อภินันทนาการ

สัญญาเลขที่ R2561B065
สำนักหอสมุด

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การผลิตไบโอเอทานอลจากการหมักของยีสต์ทนร้อนโดยใช้ชีวมวลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

คณะผู้วิจัย

ดร.พงศนาถ ผ่องเจริญ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ทาวงศ์

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร

คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน 1 ส.ค. 2562
เลขทะเบียน 10200020
เลขเรียกหนังสือ

สนับสนุนโดย งบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร

ปีงบประมาณ 2561

ชื่อเรื่อง	การผลิตไบโอเอทานอลจากการหมักของยีสต์ทนร้อนโดยใช้ชีวมวลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน
หัวหน้าโครงการวิจัย	ดร.พงศนาถ ผ่องเจริญ
ผู้ร่วมโครงการวิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ทาวงศ์
คำสำคัญ	ไบโอเอทานอล การหมัก ยีสต์ทนร้อน *Pichia kudriavzevii* สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์ประเภทยีสต์ที่มีความสามารถทนร้อนและผลิตเอทานอลได้ เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญอย่างมากในวงการอุตสาหกรรม โดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อการประยุกต์ใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล การศึกษาครั้งนี้ สามารถคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์ทนร้อนได้ทั้งหมดสามไอโซเลท (NUNS4, NUNS5 และ NUNS6) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อประเภท enrichment medium ที่มีส่วนประกอบของเอทานอล 4 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตร จากผลการทดลองพบว่า ทั้งสามไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นเอทานอลสูงถึง 13 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรโดยปริมาตรภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ลำดับต่อมา วิเคราะห์ความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง พบว่ายีสต์สายพันธุ์ NUNS4, NUNS5 และ NUNS6 สามารถผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40°C ได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 88.60, 78.52 และ 77.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และที่อุณหภูมิ 45°C สามารถผลิตความเข้มข้นเอทานอลได้สูงสุดที่ 54.30, 37.73 และ 44.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการของยีน 26S rDNA บนตำแหน่ง D1/D2 พบว่าสามไอโซเลทที่คัดแยกมาได้นั้นคือยีสต์สายพันธุ์ *Pichia kudriavzevii* ดังนั้นแล้ว สายพันธุ์ *P. Kudriavzevii* จำนวนสามไอโซเลทได้แก่ NUNS4, NUNS5 และ NUNS6 ที่คัดแยกได้จากรายงานวิจัยนี้เป็นสายพันธุ์ยีสต์ทนร้อนและความเข้มข้นเอทานอลที่มีความสามารถนำมาใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไป จากการคัดแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินทั้งหมด พบจำนวน 105 สายพันธุ์สามารถเจริญเติบโตได้ในห้องปฏิบัติการ เมื่อตรวจทางสัณฐานวิทยา และยีน 16S rRNA พบว่าสายพันธุ์ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

9 สกุล 12 ชนิด ได้แก่ *Dolichospermum* spp., *Anabaenopsis* sp., *Sphaerospermopsis* spp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Wollea* sp. , *Planktothricoides raciborskii*, *Psuedoanabaena* sp., *Microcystis* sp. และ *Lyngbya* sp. เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณของคาร์โบไฮเดรตพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Dolichospermum* sp.1_7 มีการสะสมปริมาณคาร์ไฮเดรทมากที่ที่สุดเท่ากับ 23.54% ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งสามารถนำไปพัฒนาสำหรับการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตพลังงานเอทานอลได้ แต่อย่างไรก็ตามการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น สารอาหาร ความเข้มแสง หรืออุณหภูมิ เพื่อช่วยเพิ่มการผลิตคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสูงขึ้นต่อไป เพื่อประเด็นที่ควรทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

Title	Bioethanol production by thermotolerant yeast fermentation using cyanobacterial biomass as nutrient feedstock
Project leader	Dr. Pongsanat Pongcharoen
Co-researcher	Assistant Professor Dr. Wittaya Tawong
Keywords	Bioethanol, Fermentation, Thermotolerant yeast, *Pichia kudriavzevii*, Cyanobacteria

ABSTRACT

The thermotolerant and ethanol- producing yeasts are especially required in numerous industrial applications, such as alternative sources for bioethanol. In this study, we isolated three novel thermotolerant yeast strains (NUNS4, NUNS5 and NUNS6) using the enrichment technique with 4% (v/v) ethanol. All isolated strains showed their ability to grow at 45°C and tolerate under ethanol concentration of 13% (v/v). The strain NUNS4, NUNS5 and NUNS6 could convert glucose to ethanol at concentration of 88.60, 78.52 and 77.97 g/L, respectively, under the temperature of 40°C, and of 54.30, 37.73 and 44.04 g/L, respectively, under the temperature of 45°C which showed higher productivity of ethanol than the reference strain *Saccharomyces cerevisiae* TISTR5606. The phylogenetic analysis based on the sequences of D1/D2 domain of 26S rDNA revealed that all strains were belonging to *Pichia kudriavzevii*. Considering the results in this study, it is suggested that the *P. kudriavzevii* NUNS4, NUNS5 and NUNS6 strains isolated in this study are thermo- and ethanol-tolerant ones which can be utilized as industrial microorganisms with traits that are important for future adaptation in industrial ethanol production. From all isolations of cyanobacteria in this study, 105 strians were successfully established in laboratory cultivation. Based on morphological features and 16S rRNA gene analysis, all isolated strains could be classified to 9 genera and 12 species including *Dolichospermum* spp. ,

Anabaenopsis sp., *Sphaerospermopsis* spp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Wollea* sp., *Planktothricoides raciborskii*, *Psuedoanabaena* sp., *Microcystis* sp. and *Lyngbya* sp. When determined the total carbohydrate content, the maximum value (23.54 % dry weigth) was found in a strain of *Dolichospermum* sp. 1_7. This finding could be ultilized in the development of carbon source for bioethanol. However, studies of the optimum condition of growth such as nutrition, light intensity or temperature are necessary to increase the carbohydrate production of cyanobacteria.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงลงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับการสนุบสนับจากกองทุนวิจัยของงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ 2561 และ คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม และสถานวิจัยเพื่อความเป็นเลิศทางวิชาการด้านเทคโนโลยีชีวภาพเกษตร สำหรับสถานที่ในการทำวิจัย ห้องปฏิบัติการ ตลอดจนอุปกรณ์และเครื่องมือทางวิทยาศาสตร์อื่นๆที่เกี่ยวข้อง สุดท้ายนี้ คณะผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณครอบครัวอันเป็นที่รักยิ่ง สำหรับกำลังใจที่ดีเสมอมา คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัย การเรียนรู้ และเป็นส่วนหนึ่งในการส่งเสริม พัฒนา ศักยภาพของอุตสาหกรรมไทยต่อไปในอนาคต

พงศนาถ ผ่องเจริญ

วิทยา ทาวงศ์

25 ธันวาคม 2561

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ	V
สารบัญ	VI
สารบัญรูป	VII
สารบัญตาราง	VIII
ข้อสรุปโครงการ	
1. ข้อมูลโครงการ	1
2. เนื้อหางานวิจัย	
2.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	2
2.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
2.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	6
2.4 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
2.5 ระเบียบวิธีวิจัย	12
2.6 ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการทดลอง	15
2.7 สรุปผลการทดลอง	31
เอกสารอ้างอิง	32
ภาคผนวก	39
1. บทความสำหรับการเผยแพร่วารสารนานาชาติ	40
2. การเผยแพร่ผลงานในงานประชุมวิชาการนานาชาติ	41
3. ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์และผลที่ได้รับ	42
4. ตารางเปรียบเทียบแผนการดำเนินงานที่ตั้งไว้และกิจกรรมที่ทำได้จริง	43

สารบัญรูป

เรื่อง	หน้า
ภาพที่ 1 สัดส่วนพลังงานหมุนเวียนบนโลก	3
ภาพที่ 2 ปฏิกิริยาทางเคมีของกระบวนการหมักเอทานอล	5
ภาพที่ 3 กระบวนการหมักทางอุตสาหกรรม	6
ภาพที่ 4 ปัจจัยความเครียดต่อการหมักเอทานอลของยีสต์	9
ภาพที่ 5 ความสามารถเจริญเติบโตของยีสต์ภายใต้สภาวะความเครียดจากอุณหภูมิ	23
ภาพที่ 6 ลักษณะการเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อนภายใต้สภาวะความเครียดจากความเข้มข้นเอทานอล	24
ภาพที่ 7 แผนภูมิวงวานวิวัฒนาการของยีสต์ด้วยวิธีการ Neighbor-Joining	26
ภาพที่ 8 ตัวอย่างชนิดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	28

สารบัญตาราง

เรื่อง	หน้า
ตารางที่ 1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดิน ชื่อย่อ จำนวนตัวอย่างและจำนวนไอโซเลทที่คัดแยกได้ในแต่ละจังหวัด	22
ตารางที่ 2 ความเข้มข้นเอทานอลของยีสต์ทนร้อนด้วยวิธี gas chromatography	25
ตารางที่ 3 ชนิดและจำนวนสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่คัดแยกจากแหล่งน้ำยูโธฟิเคชั่น	27
ตารางที่ 4 เปอร์เซนต์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมของของน้ำหนักแห้งของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน	29

ข้อสรุปโครงการ

(Executive Summary)

1. ข้อมูลโครงการ

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การผลิตไบโอเอทานอลจากการหมักของยีสต์ทนร้อนโดยใช้ชีวมวลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

(ภาษาอังกฤษ) Bioethanol production by thermotolerant yeast fermentation using cyanobacterial biomass as nutrient feedstock

ชื่อหัวหน้าโครงการ ดร.พงศนาถ ผ่องเจริญ

ผู้ร่วมโครงการวิจัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิทยา ทาวงศ์

ที่อยู่ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร

ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

โทรศัพท์ 055-96-2736

E-mail pongsanatp@nu.ac.th

สาขาวิชาที่ทำการวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

งบประมาณทั้งโครงการ 324,000 บาท

ระยะเวลาดำเนินงาน 1 ปี 6 เดือน

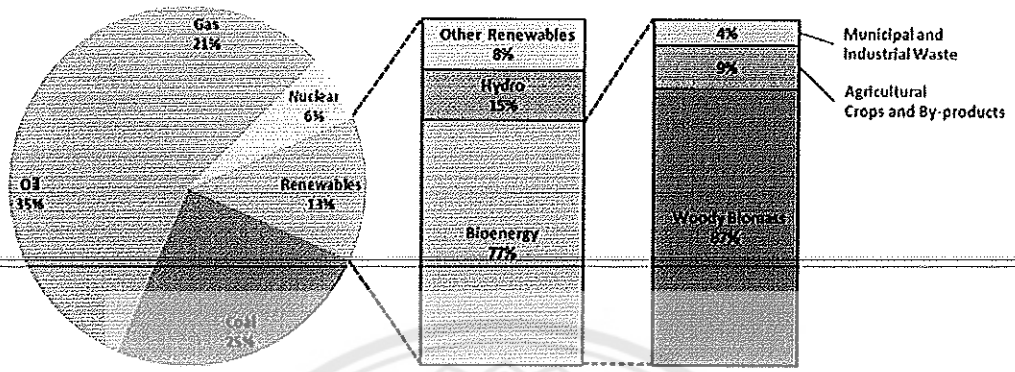
2. เนื้อหางานวิจัย

2.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

พลังงานเป็นปัจจัยพื้นฐานที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อกระบวนการพัฒนาประเทศ ครอบคลุมทั้งด้านอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และการคมนาคม เนื่องจากจำเป็นต้องใช้พลังงานในทุกขั้นตอนของการดำเนินงานเพื่อให้กระบวนการเสร็จสมบูรณ์ ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อปริมาณการใช้พลังงาน คือ จำนวนประชากรและระดับการพัฒนาประเทศ เป็นที่ชัดเจนว่าอัตราการเพิ่มของประชากรที่มีอย่างต่อเนื่องประกอบกับแรงผลักดันทางด้านเศรษฐกิจและสังคม เป็นเหตุให้มีการบริโภคพลังงานมากขึ้นเป็นเท่าตัว แหล่งพลังงานพื้นฐานที่สำคัญโดยทั่วไป คือ น้ำมัน ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ นับเป็นกลุ่มพลังงานประเภทสิ้นเปลืองหรือใช้แล้วมีโอกาสหมดไปจากโลก เนื่องจากมีต้นกำเนิดมาจากซากดึกดำบรรพ์ที่มีอยู่อย่างจำกัดและยังเป็นต้นเหตุของการทำลายสิ่งแวดล้อมอีกด้วย ดังนั้นแล้ว การใช้พลังงานจากแหล่งเหล่านี้จึงจำเป็นที่จะต้องตระหนักถึงความสมดุลระหว่างความต้องการบริโภคกับปริมาณแหล่งพลังงานที่เหลืออยู่ นอกจากนี้ สิ่งหนึ่งที่จะต้องคำนึงถึงตลอดเวลาคือผลกระทบจากการใช้พลังงานที่มีต่อสิ่งแวดล้อม

สถานการณ์การใช้พลังงานของประเทศไทยตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันยังคงเพิ่มขึ้นตามการเติบโตทางเศรษฐกิจ โดยที่น้ำมันสำเร็จรูปเป็นพลังงานที่ใช้มากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 50.8 ของการใช้พลังงานขั้นสุดท้าย สาขาขนส่งเป็นสาขาที่มีการใช้พลังงานในสัดส่วนที่สูงกว่าสาขาอื่น รองลงมาเป็นสาขาอุตสาหกรรม บ้านอยู่อาศัย ธุรกิจการค้า และเกษตรกรรม ตามลำดับ โดยในช่วงไตรมาสแรกของปี 2559 ประเทศไทยมีการนำเข้าพลังงานปริมาณ 18,039 พันตัน เพิ่มขึ้นจากช่วงเดียวกันของปีก่อนร้อยละ 4.6 คิดเป็นมูลค่ากว่า 144,445 ล้านบาท โดยมีการนำเข้าน้ำมันดิบมากที่สุด (สถานการณ์พลังงานของประเทศไทย ไตรมาสที่ 1/2559, 2559) จากแนวโน้มการใช้และความต้องการใช้พลังงาน จะเห็นว่าพลังงานที่ได้มาจากซากดึกดำบรรพ์หรือกลุ่มพลังงานสิ้นเปลืองนั้น เป็นแหล่งพลังงานส่วนใหญ่ที่ใช้กันมากและยังมีความต้องการเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เหล่านี้คือสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดผลกระทบต่อสภาพแวดล้อมอย่างหลีกเลี่ยงมิได้ ผลเสียจากการใช้ประโยชน์เกิดขึ้นตั้งแต่กระบวนการผลิต การขนส่ง การใช้ อันก่อให้เกิดปรากฏการณ์สภาวะอากาศของโลกเปลี่ยนไป (climate change) และมลพิษทางอากาศ (air pollution) เช่น คาร์บอนมอนอกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจนออกไซด์ สารประกอบกลุ่มไฮโดรคาร์บอนรวมทั้งสารโลหะหนักต่างๆ ซึ่งเป็นต้นเหตุหลักของปรากฏการณ์เรือนกระจก (greenhouse effect) การแสวงหาพลังงานทางเลือกอื่นมา

ทดแทนการใช้พลังงานฟอสซิลจึงเป็นสิ่งจำเป็นและเร่งด่วนสำหรับวิกฤติการณ์พลังงานในปัจจุบันและยังเป็นการป้องกันปัญหามลภาวะทางอากาศที่เกิดจากการเผาผลาญพลังงานฟอสซิลอีกด้วย (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 สัดส่วนพลังงานหมุนเวียนบนโลก ที่มา IEA, 2006; and IPCC, 2007 (Bauen *et al.* 2009)

มวลชีวภาพหรือชีวมวล (biomass) หมายถึงสารอินทรีย์จากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติ เกิดจากกลไกที่เรียกว่า กระบวนการสังเคราะห์แสง (photosynthetic process) กระบวนการสังเคราะห์แสงจะเปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์ให้เป็นพลังงานสะสมในรูปของสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ เช่น พืชหรือสาหร่าย เป็นต้น เมื่อคนหรือสัตว์กินพืชเป็นอาหาร ก็จะได้รับสารอินทรีย์ที่เป็นประโยชน์เป็นลำดับต่อไป สารอินทรีย์เหล่านี้หากนำมาผ่านกระบวนการที่เหมาะสมจะสามารถเปลี่ยนสภาพจากพลังงานเคมีให้เป็นพลังงานที่เป็นประโยชน์ได้ ซึ่งอาจอยู่ในรูปของเชื้อเพลิงชีวภาพ (biofuel)

เชื้อเพลิงชีวภาพแตกต่างจากเชื้อเพลิงฟอสซิลตรงที่เชื้อเพลิงชีวภาพจัดเป็นกลุ่มพลังงานหมุนเวียนที่สามารถฟื้นฟูหรือสร้างขึ้นใหม่ได้ การเผาผลาญเชื้อเพลิงชีวภาพสามารถลดการเกิดปริมาณก๊าซพิษเมื่อเทียบกับเชื้อเพลิงชนิดอื่น ลดปัญหาการเพิ่มปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ การใช้เชื้อเพลิงชีวภาพจึงนับว่าเป็นการช่วยรักษาสภาพแวดล้อมได้อย่างจริงจัง โดยส่วนใหญ่แล้วแหล่งพลังงานมวลชีวภาพเพื่อใช้ผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพแบ่งออกเป็นสองแหล่งหลักๆ คือ พืชผลทางการเกษตรจำพวก อ้อย ข้าวโพด ทานตะวัน สบู่ดำ หรือพืชตระกูลถั่วต่างๆ และ แหล่งพลังงานที่เป็นของเหลือใช้จากพืชผลทางการเกษตร เช่น เศษไม้ เศษวัสดุทางการเกษตรจำพวก ฟางข้าวสาลี ข้าวโพด ชานอ้อย เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพในปัจจุบันนี้ยังไม่สามารถตอบสนองต่ออุปสงค์ทั้งหมดได้ ไม่ว่าจะเป็นข้อจำกัดเรื่อง

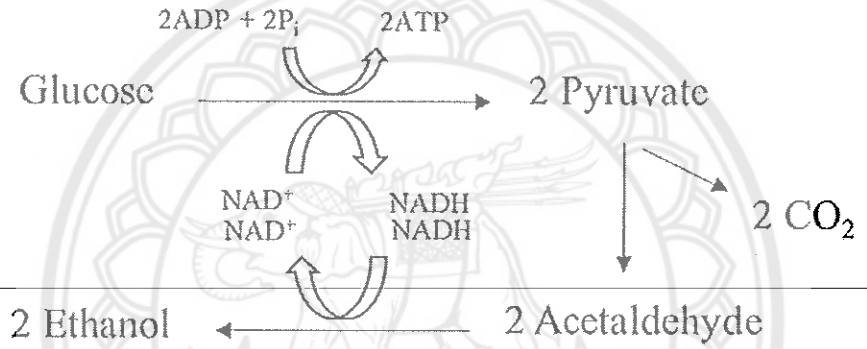
ความไม่เพียงพอของวัตถุดิบ ปัญหาเรื่องพื้นที่ทางการเกษตร ราคาต้นทุนการผลิตหรือกระบวนการผลิต เป็นต้น ดังนั้นแล้ว การค้นคว้าเพื่อหาแหล่งผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพขนาดใหญ่แหล่งใหม่จึงเป็นเรื่องเร่งด่วนที่น่าสนใจอย่างยิ่ง

เชื้อเพลิงชีวภาพจากจุลินทรีย์ (microorganism) ที่มีความสามารถในการสังเคราะห์แสงได้ด้วยตัวเอง (aquatic microbial oxygenic photoautotroph) เช่น สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria) สาหร่าย (algae) และ ไดอะตอม (diatom) นับเป็นแหล่งชีวมวลขนาดใหญ่ของโลก เนื่องจากเจริญเติบโตได้ง่ายและรวดเร็วเมื่อเทียบกับพืชบก มีการแพร่กระจายอย่างมากในทุกๆแหล่งน้ำ ไม่ว่าจะเป็นแหล่งน้ำจืด น้ำเค็ม และน้ำเสีย สามารถสังเคราะห์แสงได้ด้วยตัวเอง เพาะเลี้ยงและเก็บผลผลิตได้มากโดยไม่ส่งผลกระทบต่ออาหารของประชากรโลก อีกทั้งสาหร่ายบางสายพันธุ์ยังสามารถสะสมน้ำมันไว้ภายในตัวได้อีกด้วย โดยเฉพาะกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีผนังเซลล์คล้ายแบคทีเรีย ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสามารถย่อยได้ด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์และมีความสลับซับซ้อนน้อยกว่าเมื่อเทียบกับผนังเซลล์ของสาหร่ายขนาดเล็กชนิดอื่นๆ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการสะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปของไกลโคเจนซึ่งไม่พบในกลุ่มสาหร่ายขนาดเล็กพวกยูคาริโอต จึงเป็นแนวคิดริเริ่มที่จะใช้ประโยชน์จากเก็บไกลโคเจนของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินให้เป็นแหล่งพลังงานชีวมวลสำหรับกระบวนการหมักของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพต่อไป

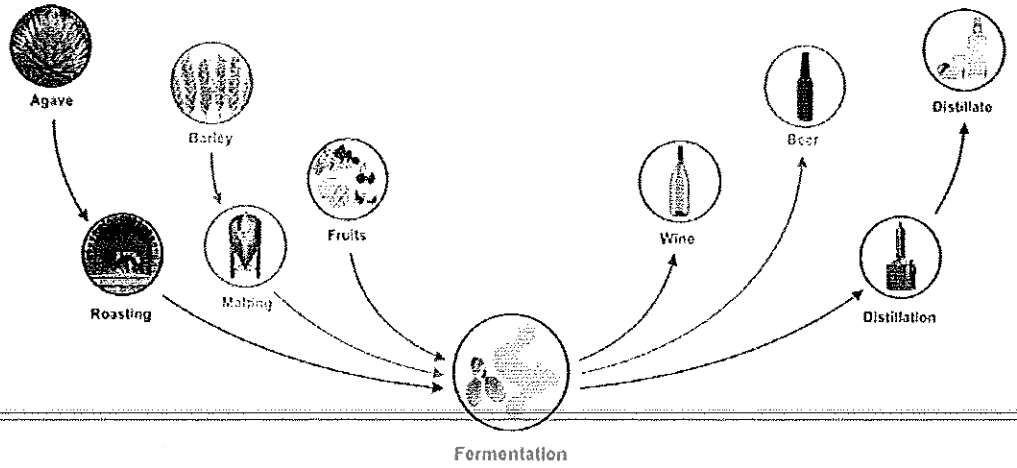
เอทานอล (ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) คือ แอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีสูตรเคมี C_2H_5OH สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ใช้ผลิตอาหารและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิง ฯลฯ เป็นต้น เอทานอลสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมัก (fermentation) ซึ่งเป็นขั้นตอนการใช้ยีสต์เพื่อเปลี่ยนแป้งหรือน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์หรือเอทานอล (ภาพที่2) ในกระบวนการหมักเอทานอลอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักของยีสต์โดยทั่วไปจะอยู่ที่ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ในการหมักจะเกิดความร้อนร่วมด้วยที่อุณหภูมิเฉลี่ย 30-40 องศาเซลเซียส (Kiran Sree et al. 2000) ซึ่งมีผลไปยังยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์เซลล์และลดผลผลิตเอทานอล ความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักจะถูกระบายหรือลดอุณหภูมิลงด้วยระบบหล่อเย็น ทำให้มีค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับการลดอุณภูมิค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามการหมักที่อุณหภูมิสูงด้วยระยะเวลาอันสั้นนอกจากจะช่วยลดการปนเปื้อน

ที่อาจจะเกิดขึ้นและยังลดค่าใช้จ่ายในการลดอุณหภูมิอีกด้วย เพราะฉะนั้นแล้วการเสาะแสวงหาสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสามารถในการทนร้อนจึงเป็นทางออกหนึ่งที่น่าสนใจ (ภาพที่ 3)

จากปัญหาการใช้และการเผาผลาญพลังงานฟอสซิลที่ส่งผลกระทบอย่างวิกฤติต่อสิ่งแวดล้อมตลอดจนเพื่อลดภาระค่าใช้จ่ายในการนำเข้าน้ำมันดิบจากต่างประเทศ ทำให้การค้นหาแหล่งพลังงานใหม่ที่สะอาดและยั่งยืนกลายเป็นเรื่องเร่งด่วนอย่างยิ่งในขณะนี้ ในการศึกษาครั้งนี้ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจึงถูกนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานชีวมวลสำหรับการผลิตคาร์โบไฮเดรตเพื่อใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการหมักของยีสต์ให้ได้มาซึ่งเชื้อเพลิงชีวภาพประเภทไบโอเอทานอลต่อไป



ภาพที่ 2 ในการหมักเอทานอล น้ำตาลกลูโคสหนึ่งโมเลกุลสามารถสลายให้เป็นสารไพรูเวทสองโมเลกุลโดยกระบวนการไกลโคไลซิส (1) พลังงานจากปฏิกิริยาคายความร้อนถูกนำมาใช้เกี่ยวข้องกับสาร ADP และเปลี่ยน NAD+ ไปเป็น NADH ไพรูเวทสองโมเลกุลถูกสลายเป็นสองโมเลกุลของอะซีทัลดีไฮด์และให้คาร์บอนไดออกไซด์สองโมเลกุล (2) ต่อมาสองโมเลกุลของอะซีทัลดีไฮด์ถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลสองโมเลกุล และ NADH ถูกออกซิไดส์ไปเป็น NAD+ (อ้างอิงจาก https://en.wikipedia.org/wiki/Ethanol_fermentation)



ภาพที่ 3 การหมักคือพื้นฐานของเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ทุกประเภท น้ำตาลเป็นสารตั้งต้นที่ปรากฏอยู่ในผลไม้หลากหลายชนิด เมล็ดธัญพืช น้ำหวาน ซึ่งเป็นสารประกอบที่สำคัญและจำเป็นในกระบวนการสันดาปของยีสต์ ยีสต์จะทำการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารประกอบอื่นๆที่เกี่ยวข้อง ต่อมาจึงเข้าสู่กระบวนการทางอุตสาหกรรมเพื่อผลิตเครื่องดื่มประเภทต่างๆ เช่น ไวน์ เบียร์ สุรา (Cristian Varela, 2016)

2.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสกัดคาร์โบไฮเดรตได้ในปริมาณสูงในสภาวะที่กำหนด

2. เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง

2.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้แบ่งเป็นสองส่วนคือ

ส่วนที่ 1 การเก็บตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจากแหล่งน้ำธรรมชาติ บ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ หรือบ่อบำบัดน้ำเสียในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง โดยน้ำตัวอย่างปริมาตร 10-20 ลิตร กรองผ่านถุงกรองขนาดความถี่ตา 20 ไมโครเมตร เพื่อรวบรวมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสายพันธุ์ของประเทศไทย จากนั้นคัดแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น *Arthrospira* spp. *Anabaena* spp. *Microcystis* spp. *Cylindrospermopsis* spp. *Pseudanabaena* spp. *Plankthoricoides* spp. เป็นต้น โดยใช้เทคนิคไมโครปิเปต นำสาหร่ายที่ได้มาเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหาร BG 11 ในห้องปฏิบัติการ จากนั้นทดสอบ

ความสามารถในการสะสมคาร์โบไฮเดรต โดยนำสาหร่ายที่ทำการคัดแยกมาเลี้ยงภายใต้ความแตกต่างของปริมาณไนโตรเจน ในสูตรอาหาร BG 11 สาหร่ายที่สามารถให้คาร์โบไฮเดรตได้ในปริมาณสูงจะถูกคัดเลือกเพื่อทำการทดลองต่อไป

ส่วนที่ 2 การคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) และ 4% เอทานอล นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 37, 40, 42, 45 องศาเซลเซียส เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ทนร้อนหรือสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลด้วยเทคนิค Gas chromatography สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ดีในสภาวะอุณหภูมิสูงจะถูกคัดเลือกเพื่อเลี้ยงร่วมกับสาหร่ายในการทดลองต่อไป

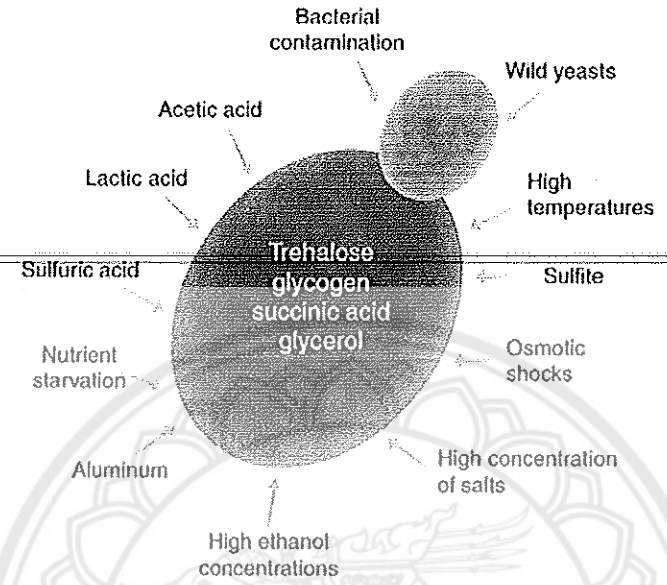
2.4 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกกำลังประสบปัญหาเกี่ยวกับพลังงานเชื้อเพลิงโดยเฉพาะพลังงานจากฟอสซิลที่กำลังจะหมดไปในอนาคต ปัญหาราคาน้ำมันในตลาดโลกที่ผันผวนอยู่ตลอดเวลาและมีการปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ประเทศไทยเป็นหนึ่งในหลายๆประเทศที่กำลังเผชิญกับวิกฤติการณ์ดังกล่าว เนื่องจากมีความจำเป็นต้องนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศเพื่อให้เพียงพอกับความต้องการภายในประเทศ ทำให้มูลค่าการนำเข้าน้ำมันที่ไม่คงที่นี้ส่งผลกระทบต่อภาพรวมทางเศรษฐกิจและสังคม เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวจึงเริ่มมีการคิดค้น วิจัย เสาะหา แหล่งพลังงานทดแทนใหม่ๆให้ได้รับการพัฒนาขึ้นมาอย่างต่อเนื่อง เช่น พลังงานไฟฟ้า พลังงานไฮบริด และ พลังงานชีวภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพลังงานชีวภาพอันเกิดจากมวลสารของสิ่งมีชีวิตเช่นป่าไม้ ผลผลิตสินค้าการเกษตร กากเหลือจากการเกษตรหรือของเสียอินทรีย์จากโรงงานอุตสาหกรรมการเกษตร พลังงานชีวภาพจึงเป็นพลังงานทางเลือกใหม่ที่มีความสะอาดอีกทั้งยังลดปัญหาการปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้อีกด้วย

ไบโอเอทานอลคือพลังงานชีวภาพรูปแบบหนึ่งที่กิดจากการใช้วัสดุการเกษตรหรือสารชีวมวลที่มีองค์ประกอบประเภทแป้ง น้ำตาล หรือ เซลลูโลส เป็นวัตถุดิบ เอทานอลหรือเอทิลแอลกฮอล์ (ethyl alcohol) มีสูตรเคมี C_2H_5OH เป็นแอลกฮอล์ชนิดหนึ่งที่เป็นของเหลว ไม่มีสี จุดไฟติด ระเหยง่าย สามารถลอยได้ในน้ำและในสารละลายอินทรีย์อื่นๆ ผลิตได้จากวัตถุดิบที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวอยู่ในโครงสร้างโมเลกุล โดยในกระบวนการผลิตจำเป็นต้องเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลด้วยกรดหรือเอนไซม์ หลังจากนั้นจึง

เข้าสู่กระบวนการหมักซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกฮอล์ภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ในกระบวนการหมักเอทานอลอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักของยีสต์โดยทั่วไปจะอยู่ที่ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ในการหมักจะเกิดความร้อนร่วมด้วยที่อุณหภูมิเฉลี่ย 30-40 องศาเซลเซียส (Kiran Sree et al. 2000) มีผลไปยังยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์เซลล์และลดผลผลิตเอทานอล ความร้อนที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักจำเป็นต้องถูกระบายหรือลดอุณหภูมิลงด้วยระบบหล่อเย็น ทำให้มีค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับการลดอุณภูมิค่อนข้างสูง อย่างไรก็ตามการหมักที่อุณหภูมิสูงด้วยระยะเวลาอันสั้นนอกจากจะช่วยลดการปนเปื้อนที่อาจจะเกิดขึ้นและยังลดค่าใช้จ่ายในการลดอุณหภูมิอีกด้วย เพราะฉะนั้นแล้วการเสาะแสวงหาสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสามารถทนร้อนจึงเป็นทางออกหนึ่งที่น่าสนใจ การวิจัยก่อนหน้านี้ได้แสดงให้เห็นถึงความหลากหลายของยีสต์ที่ถูกนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล เริ่มจากยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ถูกใช้อย่างแพร่หลายในวงการอุตสาหกรรมการหมัก แต่มีข้อจำกัดบางประการคือ *S. cerevisiae* ไม่สามารถทนต่อความเข้มข้นแอลกฮอล์ที่สูงได้ (Limtong et al. 2007) ยีสต์สายพันธุ์ *Kluyveromyces marxianus* สามารถผลิตเอทานอลได้ดีในสภาวะอุณหภูมิสูงระหว่าง 40-45 องศาเซลเซียส (Christensen et al. 2011; Limtong et al. 2007; Kourkoutas et al. 2002) ผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาลแลคโตสที่ 0.5 กรัมเอทานอลต่อกรัมแลคโตส ณ อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ด้วยค่า pH 4.5 หรือไม่จำเป็นต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ส่งผลให้ *K. marxianus* ถูกจัดเป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่มีประโยชน์อย่างมากในทางอุตสาหกรรม (Christensen et al. 2011) *Pichia kudriavzevii* หรือ *Issatchenkia orientalis* (Kurtzman, 2011) เป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งที่สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง (Dhaliwal et al. 2011; Gallardo et al. 2011) สามารถใช้น้ำตาลกาแล็กโตสแทนน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล เจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 43 องศาเซลเซียส (Isono et al. 2012) และมีความสามารถในการทนร้อนได้ดีกว่า *S. cerevisiae* (Chi and Arnebory, 2000; Edgardo et al. 2008) *P. kudriavzevii* MF-121 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถพบได้บริเวณบ่อน้ำร้อนและทนต่อสภาวะความเครียดที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตเอทานอล เช่น ความเป็นกรด อุณหภูมิ และ ความเข้มข้นของเอทานอล (Hisamatsu et al. 2006) เจริญเติบโตได้ที่

อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสและผลิตเอทานอลได้จากน้ำตาลกลูโคสในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือและค่าความเป็นกรดสูงระหว่าง pH 2.0-2.5 (Isono et al. 2012; Hisamatsu et al. 2006) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ปัจจัยความเครียดต่างๆที่ส่งผลกระทบต่อความสามารถในการหมักเอทานอลของยีสต์เซลล์ในระดับอุตสาหกรรมและกลไกการตอบสนองที่เกิดขึ้นภายในยีสต์เซลล์ ได้แก่ trehalose, glycogen, succinic acid และ glycerol (Lopes *et al.* 2016)

สำหรับประเทศไทยเริ่มมีรายงานเกี่ยวกับสายพันธุ์ยีสต์ทนร้อนต่อการผลิตเอทานอลแต่ยังไม่เป็นที่กว้างขวาง Buddiwong et al. (2014) รายงานยีสต์สายพันธุ์ *Candida* sp, *Pichia* sp. และ *Issatchenkia* sp. จากบริเวณพื้นที่เพาะปลูกอ้อยภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ในปริมาณมากเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิสูง โดยที่ *P. kudriavzevii* (S10-2) ผลิตเอทานอลได้ 64.97, 57.99 และ 37.09 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ Yuangsaard et al. (2013) รายงาน *P. kudriavzevii* (DMKU 3-ET15) ผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสให้ปริมาณเอทานอล 7.86 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ในขณะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสปริมาณเอทานอลลดลงไปที่ 3.82 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kaewkrajay et al. (2014) กล่าวว่า *P. kudriavzevii* (PBB511-1) เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลได้ดีเมื่ออยู่ในอุณหภูมิสูงโดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่ง

พลังงาน สายพันธ์ *K. marxianus* (DMKU 3-1042) สามารถผลิตเอทานอลได้เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียสโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส *K. marxianus* ให้ปริมาณเอทานอล 8.70 และ 6.78 เปอร์เซ็นต์ (มวลต่อปริมาตร) ตามลำดับ (Limtong et al. 2007) มีรายงานการวิจัยจาก Wu et al. (2016) แสดงให้เห็นว่าของเสียจากไร่เผือกคือเปลือกเผือกและหัวเผือกนั้นมีส่วนประกอบของแป้งอยู่เป็นจำนวนมาก นับเป็นแหล่งคาร์บอนหลักในการผลิตไบโอเอทานอล ยีสต์สายพันธุ์ *K. marxianus* K21 สามารถใช้ของเสียดังกล่าวในการผลิตเอทานอลได้ 48.98 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เนื่องจากเชื้อเพลิงชีวภาพ คือ เชื้อเพลิงที่ได้จากชีวมวลหรือสสารที่ได้จากพืชและสัตว์โดยมีพื้นฐานจากการสังเคราะห์แสง (photosynthetic process) แล้วเก็บรวบรวมพลังงานจากดวงอาทิตย์เอาไว้ในรูปของพลังงานเคมี พืชจัดเป็นพลังงานชีวภาพขนาดใหญ่เนื่องจากมีกระบวนการสังเคราะห์แสงที่เปลี่ยนพลังงานแสงอาทิตย์ให้อยู่ในรูปสารอินทรีย์ สารอินทรีย์จากพืชนอกจากจะมีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของพืชเองแล้ว หากนำมาผ่านกระบวนการที่เหมาะสมก็จะสามารถเปลี่ยนเป็นพลังงานที่เป็นประโยชน์ต่อไปได้ นอกจากนี้ยังมีจุลินทรีย์อีกหลายชนิดที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ด้วยตนเองอีกด้วย นับได้ว่าเป็นชีวมวลทางเลือกใหม่ที่มีกำลังการผลิตมหาศาลและได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากจุลินทรีย์มีระยะเวลาการเจริญเติบโตสั้นกว่าพืชบก สามารถเพาะเลี้ยงได้เอง และ ผลผลิตที่ได้จากจุลินทรีย์ไม่ส่งผลกระทบต่อความต้องการบริโภคของมนุษย์และการใช้ประโยชน์จากผลผลิตทางการเกษตร จุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงได้ด้วยตนเองและพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติคือสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (cyanobacteria) และสาหร่ายขนาดเล็ก (microalgal) กลุ่มยูคาริโอต เช่น สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีแดงและไดอะตอม เป็นต้น (Graham et al., 2009) สาหร่ายสามารถผลิตคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสงเปรียบเสมือนเป็นแหล่งพลังงานคาร์บอนให้กับการหมัก สอดคล้องกับรายงานของ Harun et al. (2009) กล่าวว่า คาร์โบไฮเดรตและโปรตีนจากสาหร่ายขนาดเล็กสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงานสำหรับการหมักได้ Moen (2008) แสดงให้เห็นว่า สาหร่ายสีน้ำตาล (brown seaweed) สามารถใช้เป็นสารตั้งต้นที่มีคุณภาพในการผลิตไบโอเอทานอล มีงานวิจัยจาก Hirayama et al. (1998) และ Ueda et al. (1996) รายงานว่า สาหร่ายขนาดเล็กสามารถเกิดการหมักเพื่อผลิตเอทานอลได้ Hon-Nami (2006) รายงานถึงความสามารถในการผลิตเอทานอล บิวเทนไดออล อะซีติกแอซิด และคาร์บอนไดออกไซด์จาก

Chlamydomonas perigranulata สำหรับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจัดเป็นสิ่งมีชีวิตกลุ่มโปรคาริโอตที่สามารถสังเคราะห์แสงได้ด้วยตนเอง แพร่กระจายตามแหล่งน้ำจืดและน้ำทะเล และมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิต่างๆที่มีประโยชน์ทั้งทางการแพทย์ สิ่งแวดล้อม และอุตสาหกรรม เช่น เป็นองค์ประกอบของยาต้านไวรัส แบคทีเรีย รา และ มะเร็ง ใช้เป็นส่วนประกอบของการผลิตพลาสติกปิโตรเคมีและใช้ในการบำบัดทางชีวภาพ เป็นต้น (Abed et al., 2009; Rosgaard et al., 2012; Wang et al., 2012) สำหรับการใช้สารชีวมวลจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินนั้นมีข้อได้เปรียบมากกว่าชีวมวลจากสาหร่ายขนาดเล็กยูคาริโอต เนื่องจากผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีโครงสร้างประกอบไปด้วย peptidoglycan ซึ่งคล้ายคลึงกับแบคทีเรียแกรมบวก (Hoiczyk et al., 2000) สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายด้วย lysozyme enzyme ผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีความสลับซับซ้อนน้อยกว่าสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่มยูคาริโอตที่ผนังเซลล์จะประกอบไปด้วย polysaccharide และ proteoglycans (Domozych, 2011) นอกจากนี้ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีการสะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปของไกลโคเจนเป็นแหล่งพลังงาน (Allen, 1984; Ball et al., 2003) ในขณะที่สาหร่ายกลุ่มอื่นจะสะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปของแป้งหรือเบต้ากลูแคน เช่น สาหร่ายสีเขียว สาหร่ายสีแดง สาหร่ายสีน้ำตาลและไดอะตอม เป็นต้น ไกลโคเจนและแป้งมีโครงสร้างทางเคมีค่อนคล้างคล้ายคลึงกันคือแอลฟา 1,4 กลูแคน และ แอลฟา 1,6 แต่สิ่งหนึ่งที่มีความแตกต่างกันและเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการหมักคือไกลโคเจนเป็นโมเลกุลขนาดเล็กประมาณ 0.04-0.05 ไมครอน และละลายน้ำได้ ในขณะที่แป้งมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่กว่าประมาณ 0.1-100 ไมครอนและไม่สามารถละลายน้ำได้ (Ball et al., 2011) ดังนั้นแล้ว ไกลโคเจนจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นให้กับการหมักที่ดีกว่าแป้ง เพราะการย่อยโมเลกุลแป้งให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้นมีความสลับซับซ้อนและมีค่าใช้จ่ายสูงกว่าการย่อยไกลโคเจนให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพื่อเตรียมพร้อมสำหรับขั้นตอนการหมักต่อไป (Mamo et al., 2013)

การเสาะแสวงหาสายพันธุ์ยีสต์ทนร้อนและแหล่งชีวมวลจำนวนมากที่เหมาะสมต่อการผลิตไบโอเอทานอลเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงอุตสาหกรรมและพลังงานทดแทนถือเป็นวาระแห่งชาติที่จำเป็นและเร่งด่วน จากงานวิจัยและองค์ความรู้ทั้งหมดที่กล่าวมาเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่าประเทศไทยมีสภาพแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการค้นหาสายพันธุ์ยีสต์ทนร้อนเพื่อใช้เป็นจุลินทรีย์ตั้งต้นในกระบวนการหมักไบโอเอทานอล ประกอบกับการแพร่กระจายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่พบได้ตามแหล่งน้ำทั่วไปและยังสามารถ

เพาะเลี้ยงได้ง่าย การใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเป็นแหล่งคาร์บอนหลักสำหรับกระบวนการหมักของยีสต์เพื่อผลิตไบโอเอทานอลนับเป็นงานวิจัยที่มีความท้าทายและน่าสนใจอย่างยิ่ง เนื่องจากประเทศไทยยังขาดรายงานการวิจัยในส่วนนี้เป็นอย่างมาก หากสามารถผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้แล้วนั้น ก็จะเป็นการลดต้นทุนการนำเข้าของแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงได้เป็นจำนวนเงินมหาศาล อีกทั้งยังเป็นการรักษาสภาพแวดล้อมมิให้เลวร้ายลงไปมากกว่าเดิมอีกด้วย

2.5 ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง การเพาะเลี้ยง และการวิเคราะห์ผลทางพันธุกรรมของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน

เก็บตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำในอ่างเก็บน้ำ แหล่งน้ำ หรือบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในเขตพื้นที่ภาคเหนือตอนล่าง โดยการเก็บน้ำตัวอย่างปริมาตร 20 ลิตร ผ่านถุงกรองแพลงก์ตอน (plankton net) ขนาดตา 20 ไมโครเมตร นำน้ำตัวอย่างที่ได้เก็บใส่ขวดพลาสติกขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำมาตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อระบุชนิดเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ Olympus CHK-N (Olympus, Japan) โดยอาศัยการเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากการอ้างอิงในลัดดา (2544) และ ยุวดี (2549) จากนั้นคัดแยกเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เช่น *Arthrospira* spp. *Anabaena* spp. *Microcystis* spp. *Cylindrospermopsis* spp. *Pseudanabaena* spp. *Planktholyngbya* spp. เป็นต้น ซึ่งเป็นสาหร่ายที่พบได้ทั่วไปในแหล่งน้ำของประเทศไทย โดยใช้ Komagome pipette เซลล์สาหร่ายที่ถูกคัดแยกจะนำมาเลี้ยงในอาหาร BG-11 (Rippka et al., 1979) ภายใต้สภาวะที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และสภาพการให้แสง 16:8 ชั่วโมง (L:D) ในตู้ควบคุมการเจริญเติบโต เมื่อสาหร่ายมีการเจริญเติบโตและมีปริมาณเซลล์ที่มากพอ ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อยืนยันการจำแนกชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยสกัด DNA ด้วยวิธีการ Chelex 100 จากนั้นเพิ่มชิ้นส่วน DNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR) สำหรับการเพิ่มชิ้นของยีน 16S rRNA โดยใช้ primer จำเพาะตามรายงานของ Neilan et al. (1997) ทำการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ที่ได้จากตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้กับฐานข้อมูลที่มีใน Gene Bank และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้หลักการ Maximum likelihood

เพื่อศึกษาการสะสมคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน เมื่อทำการเพาะเลี้ยงสาหร่ายได้ในปริมาณที่เพียงพอ นำสาหร่ายที่ได้มาเพาะเลี้ยงต่อในขวดรูปชมพู่ด้วยสูตรอาหาร BG 11 ที่มีปริมาณไนโตรเจนแตกต่างกัน ปริมาณสาหร่ายเริ่มต้นทำการทดลองจะพิจารณาจากค่าความหนาแน่นเซลล์โดยการวัดความขุ่น (Optical density:OD) ด้วยเครื่อง spectophotometer ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 – 0.3 นำสาหร่ายที่เตรียมได้เพาะเลี้ยงในสภาวะเช่นเดียวกับที่อธิบายไว้ด้านบน ตรวจวัดการเจริญเติบโตโดยใช้การวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ทุก ๆ 2-3 วัน เพื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เมื่อสาหร่ายเข้าสู่ช่วงการเจริญเติบโตแบบคงที่ (stationary phrase) ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตต่อไป

2. การเก็บตัวอย่าง คัดเลือกและจำแนกยีสต์ทนร้อน

ทำการเก็บตัวอย่างยีสต์จากบริเวณดิน น้ำ หรือ ผลผลิตทางการเกษตรตามธรรมชาติ โดยพิจารณาจากลักษณะทางกายภาพโดยรอบของสิ่งแวดล้อม เช่น บริเวณนั้นมีอุณหภูมิโดยเฉลี่ยค่อนข้างสูง นำตัวอย่างมาบดละเอียด ปริมาณ 2 กรัม ใส่ลงอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose) ด้วย 0.25% sodium propionate, 0.02% chloramphenicol และ 4% เอทานอล ปริมาตรรวม 50 มิลลิลิตร ภายในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ด้วยวิธีการ aseptic technique บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เครื่องเขย่าความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1-2 วัน เพื่อทำการคัดเลือกยีสต์ที่สามารถเจริญเติบโตได้ดี ยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกจะถูกนำไปเลี้ยงลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (solid medium) YPD (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose, 1.8% agar) ด้วย 0.25% sodium propionate, 0.02% chloramphenicol และ 4% เอทานอล บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนกว่าโคโลนีจะปรากฏ อ้างอิงจาก Yuangsaard et al. (2013) หลังจากนั้นนำมาคัดแยกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการ cross streaking (Yuangsaard et al. 2013) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ solid medium

ยีสต์ที่คัดแยกออกมาได้ถูกนำมาเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (Yuangsaard et al. 2013) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนเข้าสู่ระยะ stationary phase ช่วงต้น (ประมาณ 9-12 ชั่วโมง) หลังจากนั้นทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 37, 40, 42 และ 45 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นเอทานอล 0, 5, 10, 15 และ 20% ยีสต์ที่สามารถโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะถูกนำมาทดลองต่อไป

การใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อจัดจำแนกยีสต์ โดยสกัดจีโนมิคดีเอ็นเอจากยีสต์ด้วยวิธีการของ Harju et al. (2004) ตรวจสอบคุณภาพของจีโนมิคดีเอ็นเอที่สกัดออกมาโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectophotometer และวิธีการรันเจลแบบ agarose gel จำแนกสายพันธุ์ยีสต์โดยใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 ของ 26s LSU rRNA gene (Kurtzman and Robnett, 1998) และตรวจสอบโดยวิธี PCR ด้วย primer ที่มีลำดับเบส

NL-1 5' GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG 3'

NL-4 5' GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'

วิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างที่ถูกคัดเลือกและหาความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมโดยใช้โปรแกรม BLAST และ MEGA, version 5 (Altschul et al. 1997)

3. การสกัดคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อใช้ในการหมักของยีสต์

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินถูกเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น ทำการเก็บเซลล์สาหร่ายด้วยวิธีการปั่นเหวี่ยงเพื่อให้ตกตะกอนที่ความเร็ว 10000g เวลา 20 นาที สกัดคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยใช้ lysozyme enzyme เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ liquozyme enzyme เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เพื่อย่อยสลายผนังเซลล์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและแป้งที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ๆ สารที่สกัดออกมาได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยเอนไซม์ดังกล่าวถูกเรียกว่า hydrolysate นำ hydrolysate ที่สกัดได้มาหมักร่วมกับยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือกได้ เปรียบเทียบผลการทดลองกับการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสารตั้งต้นและการใช้สายพันธุ์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นมาตรฐาน

4. การตรวจสอบปริมาณน้ำหนักแห้งและการวิเคราะห์ทางเคมี

ตรวจสอบน้ำหนักแห้ง (dry weight) ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยวิธีการกรอง (filtration) ตรวจสอบปริมาณคาร์โบไฮเดรตด้วยวิธีการ phenol sulfuric acid assay (DuBois M et al., 1956) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินด้วยวิธี Technical Association of the Pulp and Paper Industry (TAPPI) (Sluiter et al., 2008) วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องมือ Gas Chromatography (GC)

2.6 ผลการศึกษาและวิจารณ์ผลการทดลอง

เนื่องจากมีหลากหลายวิธีการในการคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตาม พบว่าการคัดแยกยีสต์จากธรรมชาติเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดวิธีหนึ่ง (Banat *et al*. 1998) มีรายงานการวิจัยแสดงให้เห็นว่า ยีสต์ทนร้อนหลากหลายสายพันธุ์ที่คัดเลือกออกมาจากวิธีการenrichment isolation technique สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงช่วงระหว่าง 45 – 50 องศาเซลเซียส ตัวอย่างรายงานการวิจัยของ Limtong และคณะ ปี ค.ศ. 2007 สามารถคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ได้จากตัวอย่างดินและน้ำจากไร่เกษตรกรรมประเภทอ้อย โดยวิธีการ enrichment isolation technique ที่มีส่วนประกอบของเอทานอลที่ 4 เปอร์เซ็นต์ มีรายงานการวิจัยอื่นๆ ที่สนับสนุนและรองรับวิธีการดังกล่าวว่าเป็นกระบวนการที่มีประสิทธิภาพในการคัดแยกยีสต์ตามธรรมชาติ (Limtong *et al*. 2007; Yuangsaard *et al*. 2013; Kaewkrajay *et al*. 2014) Limtong et al., 2007 รายงานว่า ปัจจัยเรื่องความร้อนและความเข้มข้นเอทานอลที่มากกว่า 3% (ปริมาตร/ปริมาตร) มีผลต่อประสิทธิภาพการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ดังนั้นแล้วที่ความเข้มข้นเอทานอล 4% (ปริมาตร/ปริมาตร) และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สามารถใช้เป็นปัจจัยในการคัดเลือกยีสต์ทนร้อนได้ สำหรับการศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 60 ไอโซเลทและกำหนดชื่อเป็น NUUD จำนวน 12 ไอโซเลท NUKP จำนวน 12 ไอโซเลท NUCN จำนวน 6 ไอโซเลท NUST จำนวน 12 ไอโซเลท NUNS จำนวน 6 ไอโซเลท และ NUPHS จำนวน 12 ไอโซเลท (ตาราง 1) อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการเจริญเติบโตของยีสต์ภายใต้อุณหภูมิสูงนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ยีสต์แต่ละชนิดและอัตราการเจริญเติบโตในแต่ละสภาวะร่วมด้วย

การคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถทนต่ออุณหภูมิสูง พบว่ามี 30 ไอโซเลท ได้แก่ NUCN–1, NUCN–2, NUCN–3, NUCN–4, NUCN–5, NUCN–6, NUNS–4, NUNS–5, NUNS–6, NUST–1, NUST–2, NUST–3, NUUD–1, NUUD–2, NUUD–3, NUUD–4, NUUD–5, NUUD–6, NUUD–7, NUUD–8, NUUD–9, NUUD–10, NUUD–11, NUUD–12, NUKP–1, NUKP–2, NUKP–3, NUKP–4, NUKP–5 และ NUKP–6 สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส มีหกไอโซเลทได้แก่ NUCN–1, NUCN–2, NUCN–3, NUCN–4, NUCN–5 และ NUCN–6 ที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส จากรายงานการวิจัยของ Sree et al. (2000) และ Chamnipa et al. (2017) ได้กล่าวไว้ว่ายีสต์ทนร้อนคือ

ยีสต์ที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นแล้วทั้ง 30 ไอโซเลทจึงถูกจัดเป็นยีสต์ทนร้อน (ภาพที่ 5)

สำหรับการทดสอบความสามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอล โดยใช้อาหารแข็ง YPD ที่มีเอทานอลความเข้มข้น 7% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่าทั้งหมด 30 ไอโซเลท สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นเอทานอลดังกล่าว เมื่อเพิ่มความเข้มข้นเอทานอลที่ 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) มี 13 ไอโซเลท ดังต่อไปนี้ NUNS-4, NUNS-5, NUNS-6, NUST-2, NUST-3, NUUD-1, NUUD-2, NUUD-3, NUUD-4, NUUD-5, NUUD-6, NUUD-7 และ NUUD-8 สามารถเจริญเติบโตได้ และมีเพียงสามไอโซเลทได้แก่ NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 ที่สามารถเจริญเติบโตภายใต้ความเข้มข้นเอทานอล 13% (ปริมาตร/ปริมาตร) และไม่มีไอโซเลทใดๆเลยที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นเอทานอล 15% (ปริมาตร/ปริมาตร) (ภาพที่ 6) Stanley et al., 2010 และ Costa et al., 2014 ได้รายงานว่า ความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่า 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่งผลกระทบต่อระบบ metabolism และอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ และความเข้มข้นเอทานอลที่สูงจนเกินไปนั้นมีผลเสียต่อเซลล์เมมเบรนและระบบการขนส่งสารภายในเซลล์ร่วมด้วย ดังนั้นแล้วยีสต์ที่มีความสามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่า 10% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นยีสต์ที่มีความเหมาะสมจะใช้ในระบบอุตสาหกรรม จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ยีสต์ทนร้อน NUNS-4, NUNS-5 and NUNS-6 ไม่เพียงแต่สามารถเจริญเติบโตภายใต้อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส แต่ยังเจริญเติบโตได้ที่ระดับความเข้มข้นเอทานอล 13% (ปริมาตร/ปริมาตร) สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Costa et al. (2014) ที่ได้รายงานเกี่ยวกับทฤษฎี cross-tolerance ไว้ว่า ลักษณะใดลักษณะหนึ่งของปัจจัยความเครียดที่เกิดขึ้นกับเซลล์สามารถป้องกันเซลล์จากความเครียดชนิดอื่นๆได้อีกด้วย (Koedrith et al. 2008; Zakrzewska et al. 2011) เนื่องจากการเหนี่ยวนำให้เกิด “cross-tolerance” จากปัจจัยความเครียดต่างๆนั้น ย่อมมีความสัมพันธ์กับอีกหลายๆปัจจัยร่วมด้วยเช่นกัน เช่น กลุ่มโปรตีน heat-shock หรือ การส่งสัญญาณระหว่างเซลล์ (signal transduction) หรือ ยีนอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต จึงจำเป็นที่จะต้องทำการวิจัยเพื่อเก็บรวบรวมข้อมูลต่อไป ดังนั้นแล้ว ผลการศึกษาคุณลักษณะของ NUNS ไอโซเลทต่อปัจจัยความเครียดและความเข้มข้นเอทานอลจึงอาจอธิบายได้ด้วยทฤษฎี cross-tolerance

สำหรับการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับความสามารถในการหมักที่อุณหภูมิสูง ทั้ง 30 ไอโซเลทที่ถูกคัดเลือกมาแล้วนั้นถูกนำมาทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับความสามารถในการเกิดแก๊สคาร์บอนไดแกไซด์ด้วยหลอดดักก๊าซ (Durham tube) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ทั้งหมด 30 ไอโซเลทสามารถผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 42°C ภายในระยะเวลา 36 ชั่วโมงโดยมีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานคาร์บอน เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงขึ้นที่ 45 องศาเซลเซียส มีเพียงสามไอโซเลทคือ NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 ที่สามารถผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ได้ ในขณะที่ไอโซเลทอื่นๆไม่มีความสามารถผลิตแก๊สที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้ ทั้ง 30 ไอโซเลท ยังถูกทดสอบความสามารถในการผลิตแก๊สโดยใช้แหล่งพลังงานคาร์บอนเป็นน้ำตาลซูโครสและน้ำตาลไซโลส พบว่า ทุกไอโซเลทของ NUUD, NUKP, NUCN, NUST และ NUPHS สามารถผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยน้ำตาลซูโครสได้แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ แต่ NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 ไม่สามารถใช้ทั้งน้ำตาลซูโครสและไซโลสได้ จากผลการทดลองดังกล่าว ไอโซเลท NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 จึงถูกนำมาทดสอบความสามารถผลิตเอทานอลด้วยวิธี gas chromatography เป็นลำดับต่อไป

ความสามารถในการผลิตเอทานอลของไอโซเลท NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 ถูกเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน *S. cerevisiae* TISTR5606 ด้วยวิธี gas chromatography โดยใช้อาหารเหลว YPD ที่มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 16% (กรัม/ปริมาตร) ผลการทดลองที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาบ่ม 24 ชั่วโมงแสดงให้เห็นว่า NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 มีความเข้มข้นเอทานอลที่ 58.78 ± 0.51, 49.39 ± 1.04 และ 53.16 ± 0.59 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สายพันธุ์มาตรฐาน *S. cerevisiae* TISTR5606 สามารถผลิตความเข้มข้นเอทานอลได้ที่ 34.37 ± 0.74 กรัมต่อลิตร ($p < 0.05$) และให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดเมื่อระยะเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง โดย NUNS-4, NUNS-5, NUNS-6 และ TISTR5606 มีความเข้มข้นเอทานอลที่ 88.60 ± 0.75, 78.52 ± 0.21, 77.97 ± 0.65 และ 65.37 ± 0.82 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อบ่มที่อุณหภูมิสูง 45 องศาเซลเซียส ไอโซเลท NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 ยังคงมีความสามารถผลิตเอทานอลได้ดีกว่าสายพันธุ์มาตรฐานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดของ NUNS-4, NUNS-5, NUNS-6 และ TISTR5606 แสดงดังต่อไปนี้ 54.30 ± 0.97, 37.73 ± 1.46, 44.04 ± 0.92 และ 4.067 ± 0.38 ตามลำดับ (ตาราง 2)

ที่ผ่านมา มีรายงานการวิจัยที่แสดงให้เห็นว่ามียีสต์ทนร้อนหลายสายพันธุ์ที่ถูกนำมาใช้ในระบบอุตสาหกรรมเพื่อผลิตเอทานอล เช่น *S. cerevisiae*, *K. marxianus*, *Pichia* sp. และ *Candida* sp. (Limtong et al., 2007; Auesukaree et al., 2012; Buddiwong et al., 2014; Costa et al., 2014) การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า NUNS-4 เป็นอโซเลทที่มีความโดดเด่นที่จะนำไปผลิตเอทานอลได้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจาก ช่วงระยะเวลาที่เกิดการหมักนั้นมีปัจจัยความเครียดทั้งความร้อน ความเข้มข้นเอทานอล และความเข้มข้นกลูโคส เกิดขึ้นซึ่งล้วนแต่ส่งผลเสียต่อการดำเนินชีวิตของเซลล์ยีสต์ Costa et al. (2014) ได้รายงานว่า *K. marxianus* UFV-3 สามารถเจริญเติบโตที่ที่มีความเข้มข้นกลูโคสสูงได้ดีกว่าที่ที่มีความเข้นข้นกลูโคสต่ำๆ ณ อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่า *S. cerevisiae* LBM-1, PE-2 และ CAT-1 ไม่สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส น้ำตาลกลูโคส 2% (กรัม/ปริมาตร) แต่สามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสสูงกว่า 2% (กรัม/ปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD ดังนั้นแล้วจึงเป็นไปได้ว่า น้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นสูงสามารถปกป้องเซลล์ยีสต์จากสภาวะความเครียดเรื่องอุณหภูมิได้ นอกจากนี้ การศึกษาที่ผ่านมายังแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิที่สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ส่งผลเสียต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ยีสต์และยังลดความสามารถในการผลิตเอทานอลอีกด้วย ดังนั้นแล้ว ความเข้มข้นกลูโคสและอุณหภูมิจึงเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นเอทานอลนั่นเอง (Costa et al. 2014)

สำหรับการวิเคราะห์แผนภูมิวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) จากการศึกษาครั้งนี้ จำนวนไอโซเลททั้งหมดสามไอโซเลท คือ NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 ถูกนำมาเพิ่มชิ้นส่วนของยีน 26S rDNA บริเวณ D1/D2 domain (Kaewkrajay et al. 2014; Lorliam et al. 2013; Limtong et al. 2004; Limtong et al. 2005) โดยมี *Scizosaccharomyces pombe* NRRL Y-12796 เป็นตัวอย่างนอกกลุ่ม (outgroup) จากผลการจัดเรียงและตรวจสอบความถูกต้อง (multiple alignment) ของยีน 26S rDNA ด้วยวิธีการ Neighbor-Joining (NJ) and Maximum Likelihood (ML) พบว่ามีแผนภูมิวิวัฒนาการสอดคล้องกับงานวิจัยของ Nitiyon et al. (2011) และ Lorliam et al. (2013) (ภาพที่ 7) และแสดงให้เห็นได้ว่า NUNS ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสปีชีส์ *Pichia kudriavzevii* มีรายงานการวิจัยที่ได้กล่าวว่ายีสต์สกุล *P. kudriavzevii* จัดเป็นยีสต์ที่ถูกใช้ในระบบอุตสาหกรรมอย่างหลากหลายเนื่องจากมีความสามารถทนต่อสภาวะความเครียดต่างได้อย่างหลากหลาย เช่น ความเป็นกรด, ความร้อน หรือ สภาพเกลือ เป็นต้น

(Koutinas et al., 2016; Chamnipa et al., 2017) มีหลายรายงานการวิจัยที่ชี้ให้เห็นว่า *P. kudriavzevii* ถูกนำมาใช้ในงานอุตสาหกรรมอย่างหลากหลาย (Dhaliwal et al., 2011; Yuangsaard et al., 2013; Koutinas et al., 2016; Chamnipa et al., 2017; Joshi and Patel, 2017; Techaparin et al., 2017) ดังนั้นแล้ว งานวิจัยชิ้นนี้จึงแสดงให้เห็นว่า *P. kudriavzevii* NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 ที่จำแนกได้นั้น มีความสามารถที่จะนำไปใช้งานได้จริง

รายงานการวิจัยฉบับนี้ได้แสดงให้เห็นว่า จากยีสต์ทนร้อนจำนวน 30 ไอโซเลทที่คัดแยกได้จากดินไร่อ้อยนั้น มียีสต์สกุล *P. kudriavzevii* NUNS ที่ไม่เพียงแต่มีความสามารถทนต่อความเครียดเรื่องอุณหภูมิและความเข้มข้นเอทานอลได้เป็นอย่างดี แต่ยังสามารถผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้ในปริมาณมากอีกด้วย จึงมีโอกาสเป็นไปได้ว่า ยีสต์ *P. kudriavzevii* NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 จะสามารถนำไปใช้ในระบบอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลได้ต่อไป แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการแสดงออกของยีนเพื่อตอบสนองต่อสภาวะความเครียดเป็นเรื่องที่จำเป็นและควรได้รับการศึกษาเป็นลำดับต่อไป

เมื่อรวบรวมสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถพบได้บ่อยในแหล่งน้ำที่เกิดในสภาวะยูโธฟิเคชั่นในเขตจังหวัดพิษณุโลกเพื่อตรวจสอบคุณสมบัติการสะสมของปริมาณคาร์โบไฮเดรต เมื่อทำการคัดแยกเดียวของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและเลี้ยงโดยใช้สูตรอาหาร BG11 และเก็บสายพันธุ์เหล่านี้ในห้องปฏิบัติการของสาขาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้สามารถรวบสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีการเจริญเติบโตได้จำนวน 105 สายพันธุ์ โดยแบ่งได้เป็น 9 สกุล 12 ชนิด (ตาราง 3) เมื่อทำการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาและทางโมเลกุลล่าจากการใช้ยีน 16S rRNA ที่ยืนยันด้วยผลของการทดสอบความคล้ายคลึงทางพันธุกรรมจากโปรแกรม BLAST (อยู่ในช่วง 98-100%) พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในกลุ่มของ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจนในอากาศ ได้แก่ *Dolichospermum* spp. , *Anabaenopsis* sp. , *Sphaerospermopsis* spp. , *Cylindrospermopsis raciborskii* และ *Wollea* sp. และกลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศ ได้แก่ *Planktothricoides raciborskii*, *Psuedoanabaena* sp., *Microcystis* sp. และ *Lyngbya* sp. (ภาพที่ 8) โดยกลุ่มสาหร่ายมีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้ทำการรวบรวมนั้นส่วนใหญ่

สามารถพบได้ในแหล่งน้ำจืด เช่น ปฏิพัท และคณะ (2560) รายงานว่าอ่างเก็บน้ำแม่ถาง จังหวัดแพร่ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *C. raciborskii*, *Psuedoanabaena* sp. และบางฤดูกาลจะพบการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วของสาหร่าย *Microcystis* sp. และ สิริพร และปริญญา (2558) พบสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกลุ่ม *Dolichospermum* spp., *Merismopedia* spp. ในห้วยสำราญ จังหวัดศรีสะเกษ เป็นต้น โดยส่วนใหญ่แล้วสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินจะมีความสามารถในการผลิตสารทุติยภูมิที่มีมูลค่าสูง เช่น สารต้านอนุมูลอิสระไฟโคไซยานิน สารชีวเคมี (โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และน้ำมัน) แต่สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินบ้างชนิดหรือบ้างสายพันธุ์สามารถผลิตสารพิษที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตได้ ดังนั้นการนำสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมาใช้ในเชิงอุตสหกรรม ควรเลือกสายพันธุ์ที่ไม่ผลิตสารพิษ มีการเจริญเติบโตที่ดี ให้ผลผลิตมวลชีวภาพ และสารที่มีคุณค่าเชิงพาณิชย์ได้สูง

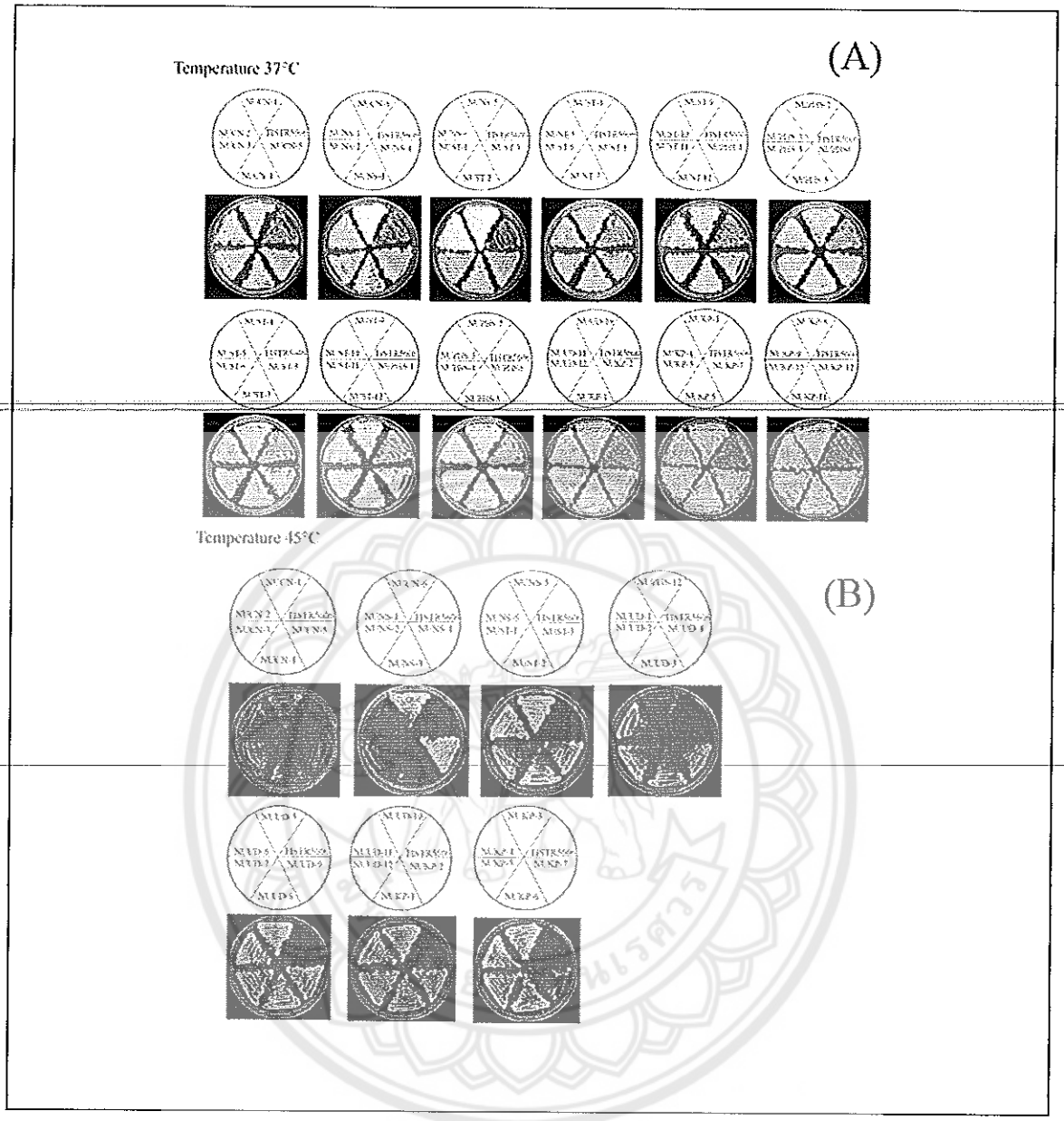
จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยกลุ่มของสาหร่ายที่มีความสามารถในการตรึงไนโตเจนในอากาศจะเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร BG10 ซึ่งไม่มีส่วนประกอบของไนโตรเจน และ กลุ่มของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ไม่สามารถตรึงไนโตรเจนในอากาศจะเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร BG11 ปกติเมื่อทำการตรวจการสะสมปริมาณคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้คัดแยกมา โดยทำการคัดสายพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตที่ดีมาอย่างน้อยชนิดละ 3 สายพันธุ์ พบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินแต่ละชนิดที่รวบรวมได้นั้นมีการสะสมปริมาณของคาร์โบไฮเดรต ที่แตกต่างกันซึ่งมีปริมาณอยู่ในช่วง 3 - 23 % ของน้ำหนักแห้ง (ตาราง 4) โดยสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินกลุ่มที่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน เช่น *Dolichospermum* spp. และ *C. raciborskii* มีแนวโน้มในการสะสมปริมาณคาร์โบไฮเดรตได้สูงกว่ากลุ่มสาหร่ายที่ไม่มีความสามารถในการตรึงไนโตรเจน ซึ่งสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Dolichospermum* sp.1_7 มีการสะสมปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่ที่สุดเท่ากับ 23.54 % ของน้ำหนักแห้ง และสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Psuedoanabaena* sp. PPLA มีการสะสมปริมาณคาร์โบไฮเดรตน้อยที่สุด เท่ากับ 3.57 % ของน้ำหนักแห้ง

จากผลปริมาณการสะสมของปริมาณคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ยังมีค่าน้อยกว่าเมื่อเทียบกับสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดอื่น เช่น *Nostoc muscorum* (31.99%) *Anabaena cylindrica* (26.20 %) และ *Phormidium* sp. (27.79%) *Scytonema bohneri* (28%) (Rajeshwari and Rajashekhar 2011, Patel et al. 2017) แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงใน

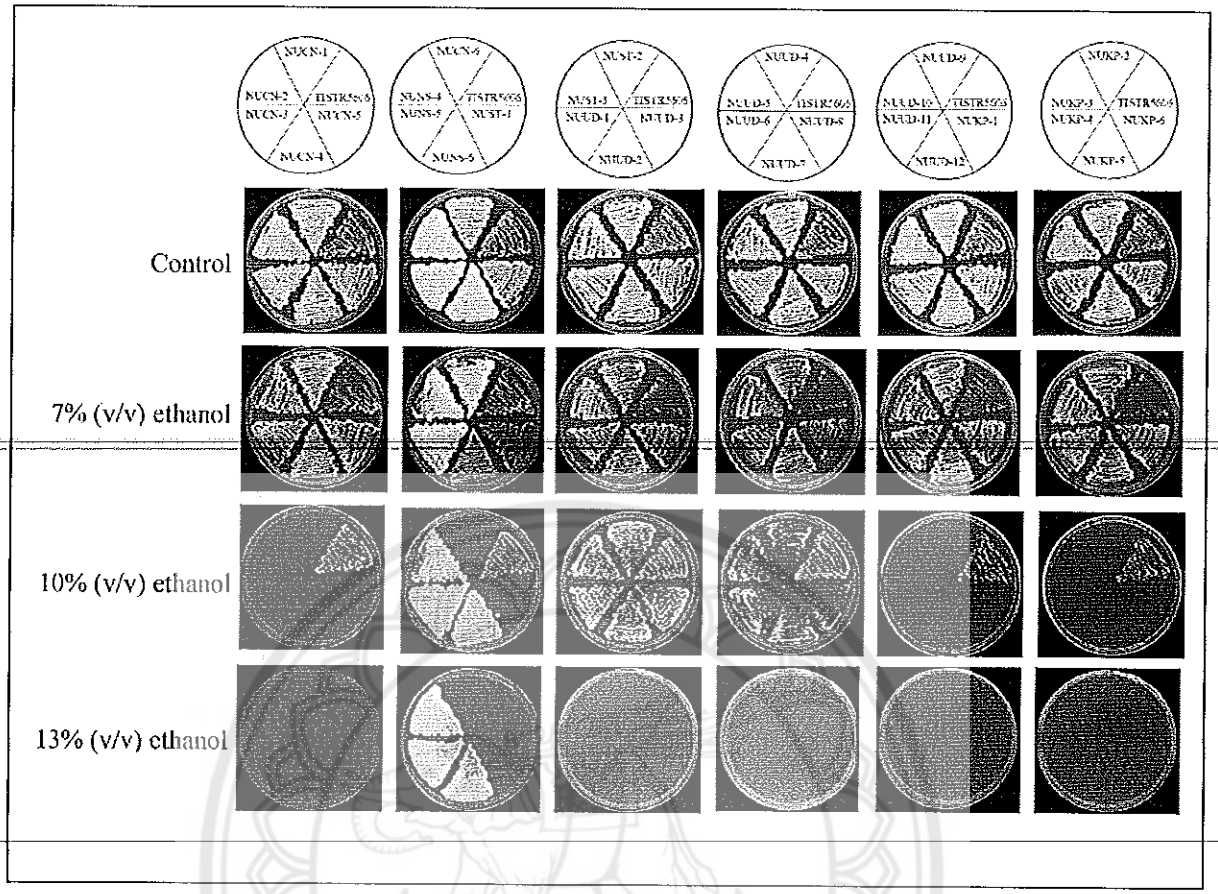
สภาวะที่เหมาะจะสามารถช่วยเพิ่มปริมาณสารชีวเคมีภายในสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินได้ เช่น การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินสกุล *Nostoc* โดยไม่มีการสารอาหารไนโตรเจน และ สกุล *Anabaena* ที่มีการเติมสารอาหารไนโตรเจนที่ระดับความเข้มข้น 4.25 mM $NaNO_3$ จะช่วยเพิ่มปริมาณคาร์โบไฮเดรตได้มากที่สุด (895.12 - 912.61 µg/ml) (Rosales loaiza et al. 2016) ดังนั้นการศึกษาสภาวะการเลี้ยงและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น ปริมาณสารอาหาร แสง ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง หรือ อุณหภูมิ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งเพื่อแสดงศักยภาพของสาหร่ายในการผลิตคาร์โบไฮเดรตให้ได้สูงที่สุด

ตารางที่ 1 แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างดิน ชื่อย่อ จำนวนตัวอย่างและจำนวนไอโซเลทที่คัดแยกได้ในแต่ละจังหวัด

สถานที่ (จังหวัด)	ชื่อย่อ	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท
อุตรดิตถ์	NUUD	3	12
กำแพงเพชร	NUKP	3	12
ชัยนาท	NUCN	3	6
สุโขทัย	NUST	3	12
นครสวรรค์	NUNS	3	6
พิษณุโลก	NUPHS	3	12
รวมทั้งหมด			60



ภาพที่ 5 ความสามารถเจริญเติบโตของยีสต์ 60 ไอโซเลท และ *S. cerevisiae* TISTR5606 ภายใต้สภาวะความเครียดจากอุณหภูมิ 37°C (A) และ 45°C (B) *S. cerevisiae* TISTR5606 และ ยีสต์ 60 ไอโซเลทถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD



ภาพที่ 6 ลักษณะการเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อน 30 ไอโซเลท และ *S. cerevisiae* TISTR5606 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง YPD ที่มีความเข้มข้นเอทานอล 7, 10 และ 13% (ปริมาตร/ปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C

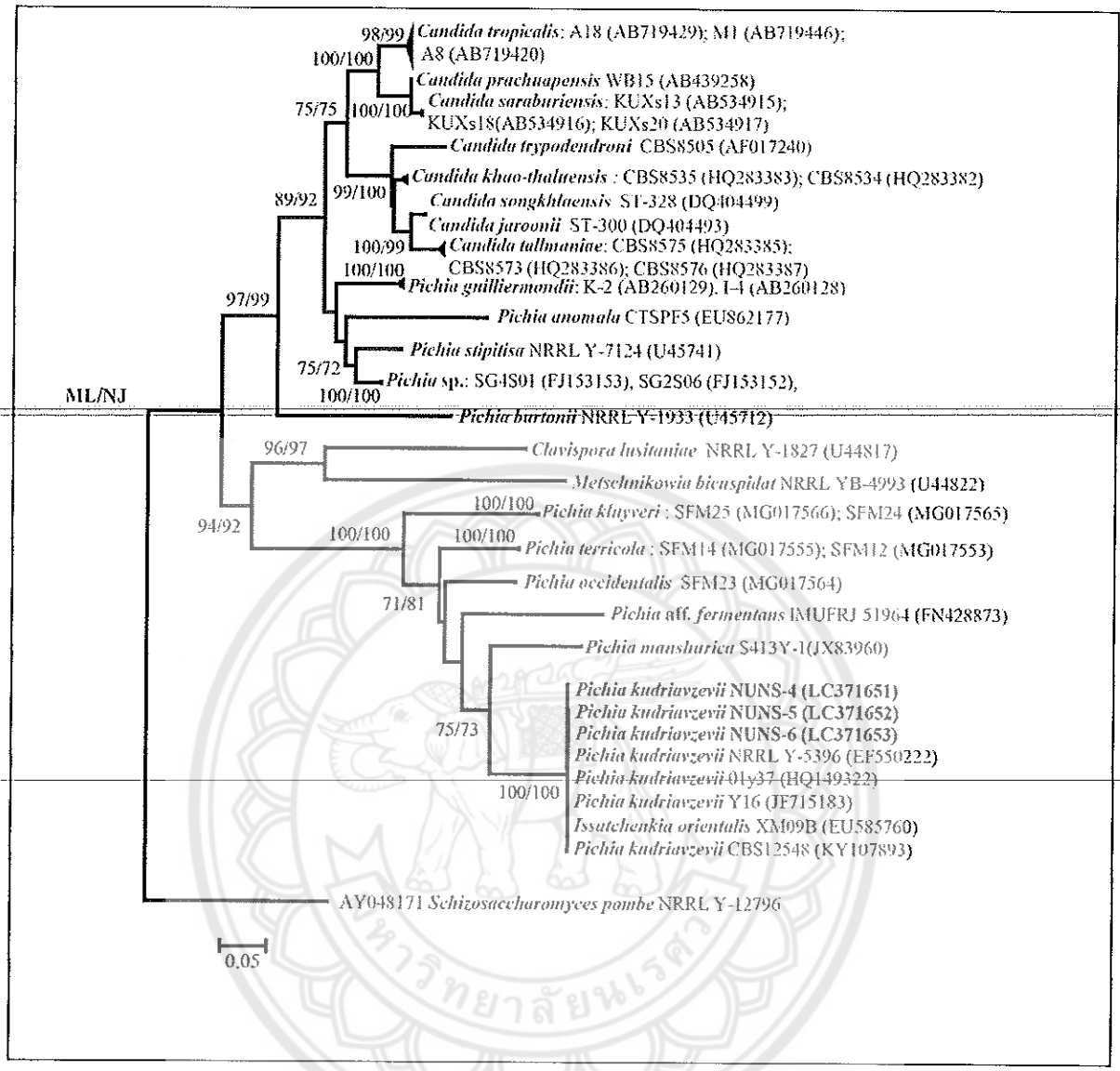
จ TP
339
ท๓๓๘
2561 1020620

ตารางที่ 2 ความเข้มข้นเอทานอลของยีสต์สามไอโซเลท ได้แก่ NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 ที่ระยะเวลาบ่ม 24, 36 และ 48 ชั่วโมง อุณหภูมิ 40 และ 45°C เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน *S. cerevisiae* TISTR 5606 วิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติ One-way ANOVA

Temperature (°C)	Isolate	Ethanol concentration (g/L)		
		24h	36h	48h
40	NUNS-4	58.78 ± 0.51^{A*}	82.36 ± 1.79 ^{A*}	88.60 ± 0.75^{A*}
	NUNS-5	49.39 ± 1.04^{B*}	76.02 ± 0.33 ^{B*}	78.52 ± 0.21^{B*}
	NUNS-6	53.16 ± 0.59^{C*}	71.06 ± 0.84 ^{C*}	77.97 ± 0.65^{B*}
	TISTR 5606	34.37 ± 0.74^{D*}	56.77 ± 1.32 ^{D*}	65.37 ± 0.82^{C*}
45	NUNS-4	37.78 ± 1.39^{a*}	51.05 ± 1.20^{a*}	54.30 ± 0.97^{a*}
	NUNS-5	16.17 ± 0.86^{b*}	37.73 ± 1.46^{b*}	28.62 ± 1.66^{b*}
	NUNS-6	31.03 ± 1.32^{c*}	42.28 ± 1.23^{c*}	44.04 ± 0.92^{c*}
	TISTR 5606	3.27 ± 0.65^{d*}	4.07 ± 0.38^{d*}	3.96 ± 0.47^{d*}

* แสดงถึงค่าแตกต่างทางสถิติระหว่าง NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 เปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* TISTR 5606 ที่สภาวะอุณหภูมิและระยะเวลาการบ่มเดียวกัน

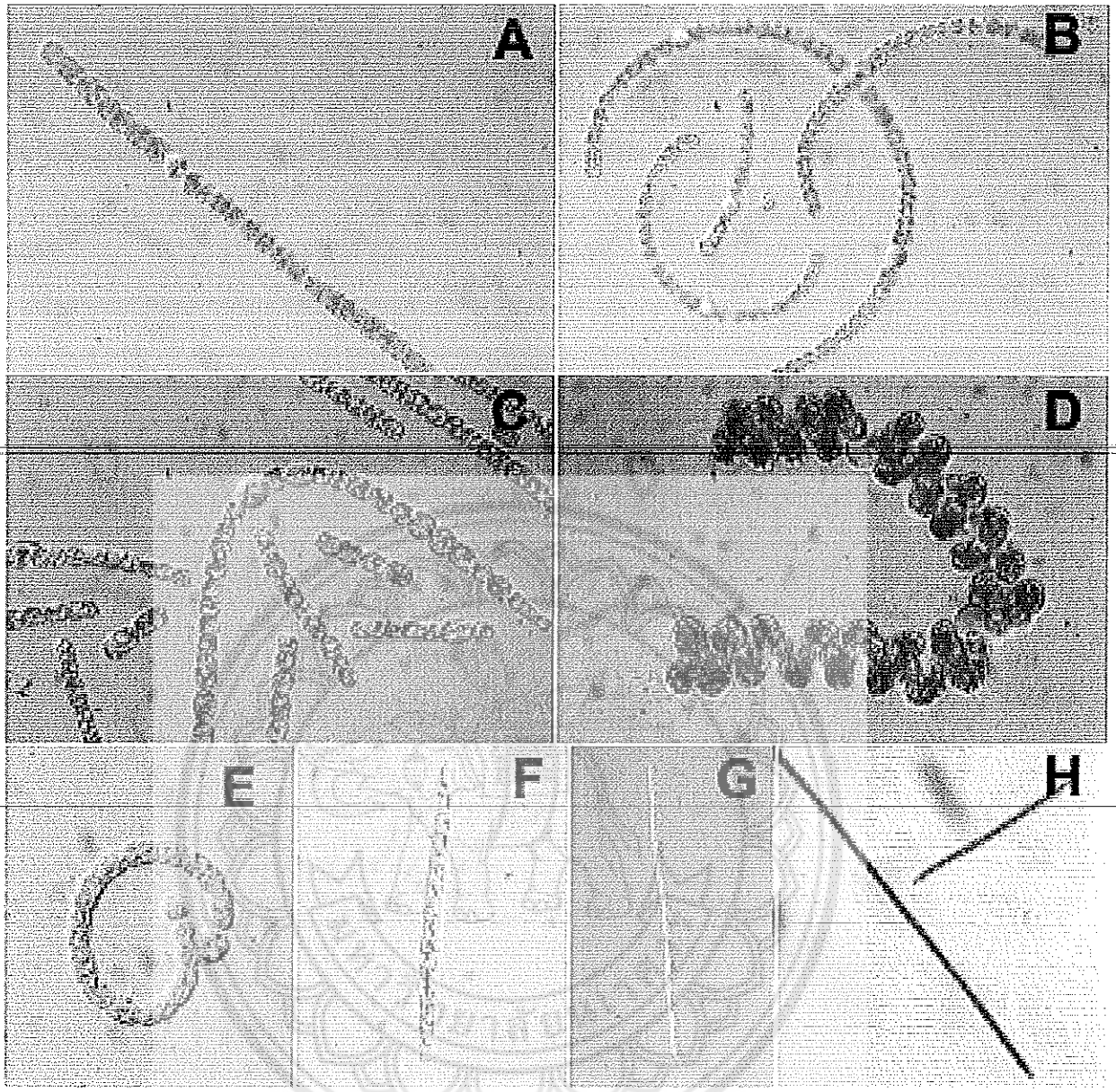
^{abcd} หรือ ^{ABCD} แสดงถึงความแตกต่างภายในคอลัมน์ที่อุณหภูมิเดียวกันและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ โดยใช้การจัดกลุ่มแบบ Duncan's multiple range test



ภาพที่ 7 แผนภูมิวงวานวิวัฒนาการของยีสต์ NUNS ไอโซเลทถูกสร้างด้วยวิธีการ Neighbor-Joining โดยใช้พื้นที่ยีนบริเวณ D1/D2 domain ของ large subunit 26S rDNA *Schizosaccharomyces pombe* ถูกใช้เป็น out-group

ตารางที่ 3 ชนิดและจำนวนสายพันธุ์ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่คัดแยกจากแหล่งน้ำยูโธฟิเคชั่นในเขตจังหวัดพิษณุโลกและจังหวัดใกล้เคียง

ชนิด(species)	จำนวน (strain)
Dolichospermum sp. 1 (แบบเส้นตรง)	17
Dolichospermum sp. 2 (แบบเกลียว)	12
Anabaenopsis sp.	10
Sphaerospermopsis sp. 1 (แบบเกลียว)	6
Sphaerospermopsis sp. 2 (แบบเส้นตรง)	10
Cylindrospermopsis raciborskii	19
Wollea sp.	1
Planktothricoides raciborskii	8
Microcystis sp.	8
Psuedoanabaena sp.	7
Lyngbya sp.	7
รวม	105



ภาพที่ 8 ตัวอย่างชนิดสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถคัดแยกและเพาะเลี้ยงได้ในการศึกษาครั้งนี้ A: ***Dolichospermum*** sp.1 (Straight type); B: *Dolichospermum* sp.2 (Coiled type); C: *Sphearospermopsis* sp.1 (Straight type); D: *Sphearospermopsis* sp.2 (Coiled type); E: *Anabaenopsis* sp.; F: *Cylindrospermopsis raciborskii*; G: *Wollea* sp.; H: *Planktothricoides raciborskii*

ตารางที่ 4 แสดงเปอร์เซนต์ปริมาณคาร์โบไฮเดรตรวมของของน้ำหนักแห้ง ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่คัดเลือกสำหรับการศึกษาครั้งนี้

ชนิด(species)/สายพันธุ์(strain)	เปอร์เซนต์ของคาร์โบไฮเดรต (% dry weight)
Dolichospermum sp. 1_7	23.54
Dolichospermum sp. 1_4-2	21.67
Dolichospermum sp. 1_15-2	19.89
Dolichospermum sp. 1_8	23.44
Dolichospermum sp. 2_2	22.38
Dolichospermum sp. 2_2	20.93
Dolichospermum sp. 2_2	22.05
Anabaenopsis sp. 2_57	10.47
Anabaenopsis sp. 2_7	9.56
Anabaenopsis sp. 2_6	13.90
Sphaerospermopsis sp. 1_4-1	9.83
Sphaerospermopsis sp. 1_4-2	8.51
Sphaerospermopsis sp. 1_4-3	8.34
Sphaerospermopsis sp. 2_3-4	6.74
Sphaerospermopsis sp. 2_3-7	5.95
Sphaerospermopsis sp. 2_3-3-1	6.81
Cylindrospermopsis raciborskii PLC2	16.21
Cylindrospermopsis raciborskii PLC27	17.51
Cylindrospermopsis raciborskii PLC32	18.62
Planktothricoides raciborskii SBR8	7.32
Planktothricoides raciborskii SBR7	4.89

Planktothricoides raciborskii SBR4	6.65
Wollea sp. CNA1.5	10.48
Microcystis sp. PLM4	5.65
Microcystis sp. PLM6	9.42
Microcystis sp. PLM7	13.38
Psuedoanabaena sp. PPLA	3.57
Psuedoanabaena sp. PLL1	7.72
Lyngbya sp. L1	3.83

2.7 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสายพันธุ์ยีสต์ NUNS ที่ถูกคัดแยกมาจากดินไร่อ้อยในพื้นที่เกษตรกรรม ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม *P. kudriavzevii* มีความสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีความเครียด ได้แก่ อุณหภูมิ (45°C) และความเข้มข้นเอทานอล (13% ปริมาตรโดยปริมาตร) พบว่า *P. kudriavzevii* NUNS-4, NUNS-5 และ NUNS-6 เป็นไอโซเลทที่สามารถให้ค่าการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูง 45°C ที่ความเข้มข้น 54.30 ± 0.97, 37.73 ± 1.46 และ 44.04 ± 0.92 ตามลำดับ และสูงกว่าสายพันธุ์มาตรฐาน *S. cerevisiae* TISTR5606 ที่ปริมาณความเข้มข้น 4.067 ± 0.38 กรัมต่อลิตร ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวทำให้ *P. kudriavzevii* NUNS จึงสามารถใช้เป็นตัวแทนจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเอทานอลระดับอุตสาหกรรมได้ต่อไปในอนาคต จากการศึกษาครั้งนี้ สามารถคัดแยกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่จำนวน 105 สายพันธุ์ เมื่อตรวจทางสักษณะสัณฐานวิทยา และยีน 16S rRNA พบว่าสายพันธุ์ที่ได้ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในกลุ่มสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน 9 สกุล 12 ชนิด ได้แก่ *Dolichospermum* spp., *Anabaenopsis* sp., *Sphaerospermopsis* spp., *Cylindrospermopsis raciborskii*, *Wollea* sp. , *Planktothricoides raciborskii*, *Psuedoanabaena* sp., *Microcystis* sp. และ *Lyngbya* sp. เมื่อทำการตรวจวัดปริมาณของคาร์โบไฮเดรตพบว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Dolichospermum* sp.1_7 มีการสะสมปริมาณคาร์ไฮเดรทมากที่ที่สุดเท่ากับ 23.54 % ของน้ำหนักแห้ง ดังนั้นจึงมีแนวโน้มว่าสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Dolichospermum* sp.1_7 สามารถนำไปพัฒนาสำหรับการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตพลังงานเอทานอลได้ แต่อย่างไรก็ตามควรการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต เช่น สารอาหาร ความเข้มแสง หรืออุณหภูมิ เพื่อช่วยเพิ่มการผลิตคาร์โบไฮเดรตของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินในสูงขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] สถานการณ์พลังงานของประเทศไทย ไตรมาสที่ 1/2559. 2559. กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. กรุงเทพมหานคร. 5 น.

[2] ปฏิพัทธ์ สันป่าเป้า สุพัฒน์ พลชา ปิยวัฒน์ ปองผดุง และวิทยา ทาวงศ์ (2560) ความหลากหลายชนิดของแพลงก์ตอนพืชและความสัมพันธ์ต่อคุณภาพน้ำในอ่างเก็บน้ำแม่ถาง จังหวัดแพร่. แก่นเกษตร 45: 663 – 674.

[3] สิริพร ยศแสน และปริญญา มูลสิน (2558) การใช้แพลงก์ตอนพืชชนิดเด่นในการบ่งชี้คุณภาพน้ำในห้วยสำราญจังหวัดศรีสะเกษ. วารสารวิจัยและพัฒนา มจธ. 38: 295 – 309.

[4] ลัดดา วงศ์รัตน. 2544. แพลงก์ตอนพืช. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. 851 น.

[5] ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายน้ำวิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. เชียงใหม่. 545 น.

[6] Kiran Sree N, Sridhar M, Suresh K, Banat IM, Venkateswar Rao L. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Bioresour Technol. 2000; 72: 43-46.

[7] Limtong S, Sringiew C, Yongmanitchai W. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. Bioresour Technol. 2007; 98: 3367-3374.

[8] Christensen AD, Kadar Z, Oleskowicz-Popiel P, Thomsen MH. Production of bioethanol from organic whey using *Kluyveromyces marxianus*. J Ind Microbiol Biotechnol. 2011; 38(2): 283-289.

[9] Kourkoutas Y, Dimitropoulou S, Kanellaki M, Marchant R, Nigam P, Banat IM, et al. High-temperature alcoholic fermentation of whey using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 yeast immobilized on delignified cellulosic material. Bioresour Technol. 2002; 82(2): 177-181.

[10] Kurtzman CP, Robnett CJ. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. Antonie Van Leeuwenhoek. 1998; 73(4): 331-371.

[11] Dhaliwal SS, Oberoi HS, Sandhu SK, Nanda D, Kumar D, Uppal SK. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. Bioresour Technol. 2011; 102(10): 5968- 5975.

[12] Gallardo JC, Souza CS, Cicarelli RM, Oliveira KF, Morais MR, Laluce C. Enrichment of a continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* with the yeast *Issatchenkia orientalis* in the production of ethanol at increasing temperatures. J Ind Microbiol Biotechnol. 2011; 38(3): 405-414.

[13] Isono N, Hayakawa H, Usami A, Mishima T, Hisamatsu M. A comparative study of ethanol production by *Issatchenkia orientalis* strains under stress conditions. J Biosci Bioeng. 2012; 113(1): 76-78.

[14] Chi Z, Arnebory N. *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produced ethanol. J Ind Microbiol Biotechnol. 2000; 24: 75-78.

[15] Edgardo A, Carolina P, Manuel R, Juanita F, Baeza J. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. Enzyme Microb Technol. 2008; 43(2): 120-123.

[16] Hisamatsu M, Furubayashi T, Karita S, Mishima T, Isono N. Isolation and identification of a novel yeast fer- menting ethanol under acidic conditions. J Appl Glycosci. 2006; 53(2): 111-113.

[17] Buddiwong S, Thanonkeo S, Phetsom J, Jaisil P, Thanonkeo P. Screening of thermotolerant yeast isolated from sugarcane plantations in Northeastern part of Thailand. KKU Res J. 2014; 19: 217-223.

[18] Yuangsaard N, Yongmanitchai W, Yamada M, Limtong S. Selection and characterization of a newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* strain for ethanol production at high temperature from cassava starch hydrolysate. Antonie Van Leeuwenhoek. 2013; 103: 577-588.

[19] Kaewkrajay C, Dethoup T, Limtong S. Ethanol production from cassava using a newly isolated thermotolerant yeast strain. ScienceAsia. 2014; 40: 268-277.

[20] Wu WH, Hung WC, Lo KY, Chen YH, Wan HP, Cheng KC. Bioethanol production from taro waste using thermo-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* K21. Bioresour Technol. 2016; 201: 27-32.

[21] Graham J, Wilcox L, Graham L. Algae. 2nd edition. San Francisco: Benjamin Cummings (Pearson); 2009.

[22] Harun R, Danquah MK, Forde GM. Microalgal biomass as a fermentation feedstock for bioethanol production. J Chem Technol Biotechnol 2010 Feb; 85:199–203.

[23] Moen E, Biological degradation of brown seaweeds. Doctoral thesis. Norwegian University of Science and Technology (1997) in Maeve SK and Symon D, The potential of marine biomass for anaerobic biogas production, Marine estate research report, Scottish Association for Marine Science Oban, Argyll, Scotland (2008).

[24] Hirayama S, Ueda R, Ogushi Y, Hirano A, Samejima Y, Hon-Nami K and Kunito S. Ethanol production from carbon dioxide by fermentative microalgae, in Inui T, Anpo M, Izui K, Yanagida S, Yamaguchi T, Advances in chemical conversions for

mitigating carbon dioxide. Studies in Surface Science and Catalysis. 1998 Sep;114:657–660.

[25] Ueda R, Hirayama S, Sugata K and Nakayama H, Process for the production of ethanol from microalgae. US Patent 5578472 (1996).

[26] Hon-Nami K. A unique feature of hydrogen recovery in endogenous starch-to-alcohol fermentation of the marine microalga, *Chlamydomonas perigranulata*. Appl Biochem Biotechnol. 2006 Mar;131(1-3):808-828.

[27] Abed RM, Dobretsov S, Sudesh K. Applications of cyanobacteria in biotechnology. J Appl Microbiol. 2009 Jan;106(1):1-12.

[28] Rosgaard L, de Porcellinis AJ, Jacobsen JH, Frigaard NU, Sakuragi Y. Bioengineering of carbon fixation, biofuels, and biochemicals in cyanobacteria and plants. J Biotechnol. 2012 Nov 30;162(1):134-147.

[29] Wang B, Wang J, Zhang W, Meldrum DR. Application of synthetic biology in cyanobacteria and algae. Front Microbiol. 2012 Sep19;3:344.

[30] Hoiczyk E, Hansel A. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. J Bacteriol. 2000 Mar;182:1191–1199.

[31] Domozych DS. Algal cell walls. In eLS. Chichester: John Wiley and Sons;2011.

[32] Allen MM. Cyanobacterial cell inclusions. Annu Rev Microbiol. 1984 Oct;38:1–25.

[33] Ball SG, Morell MK. From bacterial glycogen to starch: understanding the biogenesis of the plant starch granule. Annu Rev Plant Biol. 2003 Jun;54:207–233.

[34] Ball S, Colleoni C, Cenci U, Raj JN, Tirtiaux C. The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. J Exp Bot . 2011 Jan;62:1775–1801.

[35] Mamo G, Faryar R, Karlsson EN. Microbial glycoside hydrolases for biomass utilization in biofuels applications. In Biofuel Technologies. Edited by Gupta VK, Tuohy MG. Heidelberg: Springer; 2013 Jan;171–188.

[36] Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M, Stanier RY. Generic Assignments, Strain Histories and Properties of Pure Cultures of Cyanobacteria. Microbiology. 1979 Mar111;1-61.

[37] Neilan BA, Jacobs D, Del Dot T, Blackall LL, Hawkins PR, Cox PT, Goodman AE. rRNA sequences and evolutionary relationships among toxic and nontoxic cyanobacteria of the genus Microcystis. Int J Syst Bacteriol. 1997 Jul;47(3):693-697.

[38] Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Res. 1997; 25(17): 3389-3402.

[39] DuBois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 1956 Mar;28(3)350–356.

[40] Sluiter AD, Hames BR, Ruiz RO, Scarlata C, Sluiter JB, Templeton DW, Crocker D. Determination of Structural Carbohydrates and Lignin in Biomass, Technical report NREL/TP-510-42618. National Renewable Energy Laboratory: Golden, Colorado; 2008.

[42] Chamnipa N, Thanonkeo S, Klanrit P, Thanonkeo P. The potential of the newly isolated thermotolerant yeast *Pichia kudriavzevii* RZ8-1 for high-temperature ethanol production. Braz J Microbiol. 2018;49(2):378-391.

[43] Costa DA, de Souza CJ, Costa PS, Rodrigues MQ, dos Santos AF, Lopes MR, Genier HL, Silveira WB, Fietto LG. Physiological characterization of thermotolerant yeast for cellulosic ethanol production. Appl Microbiol Biotechnol. 2014; 98: 3829-3840.

[44] Koedrith P, Dubois E, Scherens B, Jacobs E, Boonchird C, Messenguy F. Identification and characterization of a thermotolerant yeast strain isolated from banana leaves. ScienceAsia. 2008; 34: 147-152.

[45] Zakrzewska A, van Eikenhorst G, Burggraaff JE, Vis DJ, Hoefsloot H, Delneri D, Oliver SG, Brul S, Smits GJ. Genome-wide analysis of yeast stress survival and tolerance acquisition to analyze the central trade-off between growth rate and cellular robustness. Mol Biol Cell. 2011; 22: 4435-4446.

[46] Auesukaree C, Koedrith P, Saenpayavai P, Asvarak T, Benjaphokee S, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S, Boonchird C. Characterization and gene expression profiles of thermotolerant *Saccharomyces cerevisiae* isolates from Thai fruits. J Biosci Bioeng. 2012; 114: 144-149.

[47] Lorliam W, Akaracharanya A, Jindamorakot S, Suwannarangsee S, Tanasupawat S. Characterization of xylose-utilizing yeasts isolated from herbivore faeces in Thailand. ScienceAsia. 2013; 39: 26-35.

[48] Limtong S, Srisuk N, Yongmanitchai W, Kawasaki H, Yurimoto H, Nakase T, Kato N. Three new thermotolerant methylotrophic yeasts, *Candida krabiensis* sp. nov., *Candida sithepensis* sp. nov., and *Pichia siamensis* sp. nov., isolated in Thailand. J Gen Appl Microbiol. 2004; 50: 119-127.

[49] Limtong S, Srisuk N, Yongmanitchai W, Yurimoto H, Nakase T, Kato N. *Pichia thermomethanolica* sp. nov., a novel thermotolerant, methylotrophic yeast isolated in Thailand. Int J Syst Evol Microbiol. 2005; 55: 2225-2229.

[50] Nitiyon S, Keo-Oudone C, Murata M, Lertwattanasakul N, Limtong S, Kosaka T, Yamada M. Efficient conversion of xylose to ethanol by stress-tolerant *Kluyveromyces marxianus* BUNL-21. Springerplus. 2016; 5: 1-12.

[51] Koutinas, M., Patsalou, M., Stavrinou, S., Vyrides, I. 2016. High temperature alcoholic fermentation of orange peel by the newly isolated thermotolerant *Pichia kudriavzevii* KVMP10. Lett. Appl. Microbiol. 62: 75–83.

[52] Joshi, B.H., Patel, D.K. 2017. Screening and characterization of newly isolated thermotolerant and ethanogenic strain of *Pichia kudriavzevii*. IJEAB. 10: 115–123.

[53] Techaparin, A., Thanonkeo, P., Klanrit, P. 2017. High–temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. Braz. J. Microbiol. 48: 461–475.

[54] Patel, V. K., Sundaram, S., Patel, A. K., and Kalra, A. (2017) Characterization of seven species of cyanobacteria for high-quality biomass production. Arabian Journal for Science and Engineering, 43: 109–121.

[55] Rajeshwari, K.R. and Rajashekhar, M. (2011) Biochemical composition of seven species of cyanobacteria isolated from different aquatic havitats of Western Ghats, Southern India. Brazilian Archives of Biology and Technology 54: 849 – 857.

[56] Rosalesloaiza, N., Vera, P., Aiello-Mazzarri, C. and Morales, E. (2016) Comparative growth and biochemical composition of four strains of *Nostoc* and *Anabaena* (Cyanobacteria, Nostocales) in relation to sodium nitrae. Acta Biológica Colombiana 21: 347 – 354.

ภาคผนวก

บทความสำหรับการเผยแพร่วารสารนานาชาติ

Agriculture and Natural Resources 52 (2018) 511–518

Contents lists available at ScienceDirect

Agriculture and Natural Resources

journal homepage: http://www.journals.elsevier.com/agriculture-and-natural-resources/

Original Article

High temperature alcoholic fermentation by new thermotolerant yeast strains *Pichia kudriavzevii* isolated from sugarcane field soil

Pongsanat Pongcharoen,[a, b, *] Jariya Chawneua,[a, 1] Wittaya Tawong[a, b, 1]

[a] Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand
[b] Center of Excellence in Research in Agricultural Biotechnology, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand

ARTICLE INFO

Article history:
Received 2 March 2018
Accepted 27 May 2018
Available online 23 November 2018

Keywords:
Ethanol production
Ethanol tolerant
Pichia kudriavzevii
Sugarcane field
Thermotolerant yeast

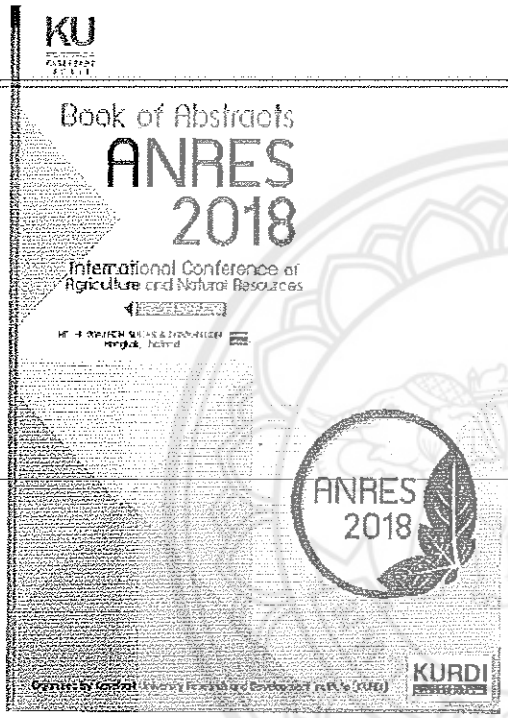
ABSTRACT

The thermotolerant and ethanogenic yeasts are an important factor in numerous ethanol industrial applications. In this study, the potential of new isolates of thermotolerant, ethanol-producing yeasts was successfully demonstrated. In total, 60 yeast isolates were obtained from soil sugarcane fields in Uttaradit, Kamphang Phet, Chai Nat, Sukhothai, Nakhon Sawan and Phitsanulok provinces, Thailand and subjected to characterization of thermotolerance using an enrichment technique with 4% (volume per volume) ethanol. The growth performance and fermentation activity under stress conditions were compared with that of Thai industrial *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5606. Interestingly, the results showed that 30 isolates grew at high temperatures (up to 45 °C). Three isolates (NUNS–4, NUNS–5 and NUNS–6) could tolerate those conditions on agar composed of yeast extract, peptone and glucose containing 13% (v/v) ethanol. Furthermore, gas chromatography analysis to determine the ethanol concentration revealed the three new isolates produced higher amounts of ethanol than *S. cerevisiae* TISTR 5606 at fermentation temperatures of 40 °C and 45 °C ($p < 0.05$) when utilizing glucose as the carbon source. The isolate NUNS–4 had the highest ethanol concentrations of 88.60 ± 0.75 g/L and 54.30 ± 0.97 g/L at 40 °C and 45 °C, respectively. Furthermore, phylogenetic analysis based on the D1/D2 domain of 26S rDNA showed that the new isolates were identified as *Pichia kudriavzevii*. Consequently, thermo-tolerant and ethanol-tolerant *P. kudriavzevii* NUNS–4, NUNS–5 and NUNS–6 are possible candidates as strains for commercial-scale ethanol production when using glucose as the fermentation substrate.

Copyright © 2018. Production and hosting by Elsevier B.V. on behalf of Kasetsart University. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

การเผยแพร่ผลงานในงานประชุมวิชาการนานาชาติ

การนำเสนอผลงานวิจัยในการประชุมนานาชาติ International Conference of Agriculture and Natural Resources (ANRES 2018) ระหว่างวันที่ 26 - 28 เมษายน 2561
ณ โรงแรมวินด์เซอร์ สวีท แอนด์ คอนเวนชั่น กรุงเทพมหานคร



Potential of isolated thermotolerant yeast from sugarcane plantation in lower northern Thailand for bioethanol industry

Pongsarot Pongsharoen[1,2,*], Sirilwat Kucharoenpaisal[3], Wittaya Tanyong[1,2]

[1] Department of Agricultural Science, Faculty of Agriculture, Natural Resources and Environment, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
[2] Center of Excellence in Research in Agricultural Biotechnology, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand
[3] Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

*Corresponding author
E-mail address: pongsarotp@nu.ac.th (P. Pongsharoen)

Abstract

Thermotolerant and ethanol-producing yeasts are mainly used in numerous industrial applications, such as production of bioethanol. Isolation and screening of thermos and ethanol tolerant yeast capable of producing ethanol at high temperature were determined in this study. Soil samples from sugarcane plantations in lower northern Thailand including Uttaradit, Tak, Phichit, Sukhothai, Kamphaeng Phet, Nakhonsawan, Phitsanulok and Phetchabun province, were collected and subjected to the isolation of thermos and ethanol-tolerant yeast strains. Based on the enrichment culture technique supplemented with 4% (v/v) ethanol, a total of 222 yeast isolates were obtained and showed their ability to grow at temperature up to 45°C and 110 isolates of them capable to tolerate at elevated temperature 16°C. After that, 222 isolates were chosen for further study on ethanol tolerance and fermentative capacity at high temperature. Among 222 isolates, 85 isolates were found to be tolerant up to 15% (v/v) ethanol under mild heat stress (37°C) and 25 isolates could performed the ability of fermentation at temperature of 45°C. The results suggested that described 25 isolates were exhibited as thermotolerant and ethanol-producing yeasts at high temperature. They are a good candidate of useful yeast for using in biotechnological industry, especially, for production of ethanol at elevated temperature.

Keywords: Ethanol, Isolation, Lower northern Thailand, Soil sugarcane field, Thermotolerant yeast

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์และผลที่ได้รับ

ข้อ	วัตถุประสงค์ที่กำหนดไว้	ผลลัพธ์ที่ได้
1	เพื่อคัดเลือกชนิดของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่สามารถสกัดคาร์โบไฮเดรตได้ในปริมาณสูงในสภาวะที่กำหนด	สามารถคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่มีความสามารถสะสมปริมาณคาร์โบไฮเดรตได้มากที่สุดคือ *Dolichospermum* sp.1_7
2	เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง	สามารถคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูงจำนวนสามไอโซเลทคือ 1) *Pichia kudriavzevii* NUNS4 2) *Pichia kudriavzevii* NUNS5 3) *Pichia kudriavzevii* NUNS6
3	เพื่อผลิตไบโอเอทานอลโดยใช้คาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินที่คัดเลือกได้มาเป็นแหล่งพลังงานชีวมวลให้กับกระบวนการหมักของสายพันธุ์ยีสต์ทนร้อนที่ค้นพบ	โครงการต่อเนื่องปีที่ 2

แผนการดำเนินงานวิจัยที่ตั้งไว้ (X) เปรียบเทียบกิจกรรมที่ทำได้จริง (⟷)

ปี	กิจกรรม	ตค	พย	ธค	มค	กพ	มีค	เมย	พค	มิย	กค	สค	กย	ตค	พย	ธค
2561	เก็บตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินและเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ	X	X	X												
2561	คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์จากห้องปฏิบัติการ	X	X	X												
2561	สกัดดีเอ็นเอ วิเคราะห์ปฏิกิริยา Polymerase Chain Reaction ของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน			X	X	X										
2561	ตรวจวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จากตัวอย่างสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน				X	X	X									
2561	วิเคราะห์ชีวมวลประเภทคาร์โบไฮเดรตจากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน					X	X	X	X							
2561	ทดลองเพื่อคำนวนอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน						X	X	X	X						
2561	วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง (โครงการปีที่ 1)								X	X	X					
2561	เขียนบทความเพื่อตีพิมพ์						X	X	X	X	X	X	X			
2561	ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ (โครงการปีที่ 1)										X	X	X			
2562	เพาะเลี้ยงสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินเพื่อใช้เป็นชีวมวลสำหรับการสกัดคาร์โบไฮเดรต	X	X								X	X	X			
2562	สกัดคาร์โบไฮเดรตจากชีวมวลสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินโดยใช้เอนไซม์บำบัด	X	X	X	X											
2562	ทดสอบการหมักของยีสต์ทนร้อนโดยใช้คาร์โบไฮเดรตที่สกัดออกมาได้จากสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน			X	X	X	X									
2562	วิเคราะห์ผลทางเคมี ได้แก่ การผลิตเอทานอล การสูญเสียคาร์โบไฮเดรต วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล และ ตรวจสอบน้ำหนักแห้งที่คงเหลือ					X	X	X	X							
2562	วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง (โครงการปีที่ 2)							X	X	X						
2562	เขียนบทความเพื่อตีพิมพ์					X	X	X	X	X	X	X	X			
2562	ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ (โครงการปีที่ 2)									X	X	X	X			