รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์

นางสาวสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา
คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นายสุรชัย ใหญ่เย็น
คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นายเทพปัญญา เจริญรัตน์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์

นางสาวสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา
คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นายสุรชัย ใหญ่เย็น
คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นายเทพปัญญา เจริญรัตน์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

12695294

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก เงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2557
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการ การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์

แหล่งเงิน งบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร

ประจำปีงบประมาณ 2557 **จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน** 70,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี **ตั้งแต่** 1 ตุลาคม 2556 ถึง 30 กันยายน 2557

หัวหน้าโครงการ นางสาวสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ผู้ร่วมโครงการวิจัย นายสุรชัยใหญ่เย็น คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

นายเทพปัญญา เจริญรัตน์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC 90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ในเบื้องต้นศึกษาผลของเกลือ ต่อการเจริญของยีสต์ของยีสต์ *S. cerevisiae* SC 90 บนอาหารวุ้น YPD ที่มีการผันแปรความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มในสภาวะที่มีอากาศภายใต้อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส โดยความเข้มข้นเกลือที่เพิ่มขึ้น มีผลทำให้ การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง เซลล์ที่บ่มในอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส สามารถเจริญเติบโตได้ดีถึงความเข้มข้นเกลือ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* SC 90 ในอาหาร YPD ที่ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร มีการผันแปรความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์เจริญเติบโตในอาหาร YPD ร่วมกับเกลือที่มีความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งแสดงให้เห็นถึงอัตราการลดลงของน้ำตาลกลูโคสอย่างรวดเร็วกับเปอร์เซ็นต์ที่รอดชีวิตสูงที่ชั่วโมง 48 การศึกษาผลของการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* SC 90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ จึงเลือกกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมในอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของเกลือ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นจะถูกย้ายไปที่ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตรและหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารมาตรฐาน YPD เป็นตัวอย่างควบคุม การผลิตเอทานอลของยีสต์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยเกลือ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในความเข้มข้นของเอทานอลและประสิทธิภาพการหมักเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม อย่างไรก็ตาม การเหนี่ยวนำเชื้อภายใต้สภาวะที่มีเกลือจะให้เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่าตัวอย่างควบคุม อาจกล่าวได้ว่า *S. cerevisiae* SC 90 สามารถหมักเอทานอลได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูงถึงแม้จะใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่ไม่ผ่านการปรับตัวในอาหารที่มีเกลือก็ตาม

คำสำคัญ : การหมักเอทานอล โซเดียมคลอไรด์ *Saccharomyces cerevisiae* SC 90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title: Improvement of ethanol production performance of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 inducing by sodium chloride

Researcher: Soisuda Pornpukdeewattana, Faculty of Agro-Industry, KMITL
Surachai Yaiyen, Faculty of Agro-Industry, KMITL
Theppanya Charoenrat, Faculty of Science and Technology, TU

ABSTRACT

The objective of this study was to improve ethanol production performance of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 using sodium chloride (NaCl). Firstly, the effect of NaCl on cell growth of *S. cerevisiae* SC90 was studied on YPD agar plates containing various concentrations of NaCl concentration (0, 2, 4, 6, 8, and 10% (w/v)). These plates were incubated aerobically under 30, 35, 40 and 45°C. Increasing of NaCl concentrations resulted in a reduction of cell growth. Cells incubated in 30-35°C were able to grow at 6% (w/v) NaCl. Secondly, the effect of NaCl on growth of *S. cerevisiae* SC90 was studied in YPD medium containing 200 g/L D-glucose with various NaCl concentrations (0, 2, 4, 6, 8 and 10%(w/v)) under 30°C. Yeast grown in YPD plus with 6%(w/v) NaCl demonstrated the most rapid rate of reduction in glucose excepting compared to that grown in YPD plus with 2%(w/v) NaCl with high percent viability at 48 hour. Finally, the effect of NaCl on very high gravity (VHG) ethanol fermentation performance of *S. cerevisiae* SC90 was studied. The strain was pre-grown in normal YPD supplemented with 6%(w/v) NaCl. It was then transferred to YPD containing 300 g/L D-glucose and fermented at 30°C. Yeast was pre-grown in normal YPD was used as a control. Ethanol production of yeast induced by NaCl 6%(w/v) showed no significant difference in the amount of ethanol concentration and fermentation efficiency comparing to the control. However, growing under conditions induced by salt seemed to present higher percentage viability than the control at 54 h. It can be said that *S. cerevisiae* SC90 is able to use for very high gravity ethanol production even used the inoculums without NaCl adaptation.

Keywords: Sodium chloride, *Saccharomyces cerevisiae* SC90, Ethanol fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากงบประมาณเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ประจำปีงบประมาณ 2557 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ได้จัดสรรงบประมาณ และสถานที่ในการดำเนินงานวิจัยสำหรับโครงการวิจัยนี้จนสำเร็จลุล่วง

ขอขอบคุณนักศึกษาชั้นปีที่ 4 สาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับการเป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการดำเนินงานวิจัย

คณะผู้วิจัยหวังเป็นอย่างยิ่งว่าผลงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์สำหรับผู้สนใจ หากมีข้อผิดพลาดประการใดในการทำวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยขอน้อมรับเพื่อนำมาปรับปรุงและพัฒนาต่อไป

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา
สุรชัย ใหญ่เย็น
เทพปัญญา เจริญรัตน์
พฤษภาคม 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 วิธีการดำเนินงานวิจัย	2
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 แนวคิด ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรม	5
2.1 **แนวคิด และทฤษฎี**	5
2.2 การทบทวนวรรณกรรม	**5**
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	11
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา	11
3.2 **วิธีดำเนินการวิจัย**	11
บทที่ 4 ผลการวิจัย	13
4.1 ผลการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ด้านความทนต่อโซเดียมคลอไรด์และเอทานอลร่วมกับอุณหภูมิ	13
4.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคส	17
4.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล	25
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	34
5.1 สรุปผลการวิจัย	34
5.2 ข้อเสนอแนะ	35
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย	36
เอกสารอ้างอิง	37
ภาคผนวก	41
แบบรายงานการใช้จ่ายเงินโครงการวิจัย	42
ประวัตินักวิจัย	43

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ค่าพารามิเตอร์ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
4.1	ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0 %(w/v)	13
4.2	ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 2 %(w/v)	13
4.3	ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 4 %(w/v)	14
4.4	ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 6 %(w/v)	15
4.5	ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 8 %(w/v)	15
4.6	ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 10 %(w/v)	16
4.7	การลดลงของน้ำหนักของระบบเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์	17
4.8	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์	18
4.9	การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์	19
4.10	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์	20
4.11	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์	21
4.12	การใช้น้ำตาลทั้งหมดของ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์	22
4.13	การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์	23
4.14	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์	24
4.15	การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักระบบ เมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 6 %(w/v)	26
4.16	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 6 %(w/v)	26
4.17	น้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 6 %(w/v)	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.18	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 6 %(w/v)	28
4.19	จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 6 %(w/v)	29
4.20	การใช้น้ำตาลทั้งหมดของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 6 %(w/v)	30
4.21	เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 และ 6 %(w/v)	31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

เอทานอลสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทางเลือกในภาคการคมนาคมขนส่งเพื่อทดแทนแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิล (น้ำมัน) ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาความไม่มีเสถียรภาพด้านพลังงานของประเทศ ช่วยในการลดการนำเข้าน้ำมัน อีกทั้งช่วยลดปัญหามลภาวะทางอากาศที่เกิดจากภาวะเรือนกระจกจากการใช้เชื้อเพลิงประเภทน้ำมันปิโตรเลียม (Prasad *et al.*, 2007) เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบ 3 ประเภทใหญ่ ๆ คือ (1) วัตถุดิบประเภทแป้ง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ข้าวบาร์เล่ย์ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น (2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย ข้าวฟ่างหวาน กากน้ำตาล บีทรูท เป็นต้น (3) วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากวัสดุการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย และวัชพืช ทั้งนี้ ความแตกต่างของกระบวนการผลิตเอทานอลขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่นำมาใช้ (Demírbaş, 2007; Sánchez and Cardona, 2008) กล่าวคือ การผลิตเอทานอลจากพืชน้ำตาล สามารถนำน้ำคั้นจากวัตถุดิบมาผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ ยีสต์ หรือแบคทีเรีย โดยตรง (Demírbaş, 2007) ส่วนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบจำพวกพืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ จะต้องผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นจึงนำมาหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอทานอล (Gray *et al.*, 2006) สำหรับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบพวกเซลลูโลสนั้นจะมีขั้นตอนมากกว่าวัตถุดิบพวกแป้งหรือน้ำตาล กล่าวคือ ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ อาจต้องเพิ่มขั้นตอนการลดขนาดของวัตถุดิบให้เล็กลงโดยอาศัยกระบวนการทางกล และอาจมีการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อให้เหมาะต่อการนำไปย่อยเพื่อเปลี่ยนสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2006) ที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ เอทานอลที่ผลิตขึ้นจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการกลั่นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นเอทานอลที่สูงขึ้น (Cardona *et al.*, 2010) วัตถุดิบที่นำมาผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมของประเทศไทยคือ กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง เนื่องจากประเทศไทยมีวัตถุดิบดังกล่าวเป็นจำนวนมาก

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเพิ่มผลผลิตเอทานอลให้ได้ความเข้มข้นสูงนั้น จำเป็นต้องผลิตจากสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งส่งผลให้ระบบมีแรงดันออสโมติกสูง จากผลนี้จะส่งผลกระทบต่อการเจริญ และกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์จุลินทรีย์ ในระหว่างกระบวนการผลิตเอทานอลนั้น นอกจากความเครียดอันเกิดจากแรงดันออสโมติกแล้ว ยีสต์ยังเผชิญกับความเครียดอันเกิดจากเอทานอล และอุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้นในระหว่างการหมัก โดยความเครียดอันเกิดจาก 2 ปัจจัยนี้จะส่งผลกระทบร่วมกัน โดยความเป็นพิษของเอทานอลต่อเซลล์จะมีค่าสูงขึ้น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น (Casey *et al.*, 1984) และสุดท้ายมีผลเชิงลบต่อการผลิตเอทานอล (Salmon *et al.*, 1993; Fernandes *et al.*, 1997; Piper 1995; Santos *et al.*, 2008) ในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลความเข้มข้นสูง มีความต้องการยีสต์ที่สามารถทนต่อเอทานอลได้ เพื่อที่จะเลี่ยงปัญหาการหมักหยุดชะงัก ซึ่งหมายถึงกระบวนการหมักยังไม่เสร็จสมบูรณ์ มีการรายงานว่า การเหนี่ยวนำเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติก จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล (Logothetis *et al.*, 2010) โดยอยู่ภายใต้สมมุติฐาน คือ เมื่อเชื้อเผชิญสภาพเครียดอันเกิดจากแรงดันออสโมติกจากภายนอก เชื้อจะมีการสะสมสารอันได้แก่ กลีเซอรอล และทรีฮาโลส ซึ่งมีส่วนเพิ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการรอดชีวิต รวมถึงประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยงานวิจัยนี้ได้เลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดแรงดันออสโมติกดังกล่าว

ผลสำเร็จจากงานวิจัยนี้จะนำไปสู่การยกระดับความสามารถของเชื้อจุลินทรีย์ให้ผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงได้ ซึ่งเทคโนโลยีนี้จะช่วยในการประหยัดน้ำ และพลังงานที่ต้องใช้ในระบบ รวมไปถึงการประหยัดค่าใช้จ่ายในการบำบัดของเสียที่เกิดขึ้น คณะผู้วิจัยมีความเชื่อมั่นเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้สามารถช่วยแก้ปัญหา หรือช่วยเติมเต็มช่องว่างของการวิจัยที่ผ่านมาได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ในด้านความสามารถในการทนต่อแรงดันออสโมติก

1.2.2 ศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคส

1.2.3 ศึกษาการปรับสภาพเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาวิจัยโครงการนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน

<u>ส่วนที่ 1</u> เป็นการศึกษาความสามารถของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ในการทนต่อแรงดันออสโมติกที่เหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้น 0-10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนอาหารแข็ง YPD วิเคราะห์การทดลองจากจำนวนโคโลนี และระยะเวลาที่ใช้ในการเจริญ

<u>ส่วนที่ 2</u> ศึกษาผลของแรงดันออสโมติกที่เหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ ที่ระดับ 0-10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในอาหารเหลว YPD ต่อการเจริญ เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต และประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคส เพื่อเลือกความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ มาสร้างสภาวะเครียดเพื่อเหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการสะสมสารที่จำเป็นต่อการรอดชีวิต

<u>ส่วนที่ 3</u> ศึกษาการเลี้ยงเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง

การทดลองจะดำเนินการในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนเท่ากับ 120 รอบต่อนาที โดยปราศจากการให้อากาศ

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

1.4.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *S. cerevisiae* SC90 เชื้อจุลินทรีย์นี้ส่วนหนึ่งเก็บรักษาบนอาหารวุ้นเอียง YPD ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการต่อเชื้อใหม่ทุก 1 เดือน เชื้อจุลินทรีย์อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในรูปสารแขวนลอยเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4.2 การเตรียมเชื้อยีสต์เริ่มต้น

การเตรียมกล้าเชื้อจากยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่เก็บรักษาบนอาหารวุ้น YPD ทำโดยเขี่ยเชื้อ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YPD ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ก่อนนำไปใช้ทำโดยนำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงแล้วไปผ่านการเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสเก็บไว้ ทำการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์เข้มข้นโดยเติมส่วนใสกลับลงไปให้แก่เชื้อยีสต์ด้วยอัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อส่วนใส 1:1 โดยน้ำหนัก ตรวจนับปริมาณเชื้อและเปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตโดยวิธีของ Smart และคณะ (1999)

1.4.3 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในด้านความทนต่อแรงดันออสโมติก

การศึกษาความสามารถในการทนต่อแรงดันออสโมติกของเชื้อยีสต์ ทำโดยเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ตามข้อ 1.4.2 จากนั้นนำมาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค spot plate บนอาหารวุ้น YPD ที่มีการผันแปรความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ 0, 2, 4, 6, 8, และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิโดยทั่วไปที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ติดตามผลการทดลองโดยการบันทึกภาพทุก 24 ชม. จนกระทั่งไม่มีการเพิ่มจำนวนของโคโลนี ประเมินผลการทดลองจากจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในระดับความเข้มข้นต่างๆ

1.4.4 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ

1.4.4.1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคส

ทำโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ถ่ายเชื้อยีสต์จากข้อ 1.4.2 ลงในอาหาร ดำเนินการหมักจนกระทั่งน้ำตาลคงที่

1.4.4.2 วิเคราะห์ผล

1) การวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2) จำนวนเซลล์ทั้งหมด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ด้วยวิธีของ Smart *et al.* (1999)

3) ความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อยีสต์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นเลือกระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมที่สุดที่ส่งผลให้เชื้อยีสต์ยังคงมีการเจริญและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงเพื่อมาศึกษาต่อในหัวข้อการเหนี่ยวนำเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติกดังที่จะกล่าวในหัวข้อ 1.4.5

1.4.5 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

1.4.5.1 การเหนี่ยวนำเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

ทำโดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ระดับที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 1.4.4.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อออกมาเลี้ยงในอาหาร YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร ศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมคือ การหมักเอทานอลด้วยเชื้อที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์

1.4.5.2 วิเคราะห์ผล

1) จำนวนเซลล์ เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต ด้วยวิธีของ Smart *et al.* (1999)

2) ประสิทธิภาพการหมักจากการใช้น้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

3) การผลิตเอทานอลด้วยเครื่อง GC

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ทราบข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในด้านความทนต่อแรงดันออสโมติกที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์

1.5.2 ได้แนวทางในการพัฒนายีสต์ให้สามารถผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลความเข้มข้นสูง

1.5.3 ได้องค์ความรู้ในด้านการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลความเข้มข้นสูง

1.5.4 สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์เป็นบทปฏิบัติการสำหรับงานการเรียนการสอน

1.5.5 ได้บทความวิจัยอย่างน้อย 1 เรื่อง สำหรับนำเสนอในการประชุมวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ

1.5.6 ผลิตบัณฑิตสาขาเทคโนโลยีการหมัก จำนวน 2 คน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
แนวคิด ทฤษฎีและการทบทวนวรรณกรรม

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

เอทานอล ที่ผลิตโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์หลักที่ใช้ในการผลิตเอทานอล จากความต้องการเอทานอลที่สูงขึ้น ทำให้มีการศึกษาพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลให้ได้ความเข้มข้นสูง เช่น การผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง ในสภาวะการหมักนี้มีข้อดีคือช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นและให้ผลผลิตเอทานอลที่สูง อย่างไรก็ตามความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงเกินไป ส่งผลให้ยีสต์เผชิญกับแรงดันออสโมติกสูงจะซึ่งจะส่งผลกระทบต่อการเจริญ และการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ (Nagodawithana *et al.*, 1976; Panchal and Stewart, 1980) มีรายงานว่า การมีเอทานอลสะสมอยู่ในระบบถือว่าเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Roehr, 2001) ที่ความเข้มข้นเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เกือบหยุดลง (Brown *et al.*, 1981) เนื่องจากเอทานอลมีผลต่อการแบ่งเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป

จากงานวิจัยเรื่องอิทธิพลของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการหมักไวน์ (Logothetis *et al.*, 2010) พบว่าโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ยีสต์ทนต่อความเครียดต่างๆที่ก่อเกิดจากการหมัก โดยเหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการสังเคราะห์และสะสมสารที่สำคัญเช่น กลีเซอรอลและทรีฮาโลส สารเหล่านี้ทำหน้าที่ในการปรับปรุงความสามารถในเซลล์ยีสต์ให้ทนต่อแรงดันออสโมติกและความเป็นพิษในระหว่างกระบวนการหมัก ซึ่งมีส่วนเพิ่มความสามารถในการรอดชีวิต รวมถึงประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของยีสต์

2.2 การทบทวนวรรณกรรม

2.2.1 การผลิตเอทานอลชีวภาพ

เอทานอลสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทางเลือกในภาคการคมนาคมขนส่งเพื่อทดแทนแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิล (น้ำมัน) ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาความไม่เสถียรภาพด้านพลังงานของประเทศ ช่วยในการลดการนำเข้าน้ำมัน อีกทั้งช่วยลดปัญหามลภาวะทางอากาศที่เกิดจากภาวะเรือนกระจกจากการใช้เชื้อเพลิงประเภทน้ำมันปิโตรเลียม

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบ 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ (1) วัตถุดิบประเภทแป้ง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ข้าวบาร์เล่ย์ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น (2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย ข้าวฟ่างหวาน กากน้ำตาล บีทรูท เป็นต้น (3) วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากวัสดุการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย และวัชพืช ทั้งนี้ความแตกต่างของกระบวนการผลิตเอทานอลขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่นำมาใช้ (Demírbaş, 2007; Sánchez and Cardona, 2008) กล่าวคือ การผลิตเอทานอลจากพืชน้ำตาล สามารถนำน้ำคั้นจากวัตถุดิบมาผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ ยีสต์ หรือ แบคทีเรีย โดยตรง (Demírbaş, 2007) ส่วนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบจำพวกพืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ จะต้องผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นจึงนำมาหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอทานอล (Gray *et al.*, 2006) สำหรับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบพวกเซลลูโลสนั้นจะมีขั้นตอนมากกว่าวัตถุดิบพวกแป้งหรือน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กล่าวคือ ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ อาจต้องเพิ่มขั้นตอนการลดขนาดของวัตถุดิบให้เล็กลงโดยอาศัยกระบวนการทางกล และอาจมีการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อให้เหมาะต่อการนำไปย่อยเพื่อเปลี่ยนสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2006) ที่เชื้อจุลินทรีย์ผลิตเอทานอลสามารถนำไปใช้ได้ เอทานอลที่ผลิตขึ้นจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่สูงขึ้น (Cardona *et al.*, 2010)

2.2.2 การผลิตเอทานอลและเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

สิ่งที่คาดหวังในการผลิตเอทานอลชีวภาพ คือ การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลอย่างรวดเร็ว และมีประสิทธิภาพ พารามิเตอร์ที่ใช้ในการติดตามระหว่างการหมัก คือ การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ ความสามารถ ในการใช้น้ำตาล ค่าพีเอช อุณหภูมิ การเกิดโฟม และเอทานอลที่เกิดขึ้น ทั้งนี้ผู้ผลิตต้องมีการควบคุมปัจจัยดังกล่าวให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการทำงานของยีสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อุณหภูมิ และ พีเอช

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเอทานอลนั้นโดยทั่วไปคือ *S. cerevisiae* เนื่องจากมีการรายงานว่าเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอลได้สูง อีกทั้งทนต่อสารยับยั้งที่เกิดในระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบได้ดี (Linden and Hahn-Hägerdal, 1989) และยังทนต่อเอทานอล และอุณภูมิสูงได้ (Kosaric and Vardar-Sukan, 2001) อย่างไรก็ตามเชื้อนี้มีข้อจำกัดคือไม่สามารถใช้น้ำตาลในกลุ่มเพนโทส (C5) เช่น ไซโลส และ อราบิโนส ได้ เนื่องจากขาดเอนไซม์ xylose reductase ซึ่งน้ำตาลในกลุ่มดังกล่าวจะพบมากในวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส นอกจากเชื้อ *S. cerevisiae* แล้ว ยังมียีสต์กลุ่มอื่น เช่น *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces* spp. และแบคทีเรียบางสายพันธุ์ เช่น *Zymomonas mobilis*, *Thermoanaerobacterium* spp. มีศักยภาพในการผลิตเอทานอล (Walker, 2011) อย่างไรก็ตาม *P. stipitis* ซึ่งเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักไซโลสเป็นเอทานอลโดยให้ผลได้ของเอทานอลสูงจะถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลสเบื้องต้น (Picataggio and Zhang, 1996; Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006). Hahn-Hägerdal *et al.* (2006) รายงานว่า ราเส้นสาย (Filamentous fungi) สามารถทนต่อสารยับยั้งแต่มีข้อด้อยคือ ระยะเวลาที่ใช้ในกระบวนการผลิตซึ่งไม่คุ้มทุนในระดับอุตสาหกรรม ดังนั้นงานวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นการสร้างรีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* เพื่อให้สามารถใช้น้ำตาลในกลุ่ม C5 ได้ (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Verstrepen *et al.*, 2006)

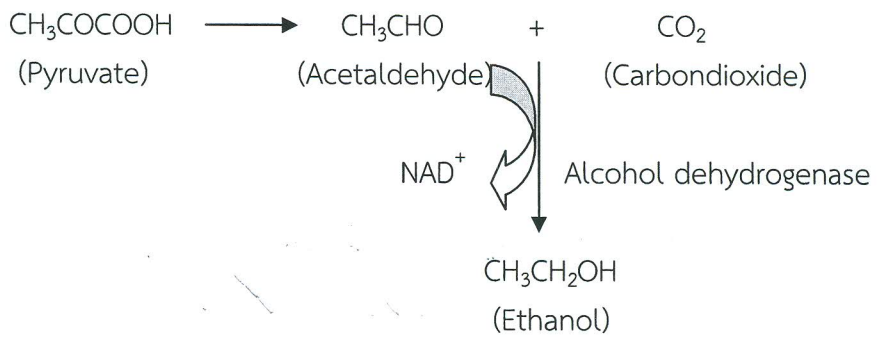
ยีสต์ และแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ มีเอนไซม์ที่จำเป็นในกระบวนการหมัก คือ pyruvate decarboxylase (PDC) โดยเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เปลี่ยน pyruvate โดย decarboxylation ไปเป็น อะซิตัลดีไฮด์ ก่อนที่จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล (Walker, 2011) *Saccharomyces* ผลิตเอทานอลโดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) หรือ วิถีไกลโคไลซิส ซึ่งสามารถสรุปได้ ดังสมการที่ (1) และ (2)

$$\text{Glucose} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} + 2\text{NAD}^+ \longrightarrow 2\ \text{Pyruvate} + 2\ \text{ATP} + 2\ \text{NADH} + 2\ \text{H}^+ \quad (1)$$

$$2\ \text{Pyruvate} + 2\ \text{NADH} + 2\ \text{H}^+ \longrightarrow 2\ \text{NAD}^+ + 2\ \text{EtOH} + 2\text{CO}_2 \quad (2)$$

สารตัวกลางที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา คือ อะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเลคตรอน และก่อให้เกิดกระบวนการ pyruvate decarboxylation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



NAD^+ ถูกสร้างขึ้นใหม่ (regenerate) โดยผ่าน alcohol dehydrogenase ซึ่งต้องการธาตุสังกะสี (Zinc) เพื่อทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ กระบวนการหมักจะรักษาระดับ redox balance โดยการสร้าง NAD ขึ้นใหม่ และทำให้ไกลโคไลซิสดำเนินต่อไปได้ ยีสต์จะได้พลังงาน 2 ATP

ผลได้ทางทฤษฎี (Theoretical yield) ของการผลิตเอทานอลจากกลูโคส แสดงได้ดังนี้ (3)

$$\underset{\text{(Glucose 180 kg)}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{(Ethanol 92 kg)}}{2C_2H_5OH} + \underset{\text{(Carbondioxide 88 kg)}}{2CO_2} \qquad (3)$$

จาก (3) จะเห็นว่ากลูโคส 1 กิโลกรัม จะให้เอทานอลซึ่งเป็นผลผลิตหลัก 0.47 กิโลกรัม คิดเป็นผลได้ 92 เปอร์เซ็นต์ของผลได้ทางทฤษฎี อย่างไรก็ตาม ผลได้เอทานอลสูงสุดในระดับอุตสาหกรรมมีค่าประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ ของผลได้ทางทฤษฎี เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนไปเป็นชีวมวล และสารในเมตาบอไลท์จากกระบวนการหมักอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ เอสเทอร์ แอลดีไฮด์ ฟูเซลออยล์ เป็นต้น (Boulton and Quain, 2006)

2.2.3 คุณสมบัติทางกายภาพของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลชีวภาพ

ยีสต์ที่จะนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล ควรเป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่ปราศจากการปนเปื้อนจากยีสต์ป่า (wild yeast) และแบคทีเรีย หากในระบบการผลิตเอทานอลถูกปนเปื้อนด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. จะทำให้ผลได้เอทานอลต่ำลง ดังนั้นจึงมีการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสามารถในการทำลายเชื้อแบคทีเรีย (bactericidal activity) เพื่อควบคุมการปนเปื้อนในกระบวนการผลิตเอทานอลชีวภาพ (Walker, 2011) การบริหารจัดการยีสต์ในบางโรงงาน มีการนำเชื้อกลับมาใช้ใหม่ (yeast recycle) ซึ่งช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายที่ต้องเสียไปกับการซื้อหัวเชื้อ หรือบางโรงงานอาศัยการเพาะเลี้ยงเซลล์และขยายขนาดเซลล์เองเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักครั้งถัดไป หัวเชื้อที่มีจำหน่ายสำหรับการใช้ในอุตสาหกรรมมี 3 รูปแบบ คือ cream, compress และ dried ยีสต์ (Walker, 2010) ในการผลิตเอทานอลความเข้มข้นสูงนั้น ยีสต์ต้องเผชิญสภาวะเครียดซึ่งจำแนกออกเป็น ทางเคมี (เช่น สารยับยั้งที่เกิดระหว่างการเตรียมวัตถุดิบ การมีสารอาหารในปริมาณไม่เหมาะสม แรงดันออสโมติกจากภายนอก เอทานอลที่สะสมภายในระบบ ค่าพีเอชที่ไม่เหมาะสม) กายภาพ (เช่น แรงเฉือน สภาวะไร้ออกซิเจน และอุณหภูมิสูงเกินกว่า 35 องศาเซลเซียส) และชีวภาพ (เช่น การปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย และการปนเปื้อนจากยีสต์อื่นที่มีคุณสมบัติเป็น killer strain) เหล่านี้ล้วนส่งผลต่อการเจริญและการทำงานของยีสต์ (Walker, 2011) อย่างไรก็ตาม ยีสต์มีการตอบสนองต่อสิ่งดังกล่าวโดยผ่านกระบวนการเหนี่ยวนำการปรับตัวให้ตอบสนองต่อความเครียด (inducing an adaptive response) (Birch and Walker, 2000) นอกจากนี้ เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ทางการค้าได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยเชื้อดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอลได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในช่วง 12-18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อีกทั้งยังสามารถทนในสภาวะที่มี osmolality สูงถึง 25-30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และยังสามารถทนต่อกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียผลิตขึ้น (Minteer, 2006) นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อสภาวะกดดันต่างๆ ในระหว่างกระบวนการผลิต อาทิ แรงดันออสโมติก สภาวะไร้อากาศ ค่าพีเอชต่ำกว่า 3-4 อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส การขาดสารอาหาร และความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่า 15% (v/v) (Walker, 2010)

2.2.4 การผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง

การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลเข้มข้น 150-200 กรัมต่อลิตร (normal gravity) จะได้เอทานอลเข้มข้น 7.5-10.0 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร การหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 270 กรัมต่อลิตร (Very high gravity, VHG) มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มทั้งอัตราการหมัก และการผลิตเอทานอล (Bvochora *et al.*, 2000) ประหยัดการใช้น้ำ (Bai, 2007) ประหยัดพลังงาน และค่าใช้จ่ายในการกลั่น ช่วยลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากเชื้อแบคทีเรีย (Wang *et al.*, 1999) อีกทั้งลดปริมาณของเสียจากการกลั่น (Bai *et al.*, 2008)

2.2.4.1 ผลของแรงดันออสโมติก

จากที่กล่าวข้างต้น การผลิตเอทานอลให้ได้ความเข้มข้นสูงนั้น จำเป็นต้องเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายน้ำตาลเริ่มต้น อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงขึ้น ทำให้แรงดันออสโมติกสูงขึ้นตามไปด้วย ซึ่งส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำจากเซลล์ และเกิดความไม่สมดุลย์ของประจุต่างๆ ภายในเซลล์ (intracellular ion imbalances) ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกิจกรรมหลายๆ อย่างภายในเซลล์ (Pastor *et al.*, 2009) นอกจากนี้ เยื่อหุ้มเซลล์อาจถูกทำลายอันเนื่องมาจากกระบวนการ plasmolysis (Gervais *et al.*, 1992) การผลิตเอทานอลจากสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง ยังส่งผลกระทบต่อการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งทำให้การผลิตเอทานอลต่ำลง (Salmon and Maurico, 1994) มีรายงานที่กล่าวว่า หากความเข้มข้นของสารละลายภายนอกสูงกว่าความเข้มข้นของสารภายในเซลล์ (Hyperosmotic stress) ซึ่งอาจเหนี่ยวนำให้เกิดได้ทั้งจากการเติมน้ำตาล หรือเกลือลงในสารละลาย สภาวะนี้จะส่งผลกระทบเชิงลบต่อการสังเคราะห์เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ซึ่งทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นกลูโคส และ ฟรุกโตส ด้วยผลดังกล่าวจึงทำให้เชื้อมีอัตราการเจริญต่ำลง (Türkel *et al.*, 2006)

2.2.4.2 ผลของเอทานอล

เอทานอลเป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลของยีสต์ภายใต้สภาวะไร้อากาศ อย่างไรก็ตาม เอทานอลจัดเป็นสารพิษที่มีบทบาทมากชนิดหนึ่งต่อเซลล์ยีสต์ (Ingram and Buttke, 1984; Carlsen *et al.*, 1991; Lopes and Sola-Penna, 2001; Schmidt *et al.*, 2006) ความสามารถในการทนต่อเอทานอลของเซลล์นั้นขึ้นอยู่กับช่วงในการเจริญเติบโต เซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญที่คงที่ (stationary phase) นั้น การขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์จะได้รับผลกระทบจากเอทานอล (ความเข้มข้น 12%โดยปริมาตร) น้อยกว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential phase) (Santos *et al.*, 2008) โดยผู้วิจัยกลุ่มดังกล่าวรายงานว่า เซลล์ที่อยู่ในช่วงการเจริญที่คงที่นั้นจะมีการสะสมสารทรีฮาโลส (trehalose) สาร heat shock protein อีกทั้งมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่เจริญภายใต้สภาวะที่มีเอทานอลสูงนั้นจะมีการรอดชีวิตต่ำลง (Pascual *et al.*, 1988) อัตราการเจริญลดลง (Nagodawithana and Steinkraus, 1976) ความสามารถในการนำสารอาหารไปใช้ต่ำลง (Salmon *et al.*, 1993; Piper 1995; Santos *et al.*, 2008) การขับเคลื่อนของสารโปรตรอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ต่ำลง (Petrov and Okorokov, 1990) และมีความสามารถในการหมักลดลง (Fernandes *et al.*, 2012) โดยมีการรายงานว่า เอทานอลจะส่งผลกระทบต่อพลาสม่าเมมเบรนและเอนไซม์ในไซโตพลาสซึม (cytosolic enzymes) (Lopes and Sola-Penna, 2001) นอกจากนี้ เอทานอลความเข้มข้น 12-16 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ก่อให้เกิดการหมักหยุดชะงัก (Tierney *et al.*, 2005)

นอกจากนี้ เอทานอลที่ความเข้มข้นสูงยังทำลายโครงสร้างโปรตีน (protein denaturation) (Ma and Lui, 2010) เอทานอลจัดเป็นตัวยับยั้งแข่งขัน (competitive inhibitor) ต่อเอนไซม์หลายชนิดในวิถีไกลโคไลซีส (glycolysis pathway) เช่น phosphoglycerate kinase; phosphoglycerate mutase; และ pyruvate decarboxylase (Carlsen *et al.*, 1991) ในขณะที่เอทานอลจัดเป็นสารยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non competitive inhibitor) สำหรับระบบการขนส่งน้ำตาลกลูโคส (Salmon *et al.*, 1993; Santos *et al.*, 2008) มีการรายงานว่า เอทานอลความเข้มข้นสูง สามารถลดการใช้น้ำตาลกลูโคส มอลโตส แอมโมเนียม และกรดอะมิโน และเป็นเหตุให้เซลล์เกิดการสูญเสียสารต่างๆ เช่น nucleotides, amino acids, and potassium (Piper 1995) ด้วยเหตุนี้จึงก่อให้เกิดการหมักหยุดชะงัก เนื่องจากการใช้น้ำตาลไม่สมบูรณ์

2.2.4.3 ผลร่วมระหว่างเอทานอลและอุณหภูมิในระหว่างการหมัก

อุณหภูมิที่เหมาะสม และอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อยีสต์ยังคงเจริญได้นั้นมีค่าลดลงเมื่อในสภาวะนั้นมีเอทานอล 3 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สภาวะอุณหภูมิสูง และเอทานอลสูงนั้นส่งผลกระทบรูปแบบเดียวกันต่อเซลล์ยีสต์ กล่าวคือ การลดการเคลื่อนย้ายโปรตรอน (proton motive force) การลดค่าพีเอชภายในเซลล์ การยับยั้งวิถีไกลโคไลซีส ซึ่งทั้งหมดนี้จะนำไปสู่อัตราการหมักที่ต่ำลง (Piper 1995) ในขณะที่ Nagodawithana และ Steinkraus (1976) และ Casey *et al.* (1984) สรุปว่าความเครียดอันเกิดจากความร้อน และเอทานอลนั้นจะส่งผลกระทบร่วมกัน โดยความเป็นพิษของเอทานอลต่อเซลล์จะมีค่าสูงขึ้น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น

2.2.4.4 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

มีการรายงานว่า แรงดันออสโมติก โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ ก่อให้เกิดการพักการเจริญ และให้ผลเชิงลบต่อการรอดชีวิตของเชื้อ โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงขึ้น จะส่งผลยับยั้งการเจริญ และความมีชีวิต (viability) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของเกลือดังกล่าว (Norberg and Blomberg, 1997) อาทิ Oda และ Tonomura (1993) ศึกษาการเลี้ยงยีสต์สำหรับผลิตขนมปัง (Baker yeast) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ พบว่า ความเข้มข้นของเกลือในช่วง 0-3 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญ และมีการรายงานว่า แรงดันออสโมติกในช่วง 0-1 OSM (OSM = Osmolarity = 5.85% โซเดียมคลอไรด์) ส่งผลให้การรอดชีวิตของเชื้อมีค่าลดลง (Morris *et al.*, 1986) อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Logothetis *et al.* (2010) พบว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ก่อนนำไปใช้ในการผลิตไวน์มีประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงได้เกือบสมบูรณ์ อีกทั้งให้ผลได้ของเอทานอลที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วยเกลือดังกล่าว คณะผู้วิจัยให้เหตุผลว่า เชื้อที่ถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์นั้นจะมีการสะสมสาร เช่น กลีเซอรอล และ ทรีฮาโลส ซึ่งมีบทบาทในการเพิ่มความสามารถของยีสต์ให้ทนต่อแรงดันออสโมติก และความเป็นพิษของเอทานอลในระหว่างการผลิตไวน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษา

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *S. cerevisiae* SC90 เชื้อจุลินทรีย์นี้ส่วนหนึ่งเก็บรักษาบนอาหารวุ้นเอียง YPD ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการต่อเชื้อใหม่ทุก 1 เดือน เชื้อจุลินทรีย์อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในรูปสารแขวนลอยเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอล 30% ที่อุณหภูมิ – 20 องศาเซลเซียส

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเตรียมเชื้อยีสต์เริ่มต้น

การเตรียมกล้าเชื้อจากยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่เก็บรักษาบนอาหารวุ้น YPD ทำโดยเขี่ยเชื้อ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YPD ปริมาณ 100 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ก่อนนำไปใช้ทำโดยนำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงแล้วไปผ่านการเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสเก็บไว้ ทำการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์เข้มข้นโดยเติมส่วนใสกลับลงไปให้แก่เชื้อยีสต์ด้วยอัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อส่วนใส 1:1 โดยน้ำหนัก ตรวจนับปริมาณเชื้อและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตโดยวิธีของ Smart และคณะ (1999)

3.2.2 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ

3.2.2.1 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคส

ทำโดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0-10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ถ่ายเชื้อยีสต์จากข้อ 3.2.1 ลงในอาหาร ดำเนินการหมักจนกระทั่งน้ำตาลคงที่

3.2.2.2 วิเคราะห์ผล

1) การวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

2) จำนวนเซลล์ทั้งหมด และเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต ด้วยวิธีของ Smart *et al.* (1999)

3) ความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อยีสต์ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)

จากนั้นเลือกระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมที่สุดที่ส่งผลให้เชื้อยีสต์ยังคงมีการเจริญและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงเพื่อมาศึกษาต่อในหัวข้อการเหนี่ยวนำเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติกดังที่จะกล่าวในหัวข้อ 3.2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

3.2.3.1 การเหนี่ยวนำเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

ทำโดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ระดับที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 3.1.4.1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อออกมาเลี้ยงในอาหาร YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร ศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมคือ การหมักเอทานอลด้วยเชื้อที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์

3.2.3.2 วิเคราะห์ผล

1) จำนวนเซลล์ เปอร์เซ็นต์เซลล์ที่รอดชีวิต ด้วยวิธีของ Smart *et al*. (1999)
2) ประสิทธิภาพการหมักจากการใช้น้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธี DNS (Miller, 1959)
3) การผลิตเอทานอลด้วยเครื่อง GC

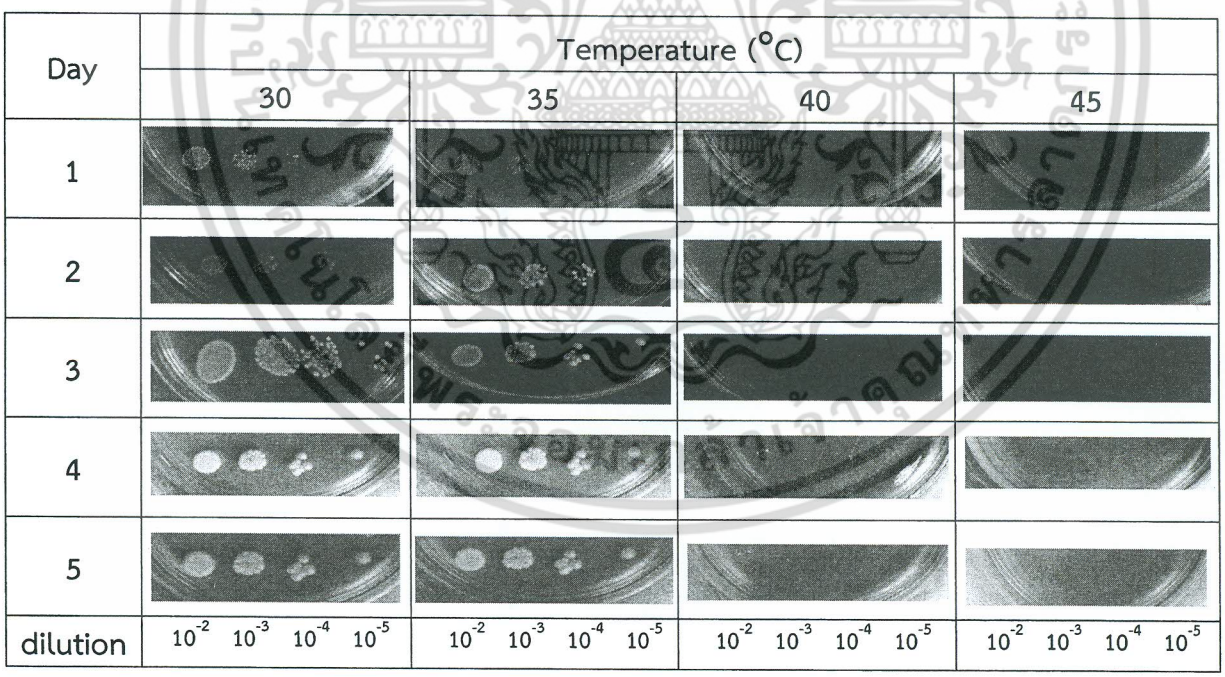
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ด้านความทนต่อโซเดียมคลอไรด์และเอทานอลร่วมกับอุณหภูมิ

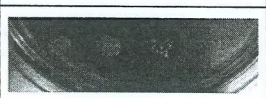
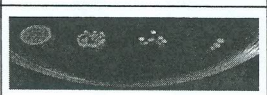
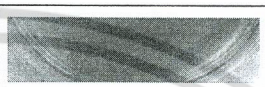
4.1.1 ผลร่วมของโซเดียมคลอไรด์กับอุณหภูมิต่อการเจริญของเซลล์

จากการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 บนอาหารแข็ง YPD ที่มีการผันแปรความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าที่ความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0, 2, 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โคโลนีของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 เริ่มปรากฏในวันที่ 1 จากนั้นการเจริญของยีสต์เริ่มคงที่ ในวันที่ 4 ซึ่งพบที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ยีสต์สามารถเจริญได้ดีในโซเดียมคลอไรด์ 0, 2 และ 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในขณะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อยีสต์เจริญได้น้อยหรือไม่เจริญ แม้จะไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ (ภาพที่ 4.1 – 4.6) นอกจากนี้ยังพบว่า การเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2-6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญเร็วกว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อาจเนื่องมาจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นช่วยเร่งกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ อย่างไรก็ตาม การบ่มที่อุณหภูมิสูงเกินไป (40 และ 45 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้เซลล์มีระยะพักที่นานขึ้น หรือการเติบโตหยุดชะงัก

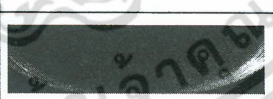
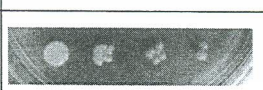


ภาพที่ 4.1 ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (ตัวอย่างควบคุม) โดยใช้ปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^{-2} – 10^{-5} เรียงจากซ้ายไปขวา ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

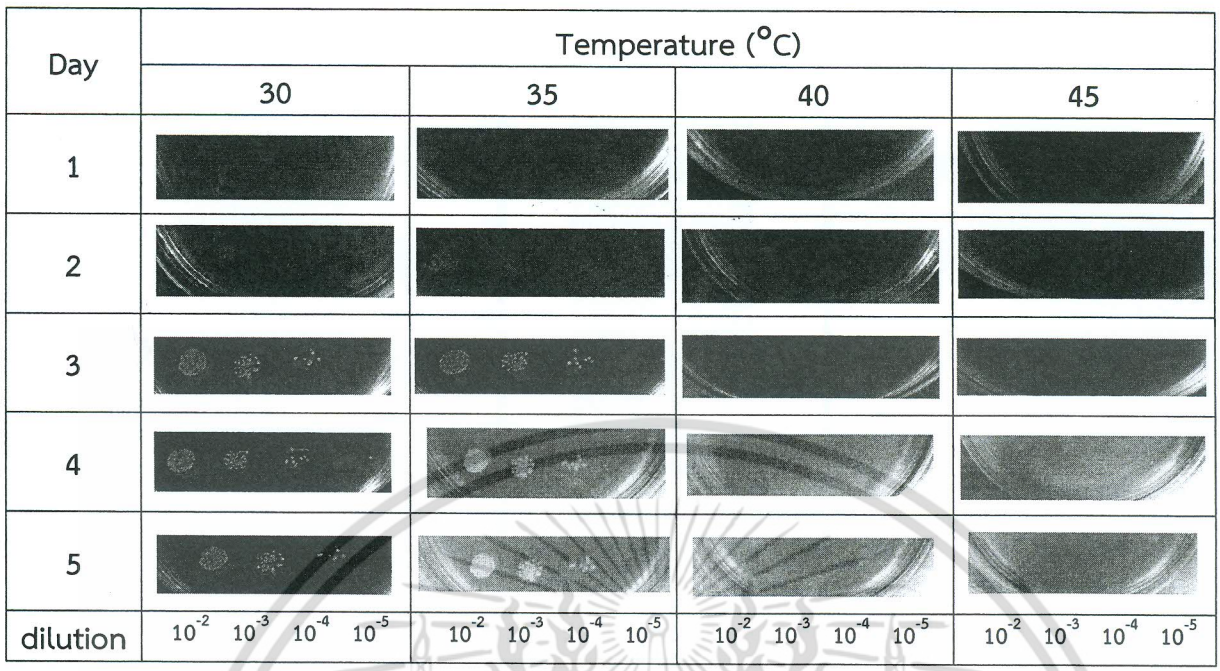
Day	Temperature (°C)			
	30	35	40	45
1				
2				
3				
4				
5				
dilution	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}

ภาพที่ 4.2 ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^{-2} – 10^{-5} เรียงจากซ้ายไปขวา ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

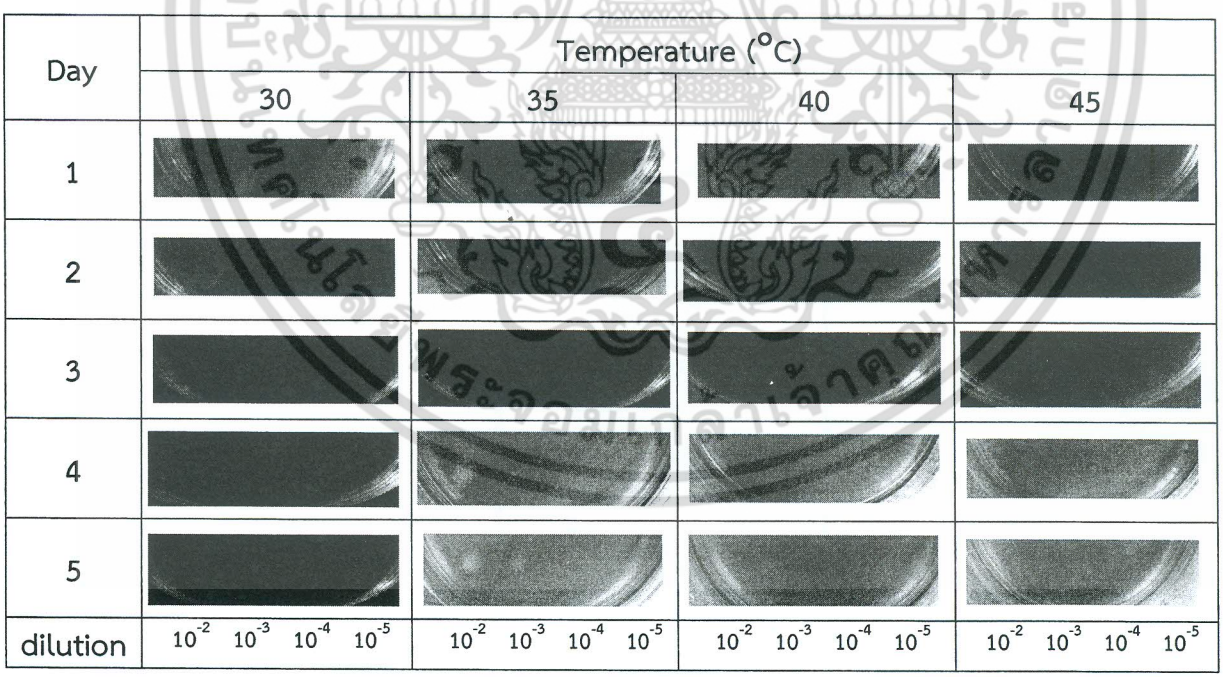
Day	Temperature (°C)			
	30	35	40	45
1				
2				
3				
4				
5				
dilution	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}	10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5}

ภาพที่ 4.3 ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^{-2} – 10^{-5} เรียงจากซ้ายไปขวา ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

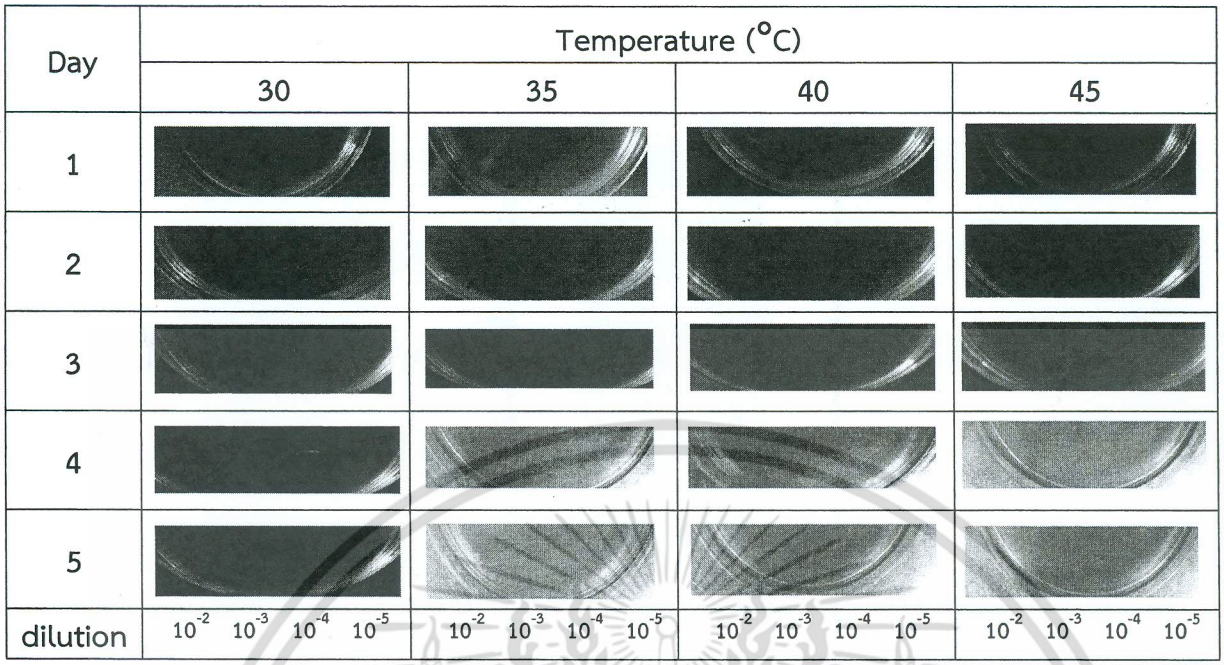


ภาพที่ 4.4 ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^{-2} – 10^{-5} เรียงจากซ้ายไปขวา ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน



ภาพที่ 4.5 ผลการเจริญของ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^{-2} – 10^{-5} เรียงจากซ้ายไปขวา ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ผลการเจริญของเชื้อ *S. ceresivisiae* SC90 บนอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยใช้ปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 10^{-2} – 10^{-5} เรียงจากซ้ายไปขวา ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

มีการรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์อันเนื่องมาจากผลของแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้น และความเป็นพิษต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์จากประจุ (ion toxicity) โซเดียม ทำให้การเจริญของเซลล์ยีสต์ลดลง (Logothetis *et al.*, 2010) ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้สนับสนุนแนวคิดที่ว่าเมื่อยีสต์ *S. cerevisiae* ได้เผชิญกับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับสูงจะส่งผลให้เซลล์ได้รับความเครียดสูงขึ้น (Varela *et al.*, 1992) อย่างไรก็ตาม ยีสต์สามารถทนความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ได้ถึง 2.0 โมลาร์ ยีสต์มีการตอบสนองต่อสภาวะเครียดดังกล่าวโดยการสะสมสารจำพวก osmolytes และ polyols โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กลีเซอรอล กรดอะมิโน และกรดไขมันในผนังเซลล์ (Butinar et al., 2005)

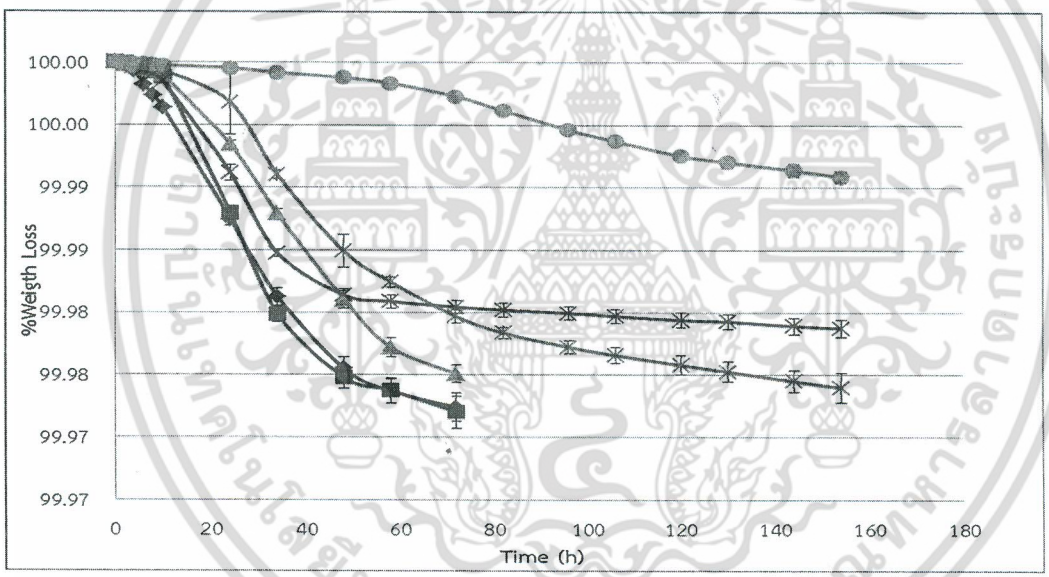
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคส

การศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคส โดยยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหาร YPD ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยมีอัตราการเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดำเนินการหมักจนกระทั่งน้ำตาลคงที่ ติดตามค่า น้ำหนักที่ลดลง การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การเจริญเติบโตของเซลล์ การใช้น้ำตาลกลูโคส และการผลิตเอทานอล

4.2.1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของระบบ

การติดตามน้ำหนักที่ลดลงระหว่างกระบวนการหมักโดยการชั่งน้ำหนักฟลาสก์ โดยน้ำหนักที่หายไปส่วนใหญ่มาเกิดจากการสูญเสียของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังเป็นการติดตามผลของการใช้น้ำตาลและการเกิดเอทานอลอย่างง่ายด้วย ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 การลดลงของน้ำหนักของระบบเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (◆), 2 (■), 4 (▲), 6 (*), 8 (×) และ 10 (●) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการวิเคราะห์น้ำหนักที่ลดลง (weight loss) ของระบบ ดังแสดงในภาพที่ 4.7 เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรมีผลทำให้ระบบมีอัตราการลดลงของน้ำหนักสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 8-10 เปอร์เซ็นต์โดย

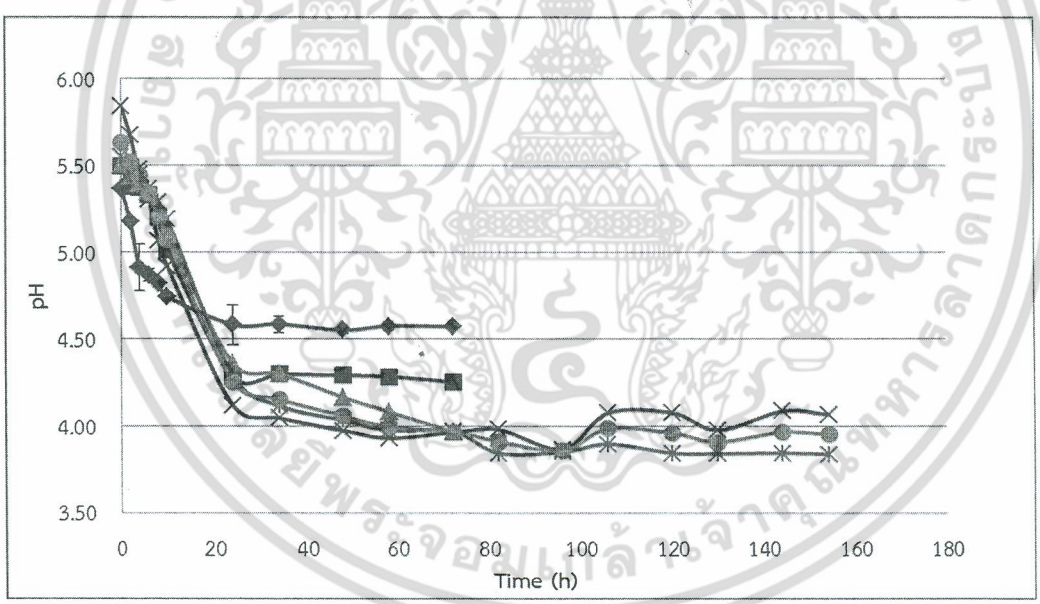
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำหนักต่อปริมาตร โดยพบว่าที่ความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์ 0-8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร น้ำหนักลดลงอย่างช้า ๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 12 จากนั้นอัตราน้ำหนักลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของระบบค่อนข้างคงที่ในชั่วโมงที่ 54

จากภาพ 4.7 จะเห็นว่าอาหาร YPD ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีการลดลงของน้ำหนักมากกว่าอาหาร YPD ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เนื่องจากไม่มีแรงดันออสโมติกหรือมีน้อยจากการเติมโซเดียมคลอไรด์

4.2.2 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช

การทดลองนี้ได้ปรับค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นให้มีค่าเท่ากับ 5.5 เนื่องจาก เป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ (Ingledew, 1993) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในทุกสภาวะการทดลองมีแนวโน้มเดียวกัน คือ ค่อย ๆ ลดลงในช่วงแรก จากนั้นจะคงที่ ค่าพีเอชต่ำสุดเมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ที่เข้มข้น 0-10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 4.56±0.05, 4.26±0.01, 3.97±0.02, 3.96±0.01, 3.97±0.02, 3.97±0.05 ตามลำดับ ดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (◆), 2 (■), 4 (▲), 6 (*), 8 (×) และ 10 (●) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

การลดลงของพีเอชนั้น เนื่องมาจากในระหว่างการผลิตเอทานอลเซลล์ยีสต์สามารถขับโปรตอนและสร้างกรดอินทรีย์เกิดขึ้น ซึ่งมาจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิดเป็นกรดคาร์บอนิก มีผลทำให้ค่าพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลง โดยความเข้มข้นของโปรตอนภายในเซลล์มาก ยีสต์ต้องขับความ

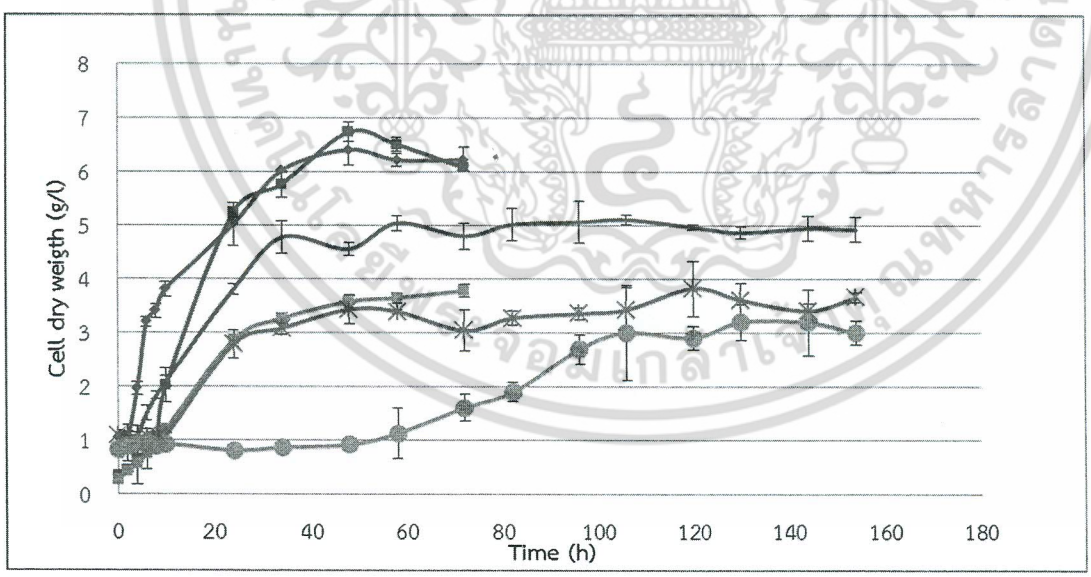
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของโปรตอนซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปยังแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารอินทรีย์ (Liu และ Shen, 2008) มีรายงานกล่าวว่าก๊าซคาร์บอนไดร์ออกไซด์ (CO_2) สามารถเกิดเป็นกรดได้ 3 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณก๊าซที่เกิดขึ้น การที่ยีสต์ขับสารอินทรีย์ออกจากเซลล์ เพื่อการรักษาระดับความเป็นกรดภายในเซลล์ให้อยู่ประมาณ 5.2 (Wales และคณะ, 1980; Cimprich และคณะ, 1995)

4.2.3 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์

4.2.3.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

ภาพที่ 4.9 แสดงการเจริญของยีสต์ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งโดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร YPD มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร และมีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงถึง 5.11±0.095 กรัม ที่ 106 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 4, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากภาพจะสังเกตเห็นว่า ยีสต์ที่เจริญในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นต่าง ๆ น้ำหนักเซลล์แห้งค่อนข้างคงที่ในช่วงแรกซึ่งอาจเกิดจากยีสต์มีการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ที่มีแรงดันออสโมติกสูงขึ้น จึงมีช่วงระยะพักยาว จากนั้นน้ำหนักเซลล์จะค่อย ๆ เพิ่มขึ้น อันเนื่องมาจากยีสต์สามารถปรับตัวได้แล้ว และมีการใช้น้ำตาลในการเจริญทำให้ยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้นเรื่อย ๆ และการเจริญจะคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 72

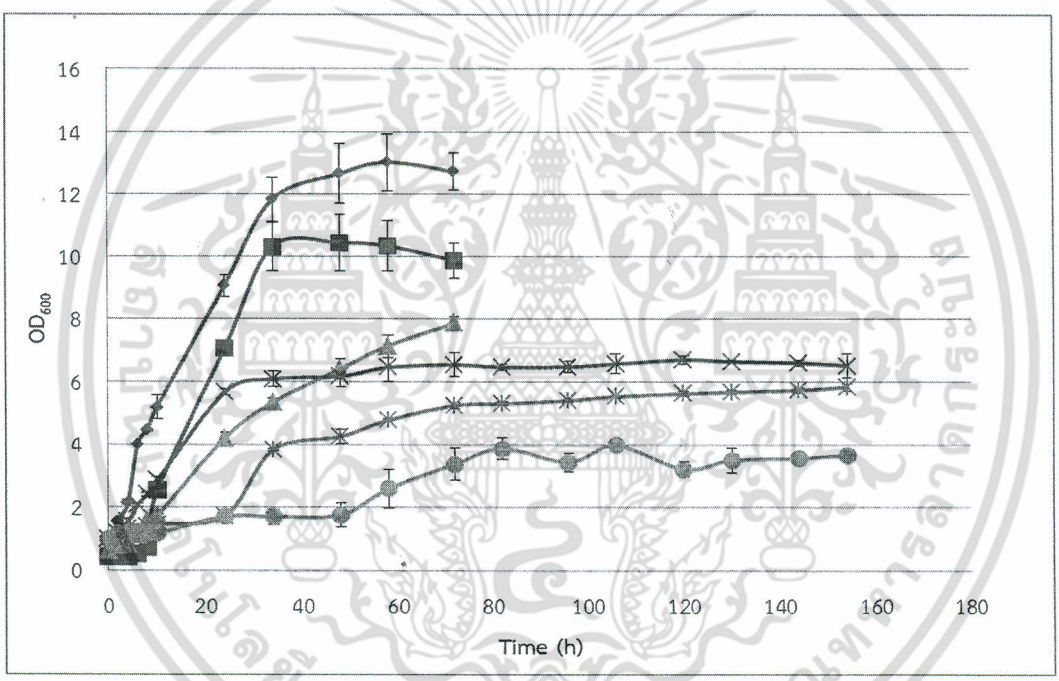


ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (◆), 2 (■), 4 (▲), 6 (*), 8 (X) และ 10 (●) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3.2 ความขุ่น

จากการศึกษาถึงผลของการเจริญของเซลล์ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส วัดค่าการเจริญในรูปค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ จากการทดลองพบว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ ชั่วโมงที่ 72 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 12.73±0.58, 9.86±0.55, 7.86±0.22, 6.53±0.37, 5.24±0.10 และ 3.36±0.51 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4.10 เมื่อพิจารณาที่ความเข้มโซเดียมคลอไรด์ 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่ายีสต์อยู่ในช่วงของระยะพัก (lag phase) นานกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้น 0-6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

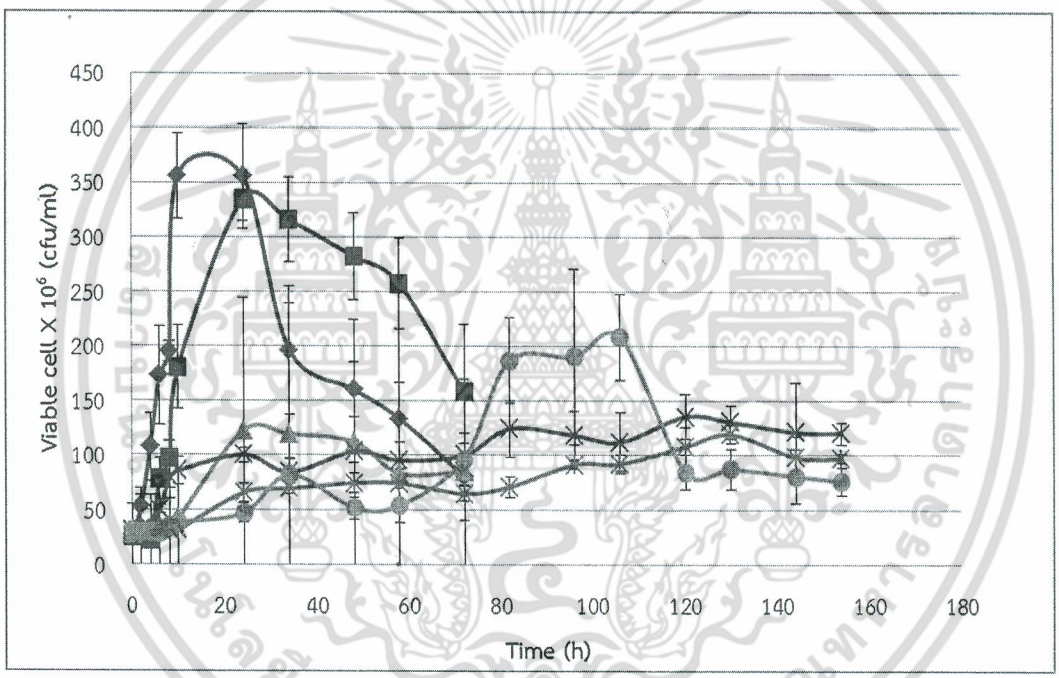


ภาพที่ 4.10 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เมื่อเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (◆), 2 (■), 4 (▲), 6 (*), 8 (×) และ 10 (●) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.3.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

การเตรียมกล้าเชื้อในการทดลองครั้งนี้ใช้ปริมาณเชื้อที่มีชีวิตทั้งหมดเริ่มต้น 3 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการทดลองพบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมที่ชั่วโมงที่ 0 มีค่าเท่ากับ 3.81 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อเวลาผ่านไปถึงชั่วโมงที่ 72 จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเท่ากับ 2.11 x 10^8±5.62 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สำหรับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ ชั่วโมงที่ 72 เท่ากับ 1.58 x 10^8±6.17 x 10^7, 8.52 x 10^7±1.35 x 10^7, 1.00x 10^8±1.08 x 10^7, 6.52 x 10^7±6.52 x 10^6 และ 9.65 x 10^7±2.39 x 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ ชั่วโมงที่ 72 พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตใกล้เคียงกัน ดังภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (◆), 2 (■), 4 (▲), 6 (*), 8 (X) และ 10 (●) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

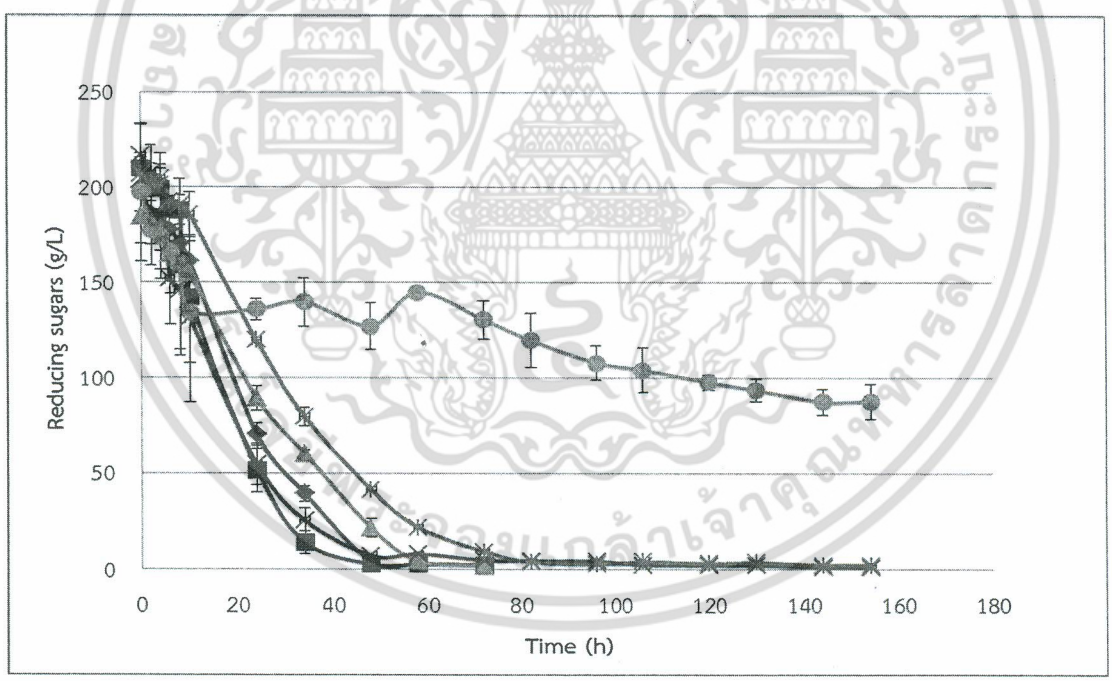
จากการการศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์ สามารถสรุปได้ว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้เชื้อมีระยะพักที่นานขึ้น ทั้งนี้ระยะเวลาในการพักแปรผันตรงกับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง ส่งผลให้เชื้อยีสต์มีการเจริญที่ต่ำลง อาจเนื่องมาจากโซเดียมคลอไรด์ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าว สามารถยับยั้งการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่งการนำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญ (El-Samargy *et al.*, 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 ผลการศึกษาการใช้น้ำตาลกลูโคส

ภาพที่ 4.12 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสของยีสต์ในอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า ณ ชั่วโมงที่ 48 มีน้ำตาลกลูโคสคงเหลือเท่ากับ 3.67±0.36, 2.63±0.16, 21.51±4.66, 7.04±0.58, 41.29±1.42 และ 139.61±12.73 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่ำ (0-6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลได้เร็วกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูง (8-10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของยีสต์เมื่อเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรพบว่าโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ส่งผลให้ยีสต์สามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้เร็วที่สุด ซึ่งน้ำตาลลดลงจนคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 48 มีน้ำตาลเหลืออยู่ 7.04±0.58 กรัมต่อลิตร ในขณะที่โซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ณ ชั่วโมงที่ 48 ยังคงมีน้ำตาลเหลืออยู่ถึง 41.29±1.42 และ 126.92 ± 12.38 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

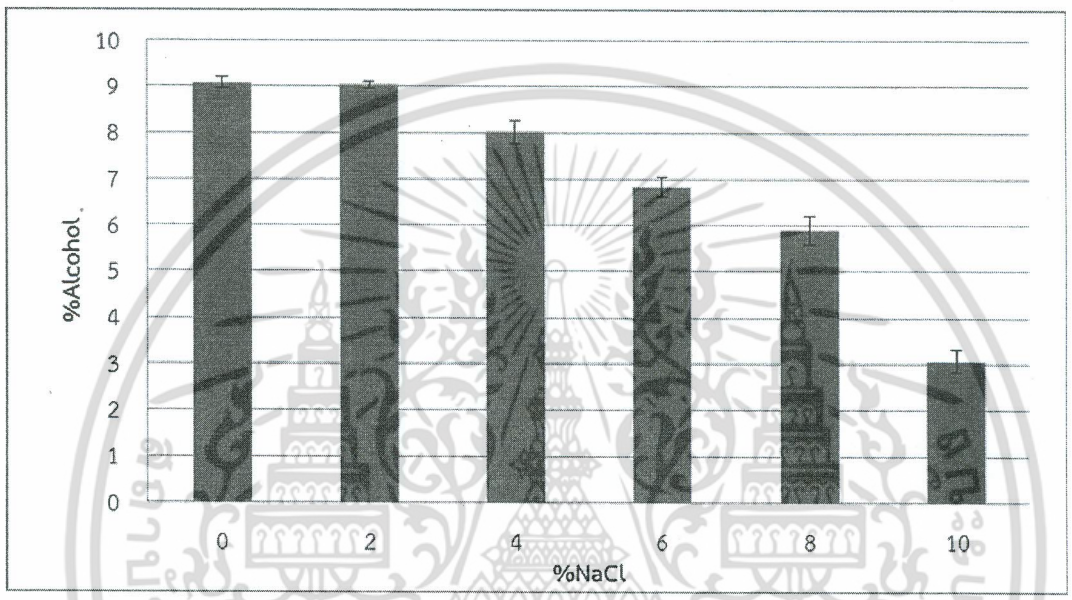


ภาพที่ 4.12 การใช้น้ำตาลทั้งหมดของ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (◆), 2 (■), 4 (▲), 6 (*), 8 (×) และ 10 (●) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.5 ผลการศึกษาการผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยวิธีไดโครเมต โดยวัดจากชั่วโมงที่ 72 พบว่าโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 และ 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลสูงกว่าที่สภาวะอื่น ๆ โดยให้เอทานอล ดังภาพที่ 4.13

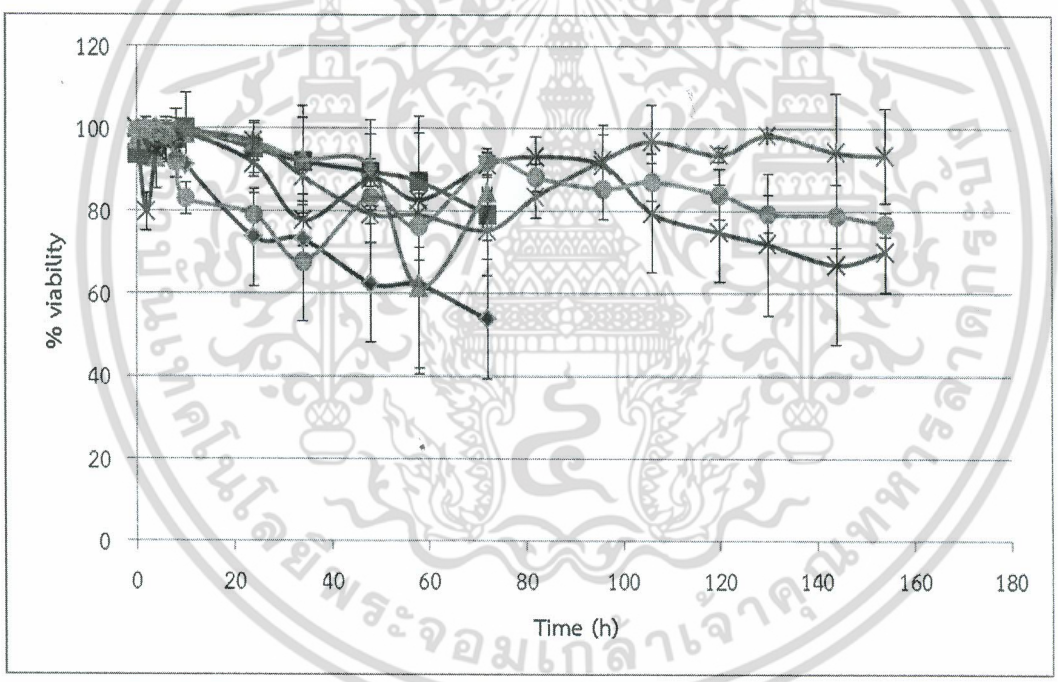


ภาพที่ 4.13 การผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (◆), 2 (■), 4 (▲), 6 (✳), 8 (×) และ 10 (●) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.6 ผลการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์

ภาพที่ 4.14 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ เป็นที่น่าสังเกตว่าการเพิ่มความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้สูงขึ้น ทำให้เชื้อมีเปอร์เซ็นต์รอดชีวิตสูงขึ้นในตอนท้ายของการหมัก โดยภาพรวมเมื่อเวลาในการหมักผ่านไปพบว่าการรอดชีวิตของเชื้อในทุกสภาวะการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การรอดลดลงชีวิตอย่างช้า ๆ เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะอื่น ๆที่ชั่วโมงที่ 72 พบว่า การเติมโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่าการเติมโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร โดยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ 91.25±2.69 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งมีอัตราการใช้น้ำตาลที่รวดเร็ว ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลได้หมดในชั่วโมงที่ 48 (ภาพที่ 4.12) นอกจากนี้เมื่อสิ้นสุดการหมัก พบว่าเซลล์ที่เผชิญกับโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม การทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Logothetis *et al.* (2007) ที่รายงานว่า ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่ายีสต์ที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสารดังกล่าว



ภาพที่ 4.14 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0 (◆), 2 (■), 4 (▲), 6 (*), 8 (×) และ 10 (●) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากการทดลองครั้งนี้ สรุปได้ว่าโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นที่สูงขึ้นส่งผลให้เชื้อมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากเชื้อเผชิญกับสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์เป็นเวลานาน (160 ชั่วโมง) จึงทำให้เชื้อมีการตอบสนองกับสภาวะดังกล่าว โดยการสังเคราะห์และสะสมสารจำพวกทรีฮาโลส และกลีเซอรอล (Logothetis *et al.*, 2007) สารทั้งสองชนิดอาจทำหน้าที่ในการส่งเสริมให้เซลล์มีความสามารถใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การต้านทานต่อแรงดันออสโมติกและความเป็นพิษจากเอทานอลได้สูงขึ้น (Logothetis *et al.*, 2010) มีการรายงานว่า *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีการสะสมสารทรีฮาโลสเพิ่มขึ้นถึง 10 เท่า ภายในเวลามีกี่ชั่วโมง

อย่างไรก็ตามพบว่าในทุกสภาวะการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่ลดลง เนื่องมาจากปริมาณแอลกอฮอล์ และความเครียดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นและสะสมในระบบ ทั้งนี้ มีการรายงานว่า เอทานอลที่ยีสต์ผลิตขึ้นก็เป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากเอทานอลมีผลต่อการแบ่งเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA โปรตีน ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ ยับยั้งการหมักโดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวของไขมัน ยับยั้งการขนถ่ายสารอาหารเข้าสู่เซลล์ เพิ่มความเป็นพิษของออกซิเจน และอาจมีผลต่อเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) และ เฮกโซไคเนส (hexokinase) จึงมีผลทำให้อัตราการรอดชีวิตของยีสต์ลดลง (สาวิตรี, 2540)

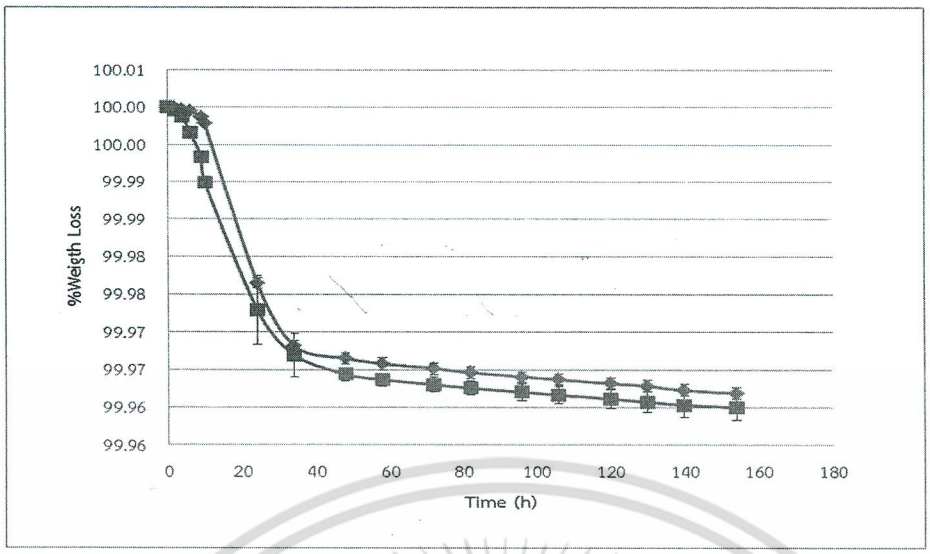
4.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

ในหัวข้อนี้เป็นการศึกษาการเหนี่ยวนำเชื้อยีสต์ภายใต้สภาวะความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล จากการศึกษาในหัวข้อ 4.2 พบว่าปริมาณความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์และการใช้น้ำตาลคือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ดังนั้น จึงได้ทำการนำสภาวะดังกล่าวมาทำการศึกษาเพื่อหาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล โดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อออกมาเลี้ยงในอาหาร YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมคือ การหมักเอทานอลด้วยเชื้อที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ และทำการวิเคราะห์ผลการทดลองดังนี้

4.3.1 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของระบบ

การเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักของระบบแสดงในรูปการสูญเสียก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สรุปได้ว่า การหมักเอทานอลที่มีน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อผ่านการเหนี่ยวนำด้วยการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในระหว่างการเลี้ยงกล้าเชื้อ พบว่าการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ ทำให้น้ำหนักของระบบที่ลดลงเพิ่มมากขึ้น โดยมีอัตราการลดลงในช่วงแรกที่ชั่วโมงที่ 6 – 24 อย่างรวดเร็ว และคงที่ในชั่วโมงที่ 72 จนถึงสิ้นสุดการหมัก เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์) ดังภาพที่ 4.15

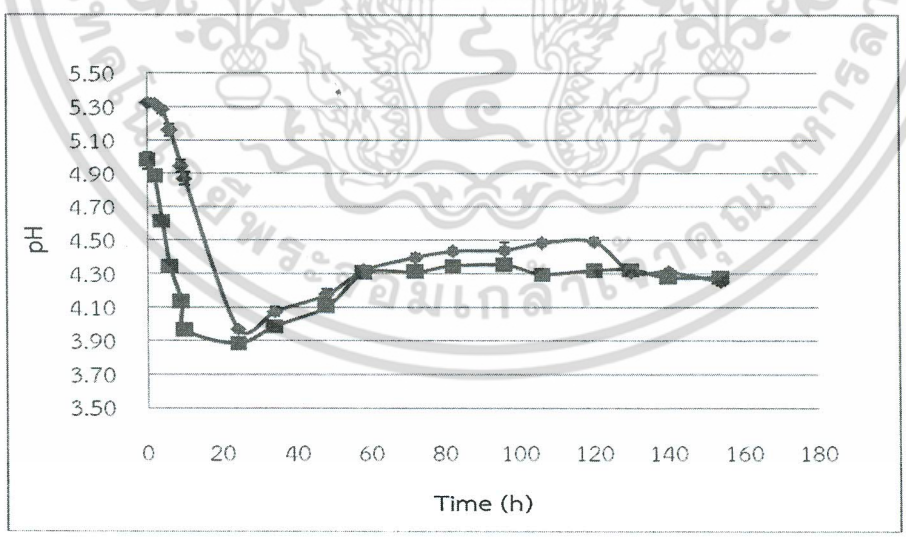
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักระบบเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 (◆) และที่มีการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 (■) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

4.3.2 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช

การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของกระบวนการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม (ภาพที่ 4.16)



ภาพที่ 4.16 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 (◆) และที่มีการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 (■) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

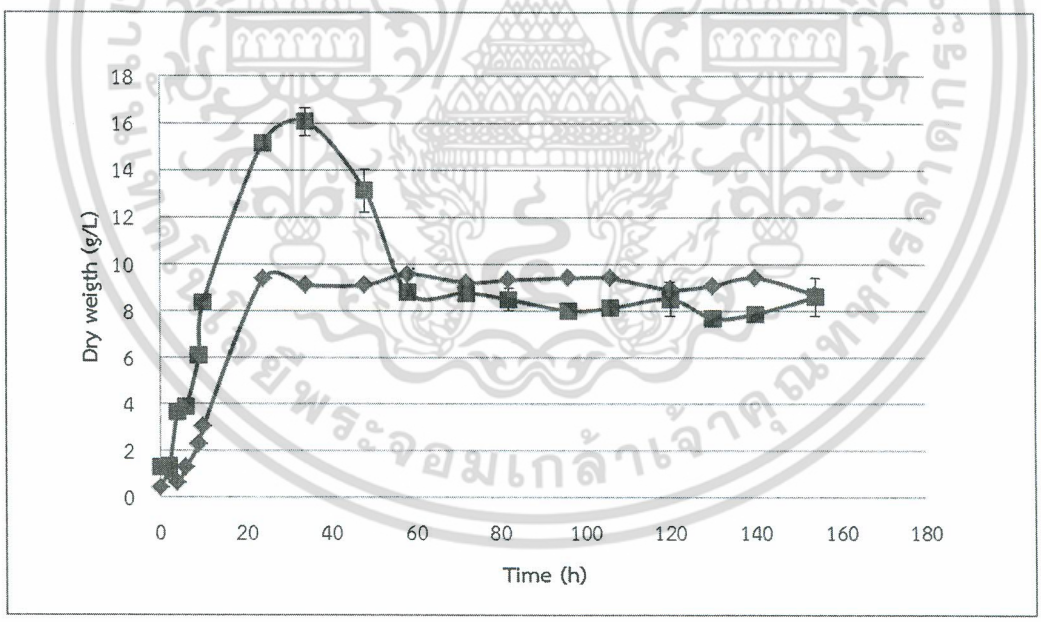
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากภาพที่ 4.16 พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน โดยค่าพีเอชลดลงในช่วง 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นจะเพิ่มขึ้น และคงที่ ในตอนท้ายของการหมัก ณ ชั่วโมงที่ 58 จากการทดลองตัวอย่างควบคุม พีเอชเริ่มลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นพีเอชเริ่มเพิ่มขึ้นจะเริ่มคงที่ชั่วโมงที่ 34 ซึ่งมีค่าพีเอชสุดท้าย 4.25±0.01 สำหรับตัวอย่างที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชมีแนวโน้มใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุม โดยค่าพีเอชสุดท้ายของทั้งสองสภาวะมีค่าเท่ากับ 4.28±0.01 ในชั่วโมงที่ 48 มีการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอช แล้วคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก Quillium *et al.*, (2000) ให้เหตุผลว่า ความเครียด เช่น ปริมาณอาหารที่ใช้ในการเจริญและความเข้มข้นของเอทานอลอาจเป็นสาเหตุของการเพิ่มขึ้นในค่าพีเอช สรุปว่าการเพิ่มขึ้นของค่าพีเอชเกิดขึ้นในช่วงที่ยีสต์เกิดการย่อยสลายตัวเอง สังเกตได้จากช่วงหลังการผลิตเอทานอลมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ลงลด

4.3.3 ผลการศึกษาการเจริญ

4.3.3.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

การเหนี่ยวนำประสิทธิภาพการหมักเอทานอลด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้เร็วกว่าตัวอย่างควบคุม โดยเชื้อเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 34 เท่ากับ 16.06±1.15 กรัมต่อลิตร จากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งจะเริ่มคงที่ ณ ชั่วโมงที่ 58 เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม ดังภาพที่ 4.17

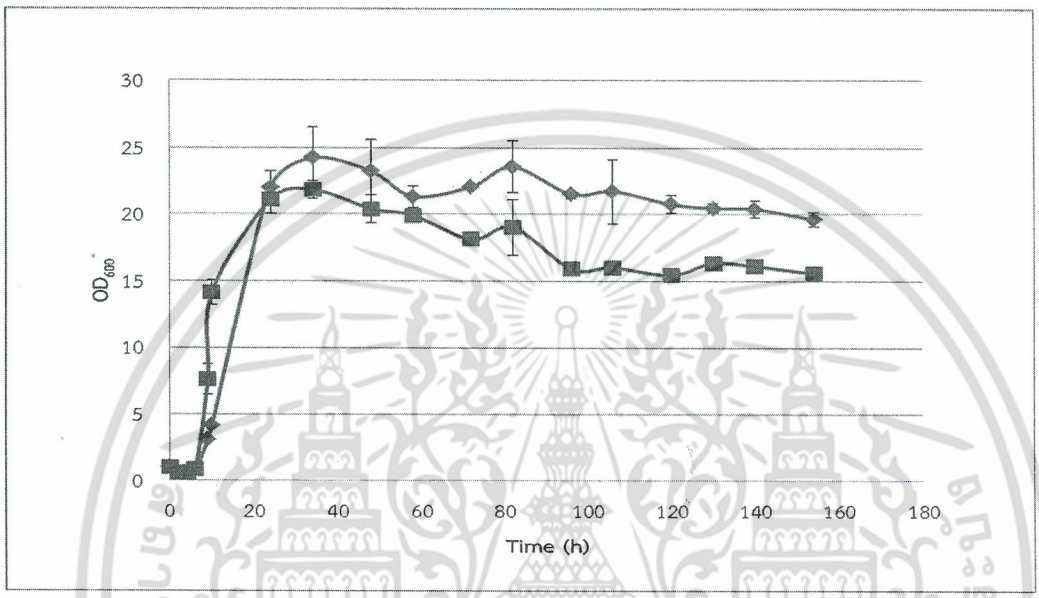


ภาพที่ 4.17 น้ำหนักแห้งของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 (◆) และที่มีการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 (■) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.2 ค่าความขุ่น

จากการทดลองวัดค่าการเจริญในรูปค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร พบว่าการเหนี่ยวนำประสิทธิภาพการหมักด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีการเจริญได้ดีกว่าตัวอย่างควบคุม ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-10 จากนั้นตั้งแต่ชั่วโมง 24 ตัวอย่างควบคุมสามารถเจริญได้ดีกว่าจนถึงตอนท้ายของการหมัก ดังภาพ 4.18

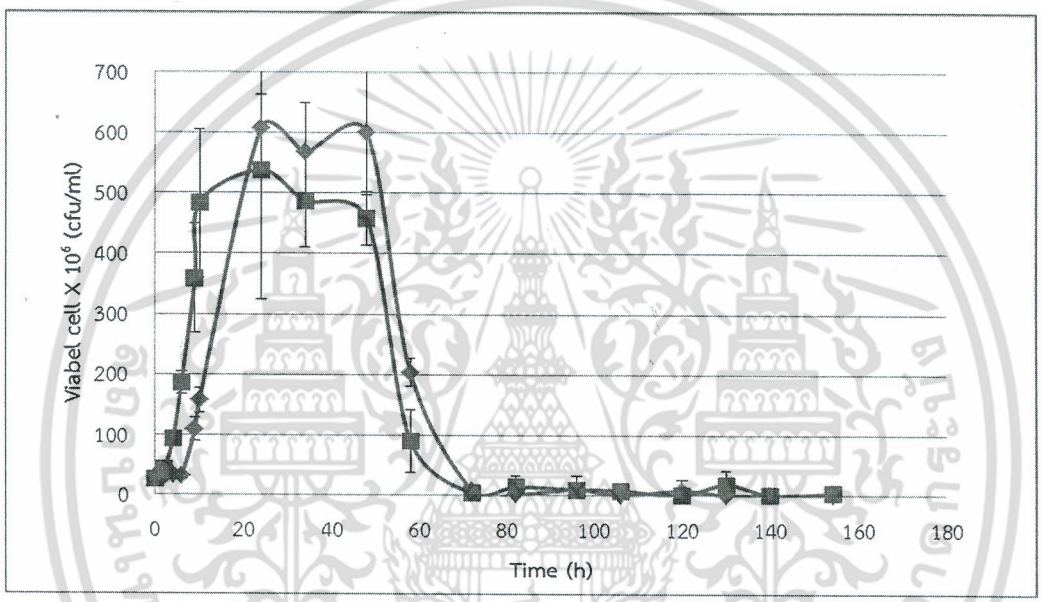


ภาพที่ 4.18 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 (◆) และที่มีการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 (■) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

จากการติดตามการเจริญของยีสต์ในรูปเซลล์ที่มีชีวิต พบว่ามีความแตกต่างกันเล็กน้อย ระหว่างการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และตัวอย่างควบคุม ซึ่งจากผลการเจริญของเซลล์ในตัวอย่างควบคุม พบว่าในช่วงแรกของการหมัก มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเหนี่ยวนำโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร แต่ในช่วงท้ายของการหมักการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตน้อยกว่าตัวอย่างควบคุม ณ ชั่วโมงที่ 82 มีจำนวนเซลล์สูงสุดเท่ากับ $1.30 \times 10^{7} \pm 1.88 \times 10^{7}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.19)

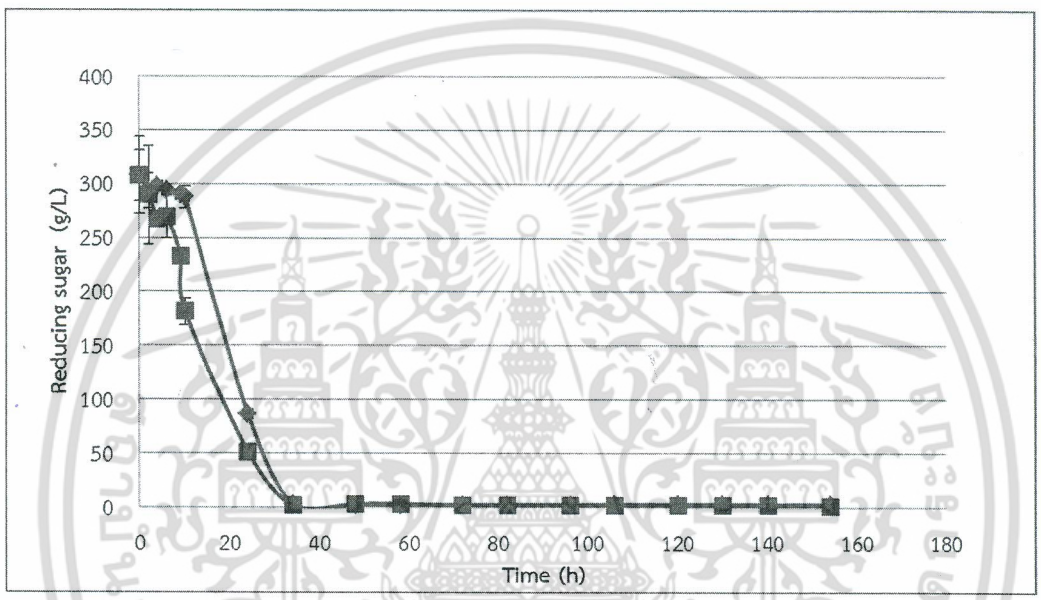


ภาพที่ 4.19 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 (◆) และที่มีการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 ■) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.4 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล

ผลของการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลกลูโคส แสดงให้เห็นว่า การเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งในชั่วโมงที่ 4 เป็นต้นไป ยีสต์สามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้ดีกว่าในตัวอย่างควบคุม อย่างไรก็ตามทั้งสองสภาวะการทดลอง ยังคงมีน้ำตาลเหลืออยู่ในระบบเล็กน้อย ซึ่งตัวอย่างควบคุม มีน้ำตาลเหลืออยู่ 2.82±0.35 กรัมต่อลิตร ขณะที่การตัวอย่างที่มีการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ มีน้ำตาลเหลืออยู่ 1.83±0.18 กรัมต่อลิตร ณ ชั่วโมงที่ 34 ดังภาพที่ 4.20

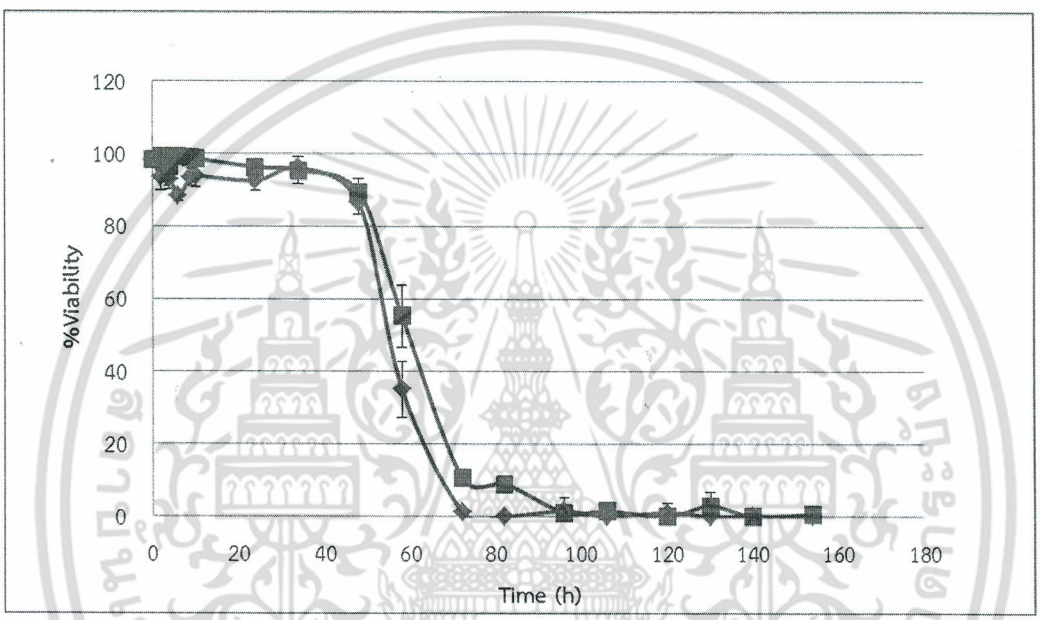


ภาพที่ 4.20 การใช้น้ำตาลทั้งหมดของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 (◆) และที่มีการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 (■) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.5 ผลการศึกษาการรอดชีวิตของเซลล์

ภาพที่ 4.21 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของยีสต์ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และในตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเหนี่ยวนำด้วยเกลือดังกล่าว พบว่า เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงที่สุด โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ชั่วโมงที่ 48 โดยตัวอย่างควบคุม มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต เท่ากับ 86.37±3.22 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่าเล็กน้อยเท่ากับ 89.357±3.84 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4.21 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 0 (◆) และที่มีการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 (■) เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิที่ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่ายีสต์ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตร โดยการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มีผลต่อการรอดชีวิตของยีสต์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก จะเห็นว่าการเหนี่ยวนำเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์สามารถช่วยให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่าตัวอย่างควบคุม อันเนื่องมาจากโซเดียมคลอไรด์ส่งผลให้ยีสต์ทนต่อความเครียดต่างๆที่ก่อเกิดจากการหมัก โดยเหนี่ยวนำให้ยีสต์มีการสังเคราะห์สารที่สำคัญเช่น กลีเซอรอลและทรีฮาโลสเก็บสะสมไว้ในเซลล์ สารเหล่านี้ทำหน้าที่ในการปรับปรุงความสามารถในเซลล์ยีสต์ให้ทนต่อแรงดันออสโมติกและความเป็นพิษในระหว่างกระบวนการหมัก (Logothetis *et al.*, 2013) อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ยังไม่ได้ศึกษาการวิเคราะห์กลีเซอรอลและทรีฮาโลส ซึ่งการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์ดังกล่าวควรทำการวิจัยศึกษาต่อในอนาคตเพื่อศึกษาความสามารถในการปรับปรุงความสามารถในการทนต่อเอทานอลของเซลล์

4.3.6 ค่าพารามิเตอร์ในการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90

จากการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลโดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากนั้นเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายใส่ในอาหาร YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร และเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม คือ การหมักเอทานอลด้วยเชื้อที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ จากผลการทดลองพบว่าการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ แสดงชั่วโมงที่มีการผลิตเอทานอลได้มากที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 58 ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ 113.62±8.83 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.10 ชั่วโมง$^{-1}$ ผลผลิตเชิงปริมาตรเท่ากับ 2.13±0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพของการหมักเท่ากับ 79.30±15.63 เปอร์เซ็นต์ สำหรับตัวอย่างควบคุมชั่วโมงที่มีการผลิตเอทานอลได้มากที่สุดคือ ชั่วโมงที่ 48 ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ 103.22±3.12 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.14 ชั่วโมง$^{-1}$ ผลผลิตเชิงปริมาตรเท่ากับ 2.15±0.07 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและประสิทธิภาพของการหมักเท่ากับ 66.42±10.41เปอร์เซ็นต์ ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 1

จากการทดลองสามารถสรุปได้ว่า การเหนี่ยวนำเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล โดยพิจารณาจากความเข้มข้นเอทานอลที่ถูกสร้างขึ้นและผลได้ของเอทานอล อย่างไรก็ตาม เป็นที่น่าสังเกตว่า การเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์จะส่งผลให้เซลล์มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการนำน้ำตาลไปใช้ที่ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ค่าพารามิเตอร์ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90

Experimental conditions	Time taken to reach maximum ethanol (h)	Specific growth rate (h^{-1})	Rate of glucose utilization (g/l.h)	Residual glucose (g/l)	Maximum Ethanol concentration (g/l)	Ethanol yield ($Y_{P/S}$ g/g)	Volumetric productivity (g_P/l.h)	Fermentation efficiency (%)
I	48	0.14	6.36±0.74[a]	2.35±0.05	103.22±3.12	0.34±0.05[a]	2.15±0.07[a]	66.42±10.41[a]
II	58	0.10	5.25±0.41[a]	3.21±0.07	113.62.±8.83	0.40±0.08[a]	2.13±0.31[a]	79.30±15.63[a]

หมายเหตุ I : เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่การเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ ที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส,
II : เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่เหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่มีน้ำตาลความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC 90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ซึ่งเกลือนี้ส่งผลให้ยีสต์ทนต่อความเครียดต่างๆที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักเอทานอล จากการศึกษาในหัวข้อต่าง ๆ ได้ข้อสรุปดังนี้

5.1.1 การศึกษาความสามารถของยีสต์ในการทนต่อโซเดียมคลอไรด์และอุณหภูมิ

จากการศึกษาข้อมูลเบื้องต้นเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ต่อโซเดียมคลอไรด์และอุณหภูมิต่างๆ โดยเทคนิค Spot plate บนอาหารวุ้น YPD ที่มีการผันแปรความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ที่ (0, 2, 4, 6, 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* SC90 สามารถเจริญได้ดีบนอาหารที่เติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0, 2, 4 และ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 และ35 องศาเซลเซียส

5.1.2 ผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคส

จากการศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญ และประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 2, 4, 6, 8 และ10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองพบว่าโซเดียมคลอไรด์ที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้การเจริญของยีสต์ลดลง อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของสารดังกล่าวที่สูง ช่วยปรับปรุงการรอดชีวิตของยีสต์ให้สูงขึ้น ทั้งนี้การเหนี่ยวนำเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6 แสดงเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูง อีกทั้งมีการนำน้ำตาลไปใช้ได้อย่างรวดเร็ว จึงเลือกเตรียมเชื้อในอาหารที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เพื่อศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

5.1.3 ผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

จากการศึกษาผลของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลความเข้มข้นสูง โดยการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YPD ที่มีความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ร่วมกับการเติมโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ในอาหาร YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร และเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมคือ การหมักเอทานอลด้วยเชื้อที่ไม่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ จากผลการทดลองสรุปได้ว่า การเหนี่ยวนำเชื้อด้วยโซเดียมคลอไรด์ 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล โดยพิจารณาจากความเข้มข้นเอทานอลที่ถูกสร้างขึ้นและผลได้ของเอทานอล อีกทั้งสามารถช่วยให้เซลล์มีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตที่สูงกว่าตัวอย่างควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

การศึกษาครั้งต่อไปควรมีการวิเคราะห์กลีเซอรอลและทรีฮาโลสที่สะสมภายในเซลล์ เพื่อตอบสมมุติฐานที่ว่า เมื่อยีสต์มีการเผชิญกับสภาวะเครียดที่มีแรงดันออสโมติกสูงอันเกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ ยีสต์จะมีการตอบสนองสภาวะดังกล่าว โดยการสะสมกลีเซอรอลและทรีฮาโลสภายในเซลล์ นอกจากนี้ควรมีการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่อประสิทธิภาพการหมักโดยใช้ยีสต์มากกว่า 1 สายพันธุ์ เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลกับยีสต์สายพันธุ์อื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6
สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

โครงการวิจัย การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งได้รับงบประมาณสนับสนุนจากแหล่งเงินรายได้ ประจำปี 2557 คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. อยู่ในระหว่างดำเนินการเตรียมต้นฉบับบทความวิจัย เพื่อนำเสนอในงานประชุมวิชาการ The 6th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products (FerVAAP 2015) ซึ่งจะจัดขึ้นระหว่างวันที่ 29-31 กรกฎาคม 2558 ณ โรงแรมเซนทารา จ. ขอนแก่น

ส่วนหนึ่งของโครงการนี้ใช้เป็นหัวข้อโครงการปัญหาพิเศษของนักศึกษาสาขาเทคโนโลยีการหมัก จำนวน 2 โครงการ ซึ่งเป็นการฝึกปฏิบัติในการทำวิจัยก่อนจบการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Bai, F.W. 2007. Process oscillations in continuous ethanol fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* . PhD thesis, Chemical Engineering, University of Waterloo, Canada.

Birch, R.M. and Walker, G.M. 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme and Microbial Technology, 26, 678–687

Boulton, C. and Quain, D. 2006. The biochemistry of fermentation. In: Brewing Yeast and Fermentation. Blackwell Science, Oxford.

Butinar, L., Santos, S., Spencer-Martins, I., Oren, A., and Gunde-Cimerman, N. 2005. Yeast diversity in hypersaline habitats. FEMS Microbiology Letters, 244, 229 234.

Bvochora, J.M.; Read, J.S.; Zvauya, and R. 2000. Application of very high gravity technology to the cofermentation of sweet stem sorghum juice and sorghum grain. Industrial Crops and Products. 11 , 11–17.

Carlsen, H.N., Degn, H., and Lloyd, D. 1991. Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspensions of baker's yeast. Journal of General Microbiology, 137, 2879-2883

Cardona, C.A., Sánchez, O.J, and Gutiérrez, L.F. 2010. Analysis of ethanol recovery and dehydration. In: Process synthesis for fuel ethanol production, pp. 199-219. CRC Press Taylor & Francis Group, New York.

Casey, G.P., Magnus, C.A. and Ingledew, W.M. 1984. High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. Applied and Environmental Microbiology, 48, 639–646.

Cimprich, P., Slavik, J., and Kotyk, A. 1995. Distribution of individual pH values in a population of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiology Letters, 130, 245-252.

Demírbaş, A. 2007. Progress and recent trends in biofuels. Progress in Energy and Combustion Science, 33: 1–18.

El-Samargy, Y.A. and Zall, R.R. 1988. The influence of sodium chloride on the activity of yeast in the production of single cell protein in whey permeate. Journal of Dairy Science, 71(5):1135–1140.

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.), pp.123-152, Available from: http://www.intechopen.com/books/bioethanol/second-generation-bioethanol-from-lignocellulosics-processing-of-hardwood-sulphite-spent-liquor.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G. and Zacchi, G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends in Biotechnology, 24 (12): 549-556.

Gervais, P., Marechal, P. A. and Molin, P. 1992. Effects of the kinetics of osmotic pressure variation on yeast viability. Biotechnology and Bioengineering, 40, 1435-1439.

Gray, K.A., Zhao, L. and Emptage, M. 2006. Bioethanol. Current Opinion in Chemical Biology, 10: 141–146.

Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G. and Zacchi, G. 2006. Bio-ethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. Trends in Biotechnology, 24(12): 549-556.

Ingledew, W.M. 1993. Yeasts for production of fuel ethanol. In: The Yeasts, vol. 5, pp. 245-291 (Eds. A.H. Rose and J.S. Harrison), Academic Press, London

Ingram, L.O. and Buttke, T.M. 1984. Effects of alcohols on micro- organisms. Advances in Microbial Physiology 25, 253-300.

Kosaric, N. and Vardar-Sukan, F. 2001. Microbiology and Biochemistry of Ethanol Formation. In: The Biotechnology of Ethanol Classic and Future Application, pp. 90-106 (Ed. M. Roehr) WILEY-VCH, NewYork.

Kumar, L., Dhavala, P., Goswami, A., and Maithel, S. 2006. Liquid biofuels in south asia: resources and technologies. Asian Biotechnology and Development Review, 8: 31–49.

Linden, T. and Hahn-Hagerdal, B. 1989. Ferementation of lignocellulosic hydrolysates with yeasts and xylose isomerase. Enzyme and Microbial Technology, 11, 583-589.

Liu, R. and Shen, F. 2008. Impacts of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). Bioresource Technology, 99(4), 847-54.

Logothetis, S. Walker, G.M., Nerantzis, E.T. 2007. Effect of salt hyperosmotic stress on yeast cell viability. Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, 113, 271-284

Logothetis, S. Nerantzis, E.T., Gioulioti A., Kanelis, T. Panagiotis, T., and Walker, G. 2010. Influence of sodium chloride on wine yeast fermentation performance. International Journal of Wine Research, 2, 35-42.

Logothetis, S. Tataridis, P., Kanellis, Kanellis, A. and Nerantzis, E. 2013. Journal of Natural Science, Matica Srpska Novi Sad, 124, 405-414.

Lopes, D.H.J. and Sola-Penna, M. 2001. Urea increases tolerance of yeast inorganic pyrophosphatase activity to ethanol: the other side of urea interaction with proteins. Archives of Biochemistry and Biophysics, 394 (1), 61-66.

Ma, M. and Liu, Z.L. 2010. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Applied Microbiology and Biotechnology, 87, 829–845.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pascual, C., Alonso, A. Garcia, I., Romay, C., and Kotyk, A. 1988. Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnology and Bioengineering, 32 (3), 374-378.

Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H.C. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. Resources, Conservation and Recycling, 50: 1–39.

Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31(3): 426–428.

Minteer, S.D. 2006. Alcoholic Fuels; CRC Press Taylor and Francis group: London, UK.

Morris, G.J., Winters L, Coulson, G.E., and Clarke, K.J. 1986. Effect of osmotic stress on the ultrastructure and viability of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of General Microbiology, 129: 2023–2034.

Nagodawithana, T.W. and Steinkraus, K.H. 1976. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in ''rapid fermentation''. Applied and Environmental Microbiology, 31, 158–162.

Norberg, J. and Blomberg, A. 1993. Metabolic and regulatory changes associated with growth of *Saccharomyces cerevisiae* in 1.4 m NaCl: Evidence of osmotic induction of glycerol dissimilation via the dihydroxyacetone pathway. Journal of Biological Chemistry, 272:5544–5554.

Oda, Y. and Tonomura, K. 1993. Sodium chloride enhances the potential leavening ability of yeast in dough. Food Microbiology, 10 (3): 249–254.

Pastor, M.M., Proft, M., and Pascual-Ahuir, A. 2009. Mitochondrial function is an inducible determinant of osmotic stress adaptation in yeast. The Journal of Biological Chemistry, 284, 30307-30317.

Petrov, V.V. and Okorokov, L.A. 1990. Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its de-energization. Yeast, 6, 311–318.

Picataggio, S.K. and Zhang, M. 1996. Biocatalyst development for bioethanol production from hydrolysates. In: Handbook on Bioethanol: Production and Utilisation, pp. 163-177 (Ed. C.E. Wyman) Taylor and Francis, Washington DC.

Piper, P.W. 1995. The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. FEMS Microbiology Letters, 134, 121–127.

Quillium, W., Hulse, G. and Cameron-Clarke, A. 2000. Yeast management and fermentation performance: a brewer's perspective. In: Brewing Yeast Fermentation Performance, pp. 189-200 (Ed. K.A. Smart) Blackwell Science, Oxford.

Salmon, J.M., Vincent, O., Mauricio, J.C., Bely, M., and Barre, P. 1993. Sugar transport inhibition and apparent loss of activity in *Saccharomyces cerevisiae* as a major limiting factor of enological fermentations. American Journal of Enology and Viticulture, 44 (1), 56-64.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Salmon, J.M. and Maurico, J.C. 1994. Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcohol fermentation. Biotechnology Letters, 16, 89–94.

Sánchez. O.J. and Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. Bioresource Technology, 99: 5270–5295.

Santos, J., Sousa, M.J., Cardoso, H., Inácio, J., Silva, S., Spencer-Martins, I., and Leão, C. 2008. Ethanol tolerance of sugar transport, and the rectification of stuck wine fermentations. Microbiology, 154, 422-430.

Schmidt, S.A., Tran, T., Chambers, P.J., Herderich, M.J., and Pretorius, I.S. 2006. Developing indicators of wine yeast performance: an overview of the impact of ethanol stress. Wine Industry Journal, 21 (5), 24-30.

Wales, D.S. Cartledge, T.G. and Lloyd, D. 1980. Effect of glucose repression and anaerobiosis on the activities and subcellular distribution of tricarboxylic acid cycle and associated enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Industrial Microbiology, 116, 92-98.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบบรายงานการใช้จ่ายเงินโครงการวิจัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานความก้าวหน้า ครั้งที่ 1 รอบ 12 เดือน ประจำปีงบประมาณ 2557

☐ แหล่งงบประมาณแผ่นดิน (แบบปกติ) ☑ แหล่งเงินรายได้

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย)

(ภาษาอังกฤษ)

ชื่อ-สกุลหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน/ผู้วิจัย ดร. สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2557

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี เดือน ตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2556 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2557

ข้อมูลการรายงานค่าใช้จ่ายงบประมาณโครงการวิจัย

1. การเบิกจ่ายงบประมาณ (กรณีการจ่ายเงินถ้าจ่ายงวดเดียวให้ลบข้อที่ไม่เกี่ยวข้องออก)

งวดที่ 1 70,000 บาท 100 % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน 1 ตุลาคม 2556

งวดที่ 2 - บาท - % วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ว/ด/ป) -

2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย (

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณรวมทั้งโครงการ	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (หรือเกิน
งบบุคลากร :ค่าจ้างชั่วคราว	-	-	-
งบดำเนินงาน			
ค่าตอบแทน	-	-	-
ค่าใช้สอย	20,000.00	20,000.00	-
ค่าวัสดุ	50,000.00	48,533.40	1,466.60
ค่าสาธารณูปโภค	-	-	-
งบลงทุน: ค่าครุภัณฑ์	-	-	-
รวม	70,000.00	68,533.40	1,466.60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาว สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา (หัวหน้าโครงการ)
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Soisuda Pornpukdeewattana

1.1. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ สาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.2 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา/ประกาศนียบัตร	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2555	ป.เอก	Ph.D. (Food Science)	Food Science	University of Nottingham	อังกฤษ
2546	ป.โท	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2542	ป.ตรี	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย

1.3 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

1.3.1 เทคโนโลยีการหมัก

1.3.2 เทคโนโลยีชีวภาพของยีสต์

1.4 หัวหน้าโครงการวิจัย

1.4.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและแอนโธไซยานินในไวน์ผลไม้ ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.ปี พ.ศ.2548

1.4.2 การผลิตโยเกิร์ตน้ำนมข้าวโพด ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี พ.ศ. 2549

1.4.3 การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดเจือจางและมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี พ.ศ. 2556

1.5. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1.5.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและแอนโธไซยานินในไวน์ผลไม้ รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี 2548-49.

1.5.2 การผลิตโยเกิร์ตน้ำนมข้าวโพด รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัย เงินรายได้คณอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี 2549-50.

1.5.3 การพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชูหมักเพื่อรองรับเทคโนโลยีผลิตน้ำส้มสายชูจากต่างชาติ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัย โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ปี พ.ศ. 2548 – 50.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5.4 การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดเจือจางและมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี พ.ศ.2556

1.5.5 การเพิ่มประสิทธิภาพการทนความร้อนของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ด้วยประจุแคลเซียม ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2557 ผู้ร่วมโครงการ

1.5.6 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ*Saccharomyces cerevisiae* SC90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี พ.ศ.2557

1.6 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

1.6.1 โครงการการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวไร่และการใช้ประโยชน์ ได้รับทุนจากกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปี 2557 เป็นระยะเวลา 3 ปี โดยมีสัดส่วนที่รับผิดชอบ 20% ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้ว 75%

1.6.2 ผลของประจุสังกะสีต่อการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลความเข้มข้นสูงด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ได้รับทุนจากกระทรวงวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2557 โดยมีสัดส่วนที่รับผิดชอบ 80% ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้ว 50%

1.6.3 การปรับสภาพเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลชีวภาพ ได้รับทุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2559 โดยมีสัดส่วนที่รับผิดชอบ 60%

1.7 การนำเสนอผลงานวิชาการ

1.7.1 บทความวิจัย

(1) 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.

(2) Krusong, W., **Pornpukdeewattana, S.**, Kerdpiboon, S. and Tantratian, S. (2014) Prediction of influence of stepwise increment of initial acetic acid concentration in charging medium on acetification rate of semi-continuous process by artificial neural network. LWT-Food Science and Technology, 56: 383-389.

(3) **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(4): 335-345.

(4) **Pornpukdeewattana, S.**, Chalearmkit, P., and Iamsamang, P. (2014) Optimization of fermenation temperature for very high gravity ethanol production using industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* SC90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thammasat International Journal of Science and Technology. 19 (3): 21-37.

(5) **Pornpukdeewattana, S.**, Khamfun, J. and Phatyenchai, N. Adaptation of commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis. The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2013), 16th-19th October 2013, The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand.

(6) **สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา** ประพัฒน์ พัวพันวัฒนะ และ ไอรยา สิทธิอำพรพรรณ (2556) การผลิตเอทานอลชีวภาพจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางและมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90. งานประชุมวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ครั้งที่ 2, 30 สิงหาคม 2556, โรงแรมวินเซอร์ สวีท สุขุมวิท, กรุงเทพ, ประเทศไทย.

(7) Sukwanno, P. **Pornpukdeewattana, S.**, Krusong, W. and Puttongsiri, T. (2013) Impact of chitosan concentrations on the reduction of initial microorganisms in dried Sepat-Siam (*Trichogaster pectoralis*). The 15th Food Innovation Asia Conference 2013, 13th-14th June 2013, Bitec Bangna, Bangkok, Thailand.

(8) **Pornpukdeewattana, S.,** Boulton, C.A. and Smart, K.A. (2011) Optimization of temperature for bioethanol production using *Saccharomyces cerevisiae*. BBSRC Workshop 30th-31st March 2011, Downing College, University of Cambridge, Cambridge, UK.

(9) **Pornpukdeewattana, S.,** Boulton, C.A. and Smart, K.A. (2010) Optimization of bioethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. Lace Conference 9th -10th September 2010, U. of Nottingham, Nottingham, UK.

(10) **Pornpukdeewattana, S.,** Boulton, C.A. and Smart, K.A. (2010) Understanding the stresses encountered during bioethanol fermentations. Second International Symposium for Young Scientists and Technologists in Malting, Brewing and Distilling 19th -21st May 2010, Freising – Weihenstephan, Germany.

(11) Krusong, W., Sawetwiwat, A., **Pornpukdeewattana, S.**, Vijittraka, A. and Tuntratian, S. (2006) Prolonged shelf-life of fresh chicken meat by using vinegar. The 8th Agro-Industrial Conference 15th -16th June 2006, Bitec Bangna, Bangkok, Thailand.

(12) **Pornpukdeewattana, S.** and Jiatrakul, P. (2006) Production of corn milk based yoghurt. The 8th Agro-Industrial Conference 15th -16th June 2006, Bitec Bangna, Bangkok, Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(13) **Pornpukdeewattana, S.** and Jiatrakul, P. (2005) Change in total polyphenol and color of fruit wine During aaging. The 7th Agro-Industrial Conference 22nd -24th June 2005, Bitec Bangna, Bangkok, Thailand. (Poster presentation)

1.7.2 บทความวิชาการ

(1) **สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา** และ เทพปัญญา เจริญรัตน์.2554. The stresses occurrence and response during bioethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. วารสารอุตสาหกรรมเกษตรพระจอมเกล้า, 3(2): 28-36.

(2) **สร้อยสุดา พรภักดีวฒนา** และเทพปัญญา เจริญรัตน์. 2556. เทคโนโลยีการหมักและการ ประยุกต์ ใน เทคนิคพื้นฐานทางเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ยูโอเพ่น จำกัด หน้า 125-173.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นายสุรชัย ใหญ่เย็น

ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)

2.1 ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล)

2.2 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา/ประกาศนียบัตร	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2549	ป.เอก	วท.ด.	เทคโนโลยีชีวภาพ	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2545	ป.โท	วท.ม.	ชีวเคมี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	ไทย
2541	ป.ตรี	วท.บ	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยรามคำแหง	ไทย

2.3 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

2.3.1 กระบวนการสังเคราะห์แป้ง

2.3.2 เอนไซม์เทคโนโลยี

2.4 หัวหน้าโครงการวิจัย

2.4.1 การตรวจสอบการปลอมปนในผลิตภัณฑ์จากน้ำนมกระบือ (ทุนเงินรายได้ ปี 2556)

2.4.2 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแมนแนนจากกากมะพร้าว (ทุนเงินรายได้ ปี 2557)

2.5 ผู้ร่วมวิจัย

2.5.1 พลังงานทดแทน: การผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ (ฝักจามจุรี) (งบประมาณแผ่นดิน 2555)

2.5.2 การใช้เอนไซม์กลุ่มเมแทบอไลซ์แป้งในการดัดแปรแป้งมันสำปะหลัง (ทุนวิจัยเร่งด่วน 2556)

2.5.3 การผลิตออลิโกกาแลกโตแมนแนนที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกจากกากมะพร้าว โดยใช้เอนไซม์แมนนาเนส (งบประมาณแผ่นดิน 2558)

2.6 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

2.6.1 การตรวจสอบการปลอมปนในผลิตภัณฑ์จากน้ำนมกระบือ (ทุนเงินรายได้ ปี 2556)

2.6.2 สภาวะที่เหมาะสมในการสกัดแมนแนนจากกากมะพร้าว (ทุนเงินรายได้ ปี 2557)

2.7 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.1 การผลิตออลิโกกาแลกโตแมนแนนที่มีสมบัติเป็นพรีไบโอติกจากกากมะพร้าว โดยใช้เอนไซม์แมนนาเนส (งบประมาณแผ่นดิน 2558) โดยมีสัดส่วนที่รับผิดชอบ 50% ได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้ว 30%

2.8 การนำเสนอผลงานวิชาการ

(1) Rakphung R., **Yaiyen S.** and Limpaseni, T. (2014) Cassava starch modification using recombinant starch branching enzymes from cassava *Manihot esculenta* Crantz. Proceeding and Oral presentation of International Conference of Biotechnology: The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 26th-29th November 2014, Mae Fah Luang University, Chiang Rai, Thailand.

(2) Phatai P., Klingkaewnarong J. and **Yaiyen S.** (2014) Adsorption of Methyl Violet Dye from Aqueous Solutions by Activated Carbon Produced from Tamarind Seeds. Advanced Materials Research, 911: 326-330

(3) Kattiyawong K., Nakkapong S., Sangmanee S., **Yaiyen S.,** Pitchakula R., and Pongsawasdi P. (2014) Encapsulation of Astaxanthin in nanolevan particles, The 1st Joint Seminar New Core to Core Program A. Advanced Research Networks, 10th – 11st August 2014, Bangkok, Thailand.

(4) Kerdpithak S., **Yaiyen S.** and Limpaseni, T. (2013) Characterization of the gene encoding limit dextrinase from tuber of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Proceeding in 5th Asian Community of Glycoprotein and Glycotechnology Conference. 16th-18th October 2013, Khonkhaen University , Khonkhaen, Thailand.

(5) Jongmevasana W., **Yaiyen S.** and Prousoontorn H. M. (2013) Cassava (*Manihot esculenta* Crantz of cv. KU50) peroxidase and its potential for the detection of some thiol compounds based on the inhibitory effect of 3,3′,5,5′-tetramethylbenzidine oxidation. Process of Biochemistry: 48 1516-1523.

(6) **Yaiyen, S.,** Kudan S., Tunsuwan S. and Eksitthikul T. (2012) The characterization of rain tree pod for ethanol production. Poster presentation: 9th Asia-Biomass workshop. December 3rd – 4th, 2012. Tokyo, Japan.

(7) **Yaiyen, S.,** Netrphan., S and Limpaseni, T. (2010) Characterization of two recombinant starch branching enzymes cloned from cDNA of two cassava *sbe* genes. Proceeding and Oral presentation of International Conference of Biotechnology: The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. 20th-22nd October 2010, Prince of Songkla University, Trang Thailand.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายเทพปัญญา เจริญรัตน์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) MR.Theppanya Charoenrat

3.1 ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

3.2 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา/ประกาศนียบัตร	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2549	ป. เอก	Ph.D. (Biotechnology)	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	ไทย
2548	Licentiate	Lic. Eng. (Biotechnology)	เทคโนโลยีชีวภาพ	Royal Institute of Technology (KTH) Stockholm	Sweden
2545	ป. โท	วทม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2542	ป. ตรี	วทบ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	ไทย

3.3. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

3.3.1 วิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ

3.3.2 เทคโนโลยีการหมัก

3.3.3 เทคโนโลยีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

3.3.4 การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ

3.4. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

3.4.1 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง การควบคุมการเกิด overflow metabolism ระหว่างการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาโดย *Pichia pastoris* จำนวนงบประมาณ 480,000 บาท ชื่อแหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ช่วงปีที่รับทุน กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2552 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2552)

3.4.2 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง กระบวนการผลิตไลโซไซม์จากไข่ขาวโดยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 80,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน เมษายน 2550 ถึง กันยายน 2551 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2552)

3.4.3 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง การศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกตัวด้วยกระบวนการหมักแบบแบทช์ซ้ำเพื่อเก็บเกี่ยวไฟโคไซยานินจากสาหร่ายที่ได้ด้วยโครมาโตร-กราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน มิถุนายน 2552 ถึง พฤษภาคม 2553 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2553)

3.4.4 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนเทอโรไคเนสสายสั้นโดย *Pichia pastoris* และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน มิถุนายน 2553 ถึง พฤษภาคม 2554 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2555)

สงวนลิขสิทธิ์ เอกสารนี้จัดทำขึ้นไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

3.5.1 การควบคุมการเกิด overflow metabolism ระหว่างการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาโดย *Pichia pastoris* จำนวนงบประมาณ 480,000 บาท ชื่อแหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ช่วงปีที่รับทุน กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2552 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2552)

3.5.2 กระบวนการผลิตไลโซไซม์จากไข่ขาวโดยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 80,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน เมษายน 2550 ถึง กันยายน 2551 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2552)

3.5.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกตัวด้วยกระบวนการหมักแบบแบทช์ซ้ำเพื่อเก็บเกี่ยวไฟโคไซยานินจากสาหร่ายที่ได้ด้วยโครมาโตร-กราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน มิถุนายน 2552 ถึง พฤษภาคม 2553 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2553)

3.5.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนเทอโรไคเนสสายสั้นโดย *Pichia pastoris* และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน มิถุนายน 2553 ถึง พฤษภาคม 2554 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2555)

3.6. งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

3.6.1 ผู้ร่วมโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายเซลลูโลสจากยีสต์ *Pichia pastoris* KM71 จำนวนงบประมาณ 1,112,400 บาท ชื่อแหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ช่วงปีที่รับทุน ตุลาคม 2554 ถึง เมษายน 2556

3.7 ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ หรือการยื่นจดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร หรือการนำไปใช้ประโยชน์ต่อชุมชน/สังคม (กรณีงานวิจัยเพื่อตอบปัญหาและพัฒนาชุมชน/สังคม)

3.7.1 ผลงานตีพิมพ์

(1) **Charoenrat, T.**, Khumruaengsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S., and Roongsawng, 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. (Accepted manuscript)

(2) Rattananikom, K., Choengpanya, K., Tongtubtim, N., **Charoenrat, T.**, Withers, S.G., and Kongsaeree, P.T. (2013) Mutational analysis in the glycone binding pocket of *Dalbergia cochinchinensis* β-glucosidase to increase catalytic efficiency towards mannosides. Carbohydrate Research. (In Press, Accepted manuscript, doi: http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2012.10018)

(3) ศจิกาญจน์ พึ่งบัว ชนิดา กุประดิษฐ์ มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และเทพปัญญา เจริญรัตน์ (2555) การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้นโดย *Pichia pastoris*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 20(1): 83-97.

(4) กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ แพรพรรณ เกตุเรืองรอง สุเปญญา จิตตพันธ์ วัชรี กัลยาลัง และ **เทพปัญญา เจริญรัตน์** (2554) การคัดเลือกสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน *Oscillatoria* ssp. สำหรับนำมาใช้ในการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 19(3): 1-12.

(5) **เทพปัญญา เจริญรัตน์** กรวิชญ์ จิ๋วสวัสดิ์ นิติ พานิชเกษม และพรรณทิพย์ วรเดชวิทยา (2553) เทคนิคอย่างรวดเร็วและประหยัดในการหาสภาวะดูดซับโปรตีนของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 18(3): 1-11.

(6) อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข **เทพปัญญา เจริญรัตน์** นิติ พานิชเกษม และสุเปญญา จิตตพันธ์ (2553) ความหลากหลายของโรติเฟอร์ในแหล่งน้ำรอบอาคาร SME ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 18(2): 1-8.

(7) Kupradid, C., **Charoenrat, T.** and Ketudat-Cairns, M. (2008) Bovine enterokinase light chain production by *Pichia pastoris*: Effect of induction temperature. Thai Journal of Biotechnology 8(1): 99-105.

(8) Jahic, M., Veide, A., **Charoenrat, T.**, Teeri, T.T. and Enfors, S.-O. (2006) Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. Biotechnology Progress. 22: 1465-1473.

(9) **Charoenrat, T.**, Ketudat-Cairns, M., Jahic, M., Veide, A. and Enfors, S.-O. (2006) Increased total air pressure *versus* oxygen limitation for enhanced oxygen transfer and product formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process. Biochemical Engineering Journal. 30: 205-211.

(10) Jahic, M., Knoblechner, J., **Charoenrat, T.**, Enfors, S.-O. and Veide, A. (2006) Modified *Pichia pastoris* culture technique for improved interfacing with expanded bed adsorption. Biotechnology and Bioengineering. 93(6): 1040-1049.

(11) **Charoenrat, T.**, Ketudat-Cairns, M., Jahic, M., Enfors, S.-O. and Veide, A.(2006) Recovery of recombinant β-glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high-cell-density culture broth. J. Biotechnology. 122: 86-98.

(12) **Charoenrat, T.**, Ketudat-Cairns, M., Stendahl-Andersen, H., Jahic, M. and Enfors, S.-O. (2005) Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. Bioprocess and Biosystem Engineering. 27(6): 399-406. **Received Best paper of the year award.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(13) Andersen, H.S., **Charoenrat, T.**, Eriksen, N.T., Enfors, S.-O. (2004) Ilt- og methanolbegrænsede fed-batch-kulturer af gæren *Pichia pastoris* (Oxygen and methanol limited fed-batch cultures of the yeast *Pichia pastoris*). Dansk Kemi 85: 22-24.

(14) **Charoenrat, T.,** Vanichsrirattana, W. and Ketudat-Cairns, M. (2004) Recombinant β-glucosidase Production by *Pichia pastoris*: The influence of pH. Thai Journal of Biotechnology 5(1): 51-55.

3.7.2 สิทธิบัตร :

การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง (เลขที่คำขอ : 071698)

3.7.3 อนุสิทธิบัตร :

กระบวนการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Pichia pastoris* กลุ่มที่มีความสามารถในการใช้เมทานอลช้าลง (Mut^S) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกล้าเชื้อในกระบวนการหมัก (เลขที่คำขอ : 1203000856)

3.7.4 การได้รับรางวัลทางด้านวิชาการ

(1) Best paper of the year 2005: Award from Bioprocess and Biosystems Engineering Journal

(2) The 2006 Taguchi Price for Outstanding Doctoral Degree Thesis in the Field of Biotechnology: Award from Thai Society for Biotechnology

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้