การผลิตเอทานอลจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ลูกแป้งสาโทด้วยกากน้ำตาล

อรรถพล กุลบุตร[1] สุภาพร พรไตร[1,2] และจิดาภา แสงสวัณต์[2*]

[1]หลักสูตรวิทยาศาสตร์ศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190
[2]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี อุบลราชธานี 34190
[*]E-mail: sanom.n@ubu.ac.th

รับบทความ: 31 สิงหาคม 2562 แก้ไขบทความ: 17 มกราคม 2563 ยอมรับตีพิมพ์: 2 มีนาคม 2563

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอลจากลูกแป้งสาโท ในพื้นที่จังหวัดอุบลราชธานี (UB) ศรีสะเกษ (SK) และสุรินทร์ (SR) โดยนำตัวอย่างลูกแป้งจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 5 ตัวอย่าง มาคัดแยกเชื้อและทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอล เบื้องต้นพบ 22 ไอโซเลตที่มีปริมาณเอทานอลมากกว่าร้อยละ 6 โดยปริมาตร จากนั้นนำมาจัดจำแนกชนิดโดยการเทียบลำดับเบสบริเวณตำแหน่ง D1/D2 ของยีน 26S rDNA ผลการระบุสปีชีส์ใกล้เคียงกับยีสต์ 2 สปีชีส์ โดยทุกไอโซเลตจากแหล่งอำเภอเดชอุดม (UB2) และอำเภอกันทรารมย์ (SK1) ใกล้เคียงกับ *Wickerhamomyces anomalus* ส่วนแหล่งอำเภอเมืองศรีสะเกษ (SK2) และอำเภอสำโรงทาบ (SR) ทุกไอโซเลตใกล้เคียงกับ *Candida tropicalis* ในการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ผลการทดลองพบว่า *W. anomalus* สามารถใช้และหมักน้ำตาลได้เฉพาะกลูโคส ฟรุกโทส มอลโทส และซูโครส ในขณะที่ *C. tropicalis* สามารถใช้และหมักน้ำตาลกลูโคส แกแลกโทส ฟรุกโทส มอลโทส และซูโครส เมื่อนำยีสต์บริสุทธิ์ทดสอบการหมักเอทานอลด้วยกากน้ำตาลซึ่งมีระดับความหวานที่ 20 องศาบริกซ์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง พบว่า ยีสต์ *C. tropicalis* จากแหล่ง SK2 สามารถหมักและให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่เวลา 36 ชั่วโมง เท่ากับร้อยละ 6.8±0.01 โดยปริมาตรและผลผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.39 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

คำสำคัญ: เอทานอล กากน้ำตาล ยีสต์ ลูกแป้งสาโท

Ethanol Production from Loog–Pang–Sato Yeast Cultivation with Molasses

Autthapon Kunlabut[1], Supaporn Porntrai[1,2] and Jidapa Sangswan[2*]

[1]Program of Science Education, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand
[2]Department of Biological Science, Faculty of Science, Ubon Ratchathani University, Ubon Ratchathani 34190, Thailand
[*]E-mail: sanom.n@ubu.ac.th

Received: 31 August 2019 Revised: 17 January 2019 Accepted: 2 March 2020

Abstract

This research aimed to isolate yeast strains capable of high ethanol production from Loog–Pang–Sato in Ubon Ratchathani (UB), Sisaket (SK) and Surin (SR) provinces. The 5 samples of Loog–Pang from different sources were used for yeast isolation. We obtained 22 isolates that could produce ethanol higher than 6%(v/v). The 22 yeast isolates were then identified by comparison of nucleotide sequences D1/D2, region of 26S rDNA gene, the result showed that all yeasts isolated from UB2 and SK1 were similar to *Wickerhamomyces anomalus* whereas all yeasts isolated from SK2 and SR were similar to *Candida tropicalis*. Based on sugar assimilation and fermentation test, *W. anomalus* could assimilate and ferment glucose, fructose, maltose and sucrose, whereas *C. tropicalis* could assimilate and ferment glucose, galactose, fructose, maltose and sucrose. Ethanol fermentation were carried out by using molasses as substrate with 20°Brix, incubation at 30°C for 48 hours. The samples were collected every 12 hours. The results indicated that the highest ethanol amount was 6.8±0.01 %(v/v) at 36 hours from *C. tropicalis* isolated from SK2. The highest ethanol yield of 0.39 $g_{ethanol}/g_{sugar}$ was also obtained at 36 hours.

Keywords: Ethanol, Molasses, Yeast, Loog–Pang–Sato

บทนำ

ลูกแป้ง (Look–pang) เป็นหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากธรรมชาติเก็บไว้ในรูปเชื้อแห้ง เกิดจากภูมิปัญญาท้องถิ่นที่ผสมแป้งข้าวจ้าวกับลูกแป้งที่สำเร็จแล้ว เพื่อเป็นการต่อเชื้อโดยมีองค์ประกอบของสมุนไพรบางชนิด เช่น กานพลู พริกไทย ดีปลี กระเทียม ขิง ซึ่งสมุนไพรเหล่านี้ช่วยในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรคและลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ไม่พึงประสงค์ (Chaijamrus and Mouthung, 2011; Chanchaichaovivat and Utian-

sut, 2013) ทั้งนี้หัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากธรรมชาติสามารถพบได้ในประเทศต่าง ๆ ซึ่งมีส่วนผสมกรรมวิธีการเตรียม ชนิดของจุลินทรีย์รวมถึงมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปตามท้องที่ เช่น ประเทศญี่ปุ่น เรียกว่า โคจิ (Koji) ประเทศเกาหลี เรียกว่า นุรุก (Nuruk) ประเทศจีน เรียกว่า ชู (Chu) ประเทศอินโดนีเซีย เรียกว่า รากิ (Ragi) ประเทศเวียดนาม เรียกว่า บันเมน (Banh men) (Sangswan and Loorroengsil, 2018; Techavasonyoo, 2007; Thanh *et al*., 2008) โดยจุลินทรีย์ที่พบในหัวเชื้อแต่ละแหล่งประกอบด้วยจุลินทรีย์หลากหลายชนิดแตกต่างกัน และสามารถจัดจำแนกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ รา ซึ่งเป็นกลุ่ม *Amylomyces* sp., *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. และ *Aspergillus* sp. ส่วนยีสต์เป็นกลุ่ม Ascomycetes เช่น *Saccharomyces* sp., *Endomycopsis* sp., *Hensenula* sp., *Candida* sp., *Wickerhamomyces* sp. และแบคทีเรียในกลุ่ม *Acetobacter* sp., *Gluconobacter* sp., *Lactobacillus* sp., *Bacillus* sp. (Chanchaichaovivat and Utiansut, 2013; Kanlayakrit *et al*., 2012; Limtong, 2005; Thanh, 2008; Sangswan and Loorroengsil, 2018) ในประเทศไทยนิยมนำลูกแป้งมาใช้ในกระบวนการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่ไม่ผ่านการกลั่นซึ่งมีชื่อเรียกแตกต่างกันตามท้องที่ เช่น กระแช่ เหล้าอากุน น้ำขาว น้ำแดง สาโทขาว รวมทั้งในการผลิตข้าวหมาก (Kanlayakrit *et al*., 2012; Sangswan and Loorroengsil, 2018; Sridam and Dajanta, 2014) แต่เนื่องจากลูกแป้งในแต่ละแหล่งนั้นมีกรรมวิธีผลิตที่แตกต่างกันทำให้มีความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ และไม่สามารถควบคุมคุณภาพได้ ส่งผลให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้ในแต่ละครั้งมีคุณภาพที่ไม่แน่นอน เช่น มีเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ต่ำหรือสูงจนเกินไป หรือมีรส กลิ่น สี ที่ไม่พึงประสงค์และไม่คงที่ (Chanayart, 2006; Techavasonyoo, 2007)

ปัจจุบันมีการศึกษาการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากลูกแป้งเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในงานด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น การนำเชื้อบริสุทธิ์ใช้ในการผลิตมิริน การผลิตสาโท การผลิตเอทานอล รวมทั้งใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (Chaijamrus, 2011; Chanayart, 2006; Chanchaichaovivat and Utiansut, 2013; Techavasonyoo, 2007; Thanh *et al*., 2016) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกยีสต์สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่สามารถหมักให้ปริมาณเอทานอลสูงจากลูกแป้งสาโทแหล่งต่าง ๆ เพื่อประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพ รวมทั้งเพื่ออนุรักษ์สายพันธุ์ยีสต์ดั้งเดิมซึ่งอาจเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง

เก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโท จำนวน 5 ตัวอย่าง จากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ จังหวัดอุบลราชธานี จำนวน 2 ตัวอย่าง จังหวัดศรีสะเกษ จำนวน 2 ตัวอย่าง และจังหวัดสุรินทร์ จำนวน 1 ตัวอย่าง จากนั้นศึกษาลักษณะภายนอกของลูกแป้ง และเก็บรักษาตัวอย่างลูกแป้งในภาชนะถุงพลาสติกปิดผนึกที่อุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปแยกเชื้อ

การคัดแยกยีสต์

คัดแยกยีสต์จากลูกแป้งโดยบดลูกแป้งแล้วนำมาตัวอย่างละ 2 กรัม ใส่ในข้าวเหนียวนึ่ง 100 กรัม บรรจุในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากันและทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นชั่งตัวอย่าง 2.5 กรัม และเจือจาง

ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 10 เท่า ผสมให้เข้ากัน โดยใช้เทคนิคการเจือจางครั้งละ 10 เท่า และปิเปตต์ความเจือจางที่เหมาะสมปริมาตร 100 ไมโครลิตร เกลี่ยเชื้อ (spread) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) agar ที่ประกอบด้วย yeast extract 1%(w/v), peptone 2%(w.v), dextrose 2%(w/v) และ agar 1.5%(w/v) เติมโซเดียมโพรพิโอเนต (sodium propionate) ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะต่างกันซึ่งพิจารณาจากลักษณะของโคโลนี ผิวหน้าโคโลนี สี และขนาด จากนั้นนำโคโลนีที่คัดเลือกได้เขี่ย (streak) บนอาหาร YPD agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวมาเขี่ยซ้ำ (re-streak) บนอาหาร YPD agar จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ในอาหาร YPD agar ผิวหน้าเอียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ทดสอบการผลิตเอทานอลหมักด้วยกากน้ำตาล และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลเบื้องต้นด้วยเครื่อง Ebulliometer วิเคราะห์ความแปรปรวนด้วยวิธี one–way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้การทดสอบแบบ Duncan's new multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ .05

การจำแนกชนิดของยีสต์

1) การตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของโคโลนีและลักษณะของเซลล์ยีสต์ที่แยกได้

นำยีสต์ที่คัดแยกได้ลากไปมา (cross streak) บนอาหาร YPD agar และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง แล้วสังเกตรูปร่าง ลักษณะขอบ สี กลิ่น และผิวหน้าของโคโลนี จากนั้นเตรียมสไลด์สด (wet mount) แล้วนำไปศึกษาโครงสร้างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เช่น ลักษณะรูปร่าง การแตกหน่อ

2) การจัดจำแนกสายพันธุ์

ถ่ายเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ลงในอาหาร YPD broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 20 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที สกัดดีเอ็นเอด้วยชุดสกัด PureLink Genomic DNA Purification Kit ตามวิธีการของผู้ผลิต (Invitrogen, USA) และเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอเป้าหมายในตำแหน่ง D1/D2 ของ 26s rDNA gene โดยใช้ไพรเมอร์ NL–1 (5'–GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG–3') และNL–4 (5'–GGTCCGTGTTTCAAGACGG–3') จากนั้นเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธี PCR โดยใช้สภาวะของปฏิกิริยา ดังนี้ 95 องศาเซลเซียส 2 นาที; 95 องศาเซลเซียส 20 วินาที, 55 องศาเซลเซียส 30 วินาที, 68 องศาเซลเซียส 2 นาที, จำนวน 30 รอบ; 68 องศาเซลเซียส 5 นาที ตรวจสอบขนาดด้วยเทคนิค gel electrophoresis ส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาระบุสปีชีส์โดยเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์กับยีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ จากฐานข้อมูลใน The National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST) โดยใช้โปรแกรม Nucleotide Blast

การศึกษาคุณลักษณะของยีสต์ที่คัดแยกได้

ถ่ายยีสต์บริสุทธิ์ 100 ไมโครลิตรหรือ 1 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ลงในอาหาร YPD broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริ-

มาตร 50 ไมโครลิตรลงในอาหารสำหรับการหมัก (fermentation medium) ที่มีแหล่งของน้ำตาลแตกต่างกัน ได้แก่ กลูโคส กาแลกโทส ฟรุกโทส มอลโทส ซูโครส ไรโบส และไซโลส ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ละลายโบรโมไทมอลบลู (bromothymol blue) ร้อยละ 1.6 โดยน้ำหนัก จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นใสของอาหาร การเปลี่ยนสี และแก๊สที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุม (control) ที่มีเฉพาะน้ำตาล และสารละลายโบรโมไทมอลบลู ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

การทดสอบการผลิตเอทานอล

ถ่ายเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ลงในอาหาร YPD broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในกากน้ำตาลปริมาตร 100 มิลลิลิตรที่ประกอบด้วยน้ำกลั่นและกากน้ำตาล ซึ่งกากน้ำตาลที่ทดลองในครั้งนี้ผู้วิจัยได้มาจากตลาดวารินชำราบ จังหวัดอุบลราชธานี โดยนำมาปรับระดับองศาบริกซ์ให้เท่ากับ 20 ด้วยการเจือจางกากน้ำตาลกับน้ำกลั่นและตรวจสอบระดับความหวานโดยเครื่องวัดระดับความหวาน (refractometer) เมื่อถ่ายเชื้อลงในกากน้ำตาลแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก ๆ 12 ชั่วโมง เพื่อวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วย DNS method ตามวิธีของ Miller (1959) โดยเจือจางตัวอย่าง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นและปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสเหนือตะกอน (supernatant) และดูดตัวอย่างรวมกับสารละลาย DNS ในอัตราส่วน 1:1 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแช่ในน้ำเย็นจนตัวอย่างเย็นลง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร และนำตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography, GC) ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง

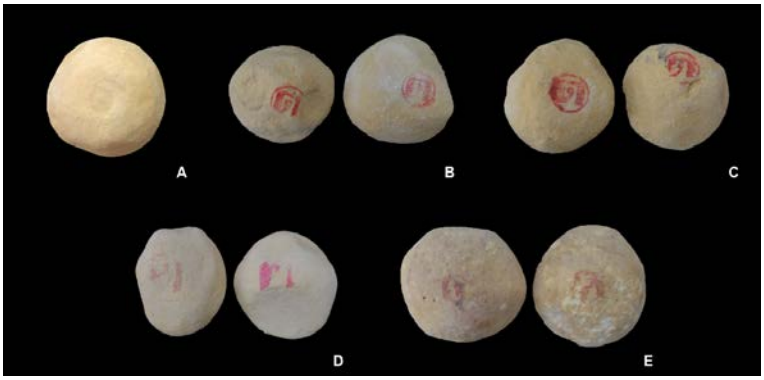
ผลการวิจัย

ตัวอย่างลูกแป้ง

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างลูกแป้งสาโททั้งหมด 5 ตัวอย่างจาก 3 จังหวัด ได้แก่ อ.วารินชำราบ อ.เดชอุดม จ.อุบลราชธานี อ.กันทรารมย์ อ.เมือง จ.ศรีสะเกษ และ อ.สำโรงทาบ จ.สุรินทร์ ตัวอย่างลูกแป้งส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายกันคือมีลักษณะเป็นก้อนครึ่งวงกลม ลักษณะของผิวมีทั้งเรียบและขรุขระ มีสีเหลืองนวลและเหลืองปนเทา มีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 3.20 เซนติเมตร กลิ่นของลูกแป้งมีลักษณะคล้ายกัน คือมีกลิ่นข้าว แป้งหมักและเครื่องเทศ โดยลูกแป้งแต่ละที่มีการทำเครื่องหมายประทับบนผิวของลูกแป้งเพื่อบ่งบอกความแตกต่างของแหล่งผลิต ยกเว้นตัวอย่าง อ.วารินชำราบ ที่ไม่มีการทำเครื่องหมายประทับ และผู้วิจัยได้มีการตั้งรหัสสำหรับลูกแป้งแต่ละแหล่ง คือ UB1 UB2 SK1 SK2 และ SR แทน อ.วารินชำราบ อ.เดชอุดม อ.กันทรารมย์ อ.เมืองศรีสะเกษ และ อ.สำโรงทาบ ตามลำดับ ดังในภาพที่ 1

การคัดแยกยีสต์

จากตัวอย่างลูกแป้ง 5 แหล่ง สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 64 ไอโซเลต โดยลูกแป้งจาก อ.วารินชำราบ แยกได้ 10 ไอโซเลต อ.เดชอุดม แยกได้ 12 ไอโซเลต อ.กันทรารมย์ แยกได้ 8 ไอโซเลต อ.เมืองศรีสะเกษ แยกได้ 16 ไอโซเลต และ



ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างลูกแป้งสาโท จาก (A) อ.วารินชำราบ (B) อ.เดชอุดม (C) อ.กันทรารมย์ (D) อ.เมืองศรีสะเกษ และ (E) อ.สำโรงทาบ

อ.สำโรงทาบ แยกได้ทั้งหมด 18 ไอโซเลต

เมื่อนำเชื้อยีสต์ทั้ง 64 ไอโซเลต ทดสอบการผลิตเอทานอลเบื้องต้น พบว่า ยีสต์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งแต่ละแหล่งสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่แตกต่างกันเมื่อหมักด้วยกากน้ำตาล ดังนั้นผู้วิจัยจึงคัดเลือกเฉพาะไอโซเลตที่มีปริมาณเอทานอลสูง (ร้อยละ 6) ไปใช้ในการศึกษาต่อโดยมีทั้งหมด 22 ไอโซเลต (ตาราง 1) ประกอบด้วยแหล่ง UB2 SK1 SK2 และ SR จำนวน 4 7 1 และ 10 ไอโซเลต ตามลำดับ ซึ่งผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกัน ($p < .05$) โดยไอโซเลต SK1–2 และ SR13 ให้ปริมาณร้อยละเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 6.67±0.06 และ 6.67±0.00 โดยปริมาตร ตามลำดับ ส่วนไอโซเลต SR6 ให้ปริมาณร้อยละเอทานอลน้อยที่สุด คือ ร้อยละ 6.0±0.05 โดยปริมาตร

การจำแนกชนิดของยีสต์

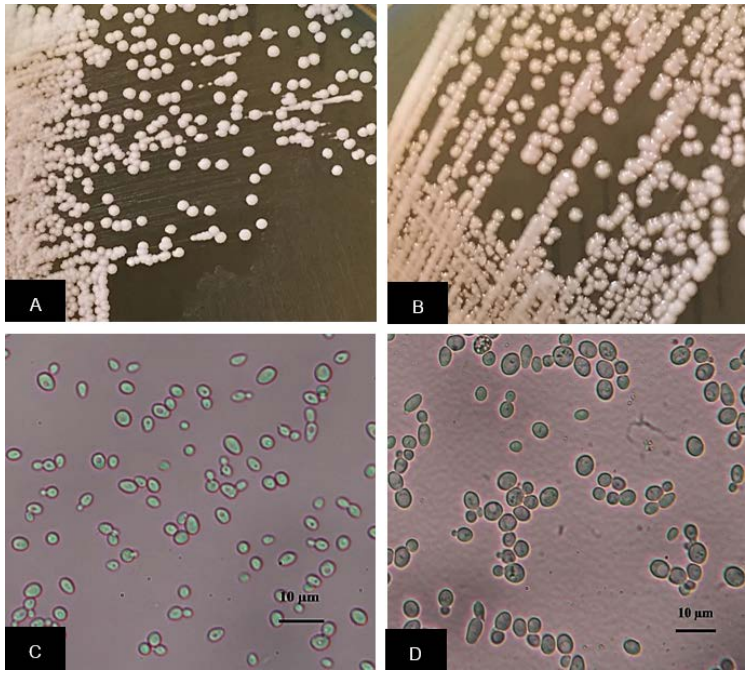
เมื่อนำเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้ 22 ไอโซเลต มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบนอาหาร YPD agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24–48 ชั่วโมง พบว่า โคโลนีของยีสต์มีลักษณะกลม สีขาวครีมมันวาว ขอบเรียบ และมีผิวหน้าแห้ง จำนวน 11 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ไอโซเลตจากแหล่ง UB2 และ SK1 (ภาพที่ 2A) และผิวหน้ามัน จำนวน 11 ไอโซเลต ได้แก่ แหล่ง SK2 และ SR (ภาพที่ 2B) จากนั้นศึกษารูปร่างเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า มีลักษณะเซลล์กลมรีทั้งหมด (ภาพที่ 2C–2D)

ผลการจัดจำแนกชนิดของยีสต์ด้วยลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง D1/D2 ของ 26s rDNA gene โดยเปรียบเทียบร้อยละความคล้าย (% similarity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่งเดียวกันของยีสต์จากฐานข้อมูล GenBank พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อยีสต์แต่ละไอโซเลตมีความเหมือน (identity) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูลร้อยละ 99–100 ซึ่งคล้ายคลึงกับ *Wickerhamomyces anomalus* จำนวน 11 ไอโซเลต ประกอบด้วยไอโซเลตจากแหล่ง UB2 และ SK1 และคล้ายคลึงกับ *Candida tropicalis* จำนวน 11 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลตจากแหล่ง SK2 และ SR (ตาราง 2)

ตาราง 1 ความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ไอโซเลต UB2 SK1 SK2 และ SR

Source	Isolates	Ethanol production % (v/v)	Source	Isolates	Ethanol production % (v/v)
UB2	UB2–2	$6.47^{b,c}$ ±0.06	SK2	SK2–9	6.10^{g} ±0.10
	UB2–7	$6.47^{b,c}$ ±0.06	SR	SR4	6.10^{g} ±0.10
	UB2–11	$6.47^{b,c}$ ±0.06		SR6	6.00^{h} ±0.06
	UB2–12	$6.47^{b,c}$ ±0.06		SR11	$6.30^{d,e}$ ±0.10
SK1	SK1–1	$6.17^{f,g}$ ±0.06		SR12	$6.40^{c,d}$ ±0.10
	SK1–2	6.67^{a} ±0.06		SR13	6.67^{a} ±0.00
	SK1–3	$6.47^{b,c}$ ±0.06		SR14	$6.37^{c–e}$ ±0.06
	SK1–5	$6.40^{c,d}$ ±0.00		SR15	6.60^{a} ±0.00
	SK1–6	$6.30^{d,e}$ ±0.10		SR16	$6.57^{a,b}$ ±0.06
	SK1–7	$6.27^{e,f}$ ±0.06		SR17	$6.30^{d,e}$ ±0.10
	SK1–8	$6.37^{c–e}$ ±0.06		SR18	$6.37^{c–e}$ ±0.06

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c, … ที่อยู่ต่อท้ายค่าเฉลี่ย ($\bar{x}$±SD) แสดงค่าที่แตกต่างกัน ($p < .05$)



ภาพที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์ (A) ลักษณะโคโลนีผิวหน้าแห้ง; SK1–5 (B) ลักษณะโคโลนีผิวหน้ามัน; SR11 (C) ลักษณะของเซลล์ไอโซเลตที่ผิวหน้าแห้ง; SK1–5 และ (D) ลักษณะของเซลล์ไอโซเลตที่ผิวหน้ามัน; SR11

ตาราง 2 ผลการระบุสายพันธุ์จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ตำแหน่ง D1/D2 domain ยีน 26s rDNA ของยีสต์ทั้ง 22 ไอโซเลต

Isolates	Species	Strain	Accession No.	Identity (%)
UB2–2, UB2–7, UB2–11, UB2–12	*Wickerhamomyces anomalus*	SFM4	MG017545	99
SK1–1, SK1–3	*Wickerhamomyces anomalus*	S4R1–3	MG773362	100
SK1–2, SK1–5, SK1–6, SK1–7, SK1–8	*Wickerhamomyces anomalus*	SFM4	MG017545	100
SK2–9	*Candida tropicalis*	SY3-2	KY928422	100
SR4	*Candida tropicalis*	DMKU–SE73	LC176991	100
SR6, SR12	*Candida tropicalis*	QDX	EU585761	99
SR11, SR13, SR14, SR15, SR17, SR18	*Candida tropicalis*	XJURML	EF151501	100
SR16	*Candida tropicalis*	LYSC–3	GU388393	100

การศึกษาคุณลักษณะของยีสต์ที่คัดแยกได้

เมื่อทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อบริสุทธิ์ พบว่า *C. tropicalis* ทุกสายพันธุ์สามารถใช้และหมักน้ำตาลกลูโคส แกแลกโทส ฟรุกโทส มอลโทส และซูโครสได้ ในขณะที่ *W. anomalus* ทุกสายพันธุ์สามารถใช้และหมักน้ำตาลได้เฉพาะกลูโคส ฟรุกโทส มอลโทส และซูโครสเท่านั้น (ตาราง 3)

ตาราง 3 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นของเชื้อบริสุทธิ์ *W. anomalus* และ *C. tropicalis*

สายพันธุ์	การหมักน้ำตาล*							การใช้แหล่งคาร์บอน**						
	Glucose	Galactos	Fructose	Maltose	Sucrose	Ribose	Xylose	Glucose	Galactos	Fructose	Maltose	Sucrose	Ribose	Xylose
W. anomalus SFM4	+	–	+	+	+	–	–	+	–	+	+	+	–	–
W. anomalus S4R1–3	+	–	+	+	+	–	–	+	–	+	+	+	–	–
C. tropicalis SY3–2	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–
C. tropicalis DMKU–SE73	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–
C. tropicalis QDX	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–
C. tropicalis XJURML	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–
C. tropicalis LYSC–3	+	+	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–	–

หมายเหตุ * การหมัก: + สามารถหมักให้แก๊ส และ – ไม่สามารถหมักให้แก๊ส

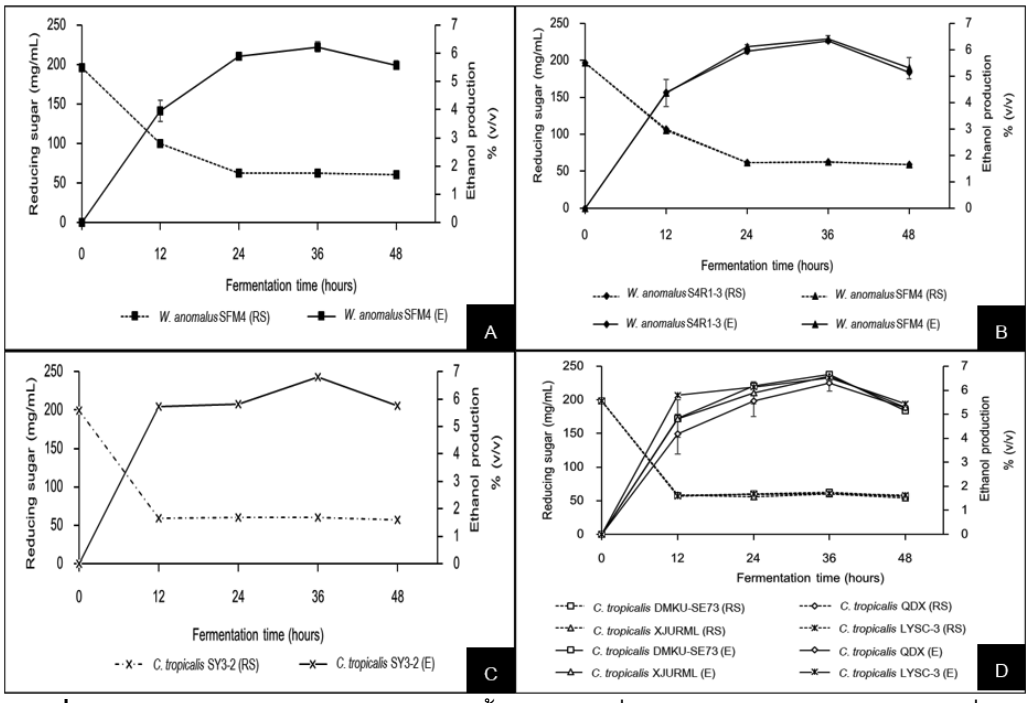
**การใช้แหล่งคาร์บอน: + สามารถเจริญได้ และ – ไม่สามารถเจริญได้

การทดสอบการผลิตเอทานอล

จากการทดสอบการผลิตเอทานอลของเชื้อบริสุทธิ์ ได้แก่ *W. anomalus* และ *C. tropicalis* หมักด้วยกากน้ำตาลและบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่า ใน 12 ชั่วโมงแรก ยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถผลิตเอทานอลได้และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และที่เวลา 36 ชั่วโมง พบยีสต์จากแต่ละแหล่งสามารถหมักให้ปริมาณร้อยละเอทานอลสูงที่สุด โดยยีสต์จากแหล่ง UB2 ได้แก่ *W. anomalus* SFM4 มีค่าเท่ากับร้อยละ 6.2±0.03 โดยปริมาตร (ภาพที่ 3A) แหล่ง SK1 ได้แก่ *W. anomalus* SFM4 และ S4R1–3 เท่ากับร้อยละ 6.4±0.01 และ 6.3±0.01 โดยปริมาตร ตามลำดับ (ภาพที่ 3B) แหล่ง SK2 ได้แก่ *C. tropicalis* SY3–2 เท่ากับร้อยละ 6.8±0.01 โดยปริมาตร (ภาพที่ 3C) และแหล่ง SR ได้แก่ *C. tropicalis* DMKU–SE73 XJURML LYSC-3 และ QDX มีค่าเท่ากับร้อยละ 6.7±0.01 6.6±0.01 6.5±0.01 และ 6.3±0.00 โดยปริมาตร ตามลำดับ (ภาพที่ 3D) จากนั้นที่เวลา 48 ชั่วโมง ผลผลิตของเอทานอลมีปริมาณร้อยละลดน้อยลงในทุกสายพันธุ์ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์ กล่าวคือ ในช่วงเริ่มต้นของการหมักปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 197.93 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อเวลาผ่านไปน้ำตาลรีดิวซ์มีปริมาณลดต่ำลง โดยที่เวลา 12 24 และ 48 ชั่วโมงมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 75.30±0.09 60.10±0.11 61.83±0.06 และ 57.65±0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังในภาพที่ 3 ค่าเฉลี่ยของผลผลิตเอทานอลที่เวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.31±0.05 0.34±0.01 0.37±0.01 และ 0.30±0.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกจากลูกแป้งสาโทจากแหล่งตัวอย่าง 5 แหล่ง ในเบื้องต้นสามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมดจำนวน 64 ไอโซเลต โดยมี 22 ไอโซเลตที่สามารถหมักให้ปริมาณเอทานอลสูง นั่นคือ มากกว่าร้อยละ 6 โดยปริมาตร ซึ่งประกอบ ด้วยไอโซเลตจากแหล่ง UB2 SK1 SK2 และ SR จำนวน 4 7 1 และ 10 ไอโซเลต ตามลำดับ ผลการศึกษาด้านสัณฐานวิทยาพบว่าโคโลนีของยีสต์มีลักษณะกลม สีขาวครีม มันวาว ขอบเรียบ ผิวหน้าแห้ง และผิวหน้ามันลักษณะของเซลล์มีรูปร่างกลมรี เมื่อนำเชื้อทั้ง 22 ไอโซเลต มาจัดจำแนก ผลการระบุสปีชีส์เป็นมีความคล้ายกับยีสต์ 2 สปีชีส์ คือ *Wickerhamomyces anomalus* ซึ่งพบในแหล่ง UB2 และ SK1 ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์ คือ *W. anomalus* SFM4 และ S4R1–3 ส่วน *Candida tropicalis* พบในแหล่ง SK2 และ SR ประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ คือ *C. tropicalis* SY3–2 DMKU–SE73 QDX XJURML และ LYSC–3 ผลการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นในแหล่งของน้ำตาลที่แตกต่างกันทั้งหมด 7 แหล่ง พบว่า *W. anomalus* สามารถใช้และหมักน้ำตาลได้เฉพาะกลูโคส ฟรุกโทส มอลโทส และซูโครส ส่วน *C. tropicalis* สามารถใช้และหมักน้ำตาลกลูโคส แกแลกโทส ฟรุกโทส มอลโทส และซูโครส การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลด้วยกากน้ำตาลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ที่เวลา 36 ชั่วโมงยีสต์สามารถหมักให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 6.8±0.01 โดยปริมาตร จาก *C. tropicalis* SY3–2 ของแหล่ง SK2 มีค่าผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 0.39 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล



ภาพที่ 3 ปริมาณร้อยละเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ช่วงระยะเวลาต่าง ๆ ในเวลา 48 ชั่วโมง RS = Reducing sugar, E = Ethanol production; (A) *W. anomalus* SFM4 จากแหล่ง UB2; (B) *W. anomalus* S4R1–3 และ SFM4 จากแหล่ง SK1; (C) *C. tropicalis* SY3–2 จากแหล่ง SK2; และ (D) *C. tropicalis* DMKU-SE73, QDX, XJURML, LYSC–3 จากแหล่ง SR

อภิปรายผล

จากการคัดแยกยีสต์จากลูกแป้งสาโทในแหล่งตัวอย่างทั้งหมด 5 แหล่ง เบื้องต้นสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 64 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบการผลิตเอทานอลเบื้องต้น โดยผู้วิจัยคัดเลือกไอโซเลตที่มีปริมาณเอทานอลมากกว่าร้อยละ 6 โดยปริมาตร เนื่องจากเป็นช่วงของค่าความเข้มข้นที่มากที่สุดในการทดลองครั้งนี้โดยพบเพียงจำนวน 22 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีลักษณะโคโลนีสีขาวครีม มันวาว ขอบเรียบ เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะเป็นเซลล์กลมรี สอดคล้องกับงานวิจัยของ Techavasonyoo (2007) ที่พบว่ายีสต์ที่คัดแยกจากลูกแป้งสุรามีลักษณะโคโลนีสีขาว ขาวครีม หรือขาวนวล ลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ส่วนใหญ่เห็นเป็นลักษณะเซลล์กลมรีขนาดเล็ก เช่นเดียวกับ Chanchaichaovivat *et al*. (2015) พบลักษณะสัณฐานของ *Candida* sp. จากลูกแป้งข้าวหมากที่มีลักษณะเป็นรูปไข่และยาวรี ผลการจัดจำแนกโดยเทียบลำดับเบสตำแหน่ง D1/D2 ของยีน 26S rDNA ของ 22 ไอโซเลต ที่คัดแยกจากลูกแป้งสาโทแหล่งต่าง ๆ นั้น พบว่ามีความคล้ายกับยีสต์ *Wickerhamomyces anomalus* และ *Candida tropicalis* (ร้อยละ 99–100) โดย *W. anomalus* หรือ *Pichia anomala* (Thanh *et al*., 2016) ซึ่งยีสต์สายพันธุ์เหล่านี้สามารถพบ

ได้ในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า (Chaijamrus and Mouthung, 2011; Chanchaichaovivat *et al*., 2015; Limtong *et al*., 2002; Techavasonyoo 2007) นอกจากนี้ยังพบได้ในหัวเชื้อจุลินทรีย์ผสมจากธรรมชาติในประเทศต่าง ๆ เช่น Bahn men ของเวียดนาม และ Ragi Tapé ของอินโดนีเซียที่พบ *W. anomalus* และ *C. tropicalis* เช่นกัน (Abe *et al*., 2004; Thanh *et al*., 2008) เมื่อนำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นโดยการทดสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและการหมัก ผลการวิจัยพบว่า *W. anomalus* สามารถหมักและใช้น้ำตาล ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโทส มอลโทส และซูโครส สอดคล้องกับงานวิจัยของ Techavasonyoo (2007) ที่เชื้อ *W. anomalus* สามารถใช้และหมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครส และมอลโทสได้ ส่วน *C. tropicalis* สามารถหมักและใช้น้ำตาลกลูโคส มอลโทส ซูโครส และแกแลกโทส (Marinho *et al*., 2010) ผลการทดสอบการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลของเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 2 สปีชีส์หมักไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าเมื่อหมักภายใน 12 ชั่วโมงแรกตรวจพบปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (Pason *et al*., 2015) จนสูงที่สุดที่เวลา 36 ชั่วโมงของการหมัก โดยเชื้อ *C. tropicalis* สามารถหมักให้ปริมาณเอทานอลได้สูงสุด เท่ากับร้อยละ 6.8±0.01 โดยปริมาตร และ *W. anomalus* เท่ากับร้อยละ 6.4±0.01 โดยปริมาตร เมื่อเปรียบเทียบปริมาณร้อยละเอทานอลกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Limtong *et al*. (2002) ซึ่งหมัก *W. anomalus* ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 18 พบปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่ 48 ชั่วโมงเท่ากับร้อยละ 5 โดยปริมาตร ในขณะที่ Zulfikar *et al*. (2019) ทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของ *C. tropicalis* ซึ่งหมักในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 16 พบปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่ 48 ชั่วโมงเท่ากับร้อยละ 4.8 โดยปริมาตร นอกจากนี้ยังพบว่าในระหว่างกระบวนการหมักปริมาณของน้ำตาลรีดิวซ์มีแนวโน้มลดลงซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของเอทานอล เนื่องจากเชื้อมีการใช้น้ำตาลและเปลี่ยนเป็นเอทานอล โดยเชื้อทั้ง 2 สปีชีส์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลได้เพราะจัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มที่สามารถหมักให้เอทานอล (Limtong *et al*., 2002; Thanh *et al*., 2005) เหมาะกับการนำมาประยุกต์ใช้ต่อไปในอนาคต เช่น การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงชีวภาพ การผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) กระทรวงศึกษาธิการ และขอขอบคุณคณาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพทุกท่านในการให้คำแนะนำสำหรับการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Abe, A., Sujaya, I.N., Sone, T., Asano, K., and Oda, Y. (2004). Microflora and selected metabolites of potato pulp fermented with an Indonesian starter Ragi Tapé. **Food Technology and Biotechnology** 42: 169–173.

Chaijamrus, S., and Mouthung, B. (2011). Selection of Thai starter components for ethanol production utilizing malted rice from

wast paddy. **Songklanakarin Journal Science Technology** 33(2): 163–170. (in Thai)

Chanayart, C. (2006). **Mirin Production Using Pure–Culture Isolated from Loog–Pang**. Master of Science (Food Technology) Thesis. Chiang Mai: Maejo University. (in Thai)

Chanchaichaovivat, A., and Utiansut, A. (2013). Inhibitory efficacies of lactic acid bacteria isolated from LoogPang KaoMark against enteropathogenic bacteria. **Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning** 4(2): 124–131. (in Thai)

Chanchaichaovivat, A., Phornphisutthimas, S., and Mookseang, K. (2015). Analysis and comparison of yeast β–glucan from Loog–Pang Kao–Mak in the central part of Thailand. **Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning** 6(2): 188–197. (in Thai)

Kanlayakrit, W., Changpha, W., Rodprapakorn, M., and Sirirote, P. (2012). The study of mixed culture for Thai traditional fermentation starter (Loog–Pang) production. **49th Kasetsart University Annual Conference** (pp. 523–531). Bangkok: Kasetsart University. (in Thai)

Limtong, S., Sintara, S., Suwanarit, P., and Lotong, N. (2002). Yeast diversity in Thai traditional fermentation starter (Loog–pang). **Kasetsart Journal** 36: 149–158. (in Thai)

Limtong, S. (2005). Species diversity of molds in Thai traditional fermentationstraters (Loog–Pang). **Kasetsart Journal** 39: 511–518. (in Thai)

Malinho, S. M., Teixeira, A. B., Santos, O. S., Cazanova, R. F., Ferreira, C. A. S., Cherubini, K., and Oliveira, A. D. (2010). Identification of *Candida* spp. by phenotypic tests and PCR. **Brazilian Journal of Microbiology** 41: 286–294.

Miller, G. (1959). Use of dinitrisalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. **Analytical Chemistry** 31: 426–429.

Pason, P., Tacchaapaikoon, C., Waeonukul, R., Phoemsuk, K., Ketbot, P. and Ratanakhanokchai, K. (2015). Isolation and characterization of thermotolerant yeast for bio–ethanol production. **Agricultural Science Journal** 46(3): 373–376. (in Thai)

Sangswan, J., and Loorroengsil, S. (2018). Isolation of yeast from starter of wine (Sato) in Surin Province. **12th Ubon Ratchathani University National Research Conference** (pp. 393–404). Ubon Ratchathani: Ubon Ratchathani University. (in Thai)

Sridam, P., and Dajanta, K. (2014). Screening of potential indigenous Loog Pang for production of fermentated glutinous rice (Kho Mak) with high total soluble solid and lower alcoholic odor. **National and International Conference Interdisciplinary Research for Local Development Sus-**

tainability (pp. 129–139). Nakhon Sawan: Nakhon Sawan Rajabhat University. (in Thai)

Techavasonyoo, A. (2007). **Isolation, Classification and Characterization of Yeasts and Molds Isolated from Loog Pang for Sato Production.** Master of Science (Industrial Microbiology) Thesis. Bangkok: Chulalongkorn University. (in Thai)

Thanh, V. N., Thu Huong, N. T., and Quynh Anh, N. T. (2005). Conservation of the biodiversity of Vietnam traditional alcohol fermentation starter. **MSA Golden Jubilee International Science Congress (ISC) 2005** (pp. 160–161). Kuala Lumpur: Putra World Trade Centre.

Thanh, V. N., Mai, L. T., and Tuan, D. A. (2008). Microbial diversity of traditional Vietnamese alcohol fermentation starters (banh men) as determined by PCR–mediated DGGE. **International Journal of Food Microbiology** 128: 268–273.

Thanh, V. N., Thuy, T. N., Chi, T. N., Hien, D. D., Ha, V. T. B., Luong, T. D., Ngoc, D. P., and Ty, V.P. (2016). New insight into microbial diversity and functions in traditional Vietnamese alcoholic fermentation. **International Journal of Food Microbiology** 232: 15–21.

Zulfikar, M., Nurcholis, M., and Keo–Oudone, C. (2019). Molecular identification and potential ethanol production of long–term thermo–tolerant yeast *Candida tropicalis.* **IOP Conference Series: Earth and Environmental Science** 239: 012004.