รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. **ชุดโครงการวิจัย** : ศึกษาและพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ
2. **โครงการวิจัย** : การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวล โดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพ

   กิจกรรม 3.2 : การทดสอบจุลินทรีย์นำเข้าจากต่างประเทศที่มีประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเอทานอลเทียบกับจุลินทรีย์ท้องถิ่น
3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** : ระบุชื่อการทดลองตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

   ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : ระบุชื่อการทดลองตามแบบ ว1-ก ที่ผ่านการอนุมัติ

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง :

นางหทัยรัตน์ อุไรรงค์ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน :

5. บทคัดย่อ การผลิตเอทานอลในประเทศไทยในปัจจุบันนั้นยังใช้เทคโนโลยีที่ซื้อมาจากต่างประเทศ ซึ่งรวมถึงยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิต แต่การใช้เทคโนโลยีและยีสต์ผลิตเอทานอลจากต่างประเทศยังประสบปัญหาเกี่ยวกับการถ่ายทอดเทคโนโลยี และการหมักในสภาพอากาศของประเทศไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพจุลินทรีย์นำเข้าจากต่างประเทศที่ใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลเทียบกับจุลินทรีย์ท้องถิ่น เพื่อลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเอทานอล สามารถแยกเชื้อยีสต์ที่แตกต่างกันได้ 25 ไอโซเลต โคโลนีของยีสต์ 25 ไอโซเลต โดยเลี้ยงบน Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD) เพื่อใช้ทดสอบและเก็บรักษาเชื้อ คัดแยกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถใช้น้ำตาล Xylose โดยเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ 25 ไอโซเลต บนอาหารเหลว Xylose medium จากนั้นคัดเลือกเชื้อยีสต์ ที่เจริญบนอาหาร Xylose medium โดยดูจากความขุ่น ได้ 6 ไอโซเลต และจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ 6 ไอโซเลต โดยใช้วิธี อ่านลำดับพันธุกรรมของ rRNA และนำเข้ายีสต์ที่สามารถย่อยสลายหรือเปลี่ยนน้ำตาล Xylose เป็น alcohol

6. คำนำ

น้ำมันเชื้อเพลิงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยมาช้านาน เนื่องจากแหล่งผลิตในประเทศมีไม่เพียงพอกับความต้องการที่สูงขึ้นตามความเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจ จึงต้องพึ่งพาการนาเข้าเป็นหลัก ประเทศไทยสูญเสียเงินตราต่างประเทศเพื่อนาเข้าน้ามันเชื้อเพลิงกว่าแสนล้านบาท เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งซึ่งเกิดจากการหมักพืช เศษซากพืช ได้แก่ อ้อย น้าตาล กากน้ำตาล กากอ้อย บีทรูท (หัวผักกาดหวาน) แป้ง มันสำปะหลัง มันเทศ ธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวโพด ข้าว ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง เพื่อเปลี่ยนแป้งจากพืชให้เป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์อีก จากรายงานของผู้ผลิตรายใหญ่พบว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จากวัตถุดิบ คือ พืชชนิดต่างๆ จานวน 1 ตัน เมื่อผ่านขบวนการผลิตจะได้ผลผลิตเอทานอลที่แตกต่างกัน หากใช้วัตถุดิบประเภทธัญพืช ข้าว ข้าวโพด จะได้เอทานอลสูงถึงจำนวน 375 ลิตร รองลงมาถ้าใช้กากน้ำตาลจะได้เอทานอลจานวน 260 ลิตร ในขณะที่ใช้หัวมันสดจะได้เอทานอล 180 ลิตร

การเปลี่ยนสารเซลลูโลสให้เป็นเอทานอลได้ ในขั้นตอนแรกจะนำเซลลูโลสมาเปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยกระบวนการย่อยด้วยกรดหรือกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์จากนั้นนำน้ำตาลที่ได้มาผ่านกระบวนการหมัก ด้วยจุลินทรีย์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae, Escherichia coli, Zymomonas mobilis* เพื่อให้ได้เอทานอล

เอทานอลจากกระบวนการหมักเป็นการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยเชื้อเชื้อจุลินทรีย์ (ยีสต์) ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรก ยีสต์จะใช้น้ำตาลเชิงเดี่ยว (Monosaccharide) เป็นอาหาร และเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยกระบวนการไกลโคไลซิส (Glycolysis) ในสภาวะที่ไม่ใช้ออกซิเจน ในปัจจุบันจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องและรู้จักกันดีในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมคือ ยีสต์พวก *Saccharomyces* sp. เช่น *S. cerevisiae, S. ellipsoideus, S. uvarum* ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ แต่เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น จึงเป็นยีสต์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักน้ำตาลกลูโคส Saccharomyces เป็นสายพันธุ์ที่ได้รับการคัดเลือกจนเป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรมการหมัก สามารถเจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสสูง มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ดี

การผลิตเอทานอลในประเทศไทยในปัจจุบันนั้นยังใช้เทคโนโลยีที่ซื้อมาจากต่างประเทศ ซึ่งรวมถึงยีสต์สายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิต แต่การใช้เทคโนโลยีและยีสต์ผลิตเอทานอลจากต่างประเทศยังประสบปัญหาเกี่ยวกับการถ่ายทอดเทคโนโลยี และการหมักในสภาพอากาศของประเทศไทย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพจุลินทรีย์นำเข้าจากต่างประเทศที่ใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลเทียบกับจุลินทรีย์ท้องถิ่น เพื่อลดต้นทุนและเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเอทานอล

7. วิธีดำเนินการ

วิธีดำเนินงาน

1. รวบรวมและคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่สามารถย่อยสลายหรือเปลี่ยนน้ำตาล Xylose เป็น alclhol

1.1 เก็บตัวอย่างเศษไม้ผุ ขี้อ้อย กากน้ำตาล ขี้ควายสดและผลไม้เน่าเสียต่างๆ นำมาบด ทำให้เจือจาง แล้วเลี้ยงบน Malt Extract Agar (MEA) ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

1.2 ย้ายโคโลนีของยีสต์ เลี้ยงบน Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD) เพื่อใช้ทดสอบและเก็บรักษาเชื้อต่อไป

1.3 คัดแยกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถใช้น้ำตาล Xylose โดยเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของยีสต์

Peptone : xylose = 3:3:5:10 กรัม ในน้ำ 1 ลิตร จำนวน 50 มล. เขย่าที่ความเร็ว 250 รอบ/นาที เป็นเวลา 3 วัน คัดเลือกเชื้อยีสต์ ที่เจริญบน Xylose medium โดยดูจากความขุ่น

1.4 จำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ โดยใช้วิธี อ่านลำดับพันธุกรรมของ rRNA อยู่ในระหว่างดำเนินการ

2. นำเข้ายีสต์ที่สามารถย่อยสลายหรือเปลี่ยนน้ำตาล Xylose เป็น alcohol

3. ศึกษาวิธีการผลิตเอ็นไซม์ย่อยน้ำตาล Xylose จากเชื่อยีสต์ที่นำเข้าและที่รวบรวมได้ เตรียมการเลี้ยงเชื้อ เพื่อผลิตเอ็นไซม์ ย่อยน้ำตาล Xylose ใน flask 500 มล. และ ใน fermenter ขนาด 5 ลิตร

- **ระยะเวลาที่ดำเนินการ** ปีที่เริ่มต้น 2557 ปีที่สิ้นสุด 2558 รวม 2 ปี

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

สามารถแยกเชื้อยีสต์ที่แตกต่างกันได้ 25 ไอโซเลต โคโลนีของยีสต์ 25 ไอโซเลต โดยเลี้ยงบน Yeast Extract Peptone Dextrose Medium (YPD) เพื่อใช้ทดสอบและเก็บรักษาเชื้อ คัดแยกเชื้อยีสต์ที่มี ความสามารถใช้น้ำตาล Xylose โดยเลี้ยงโคโลนีเดี่ยวของยีสต์ 25 ไอโซเลต บนอาหารเหลว Xylose medium จากนั้นคัดเลือกเชื้อยีสต์ ที่เจริญบนอาหาร Xylose medium โดยดูจากความขุ่น ได้ 6 ไอโซเลต และจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ 6 ไอโซเลต โดยใช้วิธี อ่านลำดับพันธุกรรมของ rRNA และนำเข้ายีสต์ที่สามารถย่อยสลายหรือเปลี่ยนน้ำตาล Xylose เป็น alcohol

ตาราง ข้อมูลการทดสอบการหมักแอลกอฮอล์ในอาหาร YPD18 และ การเจริญเติบโตของยีสต์ในน้ำตาล Xylose จำนวน 12 ตัวอย่าง

ไอโซเลท	No.	Genus	% แอลกอฮอล์		ค่าเฉลี่ย	ความสามารถใน	ความสามารถใน	การเจริญเติบโต
			ซ้ำ 1	ซ้ำ 2		การตกตะกอน	การเกิดฟอง	ในน้ำตาล Xylose
1	BO-Y4	*Candida tropicallis*	8.72	8.57	8.65	ดีมาก	ฟองเยอะมาก	**ดี**
2	LP-Y1	*Candida tropicallis*	9.72	9.57	9.65	ดีมาก	ฟองเยอะมาก	**ดี**
3	WM-Y1	*Candida tropicallis*	9.05	9.05	9.05	ดีมาก	ฟองมาก	**ดี**
4	PD-Y1	*Candida tropicallis*	9.05	8.72	8.89	ดีมาก	ฟองมาก	**ดี**
5	PD-Y3	*Candida tropicallis*	8.72	8.89	8.81	ปานกลาง	ฟองปานกลาง	**ดี**
6	PA-Y1	*Candida tropicallis*	9.40	8.89	9.15	ปานกลาง	ฟองเยอะมาก	**ดี**
7	PA-Y2	*Candida lusitaniae*	8.72	8.57	8.65	ปานกลาง	ปานกลาง	**ดี**
8	T-Y1	*Candida lusitaniae*	9.22	9.22	9.22	ดีมาก	ฟองเยอะมาก	**ดี**
9	LP-Y1F	*Hanseniaspora vineae*	8.89	9.05	8.97	ปานกลาง	ไม่มีฟอง	**ไม่ดี**
10	G-Y1	*Hanseniaspora lusitaniae*	6.25	6.12	6.19	ปานกลาง	ปานกลาง	**ไม่ดี**
11	SH-Y1	*Zygosaccharromyces bailii*	8.07	7.91	7.99	ดีมาก	ฟองปานกลาง	**ไม่ดี**
12	Lalvin EC1118	*Saccharomyces Cervisiae*	9.38	9.72	9.55	ปานกลาง	ฟองเยอะมาก	**ไม่ดี**

หมายเหตุ: คัดเลือกจากเชื้อยีสต์ที่ทดสอบการหมักแอลกอฮอล์สูงสุดในอาหาร YPD18 ทั้งหมด 28 ตัวอย่าง และนำมาทดสอบการเจริญเติบโตของยีสต์ในน้ำตาล Xylose

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

จากการทดลองสรุปผลได้ว่าการคัดเลือกเชื้อยีสต์มาทดสอบการเจริญเติบโตของยีสต์ในน้ำตาล Xylose เป็น alcohol เชื้อยีสต์ที่มีการเจริญเติบโตของยีสต์ในน้ำตาล Xylose ได้ดี คือไอโซเลท ที่1 ถึง 8 จากเชื้อทั้งหมดของ 12 ไอโซเลท ซึ่งเป็น Genus *Candida tropicallis* และ *Candida lusitaniae*

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : ให้ระบุผลงานที่สิ้นสุด ได้นำไปใช้ประโยชน์อย่างไร พัฒนาต่อหรือถ่ายทอด หรือเผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์กับกลุ่มเป้าหมาย (ระบุเป็นข้อๆ)

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี) : อาจมีหรือไม่มีก็ได้ เป็นการแสดงความขอบคุณแก่ผู้ช่วยเหลือให้งานวิจัยลุล่วงไปด้วยดี แต่มิได้เป็นผู้ร่วมปฏิบัติงานด้วย

12. เอกสารอ้างอิง : เป็นส่วนที่จำเป็นต้องระบุ ถ้าได้มีการอ้างอิง ค้นคว้า เปรียบเทียบ หรือใช้เป็นแนวทางผลงานของผู้อื่นประกอบในการดำเนินงาน

13. ภาคผนวก **:** เป็นส่วนที่ให้รายละเอียดเพิ่มเติม ซึ่งไม่จำเป็นต้องแสดงไว้ในเนื้อหาของรายงาน เช่น สูตร วิธีคำนวณ ตารางการบันทึกข้อมูลภาพ แสดงเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย แบบสำรวจข้อมูล เป็นต้น ส่วนนี้จะมีหรือไม่มีก็ไม่ทำให้เนื้อหาของรายงานขาดความสมบูรณ์

หมายเหตุ

รูปแบบ :

- หัวเรื่องข้อ 1-13 : ตัวอักษร TH SarabunPSK ขนาด 16 Point ตัวหนา
- เนื้อหา : ตัวอักษร TH SarabunPSK ขนาด 16 Point ตัวธรรมดา
- Page Setup : ด้านบน 2.5 ซม. ด้านซ้าย 2.5 ซม. ด้านขวา 2 ซม. ด้านล่าง 2.5 ซม.
- ขนาด A4 โดยใช้ Program Microsoft Word

* ให้แนบไฟล์รูปภาพประกอบด้วย เพื่อนำไปจัดทำรูปเล่มต่อไป