

รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2554

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง
การทดสอบจุลินทรีย์เพื่อใช้ผลิตเอทานอล
(Microorganisms Testing for Ethanol Production)

คณะผู้ดำเนินงาน
รองศาสตราจารย์ ดร. วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นกุล
อาจารย์ ดร. ชมกฤษ วิรุณานนท์

ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล ประจำปีงบประมาณ 2554 คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ช่วยวิจัย อาสาสมัคร และผู้ร่วมงานทุกท่าน ที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคทั้งสนามและห้องปฏิบัติการมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

วัสดุลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบที่มีอยู่อย่างมากมาย ซึ่งมีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบ เมื่อย่อยสลายจะได้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลไซโลสตามลำดับ ซึ่งน้ำตาลทั้งสองชนิดเป็นสารตั้งต้นที่ดีในการผลิตเอทานอล กระบวนการในการผลิตเอทานอลที่นิยมใช้ คือ กระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการนี้ต้องใช้จุลินทรีย์ที่สามารถหมักวัสดุลิกโนเซลลูโลสได้ที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นจุดประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการใช้ไซโลสในการผลิตเอทานอลได้ ซึ่งจากการทดลองสามารถคัดเลือกยีสต์ทนร้อนได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท และมี 12 ไอโซเลท (60%) ที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสเป็นสารตั้งต้นและเปลี่ยนเป็นเอทานอล ซึ่งยีสต์ทนร้อน ไอโซเลท SBK 3-2 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเมื่อเทียบกับไอโซเลทอื่นๆ (0.43 กรัมต่อลิตร)

คำสำคัญ: ลิกโนเซลลูโลส ไซโลส เอทานอล จุลินทรีย์

Abstract

Lignocellulosic biomass represents one of the most abundant renewable energy sources. The main components of lignocellulosic biomass are cellulose and hemicellulose that are hydrolyzed to glucose and xylose, respectively, for serve as good substrate for ethanol production. Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) is generally procedure for ethanol production. However, this process requires the utilization of microorganisms that capable of working at high temperatures and can be fermented lignocellulose. In Comparison, xylose is more difficult to assimilate and ferment by microorganisms than that in glucose. Xylose can be converted to be ethanol by a simply microorganism such as *Pichia stipitis* which is a strain that represents the highest yield among other yeast for ethanol production from xylose. The objective of this study is to screen xylose-utilizing yeasts from soils in Thailand for ethanol production. Twenty and twenty eight yeasts were isolated from soil samples that were collected from ChonBuri and Kanchanaburi provinces in Thailand, respectively. Twelve of forty-eight isolates (25%) could utilize xylose as substrate and converted to ethanol. Isolate WKA 3-36 has potential to produce the highest ethanol concentration at 4.67 g L⁻¹ compared with all isolates.

Keywords: Lignocellulosic, xylose, ethanol, microorganisms

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญเรื่อง.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
วิธีดำเนินการศึกษา.....	3
ผลการศึกษา.....	5
สรุปและวิจารณ์ผล.....	11
เอกสารอ้างอิง.....	12
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	13

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 จำนวนยีสต์หมักที่ใช้น้ำตาลไซโลสได้ที่อุณหภูมิต่างๆ.....	10
ตารางที่ 2 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากยีสต์ที่สามารถคัดแยกได้จากที่ต่างๆ.....	10

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จากทรายที่เก็บจากเกาะเสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี บนผิวหน้าอาหารแข็ง YMA.....	5
ภาพที่ 2 ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จากดินที่เก็บจากวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี บนผิวหน้าอาหารแข็ง YMA.....	6
ภาพที่ 3 ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จาก Lab Biofuel Production by Biocatalyst Research Unit จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บนผิวหน้าอาหารแข็ง YMA.....	7
ภาพที่ 4 ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จาก โรงงานน้ำตาลครบุรี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา บนผิวหน้าอาหารแข็ง YMA.....	8
ภาพที่ 5 ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำข้าวฟ่างที่เก็บจากไร่สุวรรณ จังหวัดสระบุรี บนผิวหน้าอาหารแข็ง YMA.....	9

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ป่าธรรมชาติเป็นแหล่งของความหลากหลายทางพันธุกรรม แต่ในปัจจุบันป่าธรรมชาติได้ถูกทำลายจนเสื่อมโทรม จึงต้องวางแผนจัดการเพื่อปรับปรุงพื้นที่ป่าให้คืนสภาพ ซึ่งการปรับปรุงคุณภาพดินก็มีส่วนสำคัญ การที่ดินจะมีความสมบูรณ์ได้ ต้องอาศัยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากอินทรีย์วัตถุที่ทับถมกันให้เป็นสารอินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในการฟื้นฟูสภาพดินให้มีความสมบูรณ์ ดังนั้นการศึกษากลุ่มประชากรของจุลินทรีย์ในดินจึงเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญในการจัดการปรับปรุงพื้นที่ป่า เพื่อแก้ไขสภาพป่าเสื่อมโทรมที่เป็นอยู่ให้มีสภาพดั้งเดิม จุลินทรีย์ต่างๆ ในดินจึงเป็นดัชนีที่บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของการฟื้นฟูสภาพดินว่ามีความสมบูรณ์ และคงทนยาวนานเพียงใด นอกจากนี้เชื้อราในดินที่มีความสามารถในการย่อยสลายบางชนิดสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาพันธุศาสตร์และอาจนำมาพัฒนาให้เกิดประโยชน์กับมนุษย์ได้

ดินเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของจุลินทรีย์มากมายหลายชนิด ประกอบไปด้วย แบคทีเรีย รา เชื้อแอกติโนมัยสีท สาหร่าย โปรโตซัว และไวรัส นอกจากนี้แล้วในดินยังมีสัตว์หน้าดิน และแมลงหน้าดินต่างๆ สิ่งมีชีวิตเหล่านี้มีความสัมพันธ์กันในระบบนิเวศของดิน ส่วนใหญ่แล้วดินเกิดจากการสลายตัวและผุพังของแร่หินต่างๆ โดยอิทธิพลจากธรรมชาติ เช่น ความร้อน ความเย็น กระแสน้ำ และการทับถมของซากสิ่งมีชีวิตที่เน่าเปื่อยผุพัง ซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ในดิน จุลินทรีย์เหล่านี้จึงมีบทบาทสำคัญในการเกิดความอุดมสมบูรณ์ของดิน จำนวนของจุลินทรีย์ในดินขึ้นอยู่กับอาหารที่มีประโยชน์ในดิน ความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมในดิน

จุลินทรีย์ในดิน เช่น แบคทีเรียจัดเป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่พบจำนวนมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในหนึ่งกรัมของดินที่อุดมสมบูรณ์มีแบคทีเรียมากถึงหนึ่งแสนถึงพันล้านโคโลนีต่อกรัมดิน มีหน้าที่ในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์ ผลิตฮิวมัส เปลี่ยนแปลงแร่ธาตุในดินให้เป็นประโยชน์ต่อสิ่งมีชีวิตทั้งจุลินทรีย์เองและพืช แบคทีเรียบางชนิดเป็นโรคพืช แบคทีเรียที่พบในดินโดยทั่วไป มีรูปร่าง 3 แบบคือ แบบกลม แบบแท่ง และแบบเกลียว แบคทีเรียเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในดินที่มีอินทรีย์วัตถุ มีความชื้นพอสมควร และค่าความเป็นกรดต่างอยู่ระหว่าง 5.5-9 ในบริเวณรากพืชจะพบแบคทีเรียมากกว่าในบริเวณที่ไกลออกไป กิจกรรมของแบคทีเรียในดินมีมากมายแต่ที่มีความสำคัญต่อระบบนิเวศ คือ การเป็นผู้ย่อยสลายอินทรีย์วัตถุในดินทำให้อยู่ในรูปที่พืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ราเป็นจุลินทรีย์ที่มีจำนวนรองลงมาจากแบคทีเรีย เส้นใยของเชื้อรายาวเป็นสิบถึงร้อยเมตรต่อกรัมของดินที่อุดมสมบูรณ์ มีบทบาทในการย่อยสลายซากพืชซากสัตว์รวมถึงฮิวมัสในดิน บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคในสิ่งมีชีวิต บางชนิดทำลาย nematode ซึ่งเป็นศัตรูพืช ดำรงชีวิตได้โดยการดูดซึมสารอินทรีย์จากการย่อยภายนอกเซลล์ มีรูปร่างเป็นเส้นใย หรือเป็นเซลล์เดี่ยว จำเป็นต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต เชื้อราส่วนใหญ่เจริญเติบโตได้ดีในดินที่เป็นกรด เชื้อแอกติโนมัยสีทเป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะสารพันธุกรรมคล้ายแบคทีเรียและมีลักษณะสารพันธุกรรมคล้ายแบคทีเรียและมีลักษณะของผนังเซลล์เชื้อรา ในการจัดจำแนกยังคงจัดเป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในการดำรงชีวิต ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ มักอยู่รวมกันเป็นเส้นสาย สามารถเจริญเติบโตได้ในดินที่เป็นกรดถึงเป็นด่าง ประมาณ 5.5-10.0 ย่อยสลายสารที่แบคทีเรียและเชื้อราย่อยสลายได้ยาก เช่น ไขมัน โคติน วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น ชังข้าวโพด หญ้า ขี้เลื่อย เศษไม้และขานอ้อย ลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วย เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน ซึ่งพืชแต่ละชนิดจะมีปริมาณแตกต่างกันไป โดยทั่วไปเซลลูโลสซึ่งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคสจะมีปริมาณมากที่สุด คือ 35-50% รองลงมา คือ เฮมิเซลลูโลส มี 20-35% ซึ่งเฮมิเซลลูโลส

เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลหลายชนิดโดยไซโลสที่เป็นน้ำตาลคาร์บอนห้าอะตอมจะเป็นองค์ประกอบที่พบมากที่สุด และลิกนินมี 15-25% ไม่สามารถย่อยให้เป็นน้ำตาลได้

ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในความสามารถการย่อยสลายโดยเฉพาะเศษวัสดุในระบบป่าไม้ สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้กับมวลมนุษย์ในหลายๆด้าน เช่น การนำมาทำเป็นหัวเชื้อปุ๋ยอินทรีย์ หรือ ประโยชน์ในด้านการผลิตพลังงานชีวมวลจากกิจกรรมของจุลินทรีย์เหล่านี้ต่อไป

บทความวิจัยที่เกี่ยวข้อง

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

พื้นที่สำรวจและเก็บตัวอย่าง

ทำการวิจัยในหน่วยปฏิบัติการวิจัยเชื้อเพลิงชีวภาพด้วยตัวเร่งชีวภาพจากตัวอย่างจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้จากดินในพื้นที่วังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี เกาะเสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

วัตถุประสงค์ของโครงการ

คัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการย่อยสลายเซลลูโลส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้จุลินทรีย์ที่สามารถใช้ไซโลสเพื่อการผลิตเอทานอล

วิธีดำเนินการศึกษา

1) คัดกรองยีสต์ที่ทนร้อนที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล

1.1) คัดกรองยีสต์ทั้งหมด

คัดกรองยีสต์โดยชั่งตัวอย่างแต่ละตัวอย่างมา 10 กรัม แล้วเจือจาง ด้วย 0.85% (w/v) NaCl ปริมาตร 90 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ทำ serial dilutions จากนั้นปิเปตความเจือจางที่เหมาะสมมา 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยทั่วผิวน้ำอาหาร yeast extract-malt extract (YM) agar (Laplace *et al.*, 1993) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหาร มาเขียนบนอาหารชนิดเดิม เพื่อแยก pure colony

1.2) คัดกรองยีสต์ที่มีความสามารถในการใช้ไซโลส

นำยีสต์ที่คัดกรองได้เลี้ยงใน YM medium ไปบ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และวัดการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Zenyth 200rt spectrophotometer ให้มีค่าเท่ากับ 0.4 นำยีสต์ที่เจริญใน YM medium ความเข้มข้น 5% เลี้ยงใน xylose medium บ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเพื่อนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller *et al.*, 1960) และตรวจหาปริมาณเอทานอลด้วย Gas Chromatography รุ่น GC-2010A (Shimadzu, Japan)

1.3) คัดกรองสายพันธุ์ยีสต์ที่ทนร้อน

นำยีสต์ที่สามารถใช้ไซโลสได้เลี้ยงใน YM medium ไปบ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และวัดการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลวที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Zenyth 200rt spectrophotometer ให้มีค่าเท่ากับ 0.4 นำยีสต์ที่เจริญใน YM medium ความเข้มข้น 5% เลี้ยงใน xylose medium นำไปบ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสเพื่อนำไปหาปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller *et al.*, 1960) และตรวจหาปริมาณเอทานอลด้วย Gas Chromatography รุ่น GC-2010A (Shimadzu, Japan)

2) ทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่ทนร้อน

ใช้ yeast extract peptone dextrose (YPD) liquid medium ที่ดัดแปลงมาจาก Osho (2005) ซึ่งปรับ พีเอชของอาหารให้เท่ากับ 5.5 ในการทดสอบความสามารถการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่ทนร้อน โดยเลี้ยงยีสต์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรในอาหาร 7 มิลลิลิตร บ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 วัน ผลผลิตของเอทานอลที่เกิดขึ้นจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography รุ่น GC-2010A (Shimadzu, Japan) โดยผลผลิตมวลรวมของผลิตภัณฑ์คำนวณออกมาเป็น กรัมต่อลิตร

3) ทดสอบความสามารถในการทนต่อเอทานอลของยีสต์ที่ทนร้อน

อาหารที่ใช้สำหรับทดสอบความสามารถในการทนต่อเอทานอลได้ดัดแปลงมาจาก Osho (2005) ซึ่งจะใช้ YPD liquid medium โดยอาหาร YPD ซึ่งเติมเอทานอลลงในอาหารจะแปรผันความเข้มข้นของเอทานอลเป็น 5%, 10%, 15%, 20% และ 25% นำไปบ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเป็นเวลา

5 วัน ซึ่งวัดการเจริญเติบโตของเชื้อที่ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรด้วยเครื่อง Zenyth 200rt spectrophotometer

4) ผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักด้วยยีสต์ที่คัดแยกได้โดยใช้ฟางข้าวเป็นวัตถุดิบในการผลิต

4.1) ปรับสภาพวัตถุดิบด้วยวิธีทางกายภาพ

นำฟางข้าวไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นตัดให้มีขนาดเล็กลง บดด้วยเครื่องปั่นและเครื่องบดละเอียดตามลำดับ แล้วนำไปร่อนผ่านตะแกรงกรองจนได้เป็นผง

4.2) กำจัดลิกนินในฟางข้าว

เติมแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (NH_4OH) ความเข้มข้น 15% โดยปริมาตรลงในฟางข้าวที่ได้จากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบบรรจุในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร ใช้อัตราส่วนฟางข้าวต่อสารละลายแอมโมเนียม ไฮดรอกไซด์ 1 ต่อ 30 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีการเขย่าทุกๆ 2 ชั่วโมง จากนั้นปรับพีเอชให้เป็นกลางด้วยกรดไฮโดรคลอริก และนำมากรองโดยใช้กระดาษกรอง ส่วนที่เป็นของแข็งจะนำไปล้างด้วยน้ำกรอง 3 ครั้ง (อัสมา, 2550)

4.3) ผลิตเอนไซม์ไซแลเนสและวัดการทำงานของเอนไซม์ไซแลเนส

นำปลายเส้นใยของเชื้อรา *Trichoderma reesei* TISTR 3081 บนอาหารกึ่งแข็ง PDA ใส่ลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตไซแลเนส (สุมาลี, 2539) บ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน กรองเส้นใยออกด้วยกระดาษกรอง นำของเหลวที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เก็บส่วนใสที่เป็น crude enzyme มาวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์โดยวัดแอกทิวิตีด้วยวิธีที่ดัดแปลงมาจากวิธีของ Ghose (1987)

4.4) ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสและวัดการทำงานของเอนไซม์เซลลูเลส

นำปลายเส้นใยของเชื้อรา *T. reesei* TISTR 3081 บนอาหารกึ่งแข็ง PDA ใส่ลงในอาหารเหลวสำหรับผลิตเซลลูเลส ซึ่งดัดแปลงมาจากสูตรของ Mandels และ Weber (1969)

4.5) ผลิตเอทานอล

นำฟางข้าวที่บดเป็นผงและทำการกำจัดลิกนินแล้วปริมาณ 1.2 กรัม และใช้ไซแลเนสปริมาณ 0.6 กรัม เป็นตัวเปรียบเทียบ ทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ เติมสารสกัดจากยีสต์ปริมาณ 0.45 กรัม สารสกัดจากมอลต์ปริมาณ 0.45 กรัม และแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0.75 กรัม โดยละลายในสารละลายโซเดียมซิเตรต บัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ pH 5.0 ปริมาตร 7.5 มิลลิลิตร หลังจากนั้นถ่ายเชื้อ 5% ใส่ลงในพลาสติก เติมเซลลูเลสและไซแลเนสที่กรองแล้วปริมาณ 72 และ 1,440 ยูนิต แล้วปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 150 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปบ่มในภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 7 วัน โดยศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* ที่มาจากทีมวิจัยในกลุ่มเดียวกัน, ยีสต์ที่คัดแยกได้ และเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* กับยีสต์ที่คัดแยกได้

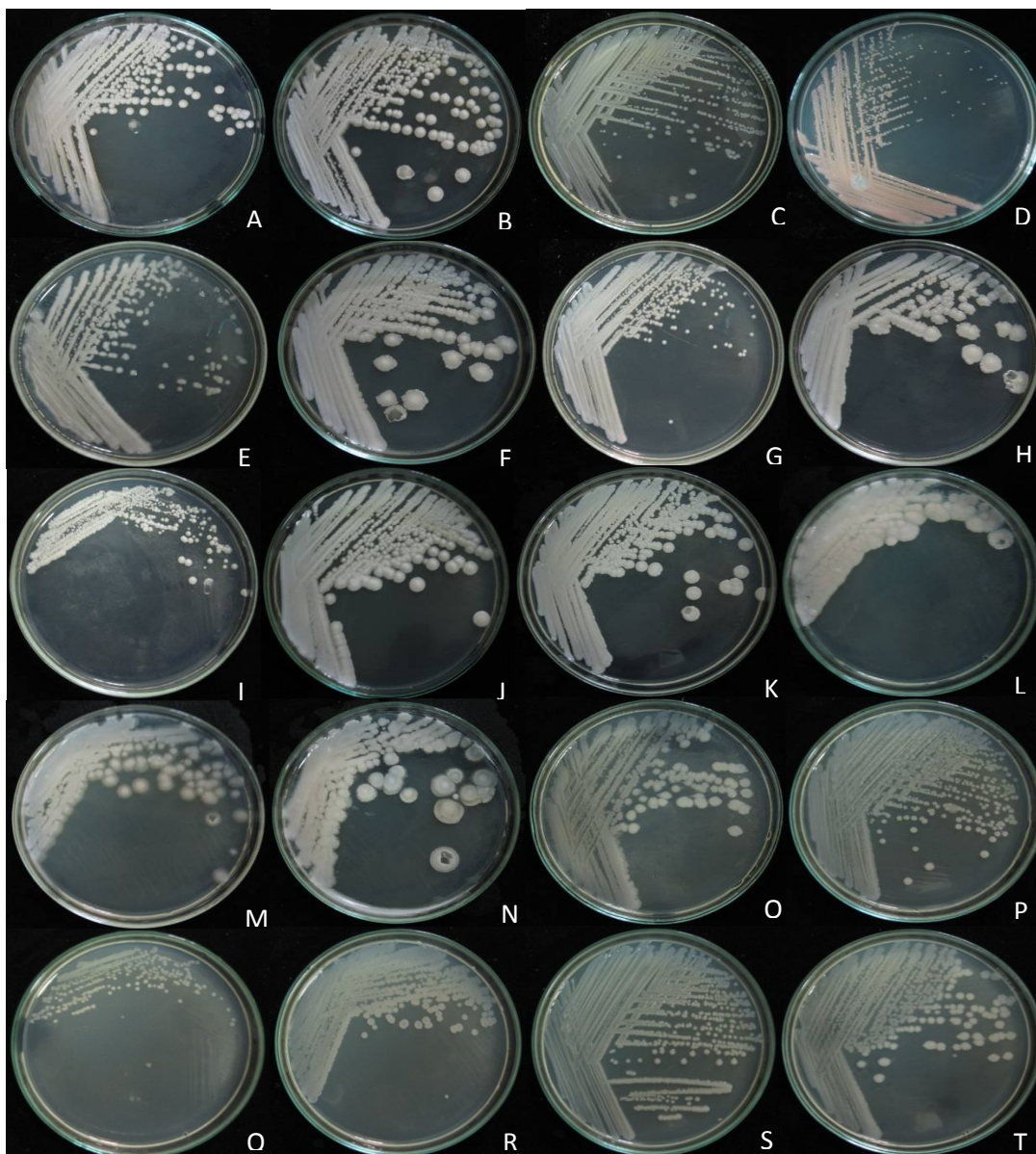
4.6) วิเคราะห์เอทานอลที่ได้จากการหมัก

เอทานอลที่เกิดขึ้นจากการหมัก จะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วย Gas Chromatography รุ่น GC-2010A (Shimadzu, Japan) โดยใช้คอลัมน์ DB-WAX (Agilent Technologies, USA) และ Flame Ionization Detector ผลผลิตมวลรวมของผลิตภัณฑ์คำนวณออกมาเป็นกรัมต่อลิตร

ผลการศึกษา

1) ยีสต์ทั้งหมดและทำให้บริสุทธิ์

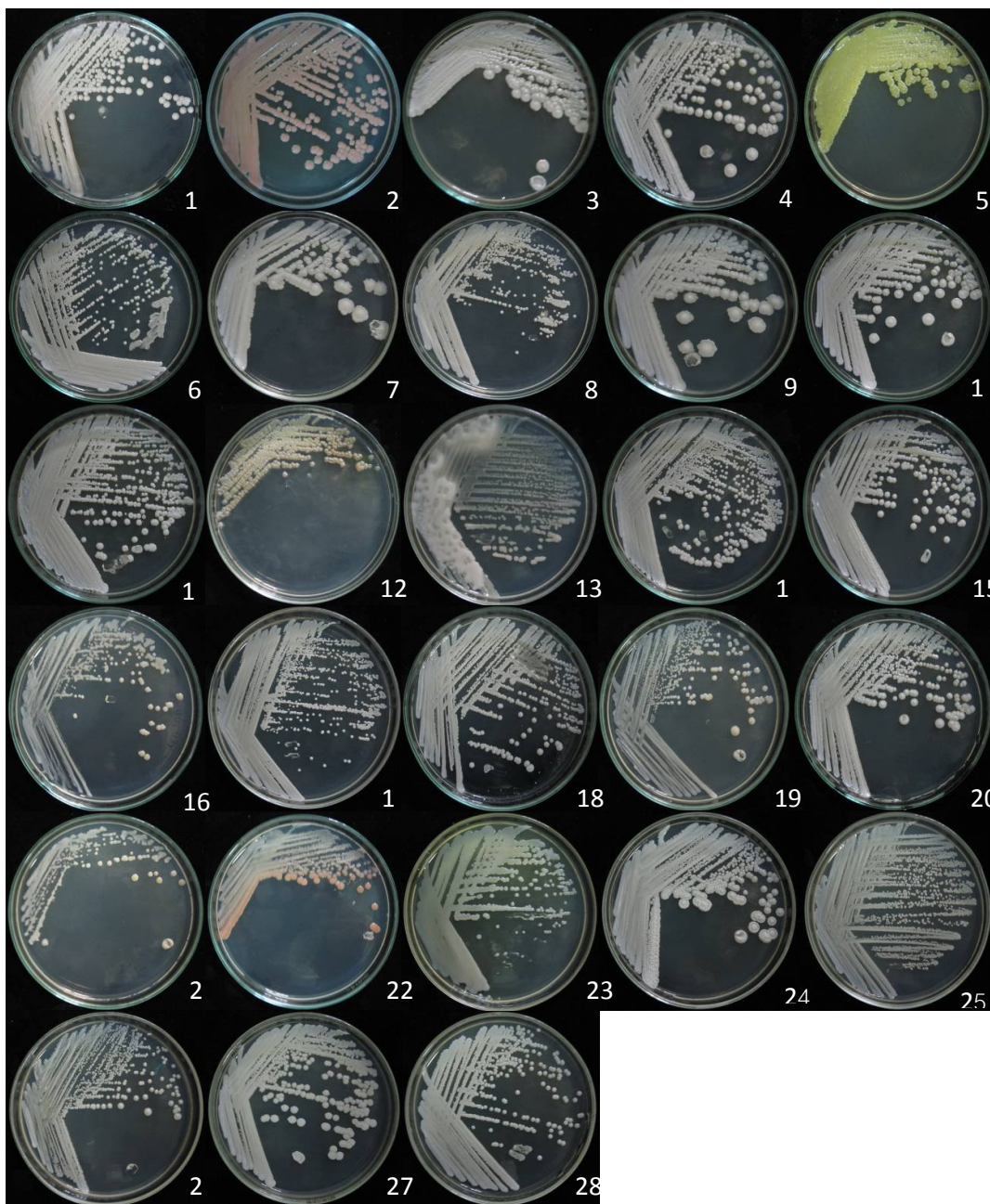
1.1) ยีสต์ทั้งหมดที่สามารถคัดกรองได้จากทรายที่เก็บจากเกาะเสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี จำนวน 20 สายพันธุ์ แสดงดังรูปที่ 1



ภาพที่ 1 ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จากทรายที่เก็บจากเกาะเสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YMA

A: KCH 1-42, B: KCH 086-41-1, C: KCH 086-41-2, D: KCH 086-3-1, E: KCH 086-8-1, F: KCH 086-6-2, G: KCH 086-2-1, H: KCH 086-41, I: KCH 086-40-1, J: KCH 086-40-2, K: SRY 19-3-2, L: SRY 19-3-3P, M: SRY 4-3, N: SRY 6-2, O: SRY 3-2, P: SRY 3-3, Q: SRY 6-3, R: SRY 14-3, S: SRY 19-3, T: SRY 19-3W

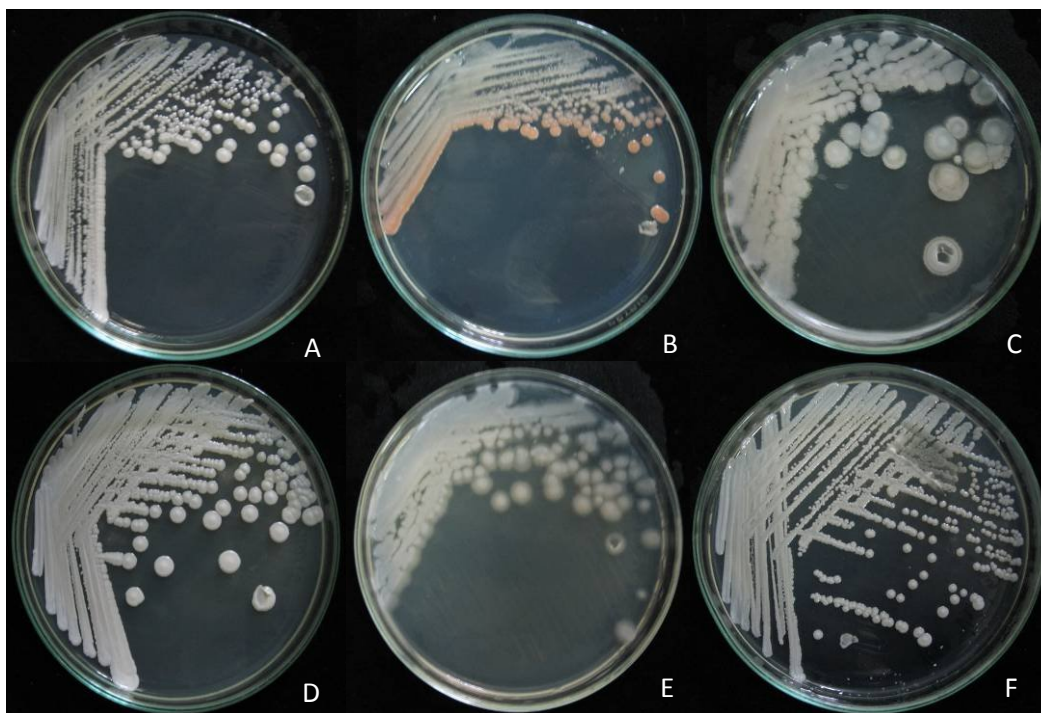
2.2) ยีสต์ทั้งหมดที่สามารถคัดกรองได้จากดินที่เก็บจากวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี จำนวน 28 สายพันธุ์ แสดงดังรูปที่ 2



ภาพที่ 2 ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จากดินที่เก็บจากวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี บนผิวหน้าอาหารแข็ง YMA

1: WKA 3-1, 2: WKA 3-2, 3: WKA 2-5, 4: WKA 2-6, 5: WKA 2-7, 6: WKA 2-9, 7: WKA 2-10, 8: WKA 2-11, 9: WKA 3-13, 10: WKA 3-14, 11: WKA 3-15, 12: WKA 3-18, 13: WKA 3-19, 14: WKA 3-20, 15: WKA 1-21, 16: WKA 1-23, 1 : WKA 1-24, 18: WKA 1-21, 19: WKA 3-25-2, 20: WKA 1-27, 21: WKA 1-28, 22: WKA 3-29-1, 23: WKA 3-29-2, 24: WKA 3-32, 25: WKA 3-34, 26: WKA 3-36, 27: WKA 3-37, 28: WKA 3-38

2.3) ยีสต์ทั้งหมดที่สามารถคัดกรองได้จาก Lab Biofuel Production by Biocatalyst Research Unit จำนวน 6 สายพันธุ์ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 3



ภาพที่ 3 ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จาก Lab Biofuel Production by Biocatalyst Research Unit จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย บนผิวหน้าอาหารแข็ง YMA A: CHU 3-1-2, B: CHU 3-2, C: CHU 3-3, D: CHU 1-1, E: CHU 1-2, F: CHU 3-1

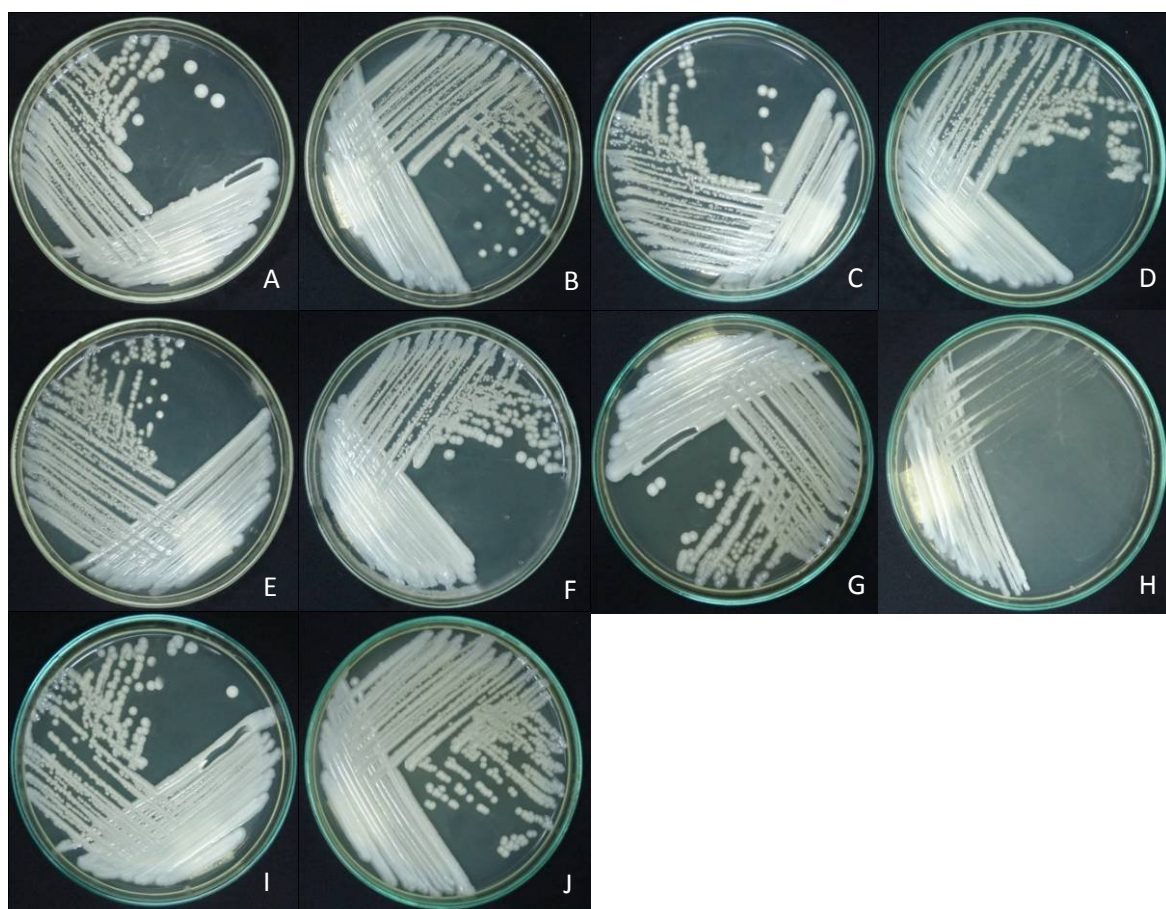
2.4) ยีสต์ทั้งหมดที่สามารถคัดกรองได้จากกากอ้อยที่เก็บจากโรงงานน้ำตาลครบุรี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา จำนวน 20 สายพันธุ์ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 4



ภาพที่ 4 ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จาก โรงงานน้ำตาลครบุรี อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา บน
ผิวหน้าอาหารแข็ง YMA

A: SBN 3-1, B: SBN 3-2, C: SBN 3-3, D: SBN 3-4, E: SBN 3-5, F: SBN 2-6, G: SBN 2-7, H: SBN 2-8, I: SBN 2-9, J: SBN 2-10, K: SBN 2-11, L: SBN 1-17, M: SBN 1-18, N: SBN 1-19, O: SBN 1-20, P: SBN 1-21, Q: SBN 1-22, R: SBN 1-29, S: SBN 1-30, T: SBN 1-31

2.5) ยีสต์ทั้งหมดที่สามารถคัดกรองได้จากน้ำข้าวผางที่เก็บจากไร่อสุพรรณ จังหวัดสระบุรี จำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 5



ภาพที่ 5 ลักษณะยีสต์ที่คัดแยกได้จากน้ำข้าวผางที่เก็บจากไร่อสุพรรณ จังหวัดสระบุรี บนผิวหน้าอาหารแข็ง YMA

A: RWS 1-12, B: RWS 1-13, C: RWS 1-14, D: RWS 1-15, E: RWS 1-16, F: RWS 1-23, G: RWS 1-24, H: RWS 1-25, I: RWS 1-26, J: RWS 1-27

2.6) การคัดกรองยีสต์ที่ร้อนที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้
สามารถคัดกรองยีสต์ที่ร้อนที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนยีสต์ที่ร้อนที่สามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ที่อุณหภูมิต่างๆ

Source	Isolate	Xylose- utilization	Thermotolerant				
			30° C	37° C	40° C	45° C	50° C
Koh Samesan, Chon Buri	20	18	18	7	7	1	0
Kanchanaburi	28	13	13	6	5	0	0
Lab Biofuel Production by Biocatalyst Research Unit	6	2	2	1	0	0	0
Nakhonratchasima	20	12	20	20	20	13	9
Saraburi	10	6	10	10	10	8	8
Total	84	51	63	44	41	22	17

2.7) ทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่ร้อน

การทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่ร้อน พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ WKA 3-36 ซึ่งสามารถคัดกรองได้จากวังเขมร จังหวัดกาญจนบุรี สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุด คือ 4.67 กรัมต่อลิตร โดยมีเปอร์เซ็นต์เอทานอลเท่ากับ 55.20

ตารางที่ 2 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากยีสต์ที่สามารถคัดแยกได้จากที่ต่างๆ

Stains	Ethanol (g/L)	Reducing sugar (g/L)	Used sugar (g/L)	g ethano/ g sugar	Ethanol yield* (%)
<i>P. stipitis</i>	5.27	1.28	18.72	0.28	55.20
<i>S. cerevisiae</i>	0	17.14	2.86	0	0
WKA 3-36	4.67	1.86	18.14	0.26	50.48
WKA 3-28	2.01	6.60	13.40	0.15	29.41
WKA 3-20	1.80	1.96	18.04	0.10	19.56
WKA 1-34	0.83	5.76	14.24	0.06	11.76
WKA 3-15	0.44	11.20	8.80	0.05	9.62

สรุปและวิจารณ์ผล

การผลิตเอทานอลทั่วโลกในปัจจุบันนี้ใช้วัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีราคาสูงทำให้ต้นทุนในการผลิตเอทานอลมีราคาสูงตามไปด้วย ดังนั้นการผลิต เอทานอลจากแหล่งพลังงานทางเลือก (Alternative energy sources) แหล่งใหม่เช่น ชานอ้อย เศษไม้ ซังข้าวโพด ฟางข้าว เป็นสิ่งที่น่าสนใจเพราะวัสดุเหล่านี้เป็นวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและมีราคาถูก ซึ่งวัสดุเหล่านี้เรียกว่า Lignocellulosic material วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล มีองค์ประกอบที่เป็นเซลลูโลส 39%, เฮมิเซลลูโลส 27% และลิกนิน 12% ซึ่งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส เมื่อผ่านการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลที่สามารถนำมาหมักด้วยจุลินทรีย์แล้วให้ผลผลิตเป็น เอทานอลได้ น้ำตาลที่ได้จากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสมีส่วนประกอบที่สำคัญคือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลไซโลสซึ่งมีคาร์บอน 6 และ 5 อะตอมตามลำดับ ซึ่งในวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสจะมีน้ำตาลกลูโคสประมาณ 30% และมีน้ำตาลไซโลสประมาณ 17% ของน้ำหนักแห้ง แต่ด้วยธรรมชาติของยีสต์จะสามารถนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อได้ผลผลิตเป็นเอทานอลได้มากกว่าการใช้น้ำตาลไซโลส ดังนั้นการคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตเอทานอลได้นั้นจึงเป็นสิ่งสำคัญ กระบวนการผลิตเอทานอลที่นิยมในปัจจุบันคือ กระบวนการผลิตแบบ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) โดยรวมขั้นตอนการย่อยครั้งสุดท้าย เพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาล พร้อมกับการหมักด้วยยีสต์ในขั้นตอนเดียวกัน แต่กระบวนการ SSF มีการใช้อุณหภูมิสูงซึ่งสามารถทำลายเซลล์ยีสต์ได้ เพราะฉะนั้นยีสต์ที่ใช้ในกระบวนการหมักควรมีความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงจะทำให้ประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้น จากงานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการใช้น้ำตาลไซโลสจากตัวอย่างกากอ้อยซึ่งเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสได้ทั้งหมด 12 ไอโซเลท ซึ่งมี 12 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และมี 8 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ SBK 3-2 สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงที่สุด ซึ่งงานวิจัยนี้จึงสามารถคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการนำไซโลสเข้าสู่กระบวนการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากมวลชีวภาพไซโลสต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Guimarães, L. H. S., Peixoto-Nogueira, S. C.; Michelin, M.; Rizzatti, A. C. S., Sandrim, V. C., Zanoelo, F. F., Ana Carla M.M. Aquino, A. C. M. M., Junior, A. B., and Polizeli, M. L. T. M. 2006. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. Brazilian Journal of Microbiology 37: 474-480.
- MacKenzie, C. R., Bilous, D., Schneider, H., and Johnson, K. G. 1987. Induction of cellulolytic and xylanolytic enzyme systems in *Streptomyces* spp. Applied and Environmental Microbiology 53: 2835-2839.
- Panagiotou, G., Kekos, D., Macris, B. J., and Christakopoulos, P. 2003. Production of cellulolytic and xylanolytic enzymes by *Fusarium oxysporum* grown on corn stover in solid state fermentation. Industrial Crops and Products 18: 37-45.
- Ryu, D. D. Y., and Mandels, M. 1980. Cellulases: biosynthesis and applications. Enzyme and Microbial Technology 2: 91-102.
- Wyman, C. E. 1994. Ethanol from lignocellulosic biomass: Technology, economics, and opportunities. Bioresource Technology 50: 3-15.

ประวัตินักวิจัย

1. (ชื่อ-สกุล ภาษาไทย) นาย วรวุฒิ จุฬาลักษณานุกุล
(ชื่อ-สกุล ภาษาอังกฤษ) Mr. Warawut Chulalaksananukul
2. การทำงาน
ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์ ดร.
สถานที่ทำงาน ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10330
โทรศัพท์ 02-218-5482 โทรสาร 02-218-5482
e-mail warawut.c@chula.ac.th
3. ที่อยู่ (ที่บ้าน) 248/10 หมู่บ้านชวนชื่นพาร์ควิลล์ ซอย6/1 แขวงศาลาธรรมสพน์ เขตทวีวัฒนา
จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10170
โทรศัพท์ 02-885-0903 โทรสาร 02-218-5482
e-mail warawut.c@chula.ac.th
4. ประวัติการศึกษา
 - 4.1 ปริญญาตรีสาขา พันธุศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ 2523
 - 4.2 ปริญญาโทสาขา พฤกษศาสตร์ สถาบัน จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีที่จบ 2527
 - 4.3 ปริญญาเอกสาขา Ph.D. (Microbiology-Biotechnology) สถาบัน INSA, Toulouse ปีที่จบ 2537
 - 4.4 อื่น ๆ (ระบุ) D.E.A. (Microbiology) INSA, Toulouse, France, พ.ศ. 2533 (1990)
5. สาขาวิชาที่เชี่ยวชาญ (ตอบได้มากกว่า 1) Biofuels, Biocatalysts, Biotechnology
6. ผลงานวิจัย (ปี 2005-ปัจจุบัน)
ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติ (โปรดระบุทั้งชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปีที่ตีพิมพ์ ฉบับที่ เล่มที่ เลขหน้า และค่า impact factor)
Charoenpanich, J., **Chulalaksananukul, W.**, and Yongvanich, T. 2005. Synthesis of amyl acetate by immobilized lipases from *Mucor mihei* and *Aspergillus niger* in n - hexane. *J. Sci. Res. Chula Univ.* **Impact factor 0.036.**
Chokchaichamnankit, P., **Chulalaksananukul, W.**, Phengklai, C., Anamthawat-Jónsson, K. 2007. Karyotypes of some species of *Castanopsis*, *Lithocarpus* and *Quercus* (Fagaceae) from Khun Mae Kuong Forest in Chiang Mai province, northern Thailand. *Thai Forest Bulletin* (Botany) 35: 38-44. **Impact factor 0.049.**
Suwannarangsee, S., Moulis, C., Potocki-Veronese, G., Monsan, P., Remaud-Simeon, M., and **Chulalaksananukul, W.** 2007. Search for dextranucrase minimal motif involved in dextran binding. *FEBS letter* 581: 4675-4680. **Impact factor 3.842.**
Chokchaichamnankit, P., Anamthawat-Jonsson, K., **Chulalaksananukul, W.** 2007. Chromosomal mapping of 18S-25S and 5S ribosomal genes on 15 species of Fagaceae from northern Thailand. *Silvae Genetica* (J. D. Sauerländer's Verlag) 57: 5-13. **Impact factor 0.372**

- Chokchaichamnankit, P., **Chulalaksananukul, W.**, Phengklai, C., Anamthawat-Jónsson, K. 2007. Karyotypes of some species of *Castanopsis*, *Lithocarpus* and *Quercus* (Fagaceae) from Khun Mae Kuong Forest in Chiang Mai province, northern Thailand. *Thai Forest Bulletin* (Botany) 35: 38-44. **Impact factor 0.049.**
- Chokchaichamnankit, P., **Chulalaksananukul, W.**, Phengklai, C., Anamthawat-Jónsson, K. 2008. Species and genetic diversity of Fagaceae in Chiang Mai, northern Thailand, based on ISSR markers. *Journal of Tropical Forest Science* (Forest Research Institute Malaysia) 20: 8-18. **Impact factor 0.160.**
- Virunanon, C., Chantaroopamai, S., and **Chulalaksananukul, W.** 2007. Solventogenic-cellulolytic Clostridia from 4-step-screening process in Agricultural Waste and Cow Intestinal Tract. *Anaerobes* . Nov 7. **Impact factor 1.561.**
- Winayanuwattikun, P., Kaewpiboon, C., Piriyananon, K., Tantong, S., Thakernkarnkit, W., **Chulalaksananukul, W.**, Yongvanich, T. 2008. Potential plant oil feedstock for lipase-catalyzed biodiesel production in Thailand. *Biomass and Bioenergy* 32 (12), pp. 1279-1286. **Impact factor 2.54.**
- P. Rattanapoltee, **W. Chulalaksananukul**, A.E. James, P.Kaewkannatre (2008) Comparison of Autotrophic and Heterotrophic cultivations of microalgae as a raw material for biodiesel production, *Journal of Biotechnology*, 136:S412. (Impact factor 2.565).
7. ผลงานวิชาการอื่นๆ (เช่น Proceeding ตำรา ฯลฯ)
- Poster and Oral Presentation (2005-2008)**
- Chulalaksananukul, W., Virunanon, P. and Soucaille, C. 2005. Screening of Cellulolytic and solvent producing Clostridium from natural resources in Thailand 14th European Biomass Conference&Exhibition Biomass for Energy Industry and Climate protection. 17-21 October 2005. Paris, France. p 1740-1741.
- Virunanon, C., Soucaille, P., Chulalaksananukul, W. 2005. *In silico* and *In vitro* Cel48A engineer in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. 10th Biological Science Graduate Congress, National University of Singapore, November 30 – December 2.
- Chokchaichamnankit, P., Chulalaksananukul, W., and Anamthawat-Jónsson K., Molecular and cytogenetic analysis of Fagaceae from northern Thailand. 8th International Congress of Plant Molecular Biology (ISPMB), Adelaide, Australia, August 20-25, 2006.
- Virunanon, C., Chulalaksananukul, W., Soucaille, P. 2006. *In silico* and *In vitro* Cel48A engineer in *Clostridium acetobutylicum* ATCC824. Clostridium IX, Rice University, Houston, USA, May18-21.
- Virunanon, C., Croux, C., Sabathe, F., Lopez, F., Girbal, L., Soucaille, P. and Chulalaksananukul, W. 2007. Two major cellulases of the *Clostridium acetobutylicum* cellulosome are active on crystalline cellulose. 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 75: Oral presentation

- Piamtongkam, R. and Chulalaksananukul, W. 2007. Biodiesel production from triolein and methanol catalyzed by immobilized lipases. 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 92: Oral presentation
- Suwannarangsee, S., Moulis, C., Remaud-Simeon, M., and Chulalaksananukul, W. 2007. Engineering of new affinity tag for protein purification onto dextran supports (Sephacryl[®] S300HR). 12th Biological Sciences Graduate Congress 17-19 December 2007. University of Malaya. Malaysia. p. 113: Oral presentation (first prize oral presentation)
- Poolsup, S. and Chulalaksananukul, W. 2008. Comparison of ethanol production from five weed species in Thailand by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis stipitis*, The 16th Annual Academic Meeting of the Faculty of Science. March 13-14, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, 7.
- Wongwatanapaiboon, J. and Chulalaksananukul, W. 2008. Cellulosic ethanol production from grasses in Thailand by *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia stipitis*, The 16th Annual Academic Meeting of the Faculty of Science. March 13-14, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand, 6.
- Wongwatanapaiboon, J., Kangvansaichol, K., Burapatana, V. and Chulalaksananukul, W. 2008. Analysis of grasses in Thailand for bioethanol production, 4th Naresuan Research Conference. July 28-29, Phitsanulok, Thailand, 261.
- P.Rattanapoltee, W.Chulalaksananukul, S.Jinsiriwanit, P.Kaewkannetra (2008) Heterotrophic growth of *Chlorella vulgaris* TISTR 8580 for increasing of storage microalgal oil. In The 2nd International Conference on Science and Technology for Sustainable Development of the Greater Mekong Sub-region (STGMS), 2-3 October 2008, Hanoi Agricultural University, Gialam, Hanoi, Vietnam.
- P.Rattanapoltee, W.Chulalaksananukul, A.E. James, P.Kaewkannatre (2008) Comparison of Autotrophic and Heterotrophic cultivations of microalgae as a raw material for biodiesel production, In The 13th International Biotechnology Symposium (IBS 2008) on Biotechnology for the Sustainability of Human Society, 12-17 October 2008, Dalian, China.
- Chulalaksananukul, W., Virunanon, C., Soucaille, P. 2005. Screening of Cellulolytic and Solvent Producing Clostridia from Natural Resources in Thailand. Biomass Conference Program and Abstract. Paris, France
- Marie Demuez, Olivier Guerrini Sophie Mondeil, Chompunuch Virunanon, Florence Saint-Prix, Christian Croux, Philippe Soucaille et Laurence Girbal. *Clostridium acetobutylicum* : une usine à biohydrogène. Posters Résumés – MicrobioToul 2006 – 11 Avril.
- Virunanon, C. Croux, C., Soucaille, P., Chulalaksananukul, W. 2007. Optimization of 2, 2-Bicinchoninic acid methods for reducing-sugar detection in anaerobic cellulase activity

assay. International Conference on New Horizons in Biotechnology (NHBT-2007), NIST, Trivandrum, India, November 26-29.

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

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

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-นามสกุล (ภาษาไทย) ชมภูณช วิรุณานนท์

(ภาษาอังกฤษ) Chompunuch Virunanon

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ดร.

สถานที่ติดต่อ (ที่ทำงาน) ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โทรศัพท์/โทรสาร 02-218-5482

E-mail – address knutz2@hotmail.com

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

โทรศัพท์/โทรสาร 02-580-3396

ประวัติการศึกษา (ปริญญาตรี – เอก; สาขา และสถาบัน)

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

*เกียรตินิยมอันดับ 2

ผลงานวิจัย

ผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติและนานาชาติ

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

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

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

ชมภูณช วิรุณานนท์ และ วรวิทย์ จุฬาลักษณ์นกุล. 2009. เซลลูโลสโชม: กุญแจสำคัญสู่การผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.* ปีที่ 25 ฉบับที่ 2.

Monnat Theerachai, **Chompunuch Virunanon**, Jitra Piapukiew, Suphang Chulalaksananukul, Nussara Sinbuathong, and Warawut Chulalaksananukul. *NirK and nirS Nitrite Reductase Genes of non-agricultural forest soil in Thailand. World Journal of Microbiology and Biotechnology.* (accepted/in press) มี impact factor 1.082

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

ชญานุช วิรุณานนท์ และ วรุฒิ จุฬาลักษณ์นกุล. 2010. ชีวสารสนเทศ: ประโยชน์ในงานวิจัยทางชีวภาพ. *วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพา*. 15(2), 99-106.

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

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

ชญานุช วิรุณานนท์ จิราพร พวงแก้ว และ วรุฒิ จุฬาลักษณ์นกุล. 2011. ดีเอ็นเอที่เรียงและบทบาทในการแก้ปัญหาหมักในสภาวะแวดล้อม. *วารสารเกษตร*. ปีที่ 27. ฉบับที่ 3 ตุลาคม 2554.

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

การประชุมวิชาการนานาชาติ

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

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

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

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

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

Chompunuch Virunanon, Christian Croux, Fabrice Sabathé, Frédéric Lopez, Laurence Girbal, Philippe Soucaille, and Chulalaksananukul, W. 2007. Two of the three major cellulases of the cellulosome of *Clostridium acetobutylicum* are active on crystalline cellulose. 12th Biological Sciences Graduate Congress (BSGC) "Science Empowering Life", University of Malaya, Malaysia, December 17-19.

- Chompunuch Virunanon**, Christian Croux, Philippe Soucaille, and Warawut Chulalaksananukul. 2008. Gene-disruption process for cellulosome modification in *C. acetobutylicum* ATCC824. Biotechnology of Lignocellulose Degradation, Biomass Utilization and Biorefinery, Shima Spain Mura, Shima-Isobe, Japan, September 1-5.
- Chompunuch Virunanon**, Chanika Ouephanit, Vorakan Burapatana, and Warawut Chulalaksananukul. 2009. Biobutanol production from pineapple waste in Thailand. Abstarct in JSPS-NRCT Summer School: Biomass Energy in Asia, Bangkok, Thailand, February 21-23.
- Chompunuch Virunanon**, Warawut Chulalaksananukul, and Philippe Soucaille. 2010. Nucleotide sequence and structure of CelC-Lic-16 homologous, a α (1,3)-glucan hydrolase from marine algae isolated *Clostridium* sp. L2-50. International proceeding ในการประชุมวิชาการ International Conference on Biotechnology for Healthy Living.
- Chanika Ouephanit, **Chompunuch Virunanon**, Vorakan Burapatana, Warawut Chulalaksananukul. 2009. Butanol and Ethanol Production from Tapioca-starch Waste Water by Clostridia strains from 16SrDNA identification in Thailand. Genetics for National Energy Crisis 2009 Proceeding.
- Chanika Ouephanit, **Chompunuch Virunanon**, Warawut Chulalaksananukul. 2010. Factor effecting butanol production of *Clostridium* sp. National proceeding ในการประชุมวิชาการ Thailand research symposium 2010.
- Phanthipa Songsermpanit, **Chompunuch Virunanon**, Vorakan Burapatana and Warawut Chulalaksananukul. 2010. Anaerobic bacteria from cow dung for biofuels applications. International proceeding ในการประชุมวิชาการ International Conference on Biotechnology for Healthy Living.
- Chanika Ouephanit, **Chompunuch Virunanon**, Vorakan Burapatana, Warawut Chulalaksananukul. 2010. Biobutanol production from tapioca starch wastewater by *Clostridium* sp. International proceeding ในการประชุมวิชาการ International Conference on Biotechnology for Healthy Living.
- Panida Suriyapan, **Chompunuch Virunanon**, Supahng Chulalaksananukul, and Warawut Chulalaksananukul. 2011. Screening of Thermotolerant Xylose-Utilizing Yeasts for Ethanol Production. Kasetsart University graduate conference.
- Chompunuch Virunanon**, Chanika Ouephanit, Vorakan Burapatana, and Warawut Chulalaksananukul. 2011. Bio-ethanol Production from Starch Industrial Waste in Thailand. The 8th Asia Pacific Conference on Sustainable Energy and Environmental Technologies (APCSEET 2011). Adelaide, Australia, July 10-13. Pp. 102.