

หัวข้อโครงการวิจัย	การคัดเลือกสายพันธุ์กลายของเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> โดยใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงและความเข้มข้นของน้ำตาลสูงในการผลิตเอทานอลจากมันเทศ
แหล่งเงิน (ระบุแหล่งทุน)	สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช)
ประจำปีงบประมาณ	2557
จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน	220,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2556 ถึง กันยายน 2557
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งใช้อุณหภูมิในการย่อยที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส ความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เวลาในการย่อยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ศึกษาเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae* YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เปรียบเทียบกันที่สภาวะการทนต่ออุณหภูมิสูงที่อุณหภูมิ 30 37 40 42 และ 45 องศาเซลเซียส และการทนต่อความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 0 5 10 15 18 และ 20 โดยปริมาตรต่อปริมาตร พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์นี้ยังสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 15 โดยปริมาตรต่อปริมาตร จึงคัดเลือกเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ ทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ใน *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 โดยการใช้รังสียูวีที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 30 วัตต์ เป็นเวลา 40 วินาที และการใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร เป็นเวลา 110 นาที ได้อัตราการรอดชีวิตประมาณร้อยละ 5 จากนั้นสุ่มคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่มีคุณสมบัติการทนต่ออุณหภูมิสูงและให้ผลผลิตเอทานอลสูง แล้วนำเชื้อไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง YPD ที่อุณหภูมิ 30 40 42 และ 45 องศาเซลเซียส และอาหารหมัก Yeast Fermentation Medium (YFM) ที่มีหลอดดักก๊าซ พบสายพันธุ์กลายที่ได้จากวิธีการใช้รังสียูวี คือสายพันธุ์ 421 และวิธีการใช้สารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต คือสายพันธุ์ 11035 ตามลำดับ นำสายพันธุ์กลายมาศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ในขั้นตอนการหมักใช้ปริมาณเชื้อร้อยละ 10 หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักของ *S. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ดั้งเดิม (YRK 017) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอทานอลได้ 15.46 15.15 และ 15.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอทานอลได้ 15.39 15.35 และ 15.55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

คำสำคัญ : *Saccharomyces cerevisiae*, เอทานอล, กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก, กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก, การกลายพันธุ์ รังสียูวี เอทิลมีเทนซัลโฟเนต

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

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

ABSTRACT

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

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

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

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาระดับปริญญาตรี ชั้นปีที่ 4 สาขา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและนักศึกษาระดับมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนคือสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2557

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
หัวหน้าโครงการวิจัย

สารบัญ

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

สารบัญ (ต่อ)

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

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สารที่ได้จากการหมักเอทานอลโดยยีสต์	12
2.2 แสดงคุณค่าทางอาหารของมันเทศเนื้อขาวเปรียบเทียบกับเนื้อเหลือง	25
2.3 แสดงองค์ประกอบหลักใน 100 กรัม ของส่วนที่รับประทานได้ของพืชตระกูลหัว เปรียบเทียบกับข้าว	25
4.1 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงบนอาหารแข็ง YPD	36
4.2 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	37
4.3 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ	39
4.4 แสดงค่าปริมาณเอทานอล หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ	41
4.5 แสดงการเจริญของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> 6 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง YPD ที่เอทานอล ความเข้มข้นต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง YPD	43
4.6 อัตราการรอดชีวิตของ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์กลายที่ได้จากการฉายรังสียูวีที่ความยาว คลื่น 254 นาโนเมตร 30 วินาที ที่เวลาต่างๆ	44
4.7 แสดงอัตราการรอดชีวิตของ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์กลายที่ได้จากการเติม EMS ความ เข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร ที่เวลาต่างๆ	46
4.8 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วย รังสียูวีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	48
4.9 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วย EMS	50
4.10 ประสิทธิภาพการสร้างก๊าซของสายพันธุ์กลาย <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 โดยรังสียูวีในอาหาร YFM ที่มีหลอดดักก๊าซ หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	53
4.11 ประสิทธิภาพการสร้างก๊าซของสายพันธุ์กลาย <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 โดยสารโดยสาร เอทิลมีเทนซัลโฟเนตในอาหาร YFM ที่มีหลอดดักก๊าซ หลังการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	53
4.12 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 สายพันธุ์กลาย ที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยรังสียูวี เมื่อหมักในอาหาร YFM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะนิ่ง	55
4.13 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ของ <i>S. cerevisiae</i> YRK 017 สายพันธุ์กลาย ที่ได้จากการกลายพันธุ์โดยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต เมื่อหมักในอาหาร YFM ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง	56
4.14 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดย กระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	58
4.15 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดย โดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	59

สารบัญรูป

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