



## รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับสภาพเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ให้ทนต่อสาร  
ยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล  
ชีวภาพ

Adaptation of Commercial Yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to  
Tolerate Inhibitors Generated during Cassava Pulp Hydrolysis for  
Bioethanol Production

นางสาว สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

นายสุรชัย ไทใหญ่เย็น

นายเทพปัญญา เจริญรัตน์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559

คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การปรับสภาพเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลชีวภาพ

แหล่งเงิน งบประมาณแผ่นดิน

ประจำปีงบประมาณ 2559 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 356,800 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 2 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2558 ถึง 30 กันยายน 2560

รายนามคณะผู้วิจัย

นางสาว สร้อยสุตา พรภักดีวัฒนา คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (หัวหน้าโครงการ)

นายสุรชัย ใหญ่เย็น นักวิจัยอิสระ (ผู้ร่วมโครงการ)

นายเทพปัญญา เจริญรัตน์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ผู้ร่วมโครงการ)

### บทคัดย่อ

กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจากการผลิตแป้งมันสำปะหลังในอุตสาหกรรมของประเทศไทย สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้โดยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดร่วมกับกระบวนการระเหยด้วยไอน้ำซึ่งอาจก่อให้เกิดสารยับยั้ง เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและส่งผลต่อการหมักของเชื้อยีสต์ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับสภาพยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ในอาหารปรับสภาพสูตรเดิมซ้ำหลายรอบเพื่อให้ได้เซลล์ที่สามารถทนต่อสารยับยั้งโดยวัดจากการเจริญเติบโตของเชื้อจนกระทั่งได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อเท่ากับหรือมากกว่า  $0.22 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$  (80% ของค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในสภาวะควบคุม) แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 20 ถึง 100% (v/v) ผลการทดลองพบว่า การเพิ่มปริมาณของสารละลายกากมันสำปะหลังส่งผลให้เชื้ออยู่ในช่วงปรับตัวนานขึ้นและใช้เวลาเพาะเลี้ยงนานขึ้นเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์สูงสุดในอาหารแต่ละสูตร อย่างไรก็ตามการเลี้ยงเชื้อในอาหารปรับสภาพสูตรเดิมซ้ำๆ ช่วยลดระยะเวลาปรับตัวของเชื้อและใช้เวลาในการทำให้เซลล์มีจำนวนสูงสุดลดลงในแต่ละรอบของการหมัก เมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่เติมสารยับยั้งผสมซึ่งคัดเลือกจากการเจริญของยีสต์ในสารยับยั้งทั้งหมด พบว่าเซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพสามารถทนสารยับยั้งกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลได้มากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ปรับสภาพ ที่ระดับความเข้มข้น 67.5 85 125 3.25 และ 4.39 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (v/v) พบว่า เซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพมีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการหมักสูงกว่าสภาวะที่ใช้เชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) เท่ากับ 38% และ 27% ตามลำดับ นอกจากการปรับสภาพเชื้อแล้ว การเติมปูนขาวให้มากขึ้นพอด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยกำจัดสารพิษในสารละลายจากวัสดุทางการเกษตรและสามารถเพิ่มความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อได้ จากการทดลองพบว่า ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากสารละลายที่กำจัดสารพิษออกโดยใช้ยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพสามารถปรับปรุงการเจริญและประสิทธิภาพการหมักของเชื้อได้สูงกว่าสภาวะที่ใช้สารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่ได้กำจัดสารพิษเพียงเล็กน้อยประมาณ 9% และ 4% ตามลำดับ

คำสำคัญ: กากมันสำปะหลัง การทนต่อสารยับยั้ง การปรับสภาพ สารยับยั้ง เอทานอลชีวภาพ *Saccharomyces cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Research Title:** Adaptation of commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis for bioethanol production

**Researcher:** Soisuda Pornpukdeewattana<sup>1</sup>, Surachai Yaiyen, and Theppanya Charoenrat<sup>2</sup>

**Faculty:** Agro-Industry<sup>1</sup> and Science and Technology<sup>2</sup>

## ABSTRACT

Cassava pulp is an agricultural residue from cassava flour manufacturing in industry of Thailand. It can be used as a substrate for ethanol fermentation by using diluted acid hydrolysis combined with steam explosion which can generate inhibitory byproducts including acetic acid, formic acid, levulinic acid, furfural and 5-hydroxy methyl furfural (5-HMF). These compounds have negative effect on yeast growth and fermentation ability. Therefore, the objective of this study was to adapt yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to obtain the inhibitor tolerable cells. Adaptation was performed by repeated culture in the same media to a specific growth rate ( $\mu$ ) of 0.22 h<sup>-1</sup> or higher (80% of the  $\mu$  in control) and then transferring them to progressively higher concentration of cassava pulp hydrolysate ranging from 20% to 100% (v/v). The results showed that a tendency of longer lag phase as well as time to reach maximum cell number ( $t_{max}$ ) with an increase in hydrolysate concentration. However, the repeated culture at the same hydrolysate concentration could shorten both lag period and  $t_{max}$ . The adapted cells were grown in YPD medium containing various mixed inhibitors which is selected from the yeast growth in each of the five inhibitors. The adapted cells showed the tolerant on acetic acid, formic acid, levulinic acid, furfural and 5-HMF more than that of non-adapted cells at the concentration of 67.5, 85, 125, 3.25 and 4.39 mmol/L, respectively. It also showed that the growth and fermentation efficiency of adapted cells in 100% hydrolysate were significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) than those of non-adapted cells by 38% and 27%, respectively. Moreover, the addition of Ca(OH)<sub>2</sub> (overliming) is an alternative for detoxification in lignocellulose hydrolysate and it can enhance the fermentability by yeast. The result showed that the adapted cells can improve both growth and fermentation efficiency of detoxified cassava pulp hydrolysates which is more than those of un-detoxified hydrolysate about 9% and 4%, respectively.

**Keywords:** cassava pulp; inhibitor tolerance; adaptation; inhibitors; bioethanol; *Saccharomyces cerevisiae*

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง แหล่งทุนเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2559 (A118-59-070) คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยงานดังกล่าวที่ได้จัดสรรงบประมาณในการดำเนินงานวิจัยสำหรับโครงการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำหรับสถานที่ในการดำเนินงานวิจัย และคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัยสำหรับโครงการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณนักศึกษาจากทั้ง 2 สถาบัน สำหรับการเป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใดในการทำวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขออภัยและขอนำมาปรับปรุงและพัฒนาต่อไป

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา  
สุรัชย์ ใหญ่เย็น  
เทพปัญญา เจริญรัตน์

มิถุนายน 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	II
กิตติกรรมประกาศ.....	III
สารบัญ.....	IV
สารบัญตาราง .....	VI
สารบัญภาพ .....	VII
<b>บทที่ 1 บทนำ</b> .....	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย .....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย .....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
<b>บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง</b> .....	<b>4</b>
2.1 ยีสต์ .....	4
2.2 เอทานอลชีวภาพ .....	6
2.3 กากมันสำปะหลัง .....	7
2.4 องค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลส.....	9
2.5 วิธีการผลิตเอทานอลชีวภาพจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส .....	12
2.6 กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้น .....	13
2.7 การย่อยสลาย .....	18
2.8 กระบวนการหมักเอทานอล.....	19
2.9 สารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยสลายด้วยกรดรวมกับการใช้ความร้อน.....	20
2.10 กลไกการยับยั้งของสารยับยั้ง.....	23
2.11 การลดความเป็นพิษของสารยับยั้งที่เกิดระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ .....	25
<b>บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงาน</b> .....	<b>28</b>
3.1 วัตถุดิบ.....	28
3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์ .....	28
3.3 สารเคมี.....	29
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์.....	29
3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	29
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
<b>บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์</b>	36
4.1 ปริมาณน้ำตาล และสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสารละลายกากมันสำปะหลัง.....	36
4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งแต่ละชนิดต่อการเจริญของเชื้อยีสต์.....	37
4.3 ผลการศึกษาการปรับสภาพยีสต์ให้สามารถทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง.....	42
4.3.1 การเจริญ และการรอดชีวิต.....	42
4.3.2 สารยับยั้ง และการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้ง.....	45
4.3.3 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล.....	48
4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งในรูปสารผสม และการผลิตเอทานอลในอาหารเหลว YPD โดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ.....	50
4.4.1 การเจริญ และการรอดชีวิต.....	50
4.4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้ง.....	52
4.4.3 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล.....	54
4.5 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ.....	56
4.5.1 การเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ).....	56
4.5.2 การเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% ที่กำจัด และไม่กำจัดสารพิษ.....	59
4.6 ผลการศึกษาปริมาณแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลชีวภาพ.....	61
4.6.1 การเจริญ และการรอดชีวิต.....	62
4.6.2 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล.....	62
<b>บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ</b> .....	65
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	65
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	65
<b>บทที่ 6 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ</b> .....	67
<b>เอกสารอ้างอิง</b> .....	69
<b>ภาคผนวก</b>	
ภาคผนวก ก เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต จากบทที่ 6.....	82
ภาคผนวก ข การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี.....	95
ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์.....	103
ภาคผนวก ง สรุปการใช้จ่ายเงิน.....	110
<b>ประวัตินักวิจัย</b> .....	111

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง .....	8
2.2 สารยับยั้งทั่วไปที่เกิดขึ้นในสารละลายจากการย่อยสลายวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส .....	22
3.1 การทดสอบความสามารถของยีสต์ในการทนต่อสารยับยั้งในรูปสารผสม .....	33
4.1 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ระยะพัก การเจริญสัมพันธ์ และน้ำหนักเซลล์ แห่งของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ระดับความเข้มข้นและสารยับยั้งแตกต่างกัน .....	37
4.2 ข้อมูลการเจริญ และการรอดชีวิตของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ในระหว่าง กระบวนการปรับสภาพ .....	40
4.3 การเจริญ และการรอดชีวิตของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ในระหว่างกระบวนการปรับสภาพ .....	45
4.4 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากการปรับสภาพเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตร .....	49
4.5 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพในอาหารเหลว YPD ที่มีการเติมสารยับยั้งผสมในระดับต่างๆ .....	52
4.6 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ ผ่านการปรับสภาพ และไม่ปรับสภาพในอาหาร YPD ที่มีการเติมสารยับยั้งผสมในระดับต่างๆ .....	55
4.7 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัด และกำจัดสารพิษ .....	58
4.8 พารามิเตอร์การผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัด และกำจัดสารพิษ .....	61
4.9 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการ ผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลาย กากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษ .....	63

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 รูปแบบการเจริญของยีสต์ในระบบให้อาหารแบบครั้งเดียว (batch culture).....	6
2.2 กากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง .....	8
2.3 โครงสร้างภายในผนังเซลล์ของพืช .....	9
2.4 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส .....	10
2.5 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส .....	11
2.6 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน.....	11
2.7 กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส .....	13
2.8 โครงสร้างวัสดุลิกโนเซลลูโลสหลังการปรับสภาพ .....	14
2.9 ผลผลิตที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลส ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด.....	21
2.10 กลไกการยับยั้งที่เกิดขึ้นในเซลล์ของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> จากอนุพันธ์ฟูแรน กรดอ่อน และสารประกอบฟีนอลิก.....	25
4.1 การเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 โดยติดตามจากค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในอาหาร YPD ที่เติมกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดลิวลินิก เพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เพอพิวรัล ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และสภาวะควบคุมที่ไม่เติมสารยับยั้ง.....	38
4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอะซิติก กรดลิวลินิก เพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเพอพิวรัล ในระหว่างการปรับสภาพเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่เลี้ยงในอาหารที่ผสมสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 20% 40% 60% 80% และ 100% (v/v) ในรอบแรก และรอบสุดท้าย .....	47
4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ไม่ได้ปรับสภาพ และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการ ปรับสภาพในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งในระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	51
4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้งเพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรัล โดยการใช้เชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพ ที่เลี้ยงในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งผสมระดับความเข้มข้นที่ 1 2 3 และ 4.....	53
4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และการรอดชีวิต การใช้น้ำตาลกลูโคส และ การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับสภาพใน สารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษ.....	57
4.6 ผลของความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง (ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ) ต่อ การเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการ ปรับสภาพด้วยเทคนิค Spot plate ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	59

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่กำจัดและไม่กำจัดสารพิษ .....	60
4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษซึ่งไม่มี และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1 3 5 และ 7.5 กรัมต่อลิตร .....	62
4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษซึ่งไม่มี และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1 3 5 และ 7.5 กรัมต่อลิตร .....	63



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันลิกโนเซลลูโลสเป็นสารประกอบชีวมวลที่มีปริมาณมากที่สุดในโลก พบได้ทั่วไปในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งมีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสแตกต่างกันตามชนิดของพืช แต่โดยทั่วไปแล้วประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (พิชามญช์ และคณะ, 2556) ประเทศไทยนับว่าเป็นประเทศเกษตรกรรม และมีผลผลิตทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก จึงมีข้อได้เปรียบในเรื่องการนำวัสดุเหลือทิ้งมาใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น ใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลซึ่งเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ สามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันจากฟอสซิลได้เป็นอย่างดี

การผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสจำเป็นต้องมีขั้นตอนปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของมวลชีวภาพโดยการละลายหรือแยกส่วนประกอบ ประเภทลิกนินและเฮมิเซลลูโลสรวมถึงการลดปริมาณคริสตัลไลน์เซลลูโลสออกจากกันเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Kumar *et al.*, 2009) โดยวิธีที่นำมาใช้ในการวิจัยคือการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน ซึ่งวิธีนี้มักจะทำให้เกิดสารเคมีอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ร่วมด้วย (Walker, 2011) โดยจะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ ตลอดจนมีความรุนแรงต่อกระบวนการผลิตเอทานอล โดยจะชะลอจลนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลให้ช้าลง บางกรณีอาจพบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และยับยั้งการผลิตเอทานอลอย่างสมบูรณ์ (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Mussatto and Roberto, 2004) ทั้งนี้ชนิดและปริมาณสารยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ และกระบวนการที่เลือกใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ

เนื่องจากกระบวนการเตรียมวัตถุดิบก่อให้เกิดสารยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ซึ่งส่งผลกระทบต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดขึ้น จึงมีการศึกษาถึงการลดความเป็นพิษของสารยับยั้งดังกล่าว เพื่อที่จะเพิ่มศักยภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา มีการศึกษาวิจัยในการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสนั้นหัวข้อหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจ คือ การปรับสภาพของเชื้อจุลินทรีย์ต่อสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยปรับปรุงผลได้ของผลิตภัณฑ์ (Silva and Roberto, 2001) เช่น ในการศึกษาการพัฒนาเชื้อ *P. stipitis*, *C. shehatae* และ *P. tanophilus* ให้ทนต่อสารยับยั้ง ซึ่งส่งผลให้เกิดการพัฒนาความสามารถในการหมักสารละลายที่มีไซโลส (Tomás-Pejó *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2009; Martin *et al.*, 2007)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือจากโรงงานโดยใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลชีวภาพ โดยวัตถุดิบดังกล่าวจะต้องผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางร่วมกับการระเหยด้วยไอน้ำเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการหมักเอทานอลได้ และมีวัตถุประสงค์ในการปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์ให้สามารถทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสารละลายที่ได้จากกระบวนการปรับสภาพ โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 5 สูตร ซึ่งจะเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเจือจางของสารยับยั้งน้อยที่สุดเพื่อให้เชื้อได้มีการปรับตัว จากนั้นจึงถ่ายเชื้อไปยังสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงขึ้น ด้วยวิธีการดังกล่าวมานี้ มีผู้รายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถทนต่อสารยับยั้งได้สูงขึ้น และพบว่ามีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลที่สูงขึ้น (Martín *et al.*, 2007; Tomás-Pejó *et al.*, 2010) ซึ่งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมที่ใช้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบ

## 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ให้สามารถทนต่อสารยับยั้งต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากกากมันสำปะหลังด้วยสารละลายซัลฟูริกเจือจาง ร่วมกับการใช้ความร้อนเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล

1.2.2 ศึกษาผลของการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดยการหมักด้วยยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

1.2.3 ศึกษาความเข้มข้นของสารอาหารแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

## 1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการปรับสภาพเชื้อยีสต์ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากกากมันสำปะหลัง คือ เพอพิวโรล 5-ไฮดรอกซี เมทิล เพอพิวรัล กรดลิวูลินิก กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิก เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล โดยขั้นต้นจะทำการศึกษาความสามารถเบื้องต้นของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในการทนต่อสารยับยั้งแต่ละชนิด และปัจจัยร่วมของสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ อีกทั้งยังทำการปรับสภาพเชื้อยีสต์ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดจากกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดรวมกับการใช้ความร้อน โดยนำสารละลายที่ย่อยได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เพอพิวโรล 5-ไฮดรอกซี เมทิล เพอพิวรัล กรดอะซิติก กรดลิวูลินิก และกรดฟอร์มิก ก่อนนำไปหมักกับยีสต์เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล ซึ่งจะทำการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายส่วนใสออกเป็น 5 ระดับ คือ ระดับความเข้มข้น 20% 40% 60% 80% และ 100% โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดเพื่อให้เชื้อได้มีการปรับตัวในการทนต่อสารยับยั้งได้มากขึ้นก่อนจะถ่ายเชื้อไปยังสภาวะที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น หลังจากที่ได้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วจึงทำการศึกษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ในรูปสารผสมอีกครั้งเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญกับเชื้อยีสต์ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ รวมทั้งทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษและกำจัดสารพิษ ตลอดจนศึกษาปริมาณแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลชีวภาพจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เพิ่มทางเลือกในการนำวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร อย่างเช่น กากมันสำปะหลัง ที่สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลชีวภาพได้

1.4.2 เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วสามารถทนต่อสารยับยั้งต่างๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยวิธีการใช้กรดเจือจางร่วมกับความร้อนได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.3 ทราบระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล  
จากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 2

### ทฤษฎี และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มนุษย์ให้ความสนใจศึกษาค้นคว้ากันมาก และรู้จักนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ วิสกี้ สุรา เป็นต้น นอกจากนี้ยีสต์ยังมีบทบาทสำคัญทางอุตสาหกรรมผลิตพลังงานทดแทนคือเอทานอลที่ผลิตจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (อรุณ, 2558) ยีสต์ที่นิยมใช้มากที่สุดในระดับอุตสาหกรรม และในการวิจัยในห้องปฏิบัติการคือยีสต์ในตระกูล *Saccharomyces* sp. ซึ่งมีการพัฒนาเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะ *S. cerevisiae* ที่มีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์มาตลอด จนปัจจุบันมีเชื้อยีสต์สายพันธุ์นี้มากกว่าพันสายพันธุ์ ด้วยคุณสมบัติที่ต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ คือ สามารถเจริญเติบโตได้เร็วทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ สามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น กลูโคส ฟรักโทส และซูโครส มีความคงทนต่อเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ และผลิตเอทานอลได้สูง อีกทั้งยังทนต่อสารยับยั้งที่เกิดในระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ (Linden and Hahn-Hägerdal, 1989; Olsson and Hahn-Hägerdal, 1993.; กล้าณรงค์ และคณะ, 2549)

##### 2.1.1 ลักษณะทั่วไปของยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดยูคาริโอตจัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจ (fungi) อยู่ในดิวิชันยูมีัยโคตา (Eumycota) สามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการแตกหน่อ (budding) และการแบ่งตัวแบบทวิภาค (binary fission) บางชนิดสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ เซลล์ยีสต์ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว (อรุณ, 2558)

##### 2.1.2 โครงสร้างของยีสต์

โครงสร้างสำคัญของยีสต์ประกอบไปด้วย ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ เพอริพลาสมิซึม ไซโทพลาสมิซึม นิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย แวกคิวโอล และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (อรุณ, 2558)

##### 2.1.3 แหล่งสารอาหารสำหรับยีสต์

**2.1.3.1 แหล่งคาร์บอน** ได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะกลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถนำไปใช้และเจริญได้ดี ห้องปฏิบัติการจึงนิยมใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์

**2.1.3.2 แหล่งไฮโดรเจน** ไฮโดรเจนไอออน หรือโปรตอน มีความสำคัญทางสรีรวิทยาของยีสต์ เนื่องจากมีผลต่อค่าความเป็นกรด-เบสทั้งภายในและภายนอกเซลล์ มีอิทธิพลมากต่อการเจริญ และเมตาบอลิซึมของยีสต์

**2.1.3.3 แหล่งออกซิเจน** ยีสต์หลายชนิดเจริญเฉพาะในที่ที่มีออกซิเจน โดยออกซิเจนทำหน้าที่หลักเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่อิเล็กตรอน (electron transport chain) และยังทำมีความจำเป็นต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซิเลชัน (hydroxylation) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์สเตอรอล และกรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.1.3.4 แหล่งไนโตรเจน** ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์สามารถใช้สารหลายชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยต้องมีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้ได้ง่าย เช่น กลีโอะแอมโมเนียม ไนเตรท ไนไตรท์ ยูเรีย กรดอะมิโนเพปไทด์ พิวรีน และเอมีน เป็นต้น

**2.1.3.5 แหล่งซัลเฟอร์** ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ แหล่งซัลเฟอร์ได้จากสารประกอบหลายชนิด เช่น ซัลเฟต ซัลไฟต์ ไทโอซัลเฟต เมไทโอนีน และกลูตาไทโอน เป็นต้น สารซัลเฟตอินทรีย์ในรูปของซัลเฟตไอออน โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต  $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$  หรือโพแทสเซียมซัลเฟต  $(\text{K}_2\text{SO}_4)$  เป็นแหล่งของซัลเฟอร์ที่นิยมใช้ในอาหาร

**2.1.3.6 แหล่งฟอสฟอรัส** ฟอสฟอรัสพบได้ในกรดนิวคลีอิกและฟอสโฟลิปิด ปรากฏในไซโทพลาสซึมของยีสต์ส่วนหนึ่งเกิดจากสารอนินทรีย์ฟอสเฟต โดยแหล่งฟอสฟอรัสที่ใช้คือ ออร์โทฟอสเฟต  $(\text{H}_2\text{PO}_4)$  และอนินทรีย์ฟอสเฟต โดยออร์โทฟอสเฟตทำหน้าที่ช่วยการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด รวมทั้งการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างพลังงาน

**2.1.3.7 แหล่งแร่ธาตุ** ยีสต์ต้องการแร่ธาตุหลายชนิดสำหรับการเจริญ โดยแมกโครอิลิเมนต์ (macro element) เป็นธาตุที่ต้องการมากกว่าธาตุอื่น คือ โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ที่ระดับมิลลิโมลาร์ (millimolar) ใช้สำหรับสร้างสถานะที่มีประจุบวกภายในเซลล์ ส่วนธาตุอาหารที่ยีสต์ต้องการในปริมาณต่ำ เรียกว่า ไมโครอิลิเมนต์ (micro element) ได้แก่ แมงกานีส แคลเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง นิกเกิล โคบอลต์ และ โมลิบดีนัม กลุ่มธาตุโลหะจำเป็น ได้แก่ อะลูมิเนียม อะเซนิก โบรอน ซีเซียม แคดเมียม พรอท ลิเทียม ตะกั่ว ต้องการในปริมาณน้อยมาก และจะเป็นพิษต่อการเจริญหากมีความเข้มข้นมากกว่า 100 ไมโครโมลาร์

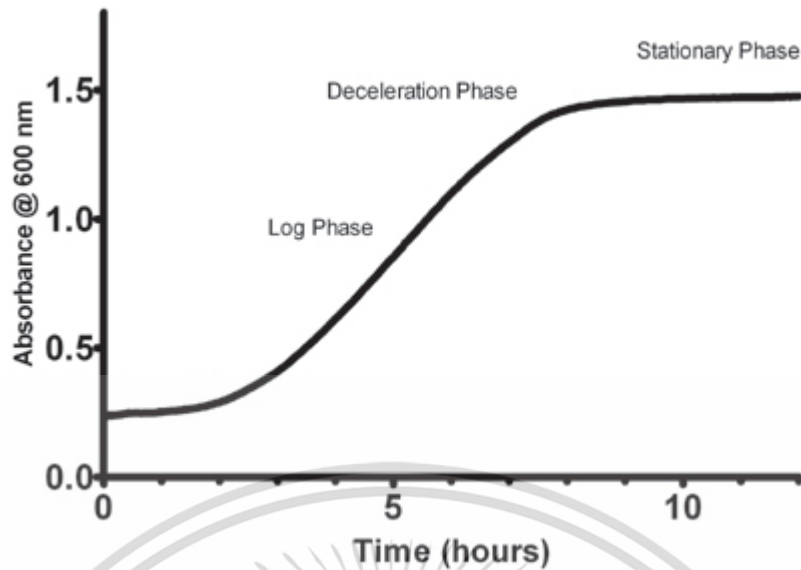
**2.1.3.8 สารสนับสนุนการเจริญ (growth factor)** เป็นสารประกอบอนินทรีย์ที่ยีสต์ต้องการในปริมาณน้อยที่นำมาใช้เฉพาะในกระบวนการแคตาบอลิซึม (catabolism) บางอย่างเท่านั้น หรือมีบทบาทต่อการทำงานของโครงสร้างของเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามิน ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ของเอนไซม์บางชนิด อีกทั้งต้องการกรดอะมิโนบางชนิด สเตอรอล พอลิเอมีน โคสไลน์ มีโซอินซิทอล และกรดไขมันบางประเภท เนื่องจากยีสต์ไม่สามารถสังเคราะห์สารเหล่านี้เองได้ ซึ่งพบว่าเมื่อเติมสารเหล่านี้ในอาหารเพาะเลี้ยงยีสต์สามารถกระตุ้นการเจริญของยีสต์ได้มากขึ้น (สาวิตรี, 2549; อรุณ, 2558)

#### 2.1.4 การเจริญของยีสต์

การเจริญ (growth) ในทางจุลชีววิทยาหมายถึงทวิจำนวนของจุลินทรีย์ ซึ่งถือว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงในด้านปริมาณมากกว่าการเพิ่มขนาดของเซลล์ โดยการเจริญของยีสต์เกี่ยวข้องกับการลำเลียงสารและการใช้สารอาหารที่นำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้สร้างโครงสร้างภายในทำให้เซลล์มีการขยายขนาดและสามารถแบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่อง กระบวนการเจริญของเซลล์ที่สำคัญประกอบด้วย การสร้างผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น และการแบ่งเซลล์ (อรุณ, 2558)

การเจริญของยีสต์ในอาหารเหลวโดยให้สารอาหารเพียงครั้งเดียว (batch culture) และบ่มในสภาวะที่เหมาะสม สามารถแบ่งการเจริญของยีสต์ ณ เวลาต่างๆ เป็น 5 ระยะ ดังภาพที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.1 รูปแบบการเจริญของยีสต์ในระบบให้อาหารแบบครั้งเดียว (batch culture)

ที่มา: ดัดแปลงจาก Paul, 2010

**2.1.4.1 ระยะปรับตัว (lag phase)** เป็นระยะที่ไม่มีมีการเจริญหรืออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate,  $\mu$ ) เป็นศูนย์ เนื่องจากยีสต์พบกับการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารหรือสภาพแวดล้อมทางกายภาพใหม่ ระยะเวลาช่วงเริ่มต้นจะนานเพียงใดขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เจริญอยู่ ระยะเริ่มต้นนี้เซลล์ยีสต์มีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมทางกายภาพและสารเคมี

**2.1.4.2 ระยะเร่ง (acceleration phase)** เป็นระยะต่อจากระยะเริ่มต้น เซลล์เริ่มปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เจริญอยู่ได้และเริ่มแบ่งเซลล์

**2.1.4.3 ระยะเพิ่มจำนวน (log phase)** ในระยะนี้เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นแบบทวีคูณในอัตราคงที่ และเป็นระยะที่มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ )

**2.1.4.4 ระยะชะลอตัว (deceleration phase)** เซลล์อยู่ในสภาวะเริ่มขาดแคลนอาหาร เกิดการสะสมเมตาบอไลต์ที่ยับยั้งการเจริญ และเซลล์เกิดการเกาะกลุ่มตกตะกอนจำนวนมาก ระยะนี้เซลล์ยีสต์เริ่มเจริญช้าลง

**2.1.4.5 ระยะคงที่ (stationary phase)** เป็นระยะที่เซลล์อยู่ในสภาพขาดสารอาหาร อัตราการเจริญในระยะนี้เท่ากับศูนย์ เซลล์ยีสต์บางส่วนแบ่งตัว บางส่วนตาย และเกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis)

## 2.2 เอทานอลชีวภาพ (bioethanol)

เอทานอล (ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) มีสูตรทางเคมี คือ  $C_2H_5OH$  เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 จุดหลอมเหลว  $-114.3$  องศาเซลเซียส จุดเดือด  $78.32$  องศาเซลเซียส เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย ระเหยง่าย สามารถละลายในน้ำและสารอินทรีย์อื่นได้ดี (สิริวรรณ, 2554) สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ตัวทำละลายทางเคมีในอุตสาหกรรม ยารักษาโรคและเครื่องสำอาง และที่สำคัญยังถูกนำมาใช้เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์อื่นใด

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อเพลิงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล ซึ่งเป็นที่รู้จักกันว่าแหล่งพลังงานนี้ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) นั้นมีแนวโน้มลดลงตามลำดับ และราคาน้ำมันที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้หลายประเทศพยายามหาพลังงานทางเลือกใหม่ (ฉพลพัทธ์ และคณะ, 2555) เช่น ก๊าซชีวภาพ (biogas) ไบโอดีเซล (biodiesel) และเอทานอลชีวภาพ (bioethanol) ซึ่งได้ถูกพัฒนาและนำไปใช้อย่างกว้างขวาง

เอทานอลชีวภาพ เป็นพลังงานชีวภาพที่ถูกผลิตขึ้นจากชีวมวลที่ได้จากผลิตผลทางการเกษตร เช่น อ้อย น้ำตาล มันสำปะหลัง และข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งกำลังได้รับความสนใจในการพัฒนาเป็นพลังงานทดแทนน้ำมันจากเชื้อเพลิงฟอสซิล มากกว่านั้นยังพบว่าการผลิตเอทานอลชีวภาพนี้สามารถผลิตจากชีวมวลที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งกำลังได้รับความสนใจและถูกนำไปใช้ในหลายประเทศ (El-Naggar *et al.*, 2014) โดยวัสดุเหล่านี้มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการลดภาวะโลกร้อนได้ เนื่องจากพลังงานจากชีวมวลมีการปลดปล่อยมลพิษทางอากาศ และสารพิษต่างๆ ออกมาน้อยกว่าพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล อีกทั้งยังเป็นการรักษาความมั่นคงของพลังงานทั่วโลกได้อีกด้วย ดังนั้น วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสจึงเป็นแหล่งพลังงานทางเลือก ซึ่งสามารถนำกลับมาให้ใหม่ได้ และนำไปใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพแทนการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิล (Wyman and Goodman, 1993; Okudoh *et al.*, 2014; อรุณี, 2555) สำหรับในประเทศไทย องค์กรทั้งภาครัฐและเอกชนประกาศแผนการลงทุนระยะยาว 10 ปี ซึ่งคาดว่าจะใช้มูลค่าประมาณ 400,000 ล้านบาทในการร่วมมือสร้างเศรษฐกิจชีวภาพโดยมุ่งเน้นไปที่อ้อยและมันสำปะหลังเป็นหลัก ในการสร้างอุตสาหกรรมชีวเคมี ชีวเภสัชภัณฑ์ และเชื้อเพลิงชีวภาพ

### 2.3 กากมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และส่วนใหญ่นำมาผลิตเป็นแป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตแป้งมันสำปะหลัง มีรายงานว่าปริมาณมากถึง 7.3 ล้านตันในปีพ.ศ.2558 (Trakulvichean *et al.*, 2017) ลักษณะทั่วไปของกากมันสำปะหลัง คือ เปลือกมีลักษณะเป็นขุย สีน้ำตาล กากมันมีลักษณะละเอียดสีขาว (ประเวทย์ และคณะ, 2551) ดังภาพที่ 2.2 ส่วนมากนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์หรือนำไปตากแห้งทำเป็นมันเส้น มันอัดเม็ด หรือมันบด Balagopalan *et al.* (1994) รายงานว่า กากมันสำปะหลังที่ผ่านการสกัดแป้งแล้ว คงเหลือแป้งเป็นส่วนประกอบร้อยละประมาณ 50-60 ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งในการผลิตแป้งมันสำปะหลังแต่ละครั้งทำให้ได้กากมันสำปะหลังสูงถึงร้อยละ 10 ของน้ำหนักหัวมันสำปะหลังสด

โดยกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังจะต้องใช้หัวมันสำปะหลังนำไปล้างให้สะอาด และสับหัวมันสำปะหลังเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อนำเข้าเครื่องโม่บดให้ละเอียด ซึ่งจะได้ของเหลวที่ประกอบด้วยแป้ง น้ำ และกากมันสำปะหลังปนกันอยู่ จากนั้นนำของเหลวดังกล่าวเข้าเครื่องสกัดกากที่จะทำหน้าที่แยกกากมันสำปะหลังออกจากน้ำแป้งโดยอาศัยแรงเหวี่ยง หลังจากนั้นนำแป้งที่ได้ไปเข้าเครื่องอบแห้งแล้วบรรจุถุงต่อไป ส่วนกากมันสำปะหลังที่ได้จากเครื่องสกัดกากจะถูกนำไปเข้าเครื่องอัดกากมันสำปะหลังแล้วตากแห้งในลานตาก



ภาพที่ 2.2 กากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง

ที่มา: ณัฐธิดา, 2557

องค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลังนั้นประกอบด้วยแป้งประมาณร้อยละ 60-75 โดยน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ เส้นใย (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ประมาณร้อยละ 12-20 โดยน้ำหนักแห้ง มีความชื้นสูงประมาณร้อยละ 60-75 โดยน้ำหนักเปียก (สิริวรรณ, 2554) ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับคุณภาพของหัวมันสำปะหลังและกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังในแต่ละโรงงานด้วย โดยมีโปรตีน ไขมัน เถ้า ไนปริมาณที่ต่ำ

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง
แป้ง	68.89
ความชื้น	72 (ร้อยละโดยน้ำหนักเปียก)
เถ้า	1.70
โปรตีน	1.55
เส้นใย	27.75
ไขมัน	0.12

ที่มา: Siroth et al. (2000)

ชลดา (2546) ศึกษาองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังจากจังหวัดนครราชสีมา พบว่า มีแป้งเป็นองค์ประกอบสูงสุด คือ ร้อยละ 61.84-69.9 โดยน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือปริมาณเส้นใยร้อยละ 10.61-14.35 โดยน้ำหนักแห้ง เถ้าร้อยละ 1.61-2.38 โดยน้ำหนักแห้ง โปรตีนร้อยละ 1.82-2.03 โดยน้ำหนักแห้ง และไขมันร้อยละ 0.09-0.20 โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

กากมันสำปะหลังจัดเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งมีปริมาณแป้งตกค้างอยู่สูง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อในรูปอาหารสัตว์ การผลิตก๊าซชีวภาพ มากกว่านั้นยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย (Balat, 2011) สารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล

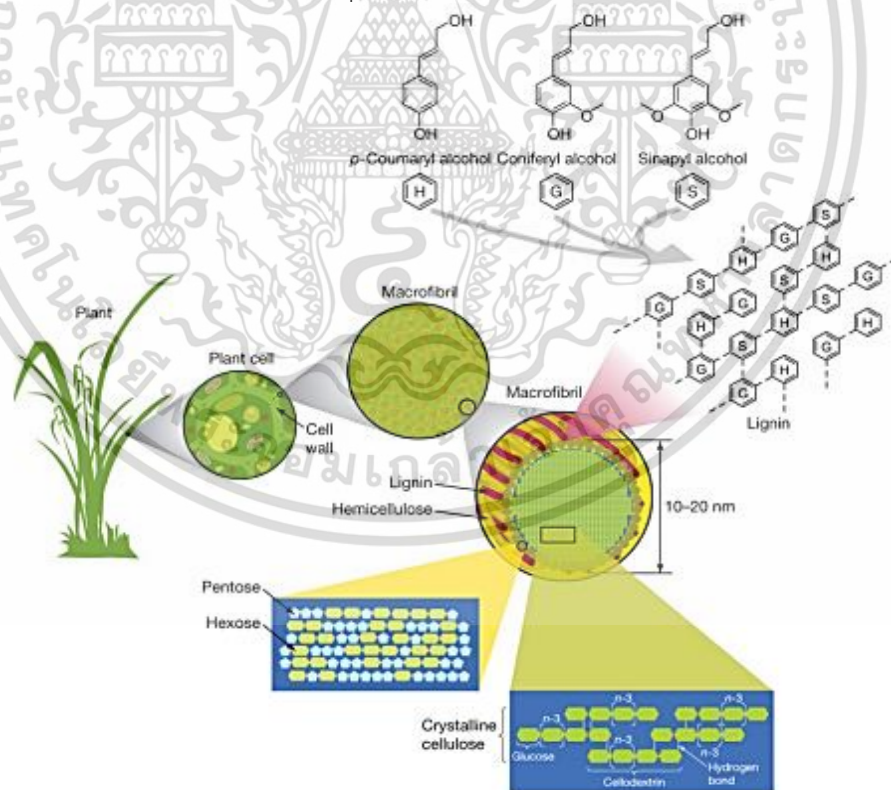
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ไปจากวัสดุประเภทแป้งหรือน้ำตาลแล้ว วัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลสที่กำลังได้รับความสนใจในปัจจุบันโดยพบว่า ร้อยละ 90 ของน้ำหนักแห้งของพืชส่วนใหญ่ ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพกติน (Yat *et al.*, 2008) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ย่อยสลายได้ยากทางชีวภาพ ดังนั้นในการผลิตวัตถุดิบประเภทนี้ควรมีขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้นก่อน (สุภาวดี, 2557; รัชพล, 2558) ซึ่งมีขั้นตอนการย่อยหลายวิธี เพื่อให้ได้สารละลายที่มีปริมาณน้ำตาลสูงขึ้นซึ่งเหมาะสำหรับการใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล

#### 2.4 องค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลส

วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นชีวมวลที่เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีมากที่สุดในโลก จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์พืช อยู่ในรูปผลึกมีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียว และไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) ร้อยละ 35-50 เป็นองค์ประกอบหลัก เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ร้อยละ 20-35 และลิกนิน (lignin) ร้อยละ 15-20 (Mood *et al.*, 2013) โดยอัตราส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดและอายุของวัสดุ

ในผนังเซลล์ของพืช เซลลูโลสแต่ละโมเลกุลจะเกิดการรวมกันเป็นมัดของเซลลูโลส (cellulose bundles) โดยมีลิกนินล้อมรอบอยู่ เฮมิเซลลูโลสทำหน้าที่เชื่อมต่อกันระหว่างเซลลูโลสกับลิกนินเข้าไว้ด้วยกัน การจัดเรียงตัวในลักษณะดังกล่าวทำให้เส้นใยที่อยู่ในผนังเซลล์มีความแข็งแรงสูงขึ้น (ประเวทย์ และคณะ, 2551; ประมุข, 2555) ดังภาพที่ 2.3



ภาพที่ 2.3 แสดงโครงสร้างภายในผนังเซลล์ของพืช

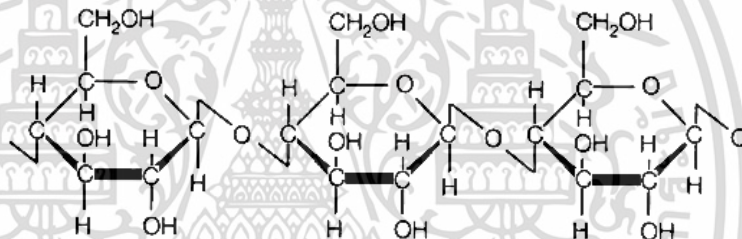
ที่มา: ชชนันท์ และเฉลิม, 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.4.1 เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีมากในผนังเซลล์พืช โครงสร้างของเซลลูโลสเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขาประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสมากกว่า 10,000 หน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะแบบ  $\beta$ -1,4 glycosidic ดังแสดงในภาพที่ 2.4 เซลลูโลสไม่สามารถละลายด้วยน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายต่างอ่อน แต่จะละลายในกรดและด่างแก่ หากการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์เกิดขึ้นสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว แต่ถ้าการย่อยสลายตัวไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอสซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ และได้โอลิโกแซ็กคาไรด์

สายพอลิเมอร์แต่ละสายจะเรียงขนานกันและสร้างพันธะไฮโดรเจนเชื่อมต่อกัน ซึ่งอาจสูงถึง 3 พันธะต่อหน่วยกลูโคส แต่เมื่อรวมกันหลายสายจะเรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบโครงผลึกสามมิติ (Crystalline) ส่วนที่ไม่ได้เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนแต่มีการจัดเรียงตัวแบบสุ่มจะเรียกว่า เซลลูโลสแบบหลวม (Amorphous) ส่วนใหญ่มักพบเซลลูโลสธรรมชาติเป็นเซลลูโลสแบบผลึก หรือโครงสร้างแบบระเบียบ ซึ่งมีการเรียงตัวของโครงสร้างแน่น มีความแข็งแรง และไม่ละลายน้ำหรือสารอินทรีย์ (สุภาวดี, 2557; ประมุข, 2555)

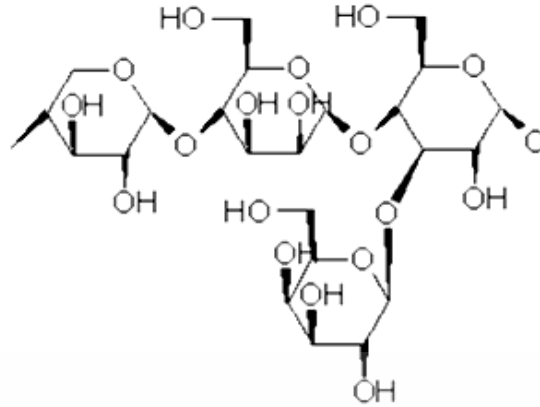


ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส

ที่มา: สุภรินทร์, 2557

### 2.4.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses)

เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของผนังเซลล์พืช มักจะอยู่ร่วมกับเซลลูโลส ลิกนิน และสารประกอบเพกทิน จัดเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ไฮดรอกซิลคาร์บอน (Amorphous polymeric carbohydrate) พบมากในพวงไม้ใบกว้างและพวกพืชตระกูลหญ้า เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลุ่มเพนโทส หรือเฮกโซสประกอบด้วยหน่วยย่อย 50-200 หน่วย และต่อกันแบบกึ่งก้านสาขามากกว่าแบบเส้นตรง ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ซึ่งมีโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลสจึงย่อยสลายได้ง่ายกว่า น้ำตาลที่ประกอบอยู่ภายในเฮมิเซลลูโลส ได้แก่ ไซโลส อะราบิโนส กลูโคส กาแลกโตส และแมนโนส เฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นพวกเฮเทอโรไกลแคน (Heteroglycan) คือประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ กันตั้งแต่ 2-4 ชนิด ส่วนเฮมิเซลลูโลสชนิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดเดียวเรียกว่า โฮโมไกลแคน (Homoglycan) แต่เฮมิเซลลูโลสชนิดนี้จะพบเป็นส่วนน้อย ซึ่งชนิดของน้ำตาลและปริมาณที่พบขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งของพืช มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่ละลายในสารละลายที่เป็นด่างเจือจาง (สุภรินทร์, 2557; ชวีญชนก, 2544 )

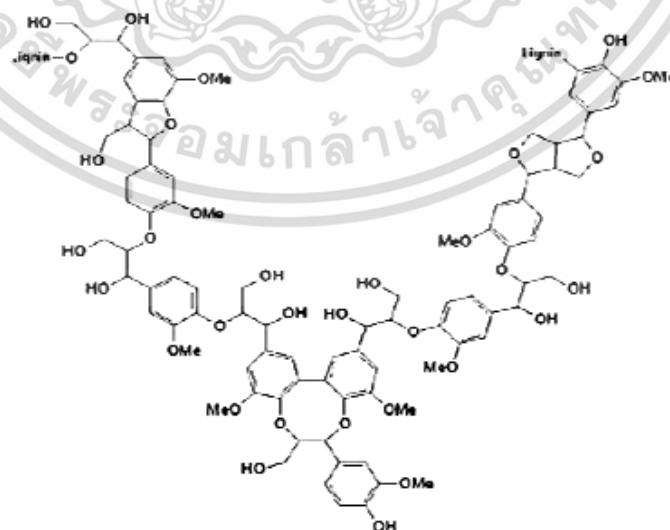


ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส  
ที่มา: ประมุข, 2555

นอกจากนี้ การใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูง ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของเฮมิเซลลูโลสในน้ำได้ ซึ่งหากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสมีการใช้อุณหภูมิสูงร่วมด้วย จำเป็นต้องระวังการเกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งในกระบวนการหมัก ตัวอย่างเช่น เฟอพิวรัล (Furfural) และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลล เฟอพิวรัล (Hydroxy methyl furfural) เป็นต้น (Mood *et al.*, 2013; Galbe and Zacchi, 2012)

### 2.4.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนิน เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่ร่วมกับเซลลูโลส เป็นสารประกอบพอลิเมอร์อะโรมาติกของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) มากกว่า 10,000 หน่วย ดังแสดงในภาพที่ 2.6 ซึ่งมีสารประกอบหลักเริ่มต้นที่สำคัญ 3 หน่วยหลักๆ คือ *p*-coumaryl, coniferyl และ sinapyl alcohol



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน  
ที่มา: ประมุข, 2555

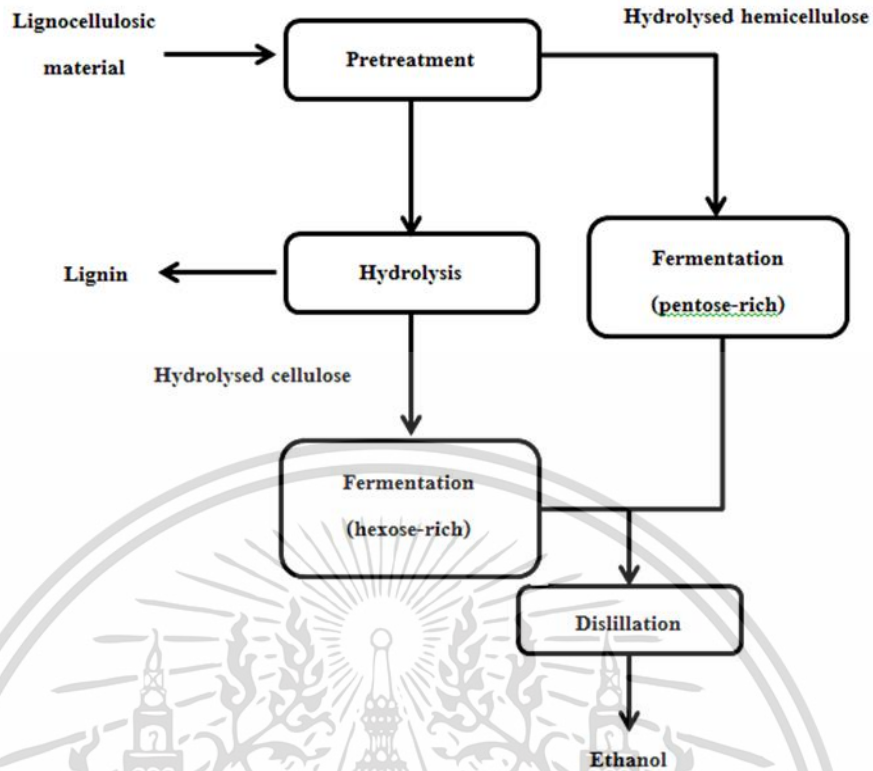
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิกนินไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต แต่เป็นส่วนของผนังเซลล์ พวกพีชอายุน้อยจะมี primary wall ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เมื่อพีชอายุมากขึ้นจะเกิด secondary wall โดยมีลิกนินเข้ามาประกอบอีกส่วน จึงเป็นสารที่อยู่ร่วมกับคาร์โบไฮเดรตของพีช การที่ลิกนินเคลือบอยู่บนผนังเซลล์ของพีช ทำให้เอนไซม์ต่างๆ เข้าไปย่อยพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสได้ยาก เป็นสาเหตุให้พีชอาหารสัตว์ชนิดนั้นๆ ไม่ถูกย่อย หรือสัตว์นำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยลง โดยทั่วไปแล้ว ลิกนินเป็นสารที่ทนต่อสารเคมี ไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ในเอทานอลหรือเมทานอลที่ร้อน และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ไม่มีสมบัติการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำให้พีชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน (ขวัญชนก, 2544; ประมุข, 2555; สุภาวดี, 2557)

## 2.5 วิธีการผลิตเอทานอลชีวภาพจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส

การผลิตเอทานอลชีวภาพสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้ (1) วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ข้าวโพด ข้าว มันฝรั่ง และมันสำปะหลัง (2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย บีทรูต ข้าวฟ่างหวาน และกากน้ำตาล และ (3) วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ ไม้ ฟางข้าว ชานอ้อย แกลบ กากมันสำปะหลัง ส่วนที่เหลือของพีช ของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ รวมทั้งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นต้น (กล้าณรงค์ และคณะ, 2548) โดยในช่วงแรกของการผลิตเอทานอลชีวภาพนั้นพบว่ามาจากวัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่เนื่องจากมีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศไทย แต่ในปัจจุบันเริ่มหันมาสนใจวัสดุทดแทนประเภทอื่นๆ นอกเหนือจากแป้งและน้ำตาล นั่นก็คือ วัสดุลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากได้ตระหนักถึงความมั่นคงของอาหารเพื่อมนุษย์และสัตว์ และปัญหาสิ่งแวดล้อม งานวิจัยด้านการผลิตเอทานอลในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นไปยังชีวมวลที่เป็นผลพลอยได้จากการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้หาได้ง่ายและราคาถูก อีกทั้งเป็นการรักษาสิ่งแวดล้อมโดยเป็นการกำจัดขยะอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2551)

กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้นประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้ (1) การปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้น (Pretreatment) (2) การย่อยสลาย (Hydrolysis) (3) การหมักเอทานอล (Fermentation) และ (4) การกลั่นเอทานอล (Distillation) (ชัชฉันทน์ และเฉลิม, 2555) ดังแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส  
ที่มา: ธีรภัทร และคณะ, 2551

เนื่องจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้นประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นโครงสร้างที่มีความซับซ้อนและมีความแข็งแรงสูงมาก ทำให้การย่อยสลายอย่างสมบูรณ์เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวทำได้ยาก ดังนั้นจึงต้องมีกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ และย่อยสลายด้วยสารเคมี หรือเอนไซม์เพื่อที่จะเปลี่ยนโครงสร้างดังกล่าวให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (glucose) ไคโลส (xylose) และอะราบิโนส (arabinose) ที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ ก่อนที่จะนำสารละลายน้ำตาลดังกล่าวไปใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล

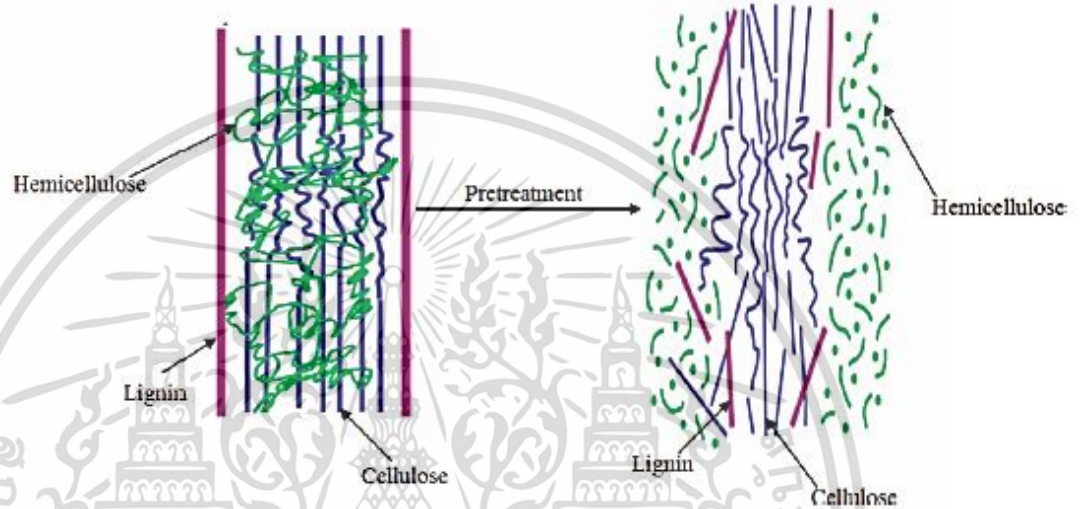
## 2.6 กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้น

การปรับสภาพวัตถุดิบเป็นขั้นตอนแรก และเป็นขั้นตอนสำคัญในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส มีวัตถุประสงค์หลักในการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมีของมวลลิกโนเซลลูโลส โดยการละลายหรือแยกส่วนประกอบพวกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารสกัดอื่นๆ ออกจากกัน ดังภาพที่ 2.8 เพื่อให้มวลชีวภาพที่เหลืออยู่ง่ายต่อการนำไปย่อย ซึ่งหากไม่กำจัดสารประกอบจำพวกลิกนินที่ห่อหุ้มโครงสร้างเฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสออกจะทำให้ขั้นตอนการย่อยสลายนั้นทำได้ยาก ขั้นตอนนี้ยังช่วยเพิ่มขนาดรูพรุนของตัววัตถุดิบ เพิ่มอัตราการย่อยน้ำตาล และลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น (Sun and Cheng, 2002; Harmsen *et al.*, 2010; สุขใจ, 2554) อีกทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายสำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยเซลลูโลส เนื่องจากหากใช้เอนไซม์ในการย่อยเพียงอย่างเดียวโดยไม่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปรับสภาพวัตถุดิบก่อนจะมีค่าใช้จ่ายสำหรับเอนไซม์ถึงร้อยละ 25 ของต้นทุนการผลิตเอทานอลทั้งหมด (สุภาวดี, 2557) มากกว่านั้นยังช่วยให้กระบวนการผลิตเอทานอลมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มกระบวนการปรับสภาพเข้าไปในกระบวนการผลิตก่อนจะนำไปหมักเอทานอล

การศึกษาของ Sreenath *et al.* (2001) พบว่า การหมักเอทานอลจากเส้นใยอัลฟาลฟา (alfalfa fiber) โดยไม่ผ่านการปรับสภาพ ให้ปริมาณเอทานอลเพียง 6.4 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อทำการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนนำไปหมักช่วยให้ปริมาณการผลิตเอทานอลสูงถึง 18.0 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างวัสดุลิกโนเซลลูโลสหลังการปรับสภาพ

ที่มา: Kumar *et al.*, 2009

กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบของวัสดุพวกลิกโนเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน แบ่งออก เป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ (1) การปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment) (2) การปรับสภาพทางเคมี (Chemical pretreatment) (3) การปรับสภาพทางเคมีร่วมกับกายภาพ (Physico-chemical pretreatment) และ (4) การปรับสภาพทางชีวภาพ (Biological pretreatment) การเลือกกระบวนการในการปรับสภาพขึ้นอยู่กับชนิด และลักษณะสมบัติของวัตถุดิบที่นำมาใช้ อย่างไรก็ตาม ปัญหาหลักที่เกิดขึ้นในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ คือ การเกิดสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งต้องใช้วัตถุดิบเป็นจำนวนมาก และต้องมีกระบวนการแยกน้ำตาลออกจากสารละลายอย่างมีประสิทธิภาพ จึงอาจกล่าวได้ว่า กระบวนการเตรียมวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสนั้นเป็นขั้นตอนหนึ่งที่ทำให้เกิดค่าใช้จ่ายสูงในกระบวนการผลิตเอทานอล (Walker, 2011; Zheng *et al.*, 2009)

### 2.6.1 การปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment)

เป็นการใช้แรงกลหรือกระบวนการทางกายภาพเพื่อปรับขนาด และทำลายโครงสร้างเซลล์ของวัตถุดิบ เพื่อให้ปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมีในขั้นตอนต่อไปเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ การตัดหรือบดให้ชิ้นวัตถุดิบมีขนาดเล็กลงจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว ทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยาเอนไซม์ หรือเอนไซม์จับกับวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น (ปฐมา และคณะ, 2551)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.6.1.1 การใช้แรงทางกล (Mechanical comminution)

คือ วิธีการทำให้วัสดุดิบมีขนาดเล็กลงสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทุบ การบด การโม่ การเขย่าวัสดุดิบ เป็นต้น (รัชพล, 2558) โดยทั่วไปขนาดของเศษวัสดุดิบหลังการหั่นแล้วมีขนาดประมาณ 1-3 เซนติเมตร และหลังจากการบดละเอียดจะมีขนาดประมาณ 0.2-2 มิลลิเมตร ซึ่งความสามารถในการลดขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของวัสดุและคุณสมบัติของวัสดุนั้น (Sun and Cheng, 2002)

### 2.6.1.2 การไพโรไลซิส (Pyrolysis)

เป็นวิธีการใช้ความร้อนในสภาวะไร้ออกซิเจนในการสลายวัสดุดิบ โดยเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 300 องศาเซลเซียส จะทำให้วัสดุดิบกลายเป็นแก๊สและผงถ่าน กระบวนการจะทำได้ช้าและการระเหยจะต่ำถ้าใช้อุณหภูมิต่ำ (Singh *et al.*, 2014)

### 2.6.1.3 การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion)

หากพิจารณาด้านค่าใช้จ่ายในกระบวนการเตรียมวัสดุดิบเบื้องต้นเป็นหลักวิธีนี้นับเป็นวิธีที่น่าสนใจ และเป็นวิธีนิยมใช้กันมากที่สุดเนื่องจากช่วยลดการใช้สารเคมี นิยมใช้กับไม้เนื้อแข็ง และวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร ไม่นิยมปรับสภาพไม้เนื้ออ่อน การปรับสภาพด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยวิธีอื่น เนื่องจากใช้พลังงานและการลงทุนที่ต่ำกว่า มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า (Balat, 2011) ทำได้โดยอาศัยใช้แรงดันไอน้ำอัดตัวสูงก่อนที่จะลดความดันลงอย่างรวดเร็วจนถึงความดันบรรยากาศ ทำให้เกิดการระเบิดของโครงสร้างวัสดุดิบ (explosive decompression of biomass) ซึ่งวิธีการปรับสภาพนี้ก่อให้เกิดการย่อยสลายอัตโนมัติ (autohydrolysis) โดยองค์ประกอบเฮมิเซลลูโลส และลิกนินสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นโอลิโกเมอร์ที่ละลายน้ำได้ (soluble oligomers) และลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (Banerjee *et al.*, 2010) ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการนี้ คือ ระยะเวลา อุณหภูมิ และขนาดอนุภาคของวัสดุ โดยส่วนใหญ่จะควบคุมอุณหภูมิที่ 160-260 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 0.69-4.83 เมกะพาสคาล เป็นเวลาสั้นๆ (Kumar *et al.*, 2009) มีรายงานว่าการใช้อุณหภูมิต่ำและระยะเวลานานขึ้นเหมาะต่อกระบวนการปรับสภาพมากกว่าการใช้อุณหภูมิสูง (Zheng *et al.*, 2009)

อย่างไรก็ตาม การย่อยวัสดุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสด้วยการระเบิดไอน้ำนี้ มักเกิดสารประเภทกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) และกรดลิวูลินิก (levulinic acid) ทำให้เกิดสารละลายในสภาวะที่เป็นกรด และอาจเกิดการย่อยสลายน้ำตาลไปเป็นเฟอฟูรัล (Furfural) และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอฟูรัล (Hydroxy methyl furfural) ต่อไปได้ (Mood *et al.*, 2013) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และกระบวนการหมัก (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000)

## 2.6.2 การปรับสภาพทางเคมี (Chemical pretreatment)

### 2.6.2.1 การใช้กรด (Acid pretreatment)

กรดที่นิยมใช้สำหรับการปรับสภาพวัสดุดิบจากลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก นอกจากนี้ยังมีกรดฟอสฟอริก และกรดไนตริก เดิมเคยใช้กรดเข้มข้นในการย่อยลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสมาก แต่เนื่องจากกรดเข้มข้นเหล่านี้มีฤทธิ์กัดกร่อนเครื่องมือหรืออุปกรณ์และเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการเกิดสารที่ไม่พึงประสงค์ต่อการหมัก และการกำจัดสารพิษที่มีราคาสูง จึงหันมาใช้กรดเจือจางร่วมกับการใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความร้อนในการปรับสภาพวัสดุจากลิกโนเซลลูโลสแทนซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจ และประสบความสำเร็จโดยสามารถกำจัดเอมิเซลลูโลส รวมทั้งเพิ่มปริมาณกลูโคสได้มากขึ้นโดยใช้ต้นทุน ในกระบวนการต่ำ (Kumar *et al.*, 2009) การปรับสภาพด้วยกรดเจือจางมักใช้ความเข้มข้นของกรด ร้อยละ 0.2-2.5 โดยอุณหภูมิที่ใช้อุณหภูมิระหว่าง 130-210 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาสั้นๆไม่กี่นาที ถึงนานเป็นชั่วโมง (Menon and Rao, 2012) ทั้งนี้การเลือกใช้สภาวะขึ้นอยู่กับความจำเพาะต่อ สารเคมี และองค์ประกอบทางโครงสร้างของแหล่งชีวมวลที่ใช้ด้วย

นอกจากนี้ กระบวนการปรับสภาพโดยใช้กรดรวมกับการใช้อุณหภูมิสูง ยังทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ เช่น เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อกระบวนการหมัก โดยปริมาณสารดังกล่าวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรด อุณหภูมิ และระยะเวลาในที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ การลดความเป็นพิษสามารถทำได้โดยการปรับ สภาพไฮโดรไลเซสให้เป็นกลางด้วยด่างก่อนนำไปใช้

### 2.6.2.2 การใช้ด่าง (Alkaline pretreatment)

กลไกการทำงานของด่างนั้นเชื่อว่าจะไปเพิ่มการพองตัวของโมเลกุลภายใน ต่อสายพันธะภายในของไซแลนในเอมิเซลลูโลส ความพรุนของวัสดุจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อทำการกำจัดสาย ไซของโครงสร้างที่เชื่อมต่อกันภายใน ด่างที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดร ออกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ การใช้ด่างเจือจาง เช่น โซเดียมไฮดรอก ไซด์เจือจางในการปรับสภาพวัสดุนั้น มีผลทำให้เกิดการบวมภายใน ช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำ ปฏิกิริยา ทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้างผลึกของเซลลูโลส และสามารถ ทำลายของโครงสร้างลิกนิน ซึ่งประสิทธิภาพของด่างที่ใช้ในกระบวนการแปลงสภาพจะขึ้นอยู่กับ ปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในวัสดุ นอกจากนี้การปรับสภาพด้วยด่างยังเป็นวิธีที่ง่าย และไม่ต้องใช้ พลังงานมากเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการปรับสภาพด้วยกรด (Balat, 2011; รัชพล, 2558)

### 2.6.2.3 การใช้โอโซน (Ozonolysis)

โอโซนเป็นตัวออกซิแดนท์ที่มีประสิทธิภาพ ช่วยลดการเกิดผลึกของ เซลลูโลส สามารถทำให้เกิดการแตกตัวของลิกนิน และเอมิเซลลูโลสได้ วิธีนี้มีจุดเด่นคือ เป็นวิธีที่มี ประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินออกได้ดี ไม่ก่อให้เกิดสารพิษที่จะไปยับยั้งการทำปฏิกิริยาในส่วน ต่างๆ กระบวนการนี้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ ต้องใช้โอโซนในปริมาณมาก และมีค่าใช้จ่ายสูง (Balat, 2011; Jönsson and Martin, 2016)

## 2.6.3 การปรับสภาพทางเคมีร่วมกับกายภาพ (Physico-chemical pretreatment)

### 2.6.3.1 การใช้ความร้อนชื้น (Liquid hot water)

วิธีการนี้อาศัยอุณหภูมิสูง (160-220 องศาเซลเซียส) และความดัน ประมาณ 15 นาที่ เพื่อควบคุมสถานะของน้ำในสถานะของเหลว โดยไม่ต้องใช้สารเคมีในการเร่ง ปฏิกิริยา การปรับสภาพวิธีนี้สามารถละลายโครงสร้างเอมิเซลลูโลส และลิกนินได้น้อยกว่าการใช้ วิธีการระเหิดด้วยไอน้ำ จึงทำให้เกิดสารยับยั้งน้อยกว่า และเกิดตะกอนของลิกนินน้อยกว่า (Mood *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2009) นอกจากนี้มีรายงานว่า การใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายชีวมวล จะเพิ่มขึ้นหลังผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ (Weil *et al.*, 1998)

### 2.6.3.2 การฉายรังสีไมโครเวฟ (Microwave irradiation)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้รังสีไมโครเวฟในการปรับสภาพ เป็นการถ่ายเทพลังงานของรังสีไปสู่ โครงสร้างโมเลกุลของวัสดุ ความร้อนที่เกิดขึ้นจะทำให้โครงสร้างผลึกของเซลลูโลสเกิดการ เปลี่ยนแปลง ช่วยกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ตลอดจนช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ได้ดีขึ้น (ณัฐธิดา, 2557)

### 2.6.3.3 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (Ammonia fiber explosion, AFEX)

เป็นการใช้แอมโมเนียเหลวร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยทำให้ชีวมวล สัมผัสกับแอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิปานกลาง (60-120 องศาเซลเซียส) ภายใต้ความดันสูง (1.72-2.06 เมกะพาสคาล) เป็นเวลา 30 นาที กลไกการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ทำให้ของเหลวเกิดสภาวะเป็น กรด ทำให้เกิดการย่อยสลายเกิดขึ้นโดยเฉพาะเฮมิเซลลูโลส (Puri and Mamers, 1983; Kumar *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่เหมาะกับวัสดุที่มีลิกนินสูง และยังเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูงกว่าวิธีการ ระเบิดด้วยไอน้ำอีกด้วย (Cheng, 2009)

### 2.6.3.4 การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide explosion)

วิธีการนี้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากกรดคาร์บอนิกในการเพิ่มอัตราการ ย่อยสลายขั้นต่อไป (ปฐมา และคณะ, 2551) โดยโมเลกุลที่มีขนาดเล็กของแก๊สสามารถแทรกซึมผ่าน รูพรุนของโครงสร้างลิกนินเซลลูโลสได้ ข้อดีของวิธีการนี้คือไม่เกิดความเป็นพิษ และไม่ทำให้เกิดไฟ ซึ่ง วิธีการนี้ได้ผลผลิตต่ำกว่าการใช้ไอน้ำหรือแอมโมเนีย แต่ไม่เกิดสารยับยั้งที่เป็นพิษต่อการหมัก (Mood *et al.*, 2013)

### 2.6.3.5 การย่อยเปียก (Wet oxidation)

โดยใช้ออกซิเจน และอากาศเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา นิยมใช้ถัง หมักชีวภาพในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำภายใต้แรงดัน และเวลาสั้น โดยทั่วไปจะใช้เวลา 10-15 นาที อุณหภูมิ 170-200 องศาเซลเซียส และความดันระหว่าง 10-12 บาร์ นิยมใช้ในการผลิตเอทานอลใน ขบวนการหมักแบบการย่อยให้เป็นน้ำตาลและหมักในขั้นตอนเดียวกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) (รัชพล, 2558)

## 2.6.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

เป็นการใช้จุลินทรีย์ปรับสภาพของวัตถุดิบเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของเซลลูโลส เช่น ราสีน้ำตาล (brown-rot fungi) จะย่อยเซลลูโลส ส่วนราสีขาว (white-rot fungi) และราผุอ่อน (soft-rot fungi) จะย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ราขาวซึ่งจัดอยู่ใน Class Basidiomycetes เป็น ตัวเลือกที่ดีที่สุดในการปรับสภาพทางชีวภาพ สามารถผลิตเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) หลายชนิด ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายโครงสร้างลิกนินได้ (Singh *et al.*, 2014) ข้อดีของกระบวนการนี้ คือ สามารถทำได้ในสภาวะปกติ ใช้พลังงานน้อย ไม่ ใช้สารเคมีในกระบวนการ ทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีค่าใช้จ่ายต่ำ แต่กระบวนการปรับสภาพ ทางชีวภาพต้องอาศัยเวลานาน เนื่องจากสภาวะที่ใช้ไม่รุนแรง อัตราการย่อยสลายค่อนข้างต่ำ ใช้ พื้นที่ในการผลิตมาก จึงไม่ค่อยเหมาะสมในการนำมาใช้จริง (สุภาวดี, 2557)

มีการรายงานถึงการเตรียมกากมันสำปะหลังโดยวิธีทางชีวภาพซึ่งอาศัยครูดเอนไซม์ เซลลูเลส จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* เพื่อเปลี่ยนเซลลูเลสในกากมันให้กลายเป็นน้ำตาล จากนั้นจึงใช้ยีสต์มาหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล (ผ่องศรี และคณะ, 2550) วิธีการนี้มีข้อดี คือ ใช้ พลังงานต่ำภายใต้สภาวะที่ไม่รุนแรง ไม่ก่อให้เกิดสารยับยั้งต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ และไม่

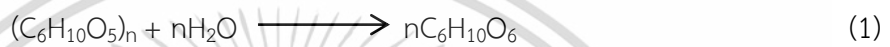
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามอัตราการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์นั้นใช้เวลานานมาก (สุขใจ, 2554)

## 2.7 การย่อยสลาย

การย่อยสลายหรือไฮโดรไลซิส คือ การย่อยสลายสายพอลิเมอร์ทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสให้สั้นลงกลายเป็นน้ำตาลอิสระก่อนที่จะนำไปหมักเป็นเอทานอลโดยใช้กรด ต่าง หรือ เอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งการย่อยสลายสามารถทำให้โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนไปเป็น น้ำตาลไซโลส แมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส ส่วนเซลลูโลสเปลี่ยนไปเป็นกลูโคส (Palmqvist and Hahn- Hägerdal, 2000) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์คือกลูโคส ดังสมการ (1) (สิริวรรณ, 2554)



ในปัจจุบันการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่นิยมใช้ในการวิจัยเพื่อผลิตเอทานอลมี 2 วิธี คือ

### 2.7.1 การย่อยสลายด้วยกรด (Acid hydrolysis)

เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและค่าใช้จ่ายไม่สูง ในการย่อยสลายวัสดุลิกโนเซลลูโลส สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีตามชนิดของกรดที่ใช้ ดังนี้

**2.7.1.1 การใช้กรดเข้มข้น (Concentrated acid hydrolysis)** เช่น กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น โดยปกติใช้ความเข้มข้นของกรดร้อยละประมาณ 10–30 กระบวนการนี้สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลลูโลสไปเป็นกลูโคสได้อย่างอย่างรวดเร็ว ด้วยสภาวะการย่อยที่รุนแรงของวิธีนี้ทำให้เกิดการฟุกร่อนของเครื่องมือ และจำเป็นต้องของการกำจัดกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้

**2.7.1.2 การใช้กรดเจือจาง (Dilute acid hydrolysis)** นิยมใช้กรดซัลฟูริกซึ่งเป็นกรดที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เป็นวิธีเก่าแก่ที่นิยมใช้เพื่อปรับสภาพวัสดุลิกโนเซลลูโลส กรดที่ใช้แล้วจำเป็นต้องทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาวหรือแคลเซียมคาร์บอเนตก่อนนำกลับมาใช้ใหม่ (ชัชฉันทน์ และเฉลิม, 2555) โดยทั่วไปการย่อยด้วยกรดเจือจางนี้มักใช้ร่วมกับสภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง แต่มักก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงคือสารอนุพันธ์ฟูแรนซึ่งจะไปขัดขวางการย่อยสลายโครงสร้างของวัสดุไปเป็นน้ำตาลได้น้อยลง มากกว่านั้นยังมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์และการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งส่งผลต่อการผลิตเอทานอลอีกด้วย (Balat, 2011)

### 2.7.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)

เป็นการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายสายวัสดุลิกโนเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลโดยอาศัยเอนไซม์ที่ได้มาจากเชื้อราและแบคทีเรีย ด้วยองค์ประกอบในโครงสร้างของวัสดุลิกโนเซลลูโลสที่มีความแตกต่างกันจำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดเพื่อให้เกิดความจำเพาะเจาะจงต่อสับเตรทในการทำปฏิกิริยาสูง จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และยังไม่ทำให้เกิดการฟุกร่อนของเครื่องมือ (ธีรภัทร, 2551) อย่างไรก็ตามโครงสร้างของวัสดุประเภทนี้ทำให้เกิดการขัดขวางการย่อยสลายโดยเอนไซม์จึงมักใช้เวลานานในการย่อย เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาย่อยสลาย คือ เอนไซม์เซลลู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่เสียค่าใช้จ่าย  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากรา *Trichoderma viride* โดยแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ได้ 3 ชนิด ที่ทำงานร่วมกัน (สิริวรรณ, 2554; ศุภรินทร์, 2553) ดังนี้

**2.7.2.1 เอ็นโดกลูคาเนส (Endoglucanase)** ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส โดยตัดพันธะ  $\beta$ -1,4 glycosidic แบบสุ่มภายในสาย ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือโอลิโกแซคคาไรด์

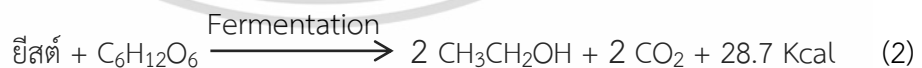
**2.7.2.2 เอ็กโซกลูคาเนส (Exoglucanase)** ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลาย non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือเซลโลไบโอส

**2.7.2.3 เบต้า-กลูโคซิเดส ( $\beta$ -Glucosidase)** ทำหน้าที่ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ และเซลโลไบโอสให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส

## 2.8 กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 2 วิธี ได้แก่ (1) กระบวนการสังเคราะห์เคมี (Chemical synthesis) ซึ่งใช้เอทิลีน ( $C_2H_4$ ) เป็นวัตถุดิบ และ (2) กระบวนการหมัก (Fermentation) โดยใช้จุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล (ศุภรินทร์, 2553) ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีมีราคาต้นทุนวัตถุดิบที่สูง และมีกระบวนการผลิตค่อนข้างยุ่งยาก พร้อมทั้งในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีการหมักมากขึ้นจึงหันมาใช้วิธีนี้ในการผลิตเอทานอลซึ่งอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์แทน โดยจุลินทรีย์ที่นิยมใช้มากที่สุดนั้นก็คือยีสต์

ขั้นตอนการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส ภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยให้เป็นแอลกอฮอล์ ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) ยีสต์จะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสในการหายใจ สำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic) ยีสต์จะสร้างเอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานจากการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ผ่านวิถีเอมบีเดน-ไทเยอร์ฮอฟ (embden-Meyerhof pathway) หรือวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) (จิรัชศักดิ์, 2551) ตามทฤษฎีแล้ว น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล สามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ 2 โมเลกุล คิดเป็นร้อยละ 51.11 โดยน้ำหนัก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล คิดเป็นร้อยละ 48.89 โดยน้ำหนัก ดังสมการ (2) (กล้าณรงค์ และคณะ, 2548) แต่ในทางปฏิบัติปริมาณเอทานอลจะได้น้อยกว่านี้ เนื่องจากน้ำตาลส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้างชีวมวลของเชื้อ และมีการสร้างผลพลอยได้อื่นๆ เช่น กลีเซอรอล และกรดอินทรีย์ (Boulton and Quain, 2006)



ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลนั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ ชนิดและความเข้มข้นของสับสเตรท ธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่างๆ ค่า pH เริ่มต้นของอาหาร อุณหภูมิ และการปรับสภาพวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก (พงษ์ศักดิ์, 2552) เนื่องจากปัจจัยสำคัญเหล่านี้มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ และการหมักเอทานอล โดยทั่วไปกระบวนการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมี 2 วิธีการ คือ กระบวนการหมักแบบ Separate hydrolysis and fermentation (SHF) หมายถึงการหมักเอทานอล โดยการย่อยสลายให้เป็นน้ำตาล แยกจากการหมัก ซึ่งมีหลายขั้นตอน ต้องทำในถังปฏิกรณ์มากกว่า 1 ถัง ทำให้ต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ในการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และบางกรณีอาจให้ผลผลิตต่ำกว่า และกระบวนการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) หมายถึงการหมักเอทานอลโดยการย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมักวิธีนี้จะทำให้เป็นน้ำตาล และเกิดการหมักในถังปฏิกรณ์เดียวกันสามารถแก้ไขข้อเสียจากวิธีการแรกได้

เวสารัช และคณะ (2557) ศึกษาการการใช้ประโยชน์จากปอควินา (*Hibiscus cannabinus* L.) เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5019 และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล 2 วิธี คือ กระบวนการหมักแบบ SHF และ SSF พบว่า กระบวนการหมักแบบ SSF มีความสามารถในการผลิตมากกว่า SHF โดย SSF ให้ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นสูงสุด และอัตราผลผลิตเอทานอล เท่ากับ 7.66 กรัมต่อ 100 กรัมของสารตั้งต้น และ 0.07 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการหมักด้วยวิธีการหมักแบบ SHF ให้ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นสูงสุด และอัตราผลผลิตเอทานอล เท่ากับ 1.70 กรัมต่อ 100 กรัมของสารตั้งต้น และ 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

กล้าณรงค์ และคณะ (2548) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยอาศัยกระบวนการหมักที่มีการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาล และหมักแบบ SSF โดยนำน้ำเชื่อมที่ผ่านการย่อยครั้งแรกด้วยเอนไซม์อะไมเลสมาผสมกับเอนไซม์กลูโคสอะไมเลสพร้อมกับเชื้อยีสต์ ซึ่งกระบวนการ SSF สามารถลดระยะเวลาการหมักได้เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม (Conventional Fermentation)

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแล้ว เอทานอลที่ได้จะถูกนำไปกลั่นเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล เนื่องจากเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักมีความเข้มข้นอยู่ในช่วงร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร และการนำเอทานอลไปใช้เป็นเชื้อเพลิงนั้นจำเป็นต้องแยกเอทานอลให้ได้ความบริสุทธิ์ถึงร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร อย่างไรก็ตามการกลั่นที่ความดันบรรยากาศจะได้เอทานอลเพียงร้อยละ 95 โดยปริมาตร ดังนั้นจำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นๆ มาช่วยแยกน้ำออกจากเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เช่น กระบวนการแยกด้วยเมมเบรน หรือกระบวนการแยกโดยการให้เอทานอลไหลผ่านวัสดุที่มีรูพรุนสูง (วิธีโมเลกุลาร์ซีฟ) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2551)

สำหรับการผลิตเอทานอลจากผลพลอยได้ทางการเกษตรนั้นจำเป็นต้องมีการเพิ่มแหล่งไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุที่จำเป็นให้แก่ยีสต์ โดยแหล่งไนโตรเจนมีความจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์กรดอะมิโน พิวรีน ไพริมิดีน คาร์โบไฮเดรตบางชนิด ลิปิด เอนไซม์ โคแฟกเตอร์และสารชนิดอื่นๆ แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรต ( $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ) และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เช่น เพปโตน และยีสต์สกัด (yeast extract) (สุขใจ, 2554) อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสูตรสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับยีสต์เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลซึ่งมีหลายสูตรด้วยกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ได้เลือกใช้และวัตถุประสงค์ของงาน งานวิจัยของ Alfenore *et al.* (2002) รายงานว่า การเติมวิตามินรวมหลายชนิด จะส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของยีสต์ และให้ผลได้เอทานอลเพิ่มขึ้น

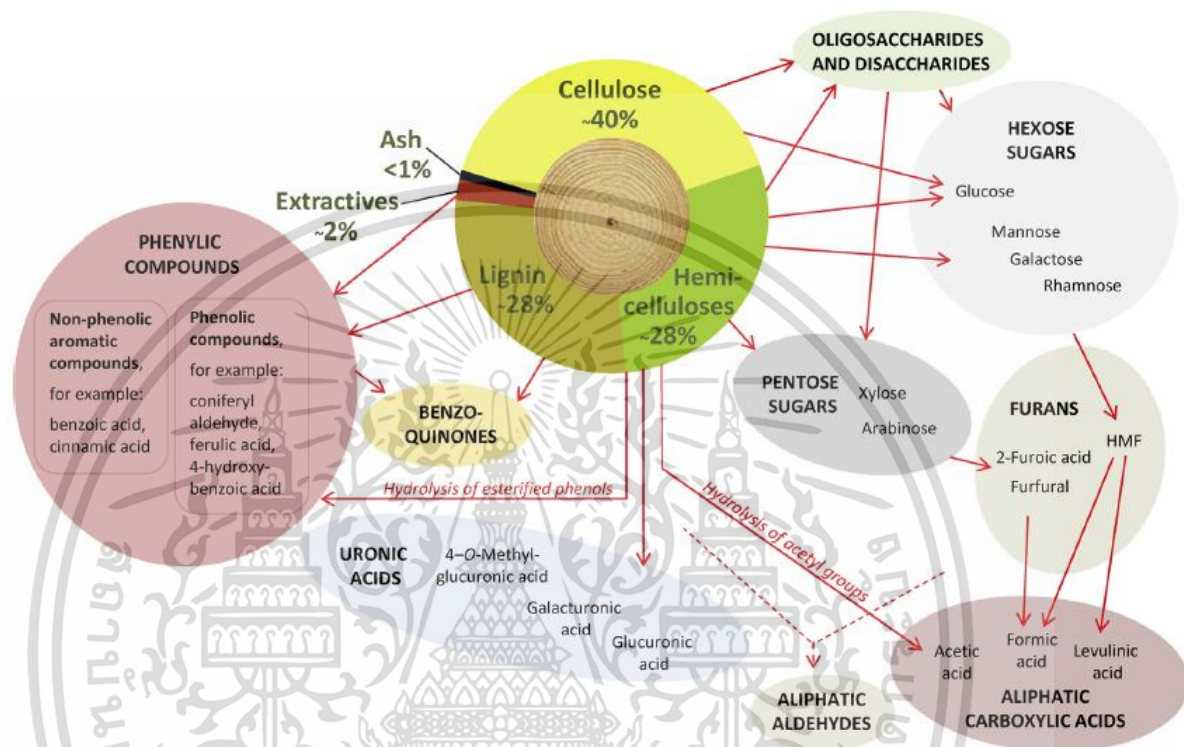
## 2.9 สารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยสลายด้วยกรดร่วมกับการใช้ความร้อน

การปรับสภาพวัตถุดิบจำพวกผลพลอยได้จากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง (กากหรือเปลือก) สามารถเตรียมได้โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน (Srinorakutara *et al.*, 2006; กัลยา และคณะ, 2548; Agu *et al.*, 1997) กรดจะเข้าไปทำปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สลายพันธะ  $\beta$ -1,4 glycosidic ของโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้แตกออก ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากขึ้น เช่น กลูโคส กาแลคโตส แมนโนส ไซโลส และอะราบินโนส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ยิ่งไปกว่านั้นยังมีผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้อื่นๆ ที่อาจเกิดจากการเปลี่ยนแปลงหรือสลายตัวของโครงสร้างวัสดุเองหรือน้ำตาลรีดิวซ์ต่อไปเป็นสารประกอบอื่นได้อีก ดังแสดงในภาพที่ 2.9 นอกจากนี้ยังทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าน้อยลง (สิริวรรณ, 2554)



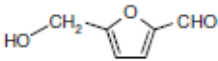
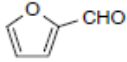
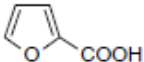
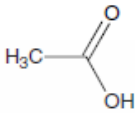

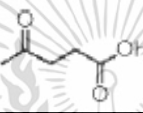

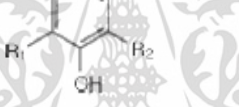
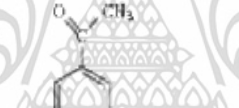
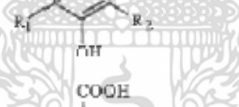
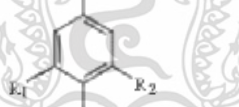
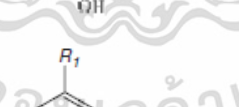
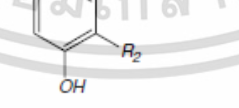
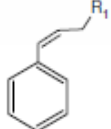
ภาพที่ 2.9 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายวัสดุชีวภาพจากเซลลูโลสภายใต้สภาวะที่เป็นกรด

ที่มา: Jönsson and Martin, 2016

อย่างไรก็ตาม สารประกอบบางตัวที่เกิดขึ้นในระหว่างการเตรียมวัสดุชีวภาพจากเซลลูโลส โดยใช้ความร้อนสูงภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดร่วมด้วยนั้นส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์เกิดขึ้น (Parajó *et al.*, 1998) ได้แก่ เฟอพิวรัล 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดลิวลินิก (Larsson *et al.*, 1999) (ตารางที่ 2.2) การเกิดสารยับยั้งเหล่านี้ในรูปแบบของสารผสม พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยลดประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการหมักเอทานอลได้มากกว่าการเกิดสารยับยั้งเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง (Mussatto and Roberto, 2004; Palmqvist *et al.*, 1999b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 สารยับยั้งทั่วไปที่เกิดขึ้นในสารละลายจากการย่อยสลายวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส

กลุ่มของสารยับยั้ง	ตัวอย่างสารยับยั้ง
Furan derivatives	   hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF) 2-Furaldehyde 2-Furoic acid
Aliphatic acids	   Acetic acid Formic acid Levulinic acid
Phenolic compounds	        $R_1 = R_2 = \text{H}$ 4-hydroxybenzaldehyde $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3$ Vanillin $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$ Syringaldehyde $R_1 = R_2 = \text{H}$ 4-hydroxyacetophenone $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3$ Acetovanillone $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$ Acetosyringone $R_1 = R_2 = \text{H}$ 4-hydroxybenzoic acid $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OCH}_3$ Vanillic acid $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$ Syringic acid $R_1 = R_2 = \text{H}$ Phenol $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{OH}$ Catechol $R_1 = \text{OH}, R_2 = \text{H}$ Hydroquinone $R_1 = \text{COOH}$ Cinnamic acid

ที่มา: Almeida *et al.* (2007)

ปริมาณและชนิดสารยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ และกระบวนการที่ใช้ย่อยสลายวัตถุดิบ โดยแบ่งสารพิษออกเป็น 4 ประเภทตามแหล่งกำเนิด (Mussatto and Roberto, 2004) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.9.1 สารยับยั้งที่เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาล

ในระหว่างการย่อยสลาย น้ำตาลกลุ่มเพนโทสถูกสลายไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นโดยกระบวนการดีไฮเดรชัน (dehydration) ต่อได้เป็นเฟอพิวรัล ซึ่งสามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ และผลได้มวลเซลล์ ส่วนการสลายตัวของน้ำตาลกลุ่มเฮกโซสสามารถเกิดเป็นสารยับยั้งได้เช่นกัน คือ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล ซึ่งมีอิทธิพลในการยับยั้งได้เช่นเดียวกับเฟอพิวรัล แต่มีความเป็นพิษน้อยกว่า อย่างไรก็ตามในสารละลายหลังการย่อยมักพบสารยับยั้งชนิดนี้ในปริมาณมากกว่าเฟอพิวรัล (Almeida *et al.*, 2007) ทั้งนี้เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล สามารถสลายไปเป็นกรดฟอร์มิก ส่วน 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล ก็สามารถสลายต่อได้เป็นกรดลิวูลินิก

### 2.9.2 สารยับยั้งที่เกิดจากการสลายตัวของลิกนิน

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายโครงสร้างลิกนินส่วนใหญ่ คือสารประกอบฟีนอลิก โดยสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำจะมีความเป็นพิษต่อกระบวนการหมักมากที่สุด (Ando *et al.*, 1986) Parajó *et al.* (1998) รายงานว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของลิกนินมีความรุนแรงต่อเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล แม้จะพบในปริมาณต่ำก็ตาม

### 2.9.3 สารยับยั้งที่มาจากองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส

สารยับยั้งในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid) ซึ่งได้จากการย่อยสลายของหมู่อะซิติกที่พบในเฮมิเซลลูโลส และสารแทรกที่อยู่องค์ประกอบภายนอกในวัสดุลิกโนเซลลูโลส เช่น เรซิน (resin) แทนนิก (taninic) และ เทอร์พีน (terpene) โดยสารแทรกที่เกิดขึ้นนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์น้อยกว่าอนุพันธ์จากการสลายโครงสร้างลิกนินหรือกรดอะซิติก

### 2.9.4 ไอออนของโลหะหนัก

ไอออนของโลหะหนัก ได้แก่ เหล็ก โครเมียม นิกเกิล และทองแดง ที่เกิดจากการกัดกร่อนของอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยด้วยกรด มีผลทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ในเมตาบอลิซึมและกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการหมัก (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000)

## 2.10 กลไกการยับยั้งของสารยับยั้ง

### 2.10.1 อนุพันธ์ฟูแรน (furan derivatives)

สารยับยั้งจากอนุพันธ์ฟูแรน เช่น 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล และเฟอพิวรัล จะไปทำให้การผลิตชีวมวล อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ และการผลิตเอทานอลน้อยลง และยังส่งผลให้ระยะปรับตัวนานขึ้น นอกจากนี้เฟอพิวรัลสามารถเปลี่ยนไปเป็นเฟอพิวรัลแอลกอฮอล์ (furfuryl alcohol) ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของเชื้อเช่นกัน ระดับความเป็นพิษขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารยับยั้งและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก Roberto *et al.* (1991a) รายงานว่า ความเข้มข้นของเฟอพิวรัลในปริมาณต่ำส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pichia stipites* ที่ใช้ในการหมักเอทานอล แต่เมื่อความเข้มข้นมากกว่า 2 กรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เกือบเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สมบูรณ์ นอกจากนี้ Liu *et al.* (2004) ทำการศึกษาผลของการใช้สารยับยั้งทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกัน พบว่ามีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์มากกว่าการมีสารยับยั้งเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง

กลไกการยับยั้งเกิดจากสารทั้ง 2 ชนิดนี้เหมือนกัน คือ ไปยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ไพรูเวทดีไฮโดรจีเนส (pyruvate dehydrogenase) และแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) รวมทั้งเอนไซม์ และโคแฟกเตอร์ในวิถีไกลโคไลซิส เพอพิวริลยังสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแควิวโอล และไมโตคอนเดรียได้อีกด้วย โดยทั่วไปอธิบายกลไกการยับยั้งของสารชนิดนี้ว่า ยีสต์จำเป็นต้องลดการใช้ ATP และ NAD(P)H ภายในเซลล์ รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการใช้โคแฟกเตอร์เพื่อซ่อมแซมการทำลายที่เกิดขึ้น (Almeida *et al.*, 2007)

### 2.10.2 กรดอ่อน (weak acids)

กรดอ่อนที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลาย ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และ กรดลิวลินิก ทำให้เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักโดยไปลดการผลิตชีวมวล และเอทานอล นอกจากนี้มีการรายงานที่ กรดอ่อนทำให้ลดการดูดซึมของกรดอะมิโนในอาหารทำให้เกิดการยับยั้ง การเจริญของเชื้อยีสต์ (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000 ; Almeida *et al.*, 2007) กระบวนการยับยั้งของกรดอ่อนประกอบไปด้วยกลไก 2 ขั้นตอน คือการแตกตัว และการสะสมประจุลบภายในเซลล์ มีรายงานว่า กรดอ่อนที่มีความเข้มข้นเท่ากันมีความเป็นพิษต่างกันเนื่องจากความสามารถในการแพร่เข้าไปในเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และความเป็นพิษของประจุลบในกรดอ่อนแต่ละชนิดแตกต่างกัน

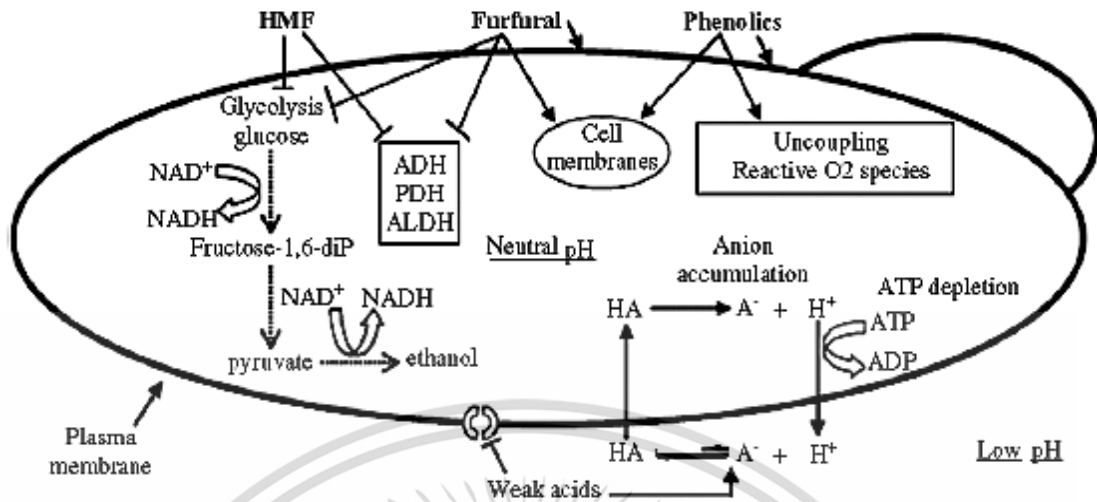
กรดอ่อนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะอยู่ในรูปไม่แตกตัว เมื่อแพร่เข้าไปในไซโทพลาสซึมของเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แล้วจะเกิดการแตกตัวของกรด ค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์จึงลดต่ำลง ดังนั้นกระบวนการปรับสภาพให้เป็นกลางภายในเซลล์จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของ ATPase ในเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขับโปรตอนออกนอกเซลล์ เป็นผลให้เซลล์ผลิตชีวมวลได้น้อยลง อย่างไรก็ตามกรดอ่อนที่มีความเข้มข้นต่ำจะช่วยส่งเสริมการผลิตเอทานอลได้ดีขึ้น โดยเชื่อว่าจะจะไปกระตุ้นการทำงานของ ATPase และขับโปรตอนมากขึ้น ทำให้ ATP เพิ่มขึ้น จึงสามารถรักษาระดับค่าความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ได้ แต่เมื่อความเข้มข้นของกรดมากขึ้น ทำให้เซลล์ขาดความสามารถในการขับโปรตอน ปริมาณ ATP ในไซโทพลาสซึมของเซลล์จึงหมดไป จึงเกิดความเป็นกรดขึ้น ส่งผลให้การผลิตเอทานอลลดลงด้วย

### 2.10.3 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งกระบวนการหมักได้ โดยพบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่มีมวลโมเลกุลต่ำมีฤทธิ์ยับยั้งในกระบวนการหมักมากกว่าสารประกอบฟีนอลิกที่มีมวลโมเลกุลสูง เนื่องจากสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำสามารถแทรกอยู่ในโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ทำให้เซลล์สูญเสียความแข็งแรง และยังมีผลต่อการควบคุมการเข้าออกของสารและเอนไซม์ต่างๆ มีผลทำให้การเจริญเติบโตและดูดซึมน้ำตาลโดยเชื้อจุลินทรีย์ลดลง นอกจากนี้ตำแหน่งของหมู่แทนที่พารา (para-) ออร์โธ (ortho-) และ เมตา (meta-) ในสารประกอบก็มีส่วนทำให้เกิดความเป็นพิษได้เช่นกัน (Mussatto and Roberto, 2004; Almeida *et al.*, 2007) กลไกการยับยั้งจากอนุพันธ์ฟูแรน กรดอ่อน และสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดขึ้นในเซลล์ของยีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 2.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.10 กลไกการยับยั้งที่เกิดขึ้นในเซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* จากอนุพันธ์ฟูแรน กรดอ่อน และสารประกอบฟีนอลิก

ที่มา: Almeida *et al.*, 2007

## 2.11 การลดความเป็นพิษของสารยับยั้งที่เกิดระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ

เนื่องจากกระบวนการเตรียมวัตถุดิบก่อให้เกิดสารยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ซึ่งส่งผลต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดขึ้น จึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพสัปดาห์แรกที่ได้หลังการย่อยเพื่อลดความเป็นพิษจากสารยับยั้งดังกล่าวให้เหมาะสมต่อระบบเมตาบอลิซึมของเชื้อ และเพื่อที่จะเพิ่มศักยภาพการผลิตเอทานอลในยุคที่สองให้ทัดเทียมกับยุคแรกได้ สิ่งที่จะต้องทราบก่อนที่จะเลือกวิธีการลดความเป็นพิษของสารยับยั้ง คือ ประเภทของสารยับยั้งที่เกิดขึ้น (Fernandes *et al.*, 2012) แนวทางที่จะลดความเข้มข้นของสารยับยั้ง มีดังนี้ (1) ป้องกันการเกิดสารยับยั้งในระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ (2) การลดความเป็นพิษก่อนจะเข้าสู่กระบวนการหมัก (3) การพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ให้สามารถทนต่อสารยับยั้งนั้นๆ ได้ และ (4) เปลี่ยนสารพิษให้เป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่รบกวนระบบเมตาบอลิซึม (Taherzadeh *et al.*, 2000b)

การลดความเป็นพิษประกอบไปด้วย (1) วิธีทางชีวภาพ (2) วิธีทางกายภาพ และ (3) วิธีทางเคมี (Mussatto and Roberto, 2004)

### 2.11.1 วิธีทางชีวภาพ

เป็นการใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะ หรือการใช้จุลินทรีย์ในการลดความเป็นพิษของสารยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งต้องการพลังงานที่ใช้ในระบบต่ำ อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดที่ต้องอาศัยเวลาในการเกิดปฏิกิริยา และอาจมีการสูญเสียของน้ำตาลเกิดขึ้น (Yang and Wyman, 2008)

#### 2.11.1.1 การปรับสภาพเชื้อ

การปรับสภาพของเชื้อจุลินทรีย์ให้ทนต่อสภาพแวดล้อมในสารละลาย หรือสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยปรับปรุงผลได้ของเอทานอลเป็นเอทานอลที่สวนงไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตภัณฑ์ (Silva and Roberto, 2001) เช่น ในการศึกษาการพัฒนาเชื้อ *P. stipitis*, *C. shehatae* และ *P. tanophilus* ให้ทนต่อสารยับยั้ง โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งตามลำดับ วิธีการนี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะที่มีสารยับยั้งได้ดีขึ้น (Tomás-Pejó *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2007)

Silva and Roberto (2001) ศึกษาการปรับสภาพเชื้อ *C. guilliermondii* ในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าว เพื่อใช้ในการผลิตไซลิตอล (xylitol) พบว่ากระบวนการดังกล่าวนี้ได้ผลดี และมีค่าใช้จ่ายไม่สูง

Pornpukdeewattana *et al.* (2014) ทำการปรับสภาพเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยพบว่าเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพให้ผลได้เอทานอลสูงกว่าเชื้อที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ

#### 2.11.1.2 การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการลดความเป็นพิษ

กระบวนการนี้ทำโดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส เพื่อให้จุลินทรีย์นั้นลดความเป็นพิษของสารยับยั้งโดยการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของสารนั้นๆ (López *et al.*, 2004) กระบวนการนี้จะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายของกระบวนการผลิตเอทานอล โดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์พวกยีสต์ รา แบคทีเรียที่ไม่ผ่าน หรือผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมที่มีเอนไซม์แลกเคส (laccase) หรือเพอรอกซิเดส (peroxidase)

Nichols *et al.* (2008) พบว่าเชื้อ *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616 สามารถเมตาโบไลต์เพอพิวรัล ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรัล สารอะโรมาติก และแอลดีไฮด์ ที่มีอยู่ในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายซังข้าวโพด

Okuda *et al.* (2008) ใช้เชื้อ *Ureibacillus thermosphaericus* ลดความเป็นพิษในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย waste house wood การศึกษาพบว่าเชื้อนี้สามารถย่อยเพอพิวรัล และไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรัลที่มีอยู่ในสารละลายที่สังเคราะห์ขึ้น อีกทั้งยังสามารถย่อยสารประกอบฟีนอลิกที่มีในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย waste house wood โดยเชื้อนี้เจริญได้อย่างรวดเร็ว และใช้น้ำตาลในระบบต่ำกว่าร้อยละ 5

2.11.1.3 การใช้ high cell density ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพการผลิตจำเพาะโดยมวล (cell specific productivity) และความเข้มข้นมวลชีวภาพ มีรายงานว่า การเติมหัวเชื้อจำนวนมาก (high cell mass inoculums) สามารถทนต่อสารยับยั้งในระบบได้ (Purwadi *et al.*, 2007) Brandberg *et al.* (2007) เสริมว่า การควบคุมระบบให้มีเชื้อเริ่มต้นจำนวนมากจะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงขึ้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังไม่ได้รับความสนใจในระดับโรงงาน (Jönsson *et al.*, 2013)

2.11.1.4 การใช้เอนไซม์ในการลดความเป็นพิษ นิยมใช้เอนไซม์ laccase และ peroxidase ที่ผลิตจากเชื้อราสีขาวในการลดปริมาณสารยับยั้งจากสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดขึ้น โดยไปทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟพอลิเมอไรเซชัน (oxidative polymerization) (Chandel *et al.*, 2011)

Jönsson *et al.* (1998) รายงานผลของการลดสารพิษในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายไม้ด้วยเอนไซม์ laccase และ peroxidase ที่ผลิตจากเชื้อรา *Trametes versicolor* โดยพบว่าเชื้อใช้น้ำตาลได้ดีขึ้น และมีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลที่สูงขึ้น เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ไปเปลี่ยนโครงสร้างของกรด และสารประกอบฟีนอลิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 2.11.2 วิธีทางกายภาพ

วิธีทางกายภาพ เช่น การใช้การระเหยแบบสุญญากาศ (vacuum evaporation) การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) และการสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction) เป็นต้น (Jönsson and Martín, 2016) Converti *et al.* (2000) รายงานว่า การลดความเป็นพิษของสารยับยั้งด้วยการระเหยแบบสุญญากาศ สามารถลดปริมาณสารประกอบที่ระเหยง่ายในสารละลายที่ย่อยได้จากวัสดุลิกโนเซลลูโลส รวมทั้งกรดอะซิติก และเฟอพิวรัล อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะทำให้สารประกอบที่ระเหยไม่ได้เพิ่มขึ้น เช่น สารแทรก และสารยับยั้งที่เกิดจากการสลายตัวของลิกนิน นอกจากนี้การแยกโดยใช้เยื่อกรอง (membrane separation) ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งในการกำจัดสารยับยั้งกรดอะซิติกได้ (Chandel *et al.*, 2011)

### 2.11.3 วิธีทางเคมี

วิธีทางเคมี เช่น การทำสารละลายให้เป็นกลาง (neutralization) โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าประมาณ 6-7 ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการหมักโดยการเติมด่าง เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) หรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{NaOH}$ ) ซึ่งสามารถลดความเป็นพิษที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งการปรับสภาพสารละลายที่ได้หลังการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจางโดยการเติมปูนให้มากเกินไป (overliming) โดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ( $\text{Ca}(\text{OH})_2$ ) หรือแคลเซียมออกไซด์ ( $\text{CaO}$ ) (Yang and Wyman, 2008) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีค่าใช้จ่ายไม่สูง โดยทั่วไปมักเติมปูนจนกระทั่งสารละลายมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 9-11 แล้วจะทำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมซัลเฟต (Mohagheghi *et al.*, 2006) ทั้งนี้ยังช่วยในการกำจัดลิกนิน และเพิ่มปริมาณการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย Chandel *et al.* (2011) รายงานว่า การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ช่วยกำจัดสารยับยั้งเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัลได้

นอกจากนั้นการดูดซับสารยับยั้งยังมีอีกหลายวิธี ได้แก่ การใช้ถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ไตอะตอมมาเซียสเอิร์ธ (diatomaceous earth) และการใช้ระบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange resins) เป็นต้น (Mussatto and Roberto, 2004)

### บทที่ 3 อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

#### 3.1 วัสดุดิบ

3.1.1 กากมันสำปะหลังสด ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท โค้วซังเอี้ยะอุตสาหกรรมแป้งมันและสาคุ จำกัด อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี

#### 3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

3.2.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	Nikon, Japan
3.2.2 เครื่องกวนผสมสาร (Overhead stirrer)	IKA รุ่น RW 20 digital, Germany
3.2.3 เครื่องเขย่าสาร	New brunswick scientific รุ่น Innova 2100 USA.
3.2.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	N-Biotek รุ่น NB-205 VL, Korea
3.2.5 เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	Shimadzu รุ่น Nexera, Japan
3.2.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Mettler toledo รุ่น Dragon3002, USA.
3.2.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius รุ่น CPA3245, Germany
3.2.8 เครื่องบดแบบแฮมเมอร์ (Hammer mill)	
3.2.9 เครื่องบ่มเชื้อ	Memmert, Germany
3.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน	Hettich รุ่น EBA20, Norway
3.2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก	Heraeus รุ่น Pico 21, Germany
3.2.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ	Eppendorf รุ่น 5804R, Germany
3.2.13 เครื่องผสมละลาย (Vortex mixer)	Scientific industries รุ่น Vortex genie2, USA.
3.2.14 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Inolab PH level1, Germany
3.2.15 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	Shimadzu รุ่น UV-1601, Japan
3.2.16 โถดูดความชื้น (desiccator)	
3.2.17 ไมโครปิเปต	Sartorius รุ่น Proline, Germany
3.2.18 ไมโครเวฟ	Electrolux รุ่น EMS 3027X, PRC
3.2.19 ตะแกรงร่อน ขนาด 40 mesh	
3.2.20 ตู้เขี่ยเชื้อ	Bosstech รุ่น HBV120S, Thailand
3.2.21 ตู้อบลมร้อน	Heraeus, Germany
3.2.22 ตู้อบแห้งแบบถาด	Progress electronic, Thailand
3.2.23 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ	Tomy รุ่น SS-325, Japan
3.2.24 ฮีมาไซโตมิเตอร์	BOECO, Germany
3.2.25 เครื่องแก้วต่างๆ	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.3 สารเคมี

3.3.1 5-Hydroxy methyl furfural (5-HMF)	Sigma-aldrich, Singapore
3.3.2 Acetonitrile	Merk, Germany
3.3.3 Ammonium sulfate	Merk, Germany
3.3.4 Calcium chloride dihydrate	Merk, Germany
3.3.5 Calcium hydroxide	Merk, Germany
3.3.6 Ethanol 95%	Italmar, Thailand
3.3.7 Ethanol 99.5%	Merk, Germany
3.3.7 Furfural	Sigma-aldrich, Singapore
3.3.8 Glycerol	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.9 Isopropanol	Merk, Germany
3.3.10 Levulinic acid 98%	Sigma-aldrich, Singapore
3.3.11 Magnesium sulfate heptahydrate	Merk, Germany
3.3.12 Methylene violet	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.13 Phenol	RCI Labscan, Ireland
3.3.14 Phosphoric acid	RCI Labscan, Ireland
3.3.15 Potassium dihydrogen phosphate	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.16 Sodium acetate trihydrate	Merk, Germany
3.3.17 Sodium chloride	Merk, Germany
3.3.18 Sodium citrate	Merk, Germany
3.3.19 Sodium formate	Merk, Germany
3.3.20 Sodium hydroxide	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.21 Sulfuric acid 98%	RCI Labscan, Ireland

### 3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 Agar	SP scientific, Thailand
3.4.2 Bacto peptone	Difco, USA.
3.4.3 Dextrose	Zhucheng dongxiao biotechnology, China
3.4.4 Yeast extract	Difco, USA

### 3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.5.1. การเตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลัง

นำกากมันสำปะหลังสดไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งกากมันสำปะหลังแห้งเป็นเวลา 16 ชั่วโมง บดด้วยเครื่องบดแบบแฮมเมอร์ แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh เก็บรักษาในภาชนะที่แห้งและปิดให้มิดชิดที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### 3.5.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SC90 จากห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารยีสต์ YPD บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการต่อเชื้อใหม่ทุก 1 เดือน เชื้อจุลินทรีย์อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในรูปสารแขวนลอย เซลล์ในสารละลายกลีเซอรอลร้อยละ 30 ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

### 3.5.3 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ดัดแปลงจาก Silva *et al.* (2011) และ Pornpukdeewattana *et al.* (2014) โดยทำการแยกกล้าเชื้อยีสต์จากอาหารยีสต์ YPD 1 ลูกปลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่ได้ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์เข้มข้นร้อยละ 50 ก่อนนำไปใช้ โดยนำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงไปเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนใสเก็บไว้ แล้วเติมส่วนใสกลับลงในเซลล์ยีสต์ด้วยอัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อส่วนใส 1:1 โดยน้ำหนัก แล้วทำการตรวจนับปริมาณเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

### 3.5.4 การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน

การย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้กรดร่วมกับการให้ความร้อนดัดแปลงจากวิธีของ Srinorakutara *et al.* (2006) ซึ่งรายงานว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง โดยชั่งกากมันสำปะหลัง 80 กรัม และเติมสารละลาย  $H_2SO_4$  ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร (อัตราส่วนกากมันสำปะหลังต่อกรดเท่ากับ 1:10 (w/v)) นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ในหม้อหม้อนึ่งฆ่าเชื้อเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง โดยแบ่งสารละลายที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน คือ

#### 1) สารละลายที่ไม่กำจัดสารพิษ

นำสารละลายไปกรองกากมันออกด้วยผ้าขาวบาง ปรับค่า pH ให้เป็นกลางเท่ากับ 5.5 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 10 โมลาร์ จากนั้นนำสารละลายที่ย่อยได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนกากมันออกที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

#### 2) สารละลายที่กำจัดสารพิษ

การกำจัดสารพิษในสารละลายออก (detoxification) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Akaracharanya *et al.* (2011) โดยกรองกากมันสำปะหลังในสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยกรดเจือจางออกด้วยผ้าขาวบาง ปรับค่า pH ให้เป็นเท่ากับ 10 ด้วยผง  $Ca(OH)_2$  ทำการกวนต่อเป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปรับค่า pH ให้เป็นกลาง เท่ากับ 5.5 ด้วยกรด  $H_2SO_4$  เข้มข้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

นำสารละลายไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) วิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดในสารละลาย ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) ดัดแปลงจากวิธีการของ Sluiter *et al.* (2012) และสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก เพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรัล ด้วยเทคนิค HPLC แล้วเก็บสารละลายจากมันสำปะหลังพร้อมใช้ไว้ในภาชนะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

### 3.5.5 การศึกษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างโดยใช้กรดเจือจาง

เตรียมอาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารยับยั้งแต่ละชนิดดังนี้ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิกในรูปเกลือ ระดับความเข้มข้นละ 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ เพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรัล ระดับความเข้มข้นละ 6.25 12.5 18.75 และ 25 มิลลิโมลาร์ ควบคุมค่า pH ของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลาย H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> หรือสารละลาย NaOH และทำการฆ่าเชื้อ จากนั้นถ่ายกล้ำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ลงในอาหารโดยควบคุมให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มีชีวิต  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72-120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 1 2 4 8 12 18 24 36 48 60 และ 72 ติดตามการเจริญของเชื้อยีสต์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง (Charoenrat *et al.*, 2013) เปรียบเทียบผลกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมสารยับยั้ง

### 3.5.6 การปรับสภาพเชื้อยีสต์ให้สามารถทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเตรียมสารละลายน้ำตาลจากกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง

#### 3.5.6.1 การเตรียมอาหารปรับสภาพเชื้อยีสต์

ทำการเติมสารอาหารต่างๆ ลงในสารละลายจากกากมันสำปะหลังส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ ดังนี้ yeast extract 5 กรัมต่อลิตร (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 7.5 กรัมต่อลิตร KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3.5 กรัมต่อลิตร MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.75 กรัมต่อลิตร และ CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1.00 กรัมต่อลิตร (Kouteu Nanssou *et al.*, 2016) ปรับค่า pH ของอาหารให้เท่ากับ 5.5 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นถ่ายกล้ำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหาร ดำเนินการหมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำ 3 ซ้ำ นำน้ำหมักชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 72 มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) และปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดด้วยเทคนิค HPLC โดยปริมาณน้ำตาลที่ลดลงคือปริมาณน้ำตาลที่เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 สามารถนำไปใช้ในการหมัก (fermentable sugar) ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $46.52 \pm 0.56$  กรัมต่อลิตร

ทำการเตรียมอาหารปรับสภาพเชื้อยีสต์โดยนำสารละลายจากกากมันสำปะหลังส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ (100% v/v) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้อาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายจากมันสำปะหลังเท่ากับ 0% 20% 40% 60% 80% และ 100% (v/v) โดยอาหารในสภาวะควบคุม (0% v/v) จะไม่มีการเติมสารละลายจากมันสำปะหลัง ปรับปริมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

fermentable sugar ในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตรให้เท่ากับ 46.52 กรัมต่อลิตร ด้วยน้ำตาล กลูโคส และเติมสารอาหารต่างๆ ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ปรับค่า pH เป็น 5.5 และนำไปฆ่าเชื้อ

### 3.5.6.2 การปรับสภาพยีสต์

การปรับสภาพเชื้อดัดแปลงจากงานวิจัยของ Pornpukdeewattana *et al.* (2014) โดยทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งต่ำก่อน จากนั้นจึงเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งให้มากขึ้น โดยมีขั้นตอนดังนี้ ถ่ายยาล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มีชีวิต  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารสภาวะควบคุมปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1,000 มิลลิลิตร ดำเนินการหมักในสภาวะเขย่า ที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่าง ชั่วโมงที่ 0 1 2 3 4 8 12 24 36 และ 48 เพื่อติดตามการเจริญของเชื้อยีสต์ โดยใช้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) และระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุด ( $t_{max}$ ) ในสภาวะควบคุมเป็นค่าอ้างอิงในการประเมินการเจริญ หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักเพื่อแยกเซลล์ยีสต์ที่ได้จากสภาวะควบคุมนี้ไปใช้เป็นก้ำเชื้อยีสต์สำหรับอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังต่ำสุด (20% (v/v)) ต่อไป โดยควบคุมให้มีเชื้อยีสต์ที่มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากัน และดำเนินการหมักเช่นเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารปรับสภาพสูตรเดิม จนกระทั่งอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อมีค่าเท่ากับหรือสูงกว่า 80% ของค่าการเจริญเติบโตจำเพาะในสภาวะควบคุม แล้วจึงทำการถ่ายเซลล์ยีสต์ลงในอาหารปรับสภาพที่มีมีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังมากขึ้นตามลำดับ (20% 40% 60% 80% และ 100%) โดยทำการทดลองทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 4 8 12 24 และ 48 ในรอบแรก และรอบสุดท้ายของอาหารแต่ละสูตร เพื่อนำมาตรวจสอบปริมาณเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการรอดชีวิต (Smart *et al.*, 1999) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) ความเข้มข้นของเอทานอล และสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ด้วยเทคนิค HPLC โดยกระบวนการปรับสภาพเชื้อยีสต์ดำเนินการต่อเนื่องเป็นเวลา 960 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการปรับสภาพ นำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งโดยมีอาหารปรับสภาพที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% เป็นส่วนประกอบเพื่อรักษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งของเชื้อยีสต์

### 3.5.7 การศึกษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งในรูปสารผสม และการผลิตเอทานอลในอาหารเหลว YPD โดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

ทำการคัดเลือกความเข้มข้นของสารยับยั้งแต่ละชนิดที่ระดับสูงสุดซึ่งทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อมีค่าเท่ากับหรือสูงกว่า 80% ของค่าการเจริญเติบโตจำเพาะในสภาวะควบคุม จากการศึกษาในหัวข้อที่ 3.5.5 เพื่อนำมาใช้ศึกษาปัจจัยร่วมของสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด โดยแบ่งระดับความเข้มข้นออกเป็น 4 ระดับ คือ (1) 25% (2) 50% (3) 75% และ (4) 100% ของความเข้มข้นสูงสุดของสารยับยั้งแต่ละชนิดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยทำการเติมลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และมีอาหารที่ไม่เติมสารยับยั้งเป็นสภาวะควบคุม ปรับค่า pH ของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลาย  $H_3PO_4$  หรือสารละลาย NaOH แล้วทำการฆ่าเชื้อ

**ตารางที่ 3.1** การทดสอบความสามารถของยีสต์ในการทนต่อสารยับยั้งในรูปแบบผสม

สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)			
	ความเข้มข้น ระดับที่ 1	ความเข้มข้น ระดับที่ 2	ความเข้มข้น ระดับที่ 3	ความเข้มข้น ระดับที่ 4
กรดอะซิติก				
กรดฟอร์มิก	33.75	67.5	101.25	135
กรดลิวลินิก	42.5	85	127.5	170
เฟอพิวรัล	62.5	125	187.5	250
5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอ พิวรัล	1.63	3.25	4.88	6.5
	2.19	4.39	6.58	8.77

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการปรับสภาพ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ) และอาหารเหลว YPD ตามลำดับ โดยมีขั้นตอนดังข้อ 3.5.3 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ ลงในอาหารเหลว YPD ที่ผสมสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ควบคุมเชื้อให้มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 4 8 12 24 48 และ 72 เพื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อยีสต์โดยวัดการเจริญ และร้อยละการรอดชีวิต (Smart et al., 1999) รวมถึงประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นของเอทานอล และสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ด้วยเทคนิค HPLC และทำการทดลองแบบเดียวกันโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ เปรียบเทียบผลในสภาวะที่ใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

### 3.5.8 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

3.5.8.1 ศึกษาการเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (v/v) (ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ)

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการปรับสภาพ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% และ 0% (v/v) ตามลำดับ โดยมีขั้นตอนดังข้อ 3.5.3 ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพลงในอาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (v/v) (ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ) ซึ่งเติมสารอาหารต่างๆ ตามการรายงานของ Kouteu Nanssou et al. (2016) ปรับค่า pH เป็น 5.5 ควบคุมปริมาณเชื้อที่มีชีวิตเริ่มต้น  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 4 8 12 18 24 36 48 60 และ 72 เพื่อตรวจสอบปริมาณเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการรอดชีวิต (Smart et al., 1999) ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois et al., 1956) และความเข้มข้นของเอทานอลด้วยเทคนิค HPLC ทำการทดลองแบบเดียวกันโดยใช้กล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ (สภาวะควบคุม) เปรียบเทียบผลในสภาวะที่ใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

ทำการประเมินความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งของเชื้อด้วยเทคนิค Spot plate โดยนำกล้าเชื้อยีสต์ทั้งสองที่มีความเข้มข้น  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาเจือจางให้อยู่ที่ระดับความเข้มข้นอย่างละ 10<sup>-4</sup> 10<sup>-5</sup> และ 10<sup>-6</sup> แล้วนำมา Spot ลงบนเพลท 0% 50% และ 100% (v/v) hydrolysate medium agar จำนวน 10 ไมโครลิตร เป็นจำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการถ่ายรูปรูปเพื่อเปรียบเทียบผลการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิด

3.5.8.2 ศึกษาการเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% ที่กำจัด และไม่กำจัดสารพิษ

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการปรับสภาพ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ) และอาหารเหลว YPD ตามลำดับ โดยมีขั้นตอนดังข้อ 3.5.3

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพลงในอาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% ทั้งส่วนที่กำจัด และไม่กำจัดสารพิษ ซึ่งเติมสารอาหารต่างๆ ตามการรายงานของ Kouteu Nanssou *et al.* (2016) ปรับค่า pH เป็น 5.5 และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ควบคุมปริมาณเชื้อที่มีชีวิตเริ่มต้น  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่าง ชั่วโมงที่ 0 4 8 12 24 48 และ 72 เพื่อตรวจสอบปริมาณเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการรอดชีวิต (Smart *et al.*, 1999) ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) ความเข้มข้นของเอทานอลด้วยเทคนิค HPLC ทำการทดลองแบบเดียวกันโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ เปรียบเทียบผลในสภาวะที่ใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

### 3.5.9 การศึกษาปริมาณแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลชีวภาพ

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพลงในอาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ โดยมีการเติม  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ในปริมาณแตกต่างกัน คือ 0 1 3 5 และ 7.5 กรัมต่อลิตร และเติมสารอาหารอื่นๆ ตามการรายงานของ Kouteu Nanssou *et al.* (2016) ตลอดจนปรับค่า pH เป็น 5.5 และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยควบคุมปริมาณเชื้อที่มีชีวิตเริ่มต้น  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0 4 8 12 24 48 และ 72 เพื่อตรวจสอบปริมาณเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการรอดชีวิต (Smart *et al.*, 1999) ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) และความเข้มข้นของเอทานอลด้วยเทคนิค HPLC

### 3.5.10 วิธีการวิเคราะห์

3.5.10.1 การตรวจสอบการเจริญ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อยีสต์ ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Charoenrat *et al.* (2013) โดยเจือจางตัวอย่างน้ำหมักให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วยสารละลาย 0.8% NaCl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.10.2 การการตรวจสอบปริมาณเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการรอดชีวิตตามวิธีการของ Smart et al. (1999) โดยใช้การย้อมด้วยสีเซลล์ด้วยเมทิลีนไวโอเลต และนับปริมาณเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และระยะพักของเชื้อ (lag time,  $t_{lag}$ ) ได้มาจากการประมาณโดยใช้กราฟความสัมพันธ์ของสมการเส้นตรงระหว่างค่าลอการิทึมธรรมชาติของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และเวลาในระยะเพิ่มจำนวนของเชื้อยีสต์ (log phase) ตามวิธีของ El-Mansi and Bruce Ward (2006) ดังสมการ (3)

$$\mu \text{ (ชั่วโมง}^{-1}\text{)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0} \quad (3)$$

3.5.10.3 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ดัดแปลงจากวิธีการของ Charoenrat et al. (2013)

3.5.10.4 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก ตามวิธีการของ Dubois et al. (1956)

3.5.10.5 การวิเคราะห์หองค์ประกอบและปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด (กลูโคส ไซโลส และอะราบินอส) ด้วยเทคนิค HPLC ดัดแปลงจากวิธีการของ Sluiter et al. (2012)

3.5.10.6 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล และสารยับยั้งประเภทกรด (กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก) ด้วยเทคนิค HPLC

ความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อประเมินโดยใช้พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ ดังนี้

(1) ผลได้เอทานอล ( $Y_{p/s}$ ; กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส) คำนวณจาก ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตสูงสุด/ปริมาณน้ำตาลที่ถูกนำไปใช้

(2) อัตราการผลิตเอทานอล ( $Q$ ; กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) คำนวณจาก ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตสูงสุด/เวลาที่ได้อเอทานอลสูงสุด

(3) ประสิทธิภาพการหมัก (%) คำนวณจาก ผลได้เอทานอล/ผลได้ของการผลิตเอทานอลทางทฤษฎีจากกลูโคส (0.51 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส) \*100

3.5.10.7 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งประเภทฟูแรน (เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล) ด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีการของ Martin et al. (2017)

### 3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การแสดงผลนำมาแสดงเป็นค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานโดยแสดงเป็นแถบค่าคลาดเคลื่อน ค่าทั้งสองได้มาจากการคำนวณในโปรแกรม Microsoft Excel 2010 โดยใช้ฟังก์ชัน AVERAGE และ STDEV ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16 ด้วยวิธี Unpaired two-tailed T-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ( $p < 0.05$ )

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง และวิจารณ์

#### 4.1 ปริมาณน้ำตาล และสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสารละลายกากมันสำปะหลัง

การปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อย่อยสลายโครงสร้างผนังเซลล์ในวัสดุ และเกิดการปลดปล่อยน้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปใช้หมักเอทานอลได้ (Kumar *et al.*, 2009; Yang and Wyman, 2008) ซึ่งการใช้กรดในการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นที่นิยมในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะกรด  $H_2SO_4$  ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากกรดชนิดนี้มีราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีประสิทธิภาพในการย่อย (Bensah and Mensah, 2013; Jönsson and Martín, 2016) อย่างไรก็ตาม ผลกระทบของการใช้กรดอ่อนในการปรับสภาพคือการเกิดสารยับยั้งต่างๆในไฮโดรไลเซส เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอร์วิรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอร์วิรัล ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งในกระบวนการหมัก (Larsson *et al.*, 1999) ในการศึกษาทำการย่อยกากมันสำปะหลัง ด้วยสารละลาย  $H_2SO_4$  ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยสัดส่วนของกากมันสำปะหลังต่อสารละลายกรดซัลฟูริก เท่ากับ 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ผลการทดลองพบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีค่าเท่ากับ 62.95 กรัมต่อลิตร โดยพบน้ำตาลกลูโคสไซโลส และอะราบินอส เป็นองค์ประกอบในสารละลายพบน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 45.47 2.52 และ 1.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบสารยับยั้งเพียง 3 ชนิด คือ กรดอะซิติก ลิวลินิก และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอร์วิรัล เท่ากับ 14.68 0.43 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Cao *et al.* (2010) ที่ทำการย่อยซังข้าวโพดด้วยสารละลาย  $H_2SO_4$  2% (v/v) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ได้น้ำตาลทั้งหมด ความเข้มข้น 14.17 กรัมต่อลิตร โดยพบกรดอะซิติก เฟอร์วิรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอร์วิรัล ปริมาณ 30.81 6.24 และ 1.98 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่ Huang *et al.* (2011) ย่อยซังข้าวโพดด้วยสารละลาย  $H_2SO_4$  ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์กรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที พบปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กรดอะซิติก เฟอร์วิรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอร์วิรัล เท่ากับ 57.15 85.26 7.18 และ 5.79 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Tian *et al.* (2011) ย่อยไม้เนื้ออ่อน killed lodgepole ด้วยโซเดียมไบซัลไฟต์ และกรดซัลฟูริกในเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ได้น้ำตาล กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอร์วิรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอร์วิรัลที่มีความเข้มข้น 33.36 85.26 77.99 2.67 20.71 และ 19.90 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าสถานะที่ใช้ในการปรับสภาพกากมันสำปะหลังนี้มีความรุนแรงน้อยกว่ารายงานที่กล่าวมาข้างต้น จึงอาจทำให้เกิดสารยับยั้งปริมาณน้อยกว่า Soleymanpour *et al.* (2018) รายงานว่า การใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงส่งผลให้เกิดการย่อยสลายน้ำตาลมากขึ้น และเกิดสารยับยั้งในปริมาณสูงด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งที่เกิดขึ้นยังขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบและความรุนแรงของสถานะที่ใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบ (Görgens *et al.*, 2014)

หลังจากได้สารละลายกากมันสำปะหลัง ทำการเตรียมอาหารปรับสภาพเชื้อยีสต์โดยทำการจำลองสถานะให้มีปริมาณ fermentable sugar เริ่มต้นให้เท่ากันในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตร เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่พบในสารละลายกากมันสำปะหลัง (62.95 กรัมต่อลิตร) ประกอบไปด้วย fermentable sugar คือน้ำตาลที่ยีสต์นำไปใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งพบเพียงน้ำตาล กลูโคส และ non-fermentable sugar เป็นน้ำตาลที่ยีสต์นำไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ ซึ่งพบเฉพาะ น้ำตาลไซโลส และอะราบินอสในไฮโดรไลเซส โดยทั่วไปแล้ว น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และ มอลโทส ไซโลส เป็นน้ำตาล fermentable sugar สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* จึงเป็นไปได้ว่า น้ำตาลดังกล่าวข้างต้นยีสต์สามารถนำไปใช้ในการหมักได้ (Luján-Rhenals and Morawicki, 2016) ทำการตรวจสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อโดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสารละลายกากมัน สำปะหลังเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยปริมาณน้ำตาลที่ลดลง คือปริมาณ fermentable sugar ผลการ ทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ยีสต์นำไปใช้ เท่ากับ 46.52 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่า มีปริมาณมากกว่าน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเล็กน้อย (45.47 กรัมต่อลิตร) ที่พบในสารละลายกากมัน สำปะหลัง หลังจากการหมักพบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลง 43.92 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตาราง ที่ 4.1 ซึ่งความแตกต่างของทั้งสองค่าอาจมาจากในไฮโดรไลเซสอาจมีน้ำตาลตัวอื่นๆ ที่ไม่ได้ วิเคราะห์ซึ่งยีสต์นำไปใช้ได้ หรืออาจมาจากความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามใน การศึกษานี้ใช้ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด คือ 46.52 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณ fermentable sugar เนื่องจากครอบคลุมปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้ดีกว่า

**ตารางที่ 4.1** ปริมาณ fermentable sugars ที่ลดลงในระหว่างการหมักในสารละลายกากมัน สำปะหลังโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ชั่วโมงที่ 72) (กรัม/ลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (กรัม/ลิตร)
น้ำตาลทั้งหมด <sup>1</sup>	59.56±1.88	13.04±0.05	46.52±0.56
กลูโคส <sup>2</sup>	44.64±0.54	0.72±0.00	43.92±0.53
ไซโลส <sup>2</sup>	2.18±0.04	1.97±0.07	0.21±0.00
อะราบินอส <sup>2</sup>	1.49±0.01	1.44±0.02	0.05±0.00

หมายเหตุ: <sup>1</sup>ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดวิเคราะห์โดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก โดยใช้กลูโคสเป็น สารละลายมาตรฐาน, <sup>2</sup>ความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC

#### 4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งแต่ละชนิดต่อการเจริญของเชื้อยีสต์

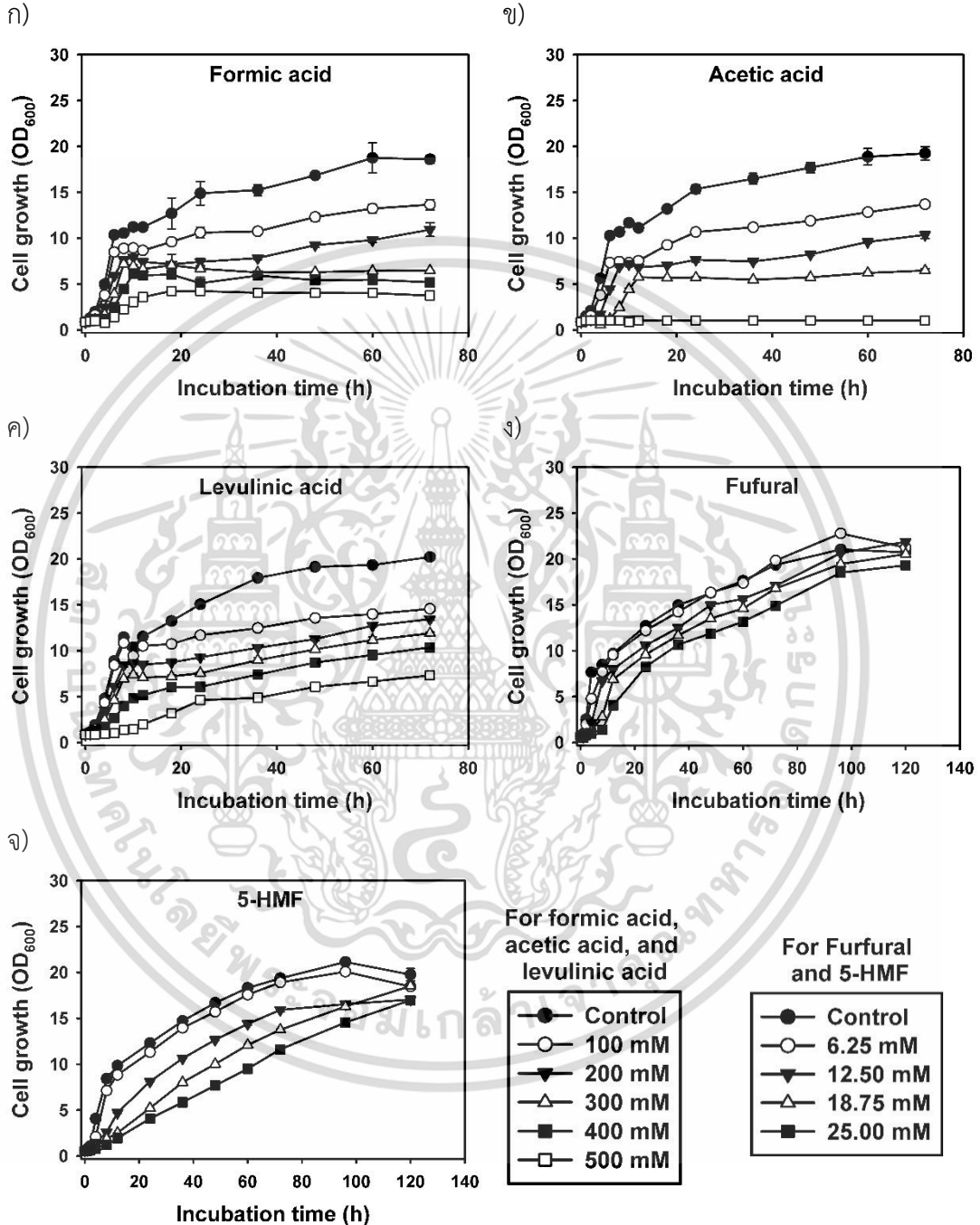
กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดลิวลินิก เป็นสารยับยั้งจำพวกกรดอ่อนที่เกิดขึ้นระหว่างการปรับสภาพวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลส (Mussatto and Roberto, 2004) ซึ่งชนิดและปริมาณ สารยับยั้งต่างๆ ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวัตถุดิบและกระบวนการไฮโดรไลซิส (Olsson and Hahn-Hägerdal, 1996) ดังนั้น การศึกษานี้จึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการทนต่อพิษของ สารยับยั้งของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 โดยทำการศึกษากการเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยง เชื้อ YPD ที่มีการเติมสารยับยั้งกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดลิวลินิก ในระดับความเข้มข้นละ 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ เพอฟิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอฟิวรัล ระดับความ เข้มข้นละ 6.25 12.5 18.75 และ 25 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อมาที่ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และติดตามการเจริญของเชื้อยีสต์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

การติดตามการเจริญของเชื้อในรูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงดังแสดงในภาพ

ที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 โดยติดตามจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในอาหาร YPD ที่เติมกรดฟอร์มิก (ก) กรดอะซิติก (ข) กรดลิวูลินิก (ค) เฟอพิวรัล (ง) และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล (จ) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และสภาวะควบคุมที่ไม่เติมสารยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.1 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อมีค่าลดลงตามระดับความเข้มข้นของกรดฟอร์มิค กรดอะซิติก และกรดลิวูลินิกที่มากขึ้น ในขณะที่เดียวกันติดตามน้ำหนักเซลล์แห้ง และแสดงผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อเป็นค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ระยะพัก และการเจริญสัมพันธ์ของเชื้อดังตารางที่ 4.2 โดยแสดงให้เห็นว่า เมื่อค่าความเข้มข้นของสารยับยั้งมากขึ้น ส่งผลให้น้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ และการเจริญสัมพันธ์ลดลง ในขณะที่ระยะปรับตัวของเชื่อนานขึ้น ส่วนสารยับยั้งกรดลิวูลินิก 100 มิลลิโมลาร์ มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าสภาวะควบคุมที่ไม่มีการเติมสารยับยั้งเล็กน้อย

อิทธิพลการยับยั้งของกรดฟอร์มิค กรดอะซิติก และกรดลิวูลินิกเป็นไปในทางเดียวกัน คือ เมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงขึ้นส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและการผลิตชีวมวลของเชื้อลดลง นอกจากนี้ยังส่งผลให้เชื้อยีสต์อยู่ในช่วงปรับตัวนานก่อนเข้าสู่ระยะแบ่งเซลล์ และจะเห็นว่าอิทธิพลของสารยับยั้งจำพวกกรดอ่อน โดยเฉพาะกรดอะซิติก มีผลต่อการการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 มากที่สุด เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงๆ (400 และ 500 มิลลิโมลาร์) พบว่า แทบไม่พบการเจริญสัมพันธ์ของเชื้อ หรือเกิดการยับยั้งการเจริญเกือบสมบูรณ์ แต่ในการศึกษานี้ อิทธิพลการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์โดยกรดฟอร์มิคดูเหมือนจะมากกว่ากรดลิวูลินิก เนื่องจากการเจริญสัมพันธ์ของเชื้อยีสต์ในสภาวะที่มีกรดลิวูลินิกมีค่ามากกว่าในสภาวะที่มีกรดฟอร์มิค และยังช่วยให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีกรดลิวูลินิกความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีการรายงานที่ กรดลิวูลินิกสามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อของยีสต์ได้ โดย Zhang *et al.* (2016) พบว่าที่ความเข้มข้นของกรดลิวูลินิก 10 กรัมต่อลิตร (ประมาณ 86 มิลลิโมลาร์) ส่งผลให้รา *Rhizopus oryzae* มีการเจริญเติบโตมากที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้กรดฟอร์มิค และกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน Almeida *et al.* (2007) อธิบายว่ากรดลิวูลินิกมีความเป็นพิษน้อยกว่ากรดฟอร์มิค แต่มากกว่ากรดอะซิติก อันเนื่องมาจากความเข้มข้นของกรดที่ไม่แตกตัวในอาหารมีความแตกต่างกัน Thomas *et al.* (2002) รายงานว่า ยีสต์สามารถเจริญในอาหารที่มีการปรับค่า pH เริ่มต้นได้ดีกว่าอาหารที่ไม่ได้ปรับค่า pH เริ่มต้น โดยพบว่า การเติมกรดอะซิติก 167 มิลลิโมลาร์ลงในอาหาร ทำให้ค่า pH ในอาหารลดลงเป็น 2.76 ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้ แต่เมื่อเติมกรดอะซิติกลงในอาหารซึ่งปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ยีสต์สามารถเจริญได้ขึ้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากการเกิดคูป์เพอร์จากการเติมกรดในอาหารสามารถลดความแตกต่างของกรดระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ เซลล์จึงมีความสามารถในการรักษาระดับ pH ได้ดีกว่าอาหารที่ไม่ได้ปรับค่า pH เริ่มต้น pH ในอาหารจึงลดลงไม่มาก ซึ่งเหตุผลนี้อาจเกี่ยวข้องกับระดับการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์จากกรดทั้ง 3 ชนิดที่เติมลงในอาหารที่ใช้ในการศึกษานี้ อย่างไรก็ตาม สาเหตุที่ฤทธิ์การยับยั้งของกรดอ่อนแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์ในการศึกษานี้แตกต่างออกไปอาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ยีสต์และสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ระยะพัก การเจริญสัมพัทธ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ระดับความเข้มข้นและสารยับยั้งแตกต่างกัน

สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง <sup>-1</sup> )	ระยะพัก <sup>a</sup> (ชั่วโมง)	การเจริญสัมพัทธ์ <sup>b</sup> (%)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)
กรดฟอร์มิก	0*	0.41 ± 0.00	0.2	100 ± 0.76	7.69 ± 0.19
	100	0.38 ± 0.01	0.6	92.15 ± 2.49	5.65 ± 0.24
	200	0.31 ± 0.00	1.7	75.33 ± 0.96	4.52 ± 0.31
	300	0.27 ± 0.00	2.5	64.13 ± 0.26	2.68 ± 0.01
	400	0.20 ± 0.00	3.6	48.96 ± 0.28	2.16 ± 0.02
	500	0.12 ± 0.00	4.45	29.54 ± 1.11	1.56 ± 0.03
กรดอะซิติก	0*	0.41 ± 0.00	0.2	100 ± 0.17	7.96 ± 0.30
	100	0.36 ± 0.00	0.8	88.05 ± 0.08	5.66 ± 0.05
	200	0.27 ± 0.00	2.7	66.10 ± 0.63	4.29 ± 0.16
	300	0.16 ± 0.00	5.35	38.97 ± 0.40	2.68 ± 0.09
	400	0.02 ± 0.00	-	4.52 ± 0.41	0.45 ± 0.00
	500	0.02 ± 0.00	-	4.57 ± 0.31	0.44 ± 0.00
กรดลิวูลินิก	0*	0.40 ± 0.00	0.33	100 ± 1.12	8.36 ± 0.06
	100	0.40 ± 0.00	1.0	101.34 ± 1.01	6.02 ± 0.09
	200	0.35 ± 0.00	1.05	86.74 ± 0.56	5.56 ± 0.05
	300	0.30 ± 0.01	1.9	75.36 ± 1.62	4.92 ± 0.05
	400	0.20 ± 0.00	2.2	50.94 ± 0.56	4.28 ± 0.12
	500	0.08 ± 0.00	3.9	20.16 ± 0.26	3.03 ± 0.04
เฟอพิวรัล	0*	0.41 ± 0.01	0.31	100 ± 0.96	7.78 ± 0.02
	6.25	0.33 ± 0.00	1.25	80.99 ± 0.38	7.70 ± 0.13
	12.5	0.20 ± 0.00	2.9	48.53 ± 0.28	6.94 ± 0.10
	18.75	0.13 ± 0.00	5.8	32.73 ± 0.02	6.52 ± 0.06
	25	0.08 ± 0.00	7	18.36 ± 0.02	6.12 ± 0.02
	5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล	0*	0.41 ± 0.00	0.34	100 ± 0.30
6.25		0.37 ± 0.00	1.22	92.13 ± 0.40	7.60 ± 0.04
12.5		0.23 ± 0.00	1.50	56.05 ± 0.31	6.86 ± 0.05
18.75		0.17 ± 0.00	2.08	41.68 ± 0.53	6.85 ± 0.05
25		0.11 ± 0.00	4.45	27.00 ± 0.28	6.83 ± 0.08

หมายเหตุ : <sup>a</sup> ได้จากการลากเส้นการเจริญของเชื้อในระยะเพิ่มจำนวนมาสัมพันธ์กับเส้นปริมาณเชื้อเริ่มต้น (-: ไม่พบระยะพักของเชื้อ)

<sup>b</sup> คำนวณจาก [อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อในแต่ละการทดลอง/อัตราการ เจริญจำเพาะของเชื้อในสภาวะควบคุม]\*100

\* สภาวะควบคุม: ไม่เติมสารยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับกลไกการยับยั้งของกรดอ่อนอธิบายไว้ว่า กรดที่ไม่แตกตัวเป็นประจุสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดการแตกตัวส่งผลให้ค่า pH ภายในเซลล์ลดลง จึงทำให้เซลล์ต้องใช้พลังงาน (ATP) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขับโปรตอนออกภายนอกเซลล์ (Russel, 1992; Verduyn *et al.*, 1992; Pampulha and Loureiro-Dias, 1989) พลังงานจึงไม่เพียงพอต่อการสร้างชีวมวลของเชื้อ จึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญ และมีการอธิบายว่า การที่เชื้อต้องขับโปรตอนที่มีปริมาณมากเกินไปออกนอกเซลล์เพื่อไม่ให้ค่า pH ภายในเซลล์เหมาะสมต่อการเจริญ รวมถึงส่งผลให้เชื้ออยู่ในระยะพักก่อนเข้าสู่ระยะแบ่งตัวนานขึ้น (Lambert and Stratford, 1999) ยิ่งกว่านั้น ในสถานะที่มีความเข้มข้นของกรดสูงๆ พลังงานในขับโปรตอนออกนอกเซลล์อาจไม่เพียงพอจนทำให้เกิดสภาวะกรดภายในเซลล์ และส่งผลให้การแบ่งเซลล์น้อยลง (Russel, 1992; Imai and Ohono, 1995) เช่นเดียวกับผลการเจริญที่ได้จากการศึกษานี้คือ เมื่อความเข้มข้นของกรดอ่อนเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสง และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อมีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการแบ่งตัวน้อยลงเนื่องจากความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นนั่นเอง

นอกเหนือจากสารยับยั้งประเภทกรดอ่อนแล้ว สารอนุพันธ์ฟูแรนก็สามารถเกิดขึ้นในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบได้เช่นกัน สารอนุพันธ์ฟูแรน เช่น เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล โดยเฟอพิวรัลเกิดจากการสลายน้ำตาลเพนโตส ส่วน 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัลเกิดจากการสลายของน้ำตาลเฮกโซส (Wright and Power 1987; Clausen and Gaddy, 1988) จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสารทั้งสองต่อการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีการเติมสารยับยั้งโดยทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหาร YPD ที่เติมเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล ระดับความเข้มข้นละ 6.25, 12.5, 18.75 และ 25 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การเจริญของเชื้อยีสต์ในสารยับยั้งประเภทฟูแรนทั้ง 2 ชนิดมีแนวโน้มเหมือนกับลักษณะการเจริญของเชื้อในสภาวะที่มีสารยับยั้งประเภทกรดอ่อน โดยค่าการดูดกลืนแสง น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าลดลง ในขณะที่ระยะพักของเชื้อมีค่ามากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งที่มากขึ้น จึงส่งผลต่อการลดลงของอัตราการเจริญจำเพาะและการเจริญสัมพันธ์เช่นกัน ยิ่งกว่านั้นในสภาวะที่เติม 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล เชื้อมีการเจริญสูงกว่า และการเจริญในช่วงระยะพักสั้นกว่าในอาหารที่เติมเฟอพิวรัลในแต่ละระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.2 สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Taherzadeh *et al.* (2000b) และ Liu *et al.* (2004) ซึ่งรายงานไว้ว่า ระดับเป็นพิษของเฟอพิวรัลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มีความรุนแรงมากกว่า 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล และยังทำให้เชื้ออยู่ในระยะพักนาน เข้าสู่ระยะแบ่งตัวช้ากว่าในสภาวะที่มีสารยับยั้ง 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัลที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน โดยปกติแล้วกลไกการยับยั้งของสารทั้ง 2 ชนิดนี้จะไปยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในวัฏจักรเครป (krebs cycle) ตลอดจนเมแทบอลิซึมในการสร้างเอทานอล (alcohol metabolism) เช่น เอนไซม์ alcohol dehydrogenase เอนไซม์ aldehyde dehydrogenase และเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase รวมถึงเอนไซม์และโคแฟกเตอร์ในวิถีไกลโคไลซิส (Banerjee *et al.*, 1981; Modig *et al.*, 2002) โดยเมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งประเภทฟูแรนสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญ โดยไปลดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ผลได้ของชีวมวล รวมทั้งยั้งระยะพักของเชื้อ (Boyer *et al.*, 1992; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Ask *et al.*, 2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่า ความเป็นพิษของสารยับยั้งประเภทนี้ต่อการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ค่อนข้างสูง เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งประเภทฟูแรนเพียง 6.25 - 25 มิลลิโมลลาร์ ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบการเจริญในสารยับยั้งประเภทกรดอ่อนซึ่งเติมในปริมาณที่สูงกว่ามาก (100 - 500 มิลลิโมลลาร์) โดยในสถานะที่มีความเข้มข้นของเพอพิวรัล หรือ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เพอพิวรัลสูงสุด (25 มิลลิโมลลาร์) ทำให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีเท่ากับ 18.36 และ 27.00 ชั่วโมง<sup>-1</sup> ตามลำดับ ในขณะที่การเติมกรดอ่อนความเข้มข้นต่ำสุด (100 มิลลิโมลลาร์) ยังให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงกว่าในสถานะที่มีสารยับยั้งฟูแรนอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zhang *et al.* (2016) ที่รายงานให้เห็นว่าสารยับยั้งประเภทฟูแรนที่เกิดจากการสลายน้ำตาลมีความเป็นพิษต่อเชื้อมากกว่าสารยับยั้งจากกรดอ่อน อย่างไรก็ตามระดับความเป็นพิษขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารยับยั้งและสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ (Almeida *et al.*, 2007).

#### 4.3 ผลการศึกษาการปรับสภาพเชื้อยีสต์ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง

เนื่องจากเกิดสารประกอบต่างๆที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยลดประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการหมักเอทานอล การปรับสภาพเชื้อให้ทนต่อสารยับยั้งเหล่านั้นจึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตเอทานอลของเชื้อจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Silva and Roberto, 2001) ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ให้ทนต่อสารยับยั้งที่อาจเกิดขึ้นในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางที่อุณหภูมิสูง โดยเริ่มเลี้ยงเชื้อจากสถานะที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งต่ำก่อน แล้วค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งให้สูงขึ้น นั่นคือเริ่มการปรับสภาพเชื้อยีสต์ในสถานะควบคุมหลังจากนั้นจึงถ่ายเชื้อลงในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 20% 40% 60% 80% และ 100% (v/v) ตามลำดับ แต่ละรอบทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ดำเนินการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรเดิมซ้ำจนกระทั่งค่าการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อไม่ต่ำกว่า 80% ของค่าการเจริญเติบโตจำเพาะของสถานะควบคุม เปรียบเทียบผลการรอดชีวิตของยีสต์ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกลูโคส เอทานอล และปริมาณสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด

##### 4.3.1 การเจริญ และการรอดชีวิต

ผลการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตรใช้เวลาการปรับสภาพเชื้อยีสต์ทั้งหมด 19 รอบ โดยทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารปรับสภาพที่มีสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 20% 40% 60% 80% และ 100% (v/v) อย่างละ 2 2 3 5 และ 7 รอบ ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.3 ปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุดในอาหารสถานะควบคุม (ไม่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง) คือ  $1.99 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 20% และ 40% (v/v) มีปริมาณมากกว่าเล็กน้อย คือ  $2.6 \times 10^8$  และ  $2.4 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Greetham (2014) รายงานว่ากรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่ำประมาณ 10-25 มิลลิโมลลาร์ มีผลกระทบเล็กน้อยหรือไม่ผลกระทบต่อการเจริญของยีสต์ นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 25 มิลลิโมลลาร์ สามารถเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเจริญให้แก่เซลล์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับสถานะที่ไม่มีสารยับยั้งกรดอะซิติก ส่วนระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุด ( $t_{maxC}$ ) ของรอบแรกในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 20% (v/v) คือ 12 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับสถานะควบคุม และเมื่อปรับสภาพเชื้อในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 40% (v/v) ในรอบแรก พบว่าระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดคือ 24 ชั่วโมง และการปรับสภาพเชื้อในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้นมากกว่า 40% (v/v) ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุดมีค่าน้อยลงและใช้เวลาในการทำให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุดของรอบสุดท้ายในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 60% 80% และ 100% (v/v) มีค่ามากกว่าปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุดของรอบแรกประมาณ 11 13 และ 34% ตามลำดับ

ในไฮโดรไลเซสที่ระดับความเข้มข้นต่ำหรือมีสารยับยั้งน้อยเป็นสถานะที่เซลล์ยืดหยุ่นไม่ได้รับการปรับสภาพ เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรไลเซสสูงขึ้นหรือมีสารยับยั้งมากขึ้นทำให้การปรับสภาพเชื้อรอบแรกในอาหารแต่ละสูตรมีปริมาณเซลล์น้อยลง แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อหลายรอบในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 80% และ 100% (v/v) แสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถทนต่อสารยับยั้งได้ นั่นคือ มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงขึ้น ระยะพักของเชื้อ และระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดมีค่าน้อยลง (ตารางที่ 4.3) ซึ่งการลดลงของระยะพักเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อซ้ำในอาหารเดิม ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษานี้ของ Wallace-Salinas and Gorwa-Grauslund (2013) และ Koppram *et al.* (2012)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อที่สถานะควบคุมและในสถานะที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 20% และ 40% (v/v) อยู่ในช่วง 0.27-0.30 ชั่วโมง<sup>-1</sup> หลังจากนั้น เซลล์ถูกนำไปเลี้ยงต่อในรอบแรกของสถานะที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 60% 80% และ 100% (v/v) ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลงเป็น 0.24 0.21 และ 0.20 ชั่วโมง<sup>-1</sup> ตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อที่ลดลงเมื่อถ่ายเชื้อไปยังอาหารที่มีความเข้มข้นของไฮโดรไลเซสสูงขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองของ Wallace-Salinas and Gorwa-Grauslund (2013) งานวิจัยของ Koppram *et al.* (2012) อธิบายไว้ว่า ช่วงระยะพักที่นานขึ้นก่อนที่เชื้อจะฟื้นตัวและเจริญแบ่งตัวได้นั้นบ่งบอกว่าเซลล์เกิดการปรับเปลี่ยนสรีรวิทยาภายใต้สถานะเครียดจากสารยับยั้งในอาหาร โดยอัตราการเจริญของเซลล์ที่ค่อยๆ เพิ่มขึ้นนี้เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ปรับสภาพซึ่งมีปริมาณมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ปรับสภาพ นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ในสถานะที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงขึ้นจำเป็นต้องมีการเลี้ยงเชื้อซ้ำในอาหารนั้นๆ จนกระทั่งเชื้อสามารถเจริญและทำให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่ต่ำกว่า 80% ของสถานะควบคุม (0.28 ชั่วโมง<sup>-1</sup>) นั่นก็คือ 0.22 ชั่วโมง<sup>-1</sup> โดยยีสต์จากสถานะควบคุมที่ถูกนำไปเลี้ยงต่อในสถานะที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 20% 40% และ 60% (v/v) ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้ออยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ไม่ต่ำกว่า 0.22 ชั่วโมง<sup>-1</sup>) แต่เมื่อเซลล์อยู่ในสถานะที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังสูงขึ้นเป็น 80% หรือ 100% (v/v) พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะน้อยกว่าสถานะที่เลี้ยงในอาหารปรับสภาพช่วงแรกซึ่งมีความเข้มข้นสารละลายกากมันสำปะหลังต่ำกว่า ดังนั้นเพื่อที่จะได้อัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้น (มากกว่า 0.22 ชั่วโมง<sup>-1</sup>) จึงต้องเพิ่มจำนวนรอบในการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรเดิมซ้ำ 5 และ 7 รอบ ตามลำดับ ซึ่งอัตราการเจริญที่ลดลงนี้อาจมาจากปริมาณสารยับยั้งที่สูงขึ้นในอาหารปรับสภาพที่ใช้ ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดจากความ

เข้มข้นของสารยับยั้งที่มากขึ้นในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังมากขึ้นนั่นเอง

สารยับยั้งกรดอะซิติก กรดลิวูลินิก และ 5-ไดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล เป็นที่รู้จักกันว่า เป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยในสารละลายกากมันสำปะหลังในการศึกษานี้พบกรดอะซิติก กรดลิวูลินิก และ 5-ไดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลที่มีความเข้มข้น 14.68 0.43 และ 0.10 มิลลิโมลลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2) ความรุนแรงของสารยับยั้งขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ ความสามารถในการปรับตัวของยีสต์ต่อสารยับยั้ง กระบวนการหมัก ประเภทของสารยับยั้ง ตลอดจนการเสริมฤทธิ์กันของสารยับยั้งร่วม (Mussatto and Roberto, 2004) อนุพันธ์ฟูแรน เช่น เฟอพิวรัล และ 5-ไดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล เป็นสารยับยั้งที่เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซส ตามลำดับ โดยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวิถีไกลโคไลซิสซึ่งส่งผลให้อัตราการเจริญของเชื้อ การสร้างชีวมวล ประสิทธิภาพการผลิต และผลได้เอทานอลลดลง และทำให้ระยะพักของเชื้อนานขึ้น (Almeida *et al.*, 2007; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000) สารยับยั้งประเภทกรดอ่อนที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยวัตถุดิบส่วนใหญ่ คือ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวูลินิก ซึ่งส่งผลกระทบต่อการผลิตชีวมวลและผลได้เอทานอลของเชื้อได้น้อยลง (Larsson *et al.*, 1999; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000) Bauar *et al.* (2003) รายงานว่า กรดอ่อนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยลดการดูดซึมกรดอะมิโนในอาหาร ซึ่งระดับความเป็นพิษของกรดนั้นขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้ในการหมัก (Mussatto and Roberto, 2004)

ระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดเป็นพารามิเตอร์ที่สามารถบ่งบอกได้ว่าเซลล์เกิดการปรับตัว ในอาหารสภาวะควบคุมและอาหารปรับสภาพที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 20% (v/v) เชื้อใช้เวลาในการทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดเท่ากัน คือ 12 ชั่วโมง แต่เมื่อการปรับสภาพเชื้ออยู่ในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 40%-100% (v/v) เวลาในการทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดมีค่ามากขึ้น อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงเชื้อในอาหารเดิมหลายๆ ครั้ง ช่วยลดระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุด สิ่งนี้อาจบ่งบอกได้ว่าการปรับตัวของเซลล์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อหลายๆรอบ ช่วยให้เซลล์ทนต่อความเป็นพิษของสารยับยั้งได้ (ตารางที่ 4.3)

**ตารางที่ 4.3** การเจริญ และการรอดชีวิตของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในระหว่างกระบวนการปรับสภาพ

การทดลอง	เซลล์ทั้งหมดสูงสุด (เซลล์/มิลลิลิตร)	การรอดชีวิต (%)	อัตราการเจริญ เติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง <sup>-1</sup> )	ระยะเวลาที่ทำให้ ปริมาณ เซลล์มีค่าสูงสุด (ชั่วโมง)	ระยะ พัก (ชั่วโมง)
สภาวะควบคุม	$1.99 \pm 0.04 \times 10^8$	$92.04 \pm 2.46$	$0.28 \pm 0.00$	12	0.9
สารละลายกากมัน 20% (v/v)					
รอบที่ 1 <sup>a</sup>	$2.55 \pm 0.16 \times 10^8$	$91.18 \pm 2.40$	$0.27 \pm 0.01$	12	1.5
รอบที่ 2 <sup>b</sup>	$2.58 \pm 0.17 \times 10^8$	$89.41 \pm 0.48$	$0.30 \pm 0.01$	12	1.0
สารละลายกากมัน 40% (v/v)					
รอบที่ 3 <sup>a</sup>	$2.42 \pm 0.06 \times 10^8$	$98.60 \pm 0.23$	$0.30 \pm 0.01$	24	1.9
รอบที่ 4 <sup>b</sup>	$2.44 \pm 0.01 \times 10^8$	$98.94 \pm 0.23$	$0.28 \pm 0.01$	12	1.5
สารละลายกากมัน 60% (v/v)					
รอบที่ 5 <sup>a</sup>	$1.95 \pm 0.10 \times 10^8$	$99.00 \pm 0.05$	$0.26 \pm 0.02$	36	2.0
รอบที่ 6	$2.03 \pm 0.13 \times 10^8$	$98.99 \pm 0.50$	$0.24 \pm 0.01$	24	1.9
รอบที่ 7 <sup>b</sup>	$2.16 \pm 0.06 \times 10^8$	$98.58 \pm 0.46$	$0.25 \pm 0.01$	12	15
สารละลายกากมัน 80% (v/v)					
รอบที่ 8 <sup>a</sup>	$1.74 \pm 0.06 \times 10^8$	$98.16 \pm 1.13$	$0.21 \pm 0.01$	48	2.0
รอบที่ 9	$1.74 \pm 0.07 \times 10^8$	$99.01 \pm 0.76$	$0.21 \pm 0.01$	36	1.9
รอบที่ 10	$1.74 \pm 0.15 \times 10^8$	$99.63 \pm 0.64$	$0.22 \pm 0.01$	36	1.6
รอบที่ 11	$1.88 \pm 0.13 \times 10^8$	$98.83 \pm 2.03$	$0.23 \pm 0.01$	24	1.6
รอบที่ 12 <sup>b</sup>	$1.96 \pm 0.12 \times 10^8$	$99.06 \pm 0.34$	$0.23 \pm 0.01$	12	1.6
สารละลายกากมัน 100% (v/v)					
รอบที่ 13 <sup>a</sup>	$1.52 \pm 0.10 \times 10^8$	$98.31 \pm 1.10$	$0.20 \pm 0.01$	48	1.9
รอบที่ 14	$1.48 \pm 0.14 \times 10^8$	$99.24 \pm 0.37$	$0.20 \pm 0.01$	48	1.7
รอบที่ 15	$1.68 \pm 0.11 \times 10^8$	$99.26 \pm 0.38$	$0.21 \pm 0.02$	36	1.5
รอบที่ 16	$1.55 \pm 0.02 \times 10^8$	$99.40 \pm 0.63$	$0.19 \pm 0.01$	24	1.5
รอบที่ 17	$1.67 \pm 0.16 \times 10^8$	$98.88 \pm 1.12$	$0.21 \pm 0.01$	12	1.3
รอบที่ 18	$1.97 \pm 0.06 \times 10^8$	$99.11 \pm 0.93$	$0.23 \pm 0.01$	12	1.3
รอบที่ 19 <sup>b</sup>	$2.04 \pm 0.07 \times 10^8$	$99.69 \pm 0.53$	$0.24 \pm 0.00$	12	1.3

หมายเหตุ : <sup>a,b</sup> คือ การปรับสภาพเชื้อรอบแรกและรอบสุดท้ายในสารละลายกากมันสำปะหลังแต่ละสูตรตามลำดับ

#### 4.3.2 สารยับยั้ง และการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้ง

จากที่รายงานไปข้างต้น สารยับยั้งที่สำคัญที่พบในสารละลายกากมันสำปะหลัง คือ กรดอะซิติก กรดลิวูลินิก และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอพิวริล ในการดำเนินการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่มีการใช้อาหารปรับสภาพหลายความเข้มข้น พบว่า ในอาหารที่ใช้ไฮโดรไลเซสที่มีความเข้มข้นสูง จะพบปริมาณสารยับยั้งที่มากขึ้น ดังภาพที่ 4.2 ในช่วงแรกของการหมัก พบกรดอะซิติก และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวริลในปริมาณสูง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารละลายกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารปรับสภาพ โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 20% 40% 60% 80% และ 100% (v/v) มีกรดอะซิติกเริ่มต้นเท่ากับ  $4.08 \pm$

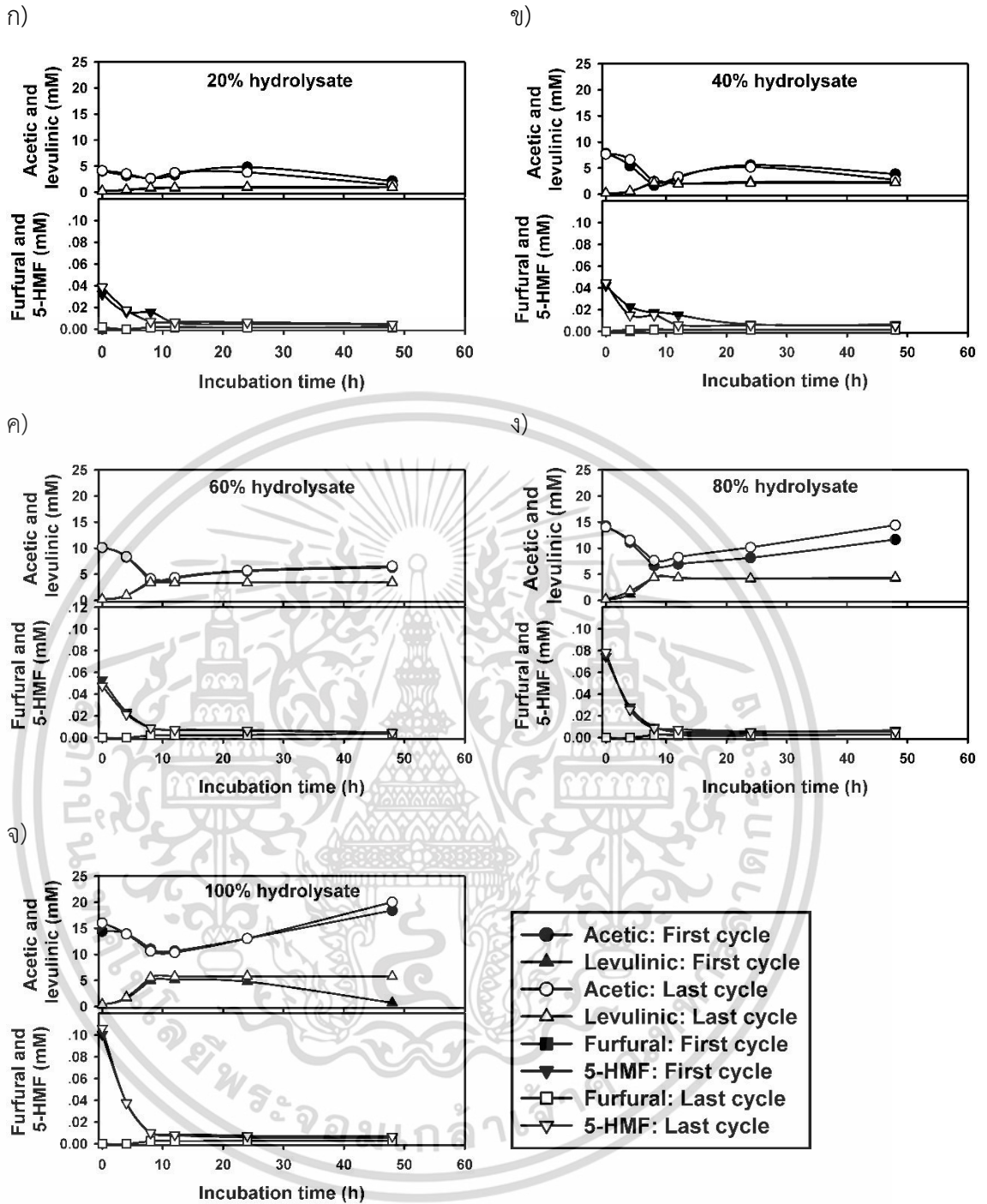
เอกสารนี้เป็นเอกสารหลังวันเวสต์หรือบริการเชิงพาณิชย์อื่น ๆ ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

0.04 7.75±0.08 10.13±0.01 14.16±0.12 และ 15.96±0.09 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีลเริ่มต้นเท่ากับ 0.035±0.004 0.043±0.002 0.051±0.003 0.076±0.002 และ 0.103±0.003 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้มีรายงานว่า กรดอะซิติกมักพบในปริมาณสูงกว่าสารยับยั้งที่เป็นกรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก เช่นเดียวผลการทดลองของ Tomás-Pejó *et al.* (2010) และ Tian *et al.* (2011) และยังพบว่าเป็นสารยับยั้งที่พบมากในไฮโดรไลเซส Nilvebrant *et al.* (2003) รายงานว่า โดยทั่วไปแล้ว เฟอพิวรีลมักพบในปริมาณที่น้อยกว่า 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีล ซึ่งในการศึกษานี้ ไม่พบสารยับยั้งเฟอพิวรีล

จากการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสภายใต้สภาวะที่เป็นกรดร่วมกับการให้ความร้อน มักพบ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีล ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายจากน้ำตาลเฮกโซส และยังสามารถสลายตัวไปเป็นกรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก ซึ่งจากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่ากรดลิวลินิกที่เกิดขึ้นในสารละลายกากมันสำปะหลังนั้นมีความเข้มข้นต่ำ ในขณะที่ไม่พบกรดฟอร์มิก อันเนื่องมาจากการสลายตัวของสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีลที่เกิดขึ้นได้น้อย (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Thomas *et al.*, 2002) ส่วนกรดอะซิติกเกิดจากการย่อยสลายของหมู่อะซิติกที่มีอยู่ในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Almeida *et al.*, 2007) นอกจากนี้กรดอะซิติกยังเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces sp.* อีกด้วย (Narendranath *et al.*, 2001) ในผลการศึกษาจะเห็นได้ว่ากรดลิวลินิกที่เกิดขึ้นในสารละลายกากมันสำปะหลังมีปริมาณต่ำ ในขณะที่ไม่พบกรดฟอร์มิก อาจมาจากการสลายตัวของสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีลเกิดขึ้นได้น้อย

จากวิธีการปรับสภาพกากมันสำปะหลังในการศึกษานี้โดยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริก 0.6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 30 นาที พบปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีลน้อยมาก (ประมาณ 0.1 มิลลิโมลาร์) ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาของ Lacerda *et al.* (2013) ที่ศึกษาการย่อยเส้นใยป่าน (sisal pulp) โดยใช้สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร (ประมาณ 0.5 โมลาร์) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่า การย่อยที่เวลาดำกว่า 120 นาที พบปริมาณเฟอพิวรีล (น้อยกว่า 0.26 มิลลิโมลาร์) และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีล (น้อยกว่า 0.04 มิลลิโมลาร์) ในไฮโดรไลเซสปริมาณต่ำ และสามารถพบกรดฟอร์มิกเมื่อใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นตั้งแต่ 15-25% โดยปริมาตร (1.5-2.5 โมลาร์) ขึ้นไป ดังนั้นชนิดสารยับยั้งและปริมาณสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสารละลายลิกโนเซลลูโลสมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบและกระบวนการเตรียมวัตถุดิบที่เลือกใช้



ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอะซิติก กรดลิวลินิก เฟอร์ฟูรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอร์ฟูรัล ในระหว่างการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่เลี้ยงในอาหารที่ผสม สารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 20% (ก) 40% (ข) 60% (ค) 80% (ง) และ 100% (จ) ในรอบแรก และรอบสุดท้าย

สำหรับแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสารยับยั้งในระหว่างการปรับสภาพเชื้อยีสต์รอบแรกและรอบสุดท้ายในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตรนั้น มีรูปการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารยับยั้งที่เหมือนกัน (ภาพที่ 4.2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณกรดอะซิติกมีค่าน้อยลงอย่างต่อเนื่อง ใน 8 ชั่วโมงแรก และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ซึ่งกรดอะซิติกนี้เป็นกรดที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซิติคสามารถดูดซึมโดยนำไปสร้างอะซิติลโคเอ (Acetyl CoA) และนำไปใช้ในวัฏจักรเครปต่อไป อย่างไรก็ตาม กรดอะซิติคก็เป็นผลพลอยได้จากการหมักโดยใช้ยีสต์เช่นกัน (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Thomas *et al.*, 2002) สำหรับกรดลิวูลินิกมีปริมาณมากขึ้นอย่างรวดเร็วใน 8 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นจึงมีปริมาณคงที่ตลอดการหมัก มีการวิจัยที่สอดคล้องกันกับผลการทดลองนี้ โดย Thompson *et al.* (2016) พบว่า กรดลิวูลินิกมีค่าสูงขึ้นในระหว่างการหมัก เช่นเดียวกับ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล ที่มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วใน 8 ชั่วโมงแรก การศึกษาของ Palmqvist and Hahn-Hägerdal (2000) แสดงให้เห็นว่ายีสต์ *S. cerevisiae* สามารถเปลี่ยน 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล ด้วยเอนไซม์ไปเป็นสารประกอบที่เป็นพิษน้อยลง โดย 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลถูกรีดิวซ์ไปเป็น 2,5-bis-hydroxymethylfuran (HMF-alcohol) ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (Liu *et al.*, 2004) และ Koppram *et al.* (2012) ยังค้นพบว่า ในระหว่างการปรับสภาพ เซลล์มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสารยับยั้งประเภทฟูแรนได้ ทั้งนี้ข้อมูลของสารยับยั้งกรดฟอร์มิกไม่ได้นำมาแสดงเนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นขั้นสุดท้ายต่ำมากจนไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ดังนั้น ในการค่อยๆปรับสภาพเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ซึ่งเชื่อมีการนำสารยับยั้งไปใช้ ถือได้ว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญซึ่งอาจช่วยให้เซลล์ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างการปรับสภาพกากมันสำปะหลังได้ดีขึ้น

#### 4.3.3 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในระหว่างการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารแต่ละสูตรโดยคำนวณค่าพารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอล จากชั่วโมงที่ 8 ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด โดยพบว่า การปรับสภาพเชื้อยีสต์ในอาหารแต่ละสูตรมีผลต่อการปรับปรุงการใช้น้ำตาลกลูโคสในสารละลายได้ดีขึ้น แต่พบการลดลงของอัตราการผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมักในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 80% และ 100% (v/v) ดังตารางที่ 4.4 เนื่องมาจากความเป็นพิษจากความเข้มข้นของสารยับยั้งที่พบในอาหารปรับสภาพมากขึ้นนั่นเอง (ภาพที่ 4.2) จากการปรับสภาพปรับสภาพเชื้อยีสต์ในขั้นแรกๆที่เริ่มเลี้ยงในสภาวะควบคุม (ไม่เติมสารละลายกากมันสำปะหลัง) พบว่า เชื้อมีประสิทธิภาพการหมักสูงถึง 96.15 % และเมื่อเลี้ยงเชื้อลงในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 20% (v/v) รอบแรก พบว่ามีประสิทธิภาพการหมักลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม โดยในสภาวะที่มีสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 20% (v/v) ในการศึกษาพบสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างการปรับสภาพโดยพบกรดอะซิติคปริมาณเริ่มต้นต่ำมากประมาณ 4 มิลลิโมลาร์ ดังที่รายงานไว้ข้างต้น มีรายงานก่อนหน้านี้ที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้กรดอะซิติคความเข้มข้นต่ำในการปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอล การศึกษาของ Thomas *et al.* (2002) พบว่า ในสภาวะการหมักที่มีกรดอะซิติค ทำให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีกรดอะซิติค และ Greetham (2014) ค้นพบว่า ความเข้มข้นกรดอะซิติคที่ต่ำกว่า 25 มิลลิโมลาร์ ไม่ส่งผลต่อ metabolic output ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ Larsson *et al.* (1999) รายงานเพิ่มเติมว่า กรดอะซิติคที่ความเข้มข้นต่ำช่วยเพิ่มผลได้ของเอทานอลซึ่งอาจเกิดจากการกระตุ้นการผลิต ATP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.4** พารามิเตอร์ทางจุลชีววิทยาของการผลิตเอทานอลจากการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตร

การทดลอง	อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)	ผลผลิตชีวมวล (เซลล์/กรัม)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการหมัก (%)
สภาวะควบคุม	6.08	0.49	$4.09 \times 10^6$	3.20	96.15
สารละลายกากมัน 20% (v/v)					
รอบที่ 1 <sup>a</sup>	5.61	0.48	$5.49 \times 10^6$	3.14	94.83
รอบที่ 2 <sup>b</sup>	6.02	0.49	$5.55 \times 10^6$	3.19	96.12
สารละลายกากมัน 40% (v/v)					
รอบที่ 3 <sup>a</sup>	6.52	0.46	$4.60 \times 10^6$	2.96	89.37
รอบที่ 4 <sup>b</sup>	6.57	0.47	$4.64 \times 10^6$	3.09	93.10
สารละลายกากมัน 60% (v/v)					
รอบที่ 5 <sup>a</sup>	6.80	0.44	$3.41 \times 10^6$	2.86	86.35
รอบที่ 7 <sup>b</sup>	7.49	0.41	$3.78 \times 10^6$	2.91	80.09
สารละลายกากมัน 80% (v/v)					
รอบที่ 8 <sup>a</sup>	6.77	0.43	$3.03 \times 10^6$	2.80	84.50
รอบที่ 12 <sup>b</sup>	7.58	0.40	$3.41 \times 10^6$	2.62	78.96
สารละลายกากมัน 100% (v/v)					
รอบที่ 13 <sup>a</sup>	7.96	0.36	$2.44 \times 10^6$	2.32	69.91
รอบที่ 19 <sup>b</sup>	7.62	0.32	$3.27 \times 10^6$	2.06	62.14

หมายเหตุ : เวลาที่ได้เอทานอลสูงสุดคือชั่วโมงที่ 8, <sup>a,b</sup> คือ การปรับสภาพเชื้อรอบแรกและรอบสุดท้ายในสารละลายกากมันสำหรับแต่ละสูตร ตามลำดับ

เมื่อสังเกตประสิทธิภาพการหมักในรอบแรกของสภาวะที่มีความเข้มข้นของกากมันสำหรับ 20% (v/v) พบว่ามีค่าเท่ากับ 94.83% และในรอบสุดท้าย มีค่าเท่ากับ 96.12% จะเห็นได้ว่าไม่มีความแตกต่างกันของผลได้เอทานอล อัตราการผลิตเอทานอล การใช้น้ำตาล และประสิทธิภาพในการหมักระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำในอาหารเดิม เมื่อทำการปรับสภาพเชื้อยีสต์ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำหรับ 60% 80% และ 100% (v/v) พบว่า ผลได้เอทานอลและประสิทธิภาพในการหมักลดลงในรอบสุดท้ายเมื่อเปรียบเทียบกับรอบแรก (ตารางที่ 4.4) อย่างไรก็ตาม ในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำหรับ 60% 80% และ 100% (v/v) ในรอบแรกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุดท้าย พบว่า ปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุด (ตารางที่ 4.3) และผลผลิตชีวมวล ( $Y_{x/s}$ ) (ตารางที่ 4.4) มีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับผลในรอบแรกของการปรับสภาพในอาหารแต่ละสูตร สิ่งนี้สามารถอธิบายได้จากกระจายตัวของ flux ของคาร์บอนในระหว่างการหมักเอทานอลซึ่งนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ห่อหุ้มประกอบ (anabolism) และเมตาโบลิซึมของพลังงานภายในเซลล์ โดยในรอบแรกของอาหารปรับสภาพแต่ละสูตร เซลล์อาจต้องปรับตัวให้เข้ากับความเข้มข้นของสารยับยั้งที่สูงขึ้น จึงจำเป็นต้องใช้พลังงานมากกว่าปกติเพื่อใช้ในการหมักเอทานอล ดังจะเห็นได้จากผลได้เอทานอลที่มากขึ้นในรอบแรก (ตารางที่ 4.4) และหลังจากที่เซลล์สามารถปรับตัวให้ทนต่อสารยับยั้งในรอบสุดท้ายในอาหารแต่ละสูตร พบการเจริญของเซลล์เพิ่มขึ้นและแหล่งคาร์บอนสำหรับการหมักเอทานอลลดลง ผลการทดลองในการศึกษานี้คล้ายกับการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *Pichia stipitis* ของ Zhu et al. (2009) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรไลเสซซึ่งข้าวโพดตั้งแต่ 10% ถึง 50% (v/v) แต่ละความเข้มข้นทำการเลี้ยงเชื้อซ้ำ 3 รอบ พบว่า ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เหลือค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในอาหารที่มีความเข้มข้นไฮโดรเซสมากขึ้น ในขณะเดียวกัน เอทานอลที่ผลิตในแต่ละรอบมีปริมาณสูงขึ้นในอาหารที่มีความเข้มข้นไฮโดรเซสต่ำ และมีค่าน้อยลงในแต่ละรอบในสถานะที่มีความเข้มข้นของไฮโดรไลเสซสูงขึ้น

#### 4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งในรูปสารผสม และการผลิตเอทานอลในอาหารเหลว YPD โดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

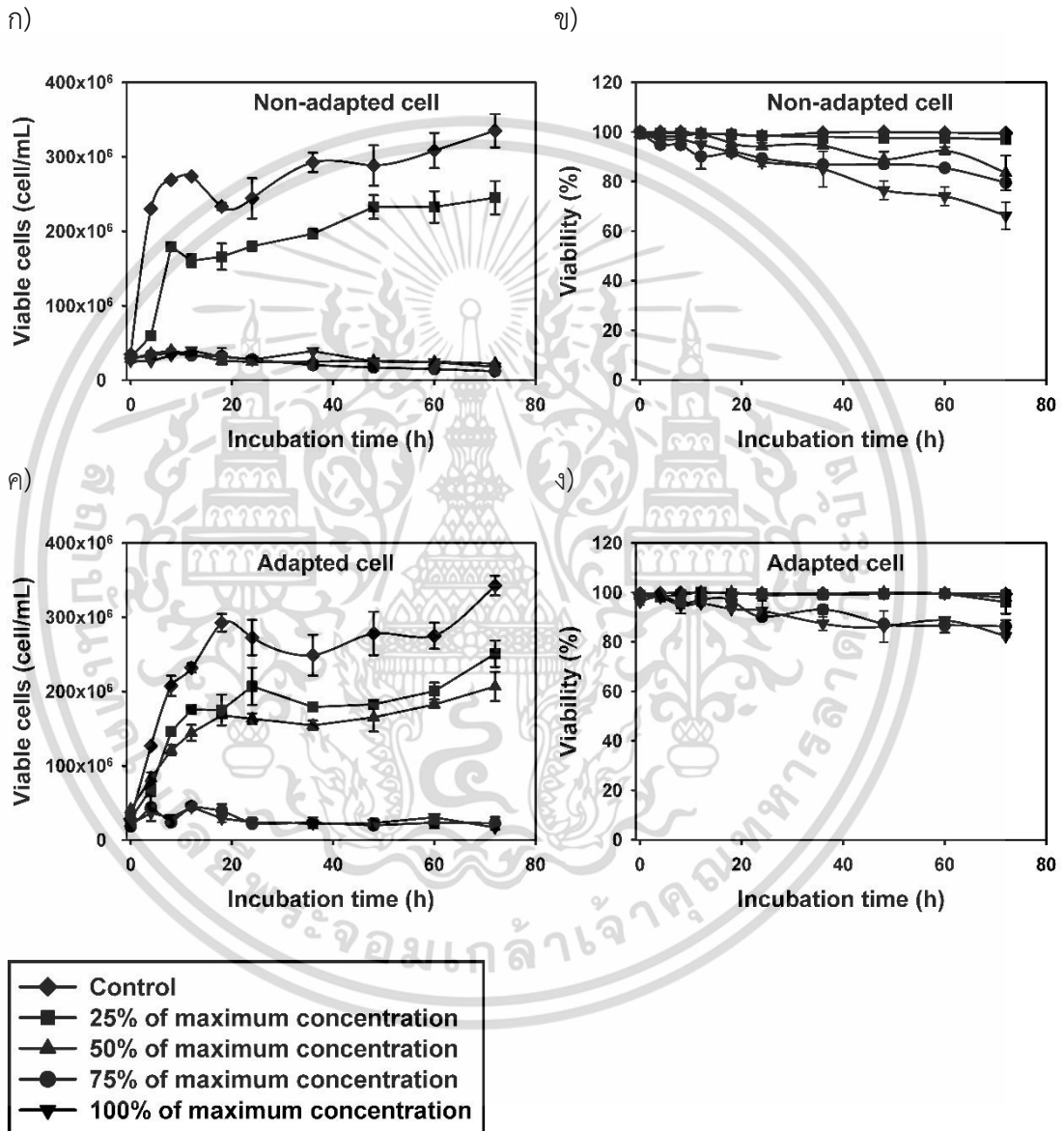
หลังทำการศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งแต่ละชนิด (กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เพอพิวรัล) ในหัวข้อที่ 4.2 ต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ จึงได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการมีสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิดร่วมกันในอาหารเหลว YPD โดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ ซึ่งความเข้มข้นของสารยับยั้งแต่ละชนิดที่เติมในอาหารได้มาจากการคัดเลือกความเข้มข้นของสารยับยั้งแต่ละชนิดที่ระดับสูงสุดที่ทำให้เชื้อยีสต์ (ยังไม่ปรับสภาพ) สามารถเติบโตไม่ต่ำกว่า 80% ของค่าการเจริญสูงสุด ดังความเข้มข้นที่แสดงในตารางที่ 3.1 โดยระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารยับยั้งกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรัลที่ยีสต์สามารถเจริญได้คือ 135 170 250 6.5 และ 8.77 มิลลิโมลลาร์ ตามลำดับ (ความเข้มข้นสูงสุด; 100%) จัดให้เป็นความเข้มข้นระดับที่ 4 แล้วทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นน้อยลงเหลือ 25% 50% และ 75% ของความเข้มข้นสูงสุด จัดให้เป็นความเข้มข้นระดับที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญ อัตราการรอดชีวิต การเปลี่ยนแปลงสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอล ตลอดจนเปรียบเทียบผลกับสถานะที่หมักโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ยังไม่ได้ปรับสภาพ

##### 4.4.1. การเจริญ และการรอดชีวิต

ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีเซลล์ที่มีชีวิต และการรอดชีวิตในสถานะควบคุมสูงสุด เมื่อเติมสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิดลงในอาหาร พบว่า ที่สถานะการเติมสารยับยั้งผสมน้อยที่สุด หรือความเข้มข้นระดับที่ 1 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อสูงกว่าความเข้มข้นระดับที่ 2 3 และ 4 ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ก และ 4.3 ข โดยที่ความเข้มข้นระดับที่ 1 เชื้อมีการรอดชีวิตต่ำ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กว่าสภาวะควบคุมเล็กน้อย และเมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมมากขึ้นเป็นระดับที่ 2 3 และ 4 การรอดชีวิตมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นระดับที่ 1 ประมาณ 13.54% 17.45% และ 30.78% ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อมีระยะพักประมาณ 4 ชั่วโมงในสภาวะที่มีสารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 1 ซึ่งนานกว่าสภาวะควบคุมที่ไม่เติมสารยับยั้ง

สำหรับการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ค และ 4.3 ง



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) และการรอดชีวิต (ข) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ได้ปรับสภาพ และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ค) และการรอดชีวิต (ง) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งในระดับความเข้มข้นต่างๆ

จากภาพที่ 4.3 ค และ 4.3 ง พบว่าเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าสูงสุดในสภาวะควบคุม และมีค่าน้อยลงในสภาวะที่เติมสารยับยั้งผสมที่ระดับความเข้มข้นที่ 1 และความเข้มข้นระดับที่ 2 ตามระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมที่มากขึ้น เมื่อเพิ่มความเข้มข้นสูงถึงระดับที่ 3 และ 4 พบการเจริญไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อน้อยมาก ส่วนการรอดชีวิตของเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะที่มีสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 2 มีค่าใกล้เคียงกับสภาวะควบคุม ในขณะที่การรอดชีวิตน้อยลงในระดับความเข้มข้นที่ 3 และ 4 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นระดับที่ 2 ประมาณ 11.6% และ 15.58% ตามลำดับ จุดสิ้นสุดการหมัก อย่างไรก็ตาม จากการทดลองสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้นที่ 2 หรือความเข้มข้น 50% ของความเข้มข้นสูงสุด พบว่า สภาวะที่ใช้เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพมีปริมาณเซลล์สูงกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพอย่างเห็นได้ชัด

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อทั้ง 2 ตัว ดังตารางที่ 4.5 พบว่า ในสภาวะที่เติมสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้นที่ 1 ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำกว่าสภาวะควบคุม แต่มีค่าสูงกว่าในอาหารที่มีสารยับยั้งผสมความเข้มข้นระดับที่ 2 3 และ 4 อย่างชัดเจน โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเจริญได้น้อยมากในระดับความเข้มข้นที่ 2 โดยให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.04 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$  ในขณะที่เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงกว่านั้นคือ  $0.08 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$  จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมิให้การเจริญที่สูงกว่าเชื้อที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ โดยแสดงความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้น 50% ของความเข้มข้นสูงสุด

**ตารางที่ 4.5** อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพและผ่านการปรับสภาพในอาหารเหลว YPD ที่มีการเติมสารยับยั้งผสมในระดับต่างๆ

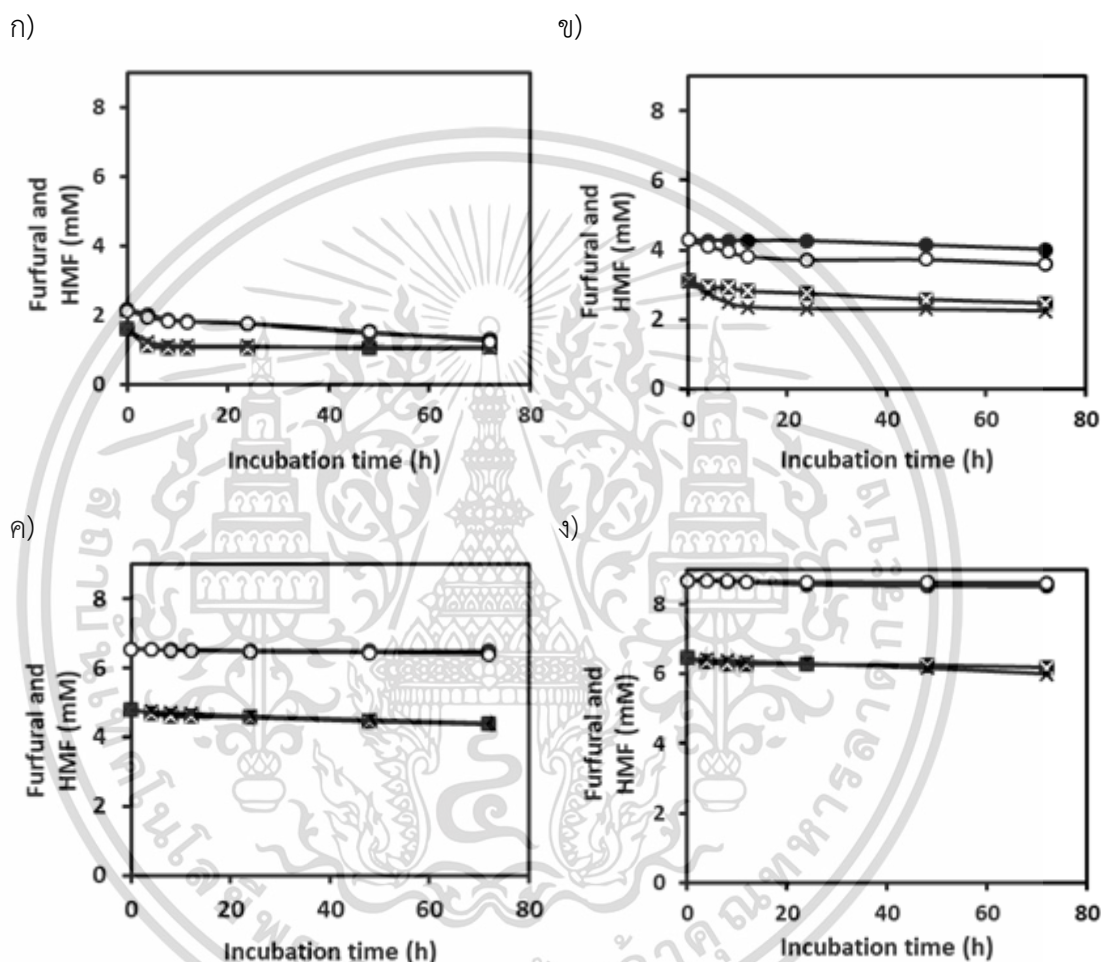
การทดลอง	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ( $\text{ชั่วโมง}^{-1}$ )	
	เชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ยังไม่ปรับสภาพ	เชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ
ควบคุม	$0.26 \pm 0.00$	$0.25 \pm 0.03$
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 1	$0.22 \pm 0.00$	$0.21 \pm 0.04$
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 2	$0.04 \pm 0.00$	$0.08 \pm 0.01$
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 3	$0.03 \pm 0.00$	$0.03 \pm 0.01$
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 4	$0.03 \pm 0.00$	$0.04 \pm 0.03$

#### 4.4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้ง

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารยับยั้งในระหว่างการหมักโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ พบการเปลี่ยนแปลงของสารยับยั้งประเภทฟูแรน ดังแสดงในภาพที่ 4.4 ในขณะที่สารยับยั้งประเภทกรดอ่อนไม่พบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการหมัก จึงไม่นำมาแสดงผล ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมระดับที่ 1 เชื้อทั้งสองตัวสามารถใช้สารยับยั้งทั้งเพอพิวริล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวริลได้ไม่แตกต่างกัน โดยมีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 4 ชั่วโมงแรก และอัตราการใช้สารยับยั้งทั้งสองไม่มีความแตกต่างโดยเชื้อทั้งสอง เมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงถึงระดับที่ 2 พบว่า เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพสามารถลดความเข้มข้นของสารยับยั้งทั้งสองได้มากกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งมีการลดลงของสารยับยั้งอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก โดยเพอพิวริลสามารถลดลงได้ 64.95% และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอ

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟิวรัลลดลง 16.10% โดยเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ส่วนเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพสามารถลดเฟอฟิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรัลได้ 88.56% และ 39.49% ตามลำดับ จากผลการทดลองเห็นได้ชัดว่า ที่ระดับของความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมเป็น 50% ของสารยับยั้งสูงสุด เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพมีความสามารถในการใช้สารยับยั้งทั้งสองในอาหารได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ แต่เมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมสูงขึ้นเป็นระดับที่ 3 และ 4 พบว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้งในระหว่างการหมัก



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้งเฟอฟิวรัล (—■—) และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรัล (—●—) โดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ผ่านปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพ [(—×—), (—○—)] ที่เลี้ยงในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งผสมระดับความเข้มข้นที่ 1 (ก) 2 (ข) 3 (ค) และ 4 (ง)

ในการศึกษานี้จะเห็นว่า การลดลงของสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรัลช้ากว่าการลดลงของเฟอฟิวรัล ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Larsson *et al.* (1999) อีกทั้งมีการศึกษาอื่น ๆ ก่อนหน้านี้ รายงานว่า ยีสต์สามารถใช้สารยับยั้งเฟอฟิวรัลได้ทั้งหมดโดยใช้เวลาเร็วกว่า 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรัล โดยสามารถเปลี่ยนสารยับยั้งประเภทฟูแรนไปเป็นสารประกอบที่มีความเป็นพิษน้อยกว่า นั่นคือ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟิวรัลถูกเปลี่ยนไปเป็น 2,5-บิส-ไฮดรอกซีเมทิลฟูแรน (2,5-bis-hydroxymethylfuran) และเฟอฟิวรัลสามารถเปลี่ยนไปเป็นเฟอฟิวรัล แอลกอฮอล์ (furfuryl alcohol) เมื่อสารยับยั้งถูกเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นแล้วจะปรากฏการเจริญของเชื้อยีสต์ขึ้น (Villa *et al.*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

al., 1992; Taherzadeh *et al.*, 2000a; Liu *et al.*, 2004) Palmqvist *et al.* (1999a) รายงานว่า อัตราการลดลงของเพอพิวรัลมีค่าลดลงเนื่องจากเซลล์ตายเมื่อความเข้มข้นของเพอพิวรัลสูงมาก เช่นเดียวกับการเปลี่ยนแปลงของสารยับยั้งในผลการศึกษาเมื่อมีการใช้เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพ แล้วพบว่าเชื้อมีความสามารถสูงในการใช้สารยับยั้งทั้งเพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรัล เช่นเดียวกับการรายงานของ Tian *et al.* (2011) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Wallace-Salinas and Gorwa-Grauslund (2013) รายงานว่า ในสภาวะที่มีกรดอินทรีย์ในไฮโดรไลเซส การเจริญ และประสิทธิภาพการหมักของเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพไม่มีความแตกต่างกับเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ และ Landaeta *et al.* (2013) ยังพบอีกว่า ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นกรดอะซิติกในระหว่างการหมักแบบแบทช์จากสายพันธุ์ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ได้ปรับสภาพ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของการใช้กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิกในอาหารจาก เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ได้ปรับสภาพ ตลอดจนไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดที่เติมลงในระหว่างการหมัก ดังนั้น จะเห็นได้ว่าในสภาวะที่มีสารยับยั้งผสมในอาหาร เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพจะมีความทนต่อสารยับยั้ง โดยเซลล์สามารถนำสารยับยั้งในกลุ่มฟูแรนไปใช้ได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ Martin *et al.* (2007) และ Tian *et al.* (2011)

#### 4.4.3 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล

ความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ผ่านการปรับสภาพในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้นต่างๆ นำมาแสดงเป็นค่าพารามิเตอร์ ดังแสดงในตารางที่ 4.6 แต่ไม่ได้แสดงข้อมูลในสภาวะความเข้มข้นระดับที่ 3 และ 4 เนื่องจากมีอัตราการเจริญ และอัตราการใช้น้ำตาลของเชื้อรวมถึงการผลิตเอทานอลมีค่าต่ำมากซึ่งไม่สามารถนำมาคำนวณได้ จากผลการทดลองพบว่า เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะควบคุม และในสภาวะที่สารยับยั้งผสมระดับความเข้มข้นที่ 1 ให้อัตราการผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมักสูง โดยให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่เวลาการหมัก 8 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับความสามารถในการหมักเอทานอลโดยเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพ เมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมสูงขึ้น เป็นระดับที่ 2 พบว่า เชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอทานอลโดยให้ความเข้มข้นสูงสุดนานขึ้นเป็น 12 ชั่วโมง โดยอัตราการผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมักโดยเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ มีค่าเท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 63.63% ตามลำดับ และเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพ ให้อัตราการผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมัก เท่ากับ 0.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 104.45% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ Boulton (2000) อธิบายว่า การเติมกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ช่วยให้เกิดการสลายไกลโคเจนในเมแทบอลิซึมมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อสร้างเอทานอลได้สูงกว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี เช่นเดียวกันกับการศึกษาที่ใช้อาหารเหลว YPD ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร จึงทำให้มีประสิทธิภาพการหมักค่อนข้างสูง นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมที่ 1 เชื้อยังสามารถให้ประสิทธิภาพการหมักสูงใกล้เคียงกับสภาวะควบคุม อาจเนื่องมาจากการมีกรดอะซิติกในปริมาณต่ำ งานวิจัยของ Greetham *et al.* (2016) เปิดเผยว่า การเติมกรดอะซิติกในระดับ 20 มิลลิโมลาร์ สามารถป้องกันเซลล์ยีสต์อื่นเนื่องมาจากความเครียดจากสารยับยั้งเพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เพอพิวรัลได้ อีกทั้งช่วยปรับปรุงอัตราการใช้น้ำตาลและอัตราการผลิตเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอลได้ จึงเป็นไปได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมที่ 1 ซึ่งเติมกรดอะซิติกลงในอาหาร YPD ความเข้มข้น 33.75 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มความสารถในการหมักให้สูงขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมสูงขึ้นเป็นระดับที่ 2 ซึ่งเติมกรดอะซิติก 67.5 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการหมักลดลง ซึ่งรายงานของ Greetham (2014) ได้อธิบายว่า การเจริญเติบโตของเชื้อและประสิทธิภาพการหมักลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงถึง 50 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมมากขึ้นกว่าระดับนี้ไม่พบการผลิตเอทานอลของเชื้อทั้งสอง โดยการศึกษาของ Larsson *et al.* (1999) ได้จำลองโมเดลผลของสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่อการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่า สภาวะที่มีสารยับยั้งจากกรดสามชนิด และจากอนุพันธ์เฟอพิวรัลยิ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งร่วมกัน จะเห็นได้ว่าการใช้สารยับยั้งร่วมกันนั้นสามารถเสริมฤทธิ์กันในการเกิดผลกระทบด้านลบต่อการเจริญ และการหมักเอทานอลของเชื้อ

**ตารางที่ 4.6** พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพ ในอาหาร YPD ที่มีการเติมสารยับยั้งผสมในระดับต่างๆ

การทดลอง	เวลาที่ได้อเอทานอลสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการหมัก (%)
ควบคุม						
เชื้อยังไม่ปรับสภาพ	8	2.39	0.25	0.53	1.28	104.77
เชื้อผ่านการปรับสภาพ	8	2.29	0.07	0.54	1.25	106.58
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 1						
เชื้อยังไม่ปรับสภาพ	8	2.38	0.15	0.54	1.30	106.74
เชื้อผ่านการปรับสภาพ	8	2.22	0.15	0.54	1.19	105.10
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 2						
เชื้อยังไม่ปรับสภาพ	12	1.59	0.20	0.32	0.52	63.63
เชื้อผ่านการปรับสภาพ	12	1.39	0.66	0.53	0.74	104.45

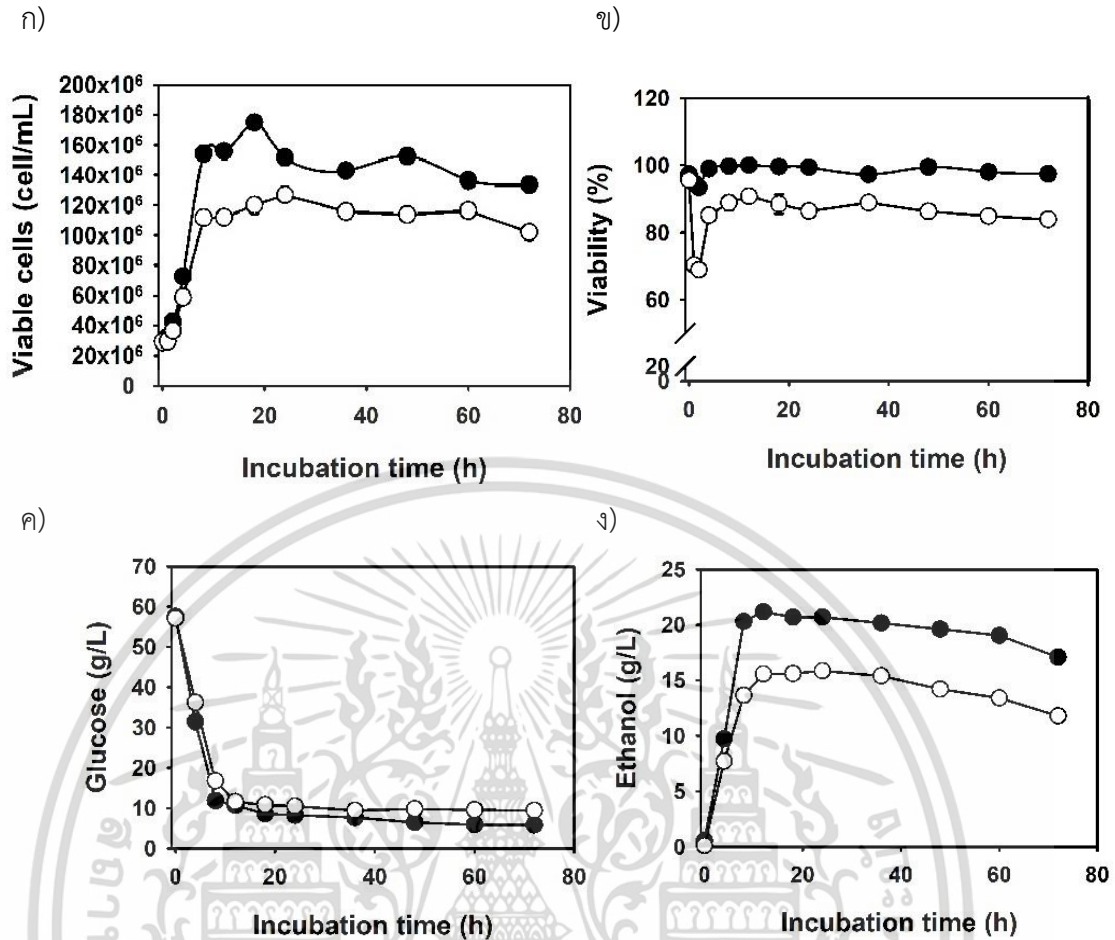
Tomás-Pejó *et al.* (2010) ศึกษาการปรับสภาพเชื้อยีสต์ด้วยการเลี้ยงเชื้อในสารละลายฟางข้าวสาลี โดยค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย พบว่า เชื้อที่ผ่านปรับสภาพสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการหมัก และทนต่อสารยับยั้งได้ดีกว่าการใช้เชื้อที่ยังไม่ได้ปรับสภาพ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาอื่นๆ (Zhu *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2007) มีการรายงานว่า ความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งของเชื้อที่ได้จากการปรับสภาพ สามารถลดความเข้มข้นของเอทานอลเป็นเอทานอลที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นอญูชาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลได้อย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อสายพันธุ์เดิม ดังนั้น การศึกษาปัจจัยร่วมกันของสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิดโดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ สามารถเจริญและให้ประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลสูงกว่าการใช้เชื้อที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ โดยแสดงความสามารถในการทนสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้น 50% ของความเข้มข้นสูงสุดได้นั้นคือ ที่ระดับความเข้มข้นของกรดอะซิติก 67.5 มิลลิโมลาร์ กรดฟอร์มิก 85 มิลลิโมลาร์ กรดลิวลินิก 125 มิลลิโมลาร์ เฟอพิวรัล 3.25 มิลลิโมลาร์ และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล 4.39 มิลลิโมลาร์ จึงมีความเป็นไปได้ว่าการใช้ไฮโดรไลเซสที่เตรียมได้จากวัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตรต้องมีความเข้มข้นของสารยับยั้งต่างๆ เริ่มต้นไม่เกินตามที่อธิบายไว้ข้างต้น เพื่อสามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการหมักเอทานอลในอุตสาหกรรมโดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ

#### 4.5 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

##### 4.5.1 การเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการกำจัดสารพิษความเข้มข้น 100% (v/v)

จากการปรับสภาพยีสต์ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสารละลายไฮโดรไลเซสเป็นกระบวนการทางชีวภาพอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความสะดวกซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการกำจัดสารพิษในสารละลายได้ (Parawira and Tekere, 2011) ในการศึกษาครั้งนี้ ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ได้จากการปรับสภาพของรอบสุดท้ายถูกนำมาเพาะเลี้ยงในสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (v/v) ที่ไม่กำจัดสารพิษ เพื่อประเมินการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลเพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ผลการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ภาพที่ 4.5ก, ข; ตารางที่ 4.7) เมื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะพบว่าเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.22 \pm 0.00$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> ในขณะที่เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีค่าเท่ากับ  $0.19 \pm 0.00$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> (ตารางที่ 4.7) ช่วงระยะพักของเชื้อที่ปรับสภาพและไม่ปรับสภาพ ซึ่งมีปริมาณเซลล์ค่อนข้างน้อย มีระยะพักเท่ากับ 0.3 และ 0.7 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลกลูโคสและการผลิตเอทานอลโดยเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพและยังไม่ปรับสภาพ ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ค และ ง และตารางที่ 4.7 พบว่า เชื้อที่ปรับสภาพแล้วให้ความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้เอทานอล ประสิทธิภาพการหมัก และอัตราการผลิต เอทานอลที่สูงกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพอย่างมีนัยสำคัญ ( $p \leq 0.05$ ) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Silva and Roberto (2001) ซึ่งรายงานว่า จุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนต่อสารยับยั้งแล้วสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลในสารละลายลิกโนเซลลูโลสได้



ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) อัตราการรอดชีวิต (ข) การใช้น้ำตาลกลูโคส (ค) และ (ง) การผลิตเอทานอล ของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ (—●—) และไม่ผ่านการปรับสภาพ (—○—) ในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษความเข้มข้น 100% (v/v)

เมื่อเปรียบเทียบผลของการศึกษานี้กับการศึกษาของ Landaeta *et al.* (2013) ที่ทำการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NRRL Y-265 ในอาหารที่ค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นสารยับยั้งต่างกัน 5 ระดับ โดยมีการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ อาหารที่ใช้นั้นเป็นสภาวะจำลองปริมาณสารยับยั้งในสารละลายจากไม้ยูคาลิปตัส พารามิเตอร์ทางจุลพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลแสดงในตารางที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าเชื้อที่ปรับสภาพในสภาวะที่มีสารละลายจากยูคาลิปตัสสามารถปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตเอทานอลประมาณ 70% และ 10% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลของเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า เชื้อที่ปรับสภาพมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตเอทานอลได้ 17% และ 46% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลของเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ อย่างไรก็ตาม ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตเอทานอลที่ได้จากผลการศึกษา Landaeta *et al.* (2013) มีค่าต่ำกว่าผลจากการศึกษานี้ทั้งเชื้อที่ปรับสภาพและไม่ปรับสภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.7** พารามิเตอร์การเจริญและการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษ 100% (v/v)

พารามิเตอร์	การศึกษาปัจจุบัน		การศึกษาของ Landaeta <i>et al.</i> (2013)	
	เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพ	เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ	เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพ	เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ
ระยะพัก (ชั่วโมง)	0.3	0.7	nd	nd
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง <sup>-1</sup> )	0.22 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.05	0.03
ปริมาณเซลล์สูงสุด (×10 <sup>8</sup> เซลล์/มิลลิลิตร)	1.75 ± 0.05	1.27 ± 0.02	nd	nd
ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)	0.43 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.34 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.48	0.48
ประสิทธิภาพการหมัก (%)	83.82 ± 1.37 <sup>a</sup>	66.04 ± 2.94 <sup>b</sup>	nd	nd
อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	2.47 ± 0.01 <sup>a</sup>	1.69 ± 0.08 <sup>b</sup>	0.53	0.48

หมายเหตุ : <sup>a, b</sup> ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ), การศึกษาของ Landaeta *et al.* (2013) เปรียบเทียบผลการเจริญและประสิทธิภาพการหมักของเชื้อที่ปรับและไม่ปรับสภาพในสารละลายยูคาลิปตัส  
nd: ไม่มีข้อมูล

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Parekh *et al.* (1986) ซึ่งรายงานว่ายีสต์ *Candida shehatae* และ *Pichia stipites* ที่ปรับสภาพแล้วด้วยวิธีการนำเซลล์กลับมาเพาะเลี้ยงในสารละลายไม้แอสเพน (aspen wood) หลากๆ รอบ ส่งผลให้การผลิตเอทานอลมีค่ามากขึ้นประมาณ 13% เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ Yu and Zhang (2003) รายงานว่า การเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ปรับสภาพในสารละลายที่ได้จากการย่อยฝ้าย สามารถเพิ่มการผลิตเอทานอลได้สูงกว่าการใช้เชื้อที่ยังไม่ปรับสภาพ และการศึกษาของ Pornpukdeewattana *et al.* (2014) ทดลองการหมักเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดอ่อน พบว่าด้วยเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพให้ผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.42 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส และเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพให้ผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.35 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส

การทดลองการเพื่อทดสอบความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ปรับสภาพด้วยเทคนิค Spot plate โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองบนเพลทที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังแตกต่างกัน (0% 50% และ 100% (v/v)) พบว่า เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ผ่านการปรับสภาพสามารถเจริญได้ดีในเพลทที่ไม่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง (0% (v/v)) (สภาวะควบคุม) แต่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังมากขึ้นเป็น 50% (v/v) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และเมื่อความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังมากขึ้นเป็น 100% (v/v)

พบเพียงการเจริญของเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพเท่านั้น ในขณะที่เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพการเจริญถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ ดังภาพที่ 4.6 ซึ่งเห็นได้ชัดว่าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วสามารถทนต่อสารยับยั้งในสารละลายกากมันสำปะหลังได้มากกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ

Tested medium	Strain	Dilution fold of cell suspension		
		$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
0% cassava hydrolysate medium (Control)	Non adapted cells			
	Adapted cells			
50% cassava hydrolysate medium	Non adapted cells			
	Adapted cells			
100% cassava hydrolysate medium	Non adapted cells			
	Adapted cells			

ภาพที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการกำจัดสารพิษ ต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ผ่านการปรับสภาพ การทดลองนี้ใช้เทคนิค Spot plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

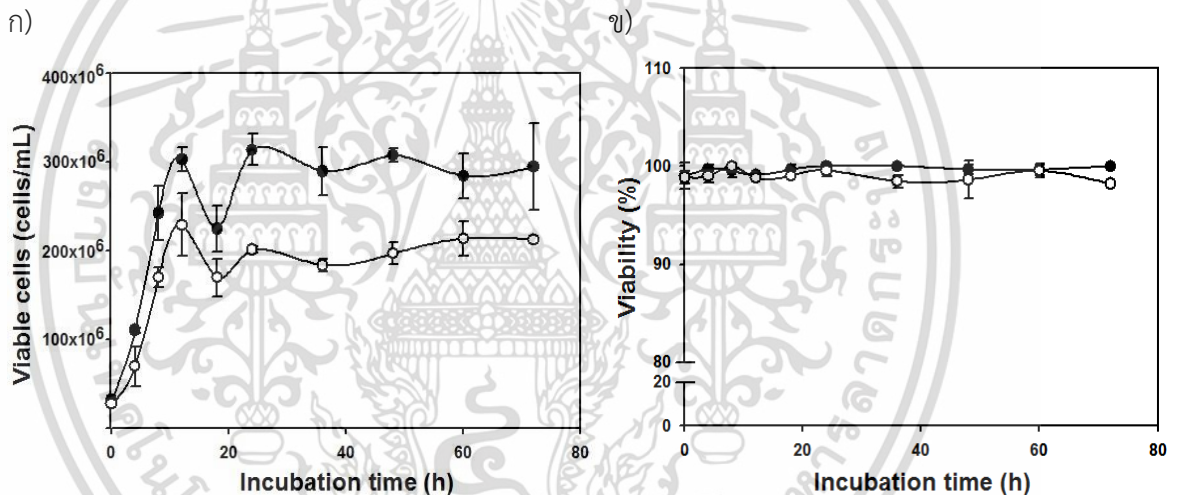
#### 4.5.2 การเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% ที่ผ่านการกำจัดและไม่กำจัดสารพิษ

อย่างที่ได้อธิบายในขั้นต้นว่าปัญหาหลักในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบโดยการย่อยด้วยกรดภายใต้อุณหภูมิสูงเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้นคือการเกิดสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ และกระบวนการหมัก (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Walker, 2011) นอกจากนี้การปรับสภาพเชื้อให้สามารถทนต่อสารยับยั้งแล้ว การลดความเป็นพิษของสับสเตรทก่อนจะเข้าสู่กระบวนการหมักเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มศักยภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสให้ดีขึ้น ดังนั้นการลดความเป็นพิษในการศึกษานี้ใช้วิธีการเติมปูนขาวให้มากเกินไป (Overliming) ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งนับว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และมีค่าใช้จ่ายไม่สูง (Mohagheghi *et al.*, 2006; Yang and Wyman, 2008) การศึกษานี้ทำโดยนำเชื้อยีสต์ที่ผ่านการเอกลำนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปรับสภาพมาเลี้ยงในอาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (v/v) ในส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ และส่วนที่กำจัดสารพิษ ตรวจสอบการเจริญ อัตราการรอดชีวิต และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

#### 4.5.2.1 การเจริญ และการรอดชีวิต

จากผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังส่วนที่กำจัดสารพิษ และไม่กำจัดสารพิษ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 จะเห็นได้ว่าเชื้อยีสต์ที่เจริญในสารละลายกากมันสำปะหลังที่กำจัดสารพิษให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและการรอดชีวิตสูงกว่าในสถานะที่ไม่กำจัดสารพิษอย่างเห็นได้ชัด โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.25 \pm 0.01$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> ซึ่งมากกว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในสถานะที่ไม่กำจัดสารพิษออก คือ  $0.23 \pm 0.00$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อยีสต์ใช้เวลาในการปรับตัวในสถานะที่กำจัดสารพิษเพียง 1.7 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าในสถานะที่ไม่มีกำจัดสารพิษซึ่งใช้เวลาการปรับตัวเท่ากับ 2.6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) และการรอดชีวิต (ข) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่กำจัด (—●—) และไม่กำจัดสารพิษ (—○—)

การศึกษาของ van Zyl *et al.* (1988) อธิบายว่า การกำจัดสารพิษด้วยการปรับ pH ของสารละลายให้เป็นด่างสูงๆ ช่วยให้เกิดการตกตะกอนของสารพิษ โดยสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิก (Roberto *et al.*, 1991b) รวมถึงกรดอะซิติก เพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรัล (Tian *et al.*, 2011) จึงเป็นไปได้ว่า การกำจัดสารพิษในสารละลายกากมันสำปะหลังก่อนจะนำมาใช้ในการทดลองด้วยการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์นั้น ส่งผลให้เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพมีการเจริญและการอยู่รอดสูงกว่าการเจริญของเชื้อในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่ได้กำจัดสารพิษ

#### 4.5.2 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

ทำการประเมินประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล ณ ชั่วโมงที่ 8 ที่เชื้อสามารถผลิตเอทานอลโดยให้ความเข้มข้นสูงสุด พบว่า ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่กำจัดสารพิษออก เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพให้ผลได้เอทานอลสูงกว่าในสภาวะที่ไม่กำจัดสารพิษออก โดยให้ประสิทธิภาพการหมักสูงกว่าประมาณ 3.13 % ดังตารางที่ 4.8

**ตารางที่ 4.8** พารามิเตอร์การผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัด และกำจัดสารพิษ

พารามิเตอร์	สารละลายที่ไม่กำจัด สารพิษ	สารละลายที่กำจัด สารพิษ
ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)	0.43 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.45 ± 0.02 <sup>b</sup>
ประสิทธิภาพการหมัก (%)	85.10 ± 4.26 <sup>a</sup>	88.23 ± 3.31 <sup>b</sup>

หมายเหตุ : <sup>a, b</sup> ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ )

Martin *et al.* (2002) ทำการศึกษาการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TMB 3001 ที่ได้รับการพัฒนาให้มีความสามารถในการหมักเอทานอลในสารละลายขานอ้อย เมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงในสารละลายขานอ้อยทั้งที่ไม่ได้กำจัดและกำจัดสารพิษโดยการเติมต่างให้มากเกินพอด้วย แคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่า ประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลของเชื้อในสภาวะที่กำจัดสารพิษออกมีค่าสูงกว่าในสภาวะที่ไม่กำจัดสารพิษ ซึ่งสอดคล้องกับผลของการศึกษานี้ คือ ในสภาวะที่มีการกำจัดสารพิษออกจากสารละลายกากมันสำปะหลัง เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพสามารถผลิตเอทานอลได้ดีกว่าในสภาวะที่ไม่มีการกำจัดสารพิษออกจากสารละลายกากมันสำปะหลัง

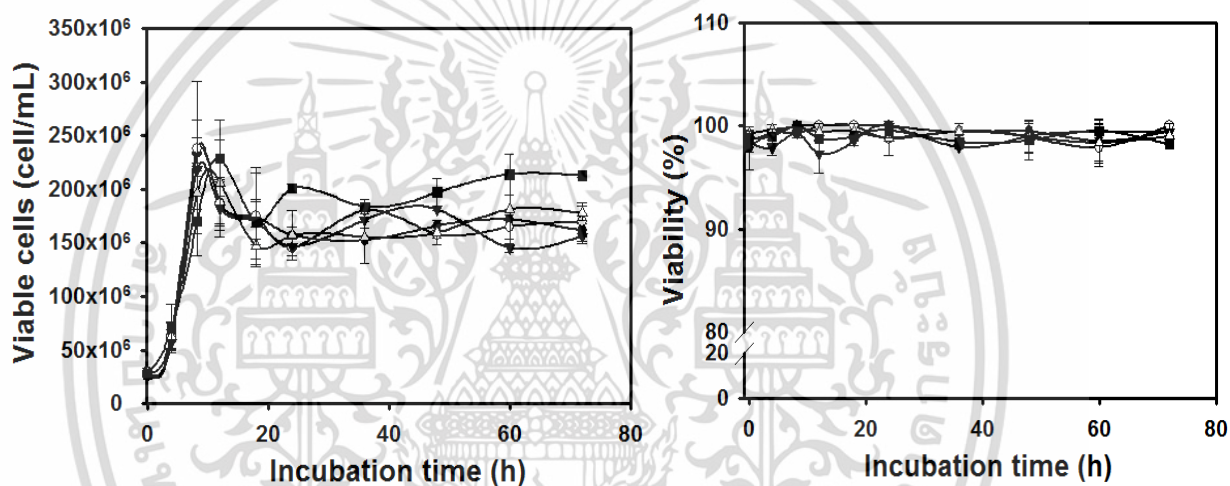
#### 4.6 ผลการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เมาะสมต่อการผลิตเอทานอลชีวภาพ

โดยทั่วไปแล้ว การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อเป็นแหล่งแหล่งไนโตรเจน โดยจัดเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของยีสต์ (Yu and Zhang, 2003) จึงได้ทำการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากสารละลายกากมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยด้วยกรดเจือจางและความร้อน โดยทำการเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในอาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษซึ่งมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 3 5 และ 7.5 กรัมต่อลิตร โดยมีสภาวะที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นการทดลองควบคุม ดำเนินการหมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ติดตามการเจริญ อัตราการรอดชีวิต การใช้ของน้ำตาล และการผลิตเอทานอล

#### 4.6.1 การเจริญ และการรอดชีวิต

จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล และการเจริญของเชื้อ พบว่า ในการทดลองควบคุม และการทดลองที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1 3 และ 5 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมักปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อใกล้เคียงกันในช่วง  $1.56 \times 10^8$  ถึง  $1.78 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ในสภาวะที่แอมโมเนียมซัลเฟตถึงระดับ 7.5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าสูงกว่า คือ  $2.13 \times 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 4.8 ก และการรอดชีวิตของเชื้อพบว่าใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 4.8 ข เมื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อในสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนมีค่าเท่ากับ  $0.25$  ชั่วโมง<sup>-1</sup> และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมากขึ้นเป็น 1 3 5 และ 7.5 กรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการเจริญของเชื้อมีค่าเท่ากับ 0.26 0.25 0.24 และ 0.23 ชั่วโมง<sup>-1</sup> ตามลำดับ

ก)

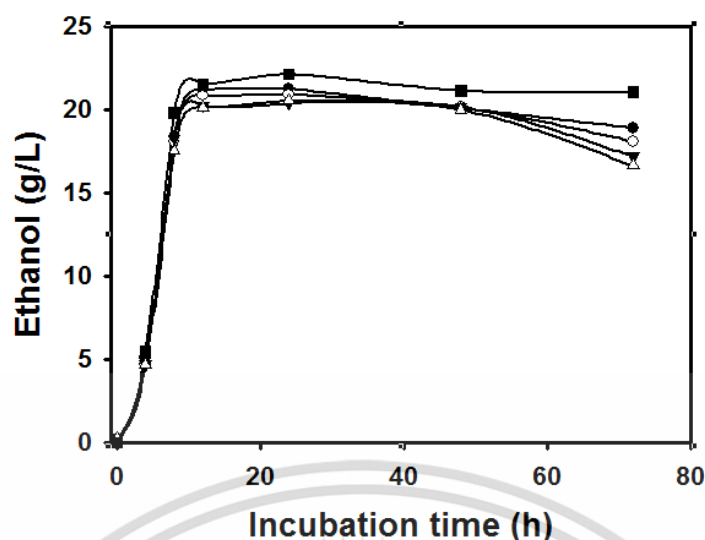


ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังไม่กำจัดสารพิษที่ไม่มี (●) และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 (○) 3 (▼) 5 (▲) และ 7.5 กรัมต่อลิตร (■)

#### 4.6.2 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล

ความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลัง ที่มีการเติม และไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต แสดงในภาพที่ 4.9 พบว่า ในสภาวะควบคุมที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นเอทานอลที่เชื้อสร้างได้เมื่อสิ้นสุดการหมักมีค่าเท่ากับ 18.92 กรัมต่อลิตร และเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 3 และ 5 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายลดลงเป็น 18.12 17.22 และ 16.67 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 7.5 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 21.09 กรัมต่อลิตร โดยค่าพารามิเตอร์การหมักเอทานอลของเชื้อ ดังตารางที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังไม่กำจัดสารพิษที่ไม่มี (—●—) และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 (—○—) 3 (—▼—) 5 (—▲—) และ 7.5 กรัมต่อลิตร (—■—)

ตารางที่ 4.9 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษ

แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	เวลาที่ได้อเอทานอลสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	ผลได้อเอทานอล (กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการหมัก (%)
-	12	4.62	1.85	0.38	1.77	74.20
1	12	4.49	1.85	0.38	1.74	74.86
3	12	4.49	1.78	0.37	1.69	72.92
5	12	4.71	0.89	0.35	1.68	69.08
7.5	12	4.82	0.49	0.37	1.80	73.05

โดยค่าพารามิเตอร์การหมักเอทานอลของเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 12 ดังตารางที่ 4.9 พบว่าในสภาวะที่ไม่เติม และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เชื้อมีประสิทธิภาพการหมักใกล้เคียงกันประมาณ 74% หลังจากนั้นเมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้นเป็น 3 และ 5 กรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพการหมักลดลงเหลือประมาณ 73% และ 69% ตามลำดับ แต่เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้นถึง 7.5 กรัมต่อลิตร พบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อสูงขึ้นเล็กน้อยคือ 73% นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตสูงถึงระดับนี้เชื้อมีการ

ปรับปรุงการใช้น้ำตาลโดยให้อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสสูงสุด ตลอดจนสามารถปรับปรุงการผลิตเอทานอล และทำให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

นอกจากแหล่งไนโตรเจนจะมีความสำคัญต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของยีสต์แล้ว ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการทนต่อเอทานอลและการผลิตเอทานอลได้ (Bafnrcová *et al.*, 1999) โดยแอมโมเนียมไอออนสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่คูร์ตอะมิโนได้อย่างรวดเร็ว (Nissen *et al.*, 2000; Mendes-Ferreira *et al.*, 2004) แต่จากผลการศึกษาใน เชื้อประสิทธิภาพการหมักที่ใกล้เคียงกัน ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Akaracharanya *et al.* (2011) ที่รายงานว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0 0.2 0.4 และ 0.6% (w/v) (0 2 4 และ 6 กรัมต่อลิตร) ลงในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริกไม่พบความแตกต่างกันของเอทานอลที่สร้างขึ้นโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5596 อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้พบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 7.5 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดและให้ความเข้มข้นสูงสุดเมื่อสิ้นสุดการหมัก แม้ว่าเชื้อจะมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำสุดก็ตาม เป็นไปได้ว่าเชื้อยีสต์อาจมีการใช้สารอาหารไปกระตุ้นการผลิตเอทานอลมากเกินไปจนลดการเจริญของเชื้อเอง อย่างเช่นการศึกษาของ Mendes-Ferreira *et al.* (2004) ซึ่งศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อรูปแบบการเจริญและการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำองุ่น (grape juice medium) พบว่าเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตมากขึ้นจะไปลดอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ *S. cerevisiae* ในขณะที่ความเข้มข้นของเอทานอลสุดท้ายมีค่ามากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการทดลอง

โดยภาพรวม สรุปได้ว่า การปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 สามารถปรับปรุงการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อจากสารละลายกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมผลิตแป้งมันได้ การปรับสภาพซึ่งทำโดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายในอาหารที่ใช้ปรับสภาพอย่างต่อเนื่อง และเลี้ยงในอาหารสูตรเติมข้าหลายรอบ การเพิ่มจำนวนรอบของการปรับสภาพสามารถปรับปรุงอัตราการผลิตเอทานอลเฉพาะของเชื้อ และลดระยะเวลาปรับตัวของเชื้อได้ สันนิษฐานได้ว่า เชื้อเกิดการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมนั้นๆ เมื่อนำเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพไปทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมีความทนต่อความเป็นพิษจากสารยับยั้งรวมทั้ง 5 ชนิด ในอาหาร YPD ได้ดีกว่าเชื้อยีสต์ที่ยังไม่ได้ปรับสภาพ โดยสามารถทนระดับสารยับยั้งผสมของกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เพอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรัลได้เท่ากับ 67.5 85 125 3.25 และ 4.39 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพสามารถนำสารยับยั้งประเภทฟูแรนไปใช้ได้ และยังพบว่าเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพเมื่อเลี้ยงในสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (v/v) ให้ผลได้เอทานอลสูงกว่าการใช้เชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ ประมาณ 27% นอกจากนี้ การเติม  $\text{Ca}(\text{OH})_2$  ลงในสารละลายกากมันสำปะหลังเพื่อกำจัดสารพิษออก ยังช่วยให้เชื้อยีสต์มีการเจริญและปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักของเชื้อได้ดีขึ้น ดังนั้น วิธีการปรับสภาพโดยเลี้ยงในอาหารเติมหลายครั้งสามารถช่วยให้เชื้อทนต่อสารยับยั้ง (กรดอะซิติก กรดลิวลินิก และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเพอพิวรัล) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยกากมันสำปะหลังได้ ทำให้เซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วสามารถทนต่อสารพิษได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ปรับสภาพ สิ่งนี้อาจเป็นประโยชน์สำหรับการหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมที่ใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพและใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบต่อไปได้

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าจะใช้เชื้อยีสต์ที่ได้จากการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังซึ่งย่อยด้วยสภาวะการย่อยที่ไม่รุนแรงมาก และก่อให้เกิดสารยับยั้งในปริมาณไม่สูง แต่ยังคงพบว่าเมื่อนำเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพมาเลี้ยงในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งผสมทั้ง 5 ชนิดซึ่งเติมในระดับความเข้มข้นสูงกว่าที่พบในไฮโดรไลเซส แล้วยังพบว่าเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดี ดังนั้นหากทำการปรับสภาพเชื้อโดยใช้ไฮโดรไลเซสที่ผ่านการย่อยด้วยสภาวะที่รุนแรงมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้ได้สารยับยั้งปริมาณที่สูงขึ้นเช่นกัน การปรับสภาพอาจเพิ่มความสามารถในการทนต่อความเป็นพิษจากสารยับยั้งและเพิ่มประสิทธิภาพการหมักได้ดีขึ้นได้ อย่างไรก็ตามในการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม อาจมีปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้อง เช่น ความเข้มข้นของสับสเตรท หรือน้ำตาลที่ใช้ในปริมาณค่อนข้างสูงกว่าในระดับห้องปฏิบัติการ รวมถึงสภาวะการหมักที่แตกต่างกันอาจมีผลต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อต่างจากผลในงานวิจัยนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2.2 สำหรับการศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งแต่ละชนิดต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ ควรใช้วิธีการวัดปริมาณเซลล์แทนการใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสง เนื่องจากสีของสารละลายกรดต่างๆหลังการนำไปนึ่งฆ่าเชื้อทำให้สีเข้มขึ้น และส่งผลให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทที่ 6

### สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

6.1 พัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ให้ทนต่อสารพิษ รวมถึงแนวทางในการผลิตเอทานอลชีวภาพจากผลพลอยได้ทางอุตสาหกรรมเกษตร ซึ่งเป็นประโยชน์ในด้านการสร้างความมั่นคงของอาหาร อีกทั้งช่วยรักษาสีและรสชาติโดยการใส่ประโยชน์จากทรัพยากรที่มีอยู่ให้เกิดความคุ้มค่ามากที่สุด และปลดปล่อยของเสียน้อยที่สุด

6.2 สร้างว่าที่มหาบัณฑิต 1 คน โดยนักศึกษาอยู่ในระหว่างเตรียมตัวในการสอบปกป้องวิทยานิพนธ์

6.3 นำองค์ความรู้ที่ได้ไปสอนในวิชาที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีการหมัก

6.4 ส่วนหนึ่งของผลงานวิจัยนี้ ได้รับการตีพิมพ์ในวารสาร 3BIOTECH (SJR impactfactor 2017: 0.51, Q2)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

- กล้าณรงค์ ศรีรอด สิริพล โกสินทรเสณีย์ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ปฐมา จาตกานนธ์ และ สิทธิโชค วัลลภาทิพย์. 2548. การพัฒนาการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อลดต้นทุนการผลิตและปลอดภัยจากผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ปฐมา จาตกานนธ์ และ สิทธิโชค วัลลภาทิพย์. 2549. การพัฒนาการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยการปรับปรุงการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- กัลยา อยู่นาน จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร และ กนก รัตนะกนกชัย. 2548. การผลิตเอทานอลจากสารละลายกากมันที่ย่อยด้วยกรดโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae*. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 537-543.
- ขวัญชนก จันทร์สว่าง. 2554. การย่อยสลายโมเลกุลของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยกระบวนการฉายรังสีแกมมาร่วมกับโซเดียมไฮดรอกไซด์/ยูเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร. 2551. การพัฒนากระบวนการเพิ่มผลผลิตไบโอเอทานอลโดยการหมักจากวัสดุเหลือทิ้งจากต้นมันสำปะหลังและผักตบชวา. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- ชลดา ชือสัตย์. 2546. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ชัชฉินท์ นิवासวงษ์ และ เฉลิม เรืองวิริยะชัย. 2555. การผลิตเซลลูโลซิกลีเอทานอลในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 40: 1073-1088.
- ณพลพัทธ์ ปุณฺณฤทธิเจริญ ภัทรพงศ์ เว้นบาป และ โศภิต แซ่ตั้ง. 2555. การผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวาโดยเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843. วิทยานิพนธ์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- ณัฐธิดา เกิดแล้ว. 2557. การปรับปรุงเส้นใยลิกโนเซลลูโลสโดยการระเบิดด้วยน้ำเพื่อการผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- ธีรภัทร ศรีนครุตร์ ณัฐชนันท์ ลิปิพัฒน์ไพบุลย์ นันทนา บำรุงเชื้อ บัญชา เม้าทุ่ง บัณฑิต ผึ้งสินธุ์ ปิยะวรรณ เดชคง มนตรี วังพิลา ยุทธศักดิ์ สุขการี ยุทธศักดิ์ รัตนสงฆ์ และ สุทธิกมล สุทธิกุล. 2551. การผลิตน้ำตาลจากยอดและใบอ้อย. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- ปฐมา จาตกานนธ์ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ สมพร อิศวิลานนท์ เอ็จ สโรบล ถาวร ปันตระกุล และ มีชัย ลัดดี. 2551. แนวทางการพัฒนาอุตสาหกรรมเอทานอลจากวัตถุดิบทางการเกษตรของประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ประมุข ภาระกุลสุขสถิต. 2555. การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวล. รายงานวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ประเวทย์ ต้อยเต็มวงศ์ ปราโมทย์ ศิริโรจน์ สรทศน์ อินทร์คัคคัมพร นงพา คุณจักร และ วรณัฐ เกิดสินธุ์ชัย. 2551. การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และ สิทธิพันธ์ ท่อแก้ว. 2550. การผลิตเอทานอลจากเชื้อรา *ไตรโคเดอรมา รีลีอี* สำหรับอุตสาหกรรมเอทานอล. รายงานการวิจัย ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. กรุงเทพฯ.
- พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์. 2552. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- พิชามญช์ แดงพราหม์ สุดาทิพย์ จันทร และ สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2556. อิทธิพลของชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการผลิตโอลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1. วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 36. 73-84.
- รัชพล พะวงศรีรัตน์. 2558. กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส. วารสารสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2: 143-157.
- เวสารัช สุนทรชัยบุรณ์ จิราภรณ์ แก้วใสแสง และ รัชพล พะวงศรีรัตน์. 2557. ศักยภาพของปอศิวบา (*Hibiscus cannabinus* L.) ในการผลิตเอทานอลโดยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5019. วารสารเกษตรพระวรุณ. 11: 167-174.
- ศุภรินทร์ ไชยกลางเมือง. 2553. การปรับสภาพฟางข้าวด้วยไอน้ำ และสารละลายต่างเจือจางเพื่อผลิตเอทานอล. รายงานการวิจัย ฐานข้อมูลโครงสร้างพื้นฐานภาครัฐด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2551. เราไม่จ้อน้ำมัน. ฐานข้อมูล. กรุงเทพฯ. 180 หน้า.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 611 หน้า
- สิริวรรณ แก้วชิงดวง. 2554. การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยการบำบัดขั้นต้น. วิทยานิพนธ์. สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สุขใจ ชูจันทร์. 2554. การผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 298 หน้า.
- สุภาวดี ผลประเสริฐ. 2557. การปรับสภาพวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. 22: 641-649.
- อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. 2558. ยีสต์และเทคโนโลยีของยีสต์. ก้าวไทยแอดเวอร์ไทซิ่ง. กรุงเทพฯ.
- อรุณี ศุภสินสาธิต. 2555. พลังงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง. วารสารสิ่งแวดล้อม. 16: 36-43.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Agu, R. C., Amadife, A. E., Ude, C. M., Onyia, A., Ogu, E. O., Okafor, M. and Ezejiofor, E. 1997. Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (cgw) biomass for ethanol production. **Waste Management**. 17: 91-96.
- Akaracharanya, A., Kesornsit, J., Leepipatpiboon, N. Srinorakutara, T. Kitpreechavanich, V. and Tolieng, V. 2011. Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**. 61: 431-436.
- Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet S. E., Uribe Larrea J. L., Goma, G., Benbadis, L. 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 60: 67-72.
- Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G. and Gorwa-Grauslund, M. F. 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 82: 340-349.
- Ando, S., Arai, I., Kiyoto, K., and Hanai, S. 1986. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation Technology**. 64: 567-570.
- Ask, M., Bettiga, M., Duraiswamy, V. R. and Olsson, L. 2013. Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different physiological responses in glucose and xylose consumption phase. **Biotechnology for Biofuels**. 6: 181.
- Bafrncová, P., ŠSmogrovicová, D., Sláviková, I., Pátrová, J. and Dömény, Z. 1999. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology**. 21: 337-441.
- Balogopalan, C., Ray, R. C., Sheriff, J. T. and Rajalekshmy, L. 1994. Biotechnology for the value addition of waste waters and residues from cassava processing industries. *In The Cassava Biotechnology Network: proceedings of the Second International Scientific Meeting*. 22-26 August. Bogor, Indonesia. pp. 609-701.
- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**. 52: 858-875.
- Banerjee, N., Bhatnagar, R. and Viswanathan, L. 1981. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 11: 226-228.

- Banerjee, S., Mudaliar, S., Sen, R., Giri, B., Satupte, D., Chakrabarti, T. and Pandey, R. A. 2010. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**. 4: 77-93.
- Bauer B. E., Rossington, D., Mollapour, M., Mamnun, Y., Kuchler, K. and Piper, P. W. 2003. Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. **European Journal of Biochemistry**. 15: 3189–3195.
- Bensah, E. C. and Mensah, M. 2013. Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: technologies and innovations. **International Journal of Chemical Engineering**. 2013: 21.
- Boulton, C. 2000. Trehalose, glycogen and sterol. In: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, (Ed. K.A. Smart). Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. pp. 10-19
- Boulton, C. and Quain, D. 2006. The biochemistry of fermentation. In: **Brewing Yeast and Fermentation**. Blackwell Science, Oxford, UK. pp. 69-142.
- Boyer, L. J., Vega, K., Klasson, K. T., Clausen, E. C. and Gaddy, J. L. 1992. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**. 3: 41-48.
- Brandberg, T., Karimi, K., Taherzadeh, M. J., Franzén, C. J., and Gustafsson, L. 2007. Continuous fermentation of wheat-supplemented lignocellulose hydrolysate with different types of cell retention. **Biotechnology and Bioengineering**. 98: 80–90.
- Cao G. L., Ren N. Q., Wang, A. J., Guo, W. Q., Xu, J. F. and Liu, B. F. 2010. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. **International Journal of Hydrogen Energy**. 35: 13475-13480.
- Chandel, A. K., Silva, S. S. and Singh O. V. 2011. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. In: **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.). InTech, Shanghai, China. pp. 225-246.
- Charoenrat, T., Khumruangsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S. and Roongsawang, N. 2013. Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 116: 193-198.
- Cheng, J., 2009. **Biomass to Renewable Energy Processes**. Taylor and Francis Group, New York.

- Clausen, E. C. and Gaddy, J. L. 1988. Ethanol from biomass by concentrated acid hydrolysis and fermentation. **Energy Biomass Wastes**. 12: 1319-1342.
- Converti, A., Domínguez, J. M., Perego, P., Silva, S. S. and Zilli, M. 2000. Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production. **Chemical Engineering Technology**. 23: 1013-1020.
- Dubois, M., Gilles, D. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. 28: 350-356..
- El-Mansi, E. M. T. and Bruce Ward, F. 2006. Microbiology of industrial fermentation. In: **Fermentation microbiology and biotechnology**, El-Mansi, E. M. T., Bryce, C. F. A., Demain, A. L. and Allman, A. R. (Eds). Taylor & Francis, Boca Raton. Pp. 11-46.
- El-Naggar, N. E., Deraz, S. and Khalil, A. 2014. Bioethanol production from lignocellulosic feedstocks based on enzymatic hydrolysis: current status and recent developments. **Biotechnology**. 13: 1-21.
- Fernandes, D. L. A., Pereira, S. R., Serafim, L. S., Evtuguin, D. V. and Xavier, A. M. R. B. 2012. Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics: Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor. In: **Biotechnology**, Marco Aurelio Pinheiro Lima (Ed.). InTech, Shanghai, China. pp. 123-152.
- Galbe, M. and Zacchi, G. 2012. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**. 46: 70-78.
- Greetham, D. 2014. Presence of low concentrations of acetic acid improves fermentations using *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**. 5: 192.
- Greetham, D., Hart, A. J. and Tucker, G. A. 2016. Presence of low concentrations of acetic acid improves yeast tolerance to hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural. **Biomass and Bioenergy**. 85: 53-60.
- Görgens, J. F., Carrier, M. and García-Aparicio, M. P. 2014. Biomass Conversion to Bioenergy Products. In: **Bioenergy from Wood**, Seifert, T. (Ed.). Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 137-167.
- Harmsen, P. F. H., Huijgen, W. J. J., Bermúdez López, L. M., Bakker and R. R. C. 2010. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. **Food and Biobased Research**. Wageningen, Netherlands.
- Huang, X., Wang, Y., Liu, W. and Bao, J. 2011. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. **Bioresource Technology**. 102: 9705-9709.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Imai, T. and Ohono, T. 1995. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. 61: 3604–3608.
- Jönsson, L. J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N. O. and Hahn-Hägerdal, B. 1998. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 49: 691-697.
- Jönsson, L. J., Alriksson, B. and Nilvebrant, N. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**. 6: 16.
- Jönsson, L. J. and Martín, C. 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**. 199: 103–112.
- Koppram, R., Albers, E., and Olsson, L. 2012. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. **Biotechnology for Biofuels**. 5: 32.
- Kouteu Nanssou, P. A., Jiokap Nono, Y. and Kapseu, C. 2016. Pretreatment of cassava stems and peelings by thermohydrolysis to enhance hydrolysis yield of cellulose in bioethanol production process. **Renewable Energy**. 97: 252-265.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J. and Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. 48: 3713–3729.
- Lacerda, T. M., Zambon, M. D. and Frollini, E. 2013. Effect of acid concentration and pulp properties on hydrolysis reactions of mercerized sisal. **Carbohydrate Polymers**. 93: 347– 356.
- Lambert, R. J. and Stratford, M. 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Applied Microbiology**. 86:157-164.
- Landaeta, R., Aroca, G., Acevedo, F., Teixeira, J. A. and Mussatto, S. I. 2013. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. **Applied Energy**. 102: 124-130.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G. and Nilvebrant, N. O. 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**. 24: 151–159.
- Linden, T. and Hahn-Hägerdal, B. 1989. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates with yeasts and xylose isomerase. **Enzyme and Microbial Technology**. 11: 583-589.
- Liu, Z. L., Slininger, P. J., Dien, B. S., Berhow, M. A., Kurtzman, C. P. and Gorsich, S. W. 2004. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and

- new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Industrial Microbiology and Biotechnology**. 31: 345-352.
- López, M. J., Nichols, N. N., Dien, B. S., Moreno, J. and Bothast, R. J. 2004. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 64:125–131.
- Luján-Rhenals, D. E. and Morawicki, R. O. 2016. Production of fermentable sugars and a high protein meal by dilute acid hydrolysis of soybean meal at high temperatures. **Bioresources**. 11: 8155–8165.
- Martin, C., Galbe, M., Wahlbom, C. F., Hahn-Hägerdal, B. and Jönsson, L. J. 2002. Ethanol production from an enzymatic hydrolysate of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. 31: 274-282.
- Martin, C., Marcet, M., Almazán, O. and Jönsson, L. J. 2007. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. **Bioresource Technology**. 98: 1767–1773.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A. and Leão, C. 2004. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. **Applied Microbiology**. 97: 540–545.
- Menon, V. and Rao, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**. 38: 522-550.
- Modig, T., Lidén, G. and Taherzadeh, M. J. 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical**. 363: 769–776.
- Mohagheghi, A., Ruth, M. and Schell, D. J. 2006. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effect of overliming pH on sugar and ethanol yields. **Process Biochemistry**. 41: 1806-1811.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M. and Ardjmand, M. 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 27: 77–93.
- Mussatto, S. I. and Roberto, I. C. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. **Bioresource Technology**. 93: 1-10.

- Narendranath, N. V., Thomas, K. C. and Ingledew W. M. 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 26: 171-177.
- Nichols, N. N., Sharma, L. N., Mowery, R. A., Chambliss, C. K., van Walsum, G. P., Dien, B. S. and Iten, L. B. 2008. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**. 42: 624-630.
- Nilvebrant, N. O., Persson, P., Reimann, A., De Sousa, F., Gorton, L. and Jönsson, L. J. 2003. Limits for alkaline detoxification of dilute acid lignocellulose hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 105-108: 615-628.
- Nissen, T. L., Kielland-Brandt, M. C., Nielsen, J. and Villadsen, J. 2000. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic Engineering**. 2: 67-77.
- Okuda, N., Sonuera, M., Ninomiya, K., Katakura, Y. and Shioya, S. 2008. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 106: 128-133.
- Okudoh, V., Trois, C., Workneh, T. and Schmidt, S. 2014. The potential of cassava biomass and applicable technologies for sustainable biogas production in South Africa: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 39: 1035-1052.
- Olsson, L. and Hahn-Hägerdal, B. 1993. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates. **Process Biochemistry**. 28: 249-257.
- Olsson, L. and Hahn-Hägerdal, B. 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**. 18: 312-331.
- Palmqvist, E., Almeida, J. and Hahn-Hägerdal, B. 1999a. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**. 62: 447-454.
- Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N. Q. and Hahn-Hägerdal, B. 1999b. Main and interaction effects of acetic, furfural, and  $\beta$ -hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**. 63: 46-55.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**. 74: 25-33.
- Pampulha, M. E. and Loureiro-Dias, M. C. 1989. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 20: 286-293.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Parajó, J. C., Dominguez, H. and Dominguez, J. M. 1998. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**. 66: 25–40.
- Parawira, W. and Tekere, M. 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Critical Reviews in Biotechnology**. 31: 20–31.
- Parekh, S. R., Yu, S. and Wayman, M. 1986. Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increased ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 25: 300–304.
- Paul Held. 2010. **Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces cerevisiae***. [online]. Available: <http://www.biotek.com/resources/articles/beer-brewing-synergyh1-yeast-growth.html>.
- Pornpukdeewattana, S., Khamfun, J. and Phatyenchai, N. 2014. Adaptation of commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis. **Suranaree Journal of Science and Technology**. 21: 335–345.
- Puri, V. P. and Mamers, H. 1983. Explosive pretreatment of lignocellulosic residues with high-pressure carbon dioxide for the production of fermentation substrates. **Biotechnology and Bioengineering**. 25: 3149–3161.
- Purwadi, R., Brondberg, T. and Taherzadeh, M. J. 2007. A possible industrial solution to ferment lignocellulosic hydrolyzate to ethanol: continuous cultivation with flocculating yeast. **International Journal of Molecular Sciences**. 8: 920–932.
- Roberto, I. C., Laci, L. C., Barbosa, M. F. S. and Mancilha, I. M. 1991a. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis*, for the production of ethanol. **Process Biochemistry**. 26: 15–21.
- Roberto, I. C., Felipe, M. G. A., Laci, L. C., Silva, S. S. and Mancilha, I. M. 1991b. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**. 36: 271–275.
- Russel, J. B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. **Applied Bacteriology**. 73: 363–370.
- Silva, C. J. and Roberto, I. C. 2001. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Letters in Applied Microbiology**. 32: 248–252.
- Silva J. P. A., Mussatto, S. I., Roberto, I. C., and Teixeira, J. A. 2011. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 28: 151–156.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S. and Srivastava M. 2014. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 32: 713–728.
- Smart, K. A., Chambers, K. M., Lambert, I. and Jenkins, C. 1999. Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. 57: 18-23
- Soleymanpour, Z. N. M., Talebnia, F. and Niknezhad, V. 2018. Xantha gum production from acid hydrolyzed broomcorn stem as a sole carbon source by *Xanthomonas campestris*. **3 Biotech**. 8: 296.
- Sreenath, H. K., Koegel, R. G., Moldes, A. B., Jeffries, T. W. and Straub, R. J. 2001. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. **Process Biochemistry**. 36: 1199–1204.
- Srinorakutara, T., Kaewwimol, L. and Saengow, L. 2006. Approach of Cassava Waste Pretreatments for Fuel Ethanol Production in Thailand. **Journal of Scientific Research Chulalongkorn University**. 31: 77-84.
- Sriroth, K., Chollakup, R., Chotineeranatb, S., Piyachomkwan, K. and Oates, C. G. 2000. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. **Bioresource Technology**. 71: 63-69.
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**. 83: 1-11.
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., and Lidén, G. 2000a. Inhibition effects of furfural on aerobic batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol and/or acetic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 90: 374-80.
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L. and Lidén, G. 2000b. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 53: 701–708.
- Thomas, K. C., Hynes, S. H. and Ingledew W. M. 2002. Influence of Medium Buffering Capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. **Applied and Environmental Microbiology**. 4: 1616–1623.
- Thompson, O. A., Hawkins, G. M., Gorsich, S. W. and Doran-Peterson, J. 2016. Phenotypic characterization and comparative transcriptomics of evolved *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved tolerance to lignocellulosic derived inhibitors. **Biotechnology for biofuels**. 9: 200.
- Tian, S., Zhu, J. and Yang, X. 2011. Evaluation of an adapted inhibitor-tolerant yeast strain for ethanol production from combined hydrolysate of softwood. **Applied Energy**. 88: 1792–1796.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Oliva, J. M. and Olsson, L. 2010. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 37: 1211–1220.
- Trakulvichean, S., Chairasert, P., Otmakhova, J. and Songkasiri, W. 2017. Comparison of fermented animal feed and mushroom growth media as two value-added options for waste Cassava pulp management. **Waste Management and Research**. 35: 1210-1219.
- van Zyl, C., Prior, B. A. and du Preez, J. C. 1988. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipites*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 17: 357-369.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. and Van Dijken, J. P. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**. 8: 501–517.
- Villa, G. P., Bartroli, R., López, R., Guerra, M., Enrique, M., Peñas, M., Rodríguez, E., Redondo, D., Iglesias, I. and Díaz, M. 1992. Microbial transformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Biotechnologica**. 12: 509–512.
- Walker, G. M. 2011. Fuel alcohol: current production and future challenges. **Journal of the Institute of Brewing**. 117: 3-22.
- Wallace-Salinas, V. and Gorwa-Grauslund, M. F. 2013. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnology for Biofuels**. 6: 151.
- Weil, J. R., Sarikaya, A., Rau, S. L., Goebz, J., Lasisch, C. M., Brwer, M., Hendrickson, R. and Tadisch, M. R. 1998. Pretreatment of corn fiber by pressure cooking in water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 73: 1–17.
- Wright, J. D. and Power, A. J. 1987. Comparative technical evaluation of acid hydrolysis processes for conversion of cellulose to alcohol. **Energy Biomass Wastes**. 10: 949–971.
- Wyman, C. E. and Goodman, B. J. 1993. Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 39: 41-59.
- Yang, B. and Wyman, C. E. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**. 2: 26–40.
- Yat, S. C., Berger, A. and Shonnard, D. R. 2008. Kinetic characterization of dilute surface acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. **Bioresource Technology**, 99. 3855–3863.

- Yu, Z. and Zhang, H. 2003. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**. 90: 95-100.
- Zhang, L., Li, X., Yong, Q., Yang, ST., Ouyang, J. and Yu, S. 2016. Impacts of lignocellulose-derived inhibitors on L-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**. 203: 173–180.
- Zheng, Y., Pan, Z. and Zhang, R. 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**. 2: 51-68.
- Zhu, J. J., Yong, Q., Xu, Y., Chen, S. X. and Yu, S. Y. 2009. Adaptation fermentation of *Pichia stipitis* and combination detoxification on steam exploded lignocellulosic prehydrolyzate. **Natural Science**. 1: 47-54.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก  
เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต จากบทที่ 6

3 Biotech (2019) 9:76  
https://doi.org/10.1007/s13205-019-1607-x

ORIGINAL ARTICLE



## Repeated cultures of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava processing waste hydrolysis for bioethanol production

Pakatham Palakawong Na Ayutthaya<sup>1</sup> · Theppanya Charoenrat<sup>2</sup> · Warawut Krusong<sup>1</sup> · Solsuda Pornpukdeewattana<sup>1</sup>

Received: 5 October 2018 / Accepted: 1 February 2019  
© King Abdulaziz City for Science and Technology 2019

### Abstract

Large amount of cassava pulp is produced as by-product of industrial tapioca production. The value-added process of this low-cost waste is to use it as a substrate for bioethanol production. However, during the pulp pretreatment by acidification combined with steam explosion, many yeast inhibitors including acetic acid, formic acid, levulinic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural are generated and these compounds have negative effects on the subsequent fermentation step. Therefore, the objective of this study was to investigate whether the repeated cultures of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 could alleviate this problem. To obtain the inhibitor tolerable cells, the repeated culture was performed by growing yeast cells to a specific growth rate ( $\mu$ ) of 0.22 h<sup>-1</sup> or higher (80% of the  $\mu$  in control) and then transferring them to progressively higher concentrations of hydrolysate ranging from 20 to 100% (w/v). The results showed a tendency of longer lag phase as well as time to reach maximum cell number ( $t_{max}$ ) with an increase in hydrolysate concentration. However, the repeated culture at the same hydrolysate concentration could shorten both lag period and  $t_{max}$ . Interestingly, the growth and fermentation efficiency of adapted cells in 100% hydrolysate were significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) than those of non-adapted cells by 38% and 27%, respectively.

**Keywords** Adaptation · Cassava pulp · Inhibitors · Inhibitor tolerance · *Saccharomyces cerevisiae*

### Introduction

Bioethanol production from lignocellulosic materials, as an alternative energy source to fossil fuels, has been used for decades in many countries (El-Naggar et al. 2014). In Thailand, the government recently launched a 10-year plan, with private and public sector investment expected to reach

\$11.3 billion, to produce biochemicals, biopharmaceuticals and biofuels from sugarcane and cassava (Lane 2017). Lignocellulosic materials are waste products from many agro-processing industries and can be an inexpensive and abundant source of biomass (Balat 2011). Lignocellulose mainly comprises cellulose, hemicellulose and lignin and occurs in all plant materials where they are constituents of the structure of cell walls. Cellulose and hemicellulose are polysaccharide chains composed mainly of glucose, galactose, mannose, xylose and arabinose. The processes of releasing the sugars from structural carbohydrates during extraction are complex and not always complete (Kumar et al. 2009; Sun and Cheng 2002).

Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is an important crop in Thailand used mainly for the production of flour. Cassava flour production was reported to have had a pulp by-product of some 7.3 million tonnes in 2015 (Trakulvichian et al. 2017). In the past, this pulp by-product was largely discarded, but it is high in starch and fermentable sugars from lignocellulosic materials that can be used as a substrate in

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s13205-019-1607-x>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Solsuda Pornpukdeewattana  
solsuda.p@kmitl.ac.th

<sup>1</sup> Division of Fermentation Technology, Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University (Rangsit Center), Pathum Thani 12120, Thailand

Published online: 11 February 2019



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ethanol production (Balat 2011). Various treatments of cassava pulp have been tested to assist the process of breaking down these structural carbohydrates, before fermentation, including dilute acid hydrolysis combined with heating (Agu et al. 1997). During this process of exposure to acids at high temperatures, sugars derived from the lignocellulosic material are a major product, but there are other compounds from decomposition that are released including formic acid, acetic acid, levulinic acid, furfural and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF). These compounds may inhibit the metabolism of yeast cells used in fermentation of the hydrolysate and impact on growth, biomass production and their fermentation performance (Almeida et al. 2007).

Several methods have been successful in increasing fermentation efficiency from lignocellulosic hydrolysate by microorganisms (Fein et al. 1984; Landaeta et al. 2013; Larsson et al. 2001). In particular, *Saccharomyces cerevisiae* has been developed to achieve higher ethanol production since it is fast growing in both aerobic and anaerobic conditions and has a high tolerance to both high ethanol concentrations and inhibitors generated during hydrolysate extraction (Olsson and Hahn-Hägerdal 1993). *S. cerevisiae* SC90 has been previously selected for its high fermentation performance in the production of ethanol from sugarcane molasses and is being used for ethanol production on an industrial scale by several alcoholic beverage companies in Thailand (Pornpukdeewattana et al. 2014). However, it has not been used in industrial-scale production of ethanol from lignocellulosic materials.

Naturally, the yeast strains can be adapted to resist the inhibitors and have been successful in improving ethanol yield (Silva and Roberio 2001; Silva et al. 2011). Pornpukdeewattana et al. (2014) adapted cells of SC90 by culturing them for two cycles at various cassava pulp hydrolysate concentrations. Therefore, the objective of the research was to test whether the adaptation of SC90 to inhibitors could be improved further by increasing the number of culture cycles in the cassava pulp hydrolysate. The adaptation process involved passing SC90 through cycles of cassava pulp hydrolysate and testing its fermentation performance, growth rate and the conversion of inhibitors, starting at 20% concentration followed by progressive transfer to concentrations up to 100%.

## Materials and methods

### Raw material

Fresh cassava pulp was provided by Khoo Chang Eah Tapioca and Sago Industry Co. Ltd., Chonburi, Thailand. The pulp was dried at 60 °C using a tray dryer until the weight was constant, milled and sieved through 40 mesh. It was

then kept dry in a closed container at room temperature until required for use.

### Yeast strain and growth medium

The yeast *S. cerevisiae* SC90 was obtained from the Faculty of Agro-industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand. The culture was grown in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) (10.0 g/L yeast extract, 20.0 g/L peptone, 20.0 g/L glucose, pH 5.5) agar slant and incubated at 30 °C for 48 h. The strain was then maintained at 4 °C.

### Inoculum preparation

The inoculum preparation method was modified from Pornpukdeewattana et al. (2014). One loop of yeast cells from an agar slant was added to a 125 mL Erlenmeyer flask containing 25 mL of YPD medium and incubated at 30 °C with a shaking speed of 200 rpm for 24 h. Then the starter was transferred to a 500 mL flask containing 225 mL of YPD. The culture was incubated as described above for 48 h. Cells were recovered by centrifugation at 2683 × g at 4 °C for 20 min and then the supernatant was separated. The supernatant was added to the wet cell at a ratio of 1:1 (mL supernatant to g wet weight) and was used as the inoculum.

### Cassava pulp hydrolysis

Preparation of cassava pulp hydrolysate was modified from the method described by Srinorakutana et al. (2006) which was shown to yield a high content of reducing sugars. Dried cassava pulp was hydrolyzed using diluted sulfuric acid (0.6 M) with the solid to liquid ratio of 1:10 (g dry weight to mL diluted acid), followed by heating in an autoclave at 120 °C for 30 min. The reaction mixture was cooled at room temperature. The residual solid was filtered using a white cloth before the pH of the filtrate was adjusted to 5.5 with 10 M NaOH. The pH adjusted hydrolysate was centrifuged at 9056 × g at 4 °C for 20 min to remove the precipitate that had occurred during neutralization. The concentration of inhibitors (acetic acid, formic acid, levulinic acid, furfural and 5-HMF) and the total sugar presented in hydrolysate was then determined. Flux distribution of material during cassava pulp hydrolysis was evaluated by relying on the data obtained from the modified protocol for the determination of structural carbohydrates and lignin in biomass developed by the National Renewable Energy Laboratory (NREL) (Sluiter et al. 2012) (Supplementary 1). The ready-to-use cassava pulp hydrolysate was stored at -20 °C until required for use.

### Preparation of the adaptation media

The medium formulations for adaptation were designed to have a similar initial concentration of fermentable sugars and varied with the concentration of cassava pulp hydrolysate. However, the total sugar in cassava pulp hydrolysate was 62.95 g/L (Supplementary II, Table SII-1) consisting both fermentable and non-fermentable sugars. Glucose, fructose, sucrose and maltose are generally recognized as fermentable sugars for yeast *Saccharomyces cerevisiae*; therefore, the summation of these sugar concentrations can be presumable as the concentration of fermentable sugars (Luján-Rhenals and Morawicki 2016). The sugar composition in hydrolysate was analyzed using high-performance liquid chromatography (HPLC) which was modified from the protocol for the determination of structural carbohydrates and lignin in biomass developed by NREL (Sluiter et al. 2012) (Supplementary III, Table SIII-1). Glucose was only one of the fermentable sugars whereas xylose and arabinose were non-fermentable sugars in hydrolysate that can be detected by HPLC (Supplementary III, Table SIII-1). The concentrations of glucose, xylose, and arabinose were  $45.47 \pm 0.23$ ,  $2.52 \pm 0.03$ , and  $1.74 \pm 0.06$  g/L, respectively.

The assimilation of sugars was also analyzed by monitoring the reduction of total sugar during SC90 fermentation in cassava pulp hydrolysate medium to confirm the value of fermentable sugar concentration obtained by HPLC technique. The concentration of fermentable sugars estimated by monitoring the reduction of total sugar during fermentation of SC90 was  $46.52 \pm 0.56$  g/L (Supplementary III, Table SIII-2) which was slightly higher than the value obtained from HPLC (Supplementary III, Table SIII-1). However, in this present work, the value obtained from total sugar was used because the concentration of sugar analysis by HPLC did not cover other sugars.

The adaptation media were prepared by diluting the cassava pulp hydrolysate to the concentrations of 0 (control), 20, 40, 60, 80 and 100% (v/v) of the initial concentration of the hydrolysate. The initial concentration of fermentable sugars in all media was adjusted to approximately 46.52 g/L using glucose. All media in 1 L were supplemented with 5.00 g/L yeast extract, 7.50 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 3.50 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.75 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  and 1.00 g/L  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , adjusted to pH 5.5 and autoclaved at 121 °C for 15 min (Koutou Nansou et al. 2016).

### Adaptation of the yeast strain to improve the inhibitor tolerance

The adaptation procedure of *S. cerevisiae* SC90 was modified in accordance with Pornpukdeewattana et al. (2014) where the experiments were conducted in 1000 mL flasks containing 300 mL of adaptation media. The control medium was inoculated to obtain the initial cell concentration of  $3 \times 10^7$  cell/mL and incubated at 120 rpm and 30 °C for 48 h. The samples were withdrawn at 0, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 36 and 48 h for measuring yeast growth. The specific growth rate ( $\mu$ ) and the time to achieve maximum cells ( $t_{\text{max}}$ ) obtained from the control were used as the reference value for growth assessment.

The yeast cells from the control medium were collected and used for inoculation into a new adaptation medium with the lowest concentration of cassava pulp hydrolysate (20% w/v). Fermentation and growth were monitored as described above. Cells were continually cultivated in the same medium until the  $\mu$  was equal to or higher than 80% of the reference value and  $t_{\text{max}}$  was not longer than  $t_{\text{max}}$  of the control experiment. Cells were then transferred to the new adaptation medium with higher concentrations of cassava pulp hydrolysate (40, 60, 80 and 100%). The initial cell concentration of every adaptation cycle was adjusted to  $3 \times 10^7$  cell/mL. The samples were withdrawn at 0, 4, 8, 12, 24 and 48 h to determine cell growth, glucose consumption, ethanol production and content of inhibitors for each of the first and last cycles in each adaptation medium. The adaptations were performed in triplicate and consecutively for 960 h. At the end of the adaptation, the adapted cells were preserved by sub-culturing in 100% hydrolysate medium to maintain their ability of inhibitor tolerance. Then the adapted cells were investigated for growth and fermentation performance compared with the non-adapted cells.

### Examination for the pattern of adaptation

The spot plate technique was used to confirm that the adaptation procedure used to obtain yeast cells was a short-term adaptation. The adapted cells were sub-cultured in 0% hydrolysate agar medium every 48 h for ten times and preserved in this medium. Then the adapted cells, sub-cultured and preserved in 0% and 100% hydrolysate medium, were cultured in 0% and 100% hydrolysate liquid medium, respectively, at 30 °C with a shaking speed of 200 rpm for 24 h. The cell concentration was adjusted to  $3 \times 10^7$  cell/mL and serially diluted to generate cell suspensions at concentrations  $10^{-4}$ ,  $10^{-3}$  and  $10^{-2}$ . A volume

of 10  $\mu$ L from each dilution was spotted onto the surface of the 0, 50 and 100% hydrolysate agar plates. The plates were incubated at 30 °C for 72 h and the results were recorded by a photograph.

### Comparison of growth and fermentation performance of adapted and non-adapted cells in 100% hydrolysate medium

A non-adapted and an adapted *S. cerevisiae* SC90 were grown in 0% hydrolysate medium (control medium) and 100% hydrolysate medium, respectively. Both were incubated using the procedure as described above to prepare the non-adapted and adapted yeast inoculums. The experiments were conducted in 1000 mL flasks containing 300 mL of the 100% hydrolysate medium. Both strains were then separately inoculated into 100% hydrolysate medium to obtain the initial cell number of  $3 \times 10^7$  cell/mL. The fermentation was at 30 °C with shaking of 120 rpm for 72 h. Cell growth was monitored at 0, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 60 and 72 h. The glucose and ethanol concentrations were determined during fermentation. The results of adapted and non-adapted cells were compared. The spot plate technique was also applied for assessing the ability of adapted and non-adapted cells to grow in the 100% hydrolysate agar medium.

### Analytical methods and data analysis

#### Investigation of growth and viability

The growth and viability of the yeast cells were monitored by staining with methylene violet and observing them under a light microscopy where the dead cells were dyed violet and viable cells were not dyed (Smart et al. 1999). The number of dead and live cells was counted using a hemacytometer. The  $\mu$  and lag time ( $t_{lag}$ ) were estimated using the graphical methods from a linear regression of the natural logarithm of a number of viable cells versus time (exponential growth curve) (El-Mansi and Bruce Ward 2006).

#### Ethanol fermentation performance

The fermentation performance of the experiments was assessed as kinetic parameters as previously described (Keating et al. 2006). Ethanol yield ( $Y_{P/S}$ ; g ethanol/g glucose) was calculated from the maximum concentration of ethanol produced divided by sugar consumed. Volumetric productivity ( $Q$ ; g/L h) was calculated from the maximum concentration of ethanol produced divided by attenuation time. Attenuation time was the time that achieved the highest concentration of ethanol. Fermentation efficiency (%) was calculated from

the observed ethanol yield divided by the theoretical yield of ethanol fermentation from glucose (0.51 g ethanol/g glucose) multiplied by 100.

#### Total sugar

The total sugar concentration was determined by the phenol-sulfuric acid colorimetric method using glucose as a standard (Dubois et al. 1956). This is a rapid method for quantifying the total soluble sugars presented in hydrolysate samples that can break down sugars into monosaccharides with concentrated sulfuric acid. The reaction mixture was measured in a spectrophotometer (UV-1601 Shimadzu, Japan) at 480 nm.

#### Ethanol and inhibitors in acid form

The content of ethanol produced during fermentation and concentration of inhibitors (acetic acid, formic acid and levulinic acid) were quantified using high-performance liquid chromatography (HPLC) (Nexera Shimadzu, Japan). The supernatant was filtered through a 0.2- $\mu$ m syringe filter before analysis and detected using a refractive index (RI) detector. A Supelco gel H 59346 column (250  $\times$  4.6 mm, Sigma-Aldrich, France) was used with the column temperature of 30 °C. Phosphoric acid, 0.1% (w/v) in water at a flow rate of 0.17 mL/min, was used as the mobile phase.

#### Furfural and 5-HMF

Analysis of furfural and 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF) was according to Martin et al. (2017) using a diode-array detector in the HPLC system. The ZORBAX RRHT SB-C18 column (3  $\times$  50 mm, 1.8  $\mu$ m) was operated with a flow rate of 0.5 mL/min. A formic acid solution (0.1% v/v) and acetonitrile solution (0.1% w/v) were used as eluents. The absorption was measured at 282 nm at a column oven temperature of 40 °C.

#### Statistical analysis

The experiments were performed in triplicate and expressed as mean values. The standard deviation (SD) of mean value was expressed as error bars. The mean and SD of a set of values were calculated using Microsoft Excel 2010 with the AVERAGE and STDEV functions. Statistical significance was assessed using an unpaired two-tailed *t* test at the ( $p \leq 0.05$ ) level.

## Results and discussion

### The contents of total sugar and inhibitors in cassava pulp hydrolysate

Several publications on acid hydrolysis for the pretreatment of biomaterial showed that a stronger hydrolysate condition generated higher concentrations of inhibitors (Supplementary II, Table SII-1). Cao et al. (2010) used corn stover hydrolyzed with 2.0% (v/v) sulfuric acid at 121 °C for 90 min. Huang et al. (2011) pretreated corn stover with dilute sulfuric acid 3.0% (g/g dry corn stover) at 190 °C for 3 min. Tian et al. (2011) used the wood of lodgepole trees (*Pinus contorta*) pretreated with bisulfite and sulfuric acid placing the wood pulp in a digester at 180 °C for 25 min. Soleymanpour et al. (2018) also noted that an increase in acid concentration resulted in increased formation of inhibitory compounds and rise of the sugar decomposition rate. The source of biomass and the harshness of the pretreatment could affect types and proportions of inhibitors and sugars produced in the hydrolysate.

In our study, cassava pulp hydrolysis yielded relatively high total sugar concentration ( $62.95 \pm 0.76$  g/L) in the hydrolysate, while gave out fewer types and lower concentrations of inhibitors (14.68  $\pm$  0.01 mM acetic acid, 0.43  $\pm$  0.00 mM levulinic acid and 0.10  $\pm$  0.00 mM 5-HMF) than previously reported (Supplementary II, Table SII-1). These results might be due to mild hydrolysis (0.6 M sulfuric acid with the solid to liquid ratio of 1:10 and heating at 120 °C for 30 min), a condition that broke down less sugars and generated low inhibitor contents.

The analysis of material distribution during cassava pulp hydrolysis is presented in Supplementary I. Ten grams of cassava pulp (9.54 g of oven dry weight) was hydrolysed with 100 ml of 0.6 M sulphuric acid. The initial hydrolysate was collected and the insoluble residual was washed twice. The solutions from the first and second wash were then collected. The volume and chemical composition of the initial hydrolysate, the first wash and the second wash were analyzed and calculated for mass recovery and sugar yield. The mass recovery of the initial hydrolysate, the first wash, the second wash, insoluble residual and total mass recovery were 52.75, 16.78, 3.78, 18.67 and 91.98%, respectively (Supplementary I, Table SI-1). About 8% of an unaccounted mass was possible to contain other soluble components such as protein, lipid and other acid soluble minerals because the chemical composition analysis in this work was subjected to total sugar, total lignin, total inhibitors and insoluble residue. Therefore, the total soluble solid (TSS) in each fraction was analyzed and calculated for total mass recovery (Supplementary I, Table SI-2). The total mass recovery calculated based on

TSS showed the reasonable value of 99.63%. This was a confirmation of the presence of other substances in the initial hydrolysate, the first wash and the second wash that were not total sugar, lignin and inhibitors.

### Changes in *S. cerevisiae* SC90 growth profiles during adaptation to cassava pulp hydrolysis

The number of cycles run in the media with 20, 40, 60, 80, and 100% hydrolysate was two cycles (1st and 2nd cycles), two cycles (3rd and 4th cycles), three cycles (5th–7th cycles), five cycles (8th–12th cycles), and seven cycles (13th–19th cycles), respectively. The maximum total cells and viability of SC90 from sequential adaptation in each medium are shown in Table 1. The maximum total cell number of the control medium was  $1.99 \times 10^8$  cell/mL. Interestingly, in the media with 20% and 40% hydrolysate, the maximum total cell number was slightly increased to approximately  $2.6 \times 10^8$  cell/mL and  $2.4 \times 10^8$  cell/mL, respectively. This result was supported by the finding of Greetham (2014) in which acetic acid concentration as low as 10–25 mM had little or no negative impact on growth. Moreover, the acetic acid at 25 mM enhanced growth compared to the control without inhibitor. The time to achieve maximum cell number ( $t_{max}$ ) in the first cycle of the media with 20% hydrolysate was 12 h which is equal to the control medium. The increase in  $t_{max}$  to 24 h was observed in the first cycle of the media with 40% hydrolysate compared to the control medium. The increase in the hydrolysis concentration above 40% resulted in both lower maximum total cell number and longer  $t_{max}$ . The maximum total number of cells in the last adaptation cycle in the 60, 80 and 100% hydrolysate was 11, 13 and 34% higher, respectively, than in the first cycle.

At low hydrolysate concentrations, there were lower levels of inhibitors, where the cells had not been acclimatized. Increasing the hydrolysate concentration led to have higher levels of inhibitors that resulted in a lower number of cells in the first cycle. The repeated cell adaptations in the same media, especially at 80 and 100% hydrolysate showed that cells can be more tolerant to the inhibitors. It can be supported by an increase in total cell numbers, shorter lag time ( $t_{lag}$ ) and  $t_{max}$  (Table 1). The reduction in the  $t_{lag}$  that was observed when cells were repeatedly cultivated in the same concentration of inhibitors was also consistent with the findings of Wallace-Salinas and Gorwa-Grauslund (2013) and Kuppram et al. (2012).

The specific growth rate ( $\mu$ ) of the control medium and low hydrolysate concentration at 20 and 40% was 0.27–0.30 h<sup>-1</sup>. The cells that had been moved to the new media contained 60, 80 and 100% hydrolysate showing a decrease in  $\mu$  of the first cycle to 0.24, 0.21 and 0.20 h<sup>-1</sup>, respectively (Table 1). The decrease in growth rate when

**Table 1** Summary of vitality of *S. cerevisiae* SC90 during the adaptation process

Experiments	Maximum total cell number (cell/mL)	Viability (%)	Specific growth rate ( $\mu$ h <sup>-1</sup> )	Time to obtain maximum cell number ( $t_{max}$ ; h)	Lag time (h)
Control	$1.99 \pm 0.04 \times 10^8$	$92.04 \pm 2.46$	$0.28 \pm 0.00$	12	0.9
20% hydrolysate medium					
1st cycle <sup>a</sup>	$2.55 \pm 0.16 \times 10^8$	$91.18 \pm 2.40$	$0.27 \pm 0.01$	12	1.5
2nd cycle <sup>b</sup>	$2.58 \pm 0.17 \times 10^8$	$89.41 \pm 0.48$	$0.30 \pm 0.01$	12	1.0
40% hydrolysate medium					
3rd cycle <sup>a</sup>	$2.42 \pm 0.06 \times 10^8$	$98.60 \pm 0.23$	$0.28 \pm 0.01$	24	1.9
4th cycle <sup>b</sup>	$2.44 \pm 0.01 \times 10^8$	$98.94 \pm 0.23$	$0.30 \pm 0.01$	12	1.5
60% hydrolysate medium					
5th cycle <sup>a</sup>	$1.95 \pm 0.10 \times 10^8$	$99.00 \pm 0.05$	$0.24 \pm 0.02$	36	2.1
6th cycle <sup>b</sup>	$2.03 \pm 0.13 \times 10^8$	$98.99 \pm 0.50$	$0.25 \pm 0.01$	24	1.9
7th cycle <sup>b</sup>	$2.16 \pm 0.06 \times 10^8$	$98.58 \pm 0.46$	$0.26 \pm 0.01$	12	1.5
80% hydrolysate medium					
8th cycle <sup>a</sup>	$1.74 \pm 0.06 \times 10^8$	$98.16 \pm 1.13$	$0.21 \pm 0.01$	48	2.0
9th cycle <sup>b</sup>	$1.74 \pm 0.07 \times 10^8$	$99.01 \pm 0.76$	$0.21 \pm 0.01$	36	1.9
10th cycle <sup>b</sup>	$1.74 \pm 0.15 \times 10^8$	$99.63 \pm 0.64$	$0.22 \pm 0.01$	36	1.6
11th cycle <sup>b</sup>	$1.88 \pm 0.13 \times 10^8$	$98.33 \pm 2.03$	$0.23 \pm 0.01$	24	1.6
12th cycle <sup>b</sup>	$1.96 \pm 0.12 \times 10^8$	$99.06 \pm 0.34$	$0.23 \pm 0.01$	12	1.6
100% hydrolysate medium					
13th cycle <sup>a</sup>	$1.52 \pm 0.10 \times 10^8$	$98.31 \pm 1.10$	$0.20 \pm 0.01$	48	1.9
14th cycle <sup>b</sup>	$1.48 \pm 0.14 \times 10^8$	$99.24 \pm 0.37$	$0.20 \pm 0.01$	48	1.7
15th cycle <sup>b</sup>	$1.68 \pm 0.11 \times 10^8$	$99.26 \pm 0.38$	$0.21 \pm 0.02$	36	1.5
16th cycle <sup>b</sup>	$1.55 \pm 0.02 \times 10^8$	$99.40 \pm 0.63$	$0.19 \pm 0.01$	24	1.5
17th cycle <sup>b</sup>	$1.67 \pm 0.16 \times 10^8$	$98.88 \pm 1.12$	$0.21 \pm 0.01$	12	1.3
18th cycle <sup>b</sup>	$1.97 \pm 0.06 \times 10^8$	$99.11 \pm 0.93$	$0.23 \pm 0.01$	12	1.3
19th cycle <sup>b</sup>	$2.04 \pm 0.07 \times 10^8$	$99.69 \pm 0.53$	$0.24 \pm 0.00$	12	1.3

The values are reported as mean  $\pm$  SD from the experiment in triplicate excepting the lag time that was estimated from the average value of growth in the form of viable cell number. Superscripts <sup>a,b</sup> represents the first cycle and last cycle of each hydrolysate concentration, respectively

the culture was transferred to the media with the higher concentration of hydrolysate confirms the findings of Wallace-Salinas and Gorwa-Grauslund (2013). Koppam et al. (2012) also explained that the extended  $t_{lag}$  prior to the cell recovery could be caused by a modification of the physiology of cells adapted under inhibitor stress. There was a gradual improvement in the growth rate because of increasing number of beneficial mutant cells that outnumbered the non-beneficial mutants. The results of the present study indicate that at higher concentrations of inhibitors, it was necessary to sub-culture in the same medium several times until  $\mu$  was not less than 80% of that of the control condition ( $0.28 \text{ h}^{-1}$ ), which was  $0.22 \text{ h}^{-1}$ . Yeast cells from the control medium transferred into the media with 20, 40 or 60% hydrolysate provided a  $\mu$  within the acceptable range of  $0.22 \text{ h}^{-1}$ . However, when cells were transferred to the 80 or 100% hydrolysate, they showed lower  $\mu$  than in the previous media running at lower hydrolysate concentrations. The cultures were consequently repeated for five and seven cycles to obtain a  $\mu$  value  $> 0.22 \text{ h}^{-1}$ . This effect may be due

to a higher concentration of inhibitors in the media with a higher concentration of hydrolysate.

Regarding our results, the amounts of acetic acid, levulinic acid and 5-HMF were  $14.68 \pm 0.01$ ,  $0.43 \pm 0.00$  and  $0.10 \pm 0.00 \text{ mM}$ , respectively (Fig. 2 and Supplementary Table S1). All substances are known to be toxic compounds to microorganisms. The severity of the inhibitor depends on various factors including yeast strain used, the adaptation ability of yeast strain to inhibitors, fermentation process, type of inhibitors as well as combined synergistic effect of several toxic compounds (Mussatto and Roberto 2004). Furan derivatives, furfural and 5-HMF, are toxic compounds generated from pentose and hexose degradation, respectively (Mussatto and Roberto 2004). They could inhibit the functions of several glycolytic enzymes resulting in a reduction in the  $\mu$ , biomass yield ( $Y_{X/S}$ ), volumetric productivity ( $Q$ ) as well as ethanol yield ( $Y_{P/S}$ ) but instead increased in  $t_{lag}$  (Almeida et al. 2007; Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000).

The major weak acids generated during hydrolysis are acetic acid, formic acid, and levulinic acid. They have

been shown to possess inhibitory effects on yeast by reduction in biomass and ethanol yield (Larsson et al. 1999; Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000). Baur et al. (2003) reported that the weak acids could inhibit cell growth by reducing aromatic amino acid assimilation from the medium. The level of acid toxicity depended upon the fermentation conditions (Mussatto and Roberto 2004).

The time to obtain the maximum cell numbers ( $t_{max}$ ) was one of the parameters that indicated the adaptability of cells. In the control medium and 20% hydrolysate medium,  $t_{max}$  was as low as 12 h, but  $t_{max}$  increased when the hydrolysate concentration was increased to 40–100%. However, the repeated cycle in the same hydrolysate concentration resulted in a reduction in  $t_{max}$ . This implies that the adaptation of cells during the repeated cycles enhanced tolerance to the toxicity of the inhibitors (Table 1). The adapted cells obtained in this experiment were only a transient or short-term adaptation which has been previously reported as phenotypic plasticity of yeast (Narayanan et al. 2016). In the present work, the results of spot plate experiment in Fig. 1 were used as the evidence to confirm the pattern of adaptation. The adapted cells lost the ability to withstand inhibitors after they were sub-cultured in the 0% cassava hydrolysate medium. However, the adapted cells that were maintained in 100% hydrolysate medium can retain the ability to tolerate the inhibitors (Fig. 1). Thus, the preservation of the adapted strain in 100% hydrolysate medium was important to maintain its ability to tolerate inhibitors. The possible reasons for a higher concentration of inhibitors in the media with a higher concentration of cassava pulp hydrolysate during SC90 adaptation are presented in the next section.

### Changes in the inhibitor concentration during *S. cerevisiae* SC90 adaptation in cassava pulp hydrolysate

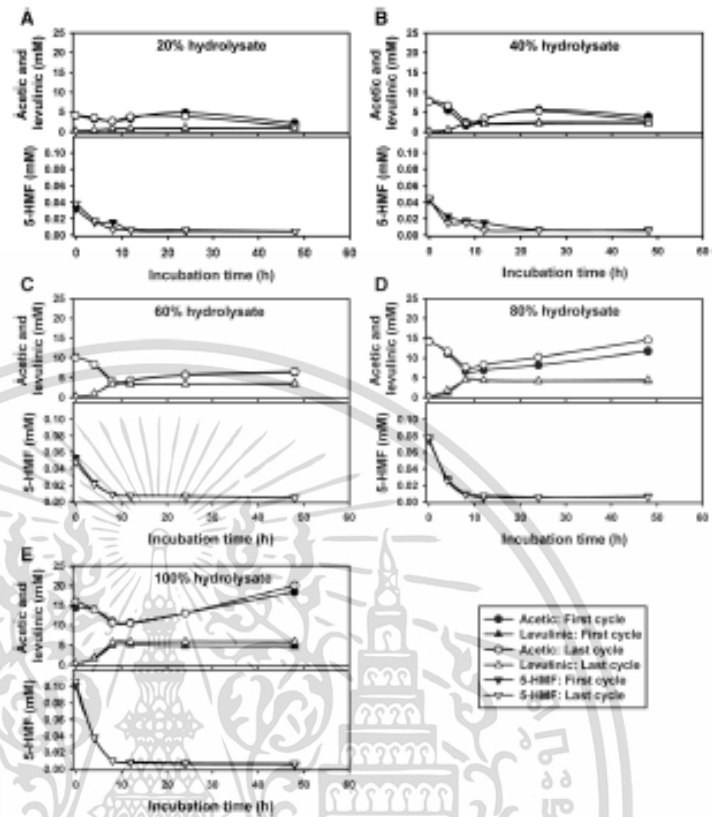
The major inhibitors in cassava hydrolysate were acetic acid, levulinic acid and 5-HMF (Supplementary Table S1). The concentration of inhibitors increased with increasing concentration of hydrolysate used (Fig. 2). At the beginning of incubation, the concentrations of acetic acid were  $4.08 \pm 0.04$ ,  $7.75 \pm 0.08$ ,  $10.13 \pm 0.01$ ,  $14.16 \pm 0.12$  and  $15.96 \pm 0.09$  mM and for 5-HMF they were  $0.035 \pm 0.004$ ,  $0.043 \pm 0.002$ ,  $0.051 \pm 0.003$ ,  $0.076 \pm 0.002$  and  $0.103 \pm 0.003$  mM, respectively, for 20, 40, 60, 80 and 100% hydrolysate levels. The concentration of acetic acid was higher than that of formic and levulinic acid, which was consistent with the findings of Tian et al. (2011) and Tomás-Pejó et al. (2010). They also found that acetic acid was a major inhibitor in biomass hydrolysate. Nilvebrant et al. (2003) reported that furfural is normally found in lower concentration than 5-HMF. In this experiment, furfural was undetectable (Supplementary Table S1).

In pretreatment of lignocellulosic material, 5-HMF is generated from hexose sugar degradation and can be converted to formic acid and levulinic acid. Therefore, the lower concentration of levulinic acid and the inability to detect formic acid that was observed was related to the low breakdown level of 5-HMF (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000; Thomas et al. 2002). Acetic acid is formed from the deacetylation of acetyl group in hemicellulose structures and may be generated from furfural under acid hydrolysis when heated. It has been reported that acetic acid is a minor product produced during yeast fermentation. In the present study, cassava pulp acid hydrolysis performed using 0.6 M sulfuric

Maintenance medium	Tested medium								
	0% cassava hydrolysate (Control)			50% cassava hydrolysate			100% cassava hydrolysate		
	Dilution of cell suspension			Dilution of cell suspension			Dilution of cell suspension		
	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
0% cassava hydrolysate									
100% cassava hydrolysate									

**Fig. 1** Loss of the ability to withstand the inhibitors by adapted cells preserved in 0% cassava hydrolysate medium compared with the adapted cells preserved in 100% cassava hydrolysate medium

**Fig. 2** Changes in amount of acetic acid, levulinic acid, and 5-HMF during adaptation of *S. cerevisiae* SC90 in medium mixed with cassava pulp hydrolysate of 20% (a), 40% (b), 60% (c), 80% (d) and 100% (e) in the first (closed symbols) and the last (open symbols) cycles. Furfural is not detected



acid at 120 °C for 30 min resulted in a low concentration of 5-HMF (approximately 0.1 mM), which confirmed results reported by Lucenda et al. (2013). They studied the influence of acid concentrations on sisal pulp pretreated with 5% (v/v) sulfuric acid (approximately 0.5 M) at 100 °C with a reaction time of less than 120 min and detected very low amounts of both furfural (< 0.26 mM) and 5-HMF (< 0.04 mM). They also found that formic acid could be detected when using concentrations of sulfuric acid of between 15 and 25% (v/v) (approximately 1.5–2.5 M). Therefore, the type of inhibitors and their amount depend on both the type of lignocellulosic material and pretreatment methods.

In the present work, the patterns of the inhibitor concentration changes were similar in all hydrolysate concentrations for both the first cycle and last cycle of each hydrolysate concentration (Fig. 2). The acetic acid concentration was continuously decreasing from the beginning to 8 h of incubation and the concentration has again increased after

12 h of incubation. The acetic acid can be assimilated by the formation of acetyl CoA and then entering the Kreb's cycle. However, it can be generated as by-product during yeast fermentation (Palmqvist and Hahn-Hägerdal 2000; Thomas et al. 2002). The levulinic acid was rapidly produced in the early stages during the first 8 h of incubation and then showed the constant concentration until the end of the process. It confirmed the findings of Thompson et al. (2016) who found that the concentration of levulinic acid was increased during fermentation.

For the concentration of 5-HMF, it was rapidly reduced in the first 8 h of incubation. Palmqvist and Hahn-Hägerdal (2000) have previously shown that *S. cerevisiae* was able to enzymatically convert HMF to less toxic compound. HMF was reduced to 2,5-bis-hydroxymethylfuran (HMF alcohol) under aerobic and anaerobic conditions (Liu et al. 2004). Koppam et al. (2012) found that cells acquired the ability of improving furan transformation during adaptation. The data

of formic acid are not shown because its concentration was below the detection limits. This implies that the sequential adaptation of SC90 in converting inhibitors can be considered an important modification that might contribute to a higher tolerance against inhibitors released during cassava pulp pretreatment.

#### Ethanol fermentation performance during *S. cerevisiae* SC90 adaptation in cassava pulp hydrolysate

The highest ethanol concentration was reached at 8 h of fermentation. The gradual adaptation of SC90 in each adaptation medium resulted in an improvement in its rate of glucose utilization. However, a decrease in volumetric productivity ( $Q$ ) and fermentation efficiency was observed at 80 and 100% hydrolysate medium (Table 2). These effects were caused by the toxicity from the inhibitors generated at the higher concentration of hydrolysate (Fig. 2). In the first step, the medium without hydrolysate was used as the control, which provided a very high fermentation efficiency of up to 96.15%. The adaptation in the first cycle in 20% hydrolysate showed a slight decrease in fermentation efficiency compared to the control. Although the 20% hydrolysate contained inhibitors formed during the pretreatment, they were present at a very low level, about 3 mM of the initial acetic acid concentration as described previously (Fig. 2). Several research works presented that low concentration of acetic acid could improve ethanol production. Thomas et al. (2002) found that fermentation in the presence of acetic acid

provided a higher ethanol concentration than in its absence. Greetham (2014) also found that the acetic acid content of less than 25 mM had no effect on the metabolic output associated with growth and ethanol production of yeast. Larsson et al. (1999) provided additional information that low concentration of acids can increase the ethanol yield which may be caused by stimulating the production of ATP.

The fermentation efficiency during adaptation in 20% hydrolysate was 94.83% in the first run and 96.12% in the second run. There were no significant differences in fermentation ability, including the  $Y_{P/S}$ ,  $Q$ , sugar consumption and fermentation efficiency during repeated cultivation cycle. Decreasing  $Y_{P/S}$  and fermentation efficiency were found in the last cycles of 60, 80 and 100% hydrolysate compared to those of the first cycle (Table 2). Meanwhile, the increase in maximum total cell number (Table 1) and  $Y_{X/S}$  (Table 2) was found in the last cycles of 60, 80 and 100% hydrolysate compared to those of the first cycle. This could be explained by the flux distribution into anabolism and energy metabolism of carbon during ethanol fermentation in the yeast. In the first cycle, cells might have to adapt to the higher concentration of inhibitors, which required more energy that could be obtained from ethanol fermentation. This was obviously shown by high  $Y_{P/S}$  in the first cycle compared to that of the last cycle (Table 2). Moreover, after the cells adapted to tolerate inhibitors in the last cycle, the cell growth increased and the carbon source available for ethanol fermentation decreased. This characteristic of fermentation confirmed the findings of Zhu et al. (2009) who showed yeast adaptation using a step-by-step gradual increase in the concentration

**Table 2** Kinetic parameters of ethanol production during adaptation of *S. cerevisiae* SC90

Experiments	Rate of glucose utilization (g/L/h)	Ethanol yield ( $Y_{P/S}$ ; g/g)	Biomass yield ( $Y_{X/S}$ ; cell/g)	Volumetric productivity ( $Q$ ; g/L/h)	Fermentation efficiency (%)
Control	6.08	0.49	$4.09 \times 10^6$	3.20	96.15
20% hydrolysate medium					
1st cycle <sup>a</sup>	5.61	0.45	$5.49 \times 10^6$	3.14	94.83
2nd cycle <sup>b</sup>	6.02	0.49	$5.55 \times 10^6$	3.19	96.12
40% hydrolysate medium					
3rd cycle <sup>a</sup>	6.52	0.46	$4.60 \times 10^6$	2.96	89.37
4th cycle <sup>b</sup>	6.57	0.47	$4.64 \times 10^6$	3.09	93.10
60% hydrolysate medium					
5th cycle <sup>a</sup>	6.80	0.44	$3.41 \times 10^6$	2.86	86.35
7th cycle <sup>b</sup>	7.49	0.41	$3.78 \times 10^6$	2.91	80.09
80% hydrolysate medium					
8th cycle <sup>a</sup>	6.77	0.43	$3.03 \times 10^6$	2.80	84.50
12th cycle <sup>b</sup>	7.58	0.40	$3.41 \times 10^6$	2.62	78.96
100% hydrolysate medium					
13th cycle <sup>a</sup>	7.96	0.36	$2.44 \times 10^6$	2.32	69.91
19th cycle <sup>b</sup>	7.62	0.32	$3.27 \times 10^6$	2.06	62.14

The alternation time of all experiments was 8 h. Superscripts <sup>a, b</sup> represent the first cycle and last cycle of each hydrolysate concentration, respectively

over the range between 10 and 50% of corn stover filtrate loading. They observed that the content of residual xylose has gradually increased with increasing filtrate loading together with an increase of ethanol produced in the initial step and a decrease in its content in later steps.

### Comparison of growth and fermentation performance of adapted and non-adapted cells in 100% hydrolysate medium

The biological method such as yeast adaptation became more attractive in overcoming inhibitors present in lignocellulose hydrolysate which practically resulted in reducing both the cost of detoxification process and loss of fermentable sugars in pre-treated hydrolysates (Parawira and Tekere 2011). In the present work, adapted cells of SC90 in the final run were obtained and then cultured in 100% hydrolysate to assess their growth and performance in ethanol fermentation compared to non-adapted SC90. This showed that the number of living cells and the viability of the adapted cells were higher than those of non-adapted cells (Fig. 3a, b; Table 3). The  $\mu$  was then calculated at the log phase where the adapted cells had a growth rate of  $0.22 \pm 0.00 \text{ h}^{-1}$  compared to  $0.19 \pm 0.00 \text{ h}^{-1}$  for non-adapted cells (Table 3). The  $t_{lag}$  of both, adapted and non-adapted, cells as relatively low, 0.3 and 0.7 h, respectively.

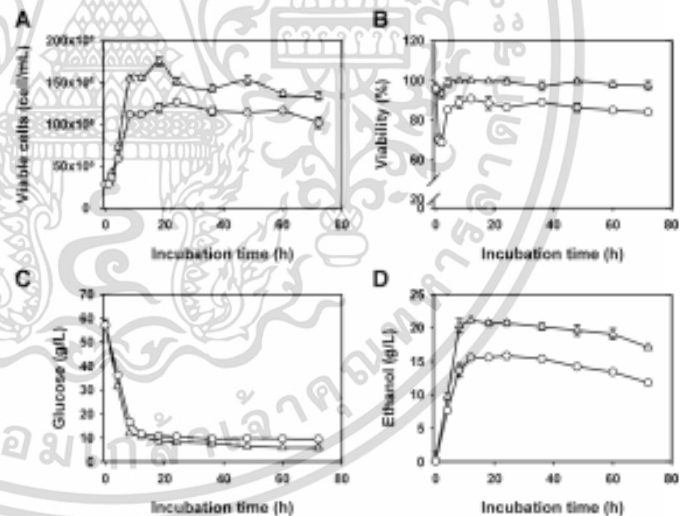
Comparison between the adapted and the original strains of SC90 in terms of glucose consumption and ethanol production is shown in Fig. 3c, d and Table 3. The adapted cells produced significantly higher ( $p \leq 0.05$ )

ethanol concentration,  $Y_{P/S}$ , fermentation efficiency and  $Q$ . These results were in line with the report of Silva and Roberto (2001) who suggested that the evolution of microorganisms to tolerate inhibitors can improve the fermentation efficiency of the lignocellulosic biomass.

The results of this study were compared to the work of Landaeta et al. (2013) who studied the adaptation of *S. cerevisiae* NRRL Y-265 by cell recycle batch fermentation. They adapted yeast using media with sequential increase in inhibitor concentrations (five different inhibitor concentrations). These media imitated the content of inhibitors to those in eucalyptus chip hydrolysate. The kinetic parameters ( $\mu$ ,  $Y_{P/S}$  and  $Q$ ) of their experiment are presented in Table 3. They showed that adapted strain cultivated in steam-exploded eucalyptus hydrolysate can improve the  $\mu$  and  $Q$  by 70% and 10%, respectively, over non-adapted strain. Our results showed that the adapted cell elevated the  $\mu$  and  $Q$  to 17% and 46%, respectively, compared to those of non-adapted cell. However, the  $\mu$  and  $Q$  of Landaeta et al. (2013) were much lower than our experiment for both adapted and non-adapted cells.

Our findings also were similar to those reported by Parekh et al. (1986). They demonstrated that adapted yeast cells of *Candida shehatae* and *Pichia stipites* from recycling the yeasts in fresh aspen wood hydrolysate medium several times increased ethanol production by 13% compared to non-adapted strains. Also Pornpukdeewattana et al. (2014) tested ethanol fermentation in cassava pulp that had been pretreated with dilute acid and showed

**Fig. 3** The change of viable cells (a), viability (b), glucose consumption (c) and ethanol production (d) of adapted cells (triangle symbols) and non-adapted cells (circle symbols) in 100% hydrolysate medium. Data represent the averages with error bars obtained from triplicate experiments



**Table 3** The comparison of kinetic parameters from the process with adapted and non-adapted cells

Kinetic parameters	This experiment		Study of Landeta et al. (2013)	
	Adapted cells	Non-adapted cells	Adapted cells	Non-adapted cells
Lag time (h)	0.3	0.7	nd	nd
Specific growth rate ( $\mu$ , h <sup>-1</sup> )	0.22±0.00	0.19±0.00	0.05	0.03
Maximum cell number ( $\times 10^8$ cell/mL)	1.75±0.05	1.27±0.02	nd	nd
Ethanol yield ( $Y_{P/S}$ ; g ethanol/g glucose)	0.43±0.01 <sup>a</sup>	0.34±0.01 <sup>b</sup>	0.48	0.48
Fermentation efficiency (%)	83.82±1.37 <sup>a</sup>	66.04±2.94 <sup>b</sup>	nd	nd
Volumetric productivity (Q; g/L h)	2.47±0.01 <sup>a</sup>	1.69±0.08 <sup>b</sup>	0.53	0.48

For the data of this experiment, the values are reported as mean±SD from the experiment in triplicate excepting the lag time that was estimated from the average value of growth in the form of viable cell number. The mean values in each row with different letters indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ). For the study of Landeta et al. (2013), they compared growth and fermentation efficiency of adapted and non-adapted cells in *cassava* hydrolysate  
nd no data

0.42 g/g of ethanol yield from adapted cells and 0.35 g/g from non-adapted cells.

The spot plate experiment of the adapted and non-adapted cells of SC90 on agar plates with different concentrations of hydrolysate was used to investigate the inhibitor tolerance ability. Strong growth was observed for both adapted and non-adapted cells in the 0% hydrolysate

(control), but the medium containing 50% hydrolysate inhibited cell growth only in the non-adapted cells. When the hydrolysate concentration was increased to 100%, there was still growth of adapted cells but the growth of non-adapted cells was completely inhibited. Thus, it is clear that the adapted cells were more tolerant to inhibitors in *cassava* pulp hydrolysate than the non-adapted cells (Fig. 4).

**Fig. 4** Impact of hydrolysate concentration on the adapted and non-adapted cells growth on spot plates at 30 °C for 72 h

Tested medium	Strain	Dilution fold of cell suspension		
		10 <sup>1</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>
0% cassava hydrolysate medium (Control)	Non adapted cells			
	Adapted cells			
50% cassava hydrolysate medium	Non adapted cells			
	Adapted cells			
100% cassava hydrolysate medium	Non adapted cells			
	Adapted cells			

## Conclusion

From the overview, it can be concluded that SC90 can be adapted to improve its growth and production of ethanol from the hydrolysate of the waste from the cassava flour-processing industry. This adaptation was achieved by progressively increasing the concentration of the cassava pulp hydrolysate over repeated cultures of SC90. Several adaptation cycles were required to improve the  $\mu$  and reduce  $t_{max}$ . This adaptation can be assumed to be acclimatization. The  $Y_{P/S}$  of adapted cells was significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) than that of the non-adapted cells by approximately 27%. The reason for this improvement was that repeated cultures made the SC90 more able to tolerate metabolic inhibitors produced during the hydrolysis of cassava pulp. The inhibitors were acetic acid, levulinic acid and 5-HMF. This implies that adapted cells were acclimated by the repeated cultures giving a higher resistance to toxins compared to the parent cells. It would be more advantageous to use an adapted strain of SC90 in industrial ethanol fermentation from cassava pulp.

**Acknowledgements** This research was financially supported by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMUTL) (A118-59-070) and National Research Council of Thailand. The contribution of Prof. Dr. Anthony Keith Thompson and Prof. Dr. George Simeonick (visiting Professor at Faculty of Agro-Industry, KMUTL) for critically editing the manuscript is acknowledged.

**Author contributions** PPNA: literature review, design of the research outline, design of research tools, analysis of data, interpretation of the data analysis, and drafting of the article (first draft). TC: design of the research outline, design of research tools, decision on the data analysis method, interpretation of the data analysis, revision of the draft of the article (second draft), and final approval of the article (final draft). WK: conception of the project, design of the research outline, interpretation of the data analysis, and final approval of the article (final draft). SP: conception of the project, literature review, design of the research outline, design of research tools, decision on the data analysis method, analysis of data, interpretation of the data analysis, revision of the draft of the article (second draft), and final approval of the article (final draft).

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Agu RC, Amadi AE, Ude CM, Onyia A, Ogu EO, Okafor M, Ezeji-ofor E (1997) Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (cgv) biomass for ethanol production. *Waste Manag* 17:91–96
- Almeida JR, Modig T, Petersson A, Hahn-Hägerdal B, Lidén G, Gorwa-Grauslund MF (2007) Increased tolerance and conversion

- of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. *J Chem Technol Biotechnol* 82:340–349
- Babal M (2011) Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: a review. *Energ Convers Manag* 52:858–875
- Bauer BE, Reisington D, Mollapour M, Mamun Y, Kuchler K, Piper PW (2003) Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. *Eur J Biochem* 15:3189–3195
- Cao GL, Ren NQ, Wang AJ, Guo WQ, Xu JF, Liu BF (2010) Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermotoga bacterium thermotogastrorum* W16. *Int J Hydrogen Energy* 35:13475–13480
- Dubois M, Gilles DA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28:350–356
- El-Mansi EMT, Bruce Ward F (2006) Microbiology of industrial fermentation. In: El-Mansi EMT, Bryce CFA, Demain AL, Allman AR (eds) *Fermentation microbiology and biotechnology*, 2nd edn. Taylor & Francis, Boca Raton, pp 11–46
- El-Naggar NE, Deraz S, Khalil A (2014) Bioethanol production from lignocellulosic feedstocks based on enzymatic hydrolysis: current status and recent developments. *Biotechnology* 13:1–21
- Fein JE, Tallim SR, Lawford GR (1984) Evaluation of *D-xylose* fermenting yeasts for utilization of a wood-derived hemicellulose hydrolysate. *Can J Microbiol* 30:682–690
- Greetham D (2014) Presence of low concentrations of acetic acid improves fermentations using *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bioprocess Biotech* 5:192
- Huang X, Wang Y, Liu W, Bao J (2011) Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon catenatum*. *Biotechnol* 102:9705–9709
- Keating JD, Pangambon C, Mansfield SD (2006) Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnol Bioeng* 93:1196–1206
- Kopprun R, Aibers E, Olsson L (2012) Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. *Biotechnol Biofuels* 5:32
- Koutou Nansosa PA, Iokap Nono Y, Kapteu C (2016) Pretreatment of cassava stems and peels by thermohydrolysis to enhance hydrolysis yield of cellulose in bioethanol production process. *Renew Energy* 97:252–265
- Kumar P, Barrett DM, Delwiche MJ, Stroeve P (2009) Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. *Ind Eng Chem Res* 48:3713–3729
- Lacenda TM, Zambon MD, Hurlini E (2013) Effect of acid concentration and pulp properties on hydrolysis reactions of mercerized sisal. *Carbohydr Polym* 93:347–356
- Landaeta R, Aroca G, Acevedo F, Tebeira JA, Mussatto SI (2013) Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. *Appl Energy* 102:124–130
- Lane J (2017) Thailand announces \$11.3 billion 10-year plan to build sugarcane and cassava bioeconomy. *Biofuelsdigest*. <http://www.biofuelsdigest.com/bdigest/2017/01/25/thailand-announces-11-3-billion-10-year-plan-to-build-sugarcane-and-cassava-bioeconomy-2>. Accessed 26 Nov 2018
- Larsson S, Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B, Tengborg C, Stenberg K, Zacchi G, Nibehani MD (1999) The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. *Enzyme Microb Technol* 24:151–159
- Larsson S, Carlsson P, Jönsson LJ (2001) Development of a *Saccharomyces cerevisiae* strain with enhanced resistance to phenolic fermentation inhibitors in lignocellulose hydrolysates by

- heterologous expression of laccase. *Appl Environ Microbiol* 67:1163–1170
- Liu ZL, Slininger PJ, Dien BS, Berhow MA, Kurtzman CP, Gorsich SW (2004) Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J Ind Microbiol Biotechnol* 31:345–352
- Luján-Rhenals DE, Morawicki RO (2016) Production of fermentable sugars and a high protein meal by dilute acid hydrolysis of soybean meal at high temperatures. *Bioresources* 11(4):8155–8165
- Marín C, Wei M, Xiong S, Jönsson LJ (2017) Enhancing saccharification of cassava stems by starch hydrolysis prior to pretreatment. *Ind Crop Prod* 97:21–31
- Mussatto SI, Roberto IC (2004) Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolysates for use in fermentative processes: a review. *Bioresour Technol* 93:1–10
- Narayanan V, Sánchez Nogue V, van Niel EJ, Gorwa-Grauslund MF (2016) Adaptation to low pH and lignocellulosic inhibitors resulting in ethanolic fermentation and growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *AMB Expr* 6:1–13
- Nitvehrant NO, Persson P, Rötter A, De Souza F, Gorton L, Jönsson LJ (2003) Limits for alkaline detoxification of dilute-acid lignocellulosic hydrolysates. *Appl Biochem Biotechnol* 105–108:615–628
- Olsson L, Hahn-Hägerdal B (1993) Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulosic hydrolysates. *Process Biochem* 28:249–257
- Palmqvist E, Hahn-Hägerdal B (2000) Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: Inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresour Technol* 74:25–33
- Parzwa W, Tekere M (2011) Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulosic hydrolysates for ethanol production: review. *Crit Rev Biotechnol* 31(1):20–31
- Parekh SR, Yu S, Wayman M (1996) Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increase of ethanol production. *Appl Microbiol Biotechnol* 25:300–304
- Pornpakdeewattana S, Khamfun J, Phatbenchai N (2014) Adaptation of commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis. *Sustainable J Sci Technol* 21:335–345
- Siba CJ, Roberto IC (2001) Improvement of xylose production by *Candida guilliermondii* FT12037 previously adapted to rice straw hemiacetalic hydrolysate. *Leti Appl Microbiol* 52:248–252
- Siba JPA, Mussatto SI, Roberto IC, Teixeira JA (2011) Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. *Braz J Chem Eng* 28:151–156
- Stuiler A, Hames B, Ruiz R, Scarlata C, Stuiler J, Templeton D, Crocker D (2012) Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, laboratory analytical procedure (LAP). National Renewable Energy Laboratory (NREL) Web. <https://www.nrel.gov>. Accessed 17 Jan 2019
- Smart KA, Chambers KM, Lambert I, Jenkins C (1999) Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *J Am Soc Brew Chem* 57:18–23
- Sotympanour Z, Nikzad M, Talebnia F, Nikzad V (2018) Xanthan gum production from acid hydrolyzed broomcorn stem as a sole carbon source by *Xanthomonas campestris*. *3 Biotech* 8:296
- Srinorakultra T, Kaewvimon L, Saengow L (2006) Approach of cassava waste pretreatments for fuel ethanol production in Thailand. *J Sci Res Chula Univ* 31:77–84
- Sun Y, Cheng J (2002) Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. *Bioresour Technol* 83:1–11
- Thomas KC, Hynes SH, Ingledew WM (2002) Influence of medium buffering capacity on inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by acetic and lactic acids. *Appl Environ Microbiol* 68:1616–1623
- Thompson GA, Hawkins GM, Gorsich SW, Doan-Peterson J (2016) Phenotypic characterization and comparative transcriptomics of evolved *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved tolerance to lignocellulosic derived inhibitors. *Biotechnol Biofuels* 9:200
- Tian S, Zhu J, Yang X (2011) Evaluation of an adapted inhibitor-tolerant yeast strain for ethanol production from combined hydrolysate of softwood. *Appl Energy* 88:1792–1796
- Tomás-Peño E, Ballesteros M, Oliva JM, Olsson L (2010) Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* FT2 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *J Ind Microbiol Biot* 37:1211–1220
- Trakulchean S, Chairasert P, Otmakova J, Songkasiri W (2017) Comparison of fermented animal feed and mushroom growth media as two value-added options for waste cassava pulp management. *Waste Manag Res* 35:1210–1219
- Wallace Salinas Y, Gorwa-Grauslund MF (2013) Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. *Biotechnol Biofuels* 6:151
- Zhu JJ, Yong Q, Xu Y, Chen SX, Yu SY (2009) Adaptation fermentation of *Pichia stipitis* and combination detoxification on steam exploded lignocellulosic prehydrolysate. *Nat Sci* 1:47–54

**ภาคผนวก ข**  
**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี**

**ข.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

**ข.1.1 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium**

Yeast Extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose (Glucose)	20	กรัม
น้ำกรอง	1000	มิลลิลิตร

**วิธีทำ**

ผสมสารอาหารต่างๆเข้าด้วยกันลงในบีกเกอร์ เหน้ากรองปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ทำการปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง เทสารละลายที่ได้ลงในขวดดูแรนแล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ข.1.2 Yeast Peptone Dextrose (YPD) Agar**

Yeast Extract	1	กรัม
Peptone	2	กรัม
Dextrose (Glucose)	2	กรัม
Agar	2	กรัม
น้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

**วิธีทำ**

ผสมสารอาหารต่างๆเข้าด้วยกันลงในบีกเกอร์ เหน้ากรองปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ทำการปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง เทสารละลายที่ได้ลงในขวดดูแรนสำหรับเทลงในจานเพาะเชื้อหรือดูดใส่หลอดทดลองเพื่อทำอาหารรุ้นเอียง แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ข.1.3 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมสารยับยั้งแต่ละชนิด**

**ก.1.3.1 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมกรดอะซิติก**

Yeast Extract	15	กรัม
Peptone	30	กรัม
Dextrose (Glucose)	30	กรัม
2 M Sodium acetate trihydrate (Stock solution)		
น้ำกรอง		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เทน้ำกรองปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรด ฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดขวดละ 200 มิลลิลิตร (จำนวน 5 ขวด) แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลาย Sodium acetate trihydrate ที่ฆ่าเชื้อและปรับค่า pH เป็น 5.5 แล้วลงในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นขวดละ 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ โดยคำนวณจากสูตร  $N_1V_1 = N_2V_2$  ( $N_1$  คือ ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการใช้  $N_2$  คือ ความเข้มข้นของสารละลาย stock solution  $V_1$  คือ ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการใช้  $V_2$  คือ ปริมาตรของสารละลาย stock solution ที่ต้องใช้ในการเตรียม) แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

#### ข.1.3.2 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมกรดฟอร์มิก

Yeast Extract	15	กรัม
Peptone	30	กรัม
Dextrose (Glucose)	30	กรัม
2 M Sodium formate (Stock solution)		
น้ำกรอง		

### วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เทน้ำกรองปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรด ฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดขวดละ 200 มิลลิลิตร (จำนวน 5 ขวด) แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลาย Sodium formate ที่ฆ่าเชื้อและปรับค่า pH เป็น 5.5 แล้วลงในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นขวดละ 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

#### ข.1.3.3 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมกรดลิวูลินิก

Yeast Extract	15	กรัม
Peptone	30	กรัม
Dextrose (Glucose)	30	กรัม
98% Levulinic acid		
น้ำกรอง		

### วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เทน้ำกรองปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับปริมาตรเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดตูแรนขวดละ 200 มิลลิลิตร (จำนวน 5 ขวด) ผสม Levulinic acid ลงในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นขวดละ 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรอง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

#### ข.1.3.4 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมเฟอพิวรัล

Yeast Extract	12	กรัม
Peptone	24	กรัม
Dextrose (Glucose)	24	กรัม
1 M Furfural (Stock solution) น้ำกรอง		

#### วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เทน้ำกรองปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 800 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดตูแรนขวดละ 200 มิลลิลิตร (จำนวน 4 ขวด) แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลาย Furfural ลงในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นขวดละ 6.25 12.5 18.75 และ 25 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

#### ข.1.3.5 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสม 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล

Yeast Extract	12	กรัม
Peptone	24	กรัม
Dextrose (Glucose)	24	กรัม
1.06 M 5-HMF (Stock solution) น้ำกรอง		

#### วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เทน้ำกรองปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 800 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดตูแรนขวดละ 200 มิลลิลิตร (จำนวน 4 ขวด) แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลาย 5-HMF ลงในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นขวดละ 6.25 12.5 18.75 และ 25 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

#### ข.1.4 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมสารยับยั้งผสมทั้ง 5 ชนิด

Yeast Extract	12	กรัม
---------------	----	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peptone	24	กรัม
Dextrose (Glucose)	24	กรัม
4.05 M Sodium acetate trihydrate (Stock solution)		
5.1 M Sodium formate (Stock solution)		
3.75 M Levulinic acid (Stock solution)		
1 M Furfural (Stock solution)		
1.06 M 5-HMF (Stock solution)		
น้ำกรอง		

### วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เทน้ำกรองปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 600 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดดูแวนขวดละ 150 มิลลิลิตร (จำนวน 4 ขวด) แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลายทั้ง 5 ชนิด คือ Sodium acetate trihydrate Sodium formate Levulinic acid Furfural และ 5-HMF ลงไปในอาหาร YPD ให้ความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมทั้ง 4 ระดับตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.1 แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

### ข.1.5 อาหารปรับสภาพเชื้อยีสต์

Yeast Extract	5	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.5	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.5	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.75	กรัม
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1	กรัม
Dextrose (Glucose)		
สารละลายกากมันสำปะหลัง		
น้ำกลั่น		

### วิธีทำ

ปริมาณสารละลายกากมันสำปะหลัง น้ำกลั่น และน้ำตาลที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารปรับสภาพทั้ง 5 สูตร ดังตารางที่ ข-1 ทำการผสมสารอาหารต่างๆ และน้ำตาลลงในบีกเกอร์ เทน้ำกลั่นครึ่งหนึ่งของปริมาณที่ใช้ลงในสารอาหาร ให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย เทสารละลายกากมันสำปะหลังลงในอาหาร ผสมให้เข้ากัน ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง เทสารละลายที่ได้ลงในขวดดูแวน แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ ข-1 สูตรอาหารปรับสภาพที่ใช้ในการปรับตัวของเชื้อยีสต์

ความเข้มข้น (%)	สารละลายกากมันสำปะหลัง (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	Dextrose (กรัม)
0	0	1000	46.52
20	200	800	37.22
40	400	600	27.91
60	600	400	18.61
80	800	200	9.30
100	1000	0	0

ข.1.6 อาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (v/v) แบบแข็ง (100% cassava hydrolysate agar)

Yeast Extract	0.5	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.75	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.35	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.075	กรัม
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.1	กรัม
Agar	2	กรัม
สารละลายกากมันสำปะหลัง	100	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ผสมสารอาหารต่างๆเข้าด้วยกันลงในปิกเกอร์ เทสารละลายกากมันสำปะหลัง 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกากมันสำปะหลัง เทสารละลายที่ได้ลงในขวดดูแรนสำหรับเทลงในจานเพาะเชื้อหรือดูดใส่หลอดทดลองเพื่อทำอาหาร วันเอียง แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ข.1.7 อาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (v/v) เสริมไนโตรเจนด้วย (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Yeast Extract	5	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1, 3, 5, 7.5	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.5	กรัม
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.75	กรัม
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1	กรัม
สารละลายกากมันสำปะหลัง	1000	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**วิธีทำ**

ผสมสารอาหารต่างๆ และ  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  ลงในบีกเกอร์ เทสารละลายกากมันสำปะหลัง 500 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 เทสารละลายกากมันสำปะหลังที่เหลือผสมไปในอาหาร และปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เทสารละลายที่ได้ลงในขวดดูแรน แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ข.2 การเตรียมสารเคมี****ข.2.1 การเตรียมสีย้อม Methylene violet**

Sodium Citrate	2	กรัม
Methylene violet	0.01	กรัม
น้ำกลั่น		

**วิธีทำ**

ละลาย Sodium Citrate ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร ละลาย Methylene violet ด้วยสารละลาย Sodium Citrate เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

**ข.2.2 สารละลาย 0.8% NaCl**

Sodium chloride	0.8	กรัม
น้ำกลั่น		

**วิธีทำ**

ละลาย Sodium chloride ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เทสารละลายที่ได้ลงในขวดดูแรน แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

**ข.2.3 สารละลาย 0.6 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$** 

98% Sulfuric acid	32.64	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

**วิธีทำ**

ค่อยๆผสม Sulfuric acid ลงในน้ำกลั่น (เตรียมในตู้ดูดควัน) แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

**ข.2.4 สารละลาย 10 M NaOH**

Sodium Hydroxide	399.97	กรัม
น้ำกลั่น		

**วิธีทำ**

ละลาย Sodium Hydroxide ด้วยน้ำกลั่นที่ละน้อยจนครบ 399.97 กรัม (เตรียมในตู้ดูดควัน) ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดพลาสติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ข.2.5 สารละลาย 5% Phenol**

Phenol	5	กรัม
น้ำกลั่น		

**วิธีทำ**

ละลาย Phenol ในน้ำกลั่น (เตรียมในตู้ดูดควัน) แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

**ข.2.6 สารละลาย 2 M Sodium acetate trihydrate**

Sodium acetate trihydrate	27.22	กรัม
น้ำกลั่น		

**วิธีทำ**

ละลาย Sodium acetate trihydrate ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

**ข.2.7 สารละลาย 4.05 M Sodium acetate trihydrate**

Sodium formate	55.11	กรัม
น้ำกลั่น		

**วิธีทำ**

ละลาย Sodium acetate trihydrate ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

**ข.2.8 สารละลาย 2 M Sodium formate**

Sodium formate	13.6	กรัม
น้ำกลั่น		

**วิธีทำ**

ละลาย Sodium formate ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

**ข.2.9 สารละลาย 5.1 M Sodium formate**

Sodium formate	34.69	กรัม
น้ำกลั่น		

**วิธีทำ**

ละลาย Sodium formate ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

**ข.2.10 สารละลาย 3.75 M Levulinic acid**

Levulinic acid	76.79	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**วิธีทำ**

ผสม Levulinic acid ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

**ข.2.11 สารละลาย 1 M Furfural**

Furfural	4.14	มิลลิลิตร
99.5% Ethanol	45.86	มิลลิลิตร

**วิธีทำ**

ละลาย Furfural ใน Ethanol และผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

**ข.2.12 สารละลาย 1.06 M 5-HMF**

5-HMF	4.02	มิลลิลิตร
99.5% Ethanol	35.63	มิลลิลิตร

**วิธีทำ**

ละลาย 5-HMF ใน Ethanol และผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา



## ภาคผนวก ค วิธีการวิเคราะห์

### ค.1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ

#### อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

#### สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- สารละลาย 0.8% NaCl

#### วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างน้ำหมักมาเจือจางด้วยสารละลาย NaCl ให้มีค่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.2 - 0.8

### ค.2 วิธีวิเคราะห์น้ำหนักรีดแห้ง

#### อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
- ตู้อบลมร้อน
- โถดูดความชื้น

#### สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- น้ำกลั่น

#### วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน 2 หลอด
2. ตูตตัวอย่างน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
3. นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเหวี่ยงแยกอีกครั้ง
5. รินส่วนใสทิ้งนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ และนำไปชั่งน้ำหนัก
7. คำนวณหาน้ำหนักแห้ง ดังสมการ

$$\text{น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดและเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอด (กรัม)} \times 1000}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

### ค.3 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยใช้สีย้อม Methylene violet

#### อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
- Hemocytometer

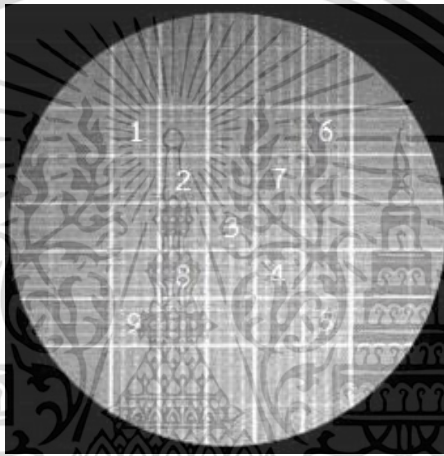
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- สีย้อม Methylene violet
- สารละลาย 0.8% NaCl

### วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างสารละลายเซลล์มาเจือจางสารละลายเซลล์โดยใช้สารละลาย NaCl จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
2. นำสารละลายเซลล์ที่เจือจางแล้วมาย้อมสีโดยการใส่สีย้อม Methylene violet โดยใช้สารละลายเซลล์ และสีย้อมในอัตราส่วน 1:1
3. นำสารละลายเซลล์ที่ย้อมสีแล้วมานับเซลล์โดยใช้ Hemocytometer โดยนับปริมาณเซลล์ 9 ช่องตามแนวทแยงดังภาพที่แสดง โดยให้ในแต่ละช่องมีปริมาณเซลล์ 10-30 เซลล์ โดยเซลล์เป็นจะไม่ติดสีย้อม และเซลล์ตายจะติดสีม่วง



4. นำปริมาณเซลล์ที่ได้มาคำนวณด้วยสูตร  $\left( \frac{\text{ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{4 \times 10^{-6}} \right)$  จะได้ปริมาณเซลล์ในหน่วย เซลล์ต่อมิลลิลิตร

### ค.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก

#### อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- คิวเวต

### สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- สารละลาย 5% Phenol
- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (98% Sulfuric acid)
- น้ำกลั่น

### วิธีวิเคราะห์

1. เติมสารละลาย Phenol 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ทำ blank โดยใช้ น้ำกลั่น แทนตัวอย่าง)
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 10 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

#### กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายน้ำตาลกลูโคส 0.04 กรัมในน้ำกลั่น ปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ค-4 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐาน และค่า OD<sub>490</sub> ของกลูโคสที่มีความเข้มข้นต่างๆ

หลอด ที่	การเจือจาง		ความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครกรัม / มล.)	OD <sub>490</sub>
	สารมาตรฐาน (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)		
1	0	10	0	0
2	0.25	9.75	10	0.103
3	0.5	9.5	20	0.200
4	1	9	40	0.412
5	1.5	8.5	60	0.612
6	2	8	80	0.825

#### ค.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์โดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- คอลัมน์ Supelcogel H ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร
- เครื่องตรวจวัดชนิด refractive index

#### สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 0.1% Phosphoric acid
- 99.5% Ethanol
- Isopropanol

#### วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางแล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร
2. ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ชุดด้วยสารละลาย Phosphoric acid ซึ่งเป็นสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.17 มิลลิลิตรต่อนาที
3. คำนวณความเข้มข้นของเอทานอลในสารละลายตัวอย่างจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### กราฟมาตรฐานเอทานอล

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้น 0 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้ Isopropanol
3. ผสมสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐาน ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะเดียวกัน นำโครมาโตแกรมที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

**ตารางที่ ค-5** ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ (retention time = 26.525 นาที)
1	0	0
2	5	0.144
3	10	0.293
4	15	0.450
5	20	0.592
6	25	0.733

### ค.6 วิธีวิเคราะห์องค์ประกอบ และปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

#### อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- คอลัมน์ Supelcogel H 59346 ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร
- เครื่องตรวจวัดชนิด refractive index

#### สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 0.1% Phosphoric acid
- Glucose
- Xylose
- Arabinose
- Isopropanol

#### วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางแล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร
2. ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ใช้น้ำยาละลาย Phosphoric acid ซึ่งเป็นสารละลายเคลื่อนที่ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.17 มิลลิลิตรต่อนาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. คำนวณความเข้มข้นของกรดแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่างจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

#### กราฟมาตรฐานสารยับยั้งประเภทกรด

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ไฮโลส และอะราบิโนสความเข้มข้น 0 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้ Isopropanol
3. ผสมสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐาน ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะเดียวกัน นำโครมาโตแกรมที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ค-6 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐานน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ความเข้มข้นของสาร ยับยั้ง (กรัม/ลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ		
		กลูโคส (retention time = 11.7 นาที)	ไฮโลส (retention time = 12.6 นาที)	อะราบิโนส (retention time = 13.8 นาที)
1	0	0	0	0
2	5	0.444	0.500	0.456
3	10	0.903	1.007	0.920
4	15	1.345	1.493	1.371
5	20	1.774	1.964	1.804
6	25	2.259	2.518	2.299

#### ค.7 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

##### ค.7.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งประเภทกรด

###### อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- คอลัมน์ Supelcogel H 59346 ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร
- เครื่องตรวจวัดชนิด refractive index

###### สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 0.1% Phosphoric acid
- Acetic acid
- Formic acid
- Levulinic acid
- Isopropanol

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางแล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

2. ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ชาติด้วยสารละลาย Phosphoric acid ซึ่งเป็นสารละลายเคลื่อนที่ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.17 มิลลิลิตรต่อนาที

3. คำนวณความเข้มข้นของกรดแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่างจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

### กราฟมาตรฐานสารยับยั้งประเภทกรด

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก ความเข้มข้น 0 5 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้ Isopropanol

3. ผสมสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐาน ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะเดียวกัน นำโครมาโตแกรมที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ค-7.1 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐานสารยับยั้งประเภทกรดที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ความเข้มข้นของสารยับยั้ง (กรัม/ลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ		
		กรดอะซิติก (retention time = 20.941 นาที)	กรดฟอร์มิก (retention time = 19.536 นาที)	กรดลิวลินิก (retention time = 23.858 นาที)
1	0	0	0	0
2	5	0.226	0.203	0.379
3	10	0.448	0.407	0.769
4	15	0.698	0.617	1.171
5	20	0.923	0.811	1.548
6	25	1.150	1.003	1.928

## ค.7.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งประเภทฟูแรน

### อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- คอลัมน์ ZORBAX RRHT SB-C18 ขนาด 50×3 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร
- เครื่องตรวจวัดชนิด diode-array

### สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 0.1% formic acid
- 0.1 % acetonitrile

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Furfural
- 5-HMF

### วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางแล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

2. ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการไหลของสารละลายกรดฟอร์มิก (Formic acid) และสารละลาย Acetonitrile ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิเมตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร

3. คำนวณความเข้มข้นของเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิวเฟอพิวรัลในสารละลายตัวอย่างจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

### กราฟมาตรฐานสารยับยั้งประเภทฟูแรน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิวเฟอพิวรัลให้มีความเข้มข้นอย่างละ 0 0.2 0.4 0.6 0.8 และ 1 กรัมต่อลิตร

2. ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะเดียวกัน นำโครมาโตแกรมที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ค-7.2 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานสารยับยั้งประเภทฟูแรนที่ความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้นของสาร ยับยั้ง (กรัม/ลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟที่	
	เฟอพิวรัล (retention time = 12.189 นาที)	5-ไฮดรอกซีเมทิวเฟอพิวรัล (retention time = 8.783 นาที)
1	0	0
2	0.062	0.138
3	0.120	0.280
4	0.179	0.421
5	0.244	0.556
6	0.304	0.696

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



## ประวัติผู้เขียน

## หัวหน้าโครงการวิจัย

## 1. ตำแหน่งทางวิชาการ-ชื่อ -นามสกุล

(ภาษาไทย) ผศ.ดร. สร้อยสุตา พรภักดีวัฒนา

(ภาษาอังกฤษ) Asst. Prof. Dr. Soisuda Pornpukdeewattana

2. หมายเลขบัตรประชาชน 31005031102413. รับราชการ/พนักงานมหาวิทยาลัย เมื่อ 1 เมษายน 2547

## 4. สถานที่ติดต่อ

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) 02-329-8526-7 ต่อ 7276 (ที่บ้าน) -

โทรศัพท์มือถือ -

E-mail address

focus0107@yahoo.com

## 5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา/ประกาศนียบัตร	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
May 1999	Bachelor Degree	Bachelor of Science (B.S.)	Biotechnology	Kasetsart University	Bangkok, Thailand
May 2003	Master Degree	Master of Science (M.S.)	Biotechnology	Kasetsart University	Bangkok, Thailand
March 2012	Doctoral Degree	Doctor of Philosophy (Ph.D.)	Food Science	University of Nottingham	United Kingdom

## 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

- Fermentation Technology

- Optimization of bioethanol production from agricultural wastes in Thailand

- Stresses occurring during bioethanol production Wine and Rice Wine

Production

## 7. รางวัลด้านวิชาการ/ด้านวิจัย/งานสร้างสรรค์ (ด้านศิลปะ หรืออื่นๆ) ที่ได้รับ

รางวัล ครูผู้สอนดีเด่น โครงการวันครู ประจำปีงบประมาณ 2560 จัดโดยคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

## 8. ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

(ระบุชื่อเรื่องและแหล่งทุน/ย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

8.1 การพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียม

เอกสารนี้ด้วยกรดเจือจางโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ทุนวิจัยเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี 2555-2556 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย 1 ปี (หัวหน้าโครงการ) นำไปใช้

8.2 การพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวไร่และการใช้ประโยชน์ ได้รับทุนจากกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังประจำปี 2556 เป็นระยะเวลา 3 ปี (ผู้ร่วมโครงการ)

8.3 การเพิ่มประสิทธิภาพการทนความร้อนของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ด้วยประจุแคลเซียม ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2557 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย 1 ปี (ผู้ร่วมโครงการ)

8.4 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยไซโตเดียมคลอไรด์ ทุนวิจัยเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี 2556-2557 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย 1 ปี (หัวหน้าโครงการ)

8.5 ผลของประจุสังกะสีต่อการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลความเข้มข้นสูงด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ทุนกระทรวงวิทยาศาสตร์ ปี 2557 (หัวหน้าโครงการ)

8.6 การปรับสภาพเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลชีวภาพ ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2559 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย 1 ปี (หัวหน้าโครงการ)

9. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ หรือการยื่นจดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร หรือการนำไปใช้ประโยชน์ต่อชุมชน/สังคม (กรณีงานวิจัยเพื่อตอบปัญหาและพัฒนาชุมชน/สังคม) (ย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

Palakawong Na Ayutthaya, P., Charoenrat, T., Krusong, W., and Pornpukdeewattana, S. 2019. Repeated cultures of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava processing waste hydrolysis for bioethanol production. 3 Biotech, 9: 1-13.

Pornpukdeewattana, S., Jindaprasert A., and Salvatore M. 2019. *Alicyclobacillus* spoilage and control - A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, doi: 10.1080/10408398.2018.1516190.

Pornpukdeewattana, S., Kerdpi boon S., Jindaprasert A., Pandee P., Teerarak M., and Krusong W. 2017. Upland rice vinegar vapor inhibits spore germination, hyphal growth and aflatoxin formation in *Aspergillus flavus* on maize grains. Food Control, 71: 88-93.

Krusong, W., Pornpukdeewatana, S., and Teerarak, M. 2016. Susceptibility of *Klebsiella pneumoniae* on coriander leaves to liquid- and vapor-phase ethanol. FEMS Microbiology Letters, 363 (9). DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/femsle/fnw072>.

Krusong, W., Kerdpi boon, S., Pornpukdeewatana, S., and Jindaprasert, A. 2016. Luffa sponge offsets the negative effects of aeration on bacterial cellulose production. Journal of Applied Microbiology, 121(6): 1665-1672. DOI: 10.1111/jam.13290.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Krusong, W., Yaiyen, S., and **Pornpukdeewatana, S.** 2015. Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*, 118(3): 629-640.

Krusong, W., Kerdpi boon, S., Jindaprasert, A., Yaiyen, S., **Pornpukdeewatana, S.** and Tantratian, S. 2015. Influence of calcium chloride in the high temperature acetification by strain *Acetobacter aceti* WK for vinegar. *Journal of Applied Microbiology*, 119(5):1291-300.

**Pornpukdeewattana, S.**, Yaiyen, .S., and Charoenrat T. 2015. Improvement of ethanol production performance of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 inducing by sodium chloride. The 6<sup>th</sup> International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FERVAAP 2015), 29<sup>th</sup>-31<sup>st</sup> July 2015, Centara Hotel & Convention Center, Khon Kaen, Thailand. (Poster Presentation)

Krusong, W., Yaiyen, S., and **Pornpukdeewattana, S.** 2015. Impact of high initial concentrations of acetic acid and ethanol on acetification rate in an internal Venturi injector bioreactor. *Journal of Applied Microbiology*, 118 (3): 629-640.

#### งานประชุมวิชาการ

Rattanamanoch, P., Charoenrat, T., and Pornpukdeewattana, S. (2017) Optimization of zinc supplementation on ethanol tolerance and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* SC90. The 19th Food Innovation Asia Conference 2017 (FIAC 2017), Food Research and Innovation for Sustainable Global Prosperity, 15-17 June 2017. Bangkok, Thailand.

Pornpukdeewattana, S., Yaiyen, .S., and Charoenrat T. 2015. Improvement of ethanol production performance of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 inducing by sodium chloride. The 6<sup>th</sup> International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FERVAAP 2015), 29<sup>th</sup>-31<sup>st</sup> July 2015, Centara Hotel & Convention Center, Khon Kaen, Thailand. (Poster Presentation)

#### อนุสิทธิบัตร :

รองศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สร้อยสุตา พรภักดี วัฒนา. กรรมวิธีลดความเปรี้ยวของน้ำผลไม้กล้วยด้วยการกรองแยกกากร่วมกับการปรับค่าพีเอชด้วยสารออกฤทธิ์ต่างชนิดปูนแดงหรือน้ำปูนใส (เลขที่คำขอ : 1803000616)

#### ผู้ร่วมโครงการ

##### 1. ตำแหน่งทางวิชาการ-ชื่อ -นามสกุล

(ภาษาไทย) รศ.ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์

(ภาษาอังกฤษ) Assoc. Prof. Dr. Theppanya Charoenrat

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ของภาควิชาวิศวกรรมเครื่องกล คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. หมายเลขบัตรประชาชน 3 2004 000XX XXX

3. รัับราชการ/พนักงานมหาวิทยาลัย เมื่อ 25 เมษายน 2549

4. สถานที่ติดต่อ

ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

โทรศัพท์ (ที่ทำงาน) (662) 564 444-59 ต่อ 2812 (ที่บ้าน) -

โทรศัพท์มือถือ (66) 83 114 4447

E-mail address thep@tu.ac.th และ

thepcharoen4@gmail.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา/ประกาศนียบัตร	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
April 1999	Bachelor Degree	Bachelor of Science (B.S.)	Biotechnology	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)	Bangkok, Thailand
February 2002	Master Degree	Master of Science (M.S.)	Biotechnology	Kasetsart University (KU)	Bangkok, Thailand
September 2005	Licentiate degree	Licentiate of Engineering (Lic. Eng.)	Biotechnology	Royal Institute of Technology (KTH)	Stockholm, Sweden
April 2006	Doctoral Degree	Doctor of Philosophy (Ph.D.)	Biotechnology	Suranaree University of Technology	Nakhon Ratchasima, Thailand

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

- Bioprocess/Biochemical Engineering
- Fermentation Technology
- Recombinant Protein Production Technology

7. งานวิจัยที่ได้รับทุนสนับสนุนทั้งจากภายในและภายนอกมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ระบุชื่อเรื่องและแหล่งทุน/ย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

[1] ผู้ร่วมโครงการ การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายเซลลูโลสจากยีสต์ *Pichia pastoris* KM71 (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี 6 เดือน) แหล่งทุน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปี 2554-2556 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2556)

[2] ผู้ร่วมโครงการ การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจาง และมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททั่วไป / เงินรายได้ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปี 2555 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2556)

[3] ผู้ร่วมโครงการ การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยไซโตเคมคลอไรด์ (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน ทุนอุดหนุนการวิจัย ประเภททั่วไป / เงินรายได้ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปี 2556 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2557)

[4] ผู้ร่วมโครงการ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการเปลี่ยนแปลงสารเมตาบอไลต์ของยีสต์ทนร้อน *Pichia thermomethanolica* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในถังหมัก (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ปี 2556 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2558)

[5] หัวหน้าโครงการ การผลิตและเก็บเกี่ยวซี-ไฟโคไซยานินจากไซยาโนแบคทีเรีย *Oscillatoria okeni* TISTR 8549 โดยเทคนิคโครสโพลวอแลตราฟิเลตรชัน (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน กองทุนสนับสนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปี 2556 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2560)

[6] ผู้ร่วมโครงการ การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิกจากอาหารหมักของไทย (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) แหล่งทุน กองทุนสนับสนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปี 2556 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2559)

[7] หัวหน้าโครงการ การพัฒนาน้ำเชื่อมจากกล้วยหอมทอง (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) ทุนวิจัยทั่วไป ประเภทกำหนดหัวข้อ แหล่งทุน กองทุนสนับสนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปี 2560 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2561)

[8] ผู้ร่วมโครงการ การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและทางเคมีในระหว่างการสุกของกล้วยหอมทอง (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) ทุนวิจัยทั่วไป ประเภทกำหนดหัวข้อ แหล่งทุน กองทุนสนับสนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปี 2560 (อยู่ระหว่างดำเนินการ)

[9] ผู้ร่วมโครงการ การคัดแยกและสมบัติของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากไซยาโนแบคทีเรีย (ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี) งบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2560 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2561)

[10] หัวหน้าโครงการ โครงการพัฒนากระบวนการเตรียมเชื้อยีสเริ่มต้นและกระบวนการหมักกากน้ำตาลอ้อยที่ความเข้มข้นสูงโดยยีสต์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล (ระยะเวลา 1 ปี 6 เดือน) โครงการสนับสนุนการศึกษา วิจัย พัฒนาเทคโนโลยีพลังงานทดแทน กองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงานทดแทน (สนพ.) ปีงบประมาณ 2560 (อยู่ระหว่างดำเนินการ)

[11] ผู้ร่วมโครงการ การพัฒนาสายพันธุ์รีคอมบิแนนท์ *Hansenula polymorpha* เพื่อผลิตวัคซีนป้องกันมะเร็งปากมดลูก (ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี) ศูนย์ความเป็นเลิศด้านเทคโนโลยีชีวภาพทางการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล ประจำปีงบประมาณ 2560 (1 เม.ย. 2560 – 31 มี.ค. 2563; อยู่ระหว่างดำเนินการ)

**8. ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ หรือการยื่นจดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร หรือการนำไปใช้ประโยชน์ต่อชุมชน/สังคม (กรณีงานวิจัยเพื่อตอบปัญหาและพัฒนาชุมชน/สังคม)**

(ย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

Palakawong Na Ayutthaya, P., Charoenrat, T., Krusong, W., and Pornpukdeewattana, S. 2019. Repeated cultures of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava processing waste hydrolysis for bioethanol production. 3 Biotech, 9: 1-13.

Chittapun, S., Charoenrat, T., Maijui, I., and Antimanon, S. (2017) Development of a simple inclined algal culture system for outdoor cultivation. Science and Technology Asia. 22(3): 1-7.

Charoenrat, T., Antimanon, S., Kocharin, K., Tanapongpipat, S., and Roongsawang, N. (2016) High cell density process for constitutive production of a recombinant phytase in thermotolerant methylotrophic yeast *Ogataea thermomethanolica* using table sugar as carbon source. Appl. Biochem. Biotechnol. 180: 1618-1634. DOI 10.1007/s12010-016-2191-8.

พรกนก คีรีวัลย์ เทพปัญญา เจริญรัตน์ กอบกุล เหล่าเที่ยง และนิติ พานิชเกษม (2559) อิทธิพลของพีเอชต่อความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* NB324 ในการผลิตกรดไขมันคอนจูเกตเต็ดไลโนเลอิก. วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยบูรพา. 21(1): 37-50.

สมพจน์ อันติมานนท์ เทพปัญญา เจริญรัตน์\* กนกกาญจน์ คชรินทร์ สุทธิพา ธนพงษ์พิพัฒน์ และนิรันดร์ รุ่งสว่าง (2559) การเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ไฟเตสของยีสต์ *Ogataea thermomethanolica*. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 24(1): 49-63.

Charoenrat, T., Sangprapai, K., Promdonkoy, P., Kocharin, K., Tanapongpipat, S., and Roongsawang, N. (2015) Enhancement of thermostable  $\square$ -glucosidase production in a slow methanol utilization strain of *Pichia pastoris* by optimization of the specific methanol supply rate. Biotechnol. Bioprocess Eng. 20: 315-323. (DOI 10.1007/s12257-014-0686-0)

Chittapun, S. and Charoenrat, T. (2015) Isolation and growth of  $N_2$ -fixing cyanobacteria from organic agricultural areas in Sanamchaikate, Chachoeng-Sao Province, Thailand. Thammasat Inter. J. Sci. and Technol. 20(2): 27-32.

กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ สมพจน์ อันติมานนท์ เทพปัญญา เจริญรัตน์\* นิรันดร์ รุ่งสว่าง และสุทธิพา ธนพงษ์พิพัฒน์ (2557) พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดยรีคอมบิแนนท์ *Pichia pastoris* ด้วยกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 22(5): 650-663.

สุกัลยา อุทัยดา วิภาวดี แขวงเมฆ สุปัญญา จิตตพันธ์ และเทพปัญญา เจริญรัตน์ (2557) การคัดกรองสารออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากไซยาโนแบคทีเรีย. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 22(2): 147-157.

Charoenrat, T., Khumruangsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S., and Roongsawang, N. (2013) Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic

medium for inoculums and pH control of proteolysis. *J. Biosci. Bioeng.* 116(2): 193-198. (doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.02.020>)

Rattananikom, K., Choengpanya, K., Tongtubtim, N., **Charoenrat, T.**, Withers, S.G., and Kongsaree, P.T. (2013) Mutational analysis in the glycone binding pocket of *Dalbergia cochinchinensis*  $\alpha$ -glucosidase to increase catalytic efficiency towards mannosides. *Carbohydrate Research.* 373: 35-41. (doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2012.10018>)

#### Conference Presentations:

Gosalawit, C., Imsoonthornruksa, S., Charoenrat, T., and Ketudat-Cairns, M. Engineering of docosahexaenoic acid (DHA) metabolic enzymes in *Pichia pastoris*. (Poster presentation), The 5<sup>th</sup> Asia Pacific Protein Association Conference and the 12<sup>th</sup> International Symposium of the Protein Society of Thailand. During 11<sup>th</sup>-14<sup>th</sup> July 2017, The Tide Resort, Bangsaen, Thailand.

Nguyen, D.H., Charoenrat, T., and Youngvises, N. (2016) A green microfluidic system for determination of silver ion using C-phycoerythrin from cyanobacteria as a natural reagent. (Poster presentation), The 2016 Pure and Applied Chemistry International Conference (PACCON 2016), During 9<sup>th</sup> – 11<sup>th</sup> February 2016, BITEC, Bangkok, Thailand.

Nguyen, D.H., Charoenrat, T., and Youngvises, N. (2016) Microfluidic system for determination of copper and silver using C-phycoerythrin extract as a natural reagent. (Oral presentation), International Conference on Advances in Chemical, Biological & Environmental Engineering (ACBEE 2016), During 11<sup>th</sup> – 12<sup>th</sup> May 2016, Singapore.

Nguyen, D.H., Tanomsridachchai, W., Charoenrat, T., and Youngvises, N. (2016) A green microfluidic system for determination of silver ion using C-phycoerythrin from cyanobacteria as a natural reagent. (Oral presentation, Proceeding), The 8<sup>th</sup> Science Research Conference University of Phayao, During 30<sup>th</sup> – 31<sup>st</sup> May 2016, Phayao, Thailand.

Keereewan, P., Panichkasame, N., Sueajai, K., Visessanguan, W., Laoteng, K. and Charoenrat, T. (2015) Selection of lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum* potential in conjugated linoleic acid production from Thai fermented foods. (Oral presentation), The 8<sup>th</sup> Asian Conference on LACTIC ACID BACTERIA, During 8<sup>th</sup>-10<sup>th</sup> July 2015, The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand.

Chittapun, S., **Charoenrat, T.**, and Maijuy, S. (2015) Development of a simple repeated batch algal culture system. (Poster presentation). The 7<sup>th</sup> National Conference on Algae and Plankton. Algae and Plankton : For Good Environments and Sustainable Economy. During March 25<sup>th</sup>-27<sup>th</sup>, 2015 at Narai Hotel, Bangkok, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Suwanmanee, K., Charoenrat, T., and Chittapun, S. (2015) Isolation and cultivation of thermophilic blue green algae from hot springs in Suratthani Province. (Oral presentation, Proceeding). The 7<sup>th</sup> National Conference on Algae and Plankton. Algae and Plankton : For Good Environments and Sustainable Economy. During March 25<sup>th</sup>-27<sup>th</sup>, 2015 at Narai Hotel, Bangkok, Thailand.

#### สิทธิบัตร :

- [1] การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง (เลขที่คำขอ : 071698)
- [2] มาโนชญ์ สุธีรพัฒนานนท์, พนารัตน์ รัตนพานิ, เทพปัญญา เจริญรัตน์ และธีระสุด สุขกำเนิด. กระบวนการเตรียมกรดแล็กติก และ/หรือ เกลืออนุพันธ์ (เลขที่คำขอ : 1501003811)
- [3] มาโนชญ์ สุธีรพัฒนานนท์, พนารัตน์ รัตนพานิ, เทพปัญญา เจริญรัตน์ และธีระสุด สุขกำเนิด. วิธีการผลิตสารผสมเอแนนทีโอเมอร์ของแล็กเทต และ/หรือ เกลือที่มาสสารผสมเอแนนทีโอเมอร์ของแล็กเทต (เลขที่คำขอ : 1501003811)
- [4] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเปัญญา จิตตพันธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์. ขาดังน้ำแบบปรับเอียงได้ (เลขที่สิทธิบัตร : 56817, ออกให้เมื่อ 18 สิงหาคม 2560)

#### อนุสิทธิบัตร :

- [1] นิรันดร์ รุ่งสว่าง, เทพปัญญา เจริญรัตน์, พีรดา พรหมดอนกอย, นกุล รัตนพันธ์, สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์, และลิลี เอื้อวิไลจิตร. กระบวนการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Pichia pastoris* กลุ่มที่มีความสามารถในการใช้เมทานอลข้าง (Mut<sup>+</sup>) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกล้าเชื้อในกระบวนการหมัก (เลขที่อนุสิทธิบัตร : 10192, ออกให้เมื่อ 7 สิงหาคม 2558)
- [2] นิรันดร์ รุ่งสว่าง, เทพปัญญา เจริญรัตน์, พีรดา พรหมดอนกอย, และสุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์. กระบวนการผลิตเอนไซม์ลูกผสมกลุ่มย่อยสลายชีวมวลในระบบถังหมักโดยยีสต์ *Pichia pastoris* กลุ่มที่มีความสามารถในการใช้เมทานอลข้าง (Mut<sup>+</sup>) (เลขที่อนุสิทธิบัตร : 9509, ออกให้เมื่อ 6 กุมภาพันธ์ 2558)
- [3] นิรันดร์ รุ่งสว่าง, เทพปัญญา เจริญรัตน์, กนกกาญจน์ คชรินทร์, และสุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์. กระบวนการผลิตโปรตีนลูกผสมในถังหมักโดยยีสต์ทนร้อน *Ogataea thermomethanolic* ที่ผ่านการดัดแปลงพันธุกรรมด้วยระบบควบคุมแบบการแสดงออกตลอดเวลา (เลขที่คำขอ : 1503001894)
- [4] ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเปัญญา จิตตพันธ์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์. กรรมวิธีการสร้างระบบเพาะเลี้ยงขนาด 18.9 ลิตร (เลขที่อนุสิทธิบัตร : 12916, ออกให้เมื่อ 3 กรกฎาคม 2560)
- [5] รองศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเปัญญา จิตตพันธ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุดาทิพย์ จันทร และ อาจารย์ ดร. ธีรวัฒนา ภาระมาตย์. กรรมวิธีการทำให้น้ำผลไม้กล้วยใส่โดยการตกตะกอนอนุภาคแขวนลอยและสารประกอบชีวโมเลกุลที่ก่อให้เกิดความขุ่นโดยใช้ความร้อน (เลขที่คำขอ : 1803000353)

[6] รองศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์, อาจารย์ ดร.ธีรวัฒนา ภาระมาตย์, นางสาวพรกนก ศิริวัลย์ และ นายสมพจน์ อันติมานนท์ กรรมวิธีเตรียมน้ำเชื่อมกล้วยหอมเข้มข้นให้ยังคงมีกลิ่นรสกล้วยหอมจากน้ำผลไม้กล้วยหอมด้วยการผสมน้ำเชื่อมกล้วยหอมเข้มข้นที่ได้จากวิธีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระเหยแบบสุญญากาศกับน้ำผลไม้กล้วยหอมชนิดใสที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม และผลิตภัณฑ์น้ำเชื่อมกล้วยหอมซึ่งได้จากกรรมวิธีดังกล่าว (เลขที่คำขอ : 1803000613)

[7] รองศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ และ อาจารย์ ดร.สวามินี นวลแขกุล. กรรมวิธีเตรียมน้ำเชื่อมกล้วยหอมเข้มข้นให้ยังคงมีกลิ่นรสกล้วยหอมจากน้ำผลไม้กล้วยหอมด้วยการผสมน้ำเชื่อมกล้วยหอมเข้มข้นที่ได้จากวิธีระเหยแบบสุญญากาศกับน้ำเชื่อมกล้วยหอมที่ได้จากวิธีการแช่แข็ง-ละลายที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม และผลิตภัณฑ์น้ำเชื่อมกล้วยหอมซึ่งได้จากกรรมวิธีดังกล่าว (เลขที่คำขอ : 1803000614)

[8] รองศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ และ นางสาวพรกนก ศิริวัลย์. กรรมวิธีเตรียมน้ำเชื่อมกล้วยหอมเข้มข้นให้ยังคงมีกลิ่นรสกล้วยหอมจากน้ำผลไม้กล้วยหอมด้วยการผสมน้ำเชื่อมกล้วยหอมเข้มข้นที่ได้จากวิธีระเหยแบบสุญญากาศกับน้ำควบแน่นที่มีกลิ่นรสกล้วยหอมซึ่งได้จากการควบแน่นไอน้ำจากการระเหยซึ่งเป็นผลพลอยได้จากวิธีระเหยแบบสุญญากาศที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม และผลิตภัณฑ์น้ำเชื่อมกล้วยหอมซึ่งได้จากกรรมวิธีดังกล่าว (เลขที่คำขอ : 1803000615)

[9] รองศาสตราจารย์ ดร. เทพปัญญา เจริญรัตน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา. กรรมวิธีลดความเปรี้ยวของน้ำผลไม้กล้วยด้วยการกรองแยกกากร่วมกับการปรับค่าพีเอชด้วยสารออกฤทธิ์ต่างชนิดปูนแดงหรือน้ำปูนใส (เลขที่คำขอ : 1803000616)

#### 10. การได้รับรางวัลทางด้านวิชาการ (ย้อนหลังไม่เกิน 5 ปี)

- 2015 Special Award for the Invention: Award from Association of Polish Invention and Rationalizers (The Invention “Easy and Small Biofertilizer Production; Algal Culture System”)
- 2015 Gold Medal: Award from Geneva Inventions Salon International Des Inventions (The Invention “Easy and Small Biofertilizer Production; Algal Culture System”)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้