

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

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

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

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

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

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

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

มีวิธีการต่างๆ ในการปรับปรุงและพัฒนาให้มีการผลิตไบโอเอทานอลเพิ่มมากขึ้น เช่น การทำให้เชื้อยีสต์เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีและวิธีทางกายภาพ (Sridher et al., 2002., Rajoka et al., 2005) การ protoplast fusion (Sakanaka et al., 2001) และ genome shuffling (Shi et al., 2009) งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่สามารถทนอุณหภูมิสูง และผลิตเอทานอลได้สูง โดยนำสายพันธุ์ต่างๆ ของ *S. cerevisiae* มาทำการศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์ จากนั้นปรับปรุงสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ให้มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น เช่น การตัดต่อยีน เป็นต้น วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการฉายรังสียูวี การใช้สารเคมี (Uma และ Polasa, 1990., Kirans et al., 2000) หรืออาจใช้เทคโนโลยีชีวภาพขั้นสูง เช่น การตัดต่อยีน เป็นต้น วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการฉายรังสียูวี (UV) เป็นวิธีที่ใช้อย่างแพร่หลาย เนื่องจากรังสียูวีเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า จัดเป็น physical mutagen ที่ใช้กันมากในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (บุษยา, 2542., สาวิตรี, 2539) เนื่องจาก DNA สามารถดูดซับแสงในช่วงความยาวคลื่น 254-260 นาโนเมตร ได้ดี ซึ่งอยู่ในช่วงความยาวคลื่นของรังสียูวี วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้สารเคมี เช่น เอทิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methane sulfonate, EMS) จัดเป็นสารก่อการกลายพันธุ์ (mutagenic agent) ที่สำคัญและมีประสิทธิภาพสูงในการเหนี่ยวนำจุลินทรีย์ให้เกิดการกลายพันธุ์และมีคุณสมบัติที่ต้องการหากมีกระบวนการคัดเลือกที่เหมาะสม ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ในอัตราสูงถึง $5 \times 10^2 - 5 \times 10^4$ ต่อยีน โดยไม่ทำให้เซลล์ตาย (French et al., 2006) EMS เป็นสาร alkylating agent ที่ชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการเปลี่ยน A-T ไปเป็น G-C (French et al., 2006) การใช้สารกลายพันธุ์ชนิดนี้ใช้ในการเพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส และการผลิตกรดซิตริกโดยเชื้อ *Aspergillus niger* (Lotfy et al., 2007., Khattab and Bazaraa,

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

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

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง ความเข้มข้นน้ำตาลสูงและทนเอทานอลได้สูง จากนั้นปรับปรุงสายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกได้โดยการกลายพันธุ์ซึ่งจะใช้สารเคมีในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้เชื้อมีศักยภาพในการทนอุณหภูมิสูง ความเข้มข้นน้ำตาลสูง ทน เอทานอลได้สูงและมีศักยภาพในการผลิตเอทานอลได้สูง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

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

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

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

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินงานวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 ศึกษาสายพันธุ์ของยีสต์ที่เจริญที่อุณหภูมิสูง

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

ขั้นตอนที่ 2 ศึกษาการทนต่อความเข้มข้นเอทานอลสูง

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

ขั้นตอนที่ 3 การกลายพันธุ์เชื้อ *S. cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิสูง และความเข้มข้นเอทานอลสูง โดยใช้เอทิลมีเทนซัลโฟเนต

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

ขั้นตอนที่ 4 การคัดแยกเชื้อยีสต์สายพันธุ์กลายที่ทนอุณหภูมิสูง และทนความเข้มข้นของเอทานอลสูง

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

ขั้นตอนที่ 4 การหมักเอทานอลจากยีสต์สายพันธุ์กลาย

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

ขั้นตอนที่ 6 เปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากยีสต์สายพันธุ์กลายกับสายพันธุ์ดั้งเดิมโดยใช้ผงมันเทศเป็นวัตถุดิบโดยใช้กระบวนการหมักแบบ SSF

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

ขั้นตอนที่ 7 สรุปผลและจัดทำรายงาน

1.5 สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

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

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

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้เอนไซม์ เปรียบเทียบกับเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าในการหมักไปเอทานอล ผลการทดลองพบว่า การใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ย่อยแป้งมันเทศที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ตามด้วยการใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสย่อยต่อที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยมาหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 ซึ่งเป็นเชื้อ ยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลที่ได้กับการหมักแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อรา *Rhizopus oryzae*, *Amylomyces rouxii* และ *Aspergillus oryzae* โดยใช้เชื้อราแต่ละชนิดหมักในแป้งมันเทศที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน และหมักต่อด้วย *S. cerevisiae* YRK 017 หมัก เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมัก พบว่าการหมักโดยใช้เอนไซม์และ การหมักโดยใช้เชื้อราโดยเฉพาะเชื้อ *A. rouxii* จะให้ผลผลิตเอทานอลใกล้เคียงกัน โดยการใช้ เอนไซม์ให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เชื้อราไม่มากนัก จากนั้นผู้วิจัยได้ทำการศึกษาต่อโดยพัฒนา กระบวนการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงของยีสต์ *S. cerevisiae* เปรียบเทียบกับเซลล์ยีสต์อิสระในการหมัก เอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เอนไซม์ย่อย พบว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์ ตรึงรูปและเซลล์อิสระไม่แตกต่างกันมากนัก ซึ่งเซลล์ยีสต์อิสระจะให้ค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาล ทั้งหมดสูงกว่าการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงรูป อาจเนื่องมาจากการใช้เทคนิคการตรึงรูปที่ไม่เหมาะสมทำให้มี การรั่วไหลของเซลล์ยีสต์ออกจากวัสดุตรึง ในงานวิจัยนี้จึงต้องการคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง ความเป็นกรดสูง ความเข้มข้นน้ำตาลสูง และเอทานอลได้สูง เนื่องจากในกระบวนการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้น ความเป็นกรดเพิ่มขึ้นอันเป็นผลมาจาก กระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ยีสต์ ซึ่งภาวะเหล่านี้เป็นปัญหาในกระบวนการหมักและทำให้เซลล์ ยีสต์ลดจำนวนลง เพราะทนต่อสภาวะต่างๆ เหล่านี้ไม่ได้ มีผลทำให้การผลิตเอทานอลลดลงตามไป ด้วย จุลินทรีย์ที่ดีและมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงควรมีลักษณะ ดังนี้

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

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

เอทานอลได้แล้ว ต่อมาได้ศึกษาการกลายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกได้โดยใช้รังสียูวี ผลการทดลองพบว่าการกลายพันธุ์โดยใช้รังสียูวี สามารถปรับปรุงสายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดเลือกได้ โดยทนอุณหภูมิสูงขึ้น ทนเอทานอลได้สูง และทนแรงดันออสโมซิสได้สูง

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

การกลายพันธุ์สามารถเกิดทั้งในระดับโครโมโซม (chromosomal mutation) และในระดับดีเอ็นเอหรือยีน (DNA or gene mutation) (จุริรัตน์, 2550) สำหรับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวี (UV ray) เป็นรังสีพลังงานต่ำ ไม่มีการแตกตัวเป็นไอออน (non-ionizing radiation) ทำให้โอเลคตรอนมีการเปลี่ยนระดับชั้นพลังงานอยู่ในชั้นของพลังงานที่สูงขึ้น (excited state) ส่งผลต่อคุณสมบัติการจับกันของเบส ส่วนใหญ่เกิดลักษณะที่เรียกว่า ไพริมิดีนไดเมอร์ (pyrimidine dimers) ซึ่งเกิดการจับกันของเบสกลุ่มไพริมิดีนที่อยู่ติดกัน (Turner, 1997) จุดนี้ให้การเปลี่ยนแปลง 2 ลักษณะ คือ ไดเมอร์ทำให้โครงสร้างของดีเอ็นเอเปลี่ยนไป ส่งผลต่อการจำลองตัวของดีเอ็นเอ (DNA replication) ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ อีกลักษณะ คือ การกลายที่เป็นผลจากการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอแล้วผิดพลาด ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้เช่นเดียวกัน (หัตยา, 2548) สำหรับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยสารเคมี สารก่อการกลายพันธุ์มีหลายกลุ่มตามกลไกการเข้าทำปฏิกิริยากับสารพันธุกรรม สำหรับเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (ethyl methane sulfonate, EMS) เป็นสารที่เติมหมู่แอลคิล (alkyl group) ให้โมเลกุลของสารอื่น โดยสารชนิดนี้จะเติมกลุ่มเอซิลให้กับเบสในดีเอ็นเอตำแหน่งที่ 7-N และ 6-O ผลจากการกลายพันธุ์แบบนี้ คือ พบลักษณะกลายแบบแทนที่เบสชนิด transition

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

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถปรับปรุงกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันเทศให้มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น โดยใช้สายพันธุ์กลายของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*
2. สามารถนำวัตถุดิบคือ มันเทศ ซึ่งมีเป็นปริมาณมากในประเทศไทยมาผลิตไบโอเอทานอลทดแทนมันสำปะหลัง และกากน้ำตาล ทำให้มันเทศมีมูลค่าสูงขึ้น และเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรผู้ปลูกมันเทศในประเทศไทยอีกด้วย

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

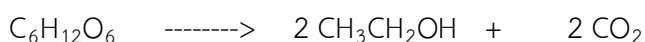
2.1 เอทานอล (web.job.haii.or.th/wiki84new/index.php ; สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

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

เอทานอลที่ใช้กันโดยทั่วไปมี 2 ประเภทคือ เอทานอลสังเคราะห์ ซึ่งได้จากกระบวนการผลิตทางเคมี และ เอทานอลชีวภาพซึ่งได้จากการใช้จุลินทรีย์จำพวกยีสต์หมักกับวัตถุดิบจากการเกษตรเช่น วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง และเส้นใยที่เป็นผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ชังข้าวโพด ในประเทศไทยวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นไบโอเอทานอลมี 3 ชนิดตามลำดับได้แก่ มันสำปะหลัง อ้อย และ กากน้ำตาล (molasses เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำตาล) ประเทศบราซิล เป็นผู้ผลิตเอทานอลรายใหญ่ของโลก ใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล สหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ

แหล่งพลังงานที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นที่รู้จักกันดีว่าได้มาจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียมคือ น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล และยังมีแนวโน้มลดลงตามลำดับ ในทางกลับกันราคาของน้ำมันในขณะนี้เพิ่มขึ้น ดังนั้นหลายประเทศจึงพยายามหาพลังงานอื่นมาทดแทนในรูปแบบต่างๆ เช่น พลังงานลม น้ำ แสงอาทิตย์ และพลังงานชีวมวล

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



วัตถุดิบ(น้ำตาล) เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

ไบโอเอทานอล (Bioethanol) (สุจิตรา และคณะ, 2552)

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

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

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

การนำเอทานอลไปใช้ประโยชน์ ([web.bsru.ac.th/~orapim/my_doc/renewable _energy](http://web.bsru.ac.th/~orapim/my_doc/renewable_energy) ;
สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

1. แอลกอฮอล์ ที่ใช้รับประทานได้โดยตรง (Portable Alcohol) ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสุรา เครื่องสำอาง และ ยา

2. แอลกอฮอล์ที่ไม่ใช้รับประทานโดยตรง (Industrial Alcohol) ตัวอย่างเช่น กรดอะซิติก หรือ กรดน้ำส้ม กรดมะนาว ที่สามารถนำไปใช้ต่อในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมทางการแพทย์ และนอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใย และ โลหะ

3. แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงบริสุทธิ์สูงร้อยละ 95 หรือ ร้อยละ 99.5 - 99.6 แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันนี้สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ 3 แบบดังนี้

1.1 แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ร้อยละ 95 ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงทดแทนน้ำมันเบนซิน หรือ ดีเซล ใช้กับเครื่องยนต์ ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง

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

การกักตุนสูงกว่าปกติ ดังนั้นในการใช้น้ำมันชนิดนี้จึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการ เตรียมความพร้อมทั้งในด้านของผู้ใช้รถยนต์และรวมถึงผู้จำหน่ายน้ำมันต้องคำนึงถึงกระบวนการผลิต และขั้นตอนการจัดจำหน่าย

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

สำหรับประเทศไทยใช้สูตร E10 หรือที่เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ 95 (เอทานอลบริสุทธิ์สูงร้อยละ 10 : น้ำมันเบนซินออกเทน 91 ร้อยละ 90) มีคุณสมบัติเทียบเท่าน้ำมันเบนซินออกเทน 95 สามารถใช้ทดแทนกันได้โดยไม่ต้องมีการปรับแต่งเครื่องยนต์ นอกจากนี้ยังมีการวิจัยและพัฒนาน้ำมันจากพืช และแอลกอฮอล์มาใช้เป็นเชื้อเพลิงเช่น มีการทดลองผลิตน้ำมันดีเซลโซฮอล์ ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงสำหรับ เครื่องยนต์ดีเซล โดยได้จากการผสมไบโอเอทานอลความบริสุทธิ์สูงในสัดส่วนร้อยละ 15 กับน้ำมัน ดีเซล และ สารอิมัลซิไฟเออร์คือ ทำให้เอทานอลผสมเข้ากับน้ำมันดีเซลโดยไม่แยกชั้น ซึ่งนำมา ทดลองใช้กับรถยนต์เครื่องยนต์ดีเซลในโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดาและได้มีการทดลองนำ น้ำมันแก๊สโซฮอล์ 91 ที่ผสมเอทานอลมากกว่าร้อยละ 20 มาใช้กับรถยนต์และรถจักรยานยนต์เบนซิน 91

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

แนวความคิดการใช้เอทานอลในประเทศไทย (ศุภวรรณ, 2551)

เอทานอลในประเทศไทยถูกพัฒนาและค้นคว้าอย่างต่อเนื่อง เหตุผลมาจาก

1. สภาวะวิกฤตน้ำมันโลก

ในสภาวะปัจจุบันประเทศไทยต้องประสบกับความเสียหายเปรียบทางด้านพลังงาน เนื่องจากมีการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อการขนส่งในปริมาณที่สูงมากและมีราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกมีราคาสูงและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดเวลา ส่งผลให้ประเทศไทยต้องเผชิญกับความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจ ต้องพิจารณาแหล่งพลังงานใหม่เพื่อทดแทนที่มาจากวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้เองภายในประเทศ ทำให้สามารถประหยัดส่วนที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศได้ร้อยละ 10 จากการนำเข้าน้ำมันปิโตรเลียมต่อปีประมาณ 4 แสนล้านบาท

2. สภาวะโลกร้อน

ปัจจุบันสภาวะโลกร้อนหรือที่เรียกว่าสภาวะเรือนกระจก ซึ่งทั่วโลกให้ความสำคัญจากผลกระทบที่เกิดขึ้นและกำลังพยายามหาแนวทางแก้ไขที่ยั่งยืน เอทานอลเป็นพลังงานที่รักษาสิ่งแวดล้อมจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดปริมาณคาร์บอนได้ออกไซด์จากสภาวะโลกร้อน

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

2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลโดยทั่วไปมีอยู่ 2 วิธี คือวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี และวิธีการหมัก สำหรับการผลิตโดยวิธีทางเคมีนั้นทำโดยไฮเดรชัน (hydration) สารเอทีลีน (ethylene) ซึ่งได้จาก ปิโตรเลียม และ ก๊าซธรรมชาติ สำหรับการผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมักนั้นอาศัยเอนไซม์ภายใน เซลล์ของจุลินทรีย์ช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลงซับซ้อน ตัวอย่างเช่นเมื่อเติมยีสต์ลงใน อาหารที่มีซูโครสยีสต์ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ซึ่งเอนไซม์นั้นทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา เปลี่ยนซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือกลูโคส และ ฟรุคโทส จากนั้นกลูโคส และ ฟรุคโทสจึงถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล และ คาร์บอนได้ออกไซด์ด้วยเอนไซม์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในวิถี Embden-Meyerhof-Parnas

เทคโนโลยีการหมักจัดว่าเป็นวิธีเก่าแก่ที่สุดของกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ คำว่า การหมัก มาจากคำกริยาของภาษาลาตินที่เรียกว่า ฟิเวีย (fevere) แปลว่าการเดือด (to boiling) ที่เกิดจากการกระทำของยีสต์ โดยเกิดเป็นฟองปูดขึ้นมาบนสารสกัดของผลไม้หรือธัญพืชที่กำลังงอก ซึ่งการหมักดังกล่าวเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยจุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น

ชีวเคมีการหมักเอทานอลโดยยีสต์

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

Paturau (1969) รายงานว่าในการหมักเอทานอลนั้นยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลและสารอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารที่ได้จากการหมักเอทานอลโดยยีสต์

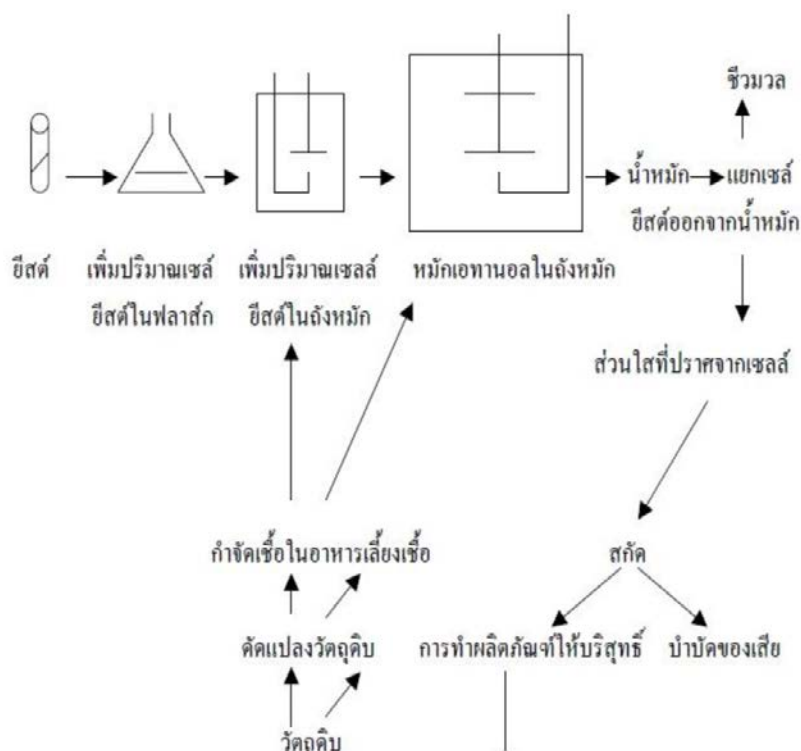
	ร้อยละ
เอทานอล	48.4
คาร์บอนไดออกไซด์	46.5
แอสีแทลดีไฮด์	0 – 0.03
กรดอะซิติก	0.05 – 0.25
กลีเซอรอล	2.5 – 3.6
กรดแล็กติก	0 – 0.2
กรดซัคซินิก	0.5 – 0.77
น้ำมันเชื้อเพลิง	0.25 – 0.5

ที่มา: คมสัน (2553)

กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ประกอบไปด้วย 6 ขั้นตอน (Stanbury and Whitaker, 1995) คือ

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



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

การหมักเอทานอล

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

กระบวนการหมักที่ใช้มี 3 แบบ (สมใจ, 2537) คือ

1. การหมักแบบแบตช์ (Batch fermentation)

เป็นการหมักที่ทำในระบบปิด มีสารอาหารเริ่มต้นจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงในระบบแล้ว ไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ เพิ่มลงไปอีกจนเสร็จการหมัก

การหมักแบบนี้มีข้อดีคือ ค่าติดตั้งอุปกรณ์ถูกกว่า ไม่ต้องการการฆ่าเชื้อในถังหมักอย่างสมบูรณ์ ไม่ต้องใช้คนที่มีความเชี่ยวชาญมากในการควบคุมเครื่องระหว่างทำงาน ความเสี่ยงในการลงทุนต่ำ ง่ายในการเก็บรักษาวัตถุดิบ สามารถใช้กับการหมักที่ต้องการผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันได้ และโอกาสที่การหมักจะปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ต่ำ

ข้อเสียของการหมักแบบนี้ ความถี่ในการฆ่าเชื้อถังจะมีผลต่อการวัดค่าของเครื่องมือวัดต่างๆ ค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อสูง ความเสี่ยงสูงในการกลายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้หมัก ถังหมักหนึ่งถังไม่เพียงพอต่อการผลิตผลิตภัณฑ์หลายอย่างและผลิตภัณฑ์จะถูกแยกออกเนื่องจากปฏิกิริยาที่ไม่ต่อเนื่อง

2. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

เป็นวิธีการที่ในระหว่างการหมักมีการเติมอาหารใหม่ และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกัน ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร

ข้อดีของการหมักแบบนี้คือ ใช้พนักงานน้อย ควบคุมผลิตภัณฑ์ได้ โอกาสติดเชื้อในระหว่างการหมักต่ำ และป้องกันการเสียหายของอุปกรณ์เครื่องมือวัดในระหว่างการฆ่าเชื้อภายในถังหมักน้อย

ข้อเสีย คือวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักต้องเป็นแบบเดียวกันตลอดการหมัก ปัญหาในการรักษาอัตราการหมักสูงๆ การใช้เครื่องควบคุมแทนคนงานมีค่าใช้จ่ายในการทำงานสูงกว่า อุปกรณ์ในการแยกของแข็งในระหว่างการหมักมีราคาแพง

3. การหมักแบบเฟด-แบตช์ (Fed-batch fermentation)

เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะ ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก ซึ่งการหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้แก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นซึ่งถ้าใช้มากไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจทำให้มีปัญหาในการให้ออกซิเจนโดยการ ให้ในปริมาณที่เพียงพอทำได้ยาก

ข้อดีของการหมักแบบเฟด-แบตช์ อธิบายได้ดังนี้ (Roehr, 2001)

1. ให้ผลผลิตสูง ทั้งนี้เพราะไม่มีการดึงเซลล์ออกในระหว่างการหมัก
2. มีความยืดหยุ่นสูง
3. มีความเสี่ยงต่อการเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นต่ำ
4. เงื่อนไขของสภาวะต่าง ๆ มีความเหมาะสม ต่อจุลินทรีย์ เช่น การเจริญของเชื้อ
ข้อเสีย ดังนี้
1. เสียเวลากับการเติมอาหาร การให้ความร้อน การกำจัดเชื้อ การใช้ระบบหล่อเย็น
และการทำความสะอาดถังหมัก
2. ต้องการกำลังคนมาก หรือต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง เช่น การใช้ระบบ
คอมพิวเตอร์ในการควบคุม
3. มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดการปนเปื้อน หรือการได้รับสารพิษจากคนที่เข้าไป
ปฏิบัติงาน
4. เครื่องมือได้รับความเสียหายมากจากการกำจัดเชื้อหลาย ๆ ครั้ง

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

Panchal (1990) ได้ชี้ให้เห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งปฏิกิริยา
การผลิตเอทานอล ทำให้ผลิตเอทานอลได้น้อยลง ซึ่งปัจจัยหลัก ๆ ได้แก่

1. การยับยั้งการผลิตเอทานอลโดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย นั่นคือ เอทานอลทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้ง
ปฏิกิริยา
2. การยับยั้งการผลิตเอทานอลโดยผลผลิตพลอยได้ (by products) เช่น กรดอินทรีย์
3. การยับยั้งโดยแรงดันออสโมซิส เนื่องจากมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง
4. การยับยั้งเนื่องจากผลของอุณหภูมิที่เพิ่มมากขึ้น
5. การยับยั้งกระบวนการหมักแต่ไปส่งเสริมการเจริญของยีสต์เนื่องจากการให้อากาศ
(aeration) หรือการกวน (agitation)
6. การยับยั้งกระบวนการหมักเนื่องจากการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์ชนิดอื่น
(โดยเฉพาะอย่างยิ่งการหมักในระดับอุตสาหกรรม)
7. การยับยั้งกระบวนการหมักเนื่องจากสายพันธุ์ยีสต์ที่เลือกใช้ไม่คงตัว มีการกลายพันธุ์หรือ
มีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ มีดังนี้ (วรารุณี และคณะ, 2529)

1. ความเข้มข้นของเอทานอล

ยีสต์หลายชนิดมีความอ่อนแอต่อการยับยั้งด้วยเอทานอล การมีเอทานอลสะสมอยู่ในถัง
หมักถือว่าเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่ไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของเอทานอลเพียง
1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักก็ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าลง และที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ทำ

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

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

2. ความเข้มข้นของน้ำตาล

อาหารสำหรับหมักที่มีน้ำตาลสูงกว่าร้อยละ 15 การหมักเอทานอลของยีสต์จะหยุดลง ดังนั้นการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มาหมักในสภาวะเช่นนี้ จึงมีผลให้การหมักเป็นไปได้ช้า ๆ และเมื่อเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerant yeast) เช่น *S. rouxii* พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำ D'Amore และคณะ (1988) ได้ศึกษาผลของแรงดันออสโมซิสต่อกระบวนการหมักของ brewing yeast (*S. cerevisiae*) ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 100, 200, 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ผลแสดงให้เห็นว่าเมื่อกลูโคสความเข้มข้นสูงขึ้นการเจริญและ การหมักของ brewing yeast ลดต่ำลง จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการเจริญ อัตราการหมัก และ ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลซึ่งดูจากค่าผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (theoretical ethanol yield) ลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลภายในเซลล์ได้รับความเสียหาย จึงมีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในวิถี Embden- Meyerhof-Parnas

3. สารอาหาร และ โคแฟกเตอร์ (cofactor)

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

3.1 ไนโตรเจน

โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมไอออน ได้ซึ่งอาจเติมในรูปของได้แอมโมเนียมฟอสเฟต หรือแอมโมเนียมซิลเฟต โดยแอมโมเนียมไอออนนั้นจัดว่าเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งยีสต์ *Saccharomyces* spp. สามารถใช้ได้ ขณะนี้ยังไม่พบว่ามี การนำยูเรียไปใช้เป็น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตอาหารสำหรับคนอย่างเป็นการค้า แต่มีการใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง โดยยูเรีย นั้นจัดเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ยีสต์สามารถใช้ได้เช่นเดียวกันกับเกลือแอมโมเนียม

3.2 ฟอสฟอรัส

ปกติในรูปของฟอสเฟต ซึ่งเป็น ionic factor จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญ ต่อการเจริญของยีสต์ แต่ไม่ควรใส่จนมีความเข้มข้นเกินร้อยละ 4 ของน้ำหนักแห้ง

3.3 ซัลเฟอร์

ปกติในอุตสาหกรรมใช้รูปของแอมโมเนียมซิลเฟต จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับฟอสฟอรัส และความเข้มข้นที่ใส่โดยทั่วไปไม่ควรเกินร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้ง

3.4 Trace element

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

3.5 วิตามิน

ความต้องการวิตามินในการเจริญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ส่วนมาก brewer's yeast มีความต้องการไบโอติน โดยไบโอตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์คาร์บอกซีเลส (carboxylase) เพื่อใช้สำหรับสังเคราะห์ลิพิดที่จำเป็น มียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ต้องการแพนโททีน เป็นปัจจัยการเจริญ แม้ว่า บางครั้งจะผลิตได้มากและปลดปล่อยออกมาสู่อาหาร ซึ่งแพนโททีนนี้เป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ เอ และมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตและลิพิด นอกจากนั้น เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ซัลเฟอร์เพื่อเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน สำหรับอินอซิทอล (inositol) มีความต้องการเป็นบางครั้งเพราะใช้เป็นองค์ประกอบของฟอสโฟลิพิด ขณะที่ไพริดอกซิน (pyridoxine) และไทอะมิน (thiamine) นั้นมีความจำเป็นต่อ brewer's top yeasts ซึ่งวิตามิน ต่างๆ เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตและ เมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน ซึ่งการจะเติมสารอาหารใดลงไปนั้นควรคำนึงถึงผลต่อต้นทุนการผลิต

4. สภาวะแวดล้อม

4.1 พีเอช

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

4.2 อุณหภูมิ

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

4.3 ออกซิเจน

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

4.4 คาร์บอนไดออกไซด์

ยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนในที่มีความดันสูงกว่าบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญและการหมักรุนแรงมากขึ้น เช่นเดียวกับสภาวะที่อาหารมีพีเอชต่ำ และมีความเข้มข้นของเอทานอลสูง ดูเหมือนว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการ ยับยั้งปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันเท่านั้น แต่ก็พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของ เยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมบางอย่างของเอนไซม์ เปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึม ได้ (permeability) และการขนส่งตัวถูกละลาย

2.4 จุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลที่สำคัญที่สุดคือ ยีสต์ ซึ่งสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นพลังงานเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอากาศ และสร้างเอทานอลเมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจากอากาศ(เมื่ออากาศจำกัด) กระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยยีสต์นั้นในระดับอุตสาหกรรมมีกระบวนการผลิตแตกต่างกันไป รวมถึงยีสต์ที่ได้รับความสนใจและถูกเลือกใช้ในการหมักได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* *Shizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces species* สำหรับแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ *Zymomonas mobilis* ซึ่งการเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดใดก็ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ สำหรับ *Z. mobilis* และ *S. cerevisiae* ต่างมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพื้นฐาน ของ

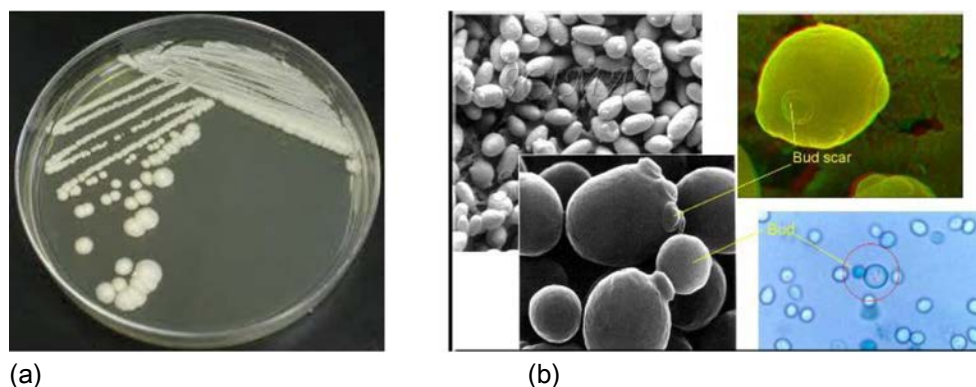
การจัดการ กรณีเลือกใช้ *Z. mobilis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงแต่มีชีวมวลต่ำ ฉะนั้น จำเป็นต้องมีความระมัดระวังในเรื่องของการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงแง่ เศรษฐศาสตร์โรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจึงให้ความสนใจ *S. cerevisiae* มากกว่าอีกทั้ง *Z. mobilis* มีความทนต่อเอทานอลต่ำกว่ายีสต์ การผลิตเอทานอลในระดับโรงงานอุตสาหกรรมนั้นจุลินทรีย์ที่ เลือก มาใช้ต้องมีลักษณะเหมาะสมกับกระบวนการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต และการออกแบบ ลักษณะ ของกระบวนการการผลิตรุนั้นก็ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ถูกเลือกมาใช้ในการหมักด้วย เช่นกัน

ยีสต์คือจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางเป็นเวลานานมาแล้ว ถึงกับมีผู้กล่าวไว้ว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาใช้ในการผลิต เบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 6,000 ก่อนคริสตกาล ปัจจุบันได้มีการนำยีสต์มา ใช้ ประโยชน์ในหลายๆด้าน ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเภสัชกรรม การแพทย์ การเกษตร และสิ่งแวดล้อม การใช้ประโยชน์ของเซลล์ยีสต์ในอุตสาหกรรมอาหาร มีบทบาท สำคัญอย่างมากและสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับเซลล์ยีสต์ได้อย่างคุ้มค่า นอกจากนี้ยีสต์ยัง สามารถ นำไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ การผลิต เอทานอลสำหรับใช้เป็นสารเคมีและเชื้อเพลิง เป็นต้น

ยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของรากลุ่มหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดียว มีรูปร่าง หลายแบบ เช่นรูปร่างกลม ทรงรี สามเหลี่ยม รูปร่างคล้ายผลมะนาวแถบประเทศตะวันตกหรือรูปร่าง ยาว เป็นต้น ยีสต์จะมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการแตกหน่อ (budding) หรือสืบพันธุ์ แบบอาศัยเพศโดยวิธีการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ยีสต์ส่วนใหญ่จะมีการใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน มนุษย์ รู้จัก นำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในแง่ของกระบวนการหมัก (fermentation) โดยเซลล์ยีสต์จะมีการ เจริญเติบโต และแพร่ขยายจำนวนภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น อาหาร อุณหภูมิ และปัจจัยแวดล้อมใน กระบวนการ หมักที่เหมาะสมด้วยการเปลี่ยนแปลงน้ำตาล (สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน) เป็นคาร์บอนได ออกไซด์และแอลกอฮอล์ เซลล์ยีสต์สามารถพบได้มากมายตามธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน พืช หรือแม้ กระทั่งในอากาศ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์บางชนิดจะรวมอยู่กับแมลง หรือในกระเพาะ ของสัตว์บาง ชนิด แหล่งที่มักพบยีสต์เจริญปะปนอยู่บ่อยๆ คือ แหล่งที่มีปริมาณความเข้มข้นของ น้ำตาลสูงๆ เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง และผลไม้ที่มีรสหวาน นอกจากนี้ยังสามารถพบยีสต์เจริญได้ในเมล็ด ธัญพืช หย้าฟาง หรือแม้กระทั่งอาหารสัตว์ การปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ในอาหารเหล่านี้อาจก่อให้เกิดเป็นสาเหตุของการ เน่าเสียของอาหารอีกด้วย อย่างไรก็ตามยีสต์หลายสายพันธุ์ที่ได้ทำการพิสูจน์และ ศึกษาค้นคว้าว่ามี ประโยชน์ต่อมนุษย์ แต่ยีสต์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมนั้นมีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ตัวอย่างสายพันธุ์ที่เป็น ที่รู้จักและมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ในการผลิต เบียร์ (Brewer's Yeast) เอทานอล และสำหรับทำขนมปัง (Baker's yeast)

Saccharomyces cerevisiae จัดอยู่ใน

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



รูปที่ 2.2 (a) ลักษณะโคโลนีของ *Saccharomyces cerevisiae* บนอาหารแข็ง
(b) ลักษณะเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
กำลังขยาย 100X

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

ในกระบวนการหมักเอทานอลจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดคือ ยีสต์ โดยเฉพาะ *S. cerevisiae* จุดเด่นของเชื้อนี้คือ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง (0 ถึง 40 องศาเซลเซียส) ทนอุณหภูมิสูงได้นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิดนอกเหนือจากน้ำตาลกลูโคส เช่น น้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย) น้ำตาลมอลโตส กาแลกโตส เป็นต้น จึงนิยมใช้หมักเพื่อผลิตเอทานอล โดยทั่วไป

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

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

ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกเพื่อการอยู่รอดได้ แตกต่างกันไป อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่สุดในด้านลบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงต้องมียีนพิเศษช่วยให้มีชีวิตรอด ซึ่งเกี่ยวข้องกับสิ่งสำคัญอยู่ 3 ประการ คือ ความคงตัวของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาของลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ การสร้าง องค์ประกอบของเซลล์ขึ้นมาทดแทนองค์ประกอบเดิมที่เสถียรสภาพไป และการที่จุลินทรีย์นั้นทนต่อ อุณหภูมิสูงอยู่ก่อนแล้วเกิดวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ประมาณ 46 - 50 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่านั้นหาได้ยาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ รวมทั้งสภาวะการเจริญ เช่น อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน น้ำ ออกซิเจน ความเข้มข้นของเอทานอล และ ปัจจัยการเจริญอื่น การให้สารอาหารพิเศษบางชนิดสามารถช่วยให้ ยีสต์เจริญที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้ เช่น การเติมกรดไขมันอิ่มตัว และเออร์โกสเตอรอลในอาหารหมัก การที่ ยีสต์มีการเจริญลดลงในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นอาจเนื่องมาจากการสังเคราะห์สเตอรอลได้น้อยลง (Anderson และคณะ, 1986) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพบว่าสภาพการเป็นของไหลขององค์ประกอบของ เยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มลดลง การมีชีวิตรอดของยีสต์น้อยลง ทั้งนี้เพราะโปรตีนหรือองค์ประกอบของ กรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เสถียรภาพ (Swan และ Watson, 1997)

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

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

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

2.5 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (www.dktac.th/kruya/energy/en_else/atanol:

สืบค้นวันที่ 10 กันยายน 2555)

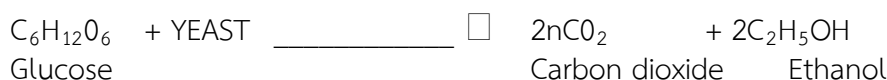
เอทานอลเกิดจากการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas Pathway หรือ Glycolysis pathway จากจุลินทรีย์ เนื่องจากยีสต์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อผลิตเอทานอลนั้น สามารถใช้น้ำตาลทราย (ซูโครส) ได้ด้วย ฉะนั้นจึงสามารถใช้น้ำอ้อย หรือกากน้ำตาลเป็น

วัตถุดิบสำหรับการหมักได้ ส่วนวัตถุดิบที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ถ้าย่อยแป้งก็จะได้น้ำตาล กลูโคส และหมักเป็นเอทานอลได้เช่นเดียวกันโดยเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากชีวมวลจะขึ้นอยู่กับประเภทของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร สามารถแบ่งตามกลุ่มพืชผลทางการเกษตรที่ใช้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

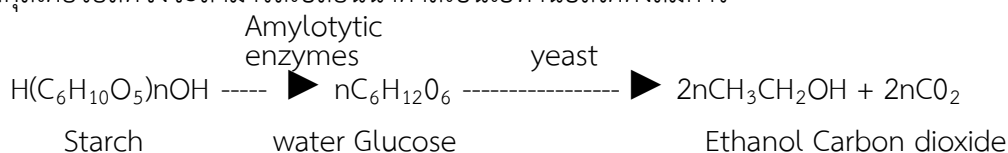
1. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

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



2. วัตถุดิบประเภทแป้ง

เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสจะต้องนำมาผ่านกระบวนการย่อยให้ได้น้ำตาลกลูโคสเป็นโมเลกุลเดี่ยวยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ดังสมการ



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

3. วัตถุดิบประเภทเส้นใย

ซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และสารประกอบอื่นๆ

เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึก มีลักษณะเป็นเส้นใย เหนียวและไม่ละลายน้ำ

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไกโซส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และ อะราบินโนส (Arabinose) เป็นต้น จะไม่ละลายน้ำและเสถียรน้อยกว่าเซลลูโลสมาก

ลิกนิน เป็นพอลิเมอร์ของ ฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane) ทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก ดังนั้นในการนำมาผลิตเอทานอลต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบก่อน

วัสดุส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ชี้อ้อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

วัสดุเหลือทางการเกษตรสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ โดยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีมากในประเทศไทย เช่น ผลพลอยได้จากข้าว ผลพลอยได้จากข้าวโพด และ ผลพลอยได้จาก 'ปาล์ม' น้ำมัน ซึ่งวัสดุเหลือทิ้งแต่ละประเภท มีคุณสมบัติและปริมาณแตกต่างกันไปสำหรับการนำ

วัสดุเศษเหลือจากการเกษตรไปผลิตเอทานอลนั้นมีข้อจำกัดเพราะวัสดุเศษเหลือที่น้ำหนักน้อยและพองฟูทำให้ไม่คุ้มค่าขนส่ง

แม้จะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่จะมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเป็นเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณาคือ

- วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดปี หาได้ง่าย ราคาถูก
- สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบและต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง
- พลังงานสมดุลของระบบเป็นบวก
- วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารของมนุษย์

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

2.6 มันเทศ (Sweet Potato)

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

ประวัติความเป็นมา

มันเทศมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่บริเวณเขตร้อนของทวีปอเมริกา แต่มันเทศที่ปลูกกันอยู่ในปัจจุบัน นักวิทยาศาสตร์ไม่มีหลักฐานแน่นอนว่ามีวิวัฒนาการมาจากพืชป่าชนิดใด ในสมัยโบราณมันเทศเป็นอาหารหลักของมนุษย์สองเขต คือ พวกอินเดียนในอเมริกากลางและบริเวณเทือกเขาแอนดิส ประเทศเปรู พวกอินเดียนทั้งสองแหล่งนี้ปลูกข้าวโพดเพื่อใช้เป็นอาหารหลัก และในขณะเดียวกันก็ปลูกมันเทศด้วย อีกเขตหนึ่ง คือ ชนเผ่าโพลิเนเซียนที่อาศัยอยู่บนหมู่เกาะต่างๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิก และ ตอนเหนือของเกาะนิวซีแลนด์ เชื่อกันว่ามันเทศที่ชาวโพลิเนเซียนปลูกกันในสมัยก่อนนั้น นำมาจาก ทวีปอเมริกาในคริสต์ศตวรรษที่ 16 หลังจากชาวยุโรปค้นพบทวีปอเมริกา นักสำรวจชาวสเปนได้นำ มันเทศไปสู่ประเทศสเปน จากประเทศสเปนก็แพร่ต่อไปยังประเทศอื่นๆในยุโรป

ทางด้านเอเชียมันเทศก็ถูกนำมายังอินเดีย ฟิลิปปินส์ จีน และญี่ปุ่น โดยนักสำรวจสเปนและโปรตุเกส สำหรับประเทศไทยไม่มีหลักฐานบันทึกว่าได้มีการนำมันเทศเข้ามาปลูกในสมัยใดแต่เข้าใจกันว่าผู้นำมันเทศมาแพร่หลายในราวสมัยกรุงศรีอยุธยาเป็นราชธานี เพราะมีเรือสำเภาไปมาค้าขายระหว่างประเทศจีน พวกคนจีนคงจะได้นำติดมือมา ตามนิสสัยที่ไปอยู่ที่ไหนก็หาพันธุ์พืชไปปลูกบริเวณ ในปัจจุบันมันเทศปลูกกันทั่วไปในประเทศไทยเพราะมันเทศเป็นพืชที่เหมาะสมกับสภาพดิน ฟ้าอากาศของประเทศไทยอย่างยิ่ง สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตของหัวค่อนข้างสูง แต่ส่วนใหญ่แหล่งปลูกเป็นจังหวัดในทางภาคกลาง จังหวัดที่ปลูกมาก ได้แก่ นครศรีธรรมราช เชียงใหม่ นครสวรรค์ พระนครศรีอยุธยา สงขลา นครปฐม เพชรบุรี ตรัง เลย และปทุมธานี โดยข้อมูลปี 2546 - 2547 ประเทศไทยมีการปลูกมันเทศ รวม 30,905 ไร่ มีปริมาณผลผลิต 56,432 ตัน เฉลี่ยผลผลิต 1.82 ตันต่อไร่ มันเทศจึงเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญเป็นอันดับที่ 5 ของโลกรองจาก ข้าว สาลี ข้าวเจ้า ข้าวโพด และ มันฝรั่ง

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



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของมันเทศ

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

ชื่ออังกฤษ : Sweet Potato
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ipomoea batatas* L.
ชื่อวงศ์ : Convolvulaceae

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

มีลำต้นเป็นเถาหรือเป็นพุ่มตั้งตรง และมีจำนวนน้อย ที่เป็นประเภทไม้ยืน ต้นพืชพวกนี้อาจเจริญในที่แห้งแล้ง ในน้ำ และอาจเป็นพวกตัวเบียน (parasite) โดยทั่วไปแล้วเมื่อใบหรือลำต้นเป็นแผลพืชในวงศ์นี้จะให้น้ำยางสีขาว

ราก มันเทศมีระบบรากแบบรากฝอย ซึ่งเกิดจากข้อของลำต้นที่ไชปลูก หรือเกิดจาก ลำต้น ที่ทอดไปตามพื้นดิน รากมันเทศจะเป็นที่สะสมอาหารและใช้รับประทานได้

ใบ เป็นแบบใบเดี่ยว เกิดสลับกันบนข้อของลำต้น มีขนาดและรูปร่างต่างกัน ความแตกต่างของใบนั้นมิใช่เกิดจากพันธุ์เท่านั้น แม้แต่ในต้นเดียวกันก็อาจมีรูปร่างแตกต่างกันได้ บางใบมีขอบใบเรียบ บางใบมีใบเป็นแฉก และบางใบมีรูปร่างคล้ายหัวใจ เป็นต้น ใบมีขนาดเล็กน้อย และ มักจะมีสี ม่วง อยู่ตามเส้นใบ ก้านใบอาจจะยาวหรือสั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์นั้นๆ

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

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

หัว มันทะลึงหัวในระดับความลึกไม่เกิน 9 นิ้ว หัวมันเทศเกิดจากการขยายตัวของราก ซึ่งเนื้อเยื่อภายในรากที่เรียกว่าพาราไคม (parenchyma) เป็นส่วนที่สะสมแป้ง รากที่ขยายตัวเป็น หัว ขึ้นมาอาจเกิดจากรากของลำต้นที่ใช้ปลูก หรือจากรากที่เกิดจากข้อของลำต้นที่เลื้อยไปตามดินก็ได้ ดังนั้นมันเทศต้นหนึ่งๆ อาจมีหัวมากกว่า 50 หัวลักษณะหัวส่วนมากมีรูปร่างทรงกระบอก ด้านหัว ท้ายเรียวยาวตรงกลางป่องออก สีผิวของหัวและสีของเนื้ออาจจะเป็นสีแดง เหลือง ขาว หรือสีน้ำตาล แตกต่างกันไปตามพันธุ์ ผิวอาจจะเรียบหรือขรุขระและมักจะมีรากแขนงเกิดในร่องของหัว

คุณค่าทางโภชนาการของมันเทศ

ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต เส้นใย โปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี 2 ไนอาซิน โฟเลต วิตามินซี สารเริ่มต้นของสารแคโรทีนและเบต้าแคโรทีน

มันเทศ เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตชั้นดีที่ให้พลังงานโดยไม่ก่อพิษต่อร่างกายแบบอาหารที่แปรรูปจากแป้งและน้ำตาลแบบอื่นๆ หัวมันเทศชนิดหัวสีเหลืองแสดงว่าเป็นแหล่งเบต้าแคโรทีนที่ดีกินแล้วจะได้วิตามินเอ มันเทศจึงมีส่วนช่วยบำรุงสายตา เสริมสร้างระบบคุ้มกันของร่างกายให้แข็งแรง ลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ

มันเทศ เป็นพืชอาหารของมนุษย์และสัตว์ โดยใช้ทั้งหัว ถั่วใบ และยอดอ่อน มาประกอบอาหารทั้งคาวและหวาน เช่น มันกระป๋อง น้ำส้มสายชูหมักจากมันเทศ ในด้านอุตสาหกรรมมีการ สกัดแป้งมันเทศเป็นส่วนผสมของอาหารเด็ก และกาว เป็นต้น นอกจากนี้มันเทศยังใช้เป็นอาหารสัตว์ ได้หลายชนิด เช่น สุกร วัว ควาย กระจ่าง เป็ด ไก่ และปลา เป็นต้น

สรรพคุณของมันเทศ

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

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

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณค่าทางอาหารของมันเทศเนื้อขาวเปรียบเทียบกับเนื้อเหลือง

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

ที่มา : กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2530)

ตารางที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบหลักใน 100 กรัม ของส่วนที่รับประทานได้ของพืชตระกูลหัวเปรียบเทียบกับข้าว

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

ที่มา : คมสัน (2553)

นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณอื่นเช่น แก้อาการท้องผูก ช่วยย่อยอาหาร ช่วยปรับสภาพเลือด บำรุงเลือด รวมถึงอวัยวะต่างๆ คือกระเพาะ ม้ามเป็นต้น ช่วยป้องกันโรคต่อกระจาก ตาบอดกลางคืน รักษาโรคเบาหวาน แก้อาการคัน ป้องกันโรคหัวใจ และ มะเร็ง

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

การกลายพันธุ์ (Mutation) เป็นการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในเซลล์ที่ถ่ายทอดไปยังเซลล์ลูกหลาน การกลายพันธุ์ของจีโนม (Genome mutation) อาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม ส่วนการกลายพันธุ์ของโครโมโซม (Chromosome mutation) อาจเกิดจากการเปลี่ยนลำดับของยีนภายในโครโมโซม เช่น การขาดหาย (Deletion) การเปลี่ยนกลับ (Inversion) การทำเป็นคู่ (Duplication) การเคลื่อนย้าย (Translocation) หรือการไม่แยกออก (Non-disjunction) ในขณะที่เกิดการกลายพันธุ์ของยีน (Gene mutation) หรือการกลายพันธุ์เป็นจุด (Point mutation) ซึ่งเป็นผลมาจากการเปลี่ยนลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนซึ่งทำให้โครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีนจำเพาะเปลี่ยนไป การกลายพันธุ์แบบนี้เป็นการกลายพันธุ์ที่มีความสำคัญในการปรับปรุงพันธุกรรมของจุลินทรีย์ (Jose และ Arnold, 2005) การเปลี่ยนแปลงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนไม่จำเป็นต้องสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในนิวเคลียส แต่อาจเกิดกับดีเอ็นเอที่อยู่ในออร์แกเนลล์อื่นๆ ในเซลล์ (Jacobson, 1981)

2.7.1 การเกิดการมิวเทชัน

แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด

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

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

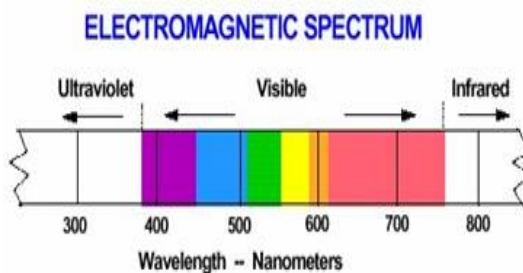
- 1.) รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (Ionizing radiation) รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้สูง ซึ่งมักจะทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม รังสีเหล่านี้ ได้แก่ รังสีแอลฟา เบตา แกมมา นิวตรอนส์ และรังสีเอ็กซ์
- 2.) รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (Non ionizing radiation) รังสีประเภทนี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อได้ต่ำ มักจะก่อให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (Thymine dimer) หรือไซโทซีนไดเมอร์ (Cytosine dimer) รังสีประเภทนี้ ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเลต (UV)

2.7.1.2 สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี (Chemical mutagen) ได้แก่ สารเคมีต่างๆ เช่น

- 1.) สารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสชนิดต่างๆ ของดีเอ็นเอ (Base analogues) สามารถเข้าแทนที่เบสเหล่านั้นได้ในระหว่างที่เกิดการจำลองโมเลกุลของดีเอ็นเอ ทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสและรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป สารเคมีเหล่านี้ ได้แก่ 5-โบรมอดอกซียูริดีน (5-Bromodeoxyuridine) 2-อะมิโนพิวรีน (2-Aminopurine)

- 2.) สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสูตรโครงสร้างของเบส มีผลทำให้เกิดการแทนที่คู่เบสเช่นเดียวกัน ทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป สารเคมีเหล่านี้ ได้แก่ กรดไนตริก ไฮดรอกซิลามีน ไนโตรเจนมัสตาด และเอธิลมีเทนซัลโฟเนต เป็นต้น
- 3.) สารเคมีที่ทำให้เกิดการเพิ่มและการขาดของนิวคลีโอไทด์ในโมเลกุลของดีเอ็นเอ มีผลทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงไป สารเคมีเหล่านี้ ได้แก่ สีย้อม เช่น อะครีดินออร์เรนจ์โพรฟลาวีน เป็นต้น

2.8 รังสีอัลตราไวโอเลต (UV)



รูปที่ 2.4 ช่วงของรังสีอัลตราไวโอเลต

ที่มา: <http://ozone.tmd.go.th/uvbasic.htm> สืบค้นวันที่ 21 กันยายน 2556

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

รังสียูวีแบ่งเป็น 3 ช่วง ตามลักษณะที่มีผลกระทบต่อสุขภาพ

- 1.) UV A ช่วงความยาวคลื่น 315-400 นาโนเมตร เป็นช่วงความยาวคลื่นที่มีพลังงานต่ำที่สุดของรังสียูวี ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อผิวหนังมีสีน้ำตาล (Sun tanning) แต่เนื่องจากเป็นคลื่นที่อยู่ใกล้กับแสงที่ตามองเห็น จึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Near UV
- 2.) UV B ช่วงความยาวคลื่น 280-315 นาโนเมตร มีพลังงานสูงขึ้นสามารถทำให้ผิวหนังไหม้เกรียมและมีหลักฐานว่าเป็นต้นเหตุของการเกิดมะเร็งผิวหนัง
- 3.) UV C ช่วงความยาวคลื่น 100 - 280 นาโนเมตร มีพลังงานสูงกว่ารังสียูวีสองชนิดแรก สามารถดูดกลืนได้โดยดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการกลายพันธุ์ เกิดเซลล์มะเร็ง และเกิดการตายของเซลล์ สมัยโบราณมีการใช้รังสียูวีฆ่าเชื้อเซลล์ที่อยู่บนผิวหนังของคนที่เป็นโรคเรื้อน ถ้ามองรังสียูวีด้วยตาเปล่าอาจทำให้เกิดการไหม้ของจอประสาทตา ทำให้ตาบอดและทำให้สารประกอบในกระจกตาขุ่นเป็นโรคต้อ

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

ออกซิเจนในอากาศ ดังนั้นหากรังสียูวีที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 200 นาโนเมตร เคลื่อนที่ผ่านบรรยากาศจะถูกดูดกลืนหมด จึงต้องอาศัยตัวกลางที่เป็นสุญญากาศรังสียูวีจึงจะส่องผ่านได้จึงเรียกว่า Vacuum UV

ความยาวคลื่นที่มีประสิทธิภาพสำหรับทำให้กลายพันธุ์อยู่ในช่วง 200-300 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการกลายพันธุ์ คือ 255 นาโนเมตร เป็นค่าความยาวคลื่นที่ดีเอ็นเอดูดกลืนสูงสุด ผลที่สำคัญจากการทำงานของรังสียูวี คือ ไพริมีดินไธม์เมอร์ซึ่งอาจเกิดได้ 3 แบบ คือ ระหว่างไทมีนกับไทมีน ไทมีนกับไซโทซีน และไซโทซีนกับไซโทซีน ไพริมีดินไธม์เมอร์เหล่านี้อาจจะเกิดระหว่างไพริมีดินที่อยู่ติดกันบนดีเอ็นเอสายเดียวกันหรือคนละสาย โดยพบว่าในยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งมีองค์ประกอบของกัวนีนและไซโทซีน (C+G content) ประมาณร้อยละ 35 มีไธม์เมอร์ระหว่างไทมีนสูงสุด รังสียูวีที่มีความยาวคลื่นสั้นนี้อาจจะเหนี่ยวนำให้เกิดทรานซิชันของ G:C ไปเป็น A:T การกลายพันธุ์แบบกรอบเลื่อน และการขาดหาย เป็นที่รู้กันว่าหากใช้รังสียูวีที่มีความยาวคลื่นสูงกว่า 260 นาโนเมตร อาจทำให้ไธม์เมอร์เปลี่ยนกลับเป็นโมโนเมอร์ด้วยแสงที่มองเห็นได้ ไธม์เมอร์ที่เกิดขึ้นทำให้มีรอยแผลขนาดใหญ่ซึ่งขัดขวางการถอดรหัสและการถ่ายแบบดีเอ็นเอ ถ้าซ่อมแซมไม่ได้ เซลล์อาจตายหรือเกิดการกลายพันธุ์ระหว่างการซ่อมแซม ผลจากผลของรังสียูวีพบว่าไม่มีไพริมีดินไธม์เมอร์ที่ถูกซ่อมแซมด้วยระบบการซ่อมแซมชนิดต่างๆในเซลล์มากถึง 1,000 ไธม์เมอร์ นอกจากไพริมีดินไธม์เมอร์แล้วรังสียูวีอาจทำให้เกิดผลอื่น ๆ บนดีเอ็นเอ เช่น การเติมน้ำที่พันธะคู่ใน ไพริมีดินซึ่งทำให้มีความผิดพลาดในระหว่างการถ่ายแบบดีเอ็นเอ ส่วนรังสียูวีชนิดคลื่นยาวซึ่งมีความยาวคลื่น 300-400 นาโนเมตร มีผลต่อการตายและการทำให้กลายพันธุ์น้อยกว่ารังสียูวีชนิดคลื่นสั้น แต่ถ้าสัมผัสนานๆในที่ที่มีรังสีที่แทรกเข้าไประหว่างเบสในดีเอ็นเอ ซึ่งหมายถึงสารอินเตอร์คาเลติงจะทำให้มีอัตราการตายและการกลายพันธุ์เพิ่มขึ้น นิยมใช้รังสียูวีเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีสต์เพราะใช้ง่าย การวัดปริมาณกำหนดทำได้ง่ายและการสัมผัสกับรังสียูวีไม่เป็นอันตรายมากนัก ทำให้การปฏิบัติไม่ต้องระมัดระวังมาก สายพันธุ์กลายที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยรังสียูวีนี้นับประมาณร้อยละ 10 อาจเป็นสายพันธุ์กลายที่ไม่เปลี่ยนกลับ (Non-reversible) หรือสามารถเปลี่ยนกลับที่ความถี่ต่ำมาก (Jacobson, 1981; Brock, 1984; Borstel, 1990)

2.9 สารเคมีก่อกลายพันธุ์ Ethyl methanesulfonate (EMS)

Ethyl methanesulfonate หรือ EMS มีสูตรโครงสร้างทางเคมี $\text{CH}_3\text{SO}_2\text{OC}_2\text{H}_5$ มีสถานะเป็นของเหลวใสไม่มีสี ความหนาแน่น 1.203 กรัมต่อมิลลิลิตร มีจุดเดือดที่อุณหภูมิ 85-86 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 10 มิลลิลิตรปรอท น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 124 และละลายน้ำได้ประมาณร้อยละ 8 (สิรินุช, 2536) ในการทำปฏิกิริยา EMS จะถ่ายหมู่เอทิล คือ C_2H_5 ให้กับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ในปฏิกิริยาแอลคิเลชัน (Alkylation) โดยทำปฏิกิริยาได้ทั้งกับเบสพิวรีน เบสไพริมีดิน รวมทั้งหมู่ฟอสเฟตของดีเอ็นเอด้วยแต่อย่างไรก็ตามปฏิกิริยาแอลคิเลชันจะเกิดมากที่สุดในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน ซึ่งภายหลังทำการปฏิกิริยาแล้วจะกลายเป็น 7-Ethylguanine หรือที่เรียกว่า Alkylated guanine (สิรินุช, 2536)

EMS ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้โดย

- 1) การแทนที่ของเบส (Single base substitution)

เมื่อ EMS ทำปฏิกิริยาแอลคิเลชันซึ่งจะเกิดมากที่สุดในตำแหน่ง N-7 ของเบสกัวนีน มีผลให้คุณสมบัติในการเกิดไอออไนเซชัน (Ionization) ของเบสผิดปกติเกิดการจับคู่ที่ผิดไปจากเดิม (สิรินุช, 2536)

2) การดึง (หลุด) เบสพิวรีนจากสายดีเอ็นเอ

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

3) การแตกหัก (ขาด) ของ DNA สายเดี่ยวและสายคู่

เมื่อเกิดดีพิวรีเนชันจะให้น้ำตาลไม่อยู่ตัว เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ตัดขาดหมู่ฟอสเฟตและน้ำตาล ทำให้อาณัติหรือสายคู่ของดีเอ็นเอขาดจากกันได้ ซึ่งนำไปสู่การหลุดหายของชิ้นส่วนดีเอ็นเอและเกิดการกลายพันธุ์ในที่สุด (สิรินุช, 2536)

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae YRK 017 ซึ่งแยกได้จากลูกแป้งเหล้าในประเทศไทย (วิมลลักษณ์, 2549)

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5196

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5202

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5339

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5088

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5596

(จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย)

3.2 วัตถุดิบ

มันเทศ สายพันธุ์ที่มีเนื้อสีเหลือง ซื้อจากตลาดหัวตะเข้ ตลาดกระบี่ กรุงเทพมหานคร

3.3 สารเคมี

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

3.4 วัสดุอุปกรณ์

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

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

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมแป้งมันเทศ

การเตรียมวัตถุดิบโดยใช้มันเทศจากตลาดหัวตะเข้ เขตตลาดกระบี่ มาล้างน้ำทำความสะอาด ปอกเปลือก แล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นบางๆ ประมาณ 1 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาวางกระจายบนถาดสแตนเลส อบแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 3 วัน นำชิ้นมันเทศที่ผ่านการอบแห้ง ทำการป่นละเอียดให้เป็นผงด้วยเครื่องบด แล้วนำมากรองผ่านตะแกรงร่อน ขนาดเบอร์ 35 จะได้ผงแป้งมันเทศที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.188 มิลลิเมตรเก็บรักษาในตู้เย็น เพื่อเก็บไว้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลต่อไป

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้น

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

3.5.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

3.5.3.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

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

กรดอะซิเตดปริมาตร 148 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้ว ปรับความเข้มข้นให้เป็น 0.05 โมลาร์ และนำไปปรับพีเอชเป็น 5.0 โดยใช้สารละลายกรดอะซิติก 0.05 โมลาร์ หรือ สารละลายโซเดียมอะซิเตด 0.05 โมลาร์

3.5.3.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ซังเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 กรัม นำมาละลายในสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วนำไปกรองด้วย Milipore filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ เก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.3.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

ซังเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.015 กรัม นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วนำไปกรองด้วย Milipore filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในสภาวะปลอดเชื้อเก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

3.5.4.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ

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

3.5.4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

เตรียมอาหารหมัก YFM (ประกอบด้วยยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 4 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) 2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร pH 5.5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหหัวเชื้อเริ่มต้น ที่ได้จากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ 30 37 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ หามวลชีวภาพ คัดเลือกสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่ผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง เพื่อศึกษาต่อไป (Kiran และคณะ, 2000)

3.5.5 ศึกษาการทนทานต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อยีสต์

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

เดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.5.2 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจนับเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต โดยนำมาทำการเจือจาง (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-8} นำมาทำการ pour plate ลงบนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับโคโลนีบนจานที่มีจำนวน 25 - 250 โคโลนี คำนวณในรูป CFU ต่อมิลลิลิตร คัดเลือกสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่สามารถเจริญได้ดีที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง เพื่อศึกษา ต่อไป (Kumar และคณะ , 2011)

3.5.6 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้รังสียูวีและการใช้สารเคมี

3.5.6.1 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้รังสียูวี

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

3.5.6.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้ EMS

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

ซึ่งอัตราการรอดชีวิตสามารถคำนวณได้ดังนี้

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

3.5.7 การคัดแยกสายพันธุ์กลายให้บริสุทธิ์

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

3.5.8 การคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

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

3.5.9 การหมักเอทานอลด้วยอาหารหมัก Yeast fermentation medium (YFM) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

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

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

3.5.10.1 การเตรียมสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

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

3.5.10.2 กระบวนการหมัก

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

3.5.11 วิเคราะห์ทางสถิติ

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

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

4.1.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ

หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง

จากการนำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 มาลากเชื้อลงบนอาหารแข็ง YPD นำไป บ่มที่ อุณหภูมิ 30 37 40 42 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเพื่อตรวจสอบการ เจริญเติบโตของ เชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีถึงดีมาก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5088 และ TISTR 5339 ยังสามารถเจริญได้ดีมาก สายพันธุ์ TISTR 5202 และ TISTR 5596 เจริญได้ดี ส่วน สายพันธุ์ TISTR 5196 เจริญได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น สำหรับที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์เจริญได้เพียงเล็กน้อย และไม่สามารถเจริญได้เลยที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงดังตาราง ที่ 4.1

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

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

หมายเหตุ: เทียบกับชุดควบคุมคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและมีการเจริญเป็น +++ +++

+++ = เจริญดีมาก

++ = เจริญดี

+

-

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

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

4.1.2 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆหลังการบ่ม 48 ชั่วโมง

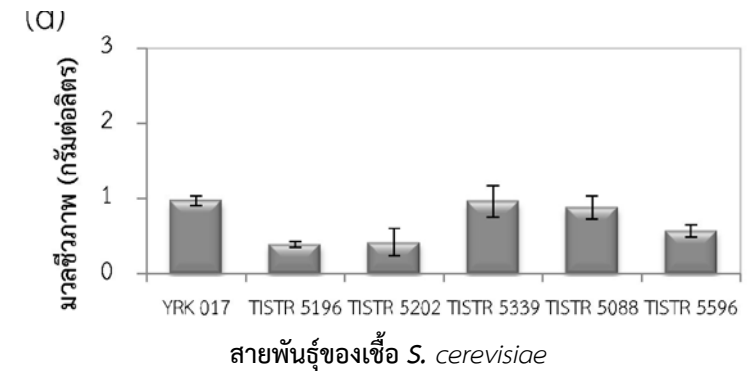
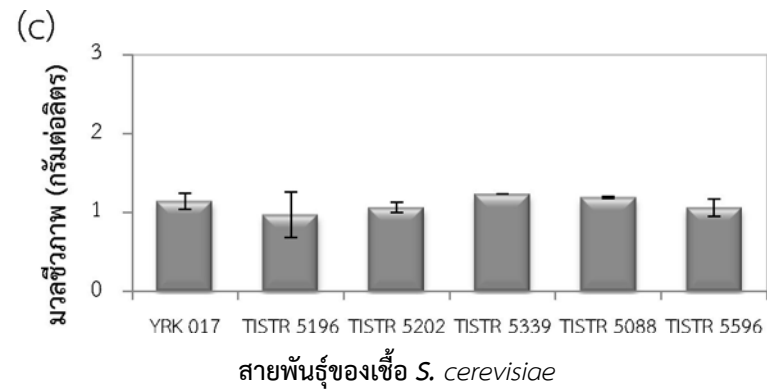
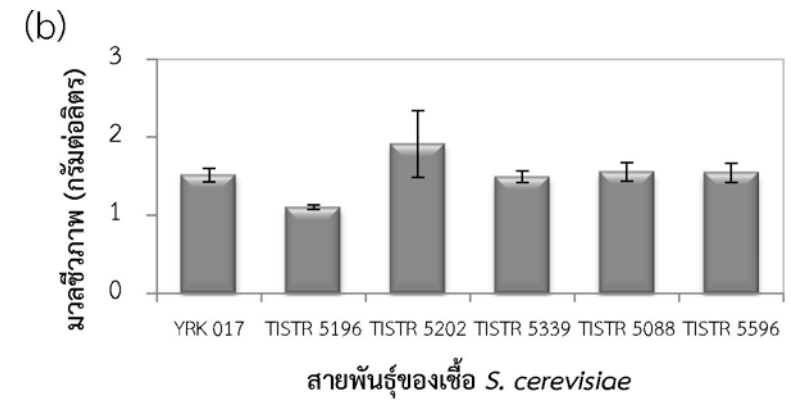
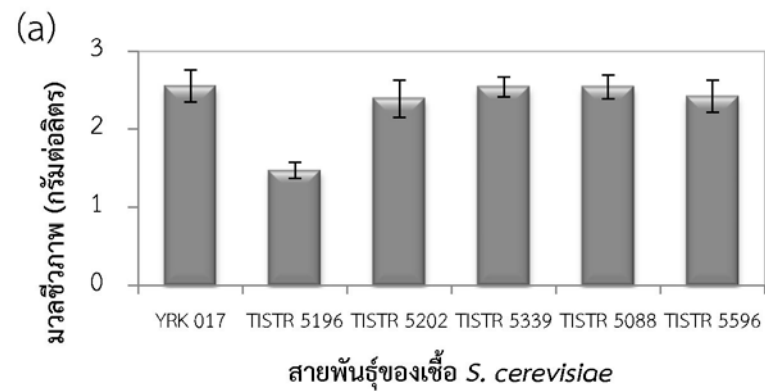
จากการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ด้วยอาหารหมัก YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 37 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาทำการวิเคราะห์หามวลชีวภาพ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอล จากการทดลองวิเคราะห์หามวลชีวภาพโดยการเก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนตะกอนของเซลล์ไปอบแห้ง แล้วนำไปคำนวณหาค่ามวลชีวภาพ พบว่ามวลชีวภาพของเชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ลดลงเมื่ออุณหภูมิที่ใช้ในการหมักสูงขึ้น และที่อุณหภูมิการหมัก 40 องศาเซลเซียส มวลชีวภาพของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339 มีปริมาณสูงสุดคือ 1.23 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือสายพันธุ์ YRK017 และ TISTR 5088 มีมวลชีวภาพ 1.14 และ 0.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส มวลชีวภาพของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 มีปริมาณสูงสุดคือ 1.06 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือสายพันธุ์ TISTR 5339 และ TISTR 5088 มีมวลชีวภาพ 0.97 และ 0.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่รูป 4.2 และรูปที่ 4.1 ซึ่งจากการทดลองพบว่า *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์คือ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 และ 42 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดเป็นสายพันธุ์ของยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง

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

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

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวนอน

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



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

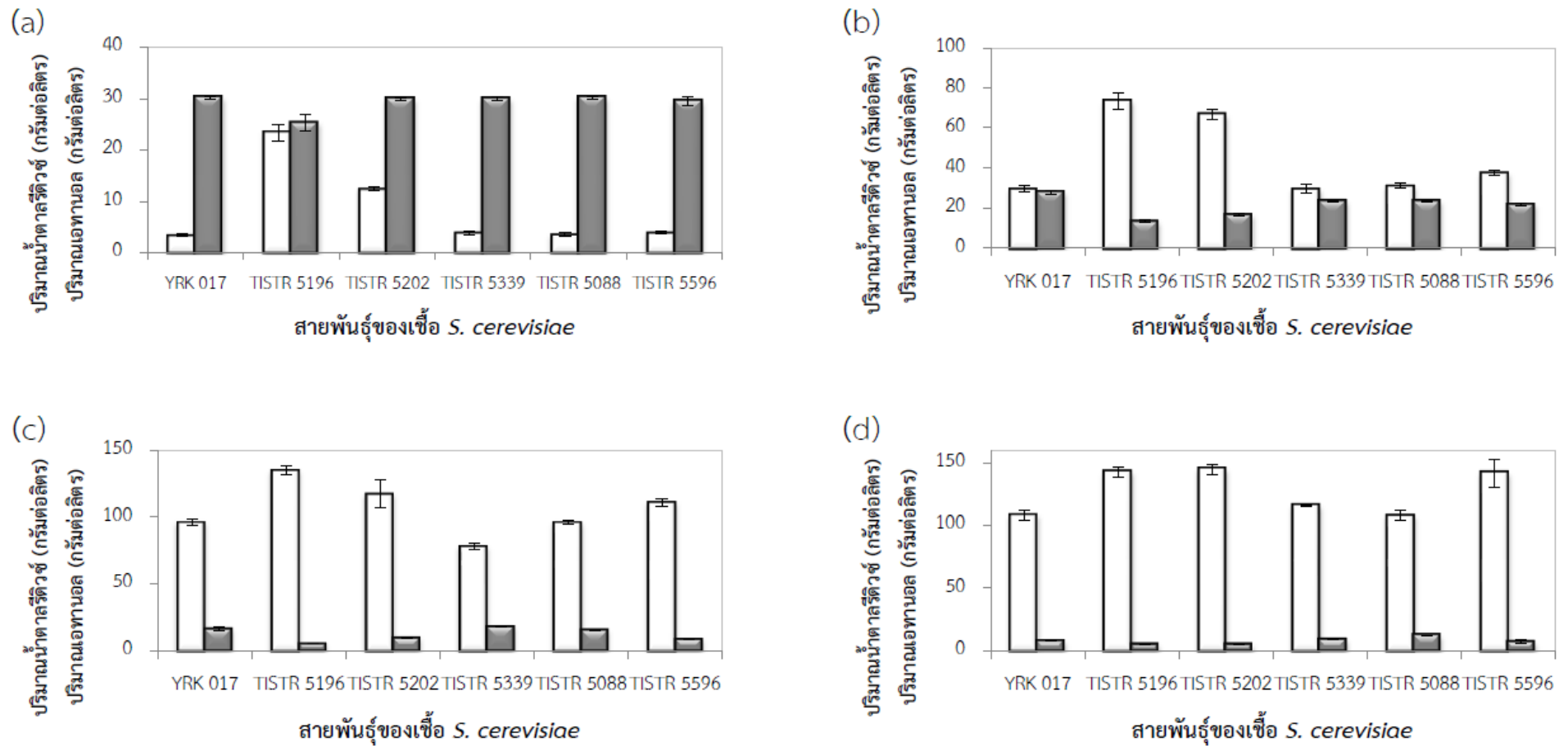
หลังจากการปั่นเหวี่ยง นำตะกอนเซลล์วิเคราะห์หามวลชีวภาพ ส่วนที่ได้จากการ ปั่นเหวี่ยงน้ำหมักของอาหาร YFM นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอานอล พบว่า ภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหารหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* ทุกสายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ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

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

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

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวนั่ง

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



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

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

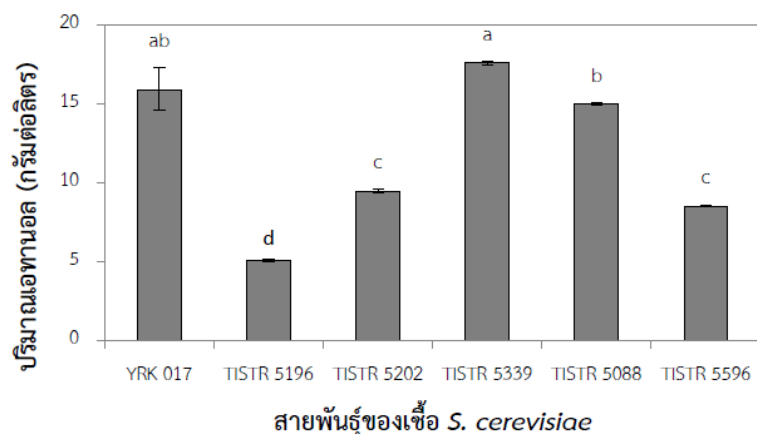
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าปริมาณเอทานอล หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ

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

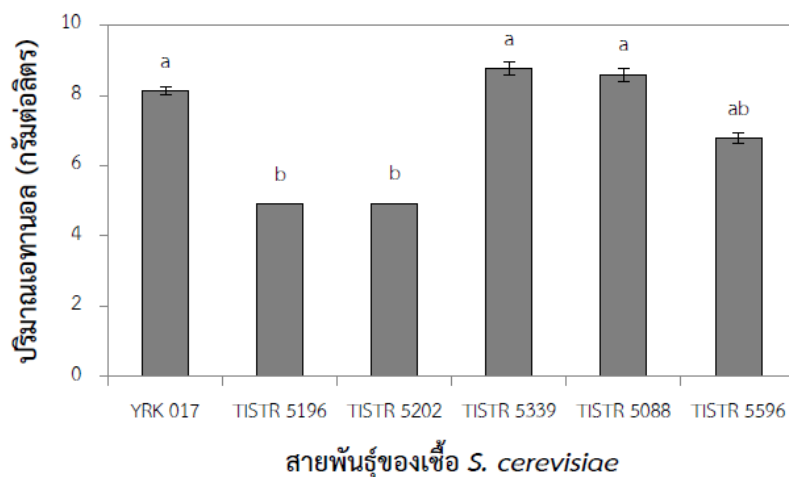
หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวนอน

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

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



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



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

ดังนั้นจากการศึกษาการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิสูงแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่สามารถเจริญและให้ผลผลิตเอทานอล ได้ดีที่สุดในอุณหภูมิสูง 40 และ 42 องศาเซลเซียส คือ *S. cerevisiae* TISTR 5339 รองลงมาคือ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ตามลำดับ

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

มีการศึกษาจำนวนมากโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* ให้สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง ตัวอย่างเช่น D'Amore และคณะ(1989) ใช้สายพันธุ์ทนร้อนของเชื้อที่สามารถหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 6.2 จากกลูโคสร้อยละ 15 แต่อย่างไรก็ตามหลังจาก 24 ชั่วโมงการมีชีวิตของสายพันธุ์นี้ลดลงอย่างเห็นได้ชัดถึงร้อยละ 57

4.2 ผลการศึกษาการทนทานต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 6 สายพันธุ์

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

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

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

จากการศึกษาการทนต่ออุณหภูมิสูง และทนเอทานอลความเข้มข้นสูงของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆพบว่า *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่ออุณหภูมิในการหมักได้สูง คือสามารถเจริญได้ที่ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า และ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์นี้ยังสามารถทนต่อเอทานอล ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 15 ได้อีกด้วย ดังนั้นจึงทำการคัดเลือก *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์นี้ไป ทำการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศต่อไป

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

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

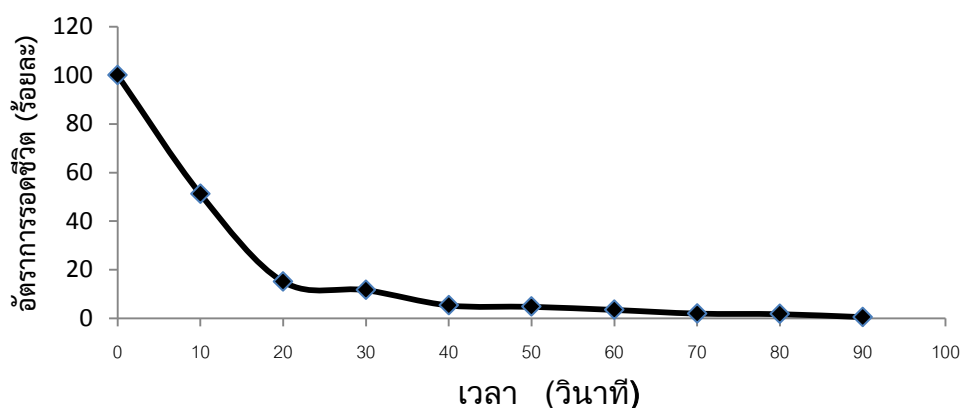
4.3 ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 โดยใช้รังสียูวีและการใช้สารเคมี

4.3.1 ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีสต์ *S. cerevisiae* YRK 017 โดยใช้รังสียูวี

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

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

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



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

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

Mehdikhani และคณะ (2011) ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ ได้แก่ PTCC⁵²⁶⁹, TTCC¹³²³ และสายพันธุ์ที่แยกได้จากการหมักไวน์ในประเทศอาร์เมเนีย โดยใช้รังสีแกมมาในปริมาณที่แตกต่างกัน พบว่าเมื่อปริมาณของรังสีแกมมาเพิ่มมากขึ้น จะส่งผลให้เชื้อลดจำนวนลง โดยที่ปริมาณรังสีแกมมา 10 KGy ไม่พบการเจริญใดๆของเชื้อ ซึ่งอัตราการรอดชีวิตที่ต้องการคือ ต่ำกว่าร้อยละ 10 สายพันธุ์ PTCC⁵²⁹⁶ และ Areni ที่ไม่ได้รับการฉายรังสีสามารถผลิตเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ได้เพียงร้อยละ 11.54 โดยปริมาตร และ 10.55 โดยปริมาตร ซึ่งการใช้รังสีแกมมาทำให้พบสายพันธุ์กลาย 2 สายพันธุ์ คือ PTCC⁵²⁹⁶ M₃ และ Areni M₇ ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลสูงสุดได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าสายพันธุ์ควบคุม โดยผลิตเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ได้ร้อยละ 23.50 โดยปริมาตร และ 22.60 โดยปริมาตร ตามลำดับ

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

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

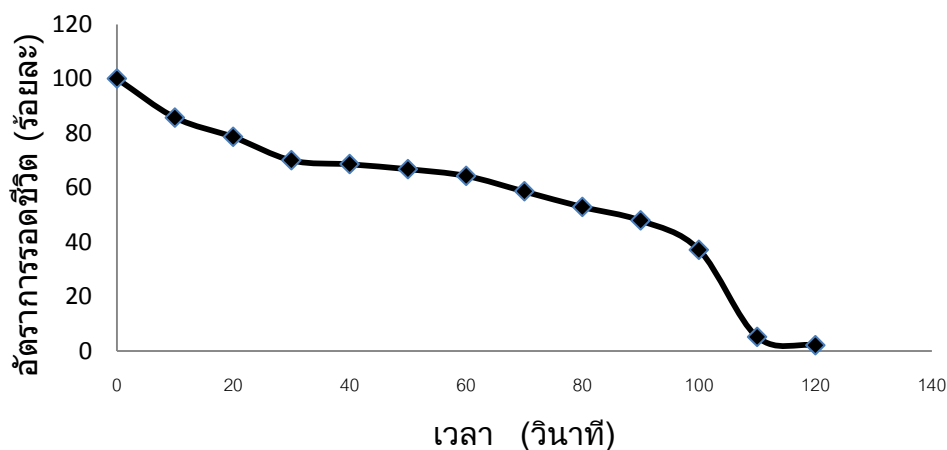
รังสีแกมมาที่ 5 KGy อยู่ที่ร้อยละ 2.67 ในขณะที่เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของรังสี จำนวนสูงสุดของสายพันธุ์กลายซึ่งถูกชักนำโดยรังสีแกมมาที่ความเข้มข้น 4 KGy ทำให้ได้เปอร์เซ็นต์การกลายพันธุ์สูงสุด (ร้อยละ 14.29)

4.3.2 ผลการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* YRK 017 โดยใช้ EMS

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

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

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



รูปที่ 4.6 อัตราการรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* ภายหลังการเติม EMS ที่ระยะเวลาต่างๆ

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

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

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

4.4 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

4.4.1 ผลการศึกษาการเจริญของสายพันธุ์กลายที่เกิดจากการชักนำโดยรังสียูวี และ EMS บนจานอาหาร YPD agar ที่อุณหภูมิต่างๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสียูวี สายพันธุ์กลายของ *S. cerevisiae* YRK 017 มีความสามารถในการเจริญลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ให้ผลการทดลองทำนองเดียวกับสายพันธุ์ดั้งเดิม โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อทุกไอโซเลตมีความสามารถในการเจริญใกล้เคียงกับการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (+++) ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทุกไอโซเลตมีความสามารถในการเจริญปานกลาง (++) และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทุกไอโซเลตมีความสามารถในการเจริญน้อย (+) ขณะที่การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดย EMS สายพันธุ์กลายของ *S. cerevisiae* YRK 017 มีความสามารถในการเจริญลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเช่นเดียวกัน โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บางไอโซเลตเริ่มมีการเจริญปานกลาง (++) เมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ทุกไอโซเลตมีความสามารถในการเจริญปานกลาง (++) และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บางไอโซเลตไม่มีการเจริญ (-) ซึ่งการทดลองจะเห็นได้ว่าการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยสาร EMS ทำให้ *S. cerevisiae* YRK 017 มีการเจริญลดลงซึ่งเห็นได้ชัดกว่าการชักนำโดยรังสียูวี

ตารางที่ 4.8 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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

ตารางที่ 4.8 (ต่อ) ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วยรังสียูวีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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

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

ตารางที่ 4.9 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการกลายพันธุ์ด้วย EMS บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD หลังการบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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

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

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

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

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

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

Sridhar และคณะ (2002) ศึกษาผลของรังสียูวีต่อสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* และการทนต่ออุณหภูมิสูง ทนเอทานอลและทนต่อแรงดันออสโมซิส จากการศึกษาพบว่าการใช้รังสียูวีในการกลายพันธุ์ *S. cerevisiae* ทำให้ยีสต์สายพันธุ์กลายผลิิตมวลเซลล์จุลินทรีย์และเอทานอลสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมที่อุณหภูมิสูงและความเข้มข้นกลูโคสสูง โดยมีมวลเซลล์จุลินทรีย์ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์กลาย VS₁ และ VS₃ คือ 0.25 และ 0.20 กรัมต่อลิตร มีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ซึ่งหมักโดยใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 2 ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงสายพันธุ์กลาย VS₁ และ VS₃ สามารถผลิตมวลเซลล์จุลินทรีย์ได้ 0.1 และ 0.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากสายพันธุ์กลาย VS₁ และ VS₃ ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ใช้ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร คือ 8.20 และ 1.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม ปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นสามารถผลิตได้จากยีสต์สายพันธุ์กลาย VS₁ และ VS₃ เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคสสูง หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะให้ปริมาณเอทานอล 5.0 และ 6.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิมและเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเอทานอล 13.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการกลายพันธุ์จุลินทรีย์โดยใช้รังสียูวีสามารถนำมาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ให้มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง ทนเอทานอล และทนแรงดันออสโมซิสหรือความเข้มข้นน้ำตาลสูง

4.4.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการหมักในอาหารหมัก Yeast fermentation medium (YFM) ของสายพันธุ์กลายที่คัดเลือก

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

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

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

หมายเหตุ : ทดสอบเทียบกับชุดควบคุม (*S. cerevisiae* YRK 017) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

+++ = สร้างก๊าซสามหลอด, ++ = สร้างก๊าซสองหลอด, + = สร้างก๊าซหนึ่งหลอด,
- = ไม่สร้างก๊าซ

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

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

หมายเหตุ : ทดสอบเทียบกับชุดควบคุม (*S. cerevisiae* YRK 017) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

+++ = สร้างก๊าซสามหลอด, ++ = สร้างก๊าซสองหลอด, + = สร้างก๊าซหนึ่งหลอด,
- = ไม่สร้างก๊าซ

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

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

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

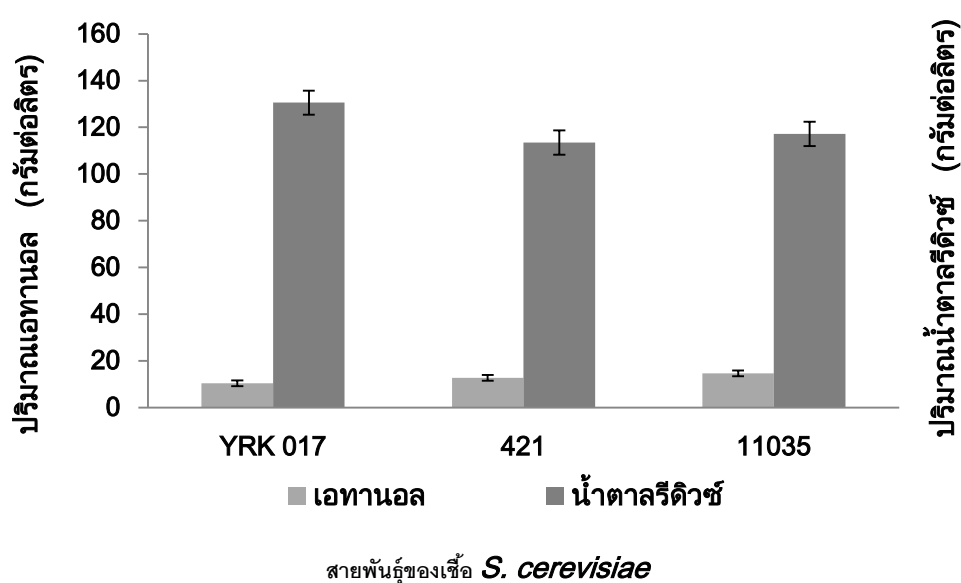
หลังจากทดสอบการหมักเอทานอลด้วยอาหารหมัก (YFM) โดยมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 10 มิลลิลิตร ที่มีหลอดดักก๊าซ ตัวอย่างละ 3 ข้างนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะนิ่ง ในที่มีด จากนั้นเลือกตัวอย่างที่ให้ปริมาณฟองก๊าซมากกว่า (+++) หรือเท่ากับสายพันธุ์ควบคุม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

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

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

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

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



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

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

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

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

4.5 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากผงแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับการกระบวนการหมัก (SSF)

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

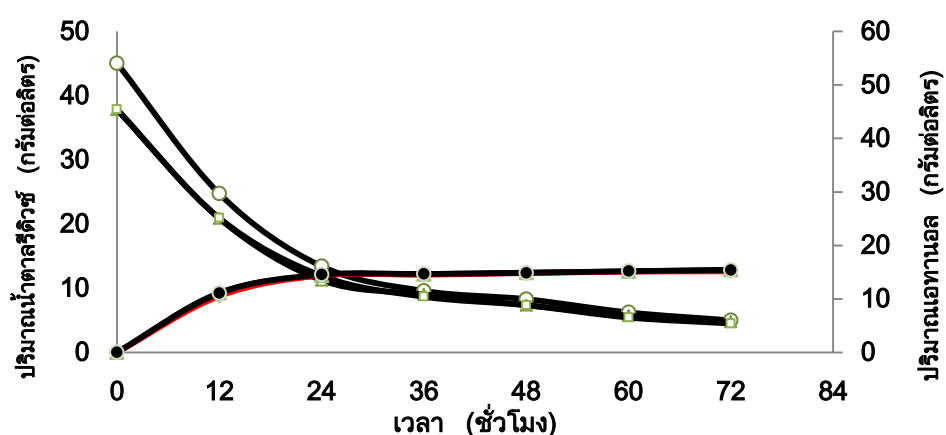
พบว่า การหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae* YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 สามารถเอทานอลในชั่วโมงที่ 72 ได้ 15.46 15.15 และ 15.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สายพันธุ์ดั้งเดิม สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการหมัก 72 ชั่วโมง 4.99 5.71 และ 5.39 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าทั้งสามสายพันธุ์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งจะเห็นได้ว่าสายพันธุ์กลายผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม แสดงดังตารางที่ 4.14 และรูปที่ 4.8 และ 4.9

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

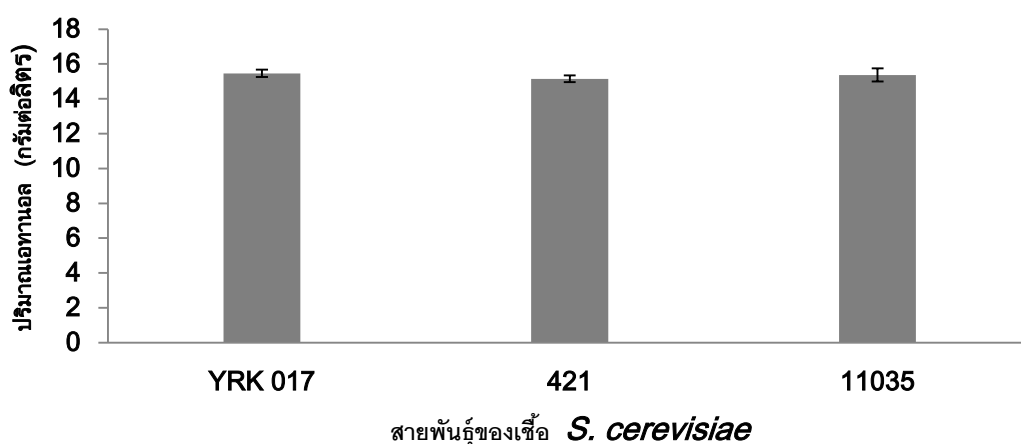
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	YRK 017	421	11035	YRK 017	421	11035
0	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00	45.80 ^a ± 0.36	45.37 ^a ± 0.55	45.47 ^a ± 0.80
12	11.12 ^a ± 0.09	10.52 ^a ± 0.64	11.06 ^a ± 0.35	24.74 ^a ± 0.59	25.04 ^a ± 0.21	25.14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

หมายเหตุ เมื่อพิจารณาในแนวโน้มของแต่ละปัจจัย

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



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



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

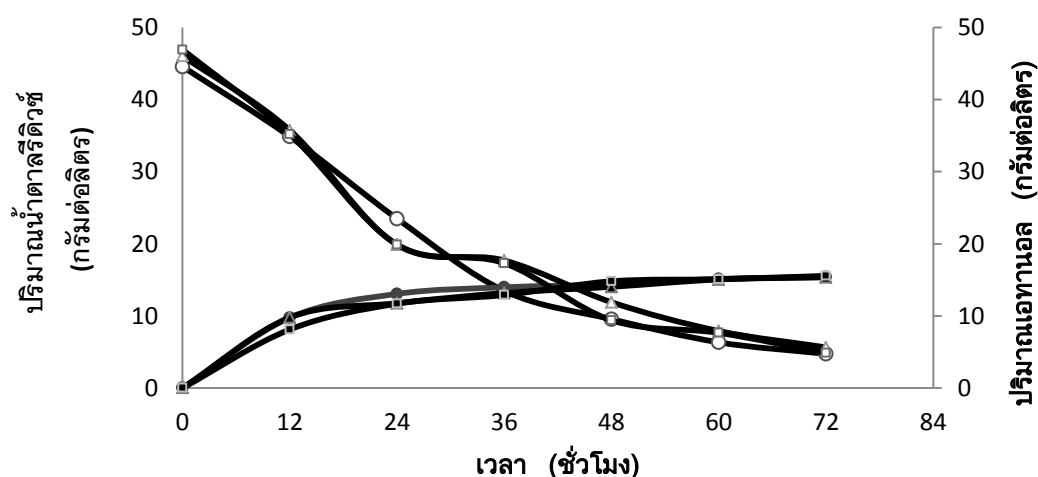
การหมักเอทานอลจากไขมันเทศ ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 หมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่า สายพันธุ์ดั้งเดิม YRK 017 สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 สามารถผลิตเอทานอล ได้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

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

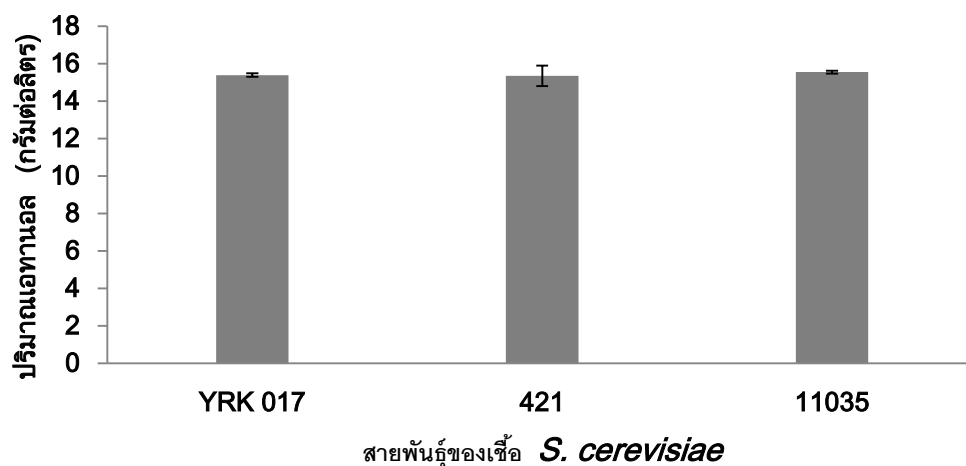
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	YRK 017	421	11035	YRK 017	421	11035
0	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00	0.00 ^a ± 0.00	44.57 ^a ± 2.00	46.06 ^a ± 1.65	46.91 ^a ± 2.25
12	9.75 ^a ± 0.07	9.78 ^a ± 0.10	8.11 ^a ± 2.84	34.86 ^a ± 1.05	35.74 ^a ± 0.24	35.19 ^a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

หมายเหตุ เมื่อพิจารณาในแถวแนวนอนของแต่ละปัจจัย

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



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



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

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

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

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

คมสัน (2534) ศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีอัลตราไวโอเลตในยีสต์ *Pa. tannophilus* NRRL Y-2460 พบว่ารังสีอัลตราไวโอเลตมีผลต่ออัตราการใช้อเอทานอลในยีสต์ กล่าวคือ จากที่ยีสต์สายพันธุ์ดั้งเดิมที่เคยใช้อเอทานอลได้กลายเป็นใช้ไม่ได้ แต่อย่างไรก็ตามเชื้อสายพันธุ์กลายที่ได้ยังคงมีอัตราการเจริญใกล้เคียงกับสายพันธุ์ดั้งเดิม บนอาหาร $\text{NO}_3\text{-Xylitol agar}$ ซึ่งอาจเกิดจากจำนวนเชื้อสายพันธุ์กลายที่นำมาทดสอบมีน้อย ดังนั้นโอกาสที่จะพบลักษณะการกลายพันธุ์ที่เจริญได้เร็วบนอาหารเลี้ยงเชื้อจึงน้อย และเมื่อนำเชื้อกลายพันธุ์ T-L-25 มาหมักในอาหาร X-YMP broth ที่อุณหภูมิ ต่างๆพบว่าเชื้อสายพันธุ์กลาย สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเป็น 6.8 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 25 28 32 35 และ 37 องศาเซลเซียส ผลิตเอทานอลได้ 6.25 6.43 5.88 5.40 และ 5.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

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

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

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

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

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

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

เอกสารอ้างอิง

- กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน. 2549. การนำของเสียจากการผลิตเอทานอลมาใช้ประโยชน์เพื่อเพิ่มมูลค่า. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เกวลิน ศรีบรรพต ชัชฎา วุฒิโชคดำรงค์ และสาโรจน์ สระกลาง. 2554. การผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักโดยใช้เซลล์ตรึงรูปของ *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- คมสัน พิระภัทรสุริยา. 2534. การคัดเลือกและกลายพันธุ์ยีสต์เพื่อการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ประสิทธิ์ ใจศีล. 2549. รายงานความก้าวหน้าเรื่องการผลิตข้าวฟ่างหวานเพื่ออุตสาหกรรมผลิตเอทานอลในเชิงพาณิชย์. ศูนย์วิจัยปรับปรุงพันธุ์พืชเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- บุญวิทย์ วัฒนวิทย์. 2540. ผลของสารเคมีเอทิลมีเทนซัลโฟเนตต่อการเกิดแคลลัสและต้นจากการเพาะเลี้ยงเมล็ดและอับละอองเรณูของข้าวขาวดอกมะลิ 105. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- พรเทพ ถนนแก้ว. 2555. การประยุกต์ใช้ยีสต์ทนร้อน *Saccharomyces cerevisiae* DBKKUY-53 ในการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลจากข้าวฟ่างหวาน. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเทคโนโลยีมหาวิทยาลัยขอนแก่น
- พนิดา สุริยะพันธ์. 2554. การคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล. หลักสูตรเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- มินตรา พรหมเล็ก วรชดา มะลิซ้อน และ สุชามา อิสมาแอล. 2554. การคัดเลือกสายพันธุ์กลายจากเชื้อยีสต์ที่ผ่านการชักนำโดยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต (Ethyl methanesulfonate) เพื่อเพิ่มการผลิตไบโอดีเซลจากน้ำมันเหลือใช้จากครัวเรือน. หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- วิมลลักษณ์ รัตนปรีดากุล. 2549. การศึกษาเชื้อราและเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าเปรียบเทียบกับยีสต์บริสุทธิ์ในการผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- วชิราภรณ์ ผิวล่อง. 2552. การเพิ่มความสามารถในการผลิตแคโรทีนอยด์ของ *Xanthophyllomyces dendrorhous* โดยนิวตรอนร่วมกับอัลตราไวโอเลต.การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีนิวเคลียร์ ครั้งที่ 11. กลุ่มวิจัยและพัฒนานิวเคลียร์ สถาบันเทคโนโลยีนิวเคลียร์แห่งชาติ (องค์การมหาชน).

- ศกุนตลา ภูเจริญ. 2551. ประสิทธิภาพพลังงานในการผลิตเอทานอลโดยใช้มันสำปะหลังและกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการจัดการพลังงาน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- สาวตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.
- สิรินุช ลามศรีจันทร์. 2536. การกลายพันธุ์ของพีช. หจก. ฟันนี้พับลิชชิง, กรุงเทพมหานคร. 190 น.
- สุพจน์ น้อยสกุล. 2554. การปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย *Corynebacterium glutamicum* สายพันธุ์ DS50 ด้วยแสงยูวีเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตกรดกลูตามิก. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุภารัตน์ เรืองมณีไพฑูรย์ สมจิตร นิยมไทย มั่นทนา ร่วมรักษ และสมยศ จรรยาวิลาส. 2526. การใช้มันเทศทำผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปและกึ่งสำเร็จรูป. สถาบันค้นคว้าและวิจัยผลิตภัณฑ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- สุรีย์ นานาสมบัติ. 2553. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแปรรูปอาหาร. สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุวภัทร เจียมทวีทรัพย์ สุกพัฒน์ ผลิตภัณฑ์ และโสมวิสา ทองปลอด. 2555. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิและเอทานอลสูง เพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ. หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- หทัยรัตน์ ธาตุไชย พรเทพ ถนอมแก้ว และสุดารัตน์ ถนอมแก้ว. 2553. การปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลด้วยสารเอทิลมีเทนซัลโฟเนต. วารสารศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ปีที่ 18, ฉบับที่ 1, หน้า 37-41
- Abosereh, N.A., Soliman, E.A.M., and Abd El-Khalek, B.A. 2006. Mutation Induction for genetic improvement of *Saccharomyces boulardii* which used as probiotic yeast. Res. J. Agr.Biol. Sci., Vol. 2 No. 6, pp. 478-482.
- Borstel, R.C. 1990. Mutagenesis principles and strategies applied to yeast. pp. 353 – 365. In. Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (eds). Yeast Technology. Springer-verlag, Berlin.
- Brock, T.D. 1984. Biotechnology. A Textbook of Industial Microbiology. Science Tech, Madison.
- Brown, S.W. and Oliver, S.G. 1981. The effect of temperature on the ethanol tolerance of the yeast *Saccharomyces uvarum*. Biological Laboratory, University of Kent at Canterbury, Kent CT2 7Nj, U.K.
- Cantarella, M., Cantarella, L., Gallifuoco, A., Spera, A. and Alfani, F. 2004. Effect of Inhibitors released during steam-explosion treatment of poplar wood on subsequent enzymatic hydrolysis and SSF. Biotechnol. Prog. 20, pp. 200–206.

- Choowong, A., Suthee, B., Preeyaporn, K., Minetaka, S., Pornpon, S., Yoshinobu, K., Thipa, A., Satoshi, H. and Chuenchit, B. 2012. Characterization and gene expression profiles of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* isolates from Thai fruits. JBB. Vol. 114 No. 2, pp.144-149
- Dehkordi, M.M., Nahvi, I., Esfahani, H.Z., Ghaedi, K., Tavassoli, M. and Akada, R. 2008. Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate – induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. JBB. Vol. 105 No. 4, pp. 403-408
- Jacobson, G.K. 1981. Mutation. pp. 279-304. In Rehm, H.J. and Reed, G. (eds). Biotechnology. A comprehensive Treatise in 8 Volumes. Vol. 1 Microbial Fundamental. Verlag Chemie Weinheim.
- Jakel, M. 2005. Gas chromatography determination of ethanol in wine by head-space gas chromatography. Department of Agro-Industry. Faculty of Food and Agricultural Technology. Pibulsongkram Rajabhat University.
- Jose, L.A. and Arnold, L.D. 2005. Genetic improvement of processes yielding microbial products. Wiley online Library, FEMS Microbiology Reviews .Vol. 30, No. 2
- Kiran, S.N., Sridha, M., Suresh, K., Banat, I.M., Venkateswar, R.L. 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating, *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Bioresource Technology 72, pp. 43–46.
- Leontina, P. 2008. Characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* stains obtained by UV mutagenesis. Innovative Romanian Food Biotechnology Vol.2, pp. 40-47
- Mehdikhani, P., Bari, M.R. and Hovsepyan, H. 2011. Screening of *Saccharomyces cerevisiae* for high tolerance of ethanol concentration and temperature. AJMR, Vol. 5 No. 18, pp. 2654-2660
- Miller, GL. 1960. Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal. Chem. 31, pp. 426–428
- Panchal, C.J. and Tavares, F.C.A. 1990. Yeast strain selection for fuel ethanol production. In Panchal, C.J. (ed.), Yeast strain selection, pp. 225-243. New York Marcel Dekker Inc.
- Petrea, L. 2008. Characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by UV mutagenesis. Innovative Romanian Food Biotechnology, Vol. 2, pp. 40-47.
- Rajni, K., Krishna, P. 2012. Improvement of multiple stress tolerance in yeast stain by sequential mutagenesis for enhanced bioethanol production. JBB, Vol. 114 No. 6, pp. 622-629.

- Soderstrom, J., Galbe, M., Zacch, I.G., 2005. Separate versus simultaneous saccharification and fermentation of two-step steam pretreated softwood for ethanol production. J. Wood Chem. Technol. Vol. 25 No. 3, pp. 187–202.
- Sridhar, M., Kiran, S., Venkateswar. and Rao, N.L. 2001. Effect of UV radiation on thermotolerance ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. Bioresource Technology. 83, pp. 199 - 202.
- Naghmeh, H., David, A.L., and Ahmed, F. 2012. A mutated yeast strain with enhanced ethanol production efficiency and stress tolerance. Ajb., Vol. 2 No. 2, pp.100–115.
- Takashi, W., Itsuki, W., Mami, Y., Akira, A. and Toshihide, N. 2010. A UV-induced mutant of *Pichia stipitis* with increased ethanol production from xylose and selection of a spontaneous mutant with increased ethanol tolerance. National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization (NARO).
- Teerapatr, S., Podjana, C., Suthkamol, S., Wandeem, Y., Ladda, W., Bancha, M. and Montree, W. 2007. Strain improvement of ethanol fermenting yeast using random mutagenesis technique. Biotechnology Department, Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR).
- Thapat, S., Shabbir, H. and Gheewala. 2009. Environmental sustainability assessment of bio-ethanol production in Thailand. Energy 34, pp.1933–1946.
- Tork, S., Hegazy, W.K., El-kawokgy, T.M.A. and El Gebaly, O.G.A. 2009. Induction of thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae* strain(s) using different mutation methods. AJB., Vol.1 No. 1, pp. 29-36.
- Watson, K. 1982. Unsaturated fatty acid not ergosterol is essential for high ethanol production in *Saccharomyces*. Biotechnology Letter 4, pp. 397-402.
- Winston, F. 2008. EMS and UV mutagenesis in yeast. Current Protocols in Molecular Biology, pp. 13.3 B.1-13.3 B.5.
- Swanson, K.M.J., Busta, F.F., Peterson, E.H., Johnson, M.G. 1992. Colony count methods. In : Vanderzant, C., Splittstoesser, D.F. (Eds.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D.C., pp. 75-95.
- [Online]. Available : <http://nstda.or.th/rural/public/100%20articles-stkc/57.pdf>
(สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)
- [Online]. Available : <http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book /book.php?book =5& chap=5&page=t5-5-infodetail01.html> (สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)
- [Online]. Available : <http://th.wikipedia.org/wiki/มันเทศ> (สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)

- [Online]. Available : http://th.wikipedia.org/wiki/Saccharomyces_cerevisiae
(สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)
- [Online]. Available : http://wiki.yeastgenome.org/index.php/File:Yeast_life_cycle.png
(สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)
- [Online]. Available : <http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/introducingmicrobes/fungi> (สืบค้นวันที่ 29 สิงหาคม 2556)
- [Online]. Available : <http://water-pacific.com/index.php/2010-08-14-10-07-37>
(สืบค้นวันที่ 12 กันยายน 2556)
- [Online]. Available : <http://www.thaiethanol.com> (สืบค้นวันที่ 12 กันยายน 2556)
- [Online]. Available : <http://www.thaiethanol.com/th/2013-04-06-13-53-49/production-process-ethanol.html> (สืบค้นวันที่ 12 กันยายน 2556)
- [Online]. Available : http://www.thai-explore.net/documents/vdo_1337_512.docx
(สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2556)
- [Online]. Available : http://en.wikipedia.org/wiki/Eutrombicula_batatas
(สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2556)
- [Online]. Available : <http://www.healthyenrich.com/ลดความอ้วนด้วยมันเทศ>
(สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2556)
- [Online]. Available : <http://www.agriculturesource.com/p-yam-sweet-potato-887988.html> (สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2556)
- [Online]. Available : <http://www.cdipab.com/DNA-analysist/DNA-information.html> (สืบค้นวันที่ 21 กันยายน 2556)
- [Online]. Available : <http://ozone.tmd.go.th/uvbasic.htm> (สืบค้นวันที่ 21 กันยายน 2556)

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YFM Broth

ประกอบด้วย

- กลูโคส	150	กรัม
- เปปโตน	5	กรัม
- ยีสต์สกัด	6	กรัม
- KH_2PO_4	4	กรัม
- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	กรัม
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1	กรัม

วิธีการเตรียม

1. ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
2. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD Broth

ประกอบด้วย

- กลูโคส	20	กรัม
- เปปโตน	20	กรัม
- ยีสต์สกัด	10	กรัม

วิธีการเตรียม

1. ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
2. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD Agar

ประกอบด้วย

- กลูโคส	20	กรัม
----------	----	------

- เปปโตน	20	กรัม
- ยีสต์สกัด	10	กรัม
- วุ้น	15	กรัม

วิธีการเตรียม

1. ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
2. นำไปให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลายจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส
3. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมีและเครื่องมือวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (Dinitrosalicylic Method) สารเคมี

1. สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic (DNS) ร้อยละ 1
2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

วิธีการเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic (DNS) ร้อยละ 1
 - ชั่งสาร 3,5-dinitrosalicylic 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร
 - เติมสารละลายต่างที่ละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร)
 - คนให้สารละลายเข้ากันจนหมด จนกระทั่งได้สารละลายใส
 - เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาเทรทไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

- อบกลูโคสที่ตู้อบ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์
- ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
- เจือจางสารละลายกลูโคสที่ได้โดยใช้น้ำกลั่นตามตาราง

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรกลูโคส (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	-	5
100	0.5	4.5
200	1	4
400	2	3
600	3	2
800	4	1
1000	5	-

วิธีการวิเคราะห์

1. การทำกราฟมาตรฐาน

1.1 นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 100 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเจือจางใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

1.3 ปิเปต DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเจือจาง ผสมให้เข้ากัน

1.4 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วรอให้เย็น

1.5 ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการต้มแล้ว ผสมให้เข้ากัน

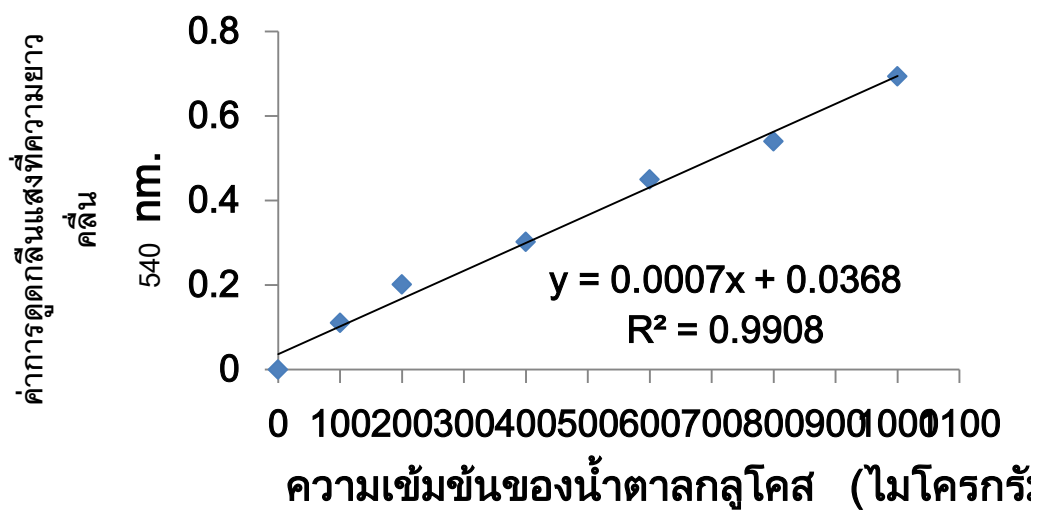
1.6 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พร้อมนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

2. หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

2.1 นำตัวอย่างมาทำการเจือจางให้เหมาะสม

2.2 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร}) \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1000}$$



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสวัดโดยวิธีดีเอ็นเอสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีการใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (สุวัทรและคณะ, 2555)

1. วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานเอทานอล

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานโพรพานอล (N-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เป็นสารละลายมาตรฐาน

1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 4 6 8 10 และ 12 โดยปริมาตร ซึ่งสามารถเตรียมได้ดังนี้

1.2.1 N-propanol ร้อยละ 10 โดยปริมาตร + Ethanol ร้อยละ 8 โดยปริมาตร จะได้เป็นสารละลายมาตรฐานร้อยละ 4

1.2.2 N-propanol ร้อยละ 10 โดยปริมาตร + Ethanol ร้อยละ 12 โดยปริมาตร จะได้เป็นสารละลายมาตรฐานร้อยละ 6

1.2.3 N-propanol ร้อยละ 10 โดยปริมาตร + Ethanol ร้อยละ 16 โดยปริมาตร จะได้เป็นสารละลายมาตรฐานร้อยละ 8

1.2.4 N-propanol ร้อยละ 10 โดยปริมาตร + Ethanol ร้อยละ 20 โดยปริมาตร จะได้เป็นสารละลายมาตรฐานร้อยละ 10

1.2.5 N-propanol ร้อยละ 10 โดยปริมาตร + Ethanol ร้อยละ 24 โดยปริมาตร จะได้เป็นสารละลายมาตรฐานร้อยละ 12

1.3 ใส่สารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นในขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมปิดฝาขวดด้วยเซปตัม (Septum)

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลใช้เทคนิคเฮดสเปซ – แก๊สโครมาโตกราฟี (HS-GC) โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-17A Chromatogram, Shimadzu) ต่อกับเครื่อง HSS - 4A (Shimadzu) ซึ่งเป็นส่วนที่ตัวอย่างจะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที สารตัวอย่างในขวดแก้วจะระเหยกลายเป็นไอจนกระทั่งอยู่ในสมดุลไดนามิก จากนั้นเครื่องจะดูดไอปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเข้าสู่คอลัมน์ต่อไป

1.5 ใช้คอลัมน์ DB-WAX (Agilent J&W GC Column) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 1 ไมครอน อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจจับ (Detector) ชนิด FID โดยปรับอุณหภูมิเท่ากับ 150 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (Injector) เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส ใช้ก๊าซฮีเลียมเป็นก๊าซตัวพา โดยมีความดันคอลัมน์เท่ากับ 30 กิโลพาสกาล

1.6 สภาวะในการวิเคราะห์เริ่มจากอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มในอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที รวมเวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 25 นาทีต่อตัวอย่าง โครมาโตแกรมจะแสดงเวลาที่เอทานอลและโพรพานอลถูกชะออกจากคอลัมน์

1.7 นำพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อโพรพานอลในแต่ละความเข้มข้นซึ่งกำหนดให้เป็นแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอลเป็นแกน x

2. วิธีการวิเคราะห์เอทานอลในตัวอย่าง

2.1 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างโดยผสม NaCl 0.5 กรัม สารละลาย โพรพานอลร้อยละ 10 โดยปริมาตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร

2.2 วิเคราะห์ดังสภาวะข้างต้น จากนั้นนำเอาอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล ในสารตัวอย่างต่อโพรพานอลมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล

สูตรคำนวณปริมาณเอทานอล ได้จากกราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอล

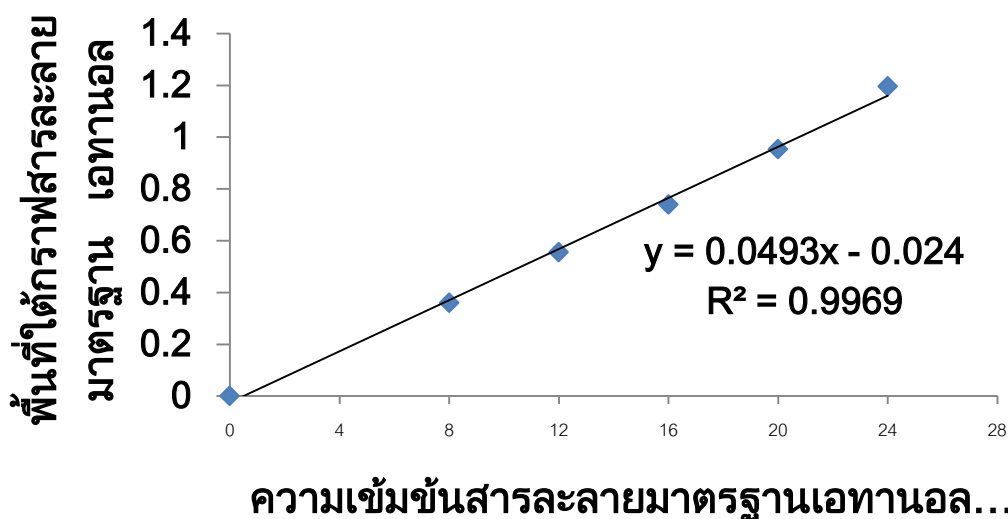
$$\text{สมการ } y = 0.1084x - 0.0665$$

ให้ $y =$ อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟเอทานอลต่อโพรพานอล

$X =$ ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ)

โดย ความหนาแน่นของเอทานอล $= 0.789$ กรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ปริมาณเอทานอล $= (x) (0.789) (10)$ กรัมต่อลิตร



รูปที่ ข-2

กราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอลวัดโดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

3. วิธีการวิเคราะห์เอทานอลในตัวอย่าง

- 3.1 เปิดปั๊ม และคลายเกลียวใต้ปั๊มเพื่อไล่น้ำออกจากปั๊มให้หมด แล้วจึงบิดเกลียวให้แน่นดังเดิม
- 3.2 เปิด Power supply และ Zero air
- 3.3 เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ และทำการตั้งค่าการใช้งาน
- 3.4 เปิดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี เครื่อง CBM และตั้งค่าบนคอมพิวเตอร์อีกครั้ง
 - 3.4.1 คลิกที่ CLASS-GC ซึ่งคอลัมน์ต้องเป็น GC-17A แล้วคลิก Real Time Analysis
 - 3.4.2 คลิก Method File แล้วกด Load หาชื่อไฟล์ JEHSS.MET แล้วจึงกด Load
 - 3.4.3 คลิก Set Up โดยเปลี่ยนอุณหภูมิที่ Colum oven ให้เป็น 120 องศาเซลเซียส คลิก Set เพื่อระเหยสารที่อาจตกค้างในระบบออกให้หมด
 - 3.4.4 คลิก System on คลิก GC Monitor หากอุณหภูมิ Colum oven เป็น 120/120 แล้วจึงเปิดถังก๊าซฮีเลียม ไฮโดรเจน และไนโตรเจน
 - 3.4.5 คลิก Flame Ignition แล้วทำการจุดไฟบนตำแหน่งของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี สังเกตที่หน้าจอจะต่ำกว่าเส้น Base line จะตรง
 - 3.4.6 คลิก GC Monitor อีกครั้งเพื่อเปลี่ยนอุณหภูมิของ Colum oven ให้กลับไปเป็น 60 องศาเซลเซียส ตรวจสอบ Flow เลือกให้เป็น 30 kPa และตัวตรวจวัดต้องเป็นชนิด FID หากอุณหภูมิ Colum oven เป็น 60/60 แสดงว่าเครื่องพร้อมทำงาน
- 3.5 ตั้งชื่อตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์
 - 3.5.1 คลิก Sample Schedule ตั้งชื่อตัวอย่าง โดยชื่อไฟล์จะลงท้ายด้วย .STB แล้ว Save
 - 3.5.2 คลิกที่ Edit parameters กรอกชื่อตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ในช่อง Sample name และ Data file ส่วนในช่อง Method file ให้ระบุเป็น JHESS.MET คลิก Next เพื่อกรอกชื่อตัวอย่างถัดไป เมื่อกรอกข้อมูลครบถ้วนแล้ว คลิก OK
 - 3.5.3 คลิก Sample Schedule เลือก File ที่เราต้องการวิเคราะห์ แล้วกด Load (หากต้องการวิเคราะห์ข้อมูลในเอกสารเดิมเลือกทำข้อ 3.5.3 เพียงข้อเดียว)
- 3.6 วิเคราะห์

4. วิธีปิดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

- 4.1 คลิก Method file เพื่อ Load โปรแกรม Cooldown (COOLKATI.MET)
- 4.2 รอให้อุณหภูมิของระบบลดลงเหลือ 50 องศาเซลเซียส แล้วจึงคลิก System off
- 4.3 ปิดโปรแกรมและ กด Shut down เครื่องคอมพิวเตอร์ จากนั้นปิดเครื่องต่างๆ ย้อนกลับ

ภาคผนวก ค

การนับจำนวนโคโลนีและการคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง

1. การนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่วิเคราะห์โดยเทคนิค Spread plate (Swanson และคณะ, 1992)

1. กรณีที่มีเชื้อเจริญปกติและมีจำนวนโคโลนีในช่วง 25 - 250 โคโลนี การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดบน Nonselective media เช่น PCA ให้นับทุกโคโลนี รวมทั้งโคโลนีขนาดเล็ก (Pinpoint size) ทั้งหมด บันทึกระดับความเจือจางและจำนวนโคโลนีที่นับได้ แต่ถ้าตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งบน Selective media หรือ Differential media ให้นับโคโลนีที่ขึ้นบนจานที่มีจำนวนโคโลนีในช่วง 15 - 150 โคโลนี

2. กรณีที่มีเชื้อเจริญหนาแน่น จำนวนมากกว่า 250 โคโลนี

2.1 ถ้ามีจำนวนมากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ไม่ต้องนับให้บันทึก “TNTC” หมายถึง มากเกินกว่าที่จะนับได้ (Too Numerous To Count)

2.2 ถ้ามีจำนวนโคโลนี 4-10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้นับ 12 ตารางเซนติเมตร (12 ช่องสี่เหลี่ยม) โดยนับติดต่อกัน 6 ช่องในแนวนอนและ 6 ช่องในแนวตั้ง จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีต่อ 1 ตารางเซนติเมตร แล้วคูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ

2.3 ถ้ามีจำนวนโคโลนีมากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร แต่ดูไม่หนาแน่นจนเกินไป สามารถนับได้ ให้นับเพียง 4 ตารางเซนติเมตร คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนี ต่อ 1 ตารางเซนติเมตรแล้วคูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ

3. กรณีที่มีเชื้อขึ้นแต่มีลักษณะแผ่ไปทั่วผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ให้บันทึกว่า “SPR” (Spreader) ลักษณะของโคโลนีที่ไม่แยกนี้แบ่งเป็น 3 ลักษณะ คือ

- 1) ลักษณะโคโลนีที่เรียงติดกันเป็นสายไม่แยกกันอย่างเด่นชัด ซึ่งเป็นลักษณะที่เกิดจากการแตกออก ของกลุ่มแบคทีเรียที่เกาะกัน
- 2) ลักษณะที่เป็นฟิล์มระหว่างวันและกันจาน
- 3) ลักษณะที่เป็นฟิล์มที่ขอบและที่ผิวของวัน

ถ้าหากมีลักษณะของการแผ่ติดกันมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่บนจานอาหารให้บันทึกว่า “SPR” สำหรับลักษณะของโคโลนีที่เรียงติดกันเป็นสาย (ลักษณะที่ 1) ถ้ามีเพียง 1 สาย ให้นับเป็น 1 โคโลนี แต่ถ้าโคโลนีมี 1 สายหรือมากกว่า 1 สายมีกำเนิดมาจากหลายแหล่ง ให้นับแต่ละสายจากแต่ละแหล่งเป็น 1 โคโลนี อย่างนับแต่ละโคโลนีที่ติดกันนั้นเหมือนกับเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ถ้าเกิดการเจริญแผ่ของโคโลนีเพียงจานเดียวจากจำนวน 2 จานของตัวอย่างเดียวกัน ให้นำผลการนับจำนวนโคโลนีเฉพาะของจานที่นับได้มาคำนวณ แต่ถ้าเกิดการเจริญแผ่เพียงส่วนเดียวของผิวหน้าอาหาร เช่น เพียงครึ่งหนึ่งหรือ 1 ใน 4 ของผิวหน้าอาหาร ให้นับเฉพาะส่วนที่นับได้แล้วคูณด้วยตัวเลขสัดส่วนที่เหมาะสมของพื้นที่บนจานเช่น คูณด้วย 2 ถ้านับจำนวนโคโลนีได้เพียงครึ่งจานและคูณด้วย 4 ถ้านับได้เพียง 1 ใน 4 ของผิวหน้าอาหาร

4. ถ้าจานอาหารนั้นปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่น ให้บันทึกว่า “LA” (Laboratory Accident)

2. การคำนวณหาจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร ของอาหาร)

ในการคำนวณหา CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร ให้คูณจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้ หรือจำนวนโคโลนีเฉลี่ย (ถ้าทำซ้ำ 2 จาน) ในส่วนกลับของ Dilution factor

Dilution Factor = ระดับความเจือจางเริ่มต้น x ระดับความเจือจางต่อมา x ปริมาณตัวอย่าง ที่เติมในจาน

CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = ส่วนกลับของ Dilution Factor x จำนวนโคโลนีที่ นับได้

การรายงานผล

ในการรายงานค่า CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร นิยมรายงานโดยเขียนเป็นเลข ทศนิยม 1 ตำแหน่ง โดยเขียนเฉพาะตัวเลข 2 ตัวเลข ส่วนตัวเลขตัวที่ 3 ให้ปัดขึ้นหรือปัดลง ถ้า ตัวเลขตัวที่ 3 เป็น 6 7 8 หรือ 9 ให้ปัดขึ้น และถ้าตัวเลขตัวที่ 3 เป็น 1 2 3 หรือ 4 ให้ปัดลง แต่ถ้า ตัวเลขตัวที่ 3 เป็น เลข 5 ให้ปัดขึ้น ถ้าตัวเลขตัวที่ 2 เป็นเลขคี่ แต่ถ้าตัวเลขตัวที่ 2 เป็นเลขคู่ให้ปัดลง

หมายเหตุ

1. ถ้าไม่พบโคโลนีขึ้นในทุกะดับความเจือจาง รายงานผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดว่า น้อยกว่า 1 เท่าของค่าความเจือจางต่ำสุด เช่น ถ้าระดับความเจือจางต่ำสุดเป็น 1:100 ให้ รายงานว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่า 100 CFU ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัม
2. ถ้าจานที่ทั้งสองระดับความเจือจางมีโคโลนีขึ้นน้อยกว่า 25 โคโลนี ให้บันทึกผลจำนวนที่นับได้ ตามความจริง แต่ให้รายงานว่า น้อยกว่า $25 \times 1/d$ เมื่อ d คือ Dilution factor ของจานเพาะ เชื้อที่ระดับความเจือจางต่ำสุดที่มีโคโลนีขึ้น
3. ถ้าทุกจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากทั้ง 2 ระดับความเจือจาง มีโคโลนีขึ้นมากกว่า 250 โคโลนี แต่ใน พื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร มีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 100 โคโลนี ให้ประมาณจำนวนจุลินทรีย์ ทั้งหมดจากจานที่มีจำนวนโคโลนีขึ้นใกล้เคียง 250 มากที่สุดแล้วคูณด้วยส่วนกลับของ Dilution factor ($1/10^{-3} = 1000$) และเขียน “ESPC” (Estimate Standard Plate Count) หรือ “EAPC” (Estimate Aerobic Plate Count) กำกับไว้ด้วย

ถ้าทุกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีโคโลนีขึ้นมากกว่า 100 โคโลนีในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ให้ ประมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดว่า มีมากกว่า 100 เท่าของส่วนกลับของ Dilution factor ที่ระดับ ความเจือจางสูงสุด ($1/10^{-3} = 1000$) คูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ

ภาคผนวก ง

ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ง-1 การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลรีตีวซ์ ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 หมักในอาหารหมักผงแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ซ้ำที่	สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i>											
		YRK017				421				11035			
		น้ำตาลรีตีวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาลรีตีวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาลรีตีวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย
0	1	46.20	45.80	0	0	46.00	45.37	0	0	44.70	45.47	0	0
	2	45.50		0		45.00		0		46.30		0	
	3	45.70		0		45.10		0		45.40		0	
12	1	24.06	24.74	11.13	11.12	24.96	25.04	10.82	10.52	25.08	25.14	11.31	11.06
	2	25.02		11.20		25.27		9.78		24.00		11.21	
	3	25.13		11.02		24.88		10.96		26.34		10.66	

ตารางที่ ง-1 (ต่อ) การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลรีตีวซ์ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 หมักในอาหารหมักผงแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

สภาวะนิ่ง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ซ้ำที่	สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i>											
		YRK 017				421				11035			
		น้ำตาล รี ดี ว์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาล รี ดี ว์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาล รี ดี ว์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย
24	1	13.89	13.42	14.32	14.36	13.44	13.49	14.38	14.39	14.43	14.31	14.49	14.53
	2	13.08		14.39		13.41		14.53		13.83		14.51	
	3	13.29		14.40		13.62		14.27		14.67		14.59	
36	1	9.63	9.58	14.53	14.62	10.86	10.84	15.01	14.52	10.71	10.40	15.01	14.66
	2	9.54		14.64		10.77		14.95		10.26		13.28	
	3	9.57		14.68		10.89		13.59		10.23		15.69	

ตารางที่ ง-1 (ต่อ) การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลรีดีวส์ ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 หมักในอาหารหมักผงแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ซ้ำที่	สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i>											
		YRK 017				421				11035			
		น้ำตาล รี ดี ว ช์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาล รี ดี ว ช์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาล รี ดี ว ช์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย
48	1	8.25	8.29	14.90	14.91	8.82	8.83	14.78	14.82	8.67	8.81	14.99	14.87
	2	8.23		14.81		8.85		14.89		8.79		14.83	
	3	8.39		15.03		8.82		14.78		8.97		14.79	
60	1	6.03	6.23	15.16	15.14	6.78	6.83	15.11	15.09	6.54	6.51	15.12	15.19
	2	6.14		15.07		6.77		15.12		6.54		15.12	
	3	6.51		15.20		6.95		15.05		6.45		15.32	

ตารางที่ ง-1 (ต่อ) การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลรีดีวช์ ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 หมักในอาหารหมักผงแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง

	ซ้ำที่	สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i>
--	--------	--------------------------------

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)		YRK 017				421				11035			
		น้ำตาล รีตีวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาล รีตีวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาล รีตีวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย
72	1	4.81	5.99	15.69	15.46	5.71	5.71	15.08	15.15	5.32	5.39	15.57	15.37
	2	5.12		15.27		5.60		15.38		5.64		14.95	
	3	5.03		15.42		5.81		14.99		5.20		15.60	

ตารางที่ ง-2 การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลรีตีวซ์ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 หมักในอาหารหมักผงแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง

ระยะเวลาในการหมัก	ซ้ำที่	สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i>											
		YRK 017				421				11035			

(ชั่วโมง)		น้ำตาล รี ดี ว ช์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาล รี ดี ว ช์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาล รี ดี ว ช์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย
0	1	46.76	44.57	0	0	45.23	46.06	0	0	49.01	46.91	0	0
	2	42.83		0		45.00		0		47.19		0	
	3	44.12		0		47.96		0		44.53		0	
12	1	36.06	24.74	9.80	9.75	36.00	35.74	9.68	9.77	34.98	35.42	9.71	9.73
	2	34.14		9.67		35.70		9.77		35.40		9.80	
	3	34.38		9.78		35.52		9.88		35.89		9.69	

ตารางที่ ง-2 (ต่อ) การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 หมักในอาหารหมักผงแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สภาวะนิ่ง

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ซ้ำที่	สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i>											
		YRK 017				421				11035			
		น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย
24	1	23.16	23.48	12.88	13.05	19.56	19.81	11.82	11.76	23.40	23.84	11.87	12.31
	2	23.55		13.05		19.86		11.75		24.39		13.52	
	3	23.73		13.23		20.16		11.71		23.72		11.53	
36	1	13.29	13.46	14.96	14.38	18.03	17.69	13.01	13.17	14.01	14.07	13.62	13.57
	2	13.77		13.34		17.28		13.16		14.16		13.51	
	3	13.32		13.60		17.77		13.35		14.04		13.57	

ตารางที่ ง-2 (ต่อ) การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย

11035 หมักในอาหารหมักผงแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง
สถานะนิ่ง

ระยะเวลาใน การหมัก (ชั่วโมง)	ซ้ำที่	สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i>											
		YRK 017				421				11035			
		น้ำตาล รีติวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาล รีติวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำตาล รีติวซ์ (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (กรัม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย
48	1	9.63	9.54	14.33	14.36	11.88	11.88	14.35	14.34	9.45	9.39	14.38	14.40
	2	9.42		14.40		11.91		14.30		9.33		14.43	
	3	9.58		14.37		11.85		14.37		9.39		14.39	
60	1	6.01	6.33	15.15	15.12	7.90	7.90	15.03	15.05	6.85	6.52	15.49	15.19
	2	5.97		15.23		7.87		15.07		6.69		15.61	
	3	7.02		15.00		7.93		15.05		6.02		14.17	

ตารางที่ ง-2 (ต่อ) การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลรีติวซ์ ของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035 หมักในอาหารหมักผงแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

สภาวะนิ่ง

ระยะเวลาใน ก า ร ห มั ก (ชั่วโมง)	ซ้ำที่	สายพันธุ์ <i>S. cerevisiae</i>											
		YRK 017				421				11035			
		น้ำ ตาล รี ตี ว ช์ (ก ร ั ม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (ก ร ั ม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำ ตาล รี ตี ว ช์ (ก ร ั ม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (ก ร ั ม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	น้ำ ตาล รี ตี ว ช์ (ก ร ั ม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย	ปริมาณ เอทานอล (ก ร ั ม / ลิตร)	ค่าเฉลี่ย
72	1	4.62	4.73	15.47	15.35	5.77	5.63	14.79	15.35	15.47	5.39	15.47	15.55
	2	4.81		15.41		5.44		15.89		15.63		15.63	
	3	4.85		15.30		5.67		15.38		15.55		15.55	

ภาคผนวก จ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 0 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

					95% Confidence Interval for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
1	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
2	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
3	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Total	9	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	.	.
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.000	8			

2. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 12 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

					95% Confidence Interval for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
1	3	11.1167	.09074	.05239	10.8913	11.3421	11.02	11.20

2	3	10.5200	.64467	.37220	8.9185	12.1215	9.78	10.96
3	3	11.0600	.35000	.20207	10.1906	11.9294	10.66	11.31
Total	9	10.8989	.46684	.15561	10.5400	11.2577	9.78	11.31

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.651	2	.325	1.787	.246
Within Groups	1.093	6	.182		
Total	1.743	8			

ETH

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2	3	10.5200
3	3	11.0600
1	3	11.1167
Sig.		.149

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

3. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	14.3700	.04359	.02517	14.2617	14.4783	14.32	14.40
2	3	14.3933	.13051	.07535	14.0691	14.7175	14.27	14.53

3	3	14.5300	.05292	.03055	14.3986	14.6614	14.49	14.59
Total	9	14.4311	.10505	.03502	14.3504	14.5119	14.27	14.59

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.045	2	.022	3.094	.119
Within Groups	.043	6	.007		
Total	.088	8			

ETH

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
1	3	14.3700
2	3	14.3933
3	3	14.5300
Sig.		.068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

4. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	14.6167	.07767	.04485	14.4237	14.8096	14.53	14.68
2	3	14.5167	.80308	.46366	12.5217	16.5116	13.59	15.01

3	3	14.6600	1.24254	.71738	11.5734	17.7466	13.28	15.69
Total	9	14.5978	.74348	.24783	14.0263	15.1693	13.28	15.69

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.032	2	.016	.022	.978
Within Groups	4.390	6	.732		
Total	4.422	8			

ETH

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2	3	14.5167
1	3	14.6167
3	3	14.6600
Sig.		.849

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

5. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	14.9133	.11060	.06386	14.6386	15.1881	14.81	15.03

2	3	14.8167	.06351	.03667	14.6589	14.9744	14.78	14.89
3	3	14.8700	.10583	.06110	14.6071	15.1329	14.79	14.99
Total	9	14.8667	.09287	.03096	14.7953	14.9381	14.78	15.03

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.014	2	.007	.768	.505
Within Groups	.055	6	.009		
Total	.069	8			

ETH

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2	3	14.8167
3	3	14.8700
1	3	14.9133
Sig.		.276

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

6. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 60 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

		Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	15.1433	.06658	.03844	14.9779	15.3087	15.07	15.20
2	3	15.0933	.03786	.02186	14.9993	15.1874	15.05	15.12

3	3	15.1867	.11547	.06667	14.8998	15.4735	15.12	15.32
Total	9	15.1411	.08023	.02674	15.0794	15.2028	15.05	15.32

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.013	2	.007	1.023	.415
Within Groups	.038	6	.006		
Total	.051	8			

ETH

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2	3	15.0933
1	3	15.1433
3	3	15.1867
Sig.		.216

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

7. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

					95% Confidence Interval for Mean			
	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	Lower Bound	Upper Bound	Minimum	Maximum
1	3	15.4600	.21284	.12288	14.9313	15.9887	15.27	15.69
2	3	15.1500	.20421	.11790	14.6427	15.6573	14.99	15.38
3	3	15.3733	.36692	.21184	14.4618	16.2848	14.95	15.60
Total	9	15.3278	.27312	.09104	15.1178	15.5377	14.95	15.69

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.153	2	.077	1.039	.410
Within Groups	.443	6	.074		
Total	.597	8			

ETH

Duncan

		Subset for alpha = 0.05
No	N	1
2	3	15.1500
3	3	15.3733
1	3	15.4600
Sig.		.225

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

8. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเพศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 0 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

					95% Confidence Interval for Mean			
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	45.8000	.36056	.20817	44.9043	46.6957	45.50	46.20
2	3	45.3667	.55076	.31798	43.9985	46.7348	45.00	46.00
3	3	45.4667	.80208	.46308	43.4742	47.4591	44.70	46.30
Total	9	45.5444	.55478	.18493	45.1180	45.9709	44.70	46.30

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.309	2	.154	.430	.669
Within Groups	2.153	6	.359		
Total	2.462	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
2	3	45.3667
3	3	45.4667
1	3	45.8000
Sig.		.424

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

9. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 12 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
1		3	24.7367	.58859	.33982	23.2745	26.1988	24.06	25.13
2		3	25.0367	.20599	.11893	24.5250	25.5484	24.88	25.27
3		3	25.1400	1.17115	.67617	22.2307	28.0493	24.00	26.34
Total		9	24.9711	.68778	.22926	24.4424	25.4998	24.00	26.34

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.263	2	.132	.224	.805
Within Groups	3.521	6	.587		
Total	3.784	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	3	24.7367
2	3	25.0367
3	3	25.1400
Sig.		.555

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

10. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเพศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
1		3	13.4200	.42036	.24269	12.3758	14.4642	13.08	13.89
2		3	13.4900	.11358	.06557	13.2079	13.7721	13.41	13.62
3		3	14.3100	.43267	.24980	13.2352	15.3848	13.83	14.67
Total		9	13.7400	.52714	.17571	13.3348	14.1452	13.08	14.67

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.469	2	.735	5.850	.039
Within Groups	.754	6	.126		
Total	2.223	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	13.4200	
2	3	13.4900	
3	3		14.3100
Sig.		.817	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

11. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	9.5800	.04583	.02646	9.4662	9.6938	9.54	9.63
2	3	10.8400	.06245	.03606	10.6849	10.9951	10.77	10.89
3	3	10.4000	.26889	.15524	9.7320	11.0680	10.23	10.71
Total	9	10.2733	.57120	.19040	9.8343	10.7124	9.54	10.89

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.454	2	1.227	47.004	.000
Within Groups	.157	6	.026		
Total	2.610	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
1	3	9.5800		
3	3		10.4000	
2	3			10.8400
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

12. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเพศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	8.2900	.08718	.05033	8.0734	8.5066	8.23	8.39
2	3	8.8300	.01732	.01000	8.7870	8.8730	8.82	8.85
3	3	8.8100	.15100	.08718	8.4349	9.1851	8.67	8.97
Total	9	8.6433	.27924	.09308	8.4287	8.8580	8.23	8.97

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.562	2	.281	27.479	.001
Within Groups	.061	6	.010		
Total	.624	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	8.2900	
3	3		8.8100
2	3		8.8300
Sig.		1.000	.817

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

13. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 60 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
1		3	6.2267	.25146	.14518	5.6020	6.8513	6.03	6.51
2		3	6.8333	.10116	.05840	6.5820	7.0846	6.77	6.95
3		3	6.5100	.05196	.03000	6.3809	6.6391	6.45	6.54
Total		9	6.5233	.29690	.09897	6.2951	6.7516	6.03	6.95

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.553	2	.276	10.888	.010
Within Groups	.152	6	.025		
Total	.705	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	6.2267	
3	3	6.5100	
2	3		6.8333
Sig.		.072	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

14. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเพศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

		N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
						Lower Bound	Upper Bound		
1		3	4.9867	.15948	.09207	4.5905	5.3828	4.81	5.12
2		3	5.7067	.10504	.06064	5.4457	5.9676	5.60	5.81
3		3	5.3867	.22745	.13132	4.8217	5.9517	5.20	5.64
Total		9	5.3600	.34590	.11530	5.0941	5.6259	4.81	5.81

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.781	2	.390	13.279	.006
Within Groups	.176	6	.029		
Total	.957	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	4.9867	
3	3		5.3867
2	3		5.7067
Sig.		1.000	.062

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

15. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 0 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
2	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
3	3	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00
Total	9	.0000	.00000	.00000	.0000	.0000	.00	.00

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	.	.
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.000	8			

16. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 12 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	9.7500	.07000	.04041	9.5761	9.9239	9.67	9.80
2	3	9.7767	.10017	.05783	9.5278	10.0255	9.68	9.88
3	3	8.1133	2.84381	1.64187	1.0489	15.1777	4.83	9.80
Total	9	9.2133	1.64508	.54836	7.9488	10.4779	4.83	9.88

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.446	2	2.723	1.008	.419
Within Groups	16.204	6	2.701		
Total	21.650	8			

ETH

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
3	3	8.1133
1	3	9.7500
2	3	9.7767
Sig.		.276

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

17. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	13.0533	.17502	.10105	12.6186	13.4881	12.88	13.23
2	3	11.7600	.05568	.03215	11.6217	11.8983	11.71	11.82
3	3	11.6933	1.92110	1.10915	6.9211	16.4656	9.69	13.52
Total	9	12.1689	1.17130	.39043	11.2686	13.0692	9.69	13.52

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.527	2	1.763	1.420	.313
Within Groups	7.449	6	1.241		
Total	10.975	8			

ETH

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
3	3	11.6933
2	3	11.7600
1	3	13.0533
Sig.		.198

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

18. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	13.9667	.87002	.50231	11.8054	16.1279	13.34	14.96
2	3	13.1733	.17039	.09838	12.7501	13.5966	13.01	13.35
3	3	12.8867	1.17619	.67908	9.9648	15.8085	11.53	13.62
Total	9	13.3422	.88153	.29384	12.6646	14.0198	11.53	14.96

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.878	2	.939	1.298	.340
Within Groups	4.339	6	.723		
Total	6.217	8			

ETH

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
3	3	12.8867
2	3	13.1733
1	3	13.9667
Sig.		.183

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

19. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	14.3667	.03512	.02028	14.2794	14.4539	14.33	14.40
2	3	14.3400	.03606	.02082	14.2504	14.4296	14.30	14.37
3	3	14.4000	.02646	.01528	14.3343	14.4657	14.38	14.43
Total	9	14.3989	.03855	.01285	14.3393	14.3985	14.30	14.43

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	2	.003	2.515	.161
Within Groups	.006	6	.001		
Total	.012	8			

ETH

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2	3	14.3400
1	3	14.3667
3	3	14.4000
Sig.		.074

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

20. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 60 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	15.1267	.11676	.06741	14.8366	15.4167	15.00	15.23
2	3	15.0500	.02000	.01155	15.0003	15.0997	15.03	15.07
3	3	15.2967	.44287	.25569	14.1965	16.3968	14.79	15.61
Total	9	15.1578	.25396	.08465	14.9626	15.3530	14.79	15.61

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.096	2	.048	.682	.541
Within Groups	.420	6	.070		
Total	.516	8			

ETH

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2	3	15.0500
1	3	15.1267
3	3	15.2967
Sig.		.312

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

21. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

ETH

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	15.3933	.08622	.04978	15.1792	15.6075	15.30	15.47
2	3	15.3533	.55048	.31782	13.9859	16.7208	14.79	15.89
3	3	15.5500	.08000	.04619	15.3513	15.7487	15.47	15.63
Total	9	15.4322	.29550	.09850	15.2051	15.6594	14.79	15.89

ANOVA

ETH

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.065	2	.032	.307	.747
Within Groups	.634	6	.106		
Total	.699	8			

ETH

Duncan^a

Stain	N	Subset for alpha = 0.05
421.00	3	15.3533
17.00	3	15.3933
11035.00	3	15.5500
Sig.		.500

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

22. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 0 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	44.5700	2.00327	1.15659	39.5936	49.5464	42.83	46.76
2	3	46.0633	1.64658	.95065	41.9730	50.1537	45.00	47.96
3	3	46.9100	2.25309	1.30082	41.3130	52.5070	44.53	49.01
Total	9	45.8478	2.00075	.66692	44.3099	47.3857	42.83	49.01

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.422	2	4.211	1.071	.400
Within Groups	23.601	6	3.934		
Total	32.024	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	3	44.5700
2	3	46.0633
3	3	46.9100
Sig.		.212

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

23. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 12 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	34.8600	1.04614	.60399	32.2613	37.4587	34.14	36.06
2	3	35.7400	.24249	.14000	35.1376	36.3424	35.52	36.00
3	3	35.1900	.29698	.21000	32.5217	37.8583	34.98	35.40
Total	9	35.2725	.71458	.25264	34.6751	35.8699	34.14	36.06

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.180	2	.590	1.232	.367
Within Groups	2.395	5	.479		
Total	3.574	7			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	3	34.8600
3	2	35.1900
2	3	35.7400
Sig.		.219

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

24. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 24 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	23.4800	.29138	.16823	22.7562	24.2038	23.16	23.73
2	3	19.8600	.30000	.17321	19.1148	20.6052	19.56	20.16
3	3	19.8933	.694298	.400853	10.6460	45.1407	23.40	35.89
Total	9	21.0767	4.92286	1.64095	19.9604	27.5285	19.56	35.89

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	97.116	2	48.558	3.011	.124
Within Groups	96.760	6	16.127		
Total	193.876	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
2	3	19.8600
1	3	23.4800
3	3	19.8933
Sig.		.056

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

25. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	13.4600	.26889	.15524	12.7920	14.1280	13.29	13.77
2	3	17.6933	.38083	.21987	16.7473	18.6394	17.28	18.03
3	3	17.2967	.556328	.321196	3.4767	31.1166	14.01	23.72
Total	9	16.1500	3.44843	1.14948	13.4993	18.8007	13.29	23.72

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32.798	2	16.399	1.579	.281
Within Groups	62.335	6	10.389		
Total	95.133	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	3	13.4600
3	3	17.2967
2	3	17.6933
Sig.		.171

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

26. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายไขมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	9.5433	.10970	.06333	9.2708	9.8158	9.42	9.63
2	3	11.8900	.01732	.01000	11.8470	11.9330	11.88	11.91
3	3	9.3900	.06000	.03464	9.2410	9.5390	9.33	9.45
Total	9	10.2744	1.21512	.40504	9.3404	11.2085	9.33	11.91

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.780	2	5.890	1.109E3	.000
Within Groups	.032	6	.005		
Total	11.812	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
3	3	9.3900		
1	3		9.5433	
2	3			11.8900
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

27. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อย พร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 60 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	6.3333	.59501	.34353	4.8553	7.8114	5.97	7.02
2	3	7.9000	.03000	.01732	7.8255	7.9745	7.87	7.93
3	3	7.6433	1.51477	.87455	3.8804	11.4062	6.69	9.39
Total	9	7.2922	1.09175	.36392	6.4530	8.1314	5.97	9.39

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.236	2	2.118	2.398	.172
Within Groups	5.299	6	.883		
Total	9.535	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05
		1
1	3	6.3333
3	3	7.6433
2	3	7.9000
Sig.		.096

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

28. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 72 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (สายพันธุ์ดั้งเดิม) สายพันธุ์กลาย 421 และสายพันธุ์กลาย 11035

Descriptives

RS

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
1	3	4.7300	.09849	.05686	4.4853	4.9747	4.62	4.81
2	3	5.6267	.16921	.09770	5.2063	6.0470	5.44	5.77
3	3	4.8533	.08737	.05044	4.6363	5.0704	4.78	4.95
Total	9	5.0700	.43434	.14478	4.7361	5.4039	4.62	5.77

ANOVA

RS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.417	2	.709	46.249	.000
Within Groups	.092	6	.015		
Total	1.509	8			

RS

Duncan

No	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
1	3	4.7300	
3	3	4.8533	
2	3		5.6267
Sig.		.268	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

ข้อมูลประวัติคณะผู้วิจัย

ประวัติส่วนตัว

ชื่อ – สกุล นางดวงใจ โอชัยกุล

ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ระดับ 9 ประธานสาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ระดับปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2529	ตรี	ว ท .บ (เกษตรศาสตร์)	เกษตรศาสตร์	การจัดการศัตรูพืช	ม.สงขลา นครินทร์	ไทย
2532	โท	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	-	ม.สงขลา นครินทร์	ไทย

สาขาวิจัยที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา)

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ในอาหารหมัก การนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าเพิ่มขึ้น

รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะหรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

ปี พ.ศ.	ชื่อรางวัล	สถาบันที่ให้
2549	งานวิจัยที่ออกรายการ Inside Technology ออกอากาศทาง สทท 11	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2550	โครงการประกวดผลงานสิทธิบัตรการประดิษฐ์ กรรมทรัพย์สินทางปัญญา กระทรวงพาณิชย์ สาขาส่งแวดล้อม	

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาและทุนวิจัย	สถาบันที่ให้
---------	------------------------	--------------

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์

ผลงานวิจัย/งานสร้างสรรค์ที่ตีพิมพ์เผยแพร่ (ระดับชาติและนานาชาติ)

- ดวงใจ โอชัยกุล และ อรพรรณ ชัยลภากุล. 2540. การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีในระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้ด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 25(1) : 56-64.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล และ วันชัย สุทธินน. 2541. การศึกษาการผลิตเอสตีจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง 8(1) : 8-15
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล. 2541. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ระหว่างการหมักเมล็ดโกโก้. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง ปีที่ 6 ฉบับที่ 1 มีนาคม 2541. 34-40
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล. 2541. การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของเมล็ดโกโก้ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อที่แยกได้จากกองหมัก. วารสารเกษตรก้าวหน้า. ปีที่ 13 ฉบับที่ 2 เดือนเมษายน – มิถุนายน 2541. 59 - 69.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล และ มาริสา จาตุพรพิพัฒน์. 2541. การผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปมันฝรั่ง โดย *Candida tropicalis* TISTR 5136. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 26(3) : 181 – 185.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล. 2543. ผลของอัตราการเจือจางและพีเอชของน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปโกโก้ที่มีต่อการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวโดยเชื้อ *Candida tropicalis* TISTR 5136. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 8(1) : 31 – 36.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล และกุลวดี ทองภูเบศร์. 2542. การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี. 6(3) : 175 – 180.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล, ประกายวัน สุรินทร์ศิริรัฐ, ปัญจพร สฤทธิชัยนันทาและรัชนิวัลย์ กลิ่นกลบ. 2545. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแปรรูปโกโก้โดย *Candida tropicalis* TISTR 5136. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง ปีที่ 11 ฉบับที่ 1 มกราคม – มิถุนายน. 14 – 22.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล กุลวดี ทองภูเบศร์ สุปรียา ฉัตรทอง และปริมประภา คณารักษ์ณ. 2545. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อ *Aspergillus niger* TISTR 3089. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 10(1) : 333 – 38.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- ดวงใจ โอชัยกุล กุลวดี ทองภูเบศร์ ดำรงค์ดี พิริยะภัทรกิจ และดาวรุ่ง ทับแสง. 2546. ผลของเมทานอลและแร่ธาตุบางชนิดต่อการผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อ *Aspergillus niger*. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร. 11(1) : 31 – 39.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล ไพศาล ประสิว รัชฎาภรณ์ บุตรสนม และสกุลรัตน์ พุกกะวรรณะ. 2547. การผลิตกรดซิตริกจากน้ำสกัดเยื่อหุ้มเมล็ดโกโก้โดยเชื้อยีสต์. วารสารวิทยาศาสตร์ลาดกระบัง. 12(2) : 67 – 74.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล นิสา เหมมาลา สรัญ บินมิตตอร์ และสาทิติ พิเสฏฐลาชัย. 2547. การศึกษาเชื้อราสำหรับผลิตโปรตีนเซลล์เดียวจากน้ำทิ้งโรงงานแป้งมันสำปะหลังในสภาวะไม่ปลอดเชื้อ. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 12 (1) : 30 – 36.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Duangjai Ochaikul, Nisakorn Noiprasert, Wipawade laoprasert and Sasima Pookpun. 2011. Ethanol production from jackfruits seeds by selected fungi and yeast from loog-pang. KMITL Sci. Tech. J. 12(1), 1 – 6.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Suwanposri, A., Yukphan, P., Yamada, Y and Ochaikul, D. 2013. Identification and biocellulose production of *Gluconacetobacter* strains isolated from tropical fruits in Thailand. Maejo Int. J. Sci. Techno. 7(01), 70-82.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Yamada, Y., Yukphan, P., Huong Thi Lan Vu., Muramatsu, Y., Ochaikul, D and Nakagawa, Y. 2012. Subdivision of the genus *Gluconacetobacter* Yamada, Hoshino and Ishikawa 1998: the proposal of *Komagatabacter* gen. nov., for strains accommodated to the *Gluconacetobacter xylinus* group in the α -Proteobacteria. Ann Microbiol, 62: 849-859
สถานภาพในการทำวิจัย : ผู้ร่วมวิจัย

การเสนอผลงานวิชาการ

- Ochaikul, D., Chinawoot, P and Wiwatsripaiboon, P. 2002. Effect of Trace Element on Citric Acid Fermentation from Cocoa Pulp Extract by *Aspergillus niger* TISTR 3089. The 14th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Biotechnology for Better Living in the New Economy” November 12 – 15, 2002. Hotel Sofitel Raja Orchaid, Khon Kaen, Thailand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Ochaikul, D., Kongkiattisak, P and Tadthongleung, W. 2003. Single Cell Protein from Cheese whey by *Kluyveromyces marxianus* TISTR 5057. Proceeding of Biological Control and Biotechnology, Harbin, China, 64 – 70.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- ดวงใจ โอชัยกุล และพรณวิภา แพงศรี. 2547. การผลิตโปรตีนจากน้ำทิ้งโรงงานแปรงมันสำปะหลังโดยเลี้ยงเชื้อผสม *Endomycopsis fibuligera* TISTR 5097 และ *Candida utilis* TISTR 5046. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 42 “เกษตรศาสตร์เพื่อการพัฒนาคุณภาพชีวิต” 3 – 6 กุมภาพันธ์ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Duangjai Ochaikul, Karuna Chotirittikrai, Jiraporn Chantra and Sinith Wutigornsombatkul. 2005. Studies on Fermentation of *Monascus purpureus* TISTR 3090 on Bacterial Cellulose : *Acetobacter xylinum* TISTR 967. Proceeding of Biological Control and Biotechnology, Wuzhong, China, 122 – 129.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Ochaikul, D., Charoenying, P and Ratanajaraya, C. 2006. Effect of the extract from *Zingiber montanum* on antimicrobial activities. 10th International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms (GIM), Prague, Czech Republic, June 24 – 28, 2006.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Duangjai Ochaikul, Linchong Suklampoo and Piyada Leelapiyanart. 2007. Ginger Wine Production by Various Strains of *Saccharomyces cerevisiae*. Proceedings of The 5th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, November 1 – 3, 2007 at KhonKaen University, Nong Khai Campus, Nong Khai, Thailand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Ochaikul, D., Rukchonlatee, S., Naranong, N and Pongsakul, P. 2008. Effect of Chitosan on Paper Production from Bacterial Cellulose and its Properties. The 6th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, November 26 – 28, 2008. Central Luzon State University, Science City of Munoz, Nueva Ecija, Philippines.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- ดวงใจ โอชัยกุล ลินจง สุขล่ำญ และปิยะดา ลีลาปิยนารถ. 2552. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักไวน์ซิงโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5018. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. 241 – 250 หน้า
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Ochaikul, D., Pongmalee, B., Yimyai, T and Keawkaew, S. 2010. Production of Ethanol from Jackfruit Seeds starch by Enzymatic hydrolyzation and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation NZMS & BZSBMB Meeting, 30 November – 3 Decemmmber 2010, The University of Auckland, New Zealand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- กมลวรรณ ตันโสภณ และดวงใจ โอชัยกุล. 2554. การผลิตสารสีของเชื้อรา *Monascus purpureus* TISTR 3090. บนลูกเดือยในสภาวะอาหารแข็ง. เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 49 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์. หน้า 330 – 339.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Duangjai Ochaikul, Linchong Suklampoo and Piyada Leelapiyanart. 2009. Ginger wine production by various starins of *Saccharomyces cerevisiae*. The 3rd International Conference on fermentation Technology for Value Added Agriculture Products. August 26th -28th, 2009. Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand, 78-80.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Mawinee Yaemchantramart, Duangjai Ochaikul and Charoen charoenchai. 2009. The influence of isolated fungi and yeast from Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Production. August 26th -28th, 2009. Kosa Hotel, Khon Kaen, Thailand, 80-81.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Jiararat Chitranuwatkul, Duangjai Ochaikul and Wanida Janrikul. 2012. Preparation and Antibacterial Properties of Mangosteen extract-cellulose composite film. Preceedings of 1 st International Symposium on Technology for Sustainability (ISTS 2011), 26-29 January 2012, KMITL, Bangkok Thailand.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

- Suwanposri, A., Yukphan, P., Yamada, Y and Ochaikul, D. 2012. Bio-cellulose Paper Production using Agricultural waste by *Gluconacetobacter* sp PAP1. 2012. International Conference on Sustainable Environmental Technologies (ICSET), April 26-27, 2012, Century Park Hotel, Bangkok, Thailand
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Suwanposri, A., Yukphan, P., Yamada, Y and Ochaikul, D. 2012. Optimization of culture condition for bio-cellulose production by *Gluconactobacter nataicola* PAPs isolated from rotten tropical fruits in Thailand. Proceedings of The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology “Renewable Energy and Global Care” November 29-30th, 2012 at Ubon Ratchathani, THAILAND.
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย
- Ochaikul, D., Tanpathanagit, K., Saleng, S and Chitkaew, N. 2012. Production of Ethanol from Sweet Potato by Enzymatic hydrolyzation and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentation. The Proceedings of 10th International Symposium on Biocontrol and Biotechnology, December 27-30, 2012, Harbin Institute of Technology, Harbin, P.R China
สถานภาพในการทำวิจัย : หัวหน้าโครงการวิจัย

ผลงานสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/งานสร้างสรรค์ (ศิลปะหรืออื่นๆ)

- อนุสิทธิบัตร เรื่อง กรรมวิธีการผลิตกระดาษเซลลูโลสจากแบคทีเรียจากน้ำทิ้งโรงงานเต้าหู้และกระดาษเซลลูโลสจากกรรมวิธีดังกล่าว เลขที่อนุสิทธิบัตร 7972 เมื่อ 4 เมษายน 2556