รายงานการวิจัย
มหาวิทยาลัยแม่โจ้

เรื่อง การกำจัดสีในน้ำกากส่าโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม WHITE-ROT FUNGI และเชื้อยีสต์

DECOLORIZATION OF MOLASSES WASTEWATER USING CONSORTIA OF WHITE-ROT FUNGI AND YEAST

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2551

จำนวน 124,500 บาท

หัวหน้าโครงการ นายฐปน ชื่นบาล

ผู้ร่วมโครงการ นางศิราภรณ์ ชื่นบาล

นายปิยะบุตร โพธิคามบำรุง

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

25 / 2 / 2552

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้ให้การสนับสนุนงบประมาณการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2551 และขอบคุณเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัย รวมทั้งทุกท่านที่มีส่วนในการสนับสนุนงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

คณะผู้วิจัย

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	1
คำนำ	6
วัตถุประสงค์	7
การตรวจเอกสาร	8
ยีสต์	8
ราขาว	39
ความสัมพันธ์ระหว่างยีสต์กับฟังไจ	45
ลักษณะทั่วไปของน้ำกากส่า	45
สีน้ำตาลเข้มของน้ำกากส่า	48
แหล่งที่มาของน้ำกากส่า	52
การแก้ไขปัญหาน้ำกากส่า	53
การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์	56
อุปกรณ์และวิธีการ	60
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	71
สรุปผลการทดลอง	107
เอกสารอ้างอิง	109

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สารเคมีพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับยีสต์	33
2	คุณลักษณะของน้ำกากส่า	46
3	องค์ประกอบของน้ำกากส่าที่ทำให้แห้งแล้ว	47
4	การวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำกากส่า	71
5	เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ	72
6	การเกิดวงใส (Clear Zone) เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ในอาหารแข็งสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์	76
7	ประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ในการลดความเข้มสีในอาหารเหลวสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์มาตรฐาน TISTR5690	79

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	รูปร่างของเซลล์ยีสต์แบบต่าง ๆ	11
2	ลักษณะโคโลนีของยีสต์แบบต่าง ๆ	13
3	ยีสต์ที่เจริญเป็นแผ่นบริเวณผิวหน้าอาหารถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	14
4	โครงสร้างของเซลล์ยีสต์	15
5	การเกิดเอนโดไซโทซิสของเซลล์ยีสต์ และเอกโซไซโทซิสของเซลล์ยีสต์ ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	16
6	โครงสร้างผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*	18
7	รอยแผลที่เรียกว่าบัดสการ์บนเซลล์แม่บริเวณที่เกิดการแตกหน่อของยีสต์	18
8	สปอร์ของยีสต์ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)	19
9	แคปซูลของยีสต์	20
10	นิวเคลียสของยีสต์ในขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสระยะ G2 (G2 Phase)	21
11	พลาสมิดวงแหวน 2 ไมโครเมตร ที่พบในยีสต์	22
12	ลักษณะของนิวคลีโอโซมของยูแคริโอตที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอของพลาสมิดพันล้อมรอบแกนที่เป็นโปรตีนฮิสโตน	23
13	แวคิวโอลที่พบในเซลล์ยีสต์	24
14	ส่วนประกอบของไมโทคอนเดรียของยีสต์	25
15	ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ กำลังแตกหน่อ	27
16	การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เนื่องจากการสูญเสียน้ำ ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	29
17	การเกิดไดเมอร์ของไพริมิดีนในดีเอ็นเอ เนื่องจากได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต	30
18	ตัวอย่างยีสต์ที่ทนเค็มได้ดี ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	37
19	แผนผังการเกิดปฏิกิริยาของ Maillard Reaction	50
20	A Possible Repeating Unit of Melanoidin	51

ภาพที่		หน้า
21	กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล	71
22	การเกิดวงใส (Clear Zone) ของเชื้อยีสต์ NG-06 ในอาหารแข็งสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์	77
23	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีของเชื้อยีสต์แต่ละไอโซเลตในอาหารเหลวสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์	80
24	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีในอาหารเหลวสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ในวันที่ 5 ของการทดลอง	81
25	ลักษณะของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* TISTR5690 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	81
26	ลักษณะของเชื้อยีสต์ NG-06 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า	82
27	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเชื้อยีสต์ NG-06	83
28	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลฟรุกโตสร้อยละ 2.5 โดยเชื้อยีสต์ NG-06	83
29	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเชื้อยีสต์ NG-06	84
30	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มี Yeast Extract ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเชื้อยีสต์ NG-06	86
31	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มี Yeast Extract ร้อยละ 0.1 โดยเชื้อยีสต์ NG-06	86
32	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มี Peptone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเชื้อยีสต์ NG-06	87
33	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีค่า pH เริ่มต้นที่ระดับต่าง ๆ โดยเชื้อยีสต์ NG-06	88
34	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมโดยเชื้อยีสต์ NG-06	89
35	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ระดับต่าง ๆ ของเชื้อยีสต์ NG-06	90

ภาพที่		หน้า
36	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ NG-06	91
37	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์โดยเชื้อยีสต์ NG-06 ในสภาวะที่เหมาะสม	92
38	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์โดยเชื้อยีสต์ NG-06 ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง	92
39	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์โดยเชื้อยีสต์ NG-06 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง	93
40	ลักษณะของเชื้อราขาว PKM 3 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งสูตร PDA	95
41	ลักษณะของเชื้อราขาว PKM 3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า	95
42	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าด้วยเชื้อราขาว PKM 3	96
43	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นเติม PDB ด้วยเชื้อราขาว PKM 3 ในวันที่ 10 ของการทดลอง	97
44	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักเติม PDB ด้วยเชื้อราขาว PKM 3 ในวันที่ 10 ของการทดลอง	97
45	ประสิทธิภาพการลดค่า COD ของน้ำกากส่าที่ผ่านการลดความเข้มสีด้วยเชื้อราขาว PKM 3	98
46	สภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำกากส่าที่ผ่านการลดความเข้มสีด้วยเชื้อราขาว PKM 3	99
47	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วด้วยเชื้อยีสต์ NG-06	101
48	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าจากหอกลั่นเติม PDB ที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วเติมสารอาหารด้วยเชื้อยีสต์ NG-06 ในวันที่ 4 ของการทดลอง	102
49	ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าจากบ่อหมักเติม PDB ที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วเติมสารอาหารด้วยเชื้อยีสต์ NG-06 ในวันที่ 6 ของการทดลอง	102
50	ประสิทธิภาพการลดค่า COD ของน้ำกากส่าที่ผ่านการลดความเข้มสีโดยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วด้วยเชื้อยีสต์ NG-06	103

ภาพที่		หน้า
51	สภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำกากส่าที่ผ่านการลดความเข้มสีโดยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วด้วยเชื้อยีสต์ NG-06	104
52	ประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นด้วยการใช้เชื้อราขาว PKM 3 และเชื้อยีสต์ NG-06 ร่วมกัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม	105
53	ประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักด้วยการใช้เชื้อราขาว PKM 3 และเชื้อยีสต์ NG-06 ร่วมกัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม	106

การกำจัดสีในน้ำกากส่าโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม WHITE-ROT FUNGI และเชื้อยีสต์

DECOLORIZATION OF MOLASSES WASTEWATER USING CONSORTIA OF WHITE-ROT FUNGI AND YEAST

ฐปน ชื่นบาล[1] ศิราภรณ์ ชื่นบาล[1] ปิยะบุตร โพธิคามบำรุง[2]

TAPANA CHEUNBARN[1] SIRAPORN CHEUNBARN[1] PIYABOOT PHOTIKARMBUMRUNG[2]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

[2]มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ แพร่

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าโดยใช้เชื้อราขาวและเชื้อยีสต์ร่วมกัน ในการลดความเข้มสีของน้ำกากส่าที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ การคัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างผลไม้เน่า ผลไม้ดอง น้ำกากส่า และดินบริเวณโรงงานสุรา จำนวน 24 ตัวอย่าง ได้เชื้อยีสต์ จำนวน 136 ไอโซเลต จากนั้นคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสีน้ำกากส่าโดยทดสอบความสามารถในการลดความเข้มของสีในอาหารแข็งสูตร MYGP ที่มีสีน้ำกากส่าสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบ พบว่า เชื้อยีสต์จำนวน 19 ไอโซเลต ทำให้สีของอาหารแข็งลดลง และเมื่อทดสอบความสามารถในอาหารเหลวสูตร MYGP ที่มีสีน้ำกากส่าสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบ พบว่า เชื้อยีสต์ไอโซเลต NG-06 ซึ่งแยกได้จากเงาะ สามารถลดความเข้มสีได้สูงที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 19.15 ในวันที่ 5 ของการทดลอง

ใกล้เคียงกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* TISTR5690 ซึ่งสามารถลดความเข้มสีได้เท่ากับ ร้อยละ 19.79 ในวันเดียวกันของการทดลอง

เมื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าสังเคราะห์ ของเชื้อยีสต์ไอโซเลต NG-06 ได้แก่ แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และปริมาณเชื้อเริ่มต้น พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มสี คือ สภาวะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสร้อยละ 2.5 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.8 และปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 โดยภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ส่งผลให้เชื้อยีสต์ไอโซเลต NG-06 สามารถลดความเข้มสีได้ร้อยละ 21.56

เมื่อนำเชื้อราขาว PKM 3 และเชื้อยีสต์ NG-06 มาศึกษาประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีร่วมกันในน้ำกากส่าของโรงงานสุรา จังหวัดเชียงใหม่ ที่ออกจากหอกลั่น และที่ออกจากบ่อหมัก ด้วยการใช้เชื้อราขาว PKM 3 บำบัดในขั้นตอนแรก โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ได้แก่ น้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นชุดที่เติมอาหาร PDB และชุดที่ไม่เติมอาหาร PDB น้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักชุดที่เติมอาหาร PDB และชุดที่ไม่เติมอาหาร PDB พบว่า เชื้อราขาว PKM 3 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดความเข้มสี การลดค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นที่เติมอาหาร PDB ได้ร้อยละ 46.44 และ 37.18 ตามลำดับ ในวันที่ 10 ของการทดลอง

เมื่อนำน้ำกากส่าของโรงงานสุราที่ผ่านการลดความเข้มสีด้วยเชื้อราขาว PKM 3 แล้ว มาศึกษาประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีต่อด้วยเชื้อยีสต์ NG-06 โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ได้แก่น้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นที่เติมอาหาร PDB ชุดที่เติมอาหารของยีสต์ และชุดที่ไม่เติมอาหารของยีสต์ น้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักที่เติมอาหาร PDB ชุดที่เติมอาหารของยีสต์ และชุดที่ไม่เติมอาหารของยีสต์ พบว่า เชื้อยีสต์ NG-06 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดความเข้มสี การลดค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นที่เติมอาหาร PDB ที่เติมอาหารของยีสต์ได้ร้อยละ 33.87 และ 35.26 ตามลำดับ ในวันที่ 4 ของการทดลอง

เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพรวมในการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าของโรงงานสุราด้วยการใช้เชื้อราขาว PKM 3 และเชื้อยีสต์ NG-06 แล้ว พบว่า มีประสิทธิภาพในการลดความเข้มสี การลด

ค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นที่เติมอาหาร PDB ที่เติมอาหารของยีสต์ได้ร้อยละ 64.00 และ 37.23 ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มสี การลดค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักที่เติมอาหาร PDB ที่เติมอาหารของยีสต์ได้ร้อยละ 49.99 และ 31.47 ตามลำดับ

ABSTRACT

This research is a study on the efficiency of both white rot fungi and yeast in the decolorization of molasses wastewater. Molasses is one of the raw materials in alcohol production. From 20 samples of rotting fruits, fermented fruits, molasses and soil collected near the alcohol factory, 136 microbial isolates were obtained from which 136 yeast isolates were found capable of decolorizing molasses wastewater. These were cultured further using selective solid media MYGP with synthetic colored molasses wastewater that resulted to 19 yeast isolates efficient in decolorizing molasses wastewater. The efficiency of the 19 yeast isolates were tested by culturing them in liquefied MYGP media with synthetic colored molasses wastewater that resulted to one yeast isolate NG-06 from a rambutan fruit that has 19.50% efficiency in decolorizing molasses wastewater at day 5 incubation which is comparable to yeast strain *Issatchenkia orientalis* TISTR5690 which has 19.79% efficiency in decolorizing molasses wastewater at day 5 incubation.

When a study was conducted determining the suitable conditions of a medium in testing the efficiency of yeast isolate NG-06 in decolorizing synthetic molasses wastewater the following factors: carbon source, nitrogen source, pH value, and initial amount of microorganisms were attained. It was found that with the suitable conditions as follows: 2.5% fructose, 0.1% yeast extract, 4.8 ph value, and 4% initial amount of microorganisms, the NG-06 yeast isolate could efficiently decolorize molasses wastewater at 21.56%.

The efficiency of both white-rot fungi PKM 3 and yeast isolate NG-06 in decolorizing molasses wastewater obtained from the alcohol factory in Chiang Mai province or from the distillation tower and fermentation pool were tested. By using four media as follows: 1) molasses wastewater from distillation tower with PDB food ingredient, 2) medium 1 without PDB food ingredient, 3) molasses wastewater from fermentation pool with PDB food ingredient, and 4) medium 3 without PDB food ingredient, results showed that the white-rot fungi PKM 3 cultured in molasses from distillation tower with added PDB food ingredient has highest efficiency at 46.44% in decolorizing and 37.18 % in decreasing COD value in day 10 incubation.

Molasses wastewater from the alcohol factory that was already decolorized using white-rot fungi PKM 3 was further tested by using yeast isolate NG-06 in four media as follows: 1) molasses wastewater from distillation tower with PDB and yeast food ingredient, 2) medium 1 without yeast food ingredient, 3) molasses wastewater from fermentation pool with PDB and yeast food ingredient, and 4) medium 3 without yeast food ingredient. Results showed that yeast isolate NG-06 cultured in molasses wastewater from distillation tower with PDB and yeast food ingredient has highest efficiency of 33.87% in decolorizing molasses and 35.26% in decreasing COD value at day 4 incubation.

The analyses of the overall efficiency in decolorizing wastewater from the alcohol factory by using both white-rot fungi PKM 3 and NG-06 showed that the efficiency of both microbial isolates have 64.00% efficiency in decolorizing molasses wastewater from distillation tower added with PDB and yeast food ingredients and 37.23% efficiency in decreasing COD value. Furthermore, both white-rot fungi PKM 3 and yeast isolate NG-06 showed 49.99% efficiency in decolorizing molasses wastewater

from the fermentation pool added with PDB and yeast food ingredients and 31.47% efficiency in decreasing COD value.

คำนำ

ปัจจุบันแนวโน้มของการขยายตัวของโรงงานสุราและโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ได้เพิ่มสูงขึ้น เนื่องจากกฎหมายเปิดเสรีการผลิตสุรา และนโยบายการใช้พลังทดแทนเพื่อใช้แทนพลังงานที่ได้จากน้ำมันของรัฐบาล ซึ่งการผลิตสุราและแอลกอฮอล์นั้นจะใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิต และมีน้ำกากส่าเป็นของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิต โดยน้ำกากส่านี้ มีค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 4.1–4.7 อุณหภูมิสูง >40 $^{\circ}$C ค่า COD 90,000 – 130,000 มิลลิกรัม / ลิตร ค่า BOD 29,000 – 45,000 มิลลิกรัม / ลิตร และนอกจากนี้ยังมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำเป็นที่น่ารังเกียจและกำจัดได้ยาก ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนของการกลั่นแยกเอาสุราหรือแอลกอฮอล์ออกจากน้ำหมักของเครื่องกลั่นสุราหรือแอลกอฮอล์ ถึงแม้ว่าจะไม่มีมาตรฐานกำหนดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่แน่นอน แต่น้ำทิ้งจากโรงงานสุราหรือน้ำกากส่าเมื่อปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมแล้วทำให้สีของแหล่งน้ำที่รองรับมีค่าความสกปรกเพิ่มขึ้นและมีสีเข้มขึ้น สีน้ำตาลเข้มส่วนใหญ่เป็นสารพวกเมลานอยดิน ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากการรวมตัวกันระหว่างน้ำตาลกับกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ ใน Hudson (1992) อุณหภูมิที่สูง โดยผ่านกระบวนการ browning reaction หรือ maillaird reaction โดยสารเมลานอยดินนี้เป็นสารที่ถูกย่อยสลายได้ยากทางชีวภาพ ดังนั้นในประเทศไทยจึงได้นำไปใช้ประโยชน์ด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์หรือผลิตปุ๋ยอินทรีย์ แต่ต้องใช้งบประมาณในการลงทุนสูง จึงไม่เหมาะกับโรงงานที่มีขนาดเล็ก การทำบ่อกักเก็บและลานตาก ต้องใช้พื้นที่ในการจัดการมาก การลาดถนนลูกรังเพื่อลดปริมาณฝุ่น ต้องเสียค่าใช้จ่ายในด้านการขนส่งและแรงงานเพิ่ม และวิธีทางการเกษตร เช่น การทำปุ๋ยหมัก ส่งผลให้เกิดการเสื่อมคุณภาพของดินถ้ามีการนำไปใช้ในไร่นาโดยตรง ซึ่งวิธีการเหล่านี้ถึงแม้จะช่วยลดปริมาณน้ำกากส่าที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตได้ แต่ก็ยังเป็นวิธีการที่ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในสภาพปัจจุบันที่มีปริมาณน้ำกากส่าเพิ่มขึ้น และยังมีข้อจำกัดของแต่ละวิธีการตามที่ได้กล่าวมาแล้วอีกด้วย ส่วนเทคโนโลยีที่นำมาใช้ในการบำบัดน้ำกากส่าด้วยวิธีการทางชีวภาพ เช่น การใช้ระบบตะกอนเร่ง ระบบบ่อผึ่ง ที่ใช้กันอยู่ตามโรงงานสุราขนาดใหญ่ จะมีประสิทธิภาพสูงในการลดค่า COD และ BOD ให้อยู่ในระดับที่ไม่เป็นปัญหาต่อสิ่งแวดล้อม แต่ก็ยังไม่สามารถลดความเข้มสีของน้ำกากส่าที่เกิดขึ้นได้

จากงานวิจัยที่ผ่านมา มีการค้นพบเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถลดความเข้มสีของน้ำกากส่าได้ ซึ่งมีทั้งเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ รวมทั้งยังมีการพัฒนาหาสภาวะและระบบที่เหมาะสมในการนำเชื้อจุลินทรีย์ดังกล่าวไปใช้ในการกำจัดสีของน้ำกากสา แต่ยังไม่มีการพัฒนาหาสภาวะและระบบที่เหมาะสมในการที่จะนำเชื้อจุลินทรีย์มากกว่า 1 ชนิดมาใช้ในการกำจัดสีของน้ำกากส่าร่วมกัน และยังไม่มีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดที่สามารถกำจัดสีน้ำกากส่าได้ทั้งหมด จึงคาดว่าน่าจะมีวิธีการในการนำเชื้อผสมระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม white-rot fungi และเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสีของน้ำกากส่ามาศึกษาหาสภาวะ และระบบที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าร่วมกัน เนื่องจากเชื้อทั้ง 2 กลุ่มมีค่าความสามารถในการกำจัดสีของน้ำกากส่าสูง (% decolorization) และถือเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการลดความเข้มสีของน้ำกากสาซึ่งเป็นของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตของโรงงานสุราที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิต ซึ่งจัดได้ว่าเป็นการจัดการและแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อมของประเทศในอีกทางหนึ่ง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาสภาวะต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าของเชื้อผสมระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม white-rot fungi และเชื้อยีสต์
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีของน้ำกากส่าของเชื้อผสมระหว่างเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม white-rot fungi และเชื้อยีสต์

การตรวจเอกสาร

ยีสต์ (yeast)

จัดเป็นสิ่งมีชีวิตพวกยูแคริโอต (eukaryotes) เซลล์เดียว ที่มีความน่าสนใจเป็นพิเศษ มีความสำคัญทั้งในด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ยีสต์ได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายอย่าง เช่น การผลิตอาหาร เครื่องดื่ม ยารักษาโรค ตลอดจนนำมาใช้ในทางการแพทย์หลายด้าน ในขณะเดียวกันยีสต์หลายชนิดก่อให้เกิดโรคในมนุษย์ ปัจจุบันมีการศึกษาสรีรวิทยาของเซลล์ยีสต์ (yeast cell physiology) เพื่อนำมาพัฒนาความรู้ทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ (biotechnology) พันธุวิศวกรรม (genetic engineering) และชีววิทยาระดับโมเลกุล (molecular biology) ตัวอย่างเช่น ศึกษาการเติบโต (growth) การเจริญ (development) เมแทบอลิซึม (metabolism) เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ให้เหมาะสมสำหรับนำมาใช้ในทางอุตสาหกรรม ทำให้ได้ผลผลิตที่มีคุณภาพ และได้ปริมาณสูง

ส่วนประกอบของเซลล์ยีสต์

1. **แมโครโมเลกุลของยีสต์ที่ประกอบกันเป็นชีวมวล** แมโครโมเลกุลในยีสต์ที่ต่างสปีชีส์กันจะแตกต่างกัน และยังเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาของการเจริญเติบโตของเซลล์ ยีสต์แมโครโลกุลที่สำคัญที่มารวมกันเป็นชีวมวลในโครงสร้างของเซลล์ ประกอบด้วยโปรตีน โพลีแซคคาไรด์ ลิพิด (lipid) และกรดนิวคลีอิก (nucleic acid)

1.1 **โปรตีน** ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนโครงสร้าง ได้แก่ แอคติน (actin) และทิวบูลิน (tubulin) ของไซโทสเกเลตัน (cytoskeleton) ฮิสโตน (histone) และเมมเบรน (membrane) นอกจากนี้โปรตีนยังเป็นส่วนประกอบของไรโบโซมอลโปรตีน (ribosomal protein) ฟีโรโมน (pheromone) และเอนไซม์ต่าง ๆ โปรตีนอาจอยู่รวมกับสารอื่น ตัวอย่างเช่น ไกลโคโปรตีน (glycoprotein) พบในโปรตีนโครงสร้าง เช่นที่พบในแมนโนโปรตีน (mannoprotein) ของผนังเซลล์ และเอนไซม์บางชนิด เช่นเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

1.2 **โพลีแซคคาไรด์** พบในผนังเซลล์ ได้แก่ กลูแคน (glucan) แมนแนน (mannan) และไคติน (chitin) พบในอาหารสะสมที่เป็นไกลโคเจน และทีฮาโลส (trehalose)

1.3 **โพลีฟอสเฟต** (polyphosphate) ส่วนใหญ่สะสมอยู่ในแวคิวโอล (vacuole) ของยีสต์

1.4 **ลิพิด** ส่วนใหญ่เป็นฟอสโฟลิพิด (phospholipid) พบตามเมมเบรนหรือสะสมในรูปสเทอรอล (sterol) เอสเทอร์ (ester) และไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) นอกจากนี้ยังอยู่ในรูปกรดไขมัน และฟอสโฟกลีเซอไรด์ (phosphoglyceride)

1.5 **กรดนิวคลีอิก** ได้แก่ ดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ กรดนิวคลิอิกที่เป็นดีเอ็นเอประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์ หรือเป็นส่วนใหญ่พบในจีโนมิกดีเอ็นเอ (genomic DNA) ที่อยู่บนโครโมโซม ส่วนอีก 0 – 20 เปอร์เซ็นต์ พบในจีโนมิกดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial Genomic DNA) และ 1 – 5 เปอร์เซ็นต์ พบในพลาสมิด (plasmid หรือ extrachromosomal DNA) ส่วนอาร์เอ็นเอพบในไรโบโซมอลอาร์เอ็นเอ (ribosomal RNA, rRNA) ประมาณ 80 เปอร์เซ็นต์และพบเมสเซนเจอร์อาร์เอ็นเอ (messenger RNA, mRNA) ที่อยู่ในไซโทพลาซึม 5 เปอร์เซ็นต์ส่วนที่เหลือพบในพลาสมิด ไมโทนเดรีย และร่างแหเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัมอย่างหยาบ (rough endoplamic reticulum, rough ER)

ขนาดของเซลล์ยีสต์

ขนาดของยีสต์มีแตกต่างกันตั้งแต่ความยาว 2-3 µm ไปจนถึง 20-50 µm ความกว้างประมาณ 1-10 µm ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* มีรูปร่างรีหรือรูปไข่ (ellipsoidal หรือ ovoid) เซลล์ขนาดเล็กมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 µm หรือในเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นมามีขนาด 5-10 µm ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่ใช้ผลิตแอลกอฮอล์ มักมีขนาดเซลล์ใหญ่กว่ายีสต์สายพันธุ์เดียวกันที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างเช่น ยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์จำพวกเอล (ale) สายพันธุ์ NCYC 1006 มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 13.4 µm ขนาดของเซลล์ยีสต์ยังอาจเพิ่มขึ้นตามอายุของเซลล์

รูปร่างของเซลล์ยีสต์

ยีสต์แต่ละสปีชีส์มีลักษณะแตกต่างกันทั้งด้าน ขนาด รูปร่างและสีของเซลล์ บางครั้งอาจพบยีสต์สปีชีส์เดียวกันมีความแตกต่างกันทั้งด้านสัณฐานวิทยา และสีของเซลล์ อาจเกิดจากสภาพแวดล้อมทางด้านเคมีและฟิสิกส์ เซลล์ยีสต์บางชนิดอาจมีรูปร่างได้หลายรูปแบบ (cell types) เช่น *Saccharomyces cerevisiae* มีรูปร่างแบบ a, x และ a/x รูปแบบที่เป็น a และ x จะเป็นแฮพลอยด์ (haploid) พบในขณะที่ยีสต์มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ทำให้เกิดกรรวม

นิวเคลียสได้เซล์ที่มีรูปแบบเป็น a/x ที่เป็นดิพลอยด์ (diploid) โดยทั่วไปรูปร่างของเซลล์ยีสต์แบ่งออกได้ดังนี้ (ภาพ 1)

1.1 รูปร่างรี หรือรูปไข่ ได้แก่ *Saccharomyces* sp.

1.2 รูปร่างทรงกระบอกที่มีปลายมน (cylindral with hemi-spherical ends) ตัวอย่างเช่น *Schizosaccharomyces*

1.3 รูปร่างแบบกลม ปลายมีลักษณะนูนคล้ายผลมะนาว (apiculate/lemon-shaped) ตัวอย่างเช่น *Hanseniaspora* และ *Saccharomycodes sp.*

1.4 รูปร่างยาว ปลายมนด้านหนึ่ง ส่วนอีกด้านหนึ่งปลายแหลมคล้ายดินสอ (ogival) ตัวอย่างเช่น *Dekkera* และ *Brettanomyces*

1.5 รูปร่างแบบชมพู่ (flask-shaped) เช่น *Pityrosporum sp.*

1.6 รูปร่างแบบสามเหลี่ยม (triangular) เช่น *Trigonopsis sp.*

1.7 รูปร่างโค้ง (curved) เช่น *Cryptococcus cereanus*

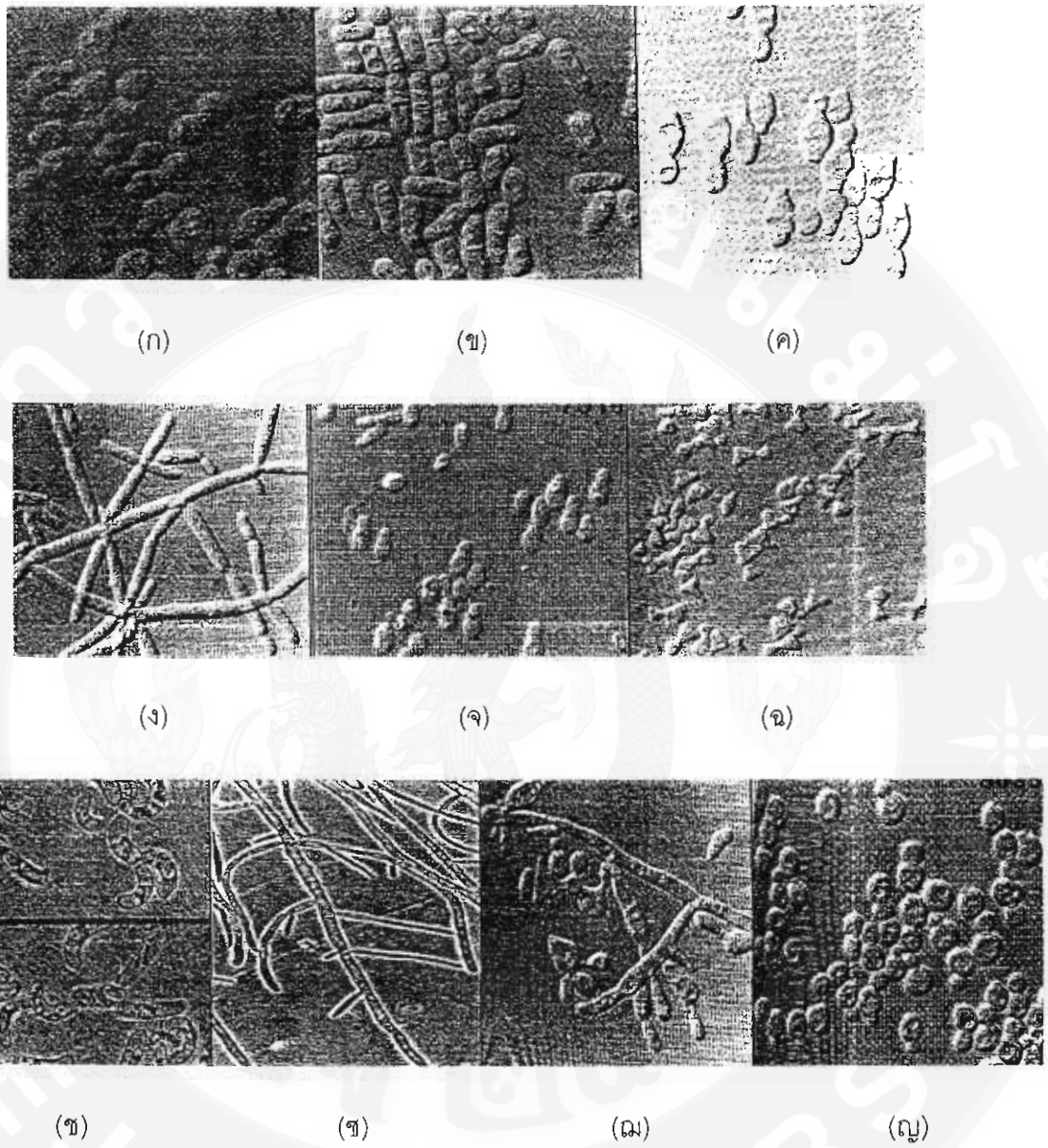
1.8 รูปร่างเป็นเส้น เรียกว่าแบบฟิลาเมนทัส (filamentous) มีไฮฟาที่มีการผนังกั้นแบ่งเป็นห้อง (septate hypha) และซูโดไฮฟา (pseudohypha) เช่น *Candida albicans* และ *Yarrowia lipolytica*

1.9 เซลล์มีก้านยื่นออกมา เช่น *Sterigmatomyces sp.*

1.10 รูปร่างกลม (spherical) เช่น *Debaryomyces sp.*

1.11 รูปร่างยืดยาวออกไป (elongated) ยีสต์หลายชนิด ในขณะที่อยู่ในระยะการเจริญ

ในสภาพแวดล้อมต่าง ๆ กัน เซลล์ปกติ หรือ เวเจเททีฟเซลล์ (vegetative cell) จะมีการเปลี่ยนสภาพ หรือ ดิฟเฟอเรนทิเอชัน (differentiation) ทำให้มีรูปร่างแบบฟิลาเมนทัส มีการสร้างหลอดสปอร์ หรือ เยิร์มทิวบ์ (germ tubes) ซูโดไฮฟา และไฮฟา จึงดูมีรูปร่างหลายแบบ



ภาพ 1 รูปร่างของเซลล์ยีสต์แบบต่าง ๆ (ก) รูปร่างแบบไข่ของ *S. cerevisiae* (ข) ทรงกระบอกของ *Schizosaccharomyces sp.* (ค) คล้ายผลมะนาวของ *Hanseniaspora sp.* (ง) คล้ายดินสอของ Dekkera (จ) แบบชมพู่ *Pityrosporum sp.* (ฉ) แบบสามเหลี่ยมของ *Trigonopsis sp.* (ช) โค้งงอของ *Cryptococcus cereanus* (ซ) ฟิลาเมนทัสของ *Yarrowia sp.* (ฌ) เซลล์มีก้านของ Sterigmatomyces sp. (ญ) รูปร่างกลมของ *Debaryomyces sp.*

ที่มา : Barnett *et.al.* (2002)

สีของเซลล์ยีสต์

ยีสต์หลายชนิดมีรงควัตถุซึ่งอาจปรากฏให้เห็นในโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหาร เช่น

1. สีครีม พบในยีสต์หลายชนิด รวมทั้ง *S.cerevisiae*

2. สีขาว ตัวอย่างเช่น *Geotrichum sp.* และในมิวแทนท์ (mutant) ของ Phaecoccomyces sp. ที่มีลักษณะเป็นอัลบิโน (albino) หรือสีเผือก

3. สีดำ เช่น *Phaecoccomyces sp.* และ *Aureobasidium pullulans*

4. สีชมพู เช่น *Phaffia sp.* และ *Oosporidium sp.*

5. สีแดง เช่น *Rhodotorula sp.* และมิวแทนท์ของ *S. cerevisian* ที่ต้องการอะดีนีน (adenine) ในการเจริญ

6. สีส้ม เช่น *Rhodosporidium sp.*

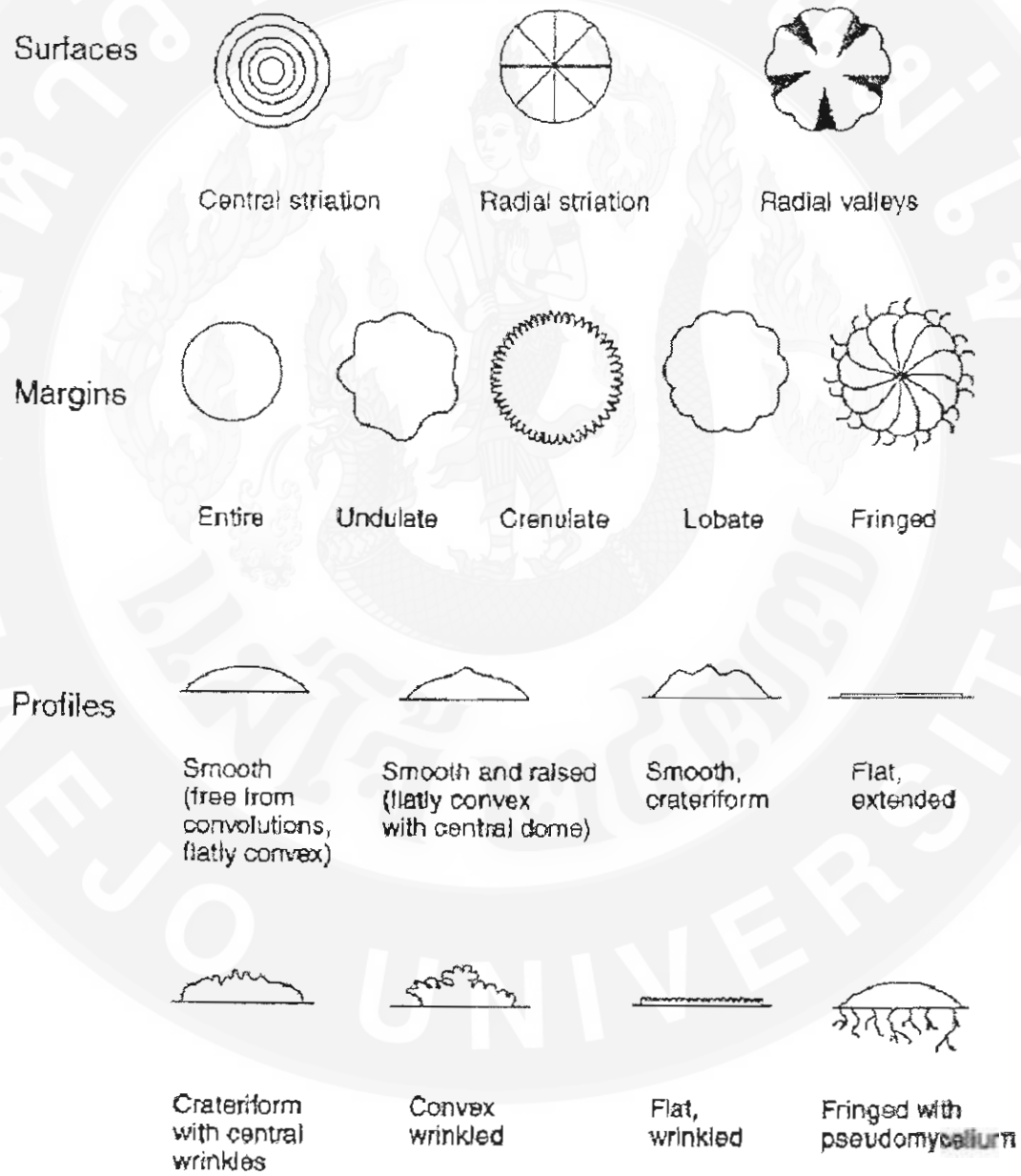
7. สีเหลือง เช่น *Cryptococcus laurentii* และ *Bullera sp.*

ยีสต์ที่มีรงควัตถุหลายชนิด สามารถนำมาใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ ได้ เช่น *Phaffia rhodozyma* มีรงควัตถุสีแดงเรียกว่าแอสทาซานทิน (astaxanthin; 3,3'-dihydroxy-B,B-Carotene-4,4'-dione) ใช้ทำสีผสมอาหารเลี้ยงปลาแซลมอนแทนการใช้สีสังเคราะห์ นอกจากนี้ รงควัตถุจากยีสต์สายพันธุ์ *Phaffia rhodozyma* นี้ยังนำมาทำอาหารสัตว์คล้ายกับ กากน้ำตาล หรือ มอลลาส (molasses) ได้อีกด้วย

ลักษณะโคโลนีของยีสต์

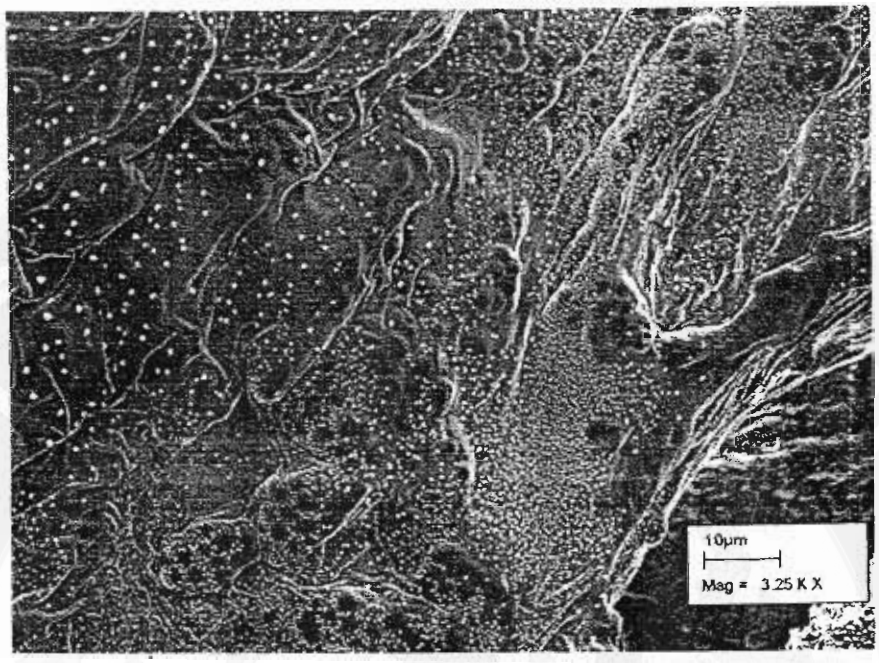
คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา และจลนพลศาสตร์ (kinetics) ของโคโลนียีสต์ที่ปรากฏบนอาหารวุ้น เป็นสิ่งแรกที่นำมาพิจารณาในการนำยีสต์มาใช้ในทางเทคโนโลยชีวภาพ ทั้งด้าน อุตสาหกรรมการหมัก และในทางการแพทย์ เช่น การสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนี ไม่ว่าจะเป็นสี ขนาด ลักษณะขอบโคโลนี การยกนูนขึ้นของโคโลนี ความมันวาวหรือความด้าน การเกิดเมือก การแผ่กระจายของโคโลนี เป็นต้น (ภาพ 2) ส่วนเซลล์ที่เจริญเป็นโคโลนีดังกล่าวจะมีหลายลักษณะ ขึ้นอยู่กับอายุของเซลล์ จลนพลศาสตร์ของการเติบโต และเมแทบอลิซึม ตัวอย่างเช่น *S. cerevisiae* และ *K. marxianus* ที่เจริญในอาหารเหลวจะพบในลักษณะเซลล์ที่กำลังแตกหน่อ แต่ถ้าเจริญบนอาหารวุ้น จะพบว่ามีการสร้างซูโดมัยซีเลียม (pseudomycelium) คาดกันว่า ใช้สำหรับแทงเข้าสู่เนื้อวุ้นเพื่อการเติบโตของเซลล์

ในบางครั้งโคโลนีของยีสต์อาจพบในลักษณะเป็นแผ่นฝ้าเจริญบริเวณผิวหน้าอาหาร เรียกว่าไบโอฟิล์ม (biofilm) (ภาพ 3) หรือเจริญเป็นกระจุกเกาะติดผิวสัมผัสต่าง ๆ เช่น เกาะตามขอบของ ถังหมัก หรือพลาสติกที่ใช้เป็นแกนในถังหมัก หรือลอยเป็นฟองอยู่ด้านบนของถังหมักที่ใช้ในการผลิตเบียร์



ภาพ 2 ลักษณะโคโลนีของยีสต์แบบต่าง ๆ

ที่มา : Walker (1998)



ภาพ 3 ยีสต์ที่เจริญเป็นแผ่นบริเวณผิวหน้าอาหารถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

ที่มา : http://academic.sun.ac.za/saf/units/xre/xre.html

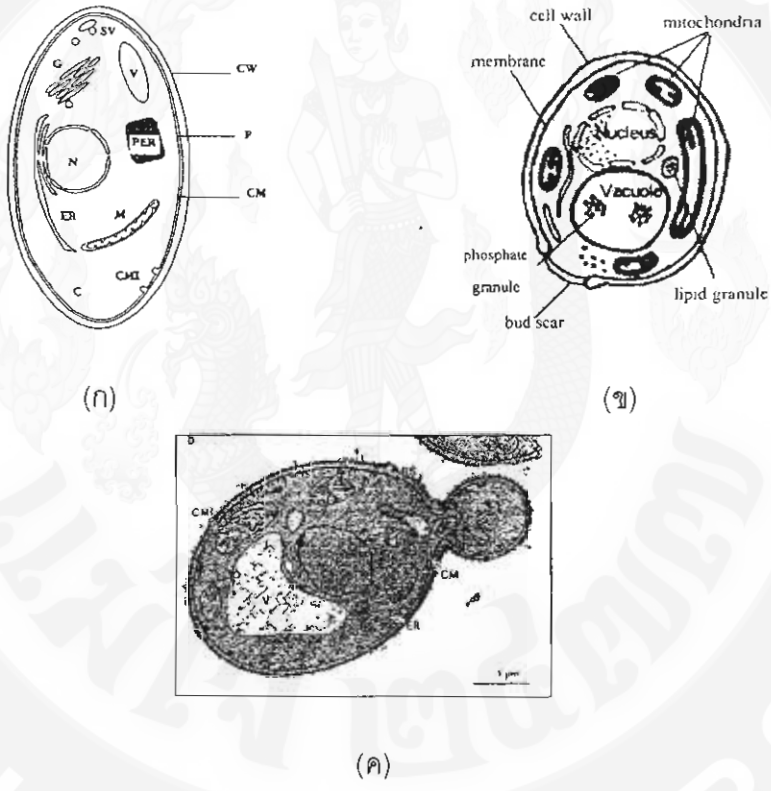
โครงสร้างและหน้าที่การทำงานของเซลล์ยีสต์

ภายในเซลล์ยีสต์ประกอบด้วยส่วนที่เป็นนิวเคลียส และไซโทพลาซึม ที่มีออร์กาเนลล์ต่าง ๆ และมีส่วนห่อหุ้มล้อมรอบโครงสร้างภายในเซลล์ ยีสต์ต่างชนิดกันไม่จำเป็นต้องมีโครงสร้างของเซลล์ครบทุกชนิดดังที่จะกล่าวต่อไปนี้ และอาจมีแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ บางโครงสร้างอาจพบได้ในบางระยะของการเจริญเท่านั้น เซลล์ของยีสต์นับว่าเป็นตัวอย่างที่ดีสำหรับการศึกษาเซลล์ของยูแคริโอตชั้นสูง รายละเอียดส่วนต่าง ๆ ของเซลล์ยีสต์ที่ครบสมบูรณ์มีดังนี้

1. **เอ็นวีโลป** (envelope) เป็นส่วนที่ห่อหุ้มไซโทพลาซึม ประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ เรียงลำดับจากภายในออกสู่ภายนอกเซลล์ดังนี้ : พลาสมาเมมเบรน (ภาพ 4) แต่บางครั้งอาจพบชั้นแคปซูลเป็นชั้นนอกสุดในยีสต์บางชนิด หรืออาจมีโครงสร้างอื่น ๆ เอ็นวีโลปของ *S. cerevisiae*

มีส่วนของเอ็นวีโลปประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรเซลล์ทั้งหมด ทำหน้าที่ควบคุมแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) และการผ่านของสารเข้าออกเซลล์

1.1 **พลาสมาเมมเบรน** ทำหน้าที่แบ่งส่วนระหว่างสิ่งแวดล้อมภายนอกกับส่วนประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ หนาประมาณ 7.5 นาโนเมตร (nm) มีคุณสมบัติเป็นเยื่อเลือกผ่านที่เป็นลิโพโปรตีน (lipoprotein) เหมือนกับเยื่อหุ้มเซลล์ทั่วไป คือ ประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด กับโปรตีนพวกสเทอรอล



ภาพ 4 โครงสร้างของเซลล์ยีสต์ (ก) และ (ข) ตัวอย่างเซลล์ยีสต์ที่มีโครงสร้างครบสมบูรณ์ (ค) ตัวอย่างโครงสร้างเซลล์ของ Candida albicans (CW = cell wall, P = periplasm, CM = plasma Membrane, CMI = invagination, BS = birth scar, C = cytoplasm, N = nucleus, M = Mitochondrion, ER = endoplasmic reticulu, G = golgi apparatus, SV = secretory vesicles, V = vacuole, PER = perioxome)

ที่มา : (ก และ ค) Walker (1998)

(ข) http://www.theartisan.net/The_Artisan_Yeast_Treatise_Section_One.html

สารที่จะผ่านเข้าออกเซลล์ทางพลาสมาเมมเบรนของยีสต์ เกิดขึ้นทั้งแบบเอโซไซโทซิส (exocytosis) และเอนโดไซโทซิส (endocytosis) (ภาพ 5) วิธีแรกเกิดขึ้นโดยเซลล์สร้างถุงเล็กที่ทำหน้าที่เกี่ยวดับการหลั่งสาร (secretory vesicle) จาก ER และกอลจิแอพพาราทัส (Golgi apparatus) ถุงเล็กนี้จะเชื่อมติดกับพลาสมาเมมเบรน เพื่อรับโปรตีนผ่านทางเอ็นวีโลปนำมาใช้ในชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ส่วนวิธีหลังเกิดขึ้นโดยพลาสมาเมมเบรนบุ๋มเข้า (invagination) เป็นแอ่ง ทำให้สารที่จะผ่านเข้าสู่เซลล์อยู่ภายในแอ่งนี้ จากนั้นเมมเบรนจะเชื่อมติดกันเป็นถุงเรียกว่าเอนโดโซม (endosome) เอนโดโซมจะเปลี่ยนเป็นเวคิวโอลในเวลาต่อมาในยีสต์พวก *S.cerevisiae* กระบวนการนี้มีบทบาทสำคัญต่อยีสต์ในการสื่อสารในการจับคู่ผสมพันธุ์ของยีสต์โดยใช้ฟีโรโมน (pheromone) นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในทางสรีรวิทยา เช่น การแตกหน่อ การสร้างสปอร์ และการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

(ก) (ข)

ภาพ 5 (ก) การเกิดเอนโดไซโทซิสของเซลล์ยีสต์ (ข) เอกโซไซโทซิสของเซลล์ยีสต์ ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบแสงส่องผ่าน (TEM)

ที่มา : (ก) Wailker (1998)

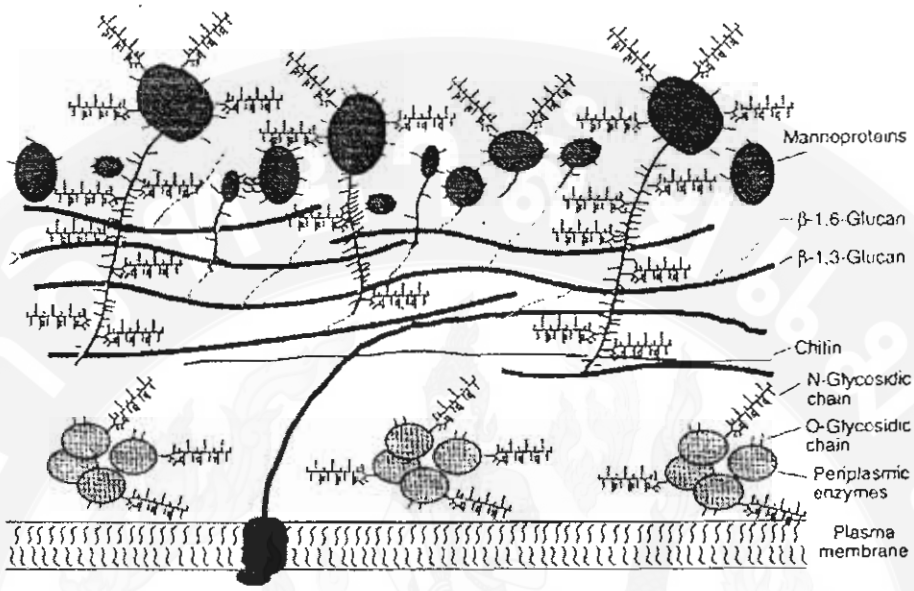
(ข) http://tidepool.st.usm.edu/crswr/exocytosis.html

พลาสมาเมมเบรนยังมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมการหมักที่ใช้ยีสต์ ในการผลิตแอลกกอฮอล์ จำเป็นต้องใช้ยีสต์ สายพันธุ์ที่ทนทานต่อแอลกอฮอล์ ความสามารถนี้ขึ้นอยู่กับกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) และสเทรอล ที่เป็นองค์ประกอบของพลาสมาเมมเบรน ทั้งนี้ปริมาณออกซิเจนนับว่ามีส่วนสำคัญต่อสัดส่วนของสารดังกล่าว ดังนั้นในกระบวนการหมักจึงต้องเติมออกซิเจนก่อนที่จะเริ่มปฏิกิริยาการหมัก เพื่อให้มีการสังเคราะห์พลาสมาเมมเบรนก่อน

1.2 **เพอริพลาซึม** (periplasm) เป็นของเหลวอยู่ภายในช่องที่อยู่ระหว่างผนังเซลล์และพลาสมาเมมเบรน เป็นชั้นที่มีความบางประมาณ 35-45 อังสตรอม (Angstom, A) ประกอบด้วยโปรตีนพวกแมนโนโปรตีน (mannoprotein) ไกลโคโปรตีน เอนไซม์อินเวอร์เทส และแอซิดฟอสฟาเทส (acid phosphatase) นอกจากนี้อาจพบเอนไซม์เมลิไบเอส (melibiase) และทรีฮาเลส (trehalase)

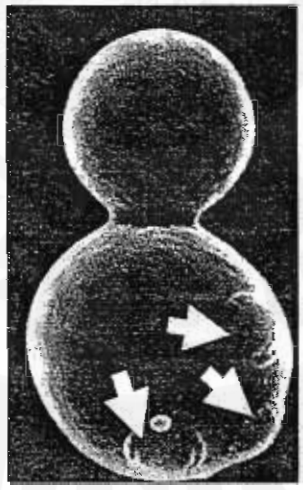
เอนไซม์อินเวอร์เทสมีความสำคัญทางด้านเทคโนโลยีชีวภาพ มีการผลิตในเชิงพาณิชย์จำกระบวนการแยกสลายตัวเองหรือออโทไลซิส (autolysis) หรือไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ซึ่งเป็นการแยกสลายด้วยน้ำ กระบวนการดังกล่าวที่พบในยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมอบ (baker's yeasts) นำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตขนมหวาน เช่น การเปลี่ยนน้ำตาลซูโครส (sucrose) ให้เป็นฟรุคโตส (fructose) และกลูโคส (glucose) เพื่อทำช็อกโคเลต และลูกกวาด

1.3 **ผนังเซลล์** มีความหนาประมาณ 100-200 nm คิดเป็นสัดส่วนประมาณ 15-25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้งของยีสต์ มีลักษณะแตกต่างกันไปในยีสตแต่ละชนิดทั้งในด้านโครงสร้าง หน้าที่ และส่วนประกอบ มีการศึกษากันมากใน S. *cerevisiae* และ *Candida albicans* โครงสร้างผนังเซลล์ประกอบด้วยโพลีเซคคาไรด์ ประมาณ 80-90 เปอร์เซ็นต์ ได้แก่ กลูแคน และแมนแน เป็นส่วนใหญ่ และอาจพบไคตินเพียงเล็กน้อย กลูแคนมีลักษณะเป็นเส้นใยสาน กันเป็นร่างแห (ภาพ 6) ประกอบด้วย B-1,6-glucan และ B-1,3-glucan ไคตินจะ ปรากฏเพียงเล็กน้อยประมาณ 2-4 เปอร์เซ็นต์ ในรูปโพลีเมอร์ของอะเซทีลกลูโคซามีน (acetylglucosamine) ส่วนใหญ่พบที่เซลล์แม่บริเวณรอยแผลที่เกิดจากการแตกหน่อที่เรียกว่าบัดสการ์ (bud scar) (ภาพ 7) และพบในยีสต์ที่มีรูปร่างเป็นเส้น เช่น *Candida albicans* ผนังเซลล์ในยีสต์บางชนิดอาจประกอบด้วยโปรตีน ลิพิด และสารอนินทรีย์ฟอสเฟต นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับระยะการเจริญและอายุของยีสต์ด้วย



ภาพ 6 โครงสร้างผนังเซลล์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

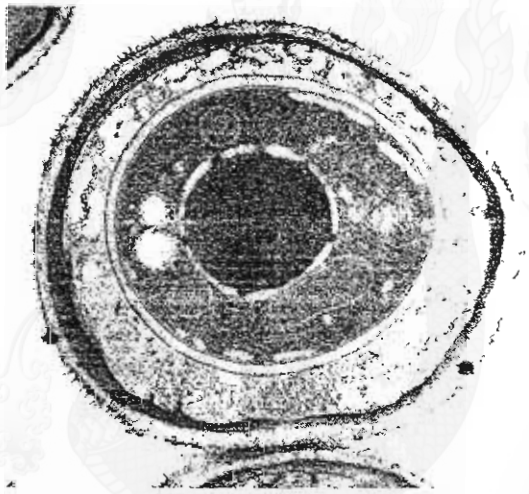
ที่มา : Wallker (1998)



ภาพ 7 รอยแผลที่เรียกว่าบัดสการ์ (ลูกศรชี้) บนเซลล์แม่บริเวณที่เกิดจากการแตกหน่อของยีสต์

ที่มา : Brock *et al.* (1994)

1.4 **ผนังสปอร์** (spore wall) การสร้างสปอร์ของยีสต์แสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนสภาพ (differentiation) ของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยมีการแสดงออกทั้งทางด้านสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี กระบวนการประกอบด้วยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis) และการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ การแบ่งแบบไมโอซิสทำให้ *S. cervisiae* แบ่งนิวเคลียสออกเป็น 4 นิวคลีไอ (nuclei) นิวเคลียร์เมแบรนจะหนาขึ้น อันเป็นจุดเริ่มต้นของการสร้างผนังสปอร์ ในที่สุดจะกลายเป็นส่วนของเอ็นวีโลป (ภาพ 8) เมื่อนิวเคลียสทั้ง 4 ถูกแยกจากกันโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ได้ผลเป็นเซลล์ใหม่จำนวน 4 เซลล์



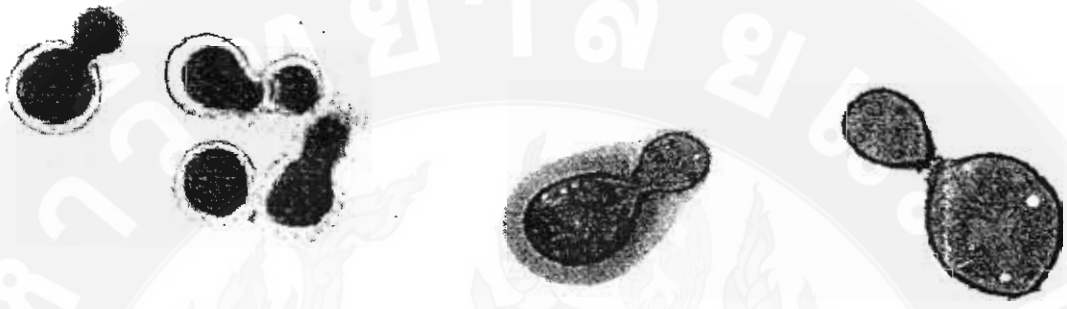
ภาพ 8 สปอร์ของยีสต์ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบแสงส่องผ่าน (TEM)

ที่มา : http://www.flickr.com/photos/joelmancuso/48090981

1.5 **ฟิมบรี** (fimbiae) ส่วนใหญ่ประกอบด้วยโปรตีนที่มีลักษณะบาง ยาวประมาณ 0.1-10 cm เส้นผ่านศูนย์กลาง 5-7 nm พบที่ผิวเซลล์ของยีสต์ในขณะที่มีการสร้างเบสิดิโอสปอร์ และแอสโคสปอร์ ทำหน้าที่ช่วยให้เกิดผสมพันธุ์แบบจับคู่ หรือคอนจูเกชัน (conjugation) ในระหว่างที่มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ ในยีสต์บางชนิดอาจพบในระยะที่เป็นเวเจเททีฟเซลล์คือเป็นเซลล์ที่ไม่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

1.6 **แคปซูล** (capsule) พบในยีสต์ที่สร้างเบสิดิโอสปอร์ เช่น *Cryptococcus, Rhodotorula* และ *Sporobolomyces* ทำหน้าที่ป้องกันเซลล์เมื่ออยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมป้องกันการสูญเสียน้ำและสารอาหารที่จำเป็น แคปซูลของ *Crytococcus neoformans* เป็นสาเหตุของการเกิดโรคในมนุษย์ (ภาพ 9) แต่แคปซูลของ

C.laurentii และ *Hansenula capsulate* เป็นพวกโพลีแซคคาไรด์มีคุณสมบัติคล้ายพลาสติกจึงมีการนำมาศึกษาวิจัยเพื่อพัฒนาใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ



(ก) (ข)

ภาพ 9 แคปซูลของยีสต์ (ก) แคปซูลของ *Blastomyces dermatitidis* มีผนังหนา (ข) แคปซูลของ *Cryptococcus neoformans* (ด้านซ้าย) เปรียบเทียบกับเซลล์ปกติที่ยังไม่สร้างแคปซูล

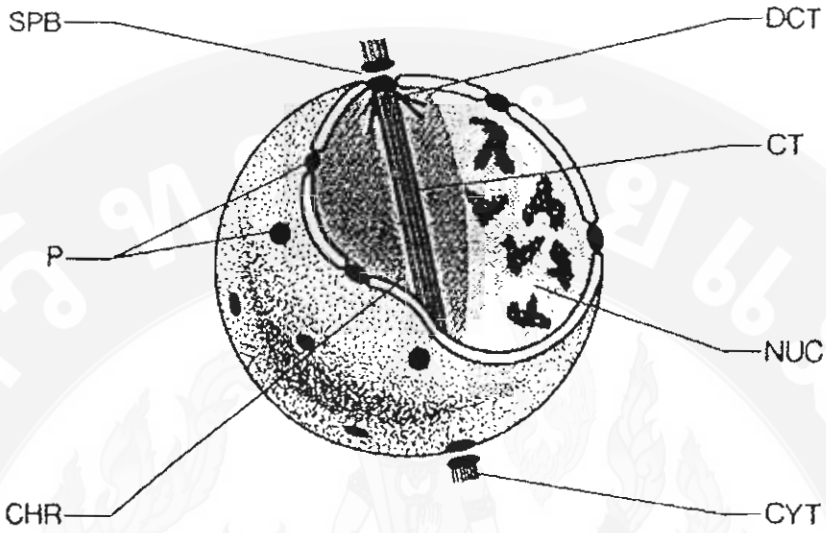
ที่มา : (ก) http://www.vetmed.wisc.edu/students/vetmycology/lab.html

(ข) http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/buchanan.html

2. **ไซโทพลาซึมและไซโทสเกเลตัน** ไซโทพลาซึมเป็นของเหลวพวกคอลลอยด์ที่มีฤทธิ์เป็นกรด (acidic colloid) ประกอบด้วยโปรตีนที่ละลายน้ำ ไกลโคเจน แมโครโมเลกุลที่ละลายได้ในตัวทำละลาย และสารแขวนลอยต่าง ๆ เช่น ไรโบโซม อนุภาคของลิพัด และไมโครบอดี (microbody) ส่วนไซโทสเกเลตัน (cytoskeleton) มีลักษณะเป็นร่างแหอยู่ในไซโทพลาซึม ประกอบด้วยไมโครทิวบูล (microtubule) และไมโครฟิลาเมนท์ (microfilament)

3. **นิวเคลียส** มีรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 cm ประกอบด้วย

3.1 **นิวเคลียร์เมมเบรน** หรือเยื่อหุ้มนิวเคลียส ทำหน้าที่กั้นแบ่งส่วนระหว่างไซโทพลาซึมกับนิวคลีโอพลาซึม (nucleoplasm) เมมเบรนนี้มีรูพรุนเรียกว่านิวเคลียร์พอร์ (nuclear pore) เส้นผ่านศูนย์กลาง 50-100 nm (ภาพ 10) ขนาดของนิวเคลียร์พอร์ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของเซลล์ นิวเคลียร์เมมเบรนของยีสต์ S. *cerevisiae* มีองค์ประกอบทางเคมีคล้ายเอนโดพลาสมิกเรทิคิวลัม และมีความแตกต่างจากของยูแคริโอตทั่วไปคือไม่มีการสลายตัวในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส



ภาพ 10 นิวเคลียสของยีสต์ในขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสระยะ G2 (G2 Phase) ในภาพจะเห็นสายใยสปินเดิล (spindle fiber) และไมโครทิวบูลบริเวณแกนกลางนิวเคลียส (SPB = spindle polar body, DCT = discontinuous microtubule, CT = continuous microtubule, CYT = cytoplasmic microtubule, NUC = nucleolus, CHR = chromatin, P = pore)

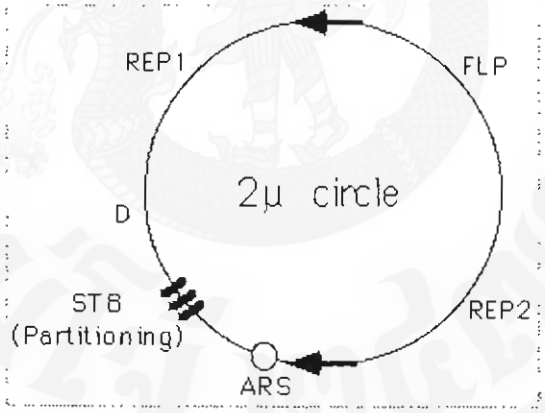
ที่มา : Walker (1998)

3.2 **นิวคลีโอลัส** (nucleolus) อยู่ภายในนิวเคลียสซึ่งจะสลายไปในขณะที่มีการแบ่งเซลล์เช่นเดียวกันแต่จะปรากฏอีกครั้งเมื่อเซลล์อยู่ในระยะอินเตอร์เฟส (interphase)

3.3 **นิวคลีโอพลาซึม** เป็นของเหลวภายในนิวเคลียส ประกอบด้วย กรดนิวคลีอิกทั้งดีเอ็นเอ และอาร์เอ็นเอ นิวคลีโปรตีนที่เป็นโปรามีน (protamine) กับฮัสโตน (histone) และ โปรตีนที่ไม่ใช่ฮิสโตน (non-histone protein) นิวคคลีโอโปรตีนที่มีความหนาแน่นมากที่สุดคือ ดีเอ็นเอฮิลโตน ที่มีลักษณะเป็นเกลียวคู่ (double helical DNA histone) หรือโครมาติน (chromatin) ที่จะหนาตัวหดสั้นกลายเป็นโครโมโซม จำนวนโครโมโซมของยีสต์ในแต่ละชนิดไม่เท่ากันมีจีโนมขนาด 10-15 เมกาเบส (megabase,Mb) มีจำนวนยีนระหว่าง 5,000-10,000 ยีน โครโมโซมที่ เป็นแฮพลอยด์มีจำนวนแตกต่างกันตามสายพันธุ์ยีสต์ เช่น ตั้งแต่ 2 แท่ง (พบใน *GuilliermondellaSelenospora*) ถึง 16 แท่ง (พบใน S. *cerevisiae*) การวิเคราะห์โครโมโซมใช้เทคนิคอิเล็กโทรฟอริซิส แบบพัลส์ฟิลด์ (pulse-field electrophoresis)

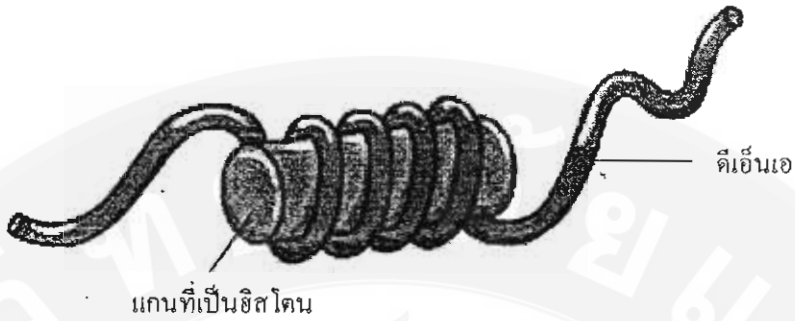
4. **สารพันธุกรรมที่อยู่ภายนอกโครโมโซม** (extrachromosomal element) เช่น พลาสมิด เรโทรทรานสโพซอน ไซ (Psi) และยูอาร์อี 3 (URE3) พบมากที่ไซโทพลาซึม ไมโทคอนเดรียและอาจพบในนิวเคลียส ตัวอย่างเช่น

4.1 **พลาสมิดที่มีลักษณะเป็นวงแหวนขนาด 2 cm** เรียกว่า พลาสมิดวงแหวน 2 ไมโครเมตร (2 cm circle plasmid) มีความยาว 6,300 คู่เบส (ภาพ 11) พบมากในยีสต์ส่วนใหญ่และ *Saccharomyces cerevisiae* การจำลองตัวเองจะให้จำนวนพลาสมิดที่เป็นผลผลิตสูง (high copy mumber) แต่ยังไม่ทราบลำดับเบสของยีนทั้งหมดบนพลาสมิดนี้ พลาสมิดวงแหวน 2 ไมโครเมตรอยู่ในรูปของนิวคลีโอโซมที่อยู่ภายในนิวเคลียส นิวคลีโอโซมมีลักษณะเป็น ดีเอ็นเอของพลาสมิด พลาสมิดพันล้อมรอบโปรตีนฮิสโตนที่ทำหน้าที่เป็นแกน (ภาพ 12) มีประโยชน์ในทางเทคโนโลยีชีวภาพโดยนำมาเป็นพาหะหรือเวกเตอร์ (vector) ในการสร้างดีเอ็นเอลูกผสม หรือรีคอมบิแนนท์ดีเอ็นเอ (recombinant DNA) พลาสมิดชนิดนี้พบใน *Saccharomyces cerevisiae, Zygosaccharomyces* และ *Kluyveromyces*



ภาพ 11 พลาสมิดวงแหวน 2 ไมโครเมตร ที่พบในยีสต์ แสดงตำแหน่ง ARS, ยีน FLP และยีนที่ ทำหน้าที่แสดงออกให้ผลเป็นโปรตีนสำหรับควบคุมการแสดงออกของยีสต์ FLP ได้แก่ REP2 REP1 และ D และตำแหน่งที่มีลำดับเบสซ้ำ ๆ เรียกว่า STB ทำหน้าที่แบ่งเซลล์ออกเป็น 2 เซลล์ลูก ระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส หรือไมโอซิส

ที่มา : http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/microbialGenetics/topics/plasmids/yeast-plasmid.html



ภาพ 12 ลักษณะของนิวคลีโอโซมของยูแคริโอตที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอของพลาสมิดพันล้อมรอบแกนที่เป็นโปรตีนฮิสโตน

ที่มา : Brock *et al.* (1994)

4.2 **พลาสมิดที่เป็นอาร์เอ็นเอสายคู่หรือเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว** พบในยีสต์สายพันธุ์คิลเลอร์ (Killer) ทำหน้าที่สร้างสารพิษหรือทอกซิน (toxin) เพื่อกำจัดยีสต์สายพันธุ์อื่น

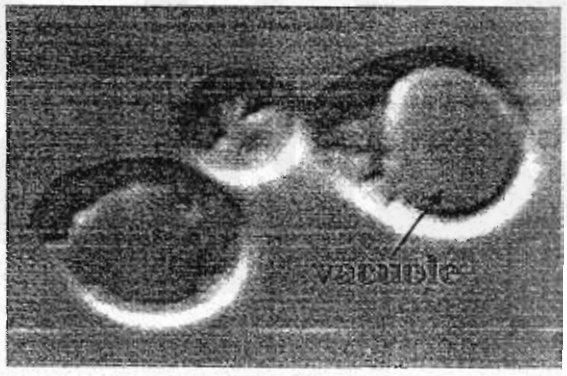
4.3 **ไซ** (Psi) **และยูอาร์อี** 3 (URE3) มีลักษณะเหมือนกับพรีออน (prion) ซึ่งเป็น อนุภาคโปรตีนที่ทำให้เกิดโรคครูทเฟลจาคอบ (Creutzfeldt-jacob) ในมนุษย์ โรคเกี่ยวกับสมองในวัว (bovine spongiform encephalopathy, BSE) พบลักษณะพยาธิสภาพคือเนื้อสมองจะมีรูพรุนคล้ายฟองน้ำ ทำให้ผู้ป่วยมีอาการคล้ายโรคเรื้อนในแกะ (scapie in sheep) พรีออนยังทำให้เกิดโรคคูรู (Kuru) ที่พบในประเทศปาปัวนิวกินี โรคนี้มีผลกระทบต่อระบบประสาท ติดต่อโดยการกินเนื้อมนุษย์ด้วยกัน (cannibalism) ผู้ป่วยมีอาการเสื่อมสภาพของระบบประสาทส่วนกลาง นอนไม่หลับ (insomnia) สูญเสียการควบคุมการเคลื่อนไหว มีอาการสั่น เดินโซเซไม่สามารถพยุงตัวได้พูดไม่ได้ และเสียชีวิตในเวลาประมาณ 1 ปี หลังเริ่มแสดงอาการ โรคคูรูติดต่อกันในมนุษย์กินคนซึ่งติดเชื้อจากการกินเนื้อสมองของผู้ที่เป็นโรคเข้าไป

การศึกษาลักษณะพรีออนที่พบในยีสต์ด้านพันธุศาสตร์เชิงโมเลกุล (molecular genetics) จะทำให้เป็นพื้นฐานของการศึกษาพรีออนที่ทำให้เกิดโรคในมนุษย์ เพื่อหาทางป้องกันแก้ไขและรักษาต่อไป

4.4 **เรโทรทรานสโพซอน** (retrotransposon, Ty) เป็นดีเอ็นเอสายสั้นๆ ที่เคลื่อนที่ย้ายตำแหน่งไปมาบนโครโมโซมได้ โดยอาศัยเอนไซม์รีเวอร์สทรานสคริปเตส (reverse transcriptase พบใน S. *cerevisiae* ทำหน้าที่สร้างอนุภาคที่คล้ายกับเรโทรไวรัส

(retrovirus–like particle, VLPs) แต่ไม่สามารถกระจายออกนอกเซลล์เพื่อก่อโรคได้ จะถ่ายทอดสู่เซลล์ยีสต์ด้วยกันเมื่อมีการหลอมรวมเซลล์ (cell fusion) Ty-VLPs นำมาใช้ประโยชน์ในทางพันธุวิศวกรรม ในการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal antibody) และการผลิตวัคซีนป้องกันไวรัส และยังคาดกันว่าน่าจะพัฒนานำมาใช้ในการผลิตวัคซีนป้องกันโรคเอดส์หรือ HIV ไวรัสที่ทำให้เกิดโรคไข้หวัดใหญ่ (influenza vvirus) ไวรัสที่ทำให้เกิดลิวคีเมียในแมว (feline leukemia virus) และไวรัสที่ ทำให้เกิดโรคผิวหนังเป็นตุ่มแผลในวัวควาย (bovine papillomavirus)

10. **แวคิวโอล** ทำหน้าที่ในการขนส่งโปรตีนระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ โดยวิธีเอนโดไซโทซิส และเอกโซไซโทซิส ขนาดของแวคิวโอลเปลี่ยนแปลงไปตามระยะการเจริญและระยะการแตกหน่อ ซึ่งในระยะนี้แวคิวโอลที่มีขนาดเล็กของ หน่อที่กำลังจะงอกออกไป จะเข้ารวมกับแวคิวโอลของเซลล์แม่ทำให้มีขนาดใหญ่ (ภาพ 13) เยื่อหุ้มแวคิวโอลเรียกว่าโทโนพลาสต์ (tonoplast) ประกอบด้วยฟอสโฟลิพิด กรดไขมันที่ไม่อิ่มตัวและสเทรอล มีความยืดหยุ่นมากกว่าพลาสมาเมมเบรน ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาวะขาดแคลนอาหาร อุณหภูมิสูง pH เป็นกรด ความเข้มข้น K^+ สูงเกินไป อาจทำให้เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเอง(autolysis) ทำให้แวคิวโอลปปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยส่วนประกอบที่เป็นแมโครโมเลกุลเพื่อนำมาใช้ภายในเซลล์ ตัวอย่างได้แก่ เอนไซม์โปรทีเอสสำหรับย่อยสลายโปรตีนแวคิวโอลยังทำหน้าที่อื่น ๆ เช่น สะสมอาหาร กรดอะมิโน โพลีฟอสเฟต และโลหะแคทไอออนควบคุมสมดุล ออสโมซิส pH การส่งผ่านเอนไซม์ ATPase



ภาพ 13 แวคิวโอลที่พบในเซลล์ยีสต์

ที่มา : http://www.biology.lsa.umich.edu/research/labs/klionsky/klionskyprojects.html

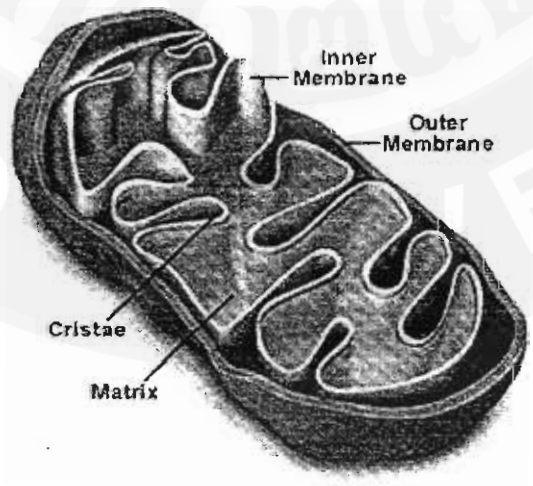
6. **ไมโทคอนเดรีย** ยีสต์นับว่าเป็นตัวแทนที่สำคัญในการศึกษาไมโทคอนเดรียของยูแคริโอตอื่น ๆ ทั้งในด้านวิวัฒนาการเกี่ยวกับต้นกำเนิดของไมโทคอนเดรีย โครงสร้างและหน้าที่การทำงาน ไมโทคอนเดรียของยีสต์ประกอบด้วย

6.1 เมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) มีเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมของลิพัด (ภาพ 14)

6.2 เมทริกซ์ (matrix) มีเอนไซม์ที่ช่วยในการออกซิเดชันของกรดไขมันและใช้ในวัฏจักรกรดซิตริก และมีดีเอ็นเอของไมโทคอนเดรียอยู่ในชั้นนี้

6.3 เมมเบรนชั้นใน (inner membrane) มีไซโทโครม (cytochrome) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายใจ NADH และเอนไซม์ซัคซิเนทดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) กับH^+-ATPase

ไมโทคอนเดรียของยีสต์มีขนาด รูปร่าง และจำนวนแตกต่างกันไปตามชนิดและระยะการเจริญ และยังขึ้นอยู่กับปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของเซลล์ยีสต์ ในสภาวะที่มีออกซิเจนพบว่า ไมโทคอนเดรียทำหน้าที่ช่วยสังเคราะห์ ATP ในกระบวนการหายใจ ปฏิกิริยาออกซิเดชันในวัฏจักรกรดซิตริกจะทำให้มีการขนส่งสารผ่านวงจรการหายใจ บริเวณคริสตี (crystae) หรือเมมเบรนชั้นใน



ภาพ 14 ส่วนประกอบของไมโทคอนเดรียของยีสต์

ที่มา : http://www.abcbodybuilding.com/magazine03/8weekstobiggertibialis.html

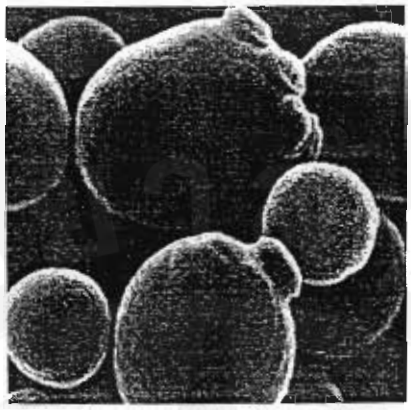
การจัดจำแนกยีสต์

ในการจัดจำแนกหมวดหมู่ของสิ่งมีชีวิตโดยโคปแลนด์ (copeland) ได้จำแนกสิ่งมีชีวิตตามลักษณะของเซลล์และองค์ประกอบทางเคมีระดับเซลล์ที่เหมือนกันหรือคล้ายคลึงกันมากที่สุดแบ่งสิ่งมีชีวิตออกเป็น 4 อาณาจักร (kingdom) คืออาณาจักรโมนีรา (kingdom monera) อาณาจักรโพรทิสตา (kingdom protista) อาณาจักรเมทาไฟตา (kingdom metaphyta) และอาณาจักรเมทาซัว (kingdom metazoa)

ถ้าจัดจำแนกสิ่งมีชีวิตตามระบบของโคปแลนด์ (copeland) จุลินทรีย์ที่เป็นพวก ยูแคริโอตจะถูกจัดไว้ในอาณาจักรโพรทิสตา ได้แก่ โพรโทซัว สาหร่าย (algae) ฟังไจ (fungi) และไลเคน (lichen) แต่ถ้าจัดจำแนกตามระบบของวิทเทเกอร์ (whittaker) ฟังไจจะถูกแยกออกมาเป็นอีกอาณาจักรหนึ่งคือ อาณาจักรฟังไจ (kingdom fungi) ประกอบด้วย เห็ด (mushroom) รา (olds หรือ filamentous fungi) และยีสต์ (yeast)

ยีสต์จัดเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดียวที่เป็นฟังไจ ไม่มีคลอโรฟิลล์ จำแนกอยู่ในคลาสแอสโคมัยซีทีส คลาสเบสิดิโอมัยซีทีส (class basidiomycetes) และคลาสดิวเทอโรมัยซีทีส (class deuteromycetes) มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และแบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) โดยการแตกหน่อ หรือการแบ่งออกเป็น 2 เซลล์ (binary fission) (ภาพ 15) ในการจัดจำแนกยีสต์ออกเป็นซับดิวิชัน (subdivision) อาศัยเกณฑ์จากลักษณะของโครงสร้างที่ใช้ในการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ โดยแบ่งออกเป็นซับดิวิชั่นแอสโคมัยโคทินา (subdivision Ascomycotina)ซับดิวิชันเบดิโอมัยโคทินา (subdivision basidiomycotina) และซับดิวิชันดิวเทอโรมัยโคทินา (subdivision deuteromycotina)

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยแม่โจ้



ภาพ 15 ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ กำลังแตกหน่อ

ที่มา : http://www.genomenewsnetwork.org/articles/12_03/yeast_screen.s.html

การจำแนกยีสต์ที่นิยมกันคือจำแนกจากลักษณะต่าง ๆ ที่สังเกตได้ เช่น ใช้สัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และคุณลักษณะทางพันธุกรรมของยีสต์ เป็นเกณฑ์ในการจำแนก ตัวอย่างเช่นมีการจำแนกยีสต์ออกเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่

1. ยีสต์ที่ทำให้เกิดการหมัก (fermenting yeasts)
2. ยีสต์ที่ไม่ทำให้เกิดการหมัก (non-fermenting yeasts)
3. ยีสต์ที่มีรงควัตถุสีชมพู (pink pigmented yeasts)
4. ยีสต์ที่มีการสร้างแอสโคสปอร์ (ascosporogenous yeasts)
5. ยีสต์ที่มีการสร้างเบสิดิโอสปอร์(basidiomycetous yeasts)

การจัดจำแนกนับว่าเป็นสิ่งที่จำเป็นในการศึกษายีสต์ เช่น การศึกษาเทคโนโลยีชีวภาพยีสต์ (yeast biotechnology) จะต้องแยกให้ออกระหว่างยีสต์ป่าหรือยีสต์สายพันธุ์ธรรมชาติ (wild yeast) กับยีสต์เลี้ยง (cultured yeast) เพื่อไม่ให้มีการปนเปื้อนของยีสต์ที่ไม่ต้องการในกระบวนการทางอุตสาหกรรม ตัวอย่างได้แก่ การทำผลิตภัณฑ์แอลกอฮอล์ให้ได้รสชาติที่ต้องการจะต้องมีการใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่จำเพาะเจาะจง ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* แต่มักมีการปนเปื้อนของยีสต์สายพันธุ์อื่น เช่น *Candida utilis* เข้ามาเจริญร่วมจะทำให้เสียรสชาติของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ เหตุผลที่ต้องจำแนกชนิดของยีสต์ยังมีประโยชน์ในการวินิจฉัยในทางการแพทย์ เนื่องจากจะต้องมีการตรวจสอบสายพันธุ์ของยีสต์ที่ก่อโรคให้ถูกต้อง และแม่นยำ

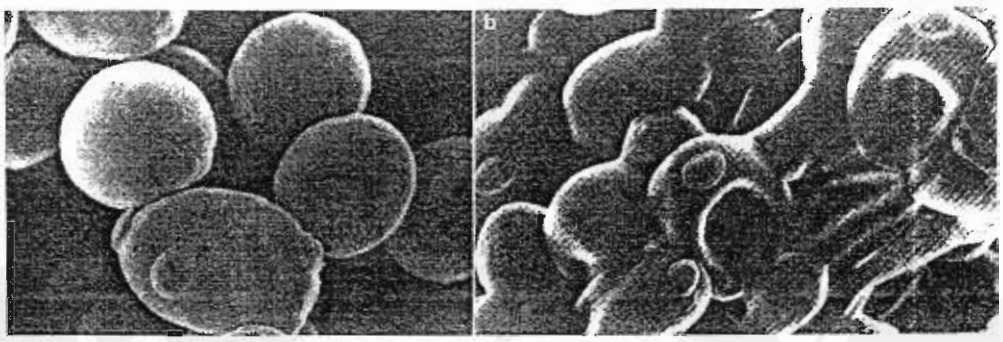
ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของยีสต์

ปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของเซลล์ยีสต์มีทั้งปัจจัยทางกายภาพ เคมีภาพ และชีวภาพดังนี้

1. **ปัจจัยทางกายภาพ** ได้แก่ อุณหภูมิ แรงดันบรรยากาศ ความชื้น pH ประจุไฟฟ้า รังสี และปริมาณออกซิเจน ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิปานกลาง ความชื้นพอเหมาะ มี pH ของอาหาร และ ออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสม

1.1 **อุณหภูมิ** โดยทั่วไปในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมและในห้องปฏิบัติการมักใช้อุณหภูมิในการเลี้ยงยีสต์ประมาณ 20-30 องศาเซลเซียส แต่อาจมีข้อยกเว้นในยีสต์พวกไซโครฟิลิก (psychrophilic) ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 12-15 องศาเซลเซียส ถ้าแบ่ง อุณหภูมิที่ยีสต์สามารถเจริญได้เป็นอุณหภูมิสูงสุด (maximum) อุณหภูมิที่เหมาะที่สุด (optimum) และอุณหภูมิต่ำสุด (minimum) (T_{max}, T_{opt} และ T_{min} ตามลำดับ) อุณหภูมิที่ยีสต์แต่ละชนิดเจริญได้จะแตกต่างกัน เช่น *S. cerevisiae* และ *S. paradoxus* มี T_{max} 35-43 องศาเซลเซียส แต่ *S.pastorianus* และ *S.bayanus* มี T_{max} ไม่เกิน 35 องศาเซลเซียส ส่วน *Torulopsis psychrophila* มี T_{min} ประมาณ 5 องศาเซลเซียส

1.2 **น้ำ** ยีสต์ต้องการน้ำสำหรับใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ค่าศักย์ของน้ำ (water poterntial, Yw) หมายถึงค่าที่แสดงให้เห็นถึงค่าความบริสุทธ์ของน้ำในการที่มีปริมาณตัวถูกละลายมากน้อยเพียงใด น้ำบริสุทธิ์มีค่า Yw เป็นศูนย์ น้ำที่ไม่บริสุทธิ์จะมีค่า Yw ต่ำจนมีค่าเป็นลบ ตัวอย่างเช่น น้ำทะเลมีค่า Yw ประมาณ -2.5 MPa ค่า Yw ที่ยีสต์เจริญได้คล้ายกับค่า อุณหภูมิคือมี Y_{max}, Y_{opt} และ Y_{min} คำศัพท์ออสโมฟิลิก (osmophilic) และออสโมดูริก (osmoduric)จะใช้ในการอธิบายลักษณะของยีสต์ที่ไม่มีปัญหาในการปรับตัวในด้านแรงดันออสโมซิก หรือทนต่อแรงดันออสโมติกได้ในสภาวะที่มีค่า Yw ต่ำ ตามลำดับ ถ้ายีสต์ไม่สามารถทนต่อแรงดันออสโมติกได้จะทำให้เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำ (dehydration) ทำให้เซลล์เหี่ยว เนื่องจากเกิดกระบวนการพลาสมอลิซิส (plasmolysis) (ภาพ 16) สามารถเจริญได้ที่ค่า Yw ระหว่าง -1.0-5.6 Mp ยีสต์ชนิดอื่น ๆ ที่ทนต่อแรงดันออสโมติก ได้แก่ *Candida mogii*, *Debaryomyces hansenii*, *Metschnikowia bicuspidat* และ *Schizosaccharomyces octosporus* ยีสต์เหล่านี้มีความสำคัญในทางเศรษฐกิจ เพราะทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสียได้



(ก) (ข)

ภาพ 16 การเปลี่ยนแปลงสัณฐานวิทยาของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เนื่องจากการสูญเสียน้ำ ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดง (ก) เซลล์ปกติ (7000x) (ข) เซลล์ที่เกิดพลาสมอลิซิส (5000x)

ที่มา : Walker (1998)

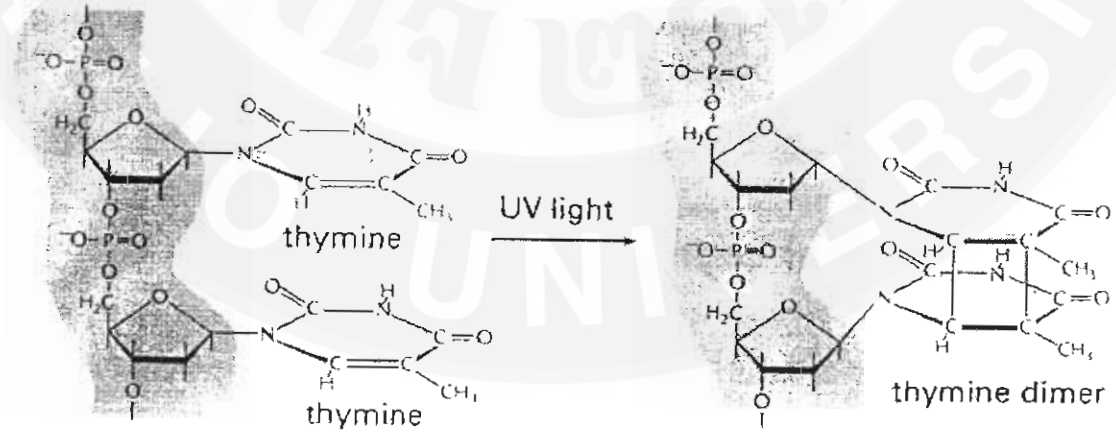
1.3 pH **ของอาหารและปริมาณออกซิเจน** ยีสต์ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่ pH 4.5 ถึง 6.5 แต่อาจพบยีสต์บางชนิดเจริญได้ที่ pH 3 หรือ pH 8 อาหารที่มี pH เป็นกรดเนื่องจากมีกรดอินทรีย์เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก จะหยุดยั้งการเจริญของยีสต์ได้ ยีสต์ส่วนใหญ่ดำรงชีวิต แบบแอโรบิค (aerobic) คือหายใจโดยใช้ออกซิเจน แต่ยีสต์ที่ใช้ทำขนมปังดำรงชีวิตแบบแฟคัลเททีฟแอนแอโรบิค (facultative anaerobic) คือใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนก็ได้ ยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับเป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในกระบวนการหายใจ และใช้เป็นโกรฟแฟคเตอร์ในชีวสังเคราะห์ของเมมเบรน กรดไขมัน และสเทอรอล ในการจำแนกประเภทของยีสต์บางครั้งจำแนกตามคุณสมบัติของการหมัก และการตอบสนองต่อออกซิเจน

1.4 **แรงกดดันของของเหลวและแก๊ส** ถ้าเลี้ยงยีสต์สำหรับใช้ในการผลิตเบียร์ อาจมีปัญหาทั้งจากแรงอัดของของเหลว (hydrostatic pressure) และแรงดันของแก๊ส (gaseous pressure) ที่เกิดขึ้นในอาหาร เช่น จากคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นในการเลี้ยงยีสต์ ความสามารถในการทนต่อแรงดันของยีสต์แต่ละชนิดไม่เท่ากัน ยีสต์ที่ทนต่อแรงกดดันสูงได้เรียกว่าบารอทอเลอแรนท์ (barotolerant) แต่ส่วนใหญ่และพบว่ายีสต์ทนแรงกดดันได้ดีไม่เกิน 10 MPa ดังนั้นจึงจัดให้เป็นกลุ่มที่ทนต่อแรงกดดันได้เล็กน้อย (mild hydrostatic pressure tolerant) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาพบว่าในขณะที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส สปินเดิลไฟเบอร์ และออร์กาเนลล์หลายอย่างสามารถทนแรงดันได้มากกว่า 150 MPa

1.5 **รังสี** ดีเอ็นเอของยีสต์จะถูกทำลายเมื่อได้รับรังสีอุลตราไวโอเลต (UV) และแกมมา (γ-ray) รังสี UV ทำให้ดีเอ็นเอเกิดไดเมอร์ (dimerization) แตกหัก (nick) และถูกทำลาย (ภาพ 17) ยับยั้งการแตกหน่อของยีสต์ *S. cerevisiae* ส่วนรังสีแกมมาทำลายดีเอ็นเอสายคู่บริเวณพันธะไฮโดรเจน นอกจากนี้ยังพบว่ารังสีเอกซ์ (x-ray) รบกวนวงจรชีวิตของยีสต์ แสงเลเซอร์ (laser-light) ที่มีความเข้มใกล้เคียงกับแสงอินฟราเรด (infrared) ที่ 1064 nm ใช้ทำลายดีเอ็นเอของ *C. albicans* ได้ จึงอยู่ในระหว่างการศึกษาเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการกำจัดยีสต์ชนิดนี้ที่ปนเปื้อนในการรักษาโรคฟันผุ

1.6 **ประจุไฟฟ้า** ถ้ายีสต์อยู่ในสนามไฟฟ้า ประจุไฟฟ้าจะมีผลต่อการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารบริเวณเมมเบรน จึงนำมาใช้ประโยชน์ในการทำให้เกิดรีคอมบิเนชันของยีนที่ต้องการ โดยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน (electroporation) ทั้งนี้ต้องมีการควบคุมแอมพลิจูด (amplitude) ความถี่ (frequency) และระยะเวลาที่กระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า เพราะมิฉะนั้นจะเป็นการทำลายเซลล์ยีสต์ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ได้

1.7 **คลื่นเสียงความถี่สูงหรืออัลตราโซนิก** (ultrasonic) อิทธิพลของเสียงอัตราโซนิกที่มีผลต่อสรีรวิทยาของยีสต์กำลังอยู่ในระหว่างการศึกษา คาดว่ามีผลทำให้เอ็นไซม์แปลงสภาพ (denature) ทำให้เอ็นวีโลปถูกทำลาย ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการหลอมรวมเซลล์โพรโทพลาสต์ของยีสต์ และในเทคนิคทางพันธุวิศวกรรม



ภาพ 17 การเกิดไดเมอร์ของไพริมิดีนในดีเอ็นเอ เนื่องจากได้รับรังสีอัลตราไวโอเลต

ที่มา : http://www.bio.miami.edu/dana/250/25002_12print.html

2. **ปัจจัยทางเคมี** สารเคมีที่มีผลต่อการเติบโตของยีสต์ มีแหล่งที่มาทั้งจากธรรมชาติ สารเคมีที่เติมลงไปในอาหาร และผลผลิตที่เกิดจากปฏิกิริยาเคมี ตัวอย่างของสารเคมีที่มีผลต่อการเติบโตของยีสต์ เช่น

2.1 **ผลผลิตจากปฏิกิริยาที่เป็นพิษต่อเซลล์โดยตรง** เช่น อะเซทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และเอธานอล การขาดแคลนสารเคมีที่จำเป็นบางชนิดก็มีผลต่อการเติบโตของยีสต์ เช่นเดียวกัน ดังนั้นในทางอุตสาหกรรมจึงต้องมีการควบคุมปริมาณสารเคมีที่เกิดขึ้น เช่น การผลิตยีสต์ในการผลิตเบียร์ ต้องชะล้างกรดที่เกิดขึ้น ควบคุมไม่ให้มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่สร้างกรดในการผลิตอาหารจะมีการเติมสารเคมีบางอย่างเพื่อยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่อาจทำให้คุณภาพผลผลิตลดลง

2.2 **สารเคมีที่เป็นสิ่งก่อการกลายพันธุ์หรือที่เรียกว่ามิวทาเจน** (mutagen) ทำให้ยีสต์เกิดการกลายพันธุ์ หรือมิวเทชัน มีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอ หรือทำให้ยีสต์มีความทนทานต่อสารเคมีบางอย่างได้ เช่น N-methyl-NI-nitro-N-nitrosoguanidine, methylmethanesulphonate, nitrogen mustard และ photoactivated psoralens สารเหล่านี้ใช้ประโยชน์ในการศึกษากระบวนการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (DNA repair process)

2.3 **โลหะหนัก** (heavy metal) เช่น ทองแดง และแคดเมียม ทำให้เกิดทอกซินที่เป็นพิษต่อยีสต์ ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ และทำลายเมมเบรนของเซลล์ยีสต์

3. **ปัจจัยทางชีวภาพ** ปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีสต์กับสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ได้มีการศึกษาโดยนักนิเวศวิทยาด้านยีสต์และนักวิทยาด้านคลินิก เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์ และอุตสาหกรรมด้านเทคโนโลยีชีวภาพ ยีสต์มีความสัมพันธ์กับสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์ และจุลินทรีย์ ทั้งในด้านการได้รับประโยชน์และเสียประโยชน์ เป็นความสัมพันธ์ทั้งแบบ saprophytism, parasitism, commensalism, competition, mutualism และ antagonism เป็นต้น ทำให้การเติบโตของยีสต์อาจมีผลในการยับยั้งการเจริญของสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น หรือสิ่งมีชีวิตอื่นอาจได้รับประโยชน์จากการอยู่ร่วมกับยีสต์

ความต้องการสารอาหารของยีสต์

สารอาหารที่ยีสต์ต้องการประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต สารอาหารที่เป็นแหล่งไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุ ยีสต์ต่างสายพันธุ์กันต้องการสารอาหารที่แตกต่างกัน เกณฑ์ในการแบ่งความต้องการสารอาหารของยีสต์ขึ้นอยู่กับชนิดสารเคมีที่จำเป็นสำหรับเซลล์ และวัตถุประสงค์ของการจำแนก โดยทั่วไปแบ่งสารอาหารออกเป็น 2 ประเภทคือ

ก. **สารอาหารหลัก** (macronutrient elements) ได้แก่ คาร์บอนไฮโดรเจน ออกซิเจนไนโตรเจน ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม แมงกานีส และซัลเฟอร์ (C, H, O, N, P, K, Mg และ S) ยีสต์ต้องการประมาณ 10^{-3} M

ข. **สารอาหารรอง** (micronutrient elements) ได้แก่ แคลเซียม คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส สังกะสี นิกเคิล และโมลิบดินัม (Ca, Fe, Mn, Zn, Ni และ Mo) ยีสต์ต้องการประมาณ10^{-6}M

สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์ในห้องปฏิบัติการ จะคำนึงถึงสารเคมีที่จะใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และแหล่งอาหารที่เหมาะสมกับความต้องการของยีสต์ แบ่งได้ดังนี้

1. **สารเคมีที่จำเป็นสำหรับเซลล์ยีสต์** ประกอบด้วย

1.1 **สารเคมีพื้นฐาน** ได้แก่ คาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและซัลเฟอร์ ที่เป็นองค์ประกอบของแมโครโมกุลพวกโปรตีน โพลีแซคคาไรด์ กรดนิวคลีอิกและลิพิด

1.2 **ไอออนของสารอนินทรีย์** ได้แก่ โพแทสเซียม และแมกนีเซียม

1.3 **สารอาหารรองที่ต้องการในปริมาณน้อยมาก** หรือเทรซเอเลเมนท์ (trace element) เป็นสารเคมีที่เซลล์ต้องการแต่เพียงในปริมาณน้อย ยีสต์ต้องการสารดังกล่าวจากแหล่งอาหารในสิ่งแวดล้อม เช่น ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม แคลเซียม แมงกานีส ซัลเฟอร์ สังกะสี นิกเคิลโมลิบดินัม คอปเปอร์ (ตาราง 1) ยีสต์หลายสปีชีส์เจริญได้ดีในอาหารเหลว pH 5.5 ที่ ประกอบด้วยน้ำตาลเฮกโซส (hexose sugar) เกลือแอมมอเนียม (ammonium salt) วิตามิน และเทรซเอเลเมนท์อื่น ๆ ที่จำเป็นอีกหลายชนิด

2. **แหล่งอาหารของยีสต์**

2.1 **คาร์บอน** ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตพวกเคโมออร์กาโนทรอฟ (chemoorganotroph) คือ ได้คาร์บอนและพลังงานจากสารอินทรีย์ แหล่งคาร์บอนโดยทั่วไปได้แก่สารประกอบอะซีเตท (acetate compound) และจากสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทั้งที่เป็นโมโนแซคคาไรด์ ไดแซคคาไรด์ และ โอลิโกแซคคาไรด์ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคส แต่ยีสต์ในธรรมชาติไม่สามารถใช้น้ำตาลโพลีแซซาไรด์ได้ ดังนั้นยีสต์จึงไม่ใช้น้ำตาลกลูโคสได้โดยตรงเพราะน้ำตาลในธรรมชาติมักพบอยู่ในรูปไดแซคคาไรด์ โพลีแซคคาไรด์ หรือเซลลูโลส แม้กระทั่งน้ำตาลที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักมักจะเป็นซูโครส ฟรุคโตส ไซโลส (xylose) แลคโทส (lactose) และมอลโทส (maltose) ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้ เช่น มอลโทสมอลโทไทโอส (maltotriose) กลูโคส ซูโคส และฟรุคโทส มักจะใช้ที่ความเข้มข้น 75-85 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยีสต์อาจได้คาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศประมาณ 5 เปอร์เซ็นต์

ในสภาพที่มีออกซิเจนยีสต์อาจใช้สารประกอบคาร์บอนพวกเอธานอล สารประกอบอะซีเตท หรือกลีเซอรอล ถ้ามีปริมาณออกซิเจนพอเพียงปฏิกิริยาออกซิเดชันของสารดังกล่าวจะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ แต่ในสภาพไร้ออกซิเจนหรือมีออกซิเจนต่ำ ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอธานอล จะให้พลังงานออกมาในปริมาณน้อยมาก อาจทำให้เกิดทอกซินสะสมในอาหารและเป็นพิษต่อเซลล์

ตาราง 1 สารเคมีพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับยีสต์

ชนิดสาร	แหล่งอาหาร	หน้าที่
คาร์บอน	น้ำตาล	ทำงานร่วมกับ H, O และ N กระบวนการเมแทบอลิซึมของสารประกอบคาร์บอนทำให้เกิดพลังงาน
ไฮโดรเจน	กรดต่าง ๆ	จำเป็นต่อเมแทบอลิซึ่มของยีสต์ ทำให้เกิดแรงขับโปรตอน (proton-motive force)

ตาราง 1 สารเคมีพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับยีสต์ (ต่อ)

ชนิดสาร	แหล่งอาหาร	หน้าที่
ออกซิเจน	อากาศ น้ำ	เป็นซับสเตรทของเอนไซม์ในกระบวนการหายใจ ช่วยในกระบวนการออกซิเดชันของกฏิกิริยาเอนไซม์ การสังเคราะห์เออร์โกสเตอรอล (ergosterol) และกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว
ไนโตรเจน	แอมมอเนียม ยูเรีย กรดอะมิโน	เป็นโครงสร้างสำคัญของโปรตีนและเอนไซม์
ฟอสฟอรัส	ฟอสเฟต	การถ่ายทอดพลังงานเป็นโครงสร้างกรดนิวคลีอิก
โพแทสเซียม	เกลือโพแทสเซียม	ควบคุมสมดุลไอออน การทำงานของเอนไซม์
แมกนีเซียม	เกลือแมกนีเซียม	การทำงานของเอนไซม์ เป็นโครงสร้างของเซลล์และออร์กาเนลล์
ซัลเฟอร์	ซัลเฟต เมไธโอนีน	เป็นโครงสร้าง sulphydryl amino acid และวิตามิน
แคลเซียม	เกลือแมกนีเซียม	การส่งผ่านสัญญาณ
คอปเปอร์	เกลือคิวปริก (cupric salt)	เป็น redox pigment
เหล็ก	เกลือเฟอริก (ferric salt)	เป็นโครงสร้างของฮีม (heam-protein) ไซโทโครม
แมงกานีส	เกลือแมงกาเนต	การทำงานของเอนไซม์

ตาราง 1 สารเคมีพื้นฐานที่จำเป็นสำหรับยีสต์ (ต่อ)

ชนิดสาร	แหล่งอาหาร	หน้าที่
สังกะสี	เกลือสังกะสี	การทำงานของเอนไซม์
นิกเคิล	เกลือนิกเคิล	การทำงานของยูริเอส (urease)
โมลิบดินัม	Na_2MoO_4	เมแทบอลิซึมของไนเตรท วิตามินบี 12

ที่มา : ดัดแปลงจาก Walker (1998)

2.2 **ไฮโดรเจน** ยีสต์ได้ไฮโดรเจนจากคาร์โบไฮเดรต และแหล่งอื่น ๆ ไฮโดรเจนไอออนหรือโปรตอน (proton) มีความสำคัญต่อสรีรวิทยาของเซลล์ยีสต์ มีผลต่อการควบคุม pH การเติบโต และเมแทบอลิซึม โดยปกติยีสต์จะเจริญได้ดีถ้า pH ของอาหารอยู่ระหว่าง 4-6 แต่ยีสต์หลายชนิดเจริญได้ที่ระดับ pH ค่อนข้างกว้าง ตั้งแต่ 2-8 ความสามารถในการทนกรดของยีสต์สูงกว่าแบคทีเรีย ทำให้พบยีสต์ได้ในแหล่งอาศัยที่มีความเป็นกรดสูง เช่นอาหารหมักดอง แต่ยีสต์ไม่ค่อยทนต่อสภาวะที่มีความเป็นเบสสูง

2.3 **ออกซิเจน** มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ในระยะที่มีการดำรงชีวิตในสภาวะปกติ ยีสต์ต้องการออกซิเจนมาใช้เป็นซับสเตรทสำหรับเอนไซม์ในกระบวนการหายใจทำให้กระบวนการไฮดรอกซิลเลชัน (hydroxylation) ดำเนินไปตามปกติ ช่วยเกี่ยวกับชีวสังเคราะห์ของสเทรอล และกรดไขมันที่ไม่อิ่มตัว ยีสต์ต่างชนิดกันมีความต้องการออกซิเจน แตกต่างกัน ใน สภาวะที่มีความดันบรรยากาศสูง และปริมาณออกซิเจนมากเกินไป จะทำให้หยุดยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ เกิดสภาพที่เป็นพิษต่อเซลล์ดังนั้น ในกระบวนการผลิตทางอุตสาหกรรมที่ต้องใช้ยีสต์จึงต้องควบคุมให้มีปริมาณออกซิเจนที่เหมาะสม เพื่อให้ยีสต์เพิ่มจำนวนและเจริญเติบโต ได้ดี

2.4 **ไนโตรเจน** ปริมาณไนโตรเจนในเซลล์ยีสต์มีประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของ น้ำหนักแห้ง ยีสต์ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนจากบรรยากาศได้ จึงได้มาจากกรดอะมิโน เปปไทด์ เกลือไนเตรท และเกลือแอมมอเนียม ยีสต์ประมาณ 1 ใน 4 ใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อในห้องปฏิบัติการนิยมเติมแอมมอเนียมซัลเฟต ซึ่งจะเป็นได้ทั้งแหล่ง

ไนโตรเจน และซัลเฟอร์ ยีสต์บางชนิดไม่สามารถใช้ไนเตรทเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ เพราะการใช้ไนเตรททำให้เกิดไนไตรท์ (nitrite) ที่เป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นจึงแบ่งยีสต์ออกเป็นกลุ่มที่ใช้ไนเตรทได้ (nitrate positive) เช่น *Hansenula sp.* และกลุ่มที่ไม่สามารถใช้ไนเตรทได้ (nitrate negative) เช่น *Pichia sp.* นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ยีสต์ในกลุ่มเบสิดิโอมัยซีทัสจัดเป็น urease-positive ในขณะที่ยีสต์ในกลุ่มแอสโคมัยซีทัสจัดเป็น urease-negative

2.5 **ซัลเฟอร์** พบประมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์เพื่อนำมาใช้ในชีวสังเคราะห์ แหล่งซัลเฟอร์อาจมาจากสารประกอบที่มีซัลเฟอร์ เช่น ซัลเฟต (sulphate) ไธโอซัลเฟต (thiosulphate) เมไธโอนีน (methionine) กลูทาไธโอน (glutathione) และซัลไฟท์ (sulphite) โดยส่วนใหญ่มักเป็นเมไธโอนีน และกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ เพื่อนำมาใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม ในขณะเดียวกันซัลเฟอร์ก็จำเป็นต่อการสังเคราะห์เมไธโอนีน ซิสเทอีน กลูทาไธโอน โคเอนไซม์ เอ และไธอามีน เช่นเดียวกัน

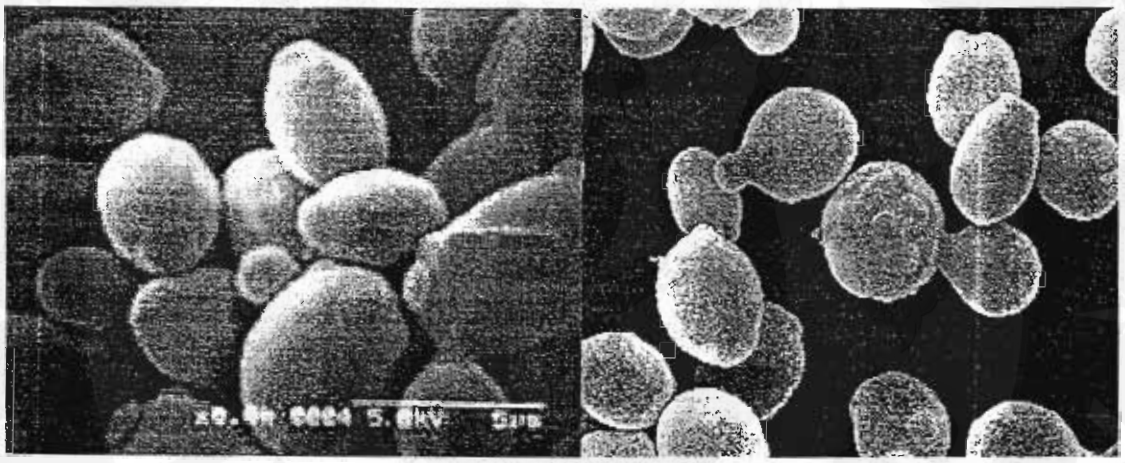
2.6 **ฟอสฟอรัส** เป็นส่วนประกอบของกรดนิวคลีอิก และฟอสโฟลิพิด สารอินทรีย์ฟอสเฟตที่พบในเซลล์ยีสต์มีประมาณ 3-5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักแห้ง โดยอยู่ในรูปของออร์โธฟอสเฟต (orthophosphate, H_2PO_4) ทำหน้าที่ที่เป็นซับสเตรทของเอนไซม์หลายชนิด ฟอสเฟตมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ช่วยในการสะสมพลังงาน และถ่ายทอดพลังงานภายในเซลล์

2.7 **แร่ธาตุต่าง ๆ** ได้แก่ โพแทสเซียม แคลเซียม แมกนีเซียม และเทรซเอเลเมนท์โพแทสเซียมมีคามสำคัญในการเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์ ไอออนของโพแทสเซียมจำเป็นต่อการรับฟอสเฟตเข้าสู่เซลล์ ช่วยในกระบวนการออกซิเดทีฟฟอสฟอไรเลชัน (oxidative-phosphorylation) ในชีวสังเคราะห์ของโปรตีน และเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต แคลเซียมช่วยการจับกันเป็นก้อน (flocculation) ของยีสต์ ควรเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมากกว่า 50 มิลลิกรัมต่อลิตร สำหรับแมกนีเซียมพบประมาณ 3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง มีความจำเป็นใน กระบวนการเมแทบอลิซึม ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ เช่น การทำงานของเอนไซม์ทรานส์ฟอสฟอไรเลชัน (transposphorylation enzyme) ขึ้นอยู่กับ Mg^{2+} จึงจะทำให้เกิดการสร้างพลังงานในรูป ATP แมกนีเซียมจึงจำเป็นต่อการเติบโตของยีสต์

แร่ธาตุที่เป็นเทรซเอเลเมนท์เป็นสารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโต แต่ต้องการในปริมาณน้อย ตัวอย่างเช่น สังกะสี ทองแดง และแมงกานีส ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ถ้า

ปริมาณสาร ดังกล่าวมากกว่า 100 μm จะมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโต พบประมาณ 1-2 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง

ถึงแม้ยีสต์บางชนิดเจริญได้ในน้ำเค็ม โซเดียมจึงน่าจะมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับยีสต์ประเภทนี้ แต่ไม่มีหลักฐานรายงานว่ายีสต์ต้องการโซเดียม ยีสต์ที่ทนเค็ม เช่น *debaryomyces Hansenii, Pichia miso* และ *Zygosaccharomyces rouxii* (ภาพ 18) มีกลไกในการควบคุมแรงดันออสโมซิส เพื่อให้เจริญได้ในสภาพที่มี NaCl สูงได้



(ก) (ข)

ภาพ 18 ตัวอย่างยีสต์ที่ทนเค็มได้ดี ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (ก) Debaryomyces hansenii (ข) Pichia miso

ที่มา : (ก) http://www.lip-sas.fr/levures_debaryomyces.html

(ข) http://genome.jgi-psf.jorg/Picst3/Picst3.home.html

2.8 **สารเร่งการเจริญหรือโกรฟ์แฟคเตอร์** (growth factor) เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ยีสต์ต้องการในระดับความเข้มข้นต่ำ เพื่อเสริมการทำงานของเซลล์ แต่ไม่ใช่เพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ตัวอย่างเช่น วิตามิน ใช้เป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ นอกจากนี้ยังมีพิวรีน ไพริมิดีน นิวคลีโอไซม์ (nucleoside) กรดอะมิโน กรดไขมัน สเทรอล และสารประกอบอื่น ๆ อีกหลายชนิด ยีสต์ไม่สามารถสังเคราะห์สารดังกล่าวได้เอง ดังนั้นจึ้งต้องเติมสารเหล่านี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัวอย่างของวิตามินที่ยีสต์ต้องการเช่น

2.8.1 ไบโอติน (biotin) ทำหน้าที่เป็นโคแฟคเตอร์ในปฏิกิริยา carboxylase-catalysed ยีสต์ที่ใช้ในกระบวนผลิตเบียร์ ได้ไบโอตินจากมอลท์ในขั้นแมชชิง (mashing) ซึ่งเป็นขั้นตอนการบดและคลุกเคล้าส่วนผสมในการผลิตเบียร์เข้าด้วยกัน และการเกิดคาร์บอกซิลเลชัน (carboxylation) ของกรดไพรูวิค การสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก โปรตีน และกรดไขมัน การขาดไบโอตินทำให้ยีสต์มีอัตราการตายสูง

2.8.2 กรดแพนโธทีนิก (panthotenic acid) ทำหน้าที่ร่วมกับโคเอนไซม์เอ ในปฏิกิริยาอะเซทีลเลชัน (acetylation) มีความจำเป็นต่อเมทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ การทำงานของเซลล์เมมเบรน ถ้าขาดกรดชนิดนี้จะทำให้เกิดการสะสมไฮโดรเจนซัลไฟด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์

2.8.3 กรดนิโคทินิก (nicotinic acid) ในรูปของนิโคทอนามาย (nicotinamide) ทำหน้าที่ร่วมในปฏิกิริยารีดอกซ์ (redox reaction) ได้แก่ปฏิกิกริยาออกซิเดชันและรีดักชัน

2.8.4 ไธอะมีน (thiamine) หรือวิตามินบี ในรูปของไธอะมีนไพโรฟอสเฟต(thiamine pyrophosphate) ช่วยในปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของ oxo-acid

2.8.5 อิโนซิทอล (inositol) จำเป็นต่อการแบ่งเซลล์ของยีสต์ ถ้าขาดจะทำให้อัตราเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตลดลง

รา (fungi)

เป็นสิ่งมีชีวิตหนึ่งซึ่งจัดอยู่ในอาณาจักรของรา (Kingdom Myceteae หรือ Fungi) โดยเฉพาะ เนื่องจากลักษณะการได้รับอาหารจากสิ่งแวดล้อมแตกต่างไปจากพืชและสัตว์ สำหรับราจัดเป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่ง (Microorganism) มีขนาดตั้งแต่เล็กมองด้วยตาเปล่าไม่เห็นต้องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ไปจนถึงขนาดใหญ่และมองเห็นได้ด้วยตาเปล่ายกเว้นส่วนของสปอร์ ราไม่มีคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll) จึงไม่สามารถใช้ประโยชน์จากแสงแดดมาสังเคราะห์เป็นอาหารได้เหมือนพืช แต่การได้รับอาหารของราคล้ายกับสัตว์ (Heterotroph) กล่าวคือจะได้รับสารอินทรีย์ (อาหาร) ที่เกิดขึ้นในสิ่งแวดล้อม ราได้รับอาหารจากภายนอกซึ่งเกิดจากการปลดปล่อยน้ำย่อย (Enzymes) ออกมาย่อยสลายวัสดุรองรับที่เป็นอาหาร (Substrate) ให้มีอนุภาคเล็กลงและง่ายต่อ

การดูดซับ (Absorb) จากรา ซึ่งลักษณะการดูดซับอาหารดังกล่าวนับเป็นพื้นฐานในการจัดจำแนกราออกมาอยู่ในอาณาจักรของตัวเอง ซึ่งอยู่รวมกันในกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีหลายเซลล์และมีผนังห่อหุ้มนิวเคลียส (Eukaryotic Muticellular Organisms) แต่ราได้รับอาหารจากการดูดซับ (Absortion) พืชได้รับอาหารจากการสังเคราะห์แสง (Photosynthesis) และสัตว์ได้รับอาหารโดยผ่านกระบวนการย่อยของตัวเอง (Ingestion)

โดยทั่วไปราจะได้รับอาหารจากการดูดซับสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ผนังเซลล์ของราส่วนใหญ่ประอบด้วยเซลลูโลส (Cellulose) และไคติน (Chitin) สปอร์จะงอกและเจริญเป็นเส้นสาย เป็นกลุ่มเส้นใย เป็นโคโลนีและพัฒนาไปเป็นโครงสร้างของราแตกต่างกันไปในแต่ละกลุ่ม เพื่อที่จะสร้างหน่วยสืบพันธุ์ของราให้สิ่งมีชีวิตอยู่รอดต่อไป ปกติการสืบพันธุ์ของรามี 2 ลักษณะ คือ การสืบพันธุ์โดยใช้เพศ (Telomorph หรือ Sexualreproduction หรือ Perfect stage)

ราขาว (White rot fungi)

จัดอยู่ใน Sub-division Basidiomycotina เป็น Sub-division ใหญ่ ที่รวมเอาราที่สร้าง Basidiospore ที่สร้างบนโครงสร้างที่เรียกว่า Basidium มีทั้งหมด 900 Genora 12,000 สปีชีย์ เช่น พวกเห็ดต่าง ๆ Puff Balls, Stink Horns, Rust, Smut และพวก Jelly Fungi ซึ่งเป็นพวกโบราณที่สุดในบรรดาพวก Basidiomycotina ด้วยกัน ราเหล่านี้มีความสำคัญพบว่ามีทั้งพวกที่เป็น Saprobe ดูดกินอาศัยอยู่บนเศษซากพืชและมูลสัตว์ บางพวกเป็นปรสิตของพืช เช่น พวกราสนิม (Rust) และพวกราเขม่าดำ (Smut) เข้าทำลายพืชเศรษฐกิจและบางพวกเข้าทำลายป่าไม้ แต่มีอีกหลาย ๆ ชนิดที่เป็นประโยชน์ เช่น พวก Mycorrhiza

ลักษณะสำคัญของราขาว

ราใน Sub-division นี้มีการสร้าง Basidium ที่มีรูปร่าง 2 แบบ คือ

1. Heterobasidium (Phragmobasidium) คือ Basidium ที่มีการแบ่งเป็นหลายส่วน โดยมีผนังกั้นหรือบางชนิดแบ่งเป็นลอนหรือพูนและมีหลายลอน

2. Holobasidium (Homobasidium) มีลักษณะ Basidium ตรงกันข้ามกับ Heterobasidium คือ ไม่มีการแบ่งเป็นส่วนและไม่มี Septate

โดย Basidium มีหน้าที่ คือ

- เป็นที่เกิดของขบวนการ Karyogamy และการแบ่งตัวแบบ Meiosis
- เป็นที่สร้างอาหารสะสม เช่น Glycogen, Fat และ Oil
- เป็นที่เกิดของ Basidiospore

Basidiospore เกิดนอก Basidium โดยมีก้านสั้น ๆ เรียกว่า Sterigma การปล่อย Basidiospore จาก Sterigma อาจเป็นแบบมีแรงดันหรือในบางกลุ่มปล่อยโดยไม่มีแรงดันก็ได้

การจำแนกหมวดหมู่ของราใน Sub-division Basidiomycotina จำแนกจากลักษณะการเจริญของ Basidiocarp ซึ่งบางชนิดอาจสร้างหรือไม่สร้างก็ได้ ลักษณะของ Basidium และวิธีการปล่อย Spore ของเชื้อแบ่งออกได้เป็น 3 Classes ดังนี้

1. Class Hemibasidiomycetes (Teliomycetes)
2. Class Hymenomycetes (White-rot Fungi)
3. Class Gasteromycetes

โดยในแต่ละคลาสมีลักษณะสำคัญ ดังนี้

1. Class Hemibasidiomycetes (Teliomycetes รากลุ่มนี้สร้าง Basidium โดยไม่มี Basidiocarp ห่อหุ้ม Basidium เกิดจากเซลล์ที่ผนังหนา ซึ่งอาจเป็นเซลล์ที่ปลายเส้นใยก็ได้ เซลล์ผนังหนาเหล่านี้ คือ Chlamy Dospore หรือ Teliospore

2. Class Hymenomycetes ราในกลุ่มนี้สร้าง Basidium จากปลายเส้นใย Basidiospore ปล่อยออกจาก Sterigma โดยมีแรงดัน มีชั้นของ Hymenium ปิดอยู่ เมื่อแก่ชั้น Hymenium จะเปิดออก แล้วปล่อยสปอร์ออกไป รากลุ่มนี้จะสร้าง Basidiospore

3. Class Gasteromycetes สร้าง Basidium จากปลายเส้นใยเช่นเดียวกับ Class Hymenomycetes แต่มีสปอร์แก่ชั้น Hymenium จะปิดตลอดเวลาและจะถูกหุ้มโดย Basidiocarp ที่เชื้อสร้างขึ้น การปล่อยสปอร์เป็นแบบไม่มีแรงดัน

ลักษณะโครงสร้าง (Somatic Structure)

ราใน Sub-division นี้มีเส้นใยที่เจริญได้ดี มีผนังกั้นเจริญอยู่ระหว่างอาหารต่าง ๆ สามารถสังเกตเห็นได้ง่ายเมื่อมีความชื้น เช่น ตามไม้ผุ เปลือกไม้เน่า อาจพบว่าบางชนิดมีเส้นใยรวมกันแน่นลักษณะคล้ายเชือกผูกรองเท้า ซึ่งเรียกลักษณะแบบนี้ว่า Rhizomorph

เส้นใยมี 3 ระยะด้วยกัน คือ

1. Primary mycelium (1° Mycelium) เป็นเส้นใยที่งอกออกจาก Basidiospore มีนิวเคลียสเพียง 1 อัน หรือหลายนิวเคลียสก็ได้ แต่แบ่ง Haploid number หรือ Homokaryon แต่ลักษณะ Homokaryon นี้จะเกิดในช่วงสั้น ๆ แต่ในบาง Species จะสร้างผนังกั้น ตั้งแต่เริ่มแรก ทำให้ 1° Mycelium เป็น Uninucleate คือมีนิวเคลียสเพียง 1 อันต่อ 1 เซลล์

2. Secondary Mycelium (2° Mycelium) ส่วนใหญ่มักจะเกิด 1° Mycelium 2 เส้นที่ต่างชนิดกันมารวมกัน ทำให้เกิดเซลล์ที่มี Binucleate Nucleus 2 ชนิดอยู่ด้วยกันแต่ไม่รวมกันหรือเรียกว่า Dikaryon (n+n)

3. Tirtiary Mycelium เป็น Dikaryotic Mycelium (n+n) หรือ 2° Mycelium นั่นเอง แต่รวมตัวกันแน่นเพื่อสร้างเป็น Fruiting Body หรือดอกเห็ด (Basidocarp)

Class Hymenomycetes

มีวิวัฒนาการต่ำที่สุด ส่วนใหญ่สร้าง Basidiocarp Basidia อาจแบ่งเป็น 4 Segmant หรือไม่แบ่งก็ได้ ปล่อยสปอร์แบบมีแรงดันแบ่งเป็น 2 Subclass คือ

1. Sub-class Phragmobasidiomycetidae

สร้าง Basidia บนแต่ละ Basidial Segment มี 4 ส่วน อาจแบ่งได้ตามขวางและตามยาว แบ่งได้เป็น 3 Orders คือ

- Order Tremellales
- Order Auriculariales
- Order Septobasidiales

2. Sub-class Holobasidiomycetidae

แบ่งได้เป็น 3 Order คือ

- Order Exobasidiales ไม่สร้าง Basidiocarp
- Order Aphyllophorales (Polyporales) Basidiocarp แข็ง
- Order Agaricales Basidiocarp อ่อนนุ่ม

Order Agaricales

ราใน Order นี้การเจริญของ Basidiocarp มีขอบเขตจำกัด (Determinated Growth) Hymenium เกิดอยู่บนส่วนของ Gill ด้านล่างของ Basidocarp ปล่อยสปอร์แบบมีแรงดัน แบ่งราใน Order Agaricales ออกเป็น 5 Family คือ

1. Family Cantharellaceae
2. Family Paxillacae
3. Family Boletaceae
4. Family Russulaceae
5. Family Agaricaceae

Family Cantharellaceae

Basidiocarp ลักษณะ Funnel-Shaped จัดเป็น Gymnocarpic Basidiocarp ลักษณะ Hymenium มีตั้งแต่เรียบจนถึงขรุขระ (Smoot&Wringkled)

ไม่เจริญเป็น Gill หรือ Lamella Hymenium เจริญแบบ Dichotomously Branch Gill-Like Ridge ถือว่าเป็นพวกที่ Primitive ที่สุดในพวก Order Agaricales เพราะไม่สร้าง Gill เช่น *Craterellus, Cantharellus*

Family Boletaceae

Basidiocarp อ่อนนุ่ม ลักษณะคล้ายทรงร่ม Stalk แยกจาก Pileus ชัดเจน Hymenium อยู่ในรู (Pores) ไม่เป็น Gill มีทั้งเป็นพิษและกินได้ Basidiocarp เน่าเปื่อยผุพังได้รวดเร็ว เช่น *Boletus sp., Boletinus sp., Strobilomyces sp., Tylopilus sp.*

Family Russulaceae

มี Structure ที่เรียกว่า Sphaerocysts ลักษณะเป็น Hyphal Segment กระจายอยู่ทั่วไปปนกับ Hypha อื่น ๆ Basidiospore หนาเป็นรอยที่ผนังเรียก 2° Thickening Spore จะให้ Amylo Reaction ดำรงชีวิตเป็น Mycorrhiza กับรากพืชชั้นสูง เช่น *Lactarius* ภายใน Basidiocarp มีสารเหนียวเรียก Latex เป็นสารเหลว ๆ ซึ่งเมื่อ Hypha แตกขาด Latex จะไหลออกมา Hypha พวกนี้เรียก Lactiferous Hypha Latex อาจไม่มีสีจนกระทั่งมีสีอื่นๆ เช่น เหลือง แดง หรือเขียว ซึ่งมีความสำคัญต่อทาง Taxomomy มาก, *Lactarius Deliciosis* นำมาประกอบอาหารได้, *Lactarius spp* ทำให้เกิดโรคท้องเดิน, *Russula* ไม่มี Latex มีสีสดใส Stalk หนามาก มีพิษ เช่น *Russula emetica*

Family Agaricaceae

สร้าง Basidiocarp ที่อ่อนนุ่มจนกระทั่งเหนียว ก้าน Stalk ติดแน่นกับ Pileus ไม่พบ Sphaerocysts จัดเป็น Family ใหญ่มีหลาย Genus มีทั้งชนิดที่นำมาประกอบอาหารได้และเป็นพิษต่อมนุษย์อย่างรุนแรง

Genus ต่าง ๆ ที่พบใน Family Agaricaceae เช่น

Pleurotus Ostreatus - Oyster Mushroom พบตามตอไม้ อยู่ข้ามฤดูในรูปของ Chlamydospore แล้วสร้างดอกเห็ดเมื่ออากาศชื้น Basidiocarp แบบหิ้ง อาจมีก้าน (Shelf Like) อาจมีก้าน (Stalk Or Stripe) อยู่ตรงกลางหรือเป็นแบบ Eccentric Stripe คือ Stripe ไม่อยู่ตรงกลาง อาจเอียงไปด้านใดด้านหนึ่งก็ได้ Basidiocarp สีขาวนวล หรือสีน้ำตาล

Armillari Mellea - Honey Mushroom เป็นปรสิตกับพืชหลายชนิด ทำให้ต้นไม้ตายได้โดยเข้าทำลาย Cortex Cell มักพบ Basidiocarp เจริญอยู่บริเวณโคนต้น เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ Basidiocarp สีขาว Stripe แบบ Decurrent อ่อนนุ่มใช้เป็นอาหารได้ สามารถอยู่ในดินได้หลายปีในรูปของ 2° Mycelium

Aanita เป็นเห็ดที่มีพิษร้ายแรง ลักษณะ Basidiospore สีขาว Basidiocarp มีครบทุกส่วน Stripitate, Volva, Annulus Ring อาจเห็นได้ไม่ชัด เพราะฝังตัวอยู่ในดิน หรือสลายตัวอย่างรวดเร็วเช่น *A.muscaria* - Fly agaric ลักษณ Pilius สีแดง มี Cuticle เหนียวเป็นเมือก มี Scale บนหมวก โคนมักโตแล้วค่อย ๆ เรียวขึ้นไปทางด้านบน เข้าใจว่าสารพิษมีอยู่เฉพาะที่ Cuticle เท่านั้น ลักษณะที่เป็นเมือกเพื่อใช้ล่อแมลงวัน

A.verna - Destroying Angel หมวกลักษณะโค้ง ถึงแบนสีขาวล้วน เมื่อเปียกจะหนืด ภายในต้นกลวง ชอบเจริญอยู่ตามแหล่งที่มีอินทรียวัตถุมาก

Coprinus - Inky Cap Mushroom สร้างสปอร์สีดำ Basidiocarp แบบ Stripitate Pilius ลักษณะโค้งไม่กางออก มีวิวัฒนาการในการปล่อยสปอร์โดยเมื่อสปอร์แก่ซึ่งจะแก่ไม่พร้อมกันจะแก่จากปลายสุดของ Lamella ก่อน เมื่อสปอร์แก่จะเกิดการย่อยสลายตัวเอง (Autodigestion) ของ Lamella ค่อย ๆ สลายตัวขึ้นไปทีละน้อย ส่วนที่ถูกย่อยสลายจะกลายเป็นหยดน้ำหลุดออกไปและมีสปอร์ติดไปด้วย เมื่อแห้งจะปลิวไปกับลมหรือไปกับน้ำ จะเกิดซ่นนี้จนกระทั่งหมดดอก เป็นการค่อย ๆ ปล่อยสปอร์ออกไปเรื่อยๆ วิธีการปล่อยสปอร์แบบนี้มีวิวัฒนาการสูงที่สุด

ความสัมพันธ์ระหว่างยีสต์กับฟังไจ

อาจอาศัยร่วมกันแบบภาวะพึ่งพากัน*(mutualism)* เช่น ยีสต์ *Pichia pini, Hansenula capsulate* และ *H. holstii* อาศัยอยู่รวมกับพวก*Ceratocytis montia* และ *Europhium clavigerum* ที่เป็นฟังไจที่ย้อมติดสีน้ำเงิน *(blue-stain fungi)* พบตามบริเวณรอยแผลของต้นสนในอเมริกาเหนือที่ถูกด้วงปีกแข็งทำลาย ยีสต์บางชนิดเป็นโฮสท์ของฟังไจ โดยเชื้อราในกลุ่มเบสิดิโอมัยโคตา*(basidiomycota)* บริเวณซากไม้ผุ เป็นปรสิตในเซลล์ยีสต์ *Candida, Cryptococcus, Pichia,Rhodotorula* และ *Sporidiobolus* ทอกซินจากเชื้อรา (mycotoxin) บางชนิดยับยั้งการเจริญของยีสต์เช่น trichothecene mycotoxin และ deoxynivalenol (DON) ที่ผลิตจากรา *Fusarium sp.* พบปนเปื้อนในมอลท์ และบาร์เลย์ ยับยั้งการเจริญของยีสต์ ที่ใช้ในการผลิตเบียร์ ในอัตราความเข้มข้น 50 ug/mlในขณะเดียวกันสารที่ผลิตจากคิลเลอร์ยีสต์ ยับยั้งการเจริญของฟังไจที่ทำให้เนื้อไม้ผุ หรือฟังไจที่ ก่อโรคในพืช จึงมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมพืชจากเชื้อราโดยวิธีชีวภาพ (biological contriol) เช่นสารจากยีสต์ *Debaryomyces hansenii* และ *Candida guilliermondii* ใช้ป้องกันเชื้อรา *Penicillium digitatum* ที่ก่อโรคในองุ่น

ลักษณะทั่วไปของน้ำกากส่า

น้ำกากส่าเป็นของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการผลิตสุราและแอลกอฮอล์ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิต โดยน้ำกากส่านี้ มีค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 4.1 – 4.7 อุณหภูมิสูงมากกว่า $40^{\circ}C$ ค่า COD 90,000 – 130,000 มิลลิกรัม/ลิตร ค่า BOD 29,000 – 45,000 มิลลิกรัม/ลิตร และนอกจากนี้ยังมีสีน้ำตาลเข้มถึงดำเป็นที่น่ารังเกียจและกำจัดได้ยาก ซึ่งเกิดขึ้นในขั้นตอนของการกลั่นแยกเอาสุราหรือแอลกอฮอล์ออกจากน้ำหมักของเครื่องกลั่นสุราหรือแอลกอฮอล์ โดยในน้ำกากส่ามีค่าองค์ประกอบต่าง ๆ ดังนี้

ตาราง 2 คุณลักษณะของน้ำกากส่า

คุณลักษณะ	ค่าโดยประมาณ	หน่วย
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	4.1-4.7	-
อุณหภูมิ (Temperature)	>40	องศาเซลเซียส
ค่าซีโอดี (COD)	90,000-130,000	มิลลิกรัม/ลิตร
ค่าบีโอดี (BOD)	29,000-45,000	มิลลิกรัม/ลิตร
สารที่แขวนลอย (Suspended Solids)	14,000	มิลลิกรัม/ลิตร
ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total Solids)	75,000-110,000	มิลลิกรัม/ลิตร
ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (Total-N)	2,000-2,400	มิลลิกรัม/ลิตร
ฟอสเฟต (PO_3^{3-}-P)	85-200	มิลลิกรัม/ลิตร
โพแทสเซียม (K)	2,500-10,000	มิลลิกรัม/ลิตร
ซัลเฟต (SO_4^{-2})	3,000-5,000	มิลลิกรัม/ลิตร
ปริมาตรน้ำกากส่าจากการผลิต	800-1,200	ลูกบาศก์เมตร/วัน

ที่มา : ธีรนุช (2539)

ตาราง 3 องค์ประกอบของน้ำกากส่าที่ทำให้แห้งแล้ว

องค์ประกอบ	เปอร์เซ็นต์
แร่ธาตุต่าง ๆ (Mineral matter)	28.5 – 29.0
น้ำตาลคอปเปอร์รีดิวซ์ (Sugar (copper reducing substances))	10.0 – 12.0
โปรตีน (Protein)	8.0 – 10.0
กรดระเหยง่าย (Volatile acids)	1.0 – 2.0
Gums	19.0 – 20.0
กรดแลคติก (Combined lactic acid)	4.0 – 5.0
กรดอินทรีย์ (Other combine organic acid)	1.0 – 2.0
กลีเซอรอล (Glycerol)	5.0 – 6.0
(ขี้ผึ้งและอื่น ๆ) Wax, phenolic bodies, lignin, glucoside, etc.	12.0 – 22.0

ที่มา : Underkofler *et al.* (1954)

ถึงแม้ว่าจะไม่มีมาตรฐานกำหนดสีของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่แน่นอน แต่น้ำทิ้งจากโรงงานสุราหรือน้ำกากส่าเมื่อปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อมแล้วทำให้สีของแหล่งน้ำที่รองรับมีค่าความสกปรกเพิ่มขึ้นและมีสีเข้มขึ้น

สีน้ำตาลเข้มของน้ำกากส่า

สีในกากน้ำตาลหรือน้ำกากส่าเกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการที่ใช้ในการแปรรูปกากน้ำตาลที่ใช้อุณหภูมิสูง ซึ่งทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในกากน้ำตาล เช่น

1. Caramelization คือปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับเกลือแอมโมเนียมหรือแอมโมเนียที่อุณหภูมิ 100-140 องศาเซลเซียส
2. Browning Reaction หรือ Maillard Reaction คือปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลรีดิวซ์กับสาร Amino-Carbonyl หรือเรียกว่า Amino-Corbonyl Reaction
3. ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ Phenol กับสารประกอบอะมิโนหลังจากPolymerization ที่อุณหภูมิสูง
4. ปฏิกิริยาของ Polyphenol โดยเอนไซม์
5. การออกซิไดส์โดยตนเองของ Lipid หลังจาก Polymerization ที่อุณหภูมิสูงหรือทำปฏิกิริยากับสารประกอบอะมิโน

จากกระบวนการต่าง ๆ เหล่านี้ข้างต้น ทำให้เกิดสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ และทำให้กากน้ำตาลมีรสขม

สีน้ำตาลเข้มในน้ำกากส่าส่วนใหญ่เกิดจากสารเมลานอยดิน ซึ่งสามารถทำการสังเคราะห์ขึ้นได้ในห้องทดลอง โดยทำการผสมระหว่างกลูโคส 1 โมลาร์ ไกลซีน 1 โมลาร์ และสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 0.5 โมลาร์ ละลายในน้ำ 1 ลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ปรับความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 7 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มอล จากนั้นทำการกรองด้วยอุลตราฟิลเตอร์ (Ultrafilter UK-10 และ UK-1) สารละลายเมลานอยดินที่สังเคราะห์ได้จะมีมวลโมเลกุลอยู่ในช่วง 1,000-10,000 นอกจากนี้ทำให้เป็นผงหรือใช้วิธีแข็งแห้ง (lyophilized) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทดลองลดความเข้มสีของน้ำกากส่าได้ Sirianuntapiboon *et al.* (1990)

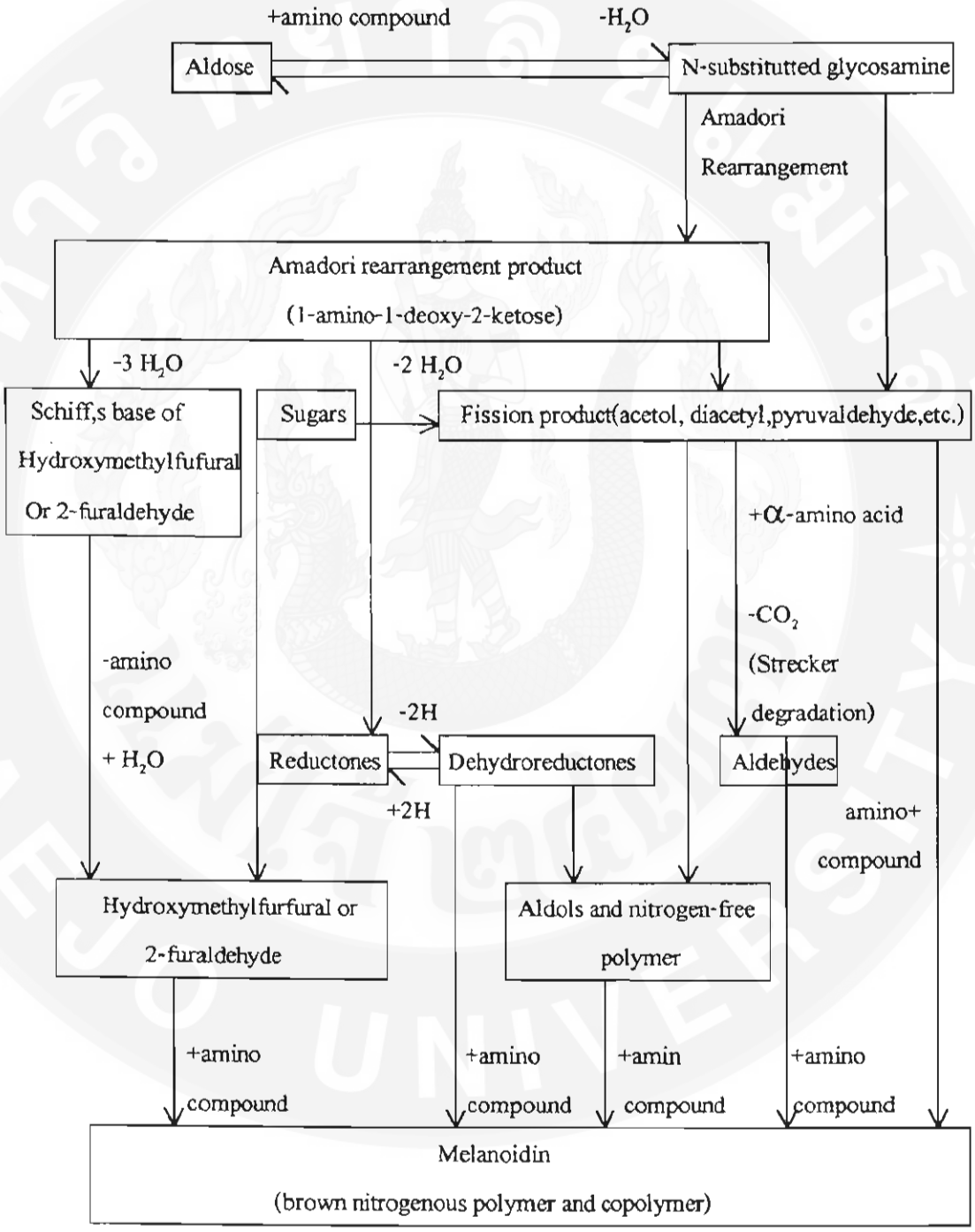
สารเมลานอยดินเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่เกิดจากการรวมตัวกันของน้ำตาลรีดิวซ์กับสารประกอบที่มีกลุ่มอะมิโนอิสระ (Free Amino Group) อย่างเช่น กรดอะมิโน (AminoAcid),

อามีน (Amine) และโปรตีน ในปฏิกิริยา Maillard Reaction ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการสูญเสียคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไป Maillard Reaction ประกอบด้วยโครงข่ายของปฏิกิริยาที่ซับซ้อนและเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการการแปรรูปอาหาร โดยเฉพาะในกระบวนการแปรรูปอาหารที่มีความร้อนเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยและในการเก็บรักษา Maillard Reaction ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงด้านกลิ่น สี และมีความเป็นไปได้ที่จะก่อให้เกิดเป็นสารพิษ

เคมีของปฏิกิริยาของ Maillard Reaction ได้ทำการศึกษามากกว่า 50 ปี โดยมีโครงสร้างของปฏิกิริยาซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน (ก) ขั้นต้น (The Early stage) ประกอบด้วยการรวมตัว (Formation) และการกำจัด (Degradation) ของ N-Substitutted Glycosamine เพื่อกลายเป็นผลิตภัณฑ์ที่ผ่านการจัดเรียงตัวใหม่ หรือผลิตภัณฑ์ที่แตกตัวออกไป (ข) ขั้นก้าวหน้า (The Advance Stage) ประกอบด้วยการกำจัด (Degradation) ของผลิตภัณฑ์ที่มีการจัดเรียงตัวใหม่ (ค) ขั้นสุดท้าย (The Final Stage) เป็นขั้นตอนที่ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นก้าวหน้ารวมตัวกับสารประกอบอะมิโนกลายเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีสีน้ำตาลนั่นก็ คือเมลานอยดิน

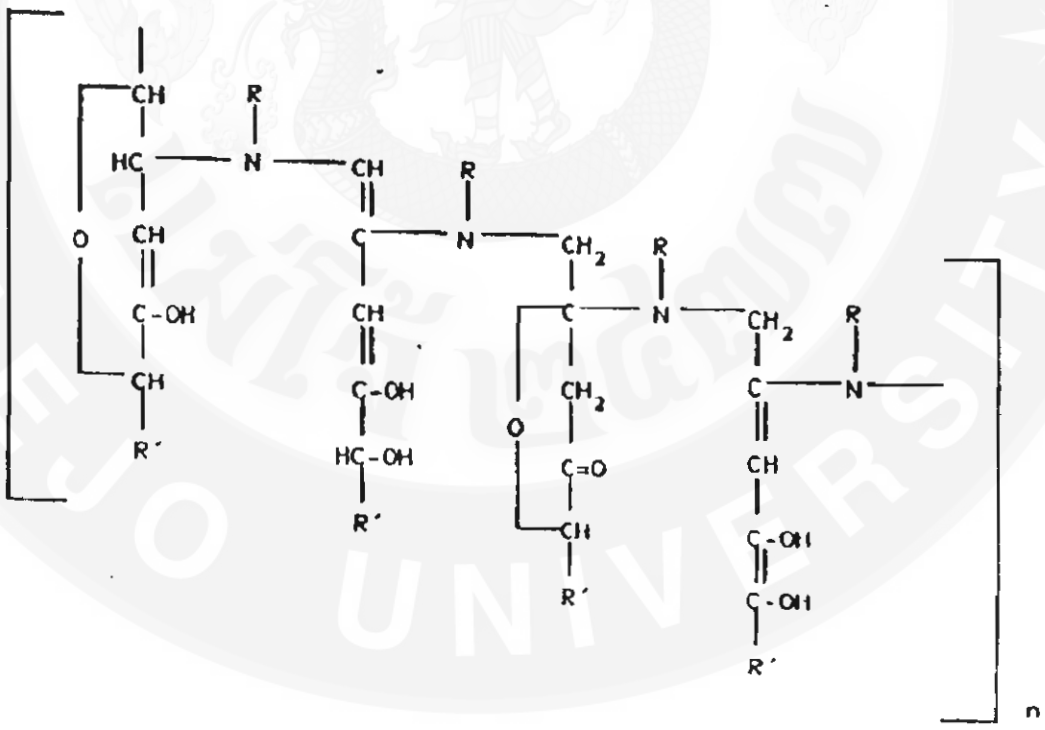
เมลานอยดินเป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงมาก เมลานอยดินมีโครงสร้างที่สารประกอบเป็นยูนิตต่อกันไป จากการศึกษาด้วย Nuclear Magnetic Resonance (NMR) เมลานอยดินที่เตรียมจากกลูโคสและไกลซีนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ทำให้พบสารประกอบคาร์บอนที่เป็นสายอิ่มตัว (Saturated Aliphatic Carbon) มาก พบสารประกอบคาร์บอนที่ไม่อิ่มตัวหรือสารประกอบคาร์บอนที่เป็นวง (Unsaturated or Aromatic Carbon) และสารประกอบคาร์บอนิลหรือหมู่คาร์บอกซิล (Carbonyl or Carboxyl Group) ในจำนวนน้อยกว่า ในการศึกษาแยกของปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับระบบไซโลส-ไลซีนที่อุณภูมิ 22, 68 และ 100 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าสัดส่วนของ Non-Dialysable Meterial ที่เกิดขึ้น (Membane Cut-Off 12,000 Da) เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น จะพบหมู่เมธิล (Methy Group) ในทุกชุดอุณหภูมิที่ทำปฏิกิริยา แต่พบความแตกต่างของคุณสมบัติทางเคมีที่แปรผันตามอุณหภูมิ ที่ 22 องศาเซลเซียส จะเกิดเมลานอยที่สามารถละลายน้ำได้ที่มีลักษณะเป็นวง และสารประกอบคาร์บอนอิ่มตัวน้อยที่สุด พบสายคาร์บอนี่มีหลายชนิดกันเกิดหมู่คาร์บอนิลและมีอัตราส่วนระหว่างไนโตรเจนกับคาร์บอนสูงกว่าเมลานอยดิน

ที่เตรียมที่อุณหภูมิสูงกว่า เพราะเมลานอยดินที่เตรียมที่อุณหภูมิสูงจะเกิดการสูญเสียไนโตรเจน เนื่องจากการระเหย



ภาพ 19 แผนผังการเกิดปฏิกิริยาของ Maillard Reaction

เมลานอยดินที่เตรียมจากกลูโคสกับไกลซีนจะมีน้ำหนักโมเลกุลมากถึง 16,000 ดาล ตัน และพบว่า C_1 บางส่วนของกรดอะมิโนจะสูญเสียไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ โดยที่ C_1ของไกลซีนจะเข้ารวมเป็นเมลานอยดินโดยเป็นคาร์บอกซิลหรือหมู่คาร์บอนิล C_2 ของไกลซีนจะ ถูกใช้เป็นหมู่เมธิลที่ถูกแทนที่ ส่วนเมลานอยดินที่เตรียมจากกลูโคสกับอะลานีน C_1 และ C_2 ของกรดอะมิโนจะถูกรวมกลายเป็นคาร์บอกซิลคาร์บอน และอะมิโนคาร์บอนที่ถูกแนที่ตามลำดับเมลานอยดินที่เตรียมจากกูลโคสและเมทไธโอนีนจะมีไนโตรเจนและกำมะถันรวมเข้าไปด้วย และกลายเป็นหมู่เมธิลที่ถูกแทนที่ ในทางตรงข้าม งานวิจัยในญี่ปุ่นแสดงให้เห็นว่าเมลานอยดินจากกลูโคสกับไกลซีน C_1 ของน้ำตาลจะถูกรวมเข้าไปได้หลายแบบ $C^1H_3CH_2$-, C^1H_3CO-, C^1H(Hหรือ OH) = C=, HOOC- CH_2-NH C^1H=, HOOC- CH_2-N= C^1H-, -N- C^1O- และ H C_1O แสดงว่าโมเลกุลของน้ำตาลเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเรื่อย ๆ ในขณะเกิดเป็นสีน้ำตาล



ภาพ 20 A Possible Repeating Unit of Melanoidin

แหล่งที่มาของน้ำกากส่า

ในการผลิตสุรานั้นจะต้องใช้วัตถุดิบในการผลิตคือกากน้ำตาลและข้าวเหนียว โดยนำมาหมักในถังหมักในอัตราความเข้มข้นที่เหมาะสม พร้อมกับใส่เชื้อยีสต์หรือเชื้อหมัก สารเคมีที่จำเป็น เมื่อหมักได้นาน 48 ชั่วโมง เชื้อยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ (เอทิลแอลกอฮอล์) 51.1 เปอร์เซ็นต์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาล ดังสมการ

$$nC_6H_{12}O_6 \text{ ---------- } 2nC_2H_5OH + 2nCO_2$$

hexose ethanol gas

แต่ในทางปฏิบัติประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลเหล่านี้เท่านั้นที่จะเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ นอกนั้นจะถูกยีสต์นำไปใช้ในการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่น

การแยกเอาแอลกอฮอล์ออกจากของเหลวรวมทำได้โดยใช้วิธีกลั่น เพราะจุดเดือดของแอลกอฮอล์อยู่ที่อุณหภูมิ 78.5 องศาเซลเซียส แต่ของเหลวอื่น ๆ หรือน้ำจะมีอุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส โดยใช้ไอน้ำแยกเอาแอลกอออล์ออกในขั้นตอนการกลั่นจะมีน้ำกากส่าทิ้งประมาณ 9.5 ลูกบาศก์เมตรของแอลกอฮอล์ 95 ดีกรี มีสำน้ำตาลไหม้ น้ำกากส่าอีกส่วนหนึ่งได้จากการล้างถังหมัก

น้ำเสียจากโรงงานสุราแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. น้ำเสียประเภทเจือจาง ได้แก่ น้ำเสียที่มีอุณหภูมิสูง น้ำล้างขวด น้ำล้างพื้น น้ำเสียที่มีอุณหภูมิสูง ได้แก่ น้ำจากการพ่นเข้า (Blow Down) เครื่องกำเนิดไอน้ำ และน้ำที่ใช้สำหรับหล่อเย็น มีอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จะถูกนำไปรวมยังบ่อพักน้ำร้อน และถูกปั๊มไปฉีดสเปรย์ที่บ่อ Polishing เพื่อลดอุณหภูมิ และเพิ่มการละลายของออกซิเจนในน้ำให้แก่น้ำ น้ำที่สเปร์แล้วจะมีอุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส ส่วนน้ำล้างขวดและน้ำโสโครกอื่น ๆ ได้จากการล้างขวดเก่า และขวดใหม่ น้ำจากการล้างเรซิ่นของเครื่องทำน้ำบริสุทธิ์ และน้ำที่ใช้ภายในโรงงาน น้ำทิ้งจากการ

ล้างขวดจะมีผง เศษฉลากต่างๆ ติดไปด้วย การกำจัดจะใช้ตะแกรงกรองเศษออกก่อน น้ำล้างขวดจะมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 7.2 และค่าบีโอดี 30 มิลลิกรัมต่อลูกบาศก์เมตร สำหรับวิธีการบำบัดจะนำไปเจือจางน้ำกากส่า

2. น้ำเสียประเภทเข้มข้น ได้แก่ น้ำกากส่า ซึ่งได้มาจากเครื่องกลั่นสุรา มีความเข้มข้นของสารอินทรีย์สูง เช่น น้ำตาลต่าง ๆ อาทิ ซูโครส กลูโกส ฟรุกโตส และราฟฟิโนส น้ำกากส่าที่ได้จะ มีสีน้ำตาลเข้ม

การแก้ไขปัญหาน้ำกากส่า ไชยยุทธ (2524)

1. การนำไปใช้ประโยชน์ (Utilization)

การใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์และในการผลิตปุ๋ยอินทรีย์ แต่ต้องใช้เงินลงทุนสูงมาก จึงไม่เหมาะสมที่จะใช้กับโรงงานที่มีขนาดเล็ก และนอกจากนี้ผลผลิตที่ได้ยังมีปัญหาเรื่องตลาดอีกด้วย ส่วนการใช้ประโยชน์ที่ง่ายกว่า เช่น การนำไปผสมกับอินทรียวัตถุเพื่อทำเป็นปุ๋ยหมัก การนำไปใช้ในไร่นาโดยตรง ส่วนการนำไปใช้ปรับสภาพถนนลูกรังนั้นมีข้อจำกัดเรื่องค่าขนส่งน้ำกากส่า แหล่งอินทรียวัตถุ (ถ้านำไปทำปุ๋ย) และการเสื่อมคุณภาพของดิน (ถ้านำไปใช้ในไร่นาโดยตรง) ข้อจำกัดเหล่านี้ทำให้การแก้ปัญหาน้ำกากส่าโดยการนำไปใช้ประโยชน์ดังกล่าวข้างต้นเป็นได้เพียงมาตรการระยะสั้น ๆ เท่านั้น ไม่เป็นการแก้ปัญหาที่ได้ผลในระยะยาว ดังนั้นการแก้ปัญหาระยะยาวจึงต้องมุ่งไปที่การกำจัด

2. การกำจัดน้ำกากส่า

2.1 การเผา (Incineration)

คือ การนำน้ำกากส่ามาระเหยน้ำออกแล้วเผาทิ้ง การระเหยเป็นกระบวนการที่รู้จักและใช้ได้ผลดีตามโรงงานอุตสาหกรรมทั่วไป สามารถใช้บำบัดของเสียได้ทั้งที่อยู่ในรูปของของเหลว สารอินทรีย์ สารอนินทรีย์ ที่มีของแข็งแขวนลอยหรือของแข็งที่ละลายน้ำหรือของเหลวที่ละลายน้ำ ทั้งนี้ของเสียนั้นต้องมีองค์ประกอบชนิดหนึ่งที่ทำให้ระเหยไปไม่ได้ กระบวนการและเครื่องมือสำหรับให้ความร้อนแก่ของเสีย คล้ายกับที่ใช้ในกระบวนการกลั่น ผิดกันที่ไม่ได้ทำการแยก และเก็บไอน้ำไว้เท่านั้น เครื่องระเหยนี้จะให้ความร้อนด้วยไอน้ำที่ควบแน่นแล้ว โดยให้ไหล

ผ่านท่อที่ภายนอกของท่อมีของเสีย (น้ำกากสา) ไหลผ่านไอน้ำที่ใช้มักเป็นชนิดความดันต่ำ และต้มของเหลวภายใต้ความดันที่ต่ำกว่าบรรยากาศ ทำการเคี่ยวน้ำกากส่าให้งวดจนมีเนื้อของแข็ง 60 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงพ่นเข้าในห้องเผาไหม้ที่มีอุณหภูมิสูงประมาณ 1,000 องศาเซลเซียส ที่ความดันบรรยากาศ

2.2 **การทิ้งให้ย่อยสลายในบ่อหมัก** (Anaerobic Lagoon)

บ่อนี้จะเป็นบ่อปิดที่มีความลึกตั้งแต่ 3 เมตร เพื่อป้องกันออกซิเจนไม่ให้ละลายลงไปถึงส่วนล่างของบ่อ โดยทั่วไปเป็นบ่อดิน และนิยมใช้ในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม

2.3 **การย่อยสลายด้วยวิธีทางชีวภาพ** (Biological Fermentation)

คือ การหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ วิธีนี้เป็นวิธีที่ได้ก๊าซมีเทนเป็นผลพลอยได้ อาจแบ่งได้ 3 ขั้นตอน คือ

ก. หมักเพื่อให้ได้ก๊าซมีเทน

ข. ขั้นตอนในการทำลายค่าบีโอดีหรือซีโอดีที่เหลือให้ต่ำลงโดยการเติมอากาศซึ่งจะใช้ระบบตะกอนเร่ง หรือวิธีอื่นตามความเหมาะสม

ค. ขั้นตอนการทำลายสี และการทำให้ใส

2.4 **การระเหย** (Evaporation)

วิธีนี้มักใช้ทดลองกับน้ำกากส่าที่มีปริมาณน้อย ๆ โดยการเคี่ยวในกระทะขนาดใหญ่ที่มีปล่องระบายควันออก วิธีนี้ต้องใช้พลังงานมาก โดยน้ำกากสา 1 ลูกบาศก์เมตรจะต้องใช้น้ำมันเตาถึง 28 ลิตร คิดเป็นเงิน 126 บาท จะทำให้มีความเข้มข้นขึ้น 20 เท่าจากเดิม และน้ำกากส่าเข้มข้นนี้จะนำไปใช้เป็นปุ๋ยทางการเกษตรได้ดี

2.5 **การหมักในถังไร้อากาศ** (Anaerobic Digestion) **และกระบวนการเติมอากาศเลี้ยงตะกอน** (Activated Sludge Process)

คือ การนำน้ำกากส่ามาหมักในถังหมักชีวภาพ เพื่อให้ได้ก๊าซมีเทนมาใช้แทนน้ำมันเตา จากนั้นจึงนำน้ำกากส่าดังกล่าวไปบำบัดด้วยกระบวนการเติมอากาศแบบเลี้ยงตะกอน แต่น้ำกากส่าที่ผ่านการบำบัดแล้วยังมีสีเข้มอยู่และมีค่าบีโอดีสูงกว่าที่กำหนดไว้ในมาตรฐานน้ำทิ้งของกระทรวงอุตสาหกรรมและระบบการกำจัดนี้ค่อนข้างจะซับซ้อน ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญควบคุมการทำงานของระบบ แต่ใช้เนื้อที่ในการจัดการน้อย วิธีการนี้เคยมีการสร้างที่โรงงานสุรา จังหวัดภูเก็ต และโรงงานสุราไทยทำจังหวัดนนทบุรีแล้ว โดยการหมักน้ำกากส่าในถังหมักชีวภาพ เพื่อให้ได้ก๊าซมีเทนมาใช้แทนน้ำมันเตา ซึ่งจะคุ้มทุนใน 3-5 ปี ปริมาณของก๊าซมีเทนที่ได้ประมาณ 20 ลิตร ผลประโยชน์จากการหมักในถังไร้อากาศนี้ เมื่อหักค่าใช้จ่ายแล้วเป็นเงินตอบแทนประมาณ 80 บาทต่อน้ำกากส่า 1 ลูกบาศก์เมตร น้ำกากส่าที่ผ่านการหมักนี้แล้ว จะมีค่าบีโอดีลดลงประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะต้องนำไปบำบัดโดยกระบวนการผลิตอากาศเลี้ยงตะกอน ซึ่งค่าใช้จ่ายสูงมาก คือประมาณ 100-200 บาทต่อน้ำกากส่า 1 ลุกบาศก์เมตร อย่างไรก็ตามน้ำกากน่าที่ผ่านการกำจัดโดยกระบวนเติมอากาศเลี้ยงตะกอนยังมีสีเข้มอยู่ และมีค่าบีโอดีสูงเกินกว่าที่กำหนดไว้ในมาตรฐานน้ำทิ้งของกระทรวงอุตสาหกรรม และระบบการกำจัดนี้ค่อนข้างจะซับซ้อน ต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญควบคุมการทำงานของระบบ แต่ใช้เนื้อที่น้อย

2.6 **การตากแห้งและการระเหยบนดินแบบ** Storage Lagoon **และ** Land Apliication

วิธีนี้จะใช้เพียงแสงแดด สายลมในการช่วยระเหยน้ำออกจากผิวหน้าในพื้นที่แผ่ขนาดใหญ่คล้ายการทำนาเกลือ โดยวิธีการตากแห้งและระเหยบนดินแบบ Storage Lagoon และ Land Application นี้จะทำเฉพาะฤดูแล้งเท่านั้น ดังนั้นระบบนี้จึงจำเป็นต้องมีบ่อเก็บกักน้ำเสียเพื่อให้เก็บกักน้ำเสียทั้งหมดในฤดูฝน Land Applocation นี้จะทำเฉพาะฤดูแล้งเท่านั้น ดังนั้นระบบนี้จึงจำเป็นต้องมีบ่อเก็บกักน้ำเสียเพื่อให้เก็บกักน้ำเสียทั้งหมดในฤดูฝน

วิธีการตากแห้งและระเหยบนดินแบบ Storage Lagoon และ Land Application นี้อาจมีข้อเสียอยู่บ้างตรงที่มีปัญหากลิ่นในบ่อเก็บกักตอนแรก ๆ โดยเฉพาะในบ่อ Storage Lagoon ซึ่งเป็นบ่อรับน้ำกากส่าที่มีฤทธิ์เป็นกรด ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.1 ดังนั้น เมื่อน้ำกากส่าสดถูกปล่อยลงในบ่อน้ำ จะเกิดปฏิกิริยารุนแรงทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง เพราะบ่อแรกนี้ทำหน้าที่เป็นบ่อหมัก (Anaerobic Lagoon) และปัญหากลิ่นจากการสลายตัวของแอมโมเนียและซัลเฟตอย่างรวดเร็ว จึงทำให้กลิ่นฉุนบ้างในบ่อนี้ เมื่อผ่านการสลายตัวไปบ้างแล้วในบ่ออื่น ๆ เช่น บ่อที่ 2, บ่อที่ 3, และลานตากที่ 1, 2 และ 3 ต่างก็มีค่าซีโอดีลดลงไปเรื่อย ๆ จาก 120,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็น 60,000มิลลิกรัมต่อลิตร ในบ่อสุดท้ายที่ 4 และเป็น 9,000 มิลลิกรัมต่อลิตรในลานตากจนไม่มีกลิ่น วิธีการแก้วิธีหนึ่งคือ นำน้ำกากส่าจาก Land Application กลับเข้าไปผสมกับน้ำกากส่าในบ่อเก็บกักที่ 1 ซึ่งจะลดปัญหากลิ่นได้มากที่สุด

การใช้จุลินทรีย์ในการบำบัดน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์

Miranda *et al.* (1996) ได้ทำการศึกษาการกำจัดสีของน้ำกากส่าโดยใช้ เชื้อรา *Aspergillus niger* พบว่าสามารถกำจัดสีของน้ำกากส่าได้ 69 เปอร์เซ็นต์ และลดค่า COD ได้ 75 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครส 10 กรัมต่อลิตร, NH_4NO_3 1.8 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 1 กรัมต่อลิตร และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร ลงไปในน้ำกากส่า ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงได้ 4 วัน ในระบบการหมักแบบ batch

Benito *et al.* (1997) ได้ทำการศึกษาการกำจัดสีของของเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์หรือน้ำกากส่าโดยใช้เชื้อรา *Trametes versicolor* พบว่าสามารถกำจัดสีของน้ำกากส่าได้ 82 เปอร์เซ็นต์ ลดค่า COD ได้ 77 เปอร์เซ็นต์ และสามารถลดแอมโมเนียมไนเตรทได้ 36 เปอร์เซ็นต์ เมื่อมีการเติมน้ำตาลซูโครส 3 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 1.0 กรัมต่อลิตร ลงไปในน้ำกากส่า ที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 ในระบบการหมักแบบ batch

Nakajima-Kambe *et al.* (1999) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการกำจัดสีของน้ำกากส่าภายใต้สภาวะที่ใช้อุณหภูมิสูง (thermophilic) และไม่ใช้อากาศ (anaerobic) จากตัวอย่างดิน พบว่าสายพันธุ์ MD-32 ซึ่งทำการทดสอบสายพันธุ์แล้วว่าเป็นเชื้อ

แบคทีเรียในจีนัส *Bacillus* และมีความใกล้เคียงกับ *Bacillus smithii* โดย *Bacillus* sp. สามารถกำจัดสีในน้ำกากส่าได้ 35.5 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 20 วัน ที่อุณหภูมิ 55°C ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic) แต่เชื้อดังกล่าวจะไม่สามารถกำจัดสีได้ในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic) และยังได้ทำการศึกษาอนุภาคของน้ำกากส่าในช่วงความเข้มข้นที่ให้ผลในการกำจัดสีสูงสุด คือ ช่วงที่มีการกำจัดสี 15 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 2 วัน โดยใช้วิธี filtration chromatography พบว่าการกำจัดสีที่เกิดขึ้นไม่เพียงแต่จะเป็นการลดขนาดของโมเลกุลขนาดเล็กเท่านั้น แต่ยังเกิดกับโมเลกุลขนาดใหญ่ด้วย

Jiminez *et al.* (2003) ได้ทำการศึกษาวิธีการกำจัดน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลที่ได้จากหัวบีทที่ผ่านการเจือจาง 50 เปอร์เซ็นต์ และมีค่า COD 82 กรัมต่อลิตร โดยการใช้ระบบการบำบัดแบบใช้อากาศ (aerobic) และไม่ใช้อากาศ (anaerobic) เริ่มจากระบบการบำบัดแบบใช้อากาศ (aerobic) ซึ่งใช้เชื้อรา 4 สายพันธุ์ คือ *Penicillium* sp., *Penicillium decumbens*, *Penicillium lignorum* และ *Aspergillus niger* แล้วพบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถกำจัดสีของน้ำกากส่าได้ตั้งแต่วันแรก และเพิ่มสูงสุดในวันที่ 4 โดย *Penicillium decumbens* สามารถกำจัดสีได้สูงสุด คือ 40 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถลดสาร phenolic ได้ในเวลาเดียวกัน และมีค่าเฉลี่ยของการลดสาร phenolic อยู่ที่ 70 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังสามารถลดค่า COD ได้โดยเชื้อ *Penicillium* sp. และ *Penicillium decumbens* สามารถลดได้ 52.1 และ 50.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับในวันที่ 5 ของการหมัก ส่วนในระบบการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ (anaerobic) ที่ใช้จุลินทรีย์พวก mesophilic ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบกันระหว่างน้ำกากส่าที่ผ่านการบำบัดด้วย *Penicillium decumbens* จากระบบการบำบัดแบบใช้อากาศ (Aerobic) กับน้ำกากส่าที่ไม่ผ่านการบำบัด แล้วพบว่าน้ำกากส่าที่ผ่านการบำบัดด้วย *Penicillium decumbens* จากระบบการบำบัดแบบใช้อากาศ (aerobic) เมื่อเข้าสู่ระบบการบำบัดแบบไม่ใช้อากาศ (anaerobic) จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดสีให้สูงขึ้น ลดเวลาและเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัด COD จาก 90 เปอร์เซ็นต์ เป็น 96.5 เปอร์เซ็นต์

Sirianuntapiboon *et al.* (2004) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ 205 สายพันธุ์จากตัวอย่างผลไม้ของประเทศไทย พบว่ายีสต์สายพันธุ์ WR-43-6 มีความสามารถในการกำจัดสีสูงสุด คือ 68.91 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°C ในวันที่ 8 ของการเพาะเลี้ยงในน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีการเติมกลูโคส 2.0 เปอร์เซ็นต์, โซเดียมไนเตรท 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ KH_2PO_4 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการปรับค่า pH ให้เท่ากับ 6 เมื่อทำการจำแนกเชื้อยีสต์ดังกล่าวแล้วพบว่าคือ *Citeromyces* sp. และเมื่อนำไปทดสอบกับน้ำกากส่าที่ได้จากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ก็ยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดสีที่สูง โดยมีค่าประสิทธิภาพของการกำจัดสี, ค่าประสิทธิภาพของการลดซีโอดี และค่าประสิทธิภาพของการลดบีโอดี เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์, เกือบ 100 เปอร์เซ็นต์ และ 76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของการกำจัดสีในระบบการให้อาหารแบบต่อเนื่อง ที่มีการเติมน้ำกากส่าใหม่ลงไปครั้งละ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อ *Citeromyces* sp. WR-43-6 สามารถลดความเข้มสีได้ 60-70 เปอร์เซ็นต์ ในระยะเวลาตั้งแต่ 8 วันขึ้นไป และเมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพในการกำจัดสีในระบบการให้อาหารแบบแทนที่พบว่าเชื้อ *Citeromyces* sp. WR-43-6 สามารถลดความเข้มสีได้ 75 เปอร์เซ็นต์ และคงประสิทธิภาพนี้ไว้ได้ใน 4 รอบ ของการเติมน้ำกากส่าใหม่ลงไปครึ่งหนึ่งต่อการเอาน้ำกากส่าเก่าออกครึ่งหนึ่ง

Sirianuntapiboon *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษา acetogenic bacteria จำนวน 170 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ NO.BP103 สามารถกำจัดสีได้สูงสุด คือ 76.4±3.2 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 30°C ในวันที่ 5 ของการเพาะเลี้ยงในน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีการเติมกลูโคส 3.0 เปอร์เซ็นต์, yest extract 0.5 เปอร์เซ็นต์, KH_2PO_4 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ที่มีการปรับค่า pH 6 เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดสีในน้ำกากส่าที่ออกมาจากเครื่องกลั่นแอลกอฮอล์และน้ำกากส่าที่ผ่านระบบการบำบัดน้ำเสียแบบไม่ใช้อากาศ (anaerobic) ที่มีการเติมกลูโคส 3.0 เปอร์เซ็นต์, yest extract 0.5เปอร์เซ็นต์, KH_2PO_4 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ $MgSO_4.7H_2O$ 0.05เปอร์เซ็นต์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ NO.BP103 สามารถกำจัดสีได้ 32.3±3.2 เปอร์เซ็นต์ และ 73.5±3.5เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ถ้าไม่มีการเติมสารอาหารประสิทธิภาพในการกำจัดสีจะอยู่ที่ 9.75±3.0เปอร์เซ็นต์ และ 44.36±3.4เ ปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดสีในระบบการให้อาหารแบบแทนที่พบว่า

แบคทีเรียสายพันธุ์ NO.BP103 สามารถลดความเข้มสีได้ 72.0±3.2-84.0±3.2 เปอร์เซ็นต์ และคงประสิทธิภาพนี้ไว้ได้ใน 6 รอบของการเปลี่ยนอาหาร (เป็นเวลา 30 วัน) และยังสามารถลดค่า BOD และ COD ได้ 58.5±6.4-82.2±7.1 เปอร์เซ็นต์ และ 35.5±0.42-71.2±0.58 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการกำจัดสีในระบบการให้อาหารแบบต่อเนื่อง สามารถลดความเข้มสีได้ 30.0±2.1-45.0±3.5 เปอร์เซ็นต์

Raghukuma *et al.* (2004) ได้ทำการศึกษาการกำจัดสีน้ำตาลของเมลานอยดิน (melanoidin) และการกำจัดสารพิษในน้ำกากส่าที่ได้จากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้เชื้อราในกลุ่ม whit-rot fungi คือ *Flavadon flavus* ที่คัดแยกได้จากทะเล ด้วยวิธีการตรึงเซลล์ความเข้มข้น 10เปอร์เซ็นต์ กับ polyurethane foam พบว่า *Flavadon flavus* สามารถกำจัดสีได้ 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 และ 7 ตามลำดับ และสามารถกำจัด polycyclic aromatic hydrocarbon ซึ่งเป็นสารพิษในน้ำกากส่าให้ลดลงได้ 68 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 5 และจากการศึกษาด้วย gel filtration chromatography พบว่าอนุภาคของสีในน้ำกากส่าถูกทำให้หายไป

อุปกรณ์และวิธีการ

1. **ตัวอย่างดินบริเวณโรงงานสุรา น้ำกากส่า และผลไม้เน่าที่นำมาแยกเชื้อยีสต์**

1.1 ตัวอย่างดินบริเวณโรงงานสุรา จาก

- โรงงานสุรา จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 1 ตัวอย่าง
- โรงงานสุรา จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 1 ตัวอย่าง
- โรงงานสุรา จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 1 ตัวอย่าง

1.2 ตัวอย่างน้ำกากส่า จาก

- โรงงานสุรา จังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 2 ตัวอย่าง
- โรงงานสุรา จังหวัดสุพรรณบุรี จำนวน 2 ตัวอย่าง
- โรงงานสุรา จังหวัดฉะเชิงเทรา จำนวน 2 ตัวอย่าง

1.3 ตัวอย่างผลไม้เน่า จาก

- ตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 13 ตัวอย่าง

1.4 ตัวอย่างผลไม้ดอง จาก

- ตลาดในจังหวัดเชียงใหม่ จำนวน 2 ตัวอย่าง

2. **ตัวอย่างน้ำที่ใช้ในการทดลอง**

น้ำกากส่าจากโรงงานสุรา จังหวัดเชียงใหม่

3. **เชื้อราขาว และเชื้อยีสต์ที่นำมาใช้เป็นเชื้อทดสอบ** (indicator strains)

3.1 เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* TISTR5690 จากศูนย์จุลินทรีย์

3.2 เชื้อราขาว PKM 3 จากห้องปฏิบัติการทางสิ่งแวดล้อม ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้

4. อาหารที่ใช้สำหรับการคัดแยก เพาะเลี้ยง และทดสอบการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าของเชื้อยีสต์

4.1 อาหารแข็งสูตร MYGP

- Malt Extract (HIMEDIA Labolatories, India)
- Yeast Extract (HIMEDIA Labolatories, India)
- Peptone (HIMEDIA Labolatories, India)
- Glucose (Ajax Finechem, Austraria)
- วุ้น (Agar)
- น้ำกลั่น

4.2 อาหารเหลวสูตร MYGP

- Malt Extract
- Yeast Extract
- Peptone (HIMEDIA Labolatories, India)
- Glucose (Ajax Finechem, Austraria)
- น้ำกลั่น

4.3 อาหารแข็งสูตร MYGP+สีน้ำกากส่าสังเคราะห์

- Malt Extract (HIMEDIA Labolatories, India)
- Yeast Extract (HIMEDIA Labolatories, India)
- Peptone (HIMEDIA Labolatories, India)
- Glucose (Ajax Finechem, Austraria)
- วุ้น (Agar)
- สารละลายสีน้ำกากส่าสังเคราะห์

4.4 อาหารเหลวสูตร MYGP+สีน้ำกากส่าสังเคราะห์

- Malt Extract (HIMEDIA Labolatories, India)
- Yeast Extract (HIMEDIA Labolatories, India)
- Peptone (HIMEDIA Labolatories, India)
- Glucose (Ajax Finechem, Austraria)
- สารละลายสีน้ำกากส่าสังเคราะห์

5. อาหารที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อราขาว

5.1 อาหารแข็งสูตร PDA

- อาหารสำเร็จรูป PDA (HIMEDIA Labolatories, India).

5.2 อาหารเหลวสูตร PDB

- อาหารสำเร็จรูป PDB (HIMEDIA Labolatories, India)

6. สารเคมี

6.1 Acetic acid (Merk, Germany)

6.2 Conc. Sulfuric acid (Conc. H_2SO_4) (Ajax Finechem, Austraria)

6.3 Sodium acetate (Ajax Finechem, Austraria)

6.4 Emulsion oil (Merk, Germany)

6.5 Absolute ethanol (Merk, Germany)

6.6 Glycerol (Merk, Germany)

6.7 Conc. Hydrochloric acid (Conc. HCL) (Merk, Germany)

6.8 Sodium hydroxide (NaOH) (LAB-SCAN Analytical Sciences, Ireland)

6.9 เอธานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ (v/v)

6.10 น้ำแป้ง (soluble starch)

6.11 ชุดสีย้อมแกรม (gram's stain set) (Bio-Medical Laboratory, ประเทศไทย)

6.12 Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) (APS, Australia)

6.13 Silver sulfate ($AgSO_4$) (POCH, Poland)

6.14 1-10 Phenanthroline monohydrate ($C_{12}H_8N_2H_2O$) (Ajax Finechem, Austraria)

6.15 Ion sulfate heptahydrate ($FeSO_4.7H_2O$) (APS, Australia)

6.16 Ferrous ammonium sulfate hexahydrate ($Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$) (APS, Australia)

6.17 Sodium nitrate ($NaNO_3$) (Ajax Finechem, Austraria)

6.18 Urea ($(NH_2)_2CO$) (Ajax Finechem, Austraria)

6.19 Glycine ($C_2H_5NO_2$) (Ajax Finechem, Austraria)

6.20 Ribose (HIMEDIA Labolatories, India)

6.21 Arabinose (Fluka, Germany)

6.22 Fructose (Ajax Finechem, Austraria)

6.23 Galactose (Ajax Finechem, Austraria)

7. **เครื่องมือ**

7.1 สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectronic® GENESYS™ Spectrophotometer, USA)

7.2 เครื่องปั่นเหวี่ยง (BENCH Top Refrigerated centrifuge ยี่ห้อ Sanyo GLLENKAMP PLC รุ่น HARRIER 18/80, United Kingdom)

7.3 เครื่องปั่นเหวี่ยง (HETTICH รุ่น EBA 12R, Germany)

7.4 เครื่องชั่งไฟฟ้า 2 ตำแหน่ง (Digital Balance, ยี่ห้อ OHAUS)

7.5 เครื่องชั่งไฟฟ้า 4 ตำแหน่ง (Digital Balance, ยี่ห้อ OHAUS)

7.6 ตู้บ่ม (Oven, ยี่ห้อ Menmert, Germany)

7.7 ตู้บ่ม (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ, Binder GMBH รุ่น ED240(E2), USA)

7.8 ตู้อบเครื่องแก้ว (Standard Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED115(E2), USA)

7.9 ตู้อบเครื่องแก้ว (High Performance Lab Oven, ยี่ห้อ Binder GMBH รุ่น ED240(E2), USA)

7.10 ตู้เขี่ยเชื้อ (Horizontal type larminar flow, ยี่ห้อ Triwork 2000 รุ่น CLEAN H2-3, ประเทศไทย)

7.11 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส (Chest-type Ult Freezer, ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MDF-592, Japan)

7.12 หม้อฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave, ยี่ห้อ Hirayama รุ่น HVE-50, Japan)

7.13 กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบ (Compound Microscope, ยี่ห้อ Olympus รุ่น UM 500

7.14 พีเอชมิเตอร์ (pH/Ion/Conductivity, ยี่ห้อ WTW รุ่น PP50)

7.15 เครื่องเขย่า

7.16 โถดูดความชื้น

8. อุปกรณ์อื่น ๆ

8.1 หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 และ 25 x 150 มิลลิลิตร

8.2 ขวดรูปชมพู่ ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร

8.3 ขวดปรับปริมาตรขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

8.4 ขวด Duran ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

8.5 ขวด BOD ขนาด 300 มิลลิลิตร

8.6 บีกเกอร์ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

8.7 ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร

8.8 กระบอกตวงขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

8.9 ไมโครปิเปต ปรับปริมาตรได้ขนาด 0-20, 20-200 และ 100-1,000 มิลลิลิตร

8.10 Dialysis Membranes MWCO ขนาด 12,000-14,000

8.11 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)

8.12 เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

8.13 ตะเกียงแอลกอฮอล์

8.14 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

8.15 สไลด์ และกระจกปิดสไลด์

8.16 ไมโครปิเปตทิปส์

8.17 จุกยาง

8.18 แท่งแก้ว

8.19 ขวดน้ำกลั่น

8.20 ถาดสแตนเลส

วิธีการ

1. **การศึกษาคุณสมบัติและคุณลักษณะของน้ำกากส่า**

วิเคราะห์คุณสมบัติและคุณลักษณะของน้ำกากส่า 2 ประเภท คือ น้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น และน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมัก โดยมีขั้นตอนการวิเคราะห์ ดังนี้

1.1 **วิเคราะห์ค่า** Chemical Oxygen Demand (COD)

โดยวิธี Close Reflux APHA, AWWA and WPCF (2005)

1.2 **วิเคราะห์ค่า** Biochemical Oxygen Demand (BOD)

โดยวิธี Azide Modification APHA, AWWA and WPCF (2005)

1.3 **วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง** (pH)

โดยใช้เครื่อง pH meter

1.4 **วัดค่าความเข้มสีโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง** (Absorbant)

โดยวัดที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร Ueda (1983)

2. **การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสีน้ำกากส่า**

2.1 **การคัดแยกเชื้อยีสต์** ดัดแปลงจาก อาภรณ์ (2532)

คัดแยกเชื้อยีสต์จากตัวอย่างผลไม้เน่า ผลไม้ดอง น้ำกากส่า และดินบริเวณโรงงานสุรา โดยตัดชิ้นตัวอย่างหนัก 1 กรัม ใส่ลงในอาหาร MYGP Broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนน้ำให้ใช้ตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร แล้วทำตามวิธีการข้างต้น

2.2 **การทำให้เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้บริสุทธิ์**

ใช้ Loop จุ่มลงในอาหารเหลวจากข้อ 2.1 แล้วนำมา Streak ลงในอาหาร MYGP Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเก็บ Single Colony ของเชื้อยีสต์ที่เกิดขึ้นทั้งหมด จากนั้นนำเชื้อยีสต์ที่ได้ทั้งหมดไปแยกใหม่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเดิม เลือก

เก็บ Single Colony จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปเก็บไว้ในสารละลายกลีเซอรอลร้อยละ 20 ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.3 การเลือกเก็บเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสี

ใช้ Loop แตะเชื้อยีสต์ในสารละลายกลีเซอรอลร้อยละ 20 จากข้อ 2.2 แล้วนำมา Streak ลงในอาหาร MYGP Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมา Streak ลงในอาหาร MYGP Agar ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกเก็บ Single Colony ของเชื้อยีสต์ที่ทำให้สีของอาหารจางลง (Clear Zone) บริเวณภายใต้โคโลนีเชื้อ แล้วจึงเก็บเชื้อนี้ไว้ใน Slant อาหาร MYGP Agar

2.4 การทดสอบความสามารถในการลดความเข้มสีของเชื้อยีสต์

ดัดแปลงจาก ประภา (2543)

ใช้ Loop เขี่ยเชื้อยีสต์ที่เก็บไว้ใน Slant อาหาร MYGP Agar จากข้อ 2.3 มาเขี่ยลงในอาหาร MYGP Broth ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์ไปวัดค่าการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 nm ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 แล้วนำสารละลายเชื้อยีสต์ดังกล่าวมาเติมในปริมาตรร้อยละ 5 ต่ออาหาร MYGP Broth ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ปริมาตร 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 วัน เมื่อครบกำหนดเวลาในแต่ละช่วง ให้นำมาวิเคราะห์ด้วยการนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย Acetate Buffer 0.1 โมลาร์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดความเข้มสีของเชื้อยีสต์แต่ละไอโซเลต

2.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มสีของเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสี ได้แก่

2.5.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

2.5.1.1 ใช้ Loop เขี่ยเชื้อยีสต์ที่ทดสอบแล้วว่าสามารถลดความเข้มสีได้สูงสุดจากข้อ 2.4 มาเขี่ยลงในอาหาร MYGP Broth ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์ไปวัดค่าการเจริญด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 660 nm ให้มีค่าเท่ากับ 0.5 แล้วนำสารละลายเชื้อยีสต์ดังกล่าวมาเติมในปริมาตรร้อยละ 5 ต่อสารละลายสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ คือ ไรโบส, อะราบิโนส, ฟรุกโตส, กาแลกโตส และกลูโคส ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน เขย่าในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

2.5.1.2 เมื่อครบกำหนดเวลาในแต่ละช่วง ให้นำน้ำเลี้ยงเชื้อยีสต์จากข้อ 2.5.1.1 มาวิเคราะห์ด้วยการนำมาปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วนำส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วย Acetate Buffer 0.1 โมลาร์ จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 475 นาโนเมตร แล้วคำนวณเปอร์เซ็นต์การลดความเข้มสีของเชื้อยีสต์แต่ละช่วงเวลา

2.5.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 แต่จะใช้แหล่งไนโตรเจนแทนแหล่งคาร์บอน ได้แก่ Urea, Peptone, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ และ Yeast Extract ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์

2.5.3 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

ทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 2.5.1 แต่ใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุด และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น คือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0

2.5.4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

นำสารละลายเชื้อยีสต์เติมลงในสารละลายสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) เริ่มต้น ที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุด ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 25 x 150 มิลลิเมตร โดยใช้เชื้อเริ่มต้นปริมาณร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 8 และ 10 เขย่าในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

2.6 **การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสีของน้ำกากส่าในสภาวะที่เหมาะสม**

นำสารละลายเชื้อยีสต์มาเติมในปริมาตรร้อยละที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุดต่อสารละลายสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และค่าความเป็นกรด- ด่าง (pH) เริ่มต้น ที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุด ในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 วัน เขย่าในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที

3. **การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราขาว PKM 3 ในการลดความเข้มสีของน้ำกากส่า**

3.1 **น้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น**

นำน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น ซึ่งผ่านการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 475 nm ให้มีค่าเท่ากับ 3.5 มาใช้แทนสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งส่วนที่ 1 เติมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) สำหรับส่วนที่ 2 ไม่มีการเติมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) จากนั้นเติมเชื้อราขาว PKM 3 ลงไปในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นทั้ง 2 ส่วนโดยตัดเส้นใยของเชื้อราขาว PKM 3 ที่เจริญในอาหาร Potato

Dextrose Agar (PDA) เติมลงไปส่วนละ 2 ชิ้น แล้ววิเคราะห์หาค่าความเข้มสีของน้ำกากส่า ค่าซีโอดี และค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ทุก 2 วัน จนกว่าค่าความเข้มสีของน้ำกากส่าคงที่

3.2 น้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมัก

ทำการทดลองเช่นเดียวกับน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นในข้อ 3.1 แต่ใช้น้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักแทน

4. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราขาว PKM 3 ร่วมกับเชื้อยีสต์ NG-06 ในการลดความเข้มสีของน้ำกากส่า

4.1 น้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น

นำน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น ซึ่งผ่านการลดความเข้มสีด้วยเชื้อราขาว PKM 3 มาแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 เติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้น ที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุด สำหรับส่วนที่ 2 ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และไม่มีการปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) เริ่มต้น จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ NG-06 ลงไปในน้ำกากส่าดังกล่าวทั้ง 2 ส่วนโดยเติมในปริมาณที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุด แล้ววิเคราะห์หาค่าความเข้มสีของน้ำกากส่า ค่าซีโอดี และค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) ทุก 2 วัน จนกว่าค่าความเข้มสีของน้ำกากส่าคงที่

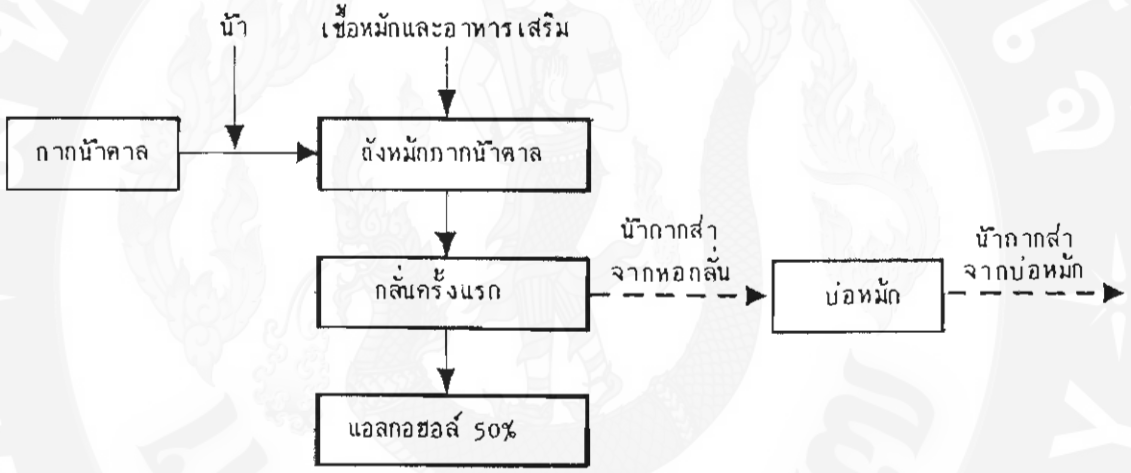
4.2 น้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมัก

ทำการทดลองเช่นเดียวกับน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นในข้อ 4.1 แต่ใช้น้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักซึ่งผ่านการลดความเข้มสีด้วยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วแทน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การศึกษาคุณสมบัติและคุณลักษณะของน้ำกากส่า

เมื่อนำตัวอย่างน้ำกากส่าทั้ง 2 ประเภท คือ น้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น และน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมัก (ภาพ 21) มาวิเคราะห์ค่า Chemical Oxygen Demand (COD) ค่า Biochemical Oxygen Demand (BOD) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าความเข้มสี พบว่า ค่า COD ค่า BOD และค่าความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำกากส่าจากบ่อหมัก มีค่าน้อยกว่าน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น ส่วนค่าความเข้มสีมีค่ามากกว่า (ตาราง 4)



ภาพ 21 กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล

ที่มา : ดัดแปลงจาก สุจินต์ (2525)

ตาราง 4 การวิเคราะห์คุณลักษณะของน้ำกากส่า

คุณลักษณะ	น้ำกากส่าจากหอกลั่น	น้ำกากส่าจากบ่อหมัก	หน่วย
ค่าซีโอดี (COD)	162,000	156,000	มิลลิกรัม/ลิตร
ค่าบีโอดี (BOD)	47,997	41,247	มิลลิกรัม/ลิตร
ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)	4.91	4.26	-
ความเข้มสี (OD 475 nm)	118	134	-

2. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสีน้ำกากส่า

2.1 การคัดแยกเชื้อยีสต์

เมื่อนำตัวอย่างผลไม้เน่า ผลไม้ดอง น้ำกากส่า และดินบริเวณโรงงานสุรา จำนวน 24 ตัวอย่าง มาคัดแยกเชื้อยีสต์ พบว่า สามารถคัดแยกเชื้อยีสต์ได้ทั้งหมด 136 ไอโซเลต โดยตัวอย่างดินบริเวณบ่อบำบัดเชียงใหม่คัดแยกเชื้อยีสต์ได้ 18 ไอโซเลต ตัวอย่างดินบริเวณบ่อบำบัดฉะเชิงเทราคัดแยกเชื้อยีสต์ได้ 13 ไอโซเลต ตัวอย่างน้ำกากส่าจากเครื่องกลั่นเชียงใหม่ 15 ไอโซเลต ตัวอย่างน้ำกากส่าจากเครื่องกลั่นสุพรรณบุรี 4 ไอโซเลต ตัวอย่างน้ำกากส่าจากบ่อบำบัดเชียงใหม่ 3 ไอโซเลต ตัวอย่างน้ำกากส่าจากบ่อบำบัดฉะเชิงเทรา 8 ไอโซเลต ตัวอย่างน้ำกากส่าจากบ่อบำบัดสุพรรณบุรี 16 ไอโซเลต และไม่สามารถแยกเชื้อยีสต์ได้จากตัวอย่างน้ำกากส่าจากเครื่องกลั่นฉะเชิงเทรา และตัวอย่างดินบริเวณบ่อบำบัด สุพรรณบุรี (ตาราง 5)

ตาราง 5 เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

ลำดับ	แหล่งที่แยก	จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อ
1	ดินบริเวณบ่อบำบัดเชียงใหม่	18	CMS-01, CMS-02, CMS-03, CMS-04, CMS-05, CMS-06, CMS-07, CMS-08, CMS-09, CMS-10, CMS-11, CMS-12, CMS-13, CMS-14, CMS-15, CMS-16, CMS-17 และ CMS-18
2	ดินบริเวณบ่อบำบัดฉะเชิงเทรา	13	CSS-01, CSS-02, CSS-03, CSS-04, CSS-05, CSS-06, CSS-07, CSS-08, CSS-09, CSS-10, CSS-11, CSS-12 และ CSS-13

ตาราง 5 เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ (ต่อ)

ลำดับ	แหล่งที่แยก	จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อ
3	น้ำกากส่าจากเครื่องกลั่นเชียงใหม่	15	CMD-01, CMD-02,CMD-03, CMD-04, CMD-05,CMD-06, CMD-07, CMD-08,CMD-09, CMD-10, CMD-11,CMD-12, CMD-13, CMD-14 และ CMD-15
4	น้ำกากส่าจากเครื่องกลั่นสุพรรณบุรี	4	SPD-01, SPD-02, SPD-03 และ SPD-04
5	น้ำกากส่าจากบ่อบำบัดเชียงใหม่	3	CMT-01, CMT-02 และ CMT-03
6	น้ำกากส่าจากบ่อบำบัดฉะเชิงเทรา	8	SST-01, SST-02, SST-03, SST-04, SST-05, SST-06, SST-07 และ SST-08
7	น้ำกากส่าจากบ่อบำบัดสุพรรณบุรี	11	SPT-01, SPT-02, SPT-03, SPT-04 , SPT-05, SPT-06, SPT-07, SPT-08, SPT-09, SPT-10, SPT-11, SPT-12, SPT-13, SPT-14, SPT-15 และ SPT-16
8	มะปราง	4	MP-01, MP-02, MP-03 และ MP-04

ตาราง 5 เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ (ต่อ)

ลำดับ	แหล่งที่แยก	จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อ
9	ละมุด	8	LM-01, LM-02, LM-03, LM-04, LM-05, LM-06, LM-07 และ LM-08
10	แคนตาลูป	6	CLT-01, CLT-02, CLT-03, CLT-04, CLT-05 และ CLT-06
11	เงาะ	8	NG-01, NG-02, NG-03, NG-04, NG-05, NG-06, NG-07 และ NG-08
12	มะละกอ	4	MLG-01, MLG-02, MLG-03 และ MLG-04
13	ส้มโอเชี่ยน	3	OCO-01, OCO-02 และ OCO-03
14	ส้มเขียวหวาน	2	KWO-01 และ KWO-02
15	สาลี่	4	SL-01, SL-02, SL-03 และ SL-04
16	ฝรั่ง	6	FR-01, FR-02, FR-03, FR-04, FR-05 และ FR-06
17	มะไฟ	1	MF-01
18	มะม่วง	5	MM-01, MM-02, MM-03. MM-04 และ MM-05

ตาราง 5 เชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ (ต่อ)

ลำดับ	แหล่งที่แยก	จำนวนไอโซเลต	รหัสเชื้อ
19	สัปปะรด	5	SPR-01, SPR-02, SPR-03, SPR-04 และ SPR-05
20	แก้วมังกร	1	KMG-01
21	ลูกท้อดอง	1	LTD-01
22	มะยมดอง	1	MYD-01

2.2 การเลือกเก็บเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสี

เมื่อนำเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างผลไม้เน่า ผลไม้ดอง น้ำกากส่า และดินบริเวณโรงงานสุรา จำนวน 136 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการลดความเข้มสีในอาหารแข็งสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ พบว่า เชื้อยีสต์ จำนวน 19 ไอโซเลต ทำให้สีของอาหารจางลง (Clear Zone) บริเวณภายใต้โคโลนีของเชื้อ ได้แก่ เชื้อยีสต์รหัส LM-04, NG-06, MLG-03, FR-05, MM-02, MM-03, CMS-05, CMS-06, CMS-08, CMS-10, CMS-15, CMS-16, CSS-12, CSS-13, SPD-04, CST-01, CST-03, CST-05 และ SPT-14 (ตาราง 6) (ภาพ 22)

ตาราง 6 การเกิดวงใส (Clear Zone) ของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ในอาหารแข็งสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์

ลำดับ	แหล่งที่แยก	รหัสเชื้อ	การเกิด Clear Zone
1	ละมุด	LM-04	+
2	เงาะ	NG-06	+
3	มะละกอ	MLG-03	+
4	ฝรั่ง	FR-05	+
5	มะม่วง	MM-02	+
6	มะม่วง	MM-03	+
7	ดินบริเวณบ่อบำบัดเชียงใหม่	CMS-05	+
8	ดินบริเวณบ่อบำบัดเชียงใหม่	CMS-06	+
9	ดินบริเวณบ่อบำบัดเชียงใหม่	CMS-08	+
10	ดินบริเวณบ่อบำบัดเชียงใหม่	CMS-10	+
11	ดินบริเวณบ่อบำบัดเชียงใหม่	CMS-15	+
12	ดินบริเวณบ่อบำบัดเชียงใหม่	CMS-16	+
13	ดินบริเวณบ่อบำบัดฉะเชิงเทรา	CSS-12	+
14	ดินบริเวณบ่อบำบัดฉะเชิงเทรา	CSS-13	+
15	น้ำกากส่าจากเครื่องกลั่นสุพรรณบุรี	SPD-04	+

+ หมายถึง เชื้อยีสต์ทำให้สีของอาหารแข็งสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์จางลงซึ่งเกิดขึ้นบริเวณใต้โคโลนี

ตาราง 6 การเกิดวงใส (Clear Zone) ของเชื้อยีสต์ที่คัดแยกได้จากแหล่งต่าง ๆ ในอาหารแข็งสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ (ต่อ)

ลำดับ	แหล่งที่แยก	รหัสเชื้อ	การเกิด Clear Zone
16	น้ำกากส่าจากบ่อบำบัดฉะเชิงเทรา	CST-01	+
17	น้ำกากส่าจากบ่อบำบัดฉะเชิงเทรา	CST-03	+
18	น้ำกากส่าจากบ่อบำบัดฉะเชิงเทรา	CST-05	+
19	น้ำกากส่าจากบ่อบำบัดสุพรรณบุรี	SPT-14	+

+ หมายถึง เชื้อยีสต์ทำให้สีของอาหารแข็งสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์จางลงซึ่งเกิดขึ้นบริเวณใต้โคโลนี

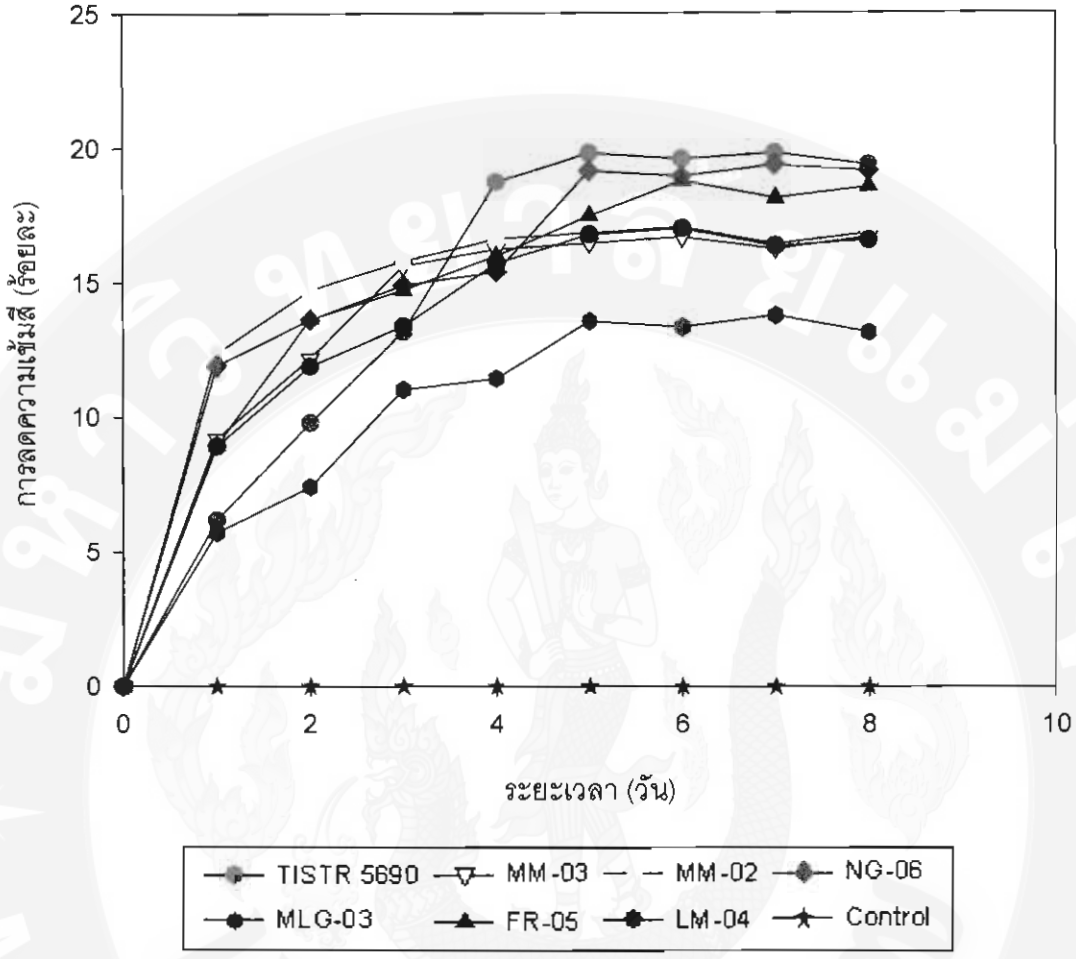
ภาพ 22 การเกิดวงใส (Clear Zone) ของเชื้อยีสต์ NG-06 ในอาหารแข็งสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์

2.3 การทดสอบความสามารถในการลดความเข้มสีของเชื้อยีสต์

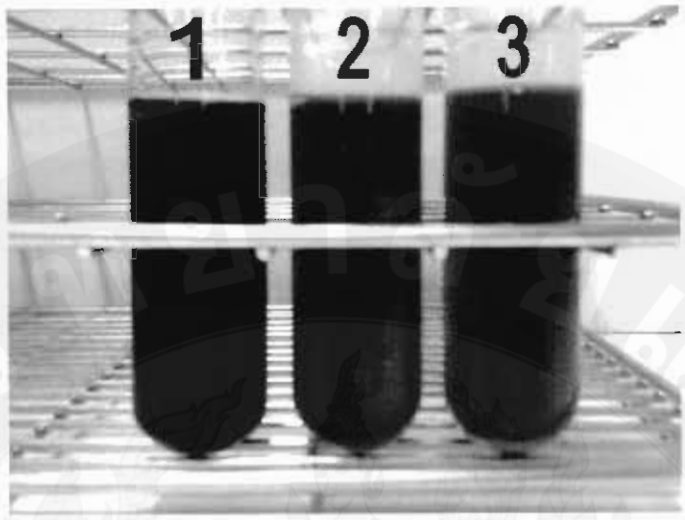
เมื่อนำเชื้อยีสต์ จำนวน 19 ไอโซเลต ที่ทำให้สีของอาหารแข็งสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์จางลง (Clear Zone) บริเวณภายใต้โคโลนีของเชื้อ มาทดสอบความสามารถในการลดความเข้มสีในอาหารเหลวสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* TISTR5690 พบว่า เชื้อยีสต์ จำนวน 6 ไอโซเลต สามารถลดความเข้มสีของน้ำกากส่าสังเคราะห์ในอาหารเหลวสูตร MYGP ได้ในระดับที่สูง คือ เชื้อยีสต์รหัส NG-06, LM-04, MLG-03, FR-05, MM-02 และ MM-03 โดยเชื้อยีสต์แต่ละไอโซเลตสามารถลดความเข้มสีได้สูงสุดร้อยละ 19.15, 16.99, 13.77, 18.76, 17.06 และ 16.67 ตามลำดับ ซึ่งเชื้อยีสต์แต่ละไอโซเลตลดความเข้มสีได้สูงสุดในวันที่ 5, 6, 7, 6, 6 และ 6 ของการทดลองตามลำดับ ส่วนเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* TISTR5690 สามารถลดความเข้มสีของน้ำกากส่าสังเคราะห์ในอาหารเหลวสูตร MYGP ได้สูงสุดร้อยละ 19.79 ในวันที่ 5 ของการทดลอง (ตาราง 7) (ภาพ 23 และ 24) ซึ่งเห็นได้ว่าเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสีสูงสุด และมีค่าร้อยละของการลดความเข้มสีใกล้เคียงกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* TISTR5690 (ภาพ 25) คือ เชื้อยีสต์รหัส NG-06 ที่แยกได้จากเงาะ และเมื่อนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเชื้อยีสต์รหัส NG-06 มีรูปร่างเซลล์รี สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อที่ขั้วของเซลล์ (ภาพ 26) จึงนำเชื้อยีสต์นี้ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตาราง 7 ประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ในการลดความเข้มสีในอาหารเหลวสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์เปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์มาตรฐาน TISTR5690

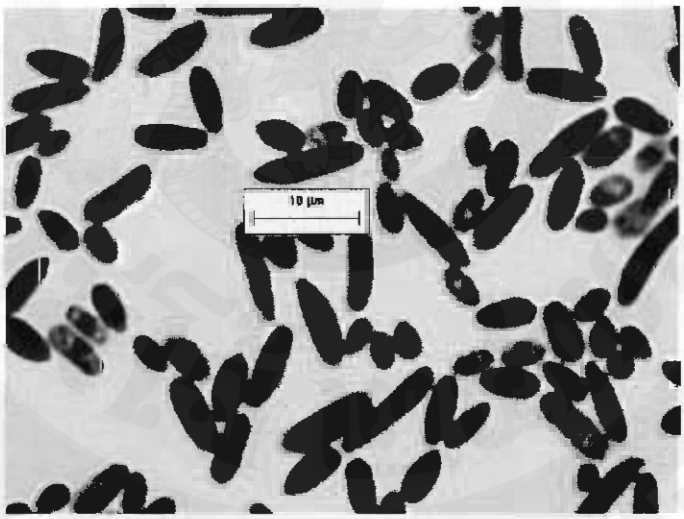
ลำดับ	รหัสเชื้อ	การลดความเข้มสี (ร้อยละ)								
		วันที่								
		0	1	2	3	4	5	6	7	8
1	TISTR5690	0	6.17	9.79	13.19	18.72	19.79	19.57	19.79	19.36
2	LM-04	0	8.92	11.89	13.38	15.71	16.77	16.99	16.35	16.56
3	NG-06	0	11.92	13.62	14.89	15.39	19.15	18.94	19.36	19.15
4	MLG-03	0	5.72	7.42	11.02	11.44	13.56	13.35	13.77	13.14
5	FR-05	0	8.96	13.65	14.71	15.99	17.48	18.76	18.12	18.55
6	MM-02	0	12.37	14.71	15.78	16.63	16.84	17.06	16.42	16.84
7	MM-03	0	9.19	12.18	15.60	16.24	16.45	16.67	16.24	16.67



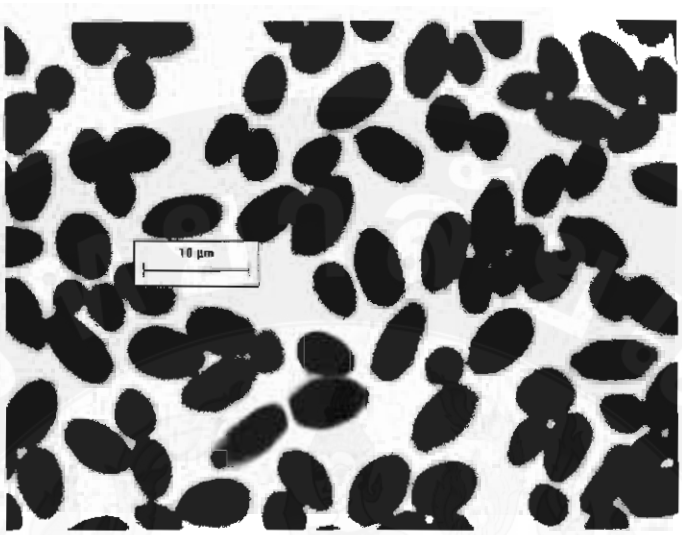
ภาพ 23 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีของเชื้อยีสต์แต่ละไอโซเลตในอาหารเหลวสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์



ภาพ 24 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีในอาหารเหลวสูตร MYGP ที่ผสมสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ในวันที่ 5 ของการทดลอง (1) Control, (2) TISTR5690, (3) NG-06



ภาพ 25 ลักษณะของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* TISTR5690 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

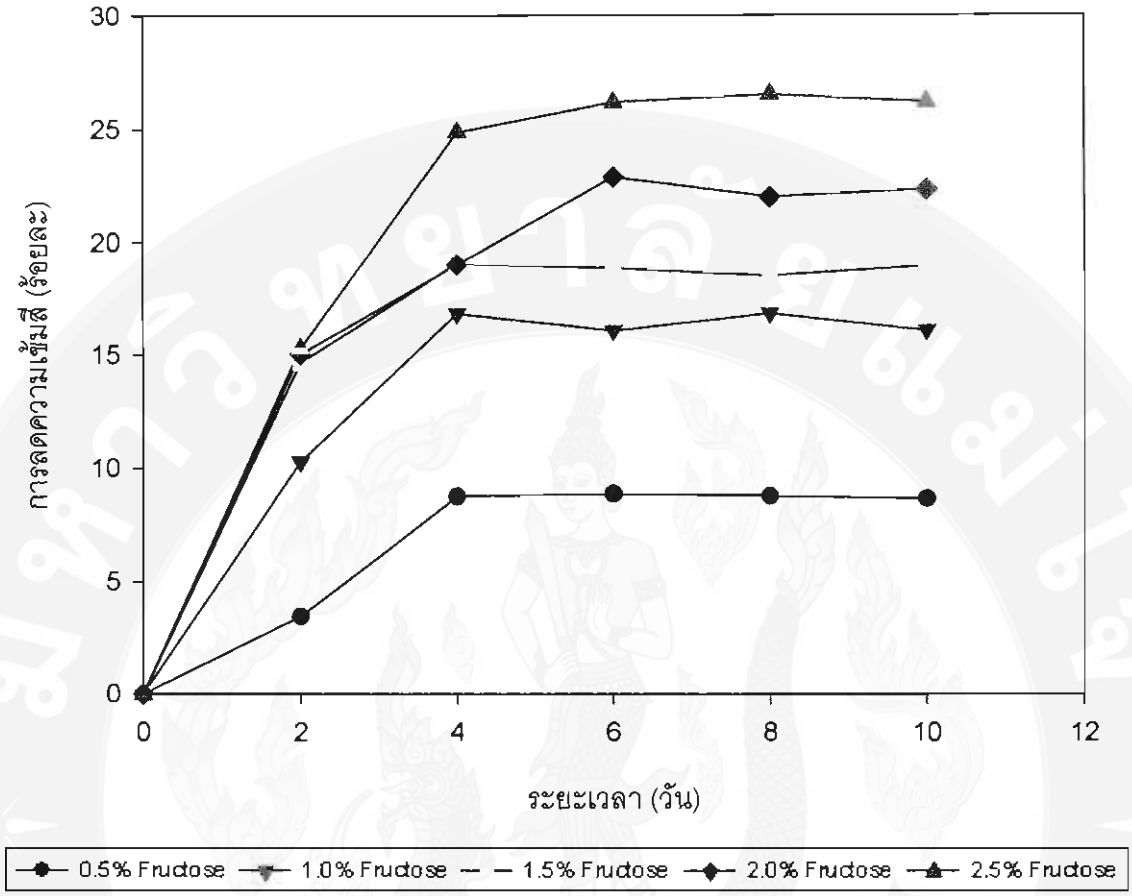


ภาพ 26 ลักษณะของเชื้อยีสต์ NG-06 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

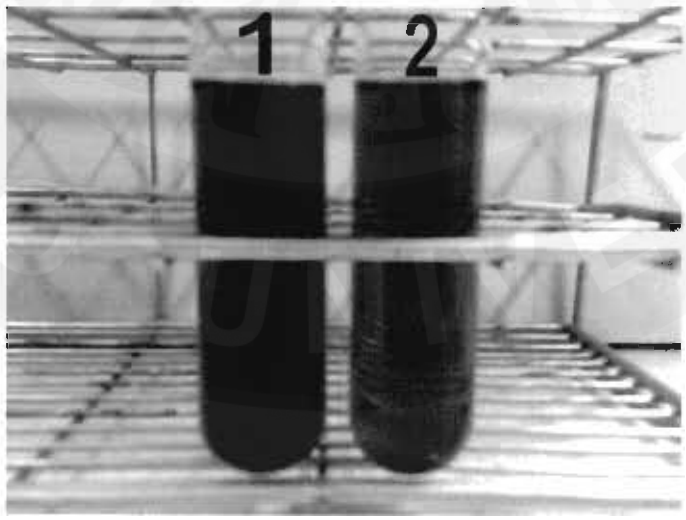
2.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มสีของเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสี ได้แก่

2.4.1 แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม

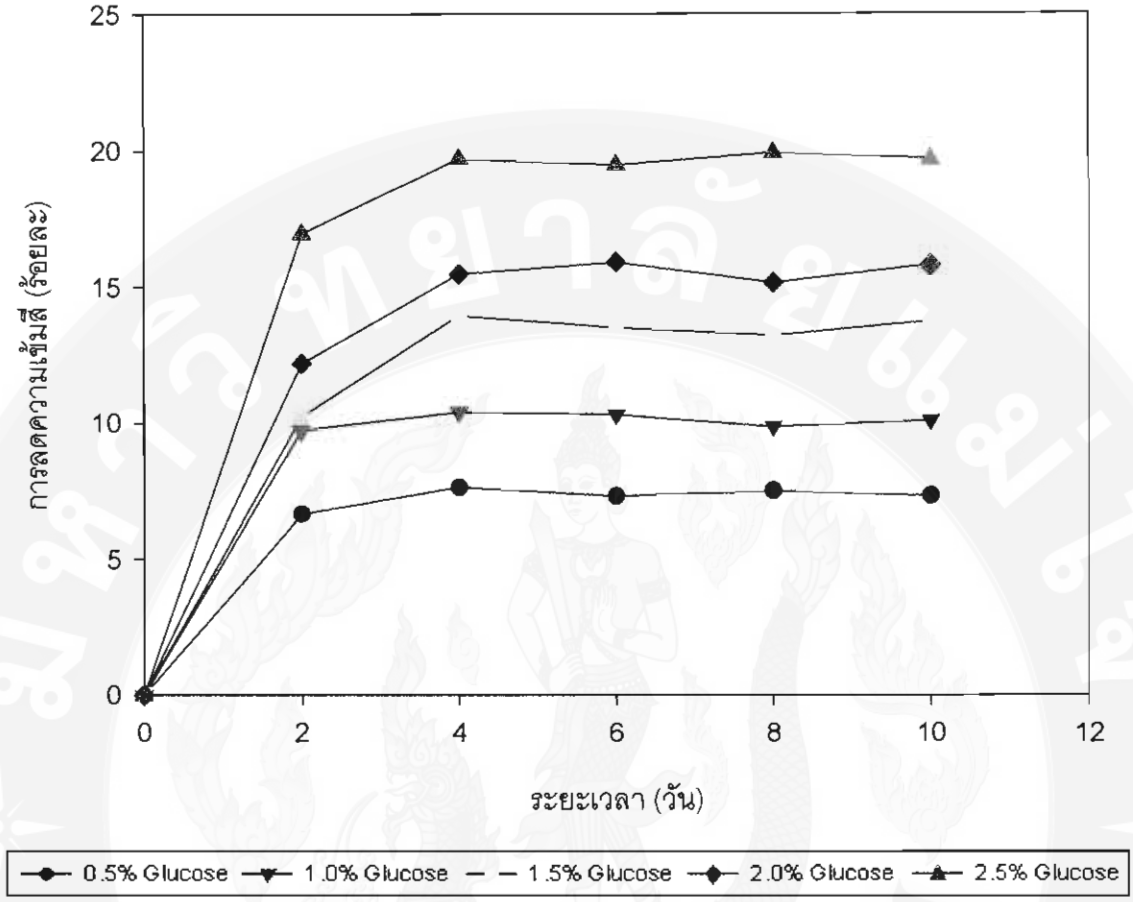
เมื่อนำสารละลายเชื้อยีสต์รหัส NG-06 มาเลี้ยงในสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ ซึ่งมีแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ คือ ไรโบส, อะราบิโนส, ฟรุกโตส, กาแลกโตส และกลูโคส ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในสารละลายสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีแหล่งคาร์บอนต่างชนิดกัน และความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ทำให้ประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีน้ำกากส่าแตกต่างกัน โดยเชื้อยีสต์รหัส NG-06 สามารถลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลฟรุกโตส ร้อยละ 2.5 ได้สูงสุดในวันที่ 6 ของการทดลอง ซึ่งลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้ร้อยละ 26.18 (ภาพ 27 และ 28) และสามารถลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2.5 ได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้ร้อยละ 19.70 (ภาพ 29) แต่ไม่สามารถลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้เมื่อใช้น้ำตาลไรโบส, อะราบิโนส และกาแลกโตส เป็นแหล่งคาร์บอน



ภาพ 27 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเชื้อยีสต์ NG-06



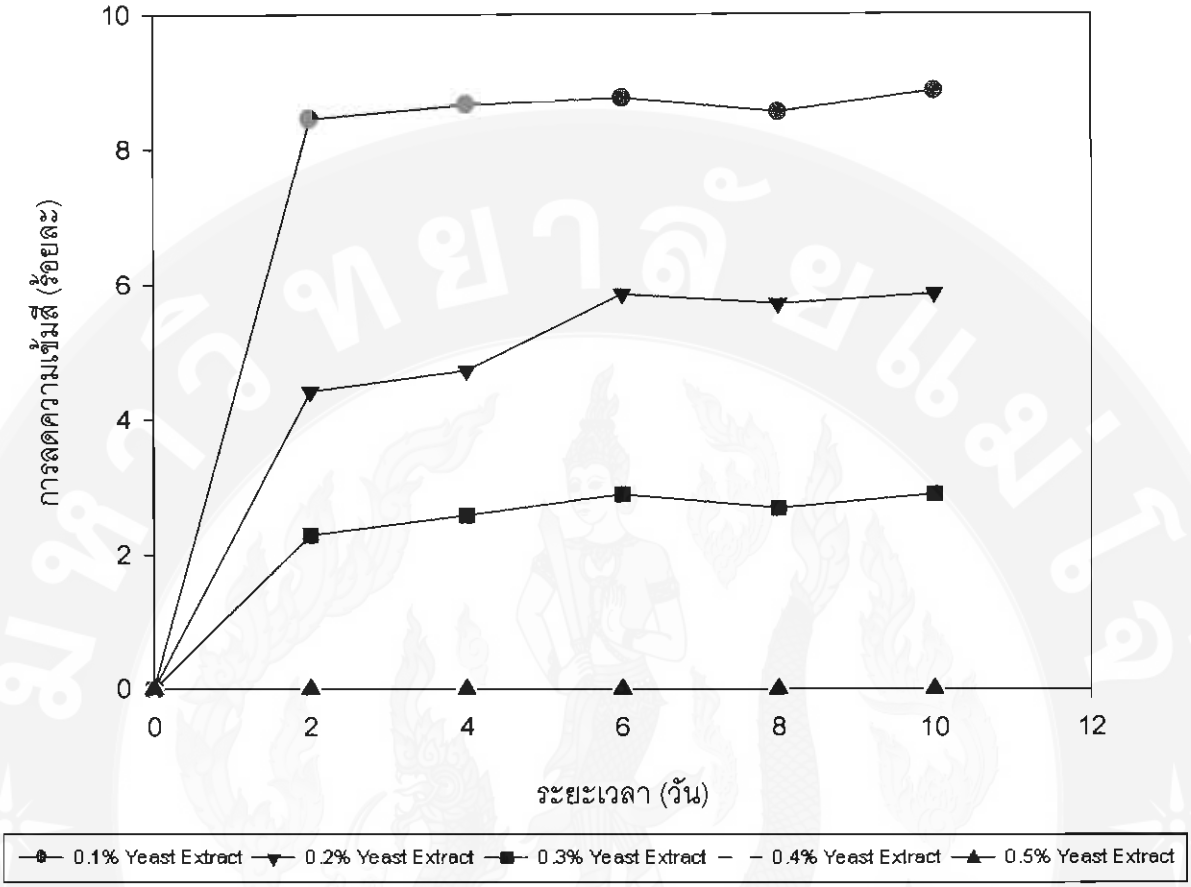
ภาพ 28 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลฟรุกโตสร้อยละ 2.5 โดยเชื้อยีสต์ NG-06 (1) Control, (2) น้ำตาลฟรุกโตสร้อยละ 2.5



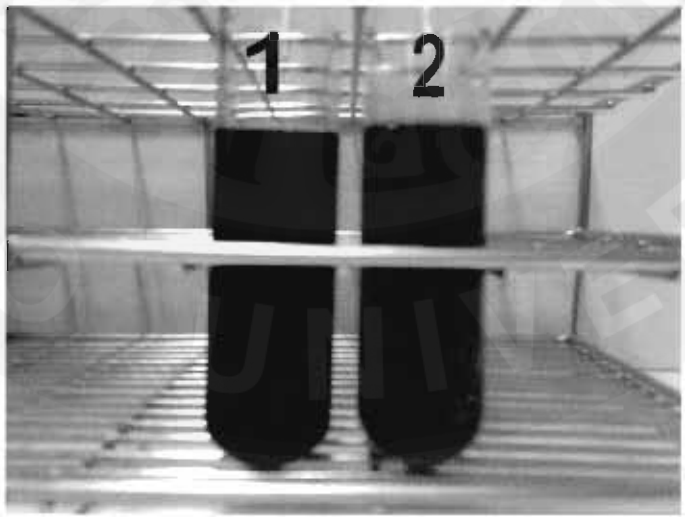
ภาพ 29 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเชื้อยีสต์ NG-06

2.4.2 แหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม

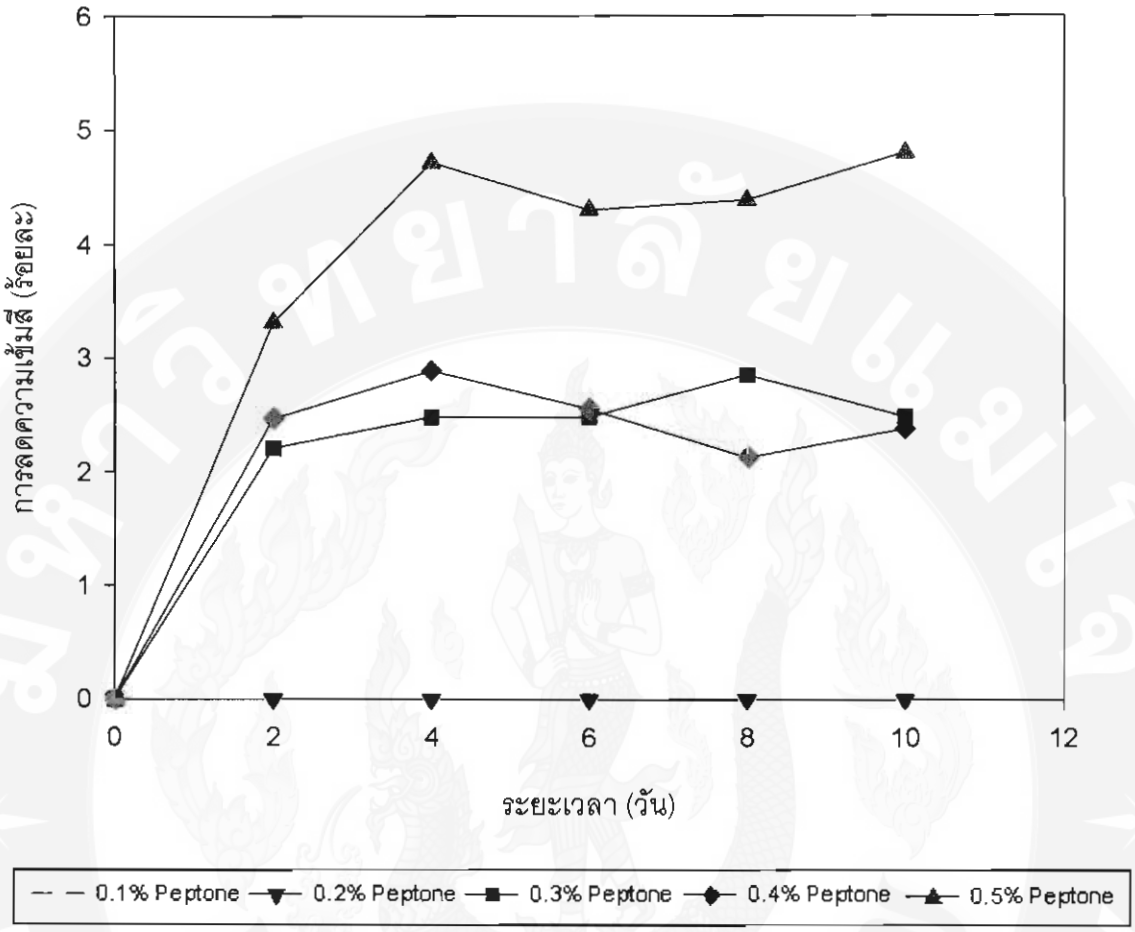
เมื่อนำสารละลายเชื้อยีสต์รหัส NG-06 มาเลี้ยงในสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ ซึ่งมีแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ คือ Urea, Peptone, $(NH_4)_2SO_4$, $NaNO_3$ และ Yeast Extract ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ในสารละลายสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างชนิดกัน และความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ทำให้ประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีน้ำกากส่าแตกต่างกัน โดยเชื้อยีสต์รหัส NG-06 สามารถลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มี Yeast Extract ร้อยละ 0.1 ได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้ร้อยละ 8.66 (ภาพ 30 และ 31) และสามารถลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มี Peptone ร้อยละ 0.5 ได้สูงสุดในวันที่ 4 ของการทดลอง ซึ่งลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้ร้อยละ 4.72 (ภาพ 32) แต่ไม่สามารถลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้เมื่อใช้ Urea, $(NH_4)_2SO_4$ และ $NaNO_3$ เป็นแหล่งไนโตรเจน



ภาพ 30 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มี Yeast Extract ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเชื้อยีสต์ NG-06



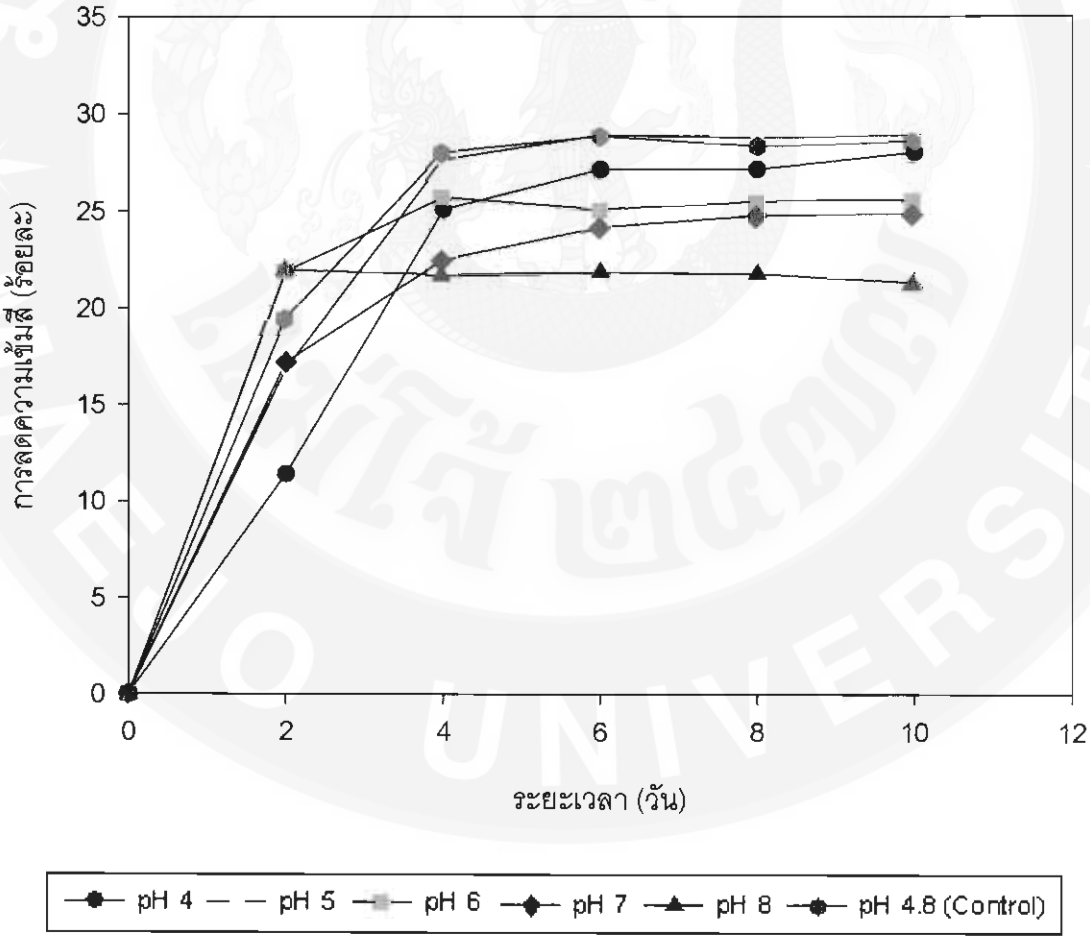
ภาพ 31 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มี Yeast Extract ร้อยละ 0.1 โดยเชื้อยีสต์ NG-06 (1) Control, (2) Yeast Extract ร้อยละ 0.1



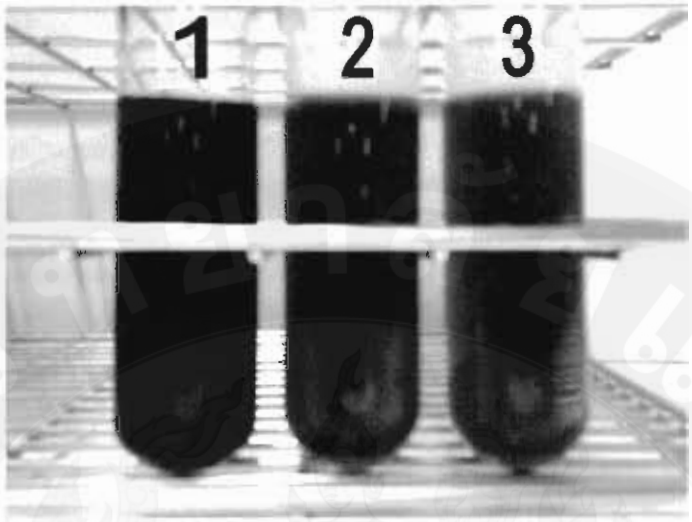
ภาพ 32 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มี Peptone ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเชื้อยีสต์ NG-06

2.4.3 ความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม

เมื่อนำสารละลายเชื้อยีสต์รหัส NG-06 มาเลี้ยงในสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่เติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุด แต่ควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น คือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นมีผลต่อการลดความเข้มสีของน้ำกากส่าสังเคราะห์ ซึ่งเชื้อยีสต์รหัส NG-06 สามารถลดความเข้มสีของน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้สูงสุดร้อยละ 28.02 ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.8 (ชุดควบคุม) ได้ในวันที่ 4 ของการทดลอง ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น คือ 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 และ 8.0 สามารถลดความเข้มสีของน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้ คือ ร้อยละ 27.12, 28.88, 25.70, 24.17 และ 21.96 ในวันที่ 6, 6, 4, 6 และ 2 ของการทดลองตามลำดับ (ภาพ 33 และ 34)



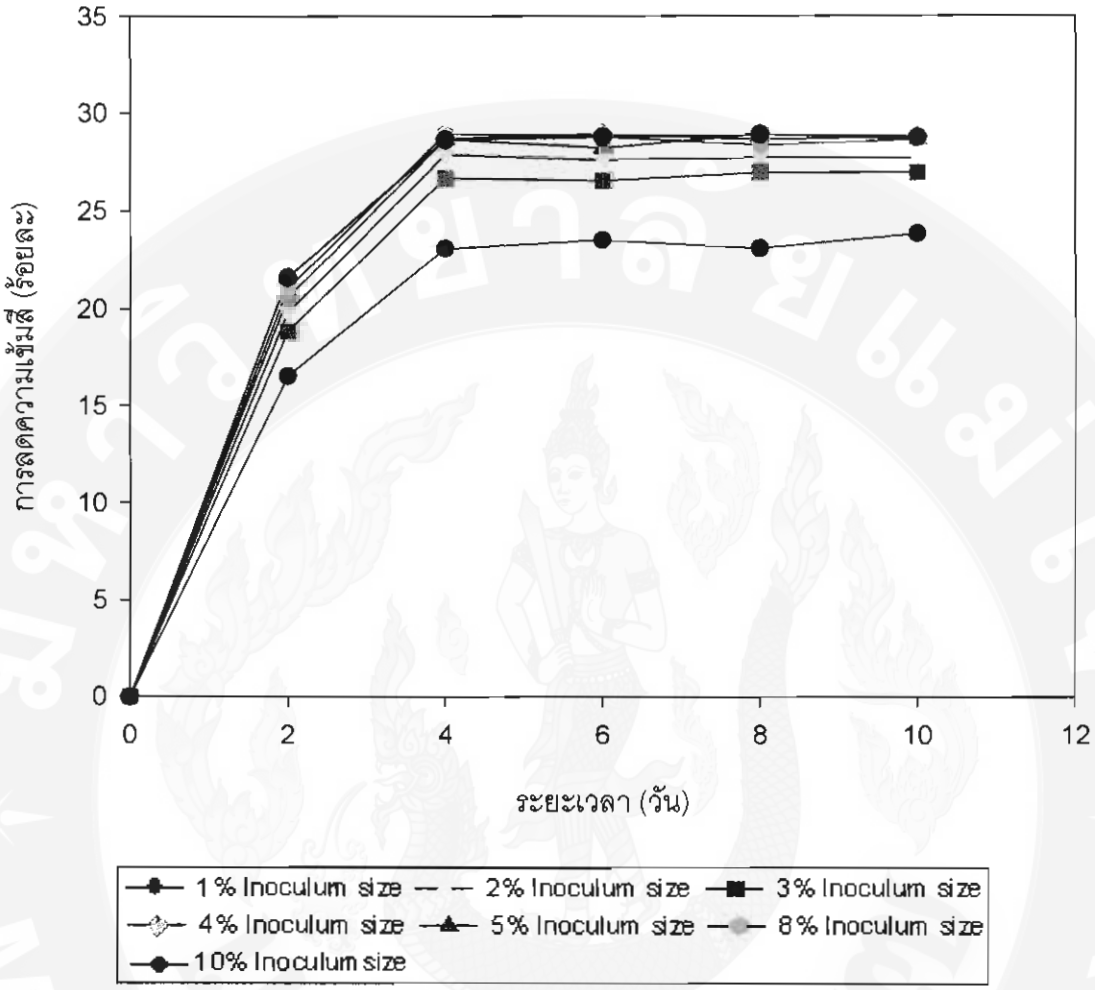
ภาพ 33 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีค่า pH เริ่มต้นที่ระดับต่าง ๆ โดยเชื้อยีสต์ NG-06



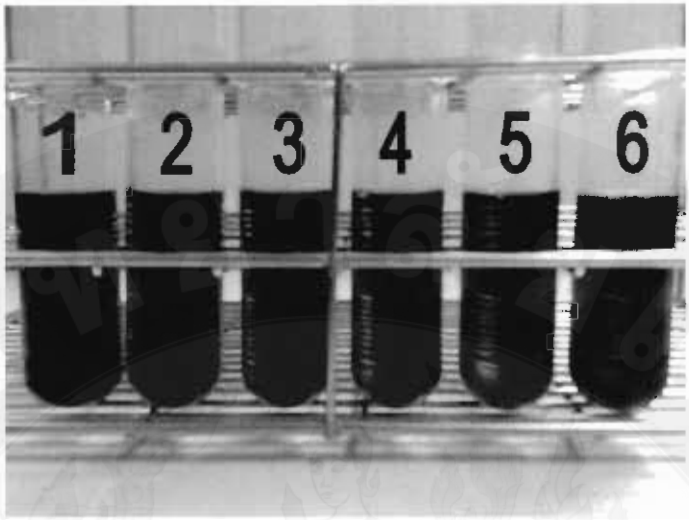
ภาพ 34 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสม โดยเชื้อยีสต์ NG-06 (1) น้ำกากส่าสังเคราะห์ที่ไม่ได้เติมเชื้อ, (2) pH 5, (3) pH 4.8

2.4.4 ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสม

เมื่อนำสารละลายเชื้อยีสต์รหัส NG-06 มาเลี้ยงในสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่เติมแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุด และควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุด แต่ควบคุมเชื้อเริ่มต้นให้มีปริมาณร้อยละ 1, 2, 3, 4, 5, 8 และ 10 พบว่า การลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ของเชื้อยีสต์รหัส NG-06 จะสูงที่สุดเมื่อมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 ในน้ำกากส่าสังเคราะห์ 30 มิลลิลิตร โดยสามารถลดความเข้มสีของน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้สูงสุดร้อยละ 28.67 ในวันที่ 4 ของการทดลอง ในขณะที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 1, 2, 3, 5, 8 และ 10 สามารถลดความเข้มสีของน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้ร้อยละ 23.10, 27.88, 26.69, 28.65, 28.94 และ 28.61 ในวันที่ 4 ของการทดลองตามลำดับ (ภาพ 35 และ 36)



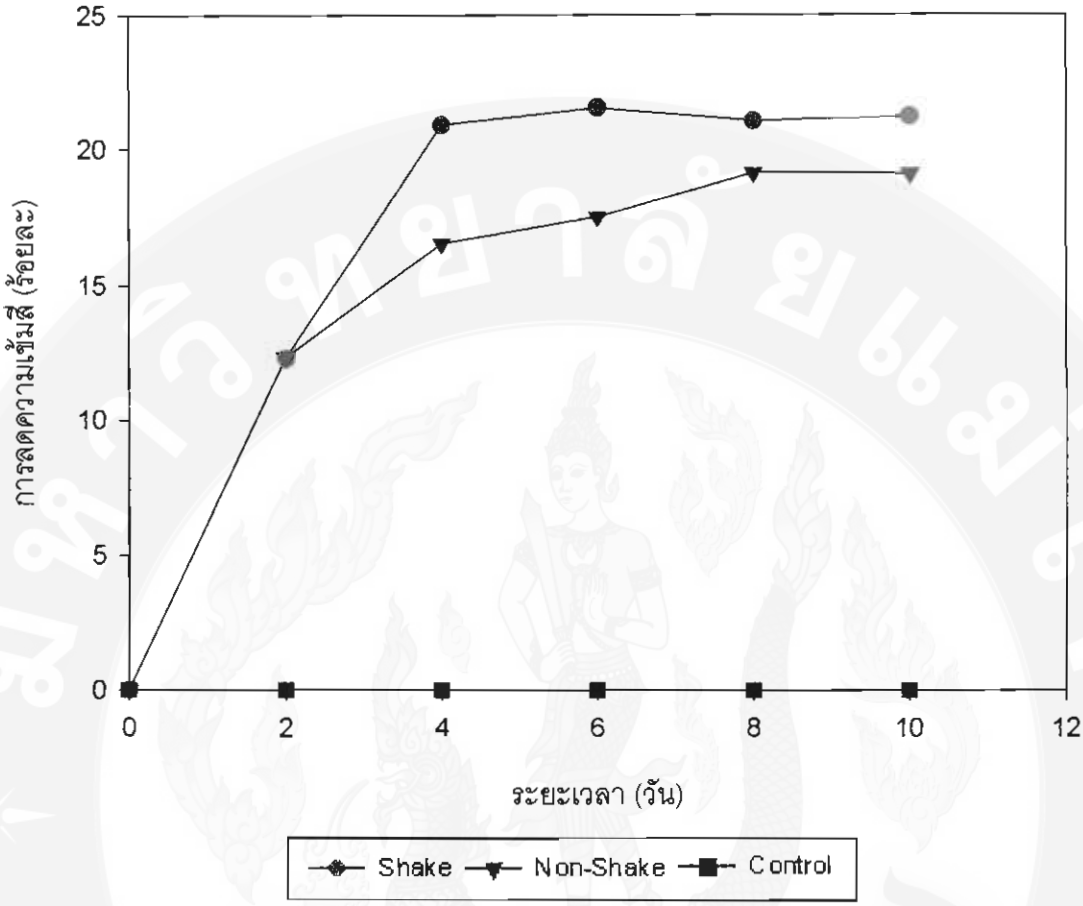
ภาพ 35 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ระดับต่าง ๆ ของเชื้อยีสต์ NG-06



ภาพ 36 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ NG - 06 (1) น้ำกากส่าสังเคราะห์ที่ไม่ได้เติมเชื้อ, (2) ปริมาณเชื้อร้อยละ 10, (3) ปริมาณเชื้อร้อยละ 8, (4) ปริมาณเชื้อร้อยละ 5, (5) ปริมาณเชื้อร้อยละ 4, (6) ปริมาณเชื้อร้อยละ 3

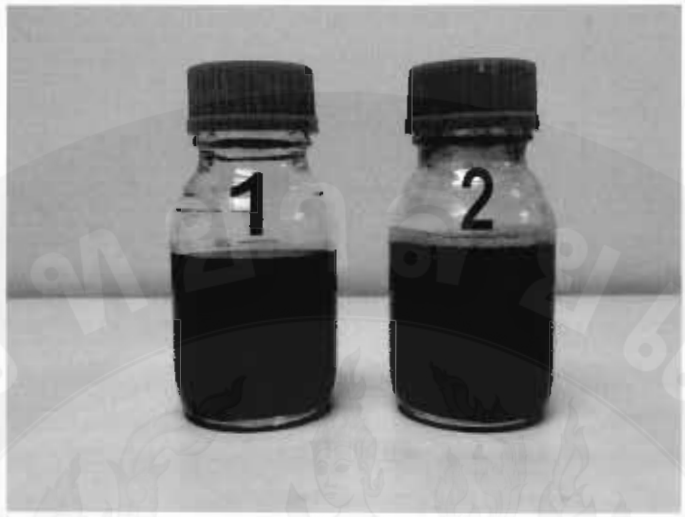
2.5 การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสีของน้ำกากส่าในสภาวะที่เหมาะสม

เมื่อนำสารละลายเชื้อยีสต์รหัส NG-06 ปริมาตรร้อยละ 4.0 (8 มิลลิลิตร) มาเติมในสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีน้ำตาลฟรุกโตส (แหล่งคาร์บอน) ร้อยละ 2.5 ยีสต์สกัด (แหล่งไนโตรเจน) ร้อยละ 0.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.8 ในขวด Duran ขนาด 250 มิลลิลิตร พบว่า สามารถลดความเข้มสีของน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้สูงสุดร้อยละ 21.56 ในวันที่ 6 ของการทดลอง ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (ภาพ 37 และ 38) และสามารถลดความเข้มสีของน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้ร้อยละ 19.16 ในวันที่ 8 ของการทดลอง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (ภาพ 37 และ 39)



ภาพ 37 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์โดยเชื้อยีสต์ NG-06 ในสภาวะที่เหมาะสม

ภาพ 38 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์โดยเชื้อยีสต์ NG-06 ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง (1) Control, (2) เขย่า



ภาพ 39 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์โดยเชื้อยีสต์ NG-06 ภายใต้สภาวะที่ไม่มีการเขย่า ที่อุณหภูมิห้อง (1) Control, (2) ไม่เขย่า

3. **การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราขาว PKM 3 ในการลดความเข้มสีของน้ำกากส่า**

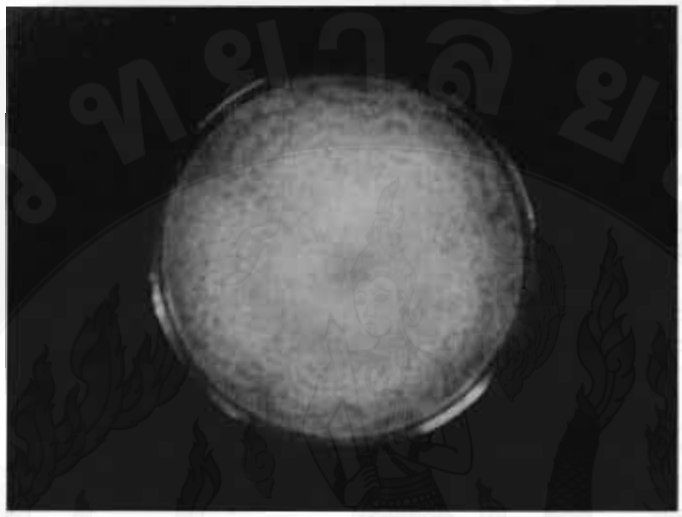
3.1 น้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราขาว PKM 3 (ภาพ 40 และ 41) ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น และนำมาเจือจางให้น้ำกากส่ามีความเข้มสีที่ 475 nm เท่ากับ 3.5 unit โดยแบ่งน้ำกากส่าออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งส่วนที่ 1 เติมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) สำหรับส่วนที่ 2 ไม่มีการเติมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) พบว่า เชื้อราขาว PKM 3 สามารถลดความเข้มสี และค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นส่วนที่เติมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ได้ ดังนี้ ลดความเข้มสีได้สูงสุดร้อยละ 46.44 ในวันที่ 10 ของการทดลอง (ภาพ 42 และ 43) ลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 37.18 ในวันที่ 10 ของการทดลอง (ภาพ 45) และค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปรับตัวสูงขึ้นจาก 4.65 เป็น 6.43 ในวันที่ 14 ของการทดลอง (ภาพ 46) แต่ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นส่วนที่ไม่มีการเติมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) พบว่า เชื้อราขาว PKM 3 ไม่สามารถลดความเข้มสี และค่าซีโอดีได้ ส่วนค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปรับตัวสูงขึ้นจาก 4.74 เป็น 7.14 ในวันที่ 14 ของการทดลอง (ภาพ 46)

3.2 น้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมัก

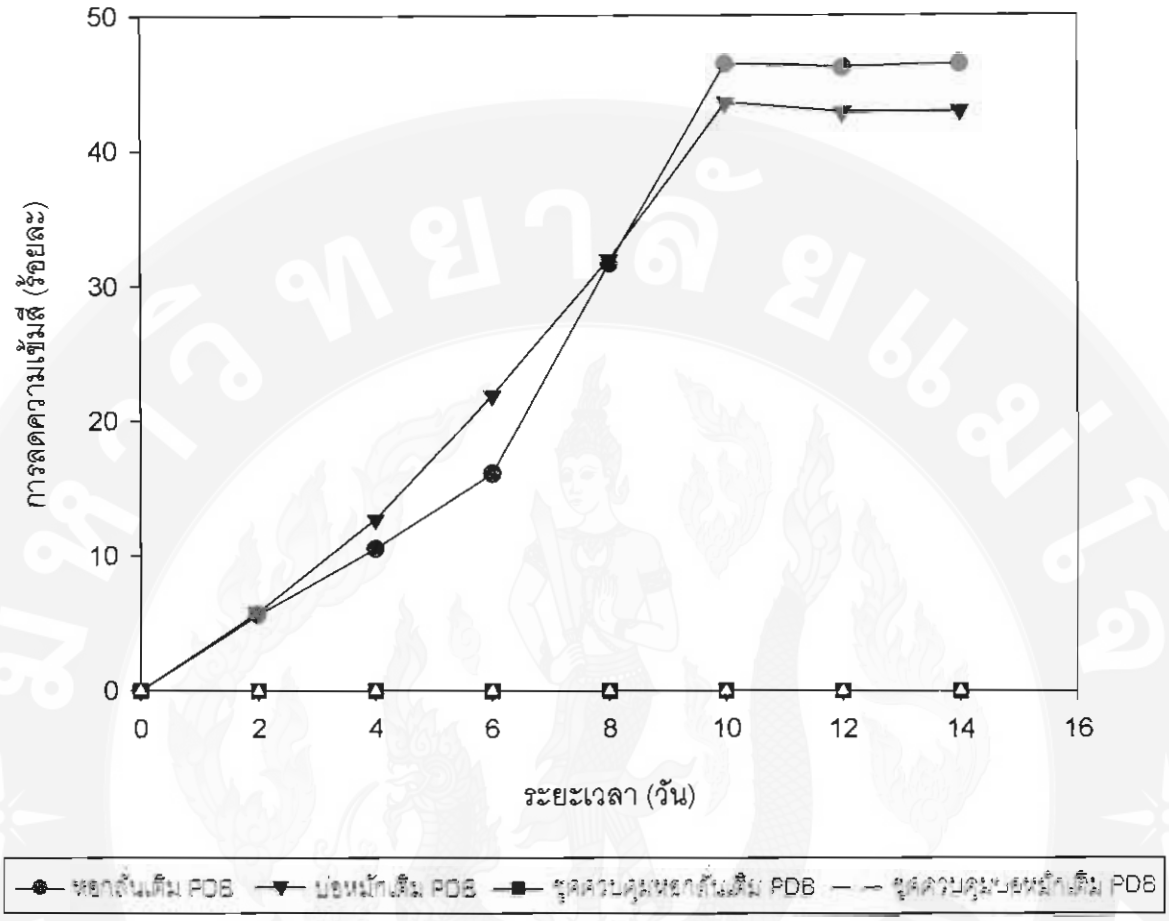
เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อราขาว PKM 3 ในน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมัก และนำมาเจือจางให้น้ำกากส่ามีความเข้มสีที่ 475 nm เท่ากับ 3.5 unit โดยแบ่งน้ำกากส่าออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งส่วนที่ 1 เติมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) สำหรับส่วนที่ 2 ไม่มีการเติมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) พบว่า เชื้อราขาว PKM 3 สามารถลดความเข้มสี และค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักส่วนที่เติมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) ได้ ดังนี้ ลดความเข้มสีได้สูงสุดร้อยละ 43.52 ในวันที่ 10 ของการทดลอง (ภาพ 42 และ 44) ลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 42.65 ในวันที่ 10 ของการทดลอง (ภาพ 45) และค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปรับตัวสูงขึ้นจาก 4.25 เป็น 6.16 ในวันที่ 14 ของการทดลอง (ภาพ 46) แต่ในน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักส่วนที่ไม่มีการเติมอาหาร Potato Dextrose Broth (PDB) พบว่า เชื้อราขาว PKM 3 ไม่สามารถลดความ

เข้มสี และค่าซีโอดีได้ ส่วนค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปรับตัวสูงขึ้นจาก 4.26 เป็น 7.07 ในวันที่ 14 ของการทดลอง (ภาพ 46)



ภาพ 40 ลักษณะของเชื้อราขาว PKM 3 เมื่อเจริญบนอาหารแข็งสูตร PDA

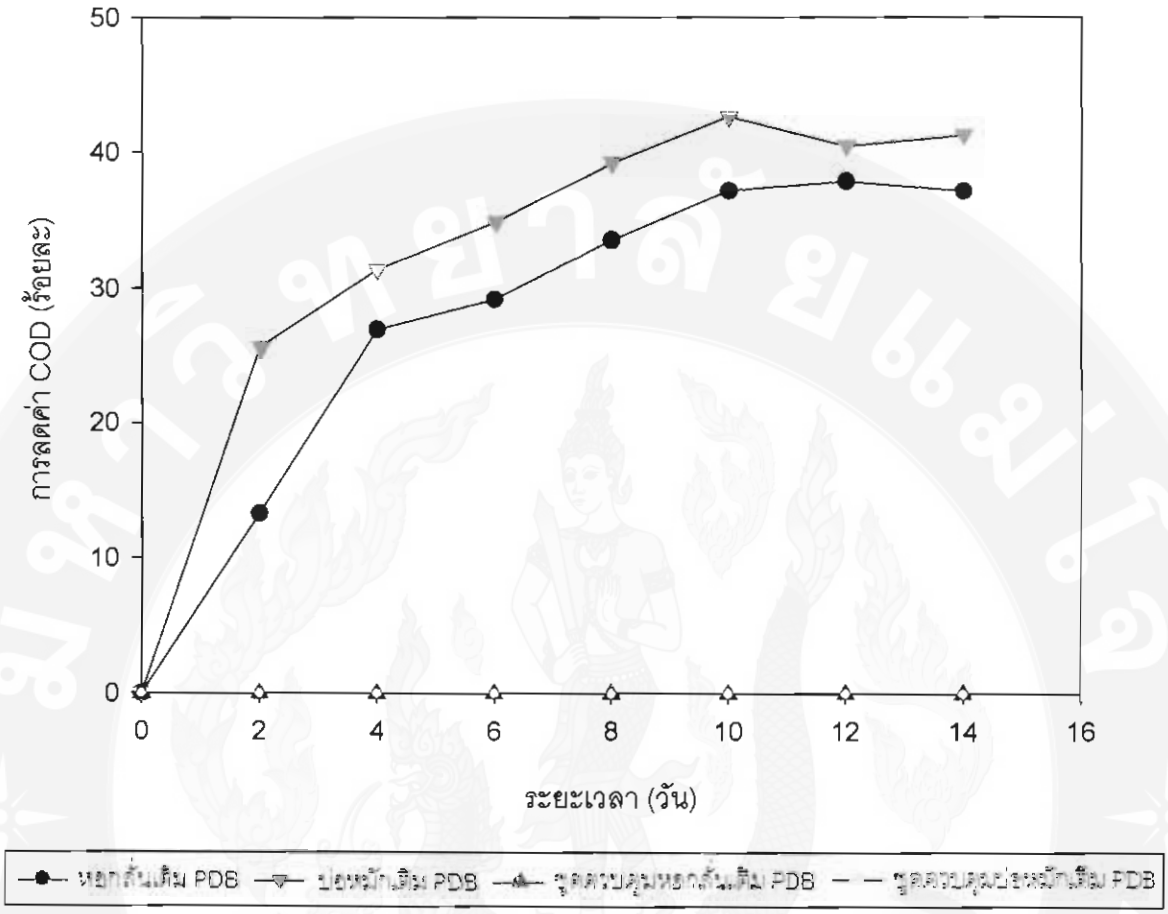
ภาพ 41 ลักษณะของเชื้อราขาว PKM 3 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า



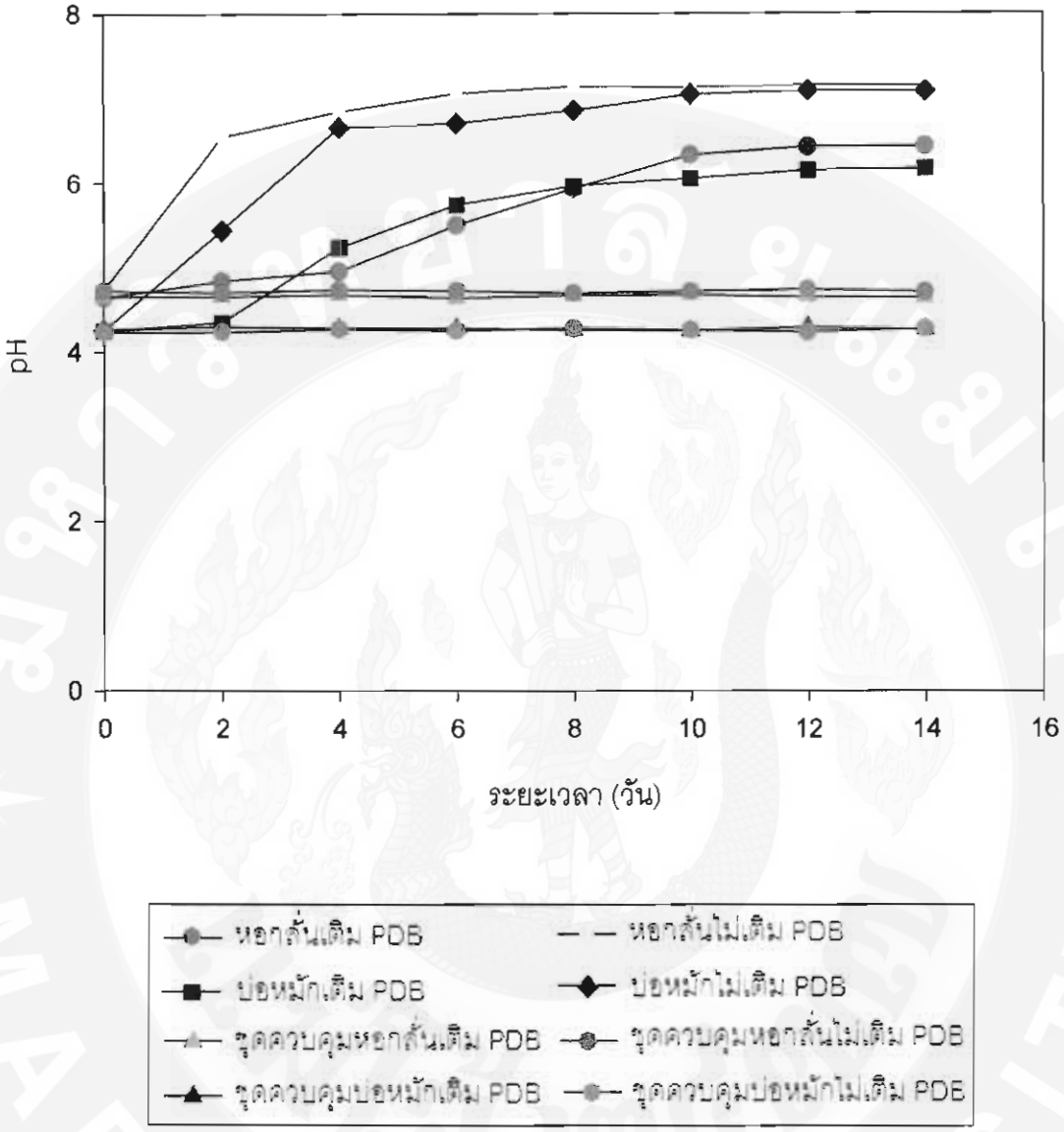
ภาพ 42 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าด้วยเชื้อราขาว PKM 3

ภาพ 43 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นเติม PDB ด้วยเชื้อราขาว PKM 3 ในวันที่ 10 ของการทดลอง (1) Control, (2) เติมเชื้อ

ภาพ 44 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักเติม PDB ด้วยเชื้อราขาว PKM 3 ในวันที่ 10 ของการทดลอง (1) Control, (2) เติมเชื้อ



ภาพ 45 ประสิทธิภาพการลดค่า COD ของน้ำกากส่าที่ผ่านการลดความเข้มสีด้วยเชื้อราขาว PKM 3



ภาพ 46 สภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำกากส่าที่ผ่านการลดความเข้มสีด้วยเชื้อราขาว PKM 3

4. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อราขาว PKM 3 ร่วมกับเชื้อยีสต์ NG-06 ในการลดความเข้มสีของน้ำกากส่า

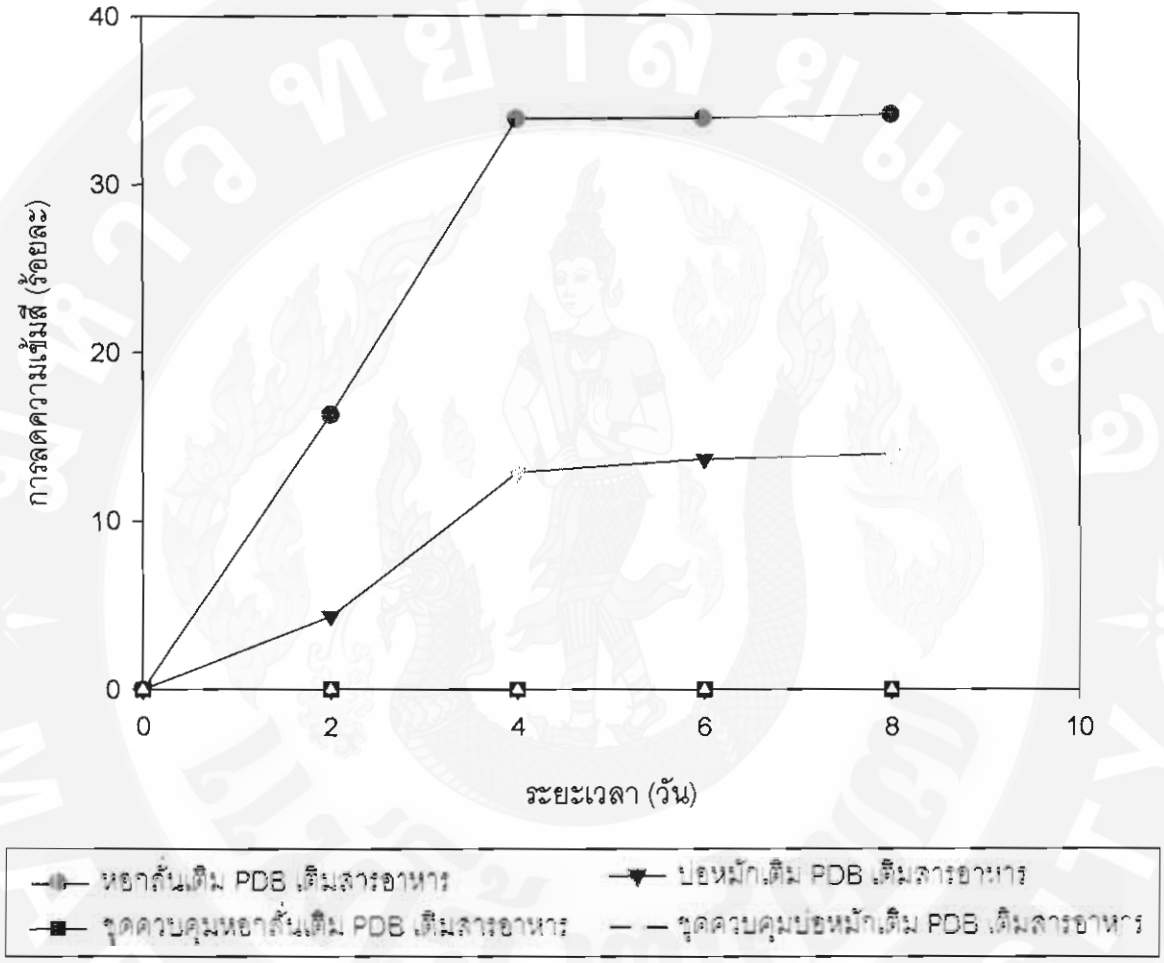
4.1 น้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ NG-06 ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น ซึ่งผ่านการลดความเข้มสีด้วยเชื้อราขาว PKM 3 แล้ว ที่แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งส่วนที่ 1 เติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้น ที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุด (เติมสารอาหาร) สำหรับส่วนที่ 2 ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และไม่มีการปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) เริ่มต้น (ไม่เติมสารอาหาร) พบว่า เชื้อยีสต์ NG-06 สามารถลดความเข้มสี และค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นส่วนที่เติมสารอาหารได้ ดังนี้ ลดความเข้มสีได้สูงสุดร้อยละ 33.87 ในวันที่ 4 ของการทดลอง (ภาพ 47 และ 48) ลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 35.26 ในวันที่ 4 ของการทดลอง (ภาพ 50) และค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปรับตัวลดลงจาก 5.22 เป็น 3.23 ในวันที่ 8 ของการทดลอง (ภาพ 51) แต่ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นส่วนที่ไม่เติมสารอาหาร พบว่า เชื้อยีสต์ NG-06 ไม่สามารถลดความเข้มสี และค่าซีโอดีได้ ส่วนค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) มีค่าคงที่อยู่ที่ 5.24 (ภาพ 51)

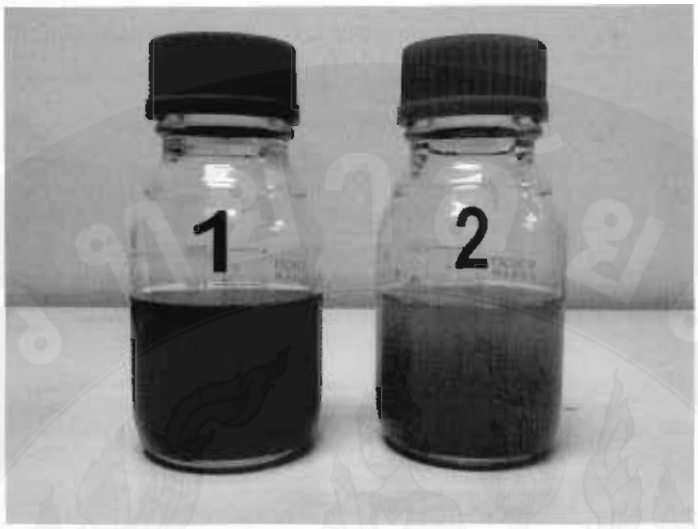
4.2 น้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมัก

เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ NG-06 ในน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมัก ซึ่งผ่านการลดความเข้มสีด้วยเชื้อราขาว PKM 3 แล้ว ที่แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ซึ่งส่วนที่ 1 เติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้น ที่ทำให้เกิดการลดความเข้มสีสูงสุด (เติมสารอาหาร) สำหรับส่วนที่ 2 ไม่มีการเติมแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และไม่มีการปรับค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) เริ่มต้น (ไม่เติมสารอาหาร) พบว่า เชื้อยีสต์ NG-06 สามารถลดความเข้มสี และค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักส่วนที่เติมสารอาหารได้ ดังนี้ ลดความเข้มสีได้สูงสุดร้อยละ 13.62 ในวันที่ 6 ของการทดลอง (ภาพ 47 และ 49) ลดค่าซีโอดีได้ร้อยละ 28.42 ในวันที่ 4 ของการทดลอง (ภาพ 50) และค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) ปรับตัวลดลงจาก 5.16 เป็น 3.58 ในวันที่ 8 ของการทดลอง (ภาพ 51) แต่ในน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักส่วนที่ไม่เติม

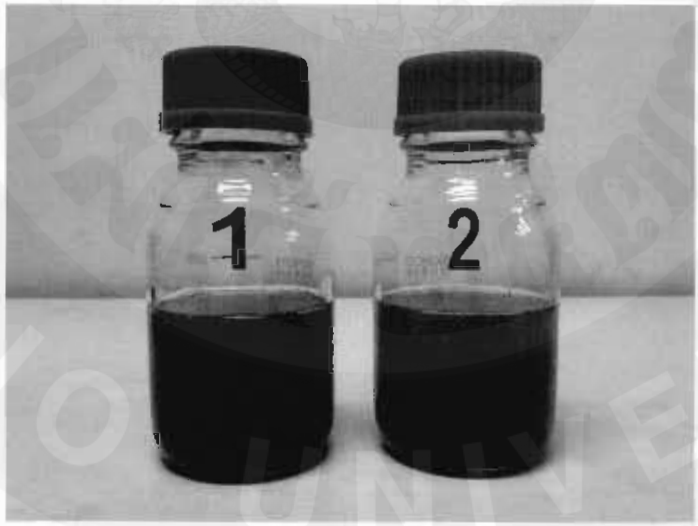
สารอาหาร พบว่า เชื้อยีสต์ NG-06 ไม่สามารถลดความเข้มสี และค่าซีโอดีได้ ส่วนค่าความเป็นกรด – ด่าง (pH) มีค่าคงที่อยู่ที่ 5.22 (ภาพ 51)



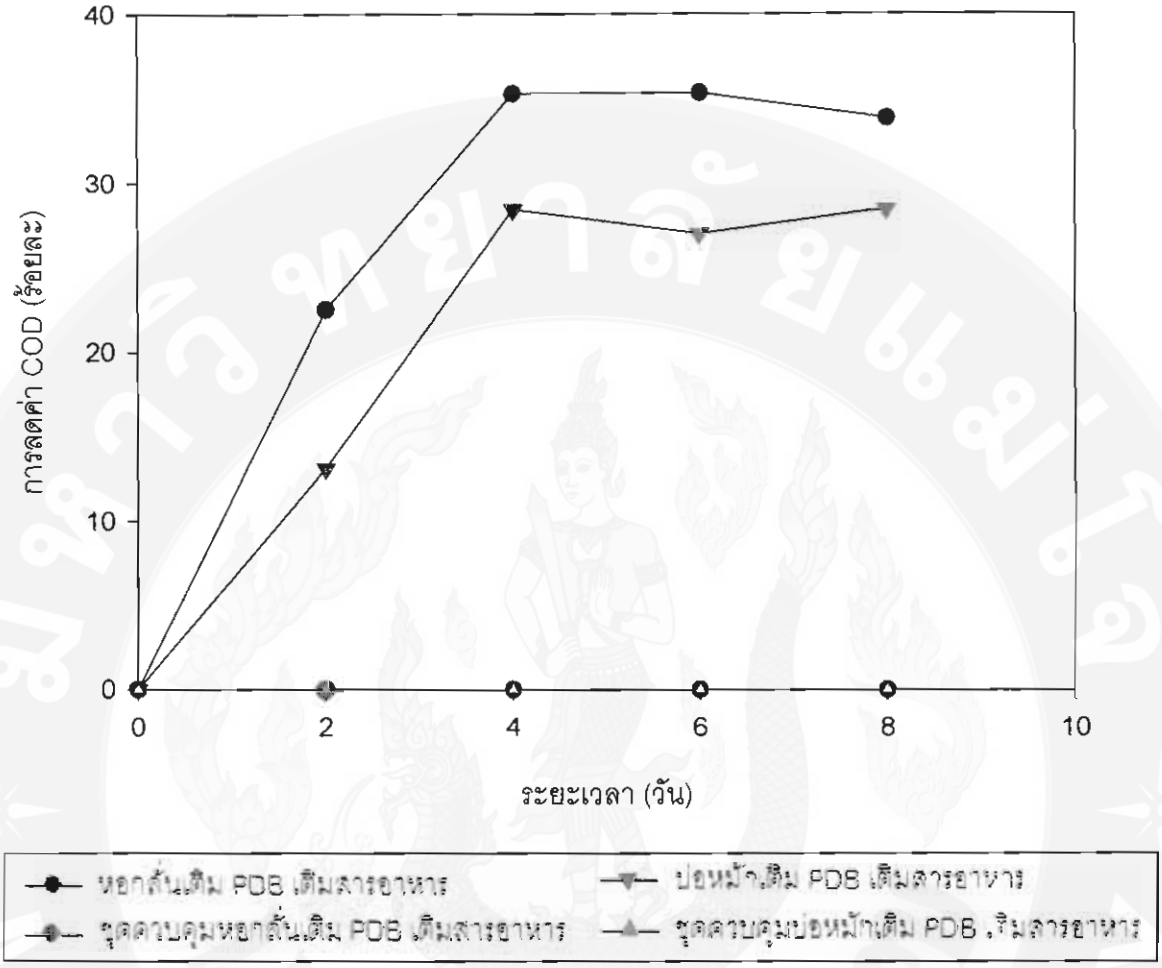
ภาพ 47 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วด้วยเชื้อยีสต์ NG-06



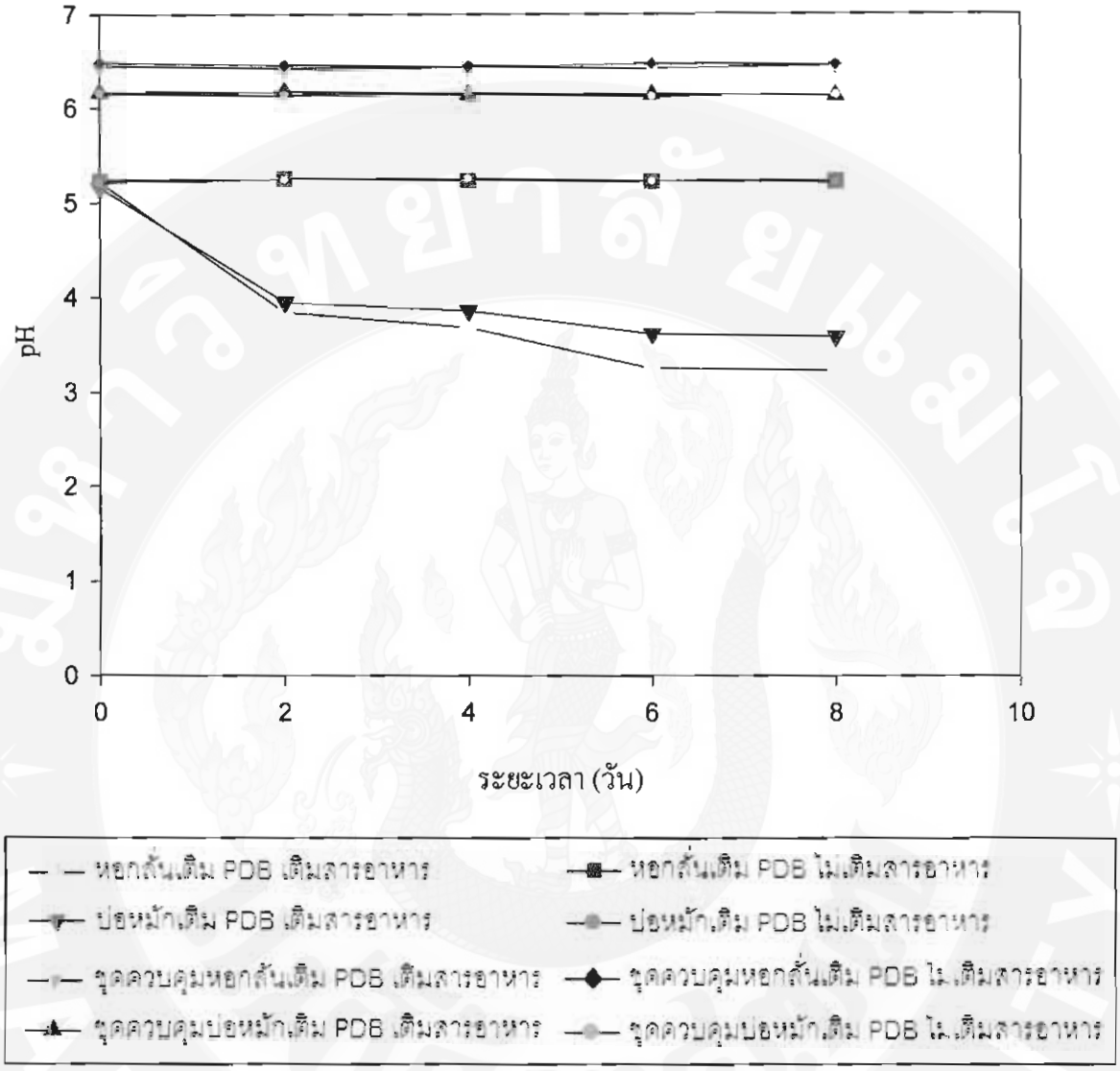
ภาพ 48 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าจากหอกลั่นเติม PDB ที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วเติมสารอาหารด้วยเชื้อยีสต์ NG-06 ในวันที่ 4 ของการทดลอง (1) Control, (2) เติมเชื้อ



ภาพ 49 ประสิทธิภาพการลดความเข้มสีน้ำกากส่าจากบ่อหมักเติม PDB ที่ผ่านการย่อยโดยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วเติมสารอาหารด้วยเชื้อยีสต์ NG-06 ในวันที่ 6 ของการทดลอง (1) Control, (2) เติมเชื้อ

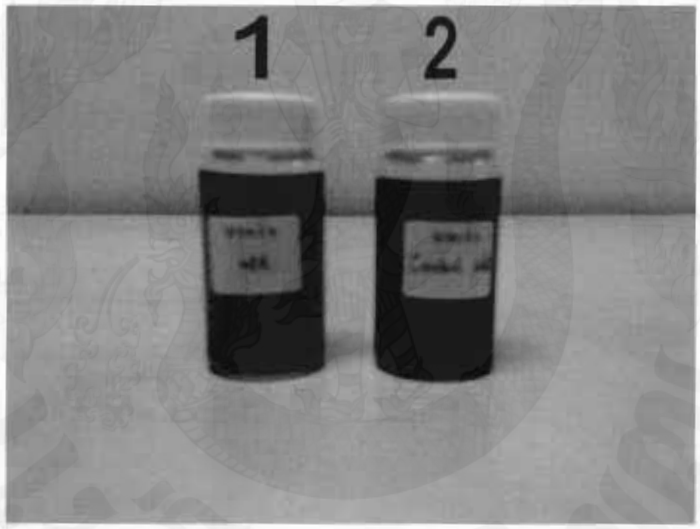


ภาพ 50 ประสิทธิภาพการลดค่า COD ของน้ำกากส่าที่ผ่านการลดความเข้มสีโดยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วด้วยเชื้อยีสต์ NG-06



ภาพ 51 สภาพความเป็นกรด-ด่างของน้ำกากส่าที่ผ่านการลดความเข้มสีโดยเชื้อราขาว PKM 3 แล้วด้วยเชื้อยีสต์ NG-06

เมื่อวิเคราะห์ประสิทธิภาพรวมในการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าของโรงงานสุราด้วยการใช้เชื้อราขาว PKM 3 และเชื้อยีสต์ NG-06 ร่วมกันแล้ว พบว่า มีประสิทธิภาพในการลดความเข้มสี การลดค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นที่เติมอาหาร PDB ที่เติมอาหารของยีสต์ได้ร้อยละ 64.00 และ 37.23 ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการบำบัด 14 วัน (ภาพ 52) และมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มสี การลดค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักที่เติมอาหาร PDB ที่เติมอาหารของยีสต์ได้ร้อยละ 49.99 และ 31.47 ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการบำบัด 16 วัน (ภาพ 53)



ภาพ 52 ประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นด้วยการใช้เชื้อราขาว PKM 3 และเชื้อยีสต์ NG-06 ร่วมกัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (1) น้ำกากส่าหลังลดความเข้มสี, (2) น้ำกากส่าก่อนลดความเข้มสี

ภาพ 53 ประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักด้วยการใช้เชื้อราขาว PKM 3 และเชื้อยีสต์ NG-06 ร่วมกัน ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (1) น้ำกากส่าหลังลดความเข้มสี, (2) น้ำกากส่าก่อนลดความเข้มสี

สรุปผลการทดลอง

น้ำกากส่าของโรงงานสุรา จังหวัดเชียงใหม่ ก่อนเข้าสู่บ่อหมักมีค่าความสกปรกสูงมาก คือ มีค่าซีโอดี 162,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าบีโอดี 47,997 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าความเข้มสีวัดที่ความยาวคลื่น 475 nm เท่ากับ 118 หน่วย เมื่อน้ำกากส่าผ่านออกจากบ่อหมักแล้ว ยังมีค่าความสกปรกที่สูง คือ มีค่าซีโอดี 156,000 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าบีโอดี 41,247 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีค่าความเข้มสีเพิ่มขึ้น เท่ากับ 134 หน่วย

การคัดแยกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสีน้ำกากส่าจากตัวอย่างผลไม้เน่า ผลไม้ดอง น้ำกากส่า และดินบริเวณโรงงานสุรา ด้วยการทดสอบความสามารถในการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ ซึ่งทดสอบในอาหารแข็ง และอาหารเหลวสูตร MYGP ที่มีสีน้ำกากส่าสังเคราะห์เป็นองค์ประกอบ ทำให้ได้เชื้อยีสต์ไอโซเลต NG-06 ซึ่งแยกได้จากเงาะ ที่มีความสามารถในการลดความเข้มสีน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้สูงที่สุด เท่ากับ ร้อยละ 19.15 ในวันที่ 5 ของการทดลอง ใกล้เคียงกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia orientalis* TISTR5690 ซึ่งสามารถลดความเข้มสีได้เท่ากับ ร้อยละ 19.79 ในวันเดียวกันของการทดลอง

การศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อยีสต์ไอโซเลต NG-06 สามารถลดความเข้มสีในน้ำกากส่าสังเคราะห์ได้สูงที่สุด ด้วยการนำเชื้อยีสต์ไอโซเลต NG-06 ไปเลี้ยงในน้ำกากส่าสังเคราะห์ที่มีการแปรผันชนิด และความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และปริมาณเชื้อเริ่มต้น พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการลดความเข้มสี คือ สภาวะที่มีน้ำตาลฟรุกโตสร้อยละ 2.5 ยีสต์สกัดร้อยละ 0.1 ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.8 และปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 4 โดยภายใต้สภาวะดังกล่าวนี้ ส่งผลให้เชื้อยีสต์ไอโซเลต NG-06 สามารถลดความเข้มสีได้ร้อยละ 21.56 ในวันที่ 6 ของการทดลอง

ประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีร่วมกันในน้ำกากส่าของโรงงานสุรา จังหวัดเชียงใหม่ ของเชื้อราขาว PKM 3 และเชื้อยีสต์ NG-06 ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่น และที่ออกจากบ่อหมัก ด้วยการใช้เชื้อราขาว PKM 3 บำบัดในขั้นตอนแรก โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ได้แก่ น้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นชุดที่เติมอาหาร PDB และชุดที่ไม่เติมอาหาร PDB น้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักชุดที่เติมอาหาร PDB และชุดที่ไม่เติมอาหาร PDB พบว่า เชื้อราขาว PKM 3 มี

ประสิทธิภาพสูงสุดในการลดความเข้มสี การลดค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นที่เติมอาหาร PDB ได้ร้อยละ 46.44 และ 37.18 ตามลำดับ ในวันที่ 10 ของการทดลอง

ประสิทธิภาพในการลดความเข้มสีต่อด้วยเชื้อยีสต์ NG-06 ในน้ำกากส่าของโรงงานสุราที่ผ่านการลดความเข้มสีด้วยเชื้อราขาว PKM 3 แล้ว โดยแบ่งการทดลองเป็น 4 ชุด ได้แก่ น้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นที่เติมอาหาร PDB ชุดที่เติมอาหารของยีสต์ และชุดที่ไม่เติมอาหารของยีสต์ น้ำกากส่าที่ออกจากบ่อหมักที่เติมอาหาร PDB ชุดที่เติมอาหารของยีสต์ และชุดที่ไม่เติมอาหารของยีสต์ พบว่า เชื้อยีสต์ NG-06 มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดความเข้มสี การลดค่าซีโอดีในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นที่เติมอาหาร PDB ที่เติมอาหารของยีสต์ ได้ร้อยละ 33.87 และ 35.26 ตามลำดับ ในวันที่ 4 ของการทดลอง

ประสิทธิภาพรวมในการลดความเข้มสีในน้ำกากส่าของโรงงานสุรา ด้วยการใช้เชื้อราขาว PKM 3 และเชื้อยีสต์ NG-06 พบว่า มีประสิทธิภาพสูงสุดในการลดความเข้มสี การลดค่าซีโอดี ในน้ำกากส่าที่ออกจากหอกลั่นที่เติมอาหาร PDB ที่เติมอาหารของยีสต์ ได้ร้อยละ 64.00 และ 37.23 ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการบำบัด 14 วัน

เอกสารอ้างอิง

ไชยยุทธ กลิ่นสุคนธ์. 2524.**การแก้ปัญหาน้ำเสียจากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์และสุรา**. น.22-23 ใน เอกสารประกอบการสัมมนาเชิงปฏิบัติการเรื่องการพัฒนาการผลิตสุราและแอลกอฮอล์. นครปฐม:มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ประนอม แก้วระคน. 2549. **เอกสารคำสอนรายวิชายีสต์และยีสต์เทคโนโลยี** (Yeasts and Yeast Technology). ฉบับปรับปรุงครั้งที่ 1. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย. 294 น.

ประภา โซ๊ะสลาม. 2543. **การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการฟอกสีน้ำกากส่า**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 146 น.

ธีรนุช โสตถิตาราม.2539.คืนน้ำสู่ธรรมชาติจากการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์เพื่อสนองความต้องการของผู้บริโภค.**วารสารวิศวกรรมสาร** 1:93-98

อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2532. **ปฏิบัติการยีสต์และรา**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 68 น.

APHA,AWWA and WPCF.2005.Standard methods for examination of water and wastewater (10^{th}ed.). American Public Health Association,New York. 489-495.

Barnett, J.A., Payne, R.W. and Yarrow, D. (2002). Yeasts : Characterisitcs and Identification. p. 350, 400, 450, 642, 678, 724, 771, 786 and 333.

Benito, G.G., M.P. Miranda and D. Rodriguez de los Santos. 1997. Decolorization of wastewater from an alcoholic fermentation process with *trametes versicolor*. Bioresource Technology. 61:33-37.

Brock T.D, *et al.* (1994). Biology of microorganisms. p. 83 and 849.

Hudson, B.J.F. 1992. Biochemistry of Food Proteins. Elsevier Applied Science. 4:99-138.

Jimenez, A.M., R. Borja and A. Martin. 2003. Aerobic-anaerobic biodegradation of beet molasses alcoholic fermentation wastewater. Process Biochemistry. 38:1275-1284.

Miranda, M.P., G.G. Benito, N.S. Cristobal and C.H. Nieto. 1996. Color elimination from Molasses wastewater by *Aspergillus niger*. Bioresource Technology. 57:229-235.

Nakajima-Kambe, T., M. Shimomura, N. Nomura, T. Chanpornpong and T. Nakahara. 1999. Decolorization of molasses wastewater by *Bacillus* sp. under thermophilic and anaerobic conditions. Journal of Bioscience and Bioengineering. 87:119-121.

Raghukumar, C., C. Mohandass, S. Kamat and M.S. Shailaja. 2004. Simultaneous detoxification and decolorization of molasses spent wash by the immobilized white-rot fungus *Flavodon flavus* isolated from a marine habitat. Enzyme and Microbial Technology. 35:197-202.

Sirianuntapiboon, S., P. Phothilangka and S. Ohmomo. 2004. Decolorization of molasses wastewater by a strain No.BP103 of acetogenic bacteria. Bioresource Technology. 92:31-39.

Sirianuntapiboon, S., P. Sihanonth and S. Hayashida. 1990. Absorption of melanoidin to *Rhizoctonia* sp. D-90 mycelia. Microbial Utilization of Renewable Resource. 7:321-329.

Sirianuntapiboon, S., P. Zohsalam and S. Ohmomo. 2004. Decolorization of molasses wastewater by *Citeromyces* sp. WR-43-6. Process Biochemistry. 39:917-924.

Ueda, K., 1983. Search and screen of microorganisms having decolorization activity of molasses pigment. Journal of Microbial Utilization of Renewable Resource. Vol.1(2):195-198.http://genome.jgi-psf.jorg/Picst3/Picst3.home.html

Underkofler, L.A. and R.J. Hickley, 1954. [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา www.http://www2.diw.go.th/sura.pdf. 25 ธันวาคม,2550

Walker, G.M.(1998). Yeast physiology and biotechnology. p. 19, 21, 22, 32, 53, 128 and 155.

http://academic.sun.ac.za/saf/units/xre/xre.html

http://tidepool.st.usm.edu/crswr/exocytosis.html

http://www.abcbodybuilding.com/magazine03/8weekstobiggertibialis.html

http://www.biology.lsa.umich.edu/research/labs/klionsky/klionskyprojects.html

http://www.bio.miami.edu/dana/250/25002_12print.html

http://www.cdc.gov/ncidod/eid/vol4no1/buchanan.html

http://www.flickr.com/photos/joelmancuso/48090981

http://www.genomenewsnetwork.org/articles/12_03/yeast_screen.s.html

http://www.lip-sas.fr/levures_debaryomyces.html

http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/microbialGenetics/topics/plasmids/yeastplasmid.html

http://www.theartisan.net/The_Artisan_Yeast_Treatise_Section_One.html

http://www.vetmed.wisc.edu/students/vetmycology/lab.html