



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตกรดออกซาโลอะซิดจากยีสต์ทนร้อน *Issatchanchia* sp. S1
Oxaloacetic Acid Production by Thermotolerant *Issatchenkia* sp. S1



ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตกรดออกซาโลอะซิดจากยีสต์ทนร้อน *Issatchanchia* sp. S1
Oxaloacetic Acid Production by Thermotolerant *Issatchenkia* sp. S1

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รศ.ดร. โชคชัย วนภู

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2553-2554

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

สิงหาคม 2559

กิตติกรรมประกาศ

กระผมขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่สนับสนุนทุนวิจัยครั้งนี้ ขอขอบคุณ
นายรูปณวัชร หมีนแจ้ ที่ช่วยทำให้งานวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

รศ. ดร. โชคชัย วนฤ



บทคัดย่อ

การผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกจากยีสต์ทนร้อน *Issatchankia* sp. S1

ยีสต์ทนร้อน การหมัก กรดออกซาโลอะซิดิก

ในปัจจุบันกรดออกซาโลอะซิดิกมีบทบาททางด้านการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่หลากหลาย และมีราคาที่สูง การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกและการนำไปประยุกต์ใช้มีน้อยมาก ดังนั้นการศึกษการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกจากเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchankia* sp. สายพันธุ์ S1 จึงเป็นที่น่าสนใจ และนำไปสู่กระบวนการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิก โดยในการทดลองนี้มุ่งเน้นที่จะหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิก โดยยีสต์ *Issatchankia* sp. สายพันธุ์ S1 ที่ใช้ในการทดลองนี้ สามารถคัดแยกได้จากหญ้าหมัก เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และการวิเคราะห์ 18S rDNA พบว่ายีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 มีความใกล้เคียงกับ *I. orientalis* 99 % จากการศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ *Issatchankia* sp. S1 ในอาหาร enrich medium ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการเปรียบเทียบชนิดของแหล่งคาร์บอน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM พบว่า *Issatchankia* sp. S1 เจริญได้น้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี ซูโครส แลคโตส กลีเซอรอล แมนนิทอล มอลโตส แป้งมันสำปะหลังและแป้งมันฝรั่ง เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน พบว่าอาหารที่ใช้น้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ยีสต์สามารถเจริญได้ดี เมื่อทำการทดสอบการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกเบื้องต้นของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchankia* sp. S1 ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในอาหาร YM ที่มีองค์ประกอบของ น้ำตาลกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร สารสกัดยีสต์ 3 กรัมต่อลิตร สารสกัดมอลต์ 3 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร ทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการกวนที่ 200 รอบต่อนาที ในสภาวะที่ไม่ให้อากาศ พบว่า การเจริญสูงสุดอยู่ที่ 0.297 ± 0.001 ต่อชั่วโมง และสามารถผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกได้ 3.02 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม หลังจาก 24 ชั่วโมง ปริมาณของกรดออกซาโลอะซิดิกที่อยู่ในอาหารเหลวจะลดลง

จากนั้น ได้ทดสอบหาแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญโดยนำแหล่งอาหารคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลซูโครสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (AMG 300L) และเอนไซม์เทอร์มาไมว (Thermamyl® SC) ที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร มาเตรียมเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนที่ใช้สำหรับการหมัก โดยใช้อาหาร YM ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมอาหาร

100 มิลลิลิตร ทำการเติมหัวเชื้อที่ 5% โดยปริมาตร ทำการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน พบว่า อัตราการเจริญของเชื้อ *Issatchenkia* sp. S1 สูงสุดที่ 0.295 ± 0.025 ต่อชั่วโมง ในอาหารที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เทอร์มามิวเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน แต่กลับไม่พบการผลิตของกรดออกซาโลอะซิดิกในตัวอย่างที่ทำการทดลอง

เนื่องจากได้มีการย้ายห้องปฏิบัติการไปยังอาคารใหม่ในระหว่างดำเนินโครงการ แต่จากความผิดพลาดในขนย้าย และกระแสไฟฟ้าไม่เสถียร มีผลทำให้ตู้แช่ -70 องศาเซลเซียส ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ เชื้อที่ทำการเก็บไว้เกิดความเสียหายและมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย หลังจากนั้นได้มีการคัดแยกเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อดังกล่าว และทำการตรวจสอบ พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส รวมทั้งใช้เกลืออะซิเตตในความเข้มข้นต่ำเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน สามารถทนอุณหภูมิ และผลิตเอทานอลได้ที่สภาวะเดิมที่ใช้ในการทดลอง และมีลักษณะทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์เช่น ลักษณะของเซลล์ การเกิด pseudomycelium ความสามารถในการใช้น้ำตาล และความสามารถในการทนอุณหภูมิสูง ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับ *Issatchenkia* sp. S1 แต่ไม่พบการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกจากโคโลนีที่ทำการแยกได้ ด้วยการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (HPLC)



ABSTRACT

Oxaloacetic Acid Production by Thermotolerant *Issatchenkia* sp. S1

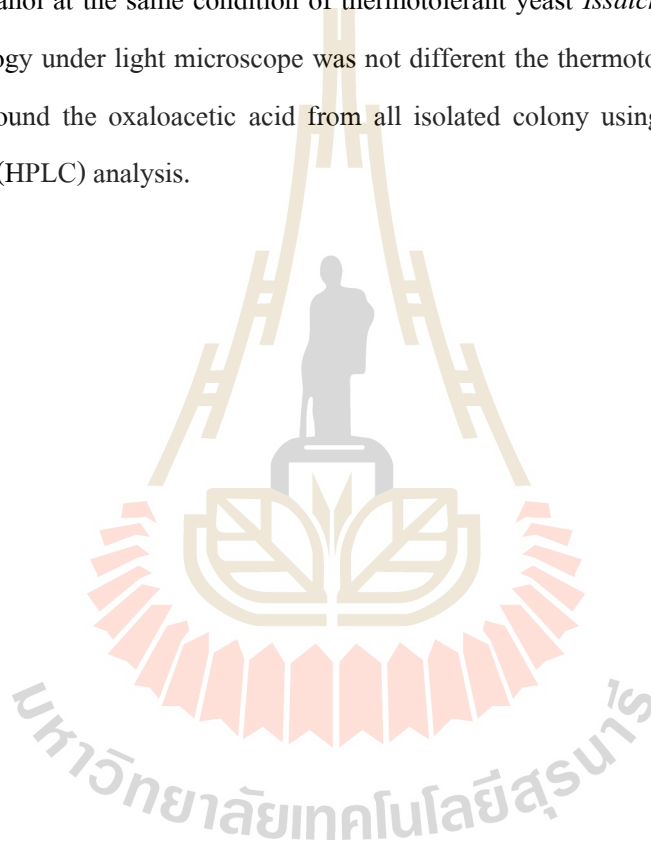
Thermotolerant yeast, Fermentation, Oxaloacetic acid

Nowadays, oxaloacetic acid has been an important chemical in life science research and its price is very expensive. Moreover, the research in oxaloacetic acid production and their application are not so much. Therefore, the production of oxaloacetic acid by thermotolerant yeast *Issatchenkia* sp. S1 is very impressive topic. Therefore, this study focuses on the optimization condition of oxaloacetic acid production by thermotolerant yeast *Issatchenkia* sp. S1. Thermotolerant yeast strain *I. orientalis* S1 was isolated from silage sample. According to the morphological, biochemical characterization and 18S rDNA analysis, the results showed the S1 strain has 99% similarity to *I. orientalis*. The optimum conditions for growth of thermotolerant *I. orientalis* S1 was determined in enrich medium at 40°C. The utilization of carbon sources by *Issatchenkia* sp. S1 was varied with sort of carbons supplemented in YM medium. *Issatchenkia* sp. S1 showed weakly grown in YM medium with sucrose, lactose, glycerol, manitol, maltose, cassava starch or potato starch as carbon sources. When either glucose or fructose was used as carbon source in YM medium, the better growth of *Issatchenkia* sp. S1 was performed. In 2 L fermenter experiment, The agitation speed at 200 rpm with no aeration in YM medium with 100 g/L and 2 g/L (NH₄)₂SO₄ at 40°C showed the highest of growth rate ($0.297 \pm 0.001 \text{ h}^{-1}$). The highest concentration of oxaloacetic acid production was 3.02 g/L at 24 h after fermentation. However, oxaloacetic acid concentration in fermented broth was decreased after 24 h of fermentation time.

Additionally, effect of carbon sources on growth were analyzed in YM medium which replaced the carbon source at 100 g/L of glucose, fructose, hydrolyzed sucrose (treated with invertase) or hydrolyzed cassava starch (treated with AMG 300L and Termamyl[®] SC). The cultures were fermented in 250-mL Erlenmeyer flasks with 100 mL of reaction volume with 5% v/v of inoculum and incubated at 40°C with 200 rpm for 2 days. The highest growth rate was obtained at

$0.295 \pm 0.025 \text{ h}^{-1}$ when cultured in hydrolyzed cassava starch but could not detect oxaloacetic acid production in fermented broth.

By transferring laboratory to the new building, the fault in transport was occurred. The deep freezer ($-70 \text{ }^{\circ}\text{C}$) could not controlled the temperature in fluctuated electricity. It was made damage and bacterial contamination in stock tube of thermotolerant yeast *Issatchenkia* sp. S1. Then, the contaminated stock tube was isolated. The all isolates were the great growth rate in YM medium with glucose and fructose including acetate salt, as carbon source, could tolerated temperature and produced the ethanol at the same condition of thermotolerant yeast *Issatchenkia* sp. S1. Moreover, the cell morphology under light microscope was not different the thermotolerant yeast *Issatchenkia* sp. S1 but not found the oxaloacetic acid from all isolated colony using high performant liquid chromatography (HPLC) analysis.



สารบัญ

หน้า

| | |
|---|----|
| กิตติกรรมประกาศ..... | ก |
| บทคัดย่อภาษาไทย..... | ข |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... | ง |
| สารบัญ..... | ฉ |
| บทที่ 1 บทนำ | |
| 1.1 ความสำคัญของงานวิจัย..... | 1 |
| 1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย..... | 2 |
| 1.3 สมมุติฐานของการทดลอง..... | 2 |
| 1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของการศึกษา..... | 3 |
| บทที่ 2 ทบทวนงานวิจัย..... | 4 |
| บทที่ 3 วิธีการทดลอง..... | 12 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... | 18 |
| บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... | 48 |
| เอกสารอ้างอิง..... | 49 |
| ประวัติผู้แต่ง..... | 53 |

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก อาหาร และเครื่องดื่ม.....4

ตารางที่ 2 แสดงค่าการเจริญจำเพาะ ค่าความสามารถในการผลิต และค่า yield ของเอทานอลและกรดออกซาโลอะซิดิกของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM23

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์กรดออกซาโลอะซิดิกของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1.....30

ตารางที่ 4 แสดงค่าการเจริญจำเพาะของเชื้อยีสต์ *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนต่างๆ.....46

ตารางที่ 5 แสดงค่าอัตราการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนต่างๆ ร่วมกับการเติมเกลืออะซิเตด.....46

ตารางที่ 6 แสดงค่าอัตราการผลิตเอทานอล (productivity) ของเชื้อยีสต์ *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนต่างๆ ร่วมกับการเติมเกลืออะซิเตด.....47

ตารางที่ 7 แสดงค่าการเจริญจำเพาะของเชื้อยีสต์ *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนต่างๆ ร่วมกับการเติมเกลืออะซิเตด.....47

สารบัญรูปภาพ

- รูปที่ 1. การเจริญของเซลล์ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิก โดยเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร YM ที่ ในถังหมักขนาด 10 ลิตร.....7
- รูปที่ 2 การย่อยสลายกลูโคสโดยวิถีไกลโคไลซิสได้ผลผลิตเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์..9
- รูปที่ 3 แสดง metabolic pathways ของการใช้โพรูเวท.....11
- รูปที่ 4 แสดงการเจริญของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร หมักในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH ที่ 4.0 และทำการให้อากาศที่ 1.0 vvm และ 0.2 vvm เทียบกับที่ไม่เติมอากาศ.....19
- รูปที่ 5 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร หมักในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH ที่ 4.0 และทำการให้อากาศที่ 1.0 vvm และ 0.2 vvm เทียบกับที่ไม่เติมอากาศ.....20
- รูปที่ 6 แสดงการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร หมักในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH ที่ 4.0 และทำการให้อากาศที่ 1.0 vvm และ 0.2 vvm เทียบกับที่ไม่เติมอากาศ.....21
- รูปที่ 7 แสดงการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

2 กรัมต่อลิตร หมักในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH ที่ 4.0 และทำการให้อากาศที่ 1.0 vvm และ 0.2 vvm เทียบกับที่ไม่เติมอากาศ.....22

รูปที่ 8 แสดงการเจริญของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของแหล่งอาหารคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์.....25

รูปที่ 9 แสดงใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของแหล่งอาหารคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์.....26

รูปที่ 10 แสดงการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของแหล่งอาหารคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์.....27

รูปที่ 11 แสดงการผลิตกรดออกซาโลอะซิติกของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของแหล่งอาหารคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์.....28

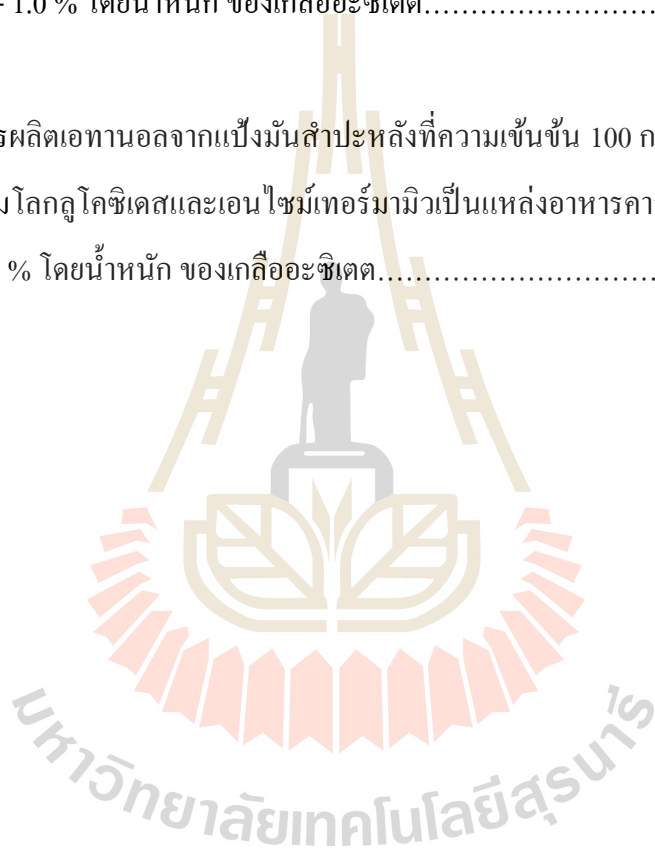
รูปที่ 12 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าของเซลล์ยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S129

รูปที่ 13 แสดงการเจริญของยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด...33

รูปที่ 14 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสของยีสต์ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด.34

| | |
|---|----|
| รูปที่ 15 แสดงผลผลิตเอทานอลของยีสต์ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด..... | 35 |
| รูปที่ 16 แสดงการเจริญของยีสต์ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด..... | 36 |
| รูปที่ 17 แสดงการใช้น้ำตาลฟรุกโตสของยีสต์ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด..... | 37 |
| รูปที่ 18 แสดงการผลิตเอทานอลของยีสต์ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด..... | 38 |
| รูปที่ 19 แสดงการเจริญของยีสต์ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลซูโครสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นแหล่งอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด..... | 40 |
| รูปที่ 20 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคส (A) และฟรุกโตส (B)ของยีสต์ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลทรายที่ย่อยด้วยอินเวอร์เทส เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด..... | 41 |
| รูปที่ 21 แสดงการเอทานอลของยีสต์ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลซูโครสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด..... | 42 |

- รูปที่ 22 แสดงการการเจริญของยีสต์ในอาหาร YM ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เทอร์มามิวเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด.....43
- รูปที่ 23 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เทอร์มามิวเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด.....44
- รูปที่ 24 แสดงการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เทอร์มามิวเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนัก ของเกลืออะซิเตด.....45



บทที่ 1

บทนำ

1. ความสำคัญของงานวิจัย

กรดออกซาโลอะซิติก (oxaloacetic acid; $\text{HO}_2\text{CC}(\text{O})\text{CH}_2\text{CO}_2\text{H}$) เป็นกรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนอะตอม 4 อะตอม ซึ่งประกอบด้วยหมู่คาร์บอกซิลิก 2 หมู่ ซึ่งเป็น substrate ของเอนไซม์ malate dehydrogenase และ oxaloacetate dehydrogenase เมื่อกรดออกซาโลอะซิติก สามารถพบใน mesophyll ของพืชและมีความสำคัญในกลไกการเพิ่มความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ในพืช C4 และเป็นสาร intermediate ที่พบอยู่ในวัฏจักรเครปส์ (Kreb's cycle) ในไมโทคอนเดรียของ Eukaryotes และในกระบวนการ gluconeogenesis และใช้เป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดอะมิโนในกลุ่มของ aspartate นอกจากนี้ยังมีความสำคัญในการยับยั้ง succinate-coenzyme Q ในไมโทคอนเดรีย และเซลล์ของแบคทีเรียบางชนิด จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 พบว่าเชื้อชนิดนี้สามารถผลิตกรดออกซาโลอะซิติกและขับออกจากเซลล์ อยู่ที่ประมาณ 3 กรัมต่อลิตร (Muaejang, 2008) ซึ่งในปัจจุบันยังไม่พบข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดออกซาโลอะซิติกออกสู่ภายนอกเซลล์และมีปริมาณที่ค่อนข้างสูง

ในปัจจุบันกรดออกซาโลอะซิติกมีบทบาททางด้านการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ที่หลากหลาย เช่น ในด้านการสังเคราะห์กรด benzylamino (Kadyrov *et al.*, 2003) ใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการวิเคราะห์เอนไซม์ malic dehydrogenase (Davindson *et al.*, 1984) ใช้สำหรับการเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อสัตว์ (Jeremy and Michelle, 2007; Reichling *et al.*, 1995; Peng *et al.*, 2007; David *et al.*, 2005) ใช้เป็น substrate ของเอนไซม์ glutamate oxaloacetate transaminase เพื่อใช้ในการทดสอบการทำงานของตับ (Monte *et al.*, 1976; Shirahase and Watazu, 1992) และใช้เป็นสารมาตรฐานในการวิเคราะห์ทางเคมี ซึ่งสารมาตรฐานของกรดออกซาโลอะซิติกมีราคาที่สูง ต้องนำเข้าจากบริษัทต่างชาติ เช่น SIGMA (catalog number 04126-1G ราคา 22.30 ดอลลาร์ต่อกรัม; 2015) ซึ่งเป็นราคาที่ค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับสารเคมีชนิดอื่นๆ นอกจากนี้ การศึกษาเกี่ยวกับการผลิตกรดออกซาโลอะซิติกและการนำกรดออกซาโลอะซิติกไปประยุกต์ใช้มีน้อยมาก ดังนั้นการศึกษการผลิตกรดออกซาโลอะซิติกจากเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจ และนำไปสู่กระบวนการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก รวมถึงการประยุกต์ใช้กรดออกซาโลอะ

ซิติคต่อไป ซึ่งจะก่อให้เกิดประโยชน์หลายด้าน สามารถลดต้นทุนในการสั่งซื้อจากต่างประเทศ และเนื่องจากกรดออกซาโลอะซิติคมีหมู่คาร์บอกซิลิกถึง 2 หมู่ จึงสามารถเกิดปฏิกิริยา polymerization เป็น polymer ได้ หรือนำไปใช้เป็นส่วนประกอบของ polyester อื่นๆ (Nyilas, 1984) เพื่อประยุกต์ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ biopolymer หรือ bioplastic ต่อไปได้ในอนาคต เป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่นำไปสู่กระบวนการการผลิต bioplastic ชนิดใหม่ที่มีคุณสมบัติแตกต่างไปจาก bioplastic ที่มีอยู่ในปัจจุบัน (polylactate, polyacetate, polysuccinate เป็นต้น)

การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดออกซาโลอะซิติคจากยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia* sp. S1 และการสกัดที่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากจุดเด่นของยีสต์สายพันธุ์ *Issatchenkia* sp. S1 สามารถผลิตกรดออกซาโลอะซิติคและขับออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งลดขั้นตอนในการสกัดแยกกรดออกซาโลอะซิติคได้ ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นประโยชน์ในการประยุกต์ใช้กรดออกซาโลอะซิติคให้เกิดประโยชน์หลากหลายด้านไม่มากก็น้อยต่อไปในอนาคต

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 2.1 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดออกซาโลอะซิติคของยีสต์พันธุ์อื่น *Issatchenkia* sp. S1
- 2.2 เพื่อศึกษากลไกการทำงานและหาค่าจลพลศาสตร์ของการผลิตกรดออกซาโลอะซิติคด้วยเชื้อยีสต์พันธุ์อื่น *Issatchenkia* sp. S1 ในสภาวะต่างๆ
- 2.3 เพื่อทดสอบหาความสามารถในการผลิตกรดออกซาโลอะซิติคในถังหมัก
- 2.4 เพื่อหาวิธีการสกัดกรดออกซาโลอะซิติคที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพ

3. สมมุติฐานของการทดลอง

ยีสต์พันธุ์อื่น *Issatchenkia* sp. S1 จะมีความสามารถในการผลิตกรดออกซาโลอะซิติคได้ในปริมาณสูง และมีความเสถียรในการผลิตกรดออกซาโลอะซิติค

4. ขอบเขตของโครงการวิจัย

- 4.1 ศึกษาประสิทธิภาพการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกในกระบวนการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังหรือกากน้ำตาลที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เป็นอาหารของยีสต์ในการหมัก
- 4.2 ศึกษากลไกการทำงานและหาค่าจลพลศาสตร์ของการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกด้วยเชื้อยีสต์พันธุ์ *Issatchenkia* sp. S1 ในสภาวะต่างๆ เช่น ประเภทของน้ำตาล (แป้งมันสำปะหลังและน้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์) ที่เหมาะสมในการหมัก ความสามารถทนทานต่อความเข้มข้นของน้ำตาล ช่วงของ pH ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ ปริมาณกรดออกซาโลอะซิดิกที่ผลิต ค่าจำเพาะต่างๆ ตามหลักจลพลศาสตร์ของการหมัก เป็นต้น
- 4.3 ศึกษาประสิทธิภาพของการสกัดกรดออกซาโลอะซิดิกด้วยวิธีการสกัดต่างๆ เพื่อหาวิธีที่มีประสิทธิภาพสูง

5. ผลที่คาดว่าจะได้รับ

การศึกษาวิจัยครั้งนี้ควรจะคัดเลือกสภาวะที่เหมาะสมของยีสต์พันธุ์ *Issatchenkia* sp. S1 ในการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิก ซึ่งจะมีประโยชน์อย่างมากสำหรับการประยุกต์ใช้กรดออกซาโลอะซิดิกให้เกิดประโยชน์

บทที่ 2

ทบทวนงานวิจัย

ยีสต์และยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1

ยีสต์จัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจ (fungi) ในกลุ่มแอสโคไมซีตัส (ascomycetous) หรือเบสิดีโอไมซีตัส (basidiomycetous) ซึ่งมีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) หรือการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองเซลล์ (fission) และหากมีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะไม่พบฟรุติดี บอดี (fruiting body) (Boekhout และ Kurtzman, 1996)

ยีสต์มีประโยชน์อย่างมากในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ การผลิตเป็น biomass และผลผลิตต่างๆ ที่ได้จากกระบวนการหมักของยีสต์ ได้แก่ เอนไซม์ วิตามิน พอลิแซ็กคาไรด์ แลโรทีนอยด์ แอลกอฮอล์ในกลุ่มพอลิไฮดริค (polyhydric alcohols) ไขมัน ไกลโคลิปิด กรดซิทริก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารประกอบอื่นๆ ที่เกิดจากการนำดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่เซลล์ยีสต์ ตารางที่ 8.1 แสดงสายพันธุ์ของยีสต์และประโยชน์ในการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

ตารางที่ 1 ตัวอย่างของสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก อาหาร และเครื่องดื่ม (Jacobson and Jolly, 1989)

| ประเภทของอุตสาหกรรม | สายพันธุ์ยีสต์ |
|-----------------------------|--|
| สุรา | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| ขนมปัง | <i>S. cerevisiae</i> , <i>S. exiguus</i> , <i>S. rosei</i> |
| สารให้ความหวานแทนน้ำตาล | <i>Candida diddensiae</i> |
| อิมัลซิไฟเออร์ | <i>C. lipolytica</i> |
| เอทานอล | <i>S. cerevisiae</i> |
| อาหารสัตว์ | <i>Phaffia rhodozyma</i> |
| โปรตีนเซลล์เดียว | <i>C. utilis</i> |
| การหมักแลคโตสและผลิตภัณฑ์นม | <i>C. pseudotropicalis</i> , <i>Kluyveromyces fragilis</i> , <i>K. lactis</i> |

อุณหภูมิเป็นปัจจัยแวดล้อมที่สำคัญอย่างหนึ่งซึ่งส่งผลต่อกิจกรรมต่างๆ ของจุลินทรีย์เมื่อใช้ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถแบ่งยีสต์ออกเป็น 3 กลุ่ม (Arthur และ Watson, 1976) ดังนี้

- ยีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic yeast) มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญตั้งแต่ 2 ถึง 20 องศาเซลเซียส
- ยีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeast) มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญตั้งแต่ 5 ถึง 35 องศาเซลเซียส
- ยีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (thermophilic yeast) มีช่วงอุณหภูมิในการเจริญตั้งแต่ 28 ถึง 45 องศาเซลเซียส

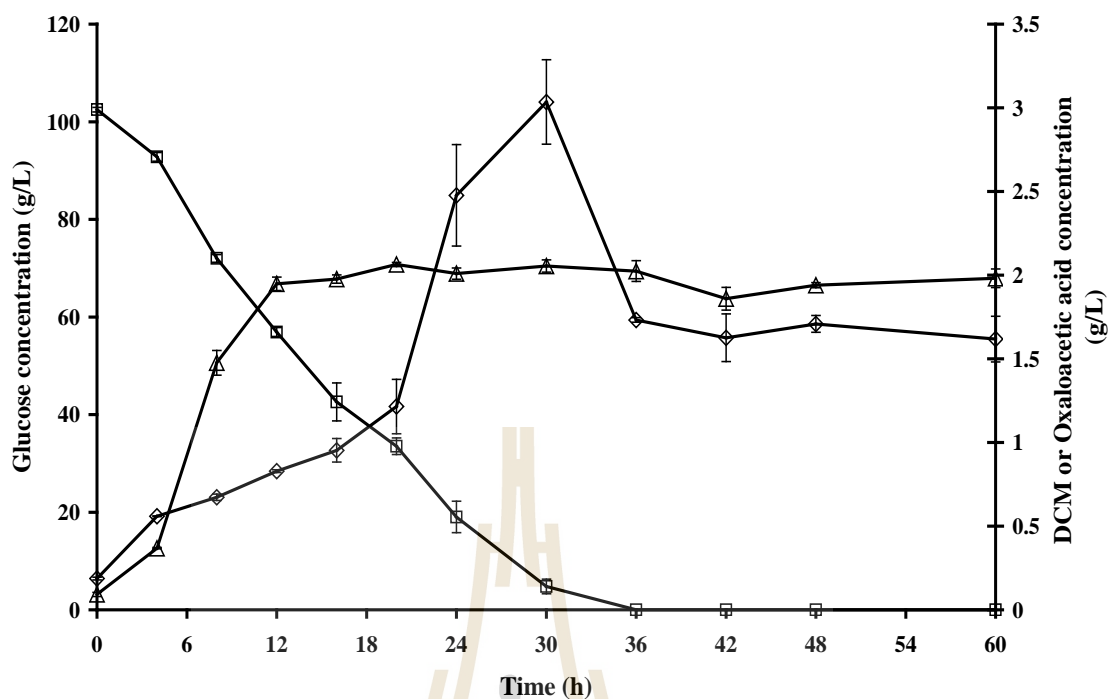
ในแต่ละช่วงอุณหภูมิของการเจริญจะแบ่งแยกได้เป็น อุณหภูมิต่ำสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ เรียกว่า minimum growth temperature (T_{min}) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ เรียกว่า optimum growth temperature (T_{opt}) อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ เรียกว่า maximum growth temperature (T_{max})

สำหรับยีสต์ทนร้อน (thermotolerant yeast) จะมีช่วงอุณหภูมิในการเจริญตั้งแต่ 8 ถึง 42 องศาเซลเซียส โดยมีช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ (T_{opt}) สูงกว่ายีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง แต่ต่ำกว่ายีสต์ที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง อย่างไรก็ตามกฎเกณฑ์นี้อาจมีข้อยกเว้นในยีสต์บางสายพันธุ์ เช่น *Candida macedoniensis* (T_{min} 5 องศาเซลเซียส และ T_{max} 45 องศาเซลเซียส) *S. guttulata* (T_{min} 34 องศาเซลเซียส และ T_{max} 42 องศาเซลเซียส) ดังนั้นยีสต์ทนร้อนที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจึงหมายถึงยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และ/หรือ ที่อุณหภูมิมากกว่าหรือเท่ากับ 45 องศาเซลเซียส (Hacking และคณะ, 1984)

คณะวิจัย ได้ทำการศึกษาคัดแยกยีสต์ทนร้อนเพื่อผลิตเอทานอลและจัดจำแนกชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้ (Sripiromrak, A., 2006) โดยสามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ S1 ได้จากหมักจากฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเซลล์มีรูปร่างเป็นรูปไข่จนถึงรูปท่อนปลายมน ขนาดเซลล์ประมาณ 2.7-4.2 x 5.6-10.1 ไมโครเมตร การเรียงตัวของเซลล์ทั้งเดี่ยวและคู่ พบการแตกหน่อของเซลล์ และมีการพัฒนาของเส้นใยเทียมสำหรับลักษณะการเจริญในอาหารเหลว เป็นแผ่นแห้งและหนาสีขาวเกาะอยู่บนบริเวณผิวหน้าของ

อาหารเหลว การเจริญบนอาหารแข็งโคโคโคนีมีความหนืดคล้ายเนยเหลว และมีลีสทรีม ยีสต์ที่ร้อนที่คัดเลือกได้นี้ไม่สามารถสร้างสารพิษต้านทานต่อยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* EC 1118 แบคทีเรีย *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 จากการวิเคราะห์สารพันธุกรรมโดยศึกษา 18S rDNA พบว่ายีสต์ที่ร้อนสายพันธุ์ S1 มีความใกล้เคียงกับ *Issatchenkia* sp. 99% จากการศึกษากลางไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน (น้ำตาลกลูโคส) และค่าพีเอช (pH) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหาร M9 minimal medium พบว่ายีสต์ที่ร้อนสายพันธุ์ S1 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 74.58% โดยทฤษฎี ที่ค่าพีเอช 4.0 เมื่อใช้แอมโมเนียม ซัลเฟต และน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร เป็นแหล่งไนโตรเจน และ แหล่งคาร์บอน ตามลำดับ

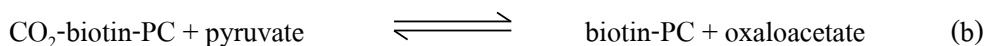
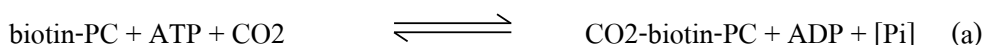
คณะวิจัย ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร enrich medium พบว่าความเข้มข้นของกลูโคสที่ 100 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นศึกษาการผลิตเอทานอล ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ซึ่งพบว่า ค่าการเจริญจำเพาะที่ 0.355 ± 0.012 ต่อชั่วโมง ค่า ethanol productivity ที่ 1.335 ± 0.104 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และให้ค่า yield ที่ 0.431 ± 0.005 กรัมต่อกรัม และความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด 42.434 ± 1.699 กรัมต่อลิตร (Muaenjang, 2008) นอกจากนี้ ได้ทำการพัฒนาการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยใช้ระบบแบบ fed-batch โดยทำการเติมน้ำตาลกลูโคสเพื่อเพิ่มการผลิตเอทานอล พบว่าการเติมน้ำเชื่อมที่มีน้ำตาลกลูโคส 350 กรัม ปริมาตร 1 ลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมงและ 400 กรัม ปริมาตร 1 ลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังจากเริ่มต้นการหมัก ให้ผลสูงสุดของการผลิตเอทานอล พบว่าค่า specific growth rate มีค่า 1.716 ± 0.150 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ให้ค่า yield ที่ 0.506 ± 0.011 กรัมต่อกรัม และความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ 77.810 ± 1.879 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ ได้ทำการวิเคราะห์หาการผลิตกรดอินทรีย์ในถังหมัก 10 ลิตร พบว่าเป็นกรดออกซาโลอะซิดิก (oxaloacetic acid) ซึ่งจะผลิตในช่วงที่มีการเจริญของยีสต์และลดลงเมื่อน้ำตาลกลูโคสถูกใช้จนหมด ความเข้มข้นสูงสุดของกรดออกซาโลอะซิดิกคือ 3.035 ± 0.252 กรัมต่อลิตรที่ 30 ชั่วโมงหลังจากเริ่มต้นการหมัก ดังในรูปที่ 1



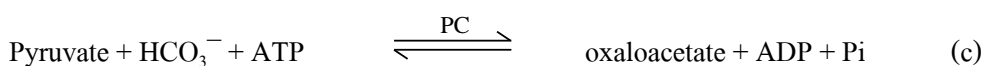
รูปที่ 1. การเจริญของเซลล์ ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก โดยเชื้อยีสต์พันธุ์ *Issatchenkia sp. SI* ที่ทำการเลี้ยงในอาหาร YM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 100 g/L และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 2 g/L ในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่ทำการควบคุม pH ที่ 4.0 ความเร็วรอบในการกวนที่ 500 รอบต่อนาที และอุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส; \square ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (g/L), \diamond ความเข้มข้นของกรดออกซาโลอะซิติก (g/L) และ \triangle น้ำหนักเซลล์แห้ง (Dry Cell Mass; DCM) (g/L).

กระบวนการสังเคราะห์กรดออกซาโลอะซิติก

ในสภาวะที่มีออกซิเจน กรดออกซาโลอะซิติกจะเข้าจับกับไพรูเวท เปลี่ยนไปเป็นกรดซิตริก เพื่อเข้าสู่วัฏจักรเครป ซึ่งเกิดขึ้นในไมโทคอนเดรีย แต่ก็ยังพบเอนไซม์ที่ทำงานในไมโทคอนเดรีย อยู่ในไซโทพลาสซึม เอนไซม์ pyruvate carboxylase (PC) จะทำให้เกิดกระบวนการ Carboxylation ของไพรูเวท เพื่อเปลี่ยนไปเป็นออกซาโลอะซิเตต หมู่ของ prosthetic ของเอนไซม์นี้คือไบโอติน (biotin) ซึ่งจะทำหน้าที่ในการส่งผ่าน CO_2 ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้จะใช้พลังงานจาก ATP (Ribéreau-Gayon et al, 2000) ดังสมการ:



หรือ (Mukhopadhyay et al, 2001; Devlin, 2006):

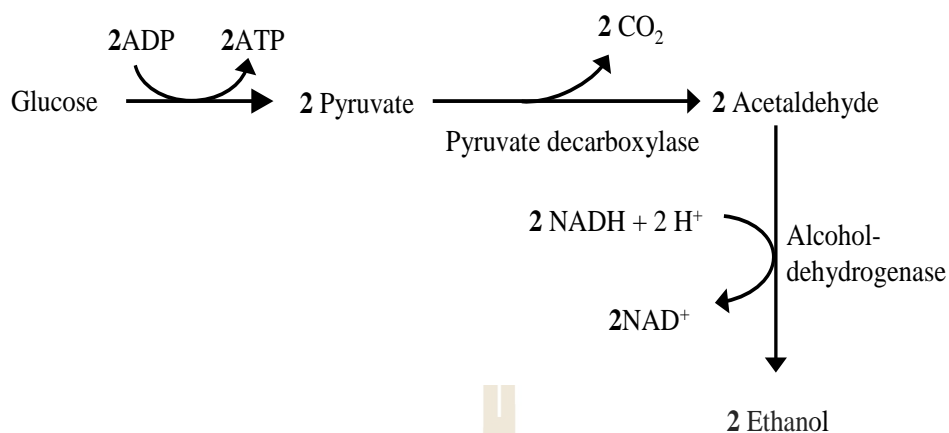


นอกจากนี้ ปฏิกิริยาการสังเคราะห์ออกซาโลอะซิเตต สามารถสังเคราะห์จาก phosphoenolpyruvate โดยเอนไซม์ phosphoenolpyruvate carboxylase (PPC) (Mukhopadhyay et al, 2001):



กระบวนการผลิตเอทานอล

ยีสต์มีความสามารถในการหมักน้ำตาลเพื่อให้ได้เป็นเอทานอลซึ่งนับว่ามีความสำคัญมากในอุตสาหกรรม ยีสต์ที่นิยมใช้ในการหมักน้ำตาล ได้แก่ *S. cerevisiae*, *S. uvarum* (*carlsbergensis*), *Sch. pombe*, และ *Kluyveromyces* sp. ยีสต์สามารถย่อยสลายกลูโคสให้เป็นเอทานอลโดยผ่านทางวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) แสดงได้จากรูปที่ 2 ปฏิกิริยารวมจากการย่อยสลายกลูโคส 1 โมเลกุลจะได้ผลผลิตเป็นเอทานอล, คาร์บอนไดออกไซด์ และ พลังงานในรูป ATP อย่างละ 2 โมเลกุล ในทางทฤษฎีแล้วการหมักกลูโคส 1 กรัมจะได้เอทานอลประมาณ 51% โดยน้ำหนัก แต่ในทางปฏิบัติมักจะได้อเอทานอลไม่เกิน 90 – 95 % เมื่อเทียบกับค่าที่คำนวณได้จากทฤษฎี (Roehr, 2001) แสดงว่าในการกระบวนการหมักจะต้องมีการเติมสารอาหารบางอย่างเพื่อส่งเสริมกระบวนการหมักของยีสต์ จากรายงานของ Roehr (2001) พบว่า ผลผลิตข้างเคียงจากวิถีไกลโคไลซิสมักเป็นกลีเซอรอลซึ่งจะใช้สารตั้งต้นในปริมาณ 4-5% ถ้าสามารถกำจัดปฏิกิริยานี้ออกไปจะทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นถึง 2.7 % โดยน้ำหนัก



รูปที่ 2 การย่อยสลายกลูโคสโดยวิถีไกลโคไลซิสได้ผลผลิตเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ (Norr et al., 2003)

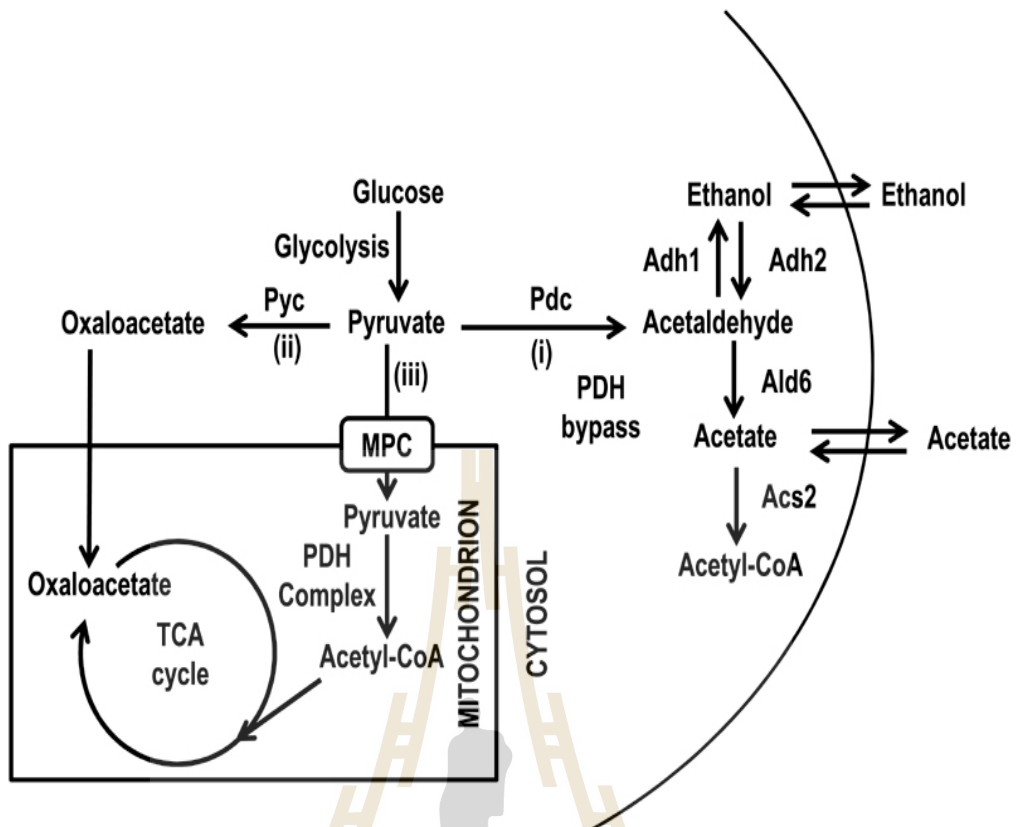
การเมแทบอลิซึมของสารอินเทอร์มีเดียต

สาร acetyl-CoA เป็นสารอินเทอร์มีเดียต (intermediates) ที่สำคัญและเป็นสารหลักที่สำคัญในการควบคุมการมีชีวิตร (longevity) ซึ่งสารเมแทบอลิไทน์นี้จะถูกกระตุ้นจากอะซิเตต (acetate) (Eisenberg et al, 2014; Friis et al, 2014; Mariño et al, 2014) โดยจะทำปฏิกิริยาสร้างพันธะ thioester กับโคเอนไซม์ A ซึ่งเซลล์จะนำไปใช้สำหรับกระบวนการสังเคราะห์สารชีวภาพที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (macromolecule biosynthesis) และในไมโทคอนเดรีย สาร acetyl-CoA เป็นสารตั้งต้นที่สำคัญอย่างมากในกระบวนการผลิตพลังงานในวัฏจักรเครป (Krebs' cycle; TCA cycle) โดยจะผลิตพลังงานจากปฏิกิริยาการรีดิวส์และการส่งผ่านอิเล็กตรอน และการเกิดปฏิกิริยา oxidative phosphorylation นอกจากนี้ สาร acetyl-CoA จะเป็นแหล่งของหมู่ acetyl สำหรับการเกิด acetylation ของโปรตีน และกระบวนการ posttranslational modification ซึ่งสามารถเกิดกับสารตั้งต้นได้หลากหลาย เช่น ฮิสโตน (histone) และเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมต่างๆ ทำให้เกิดการเชื่อมโยงของกระบวนการเมแทบอลิซึม กระบวนการ epigenetics และกระบวนการควบคุมการถอดรหัสพันธุกรรม (transcriptional regulation) (Henriksen et al, 2012; Kaelin and McKnight, 2013; Lu and Thompson, 2012)

ในยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สาร acetyl-CoA ใน nucleocytosolic pool จะถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์ acetyl-CoA synthetase 2 (Acs2) โดยการกระตุ้นของอะซิเตตในปฏิกิริยาที่เกี่ยวข้องกับ ATP (ATP-dependent reaction) ซึ่งเอนไซม์ Acs2 จะเป็น glycolytic isoform และมีบทบาทในกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์บอนและมีความจำเป็นต่อการเกิด histone acetylation (Takahashi

et al, 2006) ส่วนใน mitochondrial pool สาร acetyl-CoA จะถูกสังเคราะห์โดยเอนไซม์ Acs1 (the gluconeogenic isoform) และเอนไซม์ acetyl-CoA hydrolase 1 (Ach1) ซึ่งบางส่วนจะเกิดการแคตตาไลส์ของ CoASH จากสาร succinyl-CoA ไปเป็น acetate (Fleck and Brock, 2009) นอกจากนี้สาร acetyl-CoA สามารถทำปฏิกิริยาและถูกใช้ในกระบวนการต่างๆ ได้หลากหลายแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับสถานะที่ใช้การการเพาะเลี้ยง ในระหว่างการเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลหรือแหล่งอาหารคาร์บอนอื่นๆ ยีสต์จะสร้างไพรูเวท ซึ่งจะเป็นสารสุดท้ายในกระบวนการไกลโคไลซิสและเป็นตัวเชื่อมต่อระหว่างกระบวนการ respiratory metabolism และ alcoholic fermentation (Pronk et al, 1996) ซึ่งไพรูเวทสามารถเกิดเป็นสารอินเตอร์มีเดียตได้ 3 ทาง ดังแสดงในรูปที่ 3; (i) การเกิดปฏิกิริยา decarboxylation ไปเป็น acetaldehyde และได้ acetyl-CoA โดยเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase (PDH) bypass; (ii) การเกิด anaplerotic carboxylation ไปเป็น oxaloacetate และ (iii) การเกิด direct oxidative decarboxylation ไปเป็น acetyl-CoA โดยเอนไซม์ PDH complex ซึ่งเกิดในช่องว่างภายในของไมโทคอนเดรีย สารไพรูเวทสามารถผ่านผนังชั้นนอกของไมโทคอนเดรียได้ ขณะที่การผ่านผนังชั้นในของไมโทคอนเดรียจะต้องอาศัยตัวพา (mitochondrial pyruvate carrier; MPC) (Bricker et al. 2012; Herzig et al., 2012) ซึ่งตัวพาที่มีประสิทธิภาพจะทำหน้าที่เชื่อมระหว่าง cytosolic pyruvate metabolism และ TCA cycle





รูปที่ 3. แสดง metabolic pathways ของการใช้ไพรูเวท โดยมี 3 ทาง คือ (i) การเกิดปฏิกิริยา decarboxylation ไปเป็น acetaldehyde, (ii) การเกิดปฏิกิริยา carboxylation ไปเป็น oxaloacetate และ (iii) การเกิด oxidative decarboxylation ไปเป็น acetyl-CoA; Acs = acetyl-CoA synthase; Adh = alcohol dehydrogenase; Ald = aldehyde dehydrogenase; MPC = mitochondrial pyruvate carrier; Pdc = pyruvate decarboxylase; PDH = pyruvate dehydrogenase; Pyc = pyruvate carboxylase (Orlandi et al. 2014)

บทที่ 3

วิธีการศึกษา

วัสดุอุปกรณ์

- งานเลี้ยงเชื้อแก้วขนาด 15 x 90 มิลลิเมตร
- ขวดแก้วฝาเกลียว (Duran) ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- ขวดรูปชมพู่ ขนาด 50, 150 และ 250 มิลลิลิตร
- หลอดทดลองฝาเกลียว ขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร
- กระบอกตวงขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
- หลอดพลาสติก (microcentrifuge tube) ขนาด 1.7 มิลลิลิตร (BioScience, USA)
- หลอดพลาสติก (falcon tube) ขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร (SPL Life Science, Korea)
- ตัวกรองแมมเบรน ชนิดไนลอน (syringe filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)
- ตัวกรองอากาศ ชนิด polytetrafluoroethylene (PTFE) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Sartorius, Germany)
- กระดาษกรอง ชนิด cellulose acetate (CA) ขนาด 13 mm ความละเอียด 0.45 μm (Whatman, England)
- เข็มเขี่ยเชื้อ (loop)
- แท่งแก้วเขี่ยเชื้อ (glass spreader)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์

เครื่องมือ

- กล้องจุลทรรศน์ (Light Microscope; Primo Star, ZEISS, Germany)
- เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer; Ultraspec 2000 UV/Visible Spectrophotometer, Pharmacia Biotech, England)

- เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography: GC; AutoSystem XL, Perkin Elmer, USA)
- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatographic: HPLC; Thermo Separation Product, USA)
- ชุดควบคุมถังหมักและถังหมักแก้ว ขนาด 2 และ 10 ลิตร (Biostat B, B. Braun, Germany)
- เครื่องวัดค่ากรด-ด่าง (pH Meter ; pH/Ion 510, EUTECH Instruments, USA)
- เครื่องฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำ (Autoclave; HICLAVE HV-100, Hirayama, Japan)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Cabinet; Holten LaminAir HBB 2448, Denmark)
- เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง (Balance; ED42025-CW, Sartorius, Germany)
- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (Balance; ATX224, Shimadzu, Japan)
- ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator; innovaTM 4330, New Brunswick Scientific, N.J., USA)
- ตู้บ่มเพาะเชื้อพร้อมเขย่า (Shaking Incubator; Innova 2300 platform shaker, New Brunswick Scientific, UK)
- ตู้อบร้อน (Oven; Memmert UNB 500, WTB Binder BD115, USA)

สารเคมี

- น้ำตาลกลูโคส (Ajax Finechem, Australia)
- น้ำตาลฟรุกโตส (Ajax Finechem, Australia)
- น้ำตาลทราย (Ajax Finechem, Australia)
- แป้งมันสำปะหลัง (ตราใบหยก ขนาดถุง 400 กรัม, บริษัท บางกอกอินเตอร์ฟู้ด จำกัด, ประเทศไทย)
- เอนไซม์อินเวอร์เทส (Invertase; EC 3.2.1.26, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo)
- เอนไซม์อะไมเลส (Termamyl SC, Novozymes, Denmark)
- เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (AMG 300 L, Novozymes, Denmark)
- เกลือโซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate; MERCK, Germany)

- โซดาไฟ (Sodium hydroxide; MERCK, Germany)
- กรดเกลือ (Hydrochloric acid; Carlo Erba Reagent, USA)
- กรดออกซาโลอะซิติก (Oxaloacetic acid, Sigma Aldrich, St. Louis, Mo)
- กรดซัลฟิวริก (Sulfuric acid; Carlo Erba Reagent, USA)
- เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate; MERCK, Germany)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

- สารสกัดยีสต์ (Yeast extract; Himedia, India)
- สารสกัดมอลต์ (Malt extract; Himedia, India)
- เปปโตน (Peptone; Himedia, India)

วิธีการดำเนินงานวิจัย

1) การเลี้ยงเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1

นำยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ที่ทำการเก็บรักษาที่ -70 องศาเซลเซียส มาทำการเลี้ยงในอาหารเหลว YM broth (Difco 0712) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเลี้ยงบน YM agar ที่มีองค์ประกอบของ 20 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคส, 3 กรัมต่อลิตรของ yeast extract, 3 กรัมต่อลิตรของ malt extract, 5 กรัมต่อลิตรของ peptone และ 20 กรัมต่อลิตรของ agar (Kurtzman and Fell, 1998) และทำการบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Muaenjang, 2008) เพื่อเก็บไว้ใช้ในการทำการทดลอง

2) ทดสอบการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ modified YM ตามสูตรอาหารที่มีองค์ประกอบของ 20 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคส, 3 กรัมต่อลิตรของ yeast extract, 3 กรัมต่อลิตรของ malt extract, 5 กรัมต่อลิตรของ peptone และเติม ของ 2 กรัมต่อลิตรของ diammonium sulfate (Muaenjang, 2008) โดยใช้อาหารปริมาตร 0.95 ลิตร เติมลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ทำการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Rezić et al., 2013) ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์ทนร้อนที่เตรียมโดยเลี้ยงเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยหัวเชื้อยีสต์จะ

มีความเข้มข้นของเซลล์แห้ง อยู่ที่ 2.27 ± 0.13 กรัมต่อลิตร หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร อยู่ที่ 0.52 ± 0.03 เมื่อทำการเจือจางที่ 10 เท่าของความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น (Muaenjang, 2008) จากนั้น ทำการหมักในสภาวะที่มีอากาศ (1.0 และ 0.2 vvm) และเปรียบเทียบกับ สภาวะไม่ให้อากาศ (0.0 vvm) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ควบคุมค่าความเป็น กรดต่างที่ 4.00 ด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 N และ โซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 N โดยใช้ความเร็วในการกวนที่ 200 ต่อนาที ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักเพื่อวิเคราะห์การเจริญของยีสต์ การใช้น้ำตาลกลูโคส การผลิตเอทานอล และการผลิตกรดอินทรีย์

3) ทดสอบผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก

3.1 การย่อยน้ำตาลทราย

นำน้ำตาลทรายปริมาณ 10 กรัม เติมน้ำ 90 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 1 มิลลิลิตรของเอนไซม์ อินเวเทส (Invertase from bakers' yeasts ; Sigma, St Louis, MO, USA) ปรับ pH ที่ 4.5 และทำการ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (Rebros et al., 2007) จากนั้นนำของเหลวที่ย่อยได้ มาเติม 0.3 กรัม yeast extract, 0.3 กรัม yeast extract และ 0.5 กรัม peptone ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH 4.0 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2 การย่อยแป้งมันสำปะหลัง

นำแป้งมันสำปะหลังปริมาณ 10 กรัม เติมน้ำ 90 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 0.1 มิลลิลิตรของ เอนไซม์อะไมเลส (Termamyl SC) ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้น ลดอุณหภูมิลงมาที่ 60 องศาเซลเซียส แล้วเติม 0.1 มิลลิลิตรของเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (AMG 300 L) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำของเหลวที่ย่อยได้ มาเติม 0.3 กรัม yeast extract, 0.3 กรัม yeast extract และ 0.5 กรัม peptone ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ปรับ pH 4.0 ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร และนำไปนิ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.3 การหมัก

นำแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส น้ำตาลทรายที่ทำกรย่อยด้วย เอนไซม์ อินเวเทส และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและ กลูโคอะไมเลส มาเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในอาหาร YM โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งอาหาร

คาร์บอนที่ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ 10 % โดยน้ำหนัก และเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร (Muaenjang, 2008) จากนั้นทำการปรับค่า pH ให้ได้ 4.0 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อยีสต์ที่ 5% v/v โดยหัวเชื้อยีสต์จะมีความเข้มข้นของเซลล์แห้ง อยู่ที่ 2.27 ± 0.13 กรัมต่อลิตร หรือมีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร อยู่ที่ 0.52 ± 0.03 เมื่อทำการเจือจางที่ 10 เท่าของความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น (Muaenjang, 2008) จากนั้น ทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

4) การคัดแยกเชื้อยีสต์ *Issatchenkia* sp. S1 ใหม่จากหลอดที่ปนเปื้อน

นำเชื้อในหลอด stock ที่เก็บไว้ในตู้แช่ -70 องศาเซลเซียส เติมในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 2% w/v และมีค่า pH เริ่มต้นที่ 4.0 ทำการเลี้ยงเชื้อในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 50 มิลลิลิตร ทำการบ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หลังจากนั้น นำเชื้อที่อยู่ในอาหารเหลว มาทำการเจือจาง 1000 เท่า ด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และนำไป spread บนอาหารแข็ง YM และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37, 40, 42 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน (Sripiromrak, 2006)

นำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวจากจานอาหารแข็งที่อุณหภูมิต่างๆ มา streak บนอาหารแข็ง YM โดยทำการเลือกโคโลนีเดี่ยวที่อุณหภูมิละ 15 โคโลนี นำจานอาหาร YM ทั้งหมดมาบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน

นำเชื้อยีสต์ที่ streak บนจานอาหารแข็ง YM มาทดสอบการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก โดยทำการเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร มีปริมาตรอาหาร YM (10% w/v น้ำตาลกลูโคส) 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 40 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 วัน

5) ทดสอบผลของการเติมเกลืออะซิเตตต่อการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก

นำแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส น้ำตาลทรายที่ทำการย่อยด้วย เอนไซม์ อินเวอเทส และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลสและ กลูโคอะไมเลส มาเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในอาหาร YM โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งอาหารคาร์บอนที่ความเข้มข้น 10 % โดยน้ำหนัก เติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร และทำการเติม

เกลืออะซิเตตที่ความเข้มข้น 0.0 ถึง 1.0 % w/v จากนั้นทำการปรับค่า pH ที่ 4.0 ก่อนนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเติมหัวเชื้อยีสต์ และทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน

6) การวิเคราะห์

6.1 การวิเคราะห์การเจริญและมวลเซลล์

การวัดการเจริญของเซลล์ยีสต์ วัดโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยใช้อาหาร YM เป็น blank

การวัดมวลเซลล์ วัดโดยนำอาหารที่มีเซลล์ยีสต์เจริญอยู่ปริมาตร 10 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรอง cellulose acetate แล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำ deionized (DI) แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การวิเคราะห์มวลเซลล์จะคำนวณจากน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)

6.2 ปริมาณกรดอินทรีย์

การวิเคราะห์หาปริมาณของกรดอินทรีย์จะทำการทดสอบโดยวิธี high performance liquid chromatographic (HPLC) ผ่านคอลัมน์ Phenomenex® Rezex ROA organic acid column (300 x 7.8 mm) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ใช้ UV ที่ความยาวคลื่น 210 นาโนเมตรเป็นตัวตรวจจับ (detector) โดยมี H₂SO₄ ความเข้มข้น 0.01 N ในการพาสารตัวอย่างให้เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (mobile phase) โดยมีอัตราการไหล 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที

6.3 ปริมาณน้ำตาล

การวิเคราะห์หาปริมาณของน้ำตาลจะทำการทดสอบโดยวิธี HPLC ผ่านคอลัมน์ RHM-Monosaccharide column (300 x 7.8 mm) ที่อุณหภูมิ 75 องศาเซลเซียส ใช้ RI เป็นตัวตรวจวัด (detector) โดยมี น้ำ DI ในการพาสารตัวอย่างให้เคลื่อนที่ผ่านคอลัมน์ (mobile phase) โดยมีอัตราการไหล 0.6 มิลลิลิตรต่อนาที

6.4 ปริมาณเอทานอล

การวิเคราะห์หาปริมาณของเอทานอลจะทำการทดสอบโดยวิธี gas chromatograph (GC) (AutoSystem XL, Perkin Elmer, U.S.A.) ผ่าน capillary คอลัมน์ชนิด PE-1 column (30 m X 0.32 mm i.d., 0.25 µm film thickness) โดยใช้ flame-ionization detector ในการตรวจวัด ใช้อุณหภูมิของ

injector ที่ 250 องศาเซลเซียส และใช้อุณหภูมิของ detector ที่ 300 °C โปรแกรมของอุณหภูมิของ Oven จะใช้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น ทำการเพิ่มอุณหภูมิจาก 37 ไปยัง 245 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการเพิ่มของอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที

7) วิเคราะห์ค่าจลพลศาสตร์ของการหมัก

ศึกษาหาค่าจลพลศาสตร์ต่างๆ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate), อัตราการใช้น้ำตาล (consumption rate), อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ (productivity) และค่า yield เป็นต้น

$$\text{อัตราการเจริญจำเพาะ} = (\ln X_2 - \ln X_1) / (t_2 - t_1)$$

X_1, X_2 เป็นปริมาณของเซลล์ ณ เวลาที่ t_1 และ t_2

$$\text{อัตราการใช้น้ำตาล} = (C_2 - C_1) / (t_2 - t_1)$$

C_1, C_2 เป็นความเข้มข้นของน้ำตาล ณ เวลาที่ t_1 และ t_2

$$\text{อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์} = (P_2 - P_1) / (t_2 - t_1)$$

P_1, P_2 เป็นของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น ณ เวลาที่ t_1 และ t_2

$$\text{ค่า Yield} = (C_f - C_i) / (P_f - P_i)$$

C_i เป็นความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น

C_f ความเข้มข้นของน้ำตาลหลังจากการหมัก

P_i เป็นความเข้มข้นผลิตภัณฑ์ก่อนการหมัก

P_f เป็นความเข้มข้นผลิตภัณฑ์หลังการหมัก

บทที่ 4

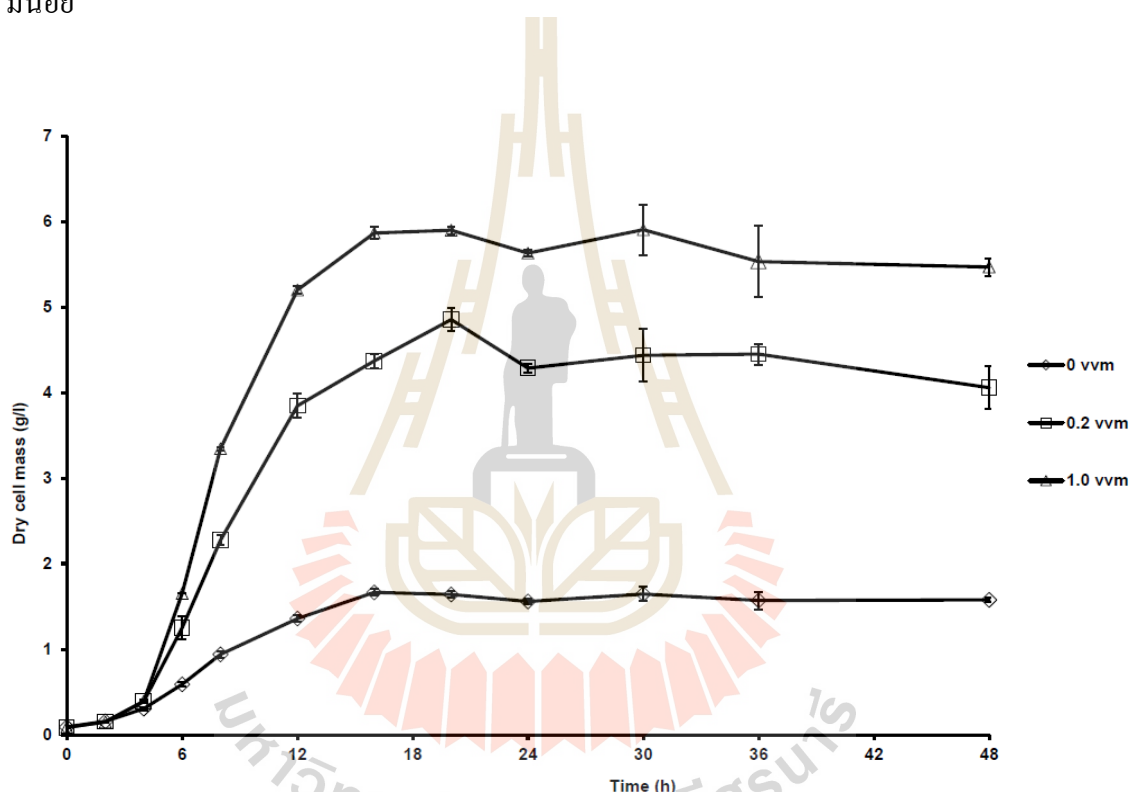
ผลการศึกษา

1. ทดสอบการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิก ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

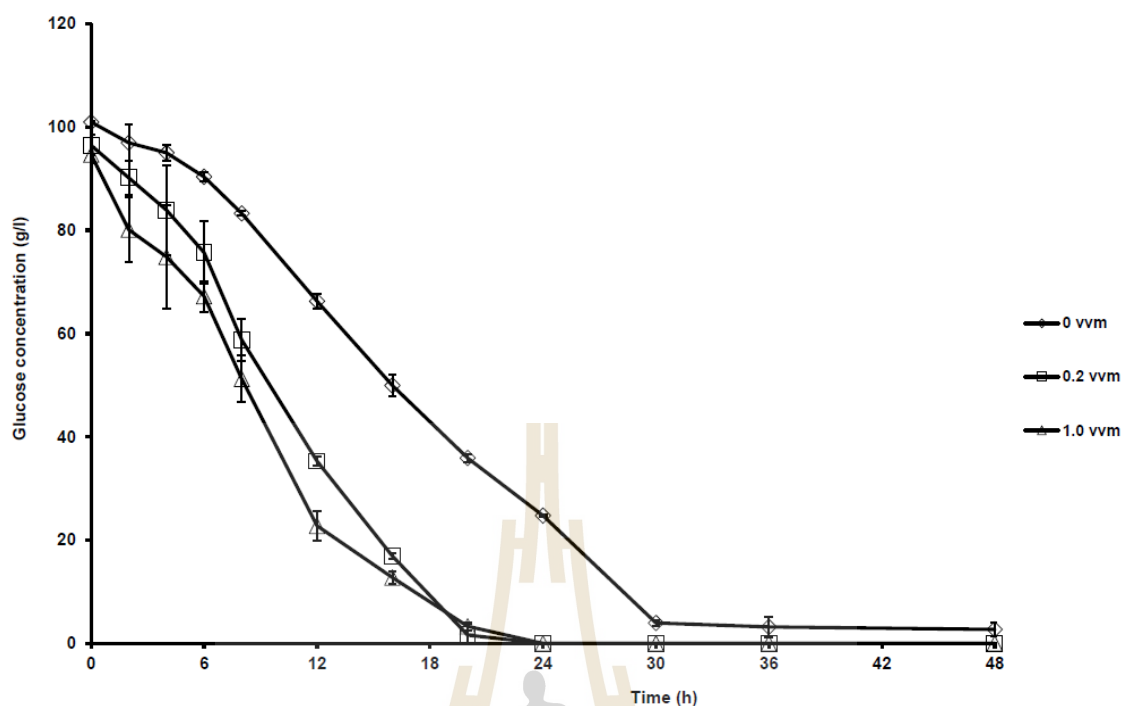
เมื่อทำการให้อากาศลงไปจนถึงหมักขนาด 2 ลิตร ที่อัตราการให้อากาศที่ 1.0 vvm พบว่าเชื้อยีสต์พันธุ์ *Issatchenkia* sp. S1 จะสามารถเจริญและให้ค่าความขุ่นของเซลล์ที่สูงสุด ดังแสดงในรูปที่ 4 และให้ค่าการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ 0.482 ± 0.002 ต่อชั่วโมง ดังแสดงในตารางที่ 2 การเติมอากาศเข้าไปในถังหมักจะกระตุ้นการเจริญของยีสต์ แต่ในทางตรงกันข้าม ความสามารถในการผลิตเอทานอลและความสามารถในการผลิตของกรดออกซาโลอะซิดิกก็ลดลงตามไปด้วย ดังแสดงในรูปที่ 6 และ 7 ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปริมาณของเอทานอลและความสามารถในการผลิตกรดจะเพิ่มสูงมากขึ้น เมื่อทำการหมักในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่เมื่อปริมาณของน้ำตาลกลูโคสลดลงจนไม่เพียงพอต่อความต้องการสำหรับการใช้งานในกิจกรรมของเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 5 และจะเห็นได้ว่า ปริมาณของเอทานอลและกรดออกซาโลอะซิดิกนั้น จะเริ่มลดลง (รูปที่ 6 และ 7) หลังจากชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงปริมาณของน้ำตาล ก็เป็นช่วงเวลาที่ปริมาณของน้ำตาลลดลงจนใกล้หมดจากอาหารเหลว ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักจะถูกนำกลับมาใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เมื่อมีปริมาณของน้ำตาลที่ใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนนั้นไม่เพียงพอต่อกิจกรรมของเซลล์ ซึ่งเป็นปรากฏการณ์ที่เรียกว่า diauxic shift ซึ่งเป็นปรากฏการณ์จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ขาดแหล่งอาหาร ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักจะถูกดึงกลับมาใช้เพื่อสร้างพลังงานให้กับเซลล์ (Pronk *et al.*, 1996) ซึ่งส่งผลทำให้จากรายงานของ Wayman and Parekh (1990) กระบวนการผลิตเอทานอลนั้นไม่ได้เกิดเฉพาะในกระบวนการหมักแบบไม่ให้อากาศ แต่ยังสามารถผลิตได้ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ออกซิเจนมีบทบาทเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจ (respiratory chain) ซึ่งจะสามารถสร้างพลังงานได้มาก จึงกระตุ้นการเจริญของเซลล์ (Markham, 1969; Andreasen and Stier, 1954)

ในการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกของเชื้อยีสต์พันธุ์ *Issatchenkia* sp. S1 พบว่า การผลิตของกรดออกซาโลอะซิดิกสามารถผลิตได้ดีในสภาวะที่ไม่มีให้อากาศ และเมื่อให้อากาศปริมาณการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกจะลดลง ดังแสดงในรูปที่ 7 และมีผลทำให้ค่าการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกและค่า Yield ของกรดออกซาโลอะซิดิกลดลงดังแสดงในตารางที่ 2 ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากใน

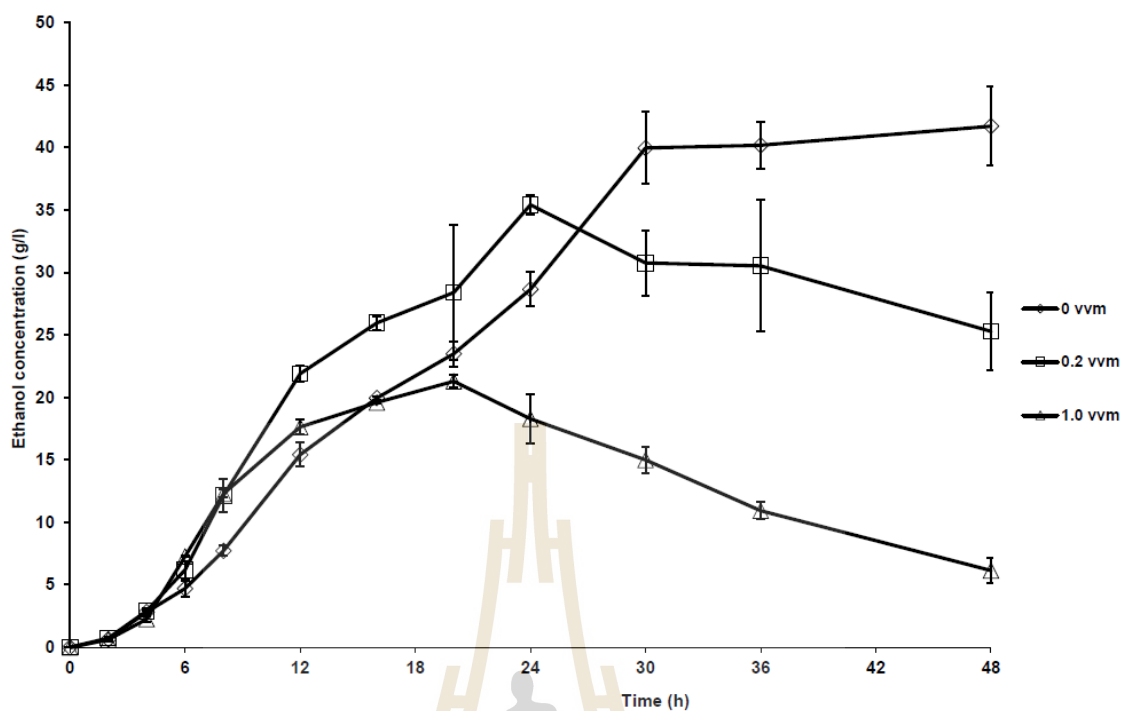
กระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ในขั้นตอนของกระบวนการไกลโคไลซิสนั้น สามารถผลิตไพรูเวทได้อย่างรวดเร็ว แต่ในขั้นตอนของกระบวนการหมักที่ทำการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นเอทานอลนั้นเกิดได้ช้ากว่า จึงมีการสะสมของไพรูเวทเป็นจำนวนมากภายในเซลล์ ซึ่งเมื่อมีปริมาณของไพรูเวทสูง ปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดออกซาโลอะซิดิก ดังในสมการ c และ d (บทที่ 2 หน้าที่ 8) สามารถเกิดได้ง่ายขึ้น จึงพบการสะสมของกรดออกซาโลอะซิดิกมากขึ้น แต่ในสภาวะที่ให้อากาศ ไพรูเวทสามารถเข้าสู่วัฏจักรเครป เพื่อสร้างพลังงานได้อย่างรวดเร็ว จึงทำให้ปริมาณของกรดออกซาโลอะซิดิกที่สะสมนั้นมีน้อย



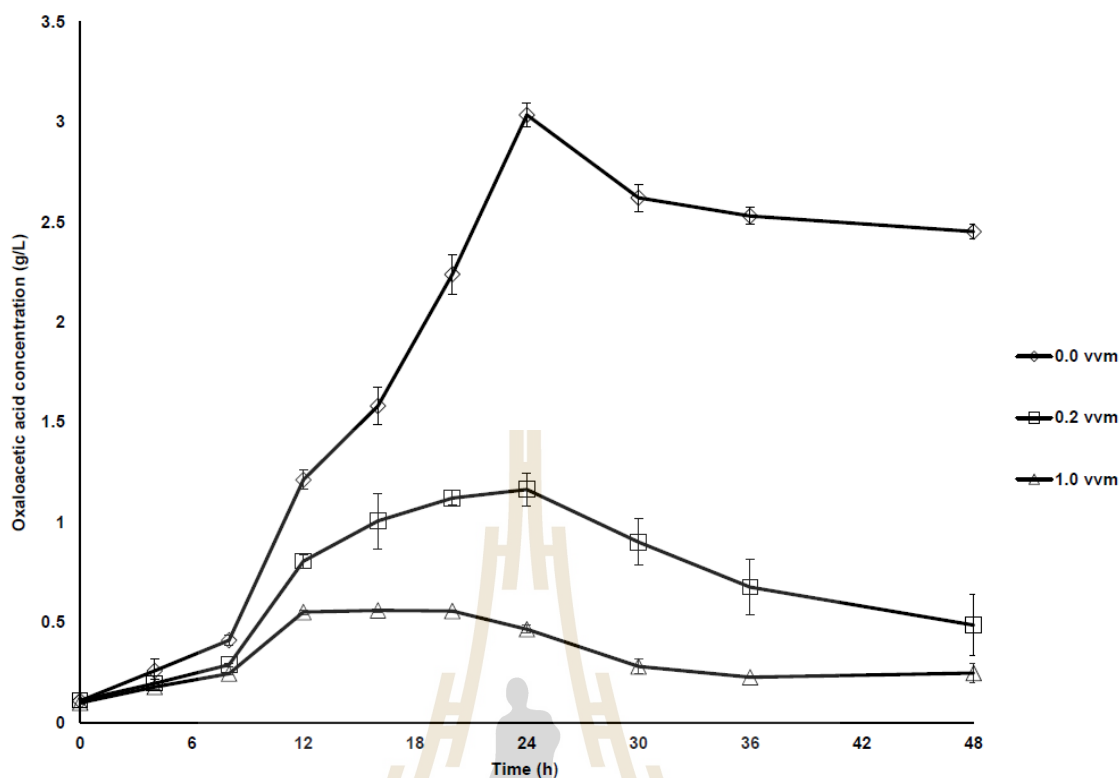
รูปที่ 4 แสดงการเจริญของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตร ของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร หมักในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH ที่ 4.0 และทำการให้อากาศที่ 1.0 vvm และ 0.2 vvm เทียบกับที่ไม่เติมอากาศ



รูปที่ 5 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร หมักในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH ที่ 4.0 และทำการให้อากาศที่ 1.0 vvm และ 0.2 vvm เทียบกับที่ไม่เติมอากาศ



รูปที่ 6 แสดงการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัม ต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร หมักในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH ที่ 4.0 และทำการให้อากาศ ที่ 1.0 vvm และ 0.2 vvm เทียบกับที่ไม่เติมอากาศ



รูปที่ 7 แสดงการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร หมักในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ควบคุมค่า pH ที่ 4.0 และทำการให้อากาศที่ 1.0 vvm และ 0.2 vvm เทียบกับที่ไม่เติมอากาศ

ตารางที่ 2 แสดงค่าการเจริญจำเพาะ ค่าความสามารถในการผลิต และค่า yield ของเอทานอลและกรดออกซาโลอะซิดิกของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 กรัมต่อลิตร หมักในถังหมักขนาด 2.0 ลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และทำการให้อากาศที่ 1.0 vvm และ 0.2 vvm เทียบกับที่ไม่เติมอากาศ

| อัตราการให้อากาศ (vvm) | ค่าการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง) | ค่าอัตราการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) | ค่า yield ของเอทานอล (กรัมต่อกรัม) | ค่าอัตราการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิก (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) | ค่า yield ของกรดออกซาโลอะซิดิก (กรัมต่อกรัม) |
|------------------------|--------------------------------|--|------------------------------------|--|--|
| 0 | 0.297 ± 0.001 ^a | 1.194 ± 0.058 ^b | 0.437 ± 0.007 ^c | 0.127±0.002 ^c | 0.0310±0.0006 ^c |
| 0.2 | 0.430 ± 0.004 ^b | 1.476 ± 0.034 ^c | 0.368 ± 0.016 ^b | 0.047±0.002 ^b | 0.0121±0.0002 ^b |
| 1.0 | 0.482 ± 0.002 ^c | 1.065 ± 0.025 ^a | 0.225 ± 0.002 ^a | 0.023±0.001 ^a | 0.0059±0.0001 ^a |

Values followed by the same letter are not significantly different at $P \leq 0.05$.

2. การทดสอบหาชนิดของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและผลิตกรดออกซาโลอะซิดิก

การทดสอบแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆ ต่อการเจริญโดยนำแหล่งอาหารคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลซูโครส ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส และแป้งมันสำปะหลัง ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (AMG 300 L) และเอนไซม์อะไมเลส (Thermamyl[®] SC) ที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร มาเตรียมเป็นอาหารที่ใช้สำหรับการหมัก โดยใช้อาหาร YM ที่ประกอบด้วย peptone 5 กรัม malt extract 3 กรัม และ yeast extract 3 กรัม ต่ออาหาร 1 ลิตร ทำการหมักในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร โดยเติมอาหาร 100 มิลลิลิตร ทำการเติมหัวเชื้อยีสต์ที่ 5% v/v อุดปากขวดด้วยจุกสำลี ทำการบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีการเขย่าที่ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 วัน พบว่า การเจริญของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในแหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 8 โดยการเจริญของเชื้อยีสต์ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมักนั้น มีความสามารถในการเจริญไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 18 จะเห็นได้ว่าเส้นกราฟของการเจริญมีการลดลง โดยเฉพาะในชุดการทดลองที่ใช้ น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

ทั้งนี้อาจจะเป็นผลมาจากปริมาณของน้ำตาลที่ลดต่ำลง เนื่องจากการใช้อย่างรวดเร็ว ดังแสดงในรูปที่ 9 เป็นผลทำให้เซลล์ของยีสต์อยู่ในสภาวะที่ขาดแคลนแหล่งอาหาร จึงทำให้เซลล์นำสารอินทรีย์ที่อยู่ภายในเซลล์มาให้ทดแทนแหล่งอาหารที่ขาดแคลน เป็นผลทำให้น้ำหนักแห้งของเซลล์ลดลง เป็นปรากฏการณ์ที่เรียกว่า diauxic shift ซึ่งเป็นปรากฏการณ์จะเกิดขึ้นเมื่อเซลล์ขาดแหล่งอาหาร ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมักจะถูกดึงกลับมาใช้เพื่อสร้างพลังงานให้กับเซลล์ (Pronk *et al.*, 1996)

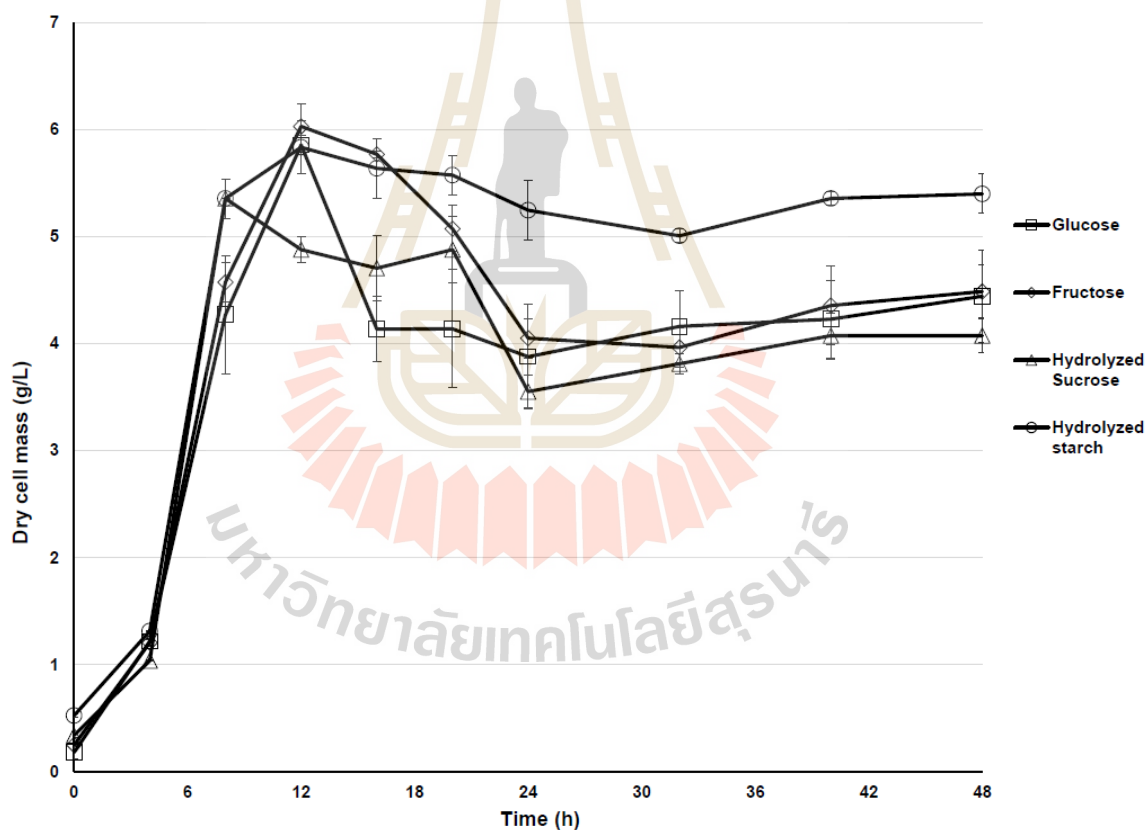
เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาล (รูปที่ 9) พบว่า ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง สามารถย่อยได้เพียง 66.9 % จากแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจจะเกิดมาจากกระบวนการย่อยของเอนไซม์ยังไม่สมบูรณ์ เนื่องมาจากระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและตามด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อาจจะยังไม่เพียงพอที่จะทำให้กระบวนการในการย่อยแป้งมันเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งอาจจะต้องเพิ่มระยะเวลาที่ใช้ในการย่อยให้นานมากขึ้น แต่ก็สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารคาร์บอนสำหรับการเจริญของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia sp. S1* ได้ ส่วนการใช้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสที่ได้จากการย่อยน้ำตาลทรายด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส พบว่าการใช้น้ำตาลลดลงอย่างช้าๆ เมื่อเทียบกับตัวอย่างทำการหมักในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลฟรุกโตสเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 9)

ในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia sp. S1* แสดงดังในรูปที่ 10 พบว่าการผลิตเอทานอลสูงสุดในอาหาร YM ที่ใช้ความกลูโคส 100 กรัม/ลิตร เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน แต่การผลิตเอทานอลจาก แป้งมันและน้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์นั้น พบว่าการผลิตของเอทานอลต่ำกว่าการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณของน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการย่อยของแป้งมัน ให้ปริมาณของน้ำตาลเริ่มต้นที่ใช้ในการหมักที่น้อยกว่าชุดการทดลองที่ให้น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และน้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยโดยเอนไซม์

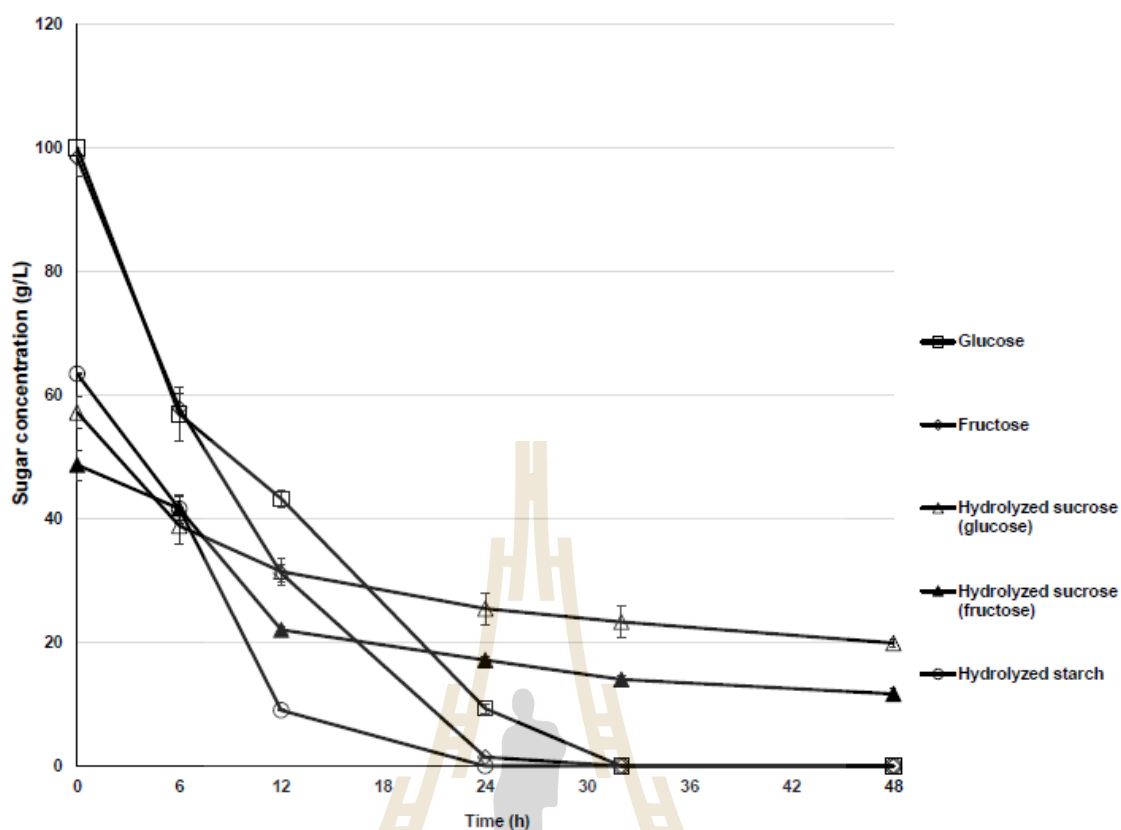
เมื่อเปรียบเทียบอัตราการหมักระหว่างน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุกโตส พบว่าอัตราการหมักของน้ำตาลทั้งสองชนิดแตกต่างกัน ความแตกต่างของอัตราการหมักนี้ยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่อาจจะเป็นเพราะกระบวนการในการนำน้ำตาลผ่านผนังเซลล์ ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกในกระบวนการเมทาโบลิซึมของน้ำตาลเฮกโซส เมื่อผ่านผนังเซลล์เข้ามาแล้ว น้ำตาลจะถูกนำเข้าสู่กระบวนการฟอสโฟไลเลชันโดยน้ำตาลแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการฟอสโฟไลเลสที่แตกต่างกัน เช่น hexokinases Hxk1 และ Hxk2 สามารถฟอสโฟไลเลสกลูโคสและฟรุกโตสได้ แต่มีประสิทธิภาพ

ในการฟอสโฟลิเลสที่แตกต่างกันและ glucokinase Glk1 สามารถฟอสโฟลิเลสได้เพียงกลูโคสเท่านั้น ไม่สามารถฟอสโฟลิเลสฟรุกโตสได้ (Entian, 1997)

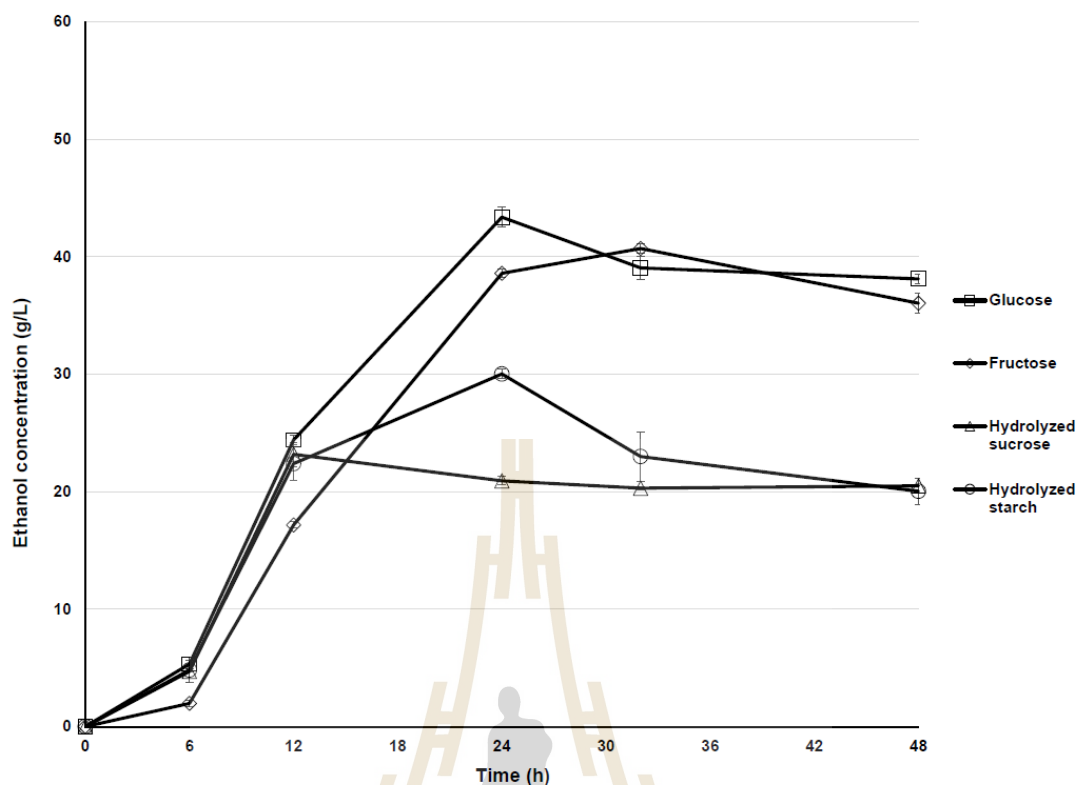
สำหรับในการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ดังแสดงในรูปที่ 11 พบว่า ไม่พบการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกในตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ทั้งหมดในการทดลอง โดยวิธี HPLC ทั้งนี้ เชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ที่ทำการคัดแยกมาใหม่ อาจสูญเสียความสามารถในการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิก ซึ่งความสามารถในการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกของยีสต์ที่พบในตอนแรกนั้น อาจจะมาจากการปนเปื้อนของพันธุกรรมของตัวยีสต์เอง ซึ่งเป็นผลให้เกิดการทำงานที่ผิดปกติ เป็นผลให้เกิดการสะสมและขับกรดชนิดนี้ออกมาภายนอกเซลล์



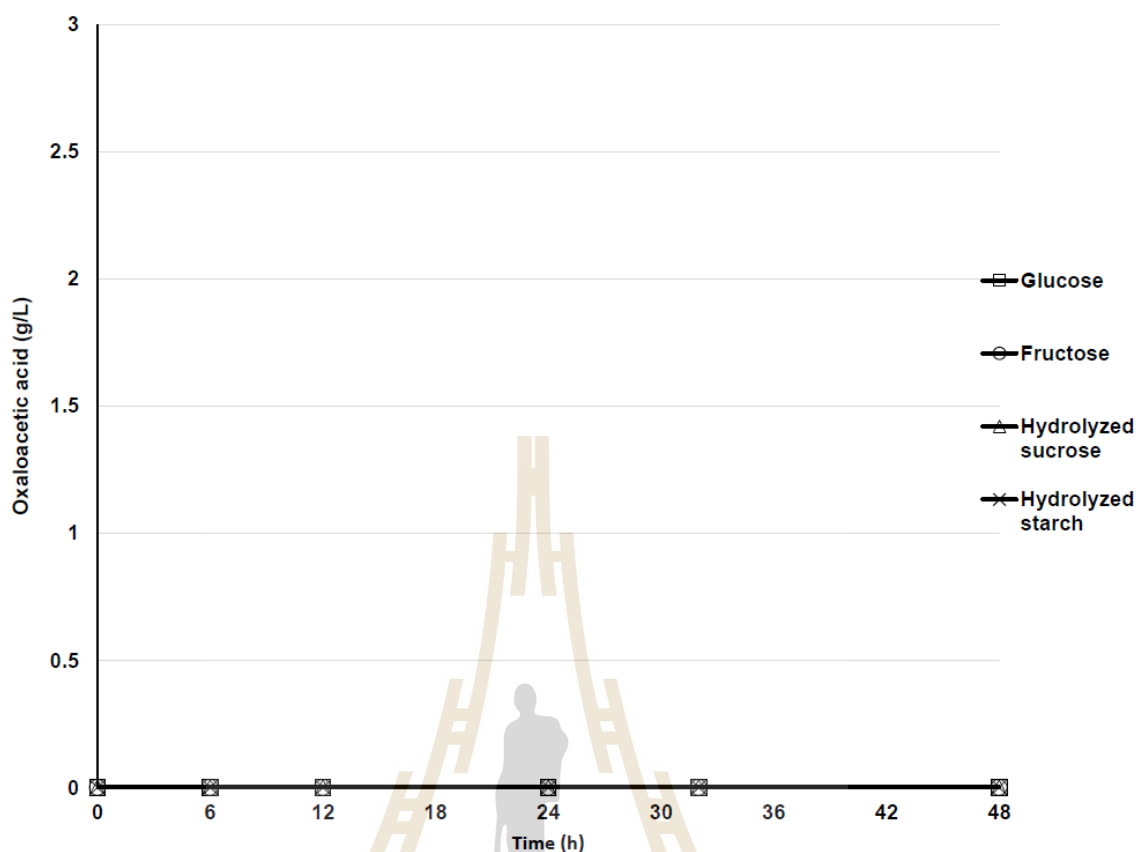
รูปที่ 8 แสดงการเจริญของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตร ของแหล่งอาหารคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์



รูปที่ ๑ แสดงใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตร ของแหล่งอาหารคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์



รูปที่ 10 แสดงการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของแหล่งอาหารคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์



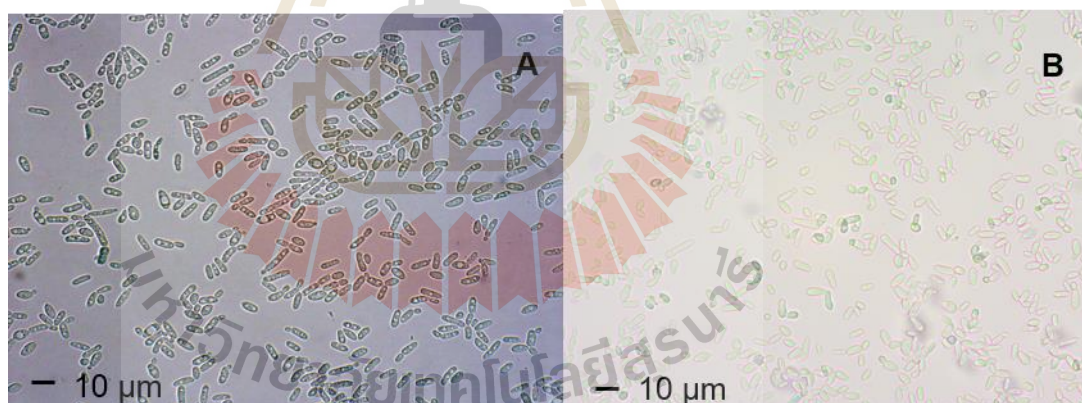
รูปที่ 11 แสดงการผลิตกรดออกซาโลอะซิดิกของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของแหล่งอาหารคาร์บอนจากน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส น้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

3. การคัดแยกเชื้อยีสต์ *Issatchenkia* sp. S1 ใหม่จากหลอดที่ปนเปื้อน

เนื่องจากเชื้อสดที่เก็บไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ซึ่งเตรียมไว้เพื่อใช้ในการทดลอง เก็บไว้ในอาหารแข็งเป็นเวลานาน มีการปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งอาจเกิดขึ้นระหว่างการจัดเก็บ ขนย้าย และติดตั้งอุปกรณ์ต่าง ๆ ของห้องปฏิบัติการจากอาคารเครื่องมือ 3 ไปยังอาคารเครื่องมือ 10 และได้พยายามทำการคัดแยกเชื้อ *Issatchenkia* sp. S1 จากโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็งจากงานที่มีการปนเปื้อน แต่ไม่มีการเจริญ จึงนำหลอด stock ที่ทำการเก็บไว้ในตู้ -70 องศาเซลเซียส มาทำการคัดแยก แต่เนื่องจากอาคารใหม่ มีปัญหากระแสไฟฟ้าไม่เสถียรในช่วงหลังจากที่มีการทำการติดตั้งตู้เย็น มี

ผลทำให้ตู้แช่ -70 องศาเซลเซียส ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ โดยอุณหภูมิภายในตู้อยู่ที่อุณหภูมิห้อง หรือประมาณ 30 องศาเซลเซียส

องศาเซลเซียส ซึ่งมีผลทำให้เชื้อที่ทำการเก็บไว้เกิดความเสียหายและมีการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในหลอด stock จึงได้การคัดแยกใหม่ โดยพบว่า เชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ที่คัดแยกได้มีความสามารถในการเจริญได้ในที่อุณหภูมิสูง โดยสามารถพบโคโลนีในงานที่ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่โคโลนีจะมีขนาดเล็กและจำนวนของโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็งจะน้อยกว่างานบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่ำกว่า แต่เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้จากงานอาหารที่บ่มที่อุณหภูมิต่างๆ มาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก พบว่าเชื้อที่ทำการแยกได้นั้น ไม่พบการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก ดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อนำเชื้อมาดูลักษณะสัณฐานทางกายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังแสดงในรูปที่ 12B พบว่า ลักษณะของเชื้อมีลักษณะไม่แตกต่างจากเชื้อ *Issatchenkia* sp. S1 ที่ทำการแยกได้ในตอนเริ่มต้นของการทำงานวิจัย (รูปที่ 12A) และมีความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงและสามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง



รูปที่ 12 ลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่าของเซลล์ยีสต์ทนร้อน

Issatchenkia sp. S1; (A) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (Sripiromrak, 2006), (B) ในอาหาร YM บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 วัน

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์กรดออกซาโลอะซิดิกของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 จากการคัดแยกเชื้อยีสต์ *Issatchenkia* sp. S1 ใหม่จากหลอดที่ปนเปื้อนในหลอดทดลอง โดยใช้อาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

| ชุดการทดลอง | ปริมาณของกรดออกซาโลอะซิดิก (กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ | | | |
|-------------|---|-------|-------|-------|
| | 37 °C | 40 °C | 42 °C | 45 °C |
| 1 | ND | ND | ND | ND |
| 2 | ND | ND | ND | ND |
| 3 | ND | ND | ND | ND |
| 4 | ND | ND | ND | ND |
| 5 | ND | ND | ND | ND |
| 6 | ND | ND | ND | ND |
| 7 | ND | ND | ND | ND |
| 8 | ND | ND | ND | ND |
| 9 | ND | ND | ND | ND |
| 10 | ND | ND | ND | ND |
| 11 | ND | ND | ND | ND |
| 12 | ND | ND | ND | ND |
| 13 | ND | ND | ND | ND |
| 14 | ND | ND | ND | ND |
| 15 | ND | ND | ND | ND |

ND = Not Detected

4. การทดสอบหาผลของเกลืออะซิเตตต่อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1

การทดสอบการเติมเกลืออะซิเตต ที่ความเข้มข้น 0.0 ถึง 1.0 % โดยน้ำหนัก ที่มีผลต่อความสามารถในการเจริญ การใช้น้ำตาล การผลิตเอทานอลและกรดออกซาโลอะซิดิกของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุก

โตส น้ำตาลซูโครสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) และเอนไซม์เทอร์มามิว (Thermamyl® SC) ที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร มาเตรียมเป็นอาหารที่ใช้สำหรับการหมัก โดยเมื่อทำการเติมเกลือโซเดียมอะซิเตต (sodium acetate) ลงไปในอาหาร และปรับค่า pH เริ่มต้นก่อนการหมักที่ 4.0 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ยีสต์สามารถถูกกระตุ้นกระบวนการสร้างออกซาโลอะซิเตตได้ด้วยเกลืออะซิเตตที่เป็นสารตั้งต้น

4.1 ผลของเกลืออะซิเตตต่อเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia sp. S1* ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

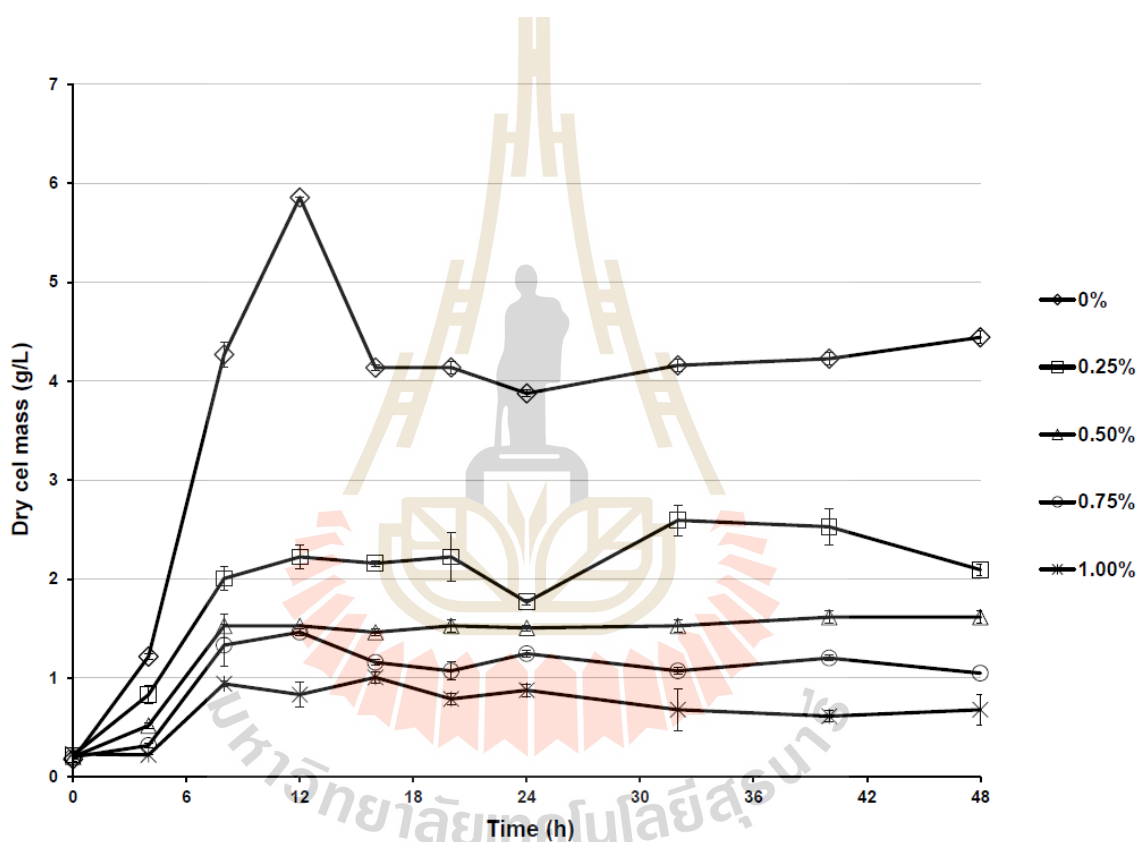
เมื่อทำการเติมเกลืออะซิเตตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เกลืออะซิเตตมีผลยับยั้งการเจริญ เมื่อทำการเปรียบเทียบการลดลงของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ พบว่า เมื่อเติม 0.25 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตต ลงไปในอาหาร ปริมาณของเซลล์ยีสต์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ลดลงถึง 164 % เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมเกลืออะซิเตต ดังแสดงในรูปที่ 13 และเมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญจำเพาะ จะเห็นว่าความสามารถในการเจริญของยีสต์จะลดลงจาก 0.295 ± 0.025 ต่อชั่วโมง เป็น 0.196 ± 0.001 ต่อชั่วโมง เมื่อทำการเติมเกลืออะซิเตตลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 0.25 % โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากนี้ เกลืออะซิเตตยังมีผลต่ออัตราการใช้น้ำตาล ดังแสดงในรูปที่ 14 และตารางที่ 5 โดยพบว่าการเติมเกลืออะซิเตต ปริมาณ 0.25% โดยน้ำหนัก จะช่วยเพิ่มอัตราการใช้น้ำตาลโดยเพิ่มขึ้น 26.4 % เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่เติมเกลืออะซิเตต แต่ที่ความเข้มข้นของเกลืออะซิเตตที่มากกว่า 0.25 % โดยน้ำหนัก จะมีผลทำให้การบริโภคน้ำตาลของเชื้อยีสต์ลดลง

จากผลข้อมูลของการผลิตเอทานอล ในรูปที่ 15 พบว่า การผลิตเอทานอลจะสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเริ่มต้นการหมัก โดยชุดการทดลองที่ทำการเติมเกลืออะซิเตต ปริมาณ 0.25 และ 0.5% โดยน้ำหนัก มีผลในการเพิ่มความสามารถในการผลิตเอทานอลจาก 1.81 ± 0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเกลืออะซิเตต เป็น 2.05 ± 0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 1.93 ± 0.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยในชุดการทดลองที่ทำการเติมเกลืออะซิเตต ปริมาณ 0.25 % โดยน้ำหนัก จะให้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุดที่ 49.32 ± 1.07 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณของเอทานอลมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมเกลืออะซิเตตถึง 13.8 %

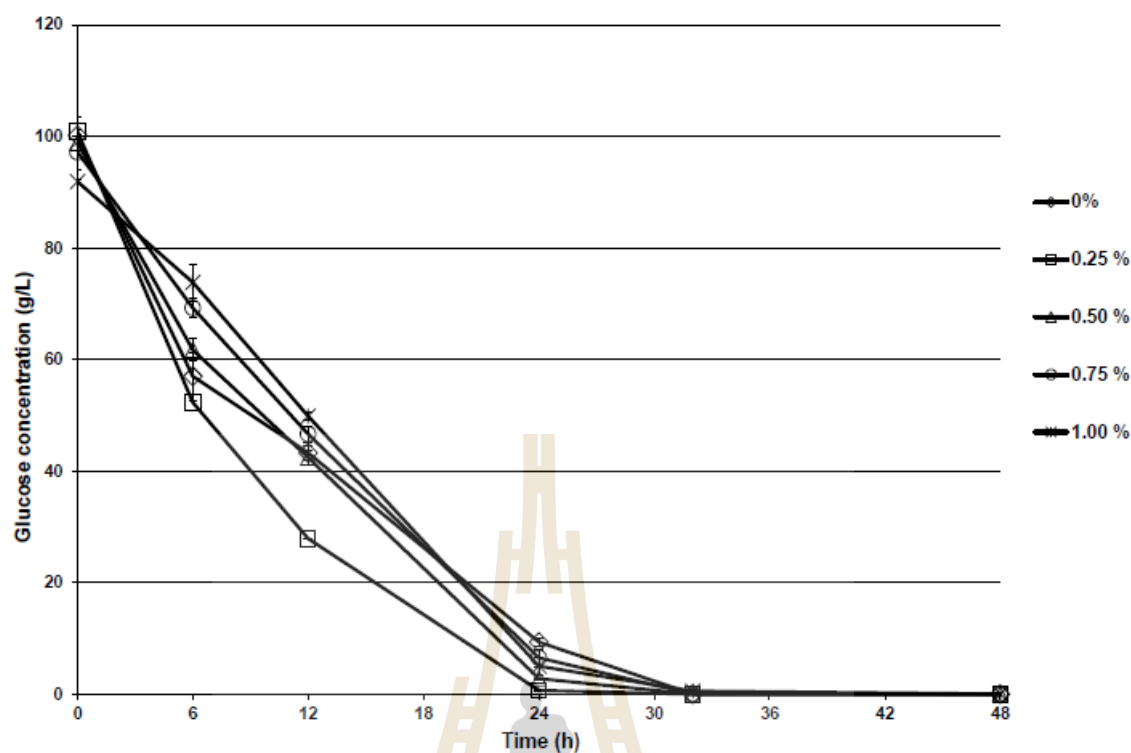
จากผลของการเจริญในรูปที่ 13 ในชุดการทดลองที่ไม่ทำการเติมเกลืออะซิเตต จะเห็นได้ว่า หลังจากชั่วโมงที่ 12 เส้นกราฟของการเจริญลดลงอย่างรวดเร็ว ลดลงอย่างช้าๆ ในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 18 – 24 และมีการเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงชั่วโมงที่ 24-48 ซึ่งเมื่อพิจารณาควบคู่กับกราฟของการใช้น้ำตาลในรูปที่ 14 และกราฟของการผลิตเอทานอลในรูปที่ 15 จะเห็นได้ว่า ในชั่วโมงที่ 12 ปริมาณของน้ำตาลในอาหารเหลวลดลงกว่า 51 % เมื่อเทียบกับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น แต่มีปริมาณของเซลล์สูงถึง 5.85 ± 0.09 กรัมต่อลิตร เป็นผลทำให้เกิดความไม่สมดุลระหว่างปริมาณของน้ำตาลที่ใช้ในกิจกรรมของเซลล์กับปริมาณของน้ำตาลที่เซลล์ได้รับ เป็นผลทำให้เซลล์เริ่มใช้สารอินทรีย์ที่เก็บสะสมไว้ภายในเซลล์ทดแทนแหล่งอาหารคาร์บอนจากภายนอกเซลล์ ซึ่งเป็นผลทำให้กราฟของน้ำหนักรวมของเซลล์แห้งมีค่าลดลงเป็น 4.13 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 18 และหลังจากชั่วโมงที่ 24 ปริมาณของน้ำตาลที่พบในอาหารเหลือเพียง 9.33 ± 0.79 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการของยีสต์ที่มีอยู่ในอาหารเหลว จึงมีการปรับกิจกรรมของเซลล์อีกครั้ง เพื่อให้สามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน จึงเป็นผลทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเหลวลดลงหลังชั่วโมงที่ 24 ดังแสดงในรูปที่ 15 ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะของปรากฏการณ์ที่เรียกว่า Diauxic growth ตามรายงานของ Chu and Barnes (2016) ได้อธิบายไว้ว่าเป็นลักษณะของการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารที่มีแหล่งของน้ำตาลที่ต่างกันสองชนิด หรืออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีสารอาหารหลากหลาย ซึ่งเมื่อเชื้อได้ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนชนิดแรกหมด จะเกิด lag-phase หรือช่วงของการพักตัว ทำให้ลักษณะของเส้นกราฟการเจริญมีเป็นรูปตัว S ซึ่งในช่วงของการพักตัวจะมีการพัฒนาตัวเอง ปรับกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ให้เหมาะสมสำหรับการใช้แหล่งอาหารคาร์บอนชนิดอื่นที่มีอยู่ในอาหารหรือสิ่งแวดล้อมนั้นๆ

จากผลการทดลอง เกลืออะซิเตตมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ซึ่งจากรายงานของ Giannattasio และคณะ (2013) รายงานว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถใช้อะซิเตต และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ในบางสภาวะ ซึ่งเซลล์ยีสต์จะสามารถใช้อะซิเตตในการเจริญได้ ซึ่งอะซิเตตสามารถส่งผ่านผนังเซลล์ โดย electroneutral proton symport transporter (ADY2) หรือ monocarboxylate transporter (JEN1) จากนั้น อะซิเตตจะถูกเมแทบอลิไทต์เป็น acetyl-CoA โดย peroxisomal หรือ cytosolic acetyl-CoA synthetases ซึ่งจะถูกใช้ในวัฏจักรไกลอออกซิเลต หรือจะถูกออกซิไดส์ในไมโทคอนเดรียในวัฏจักรเครป อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่มีกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* จะไม่สามารถเมแทบอลิไทต์อะซิเตตได้ เนื่องจากการกระตุ้นของ

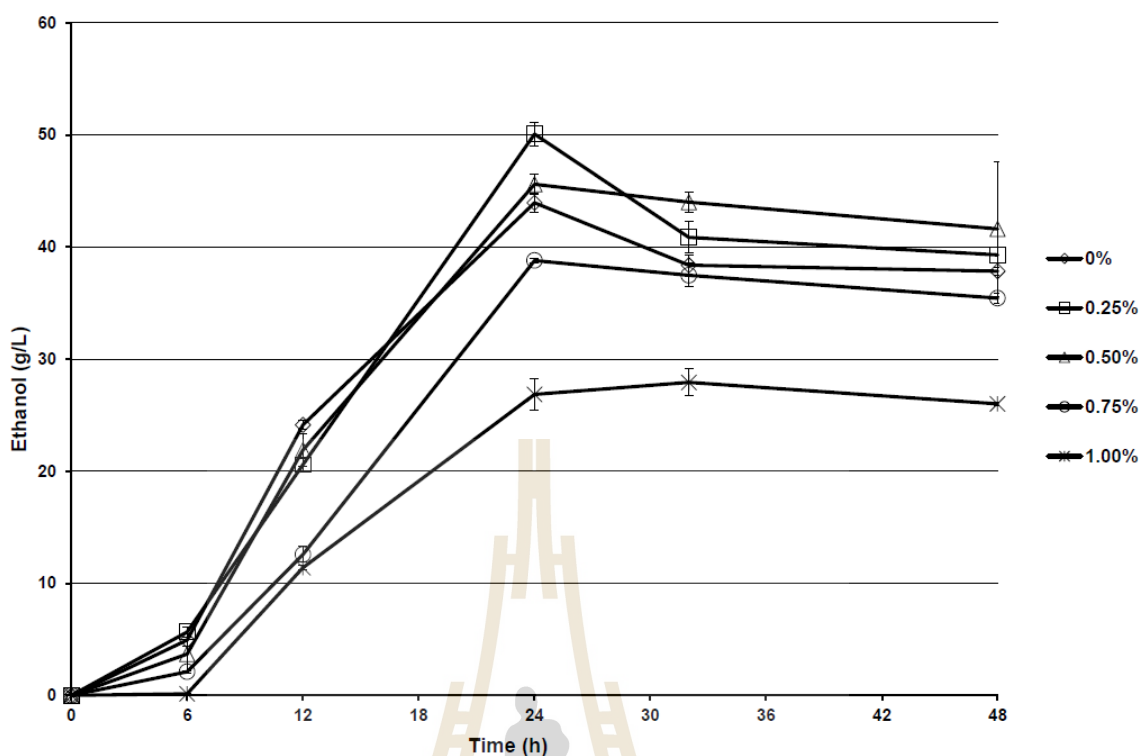
glucose repression pathways เป็นผลทำให้ยีสต์อยู่ในสภาวะความเครียดเมื่อมีกลูโคส ซึ่งจะไปกระตุ้น adaptive response และนำไปสู่กระบวนการขับอะซิเตตออกจากเซลล์ ซึ่งกระบวนการเหล่านี้ เป็นกระบวนการที่ต้องใช้พลังงานในการตอบสนองของผลกระตุ้น เป็นผลให้ยีสต์ใช้พลังงานส่วนหนึ่ง ไปกับการขับอะซิเตต ออกจากเซลล์ เป็นผลให้การเจริญของยีสต์ลดลง ดังแสดงในรูปที่ 16 ซึ่งให้ผลคล้ายกับผลการทดลองของชุดการทดลองที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน ในหัวข้อที่ 4.1



รูปที่ 13 แสดงการเจริญของยีสต์พันธุ์ *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตร ของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตต



รูปที่ 14 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสของยีสต์พันธุ์ *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตด



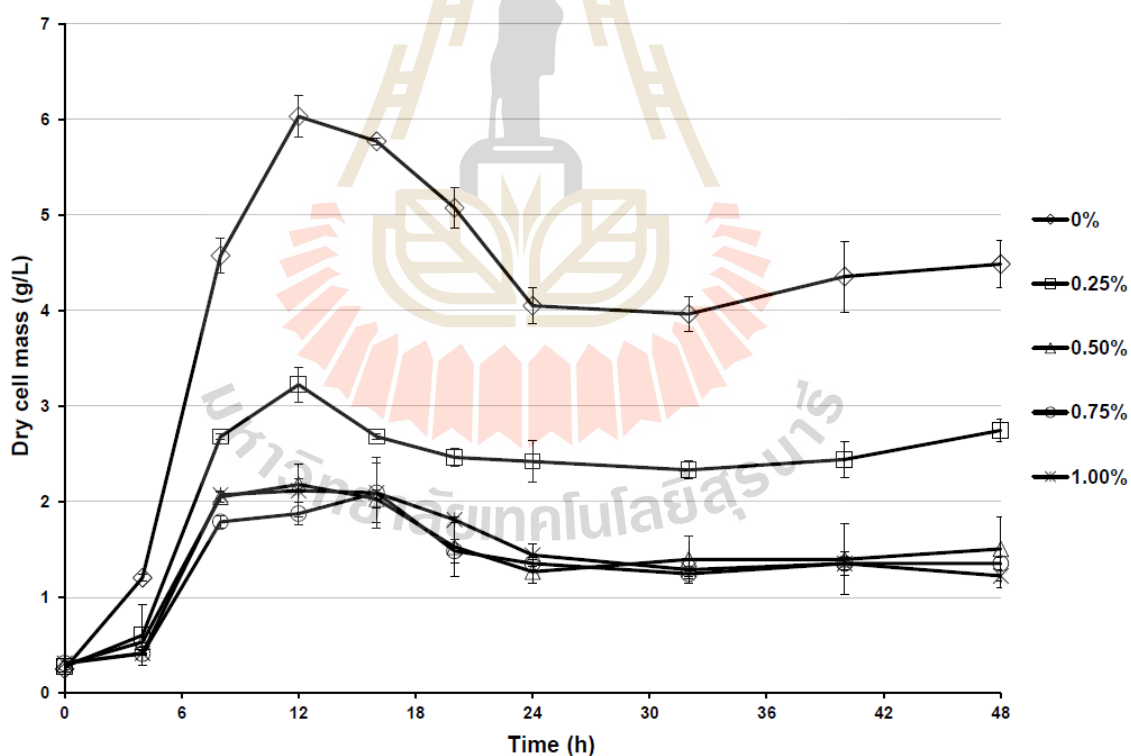
รูปที่ 15 แสดงผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตต

4.2 ผลของเกลืออะซิเตตต่อเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลฟลูคโตสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

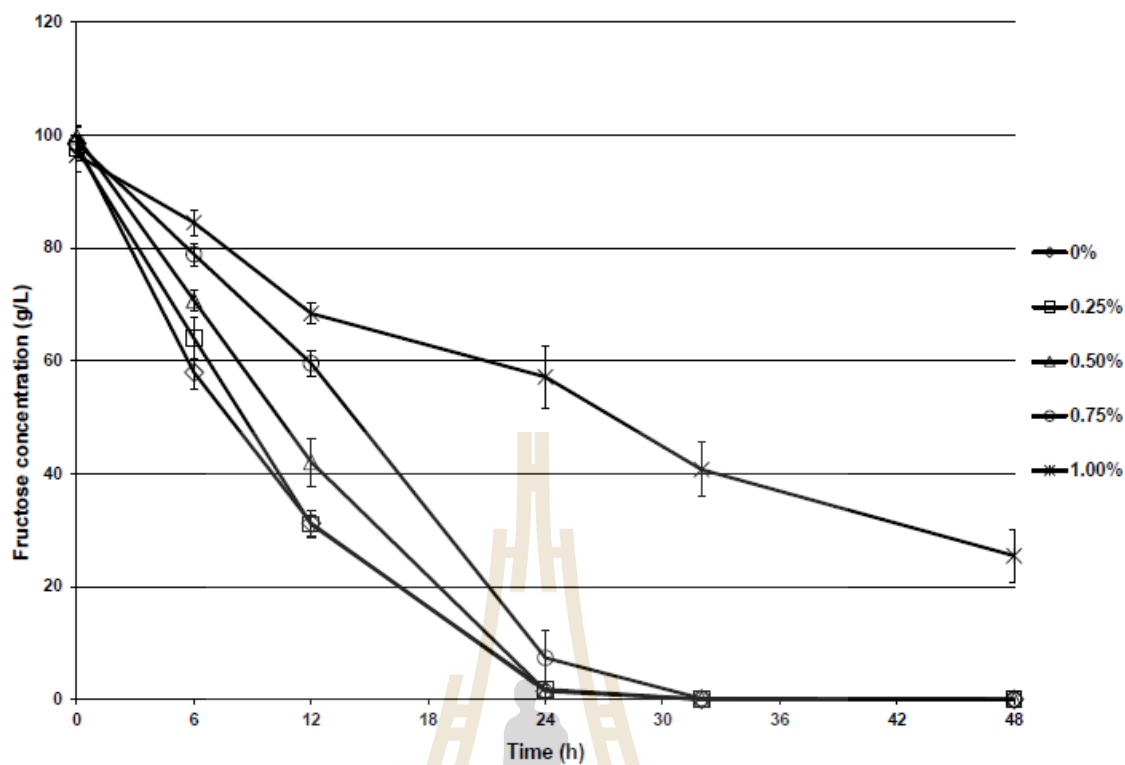
เมื่อทำการเติมเกลืออะซิเตตลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เกลืออะซิเตตมีผลยับยั้งการเจริญ เมื่อทำการเปรียบเทียบการลดลงของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ พบว่า เมื่อเติม 0.25 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตต ลงไปในอาหาร ปริมาณของเซลล์ยีสต์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ลดลงถึง 87 % เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมเกลืออะซิเตต ดังแสดงในรูปที่ 13 และเมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญจำเพาะ จะเห็นว่าความสามารถในการเจริญของยีสต์จะลดลงจาก 0.272 ± 0.001 ต่อชั่วโมง เป็น 0.224 ± 0.008 ต่อชั่วโมง เมื่อทำการเติมเกลืออะซิเตตลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 0.25 % โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากนี้ เกลืออะซิเตตยังมีผลต่ออัตราการใช้น้ำตาล ดังแสดงในรูปที่ 17 และตารางที่ 5 โดยพบว่าการเติมเกลืออะซิเตต ปริมาณ 0.25% โดยน้ำหนัก จะช่วยเพิ่มอัตราการใช้น้ำตาล

น้ำตาลโดยเพิ่มขึ้น 6.63 % เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่เติมอะซิเตด แต่ที่ความเข้มข้นของเกลืออะซิเตดที่มากกว่า 0.25 % โดยน้ำหนัก จะมีผลทำให้การบริโภคน้ำตาลของเชื้อยีสต์ลดลง

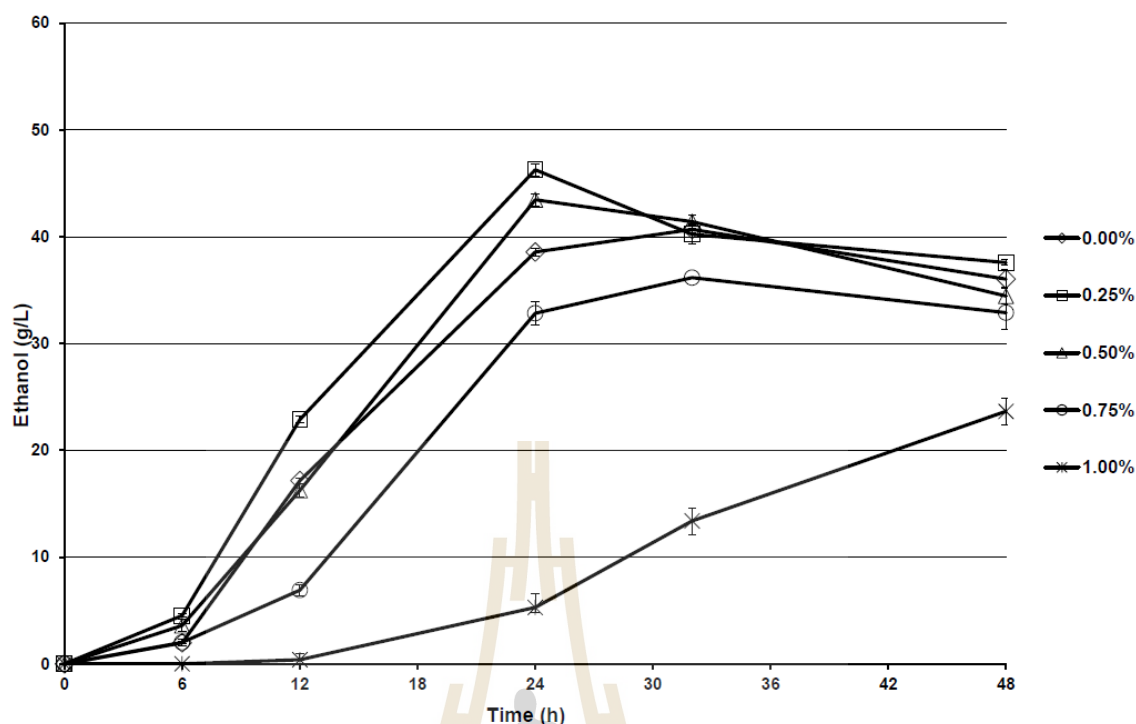
จากผลข้อมูลของการผลิตเอทานอล ในรูปที่ 18 พบว่า การผลิตเอทานอลจะสูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง หลังจากเริ่มต้นการหมัก โดยชุดการทดลองที่ทำการเติมเกลืออะซิเตด ปริมาณ 0.25 และ 0.5% โดยน้ำหนัก มีผลในการเพิ่มความสามารถในการผลิตเอทานอลจาก 1.61 ± 0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเกลืออะซิเตด เป็น 1.93 ± 0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 1.81 ± 0.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ โดยในชุดการทดลองที่ทำการเติมเกลืออะซิเตด ปริมาณ 0.25 % โดยน้ำหนัก จะให้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุดที่ 46.27 ± 0.55 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งให้ปริมาณของเอทานอลมากกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมเกลืออะซิเตดถึง 19.96 %



รูปที่ 16 แสดงการเจริญของยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตด



รูปที่ 17 แสดงการใช้น้ำตาลฟรุกโตสของยีสต์ทนร้อน *Issatchenka* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลฟรุกโตสที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตด



รูปที่ 18 แสดงการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia sp. S1* ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของกลีเซอรอล

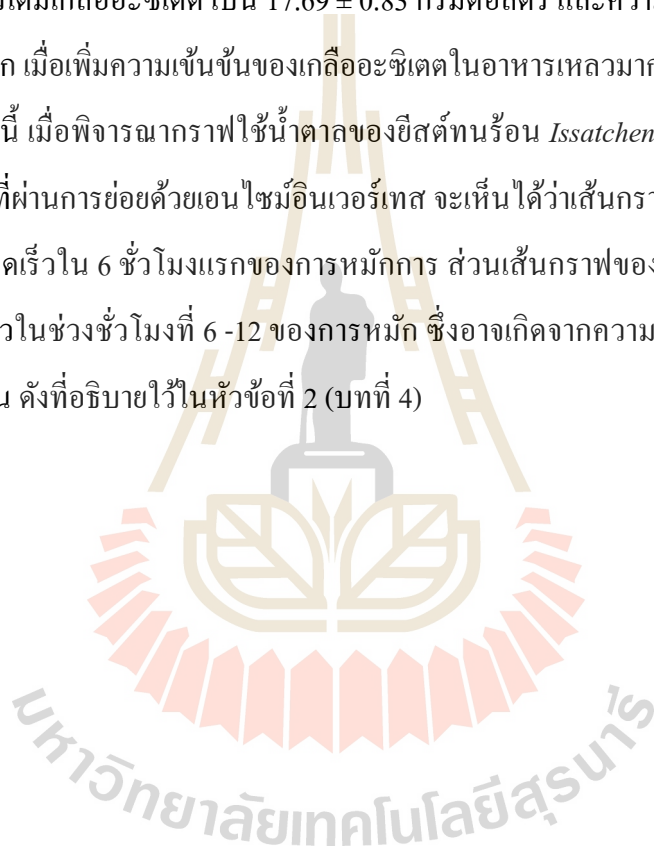
4.3 ผลของกลีเซอรอลต่อเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia sp. S1* ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลที่ได้จากย้อยน้ำตาลทรายด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

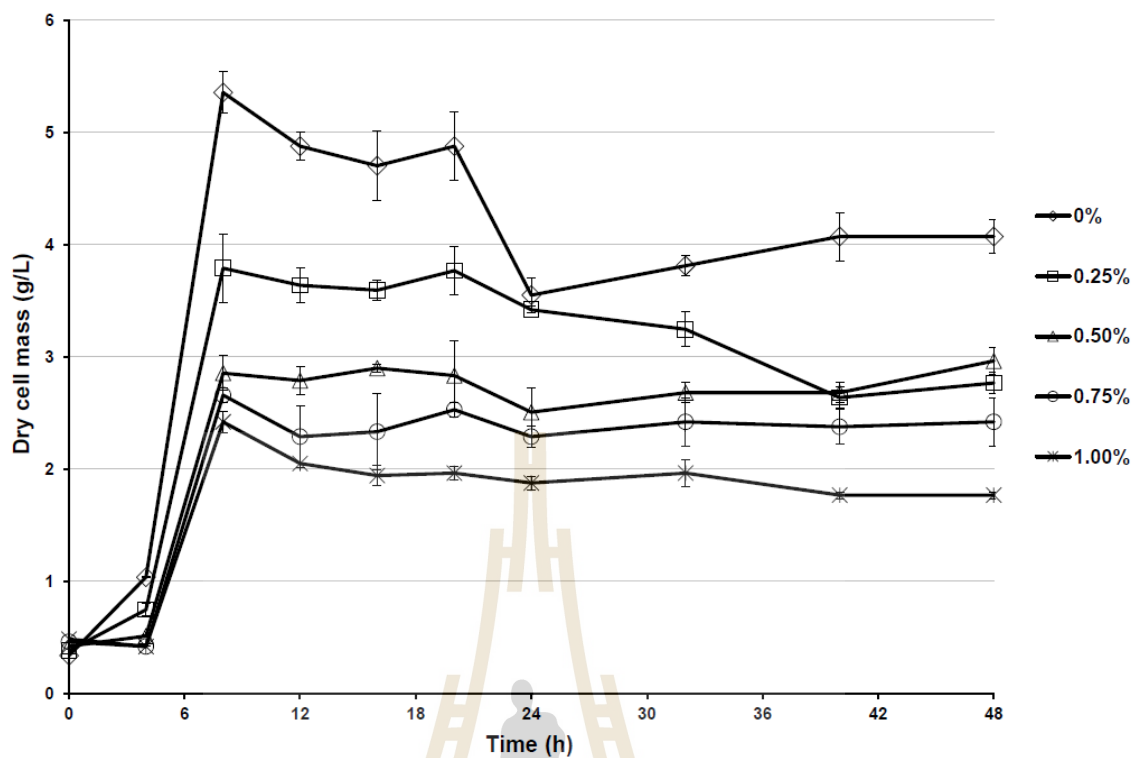
เมื่อทำการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า กลีเซอรอลมีผลยับยั้งการเจริญ เมื่อทำการเปรียบเทียบการลดลงของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ เช่นเดียวกับการทดลองทั้งสองชุดการทดลองก่อน โดยพบว่า เมื่อเติม 0.25 % โดยน้ำหนักของกลีเซอรอล ลงไปในอาหาร ปริมาณของเซลล์ยีสต์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ลดลงถึง 38 % เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมกลีเซอรอล ดังแสดงในรูปที่ 19 และเมื่อพิจารณาถึงอัตราการเจริญจำเพาะ จะเห็นว่าความสามารถในการเจริญของยีสต์จะลดลงจาก 0.241 ± 0.002 ต่อชั่วโมง เป็น 0.210 ± 0.008 ต่อชั่วโมง เมื่อทำการเติมกลีเซอรอลลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 0.25 % โดยน้ำหนัก ดังแสดงในตารางที่ 4 นอกจากนี้ กลีเซอรอลยังมีผลต่ออัตราการใช้น้ำตาล ดังแสดงในรูปที่ 20 และตารางที่ 5 โดยพบว่า การเติมกลีเซอรอล

ปริมาณ 0.25% โดยน้ำหนัก จะช่วยเพิ่มอัตราการใช้น้ำตาลโดยเพิ่มขึ้น 15.1 % เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่เติมอะซิเตด แต่ที่ความเข้มข้นของเกลืออะซิเตดที่มากกว่า 0.25 % โดยน้ำหนัก จะมีผลทำให้การบริโภคน้ำตาลของเชื้อยีสต์ลดลง

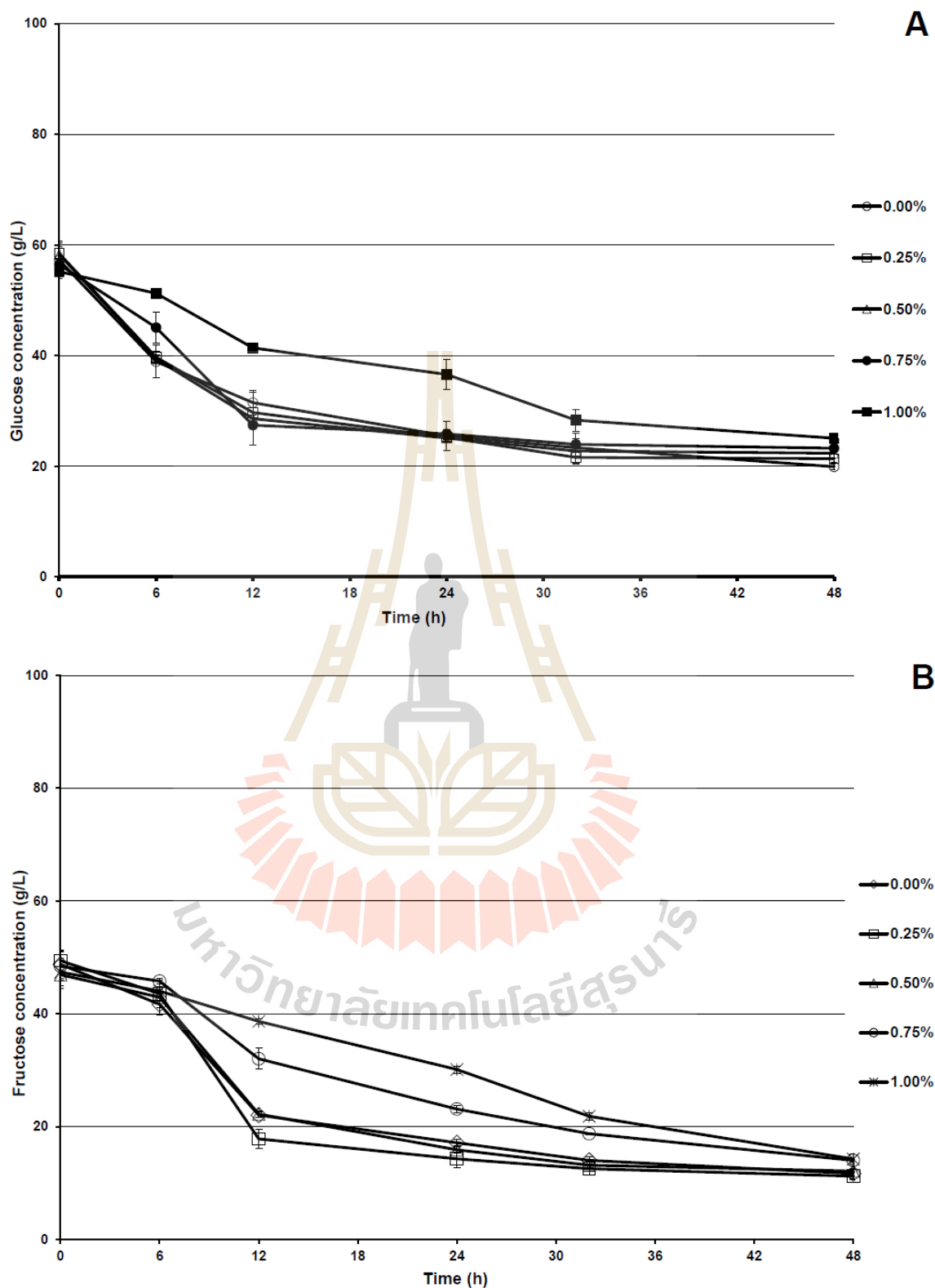
จากผลข้อมูลของการผลิตเอทานอล ในรูปที่ 21 พบว่า การเติมเกลืออะซิเตดมีผลทำให้การผลิตเอทานอลลดลง โดยชุดตัวอย่างที่มีการเติม 0.25 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตด ทำให้ปริมาณของเอทานอลที่ผลิตได้ที่ชั่วโมงที่ 12 ลดลง 23.7 % โดยลดลงจาก 23.17 ± 0.04 กรัมต่อลิตรในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเกลืออะซิเตด เป็น 17.69 ± 0.83 กรัมต่อลิตร และความปริมาณของเอทานอลที่ผลิตได้จะลดลงอีก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลืออะซิเตดในอาหารเหลวมากขึ้น

นอกจากนี้ เมื่อพิจารณากราฟใช้น้ำตาลของยีสต์พันธุ์อื่น *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส จะเห็นได้ว่าเส้นกราฟของน้ำตาลกลูโคสจะมีการลดลงอย่างรวดเร็วใน 6 ชั่วโมงแรกของการหมักการ ส่วนเส้นกราฟของน้ำตาลฟรุคโตสจะมีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 6-12 ของการหมัก ซึ่งอาจเกิดจากความสามารถของการฟอสโฟลิเลสที่แตกต่างกัน ดังที่อธิบายไว้ในหัวข้อที่ 2 (บทที่ 4)

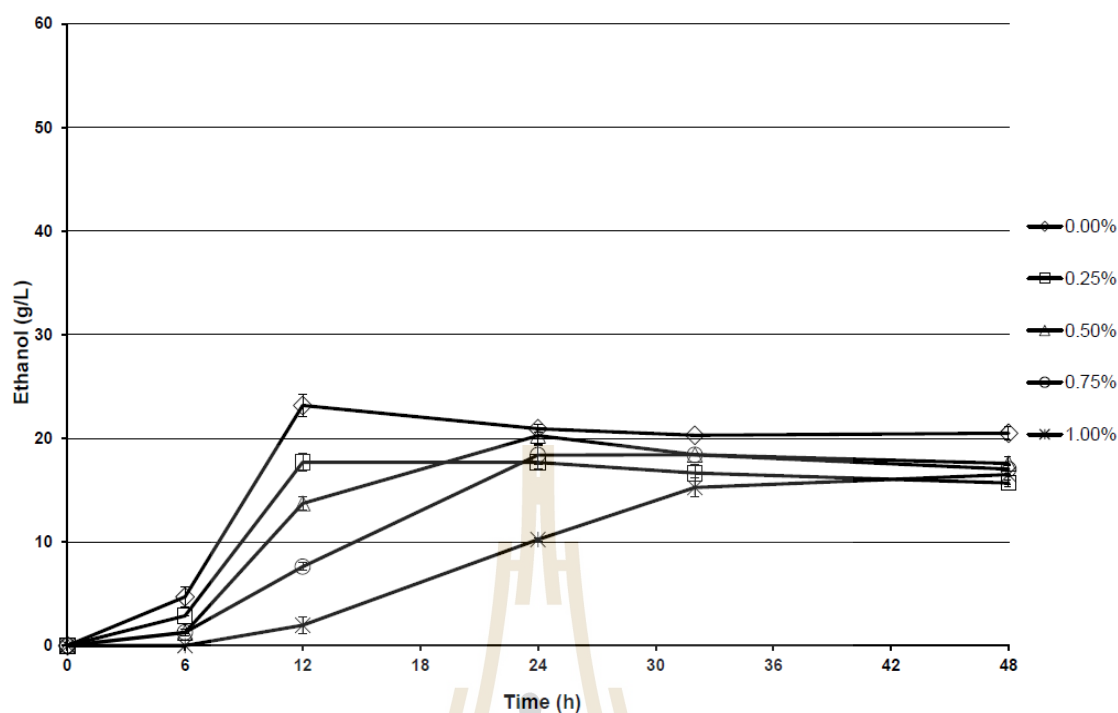




รูปที่ 19 แสดงการเจริญของยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรของน้ำตาลซูโครสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นแหล่งอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตต



รูปที่ 20 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคส (A) และฟรุกโตส (B) ของยีสต์พันธุ์อื่น *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลทรายที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร และย่อยด้วยอินเวอร์เทส เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตต

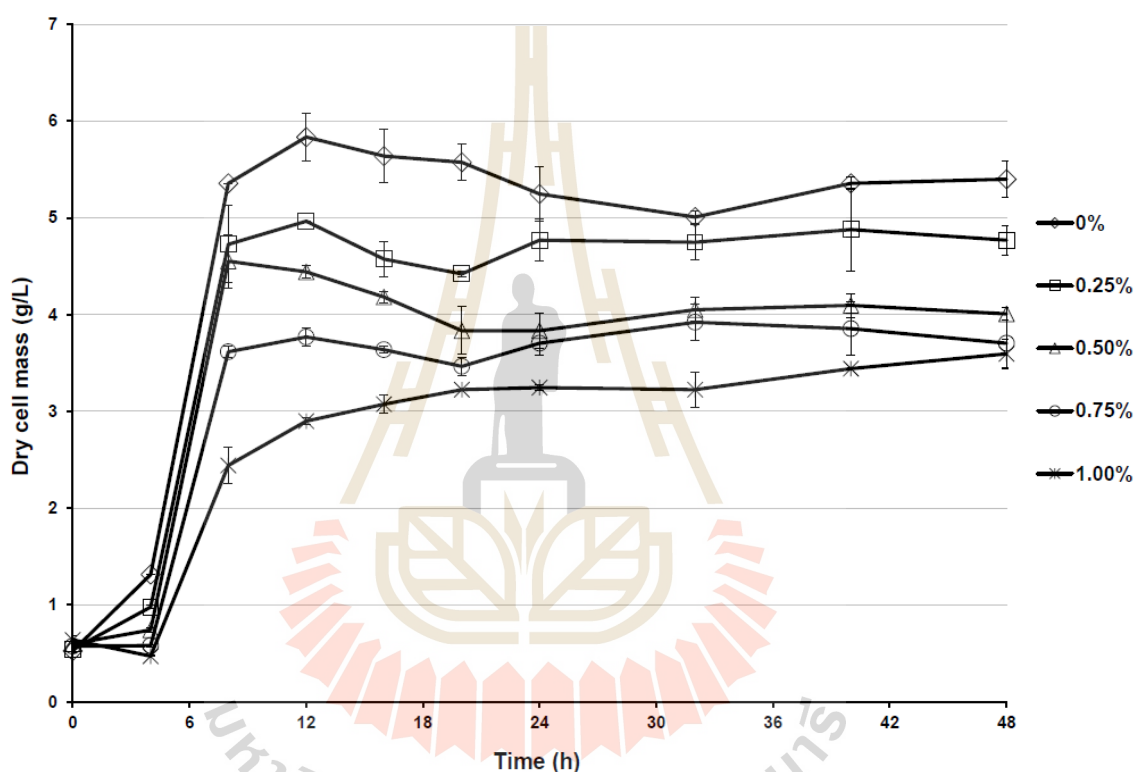


รูปที่ 21 แสดงการเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตร ของน้ำตาลซูโครสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน และทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลีอะซิเตด

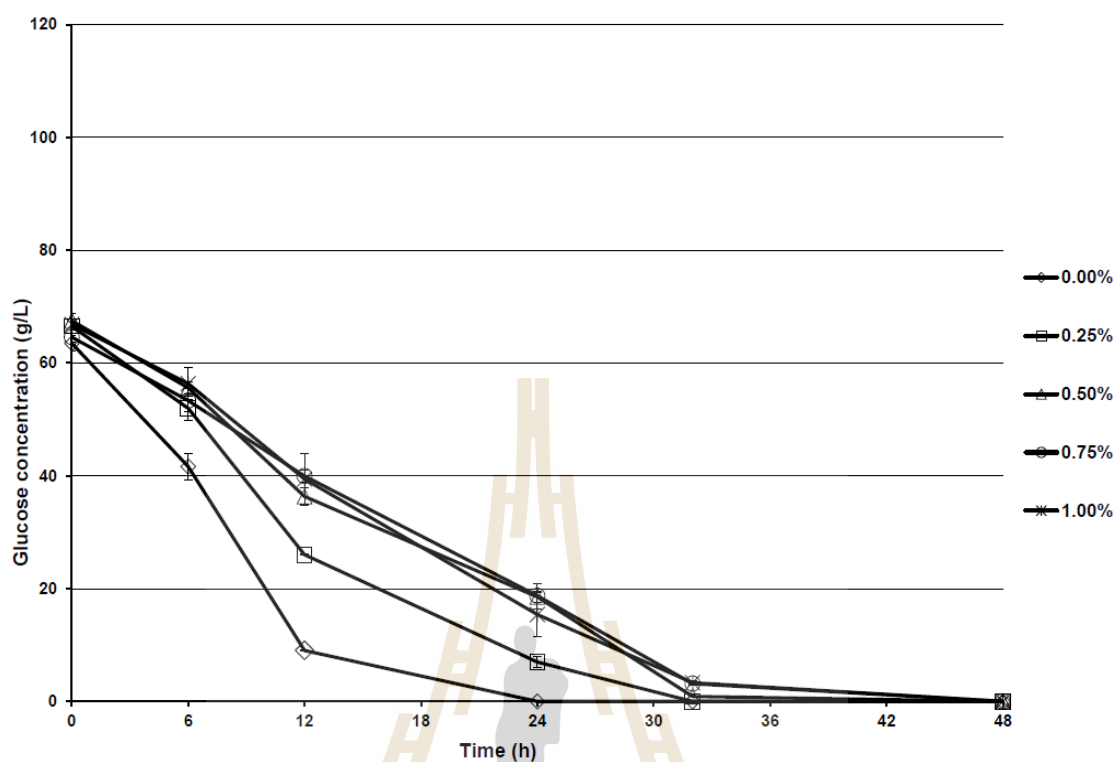
4.4 ผลของเกลีอะซิเตดต่อเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้น้ำตาลที่ได้จากย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ เป็นแหล่งอาหารคาร์บอน

เมื่อทำการเติมเกลีอะซิเตดลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เกลีอะซิเตดมีผลยับยั้งการเจริญ เมื่อทำการเปรียบเทียบการลดลงของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ เช่นเดียวกับการทดลองที่ใช้น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส และน้ำตาลทรายที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน โดยพบว่า เมื่อเติม 0.25 % โดยน้ำหนักของเกลีอะซิเตด ลงไปในอาหาร ปริมาณของเซลล์ยีสต์สูงสุดที่ 12 ชั่วโมง ลดลงถึง 14.9 % เมื่อเทียบกับตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมเกลีอะซิเตด ดังแสดงในรูปที่ 22 นอกจากนี้ เกลีอะซิเตดยังมีผลต่ออัตราการใช้น้ำตาล ดังแสดงในรูปที่ 23 และตารางที่ 5 โดยพบว่า การเติมเกลีอะซิเตดมีผลทำให้อัตราการใช้น้ำตาลลดลงในทุกชุดการทดลอง เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่เติมเกลีอะซิเตด

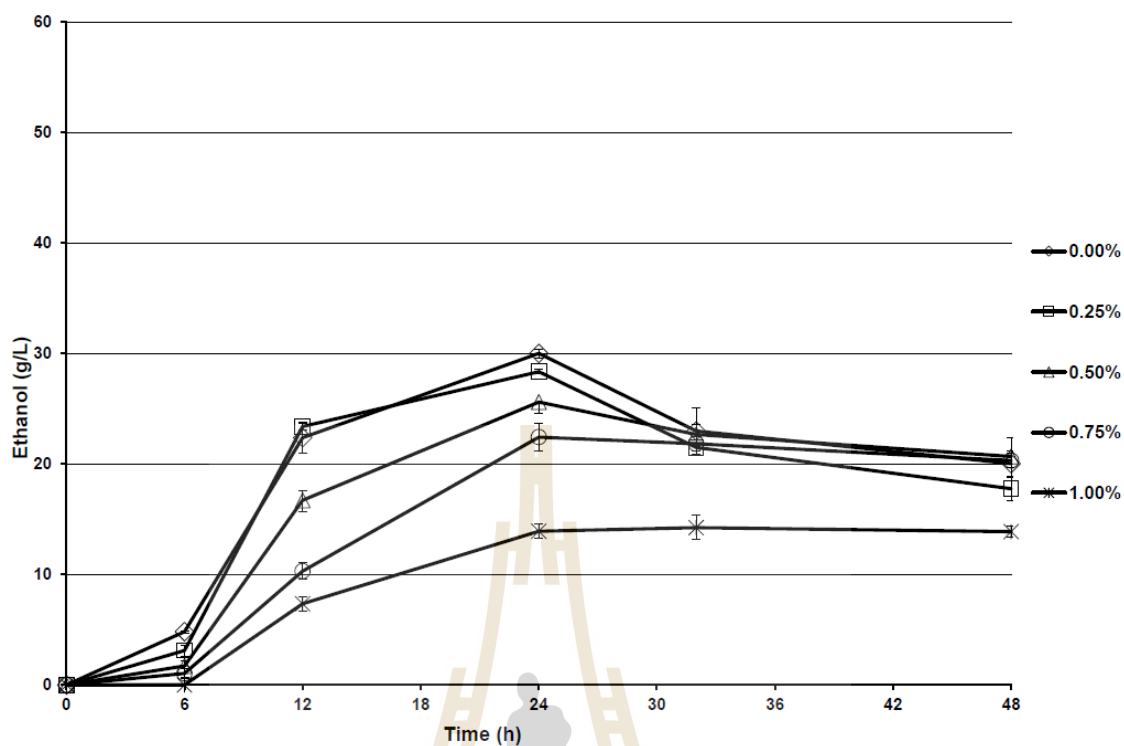
จากผลข้อมูลของการผลิตเอทานอล ในรูปที่ 24 พบว่า การเติมเกลืออะซิเตดมีผลทำให้การผลิตเอทานอลลดลง โดยชุดตัวอย่างที่มีการเติม 0.5 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตด ทำให้ปริมาณของเอทานอลที่ผลิตได้ที่ชั่วโมงที่ 24 ลดลง 16.8 % โดยลดลงจาก 30.01 ± 0.41 กรัมต่อลิตรในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเกลืออะซิเตด เป็น 24.97 ± 0.02 กรัมต่อลิตร และความปริมาณของเอทานอลที่ผลิตได้ลดลงอีก เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเกลืออะซิเตดในอาหารเหลวมากขึ้น



รูปที่ 22 แสดงการเจริญของยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้แป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เทอร์มามิวเป็นแหล่งอาหารคาร์บอน โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตด



รูปที่ 23 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เทอร์มามิวเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตด



รูปที่ 24 แสดงการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสและเอนไซม์เทอร์มามิวเป็นแหล่งอาหารคาร์บอนในอาหาร YM โดยทำการเติม 0 - 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลีอะซิเตต

ตารางที่ 4 แสดงค่าการเจริญจำเพาะของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนต่างๆ และเติม 2 กรัมต่อลิตรของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับการเติม 0.0 – 1.0 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตต

| ความเข้มข้นของ เกลืออะซิเตต (% โดยน้ำหนัก) | อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง) ในอาหาร YM ที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอน | | | |
|--|---|-------------|------------------------------|---------------------------|
| | กลูโคส | ฟรุกโตส | น้ำตาลทรายที่ ผ่านการย่อย | แป้งมันที่ผ่านการ ย่อย |
| 0.00 | 0.295±0.025 | 0.272±0.001 | 0.241±0.002 | 0.216±0.005 |
| 0.25 | 0.196±0.001 | 0.224±0.008 | 0.210±0.004 | 0.211±0.001 |
| 0.50 | 0.178±0.013 | 0.183±0.007 | 0.185±0.004 | 0.196±0.001 |
| 0.75 | 0.185±0.002 | 0.172±0.003 | 0.166±0.009 | 0.187±0.008 |
| 1.00 | 0.132±0.016 | 0.179±0.001 | 0.152±0.002 | 0.155±0.002 |

ตารางที่ 5 แสดงค่าอัตราการใช้น้ำตาลของเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนต่างๆ และเติม 2 กรัมต่อลิตรของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับการเติม 0.00 – 1.00 % w/v ของเกลืออะซิเตต

| ความเข้มข้นของ เกลืออะซิเตต (% โดยน้ำหนัก) | อัตราการบริโภคน้ำตาล (g/L/h) ในอาหาร YM ที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอน | | | |
|--|---|-----------|------------------------------|---------------------------|
| | กลูโคส | ฟรุกโตส | น้ำตาลทรายที่ ผ่านการย่อย | แป้งมันที่ผ่านการ ย่อย |
| 0.00 | 4.36±0.21 | 4.83±0.11 | 4.37±0.18 | 4.16±0.30 |
| 0.25 | 5.51±0.06 | 5.15±0.36 | 5.03±0.33 | 2.99±0.06 |
| 0.50 | 4.13±0.11 | 4.20±0.47 | 4.53±0.63 | 2.02±0.04 |
| 0.75 | 3.93±0.02 | 2.75±0.08 | 3.79±0.39 | 1.67±0.25 |
| 1.00 | 3.54±0.18 | 1.94±0.40 | 1.88±0.05 | 1.71±0.21 |

ตารางที่ 6 แสดงค่าอัตราการผลิตเอทานอล (productivity) ของเชื้อยีสต์ที่หมัก *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนต่างๆ และเติม 2 กรัมต่อลิตรของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับการเติม 0.00 – 1.00 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตด

| ความเข้มข้นของ เกลืออะซิเตด (% โดยน้ำหนัก) | อัตราการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) ในอาหาร YM ที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนชนิดต่างๆ | | | |
|--|--|-------------|------------------------------|---------------------------|
| | กลูโคส | ฟรุกโตส | น้ำตาลทรายที่ ผ่านการย่อย | แป้งมันที่ผ่านการ ย่อย |
| | 0.00 | 1.81 ± 0.03 | 1.61 ± 0.02 | 0.87 ± 0.02 |
| 0.25 | 2.05 ± 0.04 | 1.93 ± 0.02 | 0.74 ± 0.03 | 1.18 ± 0.01 |
| 0.50 | 1.93 ± 0.04 | 1.81 ± 0.02 | 0.84 ± 0.03 | 1.04 ± 0.01 |
| 0.75 | 1.62 ± 0.01 | 1.37 ± 0.05 | 0.77 ± 0.04 | 0.91 ± 0.01 |
| 1.00 | 1.16 ± 0.06 | 0.22 ± 0.05 | 0.43 ± 0.01 | 0.58 ± 0.03 |

ตารางที่ 7 แสดงการผลิตของกรดออกซาโลอะซิติกโดยเชื้อยีสต์ที่หมัก *Issatchenkia* sp. S1 ในอาหาร YM ที่ใช้ 100 กรัมต่อลิตรที่ใช้แหล่งอาหารคาร์บอนต่างๆ และเติม 2 กรัมต่อลิตรของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ร่วมกับการเติม 0.00 – 1.00 % โดยน้ำหนักของเกลืออะซิเตด

| ความเข้มข้นของ เกลืออะซิเตด (% โดยน้ำหนัก) | ปริมาณของกรดออกซาโลอะซิติก (กรัมต่อลิตร) | | | |
|--|--|---------|------------------------------|---------------------------|
| | กลูโคส | ฟรุกโตส | น้ำตาลทรายที่ ผ่านการย่อย | แป้งมันที่ผ่านการ ย่อย |
| | 0.00 | ND | ND | ND |
| 0.25 | ND | ND | ND | ND |
| 0.50 | ND | ND | ND | ND |
| 0.75 | ND | ND | ND | ND |
| 1.00 | ND | ND | ND | ND |

ND = Not Detected

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา

เชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 สามารถเจริญได้ดีในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลฟรุกโตสเป็นแหล่งคาร์บอน และสามารถใช้น้ำตาลซูโครสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์อินเวอร์เทส และแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) และเอนไซม์เทอร์มาไมว (Thermamyl® SC) ได้ แต่ประสิทธิภาพของการเจริญ และการผลิตเอทานอลน้อยกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโตสเป็นแหล่งอาหาร นอกจากนี้ เชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 สามารถผลิตกรดออกซาโลอะซิติกได้ 3.02 กรัมต่อลิตร หลังจากทำการหมักไปเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ในสภาวะที่ไม่ให้อากาศ

ในระหว่างการดำเนินการทดลอง ได้มีคำสั่งให้มีการย้ายห้องปฏิบัติการจากอาคารเครื่องมือ 3 ยังอาคารเครื่องมือ 10 ซึ่งเป็นเหตุให้ไม่มีความพร้อมในการดำเนินงาน รวมทั้งมีการเคลื่อนย้ายเครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ ไปยังห้องปฏิบัติการใหม่ ซึ่งในช่วงของการขนย้าย และดำเนินการจัดเตรียมความพร้อมต่างๆ ของห้องปฏิบัติการใหม่ ผู้เก็บเชื้อแช่แข็ง -70 องศาเซลเซียส ที่ใช้สำหรับเก็บเชื้อ ไม่สามารถควบคุมอุณหภูมิได้ โดยพบว่าอุณหภูมิภายในตู้ประมาณ 30 องศาเซลเซียส โดยคาดว่า เชื้อที่ทำการเก็บไว้ในตู้ น่าจะอยู่ที่อุณหภูมิห้องมากกว่า 2 สัปดาห์ เป็นผลให้เชื้อที่เก็บไว้ส่วนใหญ่ไม่มีการเจริญ และพบการปนเปื้อนของเชื้ออื่นในหลอดเก็บเชื้อบางหลอด โดยนำเชื้อยีสต์ที่ทำการแยกได้มาจากหลอดเก็บเชื้อที่นำการทดสอบ ซึ่งไม่พบการผลิตกรดออกซาโลอะซิติกในอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ จึงเป็นไปได้ว่าเชื้อสูญเสียความสามารถในการผลิตกรดออกซาโลอะซิติก

การกระตุ้นการผลิตอินทรีย์ โดยการเติมเกลืออะซิเตตลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า การเติมเกลืออะซิเตต ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์ออกซาโลอะซิเตต แต่กลับพบว่า มีผลในการยับยั้งการเจริญ อัตราการใช้น้ำตาล อัตราการผลิตเอทานอล และค่า yield ของเอทานอล แต่ในการทดลองนี้พบว่าเชื้อยีสต์ทนร้อน ไม่มีผลิตกรดออกซาโลอะซิติก

แม้ว่าจะมีการคัดแยกเชื้อยีสต์ทนร้อน *Issatchenkia* sp. S1 ยังคงพบว่า เชื้อยีสต์ไม่สามารถผลิตกรดออกซาโลอะซิติกได้ แต่ยังคงสามารถผลิตเอทานอล ในอาหาร YM ที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือฟรุกโตสได้ดี

เอกสารอ้างอิง

- Andreasen, A.A., and T.J.B., Stier. (1954). Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. (II) Unsaturated fatty acid requirements for growth in a defined medium. *Journal of cellular and comparative physiology*. 43:271-281.
- Arthur, H. and Watson, K. (1976). Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts. **Journal of Bacteriology**. Oct: 58-68.
- Arthur, H., and Watson, K. (1976). Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeast. **Journal of bacteriology**. 58-68.
- Bricker, D.K., Taylor, E.B., Schell, J.C., Orsak, T., Boutron, A., Chen, Y., Cox, J.E., Cardon, C.M., Van Vranken, J.G., Dephoure, N., Redin, C., Boudina, S., Gygi, S.P., Brivet, M., Thummel C.S. and Rutter J. (2012) A Mitochondrial Pyruvate Carrier Required for Pyruvate Uptake in Yeast, *Drosophila*, and Humans. **Science**. 337: 96-100.
- Boekhout, T. and Kurtzman, C.P. (1996). Principles and methods used in yeast classification, and an overview of currently accepted yeast genera. **Nonconventional Yeasts in Biotechnology: A Handbook**. Springer-Verlag: Heidelberg. 1-99 pp.
- Chu, D. and Barnes D.J. (2016). The lag-phase during diauxic growth is a trade-off between fast adaptation and high growth rate. **Scientific Reports**. 6:25191
- David, D., Nicole, S., Niko, K., Oliver, W., Dieter, S., Bengt, S. and Olof, R. (2005). GC-rich sequences in the 5-lipoxygenase gene promoter are required for expression in Mono Mac 6 cells, characterization of a novel Sp1 binding site. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**. 1738(1-3):37-47.
- Davidson, W.F., Fredrickson, T.N., Rudikoff, E.K., Coffman, R.L., Hartley, J.W. and Morse, H.C. (1984). A unique series of lymphomas related to the Ly-1+ lineage of B lymphocyte differentiation. **The Journal of Immunology**. 133(2):744-53.
- Devlin, T.M. (2006). **Textbook of Biochemistry with Clinical Correlation**. A John Wiley & Sons, INC., Publication, Canada.

- Eisenberg, T., Schroeder, S., Andryushkova, A., Pendl, T., Küttner, V., Bhukel, A., Mariño, G., Pietrocola, F., Harger, A., Zimmermann, A., Moustafa, T., Sprenger, A., Jany, E., Büttner, S., Carmona-Gutierrez, D., Ruckenstuhl, C., Ring, J., Reichelt, W., Schimmel, K., Leeb, T., Moser, C., Schatz, S., Kamolz, L., Magnes, C., Sinner, F., Sedej, S., Fröhlich, K., Juhasz, G., Pieber, T., Dengjel, J., Sigrist, S.J., Kroemer, G., and Madeo, F.. (2014). Nucleocytosolic Depletion of the Energy Metabolite Acetyl-Coenzyme A Stimulates Autophagy and Prolongs Lifespan. **Cell Metabolism**. (19): 431-444.
- Entian, K.-D. (1997). **Sugar phosphorylation in yeast**. In F. K.Zimmerman and K.-D. Entian (ed.), Yeast sugar metabolism. Technomic Publishing Company. Lancaster. PA. 67–79.
- Fleck, C.B. and Brock, M. (2009). Re-characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* Ach1p: Fungal CoA-transferases are involved in acetic acid detoxification. **Fungal Genetics and Biology**. 46: 473-485.
- Friis, R., Graves, J., Huan, T., Li, L., Sykes, B., and Schultz, M. (2014). Rewiring AMPK and Mitochondrial Retrograde Signaling for Metabolic Control of Aging and Histone Acetylation in Respiratory-Defective Cells. **Cell Reports**. 7: 565-574.
- Giannattasio, S., Guaragnella, N., Ždravlević, M., and Marra, E. (2013). Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. **Frontiers in Microbiology**. 4(33): 1-7.
- Hacking, A.J., Taylor, I.W.F. and Hanas, C.M. (1984). Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40 °C. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 19: 361.
- Henriksen, P., Wagner, S.A., Weinert, B.T., Sharma, S., Bacinskaja, G., Rehman, M., Juffer, A.H., Walther, T.C., Lisby, M. and Choudhary C. (2012). Proteome-wide Analysis of Lysine Acetylation Suggests its Broad Regulatory Scope in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular & Cellular Proteomics**. 11: 1510-1522.
- Herzig, S., Raemy, E., Montessuit, S., Veuthey, J., Zamboni, N., Westermann, B., Kunji, E.R.S. and Martinou, J. (2012). Identification and Functional Expression of the Mitochondrial Pyruvate Carrier. **Science**. 337: 93-96.
- Jacobson, G.K. and Jolly, S.O. (1989). Yeasts, molds and algae. **Biotechnology**. 7: 279-314.

- Jeremy, J. and Michelle, A. (2007). A fully defined, clear and protein-free liquid medium permitting dense growth of *Neisseria gonorrhoeae* from very low inocula. **FEMS Microbiology Letters**. 273(1), 35-37.
- Kadyrov, R., Riermeier, T.H., Dingerdissen, U., Tararov, V., Börner, A. (2003). The first highly enantioselective homogeneously catalyzed asymmetric reductive amination: synthesis of alpha-N-benzylamino acids. **The Journal of Organic Chemistry**. 68(10): 4067-4070.
- Kaelin, W., and McKnight, S. (2013). Influence of Metabolism on Epigenetics and Disease. **Cell** 153: 56-69.
- Kurtzman, C.P. and Fell, J.W. (1998). **The Yeasts, a Taxonomic Study**. Fourth Edition. Amsterdam: Elsevier Science Publishing Company. 1055 pp.
- Lu C. and Thompson, C. (2012). Metabolic Regulation of Epigenetics. **Cell Metabolism**. 16: 9-17.
- Norr, A.A., Hameed, A., Bhatti, K.P. and Tunio, S.A. (2003). Bio-ethanol fermentation by the bioconversion of sugar from dates by *Saccharomyces cerevisiae* strain ASN-3 and HA-4. **Biotechnology**. 2(1): 8-17.
- Mariño, G., Pietrocola, F., Eisenberg, T., Kong, Y., Malik, S., Andryushkova, A., Schroeder, S., Pendl, T., Harger, A., Niso-Santano, M., Zamzami, N., Scoazec, M., Durand, S., Enot, D., Fernández, A.F., Martins, I., Kepp, O., Senovilla, L., Bauvy, C., Morselli, E., Vacchelli, E., Bennetzen, M., Magnes, C., Sinner, F., Pieber, T., López-Otín, C., Maiuri, M., Codogno, P., Andersen, J., Hill, J., Madeo, F. and Kroemer, G. (2014). Regulation of Autophagy by Cytosolic Acetyl-Coenzyme A. **Molecular Cell**. 53: 710-725.
- Markham, E. (1969). **The role of oxygen in brewery fermentations**. Wallerstein Laboratory Community. 32(107): 5-12.
- Muaenjang, T. (2008). **Ethanol Production by Thermotolerant *Issatchenkia* sp. S1**. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in biotechnology. Suranaree University of Technology. Thailand.
- Mukhopadhyay, B., Purwanti, E., Kerder C.L. and Wolfe, R.S. (2001). Oxaloacetate Synthesis in the Methanarchaeon *Methanosarcina barkeri*: Pyruvate Carboxylase Genes and a Putative *Escherichia coli*-Type Bifunctional Biotin Protein Ligase Gene (*bpl/birA*) Exhibit a Unique Organization. **Journal of Bacteriology**. June: 3804-3810.

- Nyilas, E. (1984). Bioresorbable polyester and polyester composites. **United States Patent**. Patent Number: 4481353.
- Orlandi, I., Coppola D.P. and Vai, M. (2014). Rewiring yeast acetate metabolism through MPC1 loss of function leads to mitochondrial damage and decreases chronological lifespan. **Microbial Cell**. 1(12): 393 – 405.
- Peng, G., Chunyun, S., Jing, T., Xianzhe, S., Kailong, Y., Xin, L. and Guowang, X. (2007). Investigation on response of the metabolites in tricarboxylic acid cycle of *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* to antibiotic perturbation by capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. 44(1):180-187.
- Pronk, J.T., Yde Steensma, H. and Van Dijken, J.P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast**. Chichester, England. 12: 1607-1633.
- Reichling, J., Kemmerer, B. and Sauer-Gürth, H. (1995). Biosynthesis of pseudoisoeugenols in tissue cultures of *Pimpinella anisum*. Phenylalanine ammonia lyase and cinnamic acid 4-hydroxylase activities. **Pharmacy World & Science**. 17(4):113-9
- Ribéreau-Gayon, P., Dubordieu, D., Doneche, B. and Lonvaud, A. (2000). **Handbook of Enology (Vol.1): The Microbiology of Wine and Vinifications**. Chichester: John Wiley & Sons. 454 pp.
- Roehr, M. (2001). **The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications**. Chichester, Wiley-VCH.
- Shirahase, Y. and Watazu, Y. (1992). GOT Isozyme Assay. **United States Patent**. Patent Number 5122455.
- Sripiromrak, A. (2006). **Isolation and Characterization of Thermotolerant yeast for Ethanol Production**. A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the requirements for the degree of Master of Science in biotechnology. Suranaree University of Technology, Thailand.
- Takahashi, H., McCaffery, J.M., Irizarry, R.A., and Boeke, J.D. (2006). Nucleocytoplasmic Acetyl-Coenzyme A Synthetase Is Required for Histone Acetylation and Global Transcription. **Molecular Cell**. 23: 207-217.
- Wayman, M. and Parekh, S.R. (1990). Microbiology of fermentation catalysts. **Biotechnology of Biomass Conversion**. Milton Keynes: Open university press. 75-100 pp.

Curriculum vitae

Name: Chokchai Wanapu (Intapruk)

Sex: Male

Nationality: Thai

Religion: Buddhism

Home Address: 114/246 Ratchsima-Pakthongchai Road, Nong Ja Bok, Muang, Nakhon ratchasima 30000, Thailand.

Present Status: Associate Professor in Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

Education Background and Experience:

From 1978 - 1982: B.Sc. (Chemistry) from Department of Chemistry, Faculty of Science, Chiangmai University, Chiangmai, Thailand.

From 1982 - 1984: M.Sc. (Biochemistry) from Department of Biochemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok, Thailand.

From 1991 - 1994: Ph.D. (Engineering in Biotechnology) from Department of Biotechnology, Faculty of Engineering, Osaka University, Osaka, Japan.

From 1996 – 1997: Head of Department of Biochemistry, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkla 90110, Thailand.

From 1997 – 1999: Director of Center of Scientific and Equipment, Walailak University, Nakonsritummarat 80000, Thailand.

From 1999 – 2001: Director of Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

From 2002 – 2005: Manager of SUT's Farm, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima 30000, Thailand.

From 2006 – 2011: Chair, School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakonratchasima 30000, Thailand.

Symposium:

- Krongjai, T. and **Wanapu, C.** (2004) The transformation of chitinase gene into grape plants. The 4th National Symposium on Graduate Research. 94.
- Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2004) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. The 4th National Symposium on Graduate Research. 124.
- Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2004) Selection of malolactic bacteria for wine fermentation. The 4th National Symposium on Graduate Research. 128.
- Kuapunyakoon, T., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N. and Chervin, C. (2004) What is the gene which expression depends ethylene receptor inhibition in berry of Carbernet Sauvignon at veraison. The 4th National Symposium on Graduate Research. 93.
- Cheunkum, O. and **Wanapu, C.** (2002) Production of Lactic acid from cassava solid waste. The 3rd National Symposium on Graduate Research. 633-634.
- Sripunya, P. and **Wanapu, C.** (2005) Selection of Yeast Strains Containing β -glucosidase for improving Aroma in Grape Wine. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0100.
- Tasing, K., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N., Wongkaew, S. (2005) Transformation of grape calli variety shiraz with *Leucaena* chitinase cDNA. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0109.
- Wongkalasin, K., **Wanapu, C.** and Rodtong, S. (2005) Selection of malolactic bacteria for wine fermentation. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0116.
- Lertpinyochaithaworn, N., Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2005) Ma-Maow wine production. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, B0139.

- Usansa, U., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N. (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005, F0028.
- Wanapu, C.**, Rattana, P., Teaumroong, N. and Boonkerd, N. (2005) Success stories of stainable factory Management for the Thai traditional alcoholic beverage enterprises. In International Symposium on “Corporate sustainability management – approaches and applications” 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-3: 1-8.
- Boonkerd N., Teaumroong, N., **Wanapu C.** and Chankhun Y. (2005) Application of Bio and Bioorganic fertilizers in organic farming systems for sustainable agriculture. In International Symposium on “Corporate sustainability management – approaches and applications” 24-25 November 2005, Bangkok. Session 2B-4: 1-7.
- Muaenjang, T. and **Wanapu, C.** (2006) The study of ethanol production of thermotolerant yeast S1 strain. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.
- Sripiromrak, A. and **Wanapu, C.** (2006) Isolation and classification of thermotolerant yeast for ethanol production. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.
- Wasuwan, R., Boonkerd, N. and **Wanapu, C.** (2006) Classification and nitrogen fixation efficiency analysis of *Azolla* species in rice fields of Thailand. The 11th Biological Science Graduate Congress, 15-17 December 2006 Bangkok.
- Usansa, U., Wanapu, C. and N. Boonkerd (2005) Effect of alcoholic fermentation temperature on red wine flavor. 31st Congress on Science and Technology of Thailand, Chaing Mai, 2005.
- Usansa U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C.** Arendt, E. K., Kreis, S. and Zarnkow, M. (2008) The use of response surface methodology to optimize malting conditions of two black rice varieties (*Oryza sativa* L. indica) as a raw material for gluten- free foods. First International Symposium on Gluten-Free Products and Beverages, Cork, Ireland, September 2008.

- Usansa, U., Burberg, F. Geiger, E., Back W., Tea-umroong, N., **Wanapu, C.** Arendt, E. K., Kreis, S. and Zarnkow, M. (2009) The optimization of malting condition for Thai rice. 10th RGJ-Congress. Pattaya, April 2009.
- Usansa, U, Geiger, E., **Wanapu, C.** and Teaumroong, N. (2009) Improvement of nitrogenous content in wort produced from rice malt. ASBC Annual Meeting. Arizona, USA June 6-10, 2009.
- Kongkaew, A., Wanapu, C. and Usansa, U. (2010) Response surface optimization of wort production for brewing from rice malt using commercial enzymes and malt barley. The 16th Asian Agricultural Symposium on Agricultural Technology: Sufficiency Agriculture, August 25 – 27, 2010, Faculty of Agricultural Technology, KMITL, Bangkok, Thailand.
- Satsum, A, and **Wanapu, C.** (2010) FT-IR study for hydroxyapatite/alginate nanocomposite beads. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Li, L., **Wanapu, C.**, Huang, X., Huang Q., and Huang, T. (2010) Genetic variation of *Brassica napus* cultivars using SSR markers. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Kongkaew, A., Wanapu, C., and Usansa, U. (2010) Beer production from rice malt based in pilot scale brewing : chemical and sensorial properties approach. The 3rd SUT Graduate Conference 2010, November 21 – 23, 2010, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Teaumroong, N., Wanapu, C., Chankum, Y., Arjharn, W., Sang-Arthit, S., Teaimthaisong, K. and Boonkerd, N. (2010) Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming systems in Thailand: a case study. in: H. Insam, I. Franke-Whittle, M. Goberna (Eds.), *Microbes at Work*. Springer, Berlin Heidelberg, 293e312.
- Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C.** (2012) Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.

- Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C.** (2012) High selenium-Enriched Yeast Production. Burapha University International Conference 2012, July 9-11, 2012, Burapha University, Chonburi Thailand.
- Muaenjang, T., Ponchana P., and **Wanapu, C.** (2012) Improved Enzymatic Hydrolysis of Cassava Residue by Polyethylene Glycol Addition. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Satsum, A, and **Wanapu, C.** (2012) FT-IR study for Aiginate/Hydroxyapatite/latex Nanocomposite Beads. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Pinpeangchan, S, And **Wanapu, C.** (2012) Controlled releasing of urea fertilizer by biodegradable polymer with convertional encapsulation. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Ditsayabut, P., Kupittayanant P., and **Wanapu, C.** (2012) High selenium-Enriched Yeast Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Pliansrithong P., Usansa U., and **Wanapu, C.** (2012) Protein Properties in Broken Rice for optimizing of Rice Ratio in Beer Production. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.
- Lertpinyochaithaworn N, and **Wanapu, C.** (2012) Effect of ethanolic on black-kernal rice flavonoids character. School of Biotech, IAT, SUT 1st International Colloquium, July 16-20, 2012, Suranaree University of Technology, Nakhonratchasima, Thailand.

Scientific Publication:

- Intapruk, C.**, Tirawanchai, N., Wilairat, P. and Panyim, S.* (1984) Application of cloned malaria parasite DNA in strain identification. Mahidol University Annual Research Abstracts 11, 297.
- Intapruk, C.** (1984) in Manual for international laboratory workshop "Genetic engineering techniques in tropical diseases research" to be published by WHO special programme for research and training in tropical diseases, 195-204.
- Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradubkul, S. and Panyim, S.* (1984) Strain characterization of human malaria parasite, *Plasmodium falciparum*, by the use of a cloned parasite DNA probe. Microbial utilization of renewable resources. 4, 210-213.
- Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Wilairat, P., Yuthavong, Y. and Panyim, S.* (1985) Cloning of repetitive DNA from *Plasmodium falciparum* and its use in strain and species identification. Mahidol University Annual Research Abstracts, 12, 250.
- Intapruk, C.** (1985) in Manual for national laboratory workshop "DNA cloning techniques" (in Thai) to be published by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, the Ministry of Science and Technology, 172-188.
- Wilairat, P., Tirawanchai, N., **Intapruk, C.**, Tungpradabkul, S., Sertsrivanich, R., Panyim, S., Yuthavong, Y.* (1985) Recombinant DNA techniques as potential diagnostic means. Ann. Ist. Super. Sanita. 21, 299-305.
- Sriroongrueng, W.* and **Intapruk, C.** (1989) The prenatal diagnosis of thalassemias (in Thai). Songkla Med. J. 6, 428-435.
- Intapruk, C.**, Higashimura, N., Yamamoto, K., Okada, N., Shinmyo, A. and Takano M.* (1991) Nucleotide sequences of two genomic DNAs encoding peroxidase of *Arabidopsis thaliana*. Gene 98: 237-241.
- Intapruk, C.**, Yamamoto, K., Fujiyama, K., Shinmyo, A. and Takano, M.* (1993) Cloning of cDNAs encoding two peroxidases of *Arabidopsis thaliana*. J Ferment Bioeng 75: 166-172.
- Shinmyo, A., Fujiyama, K., Kawaoka, A. and **Intapruk, C.*** (1993) Structure and expression of peroxidase isozyme genes in horseradish and *Arabidopsis*. In: KG Welinder, SK

- Rasmussen, C Penel and H Greppin, eds, Plant Peroxidases Biochemistry and Physiology. Univ Geneva, Switzerland, pp 222-228.
- Intapruk, C.**, Yamamoto, K., Sekine, M., Shinmyo, A. and Takano, M.* (1994) Regulatory sequences involved in the peroxidase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Reports 13: 123-129.
- Intapruk, C.**, Takano, M. and Shinmyo, A.* (1994) Nucleotide sequence of a new cDNA for peroxidase from *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 104: 285-286.
- Wanapu, C.** and Shinmyo, A.* (1996) *cis*-Regulatory of the peroxidase gene in *Arabidopsis thaliana* involved in root specific expression and responsiveness to high-salt stress. Ann New York Acad Sci. 782 (12): 107-114.
- Kanchanatawee, S.*, **Wanapu, C.** and Ketudat-Cairns, M. (2000) Biotechnology postgraduate program in Thailand. Thai J. Biotechnol. 2, 55-62.
- Sripo, T., Phongdara, A.*, **Wanapu, C.** and Caplan, A.B. (2002) Screening and characterization of aldehyde dehydrogenase gene from *Halomonas salina* strain AS11. J. Biotech. 95, 171-179.
- Kuapunyakoon, T. and **Wanapu, C.*** (2003) Effects of diammonium phosphate (DAP) supplementation on growth rate and ethanol production of *Saccharomyces cerevisiae* K1-V1116 in tamarind wine. Suranaree J. Sci. Technol. 10: 147-151.
- Sripunya, P., **Wanapu, C.** and Boonkerd, N.* (2005) Effect of β -glucosidase enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* on aroma production during mango (Chok-anan) wine fermentation. Thai J. Biotechnol. 6: 50-56.
- Usansa, U., Sompong, N., **Wanapu, C.**, Boonkerd, N. and Teaumroong, N.* (2009) The influences of steeping duration and temperature on the α - and β - amylase activities of six Thai rice malt cultivars (*Oryza sativa* L. indica). J. Inst. Brew. 105 (2) 140-147.
- Wanapu, C.***, Sripiromrak, A. and Muaenjang, T. (2009) Ethanol production by *Thermotolerant issatchenkia* spp. S1. Biomolec. Engineer. 25, 2-4.
- Teaumroong, N.*, **Wanapu, C.**, Chankum, Y., Arjarn, W., Sang-Arthit, S., Teaimthaisong, K. and Boonkerd, N. (2010) Production and application of bioorganic fertilizers for organic farming

- systems in Thailand: A case study. In: Insam, H. , Franke-Whittle, I. and Goberna, M. (eds). *Microbs at work: from wastes to resources*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg. 294-296.
- Usansa, U., Burberg, F., Geiger, E.*, Back, W., **Wanapu, C.**, Arendt, E.K., Kreis, S., Boonkerd, N., Teaumroong, N. and Zarnkow, M. (2011) Optimization of malting for two black rice varieties, black non-waxy rice and black waxy rice (*Oryza sativa* L. Indica). *J. Inst. Brew.* 117(1), 39–46.
- Vechklang, K., Boonanuntasarn, S. Ponchunchoovong, S., Pirarat N. and **Wanapu, C.*** (2011) The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) at the juvenile stage. *Aqua. Nut.*, 17(6), 685-694.
- Li L., **Wanapu, C.***, Huang, X., Huang, T., Li, Q., Peng, Y. and Huang, G. (2011) Comparison of AFLP and SSR for Genetic Diversity Analysis of *Brassica napus* Hybrids. *J. Agri. Sc.* 3(3), 101-110.
- Boonterm, C., **Wanapu, C.**, Silapapun, A. and Boonkerd, N.* (2011) Effects of nitrogen, potassium fertilizdf, and clusters per vine on anthocyanins content in cabernet sauvignon wine. *Suranaree J. Sci. Technol.* 18(1), 41-54.
- Li, L., Huang, X., **Wanapu, C.**, Li, Q., Huang, G. and Huang, T.* (2011) Genetic diversity analysis of 25 rapeseed varieties from Guizhou rapeseed regional test by SSR marker. *Guizhou Agri. Sc.* 11, 1-4 (in Chinese).
- Wanapu, C.***, Sripunya, P. and Boonkerd, N. (2012) Selection of yeast strains \square -glucosidase for improving wine aroma. *J. Agri. Sc. Technol. B*, 2, 691-702.
- Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.*** (2012) Optimisation of wort production from rice malt using enzymes and barley malt. *Af. J. Biotech.* 11, 9941-9949.
- Kongkaew, A., Usansa, U. and **Wanapu, C.*** (2012) Beer Production from Rice Malt Based in Pilot-scale: Volatile Compounds and Sensorial Properties Analysis. (Thai) *Tech. Ed. J KMUT-NB.* 3(1), 86-94.
- Vechklang, K., Lim, C., Boonanuntasarn, S., Welker, T., Ponchunchuwong, S., Klesius, P.H. and **Wanapu, C.*** (2012) Growth performance and resistance to *Streptococcus iniae* of juvenile Nile

tilapia (*Oreochromis niloticus*) fed diets supplemented with GroBiotic-A and Brewtech dried brewers yeast. J App. Aqua. 24, 183-198.

Pliansrithong, P., Usansa, U.* and **Wanapu, C.** (2013) Increasing of Nitrogenous Substances in Wort by Using Commercial Enzymes and Modifying Mashing Method. Inter. J. Biosci. Biochem. Bioinfor. 3 (4),404-407

Pinpeangchan, S. and **Wanapu, C.*** (2015) Impact of Nitrogen Fertilizer (Encapsulated Urea Fertilizer) in Process of Controlled-Release Their Effect on Growth of Chinese Kale (*Brassica alboglabra* Bailey). Glo. Adv. Res. J. Agric. Sci. 4(4), 173-181.

Yuyuen, P., Boonkerd, N. and **Wanapu, C.*** (2016) Effect of grape berry quality on wine quality. Suranaree J. Sci. Technol. (Accepted)

Patents: 3 Thai patents and 3 Trade Secrets.

