

อิทธิพลของเกลืออนินทรีย์บางชนิดต่อการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ ของ *Saccharomyces cerevisiae* AM 12

Effect of Same Inorganic Salts on Growth and Ethanol Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* AM 12

สาวตรี ลิ้มทอง¹, Toshiomi Yoshida², Tatsuji Seki², มาลี สุวรรณอัทธ¹ และ Hisaharu Taguchi²

Savitree Limtong, Toshiomi Yoshida, Tatsuji Seki, Malee Suwana-adth and Hisaharu Taguchi

ABSTRACT

The effect of some inorganic salts on growth and ethanol fermentation of a fusant, *Saccharomyces cerevisiae* AM 12 was studied. The concentration of inorganic salts used in this study was based on concentration of inorganic ions contained in each salt. The concentration used was 3 levels which were equal to, two times and four times higher than the concentration of inorganic ions in molasses diluted to make the sugar concentration appropriate for ethanol fermentation, about 20% by weight. The results indicated that CaCl_2 at all tested concentrations showed strongly inhibition on growth at nearly the same level but inhibited ethanol fermentation at little different level. NH_4Cl inhibited growth and fermentation strongly but less than CaCl_2 did. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ showed similar effects with NH_4Cl . The ion which effect on growth and fermentation of these two salts, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and NH_4Cl was ammonium ion. KCl at all tested concentrations did not show inhibition on fermentation. NaCl at the concentration of sodium ion equal to the concentration in diluted molasses for ethanol fermentation showed no inhibition on both growth and ethanol fermentation.

บทคัดย่อ

จากการศึกษาอิทธิพลของเกลืออนินทรีย์บางชนิดต่อการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อลูกผสม *Saccharomyces cerevisiae* AM 12 โดยความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่ใช้ยึดตามความเข้มข้นของอนุมูลอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบให้เท่ากับหรือสูงกว่าสองเท่าหรือสี่เท่าของปริมาณอนุมูลอนินทรีย์ในกากน้ำตาลที่เจือจางที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลพอเหมาะสำหรับการหมักแอลกอฮอล์ คือประมาณ 20% โดยน้ำหนัก ผลการทดลองชี้ว่า CaCl_2 ทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นยับยั้งการเจริญของเชื้อได้รุนแรงในระดับที่เท่ากัน แต่ยับยั้งการหมักแอลกอฮอล์ได้ในระดับที่ต่างกันเล็กน้อย ส่วน NH_4Cl ยับยั้งทั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ได้รุนแรงเช่นกัน แต่ต่ำกว่า CaCl_2 สำหรับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มีผลยับยั้งเหมือนกับ NH_4Cl โดยอนุมูลที่มีผลต่อการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ในเกลืออนินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดคือ อนุมูลแอมโมเนียม ส่วน KCl ทั้ง 3 ระดับ ความเข้มข้นไม่ยับยั้ง การหมักแอลกอฮอล์ และ NaCl ที่ความเข้มข้นของอนุมูลโซเดียม เท่ากับในกากน้ำตาลเจือจางสำหรับหมักแอลกอฮอล์ ไม่มีผลต่อทั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์

¹ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
Dept. of Microbiology, Faculty of Science, Kasetsart Univ.

² International Center of BIO Tech, Faculty of Engineering, Osaka Univ. Japan.

คำนำ

การผลิตแอลกอฮอล์ในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศ โดยทั่วไปใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากกากน้ำตาลมีราคาถูกค่อนข้างต่ำและนำไปหมักแอลกอฮอล์ได้ทันทีโดยไม่ต้องมีการแปลงสภาพก่อน แต่กากน้ำตาลมีสารประกอบบางอย่างที่มีผลยับยั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์ (Rose and Hasrison, 1971) ในบรรดาสารประกอบเหล่านั้น มีเกลืออนินทรีย์หลายชนิดรวมอยู่ด้วย (Maiorella *et al.*, 1984) จากการวิเคราะห์ปริมาณอนุมูลอนินทรีย์ในกากน้ำตาล พบว่ามีอนุมูลต่าง ๆ ซึ่งความเข้มข้นมีหน่วยเป็นกรัมของอนุมูลต่อกรัมของกากน้ำตาลดังต่อไปนี้ $K^+ 0.0216$, $Na^+ 0.0011$, $Ca^{2+} 0.008$, $Mg^{2+} 0.003$, $Fe^{2+} 0.0002$, $Si^{2+} 0.0007$, $So_4^{2-} 0.0072$ และ $Cl^- 0.012$ (Kishimoto, 1985) ถึงแม้ว่ายีสต์ต้องการเกลืออนินทรีย์หลายชนิดในระดับไมโครกรัมหรือมิลลิกรัม สำหรับการเจริญหรือการหมักแอลกอฮอล์ หรือทั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ โดยจะทำให้ผลผลิตสูงขึ้น (Jones and Greenfield, 1984) แต่ถ้าปริมาณของเกลืออนินทรีย์เหล่านี้อยู่ในระดับที่ไม่สมดุล จะทำให้ระบบเมตาโบลิซึมและลักษณะการเจริญของเชื้อยีสต์เปลี่ยนแปลง (Meade and Chen, 1977; Watson, 1970; Saltukoglu and Slaughter, 1983) การทดลองโดยใช้ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง พบว่าเกลืออนินทรีย์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ตามลำดับดังนี้ $CaCl_2 \geq (NH_4)_2SO_4 > NaCl$, $NH_4Cl > KH_2PO_4 > Xylose$, $MgCl_2 > MgSO_4 > KCl$ อนุมูลแคลเซียมเป็นอนุมูลที่สามารถยับยั้งการเจริญได้สูงสุด โดยพบว่าทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง 80% ที่ $Ca^{2+} = 0.23$ โมลต่อลิตร ดังนั้นแคลเซียมจึงจัดเป็นอนุมูลหนึ่งที่ยับยั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของยีสต์อย่างรุนแรง (Maiorella *et al.*, 1984) และจัดเป็นอนุมูลที่มีความสำคัญเนื่องจากพบปริมาณมากในการไบโไฮเดรตหลายชนิด รวมทั้งกากน้ำตาล

Saccharomyces cerevisiae AM 12 เป็นลูกผสมที่ได้จากการผสมพันธุ์ด้วยเทคนิคโปรโตพลาส-ฟิวชั่นระหว่าง *S. cerevisiae* TJ 1 ซึ่งเป็นยีสต์ที่ทนตกตะกอนและ *S. cerevisiae* N 1 ซึ่งเป็นยีสต์ที่หมักแอลกอฮอล์ได้ความเข้มข้นสูงโดย Seki *et al.*, (1984) ได้พบว่า ลูกผสม AM 12 สามารถหมักแอลกอฮอล์ได้สูงถึง 18.3 และ 14.0% โดยน้ำหนัก ที่ 30 และ 35°ซ ตามลำดับ และหมักได้ถึง 12.4% โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิสูงขนาด 40°ซ เมื่อใช้กลูโคสเป็นวัตถุดิบ แต่เมื่อผู้รายงานนำมาหมักแอลกอฮอล์โดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ พบว่าการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ลดลง ดังนั้นจึงทำให้เกิดความสนใจที่จะหาสาเหตุซึ่งทำให้การเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ลดลง และด้วยเหตุผลดังกล่าวข้างต้นจึงได้เริ่มด้วยการทดสอบการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเกลืออนินทรีย์บางชนิดลงไป ผลจากการทดลองนี้จะเป็แนวทางหนึ่งที่ช่วยชี้ว่ายีสต์ลูกผสมสายพันธุ์ AM 12 จะเหมาะสำหรับการหมักแอลกอฮอล์โดยใช้กากน้ำตาลที่มีปริมาณเกลืออนินทรีย์บางชนิดอยู่ด้วย เป็นวัตถุดิบหรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

1. จุลินทรีย์ เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ ยีสต์ลูกผสม *S. cerevisiae* AM 12

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเตรียมต้นเชื้อ (seed culture) ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 50 กรัมต่อลิตร โพลีเปปโตน 20 กรัมต่อลิตร และยีสต์เอกซ์แทรค 10 กรัมต่อลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษาอิทธิพลของเกลืออนินทรีย์ ประกอบด้วยน้ำตาลกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร โพลีเปปโตน 2 กรัมต่อลิตร ยีสต์เอกซ์แทรค 1 กรัมต่อลิตร

3. การเตรียมต้นเชื้อ ทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวปริมาตร 100 มล. ที่บรรจุในฟลาสก์ 500 มล. ในสภาพแอโรบิกบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่อุณหภูมิ 30°ซ นาน 18 ชม.

4. การเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาอิทธิพลของเกลืออนินทรีย์ ทำโดยการเพาะต้นเชื้อปริมาณ 5 มล. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการศึกษอิทธิพลของเกลืออนินทรีย์ ซึ่งเติมเกลือชนิดต่าง ๆ แล้วปริมาตร 200 มล. บรรจุในพลาสติกขนาด 500 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ reciprocal ที่ความเร็ว 70 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ นาน 5-7 วัน

5. การศึกษาอิทธิพลของเกลืออนินทรีย์บางชนิดต่อการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ ชนิดและปริมาณของเกลืออนินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองมีดังนี้ KCl 41.74 กรัมต่อลิตร, K_2SO_4 48.14 กรัมต่อลิตร, NaCl 2.8 กรัมต่อลิตร, Na_2SO_4 0.36 กรัมต่อลิตร, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 25.10 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 30.42 กรัมต่อลิตร, $CaCl_2$ 22.15 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)_2SO_4$ 9.9 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเกลือ

อนินทรีย์ที่ใช้ยึดตามความเข้มข้นของอนุพลอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบคือ K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} และ SO_4^{2-} ให้เท่ากับ ความเข้มข้นของอนุพลอนินทรีย์ที่ตรวจพบในกากน้ำตาลเจือจางสำหรับหมักแอลกอฮอล์

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเติมเกลืออนินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ข้างต้น ตามวิธีในข้อ 4 เก็บตัวอย่างที่ 0, 1, 3 และ 5 วัน เพื่อวัดการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์

6. การศึกษาอิทธิพลของ KCl, $CaCl_2$, NaCl, $(NH_4)_2SO_4$, NH_4Cl และ K_2SO_4 ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ต่อการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ ความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองแบ่งเป็น 3 ระดับ โดยใช้ความเข้มข้นของอนุพลอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบเป็นหลักในการเปรียบเทียบ ความเข้มข้นของอนุพลอนินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ความเข้มข้นของอนุพลอนินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

อนุพลอนินทรีย์	เกลืออนินทรีย์ที่ใช้	ความเข้มข้นของอนุพลอนินทรีย์ (กรัมต่อลิตร)		
		x1	x2	x4
K^+	KCl	8.64	17.28	35.56
Ca^{2+}	$CaCl_2$	3.20	6.40	12.80
Na^+	NaCl	0.44	0.88	1.76
NH_4^+	NH_4Cl	1.08	2.16	4.33
NH_4^+	$(NH_4)_2SO_4$	1.08	2.16	4.33
SO_4^{2-}	$(NH_4)_2SO_4$	2.88	5.76	11.52
SO_4^{2-}	K_2SO_4	2.88	5.76	11.52

x1 = เท่ากับความเข้มข้นในกากน้ำตาลที่เจือจางให้ มีปริมาณน้ำตาลพอเหมาะสำหรับหมักแอลกอฮอล์ คือประมาณ 20% โดยน้ำหนัก

x2 = สูงกว่าความเข้มข้นในกากน้ำตาลที่เจือจางให้ มีปริมาณน้ำตาลพอเหมาะสำหรับหมักแอลกอฮอล์ สองเท่า

x4 = สูงกว่าความเข้มข้นในกากน้ำตาลที่เจือจางให้ มีปริมาณน้ำตาลพอเหมาะสำหรับหมักแอลกอฮอล์ สี่เท่า

การทดลองทำโดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือนิโนทรีชนิดต่าง ๆ และปริมาณต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น ตามวิธีในข้อ 4 เก็บตัวอย่าง 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน เพื่อวัดการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์

7. วิธีการเจริญและความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ วัดการเจริญโดยหาปริมาณเซลล์ด้วยการวัดความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ของเซลล์ที่ล้างด้วย 0.05 N HCl และเจือจางด้วย tween 80-EDTA buffer เพื่อช่วยกระจายเซลล์ และเปลี่ยนเป็น น.น. แห่งโดยเทียบกับเส้นกราฟมาตรฐาน

วัดการหมักแอลกอฮอล์โดยหาปริมาณเอทานอลด้วย Liquid Gas Chromotography ซึ่งใช้โปรปันอลเป็นตัวมาตรฐานภายใน (internal standard)

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาอิทธิพลของเกลือนิโนทรีชนิดนั้นเริ่มแรกปริมาณเกลือที่ใช้สูงเนื่องจากยัดปริมาณของอนุพลอนินทรีที่เป็นองค์ประกอบให้เท่ากับปริมาณของอนุพลอนินทรีในกากน้ำตาลที่ไม่ได้เจือจาง ผลการทดลองพบว่า CaCl_2 , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, K_2SO_3 , KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ทำให้การเจริญของลูกผสม AM12 ลดต่ำลงอย่างชัดเจนตามลำดับมากไปหาน้อยส่วน Na_2SO_4 มีผลเพียงเล็กน้อย (รูปที่ 1, ก) สำหรับการหมักแอลกอฮอล์นั้น KCl , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ไม่มีผลยับยั้งการหมักแอลกอฮอล์ ในขณะที่ CaCl_2 , NaCl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ K_2SO_4 ทำให้การหมักแอลกอฮอล์ลดลงอย่างชัดเจน และ Na_2SO_4 ทำให้การหมักแอลกอฮอล์ลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 1, ข) การที่การหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อลดลงนั้น อาจจะเป็นเนื่องจากการที่เซลล์มีปริมาณน้อยลงเพราะการเจริญถูกยับยั้งเพียงอย่างเดียว หรือเกลือนิโนทรีเหล่านั้นไปมีผลต่อการหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อด้วย

2. จากผลการทดลองในข้อ 1 ได้เลือกเกลือนิโนทรีที่ยับยั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของ

ลูกผสม AM12 อย่างชัดเจนมาศึกษาผลของการยับยั้งที่ความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ กัน โดยยัดความเข้มข้นของอนุพลอนินทรีที่เป็นองค์ประกอบของเกลือนิโนทรีนั้นให้เท่ากับหรือสูงกว่าสองหรือสี่เท่าของปริมาณอนุพลอนินทรี ที่พบในกากน้ำตาลเจือจางสำหรับการหมักแอลกอฮอล์ และใช้ KCl ซึ่งไม่มีผลต่อการหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อเป็นตัวเปรียบเทียบ ในกรณีของเกลือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ นั้น การยับยั้งอาจจะเกิดจาก NH_4^+ หรือ SO_4^{2-} ดังนั้นเพื่อให้ผลการทดลองชัดเจน จึงใช้ NH_4Cl เป็นตัวแทนของ NH_4^+

ผลการทำ time-course ของการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของลูกผสม AM12 ในอาหารที่เติมเกลือ KCl , CaCl_2 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ K_2SO_4 ที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับแสดงไว้ในรูปที่ 2 ก, ข, ง, จ, และ ช ตามลำดับ โดยจะเห็นว่าในกรณีที่มีการยับยั้งการเจริญอย่างเดียว หรือยับยั้งทั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อนั้น เริ่มตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อ

เมื่อนำปริมาณเซลล์และปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเกลือนิโนทรีชนิดต่าง ๆ และความเข้มข้นต่าง ๆ มาเทียบกับปริมาณเซลล์และปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารที่ไม่เติมเกลือแล้วนำมาเปรียบเทียบกันดังแสดงในรูปที่ 3 (ก, ข และ ค) ซึ่งสรุปได้ว่า

KCl ที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับคือ 0.22, 0.44 และ 0.88 โมลา ยับยั้งการเจริญของลูกผสม AM12 เท่า ๆ กันโดยทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง 40-80% ของเซลล์ที่ควรได้จากการเจริญในอาหารที่ไม่มีการเติม KCl แต่ที่ยับยั้งการหมักแอลกอฮอล์ ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ *Maioresella et. al.*, (1984) ที่ใช้ระบบการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่อง และพบว่า KCl ยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ต่ำที่สุดในบรรดาเกลือนิโนทรีที่ทดลอง และรายงานของ Jones และ Greenfield (1984) ซึ่งสรุปไว้ว่าการเจริญจะเริ่มถูกยับยั้งเมื่อมีอนุพล K^+ 0.1 โมลาและที่ 2 โมลาการเจริญจะถูกยับยั้งทั้งหมด

CaCl_2 ที่ความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับคือ 0.08, 0.16 และ 0.32 โมลา ยับยั้งการเจริญของเชื้อได้รุนแรงเท่ากันคือทำให้เซลล์ลดลงประมาณ 85% แต่ยับยั้งการหมักแอลกอฮอล์ได้ในระดับที่ต่างกัน โดยลดปริมาณเอทานอลสูงสุดลง 62, 79 และ 82% ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองนี้เป็นไปในทำนองเดียวกันกับผลการทดลองของ Maiorella *et al.* (1984) ซึ่งพบว่า CaCl_2 เป็นเกลืออนินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้สูงสุด โดยความเข้มข้นของ CaCl_2 ที่ทำให้ cell mass productivity ลดลง 20 และ 80% เท่ากับ 0.08 และ 0.23 โมลต่อลิตรตามลำดับ และจากการรวบรวมของ Jones และ Greenfield (1984) ซึ่งสรุปว่าการยับยั้งการเจริญของยีสต์จะเกิดเมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} สูงกว่า 0.25 โมลาซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ทำให้อัตราการผลิตเอทานอลของเชื้อลดลงต่ำลงมาก

NaCl ที่ความเข้มข้นของ Na^+ เท่ากับความเข้มข้นในกาน้ำตาลเจือจางสำหรับหมักแอลกอฮอล์คือ NaCl 0.02 โมลา มีผลยับยั้งต่ำมากจนอาจกล่าวได้ว่าไม่มีผลต่อการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อ ส่วนที่ความเข้มข้น 0.04 และ 0.08 โมลา ยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยลดปริมาณเซลล์สูงสุด 25 และ 30% ตามลำดับ แต่ที่ NaCl 0.08 โมลา ยับยั้งการหมักแอลกอฮอล์ได้มากกว่า คือลดปริมาณเอทานอลสูงสุดได้ 54% ในขณะที่ NaCl 0.04 โมลา ลดปริมาณเอทานอลลง 22% การที่ไม่พบว่ามีผลยับยั้งการเจริญที่ความเข้มข้น 0.02 โมลานั้น เนื่องจากปริมาณนี้เป็นปริมาณที่น้อยเกินกว่าที่จะเกิดการยับยั้งได้ มีรายงานว่า cell mass productivity ของยีสต์จะลดลง 20% เมื่อความเข้มข้นของ NaCl เท่ากับ 0.24 โมลต่อลิตร (Maiorella *et al.*, 1984) และสายพันธุ์ที่ sensitive ต่อ Na^+ นั้น การเจริญจะถูกยับยั้งทั้งหมดเมื่อมี Na^+ มากกว่า 0.1 โมลา (Jones and Greenfield, 1984)

NH_4Cl ที่ความเข้มข้น 0.06, 0.12 และ 0.24 โมลา มีผลยับยั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์

เรียงลำดับกัน คือ ทำให้ปริมาณเซลล์สูงสุดลดลงประมาณ 44, 53 และ 70% ตามลำดับ และปริมาณเอทานอลสูงสุดลดลงประมาณ 66, 72 และ 82% ตามลำดับ ซึ่งมีลักษณะเหมือนกับที่ Maiorella *et al.* (1984) ได้รายงานไว้ แต่ผลการยับยั้งรุนแรงกว่า

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ 0.03 และ 0.06 โมลา ยับยั้งการเจริญในระดับที่ใกล้เคียงกัน คือลดปริมาณเซลล์สูงสุดลงประมาณ 66% ซึ่งใกล้เคียงกับการยับยั้งของ NH_4Cl ข้างต้น ส่วนการหมักแอลกอฮอล์นั้น $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ทั้งสามระดับให้ผลเรียงตามลำดับกัน โดยที่ 0.12 โมลา ลดปริมาณเอทานอลสูงสุดลงถึงประมาณ 83% เช่นเดียวกับ NH_4Cl ที่ 0.24 โมลา ดังนั้นถ้าเปรียบเทียบ NH_4Cl กับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ แล้วที่ความเข้มข้นระดับเดียวกัน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ยับยั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ได้ดีกว่า NH_4Cl เช่นเดียวกับการทดลองของ Maiorella *et al.* (1984) ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณของ NH_4^+ ใน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มีมากกว่าใน NH_4Cl สองเท่า

K_2SO_4 ทั้ง 3 ระดับ ยับยั้งการเจริญโดยลดปริมาณเซลล์สูงสุดลง 15, 18 และ 32% ตามลำดับ แต่ไม่มีผลต่อการหมักแอลกอฮอล์ของเชื้อลูกผสม AM12

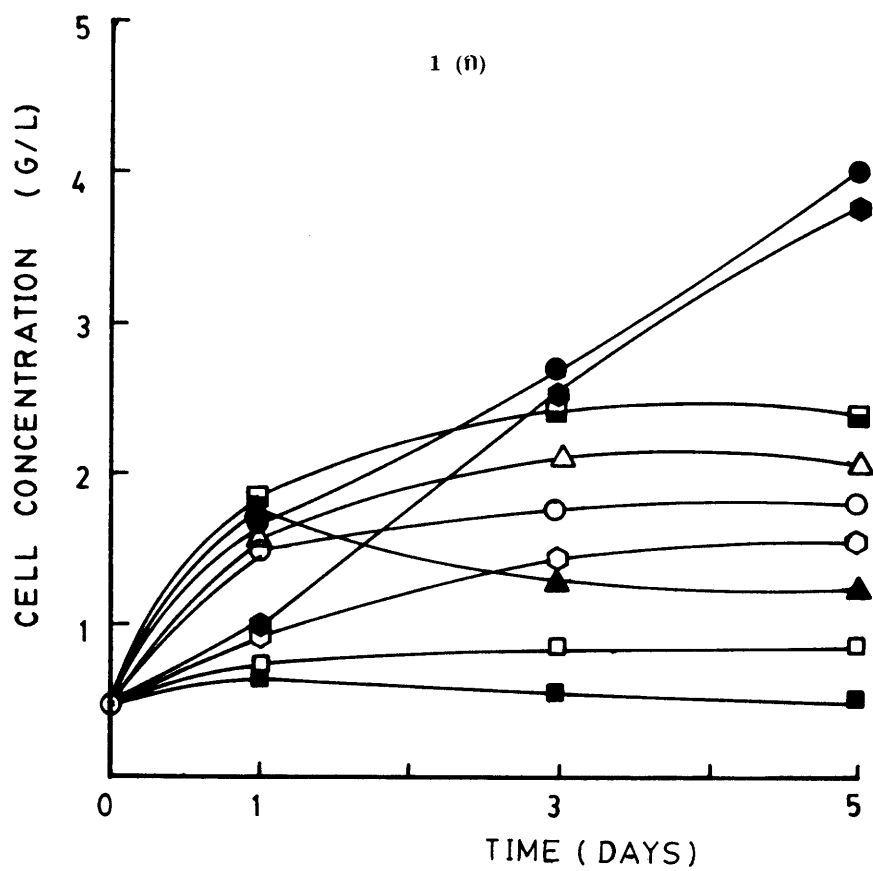
สำหรับการยับยั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ของ NH_4Cl และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ระดับของ NH_4^+ เดียวกันมีผลใกล้เคียงกัน และแสดงการยับยั้งอย่างรุนแรง ส่วน KCl ซึ่งมีปริมาณ Cl^- สูงกว่าใน NH_4Cl ไม่มีการยับยั้งการหมักแอลกอฮอล์และมีผลต่อการเจริญต่ำกว่า NH_4Cl และ K_2SO_4 ซึ่งมีปริมาณ SO_4^{2-} เท่ากับใน $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มีผลยับยั้งการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ต่ำกว่า $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ มาก ดังนั้นจึงอาจจะกล่าวได้ว่าการยับยั้งการเจริญของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ NH_4Cl เกิดจากอนุมูล NH_4^+ เป็นส่วนใหญ่

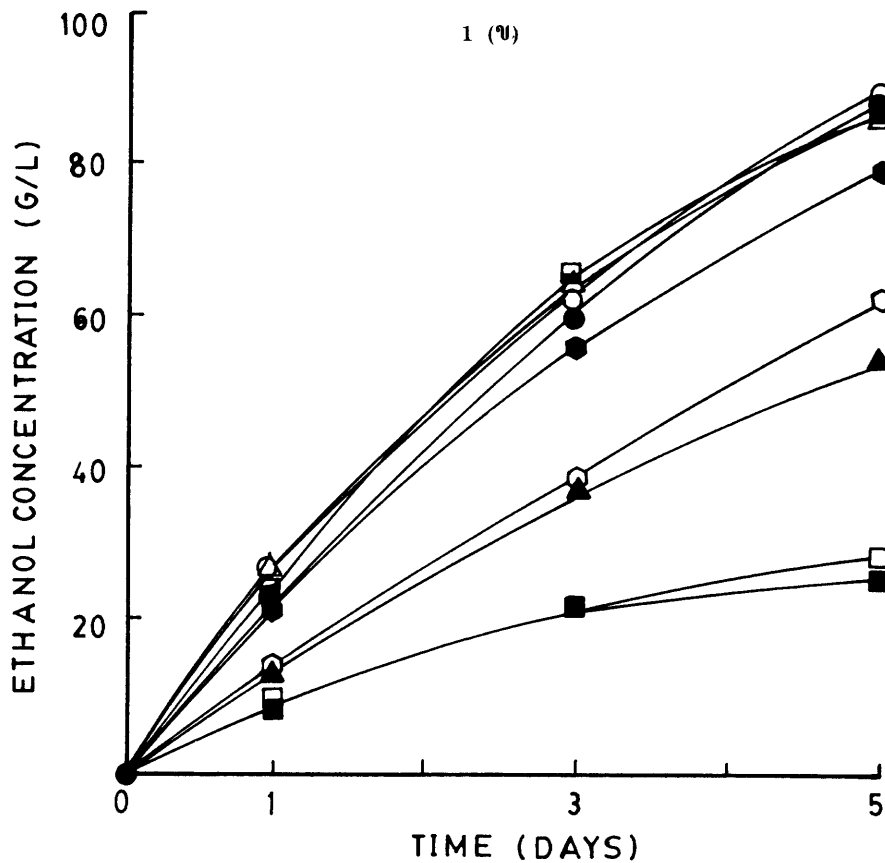
ผลจากการศึกษครั้งนี้จะเห็นว่าเกลืออนินทรีย์หลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และลดความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ ในระดับที่

ความเข้มข้นของอนุมูลอินทรีย์ในเกลือนั้น ๆ เท่ากับความเข้มข้นของเกลืออินทรีย์ในกากน้ำตาลเจือจางสำหรับหมักแอลกอฮอล์โดยเฉพาะ Ca^{2+} และ NH_4^+ ดังนั้นจุลสม AM12 จึงไม่เหมาะสำหรับนำมาผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ แนวทางที่จะทำให้จุลสม AM12 เหมาะสำหรับนำมาผลิตแอลกอฮอล์โดยใช้กากน้ำตาล คือ การปรับปรุงให้ทนต่ออนุมูลอินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะ Ca^{2+} และ NH_4^+ ซึ่งอาจจะทำได้โดยใช้วิธีทำให้กลายพันธุ์ (mutation) หรือการผสมพันธุ์ (hybridization)

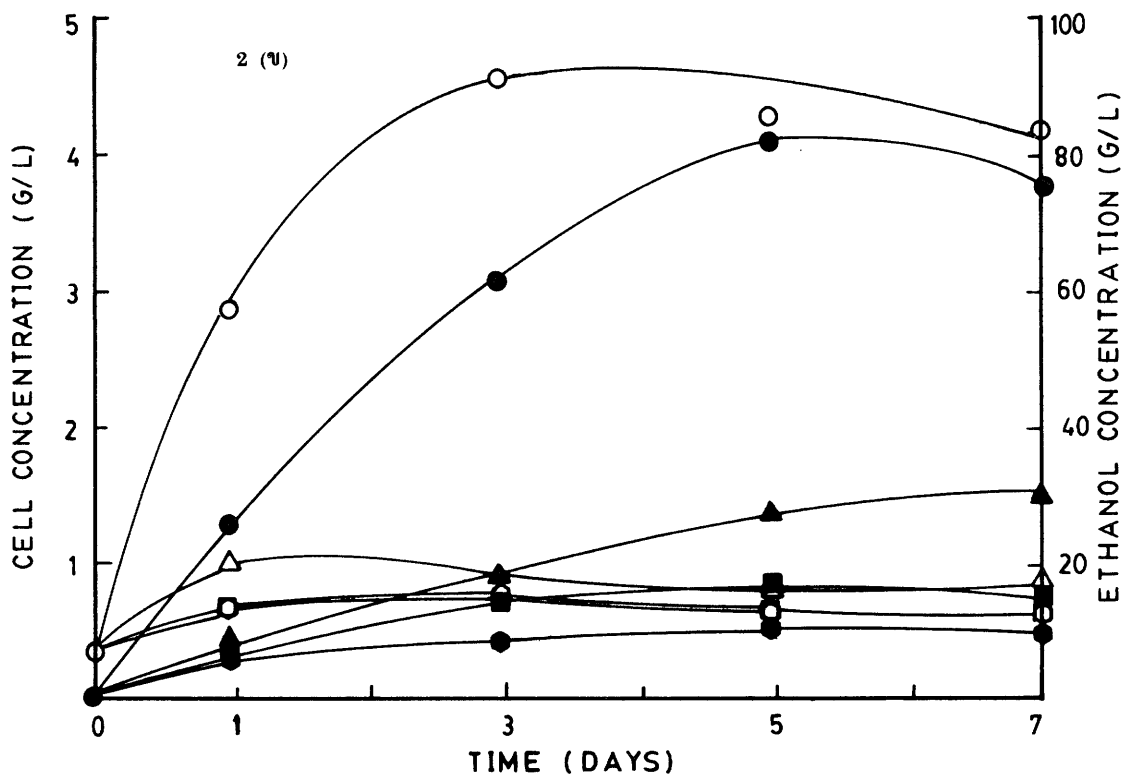
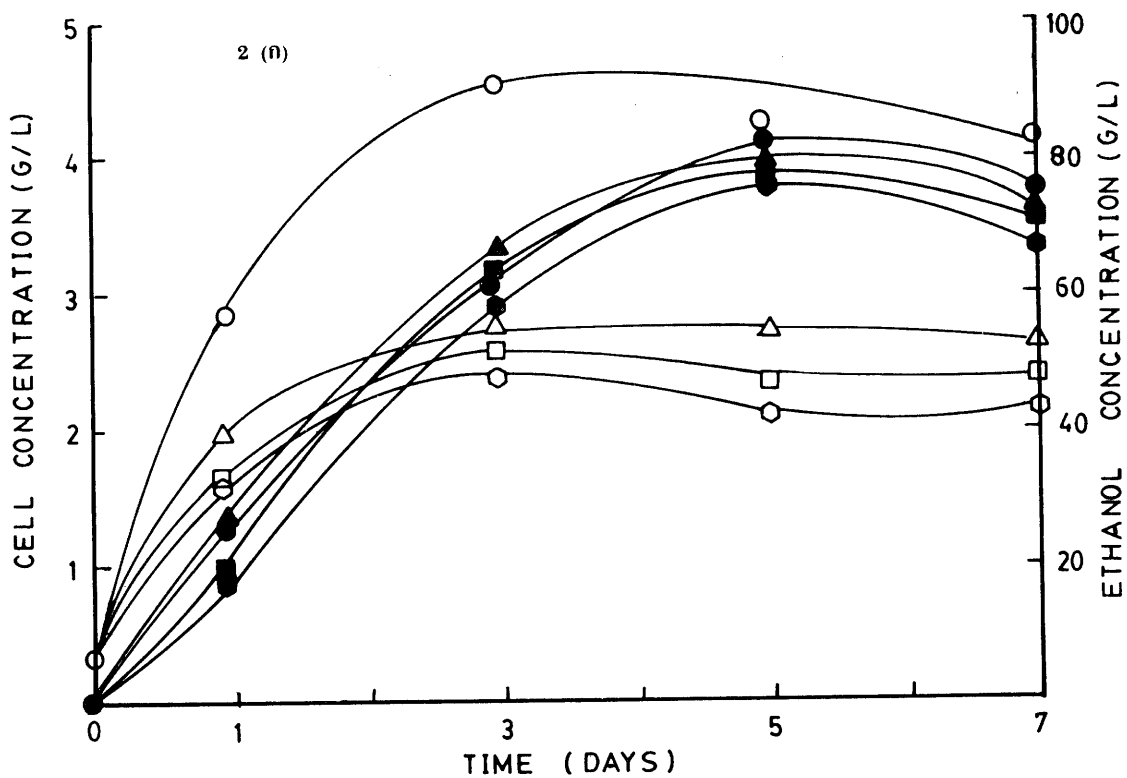
เอกสารอ้างอิง

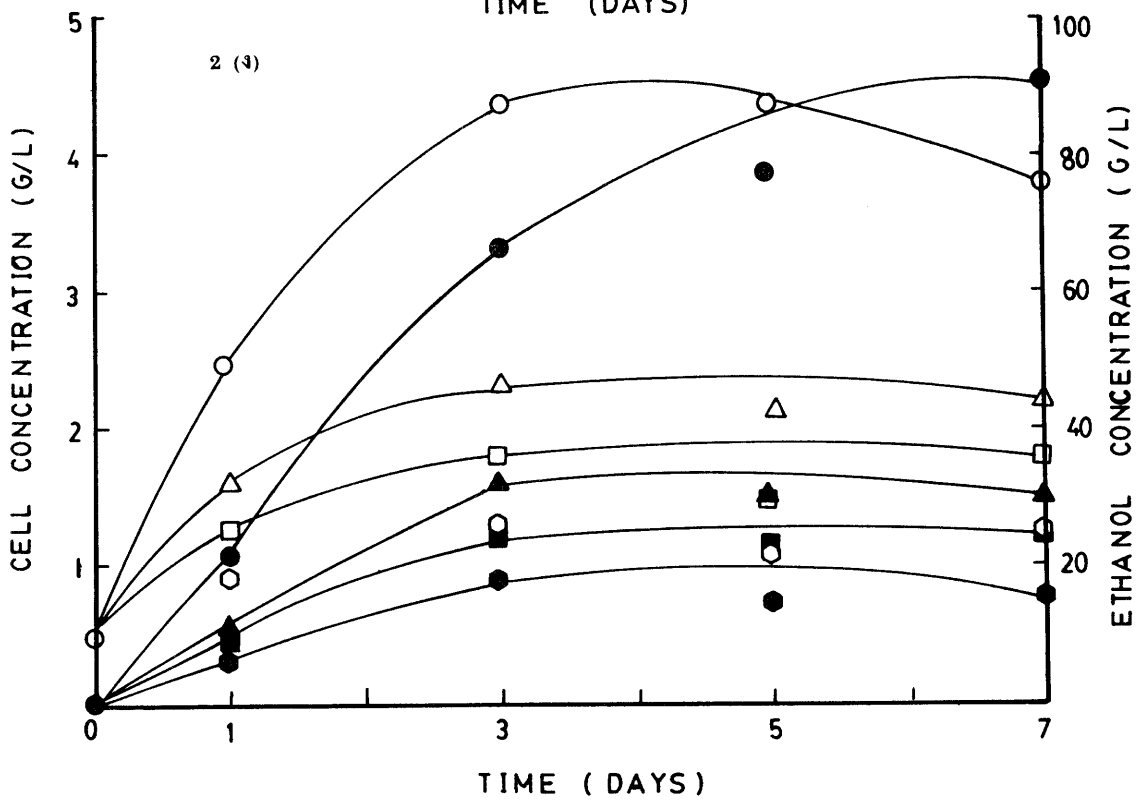
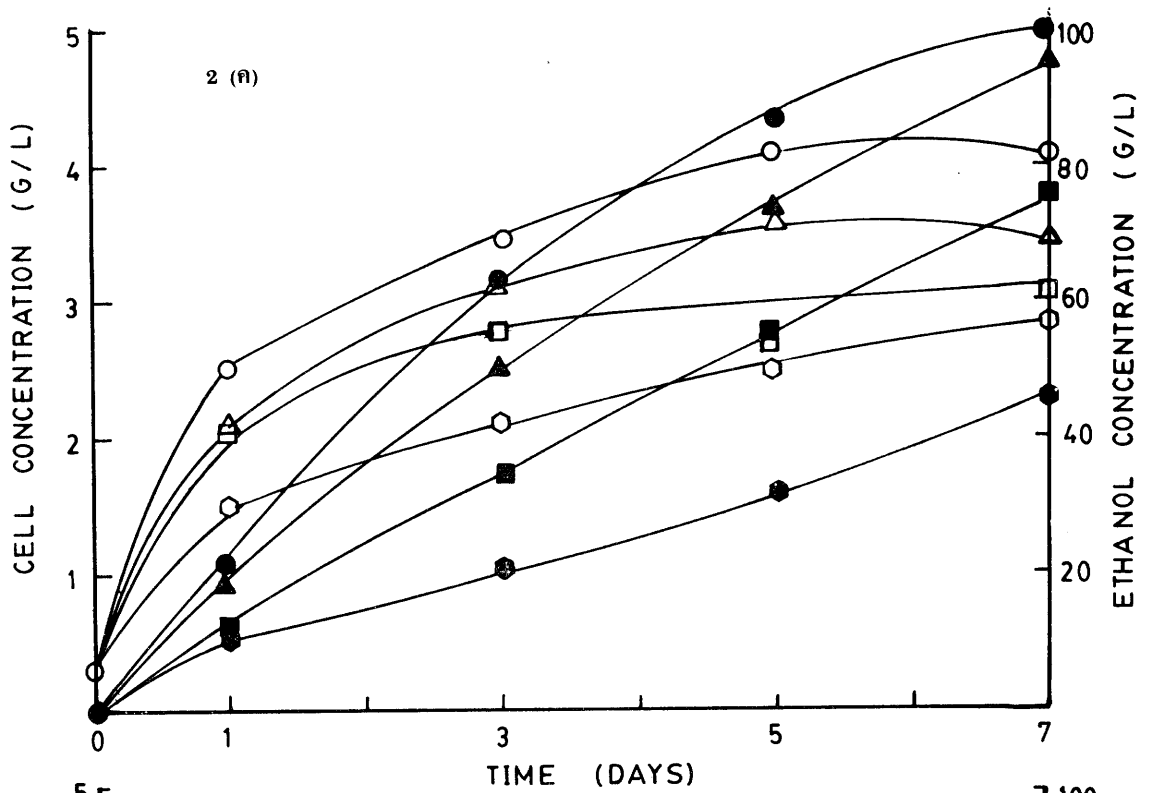
- Jones, R.P. and P.F. Greenfield. 1984. A review of yeast ionic nutrition. Part I: Growth and Fermentation Requirements. Proc. Biochem. April: 48 - 60.
- Kishimoto, M. 1985. Personal communication.
- Maiorella, B.L., H.W. Blanch and C.R. Wilke. 1984. Feed component inhibition in ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. 26: 1155 - 1166.
- Meade, G.P., J.C.P. Chen. 1977. Cane Sugar Hand-Book. 10th Ed. John Wiley & Sons, New York. 359 p.
- Rose, A.H. and J.S. Harrison 1971. The Yeasts. Vol. 2 Academic Press. 571 p.
- Saltukoglu, A. and J.C. Slaughter. 1983. The effect of magnesium and calcium on yeast growth. J. Inst. Brew. 89: 81-83.
- Seki, T., S. Myoga, S. Limtong, S. Uedono, J. Kumnuanta and H. Taguchi. 1983. Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. Biotechnol. Lett. 5(5): 351 - 356.
- Watson, T.G. 1970. Effects of sodium chloride on steady state growth and metabolism of *Saceharomyces cerevisiae*. J. Gen. Microbiol. 64: 91 - 99.

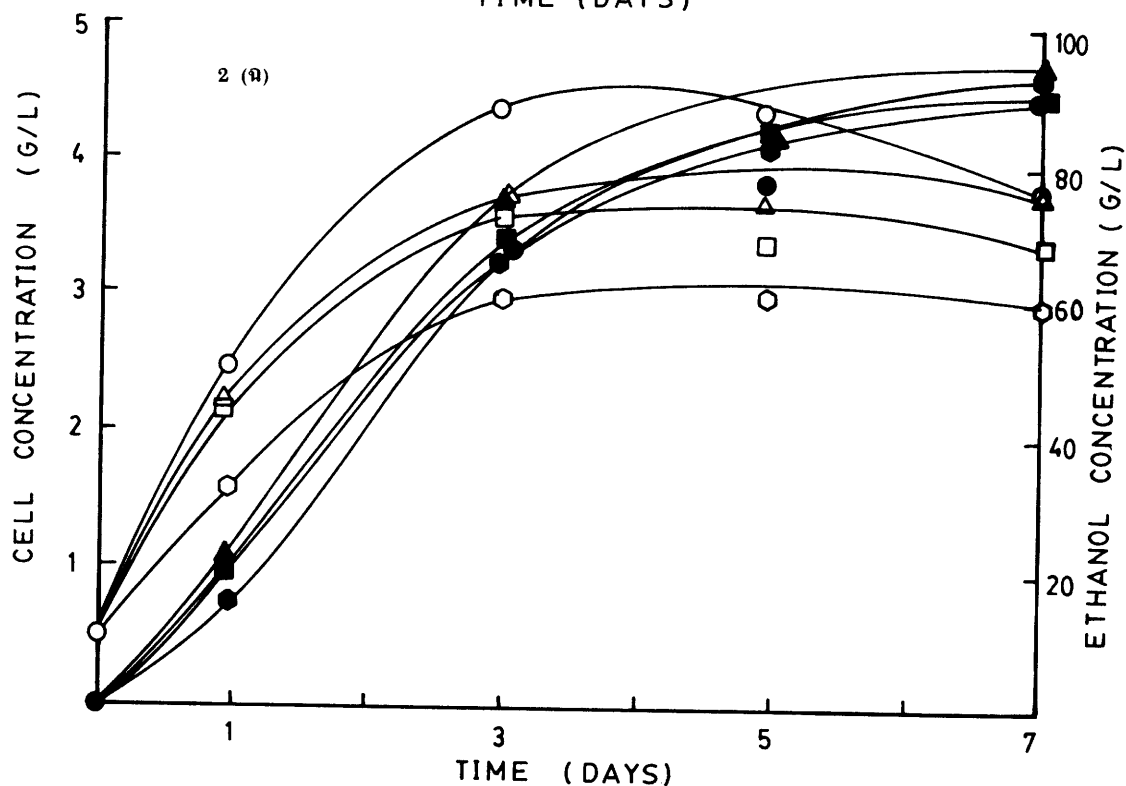
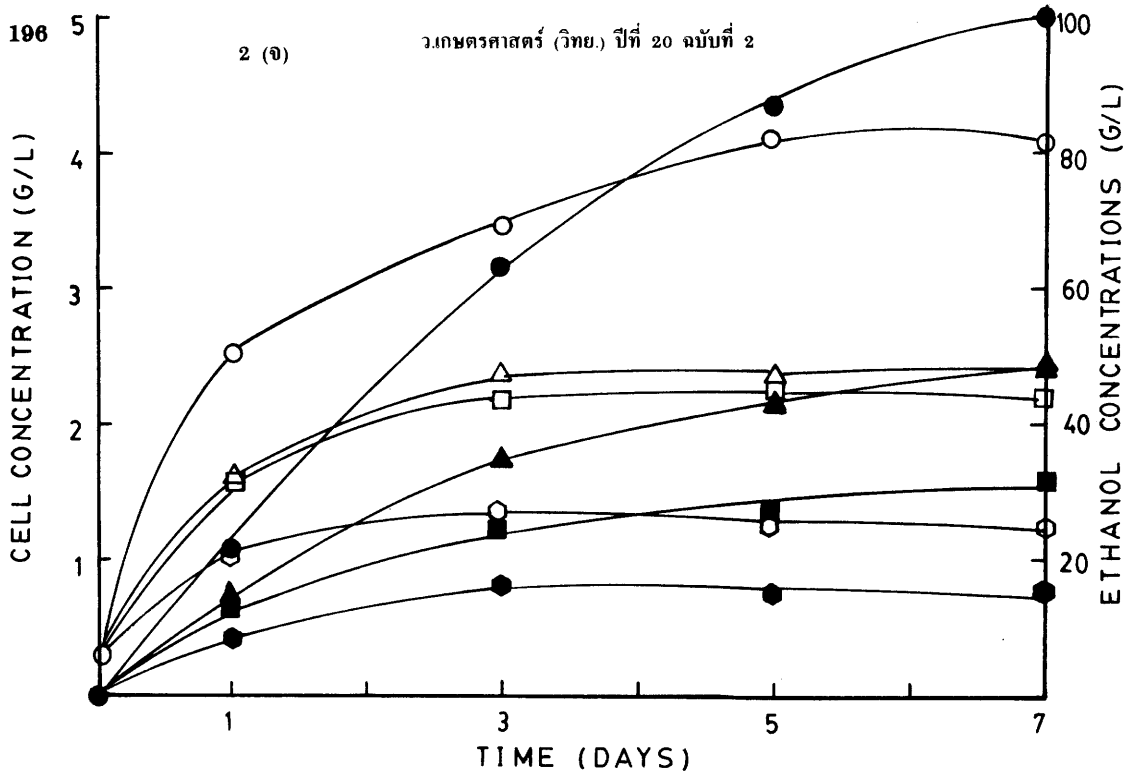




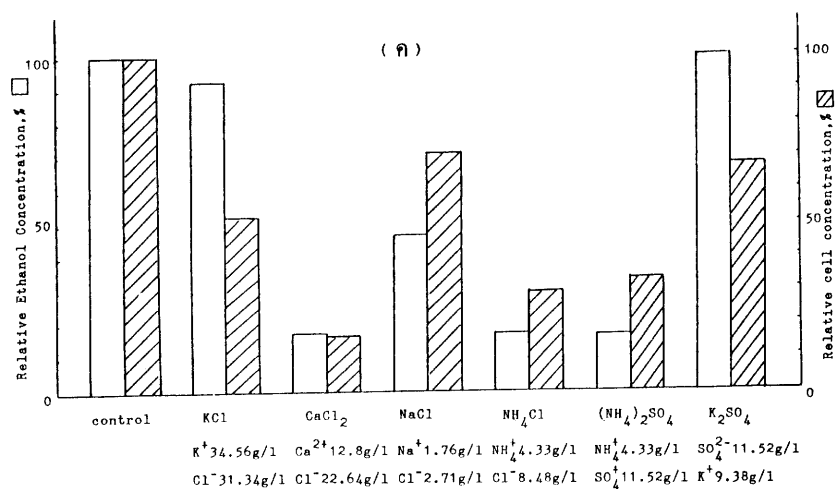
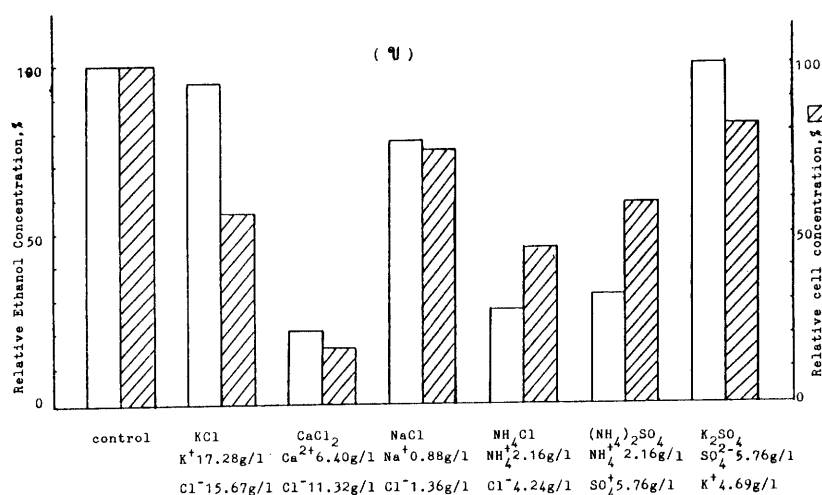
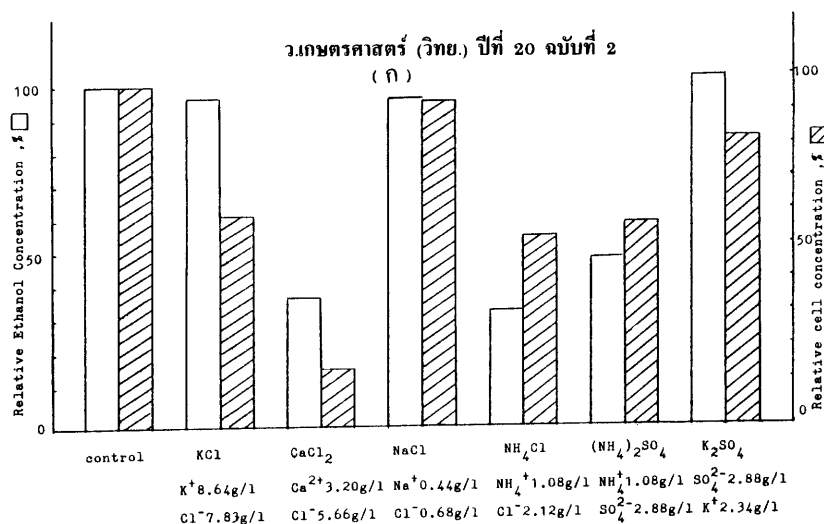
รูปที่ 1 อิทธิพลของเกลืออนินทรีย์ต่อการเจริญ (ก) และการหมักแอลกอฮอล์ (ข) ของ *Saccharomyces cerevisiae* AM 12 : control ● , KCl 41.74 กรัมต่อลิตร ○ , CaCl₂ 22.15 กรัม ต่อลิตร ■ , MgSO₄ · 7 H₂O 30.42 กรัมต่อลิตร □ , NaCl 2.80 กรัมต่อลิตร ▲ , (NH₄)₂SO₄ 9.9 กรัมต่อลิตร △ , MgCl₂ · 6 H₂O 25.10 กรัมต่อลิตร ◆ , Na₂SO₄ 0.36 กรัมต่อลิตร ● , และ K₂SO₄ 48.14 กรัมต่อลิตร ⬡







รูปที่ 2 Time-course ของการเจริญและการหมักแอลกอฮอล์ โดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* AM12 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปราศจากเกลือ (○, ●) และที่เติมเกลือ KCl (ก), CaCl₂ (ข), NaCl (ค), NH₄Cl (ง), (NH₄)₂SO₄ (จ) และ K₂SO₄ (ฉ) ที่ความเข้มข้นของอนุโมล K⁺, Cl²⁺, Na⁺, NH₄⁺, NH₄⁺ และ SO₄²⁻ ตามลำดับ เท่ากับ (Δ, ▲) สูงกว่าสองเท่า (□, ■) และสูงกว่าสี่เท่า (◊, ◐) ของความเข้มข้นที่พบในกากน้ำตาลเจือจางสำหรับหมักแอลกอฮอล์ (เครื่องหมายสี่เหลี่ยมแสดงถึงความเข้มข้นของเซลล์ และเครื่องหมายทึบแสดงถึงความเข้มข้นของแอลกอฮอล์)



รูปที่ 3 อิทธิพลของเกลืออนินทรีย์ ต่อความเข้มข้นสูงสุดของเซลและแอลกอฮอล์ ที่ผลิตได้โดย *Saccharomyces cerevisiae* AM12 โดยความเข้มข้นของเกลืออนินทรีย์ที่ใช้ยึดตามความเข้มข้นของอนุพลอนินทรีย์ที่เป็นองค์ประกอบให้ เท่ากับ (ก) สูงกว่าสองเท่า (ข) และสูงกว่าสี่เท่า (ค) ของความเข้มข้นของอนุพลอนินทรีย์ในกากน้ำตาลที่เจือจาง ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลพอเหมาะสำหรับหมักแอลกอฮอล์