รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

เซลลูโลสิกเพื่อการย่อยสลายเซลลูโลส: ปีที่ 3 การนำไปใช้ประโยชน์ทางเกษตร

Cellulosic for cellulose degradation: year 3 Agricultural application

รองศาสตราจารย์ ดร. วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล
อาจารย์ ดร. ชมภูนุช วิรุณานนท์
ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

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 2555 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ หน่วยบัญชาการทหารพัฒนา และ การไฟฟ้าฝ่ายผลิต ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ และขอขอบคุณภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

ยีสต์ถูกนำไปใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วซึ่งกระบวนการในการผลิตเอทานอลยังคงมีต้นทุนในการผลิตสูงและสิ้นเปลืองพลังงานเพราะต้องทำการหล่อเย็นในถังหมักในกระบวนการผลิตตลอดเวลา ดังนั้นยีสต์ที่มีคุณสมบัติที่สามารถเติบโตได้ดีในอุณหภูมิสูงจะทำให้ลดต้นทุนการใช้พลังงานในระบบหล่อเย็นของถังหมักในกระบวนการผลิตลงได้ งานวิจัยได้นำยีสต์ที่ได้รับการคัดกรองมาแล้วในโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ ยีสต์ทนร้อนสามารถใช้ไซโลสในการผลิตเอทานอลได้โดยใช้อาหาร 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 ยีสต์ทั้งหมด 5 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลในอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ได้แก่ WKA3-36, SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2 และ SKN2-3 ซึ่งยีสต์ที่คัดได้ถูกจัดจำแนกโดยการใช้ลักษณะสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี วิธีดังกล่าวไม่สามารถบ่งชี้ในระดับสปีชีส์ได้อย่างชัดเจน

คำสำคัญ: จุลินทรีย์เซลลูโลลิก 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. Yeast used in this project isolated in five isolates which able to produce ethanol above 40 °C are WKA3-36, SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2 and SKN2-3 all of them classified by Morphology, Physiology and Biochemistry. However this method cannot identify in species level.

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

สารบัญเรื่อง

	หน้า
ิกิกรรมประกาศ	ก
คัดย่อภาษาไทย	ข
คัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
บัญเรื่อง	ง
บัญตาราง	จ
บัญภาพ	ฉ
นำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	1
ำเนินการศึกษา	3
ารศึกษา	8
ปและวิจารณ์ผล	20
สารอ้างอิง	22
ะวัตินักวิจัยและคณะ	24

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	จำนวนยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสได้ที่อุณหภูมิต่างๆ	10
ตารางที่ 2	ปริมาณเอทานอลที่ยีสต์ทนร้อนผลิตได้	13
ตารางที่ 3	ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีของโคโลนีทั้ง 5 ไอโซเลท	17
ตารางที่ 4	การส่องเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์ เชื้อจากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 10 g/l	18
ตารางที่ 5	ปริมาณน้ำตาลที่เชื้อใช้ไป (g/L) โดยน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 10 g/L	19
ตารางที่ 6	ปริมาณเอทานอล (g/L) ที่ผลิตในแต่ละไอโซเลทในน้ำตาล 10 g/L	19

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ	8
ภาพที่ 2	ลักษณะของยีสต์ทั้ง 20 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายที่เก็บจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี	10
ภาพที่ 3	ลักษณะของยีสต์ทั้ง 28 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี	11
ภาพที่ 4	ลักษณะของยีสต์ทั้ง 20 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บจากโรงงานน้ำตาลครบุรี จังหวัดนครราชสีมา	11
ภาพที่ 5	ลักษณะของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างน้ำข้างฟ่างหวานที่เก็บจากไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา	12
ภาพที่ 6	การเจริญของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวไซโลส	12
ภาพที่ 7	ลักษณะของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1	14
ภาพที่ 8	อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1	15
ภาพที่ 9	ความสามารถในการเจริญเติบโตของยีสต์แต่ละไอโซเลท	16

เซลลูโลสิกเพื่อการย่อยสลายเซลลูโลส: ปีที่ 3 การนาไปใช้ประโยชน์ทางเกษตร

Cellulosic for cellulose degradation: year 3 Agricultural application

วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกูล และ ชมภูนุช วิรุณานนท์

Warawut Chulalaksananukul and Chompunuch Virunanon

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 ในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงปฏิกิริยาเกิดขึ้นรุนแรงและเป็นการย่อยที่ไม่เฉพาะเจาะจงเกิดผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ 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

ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซโลสในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอำเภอไทรโยคจังหวัดกาญจนบุรี

วิธีดำเนินการวิจัย

การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการย่อยสลายไซโลส

1. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างทราย ตัวอย่างดิน และตัวอย่างวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร จากจังหวัดชลบุรี กาญจนบุรี และนครราชสีมา ตามลำดับ จำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง โดยเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกที่สะอาด ดังนี้

1. ตัวอย่างทรายจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่างจากชายหาดของเกาะซึ่งขุดลึกลงไป 10 เซนติเมตรในบริเวณที่ต่างกัน 8 จุด
2. ตัวอย่างดินจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี ทำการเก็บตัวอย่างดินซึ่งขุดลึกลงไป 10 เซนติเมตรในบริเวณที่ต่างกัน 3 จุด
3. กากอ้อยจากโรงงานน้ำตาลครบุรี จังหวัดนครราชสีมา โดยทำการเก็บตัวอย่างจากกองกากอ้อยที่เหลือจากการหีบน้ำออกและเก็บไว้เป็น เวลานานไม่เกิน 3 เดือน ทำการเก็บตัวอย่างดินซึ่งขุดลึกลงไป 10 เซนติเมตรจำนวนทั้งสิ้น 3 ตัวอย่าง
4. น้ำข้าวฟ่างหวานสายพันธุ์ KKU40 จากศูนย์วิจัยข้าวโพดและข้าวฟ่างแห่งชาติ (ไร่สุวรรณ) จังหวัดนครราชสีมา โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างคั้นสด

เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4°C ทั้งนี้เพื่อรักษาคุณภาพของตัวอย่าง

2. คัดกรองยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล

2.1 คัดกรองยีสต์ทั้งหมด

คัดกรองยีสต์โดยชั่งตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมา 10 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ทำ serial dilutions จากนั้นปิเปตความเจือจางที่เหมาะสมมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยทั่วผิวหน้าอาหาร yeast extract-malt extract (YM) agar (Laplace และคณะ, 1993) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร มาเขี่ยบนอาหารชนิดเดิม เพื่อแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

2.2 คัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล

2.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) สำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (starter culture)

นำยีสต์ที่คัดกรองได้จากข้อ 2.1 เลี้ยงใน YM medium นำไปบ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์โดยมวล/ปริมาตร นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4

2.2.2 การคัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลส

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 2.2.1ความเข้มข้น 5% ลงในอาหารไซโลส (xylose medium) บ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อวัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2.2.3 คัดกรองยีสต์ทนร้อน

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 2.2.1ความเข้มข้น5% ลงในอาหารไซโลสนำไปบ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35, 40, 45, 50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อวัดการเจริญเติบโต ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

3. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน

ใช้อาหารไซโลสซึ่งปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารให้เท่ากับ 5.5 ในการทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน โดยถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 2.2.1ความเข้มข้น 5% ลงในอาหารไซโลส นำไปบ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาทีอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเพื่อนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS)(Miller*et al*., 1959) และตรวจหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas chromatography) รุ่น GC-2010A (Shimadzu, Japan)

4. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ทนร้อน

ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากข้อ 2.2.1 ความเข้มข้น 5% ลงในอาหารไซโลสนำไปบ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35, 40, 45,50 และ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเมื่อครบเวลาเก็บตัวอย่างที่ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เพื่อวัดการเจริญเติบโต ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

5. ศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphology) และสรีรวิทยา (Physiology) ของ SKN1-2 SKN2-1 SKN2-2 SKN2-3 WKA3-36 และทดสอบความสามารถในการใช้อาหารจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

5.1 การเลี้ยงยีสต์

ทำการถ่ายยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลต จาก Stock culture ลงในอาหาร Yeast extract-malt extract (YM) medium (Laplace *et al.*, 1993) ที่มีน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไอโซเลท WKA3-36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่ม SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2, SKN2-3 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที วัดการเจริญเติบโตด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 10 เพื่อเตรียมสกัดดีเอ็นเอ และเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลทลงบน YM agar ที่มีน้ำตาลไซโลส YM agar ที่มีน้ำตาลกลูโคส และ YM agar ที่มีน้ำตาลอะราบิโนส บ่มไอโซเลต WKA3-36 ที่เขี่ยลงบนน้ำตาลทั้ง 3 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่ม SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2, SKN2-3 ที่เขี่ยลงบนน้ำตาลทั้ง 3 ชนิดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อดูสัณฐานวิทยา

5.2 การศึกษาสัณฐานวิทยา

นำยีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร YM agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มาศึกษาลักษณะโคโลนี โดยดูจากรูปร่าง การยกตัว ผิวหน้า ขอบ สี และการส่องเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะเซลล์

5.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiology) ในการใช้แหล่งคาร์บอนของแต่ละไอโซเลท

เขี่ยโคโลนีขนาดใกล้เคียงกันจาก YM agar จากข้อ 1.ลงใน YM medium ที่มีน้ำตาลไซโลส YM medium ที่มีน้ำตาลกลูโคส และ YM medium ที่มีน้ำตาลอะราบิโนส นำบ่มไอโซเลท WKA3-36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่ม SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2, SKN2-3 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บเชื้อที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเพื่อนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) และตรวจหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี (Gas chromatography)

5.4 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 5.3 มาวัดปริมาตรน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดโดยวิธี DNS method (ดัดแปลงมาจาก Miller, 1959) นำตัวอย่างที่ต้องการหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มาปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Eppendrof's tube ขนาด 1500 ไมโครลิตร เติมสารละลาย DNS reagent ที่ใช้สำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาตร 450 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน สำหรับแบลงค์ คือ ใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง จากนั้นปิดฝา นำไปบ่มในอ่างน้ำแบบควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่มีอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำมาวางบนน้ำแข็งเพื่อหยุดปฏิกิริยา เจือจางสารโดยดูดสารขึ้นมา 50 ไมโครลิตร ใส่ในไมโครเพลท และเติมน้ำกลั่น 200 ไมโครลิตร ดูดขึ้นลงให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลทเปรียบเทียบค่าที่ได้กับกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลไซโลส กลูโคสและอะราบิโนส ที่มีความเข้มข้นในช่วง 0-12 กรัมต่อลิตร

5.5 การวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตของเอทานอลที่เกิดขึ้น

เก็บส่วนใสที่ได้จากข้อ 5.3 มาปริมาตร 700 ไมโครลิตรเพื่อนำมาทำกรวิเคราะห์หาปริมาณผลผลิตของเอทานอลที่เกิดขึ้นจากการหมักด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC-2010A Shimadzu, Japan) ด้วยคอลัมน์ DB-WAX (Agilent Technologies, USA) อุณหภูมิคอลัมน์ หัวฉีด (Injection) และตัวตรวจจับ (Detector) เท่ากับ 45, 250 และ 260 องศาเซลเซียล ตามลำดับ และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวนำ (Carrier gas) ผลผลิตมวลรวมของผลิตภัณฑ์คำนวณออกมาเป็นกรัมต่อลิตร

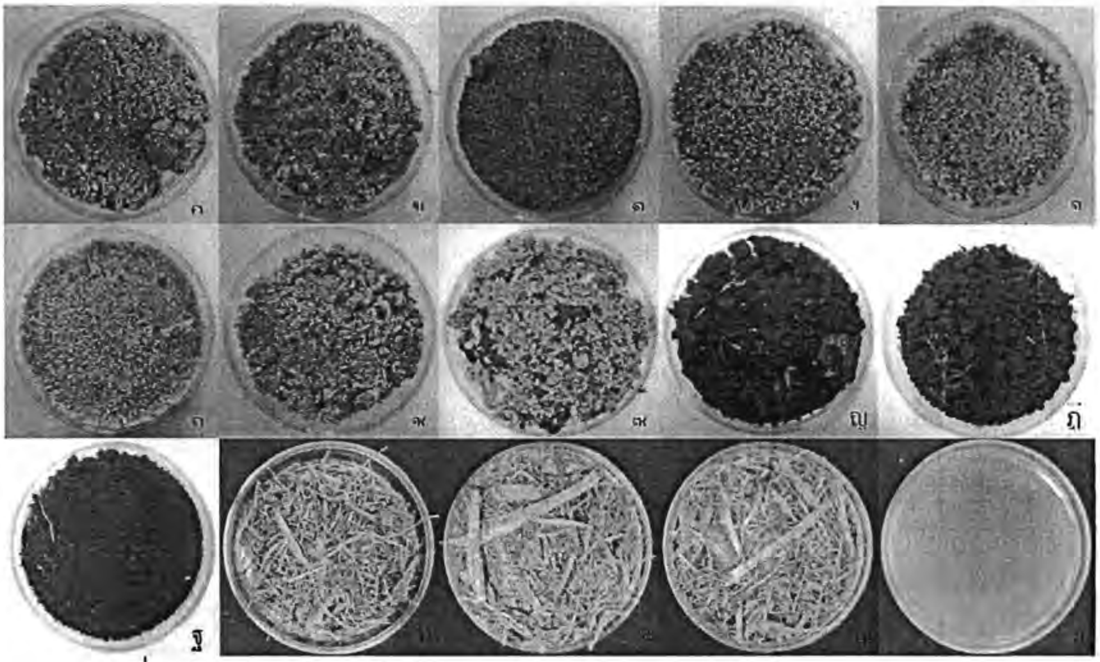
6. การเก็บรักษาเชื้อ

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

ผลการศึกษา

1. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

ทำการเก็บตัวอย่างจากบริเวณต่างๆ จำนวนทั้งสิ้น 16 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บตัวอย่างทรายจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี จำนวน 8 ตัวอย่าง ตัวอย่างดินจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 3 ตัวอย่าง ตัวอย่างกากอ้อยจาก โรงงานน้ำตาลครบุรี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 3 ตัวอย่าง และตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานจากไร่สุวรรณ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 1 ตัวอย่าง โดยลักษณะของตัวอย่างแต่ละชนิดแสดงดังภาพที่ 1



ภาพที่ 1 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆ

ก-ซ : ตัวอย่างทรายที่เก็บจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี

ญ-ฐ : ตัวอย่างดินที่เก็บมาจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

ฑ-ณ : ตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บมาจากโรงงานน้ำตาลครบุรี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

ด : ตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างที่เก็บมาจากไร่สุวรรณ อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา

ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัยนี้ จะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการคัดกรองยีสต์ต่อไป

2. การคัดกรองยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล

การคัดกรองยีตส์ทนร้อนจากตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารไซโลส สามารถคัดกรองยีสต์ได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลท โดยจำนวนของยีสต์ที่คัดกรองได้ทั้งหมดแสดงดังตารางที่ 1 ซึ่งลักษณะของยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายจากเกาะแสมสาร ตัวอย่างดินจากเขาวังเขมร ตัวอย่างกากอ้อยจากโรงงาน้ำตาลครบุรี และตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานแสดงดังรูปที่ 2, 3, 4 และ 5 ตามลำดับ จากตัวอย่างยีสต์ที่คัดกรองได้สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ทั้งหมด 49 ไอโซเลท ลักษณะการเจริญของยีสต์ในเอาหารไซโลส แสดงดังภาพที่ 6 และเมื่อทำการทดลองเพื่อคัดกรองยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง พบว่ามียีสต์ทั้งหมด 27 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทราย 7 ไอโซเลท และเป็นยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างกากอ้อย 20 ตัวอย่าง เมื่อทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส มียีสต์เจริญได้ 13 และ 9 ไอโซเลท ตามลำดับ

ตารางที่ 1 จำนวนยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสได้ที่อุณหภูมิต่างๆ

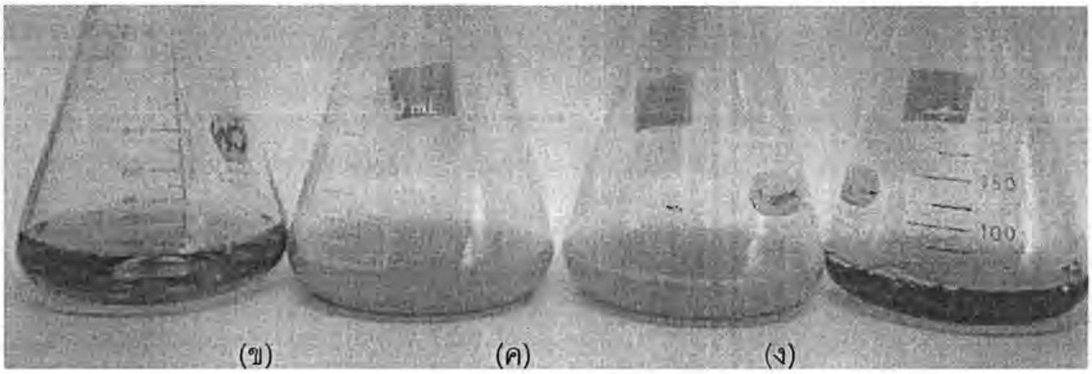
แหล่งที่มา	จำนวนยีสต์ทั้งหมด	ยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลส	อุณหภูมิ				
			30° C	37° C	40° C	45° C	50° C
เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี	20	18	18	7	7	0	0
เขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี	28	13	13	6	0	0	0
โรงงานน้ำตาลครบุรี จังหวัดนครราชสีมา	20	12	20	20	20	13	9
ไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา	5	2	5	3	0	0	0
รวม	73	45	56	36	27	13	9

ภาพที่ 2 ลักษณะของยีสต์ทั้ง 20 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายที่เก็บจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี

ภาพที่ 3 ลักษณะของยีสต์ทั้ง 28 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างดินที่เก็บจากเขาวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี

ภาพที่ 4 ลักษณะของยีสต์ทั้ง 20 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บโรงงานน้ำตาล ครบุรี จังหวัดนครราชสีมา

ภาพที่ 5 ลักษณะของยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทที่คัดกรองได้จากตัวอย่างน้ำข้างฟ้างหวานที่เก็บจากไร่สุวรรณ จังหวัดนครราชสีมา

(ก) 

ภาพที่ 6 การเจริญของเชื้อที่เจริญในอาหารเหลวไซโลส

(ก) : ชุดควบคุม

(ข) : ตัวควบคุมบวก (Positive control)

(ค) : ตัวอย่าง

(ง) : ตัวควบคุมลบ (Negative control)

การคัดกรองยีสต์ทนร้อนจากตัวอย่างทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบว่า ยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายและตัวอย่างกากอ้อยสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง เนื่องจากอุณหภูมิของตัวอย่างเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ยีสต์มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง ตัวอย่างทรายที่ความลึก 10 เซนติเมตรจะมี

อุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25-34 องศาเซลเซียส ตัวอย่างดินที่ความลึก 10 เซนติเมตรจะมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 25-35 องศาเซลเซียส (ยุพาพร ทิพย์จริยาอุดม, 2547) ตัวอย่างกากอ้อยที่ความลึก 10 เซนติเมตรจะมีอุณหภูมิเฉลี่ยประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส และตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างหวานที่หีบใหม่จะมีอุณหภูมิเฉลี่ย 28-30 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับงานวิจัยของ อภิรดี ศรีภิรมย์รักษ์ (2549) ซึ่งทำการคัดกรองยีสต์ทนร้อนจากตัวอย่างหญ้าหมัก ตัวอย่างแป้งจากโรงงานอุตสาหกรรม และตัวอย่างจากบ่อน้ำพุร้อน สามารถคัดกรองยีสต์ทนร้อนได้ 1, 3 และ 9 ไอโซเลท ตามลำดับ

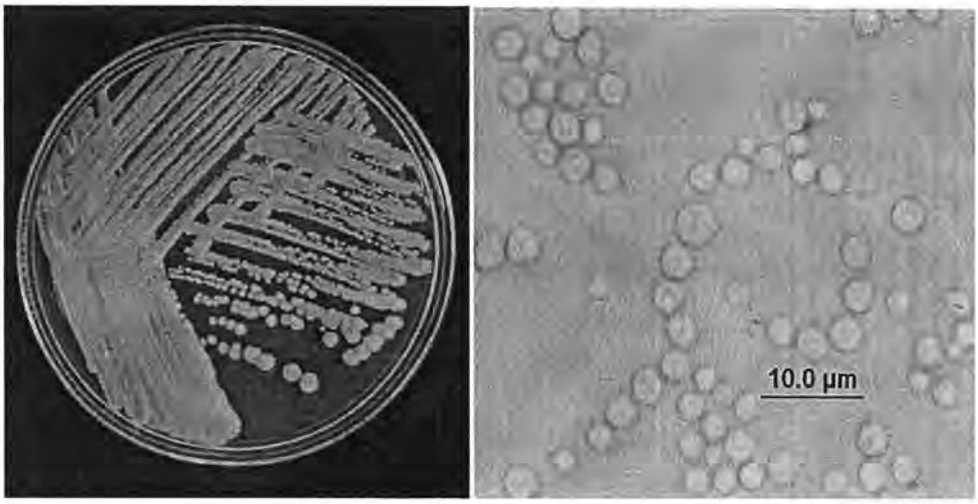
3. การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน

ยีสต์ทนร้อนที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาขึ้นไปถูกเลือกมาทดสอบ ความสามารถในการผลิตเอทานอล 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 4.2

ตารางที่ 2 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 ไอโซเลท เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างปริมาณเอทานอลเมื่อเทียบเป็นเปอร์เซ็นพบว่าไอโซเลท SKN 2-1 สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดจากแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลไซโลส 20 กรัมต่อลิตร ลักษณะของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 เป็นดังภาพที่ 3



(ก) (ข)

ภาพที่ 7 ลักษณะของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1

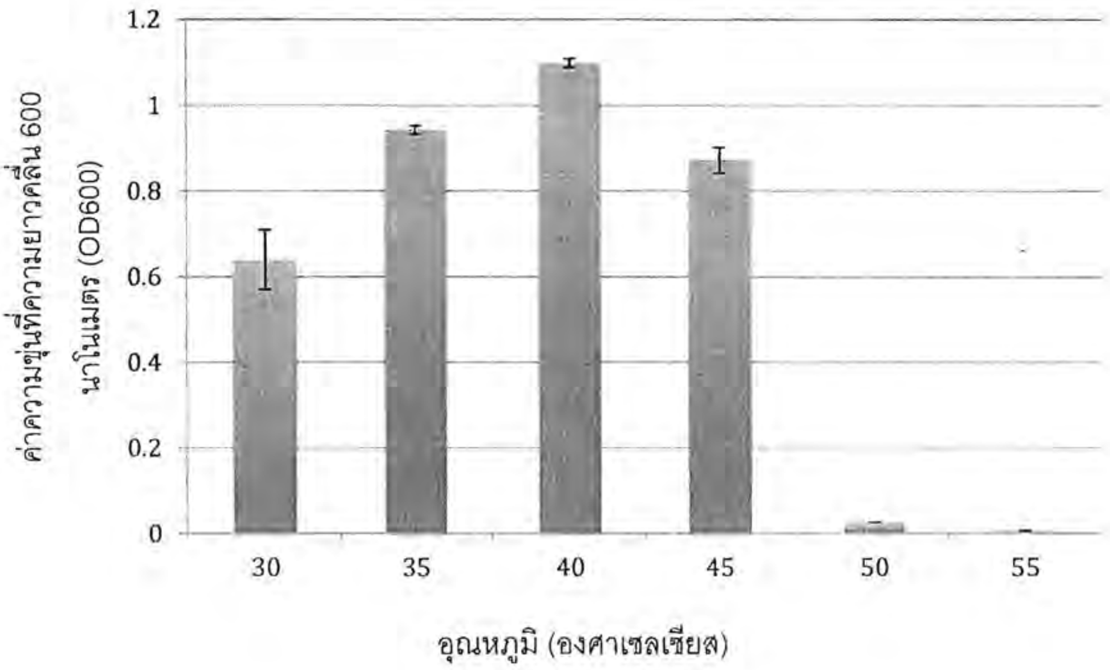
(ก) : บนผิวหน้าอาหารแข็ง YM

(ข) : ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า

4. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ทนร้อน

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ SKN 2-1 ทำการทดลองในช่วง อุณหภูมิระหว่าง 35 – 55 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.8 ผลการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่ยีสต์ทนมีการเจริญเติบโตมากที่สุด คือ อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสโดยดูจากค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และการเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อน จะลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เนื่องจากปัจจุบันการใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะใช้อุณหภูมิประมาณ 30-35 องศาเซลเซียส (Laluce และคณะ, 1987) ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของยีสต์ จึงทำให้ผลผลิตของเอทานอลได้มีปริมาณน้อย และการใช้ยีสต์ทนร้อนในอุตสาหกรรมการผลิต

เอทานอลนั้นจะส่งผลถึงต้นทุนการผลิตเนื่องจากกระบวนการผลิตเอทานอลในปัจจุบันจำเป็นต้องใช้กระบวนการหล่อเย็นเพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ ซึ่งค่าใช้จ่ายในกระบวนการหล่อเย็นมีต้นทุนสูง ดังนั้นการใช้ยีสต์ทนร้อนในกระบวนการผลิตสามารถลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการหล่อเย็นและกระบวนการกลั่นลงได้ (Sree และคณะ, 1999) จากการศึกษาของ Anderson และคณะ (1986) พบว่ายีสต์ทนร้อนสามารถเพิ่มผลผลิตของเอทานอลได้มากกว่า 6 เปอร์เซ็นที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 8 อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ซึ่งทำการทดลองในอาหารไซโลส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

5. ผลการศึกษาสัณฐานวิทยา (Morphology) และสรีรวิทยา (Physiology) ของWKA3-36 SKN1-2 SKN2-1 SKN2-2 SKN2-3 และทดสอบความสามารถในการใช้อาหารจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

5.1 ผลการเลี้ยงยีสต์

ยีสต์ไอโซเลท WKA3-36, SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2, SKN2-3 ที่ผ่านการคัดแยกและทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งปฏิกิริยาชีวภาพ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย มาถ่ายลงในอาหาร YMB ที่มีน้ำตาลไซโลส ความเข้มข้น 10 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มไอโซเลท WKA3-36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่ม SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2, SKN2-3 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที ให้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 10 เพื่อนำสกัดดีเอ็นเอต่อไป และเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลทลงบน YMA ที่มีน้ำตาลแตกต่างกัน 3 ชนิด คือ น้ำตาลไซโลส กลูโคส อะราบิโนส บ่มไอโซเลต WKA3-36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่ม SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2, SKN2-3 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 9)

ภาพที่ 9 ความสามารถในการเจริญเติบโตของยีสต์แต่ละไอโซเลท ได้แก่ WKA3-36, SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2, SKN2-3 (ซ้ายไปขวา) บนอาหารที่มีน้ำตาลไซโลส (แถวบน) น้ำตาลกลูโคส (แถวกลาง) น้ำตาลอะราบิโนส (แถวล่าง)

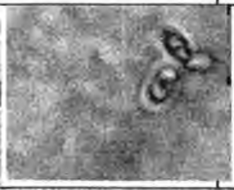
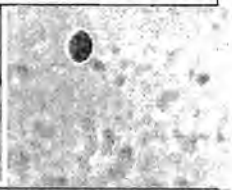
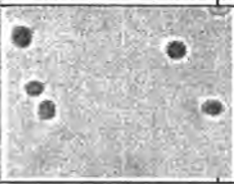
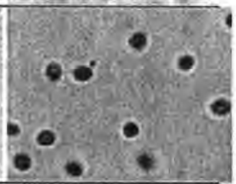
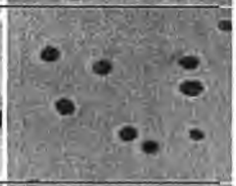
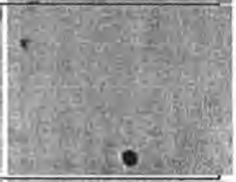
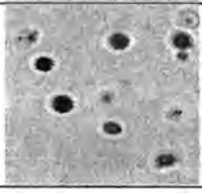
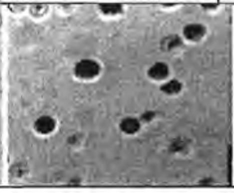
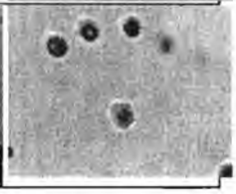
5.2 ผลการศึกษาสัณฐานวิทยา

นำยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลท มาศึกษาลักษณะโคโลนีโดยดูจาก รูปร่าง การยกตัว ผิวหน้า ขอบ สี (ตารางที่ 3) และการส่องเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะเซลล์ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 3 ลักษณะรูปร่าง ระดับความนูน ผิวหน้า ขอบ สีของโคโลนีทั้ง 5 ไอโซเลท

ไอโซเลท	ลักษณะสัณฐานวิทยา				
	รูปร่าง (Form)	การยกตัว (Elevation)	ผิวหน้า (Surface)	ขอบ (Margin)	สี
WKA3-36	round	convex	smooth	entire	white
SKN1-2	round	convex	smooth	entire	white
SKN2-1	round	convex	smooth	entire	white
SKN2-2	round	convex	smooth	entire	white
SKN2-3	round	convex	smooth	entire	white

ตารางที่ 4 การส่องเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์ เชื้อจากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 10 g/l

ไอโซเลท	น้ำตาล		
	ไซโลส	กลูโคส	อะราบิโนส
WKA3-36			
SKN1-2			
SKN2-1			
SKN2-2			
SKN2-3			

5.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiology) ในการใช้แหล่งคาร์บอนของแต่ละไอโซเลท

ยีสต์ทั้ง 5 ไอโซเลทเลี้ยงใน YMB ที่มีน้ำตาลแตกต่างกัน 3 น้ำตาลโดยบ่มไอโซเลท WKA3-36 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บ่ม SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2, SKN2-3 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เก็บเชื้อที่เวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ปริมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Microcentrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสวัดปริมาณน้ำตาลที่เหลือในด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) โดยเชื้อแต่ละไอโซเลทสามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้มากที่สุด (ตารางที่ 5) และวัดปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ด้วย

เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี เชื้อที่เลี้ยงในน้ำตาลกลูโคสสามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด (Gas chromatography) (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 5 ปริมาณน้ำตาลที่เชื้อใช้ไป (g/L) โดยน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 10 g/L

ไอโซเลท	น้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)								
	น้ำตาลไซโลส			น้ำตาลกลูโคส			น้ำตาลอะราบิโนส		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
WKA3-36	5.56	10	*	9.60	10	*	3	3.18	3.57
SKN1-2	6.71	9.63	10	6.47	9.07	9.47	3.45	3.04	3.10
SKN2-1	6.56	9.94	10	6.02	9.56	9.56	3.04	2.16	2.67
SKN2-2	6.46	10	*	6.12	9.84	9.79	2.96	4.16	2.67
SKN2-3	6.48	9.85	10	6.07	9.53	9.58	2.80	3.10	2.78

* น้ำตาลถูกใช้ไปหมด

จากการวัดปริมาณน้ำตาลที่เชื้อแต่ละไอโซเลทใช้ไป เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแต่ละไอโซเลต พบว่าไอโซเลท WKA3-36 สามารถใช้น้ำตาลไซโลสและกลูโคสได้ดีที่สุดคือ ใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาลไซโลสและกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร หมดในเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 ปริมาณเอทานอล (g/L) ที่ผลิตในแต่ละไอโซเลทในน้ำตาล 10 g/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ปริมาณเอทานอล (g/L)		
	น้ำตาลไซโลส	น้ำตาลกลูโคส	น้ำตาลอะราบิโนส
WKA3-36	0.777	3.957	ไม่พบกราฟเอทานอล
SKN1-2	0.397	1.32	ไม่พบกราฟเอทานอล
SKN2-1	0.400	3.016	ไม่พบกราฟเอทานอล
SKN2-2	0.488	3.363	ไม่พบกราฟเอทานอล
SKN2-3	0.376	1.951	ไม่พบกราฟเอทานอล

จากปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นของทั้ง 5 ไอโซเลต เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างปริมาณเอทานอล พบว่าไอโซเลต WKA3-36 สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุด และไม่พบกราฟของเอทานอลในเชื้อทุกไอโซเลทที่เลี้ยงในน้ำตาลอะราบิโนสแต่พบกราฟของกรดแอซิติกเกิดขึ้น

สรุปและวิจารณ์ผล

การคัดกรองยีสต์ทนร้อนที่สามารถใช้ไซโลสจากตัวอย่างทราย ตัวอย่างดิน ตัวอย่างกากอ้อย และตัวอย่างน้ำข้าวฟ่างจาก 3 จังหวัดในประเทศไทย จำนวนทั้งสิ้น 15 ตัวอย่าง สามารถคัดกรองยีสต์ทนร้อนได้ทั้งสิ้น 73 ไอโซเลท โดยมี 45 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ในอาหารไซโลส และ 27 ไอโซเลท เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นยีสต์ที่คัดกรองได้จากตัวอย่างทรายที่เก็บจากเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี 7 ไอโซเลท และคัดกรองได้จาดตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บจากโรงงานน้ำตาลครบุรี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา 20 ไอโซเลท นำทั้ง 27 ไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลในอาหารไซโลส พบว่า มี 7 ตัวอย่างที่สามารถใช้ไซโลสในกระบวนการหมักเอทานอลได้ โดยไอโซเลท SKN 2-1 ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกากอ้อย สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่น

การหาอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 ที่อุณหภูมิ 35, 37, 40, 45 แล 50 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ทนร้อนไอโซเลท SKN 2-1 เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

การศึกษาสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาในการใช้แหล่งคาร์บอนของ WKA3-36, SKN1-2, SKN2-1, SKN2-2, SKN2-3 ยังไม่สามารถแยกความแตกต่างของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลตได้ เนื่องจากลักษณะของโคโลนีของเชื้อทั้ง 5 ไอโซเลต มีลักษณะไม่แตกต่างกัน และการส่องเชื้อใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อดูลักษณะเซลล์ ไอโซเลต WKA3-36 มีความแตกต่างกับอีก 4 ไอโซเลต และผลสรีรวิทยาในการใช้แหล่งคาร์บอนของแต่ละไอโซเลต ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนนัก

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาแหล่งคัดกรองใหม่ๆที่มีความหลากหลายเพิ่มขึ้นเพื่อค้นหาเชื้อใหม่ๆที่สามารถและผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงๆ

2. ควรศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อให้เชื้อที่คัดกรองได้ผลิตเอทานอลได้เต็มประสิทธิภาพ

3. ควรศึกษาแหล่งที่จะนำมาใช้เป็นสารตั้งต้นที่เหมาะสมเพื่อให้การผลิตเกิดประสิทธิภาพสูงสุด

<u>เอกสารอ้างอิง</u>

1. ยุพาพร ทิพย์จริยาอุดม. 2547. <u>การวัดอุณหภูมิดิน</u>. วารสารการศึกษาวิทยาศาสตร์ คณิตศาสตร์และเทคโนโลยี, หน้า 23-26.

2. อภิรดี ศรีภิรมย์รักษ์. 2549. <u>การคัดแยกและแสดงลักษณะเฉพาะของยีสต์ทนร้อนเพื่อผลิตเอทานอล</u>. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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. <u>Journal of Applied and Environmental Microbiology</u>. 51(6): 1314-1320.

4. 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.

5. 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. <u>Process Biochemistry</u> 40: 3519-3525.

6. 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. <u>Annals of Microbiology</u> 37: 151-159.

7. Laplace, J. M., Delgenes, J. P., Molettal, R., and Navarro, J. M. 1993. Cofermentation of glucose and xylose to ethanol by a respiratory-deficient mutant of Saccharomyces cerevisiae co-cultivated with a xylose-fermenting yeast. Journal of Fermentation and Bioengineering 75: 207-212.

8. 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.

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

10. 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.

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

12. 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.

13. 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

<u>ประวัติการศึกษา</u> (ปริญญาตรี – เอก; สาขา และสถาบัน)

ปริญญา	วันเดือนปีที่จบ	มหาวิทยาลัย	สาขาวิชา
ปริญญาตรี*	2545	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พันธุศาสตร์
ปริญญาโท	-	-	-
ปริญญาเอก	2551	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

*เกียรตินิยมอันดับ 2

<u>ผลงานวิจัย</u>

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 ใน การประชุมวิชาการ 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