รายงานผลการดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง
เซลลูโลสิกเพื่อการย่อยสลายเซลลูโลส: ปีที่ 3 การนาไปใช้ประโยชน์ทางเกษตร
Cellulosic for cellulose degradation: year 3 Agricultural application

โดย

รองศาสตราจารย์. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

อ. ดร. ชมภูนุช วิรุณานนท์

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

เซลลูโลสิกเพื่อการย่อยสลายเซลลูโลส: ปีที่ 3 การนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตร

Cellulosic for cellulose degradation: year 3 Agricultural application

รศ. ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อ. ดร. ชมภูนุช วิรุณานนท์
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2556 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา และ การไฟฟ้าฝ่ายผลิต ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ และขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

ยีสต์ถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็ว ซึ่งกระบวนการในการผลิตเอทานอลยังคงมีต้นทุนในการผลิตสูงและสิ้นเปลืองพลังงานเพราะต้องทำการหล่อเย็นในถังหมักในกระบวนการผลิตตลอดเวลา ดังนั้นยีสต์ที่มีคุณสมบัติที่สามารถเติบโตได้ดีในอุณหภูมิสูงจะทำให้ลดต้นทุนการใช้พลังงานในระบบหล่อเย็นของถังหมักในกระบวนการผลิตลงได้ งานวิจัยนี้ได้นำยีสต์ที่ได้รับการคัดกรองมาแล้วในโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ มาทดสอบความสามารถการใช้ไซโลสในการผลิตเอทานอลโดยใช้อาหาร Yeast-malt extract medium ที่อุณหภูมิ 35, 37, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งพบว่ามี 7 ไอโซเลท จาก 25 ไอโซเลท ที่สามารถใช้ไซโลสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ยีสต์ไอโซเลท SKN 2-1 สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดปริมาณ 0.66 กรัมต่อลิตร (31.71 เปอร์เซ็นของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี) ที่ 196 ชั่วโมงของการหมัก การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1-D2 region ใน 26S rDNA พบว่า SKN2-1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ *Ogataea polymorpha*

คำสำคัญ: จุลินทรีย์เซลลูโลสิก ยีสต์หมักเอทานอลทนร้อน เอทานอล

Abstract

Yeast is used widely in ethanol fermentation because it can grow rapidly. Not only the procedure of ethanol cost highly but also wasteful energy as the fermenting process must be cooled all the time by the coolant tank. Therefore in term of the procedure, the more yeast can grow in the high temperature, the lower cost of using energy in the cooling system. The result revealed that 7 from 25 isolate show to be thermotolerant xylose-utilizing yeasts for ethanol production. Yeast-malt extract medium was used to isolate thermotolerant yeasts at 35, 37, 40, 45 and 50 °C. SKN 2-1 was showing producing highest yield of ethanol compared to other isolates. SKN 2-1 could grow and produce ethanol at 40 and 45 °C. SKN2-1 was fermented in 5 litre reactor at 40 °C, ethanol were produced 0.66 g/L (31.71% of the theoretical yield) at 196 h. SKN2-1 was similarly to *Ogataea polymorpha* using evaluation of nucleic acid sequencing of the D1/D2 region of the large subunit of the 26S rDNA.

Keywords: cellulosic microorganism, thermo tolerance ethanol yeast Fermenting, ethanol

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
วิธีดำเนินการศึกษา	3
ผลการศึกษาและอภิปรายผล	9
สรุปผลการทดลอง	20
เอกสารอ้างอิง	22
ประวัตินักวิจัยและคณะ	25

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	ปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ทนร้อนผลิตได้	9
ตารางที่ 2	ปริมาณองค์ประกอบของฟางข้าว (เปอร์เซ็นต์)	11
ตารางที่ 3	ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร	16
ตารางที่ 4	ผลการตรวจสอบบริเวณ D1 และ D2 region ใน 26 rDNA	19
ตารางที่ 5	ลำดับเบสบริเวณ D1 และ D2 region ใน 26S rDNA ของยีสต์ SKN2-1	19

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ	5
ภาพที่ 2	ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช	6
ภาพที่ 3	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	7
ภาพที่ 4	ลักษณะของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1	10
ภาพที่ 5	อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1	11
ภาพที่ 6	ลักษณะฟางข้าวที่การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีและย่อยสลายด้วยเอนไซม์	12
ภาพที่ 7	การเจริญเติบโตของ *P. stipitis*	15
ภาพที่ 8	การเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1	15
ภาพที่ 9	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลที่เวลาต่างๆ ของ *P.stipitis*	17
ภาพที่ 10	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลที่เวลาต่างๆ ของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ SKN 2-1	17

เซลลูโลสิกเพื่อการย่อยสลายเซลลูโลส: ปีที่ 3 การนาไปใช้ประโยชน์ทางเกษตร

Cellulosic for cellulose degradation: year 3 Agricultural application

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และ ชมภูนุช วิรุณานนท์

Warawut Chulalaksananukul and Chompunuch Virunanond

ภาคพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

Department of Botany, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัญหาสภาวะโลกร้อนและการลดลงอย่างต่อเนื่องของแหล่งน้ำมันดิบในปัจจุบันส่งผลให้ราคาน้ำมันดิบมีราคาสูงขึ้น ดังนั้นการหาแหล่งพลังงานใหม่หรือการผลิตเชื้อเพลิงขึ้นมาทดแทนจึงได้รับความสนใจมากขึ้น ทำให้พลังงานทางเลือกใหม่ๆ เช่น แก๊สโซฮอล์ ดีเซลชีวภาพถูกพัฒนาขึ้นอย่างกว้างขวาง ดังนั้นจึงมีการพัฒนาการผลิตไบโอเอทานอล ซึ่งใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตแก๊สโซฮอล์มากขึ้นตามลำดับด้วยเช่นกัน กระบวนการผลิตเอทานอลในปัจจุบันจะพิจารณาถึงความคุ้มค่าทางด้านเศรษฐศาสตร์ ด้านสิ่งแวดล้อม และด้านพลังงาน ปัจจัยที่มีผลต่อราคาของกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลนั้น มาจากวัตถุดิบซึ่งมีผลประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันมีการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลหรือแป้งที่ได้จากพืชหลายชนิด เช่น อ้อย ข้าวโพด และมันสำปะหลัง อย่างไรก็ตาม เอทานอลที่ผลิตได้ยังมีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับพลังงานจากแหล่งน้ำมันดิบ ดังนั้นจึงเลือกใช้ผลิตผลพลอยได้จากโรงงานอุตสาหกรรมหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งวัสดุเหล่านี้เรียกว่าวัตถุดิบประเภท ลิกโนเซลลูโลส เช่น ชานอ้อย เศษไม้ ซังข้าวโพด ฟางข้าว เป็นต้น

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีอยู่อย่างเหลือเฟือ มีราคาต่ำ ประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ในอัตราส่วนที่ต่างกันไปตามชนิดของวัตถุดิบ เช่น ฟางข้าว ซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต เอทานอล มีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส 39 เปอร์เซ็นต์เฮมิเซลลูโลส 27 เปอร์เซ็นต์และลิกนิน 12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลที่สามารถนำมาหมัก

ด้วยจุลินทรีย์แล้วให้ผลผลิตเป็นเอทานอลได้ น้ำตาลที่ได้จากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสซึ่งมีคาร์บอน 6 และ 5 อะตอมตามลำดับ ซึ่งในวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสจะมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์และมีน้ำตาลไซโลสประมาณ 17 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แต่ด้วยธรรมชาติของยีสต์จะสามารถนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อได้ผลผลิตเป็นเอทานอลได้มากกว่าการใช้น้ำตาลไซโลส ดังนั้นการคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตเอทานอลได้นั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญ

ในยีสต์ดีไซโลสจะถูกรีดิวซ์โดย D-xylose reductase ได้เป็นไซลิทอลและจะถูกออกซิไดซ์โดย xylitol dehydrogenase ได้เป็นดีไซลูโลสจากนั้นจะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็น glyceraldehyde-3-phosphate และ fructose-6-phosphate เข้าสู่กระบวนการหมักตามปกติ ยีสต์ที่สามารถนำน้ำตาลไซโลสเข้าสู่กระบวนการหมักที่มีการศึกษาอย่างแพร่หลายและสามารถหมักน้ำตาลไซโลสแล้วได้เอทานอลออกมาเป็นผลิตภัณฑ์อย่างเดียว คือสายพันธุ์ *Candida shehatea, Pachysolen tannophilus* และ *Pichia stipitis*

ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปจะประกอบด้วยการเตรียมวัตถุดิบการหมัก (fermentation) การกลั่น (distillation) และการกำจัดน้ำ (dehydration) ซึ่งในกรณีที่วัตถุดิบที่เป็นแป้งหรือวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส จะต้องมีขั้นตอนการย่อย (hydrolysis) เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลก่อนการหมัก ซึ่งการย่อยวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลสามารถทำได้โดยใช้กรดหรือเอนไซม์ การใช้กรดนั้นมีข้อเสีย คือ ในการเกิดปฏิกริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงปฏิกริยาเกิดขึ้นรุนแรงและเป็นการย่อยที่ไม่เฉพาะเจาะจงเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ ภาชนะที่ใช้ต้องทนทานต่อการกัดกร่อนของกรดได้ซึ่งมีราคาแพง และต้องมีการกำจัดน้ำทิ้งที่เหลือจากกระบวนการซึ่งมีกรดเจือปนอยู่ ดังนั้นการใช้เอนไซม์จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจ เพราะเอนไซม์มีความจำเพาะสูง ปฏิกิริยาเกิดที่สภาวะเป็นกลาง ไม่เกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการเหมือนกับการใช้กรด ทำให้ค่าใช้จ่ายในการกำจัดของเสียลดลง และกระบวนการผลิตเอทานอลที่นิยมในปัจจุบันคือ กระบวนการผลิตแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) โดยรวมขั้นตอนการย่อยครั้งสุดท้าย เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาล พร้อมกับการหมักด้วยยีสต์ในขั้นตอนเดียวกัน แต่กระบวนการ SSF มีการใช้อุณหภูมิสูงซึ่งสามารถทำลายเซลล์ยีสต์ได้ เพราะฉะนั้นยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักควรมีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงจะทำให้ประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้นดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดเพื่อทำการคัดกรองยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิต

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

การย่อยสลายเซลลูโลสด้วยเอนไซม์ทำได้โดยใช้เซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส เซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิดมาทำงานร่วมกัน คือ endoglucanase หรือ carboxymethyl cellulase (EC 3.2.1.4), cellobiohydrolase หรือ exoglucanase (EC 3.2.1.91) และ β-glucosidase (EC 3.2.1.21) (Howard, 2003) แม้ว่าจะมีแบคทีเรียและเชื้อรามากมายที่สามารถผลิตเซลลูเลสได้ แต่มักนำเชื้อรา *Trichoderma reesei* และสายพันธุ์ mutant มาใช้เนื่องจากมีความสามารถในการผลิตเซลลูเลสได้ดีเหมาะสำหรับการย่อยสลาย (Ryu และ Mandels, 1980; Wyman, 1994) ส่วนเฮมิเซลลูเลสเป็นเอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสซึ่งมีไซแลนเป็นองค์ประกอบหลักทำให้ได้เป็นน้ำตาลไซโลส ประกอบด้วยเอนไซม์ 2 ชนิด ใหญ่ ๆ คือ endoxylanase (EC 3.2.1.8) และ β-xylosidase (EC 3.2.1.37) (Flores, Pérez และ Huitrón, 1997) ผลิตได้จากเชื้อ เช่น *Streptomyces* spp. (MacKenzie และคณะ, 1987), *Fusarium oxysporum* (Panagiotou และคณะ, 2003) และ *Aspergillus* spp. (Guimarães และคณะ, 2006) เป็นต้น เซลลูเลสและไซแลเนสได้มีการศึกษากันมากที่สุด สามารถผลิตได้จากเชื้อราที่ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Trichoderma* spp. (MacKenzie และคณะ, 1987) *T. reesei* สามารถผลิตได้ทั้งเซลลูเลสและเฮมิเซลลูเลส (Juhász และคณะ, 2005) จึงเหมาะที่จะนำมาใช้ย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส เพราะทำให้ไม่ต้องใช้เชื้อหลายตัวในการผลิตเอนไซม์ การใช้เอนไซม์มีข้อดีหลายประการเพราะเอนไซม์มีความจำเพาะเจาะจงสูง (Wyman, 1994) ทำให้ได้น้ำตาลที่ต้องการ

วัตถุประสงค์

ทดสอบการใช้จุลินทรีย์ทนร้อนที่สามารถผลิตเอทานอลจากฟางข้าวในถังหมักขนาด 5 ลิตร

วิธีดำเนินการวิจัย

การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซโลส

1. เตรียมหัวเชื้อยีสต์ทนร้อน

นำยีสต์ทนร้อนที่คัดกรองได้เลี้ยงใน YM medium นำไปบ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นโดยมวล/ปริมาตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4

2. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลจากฟางข้าวของยีสต์ทนร้อนที่คัดเลือก

ใช้อาหารไซโลสซึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารให้เท่ากับ 5.5 ในการทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน โดยถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 1 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นลงในอาหารไซโลส นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเพื่อนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller และคณะ, 1959) และตรวจหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี (Gas chromatography) รุ่น GC-2010A (Shimadzu, Japan)

3. การศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 1 ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นลงในอาหารไซโลสนำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อวัดการเจริญเติบโต ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเพื่อนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) และตรวจหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี (Gas chromatography)

4. ผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ทนร้อนที่คัดกรองได้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตรโดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิต

4.1 ตัวอย่างฟางข้าวที่ใช้ในงานวิจัย

4.1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างฟางข้าวจากจังหวัดสุรินทร์ นำตัวอย่างฟางข้าว ที่ได้มาล้างให้สะอาด และนำไปปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพต่อไป

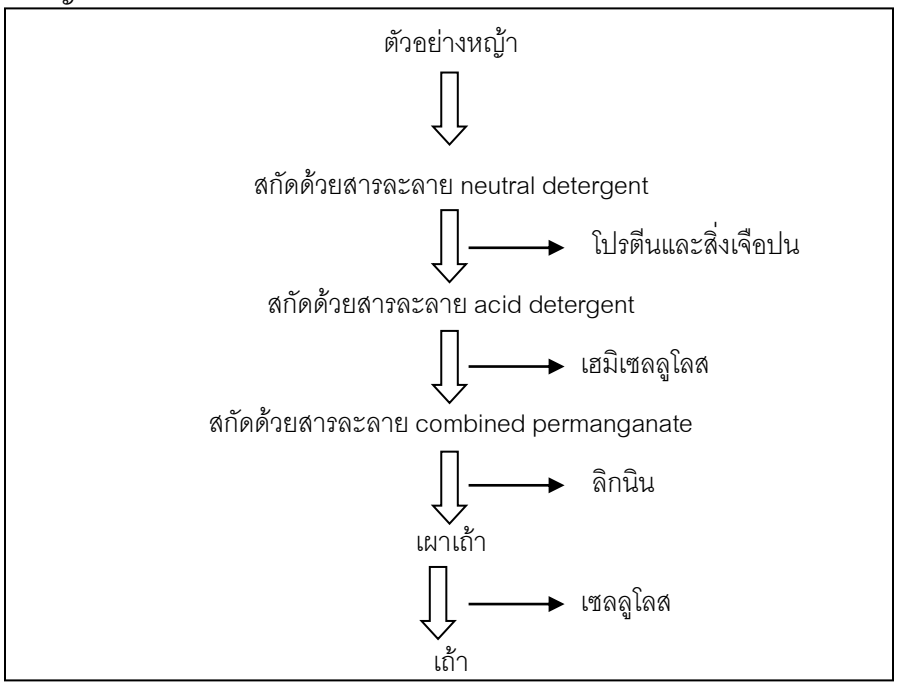
4.1.2 การปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ

4.1.4 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์

เติมเซลลูเลสจำนวน 18 ยูนิต (คิดเป็น 30 ยูนิต/กรัมของวัตถุดิบ) ไซแลเนสจำนวน 10.8 ยูนิต (คิดเป็น 18 ยูนิต/กรัมของวัตถุดิบ) (ดัดแปลงมาจาก Saha และ Cotta,2007) และสารละลายโซเดียมซิเทรตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 4.8 ปริมาตร 5มิลลิลิตร ลงไปในฟลาสก์ที่มี หญ้าและฟลาสก์ที่เป็น ชุดควบคุมซึ่งผ่านการปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีในข้อ 4.1.3 นำไปบ่มในเครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4.1.5 การวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

นำหญ้าที่บดและร่อนเอาส่วนละเอียดออกไปแล้วมาหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชตามวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) วิเคราะห์หาค่าต่างๆ คือ ปริมาณ neutral detergent fiber (NDF) ปริมาณ acid detergent fiber (ADF) ปริมาณ permanganate lignin (PML) และปริมาณเถ้า เพื่อนำไปคำนวณหา ปริมาณเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินซึ่งเป็นองค์ประกอบของชีวมวลพืช โดยหญ้าแต่ละชนิดจะวิเคราะห์ทั้งหมด 3 ซ้ำ ขั้นตอนการวิเคราะห์โดยย่อแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 ขั้นตอนการวิเคราะห์หาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืช

4.2 การผลิตเอทานอลจากฟางข้าวด้วยกระบวนการ SSF

4.2.1 การเลี้ยงกล้าเชื้อ

เลี้ยงกล้าเชื้อ *P. stipitis* และยีสต์ทนร้อน โดยเลี้ยงเชื้อตามอายุที่เหมาะสม จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อชนิดละ 200 มิลลิลิตร (คิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

4.2.2 การเติมเอนไซม์

เติมเซลลูเลสและไซแลเนสที่ผ่านการกรองแล้วปริมาณ 630 และ 378 ยูนิต ตามลำดับ ลงไปในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ จากนั้นนำถังปฏิกรณีชีวภาพไปต่อกับจอควบคุม โดยตั้งค่าใบพัดให้มีความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ตั้งอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสสำหรับ *P. stipitis* และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสำหรับยีสต์ทนร้อน เก็บตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 7 วัน โดยถังปฏิกรณ์ชีวภาพแสดงดังภาพที่ 3

ภาพที่ 3 ถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

เก็บตัวอย่างในข้อ 4.2.2 มาวิเคราะห์ โดยปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดโดยใช้วิธี DNS method (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959) นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของไมโครเพลท เติมสารละลาย DNS reagent ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน สำหรับแบลงค์ คือ ใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง จากนั้นปิดฝาไมโครเพลทแล้วนำไปบ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่มีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เมื่อครบเวลาทำการเจือจางสารในไมโครเพลทดังกล่าว

ก่อนที่จะนำไปวัด โดยดูดสารนั้นขึ้นมา 50 ไมโครลิตร นำไปใส่ไมโครเพลทอีกอัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงไปแล้วผสมให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 0 - 2.0 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาคผนวก จ

5. การวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก

ในกระบวนการหมัก ตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร จะถูกเก็บที่แต่ละช่วงเวลาของการหมักเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตของบิวทานอลที่เกิดขึ้นจากการหมักด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี (GC-2010A Shimadzu, Japan) ด้วยคอลัมน์ DB-WAX (Agilent Technologies, USA) อุณหภูมิคอลัมน์ หัวฉีด (Injector) และตัวตรวจจับ (Detector) เท่ากับ 45, 250 และ 260 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวนำ (Carrier gas) ผลผลิตมวลรวมของผลิตภัณฑ์ คำนวณออกมาเป็นกรัมต่อลิตร

6. การบ่งชี้สายพันธุ์ยีสต์ทนร้อน

6.1 การตรวจสอบบริเวณ D1 และ D2 region ใน 26rDNA ของจุลินทรีย์

เลี้ยงเชื้อไอโซเลต SKN2-1ในอาหาร YM agar ที่มีน้ำตาลไซโลส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งเชื้อไปตรวจสอบบริเวณ D1 และ D2 region ใน 26S rDNA ของจุลินทรีย์ ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

7. การเก็บรักษาเชื้อ

ถ่ายเชื้อโดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อมาลากลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สูตร YMA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยถ่ายเชื้อลงบนอาหารใหม่ (subculture) ทุก 3 เดือน

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน

ยีสต์ทนร้อนที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาขึ้นไปถูกเลือกมาทดสอบ ความสามารในการผลิตเอทานอล โดยเลือกยีสต์ทนร้อนทั้งหมด 35 ไอโซเลท มาทดสอบในอาหารไซโลสซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตร เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เพื่อให้เกิดการหมักและผลิตเอทานอล พบว่าจากยีสต์ทนร้อนทั้งหมด 42 ไอโซเลท มีเพียง 7 ไอโซเลท สามารถใช้ไซโลสและผลิตเอทานอลได้ ยีสต์ทนร้อนทั้ง 7 ไอโซเลทเป็นยีสต์ที่สามารถแยกได้จากตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บมาจากโรงงานน้ำตาลครบุรี จังหวัดนครราชสีมา ซึ่งแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ทนร้อนผลิตได้

ไอโซเลท	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาล	Ethanol yield (%)
SKN 1-2	0.05 ± 0.01	1.26 ± 0.00	18.74	0.003	0.58
SKN 2-1	0.28 ± 0.00	1.20 ± 0.01	18.80	0.015	2.94
SKN 2-2	0.04 ± 0.01	1.20 ± 0.01	18.80	0.004	0.20
SKN 2-3	0.04 ± 0.00	1.14 ± 0.00	18.86	0.002	0.10
SKN 2-7	0.04 ± 0.01	1.15 ± 0.01	18.85	0.002	0.39
SKN 3-1	0.05 ± 0.00	1.28 ± 0.01	18.72	0.003	0.59
SKN 3-2	0.04 ± 0.00	1.22 ± 0.02	18.78	0.002	0.39

จากปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากการหมักของทั้ง 7 ไอโซเลทเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างปริมาณเอทานอลเมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นพบว่าไอโซเลท SKN 2-1 สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตร ลักษณะของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 เป็นดังภาพที่ 4

(ก) (ข)

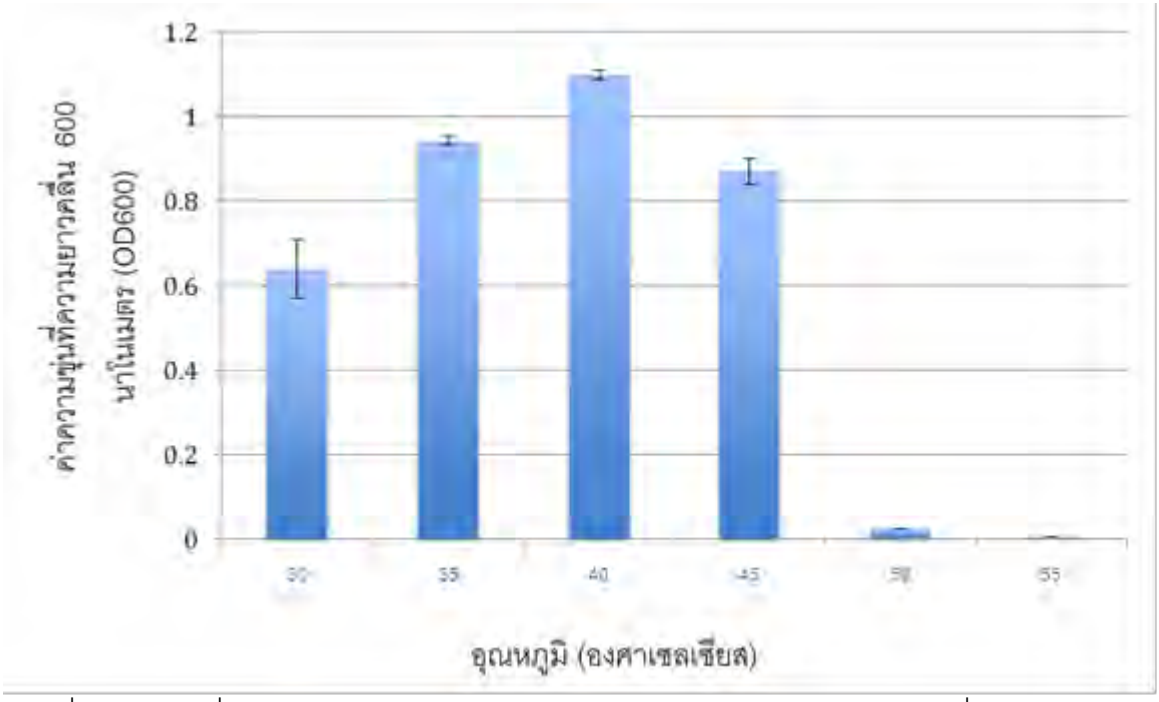
ภาพที่ 4 ลักษณะของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1

(ก) : บนผิวหน้าอาหารแข็ง YM

(ข) : ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

2. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ทนร้อน

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ SKN 2-1 ทำการทดลองในช่วง อุณหภูมิระหว่าง 35 – 55 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 3 ผลการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่ยีสต์ทนมีการเจริญเติบโตมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสโดยดูจากค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และการเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อน จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากปัจจุบันการใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะใช้อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส (Laluce และคณะ, 1987) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของยีสต์ จึงทำให้ผลผลิตของเอทานอลได้มีปริมาณน้อย และการใช้ยีสต์ทนร้อนในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลนั้นจะส่งผลถึงต้นทุนการผลิตเนื่องจากกระบวนการผลิตเอทานอลในปัจจุบันจำเป็นต้องใช้กระบวนการหล่อเย็นเพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญเตบโตได้ ซึ่งค่าใช้จ่ายในกระบวนการหล่อเย็นมีต้นทุนสูง ดังนั้นการใช้ยีสต์ทนร้อนในกระบวนการผลิตสามารถลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการหล่อเย็นและกระบวนการกลั่นลงได้ (Sree และคณะ, 1999) จากการศึกษาของ Anderson และคณะ (1986) พบว่ายีสต์ทนร้อนสามารถเพิ่มผลผลิตของเอทานอลได้มากกว่า 6 เปอร์เซ็นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 5 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ซึ่งทำการทดลองในอาหารไซโลส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

3.1 ตัวอย่างฟางข้าวที่ใช้ในการทดลอง

ตัวอย่างฟางข้าวที่ใช้ในการทดลองจะผ่านการปรับสภาพวัตถุด้วยวิธีทางกายภาพ ปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีโดยใช้อัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์แล้วย่อยสลายด้วยเซลลูเลสและไซแลเนสที่ผลิตจากเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 และหาองค์ประกอบของฟางข้าวด้วยวิธีของ Goering และ Van Soest (1970) ซึ่งองค์ประกอบของฟางข้าวแสดงดังตารางที่ 2 และฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางเคมีและย่อยสลายด้วยเอนไซม์แล้วแสดงดังภาพที่ 6

ตารางที่ 2 ปริมาณองค์ประกอบของฟางข้าว (เปอร์เซ็นต์)

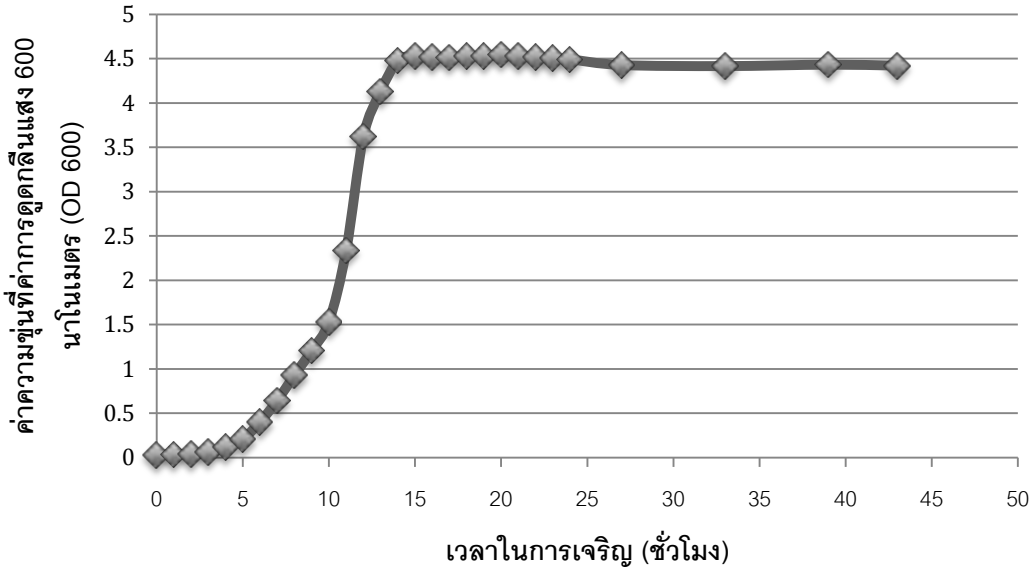
	ปริมาณองค์ประกอบของฟางข้าว (เปอร์เซ็นต์)				
	เซลลูโลส	เฮมิเซลลูโลส	ลิกนิน	เถ้า	อื่นๆ
ฟางข้าว	37.67 ± 0.31	33.36 ± 1.96	4.12 ± 0.36	0.02 ± 0.01	25.40 ± 2.35

การหาปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชสามารถวิเคราะห์ได้หลายวิธี ได้แก่ proximate analysis แต่เนื่องจากในขั้นตอนของการวิเคราะห์ทำให้ได้ค่าเยื่อใย (crude fiber) ผิดความเป็นจริง นอกจากนี้ยังไม่สามารถแยกชนิดของเยื่อใยหรือองค์ประกอบของชีวมวลพืชได้ จึงทำให้วิธีนี้ใช้ประโยชน์ได้น้อยลง (สายัณห์ ทัดศรี, 2540) ดังนั้นจึงได้ใช้วิธี detergent fiber analysis หรือ forage fiber analysis แทน ซึ่งพัฒนาโดย Goering และ Van Soest (1970) เพื่อให้สามารถแยกแยะปริมาณองค์ประกอบของชีวมวลพืชได้ วิธีการวิเคราะห์แบบนี้สามารถแบ่งองค์ประกอบของพืชได้เป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ ส่วนที่อยู่ภายในเซลล์ (cell content หรือ neutral detergent soluble หรือ NDS) เป็นส่วนสามารถละลายได้ในสารละลายที่เป็นกลาง (neutral detergent) ประกอบด้วย โปรตีน คาร์ไฮเดรต เช่น แป้งและน้ำตาล ไขมัน กรดอินทรีย์ต่างๆ สารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีน วิตามิน เพคติน และสารที่ละลายน้ำได้ เป็นต้น (วารุณี พานิชผล และคณะ, 2537) อีกส่วนหนึ่ง คือ ส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall constituents หรือ neutral detergent fiber หรือ NDF) เป็นส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ในสารละลาย neutral detergent ประกอบด้วยเฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า (Lee และคณะ, 2007) โดย NDF ยังสามารถแบ่งออกได้เป็นส่วนที่ละลายได้ในสารละลายที่เป็นกรด (acid detergent) เรียกว่า acid detergent soluble (ADS) คือ เฮมิเซลลูโลส และส่วนที่ไม่สามารถละลายได้ในสารละลาย acid detergent เรียกว่า acid detergent fiber (ADF) ได้แก่ เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ดังนั้นในการวิเคราะห์องค์ประกอบของชีวมวลพืชจึงได้ใช้สารละลาย neutral detergent ในการสกัดก่อนเพื่อสกัดเอาส่วน NDS จากพืชออกไป จึงเหลือส่วนที่เป็น NDF (เฮมิเซลลูโลส เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า) เอาไว้ ในการสกัดครั้งต่อมาจึงใช้สารละลาย acid detergent เพื่อสกัดเอาเฮมิเซลลูโลสออกไป จึงเหลือส่วนที่เป็น ADF (เซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า) เอาไว้ ดังนั้นจึงหาปริมาณของ
เฮมิเซลลูโลสได้จากผลต่างของปริมาณ NDF และ ADF จากนั้นจึงใช้สารละลาย combined permanganate ในการสกัดเอาลิกนินออกไป จึงเหลือส่วนที่เป็น PML (permanganate lignin) ที่ประกอบด้วย เซลลูโลสและเถ้า ดังนั้นจึงหาปริมาณของลิกนินได้จากผลต่างของปริมาณ ADF และ PML ขั้นตอนสุดท้ายเมื่อนำไปเผาจึงเหลือเฉพาะส่วนของเถ้าทำให้หาปริมาณของเซลลูโลสได้จากผลต่างของปริมาณ PML และเถ้า ส่วนของเถ้าที่เหลือนั้นจะเป็นพวกสารประกอบอนินทรีย์และแร่ธาตุต่างๆ ได้แก่ ซิลิกา อะลูมิเนียม แคลเซียม แมกนีเซียม โพแทสเซียม และโซเดียม เป็นต้น (Lee และคณะ, 2007) และปริมาณของสารอื่นๆ ที่พบนอกเหนือจากเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และเถ้า ก็คือ ปริมาณ NDS นั่นเอง

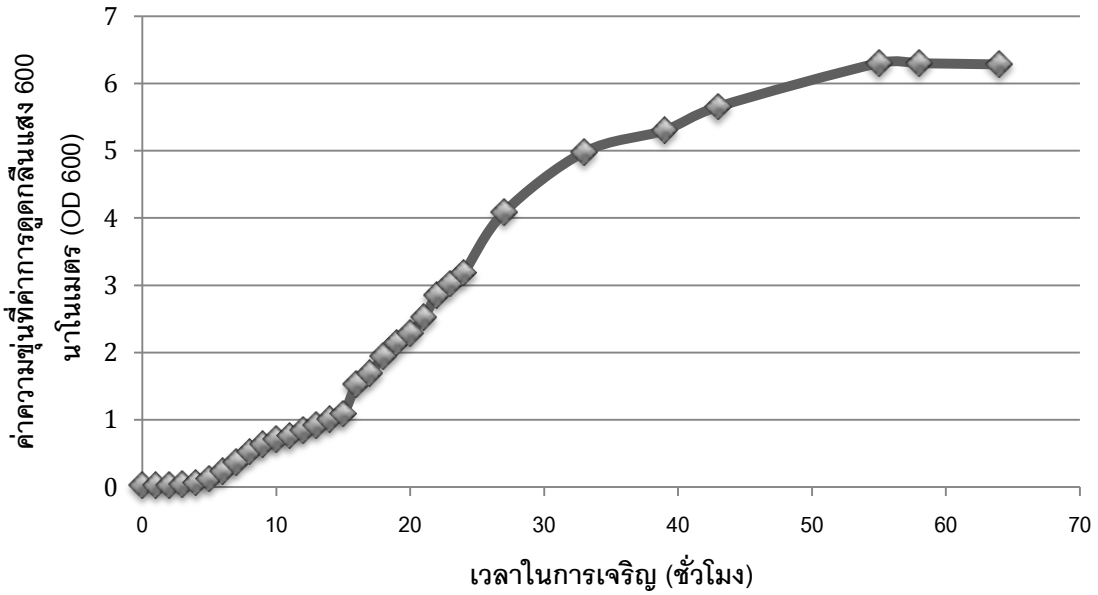
จากการวิเคราะห์ปริมาณองค์ประกอบของฟางข้าว พบว่า มีปริมาณเซลลูโลสโดยเฉลี่ยอยู่37.67 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณเฮมิเซลลูโลส 33.36 เปอร์เซ็นต์ และมีปริมาณลิกนินโดยเฉลี่ยอยู่ในช่วง 4.12 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งฟางข้าวมีปริมาณรวมของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสค่อนข้างสูง ดังนั้นในการหาค่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี จึงคิดจากปริมาณเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในฟางข้าว เพื่อคำนวณหาว่าฟางข้าวจะสามารถผลิตเอทานอลได้เท่าไหร่หากมีการย่อยสลายเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสอย่างสมบูรณ์และน้ำตาลที่ได้สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ทั้งหมด สามารถคำนวณหาประมาณกลูโคสและไซโลส ได้เท่ากับ 41.85 และ 37.90 เปอร์เซ็นตามลำดับ ดังนั้นปริมาณเอทานอลที่ได้จากการคำนวณทางทฤษฎีเท่ากับ 0.41 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

4.5.2 **การผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ**

จากการศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล พบว่าเมื่อเลี้ยง *P.stipitis* ในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญดังภาพที่ 7 โดยมีระยะแล็กที่เวลา 0 - 5 ชั่วโมง ระยะเอกซ์โพเนนเชียลที่เวลา 5 - 12 ชั่วโมง และเข้าสู่ระยะสเตชันนารีที่เวลา 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป ซึ่งช่วงเวลาที่เชื้อเข้าสู่ระยะสเตชัน เชื้อจะมีการเจริญเติบโตน้อย ส่วนยีสต์ทนร้อนที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนจะมีการเจริญดังภาพที่ 8 โดยไม่เกิดระยะแล็กจึงเริ่มระยะเอกซ์โพเนนเชียลที่เวลา 0 - 24 ชั่วโมง และหลังจาก 24 ชั่วโมงเชื้อมีการเจริญลดลง ดังนั้นอายุของกล้าเชื้อ *P. stipitis* และยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ที่เหมาะสม คือ ที่ระยะเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 7 การเจริญเติบโตของ *P. stipitis* ที่เวลา 0 - 48 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส

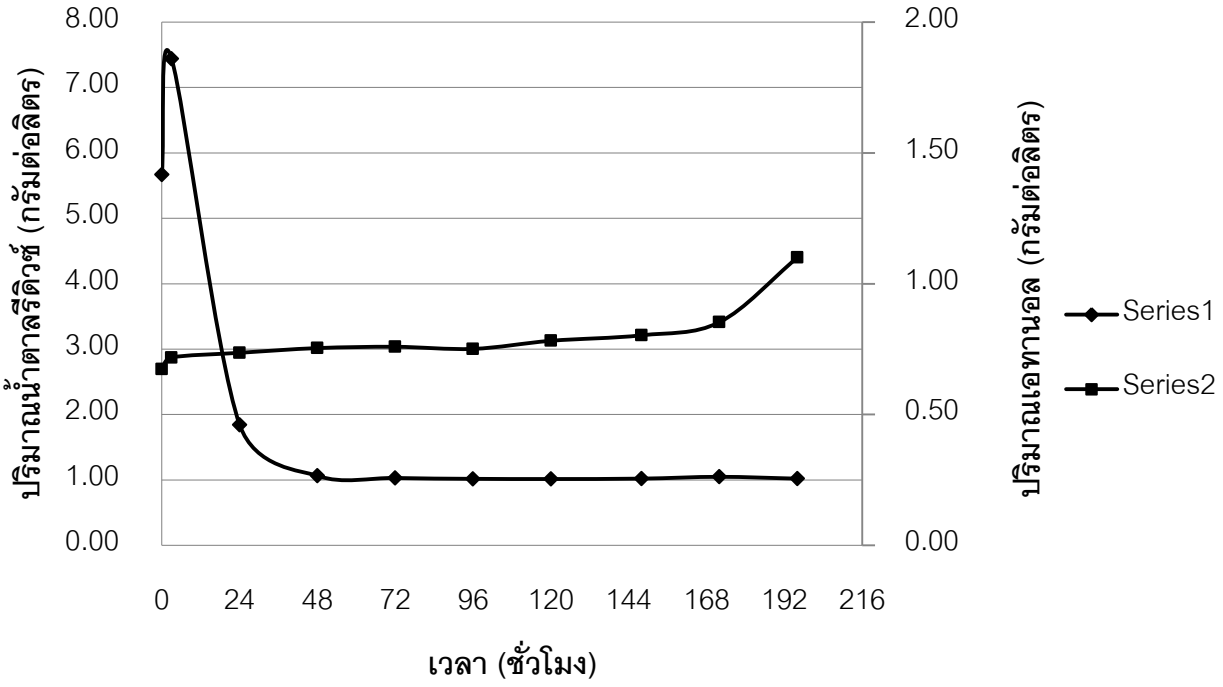


ภาพที่ 8 การเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ที่เวลา 0 - 65 ชั่วโมง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร YMB โดยมีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลไซโลส

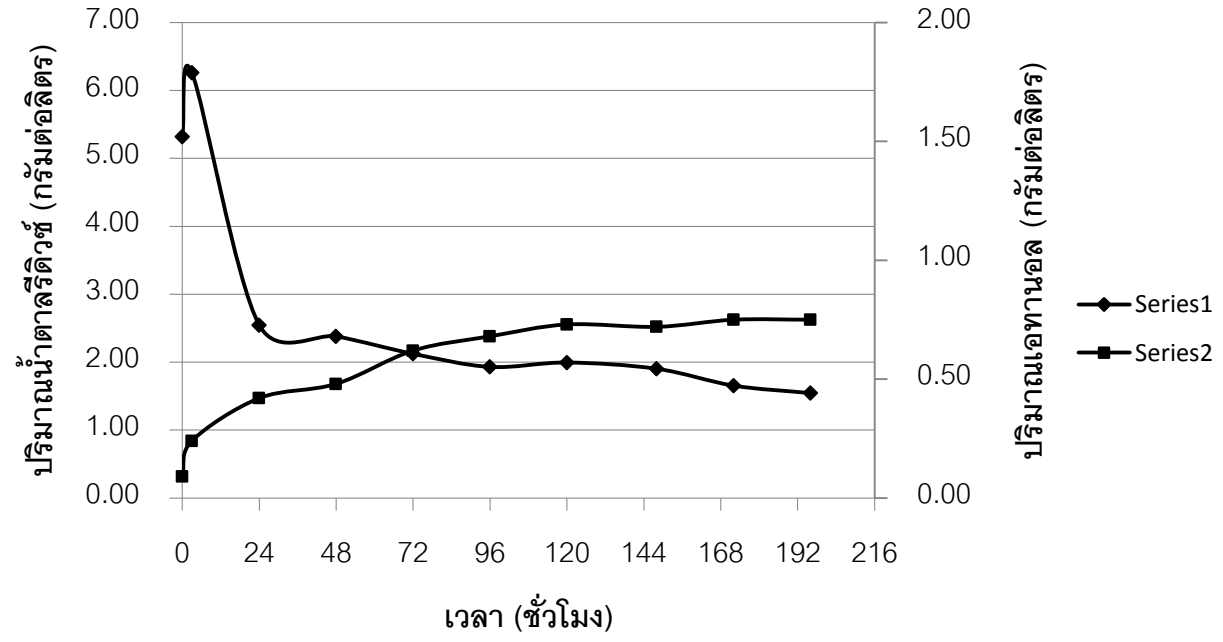
เมื่อนำฟางข้าวที่ผ่านการปรับสภาพด้วยอัลคาไลน์เพอร์ออกไซด์แล้วหมักด้วยกระบวนการ SSCF โดยใช้ยีสต์ 2 ชนิด คือ *P. stipitis* และยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 โดยเลี้ยงกล้าเชื้อที่ระยะเวลาที่เหมาะสมดังกล่าว เติมเอนไซม์ 2 ชนิดที่ผลิตจาก *T. reesei* TISTR 3081 คือ เซลลูเลสและไซแลเนสลงไป แล้วหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสสำหรับ *P.stipitis* และ 40 องศาเซลเซียส สำหรับยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 เป็นเวลา 7 วัน จะได้ปริมาณเอทานอลแสดงดังตารางที่ 3 ปริมาณการเกิดเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวส์ที่เวลาต่างของ *P.stipitis* และ ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 แสดงดังภาพที่ 9 และ 10 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร

เชื้อ	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์สุดท้าย (กรัมต่อลิตร)	น้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัมต่อลิตร)	กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล	Ethanol yield (%)
P.stipitis	0.44	7.44	1.02	6.42	0.07	17.07
SKN 2-1	0.66	6.26	1.54	4.72	0.13	31.71



ภาพที่ 9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลที่เวลาต่างๆ ของ *P.stipitis*



ภาพที่ 10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลที่เวลาต่างๆ ของยีสต์ทนร้อนสายพันธ์ SKN 2-1

ในการผลิตเอทานอลจากหญ้าที่มีองค์ประกอบหลักเป็นเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสจำเป็นต้องมีการย่อยสลายองค์ประกอบดังกล่าวเพื่อให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคสและไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลที่จะได้จากการย่อยสลายเป็นส่วนใหญ่ เพื่อที่จะนำน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้มาหมักเป็นเอทานอล และใช้ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 หมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และใช้ *P.stipitis* หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซสเซียสเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ พบว่า ปริมาณน้ำตาลที่ถูกย่อยออกมาจากฟางข้าวมีปริมาณสูงที่สุดที่เวลา 3 ชั่วโมง โดยการหมักด้วยยีสต์ทนร้อนมีประมาณน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 6.26 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลสูงในการหมักโดยใช้ *P.stipitis* เท่ากับ 7.44 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่ผลิตได้โดยยีสต์ทนร้อนและ *P.stipitis* เท่ากับ 0.44 และ 0.66 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ คิดเป็น 17.07 และ 31.71 เปอร์เซ็นเอทานอลเมื่อเทียบกับกาคำนวณทางทฤษฎี จากการทดลองจะเห็นว่า เมื่อทำการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจะสามารถเพิ่มผลผลิตของเอทานอลได้มากกว่า 6 เปอร์เซ็น ซึ่งสอดคล้องกับจากการศึกษาของ Anderson และคณะ (1986) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของอุณหภูมิต่อกระบวนการหมักเอทานอล โดยอุณหภูมที่ใช้คือ 25, 39 และ 47 องศาเซลเซียส พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส ยีสต์จะมีการผลิตเอทานอลประมาณ 6 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนัก หลังจากทำการหมัก 24 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ยีสต์จะผลิตเอทานอลประมาณ 7 เปอร์เซ็น หลังจากทำการหมัก 20 ชั่วโมง และที่ 25 องศาเซลเซียสเอทานอลจะถูกผลิตหลังจากทำการหมักไปแล้ว 60 ชั่วโมง

ในงานวิจัยที่มีการศึกษาการนำยีสต์ทนร้อนมาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสด้วยกระบวนการ SSF พบว่า Boyle และคณะ (1997) ได้ทำการศึกษาการหมักฟางข้าวบาร์เล่โดยใช้ยีสต์ *Kluyveromyces marxinus* IMB3 ในกระบวนการหมักแบบ SSF ซึ่งทำการหมักที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีฟางข้าวบาร์เล่ที่ปรับสถาพด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 เปอร์เซ็นโดยน้ำหนัก สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 2, 3 และ 3.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลมีความเข้มข้น 20 กรัมต่อ 100 กรัมของวัตถุดิบ

การลดต้นทุนการผลิตเอทานอลสามารถทำได้โดยการลดต้นทุนของวัตถุดิบหรือเอนไซม์ที่นำมาใช้ การใช้วัตถุดิบที่มีการปรับปรุงทางพันธุกรรมเพื่อให้มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตสูงร่วมกับการพัฒนาในเรื่องของการเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาลจะสามารถลดต้นทุนการผลิตเอทานอลได้ (Wooley และคณะ,1999) ส่วนการลดต้นทุนของการผลิตเอนไซม์นับได้ว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญของการย่อยสลายวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส การใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ในการโคลนยีนเซลลูเลสเข้าสู่แบคทีเรีย ยีสต์และรา จะทำให้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์และแอกทิวิตีได้สูงขึ้น (Sun และ Cheng, 2002) นอกจากนี้การพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ให้มีประสิทธิภาพดีขึ้น ไม่ว่าจะเป็นในเรื่องของความสามารถ

ในการใช้น้ำตาลได้หลายชนิด การทนต่อเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงๆ หรือความสามารถในการย่อยสลายและหมักวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสได้ในคราวเดียวกัน ถือได้ว่าเป็นสิ่งที่ควรจะทำต่อไปในอนาคต หากต้องการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

5. การบ่งชี้สายพันธุ์ยีสต์ทนร้อน

5.1 การตรวจสอบบริเวณ D1 และ D2 region ใน 26rDNA ของจุลินทรีย์

ผลจากการส่งเชื้อไปตรวจสอบบริเวณ D1 และ D2 region ใน 26rDNA ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) (ตารางที่ 4 และ 5)

ตารางที่ 4 ผลการตรวจสอบบริเวณ D1 และ D2 region ใน 26rDNA

ตรวจสอบบริเวณ D1 และ D2 region ใน 26S rDNA	Nucleotide identity (%)
Ogataea polymorpha	100

ตารางที่ 5 ลำดับเบสบริเวณ D1 และ D2 region ใน 26S rDNA ของยีสต์ SKN2-1

ไอโซเลต	ลำดับเบสบริเวณ D1 และ D2 region ใน 26S rDNA
SKN2-1	GGATCATTACGCCAGCATCCTAGGCAAAAGCCGCAGACCTCAGTCTCGGTAGGCAACATCAACAGAAGCTATAACACTCCGAGGAGCC ACATTCAACTGTCATTATCTTGCCACCAAAACTGATGCTGGCCCAGTAAAAAGCTAGAGCACCACCCACAAGGAGCGATGATAGCTAAA TACCAAGTCTGATCAAATACCCTTCCCTTTCAACAATTTCACGTACTTTTTCACTCTCTTTTCAAAGTTCTTTTCATCTTTCCTTCACAGTACT TGTTCGCTATCGGTCTCTCGCCAATATTTAGCTTTAGATGGAATTTACCACCCACTTTGAGCTGCATTCCCAAACAACTCGACTCTTCGAA AGCATCTTACACGGAAATGGACACCTCATCACACGGGATTCTCACCCTCCATGACGTCCTGTTCCAAGGAACATAGACAAAGGCCACCT CCAAGATAGCTTTCTTCAAATTACAACTCGGGCACCGAAGGTACCAGATTTCAAATTTGAGCTCTTGCCGCTTCACTCGCCGCTACTAAG GCAATCCCTGTTGGTTTC

สรุปผลการทดลอง

การคัดกรองยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสจากตัวอย่างทราย ตัวอย่างดิน ตัวอย่างกากอ้อย และตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างจาก 3 จังหวัดในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง สามารถคัดกรองยีสต์ทนร้อนได้ทั้งสิ้น 73 ไอโซเลท โดยมี 45 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ในอาหารไซโลส และ 27 ไอโซเลท เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง นำทั้ง 27 ไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลในอาหารไซโลส พบว่า มี 7 ตัวอย่างที่สามารถใช้ไซโลสในกระบวนการหมักเอทานอลได้ โดยไอโซเลท SKN 2-1 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกากอ้อย สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ที่อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ฟางข้าวที่มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส 37.67 เปอร์เซ็น เฮมิเซลลูโลส 33.63 เปอร์เซ็น ลิกนิน 4.12 เปอร์เซ็น ซึ่งผ่านการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางการภาพ วิธีทางเคมีด้วย alkaline peroxide และย่อยสลายโดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสและไซลาเนสแล้ว พบว่า ยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดปริมาณ 0.66 กรัมต่อลิตรที่ 196 ชั่วโมงของการหมัก คิดเป็น 31.71 เปอร์เซ็นของเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี

การวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ D1-D2 region ใน 26S rDNA พบว่า SKN2-1 มีลำดับนิวคลีโอไทด์คล้ายคลึงกับ *Ogataea polymorpha*

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาแหล่งคัดกรองใหม่ๆที่มีความหลากหลายเพิ่มขึ้นเพื่อค้นหาเชื้อใหม่ๆที่สามารถและผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงๆ

2. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อให้เชื้อที่คัดกรองได้ผลิตเอทานอลได้เต็มประสิทธิภาพ

3. ควรศึกษาแหล่งที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมเพื่อให้การผลิตเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

1. วารุณี พานิชผล, สมพล ไวปัญญา, เมธิน ศิริวงศ์ และเฉลียว ศรีชู .2537 .การศึกษาคุณค่าทางอาหารของหญ้าแฝก (Vetiveria zizanioides Nash.) เพื่อใช้เป็นพืชอาหารสัตว์. ใน รายงานผลงานวิจัยและรายงานประจำปี 2537, หน้า158 -182. (ม.ป.ท.).
2. สายัณห์ ทัดศรี. 2540. พืชอาหารสัตว์เขตร้อน: การผลิตและการจัดการ. กรุงเทพมหานคร: รั้วเขียว.
3. Anderson, P. J., McNeil, K., and Watson, K. 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at the temperature above 40°C by *Kluyveromyces marxianus* var. marxianus isolated from sugar mills. Journal of Applied and Environmental Microbiology. 51(6): 1314-1320.
4. Boyle, M., Barron, N., McHale, A. P. 1997. Simultaneous saccharificatio and fermentation of straw to ethanol using the thermotolerant yeast strain Kluyveromyces marxianus IMB 3. Biotechnol Letter 19: 49–51.
5. Cara, C., Ruiz, E., Ballesteros, I., Negro, M., and Castro, E. 2006. Enhanced enzymatic hydrolysis of olive tree wood by steam explosion and alkaline peroxide delignification. Process Biochemistry 41: 423-429.
6. Goering, H. K., and Van Soest, P. J. 1970. Forage fiber analysis (Apparatus, reagents, procedures, and some applications). In Agricultural Handbook No. 379, pp. 1-20. Washington, DC: US Government Printing Office.
7. Guimarães, L. H. S., et al. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiology 37: 474-480.
8. Juhász, T., Szengyel, Z., Réczey, K., Siika-Aho, M., Viikari, L. 2005. Characterization of cellulases and hemicellulases produced by *Trichoderma reesei* on various carbon sources. Process Biochemistry 40: 3519-3525.
9. Laluce, C., Bertolini, M. C., Hernandes, J., Martini, A., and Vaughan Martini, A. E. 1987. Screening survey for yeasts that ferment sucrose at relatively high temperature. Annals of Microbiology 37: 151-159.

10. Lee, D., Owens, V. N., Boe, A., and Jeranyama, P. 2007. Composition of herbaceous biomass feedstocks [Online]. Available from: http://ncsungrant.sdstate.org/uploads/publications/SGINC1-07.pdf [2012, January 8]

11. MacKenzie, C. R., Bilous, D., Schneider, H., and Johnson, K. G. 1987. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in Streptomyces spp. Applied and Environmental Microbiology 53: 2835-2839.

12. Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry 31: 426-428.

13. Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B. J., and Christakopoulos, P. 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by Fusarium oxysporum grown on corn stover in solid state fermentation. Industrial Crops and Products 18: 37-45.

14. Purwadi, R. 2006. Continuous Ethanol Production from Dilute-acid Hydrolyzates: Detoxification and Fermentation Strategy. Doctoral dissertation. Department of Chemical and Biological Engineering, Chalmers University of Technology.

15. Ryu, D. D. Y., and Mandels, M. 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. Enzyme and Microbial Technology 2: 91-102.

16. Saha, B. C., and Cotta, M. A. 2007. Enzymatic saccharification and fermentation of alkaline peroxide pretreated rice hulls to ethanol. Enzyme and Microbial Technology 41: 528-532.

17. Sree, N.K., Sridhar, M., Rao, L. V., and Pandey, A. 1999. Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. Process Biochemistry. 34: 115-119.

18. Sun, Y., and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. Bioresource Technology 83: 1-11.

19. Wooley, R., Ruth, M., Glassner, D.,and Sheehan, J., 1999. Process design and costing of bioethanol technology: A tool for determining the status and direction of research and development. Biotechnology Progress 15: 794-803.

20. Wyman, C. E. 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. Bioresource Technology 50: 3-15.

ประวัติคณะวิจัย

1. นักวิจัยที่ปรึกษา (ชื่อ-สกุล ภาษาไทย) นาย วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล

(ชื่อ-สกุล ภาษาอังกฤษ) Mr. Warawut Chulalaksananukul

เพศ ชาย อายุ 55 ปี

สถานะภาพสมรส ☐ โสด ■ สมรส

2. การทำงาน

ตำแหน่งปัจจุบัน (อาจารย์, ผศ., รศ., ศ.) รองศาสตราจารย์ ดร.

สถานที่ทำงาน ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330

โทรศัพท์ 02-218-5482 โทรสาร 02-218-5482

e-mail warawut.c@chula.ac.th

3. ที่อยู่ (ที่บ้าน) 248/10 หมู่บ้านชวนชื่นพาร์ควิลล์ ซอย6/1 แขวงศาลาธรรมสพน์ เขตทวีวัฒนา

จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10170

โทรศัพท์ 02-885-0903 โทรสาร 02-218-5482

e-mail warawut.c@chula.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

4.1 ปริญญาตรีสาขา พันธุศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ 2523

4.2 ปริญญาโทสาขา พฤกษศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีที่จบ 2527

4.3 ปริญญาเอกสาขา Ph.D. (Microbiology-Biotechnology) สถาบัน INSA, Toulouse
ปีที่จบ 2537

4.4 อื่น ๆ (ระบุ) D.E.A. (Microbiology) INSA, Toulouse, France, พ.ศ. 2533 (1990)

5. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ (ตอบได้มากกว่า 1) Biofuels, Biocatalysts, Biotechnology

6. ผลงานวิจัย (ปี 2005-ปัจจุบัน)

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (โปรดระบุทั้งชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปีที่ตีพิมพ์ ฉบับที่ เล่มที่ เลขหน้า และค่า impact factor)

1. Suwannarangsee, S., Moulis, C., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., and **Chulalaksananukul, W.** 2007. Search for dextransucrase minimal motif involved in dextran binding. *FEBS letter* 581: 4675-4680. **Impact factor 3.842**.

2.Chokchaichamnankit, P., Anamthawat-Jonsson, K., **Chulalaksananukul, W.** 2007. Chromosomal mapping of 18S-25S and 5S ribosomal genes on 15 species of Fagaceae from northern Thailand. *Silvae Genetica* (J. D. Sauerländer's Verlag) 57: 5-13. **Impact factor 0.372**

3. Chokchaichamnankit, P., **Chulalaksananukul, W.**, Phengklai, C., Anamthawat-Jónsson, K. 2007. Karyotypes of some species *of Castanopsis*, *Lithocarpus* and *Quercus* (Fagaceae) from Khun Mae Kuong Forest in Chiang Mai province, northern Thailand. *Thai Forest Bulletin* (Botany) 35: 38-44. **Impact factor 0.049**.

4. Chokchaichamnankit, P., **Chulalaksananukul, W.**, Phengklai, C., Anamthawat- Jónsson, K. 2008. Species and genetic diversity of Fagaceae in Chiang Mai, northern Thailand, based on ISSR markers. *Journal of Tropical Forest Science* (Forest Research Institute Malaysia) 20: 8-18. **Impact factor 0.160.**

5. Virunanon, C., Chantaroopamai, S., and **Chulalaksananukul, W.** 2007. Solventogenic-cellulolytic Clostridia from 4-step-screening process in Agricultural Waste and Cow Intestinal Tract. *Anaerobes* . Nov 7. **Impact factor 1.561**.

6. Siripiyasing P, **Chulalaksananukul, W**; Pariyanonth P, et al: (2008) The Identification of the Sex Chromosome and Karyotype of Four Toad Species (Genus Bufo) in Thailand by T-lymphocyte Cell Culture. CYTOLOGIA. Volume: 73 Issue: 3 : 229-241. **Impact factor 0.12**.

7. Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriyakananon, K., Tantong, S., Thakernkarnkit, W., **Chulalaksananukul, W.**, Yongvanich, T. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed

biodiesel production in Thailand. *Biomass and Bioenergy* 32 (12), pp. 1279-1286. **Impact factor 2.54**.

8. Rattanapoltee, P., **Chulalaksananukul**, W., James, AE., Kaewkannatre,P. (2008) Comparison of Autotrophic and Heterotrophic cultivations of microalgae as a raw material for biodiesel production, Journal of Biotechnology, 136:S412. **(Impact factor 2.565)**.

9. Kensingh, P., **Chulalaksananukul**, W., Charuchinda, S. 2010 Lipase immobilization on *Scirpus grossus L.f.* fiber support by glutaraldehyde-crosslinked technique for biodiesel synthesis. JOURNAL OF BIOTECHNOLOGY. Volume: **150**. Supplement: **1. S163-S163** . **Impact factor 2.97**.

10. Suwannarangsee, S., Oh, D.-B., Seo, J.-W., Kim, C.H., Rhee, S.K., Kang,H.A., **Chulalaksananukul, W.**, Kwon, O. 2010. Characterization of alcohol dehydrogenase 1 of the thermotolerant methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 88 (2), pp. 497-507. **Impact factor 3.26**.

11.Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriyakananon, K., **Chulalaksananukul, W.**, Yongvanich, T., Svasti, J. 2011. Immobilized lipase from potential lipolytic microbes for catalyzing biodiesel production using palm oil as feedstock. *African Journal of Biotechnology* 10 (9), pp. 1666-1673. **Impact factor 0.56**.

12.Theerachat, M., Virunanon, C., Chulalaksananukul, S., Sinbuathong, N., **Chulalaksananukul, W.** 2011. NirK and nirS Nitrite reductase genes from non-agricultural forest soil bacteria in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 27 (4), pp. 999-1003. **Impact factor 1.08**.

13. Piamtongkam, R., Duquesne, S., Barbe, S, André, I., Marty, A and **Chulalaksananukul, W.** 2011. Enantioselectivity of *Candida rugosa* lipases (Lip1, Lip3 and Lip4) towards 2-bromo phenylacetic acid octyl esters controlled by a single amino acid. *Biotechnology and Bioengineering*. Vol 108, no 8, 1749-1756. **Impact factor 3.7**.

14. Ouephanit, C., Virunanon, C., Burapatana, V., and **Chulalaksananukul, W**. 2011 Butanol and ethanol production from tapioca starch wastewater by Clostridium spp. Water Science and Technology. 64.9 1774-1780. **Impact factor 1.056**.

15. Theerachat, M, Morel, S., Guieysse, D., Remaud-Simeon, M., and **Chulalaksananukul, W.** 2012 Comparison of synthetic dye decolorization by whole cells and a laccase enriched extract from *Trametes versicolor* DSM11269. *African Journal of Biotechnology* 10 (9), Vol. 11(8), pp. 1964-1969, **Impact factor 0.56**.

7. ผลงานวิชาการอื่นๆ (เช่น Proceeding ตำรา ฯลฯ)

Poster and Oral Presentation (2005-2008)

Chulalaksananukul, W., Virunanon, P. and Soucaille, C. 2005. Screening of Cellulolytic and solvent producing Clostridium from natural resources in Thailand 14th European Biomass Conference&Exhibition Biomass for Energy Industry and Climate protection. 17-21 October 2005. Paris, France. p 1740-1741.

Virunanon, C., Soucaille, P., Chulalaksananukul, W. 2005. *In silico* and *In vitro* Cel48A engineer in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. 10th Biological Science Graduate Congress, National University of Singapore, November 30 – December 2.

Chokchaichamnankit, P., Chulalaksananukul, W., and Anamthawat-Jónsson K., Molecular and cytogenetic analysis of Fagaceae from northern Thailand. 8th International Congress of Plant Molecular Biology (ISPMB), Adelaide, Australia, August 20-25, 2006.

Virunanon, C., Chulalaksananukul, W., Soucaille, P. 2006. *In silico* and *In vitro* Cel48A engineer in *Clostridium acetobutylicum*ATCC824. Clostridium IX, Rice University, Houston, USA, May18-21.

Virunanon, C., Croux, C., Sabathe, F., Lopez, F., Girbal, L., Soucaille, P. and Chulalaksananukul, W. 2007. Two major cellulases of the *Clostridium acetobutylicum* cellulosome are active on crystalline cellulose. 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 75: Oral presentation

Piamtongkam, R. and Chulalaksananukul, W. 2007. Biodiesel production from triolein and methanol catalyzed by immobilized lipases. 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 92: Oral presentation

Suwannarangsee, S., Moulis, C., Remaud-Simeon, M., and Chulalaksananukul, W. 2007. Engineering of new affinity tag for protein purification onto dextran supports (Sephacryl® S300HR). 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 113: Oral presentation (first prize oral presentation)

Poolsup, S. and Chulalaksananukul, W. 2008. Comparation of ethanol production from five weed species in Thailand by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis stipitis*, The 16th Annual Academic Meeting of the Faculty of Science. March 13-14, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, 7.

Wongwatanapaiboon, J. and Chulalaksananukul, W. 2008. Cellulosic ethanol production from grasses in Thailand by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*, The 16th Annual Academic Meeting of the Faculty of Science. March 13-14, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, 6.

Wongwatanapaiboon, J., Kangvansaichol, K., Burapatana, V. and Chulalaksananukul, W. 2008. Analysis of grasses in Thailand for bioethanol production, 4th Naresuan Research Conference. July 28-29, Phitsanulok, Thailand, 261.

P.Rattanapoltee, W.Chulalaksananukul, S.Jinsiriwanit, P.Kaewkannetra (2008) Heterotropic growth of hlorella vulgaris TISTR 8580 for increasing of storage microalgal oil. In The 2nd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (STGMS), 2-3 October 2008, Hanoi Agricultural University, Gialam, Hanoi, Vietnam.

P.Rattanapoltee, W.Chulalaksananukul, A.E. James, P.Kaewkannatre (2008) Comparison of Autotrophic and Heterotrophic cultivations of microalgae as a raw material for biodiesel production, In The 13th International Biotechnology Symposium (IBS 2008) on Biotechnology for the Sustainability of Human Society, 12-17 October 2008, Dalian, China.

Chulalaksananukul, W., Virunanon, C., Soucaille, P. 2005. Screening of Cellulolytic and Solvent Producing Clostridia from Natural Resources in Thailand. Biomass Conference Program and Abstract. Paris, France

Marie Demuez, Olivier Guerrini Sophie Mondeil, Chompunuch Virunanon, Florence Saint-Prix, Christian Croux, Philippe Soucaille et Laurence Girbal. *Clostridium acetobutylicum* : une usine à biohydrogène. Posters Résumés – MicrobioToul 2006 – 11 Avril.

Virunanon, C. Croux, C., Soucaille, P., Chulalaksananukul, W. 2007. Optimization of 2, 2-Bicinchoninic acid methods for reducing-sugar detection in anaerobic cellulase activity assay. International Conference on New Horizons in Biotechnology (NHBT-2007), NIST, Trivandrum, India, November 26-29.

Chompunuch Virunanon, Christian Croux, Philippe Soucaille, and Warawut Chulalaksananukul. 2008. Gene-disruption process for cellulosome modification in *C. acetobutylicum* ATCC824. Biotechnology of Lignocellulose Degradation, Biomass Utilization and Biorefinery, Shima Spain Mura, Shima-Isobe, Japan, September 1-5.

Chompunuch Virunanon, Chanika Ouephanit, Vorakan Burapatana, and Warawut Chulalaksananukul. 2009. Biobutanol production from pineapple waste in

Thailand. Abstarct in JSPS-NRCT Summer School: Biomass Energy in Asia, Bangkok, Thailand, February 21-23.

8. รางวัลที่เคยได้รับ (ด้านวิชาการโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกี่ยวกับงานวิจัย)

ปี 2527 กุญแจทองผลการเรียนสูงสุดระดับปริญญาโทในสาขาพฤกษศาสตร์จากมูลนิธิแถบ นีละนิธิ

ปี 2537 ผลการสอบวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาเอกเกียรตินิยมอันดับหนึ่ง (ประเทศฝรั่งเศส)

ปี 2544 นักวิจัยเงินรางวัลกองทุนศาสตราจารย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี 2551 รางวัลชนะเลิศอันดับ1 การแข่งขันเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ (The Science Forum 2008) ครั้งที่

16 ประจำปี 2551 ประเภทบรรยาย Symposium: PTT Research Session ระหว่างวันที่ 13-14 มีนาคม 2551 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปี 2552 รางวัลชนะเลิศอันดับ1 การแข่งขันเสนอผลงานในการประชุมวิชาการ (The Science Forum 2008) ครั้งที่

17 ประจำปี 2552 ประเภทบรรยาย Symposium: PTT Research Session ระหว่างวันที่ 13-14 มีนาคม 2552 คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติบุคคล

2. ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ชมภูนุช วิรุณานนท์

(ภาษาอังกฤษ) Chompunuch Virunanon

เพศหญิง วันเดือนปีเกิด 12 กันยายน 2523

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ดร.

สถานที่ติดต่อ (ที่ทำงาน) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์/โทรสาร 02-218-5482

E-mail – address knutz2@hotmail.com

ที่อยู่ (ที่บ้าน) 295/51 ม. 9 ต. บางกระสอ อ. เมือง จ. นนทบุรี 11000

โทรศัพท์/โทรสาร 02-580-3396

เงินเดือนปัจจุบัน 21,440 บาท

ประวัติการศึกษา (ปริญญาตรี – เอก; สาขา และสถาบัน)

ปริญญา	วันเดือนปีที่จบ	มหาวิทยาลัย	สาขาวิชา
ปริญญาตรี*	2545	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	พันธุศาสตร์
ปริญญาโท	-	-	-
ปริญญาเอก	2551	จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตรชีวภาพ

*เกียรตินิยมอันดับ 2

ผลงานวิจัย

ก. ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ

Virunanon, C., Chantaroopamai, S., Dendoungbaripant, J., and Chulalaksananukul, W. 2008. Solventogenic-cellulolytic Clostridia from 4-step-screening process in Agricultural Waste and Cow Intestinal Tract. Anaerobe.14: 109-117.

Chompunuch Virunanon, Christian Croux, Philippe Soucaille, and Warawut Chulalaksananukul. 2008. Gene-disruption process for cellulosome modification in *C. acetobutylicum* ATCC824. MIE Bioforum 2008 proceeding.

Chompunuch Virunanon, Christian Croux, Philippe Soucaille, and Warawut Chulalaksananukul. 2008. Improved *C. acetobutylicum* Family48 Cellulase Activity by Chimera Protein Expressed in *E. coli*. MIE Bioforum 2008 proceeding.

ชมภูนุช วิรุณานนท์ และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2009. เซลลูโลโซม: กุญแจสำคัญสู่การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.* ปีที่ 25 ฉบับที่ 2.

Monnat Theerachat, **Chompunuch Virunanon**, Jittra Piapukiew, Suphang Chulalaksananukul, Nussara Sinbuathong, and Warawut Chulalaksananukul. *Nir*K and *nir*S Nitrite Reductase Genes of non-agricultural forest soil in Thailand. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. (accepted/in press) มี impact factor 1.082

Chompunuch Virunanon, Chanika Ouephanit, Vorakan Burapatana, and Warawut Chulalaksananukul. Bioethanol Production from Starch Industrial Waste in Thailand. *Journal of cleaner production*. (revised) มี impact factor 1.798

ชมภูนุช วิรุณานนท์ และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2010. ชีวสารสนเทศ: ประโยชน์ในงานวิจัยทางชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา*. 15(2), 99-106.

Chompunuch Virunanon, Chanika Ouephanit, Warawut Chulalaksananukul. Internatinal review article "Butanol, Properties, Engineering and Applications" ในหนังสือ "Chemistry research update" สำนักพิมพ์ Nova publisher, NY, USA.

Chanika Ouephanit, **Chompunuch Virunanon**, Vorakan Burapatana, and Warawut Chulalaksananukul*. 2011. Butanol and ethanol production from tapioca starch wastewater by *Clostridium* sp. Water Science and Technology. (accepted) มี impact factor 1.056

ชมภูนุช วิรุณานนท์ จิราพร พวงแก้ว และ วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล. 2011. ดีไนตริไฟอิ้งแบคทีเรียและบทบาทในการแก้ปัญหามลภาวะในสภาวะแวดล้อม. *วารสารเกษตร.* ปีที่ 27. ฉบับที่ 3 ตุลาคม 2554.

Chompunuch Virunanon, Chanika Ouephanit, Vorakan Burapatana, and Warawut Chulalaksananukul*. Bioethanol Production from Starch Industrial Waste in Thailand. *Journal of Cleaner Production*. (revised)

<u>การประชุมวิชาการนานาชาติ</u>

Virunanon, C., Soucaille, P., Chulalaksananukul, W. 2005. *In silico* and *In vitro* Cel48A engineer in *Clostridium acetobutylicum*ATCC824. 10th Biological Science Graduate Congress, National University of Singapore, November 30 – December 2.

Chulalaksananukul, W., **Virunanon, C.**, Soucaille, P. 2005. Screening of Cellulolytic and Solvent Producing Clostridia from Natural Resources in Thailand. Biomass Conference Program and Abstract. Paris, France

Virunanon, C., Chulalaksananukul, W., Soucaille, P. 2006. *In silico* and *In vitro* Cel48A engineer in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. Clostridium IX, Rice University, Houston, USA, May18-21.

Marie Demuez, Olivier Guerrini Sophie Mondeil, **Chompunuch Virunanon**, Florence Saint-Prix, Christian Croux, Philippe Soucaille et Laurence Girbal. *Clostridium acetobutylicum* : une usine à biohydrogène. Posters Résumés – MicrobioToul 2006 – 11 Avril.

Virunanon, C. Croux, C., Soucaille, P., Chulalaksananukul, W. 2007. Optimization of 2, 2-Bicinchoninic acid methods for reducing-sugar detection in anaerobic cellulase activity assay. International Conference on New Horizons in Biotechnology (NHBT-2007), NIST, Trivandrum, India, November 26-29.

Chompunuch Virunanon, Christian Croux, Fabrice Sabathé, Frédéric Lopez, Laurence Girbal' Philippe Soucaille, and Chulalaksananukul, W. 2007. Two of the three major cellulases of the cellulosome of *Clostridium acetobutylicum* are active on crystalline cellulose. 12th

Biological Sciences Graduate Congress (BSGC) “Science Empowering Life”, University of Malaya, Malaysia, December 17-19.

Chompunuch Virunanon, Christian Croux, Philippe Soucaille, and Warawut Chulalaksananukul. 2008. Gene-disruption process for cellulosome modification in *C. acetobutylicum* ATCC824. Biotechnology of Lignocellulose Degradation, Biomass Utilization and Biorefinery, Shima Spain Mura, Shima-Isobe, Japan, September 1-5.

Chompunuch Virunanon, Chanika Ouephanit, Vorakan Burapatana, and Warawut Chulalaksananukul. 2009. Biobutanol production from pineapple waste in Thailand. Abstarct in JSPS-NRCT Summer School: Biomass Energy in Asia, Bangkok, Thailand, February 21-23.

Chompunuch Virunanon, Warawut Chulalaksananukul, and Philippe Soucaille. 2010. Nucleotide sequence and structure of CelC-Lic-16 homologous, a β(1,3)-glucan hydrolase from marine algae isolated *Clostridium* sp. L2-50. International proceeding ในการประชุมวิชาการ International Conference on Biotechnology for Healthy Living.

Chanika Ouephanit, **Chompunuch Virunanon**, Vorakan Burapatana, Warawut Chulalaksananukul. 2009. Butanol and Ethanol Production from Tapioca-starch Waste Water by Clostridia strains from 16SrDNA identification in Thailand. Genetics for National Energy Crisis 2009 Proceeding.

Chanika Ouephanit, **Chompunuch Virunanon**, Warawut Chulalaksananukul. 2010. Facter effecting butanol production of *Clostridium* sp. National proceeding ในการประชุมวิชาการ Thailand research symposium 2010.

Phanthipa Songsermpanit, **Chompunuch Virunanon**, Vorakan Burapatana and Warawut Chulalaksananukul. 2010. Anaerobic bacteria from cow dung for biofuels applications. International proceeding ในการประชุมวิชาการ International Conference on Biotechnology for Healthy Living.

Chanika Ouephanit, **Chompunuch Virunanon**,Vorakan Burapatana, Warawut Chulalaksananukul. 2010. Biobutanol production from tapioca starch wastewater by

Clostridium sp. International proceeding ในการประชุมวิชาการ International Conference on Biotechnology for Healthy Living.

Panida Suriyapan, **Chompunuch Virunanon**, Supahng Chulalaksananukul, and Warawut Chulalaksananukul. 2011. Screening of Themotolerant Xylose-Utilizing Yeasts for Ethanol Production. Kasetsart University graduate conference.

Chompunuch Virunanon, Chanika Ouephanit, Vorakan Burapatana, and Warawut Chulalaksananukul. 2011. Bio-ethanol Production from Starch Industrial Waste in Thailand. The 8th Asia Pacific Conference on Sustainable Energy and Environmental Technologies (APCSEET 2011). Adelaide, Australia, July 10-13. Pp. 102.

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย นางสาว นาง ยศ
   ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr., Miss, Mrs., Rank
2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน
3. ตำแหน่งปัจจุบัน
4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก พร้อมหมายเลขโทรศัพท์ โทรสาร และไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (e-mail)
5. ประวัติการศึกษา
6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ
7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละผลงานวิจัย
   - 3.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : ชื่อแผนงานวิจัย
   - 3.2 หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย
   - 3.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว : ชื่อผลงานวิจัย ปีที่พิมพ์ การเผยแพร่ และแหล่งทุน (อาจมากกว่า 1 เรื่อง)
   - 3.4 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

<u>หมายเหตุ</u> : 1. กรณีที่หน่วยงานมิได้ทำการวิจัยเองแต่ใช้วิธีจัดจ้าง โปรดใช้ **แบบ ว–1ด** โดยระบุรายละเอียดตามแบบฟอร์มที่กำหนดไว้ให้มากที่สุด พร้อมทั้งแนบแบบข้อกำหนด (terms of reference - TOR) การจัดจ้างทำการวิจัยด้วย

2. กรณีเป็นโครงการวิจัยต่อเนื่องที่ได้รับการจัดสรรงบประมาณในปีงบประมาณที่ผ่านมา และนักวิจัยมีความประสงค์จะเสนอของบประมาณการวิจัยในปีงบประมาณต่อไป ต้องจัดทำโครงการวิจัยประกอบการเสนอของบประมาณด้วย
3. ระบุข้อมูลโดยละเอียดในแต่ละหัวข้ออย่างถูกต้องและครบถ้วนสมบูรณ์ เพื่อประโยชน์ในการประเมินผล
4. กรณีโครงการวิจัยที่มีการใช้สัตว์ ให้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ สภาวิจัยแห่งชาติ (ผนวก 11) และจัดทำเอกสารแนบตามแบบฟอร์มใบรับรองในผนวก 12 จำนวน 1 ชุด
5. กรณีโครงการวิจัยที่มีการทำวิจัยในคนให้ปฏิบัติตามจริยธรรมการวิจัยในคน (ผนวก 13) และจัดทำเอกสารแนบตามแบบฟอร์มใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยหรือ Certiftcate of Approval ที่ออกโดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยของสถาบัน (ผนวก 14) จำนวน 1 ชุด
6. กรณีโครงการวิจัยที่มีการดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพให้ปฏิบัติตามแนวทางปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับการดำเนินงานด้านเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่หรือพันธุวิศวกรรม (ผนวก 15) และจัดทำเอกสารแนบตามแบบฟอร์มใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการวิจัยด้านความปลอดภัยทางชีวภาพ ที่ออกโดยคณะกรรมการด้านความปลอดภัยทางชีวภาพของสถาบัน (ผนวก 16) จำนวน 1 ชุด