การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้ระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์และเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

นางสาวเพ็ญนภา สีมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2544
ISBN 974-03-0667-5
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CONTINUOUS ETHANOL FERMENTATION USING YEAST CELL RECYCLING AND IMMOBILIZED YEAST CELL

Miss Pennapa Seema

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Program of Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2001

ISBN 974-03-0667-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้ระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์และเซลล์ยีสต์ตรึงรูป
โดย	นางสาวเพ็ญนภา สีมา
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพ็ญนภา สีมา : การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยใช้ระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์และเซลล์ยีสต์ตรึงรูป (CONTINUOUS ETHANOL FERMENTATION USING YEAST CELL RECYCLING AND IMMOBILIZED YEAST CELL) อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์; 122 หน้า. ISBN 974-03-0667-5

งานวิจัยนี้ผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องโดย *Saccharomyces cerevisiae* ประกอบด้วย 2 กระบวนการดังนี้ กระบวนการแรกเป็นการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่องจากกากน้ำตาลในถังหมักขนาด 3 ลิตร พร้อมถังตกตะกอนขนาด 2 ลิตรสำหรับแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก พบว่าภาวะการผลิตเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับแยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมักคือ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เติม 100 กรัมต่อลิตร และอัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง ที่ภาวะนี้ระบบสามารถผลิตเซลล์ได้ความหนาแน่นเซลล์ 10 กรัมต่อลิตร หรือ 1.20 กรัมต่อชั่วโมง ส่วนกระบวนการที่สองคือการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องในถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร โดยใช้ระบบเวียนเซลล์ยีสต์จากระบบแรก พบว่าระบบผลิตเอทานอลได้เพียง 37.20 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.20 ต่อชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เติม 200 กรัมต่อลิตร จากระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์ข้างต้นประสบปัญหาความเข้มข้นของเซลล์ในระบบน้อย (8.97 กรัมต่อลิตร) เซลล์หนีออกจากระบบ และถังตกตะกอนมีประสิทธิภาพในการแยกเซลล์ต่ำเมื่อในน้ำหมักมีปริมาณน้ำตาลที่เหลือสูง เพื่อแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นจึงได้นำระบบตรึงเซลล์ยีสต์มาแทนระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์ซึ่งสามารถป้องกันเซลล์หนีออกจากระบบแม้ที่อัตราการเจือจางสูงๆ โดยทำการทดลองตรึงเซลล์ยีสต์บนโซเดียมอัลจิเนต เม็ดตรึงเซลล์บรรจุอยู่ในถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร สำหรับผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล ระบบสามารถผลิต เอทานอลได้ปริมาณสูงสุด 69.83 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เติม 200 กรัมต่อลิตร และมีเซลล์ยีสต์ในระบบ 80 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องคือ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ผลการศึกษาการนำ น้ำหมักกลับมาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับเติมเข้าสู่ระบบการหมักเอทานอลอีกครั้งพบว่าไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้อีก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หลักสูตร.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2544..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม...-.....

4172382823 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD: FERMENTATION / ETHANOL / CONTINUOUS / MOLASSES

PENNAPA SEEMA: CONTINUOUS ETHANOL FERMENTATION USING YEAST CELL RECYCLING AND IMMOBILIZED YEAST CELL THESIS ADVISOR: ASS. PROF. SURAPONG NAVANKASATTUSUS, Ph.D. 122 pp.

ISBN 974-03-0667-5

This research involves the continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* consisting of two stages. In the first stage, the yeasts cells were continuously produced from molasses in a 3 l-fermentor with a 2 l-settling tank, to separate cells from fermentation broth. The suitable condition to separate cells from broth was observed with 100 g/l total sugar as feed at a dilution rate of 0.1 hr^{-1}. Under this condition, cells may be produced with a cell density of 10 g dry weight/l or 1.20 g dry weight/hr. The second stage was continuous ethanol fermentation in a 0.45 l-tower fermentor using yeast cell recycle from the first process. It was found that the second process produced only 37.20 g of ethanol/l at a dilution rate of 0.20 hr^{-1} and 200 g/l total sugar as feed. The problems of cell recycling operation were that of low attainable cell density (8.97 g of dry weight/l) in the system, high cells escape and low efficiency of settler at high sugar concentration in the fermentation broth. To solve these problems, the system was changed from free cells recycle to immobilized cell process which prohibited cells escape at the operating dilution rate. Immobilized yeast cells in calcium alginate gel beads were used in a 0.45 l-tower fermentor for the production of ethanol from molasses. The maximum attainable concentration of 69.83 g ethanol/l was obtained with 200 g/l total sugar as feed at a dilution rate of 0.1 hr^{-1} and cell density of 80 g dry weight/l. The suitable temperature of cultivation for continuous ethanol fermentation was 30 °C. Recycling of fermentation broth stillage (dealcoholised) from a previous fermentation was not applicable.

Program of ..... Biotechnology.....
Field of study.....Biotechnology.....
Academic year.....2001.....

Student's signature.....Pennapa Seema
Advisor's signature.....
Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิตและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์โดยได้รับความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์. ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ ที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ตลอดจนให้คำแนะนำแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ด้วยดีตลอดมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ งามประเสริฐสิทธิ์ รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล และ รองศาสตราจารย์ ดร. ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการสั่งซื้อและจัดหาสารเคมี รวมทั้งช่วยเหลือซ่อมบำรุงอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณแม่ พี่สาว และคนพิเศษที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจ ที่สำคัญในการทำวิจัยตลอดเวลาจนสำเร็จสมบูรณ์

และสุดท้ายขอขอบคุณเพื่อนทุกคนและน้องคำแก้วที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยตลอดมา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญรูป..... ด

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ท

บทที่1 บทนำ..... 1

1.1 การหมักเอทานอล..... 1

1.2 ทฤษฎีการหมักเอทานอล..... 1

1.3 วิธีการหมักเอทานอล..... 3

1.3.1 กระบวนการหมักแบบแบช..... 3

1.3.2 กระบวนการหมักเฟดแบช..... 3

1.3.3 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง..... 4

1.4 จลนพลศาสตร์การหมัก..... 4

1.5 จลนพลศาสตร์การหมักแบบต่อเนื่อง..... 6

1.5.1 ทฤษฎีเกี่ยวกับระบบการหมักแบบเคโมสแตท..... 7

1.5.2 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจือจางกับความเข้มข้นของเซลล์..... 7

1.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์..... 8

1.6.1 ธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามิน..... 8

1.6.2 อุณหภูมิ..... 15

1.6.3 ความเป็นกรด-ด่าง..... 15

1.6.4 ออกซิเจน..... 16

1.6.5 เอทานอล..... 16

1.6.6 คาร์บอนไดออกไซด์..... 17

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

1.7 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกากน้ำตาล..... 17

1.8 แนวทางการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอล..... 18

1.8.1 การเสาะหาและปรับปรุงพันธุ์จุลินทรีย์..... 18

1.8.2 การพัฒนารูปแบบของถังหมัก..... 19

1.8.3 การเปลี่ยนแปลงรูปแบบและวิธีการหมัก..... 19

1.9 มูลเหตุในการทำงานวิจัย..... 20

1.10 ขั้นตอนการทำงานวิจัย..... 21

บทที่ 2 วิธีการทดลอง..... 22

2.1 อุปกรณ์..... 22

2.2 สารเคมี..... 23

2.3 เชื้อจุลินทรีย์และการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์..... 24

2.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์ยีสต์..... 24

2.4.1 การเตรียมหัวเชื้อ..... 24

2.4.2 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์ในการหมักแบบขวดเขย่า..... 24

2.4.3 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์ในถังหมักขนาด 3 ลิตร แบบแบช..... 25

2.4.4 การเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเซลล์แบบต่อเนื่องพร้อมถังตกตะกอนขนาด 2 ลิตร... 25

2.5 การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล..... 25

2.5.1 การเตรียมหัวเชื้อ..... 25

2.5.2 การหมักเอทานอลในระดับขวดแบบ static culture..... 25

2.5.3 การหมักเอทานอลในระดับถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร แบบแบช..... 25

2.5.4 การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องระบบเซลล์อิสระในถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร พร้อมถังตกตะกอนขนาด 2 ลิตร โดยใช้ระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์..... 26

2.5.5 การตรึงเซลล์ยีสต์ในสารละลายโซเดียมอัลจิเนตและการขึ้นรูป..... 26

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

2.5.6 การหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องระบบตรึงเซลล์ยีสต์ในถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร..... 26
2.6 วิธีการวิเคราะห์..... 26
2.6.1 การวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ยีสต์โดยหาน้ำหนักเซลล์แห้ง..... 26
2.6.2 การนับจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้เฮมาไซโตมิเตอร์..... 27
2.6.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลซูโครสโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก..... 27
2.6.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี..... 27

บทที่ 3 ผลการทดลอง..... 29
3.1 การเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตเซลล์..... 29
3.1.1 การเจริญของยีสต์ในอาหารสำหรับเตรียมหัวเชื้อ..... 29
3.1.2 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ออัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในการหมักแบบขวดเขย่า..... 30
3.1.3 การเจริญของยีสต์ระดับถังหมักขนาด 3 ลิตรแบบแบช..... 36
3.1.4 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบการหมักแบบต่อเนื่องต่อการเจริญของยีสต์เมื่อใช้อัตราการเจือจาง 0.1 ต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพของถังตกตะกอน..... 36
3.1.5 ผลของอัตราการเจือจางต่อการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่องและประสิทธิภาพของถังตกตะกอน เมื่อเติมอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร..... 39
3.2 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae*..... 46
3.2.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ออัตราการผลิตเอทานอลของยีสต์ในการหมักแบบ static culture..... 46
3.2.2 การผลิตเอทานอลของยีสต์ระดับถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร แบบแบช. 59

สารบัญ(ต่อ)

หน้า

3.2.3 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบการหมักต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่องระบบเซลล์อิสระโดยใช้ระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์ ที่อัตราการเจือจาง 0.2 ต่อชั่วโมง และอัตราการหมุนเวียนเซลล์ 1ต่อ 1 59

3.2.4 ผลของอัตราการเจือจาง, ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ และความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่ใช้เติมเข้าสู่ระบบหมักแบบต่อเนื่องต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่องด้วยการตรึงเซลล์ยีสต์..... 62

3.2.5 ผลของอาหารกากน้ำตาลที่เจือจางด้วยน้ำหมักต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ในการหมักแบบต่อเนื่องระบบตรึงเซลล์..... 80

3.2.6 ผลของอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์..... 85

บทที่ 4 วิจารณ์ผลการทดลอง..... 93

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง..... 98

รายการอ้างอิง 99

ภาคผนวก 105

ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 106

ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี..... 109

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน..... 110

ภาคผนวก ง การคำนวณ..... 112

ภาคผนวก จ ค่าทางสถิติ..... 117

ภาคผนวก ฉ รูปและแผนภาพ..... 119

ประวัติผู้เขียน..... 122

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1.1 แสดงค่าเฉลี่ยองค์ประกอบของธาตุที่พบภายในเซลล์ *Saccharomyces* sp..... 10

1.2 แสดงแหล่งคาร์บอนที่ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถนำไปใช้ได้..... 10

1.3 แสดงแหล่งไนโตรเจนที่มีความสัมพันธ์กับค่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์โดยเรียงลำดับจากมากไปน้อย..... 12

3.1 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ระดับขวดเขย่า..... 29

3.2.1 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร ระดับขวดเขย่า..... 31

3.2.2 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ระดับขวดเขย่า..... 31

3.2.3 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร ระดับขวดเขย่า..... 32

3.2.4 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร ระดับขวดเขย่า..... 32

3.2.5 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ระดับขวดเขย่า..... 33

3.2.6 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ระดับขวดเขย่า..... 33

3.3 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ระดับถังหมักขนาด 3 ลิตร แบบแบช..... 37

3.4.1 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20-100 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง..... 40

3.4.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20-100 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง..... 43

3.4.3 เปรียบเทียบอัตราการแยกเซลล์ของถังตกตะกอนขนาด 2 ลิตร เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20-100 กรัมต่อลิตร..... 45

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.5.1 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง เมื่อมีการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.10-0.40 ต่อชั่วโมง..... 47

3.5.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อ*S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.10-0.40 ต่อชั่วโมง..... 51

3.5.3 เปรียบเทียบอัตราการแยกเซลล์ของถังตกตะกอนขนาด 2 ลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.10-0.40 ต่อชั่วโมง..... 53

3.6.1 การเจริญ และการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ระดับขวดแบบ static culture..... 54

3.6.2 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ระดับขวดแบบ static culture..... 55

3.6.3 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ระดับขวดแบบ static culture..... 56

3.7 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ระดับถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร แบบแบช..... 60

3.8.1 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องโดยใช้ระบบหมุนเวียนเซลล์ยีสต์เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.20 ต่อชั่วโมง และอัตราการหมุนเวียนเซลล์ 1 ต่อ 1..... 63

3.8.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญ การผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.20 ต่อชั่วโมง และอัตราการหมุนเวียนเซลล์ 1ต่อ 1..... 65

3.8.3 เปรียบเทียบอัตราการเจริญ การผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.20 ต่อชั่วโมง และอัตราการหมุนเวียนเซลล์ 1ต่อ 1..... 65

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.9.1 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.10x3.45 มิลลิเมตร..... 67

3.9.2 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.10x3.45 มิลลิเมตร..... 68

3.9.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญ การผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.10x3.45 มิลลิเมตร..... 70

3.9.4 เปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญ การผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.10x3.45 มิลลิเมตร..... 70

3.10.1 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.05x5.95 มิลลิเมตร..... 72

3.10.2 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.05x5.95 มิลลิเมตร..... 73

3.10.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญ การผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.05x5.95 มิลลิเมตร..... 75

สารบัญตาราง(ต่อ)

หน้า

ตารางที่

3.10.4 เปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญ การผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.05x5.95 มิลลิเมตร..... 75

3.11.1 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.40x5.15 มิลลิเมตร..... 76

3.11.2 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.40x5.15 มิลลิเมตร..... 77

3.11.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญ การผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.40x5.15 มิลลิเมตร..... 79

3.11.4 เปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญ การผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.40x5.15 มิลลิเมตร..... 79

3.12.1 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์เมื่อนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหารแล้วนำกลับมาหมักเอทานอลอีกครั้ง ในการหมักแบบต่อเนื่องความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่เติม 200 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.00x3.30 มิลลิเมตร..... 81

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.12.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญ การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหารแล้วนำกลับมาหมักเอทานอลอีกครั้ง ในการหมักแบบต่อเนื่องความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่เติม 200 และ 170 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.00x3.30 มิลลิเมตร..... 83

3.12.4 เปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญ การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหารแล้วนำกลับมาหมักเอทานอลอีกครั้ง ในการหมักแบบต่อเนื่องความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่เติม 200 และ 170 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.00x3.30 มิลลิเมตร..... 84

3.12.2 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์เมื่อนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหารแล้วนำกลับมาหมักเอทานอลอีกครั้ง ในการหมักแบบต่อเนื่องความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่เติม170 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.00x3.30 มิลลิเมตร..... 86

3.13.1 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อแปรอุณหภูมิในการหมักแบบต่อเนื่องเป็น 25, 30 และ 33 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่เติมเข้าสู่ระบบเป็น 200 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.00x3.30 มิลลิเมตร..... 88

3.13.2 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่ออุณหภูมิในการหมักแบบต่อเนื่องเป็น 36 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่เติมเข้าสู่ระบบเป็น200 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.15x3.20 มิลลิเมตร..... 89

3.13.3 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญ การผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรอุณหภูมิในการหมักแบบต่อเนื่องเป็น 25, 30, 33 และ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่เติม 200 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง 91

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.13.4 เปรียบเทียบค่าอัตราการเจริญ การผลิตเอทานอล และการใช้น้ำตาลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรอุณหภูมิในการหมักแบบต่อเนื่องเป็น 25, 30, 33 และ 36 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่เติม 200 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง 92

ค-1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร..... 110

ค-2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับค่าสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟ..... 111

จ-1 ผลการวิเคราะห์ค่าทางสถิติของปริมาณเอทานอลในการทดลองที่ 3.2.4..... 117

จ-2 ผลการเปรียบเทียบความต่างของค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลในการทดลองที่ 3.2.4..... 118

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1.1 การสร้างเอทานอลโดยผ่านวิถี Embden-Mayerhof-Parnas..... 2

3.1 แสดงการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ระดับขวดเขย่า..... 30

3.2.1 เปรียบเทียบการเจริญของ*S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่แปรความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 10-60 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า..... 34

3.2.2 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลของ*S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่แปรความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 10-60 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดเขย่า..... 35

3.3 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ระดับถังหมักขนาด 3 ลิตร แบบแบช..... 38

3.4.1 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20-100 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง..... 42

3.4.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 20-100 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง..... 44

3.5.1 การเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง เมื่อมีการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.10-0.40 ต่อชั่วโมง..... 50

3.5.2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ภาวะคงที่สม่ำเสมอ เมื่อมีการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 100 กรัมต่อลิตร โดยแปรอัตราการเจือจางเป็น 0.10-0.40 ต่อชั่วโมง..... 52

3.6.1 เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่แปรความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 50-150 กรัมต่อลิตร ระดับขวดแบบ static culture..... 57

3.6.2 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่แปรความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 50-150 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดแบบ static culture..... 58

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

3.7 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ระดับถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร แบบแบช..... 61

3.8 การเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่อง เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเป็น 170 และ 200 กรัมต่อลิตรที่อัตราการเจือจาง 0.20 ต่อ ชั่วโมง และอัตราการหมุนเวียนเซลล์ 1 ต่อ1..... 64

3.9 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.10x3.45 มิลลิเมตร..... 69

3.10 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.05x5.95 มิลลิเมตร..... 74

3.11 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อแปรการเติมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 170 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง 0.10 และ 0.30 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.40x5.15 มิลลิเมตร..... 78

3.12 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อนำน้ำหมักมาเติมสารอาหารตามสูตรอาหารแล้วนำกลับมาหมักเอทานอลอีกครั้ง ในการหมักแบบต่อเนื่องที่ความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่เติม170 และ 200 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง โดยมีขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.00x3.30 มิลลิเมตร..... 82

3.13 การผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ในระบบการหมักแบบต่อเนื่องด้วยระบบตรึงเซลล์ยีสต์ เมื่อแปรอุณหภูมิในการหมักแบบต่อเนื่องเป็น 25, 30 และ 33 องศาเซลเซียส ในการหมักแบบต่อเนื่องที่ความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารกากน้ำตาลที่เติม 200 กรัมต่อลิตร อัตราการเจือจาง 0.10 ต่อชั่วโมง ขนาดของเม็ดตรึงเซลล์ 2.00x3.30 มิลลิเมตร..... 90

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่ หน้า

ค-1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสในช่วงความเข้มข้น 0.0 - 2.0 กรัมต่อลิตร..... 110

ค-2 กราฟมาตรฐานของเอทานอลสัมบูรณ์..... 111

ฉ-1 ถังตกตะกอนขนาด 2 ลิตร..... 119

ฉ-2 ถังหมักทรงสูงขนาด 0.45 ลิตร..... 120

ฉ-3 แผนภาพแสดงการผลิตเซลล์แบบต่อเนื่องพร้อมถังตกตะกอน..... 120

ฉ-4 แผนภาพแสดงการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องระบบเวียนกลับเซลล์ยีสต์..... 121

ฉ-5 แผนภาพแสดงการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องระบบตรึงเซลล์ยีสต์..... 121

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

vvm	คือ	ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรน้ำหมักภายในถังหมักต่อนาที
%	คือ	เปอร์เซ็นต์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย