บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกและการคัดเชื้อยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน

แยกยีสต์ทนร้อนจากตัวอย่างผลไม้ ใบไม้ ดอกไม้ ดิน และผลปาล์ม จำนวน 145 ตัวอย่าง จากการเจริญบนอาหาร YM ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ได้ทั้งหมด 70 ไอโซเลต แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ยีสต์ทนร้อนที่แยกได้จากธรรมชาติ

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่แยกได้ (ไอโซเลต)	รหัสสายพันธุ์
1. ผลไม้			
กล้วย	9	1	MIY1
มะละกอ	14	6	MIY5, MIY6, MIY12, MIY13, MIY14, MIY15
สับปะรด	21	7	MIY7, MIY8, MIY9, MIY10, MIY11, MIY17, MIY18
ส้ม	5	1	MIY16
องุ่นสีเขียว	6	4	MIY29, MIY30, MIY31, MIY32,
องุ่นสีแดง	7	5	MIY33, MIY34, MIY35, MIY36 MIY37
2. ใบไม้และดอกไม้	16	-	-
3. น้ำตาลโตนด	31	13	MIY2, MIY3, MIY4, MIY19, MIY20, MIY21, MIY22, MIY23, MIY24, MIY25, MIY26, MIY27, MIY28
4. ดิน	17	8	MIY38, MIY39, MIY40, MIY41,

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนของตัวอย่าง	จำนวนยีสต์ที่แยกได้ (ไอโซเลต)	รหัสสายพันธุ์
5. ผลปาล์ม	19	25	MIY42, MIY43, MIY44, MIY45 MIY46, MIY47, MIY48, MIY49, MIY50, MIY51, MIY52, MIY53, MIY54, MIY55, MIY56, MIY57, MIY58, MIY59, MIY60, MIY61, MIY62, MIY63, MIY64, MIY65, MIY66, MIY67, MIY68, MIY69, MIY70
รวม	145	70	

ยีสต์ทนร้อนส่วนใหญ่จะแยกได้จากผลปาล์ม จาก 19 ตัวอย่าง แยกยีสต์ทนร้อนได้ 25 ไอโซเลต คิดเป็น 36 % ของจำนวนไอโซเลตที่แยกได้ โดยผลปาล์มทุกตัวอย่าง แยกยีสต์ได้ 1 ไอโซเลต และมีบางตัวอย่างพบยีสต์มากกว่า 1 ไอโซเลต น้ำตาลโตนดและดินได้ยีสต์จำนวน 13 และ 8 ไอโซเลต คิดเป็น 19 % และ 11 % ของจำนวนไอโซเลตที่แยกได้ สำหรับผลไม้ ได้แก่ กล้วย มะละกอ สับปะรด ส้ม และองุ่น แยกได้ยีสต์ทั้งหมด 24 ไอโซเลต โดยองุ่นจะได้ยีสต์มากที่สุด จาก 13 ตัวอย่าง แยกได้ 9 ไอโซเลต คิดเป็น 13 % ของจำนวนไอโซเลตที่แยกได้ แต่ไม่สามารถแยกยีสต์ทนร้อนได้จากใบไม้และดอกไม้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก ยีสต์ในผลไม้ ใบไม้ และดอกไม้ เป็นยีสต์ที่เจริญที่อุณหภูมิระดับปานกลาง แต่ในขณะที่ยีสต์ทนร้อนที่แยกได้จากผลปาล์มมีจำนวนมากกว่าตัวอย่างชนิดอื่น ซึ่งเป็นไปได้ว่าคุณสมบัติในการทนร้อนของยีสต์เกี่ยวข้องกับปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเซลล์ และในผลปาล์มสุกจะมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวปริมาณสูง (ขนิษฐา, 2543) ดังนั้นยีสต์ที่แยกได้จากผลปาล์มสุกดังกล่าวจึงทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีกว่ายีสต์ที่แยกจากน้ำตาลโตนด ดิน และผลไม้ ซึ่งก่อนหน้านี้ ขนิษฐา (2543) รายงานการแยกยีสต์จากดินและพืชบริเวณโรงงานหีบน้ำมันปาล์ม และบริเวณสวนปาล์มจำนวน 67 ตัวอย่าง ที่อุณหภูมิ 35 °ซ โดยใช้อาหารที่มีน้ำมันปาล์มเป็นส่วนประกอบ ได้ยีสต์ 51 สายพันธุ์ จากรายงานการวิจัยที่ผ่านมา พบว่าส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิ 28-37 °ซ ในการแยกยีสต์ เช่น สมศรี (2524) แยกยีสต์จากผลตาลสุกจาก

ตลาดสดแหล่งต่าง ๆ ในกรุงเทพฯ และจังหวัดใกล้เคียงรวม 10 แห่ง ที่อุณหภูมิห้อง ได้ยีสต์ 20 สายพันธุ์ และนำมาทดลองการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °ซ แต่จากการทดลองนี้แยกยีสต์โดยใช้อุณหภูมิสูง (40 °ซ) ในการคัดเลือก การแยกยีสต์ทนร้อนที่ใช้อุณหภูมิ 40 °ซ หรือสูงกว่า 40 °ซ มีผู้รายงานไว้ดังนี้

Hacking และคณะ (1984) นำยีสต์ 55 สายพันธุ์ จากศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์มาคัดเลือกยีสต์ทนร้อนเพื่อดูการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °ซ พบว่ามี 8 สายพันธุ์ ทั้งหมดจัดอยู่ในจีนัส *Candida, Kluyveromyces* และ *Saccharomyces*

D'Amore และคณะ (1989) คัดเลือกยีสต์จาก 15 จีนัส 65 สายพันธุ์ จากศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อที่อุณหภูมิ 40 °ซ คัดได้ยีสต์ทนร้อน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. diastaticus* No.62, *S. cerevisiae* No.67, *Saccharomyces* fusion product No.1400, *K. marxianus* 1510, *S. cerevisiae* No.130 และ *K. lactis* No.177

Kiran Sree และคณะ (2000) แยกยีสต์จากดินบริเวณโรงงานพลังงานความร้อน ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ได้ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ (SV1-SV4)

Abdel-Fattah และคณะ (2000) แยกยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนจากดินบริเวณรอบ ๆ โรงกลั่นสุรา และกากน้ำตาลที่เก็บไว้ในถัง ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ได้ยีสต์ 14 สายพันธุ์ 3 จีนัส ได้แก่ *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* และ *Candida*

Szczodrak และ Targonski (1988) คัดเลือกยีสต์จาก 12 จีนัส 58 สายพันธุ์ จากศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์ที่อุณหภูมิ 40-46 °ซ ได้ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน 7 ไอโซเลต ได้แก่ *Fabospora fragilis* CCY51-1-1, *K. fragilis* FT23, *S. carlsbergensis* FT14, *S. cerevisiae* FTJa(a), *S. muciparus* CCY21-25-1, *K. fragilis* FT25, *S. marxianus* CCY21-40-1

Anderson และคณะ (1986) แยกยีสต์ทนร้อนได้ 35 สายพันธุ์ จากตัวอย่างในระหว่างการผลิตน้ำตาล ที่มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 40-70 °ซ และใช้อุณหภูมิ 45 °ซ ในการแยก ดังนั้นยีสต์ที่เก็บได้จากตัวอย่างจึงทนต่ออุณหภูมิสูงกว่าปกติ

นอกจากนี้ Banat และคณะ (1992) แยกยีสต์จากวัตถุดิบและของเสียที่ได้จากโรงกลั่นสุรา ประเทศอินเดีย ที่อุณหภูมิ 50 °ซ ได้ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* IMB 5 สายพันธุ์ (IMB1-IMB5)

ดังนั้น ยีสต์ MIY1-MIY70 ที่แยกมาจากตัวอย่างโดยใช้อุณหภูมิ 40 °ซ จัดเป็นยีสต์ทนร้อนเช่นกัน จึงนำยีสต์ทั้ง 70 ไอโซเลต มาทำในการทดลองต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง

2.1 ศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 40 °ซ

ผลการเจริญที่อุณหภูมิ 40 °ซ ของยีสต์ 70 ไอโซเลต เทียบกับยีสต์ที่ใช้เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* ในอาหารเหลว YM ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง มียีสต์เจริญอยู่ในระดับดี โดยมีความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 0.5-1.0 ทั้งหมด 11 ไอโซเลต จากยีสต์ 70 ไอโซเลต ได้แก่ MIY1 MIY2 MIY3 MIY4 MIY14 MIY15 MIY16 MIY26 MIY27 MIY48 และ MIY57 ส่วนสายพันธุ์เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ มีการเจริญน้อย มีความขุ่นอยู่ในช่วง 0.3-0.5 แต่เมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง พบยีสต์เพียง 6 ไอโซเลต ได้แก่ MIY1 MIY3 MIY14 MIY27 MIY48 และ MIY57 ที่มีระดับการเจริญเพิ่มขึ้นโดยมีความขุ่นมากกว่า 1.0 และยีสต์ทั้งหมดที่ทดลองรวมถึงทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เปรียบเทียบต้องใช้เวลามากกว่า 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 °ซ จึงจะเจริญโดยได้ค่าความขุ่นมากกว่า 1.0

การเจริญที่อุณหภูมิสูงเป็นลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ยีสต์ แต่ยีสต์ทนร้อนเป็นยีสต์ที่สามารถเจริญและหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ (Banat and Marchant, 1995) ซึ่งก่อนหน้านี้มีรายงานการเจริญของยีสต์ทนร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าในการทดลองนี้

ในกลุ่มของ *Saccharomyces* พบว่า Kiran Sree และคณะ (2000) สามารถแยกยีสต์ *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ (SV1-SV4) ได้ที่อุณหภูมิ 40 °ซ และยีสต์ดังกล่าวสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 44 °ซ ในขณะที่ *S. cerevisiae* F111 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 50 °ซ แม้จะใช้ช่วงอุณหภูมิในการแยกเพียง 40-43 °ซ (Abdel-Fattah *et al*., 2000) ส่วน *S. diastaticus* No.62 ที่ D'Amore และคณะ (1989) แยกได้ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ก็สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45 °ซ

กลุ่มของ *Kluyveromyces* มีผู้รายงานว่า *K. marxianus* var. *marxianus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 47 °ซ แม้จะคัดเลือกได้ที่อุณหภูมิ 45 °ซ (Anderson *et al*., 1986) ส่วน *K. marxianus* WR12 ที่ Abdel-Fattah และคณะ (2000) คัดแยกที่ช่วงอุณหภูมิ 40-43 °ซ ก็สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 °ซ และมีรายงานเพิ่มเติมว่า *K. marxianus* IMB1-IMB5 จากการแยกที่อุณหภูมิ 50 °ซ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 52 °ซ (Banat *et al*., 1992)

Candida เป็นยีสต์อีกหนึ่งกลุ่มที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 °ซ (Hacking *et al*., 1984)

นอกจากยีสต์ 3 กลุ่มนี้ Szczodrak และ Targonski (1988) พบว่า *Fabospora fragilis* CCY51-1-1 เป็นยีสต์ทนร้อนอีกกลุ่มหนึ่งที่แยกได้ที่อุณหภูมิ 40-46 °ซ แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 46 °ซ

แม้ว่า ยีสต์ทนร้อนที่แยกได้จากการทดลองนี้จะทนต่ออุณหภูมิสูงได้น้อยกว่ารายงานการวิจัยที่ผ่านมา แต่ในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการแยกยีสต์ทนร้อนที่อุณหภูมิสูง มีเพียงการแยกยีสต์ที่อุณหภูมิปกติแล้วนำมาทดสอบต่อที่อุณหภูมิสูงเท่านั้น

จากผลการทดลองที่ได้จึงนำยีสต์ทั้ง 6 ไอโซเลต ได้แก่ MIY1 MIY3 MIY14 MIY27 MIY48 MIY57 และสายพันธุ์เปรียบเทียบซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 40 °ซ มาใช้ในการทดลอง

2.2 เปรียบเทียบการหมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครสที่อุณหภูมิสูง

ผลการเปรียบเทียบการหมักน้ำตาล 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส หรือซูโครส ของยีสต์ 6 ไอโซเลต กับยีสต์ที่ใช้เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* บ่มที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดปริมาณก๊าซในหลอดดักก๊าซได้ผลแสดงดังตารางที่ 3 พบยีสต์ทนร้อน 3 ไอโซเลต ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้ดี มี 1 ไอโซเลต ได้แก่ MIY1 โดยผลิตก๊าซเต็มหลอดดักก๊าซภายใน 18 ชั่วโมง สำหรับ MIY48 และ MIY57 ได้ก๊าซเต็มหลอดใน 24 ชั่วโมง ในขณะที่ยีสต์ที่ใช้เปรียบเทียบทั้ง 2 สายพันธุ์ ใช้เวลาในการหมักน้ำตาลกลูโคสและได้ก๊าซเต็มหลอด 30 ชั่วโมง ส่วนยีสต์อีก 3 ไอโซเลต คือ MIY3 MIY14 และ MIY27 ใช้เวลาในการหมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสได้ก๊าซเต็มหลอดนานกว่า 24 ชั่วโมง

ส่วนการหมักน้ำตาลซูโครสยีสต์ MIY1 MIY48 และ MIY57 จะให้ก๊าซเต็มหลอดได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง เร็วกว่าสายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* ที่ใช้เปรียบเทียบ ซึ่งใช้เวลา 30 ชั่วโมง เช่นเดียวกับการหมักกลูโคส

การที่ยีสต์ MIY1 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้เร็วกว่าน้ำตาลซูโครส อาจเนื่องมาจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ทันที โดยไม่ต้องผลิตเอนไซม์มาย่อย อีกทั้งความสามารถในการหมักน้ำตาลแต่ละชนิดเป็นคุณลักษณะเฉพาะสายพันธุ์ ดังนั้นยีสต์ MIY1 MIY48 และ MIY57 เป็นยีสต์ที่แยกที่อุณหภูมิสูง จึงอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลซูโครสได้เร็วกว่าสายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* ที่ใช้เปรียบเทียบ เนื่องจากมีรายงานว่า ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนมีความสามารถในการหมักน้ำตาลเร็วกว่ายีสต์ทั่วไป (Singh *et al*., 1998; Abdel-Fattah *et al*., 2000)

จากผลการทดลองนี้จึงนำยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลต ที่หมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลซูโครสได้ดี ได้แก่ MIY1 MIY48 MIY57 และสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบมาศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3 เปรียบเทียบการหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลซูโครสเป็นเอทานอลของยีสต์ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ

น้ำตาล	**เวลาที่ก๊าซเต็มหลอด (ชั่วโมง)**			
	12	18	24	30
กลูโคส	-	MIY1	MIY48 MIY57	*S. cerevisiae* TISTR5048, *K. marxianus*
ซูโครส	-	-	MIY1 MIY48 MIY57	*S. cerevisiae* TISTR5048, *K. marxianus*

2.3 ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

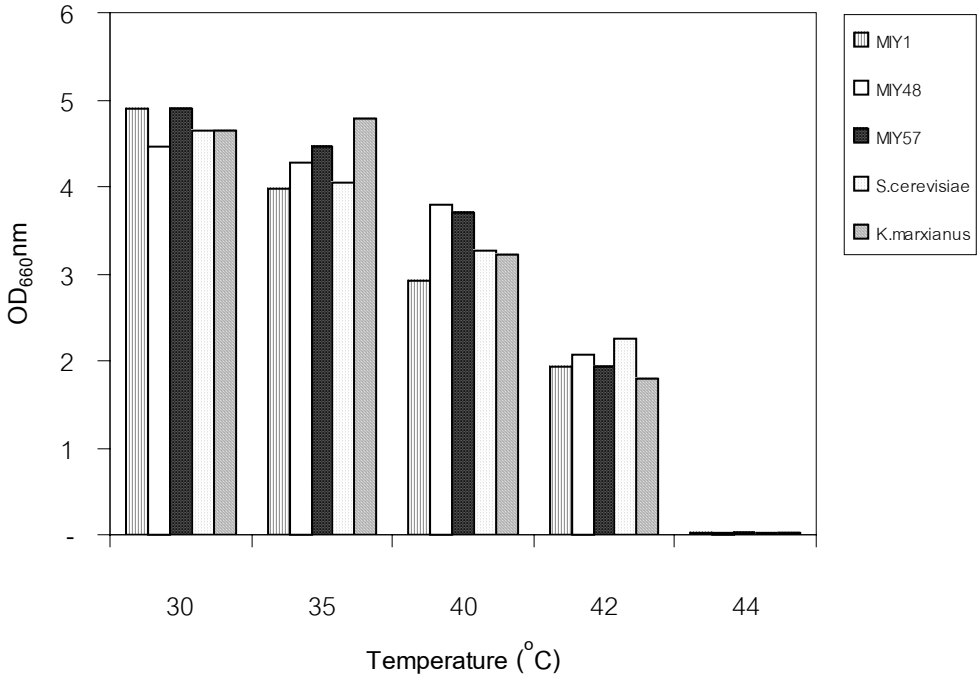
ผลการศึกษาการเจริญที่อุณหภูมิ 30 35 40 42 และ 44 °ซ ของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลต ได้แก่ MIY1 MIY48 และ MIY57 กับยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบ 2 สายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* ในอาหารเหลว YM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 1 ยีสต์ทุกไอโซเลตเจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 35 °ซ ดีกว่าอุณหภูมิอื่น มีการเจริญวัดค่าความขุ่นเฉลี่ยที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร อยู่ในช่วง 3.9-4.9 โดย MIY1 และ MIY57 เจริญดีกว่าไอโซเลตอื่นที่อุณหภูมิ 30 °ซ และ *K. marxianus* เจริญดีกว่ายีสต์อื่นที่อุณหภูมิ 35 °ซ เนื่องจากเป็นช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญโดยทั่วไปของยีสต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 40 °ซ ยีสต์ทุกไอโซเลตที่ทดสอบมีการเจริญเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.9-3.8 โดยยีสต์ MIY48 มีการเจริญสูงกว่ายีสต์ไอโซเลตอื่นๆ รวมทั้งสายพันธุ์เปรียบเทียบ แต่เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 °ซ ยีสต์ที่ทดสอบมีการเจริญ

ลดลง วัดการเจริญเฉลี่ยได้ 1.8-2.3 โดย *S. cerevisiae* ที่เปรียบเทียบเจริญดีกว่ายีสต์อื่น ๆ และทุกไอโซเลตไม่เจริญที่อุณหภูมิ 44 °ซ

Kiran Sree และคณะ (2000) ทดลองวัดการเจริญของ *S. cerevisiae* SV1-SV4 ด้วยวิธีเดียวกันนี้ พบว่ามีการเจริญวัดความขุ่นได้ 2.0-2.5 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 42 °ซ ซึ่งการเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่านี้ ยีสต์ที่ทดสอบมีการเจริญลดลง เช่นเดียวกันกับ MIY1 และ MIY57

แม้ว่า MIY1 และ MIY57 จะสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 42 °ซ แต่มีรายงานการศึกษาถึงยีสต์ทนร้อนที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 42 °ซ โดย *S. diastaticus* NO.62 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 °ซ (D'Amore *et al*., 1989) *K. marxianus* var. *marxianus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 47 °ซ (Anderson *et al*., 1986) และ *K. marxianus* IMB1-IMB5 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 50 °ซ (Banat *et al* ., 1992)

จากการทดลองนี้แม้จะพบว่า MIY1 มีการเจริญที่อุณหภูมิ 40 °ซ น้อยกว่าสายพันธุ์อื่นที่ทดสอบ แต่ MIY1 สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส และซูโครสเป็นเอทานอลได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมงในส่วนของการคัดเชื้อ อีกทั้งมีการเจริญที่อุณหภูมิ 42 °ซ ในระดับที่ใกล้เคียงกับ MIY48 และ MIY57 ดังนั้น จึงนำยีสต์ทั้งหมดนี้มาศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในการทดลองต่อไป



รูปที่ 1 การเจริญของยีสต์ MIY1 MIY48 และ MIY57 กับสายพันธุ์เปรียบเทียบ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* ที่อุณหภูมิ 30 35 40 42 และ 44 °ซ ในอาหารเหลว Yeast Malt medium (YM) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.4 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 °ซ

การเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลของยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลต คือ MIY1 MIY48 และ MIY57 กับสายพันธุ์เปรียบเทียบ *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* ในอาหาร YFM ที่มีกลูโคส 15 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 2 MIY57 ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 4.6 % (v/v) คิดเป็น 3.6 % (w/v) รองลงมาคือ MIY1 และ MIY48 ผลิตเอทานอลได้ 4.2 และ 3.7 % (v/v) คิดเป็น 3.3 และ 2.9 % (w/v) ตามลำดับ ซึ่งให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่ายีสต์ที่ใช้เปรียบเทียบทั้ง 2 สายพันธุ์ โดย *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *K. marxianus* ผลิตเอทานอลได้ 3.5 และ 3.0 % (v/v) ตามลำดับ เมื่อพิจารณาดูปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหาร พบว่า MIY57 มีน้ำตาลเหลือเพียง 2.1 % (w/v) น้อยกว่าสายพันธุ์ MIY1 MIY48 และสายพันธุ์เปรียบเทียบทั้ง 2 ทั้งนี้เนื่องจากในการเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิสูงซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เหมาะสมต้องมีการนำสารอาหารมาใช้ในการเจริญและสร้างเซลล์เพิ่มขึ้น

(Walker, 1998) ทำให้ยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบซึ่งมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 30-35 °ซ ต้องนำน้ำตาลไปใช้สำหรับการเจริญมากกว่าใช้ในการผลิตเอทานอล

นอกจากนี้ ความสามารถในการหมักน้ำตาลเป็นเอทานอลของยีสต์ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ เช่น รายงานของ Hacking และคณะ (1984) พบว่า *Candida pseudotropicalis*, *S. cerevisiae* และ *K. uvarum* ผลิตเอทานอลได้สูงกว่า 8 % (v/v) จากกลูโคส 140 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 °ซ มากกว่าที่ MIY1 และ MIY57 ผลิตได้ในเวลา 72 ชั่วโมง เท่ากัน

เมื่อเปรียบเทียบกับการคัดเลือกของ D'Amore และคณะ (1989) พบว่า คัดได้ยีสต์ทนร้อน *S. diastaticus* No.62, *S. cerevisiae* No.67, *Saccharomyces* fusion product No.1400 และ *K. marxianus* 1510 ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่า 4 % (w/v) จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งใช้ปริมาณกลูโคสและอุณหภูมิเท่ากับในการทดลองนี้ แต่เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลในหน่วยเดียวกัน MIY1 และ MIY57 มีการผลิตเอทานอลได้น้อยกว่า 4 % (w/v)

จากการทดลองนี้ พบว่า MIY48 ผลิตเอทานอลได้ 3.7 % (v/v) ต่ำกว่า MIY1 และ MIY57 ซึ่งผลิตเอทานอลได้สูงกว่า 4 % (v/v) ยิ่งไปกว่านั้น MIY48 มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหารมากกว่า MIY1 และ MIY57 แม้จะใช้เวลาในการหมักนานถึง 72 ชั่วโมง เห็นได้ว่า MIY48 ผลิตเอทานอลได้น้อยกว่า MIY57 ทั้งที่ในขั้นตอนของการคัดเชื้อ ยีสต์ทั้งสองหมักน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลภายในเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากัน ดังนั้นเลือกจึงนำยีสต์ MIY1 และ MIY57 มาศึกษาต่อ โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 เพียง 1 สายพันธุ์เป็นตัวเปรียบเทียบ เนื่องจากมีการเจริญและผลิตเอทานอลดีกว่า *K. marxianus*

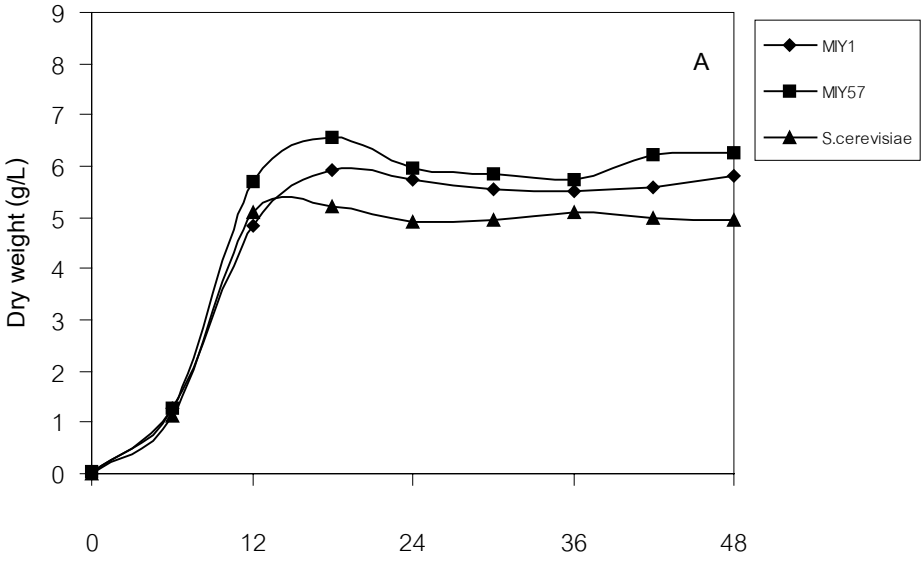
2.5 การเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนที่อุณหภูมิ 40 °ซ

การเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ MIY1 และ MIY57 เทียบกับ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร YFM ที่มีกลูโคส 15 % ที่เวลาต่าง ๆ แสดงดังรูปที่ 3(A) และ 3(B) ยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลตมีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ โดย MIY57 มีการเจริญสูงกว่า MIY1 และ *S. cerevisiae* วัดการเจริญสูงสุดจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 6.6 5.9 และ 5.2 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาถึง เวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และน้ำตาลที่เหลือของยีสต์ MIY1 และ MIY57 เทียบกับ *S. cerevisiae* พบว่า ที่เวลา 12 ชั่วโมง MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* ผลิตเอทานอลได้ 2.2 2.4 และ 2.4 % (v/v) ตามลำดับ โดยมีน้ำตาลเหลืออยู่ในช่วง 5.6-7.0 % ยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลต มีการผลิตเอทานอลและน้ำตาลที่เหลือใกล้เคียงกันในแต่ละช่วงเวลาที่ทดสอบ แต่มีปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ช่วงเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยผลิตเอทานอลได้ในช่วง 3.6-4.5 % (v/v) และมีน้ำตาลเหลือ 2.3-3.1 % (w/v) โดย MIY57 ผลิตเอทานอลได้สูงกว่า MIY1 และ *S. cerevisiae* ที่ใช้เปรียบเทียบ

ทั้งนี้การที่ยีสต์มีการผลิตเอทานอลได้น้อยที่เวลา 12 ชั่วโมง อาจเนื่องมาจากยีสต์ยังเจริญอยู่ในระยะ log ซึ่งเป็นระยะที่ยีสต์นำสารอาหารไปใช้ในการสร้างเซลล์มากกว่านำไปใช้ผลิตเอทานอล สอดคล้องกับผลการทดลองในส่วนของการคัดเชื้อพบว่ายีสต์ MIY1 และ MIY57 หมักน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้ภายในเวลา 24 ชั่วโมง การผลิตเอทานอลจึงใกล้เคียงกัน

เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลของ MIY1 และ MIY57 กับรายงานที่ผ่านมาแสดงดังตารางที่ 4



รูปที่ 3 การเจริญ(A) การผลิตเอทานอล และน้ำตาลที่เหลือ(B) ของยีสต์ MIY1 MIY57 และสายพันธุ์เปรียบเทียบ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีกลูโคส 15 % พีเอชเริ่มต้น 5.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ

สายพันธุ์	ปริมาณเอทานอล			สภาวะที่ใช้	อ้างอิง
	% (v/v)	% (w/v)	g/l		
MIY1	4.0	3.1	31	กลูโคส 15 %, อุณหภูมิ 40 °ซ เวลา 48 ชั่วโมง	การทดลองนี้
MIY57	4.5	3.5	35	กลูโคส 15 %, อุณหภูมิ 40 °ซ เวลา 48 ชั่วโมง	การทดลองนี้
S. cerevisiae TISTR 5048	4.0	3.1	31	กลูโคส 15 %, อุณหภูมิ 40 °ซ เวลา 48 ชั่วโมง	การทดลองนี้
K. marxianus var. *marxianus*	-	>6	-	กลูโคส 15 %, อุณหภูมิ 39 °ซ เวลา 36 ชั่วโมง	Anderson และคณะ (1986)
S. diastaticus No.62	-	>6	-	กลูโคส 15 %, อุณหภูมิ 40 °ซ เวลา 24 ชั่วโมง	D'Amore และคณะ (1989)
S. cerevisiae SV1-SV4	-	-	45-46	กลูโคส 15 %, อุณหภูมิ 40 °ซ เวลา 48 ชั่วโมง	Kiran Sree และคณะ (2000)

MIY1 และ MIY57 มีการผลิตเอทานอลได้น้อยกว่า *S. cerevisiae* SV1-SV4 เมื่อเปรียบเทียบที่สภาวะเดียวกัน โดย MIY1 และ MIY57 ผลิตเอทานอลได้เพียง 31 และ 35 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ *S. cerevisiae* SV1-SV4 ผลิตเอทานอลได้ 45-46 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ยังพบว่า *S. diastaticus* No.62 (D'Amore *et al*., 1989) และ *K. marxianus* var. *marxianus* (Anderson

et al., 1986) ใช้เวลาในการผลิตเอทานอลน้อยกว่าแต่มีการผลิตเอทานอลมากกว่า MIY1 และ MIY57

จากการทดลองนี้ จึงนำยีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่เปรียบเทียบและมาศึกษาต่อในเรื่องของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่คัดเลือกได้

3.1 ความเข้มข้นที่เหมาะสมของน้ำตาลกลูโคส กากน้ำตาล และยีสต์สกัด

3.1.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และกากน้ำตาล

จากการศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ MIY1 MIY57 และ ยีสต์สายพันธุ์เปรียบเทียบ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร YFM เติมแหล่งคาร์บอนต่างกัน 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และกากน้ำตาลที่มีระดับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในอาหาร 3 ระดับ คือ 10 15 และ 20 % พีเอช 5.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ยีสต์ MIY1 (รูปที่ 4 A) มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรก วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 5.3 5.5 และ 5.5 กรัม/ลิตร ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 10 15 และ 20 % ตามลำดับ หลังจาก 18 ชั่วโมง การเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ มีการเจริญใกล้เคียงกันทุกความเข้มข้นของน้ำตาลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมง วัดน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ 6.9 6.8 และ 6.2 กรัม/ลิตร ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 10 15 และ 20 % ตามลำดับ

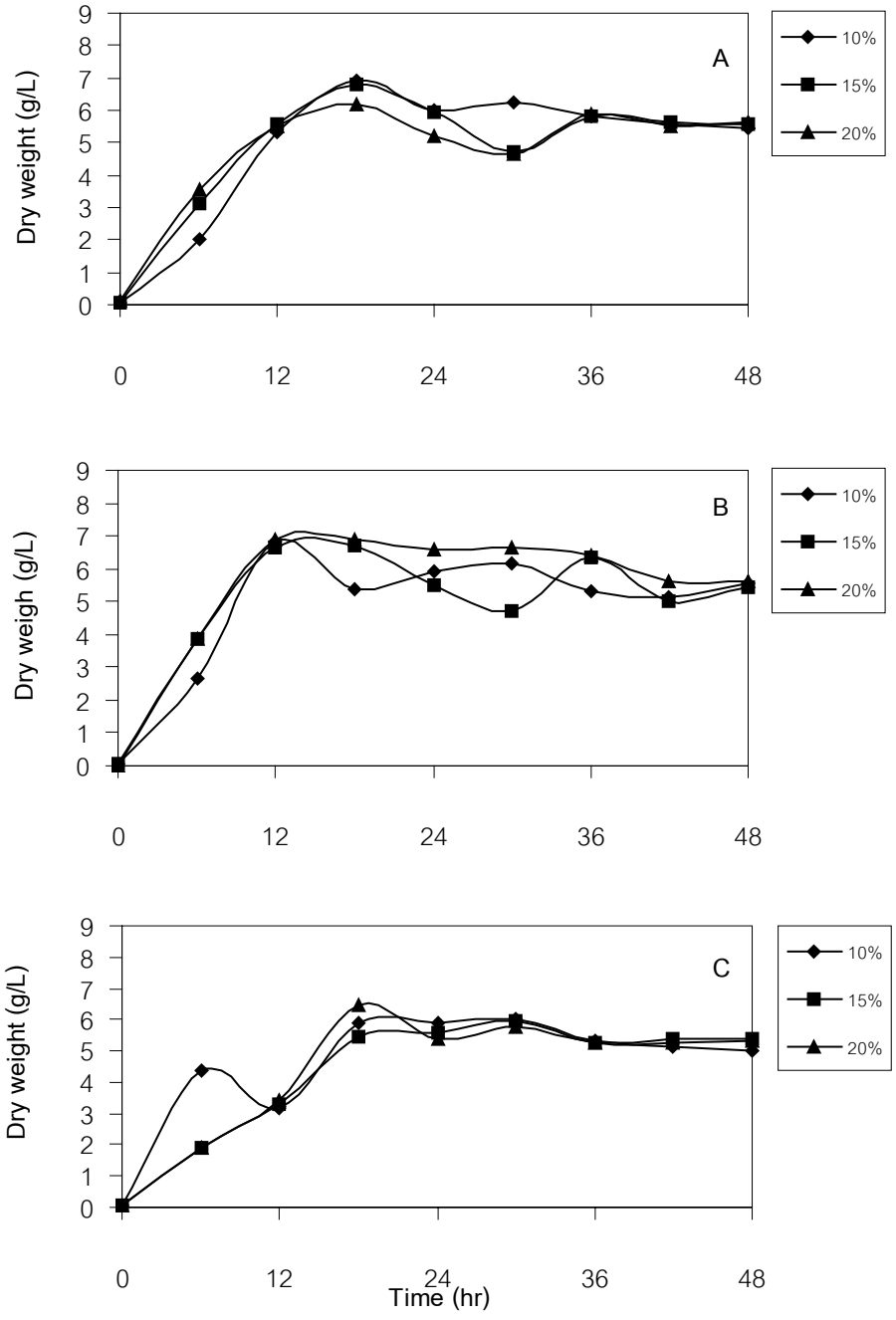
การเจริญของ MIY57 แสดงดังรูปที่ 4(B) พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกเช่นเดียวกับ MIY1 และมีการเจริญสูงสุดที่เวลานี้ วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 6.8 6.6 และ 6.9 กรัม/ลิตร ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 10 15 และ 20 % ตามลำดับ หลังจากเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง การเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่และมีเจริญใกล้เคียงกันในทุกระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้ทดสอบที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

การเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5048 (รูปที่ 4 C) มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 18 ชั่วโมงแรก วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 5.9 5.4 และ 6.5 กรัม/ลิตร ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 10 15 และ 20 % ตามลำดับ หลังจากนั้นการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่และมีการเจริญใกล้เคียงกันในทุกระดับความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้ทดสอบ เช่นเดียวกับMIY1 และ MIY57

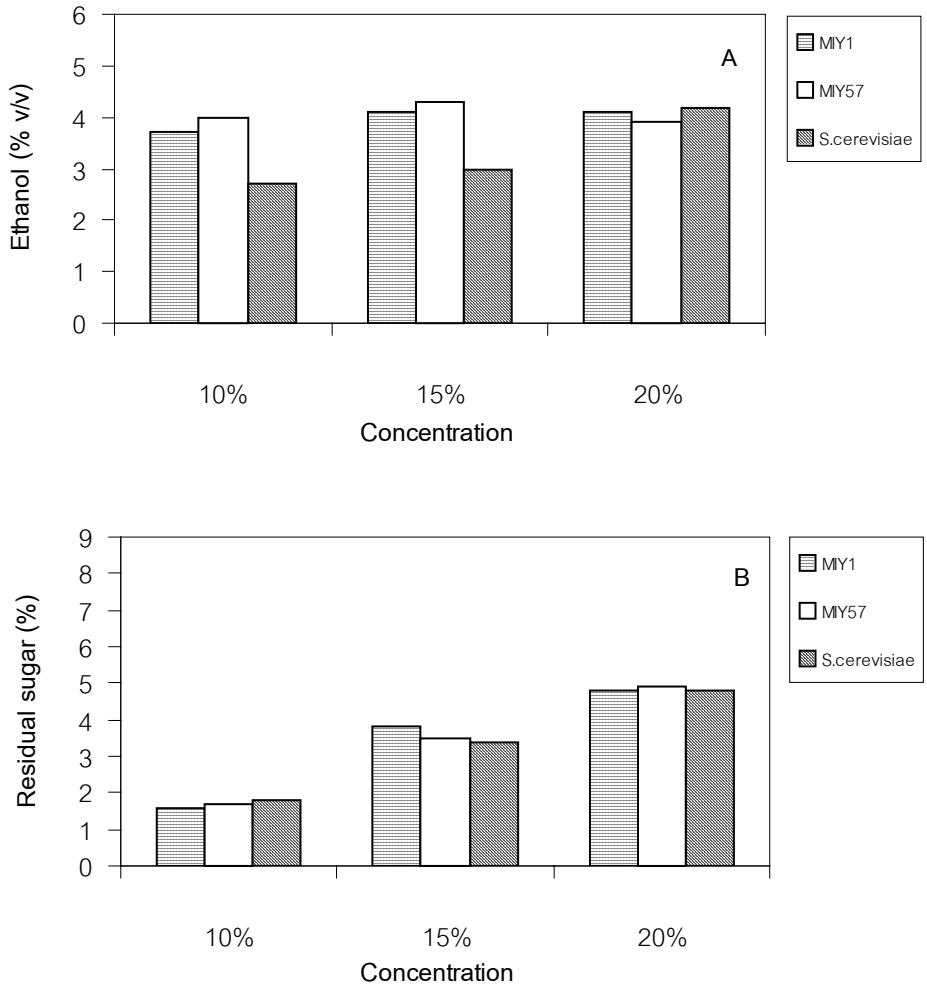
เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ MIY1 และ MIY57 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5048 พบว่า MIY1 และ MIY57 มีการเจริญเร็วกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก โดยทั้ง MIY1 และ MIY57 มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 เกือบเท่าตัวที่ช่วงเวลานี้ แต่เมื่อเลี้ยงยีสต์เป็นเวลานานขึ้น (หลัง 18 ชั่วโมง) ยีสต์ทั้ง 3 ชนิดมีการเจริญใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบการเจริญระหว่าง MIY1 กับ MIY57 พบว่า MIY57 มีการเจริญเร็วกว่า MIY1 ในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรก เมื่อพิจารณาจากน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่เมื่อการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ทั้ง MIY1 และ MIY57 มีการเจริญใกล้เคียงกันทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ทดสอบ

การผลิตเอทานอลของ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 แสดงดังรูปที่ 5 (A) พบว่า MIY1 ผลิตเอทานอลได้ 4.1 % (v/v) เท่ากันในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 15 และ 20 % MIY57 ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 4.3 % (v/v) จากอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 15 % และมีการผลิตเอทานอลลดลงเมื่อใช้อาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 20 % ส่วน *S. cerevisiae* TISTR 5048 ผลิตเอทานอลสูงสุด 4.2 % (v/v) จากอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20 % โดยทั้ง MIY1 และ MIY57 ผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 และ 15 % และเมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลของ MIY1 และ MIY57 พบว่า ยีสต์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีการผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 15 % โดย MIY57 สามารถผลิตเอทานอลได้ 4.3 % (v/v) สูงกว่าเอทานอลที่ MIY1 ผลิตได้ (4.1%(v/v))

เมื่อตรวจวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหาร (รูปที่ 5 B) พบว่ายีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisia* TISTR 5048 ใช้น้ำตาลในกระบวนการเจริญและผลิตเอทานอลในระดับที่ใกล้เคียงกันในแต่ละระดับของน้ำตาล โดยมีน้ำตาลเหลืออยู่ในอาหารมากสุด (4.8-4.9 % (w/v)) ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเข้มข้น 20 % รองลงมาคือ ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 15 % (3.4-8.8 % (w/v)) และมีน้ำตาลเหลืออยู่ในอาหารน้อยที่สุดในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 10 % (1.6-1.8 % (w/v)) ซึ่งเมื่อพิจารณาในแง่ของการผลิตแล้ว การใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20 % ในการผลิตเอทานอลไม่คุ้มทุน เพราะนอกจากมีน้ำตาลเหลืออยู่ในอาหารมากแล้วยังให้ผลผลิตเอทานอลใกล้เคียงกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 15 % ซึ่งการใช้ปริมาณน้ำตาลสูงขึ้นแต่ยีสต์ยังผลิตเอทานอลได้เท่าเดิมนี้ อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของน้ำตาลส่งผลให้ยีสต์นำน้ำตาลไปใช้ในการสร้างเซลล์มากกว่านำไปใช้ในการผลิตเอทานอล ผลผลิตเอทานอลที่ได้จึงใกล้เคียงกัน



รูปที่ 4 การเจริญของยีสต์ MIY1(A) MIY57(B) และ *S. cerevisiae* TISTR 5048(C) ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีกลูโคส 10 15 และ 20 % พีเอช 5.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 5 การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส(A) และน้ำตาลที่เหลือ(B) ของยีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีน้ำตาลเข้มข้น 10 15 และ 20 % พีเอช 5.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ยีสต์ MIY1 และ MIY57 ผลิตเอทานอลได้จะน้อยกว่าที่มีรายงานไว้ เมื่อเปรียบเทียบในการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากัน หรือใกล้เคียงกัน และอุณหภูมิเดียวกัน แต่เชื้อที่ใช้ต่างกัน (Anderson *et al*., 1986; Hacking *et al*., 1984; D'Amore *et al*., 1989)

การใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ยีสต์ MIY1 (รูปที่ 6 A) มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงแรก วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 3.7 กรัม/ลิตร ในทุกความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ หลังจาก 18 ชั่วโมง การเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ โดยมีการเจริญที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงใกล้เคียงกันทุกความเข้มข้นของน้ำตาลที่ทดสอบ โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย 4.7-4.8 กรัม/ลิตร

การเจริญของ MIY57 (รูปที่ 6 B) พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 3.7 3.4 และ 3.2 กรัม/ลิตร ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลเข้มข้น 10 15 และ 20 % ตามลำดับ หลังจากนั้นการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ มีการเจริญที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงใกล้เคียงกันทุกความเข้มข้นของน้ำตาลที่ทดสอบ ได้น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย 4.9-5.4 กรัม/ลิตร

การเจริญของ *S. cerevisia* TISTR 5048 (รูปที่ 6 C) มีการเจริญได้ดีใน 12 ชั่วโมงแรกของการทดลอง โดยมี การเจริญสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง วัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 5.6 5.7 และ 5.6 กรัม/ลิตร ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลเข้มข้น 10 15 และ 20 % ตามลำดับ หลังจากนั้นจนครบ 48 ชั่วโมง การเจริญลดลงเล็กน้อย

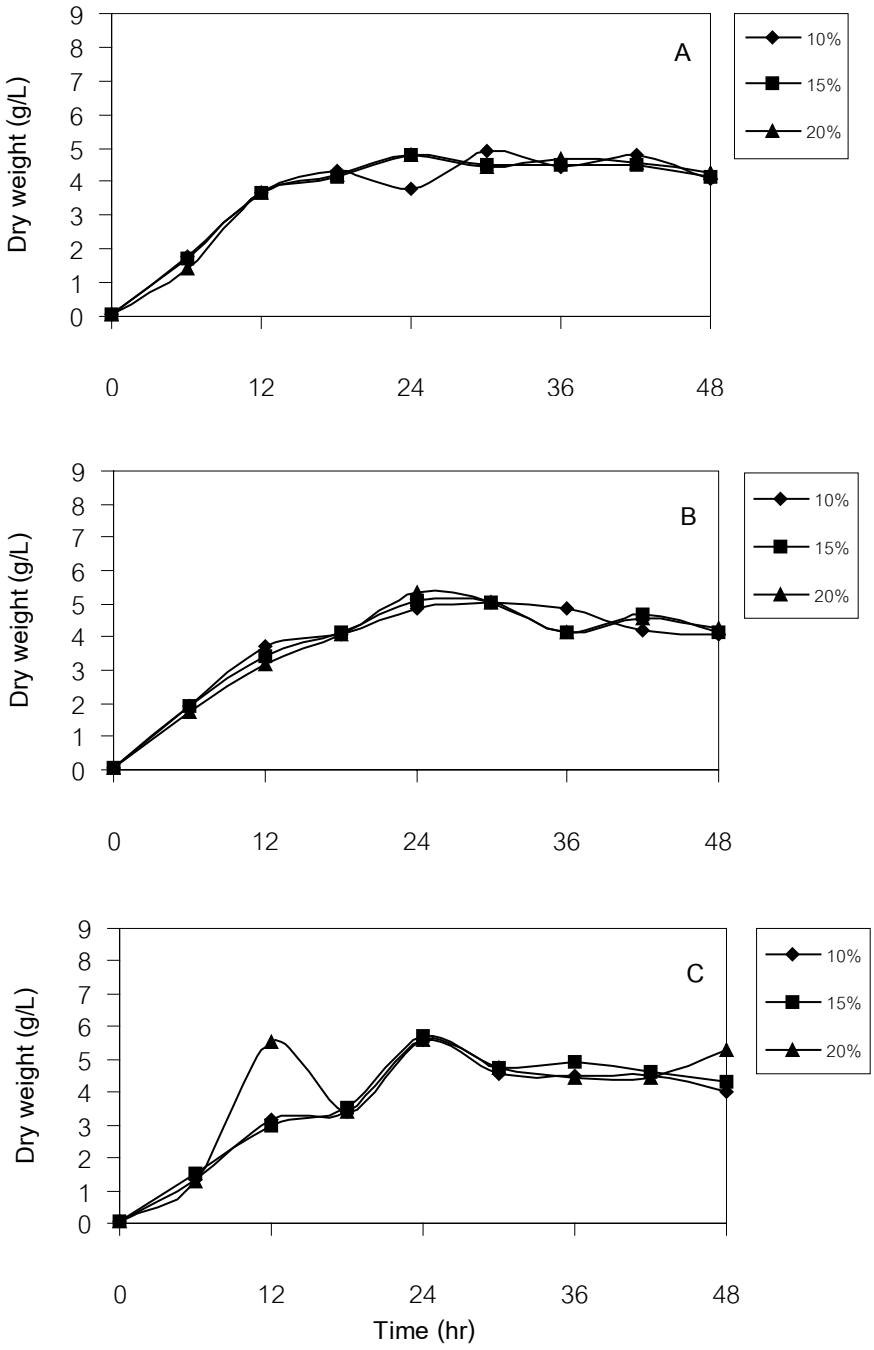
เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ MIY1 และ MIY57 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในการที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนใน 18 ชั่วโมงแรก พบว่า MIY1 และ MIY57 มีการเจริญดีกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในทุกความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ใช้ แต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง *S. cerevisiae* TISTR 5048 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่า MIY1 และ MIY57

การผลิตเอทานอล และน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในกากน้ำตาลแสดงดังรูปที่ 7(A) และ 7(B) พบว่า MIY1 ผลิตเอทานอลได้ 3 2.8 และ 4 % (v/v) ในอาหารที่มีน้ำตาลในกากน้ำตาลเข้มข้น 10 15 และ 20 % ตามลำดับ MIY57 ผลิตเอทานอลได้ 3.7 2.8 และ 4 % (v/v) ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 10 15 และ 20 % ตามลำดับ ส่วน *S. cerevisiae* TISTR 5048 ผลิต เอทานอลได้ 2.7 3 และ 4.2 % (v/v) ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาล 10 15 และ 20 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลของ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 พบว่า ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 10 และ 15 % ยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลตที่ทดสอบ ยกเว้น MIY57 มีการ

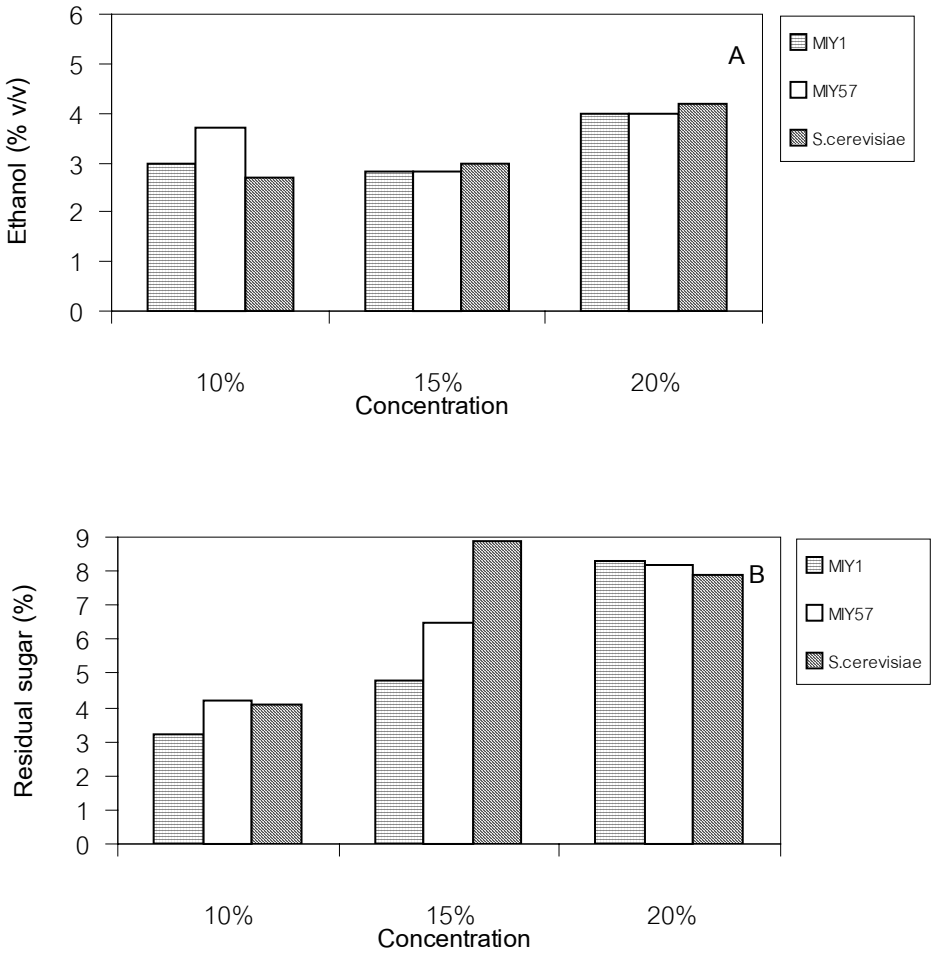
ผลิตเอทานอลไม่ต่างกัน และทั้ง 3 ไอโซเลต ผลิตเอทานอลได้สูงสุด แต่ใกล้เคียงกัน ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 20 %

เมื่อตรวจวัดน้ำตาลที่เหลือในอาหาร พบว่าการใช้อาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้มีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่ในอาหารมากขึ้น โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่น้อยสุด (3.2-4.2 % (w/v)) ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 10 % รองลงมาคือ ที่กากน้ำตาลเข้มข้น 15 % (4.8-8.9 % (w/v)) และมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่มากสุด (7.9-8.3 % (w/v)) ในอาหารที่มีกากน้ำตาลเข้มข้น 20 % ซึ่งทั้ง MIY1 และ MIY57 มีการผลิตเอทานอลได้ต่ำกว่ารายงานที่ผ่านมา โดย Kiransree และคณะ (2000) ใช้กากน้ำตาล 14 % (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า *S. cerevisiae* SV1 และ *S. cerevisiae* SV3 สามารถผลิตเอทานอลได้ 30 และ 45 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ส่วน *K. marxianus* IMB1-IMB5 ผลิตเอทานอลได้ 6.5-7.0 % (w/v) จากกากน้ำตาล 16 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ (Banat *et al*., 1992) นอกจากนี้ *K. marxianus* IMB3 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 8.5 % (v/v) จากกากน้ำตาลเข้มข้น 23 % (v/v) ที่อุณหภูมิ 45 °ซ (Gough *et al*., 1996) เมื่อมีการเติมสารอาหารต่าง ๆ เช่น โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แมงกานีส และกรดไขมันลงในอาหารจึงส่งเสริมให้ยีสต์ดังกล่าวมีการผลิตเอทานอลได้ดีขึ้น

สรุปโดยรวมถึงการเจริญและผลิตเอทานอลของยีสต์ พบว่า MIY57 เจริญและผลิตเอทานอลได้ดีกว่า MIY1 ทั้งในอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสและกากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน แม้ว่า MIY1 และ MIY57 จะผลิตเอทานอลได้เท่ากันในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลเข้มข้น 15 และ 20 % ก็ตาม แต่ทั้ง 2 สายพันธุ์ รวมถึงสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบสามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญและการผลิตเอทานอลได้ดีกว่าการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยพบว่า มีปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่ในอาหารที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนมากกว่าน้ำตาลที่เหลือในอาหารที่ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนถึง 2 เท่า การที่ยีสต์ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบมีการเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีในอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน อาจเนื่องมาจากกลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว อีกทั้งกากน้ำตาลมีองค์ประกอบที่ซับซ้อน มีทั้งน้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้และนำไปใช้ไม่ได้ มีแร่ธาตุต่างๆ เช่น ไนโตรเจน และฟอสเฟตในปริมาณที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการในการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ นอกจากนี้กากน้ำตาลอาจมีผลในการยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล (สาวิตรี, 2540; Lachance, 1990; Panchal and Tavares; 1990) เห็นได้ว่าการผลิตเอทานอลของ MIY1 และ MIY57 ทั้งในน้ำตาลกลูโคสและกากน้ำตาลทุกความเข้มข้น



รูปที่ 6 การเจริญของยีสต์ MIY1(A) MIY57(B) และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 (C) ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีน้ำตาลในกากน้ำตาลความเข้มข้น 10 15 และ 20 % พีเอช 5.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 7 การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล(A) และน้ำตาลที่เหลือ(B) ของยีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีน้ำตาลเข้มข้น 10 15 และ 20 % พีเอช 5.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ต่ำกว่างานวิจัยที่ผ่านมา ทั้งนี้เป็นเพราะความสามารถในการทนร้อน และการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิด รวมทั้งสายพันธุ์ยีสต์และสภาพแวดล้อมที่ยีสต์อาศัย อีกทั้งการทดลองผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ทนร้อนส่วนใหญ่ เป็นยีสต์ที่ใช้อุณหภูมิในการคัดแยกสูงกว่า 40 °ซ ดังนั้นจึงน่าจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ยีสต์ทนร้อนที่เคยมีรายงานมาผลิตเอทานอลได้ดีกว่า MIY1 และ MIY57

ผลการทดลองนี้พบว่า แม้ยีสต์จะมีการเจริญได้ดีแต่ผลผลิตเอทานอลไม่ได้เป็นไปตามทฤษฎี ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิในการเจริญและผลิตเอทานอลไม่เหมาะสมซึ่งยีสต์โดยทั่วไปจะเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 °ซ (Banat *et al*., 1992) แต่อุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองนี้สูงถึง 40 °ซ อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวมีผลต่อสัณฐานวิทยา และความอยู่รอดของเซลล์ยีสต์ที่เจริญในระยะ exponential จะมีความทนทานต่ออุณหภูมิสูงน้อยกว่ายีสต์ที่อยู่ในระยะ stationary และพบว่าอุณหภูมิสูงมีผลทำให้การแตกหน่อของยีสต์ผิดปกติ ผนังเซลล์เจริญไม่สมบูรณ์ การเพิ่มขนาดของเซลล์ผิดปกติ มีปริมาณของเหลวในเซลล์เพิ่มขึ้น ความสามารถในการเลือกผ่านของสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง ลดกรดไขมันไม่อิ่มตัวในเมมเบรนทำให้ความทนต่ออุณหภูมิสูงของเซลล์ลดลง ทำลายพันธะไฮโดรเจนทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิคเสื่อมสภาพ ขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิด เมื่อมีการสังเคราะห์โปรตีนลดลงส่งผลให้กิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ยีสต์ลดลงด้วย นอกจากนี้ยังยับยั้งกระบวนการหายใจและกระบวนการหมัก (Walker, 1998) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการหมักจะสูงกว่าอุณหภูมิสำหรับการเจริญ 5-10 °ซ ดังนั้นการนำยีสต์มาผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ จึงทำให้เอทานอลที่ผลิตได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิปกติ ทั้งนี้เนื่องจากเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับการออกซิเดชั่น 4 ชนิด ถูกยับยั้ง ทำให้เกิดการสะสมของไพรูเวตและเอทานอล (สาวิตรี, 2540)

จากผลการทดลองนี้ พบว่า ยีสต์ทุกไอโซเลตที่แยกได้ผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกันทุกความเข้มข้นของกลูโคสที่ทดสอบ เมื่อพิจารณาในแง่ของค่าใช้จ่ายในการผลิตและความเป็นไปได้ในการผลิตแล้ว ยีสต์มีผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่น้ำตาลกลูโคส 15 % ดังนั้นจึงเลือกใช้น้ำตาลกลูโคส 15 % ในการศึกษาต่อในเรื่องของยีสต์สกัด เพื่อให้มีปริมาณคาร์บอนเพียงพอ เนื่องจากมีรายงานว่าไนโตรเจนช่วยส่งเสริมการสร้างเซลล์และการผลิตเอทานอลของยีสต์

3.1.2 ผลของยีสต์สกัดต่อการผลิตเอทานอล

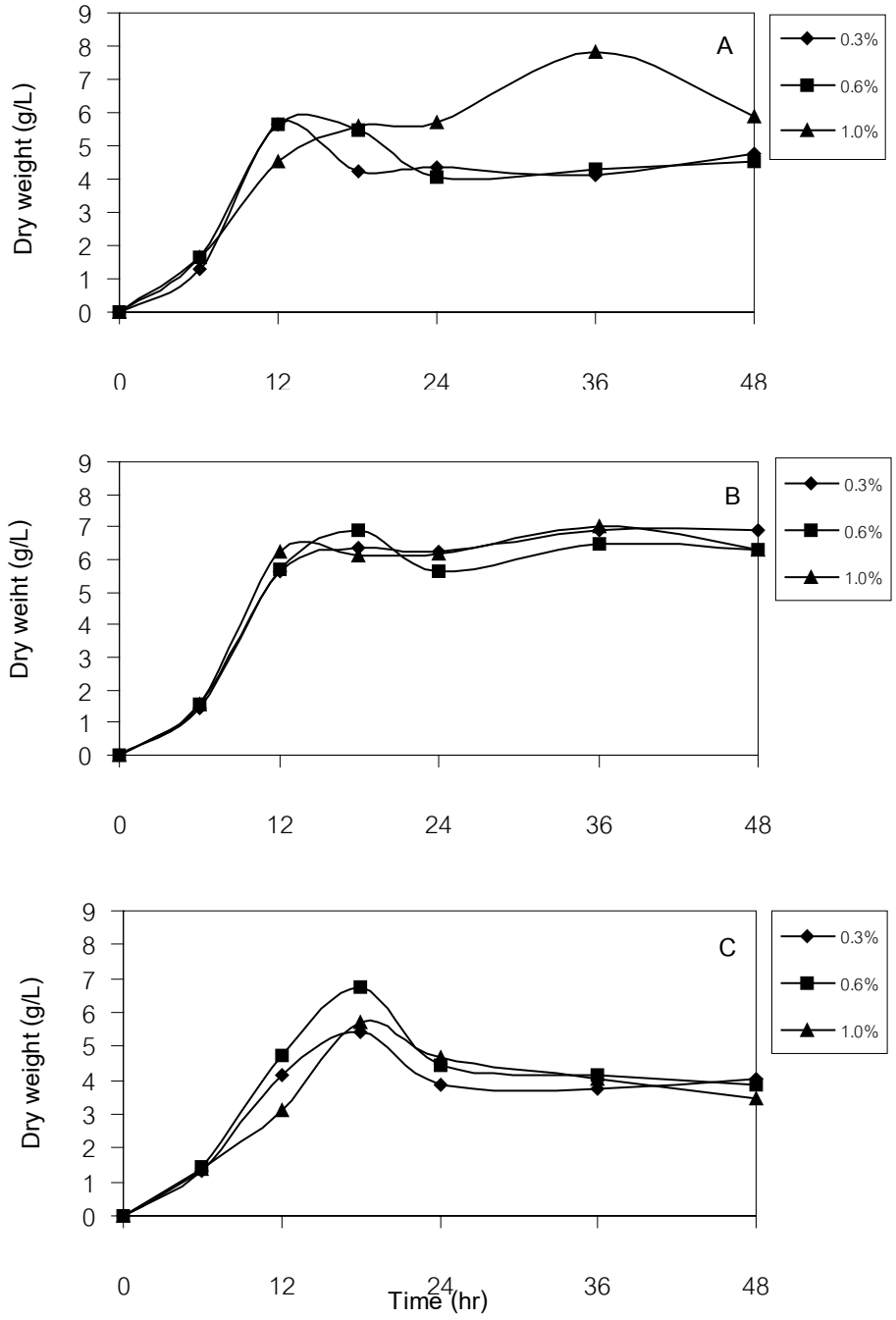
การศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ MIY1 MIY57 และยีสต์สายพันธุ์เปรียบเทียบ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15 % เมื่อใช้ปริมาณยีสต์สกัด 3 ระดับ คือ 0.3 0.6 และ 1.0 % พีเอช 5.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงใน รูปที่ 8 และ 9

MIY1 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 12 ชั่วโมง (รูปที่ 8 A) วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 5.7 5.6 และ 4.5 กรัม/ลิตร ในอาหารที่มียีสต์สกัด 0.3 0.6 และ 1.0 % ตามลำดับ หลังจาก 18 ชั่วโมง การเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ การเจริญอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกันที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ในอาหารที่เติมยีสต์สกัด 0.3 และ 0.6 % แต่มีการเจริญเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 36 ชั่วโมง เมื่อใช้ยีสต์สกัด 1.0 % วัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 7.5 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นการเจริญลดลงที่เวลา 48 ชั่วโมง

MIY57 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ MIY1 วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้สูงสุด 6.4 6.9 และ 6.1 กรัม/ลิตร ที่ 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ โดยมีการเจริญใกล้เคียงกันที่ระดับของยีสต์สกัด 0.3 และ 1.0 % การเจริญลดลงเล็กน้อยที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อใช้ยีสต์สกัด 0.6 % (รูปที่ 8 B)

ส่วน *S. cerevisiae* TISTR 50 มีการเจริญในช่วง 12 ชั่วโมงแรกน้อยกว่า MIY1 และ MIY57 การเจริญสูงสุดพบได้ใน 18 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งได้ 5.4 6.8 และ 5.7 กรัม/ลิตร เมื่อใช้ปริมาณยีสต์สกัด 0.3 0.6 และ 1 % ตามลำดับ (รูปที่ 8 C) หลังจากนั้นการเจริญจะลดลงเล็กน้อย

เปรียบเทียบการเจริญของ MIY1 และ MIY57 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5048 พบว่า MIY1 และ MIY57 มีการเจริญเร็วกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกทุกความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ใช้ทดสอบ โดย MIY57 มีการเจริญดีกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ทุกความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ทดสอบทุกช่วงเวลา ในขณะที่ MIY1 มีการเจริญสูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ทุกระดับของยีสต์สกัดที่ใช้ เมื่อเปรียบเทียบการเจริญระหว่าง MIY1 กับ MIY57 พบว่าแม้ MIY1 จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 36 ชั่วโมง มากกว่า MIY57 ที่ปริมาณยีสต์สกัด 1 % แต่เมื่อพิจารณาแนวโน้มในการเจริญจะเห็นได้ว่า MIY57 มีการเจริญดีกว่า MIY1 ทุกความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ใช้ทดสอบ



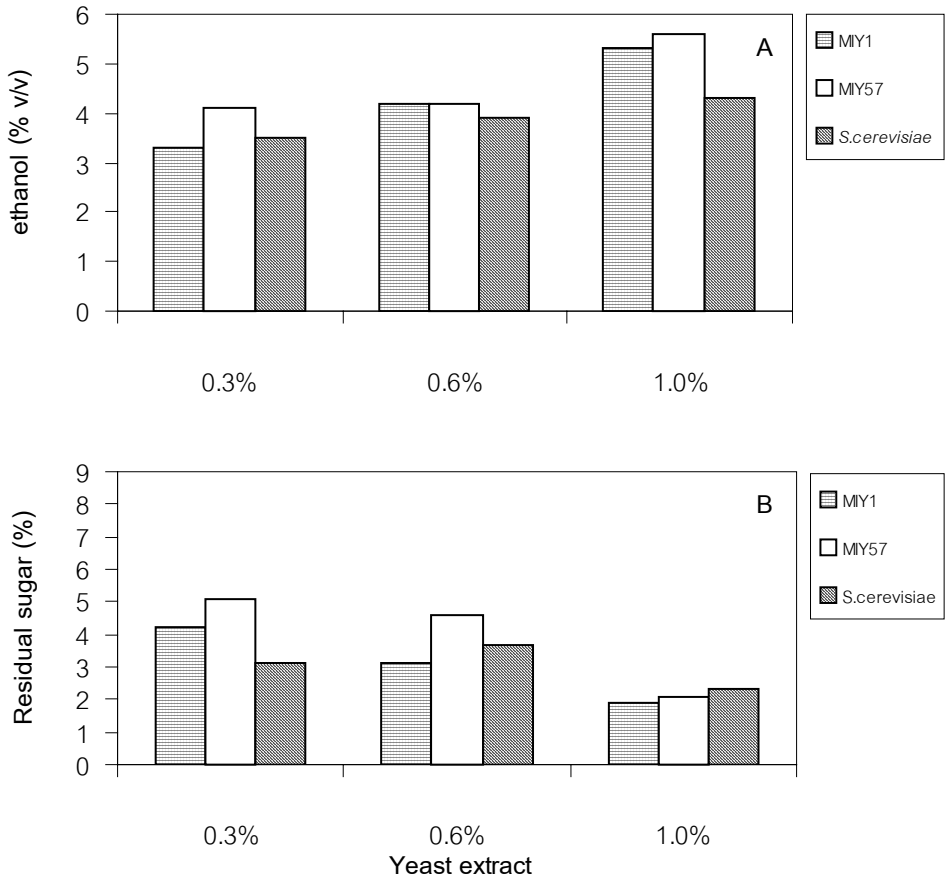
รูปที่ 8 การเจริญของยีสต์ MIY1(A) MIY57(B) และ *S. cerevisiae* TISTR 5048(C) ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 15 % เติมยีสต์สกัด 0.3 0.6 และ 1.0 % พีเอช 5.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การผลิตเอทานอลของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ (รูปที่ 9 A) จะเพิ่มขึ้นเมื่อใช้ปริมาณยีสต์สกัดสูงขึ้น โดย MIY57 ผลิตเอทานอลได้ดีกว่า กับ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ทุกความเข้มข้นของยีสต์ที่ทดสอบ ในขณะที่ MIY1 ผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 เมื่อใช้ยีสต์สกัด 0.6 และ 1.0 % แต่ผลิตเอทานอลได้น้อยกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 เล็กน้อยที่ยีสต์สกัด 0.3 %

MIY57 และ MIY1 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากันที่ปริมาณยีสต์สกัด 0.6 % แต่ MIY57 ผลิตเอทานอลได้ดีกว่า MIY1 เมื่อใช้ปริมาณยีสต์สกัด 0.3 และ 1.0 % โดย MIY57 และ MIY1 ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 5.6 และ 5.3 % (v/v) เมื่อเติมยีสต์สกัด 1.0 % ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหาร พบว่า มีน้ำตาลเหลืออยู่ในอาหารมากสุดในอาหารที่เติมยีสต์สกัด 0.3 % (3.1-5.1 % (w/v)) รองลงมาคือ ยีสต์สกัด 0.6 % (3.1-4.6 % (w/v)) และมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในอาหารน้อยที่สุดในอาหารที่เติมยีสต์สกัด 1.0 % (1.9-2.3 % (w/v))

ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์เมื่อใช้ยีสต์สกัด 1.0 % พบว่า MIY1 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีการเจริญสูงที่ 36 ชั่วโมง ซึ่งการเจริญที่เพิ่มขึ้นนี้อาจมีผลทำให้ยีสต์มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น ในขณะที่ *S. cerevisiae* TISTR 5048 มีการเจริญลดลงหลัง 18 ชั่วโมง ทำให้มีผลผลิตเอทานอลน้อยกว่า MIY1 และ MIY57 ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณยีสต์สกัดมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ ทั้งนี้เนื่องจากไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญในการสร้างโปรตีนของเซลล์ ผนังเซลล์ของยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 10 % ของน้ำหนักแห้ง (Walker, 1998 ดังนั้นยีสต์สกัดจึงเป็นแหล่งวิตามินที่สำคัญช่วยในการเจริญ แบ่งเซลล์ และฟื้นฟูความสามารถในการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ (สืบศักดิ์ และคณะ, 2547; Dombek and Ingram, 1986) ยีสต์สกัดช่วยส่งเสริมให้ยีสต์มีการใช้น้ำตาลได้ดีขึ้น สอดคล้องกับการทดลองที่ใช้เชื้อ *S. diastaticus* NO.62 ผลิตเอทานอลจากอาหาร PYN ที่มียีสต์สกัด 0.3 % เทียบกับอาหาร PYN ที่เพิ่มส่วนประกอบของอาหารเป็น 2 เท่า (มียีสต์สกัด 0.6 %) พบว่าเมื่อใช้อาหาร PYN ที่เพิ่มส่วนประกอบของอาหารเป็น 2 เท่า ยีสต์มีการผลิตเอทานอลสูงขึ้นและมีการบริโภคน้ำตาลอย่างสมบูรณ์ โดยผลิตเอทานอลได้ 7.0 และ 9.1 % (w/v) ตามลำดับ จากน้ำตาลกลูโคส 200 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 ^{o}ซ (D'Amore *et al*., 1989) ผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ปริมาณของยีสต์สกัดในอาหารมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล จึงเลือกใช้ยีสต์สกัด 1.0 % ในการทดลองต่อไปเพื่อให้มีสัดส่วนของไนโตรเจนในปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการในการเจริญและผลิตเอทานอลของยีสต์



รูปที่ 9 การผลิตเอทานอล(A) และน้ำตาลที่เหลือ(B) ของยีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 15 % เติมยีสต์สกัด 0.3 0.6 และ 1 % พีเอช 5.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอล

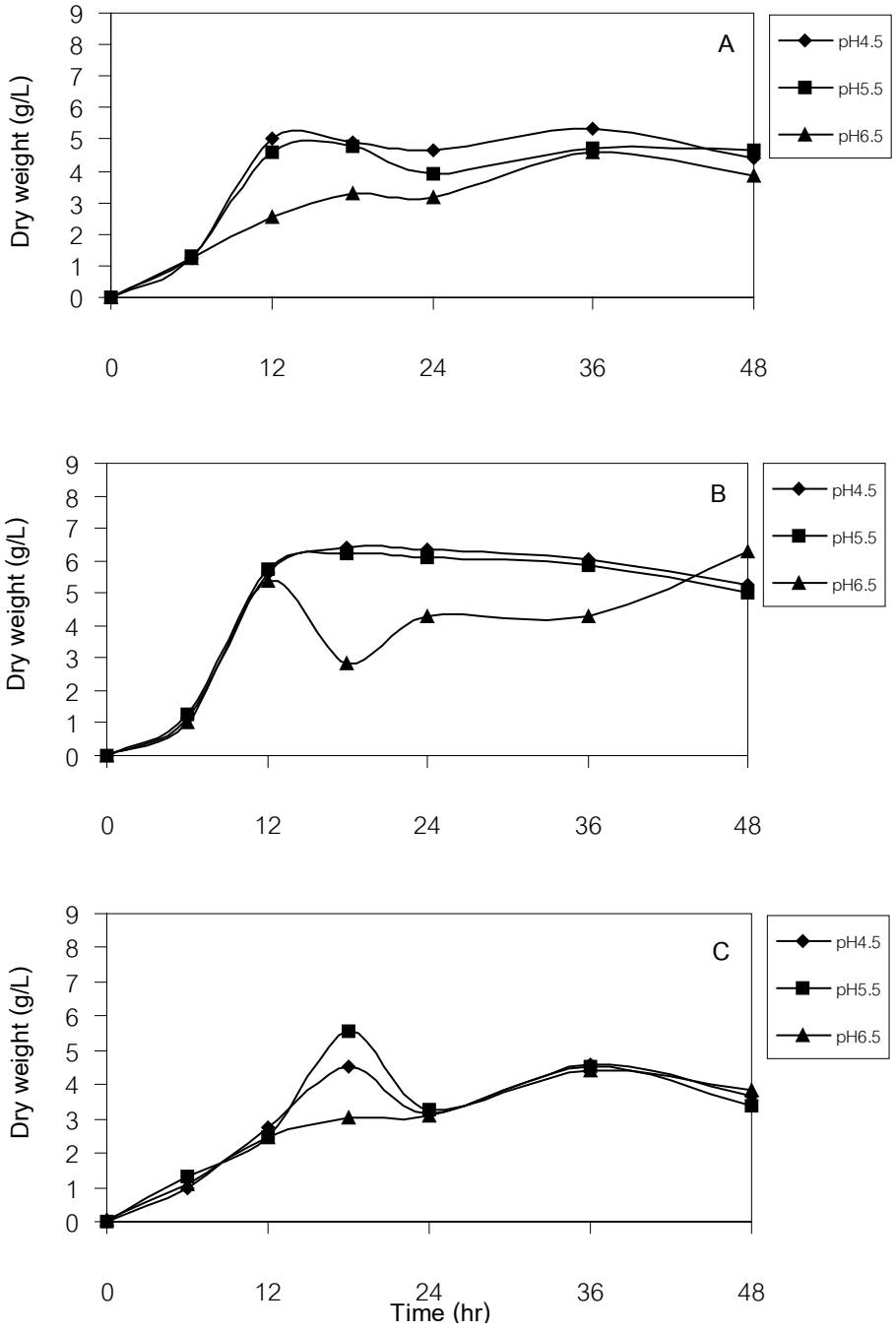
จากการทดลองหาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง และการผลิตเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ ในอาหาร YFM ที่มีกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.5 5.5 และ 6.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 °ซ พบว่า ที่พีเอช 4.5 และ 5.5 MIY1 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมง มีการเจริญวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 5.0 และ 4.6 กรัม/ลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่และมีการเจริญใกล้เคียงกันทุกพีเอชที่ทดสอบตลอดช่วงเวลาที่ทดสอบในอาหารที่ปรับพีเอชยีสต์มีการเจริญที่พีเอช 6.5 ต่ำกว่าการเจริญที่พีเอชของอาหาร 4.5 และ 5.5 (รูปที่ 10 A)

ส่วน MIY57 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง วัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 6.0 5.8 และ 5.4 กรัม/ลิตร หลังจากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ โดยที่พีเอช 4.5 และ 5.5 การเจริญอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน แต่ที่พีเอช 6.5 ยีสต์มีการเจริญต่ำกว่าพีเอชอื่น วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 6.4 6.1 และ 4.3 กรัม/ลิตร ในอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 4.5 5.5 และ 6.5 ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมง (รูปที่ 10 B)

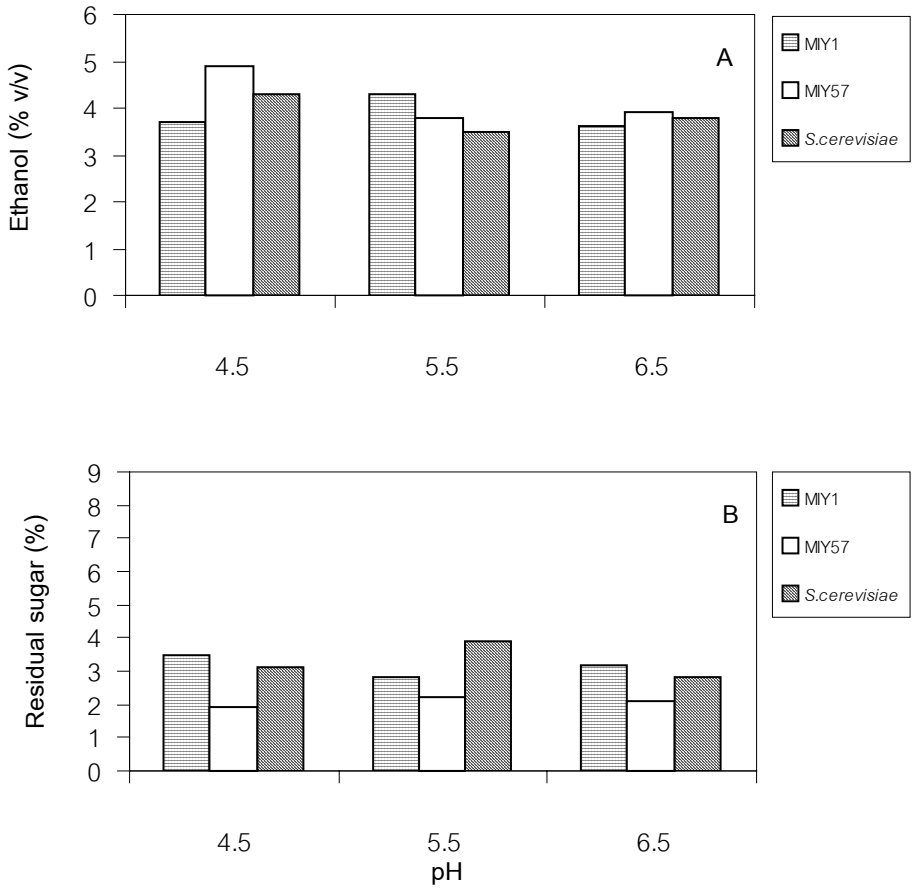
ผลของพีเอชต่อการผลิตเอทานอล (รูปที่ 11 A และ B) พบว่า MIY1 ผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกันที่พีเอช 4.5 และ 6.5 (3.7 และ 3.6 % (v/v)) และผลิตเอทานอลสูงสุดที่พีเอช 5.5 (4.3 % (v/v)) โดยมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในอาหาร 3.9 2.8 และ 3.2 % (w/v) ที่พีเอช 4.5 5.5 และ 6.5 ตามลำดับ MIY57 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่พีเอช 4.5 (4.9 % (v/v)) และมีการผลิตเอทานอลในระดับที่ใกล้เคียงกันที่พีเอช 5.5 และ 6.5 (3.8 และ 3.9 % (v/v)) มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในอาหาร 1.9 2.2 และ 2.1 % (w/v) ที่พีเอช 4.5 5.5 และ 6.5 ตามลำดับ ส่วน *S. cerevisiae* TISTR 5048 ผลิตเอทานอลได้ 4.3 % (v/v) ที่พีเอช 4.5 มีผลผลิตเอทานอลที่พีเอช 5.5 (3.5 % (v/v)) และ 6.6 (3.8 % (v/v)) ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในอาหาร 3 3.9 และ 2.8 % (w/v)

MIY57 มีการเจริญดีกว่า MIY1 ทุกระดับพีเอชที่ทดสอบ โดย MIY57 มีการเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงสุด 6.4 กรัม/ลิตร และ 4.9 % (v/v) ตามลำดับ ที่พีเอช 4.5 ในขณะที่ MIY1 มีการเจริญสูงสุด (4.7 กรัม/ลิตร) ที่พีเอช 4.5 แต่ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 4.3 % (v/v) ที่พีเอช 5.5

การเจริญและการผลิตเอทานอลของ MIY1 และ MIY57 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ พบว่า MIY1 และ MIY57 มีการเจริญสูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ทุกพีเอชที่ทดสอบ (รูปที่ 10) แต่ MIY57 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR



รูปที่ 10 การเจริญของยีสต์ MIY1(A) MIY57(B) และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 (C) ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % พีเอชเริ่มต้น 4.5 5.5 และ 6.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 11 ผลิตเอทานอล(A) และน้ำตาลที่เหลือ(B) ของยีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % พีเอชเริ่มต้น 4.5 5.5 และ 6.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5048 ทุกระดับพีเอชที่ทดสอบ โดย MIY57 ผลิตเอทานอลได้สูงถึง 4.9 % (v/v) ในขณะที่ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่เปรียบเทียบผลิตเอทานอลได้เพียง 4.3 % (v/v) (รูปที่ 11 A) ส่วน MIY1 ผลิตเอทานอลได้น้อยกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่พีเอช 4.5 แม้จะมีการเจริญมากกว่า แต่ที่พีเอช 5.5 ยีสต์ MIY1 สามารถผลิตเอทานอลได้ 4.3 % (v/v) มากกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบที่ผลิตได้เพียง 3.5 % (v/v) เมื่อพิจารณาน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหาร พบว่า MIY57 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยกว่า MIY1 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ทุกระดับพีเอช

จากผลการทดลอง พบว่า พีเอชเริ่มต้นของอาหารมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ ซึ่งยีสต์โดยทั่วไปเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด ดังนั้นเมื่อทดลองปรับพีเอชของอาหารเป็นกรด (4.5-5.5) ยีสต์ที่ทดสอบจึงมีการเจริญและผลิตเอทานอลดีกว่าอาหารที่ปรับพีเอช 6.5 พีเอชของอาหารมีผลต่ออัตราการหมัก อีกทั้งมีบทบาทในการควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นอีกด้วย ปกติเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ยอมให้ประจุไฮโดรเจนหรือประจุไฮดรอก-ซิลผ่านเข้าออกได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น รวมทั้งภายในไซโตรพลาสซึมของเซลล์มีระบบบัฟเฟอร์ควบคุมการเปลี่ยนแปลงพีเอช (วราวุฒิ, 2538) การเลือกพีเอชเริ่มต้นของอาหารขึ้นอยู่กับ buffer capacity ของอาหารที่ใช้ในการหมัก ในอาหารที่มี buffer capacity ต่ำ พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมประมาณ 5.5 ส่วนอาหารที่มี buffer capacity สูง พีเอชที่ควรใช้อยู่ในช่วง 4.5-4.7 (สาวิตรี, 2540) ส่วนใหญ่ในการทดลองนิยมใช้อาหารที่ปรับพีเอชให้อยู่ในช่วงความเป็นกรด

ก่อนหน้านี้ Banat และคณะ (1992) พบว่า *K. marxianus* IMB1 และ IMB3 สามารถผลิตเอทานอลได้ 6.7 และ 6.5 % (w/v) จากอาหาร YFM ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.5 ซึ่งสูงกว่าเอทานอลที่ MIY1 และ MIY57 ผลิตได้เมื่อเปรียบเทียบที่พีเอชเดียวกัน เช่นเดียวกับที่ Kiransree และคณะ (2000) พบว่า *S. cerevisiae* SV3 มีพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ที่ 5.5 แต่เมื่อเปลี่ยนสับเสตรทเป็นแป้งโมเลกุลใหญ่ เช่น แป้งข้าวสาลี แป้งมันฝรั่ง หรือสารละลายแป้ง ควรปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 5.0 เพื่อให้มีพีเอชเหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสลายสับสเตรท

แม้จะพบว่า MIY1 ผลิตเอทานอลได้ดีที่พีเอช 5.5 แต่มีแนวโน้มของการเจริญดีที่พีเอช 4.5 รวมทั้ง MIY57 มีการเจริญและผลิตเอทานอลดีที่สุดที่พีเอช 4.5 ดังนั้น จึงเลือกปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.5 ในการทดลองต่อไป

3.3 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอล

จากการทดลองหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอล โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 2 ระดับ คือ 5 และ 10 % ในอาหาร YFM ซึ่งมีกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % พีเอช

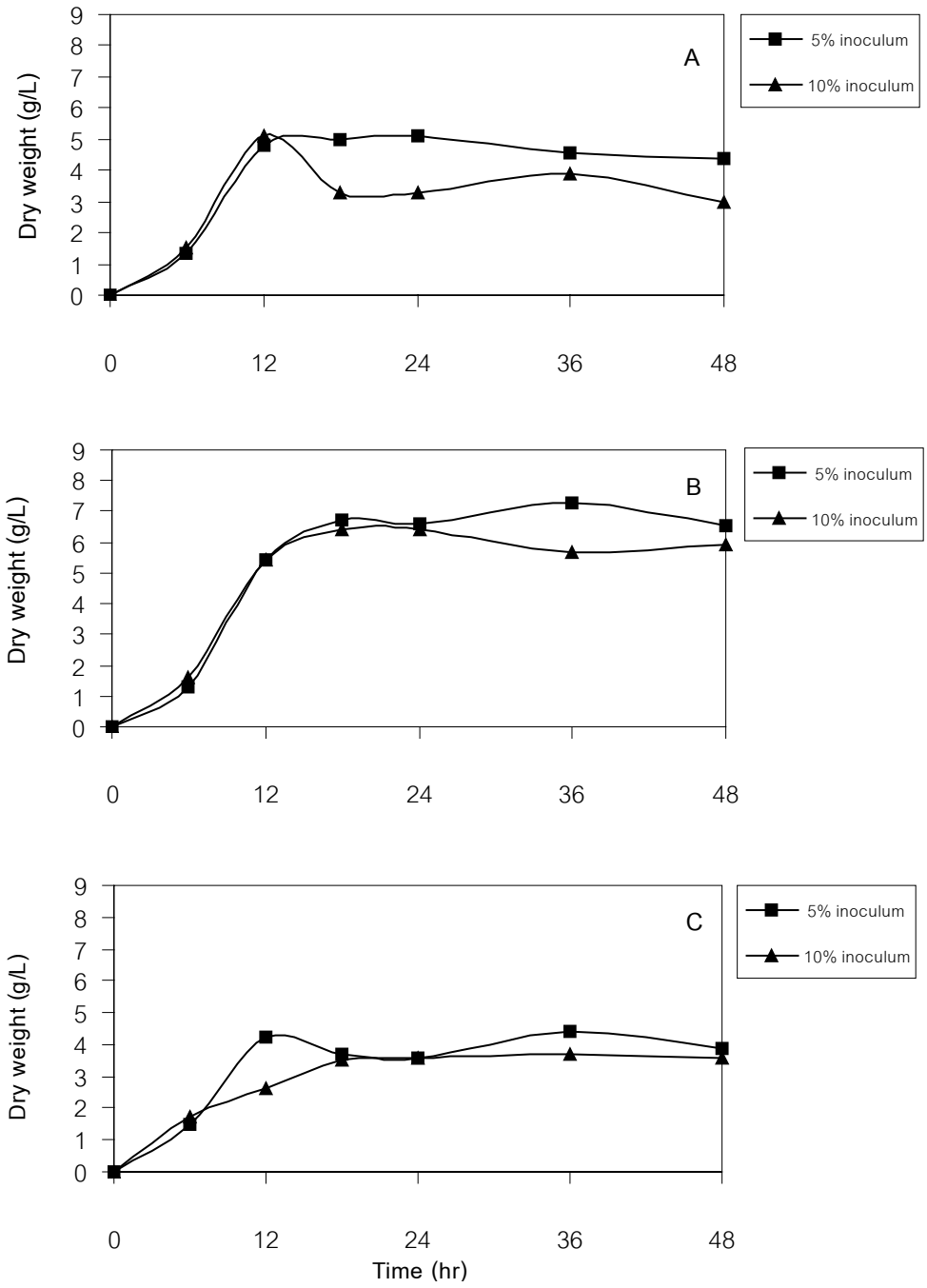
4.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ได้ผลดังรูปที่ 12 และ 13

จากการทดลองพบว่า MIY1 มีการเจริญอย่างรวดเร็วที่ช่วงเวลา 12 ชั่วโมง หลังจาก 18 ชั่วโมง เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 % การเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ แต่ที่ใช้เชื้อเริ่มต้น 10 % การเจริญลดลงหลังจาก 12 ชั่วโมง แต่หลังจากนั้นการเจริญใกล้เคียงกันตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง (รูปที่ 12 A) และผลิตเอทานอลได้ 4.5 และ 4.3 % (v/v) เมื่อเติมเชื้อเริ่มต้น 5 และ 10 % (รูปที่ 13 A) โดยมีน้ำตาลเหลือในอาหาร 2.6 % เท่ากันทั้ง 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นของเชื้อที่ใช้

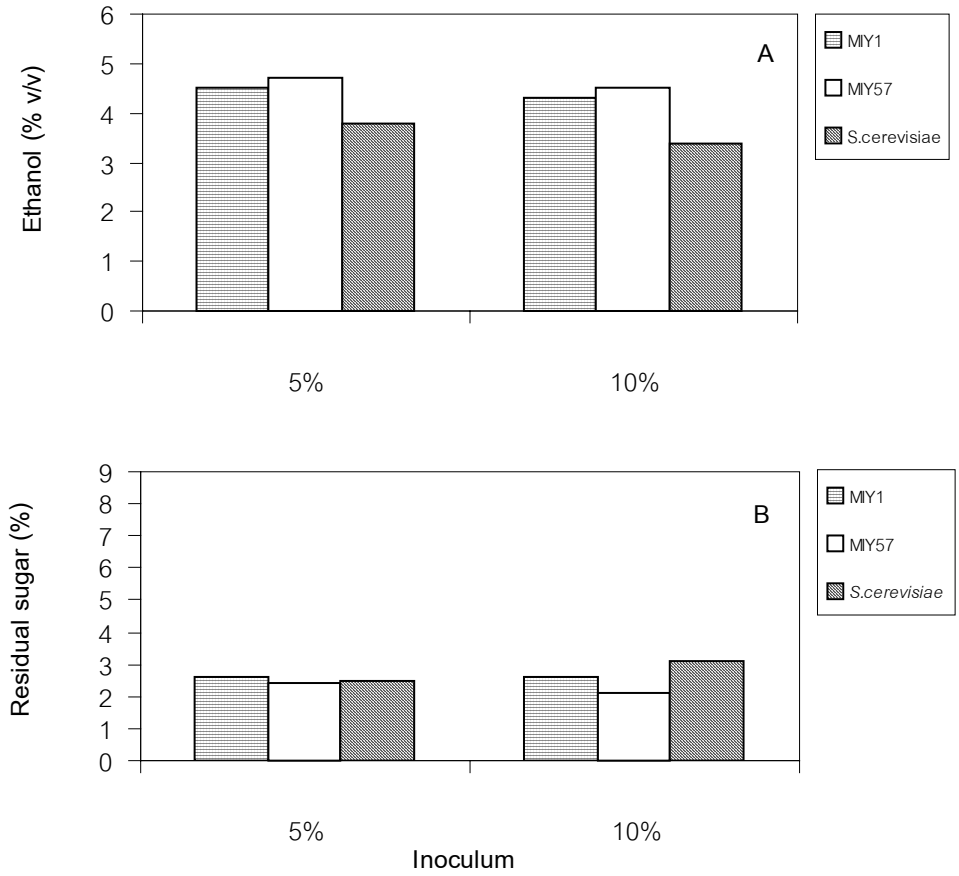
การเจริญและผลิตเอทานอลของ MIY57 แสดงดังรูปที่ 12(B) และ 13(A) มีการเจริญอย่างรวดเร็วที่ช่วงเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญเพิ่มขึ้นอีกที่ 18 ชั่วโมง การเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ทั้งที่ใช้เชื้อเริ่มต้น 5 % และ 10 % วัดการเจริญจากน้ำหนักแห้งได้ 6.6 และ 6.4 กรัม/ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 และ 10 % ตามลำดับ เมื่อพิจารณาดูการผลิตเอทานอลและน้ำตาลที่เหลือในอาหาร (รูปที่ 13 A และ B) พบว่า เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 % MIY57 มีการผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เชื้อเริ่มต้น 10 % และมีน้ำตาลเหลือในอาหาร 2.4 และ 2 % เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 และ 10 % ตามลำดับ

S. cerevisiae TISTR 5048 มีการเจริญเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกเมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 % หลังจากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ โดยมีการเจริญใกล้เคียงกันทั้ง 2 ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอทานอลระหว่าง MIY1 และ MIY57 พบว่า MIY57 มีการเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีกว่า MIY1 ทั้ง 2 ระดับของเชื้อเริ่มต้นที่ใช้ โดยทั้ง MIY57 และ MIY1 มีการเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ ซึ่งมีการเจริญ 3.9 และ 3.6 กรัม/ลิตร ผลิตเอทานอลได้ 3.8 และ 3.4 % (v/v) ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 5 และ 10 % ตามลำดับ ซึ่งการที่ใช้เชื้อเริ่มต้น 5 % ยีสต์มีการเจริญใกล้เคียงกับการใช้เชื้อเริ่มต้น 10 % อาจเนื่องมาจากการใช้เชื้อเริ่มต้นน้อยทำให้ยีสต์มีอาหารเพียงพอต่อการเจริญ (มีจำนวนเชื้อที่แย่งอาหารกันน้อย) สังเกตได้จากการเจริญในระยะ log (ภายใน 12 ชั่วโมง) ยีสต์เริ่มต้นทั้ง 2 ความเข้มข้นเริ่มต้นมีระดับการเจริญใกล้เคียงกัน ทำให้มีปริมาณการผลิตเอทานอลไม่ต่างกันมากนักและมีน้ำตาลที่เหลือในอาหารอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน

การใช้เชื้อเริ่มต้นเพื่อการผลิตเอทานอลมีทั้งที่ใช้เชื้อเริ่มต้น 5 % (Kiransree *et al.*, 2000) และ 10 % (Anderson *et al.*, 1986)



รูปที่ 12 การเจริญของยีสต์ MIY1(A) MIY57(B) และ *S. cerevisiae* TISTR 5048(C) ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % พีเอชเริ่มต้น 4.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 และ 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 13 การผลิตเอทานอล(A) และน้ำตาลที่เหลือ(B) ของยีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % พีเอชเริ่มต้น 4.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 และ 10 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

D'Amore และคณะ (1989) เปรียบเทียบการใช้เชื้อเริ่มต้น (*S. diastaticus* NO.62) ในปริมาณที่ต่างกัน ได้แก่ 0.35 1 2 และ 3.5 % มาผลิตเอทานอลจากกลูโคส 200 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 °ซ พบว่า ยีสต์มีการเจริญและผลิตเอทานอลใกล้เคียงกันทุกระดับที่ศึกษาที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยมีการผลิตเอทานอลได้ 70 78 82 และ 80 กรัม/ลิตร ตามลำดับ

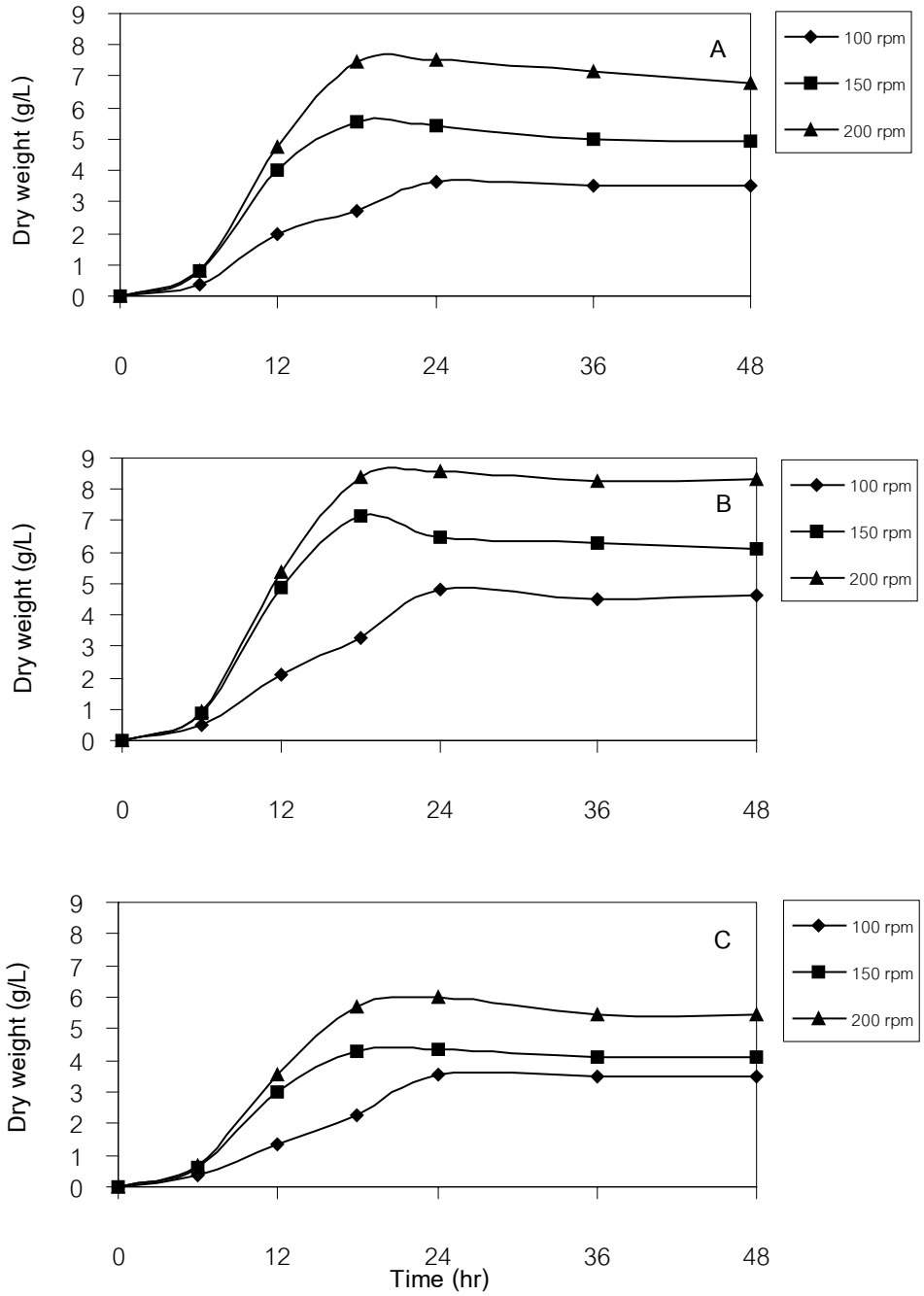
จากผลการทดลอง แม้ว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้จะผลิตเอทานอลได้น้อยกว่ายีสต์ทนร้อนที่เคยรายงาน แต่การใช้เชื้อเริ่มต้น 5 % ยีสต์ที่ทดสอบเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีกว่าการใช้เชื้อเริ่มต้น 10 % ดังนั้น จึงเลือกใช้เชื้อเริ่มต้น 5 % ในการทดลองต่อไป

3.4 ผลของความเร็วรอบต่อการผลิตเอทานอล

จากการทดลองหาความเร็วรอบที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลของยีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 5 % ในอาหาร YFM ซึ่งมีกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % พีเอช 4.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 100 150 และ 200 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อใช้ความเร็วในการเขย่า 150 และ 200 รอบ/นาที ยีสต์ MIY1 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 18 ชั่วโมงแรก วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 5.53 และ 7.44 กรัม/ลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ แต่ยีสต์ที่เลี้ยงเขย่าด้วยความเร็ว 100 รอบ/นาที มีการเจริญต่ำกว่าการเลี้ยงเขย่าด้วยความเร็วรอบอื่น (รูปที่ 14 A)

MIY57 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 18 ชั่วโมงแรกเช่นเดียวกับ MIY1 วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 7.14 และ 8.36 กรัม/ลิตร เมื่อเลี้ยงเขย่าด้วยความเร็ว 150 และ 200 รอบ/นาที ตามลำดับ หลังจากนั้นการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ ที่เวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 4.81 6.47 และ 8.56 กรัม/ลิตร ที่ความเร็ว 100 150 และ 200 รอบ/นาที ตามลำดับ (รูปที่ 14 B)

S. cerevisiae TISTR 5048 มีการเจริญในช่วง 18 ชั่วโมงแรกน้อยกว่า MIY1 และ MIY57 ที่เวลา 24 ชั่วโมง มีการเจริญวัดจากน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 3.57 4.32 และ 6.0 กรัม/ลิตร เมื่อเขย่าด้วยความเร็ว 100 150 และ 200 รอบ/นาที ตามลำดับ (รูปที่ 14 C)

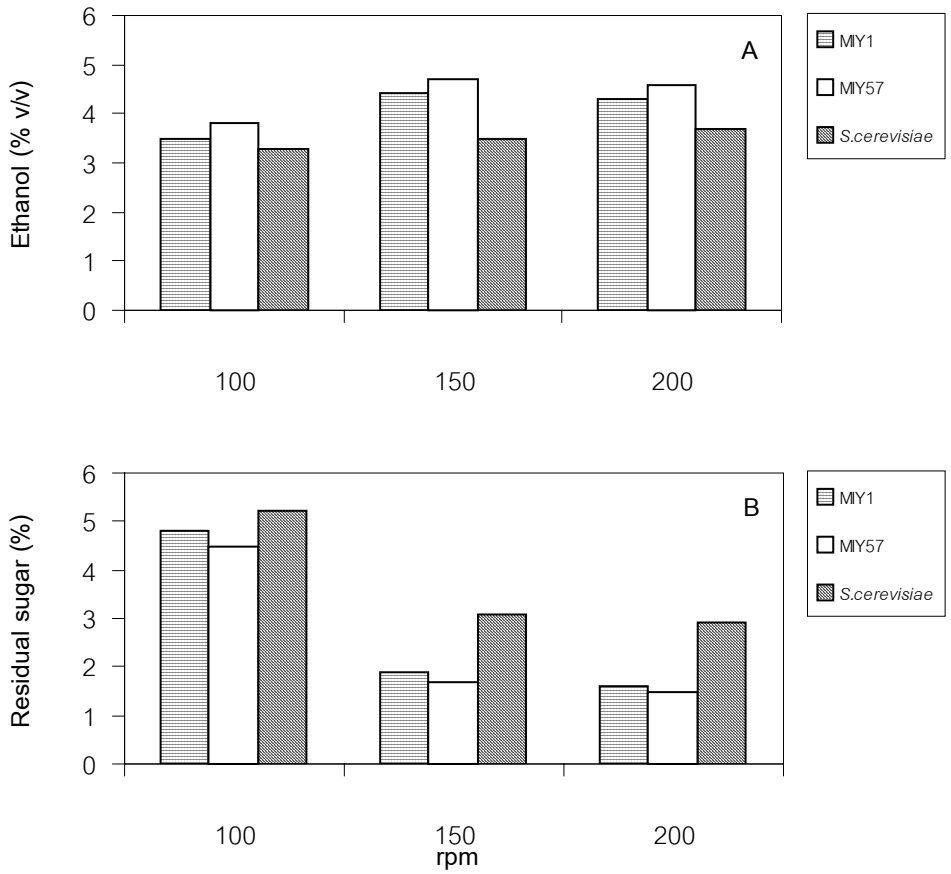


รูปที่ 14 การเจริญของยีสต์ MIY1(A) MIY57(B) และ *S. cerevisiae* TISTR 5048(C) ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % พีเอชเริ่มต้น 4.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 150 และ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เปรียบเทียบการเจริญของ MIY1 MIY57 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5048 พบว่าทั้ง MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 มีแนวโน้มการเจริญคล้ายกัน โดยยีสต์ทั้ง 3 ชนิด มีการเจริญดีที่สุดเมื่อเลี้ยงเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที รองมาคือ 150 รอบ/นาที และมีการเจริญต่ำสุดเมื่อเลี้ยงเขย่าที่ความเร็ว 100 รอบ/นาที แต่ MIY1 และ MIY57 มีการเจริญเร็วกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ทุกช่วงเวลาและทุกระดับของความเร็วในการเขย่าที่ใช้ทดสอบ และเมื่อเปรียบเทียบการเจริญระหว่าง MIY1 กับ MIY57 พบว่า MIY57 มีการเจริญดีกว่า MIY1 ทุกความเร็วที่ใช้ทดสอบ

การผลิตเอทานอลของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ แสดงในรูปที่ 15 A พบว่า MIY1 และ MIY57 ผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 โดย ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 4.4 4.7 และ 3.7 % (v/v) เมื่อใช้ความเร็วในการเขย่า 150 รอบ/นาที ตามลำดับ และผลิตเอทานอลได้ต่ำสุดที่ความเร็วในการเขย่า 100 รอบ/นาที โดย MIY57 ผลิตเอทานอลดีกว่า MIY1 ทุกความเร็วรอบที่ทดสอบ

เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เหลือในอาหาร (รูปที่ 15 B) ร่วมกับการเจริญและการผลิต เอทานอลของ MIY1 และ MIY57 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5048 พบว่า MIY1 และ MIY57 มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในอาหารน้อยกว่าสายพันธุ์เปรียบเทียบ ทั้งนี้เนื่องจาก MIY1 และ MIY57 มีการเจริญและการผลิตเอทานอลสูงกว่าสายพันธุ์ที่ใช้เปรียบเทียบ แม้ว่าการเลี้ยงเขย่าด้วยความเร็ว 200 รอบ/นาที จะมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือในอาหารน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที แต่เอทานอลที่ผลิตได้ที่ความเร็วในการเขย่า 200 รอบ/นาที น้อยกว่าเอทานอลที่ผลิตได้จากการเลี้ยงเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ดังนั้นเมื่อมีออกซิเจนในกระบวนการหมักสูง กระบวนการเมตาบอลิซึมของยีสต์จึงเบี่ยงเบนไปในกระบวนการผลิตเซลล์ นอกจากออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย และเป็นองค์ประกอบของไซโตรโครมในกระบวนการลูกโซ่หายใจแล้ว (Spencer *et al*., 1997) ยังเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์กรดไขมันพันธะคู่ และสเตอรอลของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งช่วยให้ยีสต์ทนต่อความเป็นพิษของเอทานอลได้มากขึ้น (Walker, 1998) แต่กระบวนการผลิตเอทานอลต้องการออกซิเจนในปริมาณไม่มากนัก ดังนั้นการผลิตเอทานอลที่ใช้ความเร็วในการเขย่าเพียง 100 รอบ/นาที ส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญได้ไม่เต็มที่ เนื่องจากมีปริมาณออกซิเจนน้อยทำให้ไม่เพียงพอต่อการสร้างเซลล์ของยีสต์ เมื่อมีปริมาณมวลชีวภาพน้อยจึงส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลลดลงด้วย



รูปที่ 15 การผลิตเอทานอล(A) และน้ำตาลที่เหลือ(B) ของยีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % พีเอชเริ่มต้น 4.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 100 150 และ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การเลี้ยงเขย่าที่ความเร็วรอบสูง (200 รอบ/นาที) ยีสต์ที่ทดสอบมีการผลิตมวลเซลล์ดีที่สุด ซึ่ง สอดคล้องกับรายงานของ Banat และคณะ 1992 ที่เลี้ยง *K. marxianus* IMB1-IMB5 และเขย่าด้วยความเร็วสูง (250 รอบ/นาที) ยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด 0.86-0.99 h^{-1} แต่ในการผลิตเอทานอลใช้อัตราการเขย่า 100 รอบ/นาที ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ผลิตเอทานอลได้ 6.4-6.8 % (w/v) ที่อุณหภูมิ 40 °ซ ซึ่งสูงกว่าปริมาณเอทานอลที่ MIY1 และ MIY57 ผลิตได้ (2.7 และ 3 % (w/v)) จากการใช้ความเร็วรอบเท่ากัน

เมื่อเลี้ยงเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ยีสต์ผลิตเอทานอลดีกว่าการใช้ความเร็วในการเขย่า 200 รอบ/นาที เพราะที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที ยีสต์นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญมากกว่านำไปผลิตเอทานอลจึงให้ผลผลิตเอทานอลน้อย

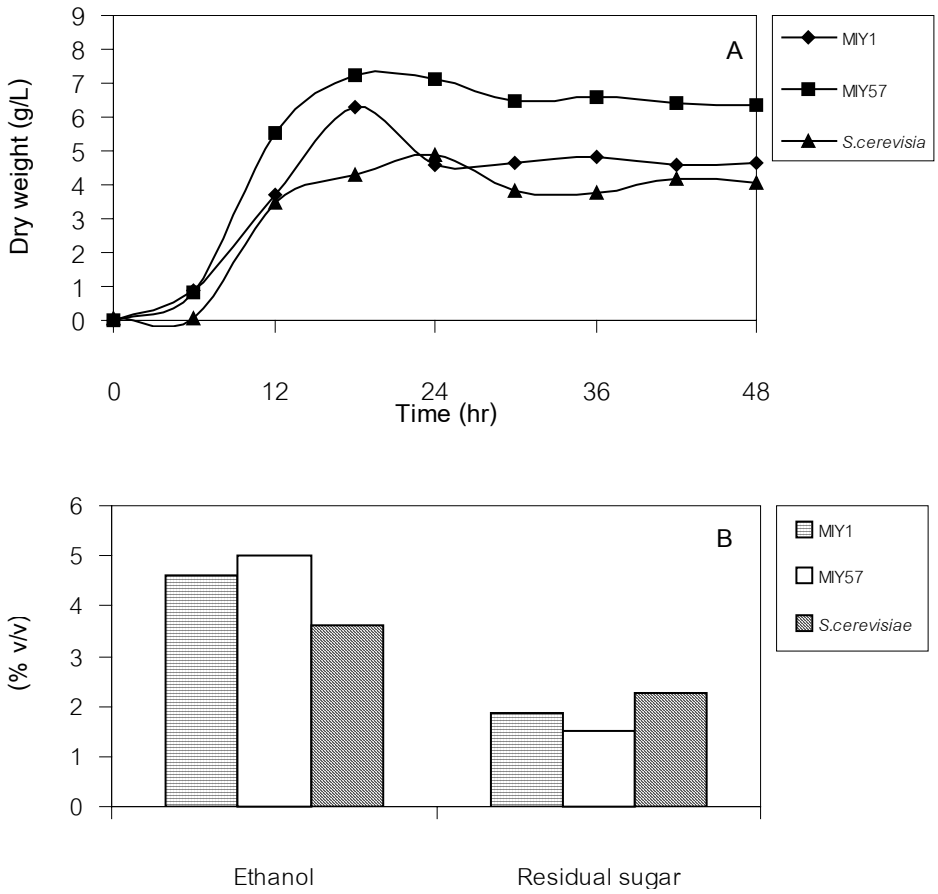
จากการทดลองนี้ MIY1 และ MIY57 ผลิตเอทานอลได้ดีเมื่อเลี้ยงเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเร็ว 150 รอบ/นาที ในการเขย่าเพื่อการผลิตเอทานอล

3.5 การเจริญและการผลิตเอทานอลในสภาวะที่เหมาะสม

ผลของความเร็วรอบต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ ในอาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % โดยปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเป็น 4.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบ/นาที เวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 °ซ แสดงในรูปที่ 16(A) และ 16(B)

จากผลการทดลอง พบว่า MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 มีการเจริญอย่างรวดเร็วที่ช่วงเวลา 12 ชั่วโมง โดย MIY1 และ MIY57 มีการเจริญสูงสุดที่ 18 ชั่วโมง วัดน้ำหนักเซลล์แห้งได้ 6.3 และ 7.2 กรัม/ลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นการเจริญของ MIY57 เข้าสู่ระยะคงที่ ส่วน MIY1 มีการเจริญลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญเข้าสู่ระยะคงที่เช่นกัน สำหรับการเจริญของ *S. cerevisiae* TISTR 5048 วัดน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 4.9 กรัม/ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญลดลงและเข้าสู่ระยะคงที่

MIY57 มีการผลิตเอทานอลสูงกว่า MIY1 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 โดย MIY57 ผลิตเอทานอลได้สูงถึง 5 % (v/v) ในขณะที่ MIY1 ผลิตเอทานอลได้ 4.7 % (v/v) และพบว่าทั้ง MIY57 และ MIY1 มีการผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ ซึ่งผลิตเอทานอลได้เพียง 3.6 % (v/v) ในส่วนของน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (รูปที่ 16 B) พบว่า MIY57 มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุด (1.5 % (w/v)) รองลงมาได้แก่ MIY1 (1.9 % (w/v)) และมีน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ในอาหารสูงสุด (2.3 % (w/v)) จากเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5048



รูปที่ 16 การเจริญ(A) การผลิตเอทานอล และน้ำตาลที่เหลือ(B) ของยีสต์ MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในอาหาร Yeast fermentation medium ที่มีกลูโคส 15 % ยีสต์สกัด 1 % พีเอชเริ่มต้น 4.5 เติมเชื้อเริ่มต้น 5 % เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที อุณหภูมิ 40 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

MIY1 MIY57 และ *S. cerevisiae* TISTR 5048 มีการเจริญและผลิตเอทานอลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองเรื่องยีสต์สกัดที่ปริมาณของยีสต์สกัดเท่ากัน ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจากยีสต์ที่ใช้ทดลองมีการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงถึง 40 °ซ และ subculture มาเป็นเวลานาน ซึ่งเหตุผลทั้ง 2 ประการนี้ โดยเฉพาะการเลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิสูงมีผลต่อการเจริญของยีสต์ และส่งผลให้คุณสมบัติต่าง ๆ รวมทั้งความความสามารถในการเจริญ และผลิตเอทานอลลดลง เมื่อตรวจวัดดูขนาดของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่า ขนาดของยีสต์เล็กลงกว่าครั้งแรกที่แยกเชื้อได้จากตัวอย่าง สอดคล้องกับ Walker (1998) ซึ่งรายงานว่า อุณหภูมิมีผลต่อสัณฐานวิทยา และความอยู่รอดของเซลล์ ทำให้การแตกหน่อของยีสต์ผิดปกติ ผนังเซลล์เจริญไม่สมบูรณ์ ทำให้การเพิ่มขนาดของเซลล์ผิดปกติ ลดความสามารถในการเลือกผ่านของสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลง ขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิด ส่งผลให้กิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ยีสต์ลดลง นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งกระบวนการหายใจและกระบวนการหมัก (สาวิตรี, 2540) อย่างไรก็ตาม จากรายงานการวิจัยหลายฉบับพบว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 °ซ ยีสต์ทนร้อนสามารถเจริญได้ แต่มีการผลิตเอทานอลลดลง (Anderson *et al*., 1986; D'Amore *et al*., 1989; Banat *et al* .,1992; Kiransree *et al*., 2000)

4. ลักษณะบางประการของเชื้อ MIY1 และ MIY57 ที่ใช้ชี้บ่งคุณลักษณะของยีสต์

ลักษณะบางประการของ ยีสต์ MIY1 และ MIY57 ที่คัดแยกได้ทั้ง 2 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีกลม ขอบเรียบ สีครีมด้าน มีการเจริญทั่วทั้งหลอดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว YM โดย MIY1 มีขนาดเซลล์ 5x7.5 ไมโครเมตร MIY57 มีขนาดเซลล์ 6.75x8.75 ไมโครเมตร ทั้ง MIY1 และ MIY57 มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อแบบ multipolar budding และมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore รูปร่างกลมจำนวน 1-4 ascospore ต่อ ascus ในอาหารแข็ง YM เวลา 35 วัน และผลการย้อม Diazonium Blue B ไม่เกิดการเปลี่ยนสี (ตารางที่ 5)

MIY1 และ MIY57 สามารถใช้ และหมักน้ำตาล D-Glucose Sucrose และ D-maltose ได้เร็ว สามารถหมักน้ำตาล D-Galactose D-Melibiose และ Raffinose ได้ช้า และไม่สามารถใช้และหมักน้ำตาล Lactose D-Cellobiose D-Trehalose และ D-Xylose ได้เลย ไม่ใช้น้ำตาล Inositol ไม่สามารถใช้โซเดียมไนไตรท์ และโพแทสเซียมไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ (ตารางที่ 6 7 และ 8) ไม่ทำปฏิกิริยากับสี Diazonium Blue B คุณสมบัติเหล่านี้จึงจัด MIY1 และ MIY57 ให้อยู่ในกลุ่ม *Saccharomyces* sp. เมื่อส่ง MIY1 และ MIY57 ตรวจยืนยันด้วยวิธีทดสอบคุณสมบัติทางสรีรวิทยาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ โดยใช้ชุดทดสอบ API 20C AUX และ

conventional method รวมทั้งผลการทำ DNA Sequencing จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่า MIY1 และ MIY57 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *S. cerevisiae* ที่ระดับความเชื่อมั่น 97 % และบ่งชี้ว่า เป็น *S. cerevisiae* (ตารางภาคผนวก ค 1 ตารางภาคผนวก ค 2 รูปภาคผนวก ค 1 และรูปภาคผนวก ค 2)

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ MIY1 และ MIY57

เชื้อ	**ขนาดเซลล์ (μm)**	**ลักษณะโคโลนี**	**การเจริญในอาหารเหลว**	**การสืบพันธุ์**		**ย้อมสี Diazonium Blue B**
				แบบอาศัยเพศ	**แบบไม่อาศัยเพศ**	
MIY1	5x7.5	กลม ขอบเรียบ สีครีมด้าน	เจริญทั่วทั้งหลอด	สร้าง ascospore	multipolar budding	-
MIY57	6.7x8.75	กลม ขอบเรียบ สีครีมด้าน	เจริญทั่วทั้งหลอด	สร้าง ascospore	multipolar budding	-

หมายเหตุ : + คือ ย้อมติดสี Diazonium Blue B

- คือ ย้อมไม่ติดสี Diazonium Blue B

ตารางที่ 6 ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของยีสต์

	สายพันธุ์			
Fermentation	MIY1	MIY57	*S. cerevisiae* TISTR5048	*S. cerevisiae**
D-Glucose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
D-Galactose	s	s	s	+
Lactose	-	-	-	-
D-Maltose	+	+	+	-
D-Trehalose	-	-	-	s
D-Melibiose	s	s	s	-
D-Cellobiose	-	-	-	ND
Raffinose	s	s	s	+
D-Xylose	-	-	-	ND

หมายเหตุ : * คือ จาก Kurtzman และคณะ (1998)

(+) คือ หมักน้ำตาลได้ก๊าซเต็มหลอดภายใน 7 วัน

(s) คือ หมักน้ำตาลได้ก๊าซเต็มหลอดหลังจาก 7 วัน (slow positive)

(v) คือ ให้ผลไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

(-) คือ ไม่หมักน้ำตาล

ND คือ ไม่มีข้อมูล

ตารางที่ 7 ความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ของยีสต์

Assimilation carbon	สายพันธุ์			
	MIY1	MIY57	*S. cerevisiae* TISTR5048	*S. cerevisiae**
D-Glucose	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+
D-Galactose	s	s	s	v
Lactose	-	-	-	-
D-Maltose	+	+	+	+
D-Trehalose	-	-	-	+
D-Melibiose	s	s	s	v
D-Cellobiose	-	-	-	-
Raffinose	s	s	s	+
D-Xylose	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-

หมายเหตุ : * คือ จาก Kurtzman และคณะ (1998)

(+) คือ ใช้น้ำตาลได้ ให้ความขุ่น +2 หรือ +3 ภายใน 7 วัน

(s) คือ ใช้น้ำตาลช้า ให้ความขุ่น +2 หรือ +3 หลังจาก 7 วัน (slow positive)

(v) คือ ให้ผลไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

(-) คือ ไม่ใช้น้ำตาล

ตารางที่ 8 ความสามารถในการใช้แหล่งไนโตรเจนของยีสต์

Assimilation Nitrogen	สายพันธุ์			
	MIY1	MIY57	*S. cerevisiae* TISTR5048	*S. cerevisiae**
Ammonium sulfate	+	+	+	+
Sodium nitrite	-	-	-	-
Potassium nitrate	-	-	-	-

หมายเหตุ : * คือ จาก Kurtzman และคณะ (1998)

(+) คือ ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ให้ความขุ่น +2 หรือ +3 ภายใน 7 วัน

(-) คือ ไม่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน