บทที่ 5 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ (Conclusions and suggestions)

การคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ที่แยกได้จากเขื่อนอุบลรัตน์ (Isolation and study of yeast from Ubontana Dam)

การสุ่มเก็บตัวอย่างจาก ใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้และดิน บริเวณป่าเขื่อนอุบลรัตน์ อำเภออุบลรัตน์ จังหวัด ขอนแก่น เก็บตัวอย่างเส้นทางที่ 1ได้จำนวน 17 ตัวอย่าง เส้นทางที่ 2ได้จำนวน 18 ตัวอย่าง และเส้นทางที่ 3ได้จำนวน 35 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 70 ตัวอย่าง วิธีการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสมจำนวนตัวอย่างต้องมากพอ Lachance และ Starmer (1998) รายงานการศึกษายีสต์ที่อยู่ในกระบองเพชรที่เน่าเสีย แมลง ยางไม้หรือดอกไม้ จำนวนตัวอย่างที่น้อยที่สุดที่ให้ค่าแม่นยำ คือ 15 ตัวอย่าง นอกจากนั้นจำนวนอาจแปรผันตามจำนวนตัวอย่างที่ไม่มีเชื้อ โดยถ้าตัวอย่างไม่มีเชื้อจำนวนตัวอย่างควรเพิ่มขึ้นอย่างน้อย 8 ตัวอย่าง สำหรับการเก็บตัวอย่างดิน เนื่องจากยีสต์เป็นพวกที่ต้องการอากาศในการเจริญ ดังนั้นการเก็บตัวอย่างเพื่อให้ได้ยีสต์ควรเก็บบริเวณผิวดินใส่ถุงพลาสติกหรือภาชนะที่สะอาด

การคัดแยกยีสต์จาก ใบไม้ ดอกไม้ ผลไม้และดิน บริเวณป่าเขื่อนอุบลรัตน์ทั้งหมด 70 ตัวอย่าง มีการศึกษาลักษณะโคโลนีใหญ่ ทึบแสง เป็นต้น พบว่าเส้นทางที่ 1 แยกยีสต์ได้ 32 ไอโซเลต เส้นทางที่ 2 แยกยีสต์ได้ 41 ไอโซเลต เส้นทางที่ 3 แยกยีสต์ได้ 45 ไอโซเลต รวมทั้งสามเส้นทาง ได้ 118 ไอโซเลท การคัดแยกนี้ยังพบยีสต์ที่อยู่ในกลุ่ม Basidiomycetus yeast ซึ่งมีลักษณะโคโลนีเป็นสี เช่น สีแดง ชมพู เหลือง เป็นต้น ในการคัดแยกยีสต์ วิธีการไม่ควรเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมี ความต้องการธาตุอาหารและสภาพทางกายภาพของเชื้อ ในระหว่างการแยก ทุกขั้นตอนต้องใช้เทคนิคที่ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่น

ความสามารถของยีสต์ในการเจริญที่สภาวะอุณหภูมิต่างๆ โดยการเทียบความขุ่นของอาหาร ดังภาพที่ 4 ส่วนมากยีสต์เจริญได้ดีในอุณหภูมิช่วง 25-35 องศาเซลเซียส และมี 20ไอโซเลตที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มี 2 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีด้วยเช่นกัน ส่วน อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส มีเพียง C9-2 และ F8-2 ที่เจริญได้น้อย ยีสต์ส่วนใหญ่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลางซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม (Optimal temperature) เหมาะสำหรับการเจริญในช่วง 20-28 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้ต่ำกว่า

46 องศาเซลเซียส (Nakase, 2001) ความทนอุณหภูมิสูงเป็นลักษณธประจำสายพันธุ์ *Saccharomyces* เป็นสายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic strain) ให้เซลล์ปริมาณสูงสุดและอัตราการเจริญสูงสุดในช่วง 28-35 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ 40 องศาเซลเซียส ส่วนยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิสูง ระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้สำหรับการเจริญที่ 40 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิสูงสุดที่เจริญได้ 50 องศาเซลเซียส (สาวิตรี ,2549)

ยีสต์ที่พบจากแหล่งน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงมักเป็นพวกที่ทนแรงดันออสโมซิส จากตารางที่ 10 จะเห็นว่าส่วนมากยีสต์ที่คัดแยกได้นั้นสามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงๆ ส่วนมากเจริญได้ดีในช่วง 30%-50% กลูโคส มีเพียง 106-1, 106-2, S12-2, F14-2 เจริญได้น้อยที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 30%

จากตารางที่ 11 ผลการเจริญของยีสต์ที่ความเข้มข้นของเกลือ 3%, 5%, 10%, 15%, 20% พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดีในช่วงความเข้มข้นของเกลือ 3 - 5%, และมี 19 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของเกลือสูงถึง 15% ยีสต์ที่ไม่สามารถเจริญได้เลยคือ 106-1, S12-1, 208-1, C6-2, C6-3,C9-2, F14-2, F5-1, F5-2

การทดสอบการย่อยโปรตีนโดยใช้ Skim milk เป็นสับสเทรต ยีสต์ 118 ไอโซเลต มียีสต์ที่สามารถย่อยโปรตีนได้จำนวน 29 ไอโซเลต และ ไอโซเลต S21-1 S21-2 ที่แยกได้จากดินเส้นทางที่ 2 มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตีนมากที่สุดจากความแตกต่างระหว่าง clear zone และ colony zone มากที่สุด คือ 1.3 เซนติเมตร เนื่องจากดินมีองค์ประกอบที่เป็นโปรตีนมาก จากซากพืช ซากสัตว์ที่ทับถมกันจึงส่งผลให้ยีสต์ที่ได้มีประสิทธิภาพการย่อยโปรตี และไอโซเลต 210-2 ที่แยกได้จากแก่นเทามีความแตกต่างระหว่าง clear zone และ colony zone คือ 1.1 เซนติเมตร

ความสามารถในการย่อยแป้งของยีสต์ 118 ไอโซเลต มี 16 ไอโซเลตที่สามารถย่อยแป้งได้ และไอโซเลต S11-1 ที่แยกได้จากดินมีประสิทธิภาพการย่อยแป้งมากที่สุด โดยความแตกต่างระหว่าง clear zone กับ colony zone เท่ากับ 0.8 เซนติเมตร นอกจากนั้น ไอโซเลต 101-2, 213-3 มี clear zone กับ colony zone ต่างกัน 0.5 เซนติเมตร

ความสามารถในการย่อย Xylan ของยีสต์ 118 ไอโซเลต มี 22 ไอโซเลตที่สามารถย่อย Xylan ได้ โดยส่วนมากแล้วประสิทธิภาพการย่อย Xylan ค่อนข้างต่ำสังเกตได้จกตารางที่มีค่าความแตกต่าง ระหว่าง clear zone กับ colony zoneน้อย และไอโซเลต 216-2 ที่แยกได้จากหญ้าทักษิณมีประสิทธิภาพการย่อย Xylan มากที่สุด โดยความแตกต่าง ระหว่าง clear zone กับ colony zone

เท่ากับ 0.9 เซนติเมตรและไอโซเลต 108-2, S5-1 มี clear zone กับ colony zone ต่างกัน 0.6 และ 0.5 เซนติเมตร ตามลำดับ

จากการทดลองความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นของเอทานอลต่างๆ วัดโดยเทียบความขุ่นของอาหาร ดังภาพที่10 พบว่ายีสต์สามารถเจริญได้ดีที่ 5 เปอร์เซ็นต์เอทานอล มี 3ไอโซเลตที่เจริญได้ดีที่ 10 % ethanol คือ 111-2, 112-1, S13-1, S21-2 และที่สามารถเจริญได้ปานกลางที่ 10 เปอร์เซ็นต์เอทานอล

มี 5ไอโซเลตคือ F2-4, S1-1, S1-2, 107-1, 201-2, 204-1, 204-2, S12-2, S13-1, S21-1 ยีสต์ที่ทนเอทานอล โดยทั่วไปแล้วการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอล โดยพบว่าเอทานอลเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักทำให้การเจริญของยีสต์ลดลงและการเจริญของยีสต์จะหยุดเมื่อมีเอทานอล 4.7-7.8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Panchal and Tavares, 1990) ดังนั้นจะเห็นว่าผลการทดลองส่วนมากแล้วยีสต์จะทนเอทานอลได้สูงสุดที่ 5 เปอร์เซ็นต์เอทานอล ซึ่งใกล้เคียงกับที่เคยรายงานไว้

การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ จะทำการเลือกไอโซเลตยีสต์ที่มีศักยภาพดี ไอโซเลตที่เลือกทำการทดลองได้แก่ S1-1, S5-5, S11-1, S13-1, 109-1,204-1, 216-2 เมื่อพิจารณาคัดเลือกจุลินทรีย์มาใช้สำหรับการผลิตเอทานอลให้มีผลผลิตและอัตราการผลิตที่สูงนั้น เป็นเรื่องที่ต้องให้ความสำคัญเป็นดับแรก นอกจากนั้นลักษณะที่ใช้ในการคัดเลือกการผลิตเอทานอลเช่น ความทนเอทานอล ความทนอุณหภูมิสูง ความทนแรงดันออสโมซิส ความสามารถในการย่อยโปรตีน ความสามารถในการย่อยแป้ง ความสามารถในการย่อย Xylan และความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นของเอทานอลต่างๆสาเหตุที่ทำให้ลักษณะเหล่านี้เป็นลักษณะที่สำคัญ เนื่องจากในการหมักเอทานอลจากกลูโคสนั้นตามทฤษฎีกลูโคส 1 กรัมจะให้เอทานอล 0.51 กรัม แต่ในทางปฏิบัติทั่วไปจากกลูโคส 1 กรัม จะให้เอทานอลเพียงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแปลงสารประกอบคาร์บอนไปเป็นผลผลิต และมีบางส่วนนำไปใช้สร้างเซลล์ ทำให้เอทานอลลดลงและการหมักนานเนื่องจากปัจจัยหลายอย่าง เช่น การยับยั้งด้วยเอทานอล การยับยั้งโดยผลผลิตพลอยได้บางชนิด เช่น กรดอินทรีย์ การยับยั้งเนื่องจากแรงดันออสโมซิสเพราะมีน้ำตาลความเข้มข้นสูง (Panchal and Tavares, 1990)

จากการทดลองพบว่า ทั้งหมด 7 ไอโซเลต มี S13-1ที่แยกได้จากตัวอย่างดิน บริเวณเส้นทางที่ 1 ของป่าเขื่อนอุบลรัตน์ มีปริมาณแอลกอฮอล์มากที่สุดที่ 5.6 % v/v แต่น้อยกว่า *Saccharomyces* QA23* เมื่อดูจากตารางที่ 17 ในช่วงบ่มตัวอย่างพบว่า มีฟองอากาศและสร้างแก๊สเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเจริญดีมากเมื่อเทียบกับไอโซเลต S5-5 ที่ไม่มีการสร้างแก๊ส และตามด้วย 204-1เป็นไอโซเลตที่แยกได้จากใบไม้ เส้นทางที่ 2 และไอโซเลต S1-1 แยกได้จากตัวอย่างดิน บริเวณเส้นทางที่ 3 มี

ปริมาณแอลกอฮอล์ 3.1 % v/v ไอโซเลต S5-5 ไม่พบแอลกอฮอล์ ส่วน S11-1, 216-2 มีปริมาณแอลกอฮอล์ <0.6 % v/v การทดสอบประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์ และสามารถคาดการผลได้ล่วงหน้าได้โดยสังเกตจากการเกิดแก๊ส กลิ่นแอลกอฮอล์ ในช่วงกระบวนการหมักได้ ปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่ใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* นอกจากนั้นยังมีการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดนใช้แบคทีเรียสกุล Zymomonas คือ *Z. mobilis* และสกุล *Clostidium* คือ *Cl. Thermocellum* ซึ่งเป็นแบคที่เรียไม่ต้องการออกซิเจน สามารถหมักเซลลูโลสและเจริญได้อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามแบคที่เรียทั้งสองสกุลดังกล่าวมีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์ (สาวิตรี, 2549)

การศึกษาการกระจายตัวของจุลินทรีย์เพื่อที่จะได้จุลินทรีย์ผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีความสำคัญและมีศักยภาพสูงสำหรับอุตสาหกรรม จุลินทรีย์หลายชนิดมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงธาตุอาหารและพลังงาน ทำให้ระบบนิเวศน์ป่าไม้ ระบบนิเวศน์เกษตร และระบบนิเวศน์ประมงยังคงสภาพเดิม การค้นพบและศึกษาจุลินทรีย์ที่อยู่ในสภาวะวิกฤต เช่น อุณหภูมิสูง ความเค็มสูง น้ำตาลสูง ความสามารถในการย่อยสับสเทรต สามารถอธิบายสิ่งเหล่านั้นอยู่ได้อย่างไรในสภาวะแบบนั้นและนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุดและปรับเปลี่ยนให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น นอกจากนั้นการรู้องค์ประกอบของจุลินทรีย์ในแหล่งต่างๆนำไปสู่การจัดการเกี่ยวกับจุลินทรีย์ได้ดีขึ้น

การจัดจำแนกประเภทยีสต์โดยเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของยีสต์

จากการทดลอง การจัดจำแนกประเภทยีสต์โดยเปรียบเทียบนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของยีสต์ ของยีสต์ 20 ไอโซเลท ที่ได้จากตัวอย่าง ดิน ดอกไม้และผลไม้ พบว่า การวิเคราะห์ผลได้ยีสต์ 17 ไอโซเลท เป็น known species และ พบยีสต์ 2 ไอโซเลท เป็น Sister species ได้แก่ F5-1 และ 204-2 ซึ่งพบสายพันธุ์ที่ใกล้เคียง คือ *Candida sp.* EN28S10 และ *Kodamaea ohmeri* ตามลำดับ พบ 1 ไอโซเลทที่เป็น New species คือเชื้อ S11-1 เชื้อที่พบใกล้เคียง คือ *Debaryomyces polymorphus*

การจัดจำแนกทางชีวเคมีของยีสต์

ในการทดสอบทางชีวเคมีได้นำเชื้อยีสต์ทั้งหมด 7 ไอโซเลทดังนี้

204-2	*Kodamaea ohmeri*
F5-1	*Candida sp.* EN28S10
S11-1	*Debaryomyces polymorphus*
L1	*Pichia sydowiorum*
FR7-1	*Candida sp.* EM 33 *(Candida pseudohaemulonii)*
FW10	*Candida sp.* EM 33 *(Candida pseudohaemulonii)*
S3-1-2	*Torulaspora delbrueckii*

เมื่อนำเชื้อมาทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนต่างๆ พบว่า ยีสต์รหัส FR7-1 และ FW10 เป็นเชื้อสายพันธุ์เดียวกัน แต่เนื่องจากข้อมูลของเชื้อ *Candida sp.* EM 33 ไม่สามารถนำมาเปรียบเทียบได้ จึงต้องนำข้อมูลที่มีความใกล้เคียงมากที่สุดนำมาเปรียบเทียบ ได้แก่เชื้อ *Candida pseudohaemulonii* การทดสอบการหมักน้ำตาล พบว่ายีสต์สามารถหมักกลูโคสได้ทุกสายพันธุ์ ส่วนการทดสอบอื่นๆ พบว่า ยีสต์ เจริญในอาหารที่มี 50% กลูโคส ได้ดีกว่า 60% กลูโคส และยีสต์สามารถเจริญได้ที่10%NaCl/5%glucose ดีกว่า 15%NaCl/5%glucose ส่วนยีสต์ทุกสายพันธุ์เจริญได้ในอาหารที่ขาดวิตามิน และยีสต์สามารถต้านทานต่อไซโคเฮกซิไมด์ ที่ 0.01 % ได้ แต่ไม่ทนต่อ ไซโคเฮกซิไมด์ที่ 0.1 % ได้ ยีสต์สามารถใช้แหล่งในโตรเจนได้ และยีสต์เจริญได้ที่อุณหภูมิที่ 25 -37 องศาเซียลเซลได้ดี แต่ไม่สามารถเจริญได้เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ยีสต์รหัส L1 สามารถย่อยเจ

ลาติน ได้สายพันธุ์เดียว การทดสอบการใช้ยูเรียแล้วการสร้างแป้งของยีสต์ ไม่พบการใช้ยูเรียและการใช้แป้ง และยีสต์สามารถสร้างกรดได้

การจัดจำแนกทางสรีระวิทยา

การทดสอบเพื่อดูการเจริญที่อาหาร YM broth พบว่า ยีสต์มีการเจริญทั้งบนผิวหน้าอาหารที่เป็นแบบวงรอบหลอดและไม่พบการเจริญบนอาหาร และการทดสอบการเจริญที่ อาหาร YM agar slant พบว่ายีสต์มีการเจริญแบบ filiform โดยทั้งใน streak และ stab การเจริญจะสม่ำเสมอตามแนวที่ปลูกเชื้อ ส่วนการทดลองเพื่อดูลักษณะโคโลนีของเชื้อบนอาหาร YM agar plate พบว่า เชื้อส่วนมาก มีโคโลนีรูปร่างกลม โคโลนีนูนโค้งจากผิวหน้าอาหารมีรูปร่างกลมแต่จะไม่สูงกว่าผิวหน้าอาหารเท่าใดนัก ผิวหน้าเกลี้ยงเกลา ริมขอบเกลี้ยงไม่มีรอยหักเว้า ทึบไม่ให้แสงผ่าน เนื้อในเละคล้ายเนยเหลว มีสีครีม เชื้อยีสต์ที่ทดสอบไม่พบการสร้าง Ascospore อาจเนื่องมาจากความไม่เหมาะสมของสภาวะในการบ่มซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่น้อยเกินไป จึงทำให้ไม่พบ Ascospore ส่วนการสร้าง Pseudomycelium พบว่าเชื้อ S11-1 มีการสร้าง Pseudomycelium ที่ยาวกว่าเชื้อตัวอื่นๆ

อย่างไรก็ตามการบ่งชนิดของยีสต์ที่น่าสนใจในครั้งนี้ หากต้องการประกาศการค้นพบเป็นยีสต์ชนิดใหม่ จะต้องถูกทดสอบซ้ำเพื่อยืนยันผลและทดสอบเพิ่มเติมอีก อย่างไรก็ดีการศึกษาในครั้งนี้ทำให้ทราบชนิดของยีสต์และ มีความเป็นไปได้ที่จะค้นพบยีสต์ชนิดใหม่ และยีสต์ที่มีสมบัติน่าสนใจหลายชนิด โดยมีความสามารถย่อยสลายสับเสตรทได้หลายชนิด จึงควรจะมีการศึกษาในขั้นต่อๆ ไป เพื่อนำยีสต์ที่แยกได้ดังกล่าวไปใช้ให้เกิดประโยชน์ ในด้านต่างๆ เช่น การศึกษาการย่อยสลายวัสดุทางการเกษตรซึ่งไม่มีให้เพิ่มมูลค่าขึ้นโดยอาจใช้เป็นสารตั้งต้นของการผลิตน้ำตาลเพื่อใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งเป็นแหล่งพลังงานทดแทนทางเลือก อีกแหล่งหนึ่ง