บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยีสต์ (Yeast)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของยีสต์

ยีสต์เป็นราชนิดหนึ่งที่มีโครงสร้างเซลล์แบบยูคาริโอตมีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยวมีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม (Round) รี (Oval) สามเหลี่ยม (Triangular) ยาวและปลายด้านหนึ่งแหลม (Ogivals หรือ Boat) ทรงกระบอก (Cylindrical) รูปมะนาวฝรั่ง (Apiculate) หรือเป็นสาย (Filamentous) เป็นต้น เซลล์ยีสต์มีความกว้างประมาณ 1 - 5 ไมโครเมตร และยาวประมาณ 5 - 3 ไมโครเมตร ดำรงชีวิตแบบเฮเทโรทรอพ (Heterotroph) คือ ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน หรือดำรงชีพแบบผู้ย่อยสลาย (Saprophyte) และแบบปรสิต (Parasite) (สุดารัตน์ แซ่โจว, 2555)

2.1.2 การจัดลำดับชั้นอนุกรมวิธานของยีสต์ (ปฏิพล ชัยเทพ ไพรัช สาใจ และรัชฎาภรณ์ ปวงก๋องตั๋น, 2555)

สามารถจำแนกยีสต์ออกเป็นหมวดหมู่ตามสายวิวัฒนาการ ดังต่อไปนี้

Kingdom Fungi
Phylum Ascomycota
Subphylum Saccharomycotina (true yeasts)
Class Ascomycetes
Order Saccharomycetales
Family Saccharomycetaceae
Genus *Saccharomyces*

2.1.3 ยีสต์ทนแรงดันออสโมติก (Osmotolerant yeast)

ยีสต์ทนแรงดันออสโมติก (Osmotolerant yeast) หมายถึง ยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง และสามารถทนต่อแรงดันออสโมซีสได้ดี เช่น น้ำผึ้ง น้ำผลไม้ น้ำเชื่อม แยม นมข้นหวาน รวมทั้งสามารถเจริญได้ที่ค่า Water activity ต่ำสุด คือ 0.85 ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงพบว่ายีสต์บางสายพันธุ์สามารถก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารที่มีแรงดันออสโมติกสูงได้ (Food spoilage) (พิมเพ็ญ พรเฉลิมวงศ์ และคณะ, 2015)

2.1.4 การสืบพันธุ์ของยีสต์

การสืบพันธุ์ของยีสต์สามารถแบ่งได้ 2 ประเภท (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) ดังนี้

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2.1.4.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ได้แก่

1. การแตกหน่อ (Budding) ยีสต์มีการแตกหน่อ 2 แบบ ได้แก่ การแตกหน่อแบบโฮโลบลาสติก (Holoblastic budding) คือ ผนังเซลล์แม่ทุกชั้นยังคงสมบูรณ์ในระหว่างการสร้างหน่อ และการแตกหน่อแบบเอนเทโรบลาสติก (Enteroblastic budding) คือ การแตกหน่อจะเกิดจากการมีรอยแยกบนผนังเซลล์ของเซลล์แม่ ผนังชั้นในสุดของเซลล์แม่จะกลายเป็นผนังชั้นนอกสุดของหน่อ และสุดท้ายจะหลุดออกจากเซลล์แม่

2. การแตกหน่อร่วมกับการแบ่งเซลล์ (Bud-Fission)

2.1 การแตกหน่อขั้วเดียว (Monopolar budding) เป็นการแตกหน่อเกิดที่ขั้วหรือปลายเพียงด้านเดียว โดยการแตกหน่อจะเกิดขึ้นซ้ำๆ ที่ตำแหน่งเดิม ยีสต์ที่มีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Pityrosporum* เป็นต้น

2.2 การแตกหน่อสองขั้ว (Bipolar budding) การแตกหน่อแบบนี้เกิดขึ้นที่ขั้วหรือปลายทั้งสองด้านของเซลล์ ปกติจะเกิดทีละขั้ว หรืออาจเกิดพร้อมกันทั้งสองขั้วก็ได้ โดยพบว่าหน่อจะแยกออกจากเซลล์แม่เมื่อมีการสร้างผนังกั้นระหว่างเซลล์ใหม่ทั้ง 2 ซึ่งเป็นการแตกหน่อบนฐานกว้าง ผลจากการแตกหน่อซ้ำๆ ที่ตำแหน่งเดิมทำให้เกิดรอยแผลตามขวางหลายแผลที่ขั้วทั้งสองข้างที่เรียกว่า แอนเนลเลชัน (Annellation) การแตกหน่อสองขั้วเป็นลักษณะประจำของยีสต์ที่มีรูปร่างมะนาวฝรั่ง (Apiculate yeast) ยีสต์ที่มีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Hanseniaspora*, *Nadsonia* และ *Kloeckerra* เป็นต้น

3.การแตกหน่อหลายขั้ว (Multipolar หรือ Multilateral budding) ยีสต์ส่วนใหญ่มีการแตกหน่อแบบนี้ โดยการแตกหน่อเกิดได้โดยรอบเซลล์ ยีสต์ที่มีการแตกหน่อแบบนี้ เช่น *Pichia, Saccharomyces*, *Zygosacharomyces* และ *Hansenula* เป็นต้น

การสืบพันธุ์ของยีสต์แบบการแตกหน่อร่วมกับการแบ่งเซลล์ แสดงดังภาพที่ 2.1

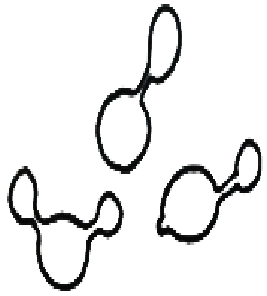
(a) (b) (C)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

ภาพที่ 2.1 การแตกหน่อของยีสต์ตามตำแหน่งที่เกิด (a) การแตกหน่อขั้วเดียว (b) การแตกหน่อสองขั้ว (c) การแตกหน่อหลายขั้ว

ที่มา: Yarrow, 1998

3. การแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน (Fission) คือ ยีสต์จะเพิ่มจำนวนและเพิ่มขนาดเซลล์ก่อน จากนั้นจึงจะสร้างผนังกั้นตามขวางเพื่อแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 เซลล์ พบเฉพาะในยีสต์กลุ่ม *Schizosaccharomyces* (ภาพที่ 2.2)



ภาพที่ 2.2 การแบ่งเซลล์แบบฟิสชัน
ที่มา: สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549

4. การสร้างคอนิเดียบนก้าน (Conidia on stalk) เกิดโดยมีโครงสร้างลักษณะเป็นท่อโผล่ออกจากเซลล์ 1 ก้าน (Stalk) หรือมากกว่า 1 ก้าน จากโครงสร้างนี้จะพบคอนิเดียที่ส่วนปลายเมื่อแก่เต็มที่จะแยกออกมาโดยการสร้างผนังกั้นที่บริเวณตำแหน่งตรงกลางของก้าน และคอนิเดียถูกปล่อยออกไป พบในสกุล *Streigmatomyces* (ภาพที่ 2.3)

ภาพที่ 2.3 การสร้างคอนิเดียบนก้าน
ที่มา: สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549

5. การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ คือ การเพิ่มจำนวนของยีสต์โดยการแตกหน่อนั้น เมื่อหน่อที่ได้ยังติดอยู่กับเซลล์แม่ทำให้เกิดกลุ่มหรือสายของเซลล์เรียกว่า เส้นใยเทียม (Pseudomycelium) ซึ่งอาจเป็นแบบที่ไม่มีการพัฒนา (Rudimentary) ประกอบด้วยเซลล์ยาวมีขนาดเท่าๆ กัน แต่ละเซลล์จะสร้างบลาสโทสปอร์ (Blastospore) ซึ่งการเรียงตัวของบลาสโทสปอร์อาจใช้แยกความแตกต่างของสกุลได้ นอกจากนี้สภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่อรูปแบบของเส้นใยเทียมได้เช่นเดียวกัน (ภาพที่ 2.4)

ปี ค.ศ. 1932 Van der Walt และ Yarrow อธิบายรูปร่าง และรายละเอียดของเส้นใยเทียมแบบต่างๆ ดังนี้

5.1 Mycotorula-type เป็นเส้นใยเทียมที่ค่อนข้างกระชับ มีบลาสโทสปอร์รูปร่างค่อนข้างกลมอยู่เป็นกลุ่มรอบๆ รอยต่อของเซลล์ เซลล์มีลักษณะยาวต่อกันเป็นเส้นใยเทียม

5.2 Mycotoruloides-type เส้นใยเทียมชนิดนี้มีบลาสโทสปอร์ที่มีการแตกแขนงอย่างหลวมๆ เกาะอยู่ที่รอยต่อของเซลล์

5.3 Candida-type เป็นเส้นใยเทียมที่มีสายของบลาสโทสปอร์ที่รอยต่อของเซลล์

5.4 Mycocandida-type เป็นเส้นใยเทียมที่มีการแตกกิ่งมาก และมีบลาสโทสปอร์ 1 - 2 สปอร์ที่รอยต่อหรือบลาสโทสปอร์อาจเรียงเป็นขด (Whorls) หรือตั้งตรง (Verticals) ที่รอยต่อของเซลล์

5.5 Blastodendrion-type เส้นใยเทียมชนิดนี้มีบลาสโทสปอร์รูปร่างเป็นหยดน้ำเรียงตัวคล้ายกับโครงสร้างของเพนนิซิเลียม

(a) (b) (c) (d) (f)

ภาพที่ 2.4 การแสดงเส้นใยเทียมแบบต่างๆ (a) Mycotorula-type (b) Mycotoruloides-type (c) Candida-type (d) Mycocandida-type (f) Blastodendrion-type

ที่มา: Van der Walt and Yarrow, 1984

ยีสต์หลายชนิดสามารถสร้างเส้นใยแท้ที่มีผนังกั้นและมีการแตกกิ่งก้านสาขา (True septate branching hyphae) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยเส้นใยแท้จะขยายขนาดโดยการเจริญอย่างต่อเนื่องและตามด้วยการสร้างผนังกั้น ทั้งนี้การแยกระหว่างเส้นใยแท้ เส้นใยเทียม และแบบที่อยู่ระหว่างกลางทำได้ค่อนข้างยาก โดยทั่วไปจึงใช้เกณฑ์ 3 ข้อ สำหรับการแยกเส้นใยทั้งสองแบบดังนี้

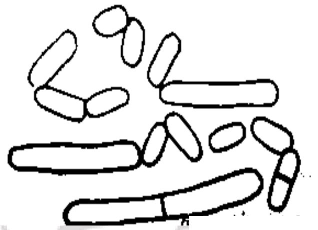
1) เส้นใยแท้จะเห็นผนังกั้นมีลักษณะตรงและสะท้อนแสงชัดเจน ในขณะที่เส้นใยเทียมไม่มีผนังกั้นที่เห็นได้ชัด และปลายของเซลล์ในระหว่างเส้นใยมีลักษณะโค้งและไม่สะท้อนแสง ในขณะที่แบบที่อยู่ระหว่างเส้นใยแท้และเส้นใยเทียมมักแสดงว่ามีการแบ่งของเซลล์โดยผนังกั้นน้อยกว่า

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2) เส้นใยแท้เซลล์ที่ตรงปลายเส้นยาวกว่าเซลล์ภายในเส้นใย แต่สำหรับเส้นใยเทียมพบว่า เซลล์ตรงปลายสั้นกว่าหรือเท่ากับเซลล์ที่อยู่ถัดไป ส่วนแบบที่อยู่ระหว่างกลางของแบบทั้งสองพบว่า มีน้อยมากที่เซลล์ตรงปลายยาวกว่าเซลล์ที่อยู่ถัดไป ส่วนแบบที่อยู่ระหว่างกลางของแบบทั้งสองพบว่า มีน้อยมากที่เซลล์ตรงปลายยาวกว่าเซลล์ที่อยู่ถัดไป

3) เส้นใยแท้ไม่แสดงรอยคอดที่ผนังกั้นหรือบริเวณที่จะสร้างผนังกั้นต่อไป ในขณะที่เส้นใยเทียมแสดงรอยคอดที่เห็นชัดเจนมาก

ยีสต์บางชนิดอาจมีการสร้างสปอร์แบบไม่อาศัยเพศชนิดต่าง ๆ เช่น เอนโดสปอร์ (Endospore) ซึ่งไม่ใช่ลักษณะปกติของยีสต์ทั่วไป มักพบเฉพาะในสกุล *Cystofilbasidium*, *Filobasidiella*, *Oosporidium* และ *Leucosporidium* (Fell et al., 2001) ทั้งนี้เอนโดสปอร์ที่พบในยีสต์เป็นเซลล์ที่มีการกั้นขอบเขตภายในทำให้มีลักษณะเหมือนสปอร์อยู่ในเซลล์มักพบในเชื้อที่มีอายุมากบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract malt extract agar, Malt extract agar, Potato dextrose agar และ Corn meal agar ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้อง และยีสต์บางชนิดสามารถสร้างคลามัยโดสปอร์ (Chlamydospore) ซึ่งเป็นสปอร์ที่มีผนังหนาอาจเกิดที่เซลล์ตรงกลางหรือปลายเส้นใย ทั้งนี้คลามัยโดสปอร์ไม่ได้เกิดขึ้นเป็นประจำ และสปอร์ชนิดนี้เป็นลักษณะเฉพาะในยีสต์บางชนิด เช่น *Candida albicans* และสกุล *Metschniko* เป็นต้น (ภาพที่ 2.5) นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดอาจพบว่ามีการสร้างทั้งเส้นใยแท้และเส้นใยเทียม เช่น *Saccharomycopses* และ *Trichosporon* สำหรับยีสต์บางชนิดที่มีเส้นใยแท้อาจสร้างอาร์โทรสปอร์หรืออาร์โทรคอนิเดียจากการแตกหักของเส้นใย และเรียงตัวแบบซิกแซก



ภาพที่ 2.5 อาร์โทรสปอร์ที่พบในยีสต์บางชนิด
ที่มา: Van der Walt and Yarrow, 1984

2.1.4.1 การสืบพันธุ์ของยีสต์แบบอาศัยเพศ

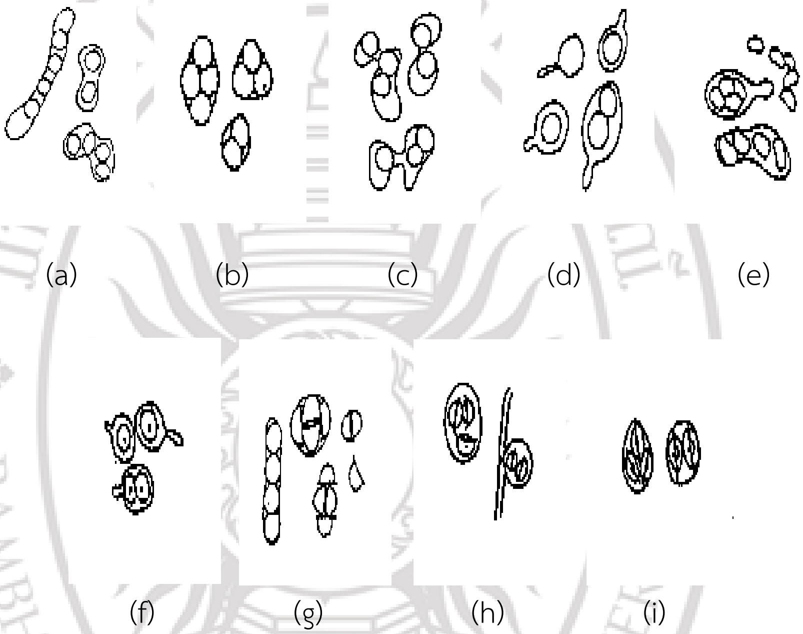
การสืบพันธุ์ของยีสต์แบบอาศัยเพศมี 2 กลุ่ม คือ แอสโคมัยซีตัสยีสต์ (Ascomycetous yeast) และแบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์ (Bacidiomycetous yeast) (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) ดังนี้

1. ลักษณะการสร้างแอสโคสปอร์ คือ ยีสต์สามารถสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (Ascospore) มีทั้งกลุ่มที่เป็นโฮโมทาลลิก (Homothallic) ซึ่งวงจรชีวิตอาจเป็นแฮพลอนติก (Haplontic) ดิพลอนติก (Diplontic) และดิพลอแฮพลอนติก (Diplohaplontic) และกลุ่มที่เป็นเฮเทอโรทาลลิก (Heterothallic) ดังนั้นการเกิดแอสโคสปอร์จึงมีความแตกต่างกัน

สำหรับโฮโมทาลลิกยีสต์ที่มีวงจรชีวิตแบบแฮพลอนติกนั้น เซลล์อยู่ในระยะแฮพลอยด์เป็นส่วนใหญ่ ทั้งนี้การรวมของไซโทพลาสซึม การรวมตัวของนิวเคลียส และไมโอซิสเกิดในไซโกตซึ่งเป็นช่วงเดียวที่นิวเคลียสมีโครโมโซมสองชุด ทั้งนี้การเกิดโครโมโซมสองชุด (Diploidization) ของยีสต์ที่มีวงจรแบบนี้อาจเกิดโดยเซลล์ที่นิวเคลียสมีโครโมโซมหนึ่งชุดแตกหน่อ แล้วหน่อยังติดเซลล์แม่และมีการรวมตัวของนิวเคลียส ต่อมาเซลล์แม่และหน่อนั้นจะเปลี่ยนเป็นแอสคัสที่ภายในมี 1 - 4 แอสโคสปอร์ กลไกการสร้างแอสคัสแบบนี้คือคอนจูเกชันระหว่างเซลล์แม่และเซลล์ลูก เพราะนิวเคลียสที่มารวมกันทั้งสองนิวเคลียสมาจากนิวเคลียสเดียวกันจึงถือว่าเป็นการผสมกันในพวกการ

เกิดนิวเคลียสที่มีโครโมโซมสองชุดแบบนี้พบในสกุล *Torulapora*, *Wingea*, *Debaryomyces* และ *Schwanniomyces*

1.1 แอสโคสปอร์มีรูปร่างหลายแบบ เช่น กลม รี รูปถั่ว (Reniform) ทรงกระบอกหัวท้ายมน (Cylindrical with obtusen ends) รูปหมวก (Helmet) รูปกระสวยและมีรยางค์ (Spindle with appendages) และรูปดาวเสาร์ (Saturn, Satruniform) ผิวของแอสโคสปอร์อาจมีลักษณะเรียบ บาง หนา ขรุขระ หรือเป็นรอยหยักที่ผิว (Warty) (ภาพที่ 2.6)



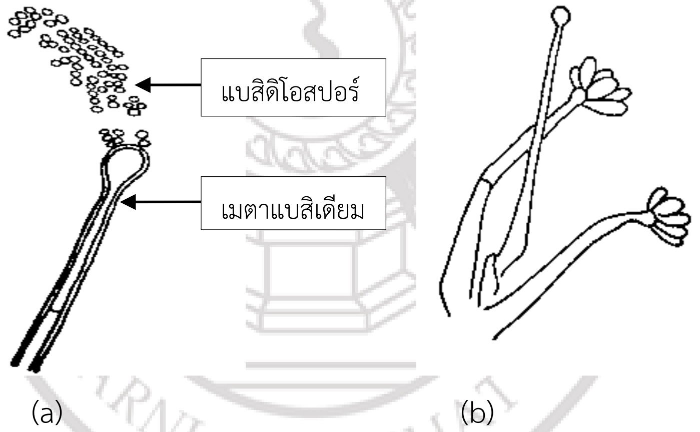
ภาพที่ 2.6 รูปร่างของแอสคัสและแอสโคสปอร์ (a) กลมและค่อนข้างรี; *Schizosaccharomyces pombe* (b) กลมและรูปไข่; *Saccharomyces cerevisiae* (c) กลมและรูปไข่ (เกิดจากคอนจูเกชัน); *Zygosaccharomyces rouxii* (d) กลม (มีท่อคอนจูเกชัน); *Torulaspora delbrueckii* (e) รูปไต (ปล่อยออกจากแอสคัส); *Kluyveromyces marxianus* (f) กลมและผนังเป็นรอยหยักที่ผิว (ผนังขรุขระ); *Debaryomyces hansenii* (g) รูปร่างเป็นหมวกทหาร (Helmet-shaped) หรือรูปร่างครึ่งวงกลม (Hemispherical); *Pichia membranaefaciens* (h) รูปร่างเป็นหมวก (Hat-shaped); *Saccharomycopsis fibuligera* และ (i) รูปร่างเป็นดาวเสาร์ (Saturn-shaped) และผิวเรียบ; *Williopsis saturnus*

ที่มา: Nakase, 2001

สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2) ลักษณะการสร้างแบสิดิโอสปอร์ คือ ยีสต์ที่มีวงจรชีวิตแบบเฮเทอโรทาลลิกเกิดการคอนจูเกชันของเซลล์ยีสต์ที่ต่างเมติงไทป์ 2 เซลล์ และสร้างเส้นใยที่เซลล์มีสองนิวเคลียสและมักเชื่อมแคลมป์ (Clamp connection) จากนั้นนิวเคลียสเกิดการรวมกันและเกิดการรวมนิวเคลียสแบบไมโทซิสในแบสิเดียม (Basidium) โดยหลังจากเกิดไมโทซิส แบสิเดียมอาจยังคงเป็นเซลล์เดียว (Holobasidium) หรือมีการสร้างผนังกั้นทำให้มีลักษณะหลายเซลล์ (Phragmobasidium) ซึ่งปกติ

มักจะสร้าง 4 แบสิดิโอสปอร์ ซึ่งเมื่อสปอร์แก่จะถูกดีดออกหรือหลุดออกจากแบสิเดียม ทั้งนี้เบสิดิโอสปอร์เกิดในระยะที่เป็นเซลล์ยีสต์ โดยเซลล์ยีสต์ที่สร้างขึ้นจะมีนิวเคลียสที่มีโครโมโซมหนึ่งชุด สำหรับวงจรชีวิตแบบโฮโมทาลลิกต่างจากวงจรชีวิตแบบเฮเทอโรทาลลิก คือ เส้นใยที่เซลล์มีสองนิวเคลียสซึ่งมีการเชื่อมแคลมป์สร้างจากเซลล์ที่มีโครโมโซมสองชุดโดยไม่มีการคอนจูเกชัน บางชนิดสร้างแบสิดิโอสปอร์ที่นิวเคลียยสมีโครโมโซมสองชุดเนื่องจากไม่เกิดไมโอซิส เช่น *Sporidiobolus johnsonii* และ *S. ruineniae* บางสกุลสร้างโพรแบสิเดียม (Probasidium) ที่มีผนังหนาซึ่งอาจเรียกว่าเทลิโอสปอร์ (Teliospore) จากเส้นใยที่เซลล์มีสองนิวเคลียส พบในสกุลต่าง ๆ เช่น *Cystofilobasidium*, *Leucosporidium* และ *Sporidiobolus* เป็นต้น ทั้งนี้เทลิโอสปอร์อาจมีรูปร่างกลมจนถึงเหลี่ยม อาจอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม อาจอยู่ตรงกลางหรือปลายเส้นใย ผนังเรียบหรือมีขนแหลม นอกจากนี้เทลิโอสปอร์เป็นที่เกิดการรวมนิวเคลียสและเมื่องอกจะสร้างแบสิเดียม อย่างไรก็ตามพบว่า ยีสต์บางสกุลไม่สร้างเทลิโอสปอร์ โดยพวกที่ไม่สร้างเทลิโอสปอร์มักจะสร้างแบสิเดียมแบบโฮโลแบสิเดียมจากเส้นใยที่เซลล์มีสองนิวเคลียสโดยตรง เช่น *Xanthophyllomyces, Filobasidiella* และ *Filobasidium* ส่วนบางชนิดสร้างแบบแบสิเดียมที่มีผนังกั้นตามขวาง และมีบอลลิสโทสปอร์ (Ballistospore) ซึ่งสร้างโดยการแตกหน่อ เช่น *Kondoa* และ *Occultifur* เป็นต้น (Fell et al., 2001) ทั้งนี้ลักษณะการสร้างโฮโมเมตาแบสิเดียมโดยไม่มีการสร้างเทลิโอสปอร์แสดงดังภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 แบสิดิโอมัยซีตัสยีสต์แสดงการสร้างโฮโมเมตาแบสิเดียมโดยไม่มีการสร้างเทลิโอสปอร์

(a) *Filobasidiella neoformans*

(b) *Filobasidium uniguttulatum*

ที่มา: Fell et al., 2001

2.1.5 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์

ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีมีความสำคัญสำหรับการจำแนกประเภทของยีสต์ในระดับสปีชีส์ (Species) ซึ่งเป็นการจัดจำแนกโดยอาศัยแบบดั้งเดิม ทำโดยนำยีสต์ที่มีอายุ 24 ชั่วโมงที่เจริญบนอาหารแข็ง Yeast extract peptone dextrose agar (YPD) มาศึกษาลักษณะสำคัญต่างๆ ตามวิธีของ Yarrow (1998) ดังนี้

2.1.5.1 การศึกษาสัณฐานวิทยาของเซลล์ ได้แก่ การศึกษากลไกการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ การสร้างแอสโคสปอร์ ตลอดจนศึกษาลักษณะการเจริญของยีสต์บนอาหารแข็งและอาหารเหลว เช่น

1. สัณฐานวิทยาของเซลล์และการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศ ทำโดยการนำยีสต์มาขีดลากแบบไขว้ (Cross streak) ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract-malt extract (YM) agar slant และถ่ายเชื้อลงใน YM broth ทำการบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง สังเกตสีและลักษณะโคโลนีของยีสต์ รวมทั้งศึกษาการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว โดยสังเกตลักษณะการเจริญต่างๆ เช่น เชื้อลอยเป็นฝ้าที่ผิวหน้าอาหาร (Pellicle) หรือจับกลุ่มกันเป็นก้อนขนาดเล็กและตกตะกอน (Flocculent) หรือเป็นเมือกตกตะกอน (Mucoid sediment) หรือเป็นวงแหวนที่ขอบหลอด (Ring) หรือเกาะกันเป็นก้อนเหนียว (Coherent) หรือเกาะกันแน่นแข็ง (Compact) เป็นต้น นอกจากนี้ควรสังเกตลักษณะอื่นๆ ประกอบ เช่น กลิ่น และสี รวมทั้งสังเกตลักษณะรูปร่าง การเรียงตัว และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ โดยตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 – 1000 เท่า

2. การสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ โดยวิธี Dalmau plate technique โดยทำการเพาะเลี้ยงยีสต์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากเป็นเส้นตรง และทำ Point inoculation 2 ตำแหน่ง ในจานเพาะเชื้อเดียวกัน ปิดทับกระจกปิดสไลด์ที่ปลอดเชื้อ และบ่มที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 7 - 10 วัน จากนั้นทำการตรวจการสร้างเส้นใยเทียมและเส้นใยแท้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าบริเวณที่ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์

3. การตรวจสอบการสร้างแอสโคสปอร์ นำยีสต์มาเพาะเลี้ยงบนอาหารสำหรับการสร้างสปอร์ (Sporulation medium) โดยใช้ 5% malt extract agar และอาหาร YM agar จากนั้นนำยีสต์มาขีดลากแบบไขว้ (Cross streak) ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนอาหาร YM agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง และตรวจดูการสร้างแอสโคสปอร์ที่เวลา 3 วัน ตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 – 1000 เท่า สังเกตระยะเวลาที่ตรวจพบ จำนวน และรูปร่างแอสโคสปอร์ในแอสคัส รวมทั้งสังเกตรูปร่าง การเกิดลักษณะของแอสคัส เป็นต้น

2.1.5.2 การทดสอบลักษณะทางชีวเคมี ได้แก่ การศึกษาลักษณะการหมักน้ำตาล การแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน และการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน (ชุติมา ศรีงิ้ว, 2548) เช่น

1. ทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบคาร์บอน (Assimilation of carbon compound) เป็นการทดสอบความสามารถของยีสต์ในการเจริญแบบใช้ออกซิเจนบนสารประกอบคาร์บอนแต่ละชนิดที่ใช้เป็นแหล่งพลังงาน โดยใช้หลอดทดสอบที่บรรจุ Nitrogen-base medium

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

และสารประกอบคาร์บอนที่จะทดสอบ ในขณะที่ Negative control ใช้ Nitrogen base medium ที่ไม่เติมสารประกอบคาร์บอน และใช้ Nitrogen-base medium ที่เติมกลูโคสเป็น Positive control จากนั้นนำกล้าเชื้อที่เตรียมจากการเลี้ยงเชื้อบน YM agar หรือ YPD agar 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปถ่ายเชื้อลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และวัดความขุ่นของเชื้อโดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นด้วยหมึก India ink สีดำ กว้าง 0.75 มิลลิเมตร หลายเส้นห่างกันประมาณ 5 มิลลิเมตร และนำหลอดเชื้อไปทาบความขุ่นของกล้าเชื้อที่ใช้ คือ ความขุ่นที่เมื่อมองผ่านหลอดแล้วเห็นเส้นสีดำเป็นเส้นพร่า (+2) ทำการเพาะเชื้อลงในอาหารสำหรับทดสอบโดยใช้ Pasture pipette ที่ปลอดเชื้อ 1 หยด ทำการบ่มที่ 25 องศาเซลเซียส ทั้งนี้อาจวางหลอดทดสอบตรงๆ หรือเอียง Slant หรือบ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุน (Rollor drum) เพื่อทำให้อากาศลงไปสู่อาหารได้มากขึ้น

ทำการตรวจระดับการเจริญหลังจากบ่มที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 สัปดาห์ โดยใช้กระดาษขาวขีดเส้นสีดำแบบเดียวกับที่ใช้กับการเตรียมกล้าเชื้อทาบหลอดมองผ่านหลอดที่เลี้ยงเชื้อและสังเกตเส้นสีดำ ดังนี้

+3 : การเจริญมากทำให้เชื้อมีความขุ่นลบเส้นสีดำอย่างสมบูรณ์

+2 : เห็นเส้นพร่า

+1 : เห็นเส้นแต่ขอบเห็นไม่ชัดเจน (ในกรณีที่ให้ผลเป็น +1 ควรทำซ้ำอีกครั้งโดยใช้ loop ตักเชื้อจากหลอดที่เป็น +1 ลงสู่อาหารใหม่)

- : ไม่มีการเจริญจึงเห็นเส้นขอบชัดเจน

ทั้งนี้ในการทดลองใช้สารประกอบคาร์บอน 36 ชนิด ดังนี้ กลูโคส เอทานอล กาแลกโทส กลีเซอรอล แอล-ซอร์โบส อีรีทริทอซูโครส ไรบิทอล มอลโทส กาแลกทิทอล หรือดูซิ-ทอล เซลโลไบโอส ดี-แมนนิทอล ทรีฮาโลส ดี-กลูซิทอลหรือดี-ซอร์บิทอล แลกโทส แอลฟา-เมทิล-ดี-กลูไซด์ เมลิไบโอส ซาลิซิน ราฟฟิโนส กลูโคโน-แกมมา-แลกโทน เมลิไซโทส 2-คีโตกลูโคนิก 5-คีโตกลูโคนิก อินูลิน แป้งที่ละลายน้ำได้ ดีแอล-แลกติก ดี-ไซโลส ซักซินิก ดี-อะราบิโนส แอล-อะราบิโนส ซิตริก อินอซิทอล ดี-ไรโบส กลูคอโรนิก แอล-แรมโนส และกรดกาแลกทูโรนิก

1.2 ทดสอบการแอสซิมิเลตสารประกอบไนโตรเจน (Assimilation of nitrogen compound) ทำการเตรียมเซลล์ยีสต์ที่ไม่มีไนโตรเจนสะสมในเซลล์ โดยการนำยีสต์ที่เจริญในอาหาร YM agar เป็นเวลา 48 – 96 ชั่วโมง มาเตรียมเป็นเซลล์แขวนลอย (Suspension) ในอาหาร Yeast carbon base broth ที่ไม่มีแหล่งไนโตรเจน และทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อให้เซลล์ยีสต์ใช้ไนโตรเจนสะสมสำหรับการเจริญกลายเป็นเซลล์ที่ไม่มีไนโตรเจนสะสม จากนั้นใช้ Pasteur pipette ปลอดเชื้อดูดเซลล์แขวนลอยมาหยดลงบนอาหารแข็ง Yeast carbon base ที่มีแหล่งของไนโตรเจนแตกต่างกัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส หรืออุณหภูมิที่เหมาะสม ทำการสังเกตการเจริญของเชื้อทุกๆ 48 ชั่วโมง เป็นเวลา 15 วัน จากนั้นบันทึกการเจริญเป็น +3, +2, +1, +/- และ - โดยเปรียบเทียบกับขนาดของโคโลนีที่เจริญบน Positive control (+3) และ Negative control (-) ทั้งนี้เมื่อบ่มครบ 15 วัน ทำการหยดสารละลาย Lugol ลงบนเชื้อที่เป็น Positive control เพื่อตรวจสอบการสร้างสารประกอบอะไมลอยด์ (Amyloid)

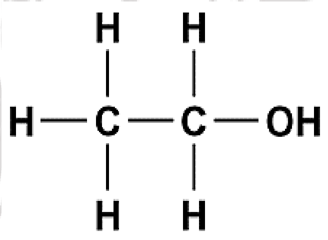
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

1.3 ทดสอบการหมักน้ำตาล (Fermentation of sugars) น้ำตาลที่ใช้สำหรับการทดสอบการหมัก ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส แลกโทส กาแลกโทส มอลโทส ทรีฮาโลส อินูลิน อัลฟา-เมทิล-ดี-กลูไซด์ เซลโลไบโอส เมลิไบโอส เมลิไซโทส ราฟฟิโนส แป้งที่ละลายน้ำได้ และ ดี-ไซโลส ทั้งนี้พบว่า ยีสต์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส จะไม่สามารถหมักน้ำตาลชนิดอื่นได้ ดังนั้นจึงควรศึกษาการหมักน้ำตาลกลูโคสเป็นอันดับแรกก่อน แล้วค่อยทดสอบการหมักกับน้ำตาลชนิดอื่น ๆ การทดสอบทำโดยเพาะเชื้อบนอาหาร YM agar โดยใช้ลูปหรือ Pasteur pipette ดูดเชื้อลงในอาหารสำหรับทดสอบใน Durham fermentation tube นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ ตรวจผลโดยวัดปริมาตรของแก๊สในหลอด Durham และสีของอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป

2.2 เอทานอล

2.2.1 คุณสมบัติทั่วไปของเอทานอล

เอทานอล (Ethanol) สูตรเคมี C_2H_5OH ประกอบด้วยธาตุ คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจนมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 จัดเป็นโมเลกุลที่มีขั้วจึงสามารถละลายน้ำได้ โดยหนึ่งโมเลกุลจะประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หนึ่งหมู่ลักษณะของเอทานอลจะเป็นของเหลวใสไม่มีสี จุดไฟติด ระเหยง่าย (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) สูตรโครงสร้างของเอทานอล แสดงดังภาพที่ 2.8



ภาพที่ 2.8 สูตรโครงสร้างทางเคมีของเอทานอล
ที่มา: สุดารัตน์ แซ่โจว, 2555

2.2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทนอลแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

2.2.2.1 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี คือ การสังเคราะห์เอทานอลโดยการนำเอาเอธิลีน (Ethylene) ซึ่งเป็นก๊าซที่เป็นผลพลอยได้จากการกลั่นน้ำมันดิบมาทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถัน จะได้สารผสมของเอธิลซัลเฟต (Ethylsulphate) จากนั้นนำไปไฮโดรไลซ์ (Hydrolyze) จนได้เอทานอลกับกรดกำมะถันเจือจาง และนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์ได้โดยการนำเอธิลีนมาทำปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) โดยมีกรดฟอสฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) ดังแสดงในสมการที่ (1) (วิมล วิริยะวิทย์, 2526) โดยเอทานอลที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีเรียกว่า เอทานอลสังเคราะห์

สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

$$CH_2{=}CH_2 + H_2O \xrightarrow{H_2PO_4} CH_3CH_2OH \quad (1)$$

(เอธิลีน) (เอทานอล)

2.2.2.2 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการหมัก คือ กระบวนการหมักทางชีวเคมีในการผลิตเอทานอลโดยเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์มีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมี วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการนี้ส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบทางการเกษตร เอทานอลที่ได้เรียกว่า ไบโอเอทานอล (สุมณฑา วัตนสินธุ์, 2545) ทั้งนี้การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักมี 2 ขั้นตอนสำคัญ คือ

ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทแป้งและวัตถุดิบประเภทเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล ขั้นตอนนี้อาศัยเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แสดงดังสมการที่ (2)

$$_2C_6H_{10}O_5 + H_2O \xrightarrow{\text{เอนไซม์}} C_6H_{12}O_6 \quad (2)$$

(แป้ง) (น้ำตาล)

ขั้นตอนที่ 2 เป็นขั้นตอนเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล โดยยีสต์หรือแบคทีเรีย โดยกระบวนการไกลโคไลซิส ในสภาวะไม่มีออกซิเจน แสดงดังสมการที่ (3)

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์/แบคทีเรีย}} 2CO_2 + 2C_2H_5OH + 28.7\ kcal \quad (3)$$

(น้ำตาล) (คาร์บอนไดออกไซด์) (เอทานอล)

จากสมการเคมี (2), (3) พบว่าแป้ง 90 กรัม จะถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม จากนั้นเชื้อยีสต์หรือแบคทีเรียจะหมักกลูโคสเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล 51.1 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม โดยน้ำหนัก แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลสามารถนำมาใช้ได้จริงมีเพียง 95% เท่านั้น และน้ำตาล 5% เหลือยีสต์หรือแบคทีเรียจะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อสร้างพลังงานและผลิตภัณฑ์พลอยได้ (By Product) อื่น ๆ เช่น อะซิติก กรดแลกติก และกลีเซอรอล เป็นต้น (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

สงวนลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2.2.3 กระบวนการหมักเอทานอล

เทคโนโลยีการหมักเอทานอลแบ่งเป็น 3 ประเภท คือ

1) การหมักแบบแบทช์ (Batch fermentation) เป็นวิธีการหมักเอทานอลที่นิยมใช้มากที่สุด ซึ่งเป็นวิธีที่พัฒนามาจากการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ที่มีมาแต่อดีต และเป็นการหมักที่มีการใส่แหล่งอาหารและยีสต์พร้อมกันเข้าไปในถังหมักพร้อมกับเติมสารอาหารและเอนไซม์ที่ต้องการลงไป เมื่อใส่จุลินทรีย์เพาะเลี้ยงลงไปในระบบแล้วจะไม่มีการเติมสารชนิดใดลงไปอีก ทั้งนี้สารตั้งต้น

(Substrate) จะถูกใช้อย่างสมบูรณ์ภายใน 36 - 48 ชั่วโมง ซึ่งได้ผลผลิตเอทานอลประมาณ 90 - 95% ของผลผลิตทางทฤษฎีซึ่งปริมาณเอทานอลสุดท้ายประมาณ 10 - 16% โดยน้ำหนัก ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของสับสเตรท โดยในระหว่างการหมักปริมาณเซลล์ สับสเตรท และความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์จะเกิดการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นและลดลงจนเกือบหมด (Kosaric and Vardar-Sukan, 2000)

2) การหมักแบบเฟดแบทช์ (Fed-batch fermentation) เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่มีการเติมอาหารเป็นระยะโดยไม่มีการถ่ายอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแล้วออก การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบเฟดแบทช์สามารถช่วยแก้ปัญหาการเจริญของจุลินทรีย์ที่ถูกกำจัดโดยความเข้มข้นของสับสเตรทจากการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบทช์ ดังผลการวิจัยของ Rickard (1987) ที่พบว่า หากใช้น้ำตาลเริ่มต้นความเข้มข้นสูง ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดจะต่ำเมื่อเทียบกับการค่อยๆ เติมน้ำตาล และการเติมน้ำตาลทีละน้อยยิ่งจำนวนครั้งมากเท่าไรจะส่งผลให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดเพิ่มมากขึ้นเท่านั้น ดังนั้นเทคนิคเฟดแบทช์ที่มีการเติมน้ำตาลเป็นระยะจึงเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอลเนื่องจากสามารถลดผลของความเข้มข้นน้ำตาลในการยับยั้งการเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอลเนื่องจากการหมักเอทานอลจะใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่ค่อนข้างสูง ซึ่งอาจมีผลยังยั้งการเจริญของยีสต์ และประโยชน์อีกอย่างหนึ่งของการหมักแบบเฟดแบทช์คือ ช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเมื่อใช้กากน้ำตาลที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นวัตถุดิบ โดยการเจริญของของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนจะถูกยับยั้งโดยความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์และปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นในถังหมัก (Limtong et al., 1987) นอกจากนี้การหมักแบบเฟดแบทช์ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณกล้าเชื้อ ความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหาร และเวลาหรืออัตราการป้อนอาหาร เป็นต้น (Koshimizu et al., 1984)

Limtong และคณะ (1987) ได้ทำการวิจัยเพื่อเปรียบเทียบระหว่างเทคนิคการหมักแบบแบทช์และการหมักแบบเฟดแบทช์ในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลพบว่า การหมักแบบเฟดแบทช์ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักแบบแบทช์ นอกจากนี้ Krauter และคณะ (1987) พบว่า ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจะเพิ่มขึ้น 10 - 14% เมื่อค่อย ๆ เติมน้ำตาลซูโครส

3) การหมักแบบรีพีทแบตซ์ (Repeated batch Fermentation) เป็นการหมักแบบแบทช์เช่นกัน แต่หลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดจะทำการถ่ายน้ำหมักออกไปส่วนหนึ่ง และเหลืออีกส่วนหนึ่งไว้ในถังหมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักรอบต่อไป ซึ่งจะเห็นได้ว่าวิธีนี้จะช่วยระยะเวลาระหว่างการหมักในแต่ละครั้ง ทำให้การหมักในแต่ละครั้งมีปริมาณเซลล์เริ่มต้นสูงคงที่ส่งผลให้ผลผลิตเอทานอลที่ได้สูง (Nishizawa et al., 1984)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2.2.4 คุณสมบัติของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (ปฏิพล ชัยเทพ และคณะ, 2555) ควรมีลักษณะดังนี้

1. ยีสต์สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด

2. ยีสต์ให้ผลผลิตเอทานอลสูงและมีอัตราการหมักเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว

3. ยีสต์มีความทนต่อเอทานอล (Ethanol tolerrance) เนื่องจากระหว่างการหมักจะมีเอทานอลบางส่วนสะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์ยีสต์แตกได้ ซึ่งยีสต์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงนั้นจะส่งผลให้การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นด้วย

4. ยีสต์ควรมีความสามารถในการตกตะกอน (Flocculation) ซึ่งทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวและนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ใหม่ได้

5. ยีสต์ทนต่ออุณหภูมิสูง (Thermotolerance) เพราะในกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้อุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น มีผลต่อการอยู่รอด และกิจกรรมการทำงานของยีสต์ ยีสต์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงจึงช่วยให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

6. ยีสต์พีเอชต่ำหรือทนกรด (Acid tolerance) ในกระบวนการหมักจะเกิดกรดทำให้พีเอชของอาหารลดลง ยีสต์ที่สามารถทนพีเอชต่ำได้จึงช่วยให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

7. ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะต่างๆ ของการหมักและมีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงง่าย ส่งผลให้ประสิทธิภาพและคุณภาพในการผลิตเอทานอลสม่ำเสมอ

8. ทนต่อแรงดันออสโมซิส (Osmotolerance) ทำให้สามารถใช้อาหารที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูงๆ และช่วยลดการเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ทนต่อแรงดันออสโมซิสจึงมีผลผลิตเอทานอลมากขึ้น

2.2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549; สุดารัตน์ แซ่โจว, 2555) ควรมีลักษณะดังนี้

1. ความเข้มข้นของเอทานอลมีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ รวมทั้งมีผลให้ยีสต์ที่เจริญอยู่ในระยะ Exponential มีอัตราการเจริญลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเอทานอลมีผลต่อการแบ่งเซลล์ยีสต์

2. ธาตุอาหาร (Nutrient) และโคแฟคเตอร์ (Cofactor) มีผลต่อการเจริญของยีสต์นอกเหนือจากคาร์โบไฮเดรต เพื่อสนับสนุนการเจริญของยีสต์ควรเติมธาตุอาหารบางอย่างเสริมลงไปยกตัวอย่างเช่น

2.1 ไนโตรเจน ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ และเป็นสับสเตรทในการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น และช่วยกระตุ้นการหมักเอทานอล ซึ่งยีสต์จะใช้ไนโตรเจนในรูปของสารอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะมิโน และโปรตีนต่างๆ ในขณะที่สารอนินทรีย์ ได้แก่ไนเตรท และแอมโมเนีย ซึ่งอยู่ในรูปแก๊ส เป็นต้น

2.2 ฟอสฟอรัสจำเป็นต่อการเจริญและกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ โดยยีสต์จะใช้ฟอสฟอรัสในการสร้างพลังงาน ATP รวมทั้งการสังเคราะห์นิวคลีโอโปรตีน และสารอื่นๆ ภายในเซลล์ นอกจากนี้การแตกตัวของฟอสเฟตทำให้เกิดสภาพบัฟเฟอร์ (Buffer) ซึ่งจะช่วยรักษาค่าพีเอชให้คงที่

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

2.3 ซัลเฟอร์เป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยในเซลล์ยีสต์มีซัลเฟอร์ประมาณร้อยละ 0.4 ของน้ำหนักแห้ง โดยเมไทโอนีน (Methionine) เป็นแหล่งซัลเฟอร์ที่ยีสต์ใช้ในการเจริญที่ดีที่สุด

2.4 แมกนีเซียมเป็นธาตุที่ช่วยปกป้องเซลล์จากการถูกทำลายเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิและความเข้มข้นของเอทานอลสูง (Birch and Walker, 2000)

3. สภาวะแวดล้อม (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

3.1 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เป็นปัจจัยที่สำคัญของการหมักเอทานอล เนื่องจากค่าพีเอชมีผลต่อการหมัก และเกี่ยวข้องกับควบคุมการปนเปื้อนของเชื้อ สำหรับการเลือกใช้พีเอชที่เหมาะสมในการหมัก พีเอชในอาหารควรมีค่าเริ่มต้นประมาณ 5.5 หากอาหารมีความเป็นบัฟเฟอร์สูงพีเอชที่ใช้ควรอยู่ในช่วงระหว่าง 4.5 - 4.7

3.2 อุณหภูมิมีผลทำให้การหมักเอทานอลมีอัตราการหมักสูง รวมทั้งมีความร้อนเกิดขึ้นเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ระหว่างการหมักเอทานอลความร้อนจะเพิ่มสูงขึ้นในอัตรา 140.2 แคลอรี่ต่อกรัมน้ำตาลกลูโคส (Saiagal, 1994) อีกทั้งประเทศไทยเป็นประเทศในเขตร้อน ดังนั้นในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอลจึงต้องมีระบบหล่อเย็น (Cooling system) เข้ามาช่วยเพื่อลดอุณหภูมิในระหว่างการหมัก (Nagodawithana et al., 1974) ซึ่งจะต้องลดอุณหภูมิของถังหมักและรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 32 - 33 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น การพ่นให้เป็นฝอยทั่วผิวนอกของถังหมัก การใช้ Cooling coli หรือใช้การผ่านส่าออกไปทำให้เย็นลงนอกถังหมัก เป็นต้น

3.3 ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในกระบวนการหายใจ (Respiratory chain) นอกจากนี้ออกซิเจนยังทำหน้าที่เป็น Growth factor ของยีสต์โดยเกี่ยวข้องในการสังเคราะห์กรดไขมันที่มีพันธะคู่ ซึ่งนอกจากการส่งเสริมการเจริญของยีสต์ภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจนแล้วยังเพิ่มความทนต่อเอทานอลของยีสต์ด้วย แต่หากเติมอากาศในปริมาณมากเกินไปอาจทำให้เกิด Pasteur effect คือ ทำให้มีการออกซิเดชันของกลูโคสอย่างสมบูรณ์และส่งผลให้ชีวมวลเพิ่มขึ้นในขณะที่การผลิตเอทานอลลดลง แต่อย่างไรก็ตามการเติมอากาศในปริมาณมากๆ ก็ไม่ได้ก่อให้เกิดเหตุการณ์ดังกล่าวข้างต้นเสมอไป เพราะการหายใจของยีสต์ยังถูกควบคุมด้วยความเข้มข้นของคาร์โบไฮเดรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยถ้าในอาหารเลี้ยงเชื้อมีน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลซูโครสสูงกว่า 0.02 - 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก แม้จะมีการเติมอากาศอย่างเต็มที่การหายใจก็ยังคงเกิดได้น้อยเมแทบอลิซึมที่เกิดจะเบนไปทางการหมักเอทานอลมากกว่าการหายใจ เรียกว่า Crabtree effect

3.4 คาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งในที่ความดันสูงกว่าบรรยากาศ คาร์บอนไดออกไซด์จะยับยั้งการเจริญและการหมักที่รุนแรง และพบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบางอย่างของกิจกรรมของเอนไซม์

2.2.6 วัตถุดิบที่ใช้สำหรับการหมักเอทานอล (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

วัตถุดิบเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อต้นทุนการผลิต องค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในการหมักเอทานอล แบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

1. พืชที่มีน้ำตาล เช่น อ้อย และผักกาดหวาน (Beet)

2. พืชที่มีแป้ง เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ มันฝรั่ง และมันสำปะหลัง

3. วัสดุที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ เช่น วัสดุเหลือใช้จากโรงงานแปรรูปไม้เฟอร์นิเจอร์ วัสดุเหลือใช้จากพืชผล และพืชไร่ต่างๆ เป็นต้น

2.3 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีรายงานวิจัยจำนวนมากที่สนับสนุนการคัดแยกยีสต์ทนแรงดันออสโมติกจากสิ่งแวดล้อมที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง ดังเช่น ในปี 2014 Fie และคณะ ได้ทำการคัดแยกออสโมฟิลิกยีสต์จากน้ำผึ้งจำนวน 13 ตัวอย่าง ซึ่งเก็บได้จากตอนเหนือของประเทศจีน จากนั้นนำมาวิเคราะห์ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา การทดสอบชีวเคมี โดยวิเคราะห์ด้วย 26S rDNA ผลการทดลองพบว่าออสโมฟิลิกยีสต์ที่คัดแยกได้เป็นสายพันธุ์ *Schizosaccharomyces octosporus, Zygosaccharomyces mellis* และ *Zygosaccharomyces siamensis* นอกจากนี้ Misra และคณะ (2012) พบว่ายีสต์จำนวน 18 สายพันธุ์ จากยีสต์ 7 ชนิด ที่แยกได้จากน้ำต้อยของดอกชบาสามารถผลิตไซลิทอลได้โดยใช้น้ำตาลดีไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยสายพันธุ์ที่สามารถผลิตไซลิทอลได้ดีที่สุด ได้แก่ *Candida tropicalis* ซึ่งสามารถผลิตไซลิทอลได้ 12.11 กรัมต่อลิตร

Sasirin และคณะ (2011) ซึ่งได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5596 ซึ่งเป็นสายพันธ์ 6 ที่ใช้ควบคุมการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมเชื้อเพลิง พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่สุดเท่ากับ 8.14 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สายพันธุ์ยีสต์ทนแรงดันออสโมติกที่มีรายงาน เช่น *Debaryomyces hansenii, Pichia farinose, Zygosaccharomyces rouxii, Z. bailii, Z. mellis, Torulaspora delbrueckii, T. delbrueckii, Schizosaccharomyces pombe, Wickerhamomyces anomalus* และ *Candida* sp. เป็นต้น (Bubnova et al., 2014; Pfannebecker et al., 2016)

Ameh และคณะ (1990) ได้ทำการคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีสต์ในท้องถิ่น เพื่อผลิตเอทานอล โดยคัดแยกยีสต์จากเครื่องดื่มที่เกิดจากการหมัก อาหาร และผลไม้ในประเทศไนจีเรียทั้งหมด 21 สายพันธุ์ จากนั้นได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของยีสต์ที่มีกระบวนการหมักที่ดีที่สุด ผลการศึกษาสามารถคัดเลือกยีสต์ได้ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ โดยพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* J-82 มีความสามารถในการจับกลุ่มตะกอน (flocculent) สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้สูงถึงร้อยละ 40 (น้ำหนัก/ปริมาตร) มีความทนต่อเอทานอลได้สูงถึงร้อยละ 10-15 (ปริมาตร/ปริมาตร) และเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37-42 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นยังพบว่ามียีสต์สายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งแสดงลักษณะที่ดีเช่นกัน ได้แก่ ยีสต์สายพันธุ์ *Pichia anomala* AK-4 มีความสามารถจับกลุ่มตะกอน เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และพบ *S. kluyveri* B-1, *S. cerevisiae* B-2 and *Debaryomyces hansenii* J-1 ซึ่งแต่ละสายพันธุ์สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้สูงถึงร้อยละ 40 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และทนต่อเอทานอลได้ 5.1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนยีสต์สายพันธุ์ *P. anomala* มีศักยภาพในการหมักน้ำตาลมอลโตสได้ดีเหมือนกัน ทั้งนี้ *Saccharomyces* ทั้ง 3 สายพันธุ์เหล่านี้ยังมีความสามารถในการหมักน้ำตาลมอลโตสและน้ำตาลซูโครสได้ดีอีกด้วย และมี

แนวโน้มที่จะนำมาศึกษาการหมักเอทานอลในกากน้ำตาลได้ และยังมีความสามารถในการไฮโดรไลซ์แป้งบางส่วนให้เป็นเอทานอลได้

Kiran และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาคัดแยกยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่มีความทนต่ออุณหภูมิสูง ทนต่อแรงดันออสโมติก และจับกลุ่มตกตะกอนเพื่อนำไปสู่การผลิตเอทานอล จากการศึกษาสามารถคัดแยกยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* จากตัวอย่างดินที่เก็บได้จากโรงงานไฟฟ้าในประเทศอินเดีย โดยพบว่าทุกไอโซเลตเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูงถึง 60 กรัม/ลิตร, 75 กรัม/ลิตร และ 150 กรัม/ลิตร สามารถให้ผลผลิตเอทานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์ VS_1 และ VS_3 ขณะที่เชื้อยีสต์สายพันธุ์ VS_3 สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส แต่การเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอลลดลงที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส แต่เชื้อยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสได้สูงถึง 350 กรัม/ลิตร และเกิดการจับกลุ่มตกตะกอน โดยเชื้อยีสต์เหล่านี้สามารถนำไปช่วยในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ช่วงฤดูร้อนในประเทศอินเดียได้

Limtong และคณะ (2007) ได้คัดแยกยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 จากน้ำอ้อยเพื่อนำไปผลิตเป็นเชื้อเพลิงเอทานอล ซึ่งสามารถคัดแยกยีสต์ได้จากดิน ตัวอย่างน้ำในพื้นที่เพาะปลูกอ้อย และโรงงานผลิตน้ำตาลในสี่จังหวัดของประเทศไทย คือ พระนครศรีอยุธยา, ราชบุรี, สุพรรณบุรี และอุทัยธานี โดยขั้นตอนการคัดแยกได้ใช้เทคนิค enrichment technique และใช้น้ำอ้อย ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลอยู่ร้อยละ 5 หรือ 8 เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้คัดแยกเฉพาะสายพันธุ์ยีสต์ที่ต้องการพร้อมทั้งมีสารอาหารสำคัญที่เอื้อต่อการเจริญเติบโตของยีสต์อีกด้วย ซึ่งประกอบด้วย เอทานอล (Ethanol) ความเข้มข้นร้อยละ 4 (ปริมาตร/ปริมาตร), แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (ปริมาตร/ปริมาตร) และปรับค่าพีเอช (pH) เท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยเขย่าความเร็ว 150 รอบ/นาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อมาขีดลากแบบไขว้ (Cross-streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Enriched cultures แข็ง ที่มีส่วนประกอบเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จนได้เชื้อบริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD เอียง ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส (Glucose) 2 กรัม/ลิตร, แบคโต-เปปโทน (Bacto-peptone) 2 กรัม/ลิตร, สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) 1 กรัม/ลิตร, ผงวุ้น (Agar) 2 กรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส เพื่อนำมาใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้สูง และทนต่ออุณหภูมิสูงได้ที่ 40-45 องศาเซลเซียส

Nyanga และคณะ (2013) ได้ทำการคัดแยกยีสต์จากพุทราอินเดียสายพันธุ์ *Ziziphus mauritiana* เพื่อนำมาหมักเอทานอลแบบดั้งเดิม จึงได้ทำการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีศักยภาพเหมาะสมเพื่อนำมาเป็นเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมักเครื่องดื่ม โดยใช้วิธีการหมักแบบดั้งเดิมในสาธารณรัฐซิมบับเว และตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสในอาหาร

เลี้ยงเชื้อเหลวภายใต้สภาวะที่มีการเติมอากาศและไม่เติมอากาศ พบสายพันธุ์ที่หมักเอทานอลได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ คือ ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* และ *Pichia kudriavzevii, fabianii Pichia* และ *Saccharomycopsi fibuligera* และทำการทดสอบรสชาติของน้ำผลไม้ ระหว่างการหมักยีสต์สามารถผลิตเอทานอลและสารระเหยอื่น ๆ ได้อย่างแตกต่างกัน โดยพบแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ที่เป็นสารระเหยที่สำคัญในน้ำผลไม้หมัก จากนั้นทำการตรวจสอบปริมาณกรดอินทรีย์และสารประกอบคาร์บอนิลคือ เอทิลเฮกซาโนเอท (ethy hexanoate) และเอทิล ออคตะโนเอท (ethy octanoate) เนื่องจากมีการผลิตในปริมาณที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสารระเหยอื่น ๆ และพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่สูงที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น ๆ

Rao และคณะ (2008) ได้ทำการคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของยีสต์เพื่อผลิตเอทานอลจากผลไม้และเปลือกต้นไม้ พบยีสต์ 27 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถดูดซึมไซโลสและผลิตเอทานอลได้ระหว่าง 0.12-0.38 กรัมของเอทานอลต่อกรัมไซโลส จากการวิเคราะห์ลักษณะฟีโนไทป์ของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลได้ถูกระบุว่าแป็นยีสต์สายพันธุ์ *Pichia, Candida, Kluyveromyces, Zygosacchraomyces, Clavispora, Debaryomyces, Metschnikowia, Rhodotorula* และ *Cryptococcus*

Tikka และคณะ (2013) ได้ศึกษาการคัดแยกยีสต์ที่ทนต่อเอทานอล โดยคัดแยกจากสภาพแวดล้อมที่อุดมไปด้วยน้ำตาล เช่น ตัวอย่างผลไม้ต่าง ๆ ยีสต์ที่ได้รับการคัดเลือกจะถูกนำไประบุในระดับสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี แล้วจึงนำยีสต์แต่ละสายพันธุ์มาตรวจสอบต่อการทนความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ YEPD เหลว (Yeast Extract Peptone Dextrose) พบยีสต์ 7 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผลไม้ที่แตกต่างกัน คือ *Saccharomyces cerevisiae* และตรวจสอบการทนต่อเอทานอล ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้ช่วงระดับที่ทนต่อเอทานอลได้อยู่ระหว่าง 7-12 เปอร์เซ็นต์ ในทุกสายพันธุ์

สุดารัตน์ แซ่โจว (2010) ได้ทำการศึกษาการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งเพื่อผลิตเอทานอล โดยใช้ตัวอย่างลูกแป้งทั้งหมด 30 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกยีสต์ที่มีความสามารถย่อยแป้งได้ทั้งหมด 102 ไอโซเลท และมียีสต์ 6 ไอโซเลท ได้แก่ SE 2-1, SE 3-2, SE 6-6, SE 10-5, SE 11-2 และ SE 11-4 ที่สามารถหมักเอทานอลได้ และพบว่าไอโซเลท SE 2-1 สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสได้ 12 เปอร์เซ็นต์ ได้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด 6.67 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร)

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี