# บทที่ 4

# ผลการทดลอง

## 1. ผลการเก็บรักษาน้ำตาลในน้ำอ้อย

หลังจากใส่สารกันเสียโซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ และโซเดียมเบนโซเอทที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในน้ำอ้อยสดเป็นเวลา 1 วัน แล้วดูดน้ำอ้อยที่ใส่สารกันเสียนี้มาเพาะเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (สูตร 4 ในภาคผนวก หน้า 93) บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง ปรากฏว่ามีเชื้อขึ้นเมื่อแช่ 12 24 ชั่วโมง ในทุกความเข้มข้นของสารกันเสียที่ใช้ และหลังจากใส่สารกันเสียในน้ำอ้อยสด ตั้งไว้ 2 วัน ดูดน้ำอ้อยนี้มาเพาะเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้างต้น ปรากฏว่ามีเชื้อขึ้นเมื่อแช่ 12 และ 24 ชั่วโมง ในทุกความเข้มข้นของสารกันเสียที่ใช้เช่นกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 1 หน้า 32 ซึ่งใช้เครื่องหมาย + แทนความหมายที่ว่า มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญขึ้นได้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 2. การเก็บเชื้อและการแยกเชื้อ

จำนวนเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากผลตาลสุกจากแหล่งต่าง ๆ ในกรุงเทพฯ และจังหวัดใกล้เคียงรวม 10 แห่ง แยกเชื้อยีสต์โดยใช้อาหารแข็ง YM (สูตร 1) ที่ปรับ pH 4.5 ซึ่งระดับ pH 4.5 นี้ เพื่อป้องกันแบคทีเรียบางชนิดขึ้น และเชื้อยีสต์ส่วนมากสามารถเจริญได้ในระดับ pH นี้ (Faparusi, 1969) พบว่าผลตาลแต่ละตัวอย่าง แยกเชื้อยีสต์ได้ 2 สายพันธุ์ที่ดีเด่น ลักษณะแตกต่างกันเห็นได้ชัด โดยสายพันธุ์หนึ่ง มีโคโลนีสีขาวขุ่นฟ่าม ๆ ผิวแห้ง เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทัศน์ เห็นเซลล์กลมขนาดใหญ่ เรียกชื่อเป็นระหัส A ซึ่งแยกมา 10 ตัวอย่าง คือ $A_1$ $A_2$ $A_3$ $A_4$ $A_5$ $A_6$ $A_7$ $A_8$ $A_9$ $A_{10}$ อีกสายพันธุ์หนึ่งเป็นโคโลนีสีขาวครีม เป็นมัน เซลล์รูปร่างกลม ขนาดเล็ก เรียกชื่อเป็นระหัส B ประกอบด้วย $B_1$ $B_2$ $B_3$ $B_4$ $B_5$ $B_6$ $B_7$ $B_8$ $B_9$ $B_{10}$ เมื่อแยกเชื้อได้แล้วเก็บเชื้อใน slant อาหารแข็ง YM pH 6

ตารางที่ 1 แสดงผลของการรักษาน้ำอ้อย โดยใช้สารกันเสีย โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ และโซเดียมเบนโซเอทที่มีความเข้มข้นต่างกัน ภายหลังจากการแช่เชื้อในสารละลายเป็นเวลาต่างกัน แล้วนำไปเพาะเชื้อในอาหารแข็งเลี้ยงเชื้อ (สูตร 4 ในภาคผนวก) และบันทึกผลของการขึ้นของเชื้อ

| สภาพน้ำอ้อยที่ใส่สารกันเสีย | ระยะเวลาการแช่เชื้อ (ชั่วโมง) | ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร) | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | โซเดียมเมตาไบซัลไฟต์ | | | | | โซเดียมเบนโซเอท | | | | |
| | | 0.02 | 0.1 | 0.3 | 0.5 | 0.7 | 0.3 | 0.5 | 0.7 | 1.0 | 2.0 |
| เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 1 วัน | 6 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | 12 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 24 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 2 วัน | 6 | – | – | – | – | – | – | – | – | – | – |
| | 12 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 24 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | 48 | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + | + + + |

– = ไม่มีเชื้อขึ้น

\+ = มีเชื้อขึ้น

\+ + + = มีเชื้อขึ้นปริมาณมาก

แหล่งที่เก็บผลตาล เชื้อยีสต์ที่แยกได้ เชื้อยีสต์ที่นำมาเป็นสายพันธุ์มาตรฐานแสดงรายละเอียดในตารางที่ 2 หน้า 34

3. การจำแนกชนิดของเชื้อ

จากผลของข้อ 2 ซึ่งได้ยีสต์ 2 กลุ่ม โดยแยกตามลักษณะโคโลนีนั้น เมื่อนำเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YM (สูตร 1) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และวัดขนาดของเซลล์ โดยหาค่าเฉลี่ยจำนวน 20 เซลล์ ผลจากการวัดขนาดคือ เชื้อกลุ่มที่มีลักษณะโคโลนีสีขาวขุ่นฟ่าม ๆ (หรือกลุ่มที่ให้ระหัส A ) ขนาดเซลล์จะค่อนข้างใหญ่กว่าขนาดของเซลล์ของเชื้อกลุ่มที่มีโคโลนีสีขาวครีมและเป็นมัน (กลุ่มระหัส B ) โดยกลุ่มระหัส A จะมีขนาดเซลล์ (3.6 – 4.6) x (4.6 – 7.9) $\mu$ และกลุ่มระหัส B จะมีขนาดเซลล์ (2.4 – 3.6) x (4.0 – 4.6) $\mu$ ผลการจำแนกชนิดของเชื้อยีสต์ $A_4$ มีคุณสมบัติต่าง ๆ คือ ลักษณะโคโลนีมีสีขาวครีมฟ่าม ๆ ผิวแห้ง ขอบมีเส้นใยเจริญออกมา การเจริญในอาหารเหลว yeast malt มี pellicle แห้ง ผิวหยาบ เชื้อกระจายทั่วไปตามผิวข้างหลอด มีการ budding แบบ multilateral เซลล์รูปไข่ ขนาด 3.6 x 4.6 $\mu$ สร้าง ascospore รูปกลม ภายใน ascus มีจำนวน 1 – 4 spores ต่อ 1 ascus มีความสามารถในการหมักน้ำตาล กาแลคโตส กลูโคส อินนูลิน แซคคาโลส ราฟิโนส แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาล แลคโตส มอลโตส มีความสามารถในการใช้น้ำตาล (Assimilation) คาแลคโตส กลูโคส แซคคาโลส แลคโตส แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาล มอลโตส สามารถใช้เกลือไนเตรต และใช้เอทธานอลเป็นแหล่งพลังงานได้ ซึ่งจำแนกชนิดเชื้อยีสต์ $A_4$ นี้ ตาม Key ของ Lodder (1974) ได้ เป็น Saccharomyces microellipsodes

4. การคัดเชื้อ (Screening)

4.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์โดยใช้ซูโครสเป็น C-source

4.1.1 คัดเชื้อโดยใช้น้ำตาลซูโครสและเพิ่มอาหารเสริม

ตารางที่ 2 แสดงแหล่งที่เก็บผลตาล เชื้อยีสต์ที่แยกได้ และเชื้อยีสต์ที่นำมาเป็นสายพันธุ์มาตรฐาน

| ลำดับที่ | แหล่งของเชื้อ | ชื่อระหัสเชื้อ | หมายเหตุ |
|---|---|---|---|
| 1 | ปากคลองตลาด | $A_1$<br>$B_1$ | ปทุมธานี |
| 2 | ตลาดคลองเตย | $A_2$<br>$B_2$ | เพชรบุรี |
| 3 | ตลาดวัดกลาง | $A_3$<br>$B_3$ | นครปฐม |
| 4 | ตลาดปากเกร็ด | $A_4$<br>$B_4$ | ปทุมธานี |
| 5 | ตลาดบางกอกน้อย | $A_5$<br>$B_5$ | เพชรบุรี |
| 6 | ตลาดท่าเรือ | $A_6$<br>$B_6$ | สระบุรี |
| 7 | ปากคลองตลาด | $A_7$<br>$B_7$ | นนทบุรี |
| 8 | ตลาดบางแค | $A_8$<br>$B_8$ | นครปฐม |
| 9 | ตลาดท่าเรือ ปทุมธานี | $A_9$<br>$B_9$ | ปทุมธานี |
| 10 | ตลาดนครปฐม | $A_{10}$-<br>$B_{10}$ | นครปฐม |
| 11 | โรงงานสุรา 1 | $S_{90}$ | อยุธยา<br>(Saccharomyces cerevisiae) |
| 12 | โรงงานสุรา 2 | $S_{10}$ | กรุงเทพฯ<br>(Saccharomyces cerevisiae) |
| 13 | ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา | $C_1$ | ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์<br>(S.cerevisiae Burgundy) |
| 14 | น้ำอ้อย | $C_2$ | แยกจากน้ำอ้อย<br>(unknown) |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

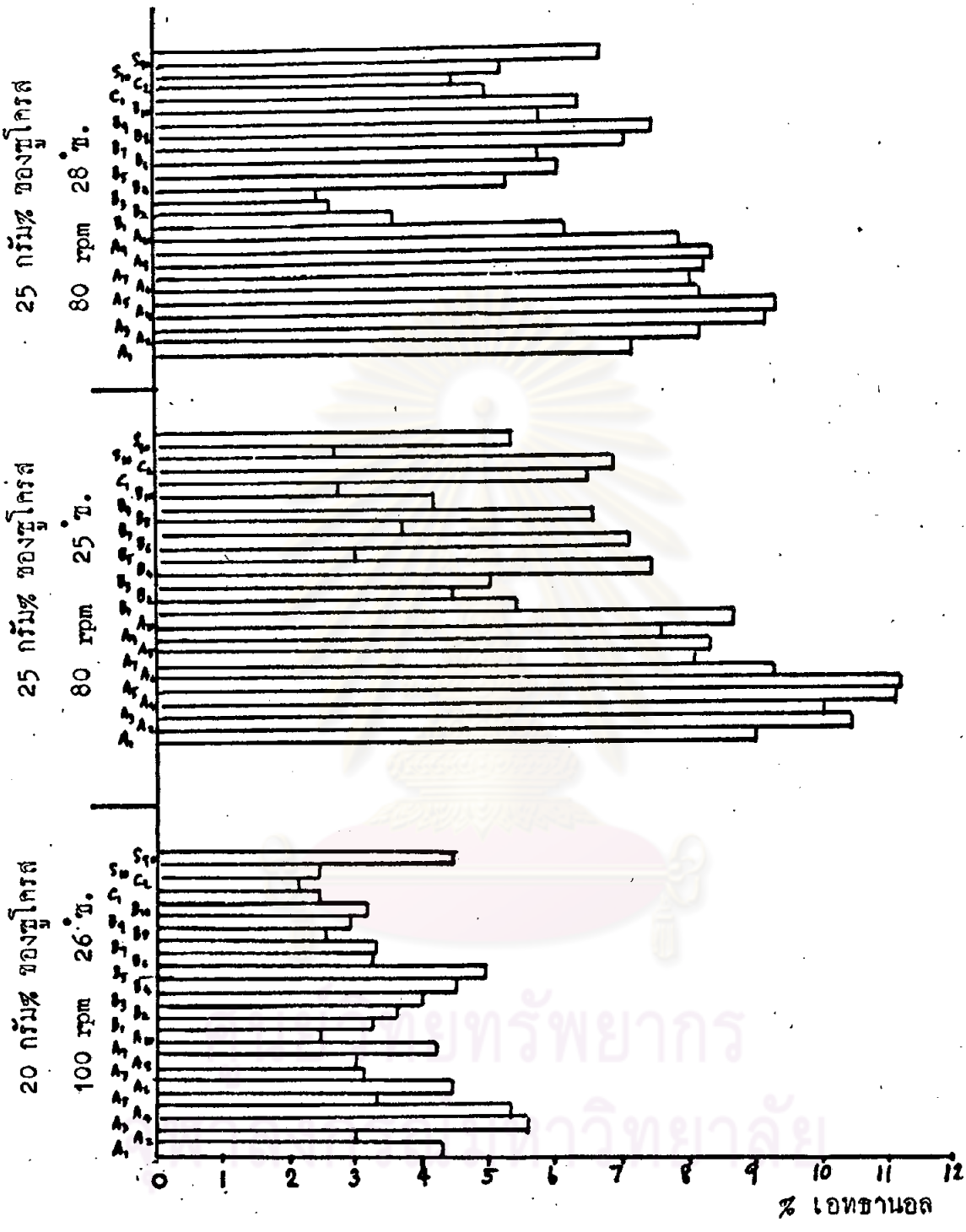
การคัดเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถหมักน้ำตาลเป็นเอทธานอล

ในการคัดเลือกขั้นต้นถือความสามารถในการหมักน้ำตาลซูโครสให้ได้เอทธานอลสูงเป็นหลัก โดยนำเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากผลตาล ทั้ง 20 สายพันธุ์กับเชื้อยีสต์มาตรฐาน $C_1$ $C_2$ $S_{90}$ $S_{10}$ รวม 24 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2 หน้า 34 ผลการคัดเชื้อยีสต์โดยใช้น้ำตาลซูโครส 20 กรัม% (ประมาณ 17 – 18 °บริกซ์) ในอาหารสูตร (1) ในภาคผนวก โดยปรับการหมุน 100 rpm ที่ 26 °ซ. วัดปริมาณเอทธานอลภายหลังการหมักได้ 7 วัน ผลปรากฏว่าปริมาณเอทธานอลต่ำมาก ส่วนใหญ่หมักเอทธานอลได้ต่ำกว่า 4% สายพันธุ์ที่หมักเอทธานอลได้ในช่วง 4 – 4.9% คือ $A_1$ $A_6$ $B_4$ $B_5$ และ $S_{90}$ และมี 2 สายพันธุ์คือ $A_3$ และ $A_4$ ที่หมักให้เอทธานอลอยู่ในช่วง 5 – 5.9% ดังแสดงการทดลองในตารางที่ 3 หน้า 36 ผลการคัดเชื้อยีสต์โดยใช้น้ำตาลซูโครส 25 กรัม% (ประมาณ 21 – 22 °บริกซ์) ในอาหารสูตร (1) ในภาคผนวก โดยปรับการหมุน 80 rpm ที่ 26 °ซ. และ 28 °ซ. วัดปริมาณเอทธานอลภายหลังการหมักได้ 7 วัน ปรากฏว่าเชื้อยีสต์ส่วนใหญ่สามารถหมักเอทธานอลได้สูงขึ้น สูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 25 กรัม% ความเร็วของการหมุน 80 rpm ที่อุณหภูมิ 26 °ซ. สายพันธุ์ยีสต์ที่หมักได้เอทธานอลได้สูงในช่วง 8 – 8.9% ได้แก่ยีสต์สายพันธุ์ $A_7$ $A_8$ และ$A_{10}$ และสายพันธุ์ยีสต์ที่หมักให้เอทธานอลได้มากระหว่าง 9 – 12% มีจำนวนถึง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ยีสต์สายพันธุ์ $A_1$ $A_2$ $A_3$ $A_4$ $A_5$ และ $A_6$ และในสูตรอาหารที่มีน้ำตาลซูโครส 25 กรัม% ความเร็วการหมุน 80 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. สายพันธุ์ยีสต์ที่หมักได้ช่วง 8 – 8.9% ได้แก่ยีสต์สายพันธุ์ $A_2$ $A_5$ $A_6$ $A_7$ และ $A_8$ และที่สามารถหมักเอทธานอลได้สูงโดยได้เปอร์เซนต์เอทธานอลปริมาณมากกว่า 9% มีเพียง 2 สายพันธุ์ คือ $A_3$ หมักเอทธานอลได้ 9.1% และ $A_4$ หมักได้สูงสุด คือ 9.25% ดังแสดงผลในตารางที่ 3 หน้า 36 และรูปที่ 1 หน้า 37 ส่วนผลของปริมาณเปอร์เซนต์เอทธานอลของสายพันธุ์ยีสต์ คัดโดยใช้น้ำตาลซูโครส 20 กรัม% ที่ 26 °ซ. 100 rpm น้ำตาลซูโครส 25 กรัม% ที่ 26 °ซ. 80 rpm และซูโครส 25 กรัม% ที่ 28 °ซ. 80 rmp แสดงผลในตารางที่ 9, 10 และ 11 ในภาคผนวก หน้า 106 107 108

i 17773003

ตารางที่ 3 แสดงผลการคัดเชื้อยีสต์เมื่อใช้ซูโครสเป็น C-source เพิ่มอาหารเสริมแอมโมเนียมซัลเฟต โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ยีสต์เอกซ์แทรก 0.5 0.3 และ 0.4 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ปรับ pH ที่ 4.5 วัดปริมาณเอทธานอลภายหลังการหมัก 7 วัน เมื่อหมักด้วยซูโครส 20 กรัม% (18 °บริกซ์) ปรับการหมุน 100 rpm ที่ 26 °ซ. ซูโครส 25 กรัม% (21 °บริกซ์) ปรับการหมุน 80 rpm ที่ 26 °ซ. และที่ซูโครส 25 กรัม% (21 °บริกซ์) ปรับการหมุน 80 rpm ที่ 28 °ซ.

| ซูโครส (กรัม %) จำนวนรอบการหมุน (rpm) อุณหภูมิ (°ซ.) | ระหัสชื่อเชื้อ | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | เปอร์เซนต์เอทธานอลภายหลังการหมัก 7 วัน | | | | | |
| | 4 – 4.9% | 5 – 5.8% | 6 – 6.9% | 7 – 7.9% | 8 – 8.9% | 9 – 12% |
| 20 กรัม% 100 rpm. 26 °ซ. | $A_1$ $A_6$ $A_9$ $B_3$ $B_4$ $B_5$ $S_{90}$ | $A_3$ $A_4$ | - | - | - | - |
| 25 กรัม% 80 rpm. 26 °ซ. | $B_2$ $B_9$ | $B_1$ $B_3$ $S_{90}$ | $B_8$ $C_1$ $C_2$ | $A_9$ $B_4$ $B_6$ | $A_7$ $A_8$ $A_{10}$ | $A_1$ $A_2$ $A_3$ $A_4$ $A_5$ $A_6$ |
| 25 กรัม% 80 rpm. 28 °ซ. | $C_1$ $C_2$ | $B_4$ $B_6$ $B_9$ $S_{10}$ | $A_{10}$ $B_5$ $B_{10}$ $S_{90}$ | $A_1$ $A_9$ $B_7$ $B_8$ | $A_2$ $A_5$ $A_6$ $A_7$ $A_8$ | $A_3$ $A_4$ |




รูปที่ 1 แสดงปริมาณเอทธานอลเมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ต่าง ๆ ในการหมักซูโครสที่เพิ่มอาหารเสริม แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม/ลิตร ยีสต์เอกซ์แทรก 0.4 กรัม/ลิตร pH 4.5 วัดปริมาณเอทธานอลภายหลังการหมัก 7 วัน เมื่อใช้ปริมาณซูโครส 20 กรัม% 100 rpm 26 °ซ., 25 กรัม% 80 rpm 26 °ซ. และ 25 กรัม% 80 rpm 28 °ซ.

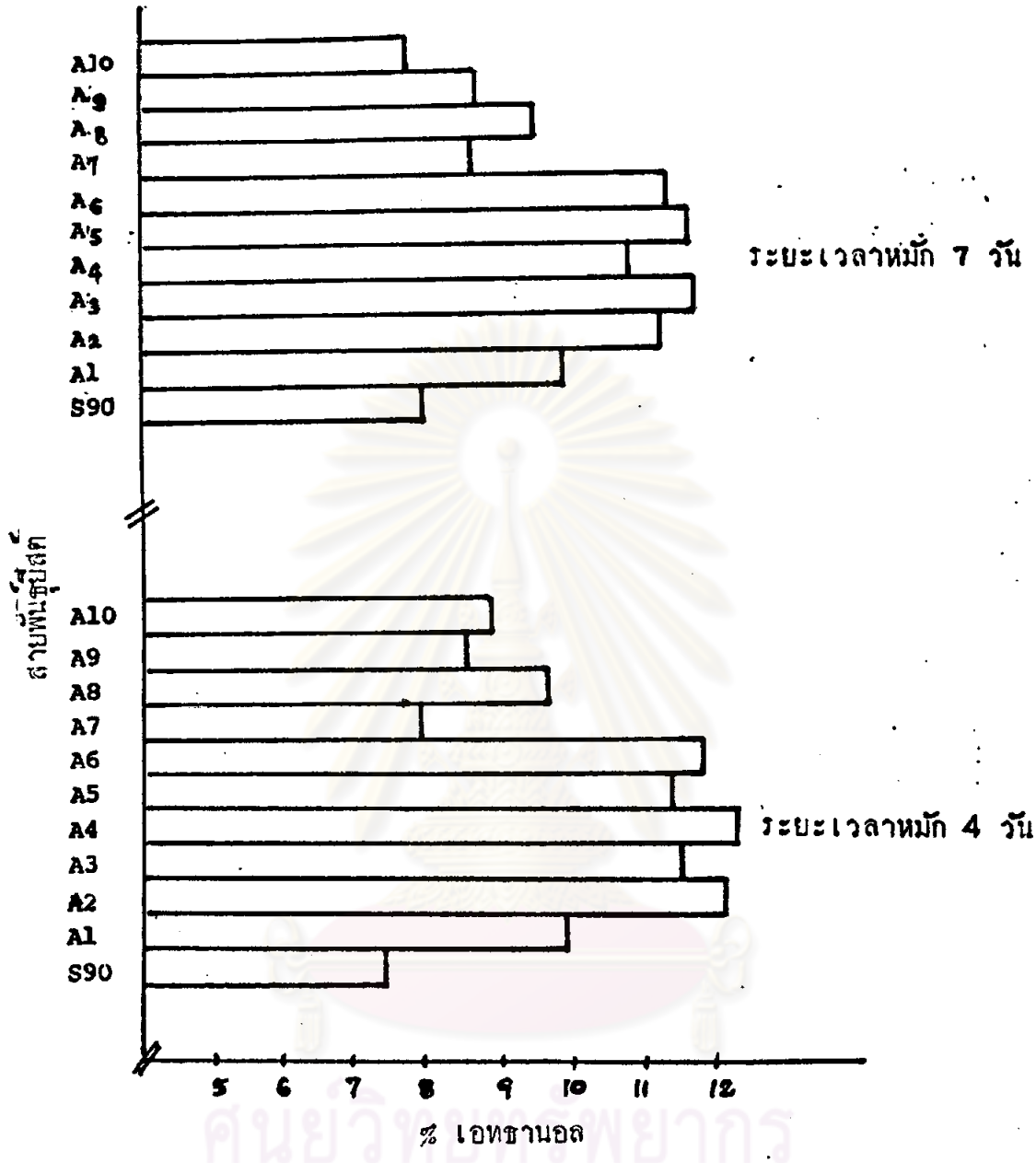
4.1.2 ใช้น้ำอ้อยและเพิ่มอาหารเสริม

ยีสต์ที่ให้ปริมาณเอทธานอลสูงจากการหมักน้ำตาลซูโครส 25 กรัม% จำนวน 10 สายพันธุ์ คือ $A_1$ $A_2$ $A_3$ $A_4$ $A_5$ $A_6$ $A_7$ $A_8$ $A_9$ $A_{10}$ และสายพันธุ์มาตรฐาน $S_{90}$ นำมาใช้หมักน้ำอ้อยที่เพิ่มอาหารเสริม ผลการคัดเชื้อยีสต์ที่ให้ปริมาณเอทธานอลสูง ได้แก่ ยีสต์สายพันธุ์ $A_2$ $A_3$ $A_4$ $A_5$ และ $A_6$ ดังแสดงผลการวัดปริมาณเอทธานอลภายหลังการหมักได้ 4 และ 7 วัน ในรูปที่ 2 หน้า 39 โดยที่ระยะเวลาหมัก 4 วัน สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถหมักเอทธานอลได้สูงสุดคือ $A_4$ หมักได้ 12.15% และที่ระยะเวลาหมัก 7 วัน สายพันธุ์ยีสต์ที่หมักให้เอทธานอลสูงสุด คือ $A_3$ ซึ่งหมักได้ 11.55%

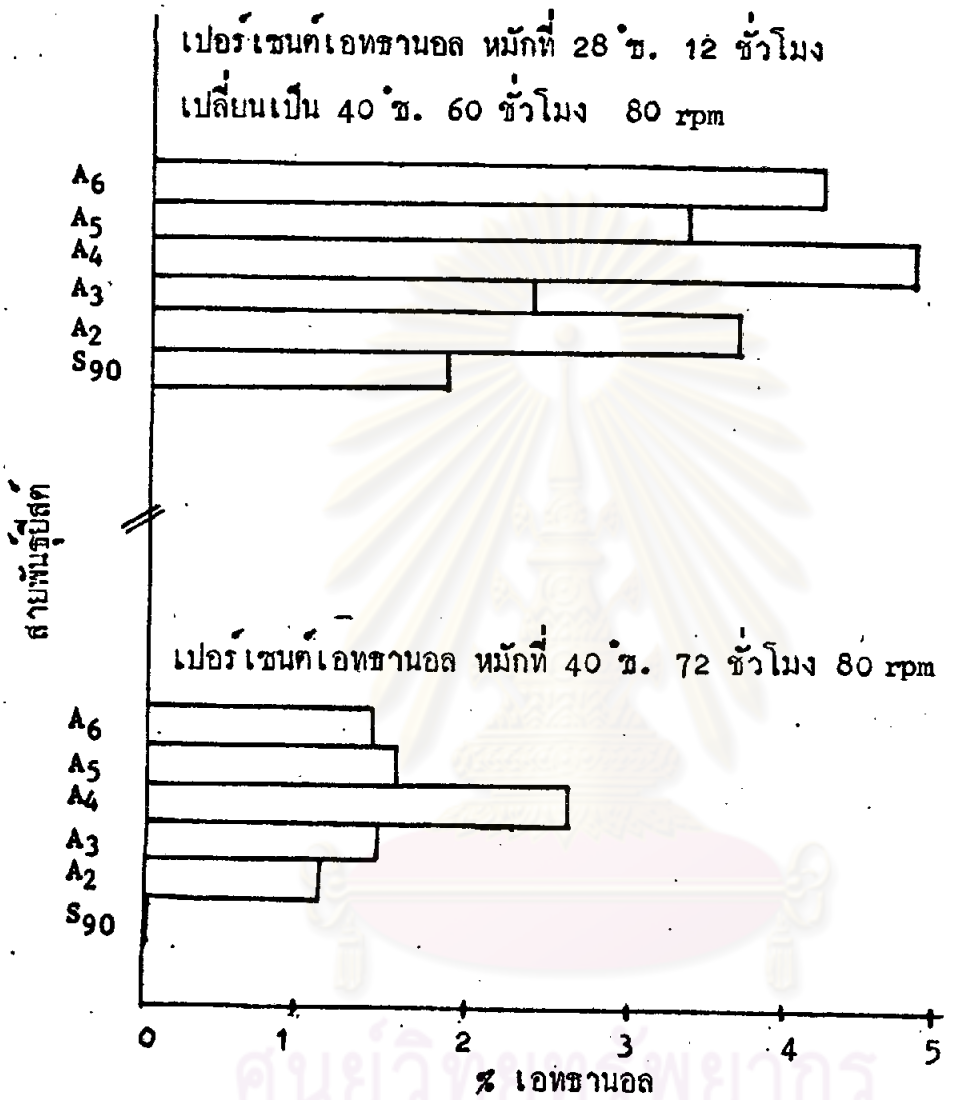
4.2 ผลการคัดสายพันธุ์ยีสต์โดยใช้อุณหภูมิ

ผลการเปรียบเทียบการหมักเอทธานอลจากน้ำอ้อยโดยยีสต์สายพันธุ์ $A_2$ $A_3$ $A_4$ $A_5$ $A_6$ และ $S_{90}$ โดยเขย่าด้วยความเร็ว 80 rmp ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. 12 ชั่วโมงและปรับอุณหภูมิเป็น 40 °ซ. วัดปริมาณเอทธานอลเมื่อสิ้นสุดการหมัก 72 ชั่วโมง ผลปรากฏว่ายีสต์สายพันธุ์ $A_4$ และ $A_6$ สามารถให้เปอร์เซนต์เอทธานอลได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น คือ $A_4$ หมักได้ 4.8% $A_6$ หมักได้ 4.25% และ $S_{90}$ ซึ่งเป็นสายพันธุ์มาตรฐานหมักได้ 1.92%

ส่วนผลการคัดสายพันธุ์ยีสต์โดยใช้อุณหภูมิ 40 °ซ. หมักน้ำอ้อยเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลปรากฏว่ายีสต์สายพันธุ์ $A_4$ สามารถให้เปอร์เซนต์เอทธานอลได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น หมักได้สูง 2.7% ในขณะที่สายพันธุ์ $A_2$ $A_3$ $A_5$ $A_6$ ให้เปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 1.12% 1.45% 1.56% และ 1.45% ตามลำดับ ส่วนยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ เมื่อหมักโดยใช้อุณหภูมิ 40 °ซ. ตลอดเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าไม่สามารถวัดปริมาณเอทธานอลได้ ดังแสดงผลในรูปที่ 3 หน้า 40




รูปที่ 2 แสดงผลของสายพันธุ์ยีสต์ คัดโดยใช้น้ำอ้อย (20.2 °บริกซ์) ต่อปริมาณเปอร์เซนต์เอทธานอล เมื่อเพิ่มอาหารเสริมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม ยีสต์เอกซ์แทรก 0.4 กรัม ในน้ำอ้อย 1 ลิตร ที่ pH 4.5 ปรับการหมุนที่ 80 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. หมักเป็นเวลา 4 และ 7 วัน




รูปที่ 3 แสดงผลการคัดเชื้อยีสต์โดยใช้อุณหภูมิ 28 °ซ. เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วปรับอุณหภูมิเป็น 40 °ซ. 60 ชั่วโมง กับโดยใช้อุณหภูมิ 40 °ซ. เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วัดปริมาณเอทธานอลที่ได้จากการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยการหมักน้ำอ้อยและเพิ่มอาหารเสริม pH 4.5 ปรับการหมุนที่ 80 rpm

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 5. ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือก

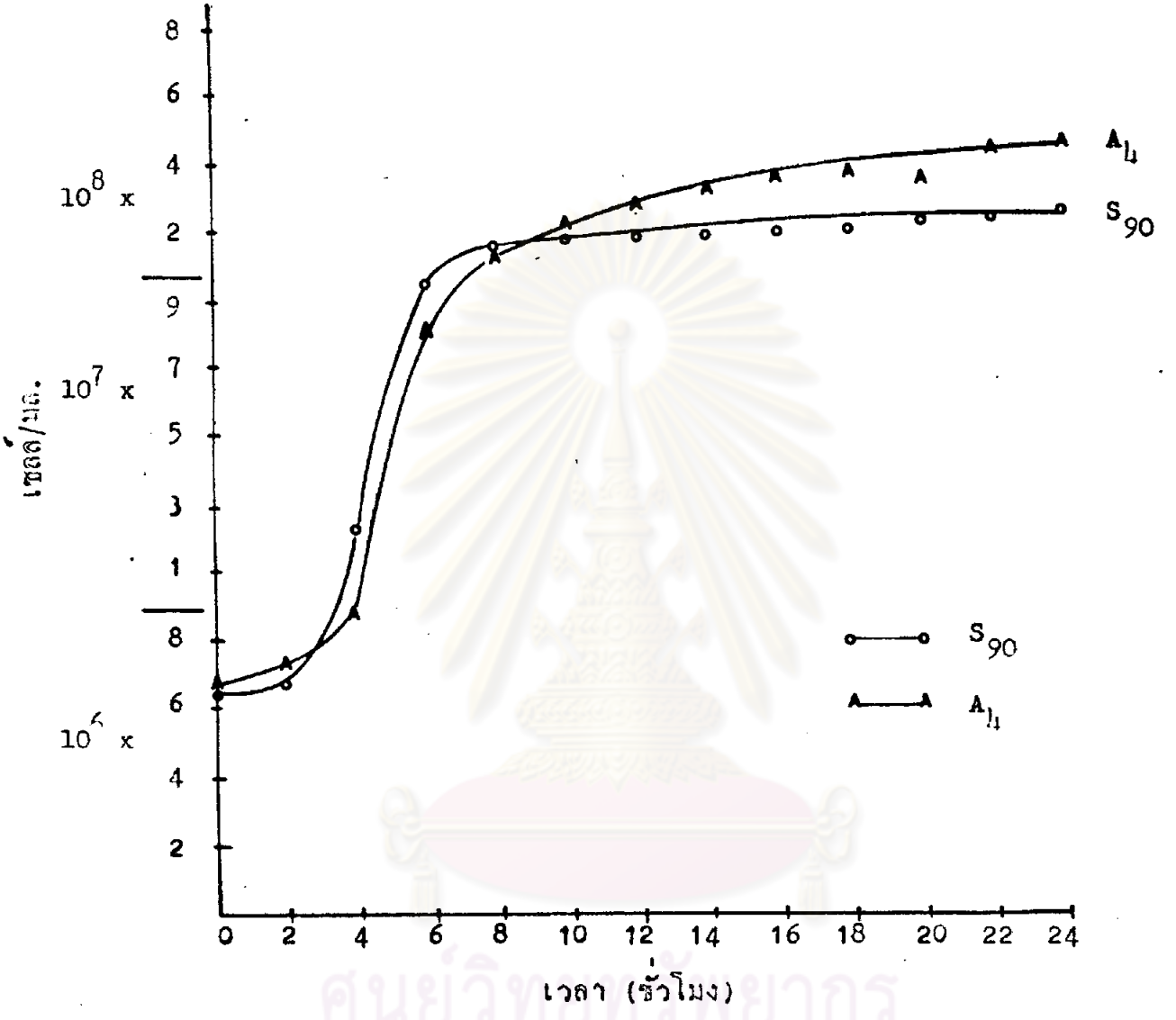
5.1 ผลการศึกษาอัตราการเจริญโดยปกติ (normal growth rate) ของยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ โดยการเขย่าที่ 150 rmp ในชั่วโมงที่ 6 จะเป็นช่วงที่ยีสต์กำลังแบ่งตัวได้ดีที่สุด คือ วัดค่า OD ที่ $\lambda$= 525 nm. อ่านค่า OD ได้เพิ่มสูงขึ้นจาก 1.56 เป็น 2.4 ในสายพันธุ์ $S_{90}$ และค่า OD เพิ่มจาก 1.8 เป็น 2.8 ในสายพันธุ์ $A_4$ หรือจากการนับจำนวนเซลล์/มล. จะเพิ่มจาก $5.6 \times 10^7$ เซลล์ไปเป็น $9.7 \times 10^7$ เซลล์ และจาก $1.02 \times 10^7$ เซลล์ไปเป็น $8.1 \times 10^7$ เซลล์ ในสายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ ตามลำดับ และในชั่วโมงที่ 9 จะเป็นช่วงที่ยีสต์เริ่มเข้าสู่ stationary phase คือ เป็นช่วงที่ยีสต์เพิ่มปริมาณเซลล์ใกล้จะสูงสุด โดยนับจำนวนเซลล์ของยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ ได้ $1.78 \times 10^8$ เซลล์/มล. หลังจากนี้ในชั่วโมงต่อ ๆ ไป เช่น ในชั่วโมงที่ 10 11 และ 12 จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อย คือ เพิ่มจาก $1.78 \times 10^8$ เซลล์/มล. เป็น 1.865 1.869 และ 1.875 เซลล์/มล. ตามลำดับ และในยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ ก็เช่นเดียวกัน ในชั่วโมงที่ 9 นับจำนวนเซลล์ได้ $2.01 \times 10^8$ ชั่วโมงที่ 10 11 และ 12 นับจำนวนเซลล์ได้ 2.29, 2.63 และ 2.84 เซลล์/มล. ตามลำดับ ดังผลในตารางที่ 4 หน้า 42 ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการเจริญเติบโตใกล้เคียงกัน คือ เมื่อเลี้ยงได้ประมาณ 2 ชั่วโมง ยีสต์จะเริ่มเข้าสู่ log phase ชั่วโมงที่ 6 เป็นช่วงที่เซลล์ยีสต์กำลังแบ่งตัว (active) ได้ดีที่สุด และประมาณชั่วโมงที่ 9 จะเริ่มมีการเจริญคงที่เข้าสู่ stationary phase ตามลำดับ รายละเอียดแสดงผลในรูปที่ 4 หน้า 43 ซึ่งจะแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์/มล. กับเวลา และรูปที่ 5 หน้า 44 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์/มล. กับค่า OD

5.2 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ โดยการหมุนที่ 60 rpm วัดปริมาณเอทธานอลทุก 12 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าชั่วโมงที่ 60 เป็นช่วงที่เหมาะในการสร้างเอทธานอลได้สูงสุด โดยชั่วโมงที่ 60 วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 1.81 และ 4.8% ในขณะที่ชั่วโมงที่ 48 วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 0.75%

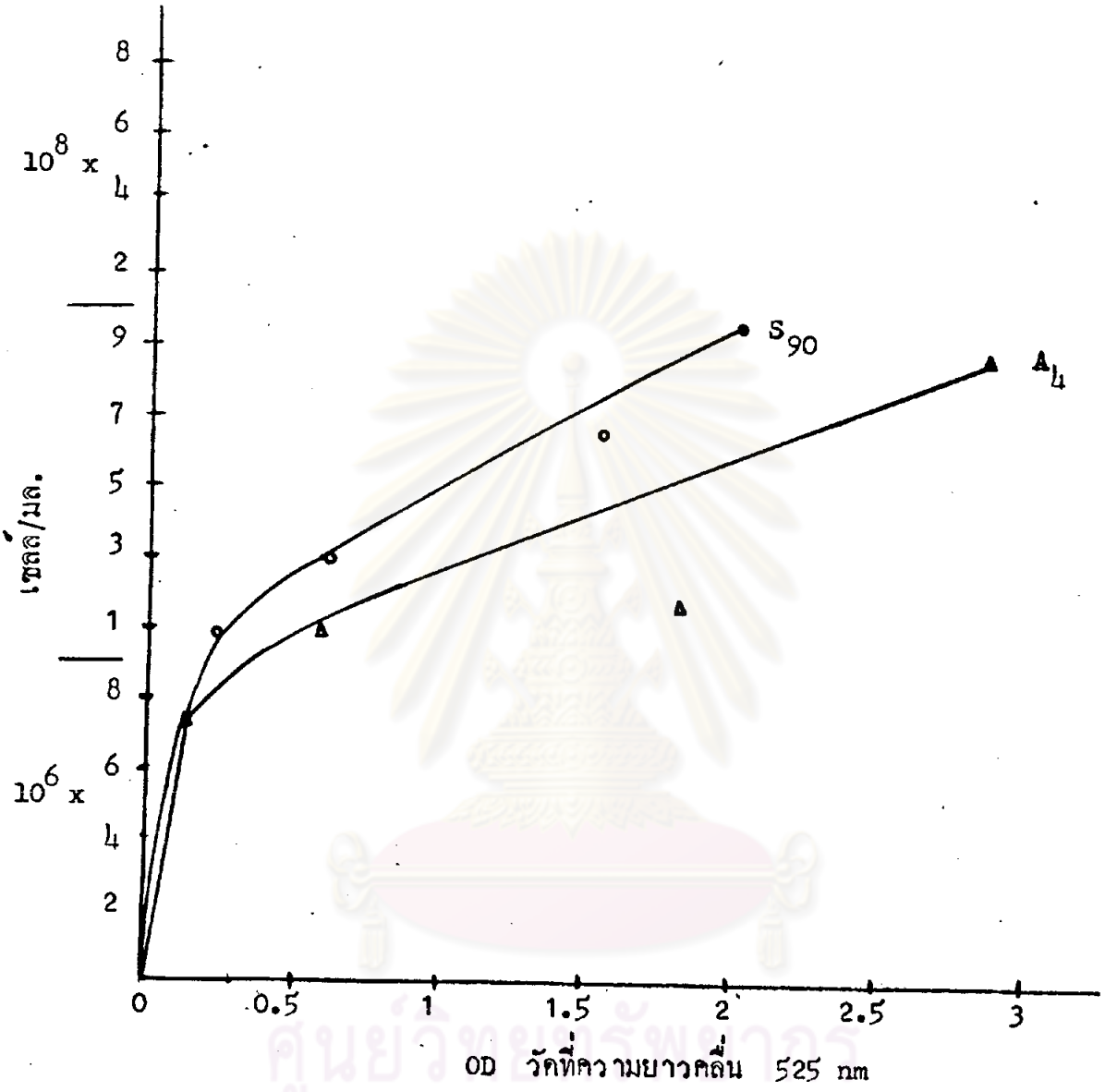
ตารางที่ 4 แสดงอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเชื้อยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ และ $A_{44}$ ในอาหารเหลว YM pH 6 ปรับการหมุนที่ 150 rpm ที่อุณหภูมิห้อง วัดการเจริญโดยวัดความขุ่น (OD) ที่ความยาวคลื่น 525 nm และนับจำนวนเซลล์/มล.

| ชั่วโมงที่ | เชื้อยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ | | เชื้อยีสต์สายพันธุ์ $A_{44}$ | |
|---|---|---|---|---|
| | OD | จำนวนเซลล์/มล. | OD | จำนวนเซลล์/มล. |
| 0 | 0.1 | $6.425 \times 10^6$ | 0.1 | $6.7 \times 10^6$ |
| 1 | 0.11 | $6.575 \times 10^6$ | 0.1 | $7.15 \times 10^6$ |
| 2 | 0.14 | $6.975 \times 10^6$ | 0.1 | $7.55 \times 10^6$ |
| 3 | 0.207 | $1.070 \times 10^7$ | 0.152 | $8.10 \times 10^6$ |
| 4 | 0.58 | $2.390 \times 10^7$ | 0.677 | $8.75 \times 10^6$ |
| 5 | 1.56 | $5.6 \times 10^7$ | 1.875 | $1.02 \times 10^7$ |
| 6 | 2.497 | $9.71 \times 10^7$ | 2.895 | $8.15 \times 10^7$ |
| 7 | 3.265 | $1.42 \times 10^8$ | 4.075 | $1.01 \times 10^8$ |
| 8 | 3.575 | $1.65 \times 10^8$ | 4.275 | $1.34 \times 10^8$ |
| 9 | 3.71 | $1.78 \times 10^8$ | 4.425 | $2.01 \times 10^8$ |
| 10 | 4.10 | $1.865 \times 10^8$ | 4.535 | $2.29 \times 10^8$ |
| 11 | 4.125 | $1.869 \times 10^8$ | 4.6 | $2.63 \times 10^8$ |
| 12 | 4.25 | $1.875 \times 10^8$ | 4.65 | $2.84 \times 10^8$ |
| 13 | 4.375 | $1.88 \times 10^8$ | 4.745 | $2.89 \times 10^8$ |
| 14 | 4.5 | $1.892 \times 10^8$ | 4.875 | $3.06 \times 10^8$ |
| 15 | 4.7 | $1.899 \times 10^8$ | 5.0 | $3.21 \times 10^8$ |
| 16 | 4.75 | $1.90 \times 10^8$ | 5.085 | $3.34 \times 10^8$ |
| 17 | 4.75 | $1.92 \times 10^8$ | 5.155 | $3.38 \times 10^8$ |
| 18 | 4.825 | $1.932 \times 10^8$ | 5.185 | $3.51 \times 10^8$ |
| 19 | 5.07 | $1.96 \times 10^8$ | 5.22 | $3.55 \times 10^8$ |
| 20 | 5.10 | $2.11 \times 10^8$ | 5.225 | $3.63 \times 10^8$ |
| 21 | 5.11 | $2.14 \times 10^8$ | 5.525 | $3.66 \times 10^8$ |
| 22 | 5.11 | $2.24 \times 10^8$ | 5.525 | $4.04 \times 10^8$ |
| 23 | 5.125 | $2.242 \times 10^8$ | 5.54 | $4.46 \times 10^8$ |
| 24 | 5.125 | $2.58 \times 10^8$ | 5.549 | $4.68 \times 10^8$ |

หมายเหตุ ทำ dilution ตั้งแต่ค่า OD 0.6




รูปที่ 4 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ $S_{90}$ กับ $A_{l_4}$ ในอาหารเหลว YM มี pH 6 จำนวนรอบการหมุน 150 rpm ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. นับจำนวนเซลล์/มิลลิลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมง




รูปที่ 5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์/มล. กับค่า OD วัดที่ความยาวคลื่น 525 nm. ของยีสต์ $S_{90}$ กับ $A_4$ ในอาหารเหลว YM มี pH 6 จำนวนรอบการหมุน 150 rpm. ที่อุณหภูมิ 28 °ซ.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

และ 3.0% ของยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ และ $A_4$ ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 72 เปอร์เซนต์เอทธานอลเพิ่มสูงขึ้นจากชั่วโมงที่ 60 แต่ปริมาณที่เพิ่มขึ้นไม่มากเท่ากับเปอร์เซนต์เอทธานอลที่ชั่วโมงที่ 60 เพิ่มจากชั่วโมงที่ 48 รายละเอียดดังแสดงผลในตารางที่ 5 หน้า 46

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ โดยการหมุนที่ 80 rpm วัดปริมาณเอทธานอลทุก 12 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าชั่วโมงที่ 12 $S_{90}$ วัดปริมาณเอทธานอลได้ 6.47% และปริมาณเอทธานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน ยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ เริ่มวัดปริมาณเอทธานอลได้ 2.24% ในชั่วโมงที่ 12 และปริมาณเอทธานอลเพิ่มขึ้นเป็นลำดับเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ในชั่วโมงที่ 72 ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ วัดปริมาณเอทธานอลที่หมักได้ 9.4% และ 6.43% ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 6 หน้า 47

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ โดยใช้น้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ปริมาณเอทธานอลที่เกิดจากการหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ ในชั่วโมงที่ 72 วัดได้ 7.05% และ 6.2% ตามลำดับ ดังแสดงผลในตารางที่ 7 หน้า 48

ในรูปที่ 6 หน้า 49 จะแสดงผลการเปรียบเทียบเปอร์เซนต์เอทธานอลที่เกิดจากการหมักโดยยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ เมื่อใช้น้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และจำนวนรอบการหมุนต่างกัน และรูป 6–1 หน้า 50 แสดงความสัมพันธ์การเกิดเอทธานอลและการเจริญเติบโตของยีสต์ในช่วงเวลาเดียวกัน

6. ศึกษาการเปลี่ยนสภาพอาหาร

6.1 ผลการศึกษาสภาพความเป็นกรดที่เหมาะสม เมื่อปรับสภาพอาหารให้มีระดับความเป็นกรดต่าง ๆ กัน ปรากฏว่ายีสต์สายพันธุ์ $A_4$ จะให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงสุดที่อาหารที่มีความเป็นกรด pH = 4 คือวัดได้ 9.87% และที่ pH 3.5, 4.5, 5 และ 5.5 เปอร์เซนต์เอทธานอลที่ได้จะลดลง คือ วัดได้ 8.5% 8.87% 5.57% และ

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณเอทธานอลที่เกิดทุก 12 ชั่วโมง ในระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง เมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ หมักน้ำอ้อยที่มีปริมาณน้ำตาล 20.2 °บริกซ์ และอาหารเสริมตามสูตร 3 ปรับความเป็นกรดที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 28 °ซ. จำนวนรอบการหมุน 60 rpm

| ชั่วโมงที่ | ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ | | ยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ | |
|---|---|---|---|---|
| | น้ำอ้อย (°บริกซ์) | % เอทธานอล | น้ำอ้อย (°บริกซ์) | % เอทธานอล |
| 12 | 18.4 | — | 18.6 | — |
| 24 | 18.4 | — | 17.0 | 0.65 |
| 36 | 18.4 | — | 16.0 | 1.9 |
| 48 | 17.8 | 0.75 | 14.8 | 3.0 |
| 60 | 15.8 | 1.81 | 12.6 | 4.8 |
| 72 | 14.0 | 3.0 | 10.8 | 5.6 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงปริมาณเอทธานอลที่เกิดจากการหมักทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ หมักน้ำอ้อยที่มีปริมาณน้ำตาล 20.2 °บริกซ์ เพิ่มอาหารเสริมตามสูตร 3 ปรับความเป็นกรดที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 28 °ซ. จำนวนรอบการหมุน 80 rpm.

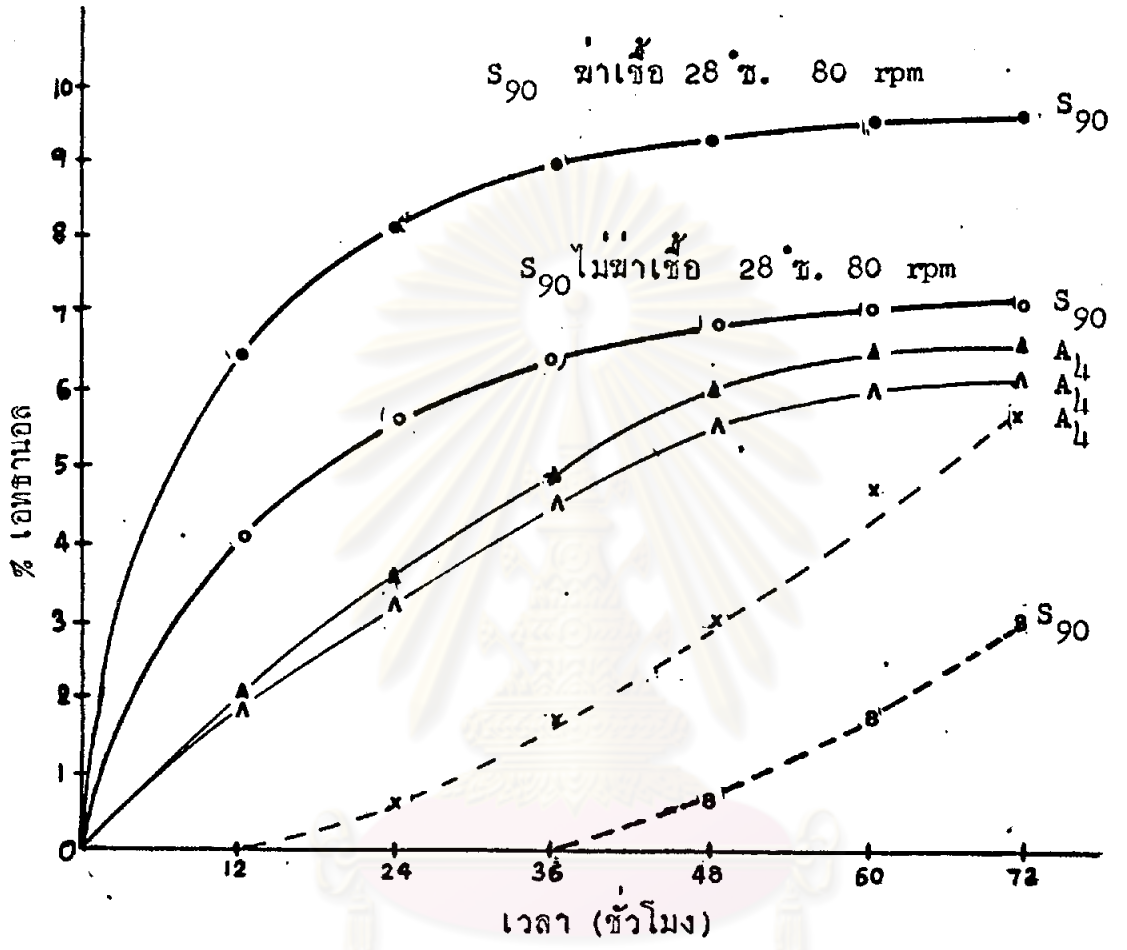
| ชั่วโมงที่ | ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ | | ยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ | |
|---|---|---|---|---|
| | น้ำอ้อย (°บริกซ์) | % เอทธานอล | น้ำอ้อย (°บริกซ์) | % เอทธานอล |
| 12 | 10 | 6.47 | 15.0 | 2.24 |
| 24 | 8.1 | 8.15 | 13.5 | 3.43 |
| 36 | 7.4 | 8.85 | 12.2 | 4.7 |
| 48 | 7.0 | 9.2 | 11.7 | 6.0 |
| 60 | 6.9 | 9.37 | 10.7 | 6.38 |
| 72 | 6.9 | 9.4 | 10.7 | 6.43 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงปริมาณเอทธานอลที่เกิดจากการหมักทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อใช้ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ หมักน้ำอ้อยที่มีปริมาณน้ำตาล 20.2 °บริกซ์ ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพิ่มอาหารเสริมตามสูตร 3 ปรับความเป็นกรดที่ pH 4.5 อุณหภูมิ 28 °ซ. จำนวนรอบการหมุน 80 rpm

| ชั่วโมงที่ | ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ | | ยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ | |
|---|---|---|---|---|
| | น้ำอ้อย (°บริกซ์) | % เอทธานอล | น้ำอ้อย (°บริกซ์) | % เอทธานอล |
| 12 | 14.0 | 4.05 | 16.0 | 2.19 |
| 24 | 12.8 | 5.62 | 15.1 | 3.23 |
| 36 | 11.7 | 6.33 | 13.5 | 4.5 |
| 48 | 11.4 | 6.68 | 12.5 | 5.7 |
| 60 | 11.0 | 6.88 | 11.8 | 5.95 |
| 72 | 10.7 | 7.05 | 11.3 | 6.2 |

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

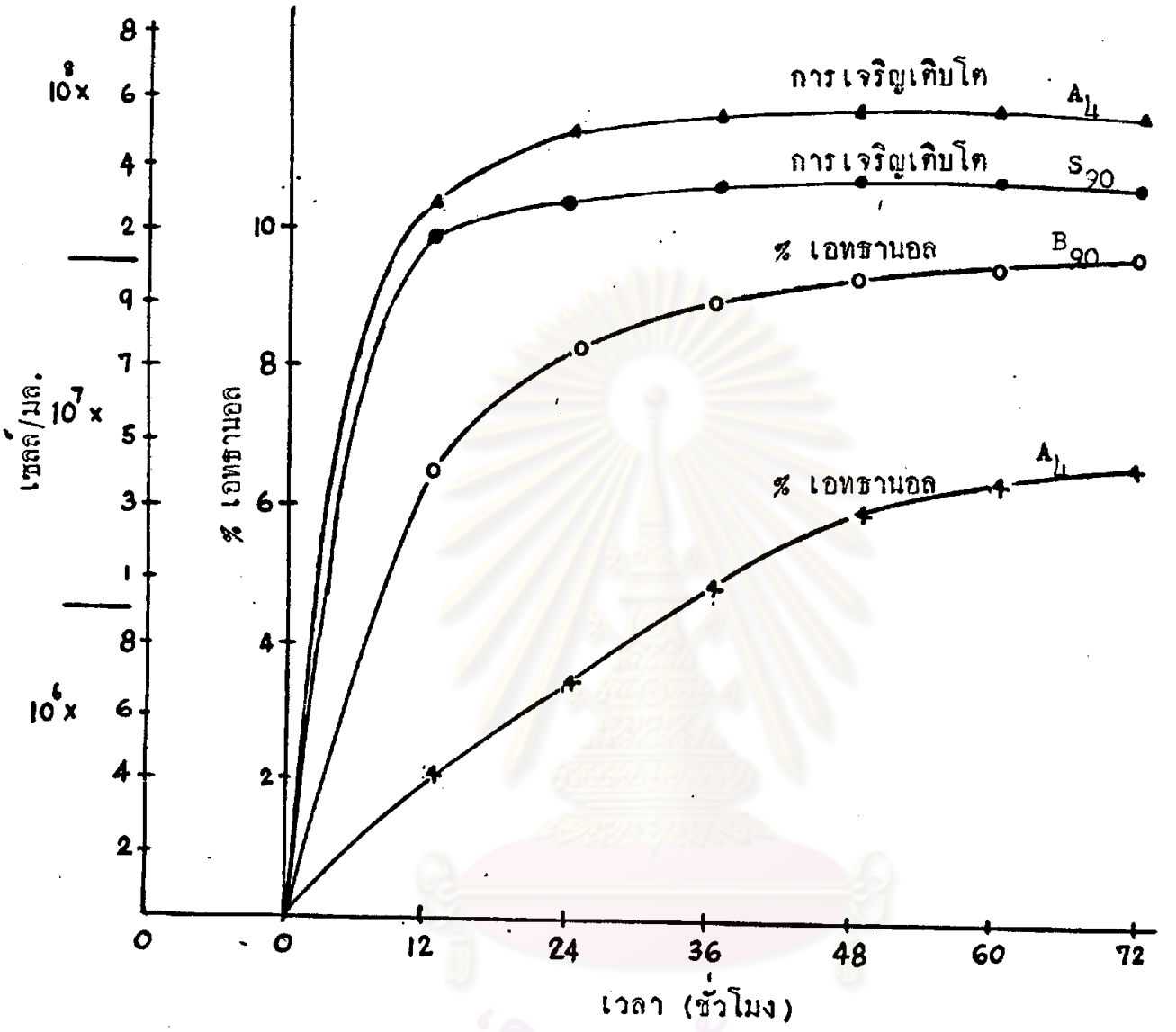



รูปที่ 6 แสดงเปอร์เซนต์เอทธานอลที่เกิดจากหมักน้ำอ้อย 20.2°บริกซ์ เพิ่มอาหารเสริม pH 4.5 อุณหภูมิ 28 °ซ. เปรียบเทียบในน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และจำนวนรอบการหมุนต่างกัน

$S_{90}$ e---e น้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 28 °ซ., 60 rpm. x---x $A_4$

●——● น้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 28 °ซ., 80 rpm. Δ——Δ

o——o น้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ 28 °ซ., 80 rpm. Λ——Λ




รูปที่ 6–1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญเติบโตของยีสต์ $S_{90}$ และ $A_4$ กับเปอร์เซนต์เอทธานอลที่เกิดจากการหมักน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพิ่มอาหารเสริมตามสูตร 3 อุณหภูมิ 28°ซ. จำนวนรอบการหมุน 80 rpm

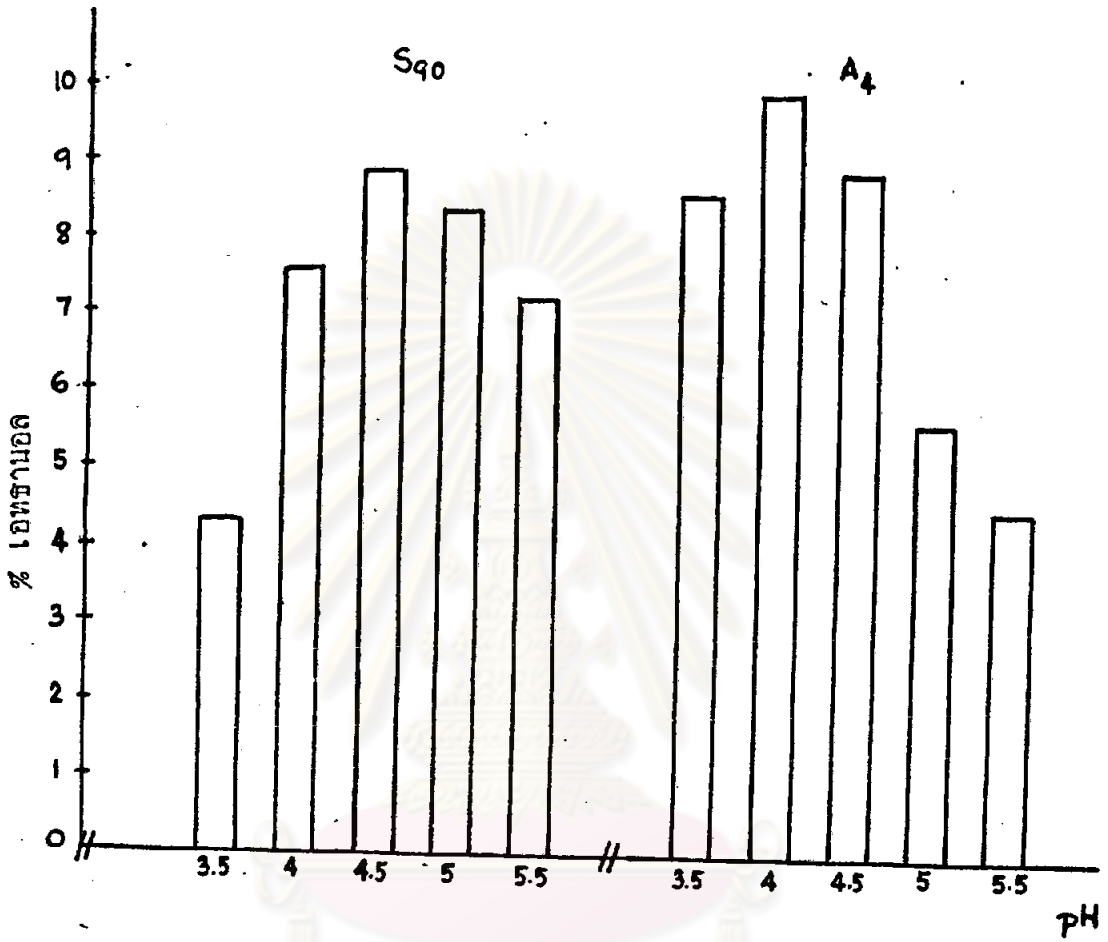
$S_{90}$ ● อัตราการเจริญเติบโต ▲ $A_4$

$S_{90}$ ○ เปอร์เซนต์เอทธานอล + $A_4$

4.45% ตามลำดับ โดยที่ pH 5.5 จะให้เปอร์เซนต์เอทธานอลต่ำสุด แต่ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ ให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงสุดที่ pH = 4.5 วัดได้ 8.9% ที่ pH 3.5 4 5 5.5 วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 4.3% 7.06% 8.35% และ 7.27% ตามลำดับ โดยที่ pH 3.5 จะให้เปอร์เซนต์เอทธานอลต่ำสุด แสดงผลการเปรียบเทียบระหว่างการหมักโดยยีสต์สองสายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ ในรูปที่ 7 หน้า 52

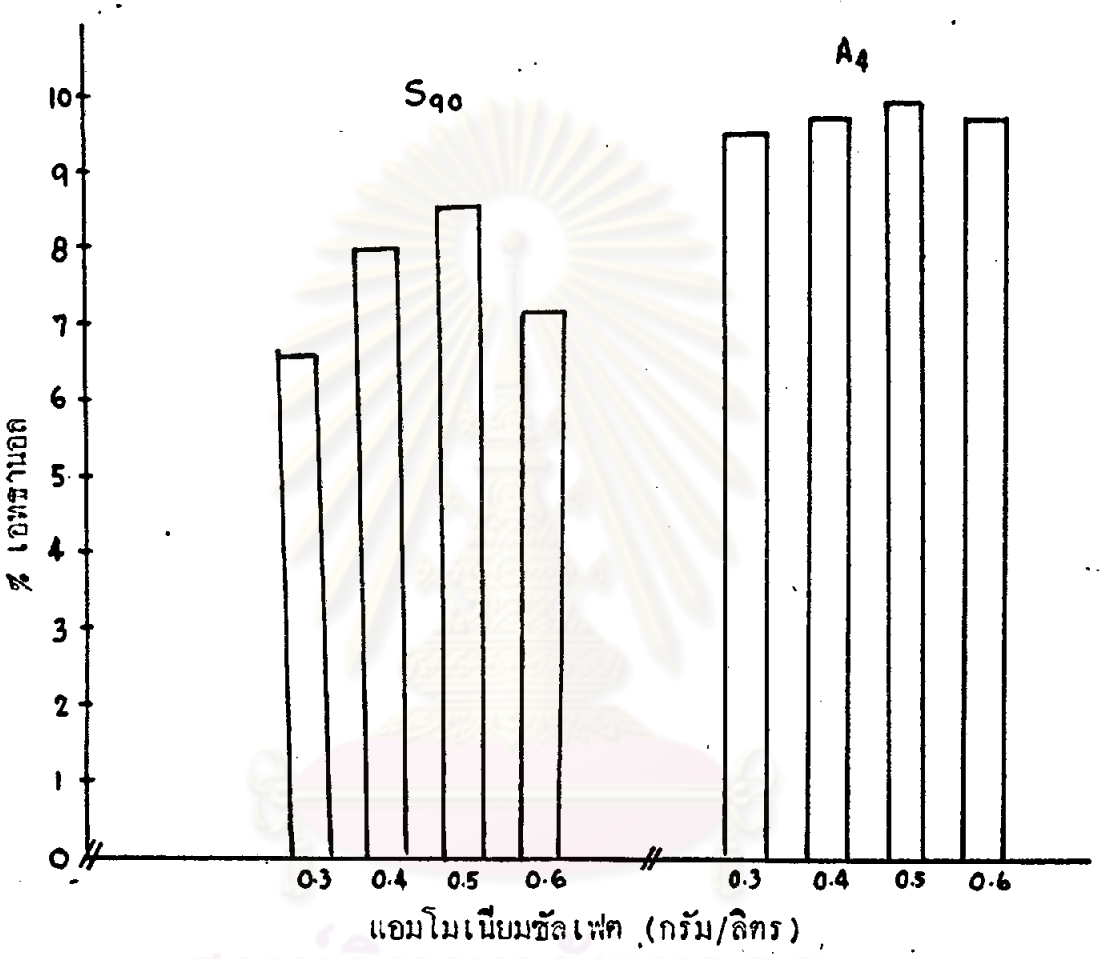
6.2 ผลการศึกษาของปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการหมักเอทธานอล คือ ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับสายพันธุ์ $A_4$ ให้ผลเช่นเดียวกัน คือ หมักน้ำอ้อยที่ 20.6 °บริกซ์ เพิ่มอาหารเสริมแอมโมเนียมซัลเฟตจำนวน 0.5 กรัม/ลิตร ปรับความเป็นกรดที่ pH = 4 จะสามารถหมักเอทธานอลได้ปริมาณสูงกว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอื่น รายละเอียดดังแสดงผลในรูปที่ 8 หน้า 53 โดยในสภาพอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 กรัม/ลิตร วัดเอทธานอลที่ 72 ชั่วโมงได้ 6.58% 7.92% 8.41% และ 7.1% ในยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ และวัดเอทธานอลได้ 9.41% 9.49% 9.68% และ 9.54% ในยีสต์สายพันธุ์ $A_4$

6.3 ผลการศึกษาปริมาณยีสต์เอกซ์แทรกที่เหมาะสมต่อการหมักเอทธานอลด้วยน้ำอ้อยของยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ พบว่า การหมักน้ำอ้อยที่ 20.4 °บริกซ์ เพิ่มอาหารเสริมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร เพิ่มโปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม/ลิตร และยีสต์เอกซ์แทรก 0.2 กรัม/ลิตร หรือที่ความเข้มข้นอื่น ๆ คือ 0.4 0.5 และ 0.6 กรัม/ลิตร ก็ไม่มีผลทำให้ปริมาณเอทธานอลแตกต่างกันมาก เมื่อปรับความเป็นกรดที่ pH = 4 หมักที่อุณหภูมิ 28 °ซ. ช่วงการหมักใช้ปรับการหมุนของเครื่องเขย่า 80 rpm วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลภายหลังการหมัก 72 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ อ่านเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 7.07%. 6.83% 6.95% และ 7.04% ส่วนยีสต์ $A_4$ สามารถหมักให้เอทธานอล 8.96% 8.65% 8.65% และ 8.73% ตามลำดับ ดังแสดงผลในรูปที่ 9 หน้า 54

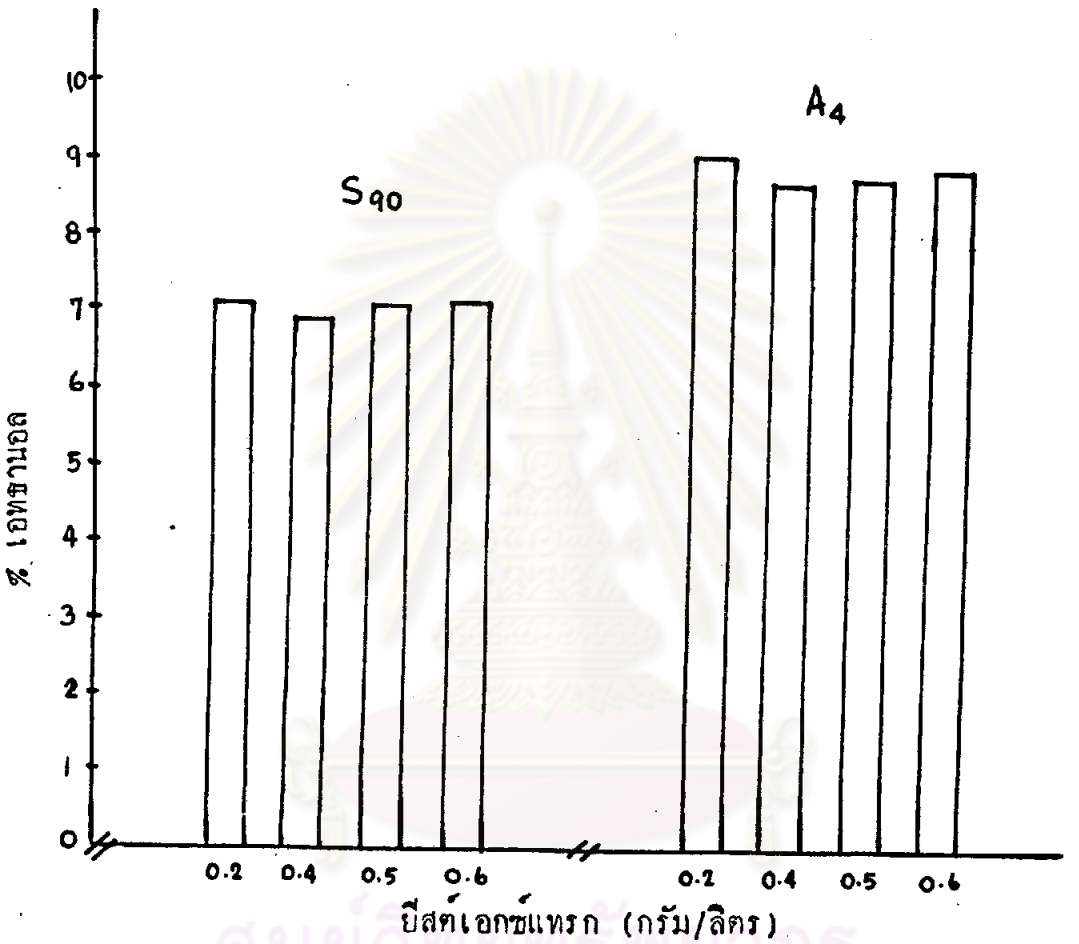



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 แสดงเปอร์เซนต์เอทธานอลที่เกิดจากการหมักของยีสต์ $S_{90}$ กับ $A_4$ ในสภาพอาหารที่มีความเป็นกรดต่างกันคือมี pH 3.5 4 4.5 5 5.5 หมักในน้ำอ้อย 20.6 °บริกซ์ ที่ใส่อาหารเสริมตามสูตร 3 หมักที่อุณหภูมิ 28 °ซ. จำนวนรอบการหมุน 80 rpm




รูปที่ 8 แสดงเปอร์เซนต์เอทธานอลของยีสต์ $S_{90}$ กับ $A_4$ หมักน้ำอ้อย 20.6 °บริกซ์ ที่ใส่อาหารเสริมตามสูตร 3 และปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีความเข้มข้นต่างกันคือ 0.3 0.4 0.5 และ 0.6 กรัม/ลิตร หมักที่อุณหภูมิ 28 °ซ. จำนวนรอบการหมุน 80 rpm ปรับ pH 4




รูปที่ 9 แสดงเปอร์เซนต์เอทธานอลของยีสต์ $S_{90}$ กับ $A_4$ หมักน้ำอ้อย 20.4 °บริกซ์ ที่ใส่อาหารเสริมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม/ลิตร โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม/ลิตร ยีสต์เอกซ์แทรกที่มีความเข้มข้นต่างกัน คือ 0.2 0.4 0.5 และ 0.6 กรัม/ลิตร ปรับ pH 4 หมักที่อุณหภูมิ 28 °ซ. จำนวนรอบการหมุน 80 rpm

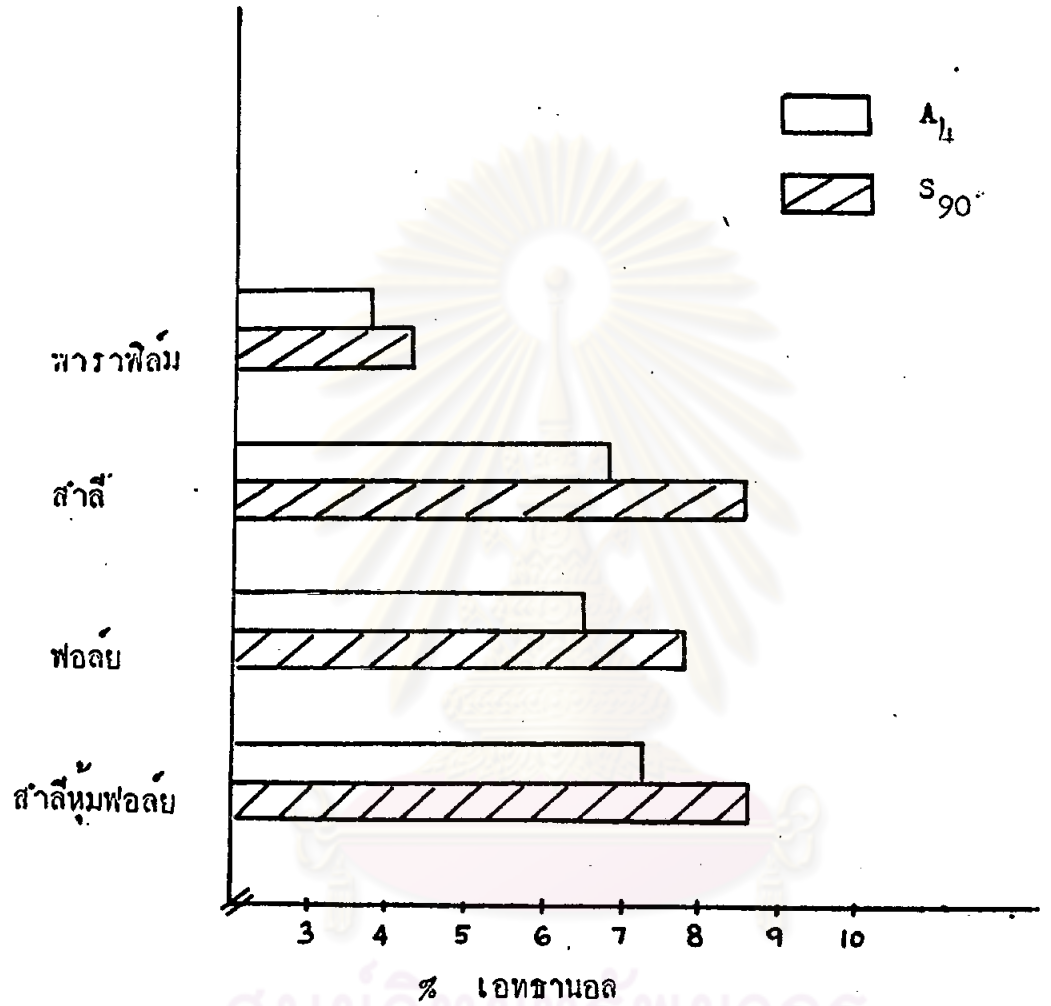
7. ผลการศึกษาผลของอากาศต่อปริมาณเอทธานอลที่เกิดขึ้นโดยการปิดจุกฟลาสด้วยวัสดุต่างกัน ได้ผลว่า

การปิดจุกฟลาสด้วยสำลีหุ้มฟอล์ยจะได้ปริมาณเอทธานอลสูงกว่าการปิดจุกฟลาสด้วยฟอล์ยหรือสำลีเพียงอย่างเดียว หรือปิดจุกฟลาสด้วยวัสดุอื่น คือ ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ หมักเอทธานอลได้ 8.53% เมื่อปิดจุกฟลาสด้วยสำลีหุ้มฟอล์ย ในขณะที่ปิดจุกฟลาสด้วยสำลีอย่างเดียวหรือปิดฟลาสด้วยฟอล์ย และปิดฟลาสด้วยพาราฟิล์ม สามารถวัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 8.49% 7.71% และ 4.33% ตามลำดับ ส่วนยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ เมื่อปิดจุกฟลาสด้วยสำลีหุ้มฟอล์ยวัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้สูงสุด 7.24% ซึ่งสูงกว่าเมื่อปิดจุกฟลาสด้วยวัสดุอื่น ๆ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับสายพันธุ์ $S_{90}$ คือ เมื่อปิดจุกฟลาสด้วยสำลีจะวัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้สูงอันดับรองลงมาคือ 6.73% ปิดจุกฟลาสด้วยฟอล์ยวัดได้ 6.42% และการปิดฟลาสด้วยพาราฟิล์มจะให้เอทธานอลต่ำสุดคือ 3.65% ดังแสดงผลในรูปที่ 10 หน้า 56

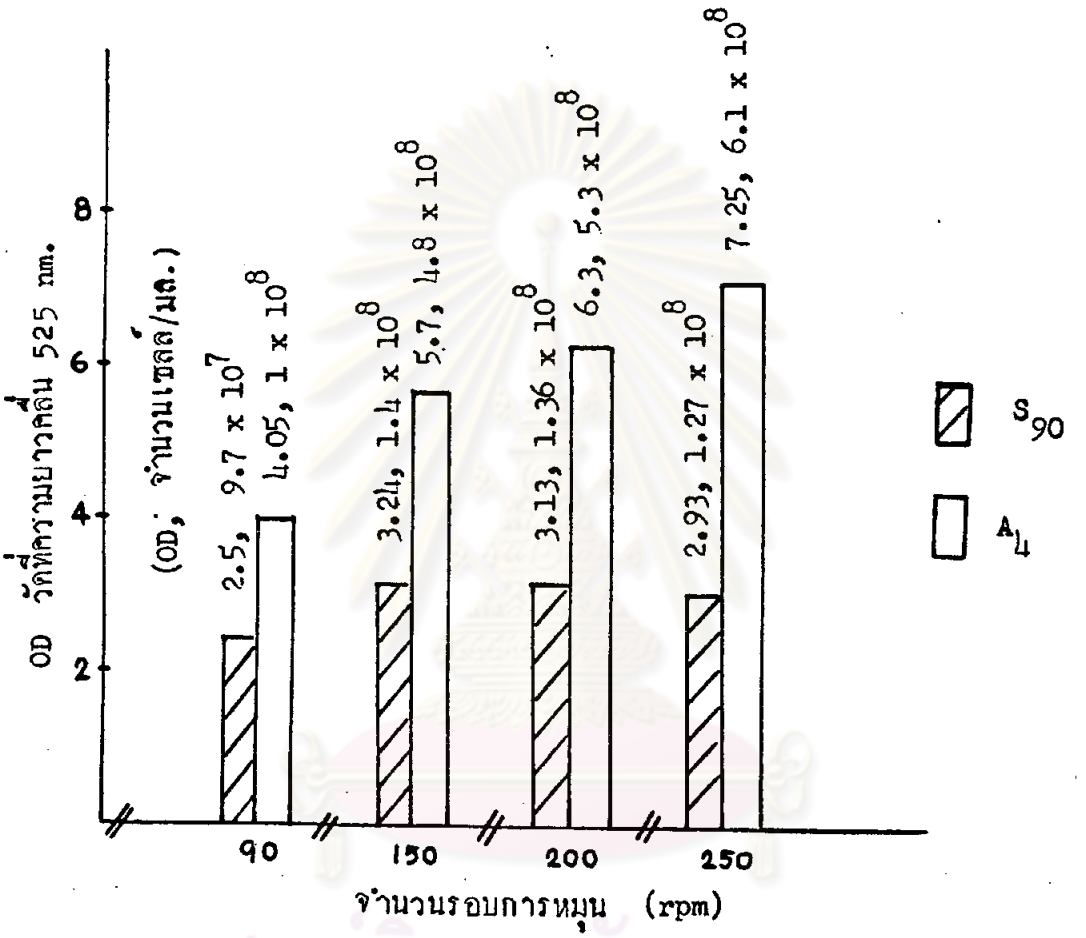
8. ผลการศึกษาจำนวนรอบของการหมุนของเครื่องเขย่าต่ออนาที่ที่เหมาะสม

ในรูปที่ 11 หน้า 57 จะแสดงรายละเอียดให้เห็นว่า เมื่อความเร็วจำนวนรอบการหมุนของเครื่องเขย่าต่างกันเป็น 90 150 200 และ 250 rpm โดยให้หมุนเป็นเวลา 9 ชั่วโมง ผลการวัด OD ที่ความยาวคลื่น 525 nm ปรากฏว่าที่จำนวนรอบการหมุนดังกล่าวข้างต้นอ่านค่า OD ได้ 2.5 3.24 3.13 และ 2.93 ตามลำดับ ในยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ อ่านค่า OD ได้ 4.05 5.7 6.3 และ 7.25 ตามลำดับ ในยีสต์สายพันธุ์ $A_4$

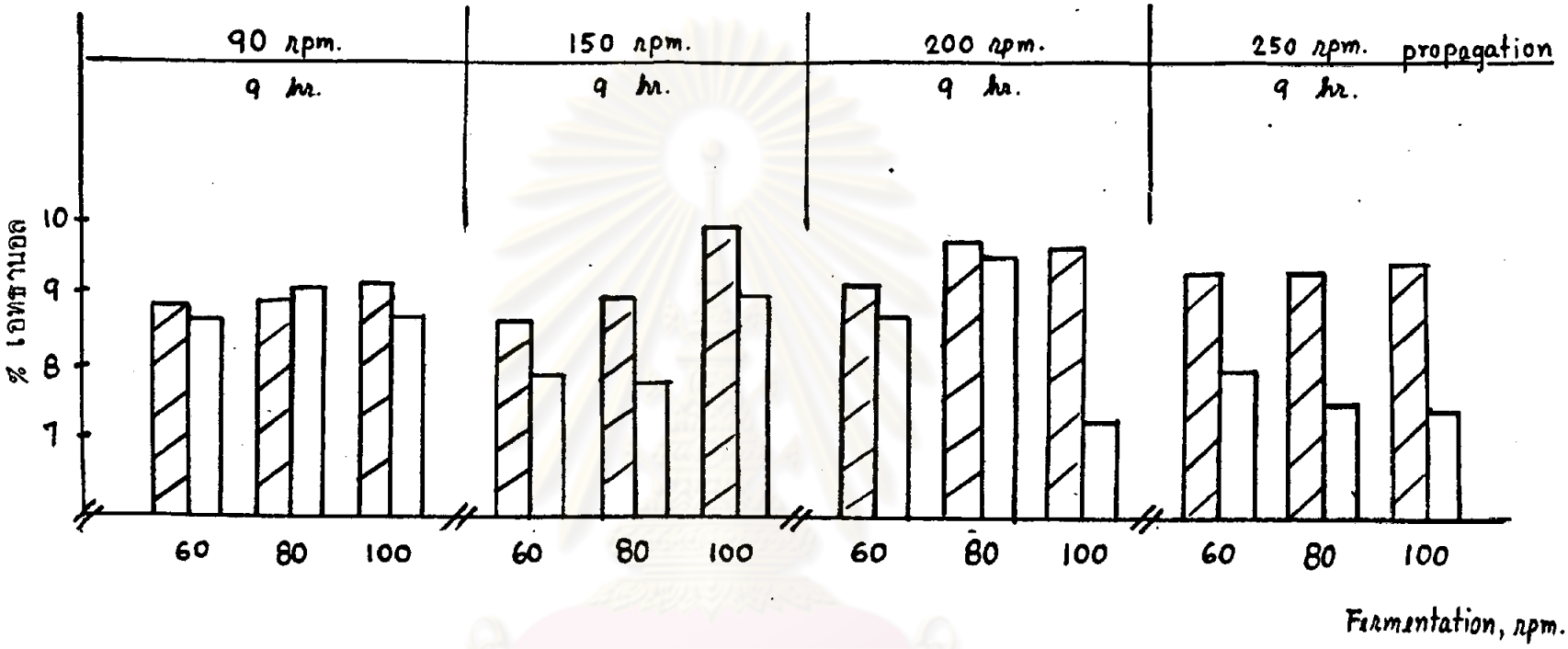
ในรูปที่ 12 หน้า 58 แสดงผลของจำนวนรอบการหมุนของเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 90 150 200 และ 250 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ซึ่งจะเป็นช่วงของการเพิ่มจำนวนเซลล์ (propagation) และเปลี่ยนความเร็วให้เป็น 60 80 และ 100 rpm เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เป็นช่วงของการหมัก (fermentation) พบว่ายีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ จะหมักเอทธานอลได้เปอร์เซนต์สูงสุด 10.08% เมื่อหมุน 150 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ในช่วงของการเพิ่มจำนวนยีสต์ และหมุน 100 rpm เมื่ออยู่ใน




รูปที่ 10 แสดงผลการวัดเปอร์เซนต์เอทธานอลหมักน้ำอ้อย 20.2 บริกซ์ ที่มีสภาพอาหารสมบูรณ์ (ตามสูตร 5) ในระยะเวลาหมัก 72 ชั่วโมง pH 4 ที่อุณหภูมิ 28 °ซ. จำนวนรอบการหมุน 100 rpm เมื่อปิดจุกฟลาสด้วยวัสดุต่าง ๆ กัน




รูปที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบการหมุนต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์/มล. ของยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ ที่อ่านออกมาเป็นค่า OD และจำนวนเซลล์/มล. เมื่อเปลี่ยนค่า OD เป็นค่าจำนวนเซลล์/มล. โดยไดลูชั่น (dilution) จากตารางที่ 4




รูปที่ 12 แสดงผลของจำนวนรอบของการเขย่าต่อการเกิดเอทธานอลด้วยสายพันธุ์ยีสต์ $S_{90}$ กับ $A_4$ ในน้ำอ้อย 20 มิริกซ์ ที่ใส่อาหารเสริมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม โปตัสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.3 กรัม ยีสต์เอกซ์แทรก 0.2 กรัม ในน้ำอ้อย 1 ลิตร ปรับ pH 4 หมักที่อุณหภูมิ 28 °ซ. เมื่อจำนวนรอบการหมุนต่อนาทีในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ (propagation) และช่วงการหมัก (fermentation) ต่าง ๆ กัน

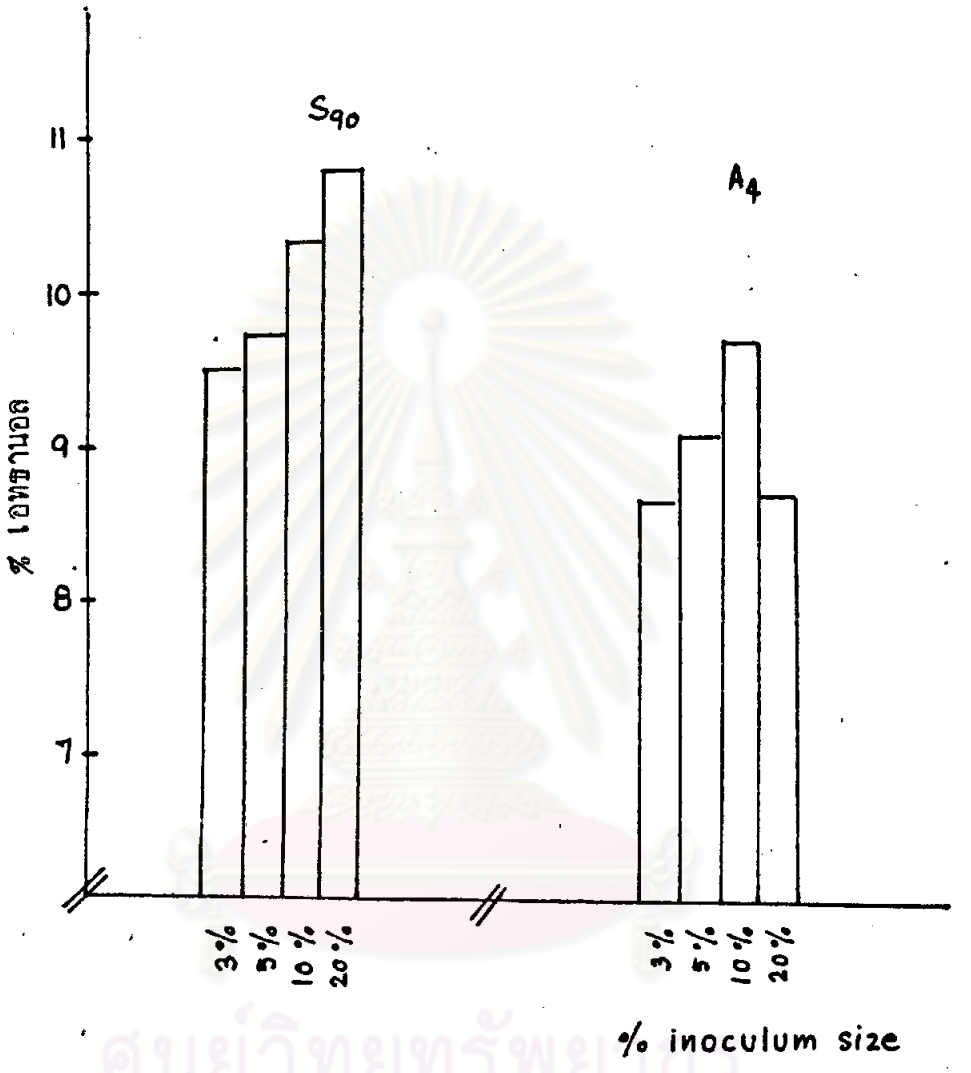
ช่วงของการหมัก ส่วนยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ จะหมักเอทธานอลได้สูงสุด 9.57% เมื่อหมุน 200 rpm เป็นเวลา 9 ชั่วโมง ในช่วงของการเพิ่มจำนวนยีสต์และหมุน 80 rpm ในช่วงของการหมัก ที่ความเร็วจำนวนรอบการหมุน 90 rpm ในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ เมื่อเปลี่ยนความเร็วเป็น 60 80 100 rpm ในช่วงการหมัก พบว่าเปอร์เซนต์เอทธานอลที่เกิดจากการหมักของยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ และ $S_{90}$ มีปริมาณไม่ต่างกันมาก แต่ที่ความเร็วจำนวนรอบการหมุน 250 rpm ในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ แล้วเปลี่ยนความเร็วเป็น 60 80 100 rpm ในช่วงการหมัก เปอร์เซนต์เอทธานอลที่เกิดจากการหมักของยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ มีปริมาณต่างกันเห็นได้ชัด คือ ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ หมักได้มากกว่า 9% ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ หมักได้สูงสุดเพียง 7.97%

9. ผลการศึกษาปริมาณและจำนวนของเชื้อยีสต์ที่ใส่เป็นเชื้อหมัก (inoculum size) ได้ผลว่า

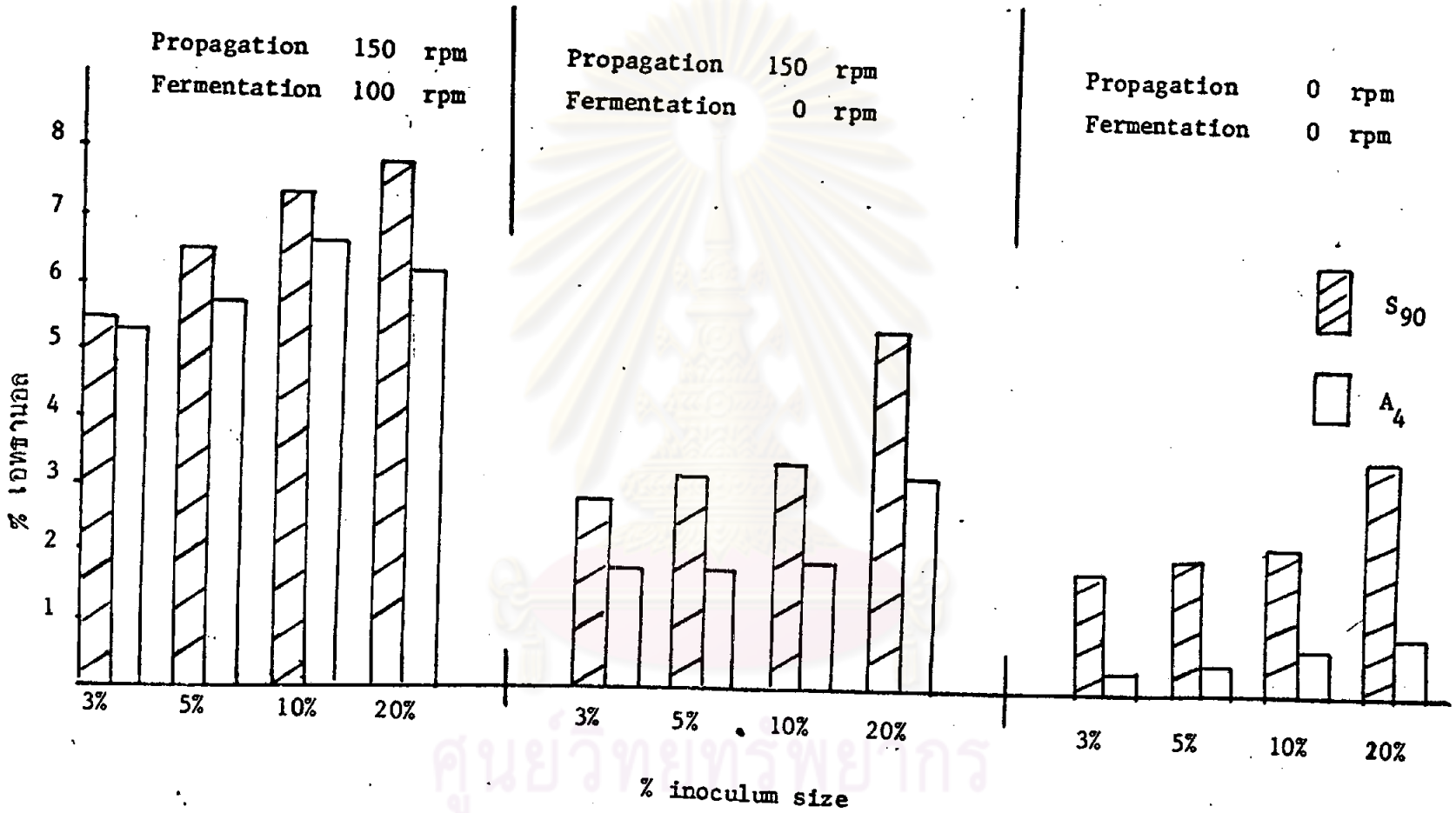
ยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ เมื่อปริมาณเชื้อที่ใช้เพิ่มขึ้น จาก 3%. 5%. 10% และ 20% ปริมาณเอทธานอลสูงขึ้นตามลำดับ คือ วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ 9.48%, 9.69% 10.28% และ 10.74% ยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ ที่ปริมาณเชื้อ 3% 5% 10% วัดปริมาณเอทธานอลได้ 8.56%. 9.05% และ 9.62% ซึ่งเปอร์เซนต์เอทธานอลเพิ่มขึ้นตามปริมาณเชื้อที่ใช้ แต่ที่ 20% inoculum size วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้เพียง 8.66% ซึ่งให้ผลผลิตใกล้เคียงกับที่ 3% inoculum size ดังแสดงผลในรูปที่ 13 หน้า 60

10. ผลการศึกษาความสำคัญการหมุนกับปริมาณเชื้อที่ใช้มีความสัมพันธ์กัน

ดังผลการทดลองที่แสดงในรูปที่ 14 หน้า 61 จะเห็นว่าในช่วงที่มีการหมุน 150 rpm ช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ (propagation) 9 ชั่วโมง แล้วเปลี่ยนความเร็วเป็น 100 rpm ในช่วงการหมักเป็นเวลา 60 ชั่วโมง เปอร์เซนต์เอทธานอลที่วัดได้ทั้งในยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ ให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงกว่าที่จำนวนรอบการหมุนอื่น และปริมาณเชื้อมาก จะให้เปอร์เซนต์เอทธานอลสูงกว่าที่ปริมาณเชื้อต่ำกว่า




รูปที่ 13 แสดงผลความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเชื้อที่ใส่กับเอทธานอลที่เกิดขึ้นจากการหมักน้ำอ้อยที่มีสภาพอาหารสมบูรณ์ เมื่อหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ กับ $A_4$ ที่อุณหภูมิ 28°ซ. จำนวนรอบการหมุน 100 rpm. เมื่อใส่เชื้อปริมาณต่างกัน 3%, 5%, 10% และ 20%




รูปที่ 14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนรอบการหมุนกับปริมาณเชื้อที่ใส่ โดยผลการวัดเปอร์เซนต์เอทธานอล หมักน้ำอ้อย 20.6 °บริกซ์ ที่มีสภาพอาหารสมบูรณ์ ในระยะเวลาหมัก 60 ชั่วโมง อุณหภูมิ 28 °ซ. จำนวนรอบการหมุนและปริมาณเชื้อ (Inoculum size) ต่างกัน

คือ ในยีสต์สายพันธุ์ $S_{90}$ ที่ 3% inoculum size เท่ากัน จำนวนรอบการหมุนในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์เท่ากัน 150 rpm แต่จำนวนรอบการหมุนในช่วงของการหมักต่างกัน คือ ให้มีการหมุน 100 rmp กับ 0 rpm เปอร์เซนต์เอทธานอลที่วัดได้จะต่างกันมาก คือ วัดได้ 5.3% และ 2.7% ตามลำดับ และในปริมาณเชื้อ 3% เท่าเดิม ถ้าไม่มีการหมุนทั้งในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์และช่วงการหมัก จะวัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้เพียง 1.87% หรือในยีสต์สายพันธุ์ $A_4$ ที่ 10% inoculum size เท่ากัน จำนวนรอบการหมุนต่างกัน คือ จำนวนรอบการหมุน 150 rpm.ในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ จำนวนรอบการหมุน 100 rpm. ในช่วงการหมัก เปรียบเทียบกับการหมุน 150 rpm ในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ จำนวนรอบการหมุน 0 rpm. ในช่วงการหมัก วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ต่างกัน คือ วัดได้ 6.5% และ 1.82% ตามลำดับ และถ้าไม่ให้มีการหมุนทั้งในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ และช่วงการหมักที่ 10% inoculum size เท่ากัน วัดเปอร์เซนต์เอทธานอลได้ต่ำมาก คือ วัดได้เพียง 0.7%

จากผลการทดลองนี้ จะเห็นได้ว่าถ้ามีการหมุนในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ และช่วงการหมัก และที่ปริมาณเชื้อมาก จะสามารถหมักให้เปอร์เซนต์เอทธานอลได้สูงกว่าเมื่อมีการหมุนเฉพาะในช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์ หรือไม่มีการหมุนทั้งช่วงเพิ่มจำนวนเซลล์และช่วงการหมัก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย