococcus laurentii</i> UFLA AMS 95.1B	$\beta$ -glucosidase	24.61 $\pm$ 2.05	Souza และคณะ (2013)
	<i>Cryptococcus laurentii</i> UFLA CES 523	$\beta$ -glucosidase	18.89 $\pm$ 2.05	
	<i>Cryptococcus laurentii</i> UFLA AMS 98.1	$\beta$ -glucosidase	18.38 $\pm$ 1.01	
	<i>Cryptococcus laurentii</i> UFLA AMS 99.2	$\beta$ -glucosidase	16.37 $\pm$ 1.72	Souza และคณะ (2013)
	<i>Cryptococcus laurentii</i> UFLA CES 526	$\beta$ -glucosidase	10.11 $\pm$ 1.63	
	<i>Trichosporon pullulans</i> CBS2532	Endoglucanase	10	Stevens และ Payne (1977)
	<i>Trichosporon pullulans</i> C35	Endoglucanase	8	
	<i>Trichosporon cutaneum</i> G3I	Endoglucanase	7.9	
	<i>Trichosporon cutaneum</i> GI	Endoglucanase	7.4	
	<i>Trichosporon cutaneum</i> GI24	Endoglucanase	5	
<i>Trichosporon cutaneum</i> YI	Endoglucanase	4.8		
<i>Trichosporon cutaneum</i> GI42	Endoglucanase	3.4		

ตารางที่ 2.1 (ต่อ) ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

ชนิด จุลินทรีย์	ชื่อ	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ที่มา
ยีสต์	<i>Trichosporon pullulans</i> CBS2533	Endoglucanase	3.2	Stevens และ Payne (1977)
	<i>Cystobasidium oligophagum</i> JRC1	Endoglucanase	2.27	Vyas และ Chhabra (2017)
	<i>Trichosporon cutaneum</i> RHY59	Endoglucanase	2	Stevens และ Payne (1977)
	<i>Trichosporon pullulans</i> CBS2536	Endoglucanase	1.5	
	<i>Trichosporon pullulans</i> CBS2543	Endoglucanase	1.5	
	<i>Trichosporon cutaneum</i> YI6	Endoglucanase	1.3	
	<i>Cystobasidium oligophagum</i> JRC1	Exoglucanase	1.26	Vyas และ Chhabra (2017)
	<i>Trichosporon cutaneum</i> YI2	Endoglucanase	1	Stevens และ Payne (1977)
	<i>Cystobasidium oligophagum</i> JRC1	$\beta$ -glucosidase	0.98	Vyas และ Chhabra (2017)
	<i>Rhodotorula glutinis</i>	$\beta$ -glucosidase	0.649	Rani และคณะ (2015)

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ให้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

ชนิด จุลินทรีย์	จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	จุลินทรีย์ที่ไม่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ที่มา
แบคทีเรีย	<i>Azoarcus</i> sp. BH72	<i>Escherichia coli</i>	Exoglucanase	30	Juturu และ Wu (2014)
	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i> DSM 8903	<i>Escherichia coli</i> ER2566	$\beta$ -Glucosidase	13	Kuhad และคณะ (2016)
	<i>Clostridium thermocellum</i>	<i>Escherichia coli</i>	Endoglucanase	3.5	
	<i>Martilella mediterranea</i>	<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	Endoglucanase	1.6	
รา	<i>Aspergillus fumigatus</i> Z5	<i>Pichia pastoris</i>	$\beta$ -Glucosidase	101.775.2	Juturu และ Wu (2014)
	<i>Phanerochaete chrysosporium</i>	<i>Pichia pastoris</i>	$\beta$ -Glucosidase	52	Kuhad และคณะ (2016)
	<i>Trametes versicolor</i>	<i>Pichia pastoris</i>	$\beta$ -Glucosidase	17.3	
	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Exoglucanase	3.81	Juturu และ Wu (2014)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ปรับปรุงสายพันธุ์ให้สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

ชนิด จุลินทรีย์	จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	จุลินทรีย์ที่ไม่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ที่มา
รา	<i>Neocallimastrix</i> sp	<i>Escherichia coli</i> EC100	Endoglucanase	2.06	Kuhad และคณะ (2016)
	<i>Trichoderma reesei</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Endoglucanase	0.1	
ยีสต์	<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	<i>Pichia pastoris</i>	Endoglucanase	4.36	Juturu และ Wu (2014)

### 2.3.1 ชนิดของเซลลูเลส

2.3.1.1 เอ็นโดกลูโคเนส (EC 3.2.1.4) (Zhang และ Zhang, 2013) จะตัดที่พันธะ  $\beta$  - 1, 4 glycosidic แบบสุ่มที่บริเวณโครงสร้างที่เรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบ (amorphous cellulose) ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้น (อรัญ, 2555) ที่มีปลายสายรีดิวซิงซูการ์และนอนรีดิวซิงซูการ์ แต่อย่างไรก็ตาม การทำงานของเอ็นโดกลูโคเนส ก็ขึ้นอยู่กับความสามารถในการสลายโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส (Srivastava และคณะ, 2017)

2.3.1.2 เซลโลไบโอไฮดรเลส (ย่อยสลายทางด้านปลายปลายรีดิวซิงซูการ์) (EC 3.2.1.91) จะตัดเข้าพันธะ  $\beta$  - 1, 4 glycosidic ของเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นที่ปลายสายรีดิวซิงซูการ์ ทำให้ได้เซลโลไบโอสเป็นผลิตภัณฑ์ และเซลโลไบโอไฮดรเลส (ย่อยสลายทางด้านปลายปลายนอนรีดิวซิงซูการ์) (EC 3.2.1.74) จะตัดเข้าพันธะ  $\beta$  - 1, 4 glycosidic ของเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นที่ปลายสายนอนรีดิวซิงซูการ์ ทำให้ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งเซลโลไบโอไฮดรเลสสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเซลลูโลสมีขนาดเล็ก (Zhang และ Zhang, 2013)

2.3.1.3  $\beta$ -กลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) นั้นจะเข้าไปตัดพันธะ  $\beta$  - 1, 4 glycosidic ของเซลโลไบโอส หรือ พันธะ  $\beta$  - 1, 4 glycosidic ของเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์สายสั้นทำให้ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์ (Srivastava และคณะ, 2017) เพื่อที่จะกำจัดเซลโลไบโอสที่เป็นตัวยับยั้ง (Zhang และคณะ, 2006) ต่อการทำงานของเอ็กโซกลูโคเนสและเอ็นโดกลูโคเนส (Zhang และ Zhang, 2013)

## 2.4 ลิพิดและไขมัน

ลิพิด (lipid) คือ สารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดและยังมีบทบาทสำคัญในการใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของร่างกายมนุษย์และสัตว์ ได้แก่ ไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ที่ประกอบไปด้วยกรดไขมัน (fatty acid) และ กลีเซอรอล (glycerol) เป็นต้น (นัยนา, 2553)

### 2.4.1 จำแนกประเภทของลิพิด

ลิพิดสามารถจำแนกได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ๆ ได้แก่ ลิพิดอย่างง่าย (simple lipid) ลิพิดเชิงประกอบ (compound lipid) อนุพันธ์ของลิพิด (derived lipid) (นัยนา, 2553)

2.4.1.1 ลิพิดอย่างง่าย (simple lipid) คือ ลิพิดที่เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมัน (fatty acids) กับแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. ไขมัน (fat) และน้ำมัน (oil) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับกลีเซอรอล (glycerol) ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ถ้าอยู่ในสถานะที่เป็นของเหลวจะ เรียกว่า น้ำมัน แต่ถ้าอยู่ในรูปของแข็งจะเรียกว่า ไขมัน

2. แวกซ์ หรือไข (waxes) เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงๆ โดยที่ไม่ใช่กลีเซอรอล เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ จะมีลักษณะเป็นของแข็งเมื่อเย็นและจะอ่อนตัวลงเมื่อได้รับความร้อน เช่น ขี้ผึ้ง

2.4.1.2 ลิพิดเชิงประกอบ (compound lipid) คือลิพิดที่เป็นเอสเทอร์ของกรดไขมันกับแอลกอฮอล์และสารอื่น แบ่งออกเป็น 3 ชนิดใหญ่ๆ ได้แก่

1. ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) ประกอบด้วย กรดไขมัน แอลกอฮอล์และกรดฟอสฟอริก บางครั้งอาจจะพบเบสที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบรวมอยู่ด้วย เช่น กลีเซอโรฟอสโฟลิพิด (glycerophospholipids) และ สฟิงโกฟอสโฟลิพิด (sphingophospholipids)

2. ไกลโคลิพิด (glycolipids) เป็นลิพิดที่ประกอบด้วยกรดไขมัน สฟิงโกไซด์ และคาร์โบไฮเดรต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ลิพิดเชิงประกอบชนิดอื่นๆ เช่น ลิโปโปรตีน (lipoproteins) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของลิพิดและโปรตีน หรือ ซัลโฟลิพิด (sulfolipids) เป็นสารประกอบเชิงซ้อนของลิพิดและซัลเฟอร์ เป็นต้น

2.4.1.3 อนุพันธ์ของลิพิด (derived lipid) คือ เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการย่อยสลายของลิพิดอย่างง่าย หรือ ลิพิดเชิงประกอบ ได้แก่ กรดไขมัน มอนอเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol) และไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) เป็นต้น

#### 2.4.2 กรดไขมัน (fatty acids)

กรดไขมัน คือ กรดอะลิฟาติกคาร์บอกซิลิก (aliphatic carboxylic acid) ที่มีสายของไฮโดรคาร์บอนสายยาวขนาดต่างๆกัน มีสูตรโครงสร้างโดยทั่วไปเป็น R-COOH โดย R คือสายไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันที่พบในไขมันและน้ำมัน ตามธรรมชาติลิพิดชนิดต่างๆจะอยู่ในรูปของเอสเทอร์ (ester) ส่วนกรดไขมันที่พบในพลาสติก จะอยู่ในรูปเสรีโดยจับอยู่กับอัลูมิเนียม กรดไขมันมักมีโครงสร้างเป็นสายตรง ไม่แตกแขนงและมีคาร์บอนเป็นแบบสายคู่ ซึ่งไฮโดรคาร์บอนของกรดไขมันอาจจะมีพันธะคู่หรือไม่มีก็ได้ ทำให้สามารถแบ่งกรดไขมันออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆคือ กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid)

#### 2.4.3 คุณสมบัติของกรดไขมัน

2.4.3.1 ลักษณะทางกายภาพของกรดไขมันขึ้นอยู่กับความยาวของสายไฮโดรคาร์บอนและความอิ่มตัวหรือไม่อิ่มตัว โดยปกติแล้วจุดหลอมเหลวของกรดไขมันจะแปรผันตรงตามความยาวของสายไฮโดรคาร์บอน ในและจะแปรผกผันกับความไม่อิ่มตัวของกรดไขมัน ซึ่งในกรดไขมันที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่จะมีจุดหลอมเหลวสูงกว่ากรดไขมันที่มีขนาดเล็ก และในกรดไขมันที่อิ่มตัวจะมีจุดหลอมเหลวสูงกว่ากรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว เช่น น้ำมันพืชซึ่งเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวมีพันธะคู่อยู่ในโมเลกุลจะยังคงสภาพเป็นของเหลวแม้ว่าจะมีอุณหภูมิลดลงถึง 4 องศาเซลเซียสก็ตาม

2.4.3.2 กรดไขมันที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ส่วนมากจะเป็นประเภทที่ไม่อิ่มตัว เนื่องจากในเยื่อหุ้มเซลล์มีความจำเป็นที่จะต้องประกอบด้วยไขมันที่มีสถานะสภาพเป็นของเหลว เพื่อทำหน้าที่ทางชีวภาพได้ โดยไขมันที่เป็นองค์ประกอบของลิพิดจะถูกเก็บสะสมเป็นพลังงานสำรอง จึงมี

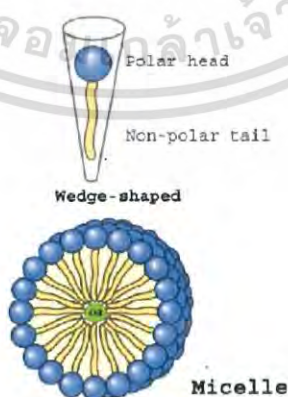
เอกสารนี้มีความอ้อมตัวมากกว่าที่พบในเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.3.3 กรดไขมันไม่อิ่มตัว มีการจัดเรียงตัวตรงตำแหน่งพันธะคู่ ได้ 2 แบบ คือ รูปแบบ Cis และ Trans กรดไขมันแบบ Trans จะมีจุดหลอมเหลวสูงกว่าแบบ Cis และกรดไขมันไม่อิ่มตัวเกือบทั้งหมดจะมีโครงสร้างแบบ Cis-form

2.4.3.4 กรดไขมันไม่สามารถดูดกลืนแสงในช่วง visible light และ near ultraviolet light ได้ แต่ถ้านำโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) เข้ามาช่วย และให้ความร้อนกับกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะ สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนพันธะ จากพันธะคู่ให้เป็นแบบคอนจูเกต (conjugated double bond,  $-\text{CH}=\text{CHCH}=\text{CH}-$ ) ซึ่งสามารถดูดกลืนแสงได้ใน ช่วงคลื่นแสง 230-260 นาโนเมตร จึงถูกนำมาใช้เป็นวิธีหาปริมาณของกรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีพันธะคู่มากกว่า 1 พันธะได้

2.4.3.5 กรดไขมัน สามารถเติมธาตุหมู่ฮาโลเจน (halogen) เช่น ไอโอดีน หรือคลอรีน ลงในพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวได้ โดยที่กรดไขมันในสิ่งมีชีวิตจะอยู่ในรูปของเอสเทอร์ (ester) หรือ เอไมด์ (amide) ซึ่งกรดไขมันอิสระมีค่า  $\text{pKa}$  ประมาณ 4.85 จึงสามารถแตกตัวได้ที่ physiological pH และสามารถใช้อิทธิพลจำนวนพันธะคู่ในกรดไขมันหรือลิปิดได้

2.4.3.6 โครงสร้างของกรดไขมันมี 2 ส่วน คือส่วนที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ บริเวณหมู่คาร์บอกซิลและส่วนที่ไม่ละลายน้ำ ได้แก่ ส่วนของสายไฮโดรคาร์บอน เมื่อนำกรดไขมันมาเขย่ากับน้ำ กรดไขมันจะกระจายตัวเป็นหยดน้ำมันเล็กๆ ในน้ำ โดยกรดไขมันจะหันส่วนที่ไม่มีขั้วไว้ด้านใน และเอาส่วนที่มีขั้วไว้ด้านนอกเพื่อสัมผัสกับน้ำ การฟอร์มตัวแบบนี้เรียกว่า ไมเซลล์ (micelle) แสดงดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 การฟอร์มตัวของกรดไขมันในรูปแบบของไมเซลล์ (micelle)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ที่มา: Nelson และ Cox, 2000  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.4 การจำแนกชนิดของกรดไขมัน สามารถจำแนกตามโครงสร้างได้ 2 ชนิด ดังนี้ แสดงดังรูปที่ 2.8

2.4.4.1 กรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่มีโครงสร้างอะตอมคาร์บอนและไฮโดรเจนเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเดี่ยวตลอดสาย กรดไขมันอิ่มตัวที่มีมากที่สุด ในธรรมชาติ คือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid: C16) รองลงมา คือ กรดสเตียริก (stearic acid: C18) ซึ่งกรดไขมันเหล่านี้ร่างกายได้รับจากอาหารหรือสังเคราะห์ขึ้นได้เอง

2.4.4.2 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acids) เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่อยู่บนโครงสร้างคาร์บอน ตรงตำแหน่งพันธะคู่ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีโครงสร้าง 2 แบบ คือแบบ cis และ trans ส่วนใหญ่กรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีพันธะคู่อยู่ในรูปแบบ cis ในธรรมชาติจะพบกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากที่สุดและมักพบว่าพันธะคู่จะอยู่ระหว่างอะตอมของคาร์บอนที่ 9 หรือ 10 (Mapato และคณะ, 2010) โดยกรดไขมันไม่อิ่มตัวจำแนกออกได้เป็น 2 ชนิด ตามลักษณะของโครงสร้างและจำนวนพันธะคู่ ดังนี้

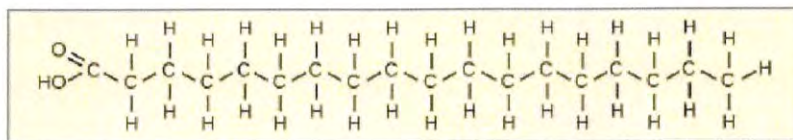
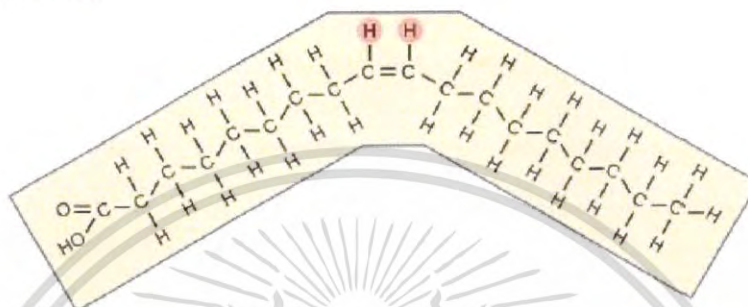
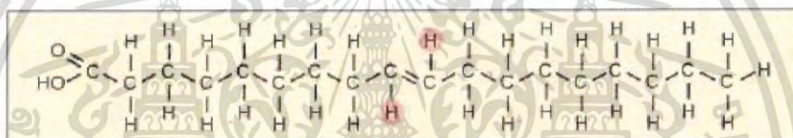
1. กรดไขมันที่มีพันธะคู่ 1 พันธะ (monounsaturated fatty acids) กรดไขมันที่มีมากที่สุดในร่างกาย คือ กรดปาล์มิโทเลอิก (palmitoleic, C16:1) และกรดโอเลอิก (oleic acid, C18:2) จากการศึกษาวิจัยของ Mapato และคณะ 2010 พบว่า การเสริมน้ำมันมะพร้าวที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบอยู่ โดยทำการเสริมที่ระดับ 3% ในสูตรอาหารเข้มข้น สามารถเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำมันในโคนมได้

2. กรดไขมันที่มีมากกว่า 1 พันธะคู่ (polyunsaturated fatty acids) เป็นกลุ่มที่มีพันธะคู่มากกว่า 2 พันธะขึ้นไป โดยปกติพันธะคู่ของกรดไขมันจะไม่อยู่ชิดกัน ซึ่งจะมีหมู่ methylene (-CH<sub>2</sub>-) มาคั่นกลางระหว่างพันธะ เช่น กรดลิโนเลอิก (linoleic, C18:2) กรดลิโนเลนิก (linolenic, C18:3) และกรดอะราชิโดนิก (arachidonic, C20:4) เป็นต้น (Park และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Saturated fatty acid**

Stearic acid

**Unsaturated fatty acids***Cis* oleic acid*Trans* oleic acid

รูปที่ 2.8 เปรียบเทียบโครงสร้างของกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวและแสดงการเกิดรูปแบบของ cis และ trans ของกรดโอเลอิก

ที่มา: OpenStax College, 2013

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.4.5 สารประกอบเอซิลกลีเซอไรด์ (acylglyceride)

กรดไขมันเมื่อรวมตัวกับกลีเซอรอลจะได้เป็นสารประกอบกลีเซอไรด์ หรือ เอซิลกลีเซอรอล (acylglycerol) สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม

2.4.5.1 โมโนเอซิลกลีเซอไรด์ (monoacylglyceride) คือ เอสเทอร์ของกรดไขมัน 1 โมเลกุลกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล โดยหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ของกรดไขมัน 1 หมู่ จะจับกับหมู่ไฮดรอกซิล (-H) ของกลีเซอรอล ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 หรือ 2 อย่างไม่อย่างหนึ่งจะได้ 1-monoacylglyceride หรือ 2-monoacylglyceride ตามลำดับ

2.4.5.2 ไดเอซิลกลีเซอไรด์ (diacylglyceride) คือ เอสเทอร์ของกรดไขมัน 2 โมเลกุลกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล โดยหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ของกรดไขมัน 2 หมู่ จะจับกับหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของกลีเซอรอลที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 3 หรือ คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 2

2.4.5.3 ไตรเอซิลกลีเซอไรด์ (triacylglyceride) คือ เอสเทอร์ของกรดไขมัน 3 โมเลกุลกับกลีเซอรอล 1 โมเลกุล โดยที่หมู่ไฮดรอกซิล (-OH) ของกลีเซอรอลทั้ง 3 หมู่ จะจับกับหมู่คาร์บอกซิล (-COOH) ของกรดไขมันทั้ง 3 หมู่ ซึ่งกรดไขมันที่มาจับกับกลีเซอรอลอาจเป็นชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดก็ได้ นอกจากนี้กลีเซอไรด์ที่พบมากในธรรมชาติส่วนใหญ่อยู่ในรูปของไตรเอซิลกลีเซอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.5 เอนไซม์ไลเปส

ไลเปส หรือ ไตรเอซิลกลีเซอรอลเอซิลไฮโดรเลส (E.C. 3.1.1.3) เป็นเอนไซม์ที่ละลายน้ำเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ของไตรเอซิลกลีเซอรอลที่ไม่ละลายน้ำให้เป็นไดเอซิลกลีเซอรอล มอนอเอซิลกลีเซอรอล กลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ตรงระหว่างบริเวณที่น้ำและน้ำมันสัมผัสกัน (Javed และคณะ, 2017) ซึ่งเอนไซม์ไลเปสสามารถเร่งได้หลายปฏิกิริยา เช่น ไฮโดรไลซิส ทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน อินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชันของหมู่เอสเทอร์ การสร้างหมู่เอสเทอร์ (Geoffry และ Achur, 2018) โดยไลเปสนั้นจะจับและสลายบริเวณคาร์บอกซิลเอสเทอร์ของเอซิลกลีเซอรอลสายยาว (มากกว่าหรือเท่ากับ 10 คาร์บอนอะตอม) (Casas-Godoy และคณะ, 2012) เอนไซม์ไลเปสและเอนไซม์เอสเทอเรสมีความจำเพาะต่อพันธะเอสเทอร์ทั้งคู่ โดยย่อยเอสเทอร์ได้เป็นกรดไขมันและแอลกอฮอล์ แต่เอนไซม์ไลเปสจะมีความจำเพาะกับหมู่เอสเทอร์ที่เป็นคาร์บอนสายยาว ในขณะที่เอนไซม์เอสเทอเรสจะมีความจำเพาะกับหมู่เอสเทอร์ที่เป็นคาร์บอนสายสั้น (อรัญ, 2555) และในการย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลที่เป็นคาร์บอนสายยาวของเอนไซม์ไลเปสนั้นจะต้องเกิดขึ้นในบริเวณที่น้ำมันสัมผัสกับน้ำเท่านั้นเนื่องจากเอนไซม์ไลเปสมีคุณสมบัติในการละลายน้ำในขณะที่น้ำมันไม่ละลายน้ำ (William, 1983)

ไลเปสยังเป็นเอนไซม์ที่พบได้อย่างกว้างขวางในธรรมชาติ สามารถพบได้ทั้งในสัตว์ พืช แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ไลเปสจากจุลินทรีย์กำลังเป็นที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากสามารถนำเอนไซม์มาใช้ในอุตสาหกรรมที่หลากหลายได้ เช่น ยา เครื่องสำอาง สารซักฟอกและไบโอดีเซล เป็นต้น (Horchani และคณะ, 2012) นอกจากนั้นเอนไซม์ไลเปสมีคุณสมบัติดังนี้ เช่น การทำงานภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง มีความเสถียรในตัวทำละลายอินทรีย์ มีความจำเพาะต่อสับสเตรทสูง และแสดง regio-, enantioselectivity (Salihu และคณะ, 2012) ซึ่งในตารางที่ 2.3 ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติ เช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์ สายพันธุ์ปกติที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้โดยรวบรวมข้อมูลจากหลายงานวิจัย

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

ชนิด จุลินทรีย์	ชื่อเชื้อ	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ที่มา
แบคทีเรีย	<i>Staphylococcus aureus</i>	Extracellular lipase	4200	Horchani และคณะ (2012)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Extracellular lipase	2392	Javed และคณะ (2017)
	<i>Staphylococcus xylosus</i>	Extracellular lipase	1900	Horchani และคณะ (2012)
	<i>Staphylococcus warneri</i>	Extracellular lipase	1860	
	<i>Staphylococcus simulans</i>	Extracellular lipase	1000	
	<i>Bacillus methylotrophicus</i> PS3	Extracellular lipase	752.97	Sharma และคณะ (2017)
	<i>Burkholderia ubonensis</i>	Extracellular lipase	86.22	Javed และคณะ (2017)
	<i>Staphylococcus chromogenes</i> O1A	Extracellular lipase	7.96	Golani และคณะ (2016)
	<i>Bacillus coagulans</i> BTS-3	Extracellular lipase	4.8	Kumar และคณะ (2005)
	<i>Serratia marcescens</i> MBB05	Extracellular lipase	3.47	Begam และคณะ (2012)
	<i>Bacillus</i> sp. S3	Extracellular lipase	0.0054	Chaturvedi และ Khare (2016)

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

ชนิด จุลินทรีย์	ชื่อเชื้อ	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ที่มา
รา	<i>Rhizopus homothallicus</i>	Extracellular lipase	10700	Salihu และคณะ (2012)
	<i>Penicillium expansum</i> DSM 1994	Extracellular lipase	558	Singh และ Mukhopadhyay (2012)
	<i>Aspergillus terreus</i> NCFT 4269.10	Extracellular lipase	468.515	Sethi และคณะ (2016)
	<i>Pythium ultimum</i>	Extracellular lipase	62.9	Saxena และคณะ (2003)
	<i>Aspergillus</i> sp. Nr. 4	Extracellular lipase	14.2	Gricajeva, และคณะ (2017)
	<i>Geotrichum candidum</i>	Extracellular lipase	5.58	Morais และคณะ (2016)
	<i>Penicillium simplicissimum</i>	Extracellular lipase	4.5	Singh และ Mukhopadhyay (2012)
	<i>Fusarium solani</i> FS1	Extracellular lipase	0.45	

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) ตัวอย่างจุลินทรีย์สายพันธุ์ปกติที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

ชนิด จุลินทรีย์	ชื่อเชื้อ	ชนิดเอนไซม์	ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)	ที่มา
ยีสต์	<i>Yarrowia lipolytica</i>	Extracellular lipase	185.1	Carvalho และคณะ (2017)
	<i>Candida cylindracea</i>	Extracellular lipase	65	Rúa และคณะ, (1993)
	<i>Cryptococcus</i> sp. S-2	Extracellular lipase	50.52	Kamini และคณะ (2000)
	<i>Candida rugosa</i>	Extracellular lipase	12.2	Öztürk (2001)
	<i>Cystobasidium oligophagum</i> JRC1	Extracellular lipase	2.88	Vyas และ Chhabra (2017)
	<i>Candida rugosa</i> CBS 6330	Extracellular lipase	2.72	Fasiloğlu และ Erkmen (2002)
	<i>Cystobasidium oligophagum</i> JRC1	Intracellular lipase	2.16	Vyas และ Chhabra (2017)
	<i>Candida rugosa</i> DSM-2031	Extracellular lipase	1.48	Benjamin และ Pandey (2001)
	<i>Kurtzmanomyces</i> sp. I-11	Extracellular lipase	0.2	Kakugawa และคณะ (2002)
	<i>Pseudozyma hubeiensis</i> HB85A	Extracellular lipase	0.048	Bussamara และคณะ (2010)

2.5.1 การแบ่งประเภทของเอนไซม์ไลเปส สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทดังนี้ 1. แบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุล 2. แบ่งโดยอาศัยรูปแบบในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

#### 2.5.1.1 แบ่งตามความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุล

2.5.1.1.1 เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะต่อตำแหน่งโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (Nonspecific lipase) จึงไม่มีความจำเพาะในการย่อยกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลทำให้สามารถย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลอย่างสมบูรณ์ ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ และในบางครั้งอาจพบโคเอซิลกลีเซอรอลและโมนอเอซิลกลีเซอรอลเป็นสารตัวกลางระหว่างการทำปฏิกิริยาได้

2.5.1.1.2 เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอล (1, 3- specific lipase) โดยเอนไซม์ไลเปสจะเร่งปฏิกิริยาการตัดกรดไขมันภายนอกเฉพาะคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 และ 3 บนโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลเท่านั้น ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดไขมันอิสระ 1,2 (2,3)-โคเอซิลกลีเซอรอล และ 2-โมนอเอซิลกลีเซอรอลที่ไม่เสถียร หากปฏิกิริยาดำเนินต่อไปจะเกิดการย้ายกรดไขมันจากคาร์บอนตำแหน่งที่ 2 ไปยังตำแหน่งที่ 1 และ 3 ได้เป็น 1,3-โคเอซิลกลีเซอรอล และ 1-โมนอเอซิลกลีเซอรอลโดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ในกลุ่มนี้

2.5.1.1.3 เอนไซม์ที่มีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมันบนโมเลกุลของไตรเอซิลกลีเซอรอลจะเกิดย่อยสลายไตรเอซิลกลีเซอรอลตรงคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 ที่มี Cis double bond โดยที่กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวที่ไม่มีพันธะคู่ในคาร์บอนตำแหน่งที่ 9 จะเกิดการย่อยสลายไม่ได้ ซึ่งคุณสมบัติเช่นนี้จะพบเฉพาะในเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์บางพวก เช่น *Geotrichum candidum* สำหรับเอนไซม์ไลเปสจากจุลินทรีย์ทั่วไปจะไม่มีคุณสมบัติเช่นนี้ (มาริสตา, 2560)

#### 2.5.1.2 แบ่งโดยอาศัยรูปแบบในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์

2.5.1.2.1 ปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) เป็นปฏิกิริยาที่ใช้น้ำในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์และผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ กลีเซอรอล (Glycerol) และกรดไขมัน (Fatty acid)

2.5.1.2.2 ปฏิกิริยาเอสเทอริฟิเคชัน (Esterification) เป็นปฏิกิริยาการย้อนกลับของปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส โดยมีการสร้างพันธะเอสเทอร์ระหว่างกลีเซอรอลและกรดไขมันได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล

2.5.1.2.3 ปฏิกิริยาทรานส์เอสเทอร์ฟิเคชัน (Transesterification) เป็นปฏิกิริยาการย้ายหมู่เอซิลหรือกรดไขมันบนโมเลกุลของสารประกอบเอสเทอร์ไปสร้างพันธะใหม่กับโมเลกุลอื่นสามารถเกิดขึ้นได้ 4 รูปแบบดังนี้

รูปแบบที่ 1 แอลกอฮอล์ไลซิส (Alcoholysis) เป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับไขมันและแอลกอฮอล์

รูปแบบที่ 2 อะซิโดไลซิส (Acidolysis) เป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับกรดไขมันอิสระ

รูปแบบที่ 3 เอสเทอร์ เอ็กซ์เชนจ์ (Ester exchange) หรือ อินเทอร์เอสเทอร์ฟิเคชัน (interesterification) เป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนกรดไขมันระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับไตรเอซิลกลีเซอรอล

รูปแบบที่ 4 อะมิโนไลซิส (Aminolysis) เป็นปฏิกิริยาการแลกเปลี่ยนกรดอะมิโนระหว่างไตรเอซิลกลีเซอรอลกับกลีเซอรอล (มาริสา, 2560)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.6 การประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลส

### 2.6.1 อุตสาหกรรมสิ่งทอ

เซลลูเลส เป็นเอนไซม์ที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมสิ่งทอและซักรีด (Behera และคณะ, 2017) ซึ่งเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ใช้อยู่เป็นประจำในกระบวนการสิ่งทอ ทั้งในกระบวนการซักตลอดจนการตกแต่งสิ่งทอที่ทำมาจากเซลลูโลส (Kuhad และคณะ, 2011) เซลลูเลสมีประสิทธิภาพในการกำจัดเส้นใยของเซลลูโลสที่นำมาใช้ในการผลิตสิ่งทอ ทำให้เนื้อผ้าเรียบ มั่นเงา สีสดใสสดใส เพิ่มคุณภาพของเนื้อผ้าและควบคุมการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยเซลลูโลส (Juturu และ Wu, 2014) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้ในการกำจัดสีส่วนเกินจากผ้าเดนิมจากกระบวนการฟอกสียีน (Bhat และ Bhat, 1997) และยังสามารถนำมาใช้เป็น Biopolishing ในการกำจัดเม็ดอากาศและป้องกันการเกิดเม็ดอากาศในเนื้อผ้าอีกด้วย (Tolan และ Foody, 1999)

### 2.6.2 อุตสาหกรรมสารซักล้าง

เมื่อไม่นานมานี้ เซลลูเลสกำลังเป็นที่นิยมในหลายอุตสาหกรรมสารซักล้าง โดยเซลลูเลสเป็นส่วนผสมในสารซักล้างสามารถผ่านเข้าสู่เนื้อผ้าชั้นในได้ง่ายและช่วยกำจัดคราบที่ฝังในเนื้อผ้าได้ รวมทั้งสามารถกำจัดฝุ่นในผ้าฝ้ายผสม (Kuhad และคณะ, 2011) นอกจากนี้เซลลูเลสยังทำให้ในส่วนของเส้นใยเซลลูโลสไฟบริลนั้นมีสีที่สว่างและทำให้เนื้อผ้าเรียบเนียน (Juturu และ Wu, 2014)

### 2.6.3 อุตสาหกรรมอาหาร

สำหรับเซลลูเลสนั้นจัดว่าเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร เซลลูเลสจะทำงานร่วมกับเอนไซม์อื่นๆ (Juturu และ Wu, 2014) เอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเปลือกของผลไม้ประกอบด้วยเซลลูเลส เพคติเนส และเฮมิเซลลูเลส (Kuhad และคณะ, 2011) ใช้ในการสกัดน้ำผลไม้เพื่อให้ได้น้ำผลไม้ที่มีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้นและย่นระยะเวลาของกระบวนการได้ เอนไซม์เซลลูเลสและเพคติเนสถูกนำมาใช้ในการย่อยเปลือกของมันเทศ แครอทและเปลือกส้ม เพื่อให้ได้สารแคโรทีนอยด์ (Behera และคณะ, 2017) นอกจากนี้ยังนำเซลลูเลสมาใช้สำหรับการกระบวนการผลิตสารสีอย่างเช่น แคโรทีนอยด์ ที่เป็นสีจากสีแดงไปจนถึงสีเหลือง ซึ่งเป็นสีของพืชมาจากแหล่งธรรมชาติ ไม่เป็นพิษ และแคโรทีนอยด์ยังเป็นที่ต้องการในตลาดอย่างต่อเนื่อง เอนไซม์เซลลูเลส สามารถนำมาใช้สำหรับการเพิ่มคุณค่าทางอาหารในอาหารหมัก เพิ่มความชุ่มชื้นให้กับผักที่ผ่านการอบแห้งหรือ เครื่องปรุงน้ำซุพ (Bhat และ Bhat, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 2.6.4 อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม

เซลลูเลสถูกนำมาใช้ในการสลายพันธะ  $\beta$ -1,3 และ  $\beta$ -1,4 glucan ในข้าวบาเลย์ที่มีคุณภาพต่ำ ช่วยในการกรองเบียร์ เพิ่มกลิ่นหอมในไวน์ (Bhat และ Bhat, 1997) และเพิ่มคุณภาพและปริมาณของผลผลิตจากการหมัก (Kuhad และคณะ, 2011)

#### 2.6.5 อุตสาหกรรมอาหารสัตว์

เซลลูเลสในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์นั้นได้รับความนิยมเนื่องจากประสิทธิภาพที่สามารถเพิ่มคุณค่าทางอาหารให้กับสัตว์ได้ เอนไซม์สามารถกำจัดสารขัดขวางโภชนะ (Antinutritional factors; ANFs) ในธัญพืชของอาหารสัตว์ (Kuhad และคณะ, 2011) เซลลูเลสนำมาเสริมในอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง และสัตว์กระเพาะเดี่ยว ในการช่วยย่อยลิกโนเซลลูโลส ผสมอาหารให้เข้ากันมากขึ้น (Juturu และ Wu, 2014) กำจัดเปลือกเมล็ดธัญพืช เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยให้กับสัตว์เคี้ยวเอื้องและสัตว์กระเพาะเดี่ยว (Bhat และ Bhat, 1997)

#### 2.6.6 ด้านพลังงาน

มีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสารประกอบเซลลูโลสที่มีขนาดใหญ่ให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่สามารถนำไปหมักและผลิตเป็นเชื้อเพลิงเหลว โดยเอนไซม์นี้จะเข้าไปย่อยที่พันธะ  $\beta$ -(1,4)-glycosidic bonds ในโครงสร้างของเซลลูโลสและได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลโดยอาศัยการหมักด้วยยีสต์ได้ โดยเซลลูโลสสามารถพบได้ทั้งในวัสดุลิกโนเซลลูโลส เช่น อ้อย ข้าวโพด ฟางข้าว กากอาหารเหลือทิ้งทางการเกษตร นอกจากนี้ยังพบได้ในเศษกระดาษ และ ขยะอุตสาหกรรม (Byadgi และ Kalburgi, 2016) ซึ่งวัตถุดิบต่างๆ เหล่านี้ เป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาได้ง่าย จึงเหมาะสำหรับการนำมาผลิตไบโอเอทานอล และการใช้เอนไซม์ในกระบวนการย่อยทำให้ไม่เกิดสารพิษ (Kitagawa และคณะ, 2011) สภาวะการย่อยไม่รุนแรง และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นข้อได้เปรียบของการนำเอนไซม์มาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล (Juturu และ Wu, 2014)

## 2.7 การประยุกต์ใช้เอนไซม์ไลเปส

### 2.7.1 ด้านอาหาร

ไลเปสนั้นจะนำมาใช้ในการพัฒนารสชาติในผลิตภัณฑ์นม การตัดแปลงไขมัน และน้ำมัน (การผลิตเนย มากรีน น้ำมันทำอาหาร) การผลิตอาหารเด็ก และโครงสร้างไขมันในองค์ประกอบที่มีเอกลักษณ์ เช่น เนยโกโก้เทียม อาหารทดแทนนมแม่ ไขมันไม่อิ่มตัวเชิงซ้อน มีการใช้สารที่ทำให้เกิดอิมัลชันนำมาพัฒนาการผลิตขนมปัง พาสต้า และผสมในอาหารสัตว์ (Casas-Godoy และคณะ, 2012) การเพิ่มรสชาติให้กับชีสอย่างหลากหลาย เอนไซม์ชนิดนี้ที่นำมาใช้ในการผลิตจะให้ความเข้มข้นของรสชาติที่มากขึ้น ชีสที่กำลังสุกจะทำให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยาอย่างช้าๆ สุดท้ายก็จะเปลี่ยนเคสโตให้เป็นชีสสุก และมีรสชาติตามที่ต้องการ (Patnala และคณะ, 2016)

### 2.7.2 ด้านการแพทย์และยา

ไลเปสเป็นตัวเร่งทางชีวภาพที่สำคัญในด้านชีวการแพทย์ เนื่องจากความจำเพาะต่อปฏิกิริยา regioselective ในหลายๆตัวทำละลายอินทรีย์ การใช้ตัวเร่งทางชีวภาพทำให้กระบวนการผลิตนั้น สะอาด เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม ปฏิกิริยาไม่รุนแรง ให้ผลที่มีความจำเพาะสูง (Joseph และคณะ, 2008) และหลีกเลี่ยงการเกิดปฏิกิริยา isomerization epimerization racemization และ rearrangement (Singh และ Mukhopadhyay, 2012) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาการรักษาแบบใหม่โดยใช้ไลเปสจากพืช และ/หรือจุลินทรีย์เข้ามารักษาให้กับผู้ป่วยที่เป็นโรคตับอ่อนทำงานบกพร่องอีกด้วย (Fickers และคณะ, 2011)

### 2.7.3 ด้านเครื่องสำอาง

การนำไลเปสมาใช้ในกลุ่มของผลิตภัณฑ์ของใช้ส่วนตัว เช่น ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาด น้ำมันหอมระเหย และสารแต่งสีโดย Marion และคณะ (2013) ได้แบ่งเครื่องสำอางออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ น้ำมันหอมระเหย เครื่องสำอาง ผลิตภัณฑ์บำรุงผิว ผลิตภัณฑ์บำรุงผม และผลิตภัณฑ์สำหรับอาบน้ำ ไขมัน กรดคาร์บอกซิลิก แอลกอฮอล์และเอสเทอร์จากไลเปส ที่ผ่านกระบวนการ alcoholysis transesterification (Gupta และคณะ, 2015) และ Monoglycerols และ diglycerols ที่ได้จากปฏิกิริยา esterification นั้น สามารถนำไปใช้เป็นสารลดแรงตึงผิวในเครื่องสำอางและน้ำหอมได้ (Singh และ Mukhopadhyay, 2012)

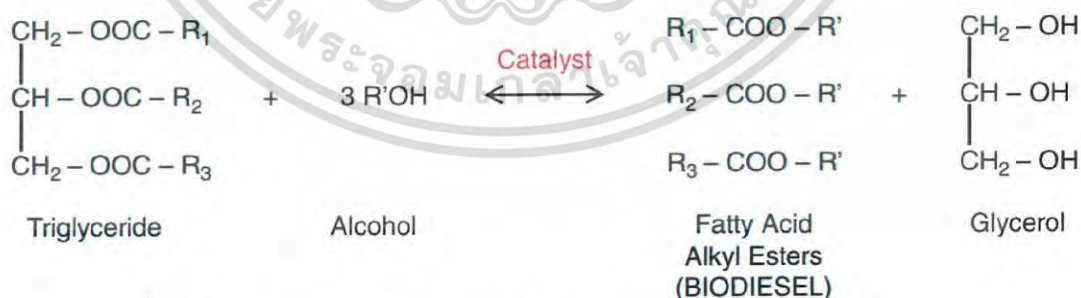
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.7.4 อุตสาหกรรมสารซักล้าง

เอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์เชิงพาณิชย์ที่สำคัญในการผลิตผงซักฟอกทั้งในระดับอุตสาหกรรมและครัวเรือน (Singh และ Mukhopadhyay, 2012) ส่วนประกอบในผงซักฟอกประกอบด้วยสารเคมีนั้น เป็นอันตรายต่อมนุษย์และเป็นมลพิษต่อสิ่งแวดล้อม ไลเปสจึงนำมาใช้แทนสารเคมีที่อันตรายเหล่านั้นในหลายบริษัทนำเอนไซม์ไลเปสมาเป็นองค์ประกอบพื้นฐานในการผลิตผงซักฟอก (Javed และคณะ, 2017) ไลเปสสามารถกำจัดไขมันออกจากเนื้อผ้าได้ ในกรณีนี้ ไลเปสต้องทนต่อความร้อน ทนต่อค่าในสิ่งแวดล้อมและย่อยสลายไขมันได้ในหลายๆองค์ประกอบ เอนไซม์ไลเปสเป็นที่น่าสนใจมากกว่าการผลิตผงซักฟอกโดยวิธีแบบเก่า เพราะทำให้ประหยัดพลังงาน และลดมลพิษ (Contesini และคณะ, 2010)

## 2.7.5 ด้านพลังงาน

ไบโอดีเซล คือ มอนอเอซิลเอสเทอร์ อนุพันธ์ในกรดไขมันอิสระสายยาวจากแหล่งไขมันที่นำกลับมาใช้ใหม่ เช่น น้ำมันพืช หรือ ไขมันสัตว์ (Gupta และคณะ, 2015) ไลเปสจะถูกนำมาใช้ในการเร่งปฏิกิริยา transesterification แสดงดังรูปที่ 2.9 หรือ esterification แสดงดังรูปที่ 2.10 ร่วมกับแอลกอฮอล์ เช่น เมทานอล (Fan และคณะ, 2012) ในการผลิตไบโอดีเซล โดยสามารถใช้สารตั้งต้นทั้งจาก น้ำมันพืช (Othman และคณะ, 2017) น้ำมันที่ไม่ใช่บริโภค น้ำมันที่ใช้แล้ว ไขมันสัตว์ (Pourzolfaghar และคณะ, 2016) และไขมันจากจุลินทรีย์ เช่น สาหร่าย (Baskar และ Aiswarya, 2016) เป็นต้น ทำให้ไบโอดีเซลสามารถผลิตขึ้นใหม่ได้



รูปที่ 2.9 การผลิตไบโอดีเซลโดยอาศัยปฏิกิริยา transesterification

ที่มา: Fan และคณะ, 2012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนแรกไตรเอซิลกลีเซอรอลจะถูกเปลี่ยนเป็นไดเอซิลกลีเซอรอลและอัลคิลเอสเทอร์ ในขั้นตอนที่ 2 ไดเอซิลกลีเซอรอลจะเปลี่ยนเป็นมอนอเอซิลกลีเซอรอลและอัลคิลเอสเทอร์ และขั้นตอนที่ 3 มอนอเอซิลกลีเซอรอลจะเปลี่ยนเป็นกลีเซอรอลและอัลคิลเอสเทอร์ โดยเอสเทอร์ที่ได้ในแต่ละขั้นตอนจะเกิดรวมตัวกันกลายเป็นไบโอดีเซล



รูปที่ 2.10 การผลิตไบโอดีเซลโดยอาศัยปฏิกิริยา esterification

ที่มา: Fan และคณะ, 2012

น้ำมันที่ใช้แล้วจะมีปริมาณของกรดไขมันอิสระสูง ดังนั้นสามารถนำน้ำมันเก่ากลับมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอดีเซลโดยใช้เอนไซม์ไลเปสผ่านปฏิกิริยา esterification ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนกรดไขมันอิสระให้เป็นเอสเทอร์หรือไบโอดีเซลเพื่อลดจำนวนกรดไขมันอิสระให้น้อยลง โดยมีเมทานอลเป็นตัวทำปฏิกิริยา

และการใช้เอนไซม์ยังทำให้ไม่เกิดสารยับยั้งที่เป็นพิษต่อผลผลิต ได้พลังงานสะอาดเนื่องจากเกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์ (Kumar และคณะ, 2017) ให้ค่ากิจกรรมและผลผลิตสูง ยิ่งไปกว่านั้นหากมีการใช้เอนไซม์ตรึงรูปในการผลิตไบโอดีเซลอาจเพิ่มการพัฒนากระบวนการการผลิตทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งมีข้อได้เปรียบมากกว่าการใช้กระบวนการผลิตทางเคมี (Poppe และคณะ, 2015) และยังสามารถนำเอนไซม์ตรึงรูปกลับมาใช้ใหม่ได้อีกด้วย (Bajaj และคณะ, 2010)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sulman และ Rehman (2013) ทำการคัดแยกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแหล่งธรรมชาติ โดยเก็บตัวอย่างดินจากบริเวณอุตสาหกรรมหนังฟอกและข้างถนน Raiwind ประเทศปากีสถาน รวมถึงน้ำและพืชที่เน่าเปื่อยที่มาจากร้านผลไม้ ทำการทดสอบการผลิต extracellular cellulase enzyme บนอาหารที่มี Carboxymethylcellulose ร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นสับสเตรท พบว่า A2, B5, W2 และ W3 มีบริเวณใสรอบโคโลนีแต่ W2 มีบริเวณใสรอบโคโลนีที่ชัด ซึ่งยีสต์ที่คัดแยกได้เมื่อนำมาทำการระบุสายพันธุ์โดยใช้ 18S rRNA แล้วพบว่าเป็น *Candida tropicalis* โดยสภาวะการเจริญที่เหมาะสมของ *Candida tropicalis* คือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพีเอช 7.0 พบว่ายีสต์สามารถผลิตได้ทั้ง intra และ extracellular cellulase enzyme แต่สามารถผลิต extracellular cellulase enzyme ได้สูงกว่า โดย *Candida tropicalis* นั้น สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงที่สุดหลังจากบ่ม 5 วัน ซึ่งอุณหภูมิ และพีเอช ที่เหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส คือที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และพีเอช 8.0 ตามลำดับ

Hamid และคณะ (2018) ทำการคัดแยกยีสต์ที่เจริญในอุณหภูมิต่ำในหมู่บ้าน Gurez ประเทศอินเดีย ซึ่งเป็นยีสต์ที่เจริญในสภาพแวดล้อมที่มีอากาศหนาวเย็น อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส เนื่องจากหมู่บ้าน Gurez เป็นหมู่บ้านที่อยู่ในพื้นที่ที่ถูกโอบล้อมด้วยภูเขาหิมาลัย ทำให้มีสภาวะภูมิอากาศที่เย็นสุดขั้ว และเป็นที่อยู่ของยีสต์ที่เจริญในอุณหภูมิต่ำอย่าง PYG3, PYG5 และ PYG6 ซึ่งเป็นยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างดินในหมู่บ้าน Gurez โดยมีสภาวะการเจริญที่เหมาะสมที่ 15 องศาเซลเซียส เมื่อทำการคัดเลือกโดยดูลักษณะการเจริญที่อุณหภูมิ 4, 10, 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน พบว่ายีสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 20 องศาเซลเซียสขึ้นไป PYG3, PYG5 และ PYG6 สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 3.0, 5.0, 7.0 และ 9.0 ทั้ง 3 ไอโซเลทพบว่า PYG3 เจริญเติบโตที่ต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียสได้ดีที่สุด และที่ 15 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และเมื่อทำการทดสอบการผลิต extracellular cellulase โดยทดสอบบนอาหารที่มี Carboxymethylcellulose ร้อยละ 0.5 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นสับสเตรท พบว่ายีสต์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

Sarawan และคณะ (2013) ทำการคัดแยกยีสต์สกุล *Candida* จากต้นมะลิวัลย์ภายในเขื่อนจุฬาภรณ์ ตำบลทุ่งลุยลาย อำเภอกอนสาร จังหวัดชัยภูมิ ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1/D2 domain ของ 26S ribosomal DNA เพื่อระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้ พบว่าเป็นสปีชีส์ใหม่จึงตั้งชื่อว่า *Candida konsanensis* และเมื่อทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสที่มี Carboxymethylcellulose ร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตร เป็นสับสเตรท เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 58.24 หน่วยต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sahoo (2013) ทำการคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 104 ไอโซเลทจากหลากหลายแหล่งตัวอย่างธรรมชาติ เช่น เปลือกผลไม้เน่า ใบไม้เน่าจากป่า ปุ่มหมักและหล้าขุ่นแก่ เป็นต้น จากนั้นทำการทดสอบคุณสมบัติการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ได้ 31 ไอโซเลท จาก 104 ไอโซเลท และมีเพียง 5 ไอโซเลทที่สร้างบริเวณใสสูงที่สุด คือ CY-52, CY-58, CY-59, CY-62 และ CY-81 ซึ่งคัดแยกได้จากเปลือกผลไม้เน่า ผักเน่า กากน้ำตาลอ้อย และเมื่อนำมาทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส พบว่า CY-52, CY-58, CY-59, CY-62 และ CY-81 ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ 3.25, 2.26, 12.99, 9.25 และ 7.05 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

Vyas และ Chhabra (2017) ทำการคัดแยก *Cystobasidium oligophagum* จากตัวอย่างดินที่อุดมไปด้วยเซลลูโลส เช่น เศษซากใบไม้ ผักเน่า จาก 5 แหล่งพื้นที่ใน Jodhpur ประเทศอินเดีย ซึ่งยีสต์ที่คัดแยกได้นั้นมีคุณสมบัติที่สามารถสะสมไขมันได้ เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มี Carboxymethylcellulose (CMC) ที่เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ endoglucanase exoglucanase และ  $\beta$ -glucosidase เท่ากับ 2.27, 1.26 และ 0.98 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ intracellular และ extracellular lipase เท่ากับ 2.16 และ 2.88 ยูนิต์ต่อมิลลิกรัม ตามลำดับ

Singh และคณะ (2013) ทำการคัดยีสต์ที่เจริญในอุณหภูมิต่ำจากตัวอย่างน้ำที่ละลายจากธารน้ำแข็ง Midre Lovénbreen ในหมู่เกาะ Svalbard ทวีป Arctic และทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริเวณ D1/D2 domain สามารถระบุสายพันธุ์ได้ 5 สายพันธุ์ คือ *Cryptococcus adeliensis* (MLB-18 JX192655), *Cryptococcus albidosimilis* (MLB-19 JX192656) *Cryptococcus saitoi* (MLB-22 JX192659) *Rhodospiridium lusitaniae* (MLB-20 JX192657) และ *Rhodotorula mucilaginosa* (MLB-27 JX192664) จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้อยู่ในช่วงอุณหภูมิ 1 ถึง 20 องศาเซลเซียส ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสพบว่ายีสต์สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้และมีการศึกษาคุณสมบัติของ lipase ในสายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. MLB-24 พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและพีเอช 7.0 นั้นเหมาะสมต่อกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส

Tsuji และคณะ (2018) พบยีสต์สกุล *Mrakia* ที่เจริญในอุณหภูมิต่ำ โดยการคัดแยกจากแหล่งน้ำน้ำแข็งที่อยู่ใต้แอ่งน้ำสะอาดบนเกาะน้ำแข็งใน Disraeli fjord ซึ่งอยู่ทางตอนเหนือของประเทศแคนาดา ทำการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริเวณ D1/D2 domain พบว่าเป็นยีสต์สปีชีส์ใหม่ และให้ชื่อว่า *Mrakia arctica* sp. nov. โดยยีสต์สปีชีส์ใหม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นเมื่อทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและไลเปส บนอาหารแข็ง ที่อุณหภูมิ -3, 4, 10 และ 15 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ -3 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ยีสต์

สามารถสร้างบริเวณใสของเอนไซม์ทั้งสองชนิดได้สูงที่สุด

เอกสารนี้เป็นฉบับร่างของงานวิจัยที่รอการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Popoola และ Onilude (2017) พบ *Candida parapsilosis* ซึ่งคัดแยกได้จากดินที่มีการปนเปื้อนของน้ำมันพืช และที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่สุด นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสนั้นให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 0.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร

Mafakher และคณะ (2010) คัดแยกยีสต์จากระบบบำบัดน้ำเสียซึ่งสามารถนำมากำจัดสารก่อมลพิษอย่างเช่น กลีเซอรอล พาราฟิน น้ำมันดิบจากของเสียในอุตสาหกรรมเกษตร โดยสายพันธุ์ M1 และ M2 นั้นมีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งเป็นผลผลิตที่มีคุณค่า เมื่อทำการระบุสายพันธุ์แล้วพบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้ คือ *Yarrowia lipolytica* จากนั้นนำ *Yarrowia lipolytica* M1 และ M2 มาทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้ Olive oil เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 11 และ 8.3 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- 3.1.1 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micropipette) บริษัท Vivantis Technologies, USA
- 3.1.2 ทิปสำหรับเครื่องดูดจ่ายสาร (Micropipette Tip)
- 3.1.3 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บริษัท Binder, Germany
- 3.1.4 หลอดสำหรับปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge Tube) บริษัท Extragene, USA
- 3.1.5 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Incubation Shaker) ยี่ห้อ New Brunswick รุ่น innova 4230, Canada
- 3.1.6 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่งรุ่น TE214S บริษัท Sartorius Weighing Technology, Germany
- 3.1.7 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับตกตะกอนตัวอย่าง (Microcentrifuge) รุ่น 16M บริษัท Labnet International, USA
- 3.1.8 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex Mixer) บริษัท VELP Scientific, Italy
- 3.1.9 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 10S UV-Vis บริษัท Thermo Fisher Scientific, USA
- 3.1.10 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) บริษัท Memmert, Germany
- 3.1.11 เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH Meter)
- 3.1.12 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave) บริษัท Hirayama, Japan
- 3.1.13 ตู้ลามินาร์ (Laminar Air Flow Cabinet) บริษัท Dwyer Instrument, USA
- 3.1.14 กล้องจุลทรรศน์ใช้แสงธรรมดา (Compound Light Microscope) บริษัท Olympus Corporation, Japan
- 3.1.15 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) บริษัท Memmert, Germany
- 3.1.16 เครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท (Microplate reader) บริษัท BMG Labtech รุ่น Fluo Star Omega, Germany
- 3.1.17 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex) บริษัท Velp scientific, Italy
- 3.1.18 สไลด์สำหรับเตรียมตัวอย่างส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริษัท Yancheng Xingfu Glass Instrument Factory, China

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.1.19 กระจกปิดสไลด์ยี่ห้อ Menzel-Glaser บริษัท Gerhard Menzel, Germany
- 3.1.20 กระบอกลีดยาขนาด 3 มิลลิลิตร บริษัท Nipro, Thailand
- 3.1.21 ตัวกรองขนาดช่องผ่าน 0.45 ไมครอน sterlitech, USA
- 3.1.22 หลอด Eppendorf
- 3.1.23 ถูสำหรับเช็ดเชื้อ
- 3.1.24 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 3.1.25 เครื่องแก้วชนิดต่างๆ
- 3.1.25 ที่วางหลอดทดลอง (Lack)
- 3.1.25 จุกยาง

## 3.2 สารเคมี

- 3.2.1 กลีเซอรอล บริษัท Sisco Research Laboratories Pvt, India และ บริษัท Ajax Finechem, Australia
- 3.2.2 สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท CTI and Science, Japan
- 3.2.3 สารสกัดจากมอลต์ (malt extract) บริษัท Sisco Research Laboratories Pvt, India
- 3.2.4 เปปโตน (peptone) บริษัท Sisco Research Laboratories Pvt, India
- 3.2.5 น้ำตาลกลูโคส (glucose) บริษัท Sisco Research Laboratories Pvt, India
- 3.2.6 carboxymethylcellulose sodium salt บริษัท SIGMA-ALDRICH, Finland
- 3.2.7 potassium dihydrogen phosphate บริษัท Merck Milipor, Germany
- 3.2.8 dipotassium phosphate CARLO ERBA Reagents, Italy
- 3.2.9 magnesium sulphate heptahydrate บริษัท CARLO ERBA Reagents, Italy
- 3.2.10 ammonium sulfate บริษัท CARLO ERBA Reagents, Italy
- 3.2.11 glyceryl tributyrate บริษัท SIGMA-ALDRICH, Switzerland
- 3.2.12 olive oil ยี่ห้อ Flagata บริษัท Angel Camacho Alimentacion S.l, Spain
- 3.2.13 citric acid monohydrate บริษัท Ajax Finechem, Australia
- 3.2.14 trisodium citrate. Dehydrate บริษัท Merck Milipor, Germany
- 3.2.15 sodium hydroxide บริษัท LOBA CHEMIE PVT, India
- 3.2.16 3, 5 dinitrosalicylic acid บริษัท SIGMA-ALDRICH, Switzerland
- 3.2.17 sodium potassium tartrate บริษัท Ajax Finechem, Australia
- 3.2.18 phenol บริษัท Fisher Chemical, UK
- 3.2.19 methylene blue Merck Milipor, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- 3.2.20 sodium carbonate บริษัท CARLO ERBA Reagents, Italy
- 3.2.21 copper sulfate pentahydrate CARLO ERBA Reagents, Italy
- 3.2.22 folin-ciocalteu บริษัท LOBA CHEMIE PVT, India
- 3.2.23 bovine serum albumin บริษัท SIGMA-ALDRICH, Switzerland
- 3.2.24 ethyl alcohol ความเข้มข้นร้อยละ 70 และ 95
- 3.2.25 phenolphthalein บริษัท Ajax Finechem, Australia
- 3.2.25 methylene blue บริษัท Merck Milipor, Germany
- 3.2.26 ยาปฏิชีวนะ Kanamycin บริษัท THAI MEJI PHAMACULTICAL, Thailand
- 3.2.27 ยาปฏิชีวนะ Ampicillin บริษัท T.P DRUG LABORATORIES (1969), Thailand



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

#### 3.3.1 Yeast Malt broth

Yeast Extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt Extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Glucose	10	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน คนจนสารเคมีละลาย และเทใส่ขวดปิดฝาแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (สำหรับการเพาะเลี้ยงบนเพลทจะมีการเติม agar 20 กรัมในส่วนผสม และใส่ยาปฏิชีวนะ Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) (Pantelides และคณะ, 2015)

#### 3.3.2 อาหารทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

Carboxymethylcellulose	10	กรัมต่อลิตร
Yeast Extract	0.6	กรัมต่อลิตร
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7	กรัมต่อลิตร
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัมต่อลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	กรัมต่อลิตร
Agar	10	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน คนจนสารเคมีละลาย และเทใส่ขวดปิดฝาแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (Vyas และ Chhabra, 2017)

#### 3.3.3 อาหารเหลวใช้สำหรับผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ใช้สูตรอาหารตามข้อ 3.3.2 แต่ไม่มี

การเติม agar 10 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3.4 อาหารทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส

Yeast Extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Glyceryl Tributyrate	ความเข้มข้นร้อยละ 10	โดยปริมาตร
Agar	20	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน คนจนสารเคมีละลาย และเทใส่ขวดปิดฝาแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (Singh และคณะ, 2013)

### 3.3.5 อาหารเหลวใช้สำหรับผลิตเอนไซม์ไลเปส

Olive oil	ความเข้มข้นร้อยละ 10	โดยปริมาตร
Yeast Extract	0.6	กรัมต่อลิตร
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7	กรัมต่อลิตร
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัมต่อลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน คนจนสารเคมีละลาย และเทใส่ขวดปิดฝาแล้วจึงนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที (Vyas และ Chhabra, 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.4.1 การเก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ภายในประเทศไทย

เก็บตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ ดินที่มีลักษณะเป็นดินขึ้น มีน้ำขัง ดินไต้ต้นไม้ ดินที่เป็นร่องน้ำทิ้งเศษอาหาร ดินที่อยู่ใกล้รางรถไฟ ดินที่อยู่ใกล้โรงงานน้ำตาลวังขนายและดินที่มีการทับถมกันของใบไม้โดยเก็บที่บริเวณผิวหน้าดินลึกลงไปไม่เกิน 2 เซนติเมตร น้ำเก็บจากบ่อน้ำตามธรรมชาติ เช่น บ่อน้ำพุร้อน น้ำคลอง บ่อน้ำเน่าเสียเป็นต้น โดยจะเก็บน้ำบริเวณผิวน้ำลึกลงไปไม่เกิน 1 เซนติเมตร (Karimi และ Hassanshahian, 2014) และผลไม้ที่สุกหรือเน่าเสียแล้ว

#### 3.4.2 การคัดแยกยีสต์

3.4.2.1 การคัดแยกยีสต์จากแหล่งตัวอย่างที่เป็นของแข็งได้แก่ ผลไม้และตัวอย่างดินโดยตัวอย่างที่เป็นผลไม้ถูกนำมาบดหยาบก่อน จากนั้นชั่งน้ำหนักตัวอย่างผลไม้ที่บดหยาบแล้วหรือดิน 10 กรัม นำมาใส่ในขวดลูกชมพูนขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 90 มิลลิลิตร และเติม Tween-20 ร้อยละ 0.02 โดยปริมาตร นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที (Pantelides และคณะ, 2015) จากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างดินหรือผลไม้ ที่ระดับความเจือจาง 1:10, 1:100, 1:1,000, 1:10,000 ในน้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 0.9 โดยมวลต่อปริมาตร (Papagora และคณะ, 2013) แต่ระดับความเจือจางมาทำการ spread ลงให้ทั่วบริเวณผิวหน้าอาหาร Yeast Malt Agar (Pantelides และคณะ, 2015) ที่มีการเติมยาปฏิชีวนะ Kanamycin ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร Ampicillin ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำสองซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน และสังเกตลักษณะโคโลนีของยีสต์ ได้แก่ สี รูปร่าง ขอบ ผิวหน้า และการยกตัวของโคโลนีบนจานอาหาร จากนั้นเลือกโคโลนียีสต์มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี Cross streak ลงบนอาหาร Yeast Malt Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน เมื่อคัดแยกได้ยีสต์ที่บริสุทธิ์แล้ว ทำการเก็บรักษาด้วยกลีเซอรอลร้อยละ 80 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อไปใช้ในการทดสอบต่อไป

3.4.2.2 การคัดแยกยีสต์จากแหล่งตัวอย่างที่เป็นของเหลวได้แก่ ตัวอย่างน้ำ ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างมาปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำมาทำการเจือจางและทำการทดลองตามวิธีการในข้อ 3.4.2.1

#### 3.4.3 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา

นำยีสต์ที่คัดแยกได้จาก 3.4.2 มาศึกษาลักษณะลักษณะของโคโลนี ได้แก่ รูปร่าง ขอบ การยกตัว ผิวหน้า และสี โดยนำยีสต์มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Yeast Malt Agar และศึกษารูปร่างของเซลล์ การแบ่งตัว (fission) การแตกหน่อ (budding) และลักษณะเส้นสายของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Singh และคณะ, 2013) ที่กำลังขยายทั้งหมด 100 เท่าและ 400 เท่า โดยใช้วิธี wet mount ย้อมเซลล์ด้วยสี methylene blue ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.4 การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

นำยีสต์บริสุทธิ์ที่เก็บรักษาไว้ในกลีเซอรอลมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt-Agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน เพื่อกระตุ้นให้เชื้อพร้อมสำหรับการนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์เอนไซม์เซลลูเลสบนอาหารแข็งที่มีการเติม Carboxymethylcellulose (CMC) โดยใช้สูตรอาหารที่มีส่วนประกอบดังนี้ (Vyas และ Chhabra, 2017)

Carboxymethylcellulose	10	กรัมต่อลิตร
Yeast Extract	0.6	กรัมต่อลิตร
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7	กรัมต่อลิตร
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2	กรัมต่อลิตร
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1	กรัมต่อลิตร
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	กรัมต่อลิตร
Agar	20	กรัมต่อลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ทดสอบการผลิตเอนไซม์โดยการย้อมด้วยสี Congo red ร้อยละ 0.2 โดยมวลต่อปริมาตรและทำการเขย่าเพลาเป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วย NaCl ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสแล้วจดบันทึกค่าที่ได้ (Goldbeck และคณะ, 2012)

### 3.4.5 การคัดเลือกยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์ไลเปส

นำยีสต์จากกลีเซอรอลมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน เพื่อกระตุ้นให้เชื้อพร้อมสำหรับการนำมาทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปสบนอาหารแข็งที่มีการเติม Tributyrin โดยใช้สูตรอาหารที่มีส่วนประกอบดังนี้ (Singh และคณะ, 2013)

Glyceryl Tributyrate	ความเข้มข้นร้อยละ 10	โดยปริมาตร
Peptone	10	กรัมต่อลิตร
Yeast Extract	5	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร

บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 วัน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีและบริเวณใส จากนั้นนำค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสหักลบค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีแล้วจดบันทึกค่าที่ได้ (Geoffry และ Achur, 2017)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.6 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์ที่คัดเลือกได้

3.4.6.1 ทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยนำยีสต์จากกลีเซอรอลมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน เพื่อกระตุ้นเชื้อ จากนั้นนำมาเตรียมกล้าเชื้อในอาหารเหลว Yeast Malt Broth บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์ CMCase โดยใช้สูตรอาหารที่มีส่วนประกอบดังนี้ (Vyas และ Chhabra, 2017)

Carboxymethylcellulose	10	กรัมต่อลิตร
Yeast Extract	0.6	กรัมต่อลิตร
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7	กรัมต่อลิตร
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัมต่อลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	กรัมต่อลิตร

นำไปบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอน เซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง จากนั้นนำส่วนใสมาทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ต่อไป

3.4.6.2 วัดกิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส นำน้ำเลี้ยงที่ได้จากข้อ 3.4.6.1 ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Carboxymethylcellulose (CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวล ต่อปริมาตร ในซีเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.1) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร และนำน้ำเลี้ยงปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย Carboxymethylcellulose (CMC) ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อปริมาตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.0 (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.2) ปริมาตร 0.25 มิลลิลิตร จากนั้นจะนำน้ำเลี้ยงที่ผสมกับสารละลาย Carboxymethylcellulose (CMC) มาบ่มตามสภาวะดังต่อไปนี้

สภาวะที่ 1>(\*a) ซีเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

สภาวะที่ 2>(\*b) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะที่ 3>(\*c) ซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

สภาวะที่ 4>(\*b) ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

จากนั้นเติมสารละลายกรด 3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.3) ลงไป 1.5 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที และนำมาให้เย็น เติมน้ำกลั่น 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร สำหรับหลอดควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกันแต่นำสารละลายเอนไซม์มาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ก่อนและเติมสารละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ก่อนเติมสารละลาย Carboxymethylcellulose (CMC) และทำตามขั้นตอนอื่นๆเหมือนกับในตัวอย่างการหาน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) ในตัวอย่างส่วนแบลนค์ (blank) เตรียมโดยใช้น้ำกลั่นแทนเอนไซม์ ทั้งนี้ได้มีการทำการพลาสมาโคสมมาตรฐานโดยมีขั้นตอนการทำเช่นเดียวกับตัวอย่างเหมือนที่กล่าวมาข้างต้นแต่เปลี่ยนจากน้ำเลี้ยงเป็นสารละลายกลูโคสมมาตรฐาน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.4) และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

กิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) =

ปริมาณน้ำตาล (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) × ปริมาตรทั้งหมด (มิลลิลิตร)

-----  
 ปริมาตรเอนไซม์ (มิลลิลิตร) × มวลโมเลกุลกลูโคส (กรัมต่อโมล) × เวลา (นาที)

- 1 ยูนิตต่อมิลลิลิตร หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นกลูโคส 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 นาที ในสภาวะที่ทดสอบ (อาร์; 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
 ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.4.7 การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ที่คัดเลือกได้

3.4.7.1 ทำการเตรียมกล้าเชื้อโดยนำยีสต์จากกลีเซอรอลมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Yeast Malt Agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน เพื่อกระตุ้นเชื้อ จากนั้นนำมาเตรียมกล้าเชื้อในอาหารเหลว Yeast Malt Broth บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงถ่ายกล้าเชื้อลงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์ extracellular lipase โดยใช้สูตรอาหารที่มีส่วนประกอบดังนี้ (Vyas และ Chhabra, 2017)

Olive oil	10	มิลลิลิตร
Yeast Extract	0.6	กรัมต่อลิตร
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	7	กรัมต่อลิตร
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	2	กรัมต่อลิตร
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัมต่อลิตร
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	กรัมต่อลิตร

นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (Goldbeck และคณะ, 2012) จากนั้นเก็บน้ำเลี้ยง นำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เพื่อแยกตะกอนเซลล์ออกจากน้ำเลี้ยง จากนั้นนำส่วนใสมาทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ extracellular lipase ต่อไป

3.7.4.2 วัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส ทำการผสมน้ำกลั่น 2.5 มิลลิลิตร ซีเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.5) และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7 (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.6) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ Olive oil ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงที่ได้จากข้อ 3.7.4.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเตรียมแบลนด์ (blank) โดยใช้ น้ำกลั่นแทนเอนไซม์ เมื่อครบ 30 นาทีทำการเติมเอทานอล ร้อยละ 95 โดยปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการย่อยไขมันและหยุดฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยมวลต่อปริมาตร (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.8) 2 – 3 หยด และทำการไตเตรทโดยใช้ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.7) และคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์ extracellular lipase โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้

กิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) =

$$\text{ปริมาตร KOH (มิลลิลิตร)} \times \text{ความเข้มข้น KOH (โมลาร์)} \times 1000 \times 2 \times \text{Dilution factor}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร หมายถึง ปริมาณเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายสับสเตรตให้เป็นกรดไขมันอิสระ 1 ไมโครโมล ในเวลา 1 ชั่วโมง ในสภาวะที่ทดสอบ (Geoffry และ Achur, 2017; Kumar และคณะ, 2017)

### 3.4.8 การวัดปริมาณโปรตีนในน้ำเลี้ยง

นำน้ำเลี้ยงที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อ 3.3.6.2 และ 3.7.4.2 ที่ต้องการหาโปรตีนปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.9) 1000 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที เมื่อครบเวลาเติม สารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มัล (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.10) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทันที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที เพื่อให้เกิดสีอย่างสมบูรณ์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร สำหรับการทำให้โปรตีนมาตรฐานทำเช่นเดียวกันแต่แปลงคใช้น้ำกลั่นแทนน้ำเลี้ยง ส่วนโปรตีน Bovine serum albumin (BSA) (วิธีการเตรียมสารที่ภาคผนวก ก.11) จะใช้โปรตีนที่ความเข้มข้น 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรและทำตามขั้นตอนอื่นๆเหมือนกับในตัวอย่าง การหาปริมาณโปรตีนในตัวอย่าง และคำนวณกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์โดยใช้สูตรคำนวณดังนี้ (อารี, 2559)

$$\text{กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์} = \frac{\text{กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต์ต่อมิลลิลิตร)}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

#### 4.1 การคัดแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติ

จากการเก็บตัวอย่างดิน น้ำ ผลไม้ จากแหล่งต่างๆ ภายในประเทศไทยจำนวน 57 ตัวอย่าง นำมาทำการคัดแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติ โดยการทำ Spread plate บนอาหาร Yeast Malt Agar และคัดแยกยีสต์ด้วยวิธี Cross streak เพื่อให้ได้ยีสต์ที่บริสุทธิ์ (Pantelides และคณะ, 2015) พบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ได้จำนวน 145 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 4.1 จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์บนอาหาร Yeast Malt Agar ได้แก่ รูปร่าง สี ขอบ การยกตัวของโคโลนีและผิวหน้าโคโลนี และรูปร่าง การแบ่งตัว (fission) การแตกหน่อ (budding) และลักษณะเส้นสายของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Bisen และคณะ, 2012; Thapa และคณะ, 2015) ซึ่งจากการคัดแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติจำนวน 57 ตัวอย่าง และจากงานวิจัยของ พัทญ์ลีตา และ พิชญ์ญา (2560) ที่นำลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์บนอาหารแข็งไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน Japan Collection of Microorganisms สามารถจัดกลุ่มตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้จำนวนทั้งสิ้น 26 กลุ่มตามการจัดจำแนก โดยคาดว่าอาจจะเป็นยีสต์สกุลต่างๆ แสดงดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.1 แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสชื่อของยีสต์ที่คัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทของยีสต์	รหัสชื่อ
ดินใต้ต้นไม้ข้างตึกแอล คณะเทคโนโลยีเกษตร ลาดกระบัง	6	AR1 AR2 AR3 AR4 AR5 AR6
ดินทรายโรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	6	WH1 WH2 WH5 WH6 WH7 WH10
ดินข้างน้ำเขื่อนแก่งกระจาน จ. เพชรบุรี	5	NK1 NK2 NK3 NK4 NK5
ฟางหยาบโรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	5	WF2 WF3 WF4 WF5 WF6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่รวบรวมไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ที่ปรากฏไปให้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสชื่อของยีสต์ที่คัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท ของยีสต์	รหัสชื่อ
ดินหลังบ้าน อ. ทับคล้อ จ. พิจิตร	4	BJ1 BJ2 BJ3 BJ4
ดินวัดพระธาตุผาซ่อนแก้ว จ. เพชรบูรณ์	4	LK1 LK2 LK3 LK4
ดินข้างร้านนมสด หน้า ร.ร.บดินทร์ 2	4	M1 M2 M3 M4
ดินร้านรัตนสินการช่าง อ. เมือง จ. เลย	4	OI3 OI4 OI5 OI6
ดินสถานีรถไฟพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง	4	PJ1 PJ2 PJ4 PJ6
ดินท่อน้ำทิ้งข้างร้านก๋วยเตี๋ยวเรือ ร.ร.บดินทร์ 2	4	PW1 PW2 PW3 PW4
ดินข้างน้ำซัง ซอย นวมินทร์ 74	4	SW1 SW2 SW4 SW6
ดินเหนียวเปียกโรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	4	WP1 WP2 WP3 WP6
ดินบางปู อ. เมือง จ. สมุทรปราการ	3	BP2 BP3 BP6
ดินหลังบ้าน ต. โพนแดงใต้ อ. บางไทร จ. พระนครศรีอยุธยา	3	HF1 HF2 HF3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำหรือปรับใช้เพื่อการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ หากมีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติมหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสชื่อของยีสต์ที่คัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท ของยีสต์	รหัสชื่อ
ดินชายเลน บางแสน จ. ชลบุรี	2	BS1 BS2
ดินหน้าบ้าน ต. โพนแดงใต้ อ. บางไทร จ. พระนครศรีอยุธยา	2	DW1 DW2
ดินครัวร้านเสพศิลป์ อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่	2	K1 K2
ดินบนเขาค้อ จ. เพชรบูรณ์	2	KK1 KK2
ดินเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จ. ลพบุรี	2	KL1 KL2
ดินข้างรางรถไฟ ลาดกระบัง	2	KT2 KT3
ดินร้านอาหารภิรมพร อ. เมือง จ. เลย	2	PP1 PP2
ดินร้านส้มตำ ปากซอยมิตรอนันต์ แขวง ถนนนครไชยศรี เขตดุสิต จ. กรุงเทพฯ	2	PY1 PY3
ดินเหนียวเปียกโรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	2	WS2 WS4
ดินหลังครัว ต. แม่สุ่น อ. ฝาง จ. เชียงใหม่	2	Y <sub>1</sub> 1 Y <sub>1</sub> 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสชื่อของยีสต์ที่คัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท ของยีสต์	รหัสชื่อ
ดินใต้ต้นไม้ ต. แม่สุน อ. ฝาง จ. เชียงใหม่	2	Y <sub>2</sub> 1 Y <sub>2</sub> 2
ดินน้ำพุร้อนฝาง อ. ฝาง จ. เชียงใหม่	2	Y <sub>3</sub> 1 Y <sub>3</sub> 2
ดินใต้ต้นพริก ที่แฟลช 19 จ. แขวงนวลจันทร์ เขตบึงกุ่ม, กรุงเทพฯ	1	CL1
ดินสวนสนบ่อแก้ว อ. ฮอด จ. เชียงใหม่	1	CM1
ดินข้างบ้าน อ. ทับคล้อ จ. พิจิตร	1	KP1
ดินอุทยานประวัติศาสตร์พระนครศรีอยุธยา อ. เมือง จ. เพชรบุรี	1	KW2
ดินข้างทาง กม.142 อ. ชัยบาดาล จ. ลพบุรี	1	TL1
ดินใต้ต้นไม้ในบ้าน อ. ทับคล้อ จ. พิจิตร	1	UT1
น้ำขัง ซอยนวมินทร์ 74	3	WA1 WA2 WA3
น้ำฝิ่ง	1	H1
น้ำหมัก	1	NM2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น น้ำปุ๋ยหมัก ให้ตัดแปลงเนื้อหาและต่ออ้างอิงถึงเจ้าของเอกสาร PM1 ที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ) แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสชื่อของยีสต์ที่คัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท ของยีสต์	รหัสชื่อ
น้ำากาน้ำตาลจากโรงงานน้ำตาล วังขนาย จ. ลพบุรี	1	WK1
องุ่น	4	G1 G2 G3 G4
ฝรั่ง	3	F1 F4 F7



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงสกุลยีสต์ จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสเชื้อของยีสต์ที่คัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ

สกุลยีสต์	จำนวนไอโซเลทของยีสต์	รหัสเชื้อ
<i>Candida</i>	58	AB2 AR1 AR2 AR5 AR6 BJ1 BJ2 BN2 BP2 BS1 CM1 DW2 G4 HF2 HF3 KK1 KL1 KP KW2 L1 LK2 LK3 LK4 LP1 M2 MG1 NB2 NB3 ND2 ND3 OI3 OI4 OI5 PK1 PK3 PP1 PW1 PW2 PW3 PW4 PY3 SB4 SB6 SL3 SL4 SW1 SW4 TK1 TK3 TL1 UT WA1 WA3 WF6 WH1 WH3 WP6 Y <sub>3</sub> 1
<i>Pichia</i>	22	BN1 F1 F7 G1 K1 K2 KL2 KT2 KT3 MG3 ND1 PY1RS1 SL2 WE3 WF3 WK1 WS4 WH10 WF2 WP1 Y <sub>2</sub> 2
<i>Rhodotorula</i>	14	BP6 BP3 H1 MG4 NB4 NK1 NK3 PJ2 PJ4 SC1 T1 W3 WH6 WH7
<i>Blastobotrys</i>	6	G2 HF1 SW6 S1 WA2 W2
<i>Meyerozyma</i>	4	BJ4 BS2 DW1 SW2
<i>Trichosporon</i>	4	SI TK2 WP3 WF5
<i>Saccharomycopsis</i>	4	AR3 AR4 SB3 WF4
<i>Schwanniomyces</i>	3	BJ3 NK5 WS2
<i>Yarrowia</i>	3	PM Y <sub>1</sub> 1 Y <sub>3</sub> 2
<i>Ambrosiozyma</i>	2	LP5 WH5
<i>Cyberlindnera</i>	2	M1 W1
<i>Filobasidium</i>	2	CL WE1
<i>Hansenula</i>	2	PJ1; PJ6
<i>Kazachstanina</i>	2	NK4 NM2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ) แสดงสกุลยีสต์ จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสเชื้อของยีสต์ที่คัดแยกจากแหล่งธรรมชาติ

สกุลยีสต์	จำนวนไอโซเลทของยีสต์	รหัสเชื้อ
<i>Kluyveromyces</i>	2	M4 MB
<i>Ogataea</i>	2	LK1 WP2
<i>Priceomyces</i>	2	F4 NK2
<i>Saccharomyces</i>	2	AB1 LP2
<i>Schizosaccharomyces</i>	2	KK2 Y21
<i>Cryptococcus</i>	1	PP2
<i>Debaryomyces</i>	1	PK4
<i>Hanseniaspora</i>	1	Ol6
<i>Metschnikowia</i>	1	Y <sub>1</sub> 2
<i>Rhodosporidium</i>	1	M3
<i>Trigonopsis</i>	1	RS2
<i>Yamadazyma</i>	1	G3

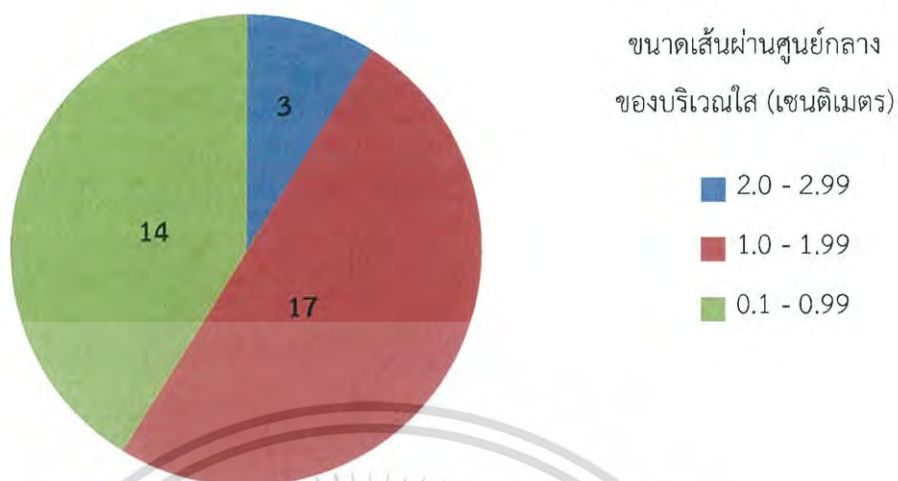
จากตารางที่ 4.1 และตารางที่ 4.2 จากแหล่งตัวอย่างดิน 50 ตัวอย่าง แหล่งน้ำ 5 ตัวอย่าง และผลไม้ 2 ตัวอย่างที่นำมาทำการคัดแยกยีสต์ พบว่ายีสต์ที่คัดแยกได้นั้นส่วนใหญ่จะคัดแยกได้จากแหล่งตัวอย่างดิน และกลุ่มยีสต์ส่วนใหญ่ที่สามารถคัดแยกได้จากตัวอย่างดินนั้นคาดว่าจะเป็ยีสต์สกุล *Candida* ที่มีจำนวนมากที่สุดถึง 58 ไอโซเลท นอกจากนั้นยังมีงานวิจัยที่สามารถคัดแยกยีสต์สกุล *Candida* ได้จากแหล่งดิน (Popoola และ Onilude, 2017; Sláviková และ Vadkertiová, 2003; Sulman และ Rehman, 2013) และดินนั้นเป็นแหล่งที่อุดมไปด้วยสารประกอบอินทรีย์และความชุ่มชื้น ซึ่งเป็นสภาพแวดล้อมที่ดีสำหรับการเจริญเติบโตของยีสต์

นอกจากนั้นน้ำในใบ ราก ดอก และลำต้นของต้นไม้ยังเป็นแหล่งที่อยู่ที่ดีของยีสต์ (Starmer และ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมออนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจาก Lachance, 2010) ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 4.2 การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้

จากการคัดแยกยีสต์จากแหล่งตัวอย่างต่างๆ 57 ตัวอย่าง เช่น ดิน น้ำ และผลไม้ เป็นต้น บนอาหาร Yeast Malt agar เพื่อให้ได้ยีสต์ที่บริสุทธิ์ตามข้อ 4.1 จากนั้นนำยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้อ 4.1 มาทำการเพาะเลี้ยง บนอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส หากยีสต์มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ จะสามารถย่อย Carboxymethylcellulose (CMC) ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เมื่อทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์โดยการย้อมด้วยสี Congo red ร้อยละ 0.2 โดยมวลต่อปริมาตร (Vyas และ Chhabra, 2017) จะพบการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ จากการคัดแยกยีสต์จำนวนทั้งสิ้น 145 ไอโซเลท พบยีสต์ที่สามารถสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 34 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 4.3 และจากการศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสจากยีสต์ที่คัดแยกได้นั้นอาจเป็นชนิดเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) หรือ CMCase เนื่องจากเอนโดกลูคาเนส (endoglucanase) มีความสามารถในการย่อยสลายโมเลกุลของเซลลูโลสในส่วนที่ไม่เป็นระเบียบ (amorphous) หรือย่อยอนุพันธ์ของเซลลูโลส เช่น Carboxymethylcellulose (CMC) ที่พันธะ  $\beta$ -1,4-glycosidic แบบสุ่ม จึงได้ผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ เซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (celluloligo-saccharides) เซลโลเพนตาออส (cellopentaose) เซลโลไตรออส (cellotriose) เซลโลไบออส (cellobiose) และกลูโคส เป็นต้น (Biely และคณะ, 1991; Wood และ Bhat, 1988) ซึ่งเอนไซม์จากยีสต์ที่คัดแยกได้นั้นมีความสามารถในการย่อยสลาย Carboxymethylcellulose (CMC) ที่เติมลงไปในการได้เช่นเดียวกันจึงมีความเป็นไปได้ที่จะเป็นเอนไซม์ชนิดเดียวกัน และยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ทั้ง 34 ไอโซเลทนั้น สามารถคัดแยกได้จากแหล่งตัวอย่างดินหลากหลายพื้นที่ซึ่งเป็นดินที่มีเศษใบไม้ เศษหญ้า ที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ โดยเซลลูโลสเป็นแหล่งคาร์บอนของยีสต์ ซึ่งยีสต์ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาใช้ในกระบวนการย่อยเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อนำมาใช้ในการดำรงชีวิต (Fujita และคณะ, 2004) จากนั้นทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Gupta และคณะ, 2012) รอบโคโลนีของทั้ง 34 ไอโซเลท แสดงดังรูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงจำนวนไอโซเลทของยีสต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่เกิดจากการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อย Carboxymethylcellulose

จากรูปที่ 4.1 พบว่ามียีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสย่อย Carboxymethylcellulose ได้จำนวน 34 ไอโซเลท โดยมียีสต์จำนวน 14 ไอโซเลท ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสน้อยกว่า 1 เซนติเมตร มียีสต์จำนวน 17 ไอโซเลท ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสอยู่ในช่วง 1.0 - 1.99 เซนติเมตร และมียีสต์จำนวน 3 ไอโซเลท ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่า 2 เซนติเมตร และทำการคัดเลือกยีสต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่าหรือเท่ากับ 1 เซนติเมตร ซึ่งมีจำนวน 20 ไอโซเลท เพื่อนำไปศึกษากิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับผลิตเอนไซม์เซลลูเลสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสชื่อของยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแหล่งธรรมชาติ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทของยีสต์	รหัสชื่อ
ดินใต้ต้นไม้ข้างตึกแอล คณะเทคโนโลยีเกษตร ลาดกระบัง	6	AR1, AR2, AR3, AR4, AR5, AR6
ดินร้านรัตนสินการช่าง อ. เมือง จ. เลย	3	OI4, OI5, OI6
ดินเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จ. ลพบุรี	2	KL1, KL2
ดินวัดพระธาตุผาซ่อนแก้ว จ. เพชรบูรณ์	2	LK2, LK4
ดินข้างร้านนมสด หน้า ร.ร. บดินทร์ 2	2	M1, M3
ดินสถานีรถไฟพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง	2	PJ1, PJ2
ดินข้างบ้านที่ อ. ทับคล้อ จ. พิจิตร	1	AB2
ดินหลังบ้านที่ อ. ทับคล้อ จ. พิจิตร	1	BJ4
ดินหน้าบ้าน ต. โพนแดงใต้ อ. บางไทร จ. พระนครศรีอยุธยา	1	DW2
ดินบนเขาค้อ	1	KK1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่ จ. เพชรบูรณ์ ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสชื่อของยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากแหล่งธรรมชาติ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทของยีสต์	รหัสชื่อ
ดินซีเมนต์บ้านเลขที่ 40/26 รามอินทรา77 แยก2 เขตคันทนายาว	1	L1
ดินตลาดมีนบุรี	1	MB
ดินสวนมะม่วงเกียรดิอัมพร อ. แปรริ้ว จ. ฉะเชิงเทรา	1	MG4
ดินข้างร้านก๋วยเตี๋ยวน้ำ ร.ร. บดินทร์ 2	1	NB2
ดินหน้าห้างร้านก๋วยเตี๋ยวน้ำ ร.ร.บดินทร์เดชา 2	1	PW1
ดินหมักได้อ้อย	1	SC1
ดินใต้ถนนบ้านเลขที่ 40/26 รามอินทรา77 แยก2 เขตคันทนายาว	1	T1
ดินข้างทางลพบุรี กม.142 อ. ชัยบาดาล จ. ลพบุรี	1	TL1
ชานอ้อย โรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	1	WF4
ดินทราย โรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	1	WH7
ดินเหนียวเปียก โรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	1	WS2
ดินหลังครัว ต. แม่สูน อ. ฝาง จ. เชียงใหม่	1	Y <sub>1</sub> 1
ดินน้ำพริกฝาง อ. ฝาง จ. เชียงใหม่	1	Y <sub>3</sub> 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น หากมีข้อผิดพลาดและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ตารางที่ 4.4 (ต่อ) แสดงรหัสเชื้อ กิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase ที่ผลิตโดยยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

รหัสเชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
AR2	0.007±0.00 <sup>*c</sup>	0.030±0.44	0.244±0.07 <sup>*c</sup>
KL1	0.004±0.00 <sup>*c</sup>	0.020±1.00	0.210±0.00 <sup>*c</sup>
BJ4	0.010±0.00 <sup>*d</sup>	0.066±0.44	0.152±0.01 <sup>*d</sup>
LK2	0.010±0.00 <sup>*d</sup>	0.077±0.44	0.123±0.00 <sup>*d</sup>
AR1	0.004±0.02 <sup>*c</sup>	0.060±1.29	0.115±0.03 <sup>*c</sup>
AR6	0.001±0.00 <sup>*c</sup>	0.079±0.60	0.101±0.01 <sup>*c</sup>
WS2	0.006±0.00 <sup>*d</sup>	0.085±0.17	0.075±0.02 <sup>*d</sup>
OI4	0.002±0.00 <sup>*c</sup>	0.073±0.44	0.029±0.02 <sup>*c</sup>
PJ1	0.001±0.00 <sup>*b</sup>	0.059±0.88	0.011±0.02 <sup>*b</sup>

หมายเหตุ : เลือกรายงานเฉพาะสภาวะที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในแต่ละไอโซเลท

\*a คือ ซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

\*b คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

\*c คือ ซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

\*d คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.0 บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากตารางที่ 4.4 เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase ที่ยีสต์ผลิตได้โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับผลิตเอนไซม์ CMCase จำนวน 20 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลทยีสต์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase สูงที่สุด 3 อันดับแรกคือ ไอโซเลท PW1 ไอโซเลท M1 และ ไอโซเลท KK1 โดย ไอโซเลท PW1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ  $3.872 \pm 0.05$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ ไอโซเลท M1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ  $3.295 \pm 0.11$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ ไอโซเลท KK1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ  $2.208 \pm 0.20$  ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลทนั้นคัดแยกมาจากดิน โดย ไอโซเลท PW1 คัดแยกได้จากดินท่อน้ำทิ้งข้างร้านก๋วยเตี๋ยวเรือ ร.ร.บดินทร์เดชา 2 ซึ่งเป็นลักษณะดินที่มีการสะสมของเศษอาหารและขี้้นและ ไอโซเลท M1 คัดแยกได้จากดินข้างร้านนมสดหน้า ร.ร.บดินทร์เดชา 2 เนื่องจากอยู่ข้างร้านนมดินจึงมีการสะสมของของเสีย เช่น นมบูด หนุ่เน่าและขี้้นและ และไอโซเลท KK1 คัดแยกได้จากดินบนเขาคือ จ. เพชรบูรณ์ ซึ่งเป็นลักษณะดินที่มีการทับถมของเศษใบไม้และเศษหญ้า จากลักษณะของดินที่สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้ง 3 ไอโซเลทนั้น เป็นดินที่มีการสะสมของเซลลูโลสซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับยีสต์ที่จะผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมาย่อยให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว นอกจากนั้นจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทซึ่งคาดว่าไอโซเลท PW1 และ ไอโซเลท KK1 อาจจัดเป็นยีสต์สกุล *Candida* และ ไอโซเลท M1 อาจจัดเป็นยีสต์สกุล *Cyberlindnera* และจากงานวิจัยที่เคยมีการศึกษาเรื่องการผลิตเอนไซม์ CMCase ในยีสต์สกุล *Candida* เช่น *Candida* sp. 05-7-186T, *Candida easanensis* และ *Candida* sp. ST-390 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 0.224, 0.238 และ 0.26 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Thongekkaew และ Kongsanthia, 2016) และ *Candida easanensis* JK-8 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ CMCase เท่ากับ 0.23 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Thongekkaew และคณะ, 2014) เมื่อนำมาเทียบกับค่ากิจกรรมเอนไซม์ CMCase ของยีสต์ไอโซเลท PW1 ที่ได้จากการคัดแยกซึ่งมีค่ากิจกรรมเอนไซม์เซลลูเลสเท่ากับ  $0.278 \pm 0.00$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่ากิจกรรมเอนไซม์ CMCase ใกล้เคียงกับงานวิจัยที่เคยมีรายงานไว้ แต่ในกรณีของยีสต์สกุล *Cyberlindnera* ยังไม่พบงานวิจัยที่เคยมีการศึกษาเรื่องการผลิตเอนไซม์ CMCase ในยีสต์สกุลนี้ ควรทำการศึกษาด้านชีวเคมีวิทยา (Biochemical characterization) และเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Molecular characterization) เพื่อระบุชนิดของยีสต์ที่ถูกต้อง (Kurtzman, 2010; Singh และคณะ, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.4 การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้

จากการคัดแยกยีสต์จากแหล่งตัวอย่างต่างๆ 57 ตัวอย่าง เช่น ดิน น้ำ และผลไม้ เป็นต้น บนอาหาร Yeast Malt agar เพื่อให้ได้ยีสต์ที่บริสุทธิ์ตามข้อ 4.1 จากนั้นนำยีสต์ที่คัดแยกได้จากข้อ 4.1 มาทำการเพาะเลี้ยงยีสต์บนอาหารแข็งที่ใช้ทดสอบการผลิตเอนไซม์ไลเปส (Singh และคณะ, 2013) หากยีสต์มีการผลิตเอนไซม์ไลเปสจะสามารถย่อย Tributyrin ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนได้และจะพบการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์ จากการคัดแยกยีสต์จำนวนทั้งสิ้น 145 ไอโซเลท พบยีสต์ที่สามารถสร้างบริเวณใสรอบโคโลนีซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้จำนวน 144 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 4.5 และจากการศึกษาคาดว่าเอนไซม์ไลเปสจากยีสต์ที่คัดแยกได้อาจเป็นชนิดเอ็กตราเซลลูลาร์ไลเปส (extracellular lipase) เนื่องจากยีสต์ที่คัดแยกได้มีการสร้างเอนไซม์ไลเปสภายในเซลล์และมีการปลดปล่อยเอนไซม์ไลเปสออกมานอกเซลล์เพื่อย่อยสลายสับสเตรทหรือไขมันจาก Tributyrin ที่เติมลงไปในการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญ ซึ่งตรงกับคุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสชนิดเอ็กตราเซลลูลาร์ (Borkar และคณะ, 2009) จากจำนวน 144 ไอโซเลท คัดแยกได้จากแหล่งดินตัวอย่างจำนวน 130 ไอโซเลท แหล่งตัวอย่างน้ำ 7 ไอโซเลท และตัวอย่างผลไม้ 7 ไอโซเลท ซึ่งส่วนใหญ่สามารถคัดแยกได้จากแหล่งตัวอย่างดิน เนื่องจากตัวอย่างดินที่เก็บมาเป็นแหล่งที่มีการสะสมของไขมัน น้ำมัน และเศษอาหารให้ยีสต์ได้นำเอามาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน อย่างเช่น บริเวณรอบบ้าน รางรถไฟ บ่อน้ำขัง รวมไปถึงเป็นบริเวณที่มีความเค็มอย่าง ป่าชายเลน และบริเวณที่มีอุณหภูมิสูงอย่าง บ่อน้ำพุร้อน ซึ่งอาจจะไม่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ ทำให้ยีสต์ต้องปรับตัวและผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยแหล่งไขมันเข้าสู่เซลล์ต่อไป (Becze และ George, 1956) จากนั้นทำการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (Geoffry และ Achur, 2017) รอบโคโลนีของทั้ง 144 ไอโซเลท แสดงดังรูปที่ 4.2 จากนั้นทำการคัดเลือกยีสต์ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสมากกว่าหรือเท่ากับ 2 เซนติเมตร พบว่ามีจำนวน 8 ไอโซเลท ซึ่งมีขนาดของบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของยีสต์กว้างที่สุด โดยจะนำทั้ง 8 ไอโซเลท ที่คาดว่าจะสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ไปทำการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสที่ยีสต์ผลิตได้โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับผลิตเอนไซม์ไลเปสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสเชื้อของยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งธรรมชาติ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทของยีสต์	รหัสเชื้อ
ดินใต้ต้นไม้ข้างตึกแอล คณะเทคโนโลยีเกษตร ลาดกระบัง	6	AR1 AR2 AR3 AR4 AR5 AR6
ดินทรายโรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	6	WH1 WH2 WH5 WH6 WH7 WH10
ดินข้างน้ำเขื่อนแก่งกระจาน จ. เพชรบุรี	5	NK1 NK2 NK3 NK4 NK5
ฟางหยาบโรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	5	WF2 WF3 WF4 WF5 WF6
ดินหลังบ้าน อ. ทับคล้อ จ. พิจิตร	4	BJ1 BJ2 BJ3 BJ4
ดินวัดพระธาตุผาซ้อนแก้ว จ. เพชรบูรณ์	4	LK1 LK2 LK3 LK4
ดินข้างร้านนมสด หน้า ร.ร.บดินทร์ 2	4	M1 M2 M3 M4
ดินร้านรัตนสินการช่าง อ. เมือง จ. เลย	4	OI3 OI4 OI5 OI6
ดินสถานีรถไฟพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง	4	PJ1 PJ2 PJ4 PJ6
ดินท่อน้ำทิ้งข้างร้านกวยเตี๋ยวเรือ ร.ร.บดินทร์ 2	4	PW1 PW2 PW3 PW4
ดินข้างน้ำซังขอย นวมินทร์ 74	4	SW1 SW2 SW4 SW6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้ภายในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสชื่อของยีสต์ที่สามารถผลิต เอ็นไซม์ไลเปสจากแหล่งธรรมชาติ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทของ ยีสต์	รหัสชื่อ
ดินเหนียวเปียกโรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	4	WP1 WP2 WP3 WP6
ดินบางปู อ. เมือง จ. สมุทรปราการ	3	BP2 BP3 BP6
ดินหลังบ้าน ต. โทแดงใต้ อ. บางไทร จ. พระนครศรีอยุธยา	3	HF1 HF2 HF3
ดินวัดลาดพร้าว เขตลาดพร้าว จ. กรุงเทพฯ	3	LP1 LP2 LP5
ดินสวนมะม่วง สวนเกียรต้อมพร อ. แปรจรรย์ จ. ฉะเชิงเทรา	3	MG1 MG3 MG4
ดินข้างร้านก๋วยเตี๋ยวหน้าร.ร. บดินทร์ 2	3	NB2 NB3 NB4
ดินข้างร้านก๋วยเตี๋ยวเรือหน้าร.ร. บดินทร์ 2	3	ND1 ND2 ND3
ดินแปลงเกษตรข้างบ่อบัว คณะเทคโนโลยีเกษตร ลาดกระบัง	3	PK1 PK3 PK4
ดินข้างถังขยะหน้า ร.ร. บดินทร์ 2	3	SB3 SB4 SB6
ดินท่อน้ำครัวบ้านเลขที่ 343 ซอยมิตอนันต์ เขตดุสิต จ.กรุงเทพฯ	3	TK1 TK2 TK3
ดินทางเชื่อมหอในลาดกระบัง	3	W1 W2 W3
ดินข้างบ้าน อ. ทับคล้อ จ. พิจิตร	2	AB1 AB2
ดินหลังบ้าน อ. บรรพตพิสัย จ. นครสวรรค์	2	BN1 BN2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมีเหตุดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสเชื้อของยีสต์ที่สามารถผลิตเอโนไซม์ไลเปสจากแหล่งธรรมชาติ

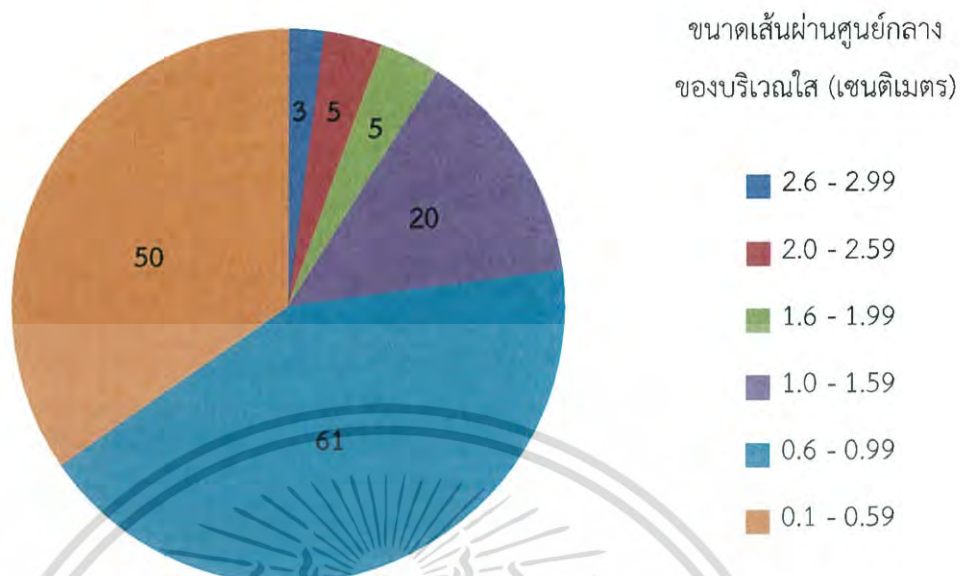
แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลทของยีสต์	รหัสเชื้อ
ดินชายเลน บางแสน จ. ชลบุรี	2	BS1 BS2
ดินหน้าบ้าน ต. โพนแดงใต้ อ. บางไทร จ. พระนครศรีอยุธยา	2	DW1 DW2
ดินครัวร้านเสพศิลป์ อ. สะเมิง จ. เชียงใหม่	2	K1 K2
ดินบนเขาค้อ จ. เพชรบูรณ์	2	KK1 KK2
ดินเขื่อนป่าสักชลสิทธิ์ จ. ลพบุรี	2	KL1 KL2
ดินข้างรางรถไฟลาดกระบัง	2	KT2 KT3
ดินร้านอาหารภิรมพร อ. เมือง จ. เลย	2	PP1 PP2
ดินร้านส้มตำปากซอยมิตรอนันต์ แขวง ถนนนครไชยศรี เขตดุสิต จ. กรุงเทพฯ	2	PY1 PY3
ดินเหนียวเปียกโรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี	2	WS2 WS4
ดินหลังครัว ต. แม่สูน อ. ผาง จ. เชียงใหม่	2	Y <sub>1</sub> 1 Y <sub>1</sub> 2
ดินใต้ต้นไม้ ต. แม่สูน อ. ผาง จ. เชียงใหม่	2	Y <sub>2</sub> 1 Y <sub>2</sub> 2
ดินน้ำพุร้อนผาง อ. ผาง จ. เชียงใหม่	2	Y <sub>3</sub> 1 Y <sub>3</sub> 2
ดินใต้ต้นพริก แฟลช19 แขวงนวลจันทร์ เขตบึงกุ่ม จ. กรุงเทพฯ	1	CL1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ) แสดงแหล่งตัวอย่าง จำนวนไอโซเลทของยีสต์และรหัสเชื้อของยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสจากแหล่งธรรมชาติ

แหล่งตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท ของยีสต์	รหัสเชื้อ
ดินสวนสนบ่อแก้ว อ. ฮอด จ. เชียงใหม่	1	CM1
ดินข้างบ้าน อ. ทับคล้อ จ. พิจิตร	1	KP1
ดินซีเลนบ้านเลขที่ 40/26 รามอินทรา77 แยก2 เขตคันนายาว	1	L1
ดินตลาดมีนบุรี	1	MB1
หินบริเวณรางรถไฟ สถานีกระบัง	1	S1
ดินหมักได้อ้อย	1	SC1
ดินใต้ต้นไทรสวนพฤกษชาติ การเคหะนมินทร์ เขตบึงกุ่ม จ. กรุงเทพฯ	1	SI
ดินใต้ถนนบ้านเลขที่ 40/26 รามอินทรา77 แยก2 เขตคันนายาว	1	T1
ดินข้างทาง กม.142 อ. ชัยบาดาล จ. ลพบุรี	1	TL1
ดินใต้ต้นไม้ในบ้าน อ. ทับคล้อ จ. พิจิตร	1	UT1
น้ำขัง ซอยนมินทร์ 74	3	WA1 WA2 WA3
น้ำผึ้ง	1	H1
น้ำหมัก	1	NM2
น้ำปุ๋ยหมัก	1	PM1
น้ำกากน้ำตาลจากโรงงานน้ำตาล วังนาย จ.ลพบุรี	1	WK1
อุ้งนุ่น	4	G1 G2 G3 G4
ฝรัง	3	F1 F4 F7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งขอให้นักศึกษาและผู้เกี่ยวข้องต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.2 แสดงจำนวนไอโซเลทของยีสต์ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสที่คาดว่าจะเกิดการ  
ผลิตเอนไซม์ไลเปสมาย่อย tributyrin

จากรูปที่ 4.2 พบว่ามียีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสย่อย Tributyrin ได้จำนวน 141 ไอโซเลท โดยมียีสต์จำนวน 50 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเอนไซม์ไลเปสน้อยกว่า 0.6 เซนติเมตร มียีสต์จำนวน 61 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเอนไซม์ไลเปสอยู่ในช่วง 0.6 – 0.99 เซนติเมตร มียีสต์จำนวน 20 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเอนไซม์ไลเปสอยู่ในช่วง 1.0 – 1.59 เซนติเมตร มียีสต์จำนวน 5 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเอนไซม์ไลเปสอยู่ในช่วง 1.6 – 1.99 เซนติเมตร มียีสต์จำนวน 5 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเอนไซม์ไลเปสอยู่ในช่วง 2.0 – 2.59 เซนติเมตร และมียีสต์จำนวน 3 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเอนไซม์ไลเปสมากกว่า 2.6 เซนติเมตร แล้วจึงทำการคัดเลือกยีสต์ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์ขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 2 เซนติเมตร ซึ่งมีจำนวน 8 ไอโซเลทเพื่อนำไปศึกษา  
กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับผลิตเอนไซม์ไลเปสต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4.5 การตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปสโดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว

จากการคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ตามข้อ 4.4 ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์ขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 2 เซนติเมตร จำนวน 8 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท BN1 ไอโซเลท SW1 ไอโซเลท BS1 ไอโซเลท WH7 ไอโซเลท Y<sub>3</sub>2 ไอโซเลท S1 ไอโซเลท PJ4 และ ไอโซเลท PJ2 ซึ่งจะนำทั้ง 8 ไอโซเลทมาทำการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ extracellular lipase ที่ยีสต์ผลิตได้โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับผลิตเอนไซม์ไลเปส (Singh และคณะ, 2013) และทำการวัดกิจกรรมเอนไซม์ extracellular lipase ที่เกิดจากเอนไซม์ไลเปสย่อย Olive oil ได้เป็นกรดไขมันอิสระด้วยวิธีการไตเตรทโดยโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (Geoffry และ Achur, 2017; Kumar และคณะ, 2017) ซึ่งผลการทดลองที่ได้แสดงดังตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงรหัสเชื้อ กิจกรรมของเอนไซม์ ปริมาณโปรตีน และกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ extracellular lipase ที่ผลิตโดยยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งธรรมชาติ

รหัสเชื้อ	กิจกรรมของเอนไซม์ extracellular lipase (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม)	กิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ extracellular lipase (ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน)
BN1	78.000±8.49 <sup>*e</sup>	0.162±1.59	481.480±52.38 <sup>*e</sup>
WH7	40.000±0.00 <sup>*f</sup>	0.127±1.57	314.140±0.00 <sup>*f</sup>
S1	44.000±5.66 <sup>*f</sup>	0.149±1.86	295.400±37.98 <sup>*f</sup>
SW1	46.000±8.49 <sup>*f</sup>	0.160±0.44	287.330±53.00 <sup>*f</sup>
PJ4	36.000±0.00 <sup>*f</sup>	0.147±1.19	244.190±0.00 <sup>*f</sup>
BS1	28.000±0.00 <sup>*f</sup>	0.138±0.76	202.760±0.00 <sup>*f</sup>
Y <sub>3</sub> 2	26.000±8.49 <sup>*f</sup>	0.134±0.66	194.580±63.50 <sup>*f</sup>
PJ2	40.000±0.00 <sup>*f</sup>	0.299±3.16	133.930±0.00 <sup>*f</sup>

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : เลือกรายงานเฉพาะสภาวะที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงที่สุดในแต่ละไอโซเลท

\*e คือ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ซิเตรทบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8

\*f คือ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 7.0

จากตารางที่ 4.8 เมื่อตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ extracellular lipase ที่ยีสต์ผลิตได้ โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่ใช้สำหรับผลิตเอนไซม์ extracellular lipase จำนวน 8 ไอโซเลท พบว่ายีสต์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ไลเปสสูงที่สุด 3 อันดับแรกคือ ไอโซเลท BN1 ไอโซเลท WH7 และไอโซเลท S1 โดย ไอโซเลท BN1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์สูงที่สุดเท่ากับ  $481.480 \pm 52.38$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน รองลงมาคือ ไอโซเลท WH7 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ  $314.140 \pm 0.00$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และไอโซเลท S1 มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ  $295.400 \pm 37.98$  หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ซึ่งทั้ง 3 ไอโซเลทนั้นคัดแยกมาจากดิน โดย ไอโซเลท BN1 คัดแยกได้จากดินหลังบ้าน อ.บรรพตพิสัย จ. นครสวรรค์ ซึ่งเป็นลักษณะดินที่มีการสะสมของแหล่งไขมันที่มาจากเศษอาหารและมีสภาพที่ชื้นแฉะ ไอโซเลท WH7 คัดแยกได้จากดินทรายโรงงานน้ำตาลวังขนาย จ. ลพบุรี ซึ่งเป็นลักษณะดินที่มีความแห้งและไม่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ และไอโซเลท S1 คัดแยกได้จากหินบริเวณรางรถไฟลาดกระบัง ซึ่งเป็นบริเวณที่ติดกับรางรถไฟ ทำให้มีการปนเปื้อนน้ำมันจากรถไฟ และจากลักษณะของดินที่สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้ง 3 ไอโซเลทนั้น เป็นแหล่งที่มีการสะสมของไขมันซึ่งยีสต์นั้นนำเอามาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้หรือบริเวณที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ เช่น ดินที่แห้งแล้ง อาจทำให้ยีสต์ต้องผลิตเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยแหล่งไขมันเพื่อให้ได้กรดไขมันอิสระ กลีเซอรอล และนำไปสร้างเป็นองค์ประกอบของฟอสโฟไลปิดในเยื่อหุ้มผนังเซลล์ นอกจากนี้จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลทซึ่งคาดว่า ไอโซเลท BN1 อาจจะเป็นยีสต์สกุล *Pichia* ไอโซเลท WH7 อาจจะเป็นยีสต์สกุล *Rhodotorula* และไอโซเลท S1 อาจจะเป็นยีสต์สกุล *Blastobotrys*

จากงานวิจัยที่เคยมีการศึกษาเรื่องการผลิตเอนไซม์ extracellular lipase ในยีสต์สกุล *Rhodotorula* เช่น *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC 8737 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ extracellular lipase เท่ากับ 72 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Potumarthi และคณะ, 2008.) *Rhodotorula glutinis* HL25 มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ extracellular lipase เท่ากับ 54.4 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Taskin และคณะ, 2016) และ *Rhodotorula glutinis* มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ extracellular lipase เท่ากับ

30.4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Papaparaskevas และคณะ, 1992) เป็นต้น เมื่อนำมาเทียบกับยีสต์ไอโซเลท WH7 ที่คัดแยกได้มีค่ากิจกรรมเอนไซม์ extracellular lipase เท่ากับ  $40.000 \pm 0.00$  ยูนิตต่อมิลลิลิตร พบว่ามีกิจกรรมเอนไซม์ extracellular lipase ต่ำกว่าที่เคยมีรายงานไว้ แต่ในยีสต์สกุล *Pichia* และ สกุล *Blastobotrys* ยังไม่พบงานวิจัยที่เคยมีการศึกษาเรื่องการผลิตเอนไซม์ extracellular lipase ในสกุลยีสต์นี้ โดยจากงานวิจัยจะพบว่ามีการใช้สกุลยีสต์ *Pichia* และ สกุล *Blastobotrys* ในการแสดงออกของยีนที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเป็นส่วนใหญ่ ควรทำการศึกษาด้านชีวเคมีวิทยา (Biochemical characterization) และเทคนิคทางชีวโมเลกุล (Molecular characterization) เพื่อระบุชนิดของยีสต์ที่ถูกต้อง (Kurtzman, 2010; Singh และคณะ, 2013)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

1. จากการคัดแยกยีสต์จากแหล่งธรรมชาติต่างๆภายในประเทศไทยทั้งหมดจำนวน 57 ตัวอย่าง ได้แก่ ดิน น้ำ และผลไม้ พบว่าสามารถคัดแยกยีสต์ได้จำนวนทั้งสิ้น 145 ไอโซเลท เมื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ รูปร่าง ขอบ การยกตัว ผิวหน้า และสี โดยนำยีสต์มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร Yeast Malt Agar และศึกษารูปร่าง การแบ่งตัว (fission) การแตกหน่อ (budding) และลักษณะเส้นสายของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าสามารถจัดกลุ่มได้จำนวนทั้งสิ้น 26 กลุ่ม
2. จากการทดสอบคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสของยีสต์บนอาหารแข็งที่ใช้ Carboxymethylcellulose (CMC) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามียีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ 34 ไอโซเลท และมี 20 ไอโซเลทที่สร้างบริเวณใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของมากกว่าหรือเท่ากับ 1 เซนติเมตร
3. จากการทดสอบคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์ไลเปสของยีสต์บนอาหารแข็งที่ใช้ Tributyrin เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่ามียีสต์ที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสได้ 144 ไอโซเลท และมี 8 ไอโซเลทที่สร้างบริเวณใสขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของมากกว่าหรือเท่ากับ 2 เซนติเมตรได้
4. จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ CMCase พบว่ายีสต์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ CMCase สูงที่สุด 3 อันดับแรก คือ ไอโซเลท PW1 ไอโซเลท M1 และ ไอโซเลท KK1 ซึ่งมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ  $3.872 \pm 0.05$ ,  $3.295 \pm 0.11$  และ  $2.208 \pm 0.20$  ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ
5. จากการตรวจสอบกิจกรรมของเอนไซม์ extracellular lipase พบว่ายีสต์ที่มีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ extracellular lipase สูงที่สุด 3 อันดับแรก คือ ไอโซเลท BN1 ไอโซเลท WH7 และ ไอโซเลท S1 ซึ่งมีค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์เท่ากับ  $481.480 \pm 52.38$ ,  $314.140 \pm 0.00$  และ  $295.400 \pm 37.98$  ยูนิต์ต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ทำการศึกษาทางด้าน Biochemical characterization เช่น การหมักน้ำตาล การใช้ไอโซโทป การใช้เมทานอลและการใช้ในเตา เป็นต้น และ Molecular characterization เช่น การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ D1/D2 domain ของ 26S rRNA การวิเคราะห์ Long Chain Fatty Acid Methyl Ester (FAME) ชนิดของโคเอนไซม์คิว และ G+C contents ของ ดีเอ็นเอในนิวเคลียส เป็นต้น เพิ่มเติมเพื่อทำการยืนยันและระบุสายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้ (Kurtzman, 2010; Singh และคณะ, 2013)

2. ทำการศึกษาสภาพที่เหมาะสม เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน อุณหภูมิ พีเอช และระยะเวลา เป็นต้น ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์โดยยีสต์ที่คัดเลือกได้ เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่สูงขึ้น (Geoffry & Achur, 2018)

3. ทำการทดสอบคุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสหรือไลเปสที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลหรือไบโอดีเซลซึ่งเป็นเชื้อเพลิงเหลว โดยเอนไซม์ที่นำมาใช้ผลิตเชื้อเพลิงเหลว ควรมีคุณสมบัติเด่นดังต่อไปนี้

คุณสมบัติของเอนไซม์เซลลูเลสที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเอทานอล

1. ไม่ก่อให้เกิดสารพิษในกระบวนการปรับสภาพที่เป็นสารประกอบฟีนอลิก (phenolic) เช่น ฟิวแรนส์ (furans), ฟิวเฟอร์ลส์ (furfurals) และ 5-HMF เป็นต้น
2. สามารถนำเอนไซม์มาใช้ในการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ที่สามารถดำเนินปฏิกิริยาได้ในถึงปฏิกิริยเดี่ยว (Spyridon และคณะ, 2016) จึงควบคุมอุณหภูมิและค่าพีเอชได้ง่ายทำให้ขั้นตอนการผลิตโดยรวมมีประสิทธิภาพและลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิต
3. ทนต่ออุณหภูมิสูงระหว่างกระบวนการปรับสภาพได้และทนต่อตัวทำละลายได้สูง เช่น เอทานอล
4. ความเสี่ยงในการปนเปื้อนต่ำ
5. สามารถย่อยสลายชีวมวลได้ทั้งหมด (cellulosic biomass) (Akram และคณะ, 2018)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### คุณสมบัติของเอนไซม์ไลเปสที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอดีเซล

1. มีความเสถียรและทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์ได้สูง เช่น เมทานอล
2. สามารถทำปฏิกิริยาได้โดยไม่ต้องใช้สภาวะที่รุนแรง เช่น อุณหภูมิ ความดันสูง
3. มีความจำเพาะต่อสับสเตรทในวงกว้าง
4. แสดง regioand และหรือ stereoselectivity สูงในการเร่งปฏิกิริยา
5. นำมาใช้ในกระบวนการเปลี่ยนสับสเตรทไปเป็นไบโอดีเซลแทนกระบวนการอัลคาไลน์ (alkaline) ซึ่งกระบวนการนี้จะส่งผลให้เกิดปัญหาผลพลอยได้ที่ไม่พึงประสงค์ระหว่างกระบวนการผลิต แต่การใช้เอนไซม์ไลเปสไม่ก่อให้เกิดปัญหาดังกล่าว (Anobom และคณะ, 2014)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- ทิพวรรณ แต่งสวน. 2553. “การคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากมูลสุกร”. โครงการงานพิเศษระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. “ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่าศรณารายณ์”. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พัชณีย์สิตา พิพัฒน์กุลภักดี และ พิชญา เมธากุลวงศ์. 2560. “การคัดแยกยีสต์ที่สะสมไขมันในเซลล์จากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย”. โครงการงานพิเศษระดับวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นัยนา บุญทวีวัฒน์. 2553. *ชีวเคมีทางโภชนาการ*. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์ เจริญดี มั่นคงการพิมพ์
- อรรณู หันพงศ์กิตติกุล. 2555. *เทคโนโลยีชีวภาพ Enzyme Technology*. สงขลา : คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
- อารี ฤทธิบุรณ์. 2559. *ปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์*. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- Akram F., ul Haq I., Imran W., & Mukhtar H. 2018. “Insight perspectives of thermostable endoglucanases for bioethanol production: A review”. *Renewable Energy*. 122 : 225-238.
- Anobom C. D., Pinheiro A. S., De-Andrade R. A., Aguiéiras E. C., Andrade G. C., Moura, M. V., & Freire D. M. 2014. “From structure to catalysis: Recent developments in the biotechnological applications of lipases”. *BioMed Research International*. 2014 : 1-11.
- Ansorge-Schumacher M. B., & Thum O. 2013. “Immobilised lipases in the cosmetics industry”. *Chemical Society Reviews*. 42(15) : 6475-6490.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Arantes CC, Castello L, Stewart DJ, Cetra M, Queiroz HL. 2010. "Population density, growth and reproduction of arapaima in an Amazonian river-floodplain". *Ecology of Freshwater Fish*. 19 : 455–465.
- Ariffin H., Abdullah N., Umi Kalsom M. S., Shirai Y., & Hassan M. A. 2006. "Production and characterization of cellulase by *Bacillus pumilus* EB3". *International Journal of Engineering and Technology*. 3(1) : 47-53.
- Azhar S. H. M., Abdulla R., Jambo S. A., Marbawi H., Gansau J. A., Faik A. A. M., & Rodrigues K. F. 2017. "Yeasts in sustainable bioethanol production: A review". *Biochemistry and Biophysics Reports*. 10 : 52-61.
- Bajaj A., Lohan P., Jha P. N., & Mehrotra R. 2010. "Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62 : 9-14.
- Baskar G., & Aiswarya R. 2016. "Trends in catalytic production of biodiesel from various feedstocks". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 57 : 496-504.
- Becze G. I. 1956. "Yeasts: I, Morphology". *Applied Microbiology*. 4(1) : 1-12.
- Begam M. S., Pradeep F. S., & Pradeep B. V. 2012. "Production, purification, characterization and applications of lipase from *Serratia marcescens* MBB05". *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. 5 : 237-245.
- Behera B. C., Sethi B. K., Mishr R. R., Dutta S. K., & Thatoi H. N. 2017. "Microbial cellulases–Diversity & biotechnology with reference to mangrove environment: A review". *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15(1) : 197-210.
- Behera S. S., & Ray R. C. 2016. "Solid state fermentation for production of microbial cellulases: Recent advances and improvement strategies". *International Journal of Biological Macromolecules*. 86 : 656-669.

- Bekatorou A., Psarianos C., & Koutinas A. A. 2006. "Production of food grade yeasts". *Food Technology and Biotechnology*. 44(3) : 407-415.
- Benjamin S., & Pandey A. 2001. "Isolation and characterization of three distinct forms of lipases from *Candida rugosa* produced in solid state fermentation". *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 44(2) : 213-221.
- Bhat M. K., & Bhat S. 1997. "Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications". *Biotechnology Advances*. 15(3-4) : 583-620.
- Biely P., Vršanská M., & Claeysens M. 1991. "The endo-1, 4- $\beta$ -glucanase I from *Trichoderma reesei*: Action on  $\beta$ -1, 4-oligomers and polymers derived from d-glucose and d-xylose". *European journal of biochemistry*. 200(1) : 157-163.
- Bisen P. S., Debnath M., & Prasad G. B. 2012. **Microbes: Concepts and Application**. New Jersey : Wiley-Blackwell
- Borkar P. S., Bodade R. G., Rao S. R., & Khobragade C. N. 2009. "Purification and characterization of extracellular lipase from a new strain: *Pseudomonas aeruginosa* SRT 9". *Brazilian Journal of Microbiology*. 40(2) : 358-366.
- Bussamara R., Fuentefria A. M., de Oliveira E. S., Broetto L., Simcikova M., Valente P., & Vainstein M. H. 2010. "Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation". *Bioresource Technology*. 101(1) : 268-275.
- Byadgi S. A., & Kalburgi P. 2016. "Production of Bioethanol from Waste Newspaper". *Procedia Environmental Sciences*. 35 : 555-562.
- Carvalho T., Finotelli P. V., Bonomo R. C., Franco M., & Amaral P. F. 2017. "Evaluating aqueous two-phase systems for *Yarrowia lipolytica* extracellular lipase purification". *Process Biochemistry*. 53 : 259-266.

Casas-Godoy L., Duquesne S., Bordes F., Sandoval G., & Marty A. 2012. "Lipases: An overview". *Lipases and Phospholipases*. 861 : 3-30

- Chang V. S., & Holtzapple M. T. 2000. **Twenty-first symposium on biotechnology for fuels and chemicals**. New Jersey : Humana Press.
- Chaturvedi S., & Khare A. 2016. "Isolation and optimization for extracellular lipase using ground nut shell under submerged fermentation". *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*. 6(3) : 4727-4732.
- Chen Y. 2007. "Potential of agricultural residues and hay for bioethanol production". *Appl Biochem Biotechnol*. 142(3) : 276-90.
- Chi Z., Chi Z., Zhang T., Liu G., Li J., & Wang X. 2009. "Production, characterization and gene cloning of the extracellular enzymes from the marine-derived yeasts and their potential applications". *Biotechnology Advances*. 27 : 236-255.
- Contesini F. J., Lopes D.B., Macedo G. A., Nascimento D. G. M., & Carvalho D. O. P. 2010. "Aspergillus sp. lipase: Potential biocatalyst for industrial use". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 67(3-4) : 163-171.
- Fan L.T., & Lee Y.H. 1983. "Kinetics studies of enzymatic hydrolysis of insoluble cellulose: Derivation of a mechanistic kinetic model". *Biotechnology and Bioengineering*. 25 : 2070-2733.
- Fan X., Niehus X., & Sandoval G. 2012. "Lipases as biocatalyst for biodiesel production". *Lipases and Phospholipases*. 861 : 471-483.
- Fasiloğlu S., & Erkmen O. 2002. "Effects of carbon and nitrogen sources on lipase production by *Candida rugosa*". *Turkish Journal of Engineering and Environmental Sciences*. 26(3) : 249-254.
- Fickers P., Marty A., & Nicaud J. M. 2011. "The lipases from *Yarrowia lipolytica*: Genetics, production, regulation, biochemical characterization and biotechnological applications". *Biotechnology Advances*. 29(6) : 632-644.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fujita Y., Ito, J., Ueda M., Fukuda H., & Kondo A. 2004. "Synergistic saccharification, and direct fermentation to ethanol, of amorphous cellulose by use of an engineered yeast strain codisplaying three types of cellulolytic enzyme". *Applied and Environmental Microbiology*. 70(2) : 1207-1212.

Geoffry K., & Achur R. N. 2017. "A novel halophilic extracellular lipase with both hydrolytic and synthetic activities". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12 : 125-130.

Geoffry K., & Achur R. N. 2018. "Screening and production of lipase from fungal organisms". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 14 : 241-253.

Golani M., Hajela K., & Pandey G. P. 2016. "Screening, identification, characterization and production of bacterial lipase from oil spilled soil". *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 5(3) : 745-763.

Goksoyr J. & Eriksen J. 1980. *Economic Microbiology*. พิมพ์ครั้งที่ 5. New York : Academic Press.

Goldbeck R., Andrade C. C. P., Pereira G. A. G., & Mauerer Filho F. 2012. "Screening and identification of cellulase producing yeast-like microorganisms from Brazilian biomes". *African Journal of Biotechnology*. 11 : 11595-11603.

Gricajeva A., Kazlauskas S., Kalėdienė L., & Bendikienė V. 2017. "Analysis of *Aspergillus* sp. lipase immobilization for the application in organic synthesis". *International Journal of Biological Macromolecules*. 108 : 1165-1175

Gupta P., Samant K., & Sahu A. 2012. "Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential". *International Journal of Microbiology*. 2012 : 1-5.

Gupta R., Kumari A., Syal P., & Singh Y. 2015. "Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology". *Progress in Lipid Research*. 57 : 40-54.

- Hamid B., Baba Z. A., Sheikh T. A., & Bhat Z. A. 2018. "Isolation and screening of psychrophilic yeast from Gurez valley of J&K". *International Journal of Interdisciplinary Research in Arts and Humanities*. 3(1) : 113-116.
- Harmsen P. F. H., Huijgen W., Bermudez L., & Bakker R. 2010. "Literature review of physical and chemical pretreatment processes for lignocellulosic biomass". *Wageningen UR-Food & Biobased Research*. 1184 : 1-49.
- Holtzapple M., Cognata M., Shu Y., & Hendrickson C. 1990. "Inhibition of *Trichoderma reesei* cellulase by sugars and solvents". *Biotechnology and Bioengineering*. 36(3) : 275-287.
- Horchani H., Aissa I., Ouertani S., Zarai Z., Gargouri Y., & Sayari A. 2012. "Staphylococcal lipases: Biotechnological applications". *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 76 : 125-132.
- Ja'afaru M. I. 2013. "Screening of fungi isolated from environmental samples for xylanase and cellulase production". *ISRN microbiology*. 2013 : 1-7.
- Javed S., Azeem F., Hussain S., Rasul I., Siddique M. H., Riaz M., & Nadeem H. 2017. "Bacterial lipases: A review on purification and characterization". *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. 132 : 23-34.
- Joseph B., Ramteke P. W., & Thomas G. 2008. "Cold active microbial lipases: some hot issues and recent developments". *Biotechnology Advances*. 26(5) : 457-470.
- Juturu V., & Wu J. C. 2014. "Microbial cellulases: Engineering, production and applications". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 33 : 188-203.
- Kakugawa K., Shobayashi M., Suzuki O., & Miyakawa T. 2002. "Purification and characterization of a lipase from the glycolipid-producing yeast *Kurtzmanomyces* sp. I-11". *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 66(5) : 978-985.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kamini N. R., Fujii T., Kurosu T., & Iefuji H. 2000. "Production, purification and characterization of an extracellular lipase from the yeast, *Cryptococcus* sp. S-2". *Process Biochemistry*. 36(4) : 317-324.
- Karimi M., Hassanshahian M. 2014. "Isolation and characterization of phenol degrading yeasts from wastewater in the coking plant of Zarand, Kerman". *Brazilian Journal of Microbiology*. 47 : 18-24.
- Khoshnevisan K., Vakhshiteh F., Barkhi, M., Baharifar H., Poor-Akbar E., Zari, N & Bordbar A. K. 2017. "Immobilization of cellulase enzyme onto magnetic nanoparticles: Applications and recent advances". *Molecular Catalysis*. 442 : 66-73.
- Kitagawa T., Kohda K., Tokuhiko K., Hoshida H., Akada R., Takahashi H., & Imaeda T. 2011. "Identification of genes that enhance cellulase protein production in yeast". *Journal of Biotechnology*. 151 : 194-203.
- Klaus, U. 1994. **Comparative Animal Biochemistry**. Berlin : Springer- Verlag, Berlin Heidelberg
- Knop M. 2011. "Yeast cell morphology and sexual reproduction—A short overview and some considerations". *Comptes Rendus Biologies*. 334(8-9) : 599-606.
- Kuhad R. C., Gupta R., & Singh A. 2011. "Microbial cellulases and their industrial applications". *Enzyme Research*. 2011 : 1-10.
- Kuhad R. C., Deswal D., Sharma S., Bhattacharya A., Jain K. K., Kaur A., & Karp M. 2016. "Revisiting cellulase production and redefining current strategies based on major challenges". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 55 : 249-272.
- Kumar D., Singh B., & Korstad J. 2017. "Utilization of lignocellulosic biomass by oleaginous yeast and bacteria for production of biodiesel and renewable diesel". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 73 : 654-671.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Kumar P. P., Jansi R. S., Kumar P. S., Christhudas I. N., Raj J. P., Vijayakumar A., & Ignacimuthu S. 2017. "Optimization of biosynthesis parameters, partial purification and characterization of extracellular lipase from soil derived *Streptomyces* sp. Loyola Lipase-1". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 12 : 241-247.
- Kumar S., Kikon K., Upadhyay A., Kanwar S. S., & Gupta R. 2005. "Production, purification, and characterization of lipase from thermophilic and alkaliphilic *Bacillus coagulans* BTS-3". *Protein Expression and Purification*. 41(1) : 38-44.
- Kurtzman, C. P. 2010. *The Yeasts*. พิมพ์ครั้งที่ 5. Amsterdam : Elsevier Science Publisher B.V.
- Lastauskienė E., Čepulytė J., Girkontaitė I., & Zinkevičienė A. 2015. "Phenotypic switching of *Candida guilliermondii* is associated with pseudohyphae formation and antifungal resistance". *Mycopathologia*. 179(3-4) : 205-211.
- Lee Y. J., Kim B. K., Lee B. H., Jo K. I., Lee N. K., Chung C. H., & Lee J. W. 2008. "Purification and characterization of cellulase produced by *Bacillus amyloquelificans* DL-3 utilizing rice hull". *Bioresource Technology*. 99(2) : 378-386.
- Luo J., Matsuo Y., Gulis G., Hinz H., Patton-Vogt J., & Marcus S. 2009. "Phosphatidylethanolamine is required for normal cell morphology and cytokinesis in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*". *Eukaryotic Cell*. 8(5) : 790-799.
- McDonald, P., R. A. Edwards, J. F. D. Greenhalgh, C. A. Morgan, L. A. Sinclair, R. G. Wilkinson. 2011. *Animal Nutrition*. พิมพ์ครั้งที่ 7. Harlow : Pearson Canada, Incorporate.
- Mafakher L., Mirbagheri M., Darvishi F., Nahvi I., Zarkesh-Esfahani H., & Emtiazi G. 2010. "Isolation of lipase and citric acid producing yeasts from agro-industrial wastewater". *New Biotechnology*. 27(4) : 337-340.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาด้านเกษตรกรรม ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Mapato C., Wanapat M., & Cherdthong A. 2010. "Effects of urea treatment of straw and dietary level of vegetable oil on lactating dairy cows". *Tropical Animal Health and Production*. 42(8) : 1635-1642.
- Montes D. O. R., Salem A.Z.M., Kholif A.E., Monroy H., Pérez L.S., Zamora J.L. & Gutiérrez A. 2016. **Yeast additive and animal production**. Tamilnadu : PubBioMed Central Research Publishing Services
- Morais W. G., Kamimura E. S., Ribeiro E. J., Pessela B. C., Cardoso V. L., & de Resende M. M. 2016. "Optimization of the production and characterization of lipase from *Candida rugosa* and *Geotrichum candidum* in soybean molasses by submerged fermentation". *Protein Expression and Purification*". 123 : 26-34.
- Morel, P.C.H., J. Leong, W.G.M. Nuijten, R.W. Purchas, B.H.P. Wilkinson. 2013. "Effect of lipid type on growth performance, meat quality and the content of long chain n-3 fatty acids in pork meat". *Meat Science*. 95 : 151-159.
- Nandy S. K., & Srivastava R. K. 2018. "A review on sustainable yeast biotechnological processes and applications". *Microbiological Research*. 207 : 83-90.
- National Research Council. 2000. **Nutrient Requirements of Beef Cattle**. พิมพ์ครั้งที่ 7. Washington : National Academy Press.
- National Research Council. 2001. **Nutrient Requirements of Dairy Cattle**. พิมพ์ครั้งที่ 7. Washington : National Academy Press.
- National Research Council. 2007. **Nutrient Requirements of Small Ruminants**. Washington : National Academy Press.
- Nelson, D.L., and Cox, M.M. 2000. **Lehninger Principles of Biochemistry**. พิมพ์ครั้งที่ 3. New York : Worth Publishers.
- Nisizawa K. 1973. "Mode of the action of cellulase". *Journal of Fermentation Technology*. 51(4): 267-304.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- OpenStax College. 2013. **Lipids, Connexions module: m44401**. [Online]. Available : <http://cnx.org/content/m44401/1.7/>
- Othman M. F., Adam A., Najafi G., & Mamat R. 2017. “Green fuel as alternative fuel for diesel engine: A review”. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 80 : 694-709.
- Öztürk B. 2001. “Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on hydrophobic and hydrophilic supports”. Master's Thesis of Izmir Institute of Technology.
- Papagora C., Roukas T., Kotzekidou P. 2013. “Optimization of extracellular lipase production by *Debaryomyces hansenii* isolates from dry-salted olives using response surface methodology”. *Food and Bioproducts Processing*. 91 : 413-420.
- Pantelides I. S., Christou O., Tsolakidou M. D., Tsaltas D., Ioannou N. 2015. “Isolation, identification and in vitro screening of grapevine yeasts for the control of black aspergilli on grapes”. *Biological Control*. 88 : 46-53.
- Papaparaskevas D., Christakopoulos P., Kekos D., & Macris B. J. 1992. “Optimizing production of extracellular lipase from *Rhodotorula glutinis*”. *Biotechnology Letters*. 14(5) : 397-402.
- Park Y., Kim J., Scrimgeour A. G., Condlin M. L., Kim D., & Park Y. 2013. “Conjugated linoleic acid and calcium co-supplementation improves bone health in ovariectomised mice”. *Food Chemistry*. 140(1-2) : 280-288.
- Patnala H. S., Kabilan U., Gopalakrishnan L., Rao R. M. D., & Kumar D. S. 2016. “Marine fungal and bacterial isolates for lipase production: A comparative study”. *Advances in Food and Nutrition Research*. 78 : 71-94.
- Popoola B. M., & Onilude A.A. 2017. “Characterisation of a yeast lipase (*Candida parapsilosis*) from vegetable oil polluted soil” *International Journal of Life Sciences Research*. 5 : 52-61.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Poppe J. K., Fernandez-Lafuente R., Rodrigues R. C., & Ayub M. A. Z. 2015. "Enzymatic reactors for biodiesel synthesis: present status and future prospects". *Biotechnology Advances*. 33 : 511-525.
- Potumarthi R., Subhakar C., Vanajakshi J., & Jetty A. 2008. "Effect of aeration and agitation regimes on lipase production by newly isolated *Rhodotorula mucilaginosa* MTCC 8737 in stirred tank reactor using molasses as sole production medium". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 151(2-3) : 700-710.
- Pourzolfaghar H., Abnisa F., Daud W. M. A. W., & Aroua M. K. 2016. "A review of the enzymatic hydroesterification process for biodiesel production". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 61 : 245-257.
- Promega. 2018. **Buffers for Biochemical Reactions**. [Online]. Available : <https://worldwide.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/buffers-for-biochemical-reactions/>.
- Rani V., Dash S., Nain L., & Arora A. 2015. "Expression of novel glucose tolerant  $\beta$ -glucosidase on cell surface by *Rhodotorula glutinis* isolate". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 4 : 380-387.
- Robert V. 2011. **The Yeasts**. พิมพ์ครั้งที่ 5. Amsterdam : Elsevier Science Publisher B.V.
- Rose A. H. & Harrison J. S. 1987. **The Yeasts. Vol. 1, Biology of Yeasts**. พิมพ์ครั้งที่ 2. Massachusetts : Academic Press
- Rúa M. L., Díaz-Mauriño T., Fernández V. M., Otero C., & Ballesteros A. 1993. "Purification and characterization of two distinct lipases from *Candida cylindracea*". *Biochimica et Biophysica Acta*. 1156(2) : 181-189.
- Sahoo S. C. 2013. "Isolation and characterization of cellulolytic yeasts for bioethanol production". Ph.D. Thesis of University of Agricultural Sciences Dharwad.

- Salihu A., Alam M. Z., AbdulKarim M. I., & Salleh H. M. 2012. "Lipase production: An insight in the utilization of renewable agricultural residues". *Resources, Conservation and Recycling*. 58 : 36-44.
- Sarawan S., Mahakhan P., Jindamorakot S., Vichitphan K., Vichitphan S., & Sawaengkaew J. 2013. "*Candida konsanensis* sp. nov., a new yeast species isolated from *Jasminum adenophyllum* in Thailand with potentially carboxymethyl cellulase- producing capability". *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 29(8) : 1481-1486.
- Saxena R. K., Sheoran A., Giri B., & Davidson W. S. 2003. "Purification strategies for microbial lipases". *Journal of Microbiological Methods*. 52(1) : 1-18.
- Sentheshanmuganathan S., & Nickerson W. J. 1962. "Nutritional control of cellular form in *Trigonopsis variabilis*". *Microbiology*. 27(3) : 437-449.
- Sethi B. K., Nanda P. K., & Sahoo S. 2016. "Characterization of biotechnologically relevant extracellular lipase produced by *Aspergillus terreus* NCFT 4269.10". *Brazilian Journal of Microbiology*. 47(1) : 143-149.
- Shaikh N. M., Patel A. A., Mehta S. A., & Patel N. D. 2013. "Isolation and screening of cellulolytic bacteria inhabiting different environment and optimization of cellulase production". *Universal Journal of Environmental Research and Technology*. 3(1) : 39-49.
- Sharma P., Sharma N., Pathania S., & Handa S. 2017. "Purification and characterization of lipase by *Bacillus methylotrophicus* PS3 under submerged fermentation and its application in detergent industry". *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. 15(2) : 369-377.
- Shurson G. C. 2017. "Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: sources, characteristics, animal responses, and quantification methods". *Animal Feed Science and Technology*. 235 : 60-76.

Singh A. K., & Mukhopadhyay M. 2012. "Overview of fungal lipase: A review". *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 166(2) : 486-520.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้เพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ยกเว้นการขออนุญาตเผยแพร่ และต้องขออนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Singh P., Tsuji M., Singh S. M., Roy U., & Hoshino T. 2013. "Taxonomic characterization, adaptation strategies and biotechnological potential of cryophilic yeasts from ice cores of Midre Lovénbreen glacier, Svalbard, Arctic". *Cryobiology*. 66(2) : 167-175.
- Sláviková E., & Vadkertiová R. 2003. "The diversity of yeasts in the agricultural soil". *Journal of Basic Microbiology*. 43(5) : 430-436.
- Souza A. C., Carvalho F. P., e Batista C. F. S., Schwan R. F., & Dias D. R. 2013. "Sugarcane bagasse hydrolysis using yeast cellulolytic enzymes". *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 23(10) : 1403-1412.
- Spyridon A., Euverink W., & Jan G. 2016. "Consolidated briefing of biochemical ethanol production from lignocellulosic biomass". *Electronic Journal of Biotechnology*. 19(5): 44-53.
- Srivastava N., Srivastava M., Mishra P. K., Gupta V. K., Molina G., Rodriguez-Couto, S., & Ramteke P. W. 2017. "Applications of fungal cellulases in biofuel production: advances and limitations". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 82(3) : 2379-2386
- Starmer W. T., & Lachance M. A. 2010. *The Yeasts*. พิมพ์ครั้งที่ 5. Amsterdam : Elsevier Science Publisher B.V.
- Stevens B. J. H., & Payne J. 1977. "Cellulase and xylanase production by yeasts of the genus *Trichosporon*". *Microbiology*. 100(2) : 381-393.
- Sulman S., & Rehman A. 2013. "Isolation and characterization of cellulose degrading *Candida tropicalis* W2 from environmental samples". *Pakistan Journal of Zoology*. 45 : 809-16.
- Sun Y., & Cheng J. 2002. "Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review". *Bioresource Technology*. 83 : 1-11.

- Taskin M., Ucar M. H., Unver Y., Kara A. A., Ozdemir M., & Ortucu S. 2016. "Lipase production with free and immobilized cells of cold-adapted yeast *Rhodotorula glutinis* HL25". *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*. 8 : 97-103.
- Techaparin A., Thanonkeo P., & Klanrit P. 2017. "High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion". *Brazilian Journal of Microbiology*. 48(3) : 461-475.
- Thapa S., Shrestha R., Tirewal A., Sharma A., & Yuvraj K. C. 2015. "Isolation of yeast from soil and different food samples and its characterization based on fermentation". *Nepal Journal of Biotechnology*. 3(1) : 29-34.
- Thongekkaew J., & Kongsanthia J. 2016. "Screening and identification of cellulase producing yeast from Rongkho Forest, Ubon Ratchathani University". *Bioengineering and Bioscience*. 4(3) : 29-33.
- Thongekkaew J., Patangtasa W., & Jansri A. 2014. "Cellulase and xylanase production from *Candida easanensis* using agricultural wastes as a substrate". *Songklanakarin Journal of Science & Technology*. 36(6) : 607-613.
- Tolan J. S., & Foody B. 1999. "Cellulase from submerged fermentation". *Recent Progress in Bioconversion of Lignocellulosics*. 65 : 41-67.
- Tsuji M., Tanabe Y., Vincent W. F., & Uchida M. 2018. "*Mrakia arctica* sp. nov., a new psychrophilic yeast isolated from an ice island in the canadian high arctic". *Mycoscience*. 59(1) : 54-58.
- Vyas S., Chhabra M. 2017. "Isolation, identification and characterization of *Cystobasidium oligophagum* JRC1: A cellulase and lipase producing oleaginous yeast". *Bioresource Technology*. 223 : 250-258.
- William M. Fogarty. 1983. **Microbial enzyme and biotechnology**. Essex : Applied Science Publishers.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ภายใต้ชื่อ "สืบค้นอย่างไร" ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ถ้ามีข้อสงสัยหรือต้องการข้อมูลเพิ่มเติม กรุณาติดต่อเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Wood T. M., & Bhat K. M. 1988. "Methods for measuring cellulase activities". *Methods in enzymology*. 160 : 87-112.

- Zhang Y. H. P., Himmel M. E., & Mielenz J. R. 2006. "Outlook for cellulase improvement: Screening and selection strategies". *Biotechnology Advances*. 24(5) : 452-481.
- Zhang J., Li, Q., Li R., & Shang J. K. 2015. "Real time, in situ observation of the photocatalytic destruction of *Saccharomyces cerevisiae* cells by palladium-modified nitrogen-doped titanium oxide thin film". *Journal of Materials Science and Technology*. 31(1), 48-54.
- Zhang X. Z., & Zhang Y. H. P. 2013. **Bioprocessing Technologies in Biorefinery for Sustainable Production of Fuels, Chemicals, and Polymers**. New Jersey : John Wiley & Sons, Incorporate.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ก

### สารเคมี

- ก.1 คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose) ร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อ ปริมาตร ในซีเทรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 4.8

คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	10	กรัม
ซีเทรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส 10 กรัม ในน้ำร้อน (80-90 องศาเซลเซียส) ให้มีความหนืดปานกลางโดยเติมสารลงไปช้าๆ และคนอย่างต่อเนื่อง และเติมซีเทรตบัฟเฟอร์ พีเอช 4.8 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็น (อาร์, 2559)

- ก.2 คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส (Carboxymethylcellulose) ร้อยละ 1.0 โดยมวลต่อ ปริมาตร ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 6.0

คาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส	10	กรัม
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์	1000	มิลลิลิตร

เตรียมโดยละลายคาร์บอกซีเมธิลเซลลูโลส 10 กรัม ในน้ำร้อน (80-90 องศาเซลเซียส) ให้มีความหนืดปานกลางโดยเติมสารลงไปช้าๆ และคนอย่างต่อเนื่อง และเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ พีเอช 6.0 ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และเก็บไว้ในตู้เย็น (อาร์, 2559)

- ก.3 สารละลายกรด 3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิก (3, 5 dinitrosalicylic acid)

โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	10	กรัม
ไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS)	10	กรัม
โซเดียมโปแตสเซียมทาร์เทรต	200	กรัม
ฟีนอล	0.2	กรัม
โซเดียมซัลไฟต์ ( $\text{Na}_2\text{SO}_3$ )	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ละลายโซเดียมไฮดรอก 10 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 600 มิลลิลิตร) ละลายจนหมด จากนั้นค่อยๆเติมไดโนโตรซาลิไซลิก 10 กรัม โซเดียมโปแตสเซียมทาร์ทเรต 200 กรัม เติมนิฮอล 0.2 กรัม และ โซเดียมซัลไฟต์ 0.5 กรัม โดยค่อยๆละลายสารเคมีแต่ละตัวจนหมด จึงค่อยเติมสารเคมีตามลำดับจนครบทุกตัว จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร (อารี, 2559)

**ก.4 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

Glucose anhydrous	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เตรียมโดยอบน้ำตาลกลูโคสที่ 60 - 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ ซึ่งน้ำหนักกลูโคส 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร ซึ่งสารละลายนี้มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (อารี, 2559)

**ก.5 ซีเทรตบัฟเฟอร์ (Citrate Buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์**

สารละลาย ก : สารละลายของกรดซิตริก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ทำการละลายกรดซิตริก 51.01 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายของโซเดียมซีเทรต ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ (ทำการละลาย  $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$  29.41 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ทำการเตรียมสารละลาย ก ปริมาตร 40 มิลลิลิตร และ ข ปริมาตร 60 มิลลิลิตร นำมาผสมกันเพื่อให้ได้พีเอชเท่ากับ 4.8 (Promega, 2018)

**ก.6 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate Buffer) ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์**

สารละลาย ก : สารละลายของ  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (ทำการละลาย  $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$  8.9025 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

สารละลาย ข : สารละลายของ  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (ทำการละลาย  $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$  6.9005 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร)

ทำการเตรียมสารละลาย ก ปริมาตร 6.15 มิลลิลิตร และ ข ปริมาตร 43.85 มิลลิลิตร นำมาผสมกันเพื่อให้ได้พีเอชเท่ากับ 6.0 และทำการเตรียมสารละลาย ก ปริมาตร 30.5 มิลลิลิตร

และ ข ปริมาตร 19.5 มิลลิลิตร นำมาผสมกันเพื่อให้ได้พีเอชเท่ากับ 7.0 (Promega, 2018)

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.7 สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ (KOH) ความเข้มข้น 0.02 โมลาร์

KOH	1.12	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ค่อยๆละลายในน้ำกลั่นปริมาณหนึ่ง (ไม่เกิน 600 มิลลิลิตร) จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตรด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร (อาร์, 2559)

ก.8 สารละลายฟีนอล์ฟทาลีน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 กรัมต่อปริมาตร

ฟีนอล์ฟทาลีน	0.1	กรัม
เอทานอล ร้อยละ 95 ปริมาตรต่อปริมาตร	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	50	มิลลิลิตร

นำฟีนอล์ฟทาลีนละลายในเอทานอลร้อยละ 95 โดยปริมาตร 50 มิลลิลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร (อาร์, 2559)

ก.9 สารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ (alkali copper)

นำสารละลาย ก ผสมกับ สารละลาย ข		
สารละลาย ก	50	มิลลิลิตร
สารละลาย ข	1	มิลลิลิตร (ควรเตรียมเมื่อต้องการใช้)
โดยการเตรียมสารละลาย ก และ สารละลาย ข เตรียมได้ดังนี้		
สารละลาย ก		
โซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )	20	กรัม
สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์	1000	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยการชั่ง NaOH 3.999 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำโซเดียมคาร์บอเนต ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) 20 กรัมละลายในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

สารละลาย ข

คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )	5	กรัม
โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เตรต (sodium potassium tartrate)	10	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (sodium potassium tartrate) 10 กรัมละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นนำคอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) 5 กรัม ในสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต (อารี, 2559)

**ก.10 สารละลาย Folin-Ciocalteu ความเข้มข้น 1 นอร์มัล**

นำสารละลาย Folin-Ciocalteu มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 (เตรียมเมื่อต้องการใช้) (อารี, 2559)

**ก.11 สารละลายมาตรฐานของโปรตีน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร**

Bovine serum albumin (BSA)	0.1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

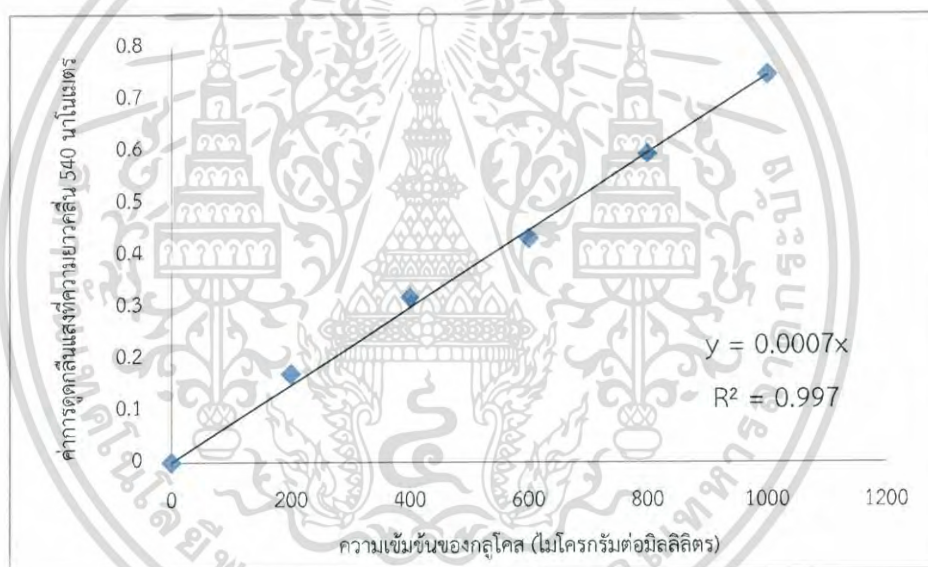
เจือจาง bovine serum albumin (BSA) ด้วยน้ำกลั่นให้ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (อารี, 2559)

## ภาคผนวก ข

### กราฟมาตรฐาน

#### ข.1 กราฟมาตรฐานของกลูโคส

นำสารละลายกลูโคสที่ความเข้มข้น 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรด 3, 5 ไดไนโตรซาลิไซลิก ลงไป 3 มิลลิลิตร นำไปต้มใน น้ำเดือด เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำมาแช่น้ำก๊อกให้เย็น เติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นในรูปของน้ำตาลกลูโคส นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

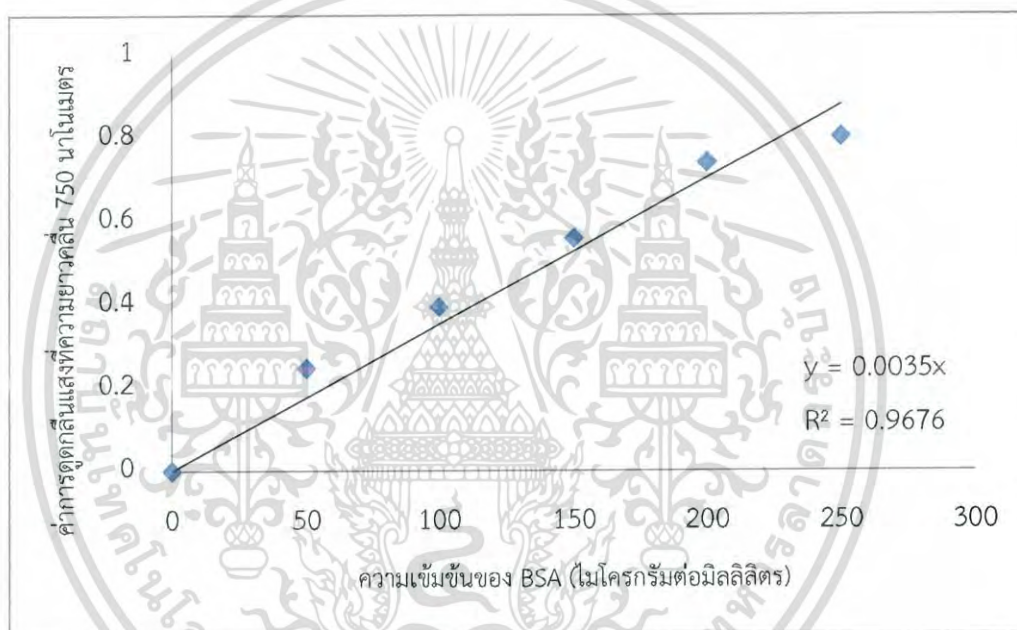


รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานของกลูโคสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ข.2 กราฟมาตรฐานโปรตีน Bovine serum albumin (BSA)

เตรียมสารละลาย Bovine serum albumin (BSA) ให้มีความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นเจือจางให้มีความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากปิเปตสารละลาย BSA ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายอัลคาไลคอปเปอร์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วป่ม 10 นาที เมื่อครบระยะเวลาเติมสารละลาย Folin-Ciocalteu ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วป่ม 30 นาที จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร






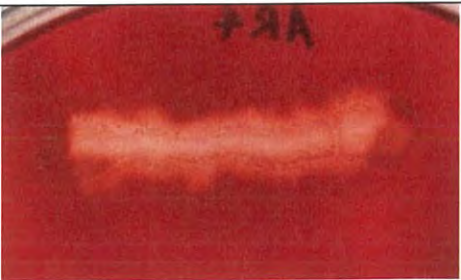
รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานของโปรตีนที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ภาคผนวก ค

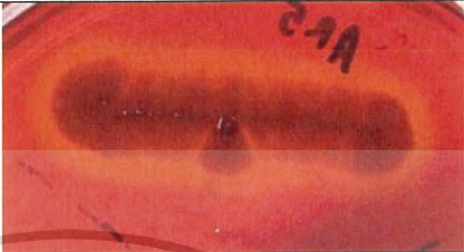



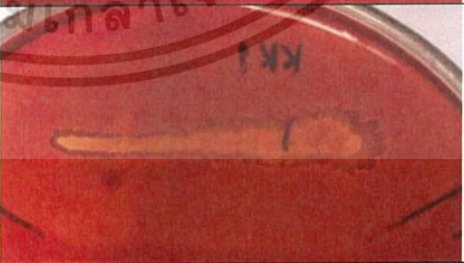

### แสดงบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส หรือไลเปสได้

ตารางที่ ค.1 แสดงรูปบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 34 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์
AB2	
AR1	
AR2	
AR4	






เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงรูปบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 34 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์
AR5	
AR6	
BJ4	
DW2	
KK1	
KL1	

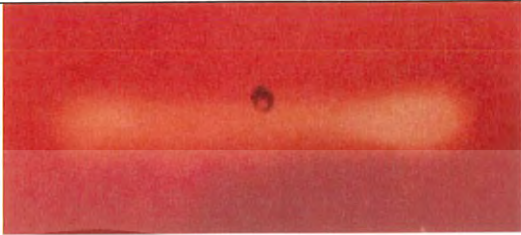

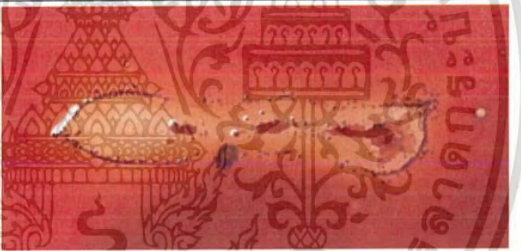
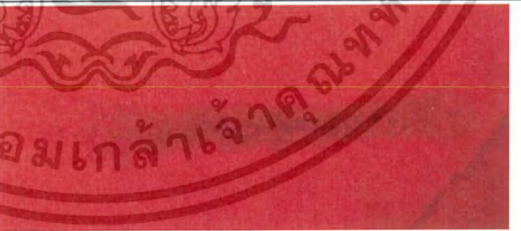


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงรูปบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 34 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์
KL2	
L1	
LK2	
LK4	
M1	

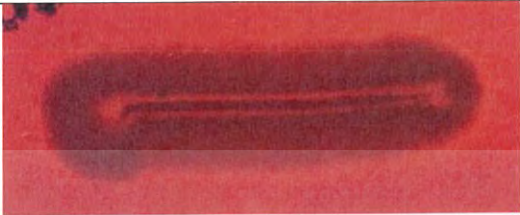




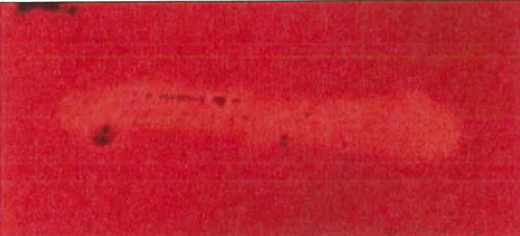
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงรูปบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 34 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์
M3	
MB	
MG4	
NB2	
OI4	
OI5	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาตจากศูนย์วิจัยด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาหรือทำซ้ำโดยไม่ได้รับอนุญาตจากศูนย์วิจัยด้านการค้าที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงรูปบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 34 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์
OI6	
PJ1	
PJ2	
PW1	
SC1	
T1	



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.1 (ต่อ) แสดงรูปบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์ที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้จำนวน 34 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์
TL1	
WF4	
WH7	
WS2	
Y <sub>1</sub> 1	
Y <sub>3</sub> 2	




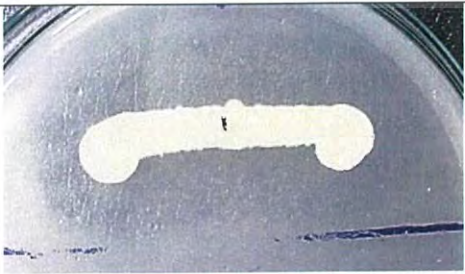
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 แสดงรูปบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์จำนวน 8 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 2 เซนติเมตร

รหัสเชื้อ	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์
BN1	
BS1	
PJ2	
PJ4	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค.2 (ต่อ) แสดงรูปบริเวณใสรอบโคโลนีของยีสต์จำนวน 8 ไอโซเลทที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 2 เซนติเมตร

รหัสเชื้อ	ลักษณะบริเวณใสรอบโคโลนียีสต์
S1	
SW1	
WH7	
Y32	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้