รายงานฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2552

โครงการวิจัยเรื่อง

การคัดกรองเชื้อราเซลล์เดี่ยวซึ่งสามารถหมักเอทานอลจากทั้งน้ำตาลกลูโคสและไซโลส

รศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา[1]
รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
[2]ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานฉบับสมบูรณ์
งบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2552

โครงการวิจัยเรื่อง

การคัดกรองเชื้อราเซลล์เดี่ยวซึ่งสามารถหมักเอทานอลจากทั้งน้ำตาลกลูโคสและไซโลส

รศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา[1]
รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
[2]ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อโครงการ การคัดกรองเชื้อราเซลล์เดี่ยวซึ่งสามารถหมักเอทานอลจากทั้ง น้ำตาลกลูโคสและไซโลส

คณะผู้วิจัย รศ.ดร.อัญชริดา อัครจรัลญา[1] และ รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์[2]

หน่วยงานรับผิดชอบ [1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และ [2]ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

แยกเชื้อราเซลล์เดี่ยว (ยีสต์) ที่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลจากมูลสัตว์กินพืช จำนวน 32 ตัวอย่าง โดยวิธี enrichment culture ได้ยีสต์ที่ต้องการ 36 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 9 แบบ เมื่อนำยีสต์ที่แยกได้มาหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลส ในสภาวะที่มีอากาศจำกัด พบว่าทุกไอโซเลตผลิตเอทานอลได้ ต่ำกว่า *Pichia stipitis* แต่เมื่อนำมาหมักในสภาวะที่มีอากาศ พบว่ายีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่ผลิตเอทานอลได้มากกว่า *Pichia stipitis* พบว่ายีสต์ไอโซเลต F1 ที่แยกได้ ผลิตเอทานอลได้ 3 กรัม/ลิตร และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสระหว่าง *Pichia stipitis* และ *Candida tropicalis* F1 พบว่า *P. stipitis* หมักเอทานอลในสภาวะมีอากาศจำกัดได้ดีคือ 1.37 g/l ส่วน *Candida tropicali* F1 หมักเอทานอลในสภาวะมีอากาศได้ดีคือ 2.21 g/l และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสระหว่าง *P.stipitis* และ *Candida tropicali* F1 พบว่า *Candida tropicali* F1 สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *P. stipitis* ในทั้งสองสภาวะทดสอบ ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของไอโซเลต F1 โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA พบว่าเป็น *Candida tropicalis*

Project title: Screening of Xylose-Alcoholic Fermenting Yeast

Name of the Investigator: Assoc.Prof. Dr. Ancharida Akaracharanya[1]

Assoc.Prof. Dr. Somboon Tanasupawat[2]

[1]Department of Microbiology, Faculty of Science and [2]Department of Biochemical and microbiology, Faculty of Phamaceutical Sciences ,Chulalongkorn University

Abstract

Isolation of xylose-alcoholic fermenting yeast from 32 herbivore faeces by enrichment cuture method resulted in 36 desired yeast isolates. The yeast is isolated showed 8 different types of colony morphologies. Fermentation of xylose to ethanol under oxygen-limited condition, there was no isolated yeasts gave higher ethanol than *Pichia stipitis*, the control. While under aerobic condition, almost all of the isolated yeast gave higher ethanol than control. Isolate F1 gave highest ethanol (3 g/l). Comparison efficiency of ethanol production of isolate F1 and *Pichia stipitis*. *Pichia stipitis* gave ethanol 1.37 g/l at fermentation of xylose to ethanol under oxygen-limited condition. F1 gave ethanol 2.21 g/l fermentation of xylose to ethanol under aerobic condition. However, isolate F1 product ethanol more than *Pichia stipitis* for all condition. On the basis of the D1/D2 domain of the 26S rDNA on comparative sequencing analysis the isolate F1 was identified as *Candida tropicalis*.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนันสนุนโครงการวิจัยนี้ โดยอนุมัติทุนงบประมาณแผ่นดิน ปีงบประมาณ 2552 เป็นเงินจำนวนทั้งสิ้น 300,000 บาท (สามแสนบาทถ้วน)

ขอขอบคุณศูนย์ปฏิบัติการ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และ ภาควิชาเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะผู้วิจัย

เลขหมู่
เลขทะเบียน 014677
วัน, เดือน, ปี 27 ส.ค. 53

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ง
สารบัญ.....	จ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	2
3. วิธีการทดลอง	5
4. ผลการทดลอง.	16
5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	30
เอกสารอ้างอิง.....	32
ภาคผนวก.....	34

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	มูลค่าการนำเข้าพลังงานน้ำมัน	2
2.2	ปริมาตรผลผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ	3
4.1	ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ	16
4.2	ลักษณะสรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์	27

สารบัญรูป

ภาพที่		หน้า
2.1	กระบวนการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส	4
4.1	ลักษณะโคโลนีของเชื้อยีสต์ที่แยกได้	
	-ภาพที่ 4.1-1 แสดงลักษณะแบบ A	18
	-ภาพที่ 4.1-2 แสดงลักษณะแบบ B	18
	-ภาพที่ 4.1-3 แสดงลักษณะแบบ C	18
	-ภาพที่ 4.1-4 แสดงลักษณะแบบ D	19
	-ภาพที่ 4.1-5 แสดงลักษณะแบบ E	19
	-ภาพที่ 4.1-6 แสดงลักษณะแบบ F	19
	-ภาพที่ 4.1-7 แสดงลักษณะแบบ G	20
	-ภาพที่ 4.1-8 แสดงลักษณะแบบ H	20
	-ภาพที่ 4.1-9 แสดงลักษณะแบบ I	20
4.2	กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล ในสภาพที่มีอากาศจำกัดโดยยีสต์ที่แยกได้	21
4.3	แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล ในสภาพที่มีอากาศจำกัด แต่เพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นขึ้นโดยเพิ่มระยะเวลาการบ่มเชื้อเริ่มต้นเป็น 48 ชั่วโมง	22
4.4	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล ในสภาพที่มีอากาศจำกัดโดยยีสต์ที่แยกได้	23
4.5	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์และระยะเวลาการบ่มของ*Pichia stipitis*	24
4.6	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์และระยะเวลาการบ่มของ *Candida tropicalis* F1	24
4.7	ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสโดย *Candida tropicalis* F1 และ *P.stipitis*	25
4.8	ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลท A14, B1, E1, D1, H1, F1, I1 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน	26

บทที่ 1
บทนำ

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

น้ำมันเป็นพลังงานประเภทใช้แล้วหมดไป ดังนั้นการวิจัยด้านพลังงานทดแทนจึงเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม พลังงานทดแทนที่มีศักยภาพสูงสุดคือพลังงานชีวมวล เอทานอลเป็นพลังงานชีวมวลที่ได้จากการหมักผลผลิตทางการเกษตรประเภทแป้ง และน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ แต่ปัจจุบันราคาต้นทุนของเอทานอลที่ประเทศไทยผลิตได้ ยังสูงมากเมื่อเทียบกับราคาน้ำมัน ทั้งนี้เพราะมันสำปะหลังและกากน้ำตาลที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบยังถือได้ว่าราคาแพง

การพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากขยะทางการเกษตร (agricultural waste) และวัชพืช จึงเป็นแนวทางที่จะทำให้ราคาต้นทุนของเอทานอลลดลงมาใกล้เคียงกับราคาน้ำมันได้ ขยะทางการเกษตรและวัชพืชเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเมื่อนำมาปรับสภาพด้วยกรด หรือด่าง จะทำให้เอนไซม์สามารถย่อยสลายไปเป็นน้ำตาลได้ดีขึ้น เนื่องจากพบว่าการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางทำให้เฮมิเซลลูโลส ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีมากเป็นที่สองรองลงมาจากเซลลูโลส ถูกย่อยเป็นน้ำตาบไซโลสในปริมาณมาก

ดังนั้นจึงได้มีผู้พยายามเพิ่มประสิทธิผลการหมักเอทานอลโดยการหมักทั้งน้ำตาลไซโลสที่ได้จากการปรับสภาพลิกโนเซลลูโลสด้วยกรดเจือจางและหมักน้ำตาลกลูโคสที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยเอนไซม์เซลลูเลสไปเป็นเอทานอล ในธรรมชาติมีเชื้อราหลายชนิด เช่น *Rhizobium, Mucor, Pichia, Candida, Pachysolen, Kluyveromyces* เป็นต้น สามารถหมักน้ำตาลไซโลสไปเป็นเอทานอลได้ (Schneider และคณะ 1981 ; Jeffiries, 1981 ; Margaritis and Bajpai, 1982 ; Millati และคณะ 2005) นอกจากนั้นยังพบว่าการถ่ายโอนยีน xylose reductase, xylitol dehydrogenase และ xylulokinase ของ *Pichia* sp. เข้าไปใน *Saccharomyces cerevisiae* (Yong และคณะ 2002) เพื่อให้สามารถหมักทั้งน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสได้นั้นยังไม่มีศักยภาพในเชิงพาณิชย์ ทั้งนี้เข้าใจว่าเกิดจากปัญหา redox cofactor imbalance (Gray และคณะ 2006) ดังนั้นการคัดกรองเชื้อรากลุ่มนี้ที่มีศักยภาพในเชิงพาณิชย์จึงเป็นสิ่งที่ควรจะทำ เพราะลักษณะภูมิอากาศของประเทศไทยเอื้อในด้านความหลากหลายทางชีวภาพของสายพันธุ์จุลินทรีย์

บทที่ 2
การสำรวจแนวความคิดและการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความเป็นมาและมูลเหตุจูงใจ

สภาวการณ์ราคาน้ำมันดิบ และน้ำมันสำเร็จรูปซึ่งขยับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของผู้คน ประเทศไทยพึ่งพาการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงเป็นหลัก (ตารางที่ 3) จึงสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศหลายล้านบาท และในอนาคตราคาน้ำมันในตลาดโลกมีแนวโน้มจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ ทำให้ต้องหันมาให้ความสำคัญและเร่งพัฒนา โดยการคิดค้นหาแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ ๆอย่างจริงจัง

ตารางที่ 2.1 มูลค่าการนำเข้าพลังงานน้ำมัน (หน่วยเป็นพันล้าน)

มูลค่าการนำเข้าพลังงานน้ำมัน หน่วย:ล้านบาท Unit:Million Bath					
ชนิด	2545	2546	2547	2548	2549
น้ำมันดิบ(crude oil)	286,953	346,057	486,627	644,627	753,783
น้ำมันสำเร็จรูป (Petroleum product)	25,817	30,735	41,533	55,680	60,253

ที่มา : http://www.energy.go.th/moen/default.aspx

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม พลังงานทดแทนที่มีศักยภาพสูงสุดคือพลังงานชีวมวล เอทานอลเป็นพลังงานชีวมวลที่ได้จากการหมักผลผลิตทางการเกษตรประเภทแป้ง และน้ำตาลด้วยจุลินทรีย์ (ตารางที่ 2) แต่ปัจจุบันราคาต้นทุนของเอทานอลที่ประเทศไทยผลิตได้ยังสูงมากเมื่อเทียบกับราคาน้ำมัน ทั้งนี้เพราะมันสำปะหลังและกากน้ำตาลที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบยังถือได้ว่าราคาแพง

ตารางที่ 2.2 ปริมาตรผลผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ

วัตถุดิบที่มีน้ำหนัก 1 ตัน	ปริมาตรของเอทานอลที่ผลิตได้(ลิตร)
กากน้ำตาล	260
อ้อย	70
หัวมันสำปะหลังสด	180
ข้าวฟ่าง	70
ธัญพืช(เช่น ข้าว ข้าวโพด)	375
น้ำมะพร้าว	83

อ้างอิง : http://www.region8.m-energy.go.th/ethanol.htm

โดยที่พื้นฐานของประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงมีเศษวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหลงเหลือจากกระบวนการผลิตมากมาย จึงได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากวัสดุทิ้งทางการเกษตรและวัชพืช ซึ่งเป็นแนวทางที่จะทำให้ราคาต้นทุนของการผลิตเอทานอลลดลงมาใกล้เคียงกับราคาน้ำมันได้ วัสดุทิ้งทางการเกษตรและวัชพืชเป็นสารประเภทลิกโนเซลลูโลส ซึ่งเมื่อนำมาปรับสภาพด้วยกรดเจือจางหรือด่างก่อนจะทำให้เอนไซม์หรือจุลินทรีย์ย่อยสลายไปเป็นน้ำตาลได้ดีขึ้น เนื่องจากพบว่าวิธีการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางทำให้เฮมิเซลลูโลสซึ่งเป็นองค์ประกอบที่มีมากเป็นที่สองรองลงมาจากเซลลูโลส ถูกย่อยเป็นน้ำตาลไซโลส ในปริมาณมาก Sumphanwanich (2008) รายงานว่าการปรับสภาพซังข้าวโพดและฟางข้าวด้วยกรดเจือจางแล้วย่อยด้วยเอนไซม์จะได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคส: น้ำตาลไซโลสสูงถึง 1:1.2 และ 1:1.4 ตามลำดับ

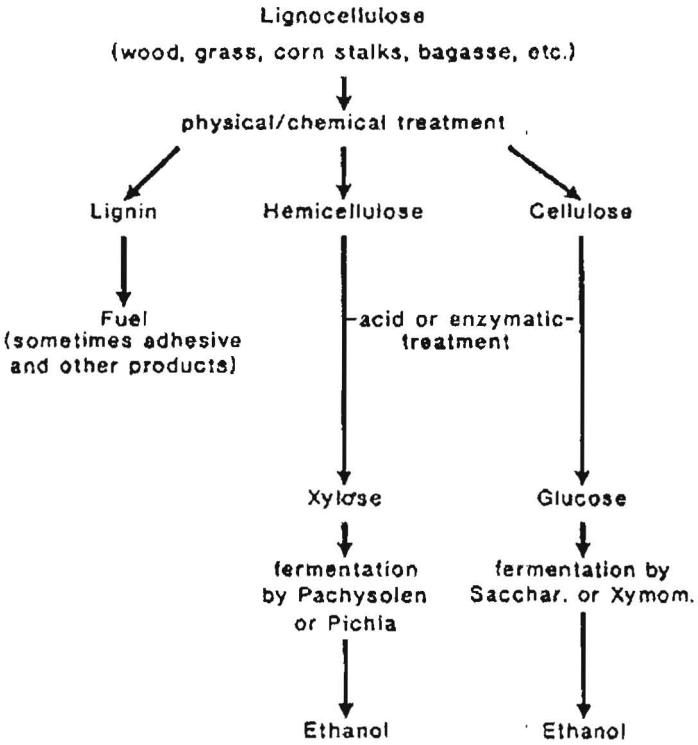
การพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส เพิ่มผลผลิตเอทานอลนั้นได้มีความพยายามที่จะหมักน้ำตาลไซโลสควบคู่ไปกับน้ำตาลกลูโคสไปเป็นเอทานอลโดยการถ่ายโอนยีน xylose reductase,xylitol dehydrogenase และ xylulokinase ของ *Pichia sp.* เข้าไปใน *Saccharomyces.cerevisiae* และ *Zymomonas mobilis* แต่พบว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ยังไม่มีศักยภาพเชิงพาณิชย์ เข้าใจว่าเกิดจากปัญหา redox cofactor imbalance (Gray และคณะ 2006)

ในธรรมชาติยีสต์หลายชนิด เช่น *Pichia* , *Pachysolen* , *Candida* สามารถหมักน้ำตาลไซโลสไปเป็นเอทานอลได้ ดังนั้นการคัดกรองยีสต์เหล่านี้แล้ว (Schneider และคณะ 1981) ที่มีศักยภาพสูงเพียงพอที่จะนำไปใช้ได้ในเชิงพาณิชย์จึงเป็นสิ่งที่ควรจะทำ เพราะลักษณะภูมิอากาศของประเทศไทยเอื้อในด้านความหลากหลายทางชีวภาพของสายพันธุ์ของจุลินทรีย์

กระบวนการเปลี่ยนเซลลูโลสเป็นเอทานอลโดยจุลินทรีย์

ลิกโนเซลลูโลสเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่พบในผนังเซลล์พืช ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน

เซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์สายยาวของน้ำตาลกลูโคส(6-C) เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์ที่เป็นน้ำตาลคาร์บอน 5 ตัว (Xylose) ทั้งเฮมิเซลโลส และเซลลูโลสสามารถย่อยสลายไปเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวได้ด้วยกรดภายใต้อุณหภูมิและความดันต่างๆหรือด้วยเอนไซม์ที่ได้จากจุลินทรีย์ ต่อจากนั้นยีสต์จึงจะสามารถนำน้ำตาลเชิงเดี่ยวไปหมักเป็นเอทานอลต่อไป ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 กระบวนการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลส

การผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสจะมีประสิทธิภาพสูง หากทั้งน้ำตาลไซโลสและกลูโคส ที่เกิดขึ้น ถูกยีสต์นำมาหมักเป็นเอทานอล

2.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

คัดกรองเชื้อราซึ่งสามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสและไซโลสไปเป็นเอทานอล

2.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สายพันธุ์เชื้อราซึ่งสามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล ทำให้กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมีความคุ้มทุนมากขึ้น

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อราจากมูลสัตว์กินพืชซึ่งสามารถหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลส

นำตัวอย่าง มูลสัตว์กินพืชประมาณ 1 กรัม ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast nitrogen base (w/o) amino acid ที่มีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว pH 5 และ pH 7 (ภาคผนวก ซึ่งต่อไปจะเรียกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ YX) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อ 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิมที่มีปริมาตร 20 มิลลิลิตร บ่มที่สภาวะเดิม เมื่อครบเวลาทำการถ่ายเชื้ออีกรอบ ด้วยวิธีเดียวกันลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรเดิม และ บ่มที่สภาวะเดิม แล้วนำมาเจือจางใน 0.85%(w/v) NaCl ให้ได้ความเจือจางที่ 10^{-1}-10^{-8} จากนั้นนำแต่ละความเจือจางมา spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YX ชนิดแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ทำเชื้อราที่แยกได้เป็นสายพันธุ์บริสุทธิ์โดยการ streak plate หรือ point inoculation ลงบนอาหารแข็งชนิดเดิมและบ่มที่สภาวะเดิม เก็บเชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ที่ได้บนอาหารแข็งเอียง ที่ 4 องศาเซลเซียส

3.2 คัดกรองเชื้อราที่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล

3.2.1 การหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพมีอากาศจำกัด

1. เลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร YX จำนวน 9 มิลลิลิตร อาหารบรรจุในหลอดทดลอง ขนาด 16x150 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศ 24-72 ชั่วโมง
2. นำเชื้อราที่ได้จากข้อ 1 มาเทลงใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และเติมอาหารเหลว YX ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 81 มิลลิลิตร ปิดฝา flask ด้วย paraffin ทับลงบนสำลีบ่มที่สภาวะเดิมโดยไม่มีการเขย่าให้อากาศเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
3. ปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนน้ำใส แล้วนำไปวิเคราะห์เอทานอลโดยวิธี Gas Chromatography

3.2.2 การหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพมีอากาศจำกัดแต่เพิ่มจำนวนเชื้อเริ่มต้น

1. เลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร YX จำนวน 10 มิลลิลิตร อาหารบรรจุในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตรที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศ 24-48 ชั่วโมง
2. นำเชื้อราที่ได้จากข้อ 1 มาเทลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร YX ที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปเขย่าให้อากาศที่อุณหภูมิห้องเป็น เวลา 48 ชั่วโมง

3. นำเชื้อราที่ได้จากข้อ 2 มาเทลงใน flask ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว ปิดฝา flask ด้วย paraffin บ่มที่สภาวะเดิมโดยไม่มีการเขย่าให้อากาศเป็นเวลา 72 ชั่วโมง
4. ปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนน้ำใส นำไปวิเคราะห์เอทานอลโดยวิธี Gas Chromatography

3.2.3 การหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพที่มีอากาศ

1. เลี้ยงเชื้อราสายพันธุ์บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร YX จำนวน 5 มิลลิลิตร บรรจุในหลอดทดลองขนาด 16x150 มิลลิเมตร เขย่าให้อากาศที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24-72 ชั่งโมง
2. นำเชื้อราที่ได้จากข้อ 1 มาเทลงใน flask ขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมอาหารเลี้ยงเหลว YX ที่มีความเข้มข้นของไซโลสเพิ่มเป็น 10%(w/v) และทำให้ปราศจากเชื้อแล้ว 45 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศ 72 ชั่วโมง
3. ปั่นเหวี่ยง เก็บส่วนน้ำใส นำไปวิเคราะห์เอทานอลโดยวิธี Gas chromatography

3.3 การศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสระหว่าง *Pichia stipitis* และ *Candida* sp. F1

1. การศึกษาการเจริญของ *P. stipitis* และ *Candida* sp F1

ปลูกโคโลนีเดี่ยวของ *P. stipitis* หรือ *Candida* sp F1 ซึ่งเจริญบนอาหารแข็ง YPD ที่ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว YPD (3 ml ในหลอดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 16 x 150 มม.) บ่มที่ 30°C เขย่าให้อากาศที่ 150 ต่อนาที 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว YPD (50 ml ใน 250 ml flask) กำหนดค่าความขุ่นเริ่มต้น (OD660 nm) เท่ากับ 0.1 บ่มที่สภาวะเดิม ติดตามวัดค่าความขุ่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น และนับจำนวนเซลล์มีชีวิตโดยวิธี spread plate ลงบนอาหารแข็ง YPD บ่มที่ 30°C 48 ชั่วโมง เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นและระยะเวลาการบ่ม

2. เลี้ยง *P. stipitis* หรือ *Candida* sp F1 ตามวิธีในข้อ 1.1 เจือจางเชื้อระยะ log phase ด้วยอาหารเหลว YPD ให้เป็น 1.3 x 10^7 cells/ml แล้วปลูกเชื้อ (10% v/v) ลงในอาหารเหลว YX (50 ml ใน 250 ml flask) บ่มที่ 30°C เขย่าให้อากาศ 150 รอบต่อนาที 72 ชั่วโมง หรือลงในอาหารเหลว YX (42 ml ใน 50 ml flask) ปิดจุก flask ด้วยสำลีทับด้วยแผ่น paraflim บ่มที่ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ปั่นแยกน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 4°C 10,000 รอบต่อนาที วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในส่วนใสด้วยวิธี gas chromatography

3.4 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

3.4.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอของยีสต์ที่เพาะบนอาหาร YM agar อายุ 24-48 ชั่วโมง มาละลายเซลล์ใน lysis buffer (100mM Tris(pH 8.0), 30 mM EDTA (pH8.0), 0.5% SDS) นำไปต้มใน water bath หรือ metal block ประมาณ 15 นาที เติม Potassium acetate (pH 7.0) ความเข้มข้น 2.5 M ปริมาณ 200 µl ผสมให้เข้ากัน แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเก็บส่วนน้ำใส่ปั่นเหวี่ยงในเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่ 4°C เก็บสารละลายเหนือตะกอน (supernatant) สกัดโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ โดยเติม $CHCl_3$-isoamylalcohol อัตราส่วน 24:1 ในปริมาณ 1 เท่าของสารละลายเหนือตะกอน (supernatant) แล้วผสมให้เข้ากันจึงไปปั่นเหวียงโดยเครื่องปั่นเหวียงที่ความเร็ว 13,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที่ ที่ 4°C เก็บสารละลายใส่ส่วนบน และทำซ้ำสำหรับการสกัดโปรตีนออกจากดีเอ็นเอ จากนั้นเติม isopropanol ที่แช่เย็นในปริมาณ 1 เท่าของสารตัวอย่างดีเอ็นเอที่เหลืออยู่ แล้วนำไปแช่เย็นที่ -20 °C ประมาณ 20 นาที จึงปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 14,500 รอบต่อนาที นาน 16 นาที เก็บตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นล้างตะกอนด้วย ethanol ความเข้มข้น 70% แล้วปั่นเหวี่ยง14,500 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ตามด้วย ethanol ความเข้มข้น 90% เก็บตะกอน จากนั้นทำแห้ง ดีเอ็นเอ แล้วละลายดีเอ็นเอที่ได้ ด้วยน้ำ nano pure ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ประมาณ 20-30 µl และเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้

3.4.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์ตามวิธีที่ดัดแปลงจากKurtzman และ Robnett (1998) โดยใช้ F63 (5'-GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3') เป็น forward primer และ LR3 (5'-GGT CCG TGT TTC AAG ACG G-3') เป็น reverse primer เตรียม PCR reaction mixture ตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิต Taq polymerase (Fermentas, USA) ที่มีองค์ประกอบ ดังนี้

PCR buffer (10X)	10 ไมโครลิตร
MgCl2 (25 mM)	8 ไมโครลิตร
dNTP mix (2.5 mM)	8 ไมโครลิตร
Primer NL1 (10 pmol)	3 ไมโครลิตร
Primer NL4 (10 pmol)	3 ไมโครลิตร
Taq polymerase (Fermentas; 5U/µl)	0.5 ไมโครลิตร
DNA template (<1 µg)	1 ไมโครลิตร
Sterilized nanopure water	57.3 ไมโครลิตร

ปริมาตรทั้งหมด 100 ไมโครลิตร

นำส่วนผสมของปฏิกิริยาที่ได้จากการเตรียมข้างต้นมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ในเครื่อง PCR System 9700 (Applied Biosystems, USA) ที่ตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

1. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	5 นาที (pre-denaturation)
2. อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส	1 นาที (denaturation)
3. อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส	1 นาที (annealing)
4. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	1 นาที (extension)
5. อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส	10 นาที (final extension)

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 35 รอบ เมื่อสิ้นสุดการทำงาน เก็บผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอโดยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (PCR product) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ตรวจสอบความบริสุทธิ์ของ PCR product โดยการทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส และมี 100 bp DNA Ladder (Fermentas, USA) เป็นดีเอ็นเอเครื่องหมาย (DNA marker) นำเจลไปย้อมด้วยเอทิเดียมโบร์ไมด์ (ethidium bromide) และส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเลตโดยเครื่อง UV transilluminator (Ultra-Lum Inc., Canada) ที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.4.3 การทำบริสุทธิ์ PCR

จากนั้นนำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์โดยใช้ QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, Germany) ตามวิธีที่ แนะนำจากบริษัทผู้ผลิตดังนี้ นำ PCR product ผสมกับ PB buffer (ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตร PCR product) ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นถ่ายลงใน QIAquick spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง จากนั้นเติม PE buffer ลงไปใน QIAquick spin column 0.75 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 30 วินาที เทของเหลวที่ผ่านคอลัมน์ทิ้ง ปั่นเหวี่ยง QIAquick spin column อีกครั้ง ที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที นำส่วนของคอลัมน์วางลงในหลอด microcentrifuge หลอดใหม่ ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ล้างดีเอ็นเอที่ติดอยู่ในคอลัมน์ด้วยน้ำนาโนเพียวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และวางไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 1 นาที จากนั้นตรวจสอบความเข้มของ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วย QIAquick PCR Purification Kit โดยนำมาทำอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซีส โดยมี 100 bp DNA Ladder เป็น ดีเอ็นเอเครื่องหมาย

3.4.4 การหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA

นำ PCR product ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ในข้อ 4.2 มาทำ cycle sequencing โดยใช้ BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit version 3.1 (Applied Biosystems, USA) ไพรเมอร์ F63 เป็น forward primer และ LR3 เป็น reverse primer โดยส่วนผสมของปฏิกิริยาประกอบด้วย

Sequencing buffer (5X)	1 ไมโครลิตร
BigDye (2.5X)	2 ไมโครลิตร
Primer (1.6 pmol)	1 ไมโครลิตร
Reverse osmosis sterile	4 ไมโครลิตร
DNA template (5-20 ng)	2 ไมโครลิตร

(ความเข้มข้นของดีเอ็นเออยู่ในช่วงที่บริษัทผู้ผลิต BigDye แนะนำ)

ปริมาตรทั้งหมด 10 ไมโครลิตร

นำหลอด PCR ที่มีส่วนผสมของปฏิกิริยาใส่ในเครื่อง PCR และตั้งโปรแกรมการทำงานดังนี้

1. อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส	30 วินาที (pre-denaturation)
2. อุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส	10 วินาที (denaturation)
3. อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส	5 วินาที (annealing)
4. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	4 นาที (extension)
5. อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส	10 นาที (final extension)

ทำซ้ำข้อ 2-4 จำนวน 25 รอบ จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการทำ cycle sequencing (sequencing product) มาตกตะกอนดีเอ็นเอโดยผสม sequencing product กับสารละลายเอทานอล/โซเดียมอะซิเตท (เอทานอลบริสุทธิ์ 95 มิลลิลิตร, 3M โซเดียมอะซิเตท (pH 4.6) 4 มิลลิลิตร และน้ำนาโนเพียวที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1 มิลลิลิตร) ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เพื่อแยกตะกอนดีเอ็นเอ ดูดสารละลายออกจากหลอดอย่างระมัดระวังเพื่อไม่ให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุดออกมาด้วย จากนั้นเติมเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 14,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ดูดสารละลายออกอย่างระมัดระวัง และทำตะกอนดีเอ็นเอให้แห้งโดยใช้เครื่อง Thermolyne (Barnstead, USA) ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยใช้เครื่องหาลำดับนิวคลีโอไทด์แบบอัตโนมัติ

3.4.5 การจัดจำแนกยีสต์โดยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ26S rDNA

นำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่วิเคราะห์ได้มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆที่อยู่ในฐานข้อมูล GenBank (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast) โดยใช้BLASTN (Basic Local Alignment Search Tool for nucleotide) homology search program (Altschul และคณะ 1997)

3.4.6 การสร้างต้นไม้วิวัฒนาการ

ทำโดยเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของสปีชีส์ที่ใกล้เคียงที่สุดโดยใช้ multiple alignment program CLUSTAL X ver. 1.81 (Thompson และคณะ 1997) ส่วนต้นไม้วิวัฒนาการสร้างจากข้อมูลความแตกต่างทางวิวัฒนาการตามวิธี two-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้neighbor-joining method (Saitou and Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985)

3.5 การศึกษาลักษณะยีสต์สปีชีส์ตามเกณฑ์ที่ใช้สำหรับอนุกรมวิธาน

นำยีสต์ที่พบว่าเป็นสปีชีส์ใหม่เมื่อจัดจำแนกโดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และมาศึกษาลักษณะต่างๆ ตามเกณฑ์อนุกรมวิธานคือ สรีรวิทยาและชีวเคมีรายละเอียดดังนี้

3.5.1 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

ศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่มีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทยีสต์ในระดับสปีชีส์และใช้ประจำในการจัดจำแนกยีสต์ ดังนี้

3.5.1.1 การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนเป็นการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการใช้สารประกอบคาร์บอนเป็นแหล่งพลังงานสำหรับการเจริญแบบใช้ออกซิเจน เป็นการทดสอบที่ใช้สำหรับการจัดจำแนกระดับสปีชีส์ การแอสซิมิเลตสารประกอบบางชนิด เช่น กรดดี-กลูโคโรนิก, ดี-ไซโลส และอินออซิทอลสามารถใช้เพื่อแยกสกุลของยีสต์ได้ การทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลวทำตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยใช้สารประกอบคาร์บอนจำนวน 39 ชนิด ดังนี้

เฮกโซส	ดี-กลูโคส, กาแลกโทส และซอร์โบส
ไดแซคคาไรด์	เซลโลไบโอส, แลกโทส, มอลโทส, เมลลิไบโอส, ซูโครสและทรีฮาโลส
ไตรแซคคาไรด์	เมลลิซิโทส และราฟฟีโนส
โพลีแซคคาไรด์	อินูลิน และแป้ง
เพนโทส	ดี-อะราบิโนส, แอล-อะราบิโนส, ดี-ไรโบส,แอล-แรมโนส และดี-ไซโลส
แอลกอฮอล์	กาแลกทิทอล, อิริทริทอล, ดี-กลูซิทอล, อินออซิทอล, ดี-แมนนิทอล, กลีเซอรอล, ไรบิทอล, เอทานอลและเมทานอล
กรดอินทรีย์	กรดซิตริก, กรดแลคติก, กรดซักซินิก, กรดดี-กลูโคโรนิก, กรดกาแลกตุโรนิก และกรดดี-กลูโคนิก
ไกลโคไซด์	แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์ และซาลิซิน
สารประกอบอื่น	เอ็นอะซิติล-ดี-กลูโคซามีน, ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน, 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต และ 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต

สำหรับวิธีการที่ใช้ทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนในอาหารเหลว ทำโดยเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย โดยใช้ลูปถ่ายเชื้ออายุ 24-48 ชั่วโมง ลงไปในน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยการใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบกับหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นเป็นแถบสีดำพร่า (ซึ่งเท่ากับ 1+ เมื่ออ่านผลการเจริญ) จากนั้นเพาะเชื้อโดยใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อ หยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน จำนวน 1 หยด ในการทดสอบใช้อาหารที่ไม่เติมสารประกอบคาร์บอนเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ (negative control) และใช้อาหารที่เติมกลูโคสเป็นหลอดควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก (positive control) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจผลทุกสัปดาห์จนครบ 4 สัปดาห์ โดยตรวจวัดระดับการเจริญซึ่งทำโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร เช่นเดียวกับที่ใช้ในการเตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย ทาบหลอดลงด้านหน้าเส้น มองผ่านหลอดเลี้ยงเชื้อแล้วสังเกตเส้นสีดำ ดังนี้ +++ คือ การเจริญของเชื้อที่มีความขุ่นซึ่งจะลบเส้นสีดำอย่างสมบูรณ์, ++ เห็นเส้นพร่า, + เห็นเส้นแต่ขอบเห็นไม่ชัด และ – คือ เห็นเส้นและขอบชัดเจน จากนั้นทำการรายงานผลดังรายละเอียดต่อไปนี้

+	=	การเจริญเป็นบวก (positive) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ในสัปดาห์ที่ 1หรือสัปดาห์ที่ 2
l	=	การเจริญเป็นบวกล่าช้า (delayed positive, latent) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ อย่างรวดเร็ว แต่หลังจาก 2 สัปดาห์ หรือ นานกว่า
s	=	การเจริญเป็นบวกช้า (slow positive) คืออ่านผลเป็น ++ หรือ +++ ช้าๆ ในระยะเวลาที่นานกว่า 2 สัปดาห์
w	=	การเจริญเป็นบวกอ่อน (weak positive) คืออ่านผลเป็น +
		- = ไม่มีการเจริญ อ่านผลเป็นลบ
(+)	=	นานๆ ครั้งที่ผลเป็นบวก (seldom positive)
v	=	ผันแปร (variable) คือบางสายพันธุ์เป็นบวก และบางสายพันธุ์เป็นลบ
+/w	=	บวก หรือ บวกอ่อน คือทุกสายพันธุ์เจริญแต่บางสายพันธุ์เจริญน้อย
w/-	=	บวกอ่อน หรือ ลบ

3.5.1.2 การหมักคาร์โบไฮเดรต

การหมักหมายถึงการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งยีสต์มีความสามารถในการหมักน้ำตาลต่างๆ กัน โดยทั่วไปน้ำตาลที่ใช้ตรวจสอบความสามารถในการหมักของยีสต์ คือ ดี-กลูโคส, ดี-กาแลกโทส มอลโทส, ซูโครส, ทรีฮาโลส, แลกโทส, ราฟฟีโนส และเมลลิไบโอส โดยทดสอบการหมักน้ำตาลตามวิธีของ Yarrow (1998)

วิธีทดสอบทำโดยเตรียมอาหารสำหรับทดสอบการหมักน้ำตาล (fermentation basal medium) (ภาคผนวก) ใส่ลงในหลอดทดสอบซึ่งภายในบรรจุหลอดดักแก๊ส (Durham tube) หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที จากนั้นทำการเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ยกเว้นราฟฟีโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด เตรียมเซลล์ยีสต์แขวนลอย โดยใช้ลูปถ่ายเชื้ออายุ 24-48 ลงไปในน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 มิลลิลิตร ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่เตรียมได้นั้นประเมินโดยการใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึกดำกว้างประมาณ 0.75 มิลลิเมตร แต่ละเส้นห่างกัน 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปทาบกับหลอดที่บรรจุเซลล์ยีสต์แขวนลอย ความขุ่นของเซลล์ยีสต์แขวนลอยที่ใช้สำหรับเป็นกล้าเชื้อเท่ากับความขุ่นที่มองผ่านหลอดเซลล์ยีสต์แขวนลอยแล้วเห็นเส้นเป็นแถบสีดำพร่า (ซึ่งเท่ากับ 1+ เมื่ออ่านผลการเจริญ) เพาะยีสต์โดยใช้พาสเจอร์ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอยลงในอาหารทดสอบที่มีสารละลายน้ำตาล

ชนิดต่าง ๆ จำนวน 1 หยด บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ตรวจผลการหมักโดยสังเกตปริมาณแก๊สที่สะสมในหลอดดักแก๊ส และการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทุกวันจนครบ 7 วัน จากนั้นตรวจสอบทุกสัปดาห์จนครบ 28 วัน ผลการหมักรายงานโดยอาศัยเวลาที่ใช้ในการสร้างแก๊สให้เต็มหลอดดักแก๊ส และปริมาณแก๊สที่สะสมไว้ในหลอดดักแก๊ส ดังนี้

+	=	มีการหมักรุนแรง (strong positive) คือมีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สภายใน 7 วัน
l	=	การหมักเกิดล่าช้า (delayed positive หรือ latent positive) คือมีแก๊สเต็มหลอดดักแก๊สอย่างรวดเร็ว แต่การหมักเกิดหลังจากบ่มนานกว่า 7 วัน
s	=	การหมักเกิดช้าๆ (slowly positive) คือมีแก๊สค่อยๆ เข้าไปจนเต็มหลอดดักแก๊ส หลังจากบ่มนานกว่า 7 วัน
+w	=	การหมักอ่อน (weak positive) คือมีแก๊สไม่เต็มหลอดดักแก๊ส (มีแก๊สน้อยกว่าหนึ่งในสามของหลอด ในขณะที่ถ้ามีแก๊สมากกว่าหนึ่งในสามของหลอดจัดว่าเป็นบวก)
-	=	ไม่มีการหมัก คือในหลอดดักแก๊สไม่มีแก๊ส
v	=	บางสายพันธุ์หมักน้ำตาลได้ บางสายพันธุ์ไม่หมัก

3.5.1.3 การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

การแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนศึกษาบนอาหารแข็งโดยใช้ starved inoculum ตามวิธีของ Nakase และ Suzuki (1986a) ยีสต์ทุกชนิดใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่ง ไนโตรเจนได้ สารประกอบไนโตรเจนที่ใช้ในการศึกษาการแอสซิมิเลตมี 6 ชนิด ได้แก่

แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate) โปแตสเซียมไนเตรต (nitrate) โซเดียมไนไตรต์ (nitrite)เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (ethylamine HCl) แอล-ไลซีน (L-lysine) และคาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์ (cadaverinedihydrochloride)

การทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนในอาหารแข็งทำโดยเพาะยีสต์บนอาหาร YM agar เพื่อเป็นกล้าเชื้อ จากนั้นทำการถ่ายเชื้อจำนวนน้อยๆ ลงในอาหาร Yeast Carbon Base (YCB) broth (ภาคผนวก) บ่มที่ 28 องศาเซลเซียส นาน 1 สัปดาห์ เพื่อให้ยีสต์ใช้ไนโตรเจนที่สะสมไว้ภายในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นใช้พาสเจอร์ปีเปตหยดเซลล์ยีสต์แขวนลอย 1 หยด ลงบนจานอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ในการทดสอบใช้อาหารที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นลบ และอาหารที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก ตรวจผลโดยสังเกตการเจริญของยีสต์ทุก 2-4 วัน จนครบ 28 วัน

3.5.1.4 การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ (amyloid) ภายนอกเซลล์

การสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์ทำตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยตรวจภายหลังการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน และสารประกอบไนโตรเจนเสร็จเรียบร้อย โดยหยด Lugol's solution (ภาคผนวก) ลงในหลอดทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และบนจานอาหารที่ทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจนที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มหรือสีน้ำเงินแกมเขียว แสดงว่ามีการสร้างสารประกอบอะมัยลอยด์และปล่อยออกมาภายนอกเซลล์

3.5.1.5 การเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามิน

ทดสอบการเจริญบนอาหารที่ปราศจากวิตามินตามวิธีของ Komagata และNakase (1967) โดยเพาะยีสต์บนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน ถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆ ลงในอาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium) (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน เพื่อให้ยีสต์ใช้วิตามินที่สะสมภายในเซลล์ออกให้หมด จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาณน้อยๆ ลงในอาหารที่ปราศจากวิตามินหลอดใหม่ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ตรวจผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ 28 วัน โดยสังเกตการเจริญของเชื้อ และรายงานผลตามการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

3.5.1.6 ความต้านทานไซโคลเฮกซิไมด์

ทดสอบความต้านทานไซโคลเฮกซิไมด์ตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีแบกโต-ยีสต์ไนโตรเจนเบส และ ดี-กลูโคส ที่มีการเติมไซโคลเฮกซิไมด์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 ส่วนต่อล้านส่วน และ 1000 ส่วนต่อล้านส่วน (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ ตรวจผลทุก 3, 5, 7, 14, 21 และ28 วัน โดยสังเกตการเจริญของยีสต์และรายงานผลตามการทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

3.5.1.7 การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

ตรวจสอบความสามารถในการเจริญบนอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงและเกลือความเข้มข้นสูงตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนอาหารแข็ง4 ชนิด คือ อาหารแข็งที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์ และกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน 3 สัปดาห์ ตรวจสอบการเจริญของยีสต์บนอาหารแข็งทุก 3, 5, 7, 14 และ 21 วัน

3.5.1.9 การทดสอบการย่อยเยลาติน

ความสามารถในการย่อยหรือทำให้เยลาตินเหลว โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนอาหารที่มีเปบโทนและเยลาตินโดยการแทง (stab) เชื้อลงในอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 20-26 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วัน ตรวจสอบการเหลว โดยเอาหลอดเลี้ยงเชื้อไปบ่มในตู้เย็น เป็นเวลา 30 นาที แล้วเอาออกมาดูการเหลว

3.5.1.10 การไฮโดรไลซ์ยูเรีย

ทดสอบการไฮโดรไลซ์ยูเรียตามวิธีของ Yarrow (1998) โดยเพาะยีสต์อายุ 24-48 ชั่วโมง ลงบนอาหาร Christensen's urea agar (ภาคผนวก) บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส นาน21 วัน ถ้ามีการไฮโดรไลซ์ยูเรียพีเอชที่เพิ่มขึ้นจะเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นสีชมพูแดง ในการทดสอบใช้ยีสต์ในสกุล Rhodotorula เป็นตัวควบคุมที่ให้ผลเป็นบวก

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกเชื้อราที่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลจากมูลสัตว์กินพืช

ผลการแยกเชื้อราจากตัวอย่างมูลสัตว์กินพืชที่เก็บจากบริเวณต่างๆ (ตารางที่ 4.1) จำนวน 32 ตัวอย่าง โดยวิธี Enrichment culture และ spread plate บนอาหารแข็งสูตร YX ซึ่งมีน้ำตาลไซโลส (2% w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนเพียงชนิดเดียว สามารถแยกเชื้อราสายใยซึ่งมีลักษณะแตกต่างกัน จากแหล่งต่างๆ ทั้งหมด 9 ไอโซเลตและสามารถแยกเชื้อราเซลล์เดี่ยว (ยีสต์) ที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน 8 แบบดังแสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 และเมื่อเปิดฝา plate ที่เพาะเลี้ยงเชื้อราสายใยไม่ได้กลิ่นเอทานอล แต่เมื่อเปิด plate ที่เพาะเลี้ยงยีสต์ จะได้กลิ่นเอทานอล แสดงว่าเชื้อราสายใยที่แยกได้ไม่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลแต่ยีสต์ทั้งหมดที่แยกได้สามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล

ตารางที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่แยกได้จากตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ

ลักษณะโคโลนี	ตัวอย่างและแหล่งที่มา	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี(ซม.)
A1	มูลช้างจังหวัดปราจีน	0.30
A2	มูลช้างสวนสัตว์เขาดิน กทม.	0.30
A3	มูลแพะสวนสัตว์เขาดิน กทม.	0.20
A4	มูลยีราฟสวนสัตว์เขาดิน กทม.	0.30
A5	มูลค่างสวนสัตว์เขาดิน กทม.	0.20
A6	มูลวัวค่ายทหารจังหวัดขอนแก่น	0.25
A7	มูลควายบ้านเหล่าอ้อยจังหวัดกาฬสินธุ์	0.25
A8	มูลควาย อ.ยางตลาด จ. กาฬสินธุ์	0.25
A9	มูลวัว บริเวณ 1 อ. โคกสะอาด จ. อุดรธานี	0.30
A10	มูลวัว บริเวณ 2 อ. โคกสะอาด จ. อุดรธานี	0.30
A11	มูลวัว บริเวณ 3 อ. โคกสะอาด จ. อุดรธานี	0.30
A12	มูลลูกวัว อ.กมลาไสย จ. กาฬสินธุ์	0.30
A13	มูลวัว บริเวณ 1 อ.กมลาไสย จ. กาฬสินธุ์	0.25
A14	มูลวัว บริเวณ 2 อ.กมลาไสย จ. กาฬสินธุ์	0.20
A15	มูลวัว บริเวณ 3 อ.กมลาไสย จ. กาฬสินธุ์	0.20
A16	มูลควายบริเวณ 1 บ้านโคกสี อ.กมลาไสย จ. กาฬสินธุ์	0.20

A17	มูลควายบริเวณ 2 บ้านโคกสี อ.กมลาไสย จ. กาฬสินธุ์	0.20
A18	มูลจิงโจ้ สวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.30
A19	มูลช้างสวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.30
A20	มูลม้าลายสวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.25
A21	มูลยีราฟสวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.25
A22	มูลเนื้อทรายสวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.30
A23	มูลละมั่งสวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.30
A24	มูลออร์ลิกสวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.30
A25	มูลม้าสวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.30
A26	มูลวัว อ. มัญจาคีรี จ.ขอนแก่น	0.30
A27	มูลเก้งสวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.25
A28	มูลม้าลายสวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.25
B1	มูลช้าง จ. ปราจีน	0.25
C1	มูลเก้งสวนสัตว์เขาดิน กทม.	0.15
D1	มูลเก้งสวนสัตว์เขาดิน กทม.	0.20
E1	มูลเก้งสวนสัตว์เขาดิน กทม.	0.40
F1	มูลค่างสวนสัตว์เขาดิน กทม.	0.30
G1	มูลม้าลายสวนสัตว์เขาดิน กทม.	0.40
H1	มูลม้าลายสวนสัตว์เขาดิน กทม.	0.10
I1	มูลม้าลาย สวนสัตว์ จ.นครราชสีมา	0.10

หมายเหตุ :

A, ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ตรงกลางนูนขึ้นมา มันวาว

B, ลักษณะโคโลนีสีชมพู กลม ขอบเรียบ มันวาว

C, ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น กลม ตรงกลางมีจุดเล็กๆนูนขึ้นมา

D, ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ข้างบนโคโลนีเป็นรอยหยัก

E, ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น มีลักษณะคล้ายสมอง

F, ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก

G, ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น ขอบเรียบ ตรงกลางนูนขึ้นมาเหมือนภูเขาไฟ

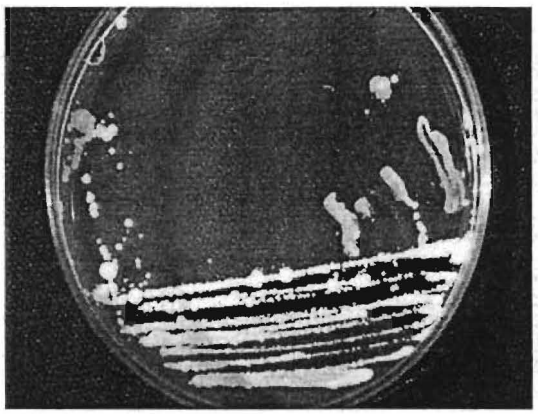
H, ลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ตรงกลางนูนขึ้นมา มันวาว ขนาดเล็กกว่า A

I,ลักษณะโคโลนีสีชมพูอ่อน กลม ขอบเรียบ ตรงกลางนูนขึ้นมา มันวาว

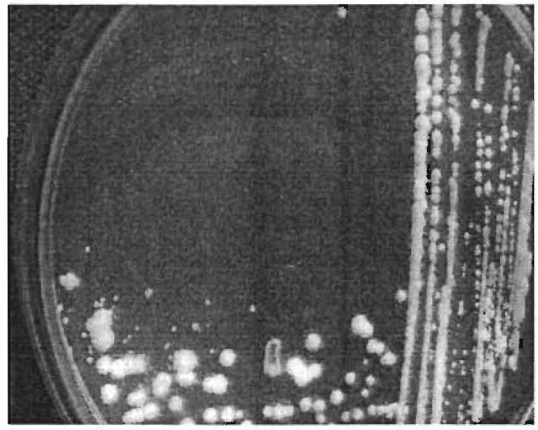
ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะโคโลนีของยีสต์ที่แยกได้

ภาพที่ **4.1-1** แสดงลักษณะแบบ A

ภาพที่ **4.1-2** แสดงลักษณะแบบ B



ภาพที่ **4.1-3** แสดงลักษณะแบบ C

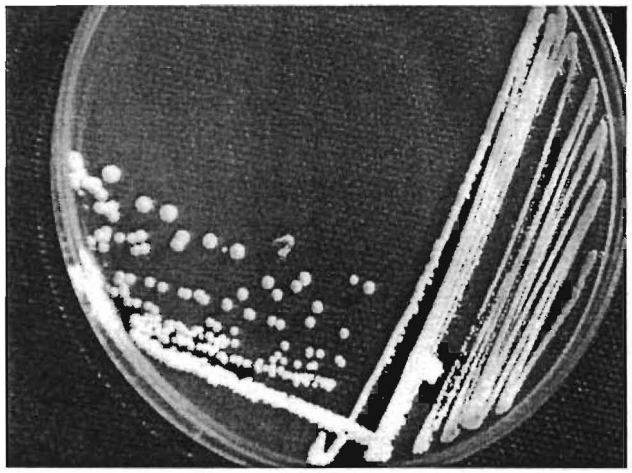


ภาพที่ **4.1-4** แสดงลักษณะแบบ D

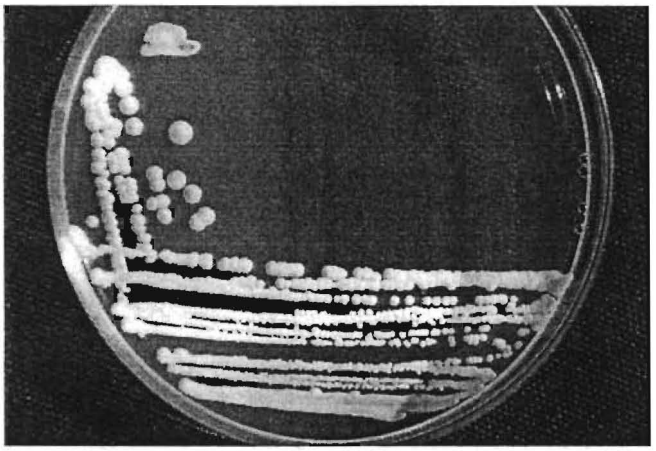
ภาพที่ **4.1-5** แสดงลักษณะแบบ E

ภาพที่ **4.1-6** แสดงลักษณะแบบ F

ภาพที่ **4.1-7** แสดงลักษณะแบบ G



ภาพที่ **4.1-8** แสดงลักษณะแบบ H

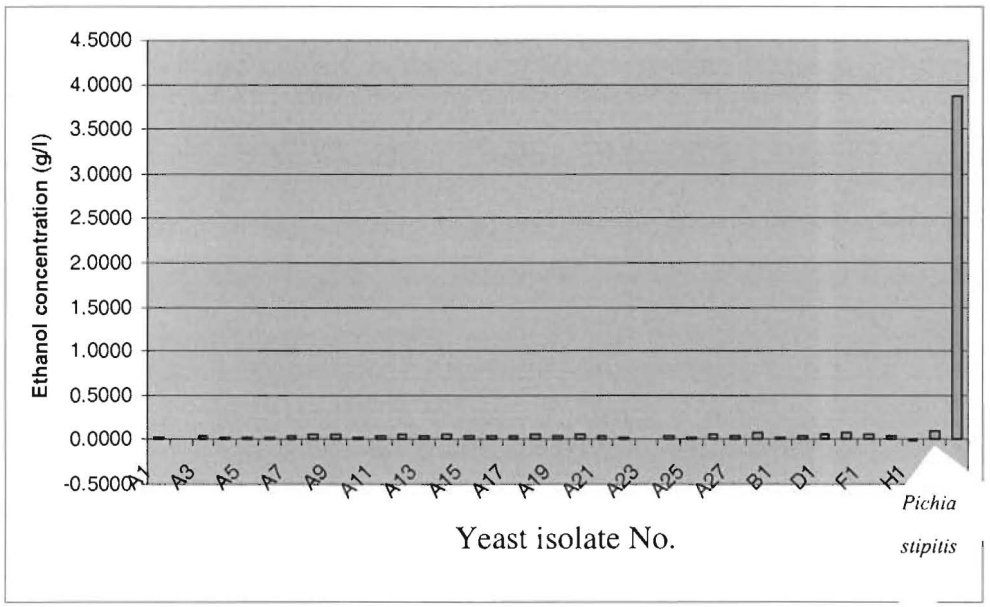


ภาพที่ **4.1-9** แสดงลักษณะแบบ I

4.2 ผลการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลของยีสต์ที่แยกได้

4.2.1 ผลจากการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพที่มีอากาศจำกัด

ผลการเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร YX ที่อุณหภูมิห้อง เขย่าให้อากาศ 24 ชั่วโมง และเมื่อนำมาทำให้เป็นสภาพที่มีอากาศจำกัดโดยการเติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร YX ลงไปจนเกือบเต็ม flask และ ปิดฝา flask ด้วย paraffin ทับบนจุกสำลีแล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง โดยไม่เขย่าต่ออีก เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อเปิดจุก flask จะได้กลิ่นเอทานอล บาง flask พบแผ่นฟิล์มที่ผิวหน้า เมื่อแยกน้ำเลี้ยงเชื้อมาวิเคราะห์เอทานอลพบว่ายีสต์ทุกไอโซเลตที่แยกได้ผลิตเอทานอลแต่ปริมาณเอทานอลที่ได้น้อยกว่า *Pichia stipitis* (ภาพที่ 4.2)

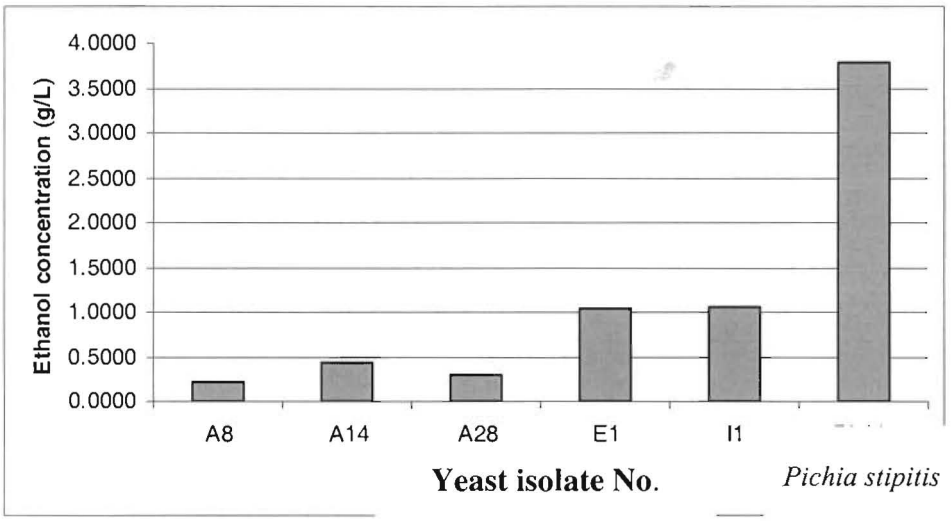


ภาพที่ 4.2 แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพที่มีอากาศจำกัดโดยยีสต์ที่แยกได้

4.2.2 ผลจากการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพที่มีอากาศจำกัด แต่เพิ่มจำนวนเชื้อเริ่มต้น

ผลการทดลองข้อ 2.1 พบว่าการเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นสำหรับหมักเอทานอลได้ 24 ชั่วโมงนั้น เชื้อมีความขุ่นน้อยจึงได้เลือกยีสต์ไอโซเลตที่ผลิตเอทานอลได้สูงจากผลการทดลองข้อ 2.1 มา 5 ไอโซเลต และเลี้ยงเชื้อในสภาพมีอากาศเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความขุ่นของเซลล์แล้วจึงเทอาหารเลี้ยงเชื้อ YX ลงไปเพิ่มใน flask จนเกือบเต็ม flask แล้ว ปิดฝา flask ด้วย paraffin ทับบนจุกสำลีเพื่อทำให้เป็นสภาพมีอากาศจำกัด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่ออีกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยไม่

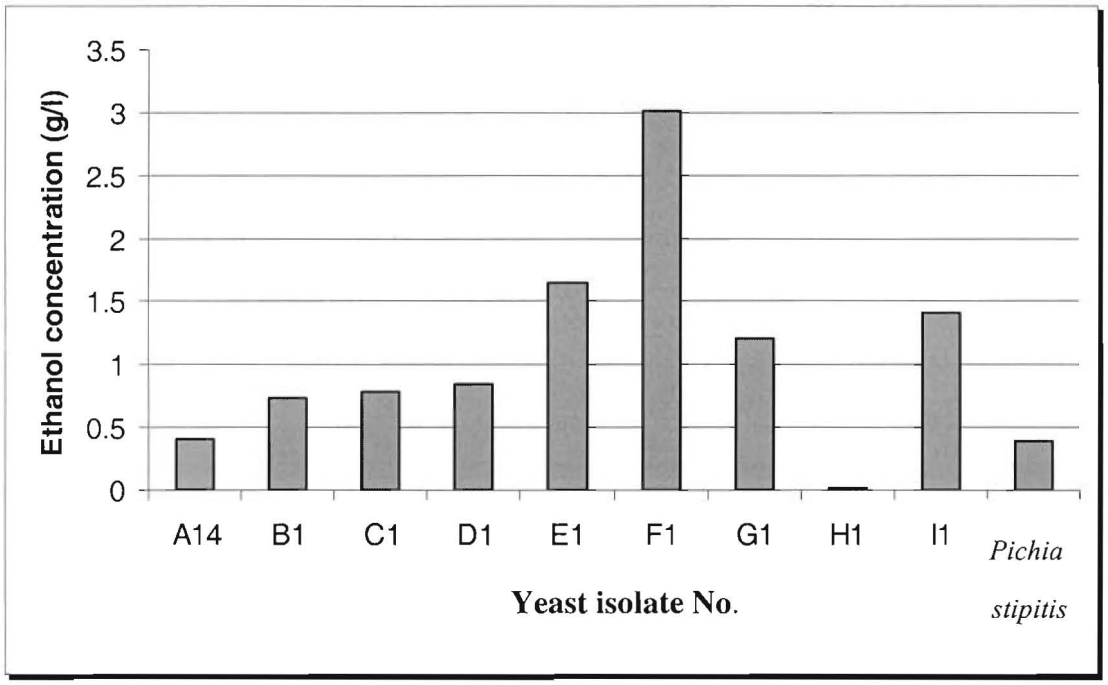
เขย่า เมื่อเปิดจุก flask ออกไม่ได้กลิ่นเอทานอล แต่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์เอทานอลพบว่ายีสต์ที่ทดสอบสามารถหมักเอทานอลได้และปริมาณเอทานอลที่ได้สูงกว่าการทดลองที่ 2.1 (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพที่มีอากาศจำกัด แต่เพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นขึ้นโดยเพิ่มระยะเวลาการบ่มเชื้อเริ่มต้นเป็น 48 ชั่วโมง

4.2.3 ผลจากการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพที่มีอากาศ

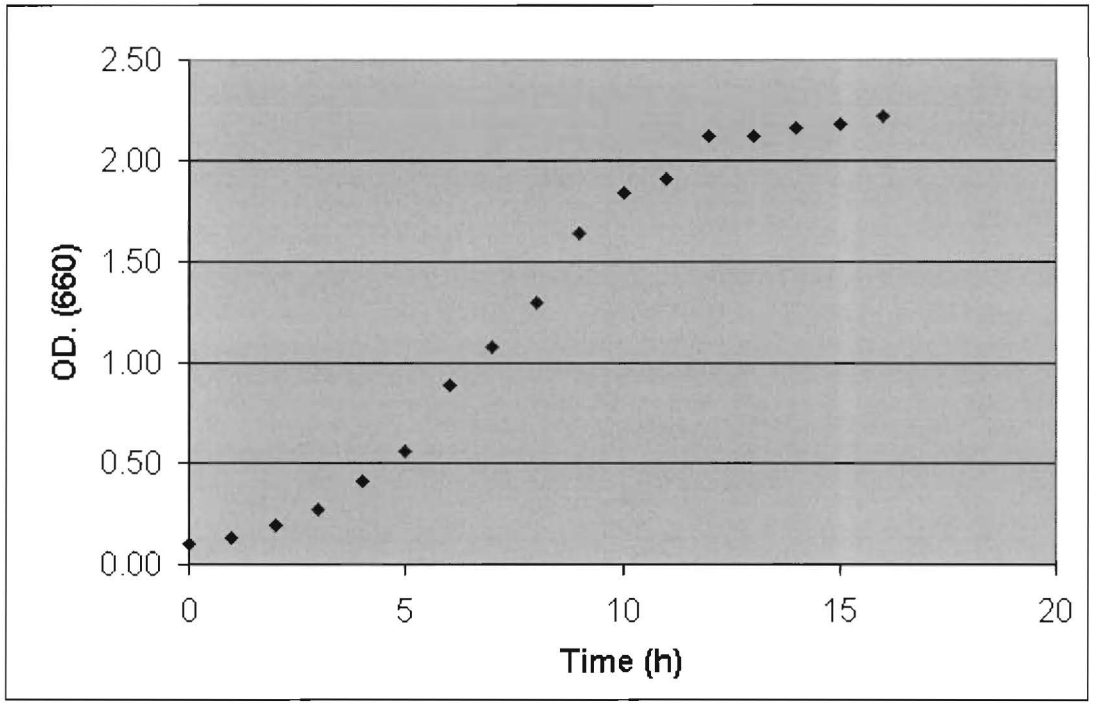
การทดลองนี้ได้เลือกยีสต์มา 9 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาศึกษาโดยเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น 24 ชั่วโมง แล้วเติมอาหารเหลว YX ที่มีน้ำตาลไซโลสเพิ่มจาก 2% (w/v) เป็น 10% (w/v) ลงไป พบว่าหลังการบ่มในสภาพที่มีอากาศต่ออีก 72 ชั่วโมง culture ที่ได้มีลักษณะขุ่น เมื่อเปิดจุก flask ไม่ได้กลิ่นเอทานอล แต่เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อไปวิเคราะห์เอทานอลพบว่าได้เอทานอลมากกว่าทั้งการทดลองที่ 2.1 และ 2.2 (ภาพที่ 4.4)



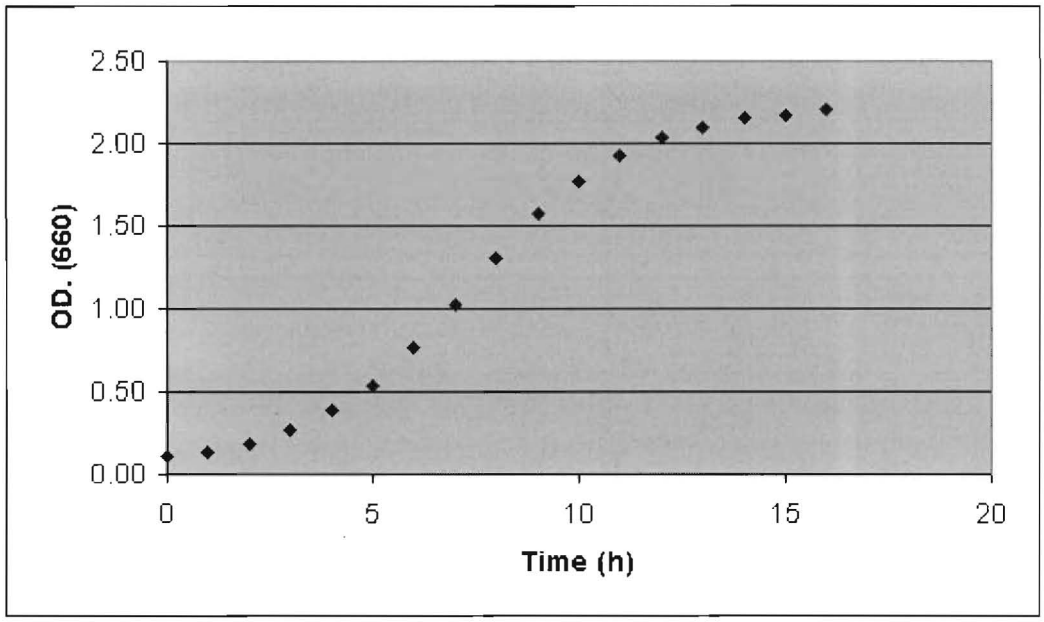
ภาพที่ 4.4 แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพที่มีอากาศโดยยีสต์ที่แยกได้

4.3 ผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสระหว่าง *Pichia stipitis* และ *Candida* sp F1

ผลการเลี้ยง *Pichia stipitis* และ *Candida* sp F1 ในอาหารเหลว YPD ที่ 30°C ให้อากาศโดยการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อค่าความขุ่นเริ่มต้นของเซลล์ (OD 660 nm) เท่ากับ 0.1 หลังการบ่มไว้ 6 ชั่วโมง ทั้ง *Pichia stipitis* และ *Candida* sp F1 จะเข้าสู่ระยะการเจริญ log phase ดังแสดงในภาพที่ 4.5 และภาพที่ 4.6

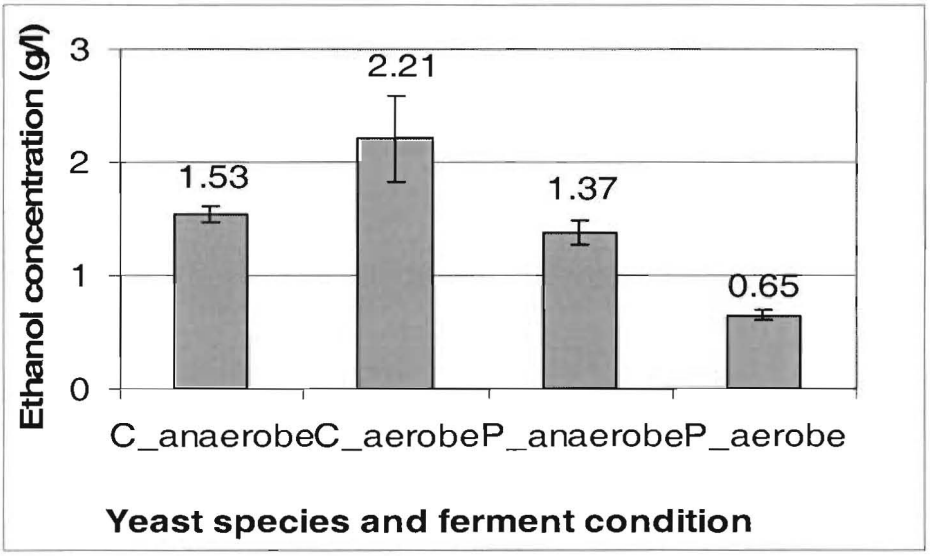


ภาพที่ 4.5 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์และระยะเวลาการบ่มของ *Pichia stipitis*



ภาพที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์และระยะเวลาการบ่มของ *Candida* sp. F1

ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสที่ 30°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยใช้ *P. stipitis* และ *Candida* sp. F1 ระยะ log phase จำนวน 1.3 x10^7 cell/ml (10% v/v) เป็นเชื้อเริ่มต้น พบว่า *P. stipitis* หมักเอทานอลในสภาวะมีอากาศจำกัดได้ดีกว่าสภาวะมีอากาศ สภาวะมีอากาศจำกัด *P.stipitis* ผลิตเอทานอลได้ 1.37 g/l แต่ *Candida* sp. F1 หมักเอทานอลในสภาวะมีอากาศได้ดีกว่าสภาวะมีอากาศจำกัด ในสภาวะมีอากาศ *Candida* sp. F1 ผลิตเอทาอนลได้ 2.21 g/l และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสระหว่าง *P.stipitis* และ *Candida sp F1* พบว่า *Candida sp F1* สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *P. stipitis* ในทั้งสองสภาวะทดสอบ ดังแสดงในภาพที่ 4.7

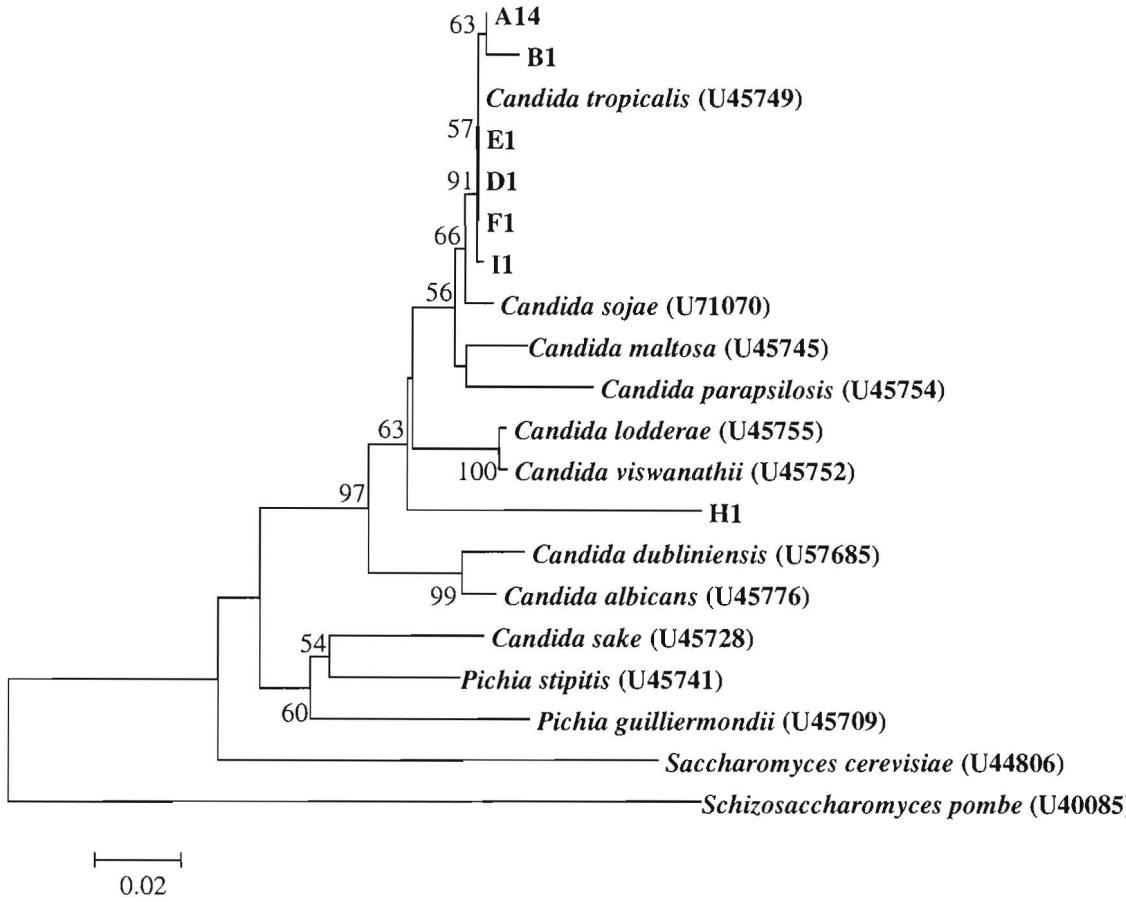


ภาพที่ 4.7 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสโดย *Candida* sp. F1 และ *P.stipitis*

4.4 การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA และการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

จากการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสตไอโซเลทต่างๆ มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้ BLASTN homology search program (Altschul และคณะ 1997) จัดจำแนกยีสต์ได้จากการคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลได้สูงได้แก่ A14, B1, DI, E1, F1, H1 และI1 จัดจำแนกได้ *Candida tropicalis* อยู่ในไฟลัม Ascomycota ชั้น Hemiascomycetes อันดับ Saccharomycetales โดยอยู่ในวงศ์ Candidaceae ซึ่งเป็น ระยะที่มีเฉพาะการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ โดยมีเปอร์เซนต์ identity 90-100% ยกเว้น H1 มีเปอร์เซนต์ identity 89% และเมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการจากต้นไม้วิวัฒนาการที่สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสต์สายพันธุ์ ดังกล่าว (ภาพที่4.8)

พบว่ายีสต์ทั้ง 7 สายพันธุ์อยู่ในตำแหน่งเดียวกันกับ *Candida tropicalis* บนต้นไม้วิวัฒนาการ ส่วน H1 จัดอยู่ใน *Candida sp.*



ภาพที่ 4.8 ต้นไม้วิวัฒนาการที่แสดงตำแหน่งของยีสต์ไอโซเลท A14, B1, E1, D1, H1, F1, I1 และสปีชีส์ที่มีความสัมพันธ์กัน สร้างจากลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ตามวิธีtwo-parameter ของ Kimura (Kimura, 1980) โดยใช้ neighbor-joining method (Saitouand Nei, 1987) และประเมินความน่าเชื่อถือจากการวิเคราะห์ค่า bootstrap โดยการทำซ้ำ 1,000 ครั้ง (Felsenstien, 1985) และแสดงเฉพาะค่า bootstrap ที่มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

จากการศึกษาลักษณะทางชีวเคมี พบว่ายีสต์ไอโซเลท A14, B1, E1, D1, H1, F1 และI1 สามารถเจริญที่ 50% glucose และในอาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium) สามารถใช้น้ำตาล ดี-กลูโคส, กาแลกโทส ซอร์โบส, ซูโครส, มอลโทส, เซลโลไบโอส, ทรีฮาโลส, เมลลิซิโทส, อินูลิน, แป้ง, ดี-ไซโลส, ไรบิทอล, ดี-แมนนิทอล, ดี-กลูซิทอล, แอลฟาเมทิล-ดี-กลูโคไซด์, ดี-กลูโคโน-5-แลกโตน, 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต, 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต, กรดซิตริก, กรดแลคติก และกรดซักซินิก เป็นแหล่งคาร์บอน นอกจากนี้กไอโซเลทสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส, กาแลคโตส, ซูโคส, มอลโทส และใช้ แอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate), เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (ethylamine HCl), แอล-ไลซีน (L-lysine) และคาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์ (cadaverinedihydrochloride) เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ เช่นเดียวกับ *Candida tropicalis* ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์

Characterise/Strain	A14	B1	D1	E1	F1	H1	I1	*C. tropicalis*[w0]
1. Growth on:								
1.1 50% Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
1.2 10% NaCl + 5% Glucose	-	+	+	-	+	-	+	l
1.3 Vitamin free medium	+	+	+	+	+	w	+	+
1.4 Cycloheximide 100 ppm	+	+	+	+	+	-	+	+
1.5 Cycloheximide 1000 ppm	+	+	+	+	+	-	+	+
2. Acid production by glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
3. Urea Hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-
4. Gelatin Hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-
5. Amyloid production	-	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ **4.2** ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์ (ต่อ)

Characterise/Strain	A14	B1	D1	E1	F1	H1	I1	*C. tropicalis* [%0]
6. Assimilation of Carbon compound :								
6.1 Glucose	+	+	+	+	+	-	+	+
6.2 Galactose	+	+	+	+	+	-	+	+
6.3 L-Sorbose	+	l	+	+	l	-	l	v
6.4 Sucrose	+	+	+	+	+	-	+	v
6.5 Maltose	+	+	+	+	+	-	+	+
6.6 Cellobiose	+	+	+	+	+	-	+	+/l
6.7 Trehalose	+	+	+	+	+	-	+	+
6.8 Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-
6.9 Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-
6.10 Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-
6.11 Melezitose	+	+	+	+	+	-	+	v
6.12 Inulin	l	s	+	s	s	-	+	-
6.13 Starch	+	+	+	+	+	s	+	+
6.14 D-Xylose	+	+	+	+	+	-	+	+
6.15 L-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
6.16 D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
6.17 D-Ribose	-	-	-	-	-	-	-	-/l
6.18 Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-
6.19 Ethanol	+	+	+	+	+	+	+	+
6.20 Glycerol	-	-	-	w	-	l	-	v
6.21 Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-
6.22 Ribitol	+	+	+	+	+	s	+	+/l
6.23 Galactitol	-	-	-	-	-	-	-	-
6.24 D-Mannitol	+	+	+	+	+	-	+	+
6.25 D-Glucitol	+	+	+	+	+	-	+	+
6.26 α-methyl-glucoside	+	+	+	+	+	-	+	v

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์ (ต่อ)

Characterise/Strain	A14	B1	D1	E1	F1	H1	I1	*C. tropicalis*[w@]
6.27 Salicin	s	s	s	s	s	-	s	v
6.28 Glucono-δ-lactone	l	l	l	+	+	-	+	nd
6.29 2-ketogluconic acid	+	+	+	+	+	-	+	+
6.30 5-ketogluconic acid	l	l	l	l	l	-	l	+
6.31 DL-lactic acid	+	+	+	+	+	s	+	v
6.32 Succinic acid	+	+	+	+	+	+	+	+
6.33 Citric acid	+	+	+	+	+	+	+	+
6.34 Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
6.35 D-Glucuronic acid	-	-	-	-	-	-	-	nd
6.36 D-galacturonic acid	-	-	-	-	-	-	-	nd
6.37 Methanol	-	-	-	-	-	-	-	-
7. Fermentation of sugar:								
7.1 Glucose	+	+	+	+	+	-	+	+
7.2 Galactose	+	+	+	+	+	-	+	+
7.3 Sucrose	+	+	+	+	+	-	+	+
7.4 Maltose	+	+	+	+	+	-	+	+
7.5 Lactose	+	+	+	+	+	-	+	+
7.6 Raffinose	+	+	+	+	+	-	+	+
8. Assimilation of Nitrogen :								
8.1 $(NH_4)_2PO_4$	+	+	+	+	+	+	+	nd
8.1 KNO_3	-	-	-	-	-	-	-	nd
8.1 $NaNo_2$	-	-	-	-	-	-	-	nd
8.1 Ethylamine	+	+	+	+	+	+	+	+
8.1 L-Lysine	+	+	+	+	+	+	+	+
8.1 Cadaverine	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ +, positive; l, delayed positive s, slow positive; v, variable; w, weak, –, negative.

[a] Data from Kurtzman and Fell (1998)

บทที่ 5
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการแยกเชื้อราจากมูลสัตว์กินพืช 32 ตัวอย่าง ได้เชื้อราสายใย 9 ไอโซเลต แต่เชื้อราที่แยกได้ไม่สามารถหมักน้ำตาลไซโลเป็นเอทานอล ได้เชื้อราเซลล์เดี่ยว (ยีสต์) 36 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน 9 แบบดังนี้ แบบ A โคโลนีสีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ตรงกลางนูน มันวาว , แบบ B โคโลนีสีชมพู กลม ขอบเรียบ มันวาว, แบบ C โคโลนีสีขาวขุ่น กลม ตรงกลางมีจุดเล็กๆนูนขึ้นมา, แบบ D โคโลนีสีขาวขุ่น ข้างบนโคโลนีเป็นรอยหยัก ,แบบ E โคโลนีสีขาวขุ่น มีลักษณะคล้ายสมอง ,แบบ F โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบหยัก, แบบ G โคโลนีสีขาวขุ่น ขอบเรียบ ตรงกลางนูนเหมือนภูเขาไฟ, แบบ H โคโลนีสีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ตรงกลางนูน มันวาว ขนาดเล็กกว่าแบบ A, แบบ I โคโลนีสีชมพูอ่อน กลม ขอบเรียบ ตรงกลางนูน มันวาว เมื่อเปิดฝาจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีของยีสต์ทั้ง 9 แบบนี้เจริญอยู่จะได้กลิ่นเอทานอล

เมื่อนำยีสต์ที่แยกได้เหล่านี้มาวิเคราะห์ประสิทธิภาพการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล เพื่อคัดกรองหายีสต์ไอโซเลต ที่สามารถหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลได้ดีที่สุด พบว่าการหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพที่มีอากาศจำกัด ยีสต์ที่แยกได้ให้ปริมาณเอทานอลต่ำกว่า *Pichia stipitis* ซึ่งเป็นตัวควบคุมมาก และเนื่องจากสังเกตพบว่าเชื้อเริ่มต้นที่ใช้มีความขุ่นน้อย จึงสันนิษฐานว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นคงไม่เพียงพอ จึงได้ทำการทดลองหมักน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอลในสภาพที่มีอากาศจำกัด แต่เพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลที่ได้คือเชื้อที่แยกได้ให้ปริมาณเอทานอลมากขึ้นกว่าการทดลองแรก แต่ปริมาณเอทานอลยังคงต่ำกว่า *Pichia stipitis* ซึ่งเป็นตัวควบคุม ทั้งนี้อาจเนื่องจากปริมาณน้ำตาลไซโลส 2% (w/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร YX เป็นปัจจัยจำกัด (limiting factor) จึงทำให้เชื้อผลิตเอทานอลได้ต่ำเพราะอาหารเลี้ยงเชื้อ YX มีน้ำตาลไซโลสเพียง 2% (w/v) แต่เพาะเลี้ยงเชื้อในสภาพมีอากาศ 48 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาหมักเอทานอลในสภาพมีอากาศจำกัดต่ออีก 72 ชั่วโมง แต่เนื่องจากปริมาณเอทานอลที่ *Pichia Stipitis* ผลิตในสภาวะนี้กับสภาวะที่เลี้ยงเชื้อเริ่มต้นไว้เพียง 24 ชั่วโมงเท่ากันจึงคิดว่าปริมาณน้ำตาลไซโลสไม่น่าจะเป็นปัจจัยจำกัดของการผลิตเอทานอล จึงได้เปลี่ยนสภาวะการหมักเป็นสภาพที่มีอากาศ คือ เลี้ยงเชื้อในอาหาร YX ที่มีน้ำตาลไซโลสเพิ่มเป็น 10% (w/v) เขย่าให้อากาศตลอด 72 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ที่แยกได้ผลิตเอทานอลได้มากขึ้นกว่า 2 การทดลองแรก โดยยีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่ผลิตเอทานอลได้มากกว่า *Pichia stipitis* ซึ่งเป็นตัวควบคุม และยีสต์ไอโซเลต F1 ผลิตเอทานอลมากที่สุดเท่ากับ 3.0 g/l

อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ F1 ผลิตได้ในสภาวะที่มีอากาศ กับที่ *Pichia stipitis* ผลิตได้ในสภาวะมีอากาศจำกัด พบว่ายีสต์ไอโซเลต F1 ผลิตเอทานอลได้ต่ำกว่า

ดังนั้นจึงทำการทดลองหมักเอทานอลในสภาพที่มีอากาศซ้ำ โดยหมักในอาหารเหลว YX ที่มีน้ำตาลไซโลส 2% (w/v) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เทียบกับเอทานอล *Pichia Stipitis* ผลิตในน้ำตาลไซโลส 2% (w/v) แต่ในสภาพมีอากาศจำกัด

โดยผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสระหว่าง *Pichia stipitis* และ *Candida tropicalis* F1 พบว่า *P. stipitis* หมักเอทานอลในสภาวะมีอากาศจำกัดได้ดีกว่าสภาวะมีอากาศ โดยสภาวะมีอากาศจำกัด *P.stipitis* ผลิตเอทานอลได้ 1.37 g/l ส่วน *Candida tropicali* F1 หมักเอทานอลในสภาวะมีอากาศได้ดีกว่าสภาวะมีอากาศจำกัด โดยในสภาวะมีอากาศ *Candida tropicali* F1 ผลิตเอทานอลได้ 2.21 g/l และเมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสระหว่าง *P.stipitis* และ *Candida tropicali* F1 พบว่า *Candida tropicali* F1 สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่า *P. stipitis* ในทั้งสองสภาวะทดสอบ

ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของไอโซเลต F1 โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการหาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26S rDNA ของยีสตไอโซเลทต่างๆ มาเปรียบเทียบความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ที่อยู่ในฐานข้อมูล โดยใช้ BLASTN homology search program พบว่าเป็น *Candida tropicalis* มีค่า identity เท่ากับ 100% เช่นเดียวกับสายพันธุ์ไอโซเลทอื่นๆ ที่มีค่า identity 90-100% จึงจัดอยู่ในกลุ่มของ *Candida tropicalis* แล้วยังให้ผลทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี แบบเดียวกับ type strain *Candida tropicalis*

เอกสารอ้างอิง

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, J. Z., Zhang, J., Zhang, Z., Miller W., and Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402.

Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution.* 39: 738-791.

Gray, K. A., Zhao, L., and Emptage, M. 2006. Bioethanol *Current Opinion in Chem.Bio.* 10:141-146.

Jeffries, T. W. 1981. Conversion of xylose to ethanol under aerobic conditions by *Candida tropicalis. Biotech Lett.* 3(5):213-218.

Kimura, M. 1980. A sample method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16: 111-120.

Kurtzman, C. P., and Fell, J. W. 1998. ***The Yeasts : A Taxonomic Study, 4th edition.*** *Elsevier*, Amsterdam.

Kurtzman, C. P., and Robnett, C. J. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek.* 73: 331-371.

Margaritis, A., and Bajpai, P. 1982. Direct Fermentation of D-Xylose to Ethanol by *Kluyveromyces marxianus* Strains. *App. Env. Microbiol.* 44(5): 1039-1041.

Millati, R., Edebo, L., and Taherzadeh, M. J. 2005. Performance of *Rhizopus, Rhizomucor* and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose and wood hydrolyzates. *Enz Microbiol Technol.* 36: 294-300

Saitou, N., and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.

Schneider, H., Wang, P.Y., Chan, Y.K., and Ma, R. 1981. Conversion of D-xylose into ethanol by the yeast *Pachysolen tannophilus*. *Biotech. Lett.* 3(2): 89-92.

Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin F., and Higgins, J. D. 1997. The Clustal X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acid Res.* 24: 4876-4882.

Yarrow, D. 1998. Methods for isolation, maintenance, and identification of yeasts, pp. 77-100. In C. P. Kurtzman and J. W. Fell, eds. ***The Yeasts: A Taxonomic Study, 4th edition***. *Elsevier,* Amsterdam.

Yong, S.J., Jones S., Nian, Q.S., and Jeffries, T.W. 2002. Molecular Cloning of *XYL3* (D-Xylulokinase) from *Pichia stipitis* and Characterization of Its Physiological Function. *App. Env. Microbiol.* 68(3): 1232–1239.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YX ประกอบด้วย

Yeast nitrogen base (w/o) amino acid	6.7	กรัม/ลิตร
Xylose	20.0	กรัม/ลิตร
(Agar	18.0	กรัม/ลิตร)

ละลาย Yeast nitrogen base (w/o) amino acid และ Xylose ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตรปรับ pH เป็น 5.0 (สำหรับการคัดแยกเชื้อราเซลส์เดี่ยว) ปรับ pH เป็น 7.0 (สำหรับการคัดแยกเชื้อราสายใย) ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อโดยการนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสูตรYX เตรียมโดยละลาย agar 18 กรัมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสูตร YX ที่ปรับ pH เป็น 5.0 และ 7.0 และปรับปริมาตรสุดท้ายแล้ว ก่อนนำไปทำให้ปราศจากเชื้อ

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ประกอบด้วย

Yeast extract	10	กรัม/ลิตร
Peptone	20	กรัม/ลิตร
Glucose	20	กรัม/ลิตร
(agar	18	กรัม/ลิตร)

pH 4.5

ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121°C, 15 lb/inc^2, 15 นาที (สารละลาย glucose แยกทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121°C, 15 lb/inc^2, 3 นาที แล้วจึงผสมลงในอาหาร)

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ YX ประกอบด้วย

Yeast nitrogen base (w/o) amino acids	6.7	กรัม/ลิตร
Xylose	20	กรัม/ลิตร
(agar	18	กรัม/ลิตร)

pH 5.0

ทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121°C, 15 lb/inc^2, 15 นาที

(สารละลาย xylose แยกทำให้ปราศจากเชื้อที่ 121°C, 15 lb/inc^2, 3 นาที แล้วจึงผสมลงในอาหาร)

I9098257

4. Stock carbon solution (10X)

ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Difco)	6.7	กรัม
สารประกอบคาร์บอน	5	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน และเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

5. อาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ stock carbon solution (10X) ลงในหลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน วางไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 3-5 วัน เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน การเตรียมอาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอนนั้น มีสารประกอบคาร์บอน 7 ชนิด ที่ต้องเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ ได้แก่ อินูลิน เอทานอล เมทานอล แป้ง กาแลกทิทอล 2-คีโต-ดี-กลูโคเนต และ 5-คีโต-ดี-กลูโคเนต

6. Yeast carbon base (10X)

ยีสต์คาร์บอนเบส (Difco)	11.7	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. Yeast carbon base broth (1X)

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ yeast carbon base (10X) ลงในหลอดขนาด13 x 100 มิลลิเมตรซึ่งบรรจุน้ำรีเวอร์สออสโมซิสที่ ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร

8. Stock nitrogen solution (10X)

ยีสต์คาร์บอนเบส (Difco)	11.7	กรัม
สารประกอบไนโตรเจน	* X	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100	มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอนและเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

สารประกอบไนโตรเจน*:

แอมโมเนียมซัลเฟต [(NH4)2SO4] 0.5 กรัม ,โปแตสเซียม ไนเตรต (KNO3) 0.78 กรัม, โซเดียมไนไตรต์ (NaNO2) 0.26 กรัม, เอทิลามีนไฮโดรคลอไรด์(ethylamine-HCl) 0.64 กรัม, แอล-ไลซีน (L-lysine-HCl) 0.56 กรัม และคาดาเวอรีนไดไฮโดรคลอไรด์ (cadaverinedihydrochloride) 0.68 กรัม

9. อาหารทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน

ชั่งวุ้น 1.67 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 90 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอจนวุ้นอุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส เติม stock nitrogen solution (10X) ปริมาตร10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเทลงเพลทที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

10. Fermentation basal medium

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	4.5	กรัม
เปปโทน	7.5	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
บรอมไทมอลบลู	จำนวนเล็กน้อยเพื่อให้มีสีเขียวเข้ม	

แบ่ง fermentation basal medium ลงในหลอดขนาด 13x100 มิลลิเมตร ซึ่งภายในมีหลอดดักแก๊ส หลอดละ 2 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายน้ำตาลที่ต้องการทดสอบซึ่งทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน ปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อหลอด ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 เปอร์เซ็นต์ (ยกเว้นราฟฟิโนสใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์)

11. Fermentation test of glucose

ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	4.5	กรัม
เปปโทน	7.5	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร
บรอมไทมอลบลู	จำนวนเล็กน้อยเพื่อให้มีสีเขียวเข้ม	

แบ่งใส่หลอดขนาด 13 x 100 มิลลิเมตร ซึ่งภายในมีหลอดดักแก๊ส หลอดละ 5 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

12. อาหารที่ปราศจากวิตามิน (vitamin free medium)

กลูโคส	10	กรัม
Vitamin assay casamino acids (Difco)	5	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์	0.1	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 5.5 และฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

13. อาหารตรวจสอบความต้านทานไซโคลเฮกซิไมด์

1) การเตรียม Basal medium (10X)

ไซโคลเฮกซิไมด์ 1 กรัม ละลายในอะซิโตน 2.5 มิลลิลิตร

ยีสต์ไนโตรเจนเบส (Difco)	6.7 กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100 มิลลิลิตร

ทำให้ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเมมเบรนที่มีขนาดรูกรอง 0.2 ไมครอน

2) Active medium

เติม 0.2 มิลลิลิตร ของ basal medium (10X) ลงในหลอดขนาด13 x 100 มิลลิเมตรซึ่งบรรจุน้ำารีเวอร์สออสโมซิสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 1.8 มิลลิลิตร

14. การเจริญในอาหารที่มีแรงดันออสโมซิสสูง

1) อาหารที่มีกลูโคส 50 เปอร์เซ็นต์

กลูโคส	50 กรัม
ยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์	1 กรัม
วุ้น	1.3 กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	100 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2) อาหารที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์ กับโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์

โซเดียมคลอไรด์	100 กรัม
กลูโคส	50 กรัม
ยีสต์ไนโตรเจนเบส	6.7 กรัม
วุ้น	20 กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000 มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

15. การเตรียมอาหารทดสอบการไฮโดรไลต์ยูเรีย

กลูโคส	1 กรัม
เปปโทน	1 กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	2 กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2 กรัม
วุ้น	20 กรัม
ฟีนอลเรด	0.012 กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	1000 มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 6.8 แบ่งใส่หลอดละ 4.5 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมสารละลายยูเรีย 20 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข.
สารเคมี และเครื่องมือวิเคราะห์

1. Bromothymol blue stock solution

ละลายบรอมไทมอลบลู 50 มิลลิกรัม ในน้ำปริมาตร 75 มิลลิลิตร วิธีใช้ คือ เติม bromothymol blue stock solution ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงใน fermentation basal medium และ fermentation test of glucose ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2. Lugol's solution

ไอโอดีน	1	กรัม
โปแตสเซียม ไอโอไดด์	2	กรัม
น้ำรีเวอร์สออสโมซิส	300	มิลลิลิตร

3. 50X TAE buffer

Tris base	48.4	กรัม
0.5M EDTA (pH 8.0)	20	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	11.5	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันโดยใช้น้ำารีเวอร์สออสโมซิส ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. 10X TBE buffer

Tris base	10.8	กรัม
กรดบอริก	5.5	กรัม
0.5 mM EDTA (pH 8.0)	4.0	มิลลิลิตร

ละลายให้เข้ากันโดยใช้น้ำรีเวอร์สออสโมซิส ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Stock ethidium bromide

ชั่ง ethidium bromide 1 กรัม ละลายในน้ำรีเวอร์สออสโมซิส 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดสีชา และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

เครื่องมือวิเคราะห์เอทานอล

1. Gas Chromatography รุ่น HP 5890 Series II apparatus ของบริษัท Hewlett-Packard, USA

2. GC column รุ่น Porapak QS ของบริษัท Alltech Associates Inc., Deerfield, IL, USA (Column of Cabowax 20M (2 m. x 0.32 cm.) ใช้แก๊สฮีเลียมเป็น carrier ที่ 35 ml/min)

3. Flame Ionization Detector (FID)

ค่าตัวแปรต่างๆ ในสภาวะการวิเคราะห์เอทานอล

Carrier gas (He) 35 มิลลิลิตรต่อนาที

Oven temperature 175 องศาเซลเซียส

Column temperature 185 องศาเซลเซียส

Injection และ detector temperature 150 องศาเซลเซียส