การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์

นายปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2547

ISBN 974-17-6266-6

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMPROVING ETHANOL PRODUCTION FROM SUGAR CANE MOLASSES BY *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 IN FED-BATCH CULTIVATION

Mr. Prissadang Vongprach

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2004

ISBN 974-17-6266-6

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์
โดย	นายปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... กรรมการ
(ดร.เพียรพรรค ทัศคร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

นายปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์ : การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อย
โดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์. (Improving ethanol production from sugar cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 in fed-batch cultivation) อ.ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร.ส่งศรี กุลปรีชา, จำนวนหน้า 139 หน้า. ISBN 974-17-6266-6

การศึกษานี้เป็นการปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ใช้กล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 อายุ 12 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหาร BSM medium ที่มีกากน้ำตาลคิดเป็นปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าในการเลี้ยงเชื้อแบบ แบตช์ ปริมาณเอทานอลที่ผลิตคือ 53.02-72.70 กรัมต่อลิตร ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร *S. cerevisiae* SKP1 ผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 72.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 9.20% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เวลา 72 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.47 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรวมเหลือเท่ากับ 12.11 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.465 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นมากกว่า 220 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ลดลง การศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ รีพีท-แบตช์ โดยการป้อนกากน้ำตาล 2 ระยะที่ชั่วโมงที่ 24 และ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรวมใกล้เคียงกับความเข้มข้นเริ่มต้น (165 กรัมต่อลิตร) พบว่าการป้อนกากน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 24 ส่งผลให้ผลิตเอทานอลได้ในเวลาเร็วขึ้นโดยได้เท่ากับ 72.98 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ การเติมกากน้ำตาลไม่มีผลชัดเจนต่อการเพิ่มการผลิตเอทานอลโดยได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 80.96 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 10.25 %(ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เวลา 120 ชั่วโมง การปรับปรุงการผลิตเอทานอลแบบ เฟด-แบตช์ โดยการป้อนกากน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 24 เพื่อให้ได้น้ำตาลรวมในถังหมักใกล้เคียงกับเริ่มต้น พบว่าได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 91.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 11.53 % (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เวลา 84 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.64 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการป้อนกลูโคสบริสุทธิ์ และการป้อนกากน้ำตาลร่วมกับไบโอติน โดยพบว่าการป้อนกลูโคสบริสุทธิ์ผลิตเอทานอลได้เร็วขึ้นตั้งแต่เวลาที่ 36 ชั่วโมง แต่ปริมาณเอทานอลสูงสุดใกล้เคียงกันโดยได้เท่ากับ 89.42 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ส่วนการป้อนไบโอตินส่งผลให้การเจริญของเซลล์ดีขึ้นที่ช่วงต้นของการเจริญ (12-36 ชั่วโมง) ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 89.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 11.28 %(ปริมาตร/ปริมาตร) ซึ่งใกล้เคียงกับเมื่อไม่ป้อนไบโอติน บทสรุปของการปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณเอทานอลจาก 53.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 6.71%ปริมาตรต่อปริมาตร ได้สูงขึ้นถึง 91.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 11.53%ปริมาตรต่อปริมาตร

ภาควิชาจุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา 2547

4472323023 MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORLD : ETHANOL / *Saccharomyces cerevisiae* / FED BATCH / MOLASSES

PRISSADANG VONGPRACH : IMPROVING ETHANOL PRODUCTION FROM SUGAR CANE MOLASSES BY *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 IN FED-BATCH CULTIVATION. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA, Ph.D., 139 pp. ISBN 974-17-6266-6

Improving ethanol production from sugar cane molasses by *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 was investigated. Twelve-hour culture of *S. cerevisiae* SKP1 in BSM medium containing 20 g/l of total sugar from sugar cane molasses was used as starter culture. The range of ethanol production by batch culture was 53.02 g/l to 72.70 g/l. Optimization of batch culture conditions showed the optimum conditions for ethanol production in 5L fermentor are as follows : initial pH , 4.5 ; agitation speed , 100 rpm ; no aeration ; temperature , 35^{O}C; initial total sugar concentration , 165 g/l. The highest ethanol concentration produced by *S. cerevisiae* SKP1 by batch culture was 72.70 g/l or 9.20 %(v/v) at 72 h with maximum dry cell weight (DCW) of 5.47 g/l and residual total sugar 12.11 g/l , $Y_{p/s}$ was 0.465 (g.ethanol/g.sugar) and ethanol productivity was 1.01 g.l^{1}h^{-1}. It was found that increasing initial total sugar to more than 220 g/l resulted in decreasing ethanol production. Ethanol production in repeated-batch with 2 times molasses feeding at 24 h and 48 h of cultivation in order to maintain total sugar concentration at the same level as initial concentration (165 g/l). It was exhibited that 72.98 g/l of ethanol produced in shorter cultivation time (48h) due to feeding of molasses at 24 h. In comparison with batch cultivation, feeding of molasses showed no significant increasing ethanol production i.e. 80.96 g/l or 10.25 %(v/v) of highest ethanol produced at 120 h. Improving ethanol production in fed-batch culture with molasses feeding at 24 h to keep total sugar concentration in broth as nearly as that of the beginning. The highest ethanol produced was 91.12 g/l or equivalent to 11.53 %(v/v) at 84 h with 5.64 g/l of highest DCW, $Y_{p/s}$ was 0.48 (g.ethanol/g.sugar) and ethanol productivity at 1.08 g.l^{-1}h^{-1}. Fed-batch cultivation with molasses feeding was better when comparing with pure glucose feeding and molasses feeding with biotin. It was shown that ethanol produced in shorter cultivation time at 36 h with pure glucose feeding. But the maximum ethanol concentration was nearly the same at 89.42 g/l at 96 h. Biotin feeding resulted in enhancing cell growth just at the early stage (12-36 h) with maximum ethanol concentration of 89.08 g/l equivalent to 11.28 %(v/v) which almost no difference from that without biotin feeding. In conclusion, ethanol production was improved by fed batch culture with ethanol concentration dramatically increased from 52.03g/l (6.71%v/v)up to 91.12 g/l which was equivalent to 11.53%(v/v).

Department Microbiology Student's signature.....

Field of study Industrial Microbiology Advisor's signature.....

Academic year 2004

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร. ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ท่านได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำอันมีค่าและข้อคิดเห็นต่างๆของงานด้วยดีตลอดมา รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ และ ดร.เพียรพรรค ทัศคร ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ นางสาวกุสุมา กมลจรัสโสภา และเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือที่ดี รวมถึง พี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ คุณวิภัทรวรรณ ปานนิล หจก.ว.ภัทร ที่ได้อนุเคราะห์นำกากน้ำตาลมาให้ใช้สำหรับงานวิจัย และงานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยของทบวงมหาวิทยาลัย จึงขอขอบคุณทบวงมหาวิทยาลัยไว้ ณ ที่นี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องชาย ที่ให้ความรักกำลังใจ และคำชี้แนะอันมีค่าที่หาสิ่งใดเปรียบมิได้ ตลอดมา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญภาพ.....ฎ
คำย่อ.....ด
บทที่ 1 บทนำ.....1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย.....26
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....38
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....98
รายการอ้างอิง.....100
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก.....107
ภาคผนวก ข.....110
ภาคผนวก ค.....125
ภาคผนวก ง..... 127
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....139

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล (Waites และ Michael, 2001)..... 7
ตารางที่ 2 องค์ประกอบของกากน้ำตาล (Stowell และคณะ, 1987) 12
ตารางที่ 3 สารประกอบไนโตรเจนชนิดต่างๆที่พบในกากน้ำตาล..... 14
ตารางที่ 4 ผลได้ของเอทานอลต่อสับเสตรตและองค์ประกอบของสับเสตรต
ที่นำมาผลิตเอทานอล (Kim และ Dale, 2004) 15
ตารางที่ 5 ปริมาณกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM
medium ที่มีกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัม/ลิตร 40
ตารางที่ 6 อัตราการเจริญจำเพาะของ *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM
medium ที่มีกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร 40
ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย
S. cerevisiae SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0..... 43
ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย
S. cerevisiae SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5..... 44
ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย
S. cerevisiae SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0..... 45
ตารางที่ 10 ผลการทดสอบทางสถิติของการศึกษาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 47
ตารางที่ 11 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1
ที่ pH เริ่มต้นต่างกัน..... 48
ตารางที่ 12 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1
ที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที 51
ตารางที่ 13 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1
ที่อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที 52
ตารางที่ 14 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1
ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที 53
ตารางที่ 15 ผลการทดสอบทางสถิติของการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อ
การผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 55

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 16 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวนต่างกัน 56
ตารางที่ 17 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 60
ตารางที่ 18 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 61
ตารางที่ 19 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 62
ตารางที่ 20 ผลการทดสอบทางสถิติของการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 64
ตารางที่ 21 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิต่างกัน..... 65
ตารางที่ 22 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิต ที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร 69
ตารางที่ 23 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร 70
ตารางที่ 24 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร 71
ตารางที่ 25 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร 72
ตารางที่ 26 ผลการทดสอบทางสถิติของการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 77
ตารางที่ 27 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นต่างกัน..... 78

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 28 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดย *S. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงแบบ รีพีท-แบตช์ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการเติมกากน้ำตาล 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ 48 83
ตารางที่ 29 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดย *S. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงแบบ เฟด-แบตช์ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการเติมกากน้ำตาล 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ 96 87
ตารางที่ 30 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟดแบตช์ มีการเติมกากน้ำตาล 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ 96 88
ตารางที่ 31 การเปลี่ยนแปลงในระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงแบบ เฟด-แบตช์ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการเติมกลูโคสบริสุทธ์ 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ 96 90
ตารางที่ 32 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟดแบตช์ มีการเติมกลูโคสบริสุทธิ์ 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ 96..... 91
ตารางที่ 33 การเปลี่ยนแปลงนระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงแบบ เฟด-แบตช์ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร โดยเติมกากน้ำตาลที่เวลา 24 ชั่วโมง และเติมไบโอตินแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล 94
ตารางที่ 34 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ fed-batch ที่มีการเติมกากน้ำตาล 1 ช่วง คือ ที่เวลาที่ 24 ชั่วโมง และเติมไบโอตินแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล 95
ตารางที่ 35 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากงานวิจัยกับงานวิจัยอื่น 96

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

รูปที่ 1 พื้นที่ที่มีการผลิตน้ำตาล โดย 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบซึ่งมีอยู่ในภูมิประเทศเขตร้อน และ 30 เปอร์เซ็นต์ ใช้หัวบีทเป็นวัตถุดิบซึ่งอยู่ในภูมิประเทศเขตหนาว 4

รูปที่ 2 วิถีการสร้างเอทานอลโดยผ่าน Emden-Meyerhof-Panas pathway 9

รูปที่ 3 ลักษณะการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ 18

รูปที่ 4 รูปแบบของจลน์ศาสตร์การเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ 21

รูปที่ 6 ลักษณะรูปร่างของ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SKP1 ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า 28

รูปที่ 7 ปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมสำหรับป้อนที่ระยะเวลาต่างๆระหว่างการเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟด-แบตช์ 34

รูปที่ 8 การเจริญของ *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่มีกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัม/ลิตร 39

รูปที่ 9 เปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะของ *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน 41

รูปที่ 10 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 43

รูปที่ 11 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 44

รูปที่ 12 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 45

รูปที่ 13 เปรียบเทียบผลของ pH เริ่มต้น 4.0 4.5 และ 5.0 ที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในภาวะอัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที น้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 46

รูปที่ 14 ค่า $Y_{P/S}$ ของการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าจากทฤษฎี ($Y_{P/S}$=0.51) เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้น 4.0 4.5 และ 5.0 อัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที น้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร และ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 49

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

รูปที่ 15 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที 51

รูปที่ 16 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที 52

รูปที่ 17 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที 53

รูปที่ 18 เปรียบเทียบผลของอัตราการกวนที่ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในภาวะน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 54

รูปที่ 19 ค่า $Y_{P/S}$ ของการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าจากทฤษฎี ($Y_{P/S}$=0.51) เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวนเท่ากับ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที น้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 57

รูปที่ 20 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 60

รูปที่ 21 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 61

รูปที่ 22 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 62

รูปที่ 23 เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิ 25 30 และ35 องศาเซลเซียส ที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในภาวะน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร อัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 63

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

รูปที่ 24 ค่า $Y_{P/S}$ ของการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าจากทฤษฎี ($Y_{P/S}$=0.51) เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส น้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร อัตราการกวนและ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 66

รูปที่ 25 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร 69

รูปที่ 26 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร 70

รูปที่ 27 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร 71

รูปที่ 28 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร 72

รูปที่ 29 เปรียบเทียบเทียบผลของน้ำตาลเริ่มต้น 165 220 260 และ 280 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในภาวะอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 73

รูปที่ 30 ลักษณะเซลล์ *S. cerevisiae* SKP1 ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ (กำลังขยาย 10,000 เท่า) 75

รูปที่ 31 ลักษณะเซลล์ *S. cerevisiae* SKP1 ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ (กำลังขยาย 10,000 เท่า) 76

รูปที่ 32 ลักษณะเซลล์ *S. cerevisiae* SKP1 ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ (กำลังขยาย 15,000 เท่า)..... 76

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

รูปที่ 33 ค่า $Y_{P/S}$ ของการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าจากทฤษฎี ($Y_{P/S}$=0.51) ของการเลี้ยงในภาวะที่ใช้น้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 220 260 และ 280 กรัมต่อลิตร อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 79

รูปที่ 34 รูปแบบการหมักเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ รีพีท-แบตช์ โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการเติมน้ำตาล 2 ช่วง คือ ชั่วโมงที่ 24 และ ชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ 82

รูปที่ 35 รูปแบบการหมักเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟดแบตช์ โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการเติมน้ำตาล 2 ช่วง คือ ชั่วโมงที่ 24 และ ชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อ 86

รูปที่ 36 รูปแบบการหมักเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟดแบตช์ โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการป้อนกลูโคสบริสุทธิ์ 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ ชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อ 89

รูปที่ 37 ปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมสำหรับป้อนระหว่างการเลี้ยง *S.cerevisiae* SKP1 แบบ เฟด-แบตช์ 92

รูปที่ 38 รูปแบบการหมักเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟดแบตช์ โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร โดยป้อนกากน้ำตาลที่เวลา 24 ชั่วโมง และเติมไบโอตินแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล 93

รูปที่ 39 กากน้ำตาลเจือจางด้วยน้ำอุ่นบรรจุในหลอดเซลตริฟิวก์ 107

รูปที่ 40 กากน้ำตาลหลังการปั่นแยกตะกอน ก่อนแยกตะกอนออก 108

รูปที่ 41 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ pH เริ่มต้น 4.0 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร 111

รูปที่ 42 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร 112

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

รูปที่ 43 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ pH เริ่มต้น 5.0 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร 113
รูปที่ 44 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้อัตราการกวน 150 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5..... 114
รูปที่ 45 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้อัตราการกวน 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5..... 115
รูปที่ 46 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm..... 116
รูปที่ 47 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm..... 117
รูปที่ 48 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 118
รูปที่ 50 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 120
รูปที่ 51 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 121
รูปที่ 52 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟด-แบตช์ ที่มีการเติมกากน้ำตาล 2 ช่วง คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมง..... 122

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพประกอบ หน้า

รูปที่ 53 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟด-แบตช์ ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 2 ช่วง คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง 123
รูปที่ 54 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟด-แบตช์ ที่มีการเติมกากน้ำตาล 1 ช่วง คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเติมไบโอตินแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล 124
รูปที่ 55 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล 125
รูปที่ 56 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณซูโครส 125
รูปที่ 57 โครมาโตรแกรมของเอทานอลมาตรฐานและ internal standard (บิวทานอล) 126

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อ

คำย่อ	คำอธิบาย
GC	ก๊าซโครมาโตรกราฟฟี
% by wt.	เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักเซลล์แห้ง
g/l	กรัมต่อลิตร
mM	มิลลิโมลาร์
μg	ไมโครกรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการแก้ปัญหาในเรื่องพลังงานเป็นเรื่องที่กำลังได้รับความสนใจอย่างมากในทุกประเทศ เพราะเกี่ยวข้องกับวิถีการดำเนินชีวิตของคนเราทั้งทางตรงและทางอ้อม ราคาน้ำมันที่ปรับตัวสูงขึ้น ส่งผลให้ค่าครองชีพสูงขึ้น นักวิชาการด้านเศรษฐกิจได้คาดการณ์ว่าในปี พ.ศ. 2553 หากยังเป็นไปตามเงื่อนไขของกลุ่มประเทศผู้ค้าน้ำมันรายใหญ่ หรือกลุ่มโอเปค (OPEC) ที่มีอัตราการผลิตน้ำมันคงที่ ราคาน้ำมันจะปรับตัวสูงขึ้น จนผู้บริโภคไม่มีกำลังซื้อ ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าในอนาคตสังคมโลกคงต้องเผชิญหน้ากับภาวะการขาดแคลนน้ำมันอย่างแน่นอนหากแหล่งพลังงานจากฟอสซิลซึ่งเป็นต้นกำเนิดของน้ำมันและก๊าซธรรมชาติหมดลง สังคมโลกกำลังตื่นตัวในการหาทางออกเพื่อบรรเทาภาวะวิกฤตินี้ โดยแสวงหาแหล่งพลังงานทดแทนจากแหล่งทรัพยากรที่ทดแทนได้ (renewable resources) เพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือกที่จะนำมาใช้ทดแทนพลังงานประเภทใช้แล้วหมดไป เช่น น้ำมัน ก๊าซธรรมชาติ และถ่านหิน ด้วยเหตุนี้ จึงได้มีการค้นคว้าวิจัยอย่างต่อเนื่องในการหาแหล่งพลังงานทดแทน เพื่อเป็นการลดปริมาณการใช้แหล่งพลังงานจากฟอสซิล และเพื่อให้มีแหล่งพลังงานพอเพียงสำหรับประชากรโลกที่เพิ่มขึ้น

ชีวมวล (biomass) เป็นวัตถุดิบทดแทนได้ที่มีมากบนโลก การนำชีวมวลมาผลิตเป็นแหล่งพลังงานทดแทนจึงเป็นทางเลือกหนึ่งในปัจจุบัน เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนอย่างหนึ่งที่มีศักยภาพสูง เพราะสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนพลังงานฟอสซิลที่หมดไป (Wheals และคณะ 1999) และยังผลิตได้จากชีวมวล ปริมาณการผลิตเอทานอลทั่วโลกสูงถึง 30,000 ล้านลิตรต่อปี โดย 70%ของปริมาณการผลิตสามารถผลิตได้จากกระบวนการหมัก (fermentation) โดยใช้จุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* และที่เหลือผลิตได้จากกระบวนการคะตะลิสต์ของเอทิลีน ในปี ค.ศ.1970 ได้มีการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจากแหล่งชีวมวลขึ้นที่ประเทศบราซิล ซึ่งเป็นการผลิตเพื่อชดเชยต้นทุนการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ (Waites และ Micheal, 2001) ประเทศไทยอุดมด้วยแหล่งทรัพยากรชีวมวลมากมาย ได้แก่ วัตถุดิบทางการเกษตร โดยเฉพาะวัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาล เช่น มันสำปะหลัง อ้อยและกากน้ำตาล สามารถที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบเพื่อหมักเป็นเอทานอลได้เป็นอย่างดี

กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเหลือใช้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งมีในปริมาณมาก หาง่ายและราคาถูก การใช้แป้งมันสำปะหลังจำเป็นต้องผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้

เป็นน้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ในการเจริญและผลิตเอทานอล (fermentable sugar) ส่วนการใช้กากน้ำตาลสามารถนำมาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อได้โดยตรง นอกจากนี้ในกากน้ำตาลยังมีองค์ประกอบอื่นที่มีประโยชน์สำหรับเป็นอาหารให้แก่จุลินทรีย์ การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลจึงมีต้นทุนที่ต่ำกว่าการใช้วัตถุดิบชนิดอื่น ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะมีการวิจัยและพัฒนาการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลให้มีประสิทธิภาพ เพื่อนำกากน้ำตาลมาใช้เป็นวัตถุดิบและปรับปรุงประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้นส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตต่ำลง ซึ่งทำให้การนำเอทานอลจากกระบวนการหมักชีวภาพมาเป็นเชื้อเพลิงมีศักยภาพสูงขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อย โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ในถังหมักระบบ เฟด-แบตช์ เพื่อให้สามารถผลิตเอทานอลได้ในราคาต้นทุนต่ำและเป็นการเพิ่มคุณค่าวัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตร ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการผลิตระดับขยายส่วนต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. หาภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 เพื่อผลิตเอทานอลในถังหมัก
2. การผลิตเอทานอลในถังหมักโดยใช้ภาวะที่เหมาะสม
3. การปรับปรุงการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักแบบ เฟด-แบตช์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แนวคิดและทฤษฎี

วิกฤติการณ์ด้านพลังงานอันเนื่องมาจากการขาดแคลนน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียม ทำให้น้ำมันเชื้อเพลิงมีราคาแพงและมีแนวโน้มที่จะมีราคาแพงยิ่งขึ้นในอนาคต จำเป็นที่จะต้องหาแหล่งพลังงานอื่นมาทดแทน เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานชนิดหนึ่งที่น่าสนใจ ประเทศไทยมีวัตถุดิบทางการเกษตรหลายชนิดและมีปริมาณมากพอที่จะนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ ดังนั้นการนำวัตถุดิบทางการเกษตรซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สามารถปลูกทดแทนได้มาใช้ในการผลิตเอทานอล โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กากน้ำตาลอ้อย เป็นวัตถุดิบที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล ซึ่งมีอยู่ทั่วไปในโลกถึง 121 ประเทศ โดยชนิดของวัตถุดิบที่นำมาผลิตน้ำตาลนั้นแตกต่างกันตามภูมิประเทศ (ดังแสดงในรูปที่ 1) ประเทศไทยเป็นประเทศในเขตอบอุ่นที่มีการปลูกอ้อยเพื่อผลิตเป็นน้ำตาลซึ่งจะให้กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ ดังนั้นกากน้ำตาลอ้อยจึงหาง่าย ราคาถูก และมีข้อดีเมื่อเทียบกับวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดอื่น เนื่องจากไม่ต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลขนาดเล็กสำหรับให้ยีสต์นำไปใช้ได้ กากน้ำตาลอ้อยประกอบด้วยน้ำตาลหลายชนิดได้แก่ ซูโครส ฟรุกโตส และกลูโคส (พิสิษฐ คงกำเนิด, 2540) นอกจากนี้ยังพบว่ามีแหล่งไนโตรเจน วิตามิน และเกลือแร่ที่จำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์ โดยทั่วไปกากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลรวม (total sugar) ในความเข้มข้นสูง การนำไปใช้จึงต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสม พบว่าหากความเข้มข้นของน้ำตาลมากกว่า 200 กรัม ต่อลิตร มีผลให้การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น แต่เมื่อมีเอทานอลความเข้มข้นสูงส่งผลให้มีการยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* และนำไปสู่ระยะสิ้นสุดของกระบวนการหมัก (Mota และคณะ, 1987; Novak และคณะ, 1981) โดยความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลอยู่ในช่วง 100 – 180 กรัม ต่อลิตร (Tyagi และ Ghose, 1982) หากความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่านี้จะเกิดการยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* และพบว่าเมื่อเอทานอลที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูง โดยถ้าความเข้มข้นของเอทานอลสูงถึง 93.5 กรัม ต่อลิตร มีผลทำให้ อัตราการเจริญจำเพาะ, อัตราการผลิตจำเพาะ และความเข้มข้นของเซลล์ในถังหมักลดลง และทำให้น้ำตาลถูกใช้ไม่สมบูรณ์ (Minier และ Goma, 1982) พบว่าปริมาณเอทานอลที่ความเข้มข้น 26 กรัม ต่อลิตร ไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ แต่มีผลที่ความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 68.5 กรัมต่อลิตร และหากใช้น้ำตาลความเข้มข้นต่ำเกินไปพบว่าจะผลิตเอทานอลได้น้อย ทำให้ต้องใช้พลังงานในการกลั่นมากขึ้น ซึ่งไม่เหมาะสมในเชิงเศรษฐศาสตร์ (Holzberg, Finn และ Steinkrans, 1967) แต่ถ้าเพาะ

เลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง จะทำให้เกิด catabolite repression ส่งผลให้เกิด feed-back inhibition ยับยั้ง glycolytic pathway จึงเป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย (Nagodawithana, Castellano และ Steinkrans คณะ,1974) ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงวิธีการหมักเพื่อแก้ปัญหาดังกล่าว วิธีการหนึ่งก็คือ การหมักแบบ เฟด-แบตช์ (fed-batch) โดยค่อยๆ ป้อนอาหารให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้เกิดกระบวนการ catabolite repression และในการหมักเอทานอลแบบ เฟด-แบตช์ ด้วยการควบคุมการป้อนอาหารโดยวัดอัตราการเกิด CO_2 ทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 124 กรัม ต่อลิตร ใน 300 ชั่วโมง ได้ผลผลิตเอทานอล 0.47 กรัม จาก 1 กรัมกลูโคส (Mota และคณะ, 1987) Alfenore และคณะ (2002) ได้ปรับปรุงกระบวนการผลิตเอทานอลจาก *S. cerevisiae* โดยวิธีการเติมวิตามินและการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลในการหมักแบบ เฟด-แบตช์ ทำให้เอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 126 กรัม ต่อลิตร เพิ่มขึ้นเป็น 147 กรัม ต่อลิตร

จากผลงานวิจัยและจากเหตุผลที่กล่าวมาการผลิตเอทานอลจาก กากน้ำตาลอ้อย เพื่อเป็นแหล่งพลังงานทดแทนจึงมีความเป็นไปได้สูง เพราะนอกจากใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในกากน้ำตาลอ้อยยังมีวิตามินและเกลือแร่ที่จำเป็นสำหรับการเจริญของยีสต์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมุ่งหมายที่จะผลิตและปรับปรุงการหมักเอทานอลให้สูงขึ้นจากวัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรได้แก่ กากน้ำตาลอ้อยซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกซึ่งมีผลทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลงด้วย

รูปที่ 1 พื้นที่ที่มีการผลิตน้ำตาล โดย 70 เปอร์เซ็นต์ ใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบซึ่งมีอยู่ในภูมิประเทศเขตร้อน และ 30 เปอร์เซ็นต์ ใช้หัวบีทเป็นวัตถุดิบซึ่งอยู่ในภูมิประเทศเขตหนาว

ที่มา : (http://www.sucrose.com/learn.html)

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การหมักกากน้ำตาลให้ได้เอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอลโดยยีสต์เป็นที่รู้จักกันมานานนับพันปีแล้ว จุดประสงค์ในตอนแรก คือ ใช้สำหรับเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ซึ่งมีทั้งชนิดที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการกลั่น เช่น เบียร์ (beer) ไวน์ (wine) และไซเดอร์ (cider) เป็นต้น และชนิดที่ผ่านกระบวนการกลั่น เช่น สุรา (potable spirit) บรั่นดี (brandy) และวิสกี้ (whisky) เป็นต้น (Margaritis และ Merchant, 1987 ; Rose, 1977) ต่อมามีความต้องการที่จะใช้ประโยชน์จากเอทานอลเพื่อกิจการอื่นเพิ่มมากขึ้น คือ ใช้เป็นตัวทำละลายหรือสารตัวกลางในอุตสาหกรรมเคมี เช่น การผลิตน้ำหอม ยารักษาโรค และสารต้านจุลชีพ และที่สำคัญมาจนถึงในปัจจุบันนี้คือการใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมเพื่อแก้ปัญหาวิกฤตของราคาน้ำมัน ทั้งนี้เพราะเอทานอลราคาถูกกว่าเบนซิน บางประเทศได้มีการนำเอทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์ซึ่งเรียกว่า ก๊าซโซฮอล (gasohol) (Reed และ Nagodawithana, 1991) เช่นประเทศบราซิลได้นำเอทานอลที่ได้จากการหมักกากน้ำตาลอ้อยด้วยยีสต์มาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์ (Walker, 1998) และอเมริกา (Zaldivar และคณะ,2001) เนื่องจากการใช้เอทานอลผสมกับเบนซินไม่ก่อให้เกิดปัญหาต่อเครื่องยนต์ และช่วยปรับปรุงความสามารถในการต้านการน็อคของเครื่องยนต์ และลดการเกิดคาร์บอนมอนอกไซด์ที่เกิดจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ (Esser และ Karsch, 1984) กระบวนการผลิตเอทานอลจึงได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน เพื่อให้ผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูงและต้นทุนการผลิตต่ำ

สำหรับประเทศไทยโครงการแก๊สโซฮอล์เกิดขึ้นในปี 2528 เนื่องจากพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวได้ทรงเล็งเห็นว่าประเทศไทยอาจประสบปัญหาการขาดแคลนน้ำมัน และปัญหาพืชผลทางการเกษตรราคาตกต่ำ จึงทรงมีพระราชดำริให้โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดาศึกษาถึงการนำอ้อยมาแปรรูปเป็นเอทานอล โดยผสมกับน้ำมันเบนซินเป็นน้ำมันแก๊สโซฮอล์ และได้ทดลองใช้กับรถยนต์ในโครงการส่วนพระองค์ตั้งแต่ปี 2537 กับเครื่องยนต์ทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ เพื่อน้อมรับแนวพระราชดำริของในหลวงมาสานต่อ บริษัท บางจากฯ (มหาชน) ได้ผลิตและจำหน่ายแก๊สโซฮอล์ 95 ที่สถานีบริการน้ำมันบางจาก โดยเริ่มทดลองจำหน่ายเมื่อปี 2544 ปัจจุบันมีจำหน่ายอย่างแพร่หลายที่สถานีบริการน้ำมันบางจาก ในเขตกรุงเทพฯ ปริมณฑล

1. ยีสต์และกระบวนการหมักเอทานอล

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่โดยส่วนใหญ่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีรูปร่างหลายแบบ คือ กลม (round) รี (oval) สามเหลี่ยม (triangular) รูปร่างแบบมะนาวฝรั่ง (apiculate) ฟลาสก์ (flask) ยาว (elongated) และเป็นสาย (filamentous) ยีสต์บางชนิดมีการสร้างเส้นใยแบบ pseudomycelium และ true mycelium สำหรับ pseudomycelium อาจเกิดเมื่อมีการเพิ่มจำนวนโดยการแตกหน่อแล้วหน่อที่เกิดขึ้นไม่หลุดจากเซลล์แม่ ทำให้มีการเรียงต่อของเซลล์เป็นสาย บางครั้งมีการต่อกันเป็นสายสั้นๆ ซึ่งแต่ละเซลล์มีรูปร่างคล้ายกันจัดเป็น rudimentary pseudomycelium บางชนิดเซลล์ที่เป็นแกนกลางยาวกว่าเซลล์อื่น และระหว่างรอยต่อของเซลล์มีกลุ่มของหน่อแตกออกมา pseudomycelium ประเภทนี้จัดว่าเป็น well developed pseudomycelium (สาวิตรี ลิ่มทอง,2536)

การเจริญของยีสต์เกิดโดยการเพิ่มขนาด เมื่อขนาดเพิ่มจนถึงจุดหนึ่ง เซลล์จะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน ในระหว่างที่มีการแบ่งเซลล์นิวเคลียสจะมีการแบ่งแบบไมโตซีส (mitosis) และการสังเคราะห์ไซโตพลาสซึมเกิดขึ้น สำหรับการแบ่งเซลล์ของยีสต์ที่เป็นการเพิ่มจำนวนแบบไม่อาศัยเพศนั้น พบว่าส่วนใหญ่เกิดจากการแตกหน่อ (budding) มีจำนวนน้อยที่เกิดโดยการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองโดยวิธี fission และมีบางพวกที่เพิ่มจำนวนโดยวิธีอื่นๆ เช่น การสร้าง conidiospore หรือ codinia ของยีสต์กลุ่มที่ไม่มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศ (สาวิตรี ลิ่มทอง,2536)

1.1 ชนิดของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล

มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอทานอล ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ดังตารางที่ 1 จุลินทรีย์ซึ่งเป็นที่สนใจสำหรับการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *S.uvarum* (carlsbergensis), *Schizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces fragilis* ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่เหมือนกัน แต่เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น ดังนั้นในปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงใช้เชื้อ *S. cerevisiae* นอกจากนั้นปัจจุบันได้มีการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียจีนัส *Zymomonas* คือ *Z. mobilis* และจีนัส *Clostridium* คือ *Cl. thermocellum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนสามารถหมักเซลลูโลส และเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้งสองจีนัสดังกล่าวมีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์ ดังนั้นจึงไม่นิยมนำแบคทีเรียมาใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม (Waites และ Michael, 2001)

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ผลิตเอทานอล (Waites และ Michael, 2001)

แบคทีเรีย	
Clostridium thermohydrosulfuricum	Extreme thermophile
Clostridium thermocellum	Thermophilic, hydrolyses cellulose
Thermoanareobacter ethanolicus	Ferments xylose and starch*
Zymomonas mobilis	The wild-type ferments only glucose, fructose and sucrose, but with high productivity
ยีสต์	
Candida pseudotropicalis, C. tropicalis	Ferments xylose*
Candida species	Ferments xylose and cellobiose*
Kluyveromyces lactis†	Ferments lactose in dairy wastes*
Kluyveromyces marxianus	Hydrolyses inulin (polyfructosan)
Pachysolen tannophilus	Ferments xylose*
Pichia stipitis	Ferments xylose*
Saccharomyces cerevisiae	Most strains ferment only glucose, sucrose, fructose, maltose and maltotriose
S. cerevisiae var. *distaticus*	Hydrolyses starch
Schwanniomyces alluvius	Hydrolyses starch
ราเส้นใย	
Fusarium species	Ferments xylose*
Monilia species	Hydrolyses cellulose and xylan
Mucor species	Ferment xylose and arabinose*

* ได้แก่ น้ำตาลซึ่งมีคาร์บอนจำนวนหกอะตอมที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและโมเลกุลคู่

† ไม่มีผลของ Crabtree effect

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอลมีดังนี้ (สาวิตรี ลิ่มทอง,2536)

1. ให้ผลผลิตสูง
2. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
3. มีความทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
4. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
5. ทน pH ต่ำ หรือทนกรด (acid tolerance)
6. มีความสามารถในการจับตัวเป็นก้อนตกลงก้นภาชนะ (flocculation)
7. มีลักษณะพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย
8. ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)

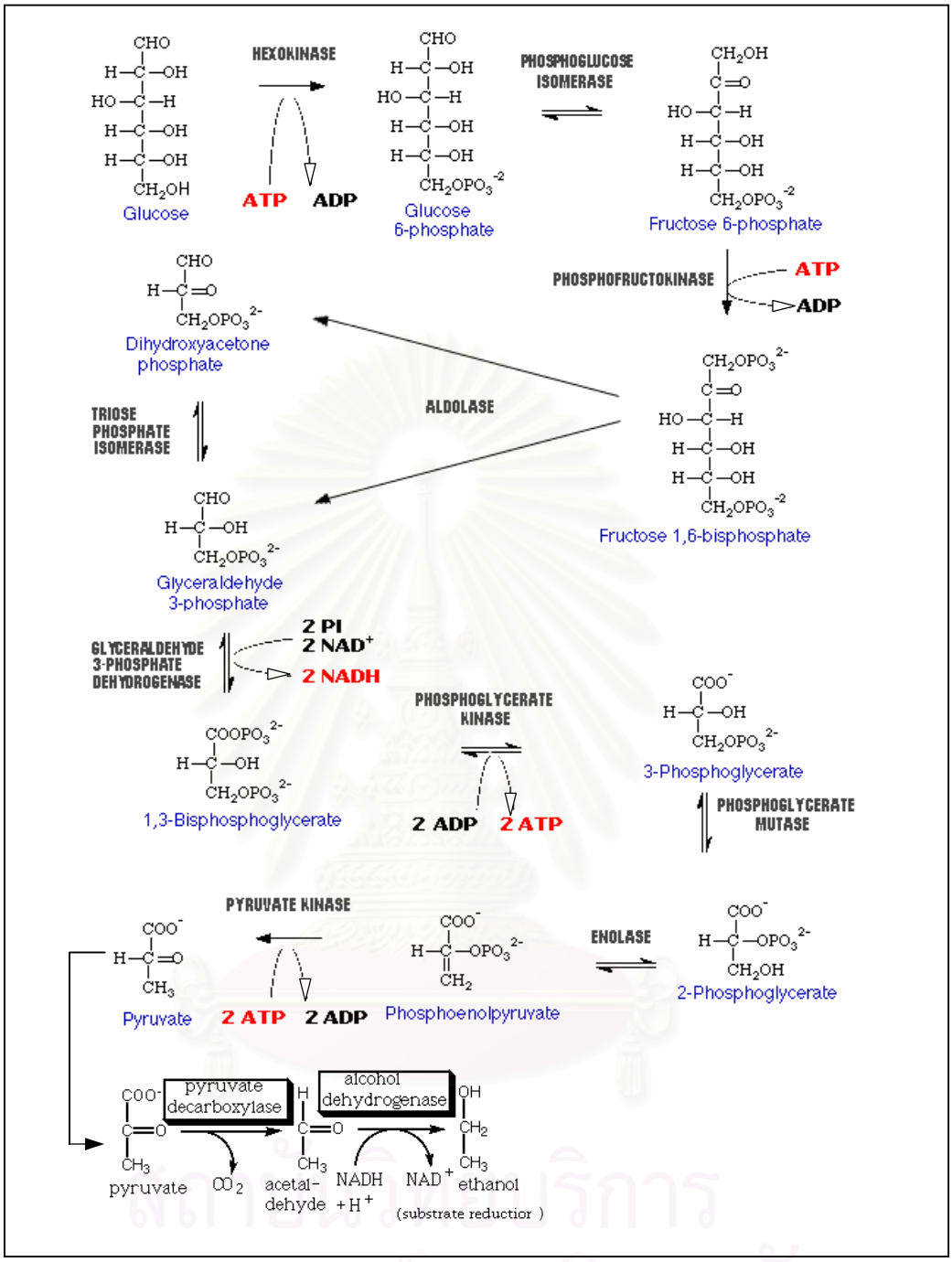
1.2 กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักเอทานอลเป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นโดยอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงสับสเตรต (substrate) เช่น น้ำตาลกลูโคส ภายใต้ภาวะที่ปราศจากออกซิเจน(fermentation)ให้เป็นเอทานอล ซึ่งจุลินทรีย์สามารถได้พลังงานจากปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นนี้ อย่างไรก็ตามพลังงานที่ได้จากกระบวนการหมักจะน้อยกว่าพลังงานที่ได้จากกระบวนการหายใจแบบใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) ประมาณ 25 เท่า จุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลได้แก่ ยีสต์ ในจีนัส *Saccharomyces* และแบคทีเรียในจีนัส *Zymomonas* การหมักเอทานอลโดยยีสต์จากกลูโคสไปเป็นเอทานอล จะเป็นไปโดยผ่าน glycolysis หรือ Emden-Meyerhof-Panas pathway (Paturau, 1987) ดังแสดงในรูปที่ 2 โดยการเปลี่ยน glucose-6-phosphate ไปเป็น pyruvate จากนั้น pyruvate จะถูกเมตาบอไลต์ต่อไปให้ผลผลิตสุดท้ายต่างๆกัน ตามชนิดของยีสต์ และภาวะแวดล้อมระหว่างเมตาบอลิซึม ในกรณีที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงหรือไม่มีออกซิเจน หรือทั้งสองอย่าง pyruvate จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล pyruvate ที่สร้างขึ้นจากวิถีไกลโคไลซิส สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลในยีสต์บางชนิดโดยเฉพาะ *S. cerevisiae* โดย pyruvate จะถูก decarboxylation โดยมีเอนไซม์ pyruvate decarboxylase ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็น acetaldehyde ซึ่งถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นเอทานอล โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ที่อาศัย $NADH_2$ ($NADH_2$ dependent alcohol dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Paturau, 1987) ในปี ค.ศ.1810 Gay-Lussac ได้แสดงผลการหมักเอทานอลเป็นสมการ

$$C_{12}H_{24}O_{12} = 4CO_2 + 4C_2H_5OH$$

ต่อมาได้เปลี่ยนมาเป็น

$$C_6H_{12}O_6 = 2CO_2 + 2C_2H_5OH$$



รูปที่ 2 วิถีการสร้างเอทานอลโดยผ่าน Emden-Meyerhof-Panas pathway

ที่มา : http://www.library.csi.cuny.edu/~davis/Bio101_Davis/Glycolysis_Fermentation /Glycolysis.htm

จากสมการของ Gay-Lussac สามารถคำนวณได้ว่าในการหมักเอทานอล จะเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล 51.1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาล และมีความร้อนเกิดขึ้น ต่อมาในปี 1875 Pasteur ได้แสดงให้เห็นว่าในสภาพที่เป็นจริง การหมัก

เอทานอลที่ให้ผลผลิตสูงสุดที่จะเป็นไปได้โดยคิดเทียบจากเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของน้ำตาลที่ถูกใช้ไปจะได้ดังนี้ เอทานอล 48.4 เปอร์เซ็นต์, คาร์บอนไดออกไซด์ 46.6 เปอร์เซ็นต์, กลีเซอรอล 3.3 เปอร์เซ็นต์, กรดซัคซินิค 0.6 เปอร์เซ็นต์ และ อื่นๆ

จากปริมาณเอทานอลที่ได้ 48.4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาลที่ถูกใช้ไปที่ Pasteur คำนวณได้ จะมีค่าประมาณ 94.5 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณเอทานอลตามทฤษฎีที่ได้จากวิธีของ Gay-Lussac ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 90-95 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี โดยผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่สร้างขึ้นเกิดจากการใช้สับสเตรต 4-5 เปอร์เซ็นต์ และถ้าสามารถป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างผลิตภัณฑ์พลอยได้เหล่านี้แล้ว จะสามารถเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอลได้ 2.7 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะมีค่าเพียง 80-90 เปอร์เซ็นต์ ของค่าทฤษฎี สำหรับการผลิตเอทานอลจากแบคทีเรีย *Z. mobilis* นั้น ต่างไปจากยีสต์ โดย *Z. mobilis* ใช้วิถี Entner doudoroff ในการเปลี่ยนน้ำตาล และพบว่า *Z. mobilis* เจริญเร็วกว่า มีอัตราการผลิตเอทานอลสูงกว่า และมี specific glucose uptake rate สูงกว่ายีสต์ แต่ความทนต่อเอทานอลนั้นต่ำกว่ายีสต์ (Esser และ Karsch, 1984)

2. วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล

ในการผลิตเอทานอลทั้งที่เป็นเครื่องดื่มและเชื้อเพลิง มักนิยมใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากกระบวนการหมักสามารถดำเนินการได้ง่าย ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลแล้วเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้เลย กากน้ำตาลที่พบโดยทั่วไปแบ่งเป็นสองชนิดตามแหล่งที่มา คือ กากน้ำตาลอ้อย (sugar cane molasses) และกากน้ำตาลบีท (beet molasses) (Harrison และ Graham, 1970 ; Hodge และ Hildebrandt, 1954 อ้างถึงใน เกศกมล ไทยทอง, 2542) การเลือกใช้กากน้ำตาลชนิดใดเป็นวัตถุดิบนั้น ขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศของแต่ละประเทศ เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งเป็นการแปรรูปจากผลผลิตทางการเกษตร เช่น อ้อย หรือ บีท ประเทศที่มีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยจะต้องมีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นเหมาะแก่การเจริญของอ้อย ส่วนบีทนั้น มักจะนิยมปลูกกันมากในประเทศที่มีลักษณะภูมิอากาศเย็น (Jenkins, 1966) สำหรับประเทศไทยที่มีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้น จึงมีการปลูกอ้อยกันมาก และมีโรงงานผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยอยู่ในบริเวณแหล่งเพาะปลูกหลายโรงงาน กากน้ำตาลอ้อยที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจึงหาง่าย ราคาถูก และมีปริมาณมาก สามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล คือ กากน้ำตาลอ้อย

กากน้ำตาล (molasses) คือผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลจากโรงงานน้ำตาล molasses เป็นคำที่มาจากภาษาละติน mel มีความหมายถึง honey หรือน้ำผึ้ง แล้ววิวัฒนาการทางภาษาผ่านไปทางภาษาสเปนไปเป็นคำว่า malaza หมายถึง crude-honey-like substanceในภาษาฝรั่งเศส หรือคำว่า melasse ซึ่งใช้ในภาษาเยอรมันและดัชท์ด้วย และสุดท้ายกลายมาเป็นคำว่า molasses (Paturau, 1987) กากน้ำตาลมี 3 ชนิด คือ

1. blackstrap molasses หรือ final molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาว มีปริมาณน้ำตาล 50-60 เปอร์เซ็นต์ การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจะใช้กากน้ำตาลประเภทนี้เป็นวัตถุดิบ

2. refinery molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 48 เปอร์เซ็นต์

3. highest molasses หรือ invert molasses ซึ่งผลิตโดยนำน้ำอ้อยมาแปรรูปเป็นน้ำตาลโดยเอนไซม์ invertase ได้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส แล้วระเหยให้ข้นเป็นน้ำเชื่อม ดังนั้น hightest molasses จึงไม่ใช่กากน้ำตาลที่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ 77 เปอร์เซ็นต์

กากน้ำตาลต่างชนิดกันจะมีองค์ประกอบและคุณสมบัติต่างกัน ความแตกต่างนี้แม้ในกากน้ำตาลชนิดเดียวกันก็ยังต่างกันอีกด้วย ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับท้องถิ่นที่ทำการผลิต กรรมวิธีของโรงงาน ฤดูกาล และสภาพการเก็บ ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะใช้ blackstrap molasses เป็นหลัก ซึ่งมีน้ำตาลส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส และมี growth factor ต่างๆ มากกว่า refinery molasses blackstrap molasses หรือ final molasses คือของเหลวข้นที่ได้จากการตกผลึกน้ำตาลครั้งสุดท้ายแล้วนำไปปั่นแยกเอาผลึกน้ำตาลซูโครสออก ส่วนที่เหลือก็คือ กากน้ำตาล ซึ่งเป็น residual syrup ไม่สามารถตกผลึกน้ำตาลซูโครสโดยกรรมวิธีง่ายๆได้อีกแล้ว การผลิตน้ำตาลจากอ้อยจะได้กากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้ 2.2-3.7 เปอร์เซ็นต์

กากน้ำตาลอ้อยมีองค์ประกอบซับซ้อน องค์ประกอบของกากน้ำตาลแสดงในตารางที่ 2 ค่าที่ได้เป็นค่าที่พบในกากน้ำตาลของหลายประเทศที่มีการผลิตน้ำตาล ความถ่วงจำเพาะของกากน้ำตาลมีค่าเท่ากับ 1.39-1.49 องค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลที่เป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมน้ำตาล คือ คาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโตส กากน้ำตาลบีทจะมีน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสในปริมาณน้อย แต่จะมีน้ำตาลราฟฟิโนสเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งต่างจากกากน้ำตาลอ้อย กากน้ำตาลอ้อยและกากน้ำตาลบีทมีส่วนที่เป็นสารประกอบอนินทรีย์ในปริมาณสูง มีวิตามินและสารที่จำเป็นสำหรับการเจริญ (growth factors) ในปริมาณที่แตกต่างกัน รวมทั้งสารประกอบไนโตรเจนดังตารางที่ 3 และสารประกอบอินทรีย์

อื่นๆอีกหลายชนิด เช่น chlorogenic และ caffeic acids uronic acids sugar alcohol organic acids amino acids nucleotides sterols tannins plant pigments gums waxes และ lipids โดยเฉพาะกากน้ำตาลบีทจะมีสารประกอบพวก non-amino acid nitrogen-containing substances อยู่ในปริมาณสูง เช่น betaine และ polyamine ชนิดต่างๆ การนำกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลมักจะเกิดปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น osmophilic yeasts หรือจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักเอทานอล ซึ่งสามารถเจริญได้ในภาวะที่มีปริมาณ dry matter มากกว่า 65 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป และในบางครั้งก็สามารถพบสปอร์ของราและแบคทีเรียในกากน้ำตาลที่เก็บรักษาในถังเก็บที่มีช่องว่างระหว่างระดับของกากน้ำตาลกับถังเก็บ ที่จะมีการกลั่นตัวของไอน้ำในอากาศที่อยู่ระหว่างช่องว่างนี้ ส่งผลให้บริเวณผิวของกากน้ำตาลที่มีการกลั่นตัวของไอน้ำเจือจางลง จึงลด osmotic effects ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ (Stowell และคณะ, 1987)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2 องค์ประกอบของกากน้ำตาล (Stowell และคณะ, 1987)

Carbohydrates	Percentage values of				
	Solids	Sugars	Sucrose	Invert	Raffinose
Blackstrap	80-86	50-65	30-40	10-25	
Beet	76-85	48-58	47-55	0.2-2	0.2-2
Refinery	76-84	50-58	32-42	14-20	
High test	82-86	72-75		72-75	
(Non-sugar organic matter 9-20%, ash 5-20 %)					

Vitamins (mg/kg)	Cane	Beet
Biotin	3	0.4
Folic acid	0.04	0.2
Inositol	6000	8000
Pantothenate	55	100
Pyridoxin	3	5
Riboflavin	3	0.4
Thaiamine	2	1.3
Nicotinic acid	800	45
Choline	600	400

Minerals (%)	Cane	Molasses
Sodium	0.1-0.4	0.3-0.7
Potassium	1.5-5..0	2.0-7.0
Calcium	0.4-0.8	0.1-0.5
Chloride	0.7-3.0	0.5-1.5
Phosphorus	0.03-0.1	0.02-0.1
Sulphur	0.3-0.8	0.15-0.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 สารประกอบไนโตรเจนต่างๆที่พบในกากน้ำตาล (Paturau, 1987)

Nitrogenous compounds	Usual range %	Indicative average express %(molasses)
Nitrogenous compounds	2.5-4.50	4.0
Crude proteins	0.3-0.5	0.5
Amino acids		
	Mg per g molasses	
Alanine	0.20-0.02	
r-Aminobutyric acid	0.06-0.08	
Aspatic acid	0.90-1.65	
Glutamic acid	1.02-1.04	
Glycerine	0.06-0.07	
Leucine	0.03-0.05	
Lysine	0.05-0.07	
Serine	0.39-0.80	
Threonine	0.30-0.90	
Valine	0.11-0.20	

3. ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

3.1 **ความเข้มข้นของเอทานอล** ความเข้มข้นของเอทานอลเป็นปัจจัยอันดับแรกที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยส่งผลต่อการเจริญของยีสต์และการหมักเอทานอล การยับยั้งเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นก็จะมีผลให้อัตราการเจริญเริ่มลดลง ส่วนความสามารถในการทนต่อเอทานอลความเข้มข้นสูงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ของยีสต์เพียงบางจีนัส ได้แก่ *Saccharomyces* และ *Schizosaccharomyces* โดยพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่มีผลต่อการเจริญและการหมัก คือ 10 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร และ 20 เปอร์เซ็นต์น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ผลของการยับยั้งที่เกิดจากเอทานอลสามารถยับยั้งอัตราการเจริญและการมีชีวิตของเซลล์ พบว่าหากมีการเติมเอทานอลในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะ log phase มีผลทำให้อัตราการเจริญและอัตราการสร้างเอทานอลลดลงอย่างรวดเร็ว แต่พบว่ามีผลต่อการเจริญมากกว่าการหมักเอทานอล (Brown และคณะ, 1981)

3.2 **ชนิดของสับสเตรต** สับสเตรตที่นำมาผลิตเอทานอลมีหลายชนิด ได้แก่ ประเภทน้ำตาล (กากน้ำตาล อ้อย และน้ำอ้อย) ประเภทแป้ง (แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง) เซลลูโลส (ฟางข้าว วัชพืช และเศษไม้เหลือทิ้ง) และของเสียจากโรงงานผลไม้กระป๋อง ชนิดของสับสเตรตเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล เพราะสับสเตรตแต่ละชนิดสามารถให้ผลได้ของเอทานอลต่อสับสเตรต ($Y_{p/s}$) แตกต่างกันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสับสเตรตที่นำมาใช้ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ผลได้ของเอทานอลต่อสับเสตรตและองค์ประกอบของสับเสตรตที่นำมาผลิตเอทานอล (Kim และ Dale, 2004)

	Dry matter (%)	Lignin (%)	Carbohydrates (%)	Ethanol yield (L kg^{-1} of dry biomass)
Barley	88.7	2.90	67.10	0.41
Barley straw	81.0	9.00	70.00	0.31
Corn	86.2	0.60	73.70	0.46
Corn stover	78.5	18.69	58.29	0.29
Oat	59.1	4.00	65.50	0.41
Oat straw	90.1	13.75	59.10	0.26
Rice	88.6		87.50	0.48
Rice straw	88.0	7.13	49.33	0.28
Sorghum	89.0	1.40	71.60	0.44
Sorghum straw	88.0	15.00	61.00	0.27
Wheat	89.1		35.85	0.40
Wheat straw	90.1	16.00	54.00	0.29
Sugarcane	26.0		67.00	0.50
Bagasse	71.0	14.50	67.15	0.28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 **ความเข้มข้นของสับสเตรต** การใช้สับสเตรตความเข้มข้นสูงในการหมักเอทานอลเป็นการลดปริมาณน้ำที่ใช้สำหรับเจือจางสับสเตรตที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล แต่ในขณะที่การใช้สับสเตรตความเข้มข้นสูงซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลสูงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล การยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้ส่วนหนึ่งเกิดจากแรงดันออสโมซิส ซึ่งเซลล์ของยีสต์จะเกิด plasmolysis เมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลที่สามารถยับยั้งการหมักนั้น แท้ที่จริงแล้วเกิดจากลักษณะของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งหากความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะส่งผลให้อัตราการหมักเริ่มต้นลดลง แต่ผลการยับยั้งที่เกิดจากน้ำตาลนี้น้อยกว่าผลของความเข้มข้นของเอทานอล หรืออาจเป็นผลยับยั้งร่วมกันระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลและความเข้มข้นของเอทานอล (Jones, Pamment และ Greefield, 1981)

3.4 **วิตามิน** ยีสต์ทั่วไปต้องการวิตามินสำหรับการเจริญ ยีสต์ทำขนมปังทุกสายพันธุ์ต้องการไบโอติน กรดแพนโททินิค และอินโนซิทอล (Rosen, 1977) โดยทั่วไปกากน้ำตาลมีวิตามินเหล่านี้อยู่เพียงพอ และพบว่าไบโอตินมีความสำคัญการผลิตเอทานอล คือ เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชั่น โดยปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ 0.05-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Jones และคณะ, 1981)

3.5 pH โดยทั่วไปยีสต์ส่วนมากเจริญได้ดีในช่วง pH 3.5-7.0 ค่า pH เริ่มต้นและ buffer capacity ของการหมักเอทานอลมักอยู่ในสภาพที่ยีสต์จะเกิดการกหมักได้ตลอดกระบวนการหมัก เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการสร้างกรดโดยยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญอยู่ด้วย (Rose และ Harrison ,1970) จึงต้องมีการปรับ pH เพื่อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมและเพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญอยู่ด้วย ดังนั้นจึงปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4.0-4.5 (Bazas, Dallman และ Szajani,1989) หรือ 4.0-5.0หรือ 4.8-5.0 (Paturau, 1987) ด้วยกรดซัลฟิวริคเข้มข้น หรือ mineral acid อื่นๆ อย่างไรก็ตาม pH ที่ให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงสุดย่อมขึ้นอยู่กับคุณภาพของกากน้ำตาลที่ใช้ และพบว่าการหมักน้ำตาลซูโครสจะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลง pH มากกว่าการหมักน้ำตาลกลูโคส ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ invertase จะเปลี่ยนแปลงที่ pH ต่ำมากกว่า (Jones และคณะ, 1981)

3.6 **อุณหภูมิ** ในระหว่างการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้น โดยกลูโคส 1 โมเลกุลจะให้ปริมาณความร้อน 26 แคลอรี่ดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 26.0 \text{ แคลอรี่}$$

ยีสต์ส่วนใหญ่จะเจริญได้รวดเร็วที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์ทั่วไปสามารถเจริญได้คือ 30-40 องศาเซลเซียส มียีสต์บางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่

อุณหภูมิสูงกว่านี้เล็กน้อย ไม่มีรายงานว่ามียีสต์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ปัจจัยที่สำคัญที่จุลินทรีย์สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากน้อยต่างกันมีหลายประการ เช่น การสังเคราะห์เอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ กลไกการควบคุมภายในเซลล์ การถ่ายทอด anaerobic information จากยีสต์ไปยังไรโบโซม การนำอาหารเข้ามาภายในเซลล์ และองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น การเพาะเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะเพิ่มอัตราการเกิด respiration dificiency “petite” mutant มากกว่าปกติ (Hutter และ Oliver,1998) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส เนื่องจากปฏิกิริยาการหมักเอทานอลเกิดความร้อนทำให้อุณหภูมิในถังหมักสูงขึ้น ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะต้องลดอุณหภูมิของถังหมักลงและรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 32-33 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส โดยวิธีการต่างๆเช่น การพ่นน้ำให้เป็นฝอยทั่วผิวนอกของถังหมัก ใช้ cooling coil ในถังหมัก หรือผ่านส่าออกไปทำให้เย็นลงนอกถังหมัก (Paturau, 1987)

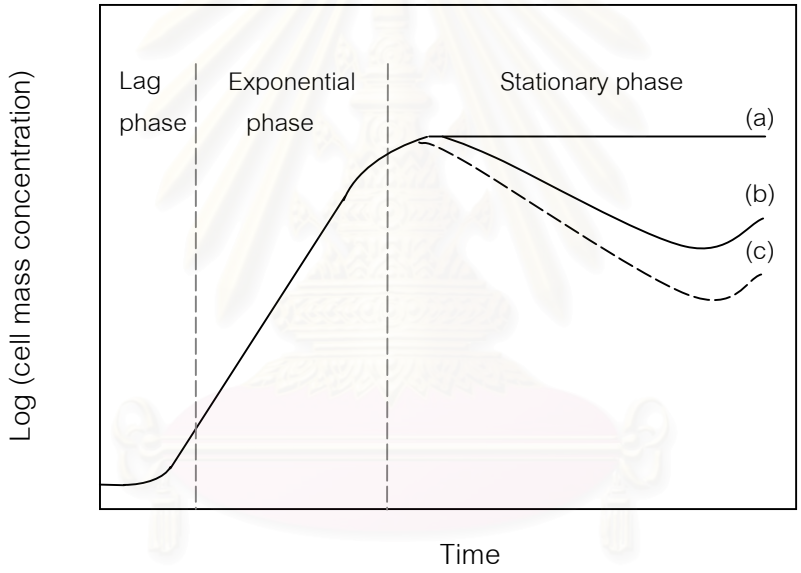
3.7 **ออกซิเจน** ออกซิเจนมีบทบาทต่อกระบวนการหมักเอทานอล โดยพบว่าออกซิเจนมีหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็คตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็น growth factor ที่ดีของยีสต์ โดยเกี่ยวข้องการสังเคราะห์ไขมันที่มีพันธะคู่ รวมทั้งกรดโอเลอิค (oleic acid) กรดลิโนลีอิค (linoleic acid) และ ergosterol ซึ่งนอกจากช่วยส่งเสริมการหายใจภายใต้ภาวะที่ปราศจากออกซิเจนของยีสต์แล้ว ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการทนต่อเอทานอลของยีสต์ (Jones และคณะ, 1981)

3.8 **คาร์บอนไดออกไซด์** คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในความดันที่สูงกว่าบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์จะยับยั้งการเจริญและการหมักได้มากขึ้น เช่นเดียวกันกับในภาวะที่อาหารมี pH ต่ำ และมีเอทานอลเข้มข้นสูง คาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งปฏิกิริยา decarboxylation ดังสมการ

พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมบางอย่างของเอนไซม์ เปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึมได้ และการขนส่งของตัวถูกละลาย ความสัมพันธ์นี้ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงผลที่มีต่อการผลิตเอทานอล ซึ่งส่งผลโดยรวมให้อัตราการผลิตเอทานอลและการสร้างชีวมวลลดลง (Jones และคณะ, 1981)

4. กระบวนการหมักแบบแบตช์ (Batch culture)

เป็นกระบวนการหมักที่ทำได้โดยการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ภายในระบบปิด การเลี้ยงเชื้อนิยมทำในขวดเขย่าหรือในถังหมัก โดยใช้สารอาหารและภาวะต่างๆเช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการเติบโต สารอาหารที่ใช้ในระบบมีปริมาณจำกัด เพราะไม่มีการเติมสารอาหาร ภาวะในระบบมีการเปลี่ยนแปลง สารอาหารถูกใช้หมดไป ความเป็นกรดด่างเปลี่ยนไป มีการสะสมสารพิษ เป็นต้น (Aiba และคณะ,1973 ; Scragg,1988) เมื่อเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์จะมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้น โดยจุลินทรีย์จะใช้สารอาหารที่มีอยู่จนหมด และมีการสร้างผลิตภัณฑ์และสารอื่นๆ ออกมา ซึ่งสามารถแสดงความสัมพันธ์ระหว่างมวลเซลล์ที่เปลี่ยนไปกับเวลาดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 ลักษณะการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ (Wang และคณะ,1979)

a) มวลเซลล์ไม่เกิดการสลายตัว

b) มวลเซลล์เกิดการสลายตัวแล้วเกิดการเจริญแบบคริปติก (cryptic growth)

c) จำนวนเซลล์มีชีวิตเมื่อเกิดการสลายตัว

4.1 จลน์ศาสตร์การเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ (Kinetics of batch culture)

อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate, μ)

การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับน้ำหนักเซลล์แห้ง (dry cell weight) เมื่อเทียบกับปริมาณเซลล์เริ่มต้นในช่วงการเจริญแบบทวีคูณของจุลินทรีย์ น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่า และเวลาที่ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าทำให้ได้ความสัมพันธ์ดังนี้ (Scragg,1988)

$$n = t / t_d \quad (1)$$

เมื่อ n คือ จำนวนของการแบ่งตัวเพิ่มเป็นสองเท่า (number of doublings)

t คือ เวลา (ชั่วโมง)

t_d คือ เวลาที่ใช้ในการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (ชั่วโมง)

ชีวมวลที่เกิดขึ้นหลังจากเวลา t คือ

$$X_t = X_0 2^n = X_0 2^{t/td} \quad (2)$$

ใส่ natural logarithm ในสมการ (2)

$$\ln (X_t / X_0) = \ln 2 \, . \, t / t_d \quad (3)$$

เมื่อ X_t คือ ความเข้มข้นของชีวมวลที่เวลา t ใดๆ (กรัมต่อลิตร)

X_0 คือ ความเข้มข้นของชีวมวลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

ทำการจัดรูปแบบสมการ (3) ใหม่

$$\frac{\ln X_t - \ln X_0}{t} = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{0.693}{t_d} = \mu \quad (4)$$

ถ้าต้องการหาอัตราการเจริญจำเพาะที่เวลาใดๆในช่วงระหว่างการเจริญสามารถหาได้จาก น้ำหนักเซลล์แห้งที่สะสม = เซลล์ที่เจริญ – เซลล์ออก – เซลล์ตาย

$$dX / dt = \mu X - \frac{F.X}{V} - \alpha X \quad (5)$$

เมื่อ F คือ อัตราการไหลออกของอาหาร (ลิตรต่อชั่วโมง)

V คือ ปริมาตรของอาหาร (ลิตร)

α คือ อัตราการตายจำเพาะ (ชั่วโมง$^{-1}$)

เซลล์ไม่มีการไหลออกจากระบบ และ $\alpha <<< \mu$ สามารถเขียนสมการได้ใหม่คือ

$$\mu = \frac{1}{X} \cdot \frac{dX}{dt} \qquad (6)$$

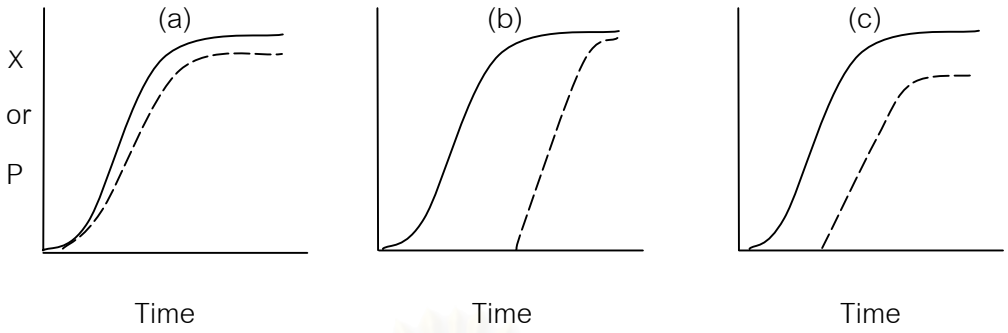
แบคทีเรียบางชนิดมีค่า t_d ที่น้อยมากเพียง 15-20 นาที ภายใต้ภาวะที่เหมาะสม แต่โดยทั่วไปแบคทีเรียจะมีค่า t_d ประมาณ 45-60 นาที ส่วนยีสต์ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมจะมีค่า t_d อาจสั้นเพียง 45 นาที แต่โดยปกติจะมีค่า t_d ประมาณ 90-120 นาที และราซึ่งมีการเจริญช้ากว่าแบคทีเรียและยีสต์ หากเลี้ยงราภายใต้ภาวะที่เหมาะสมจะมีค่า t_d เพียง 60-90 นาที ซึ่งโดยปกติราจะมีค่า t_d ประมาณ 4-8 ชั่วโมง

4.2 จลน์ศาสตร์ของการใช้อาหารและการสร้างผลิตภัณฑ์ (Kinetics of nutrient utilisation and product formation)

เมื่อทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารที่เหมาะสม จุลินทรีย์จะใช้อาหารไปสำหรับการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ออกมา ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์จำแนกได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่

1. การสร้างผลิตภัณฑ์เกิดสัมพันธ์ไปกับการเจริญ (growth associated product formation)
2. การสร้างผลิตภัณฑ์ไม่สัมพันธ์กับการเจริญ (non growth associated product formation)
3. แบบผสมระหว่างแบบ 1 และ แบบ 2 (mixed growth associated product formation)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4 รูปแบบของจลน์ศาสตร์การเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ (Wang และคณะ, 1979)

a) การสร้างผลิตภัณฑ์เกิดสัมพันธ์ไปกับการเจริญ

b) การสร้างผลิตภัณฑ์ไม่สัมพันธ์กับการเจริญ

c) แบบผสมระหว่างแบบ 1 และ แบบ 2

การหมักทั่วไปนั้น ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์นั้นมักจะเป็นแบบใดแบบหนึ่งของสองแบบแรก เช่น การหมักเอทานอลหรือกรดอะมิโนเป็นการหมักรูปแบบแรก ส่วนการผลิตสารปฏิชีวนะหรือเอนไซม์เป็นการหมักรูปแบบที่สอง แต่ก็มีการหมักบางชนิดที่เป็นไปในรูปแบบที่สาม กล่าวคือจุลินทรีย์จะเจริญขึ้นมาก่อนในระยะหนึ่ง จากนั้นจึงเริ่มสังเคราะห์ผลิตภัณฑ์ควบคู่กันไปกับการเจริญซึ่งยังดำเนินอยู่ เช่น การผลิตกรดนมหรือกรดแลกติก เป็นต้น แบบการเจริญทั้ง 3 ประเภท แสดงในรูปที่ 4

ผลได้เซลล์ต่อสับสเตรต (biomass yield from substrate, $Y_{x/s}$) **และผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรต** (product yield from substrate)

การเลี้ยงจุลินทรีย์ อาหารที่ถูกใช้ไปย่อมมีความสัมพันธ์กับการสร้างมวลของเชื้อ (การเจริญ) และการสร้างผลิตภัณฑ์ ความสัมพันธ์ของผลได้เซลล์ต่อสับสเตรต และผลได้สารผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรต ($Y_{x/s}$ และ $Y_{p/s}$) คือ พารามิเตอร์ที่บอกถึงประสิทธิภาพการเปลี่ยนแปลงสารอาหารไปเป็นชีวมวล หรือเป็นสารผลิตภัณฑ์ โดยสามารถอธิบายเป็นชีวมวล หรือมวลของสารผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้นต่อสารอาหารที่ใช้ไป ดังนี้

$$dX / dt = - Y_{x/s}. dS / dt \quad (7)$$

และ $$dP/ dt = - Y_{p/s}. dS / dt \quad (8)$$

ค่าผลผลิต (yield) สามารถหาได้โดยการหาปริมาณชีวมวลรวม หรือมวลของสารผลิตภัณฑ์ และสารอาหารที่ใช้ไป

$$Y_{x/s} = \Delta X / \Delta S \quad (9)$$

$$Y_{p/s} = \Delta P / \Delta S \quad (10)$$

$$Y_{p/x} = Y_{p/s} / Y_{x/s}$$

$$= \Delta P / \Delta X \quad (11)$$

อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ(specific production rate, q_p)

การหาประสิทธิภาพของการหมัก นอกจากจะแสดงในรูปของประสิทธิภาพการสร้างมวลและประสิทธิภาพการสร้างผลิตภัณฑ์จากอาหารแล้ว ยังสามารถหาได้ในรูปของ อัตราการใช้สารอาหารจำเพาะ (specific substrate uptake rate, q_s) และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (specific product formation rate, q_p)

อัตราเร็วการสร้างผลิตภัณฑ์ = ผลิตภัณฑ์ที่สร้าง – ผลิตภัณฑ์ที่ออกจากถังหมัก – ผลิตภัณฑ์ที่ถูกทำลาย

$$\frac{dP}{dt} = (q_p X) - \frac{F_0 P}{V} - kP \quad (12)$$

เนื่องจากการเลี้ยงแบบแบตช์ไม่มีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกจากถังหมัก ดังนั้น $(F_0 P)/V$ จึงเท่ากับศูนย์ และผลิตภัณฑ์ที่ถูกทำลายมีค่าน้อยมากเมื่อเทียบกับการสร้างผลิตภัณฑ์ในระหว่างการหมัก ดังนั้น kP จึงไม่นำมาคิด เมื่อเขียนสมการที่ (12) ใหม่จะได้เป็น

$$\frac{dP}{dt} = (q_p X) \quad (13)$$

$$q_p = \frac{1}{X}\frac{dP}{dt} \quad (14)$$

เมื่อ q_p คือ อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (specific substrate uptake rate) ($g\ g^{-1}\ h^{-1}$)

X คือ มวลของจุลินทรีย์ ($g\ l^{-1}$)

$\frac{dP}{dt}$ คือ อัตราเร็วในการสร้างผลิตภัณฑ์ ($g\ l^{-1}\ h^{-1}$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. กระบวนการหมักแบบ รีพีท-แบตช์ (Repeated-batch culture)

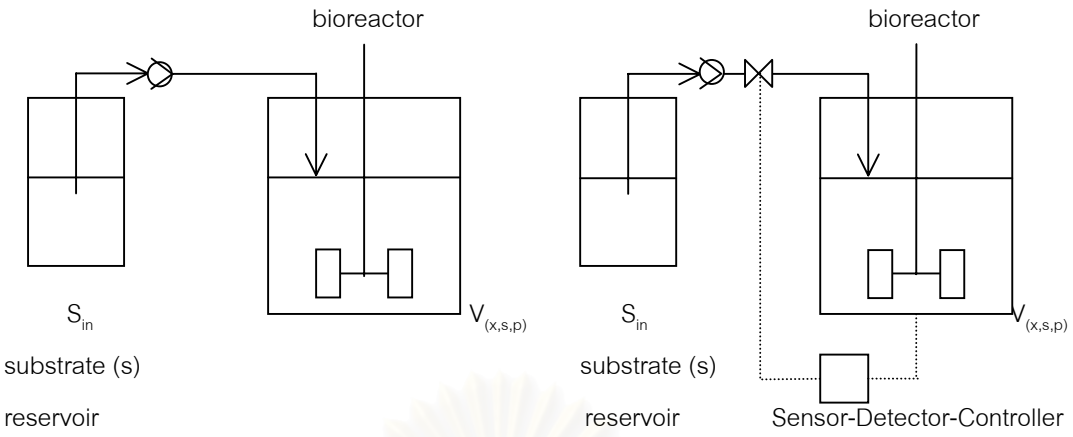
การหมักแบบ รีพีท แบตช์ เป็นการหมักแบบแบตช์อย่างหนึ่ง แต่การหมักแบบรีพีท แบตช์ จะมีการนำน้ำหมักออกจากถังหมักออกไปส่วนหนึ่ง และเหลือน้ำหมักอีกส่วนสำหรับเป็นกล้าเชื้อในการหมักรอบต่อไป โดยมีการเติมอาหารเข้าไปใหม่ด้วยปริมาตรเท่ากับปริมาตรของน้ำหมักที่นำออกมา (Nishizawa และคณะ,1984 ; Rokas, 1996) โดยมีการปรับปรุงกระบวนการหมักแบบ รีพีท-แบตช์ ไปใช้ร่วมกับวิธีอื่นๆ เช่น การนำเซลล์ที่ถูกตรึงมาใช้กับการหมักแบบรีพีท-แบตช์ จะให้ผลผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ปกติที่ไม่ถูกตรึง (Rokas, 1996)

7. กระบวนการหมักแบบ เฟด-แบตช์ (Fed-batch culture)

มีผู้ได้ให้คำจำกัดความของการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์ ว่าเป็นกระบวนการหมักแบบเติมสารอาหารที่จำเป็นอย่างต่อเนื่องแล้วหยุด หรือใส่เป็นครั้งคราว และไม่มีการดึงเอาสารผลิตภัณฑ์ออกจากระบบจนกว่าสิ้นสุดการหมัก วิธีการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์ เริ่มต้นใช้ในการผลิตยีสต์ตั้งแต่ประมาณปี 1900 สำหรับควบคุมการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* ในการเลี้ยงแบบแบตช์โดยใช้มอลท์เป็นแหล่งคาร์บอน การผลิตยีสต์นี้มีปัญหาอยู่สองประการคือ ประการแรก ถ้าความเข้มข้นของมอลท์สูงเกินไปในอาหารเลี้ยงเชื้อทำให้มีเอทานอลเกิดขึ้นแทนการผลิตเป็นชีวมวล ประการที่สองคือ ถ้าความเข้มข้นของมอลท์ถูกควบคุมให้น้อยที่สุด การเจริญของยีสต์ก็จะถูกจำกัด ปัญหานี้ได้ถูกแก้โดยการหาวิธีควบคุมการเติมอาหารให้พอเหมาะกับการเจริญ

7.1 วิธีการควบคุมสำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์

วิธีการที่จะควบคุมการเลี้ยวเชื้อแบบแบบ เฟด-แบตช์ เพื่อให้ง่ายในการใช้งาน มีการแบ่งไว้เป็นสองกลุ่มหลัก คือ with feedback control และ without feedback control ดังแสดงในรูปที่ 5 การเลี้ยงเชื้อแบบแบบ เฟด-แบตช์ จึงอาจมีการเรียกชื่อแตกต่างกัน บางครั้งเรียกว่า “semi-batch” ในอังกฤษ ในเยอรมันเรียก “zulaufverfahrem” และในญี่ปุ่นเรียก “ryukaho” (Asenjo และ Merchuk, 1995)



รูปที่ 5 แผนภาพการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์ (Asenjo และ Merchuk, 1995)

การเลี้ยงเชื้อแบบ with feedback control แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

1. indirect feedback control การควบคุมต้องอาศัยข้อมูล หรือพารามิเตอร์ที่เกี่ยวกับการหมัก ซึ่งเกี่ยวกับสารตั้งต้น เช่น การละลายของออกซิเจน อัตราส่วนของการหายใจ (เช่น CO_2/O_2) และความเป็นกรดด่าง

2. direct feedback control เป็นวิธีการติดตามความเข้มข้นของสารอาหารในการเลี้ยงเชื้อโดยตรงเฉพาะสารตั้งต้นสามารถรักษาให้คงที่ หรือสามารถแปรผันเพื่อรักษาความเข้มข้นให้พอเหมาะ และการควบคุมการเติมอาหารระบบ with feedback control สามารถจัดการให้เป็นระบบเปิด (open-loop system) หรือระบบปิด (closed-loop system)

ในระบบ Without Feedback Control การเติมสารอาหารสามารถเติมด้วยอัตราที่คงที่ เช่น ปรับอัตราการเติมของปั๊ม เติมแบบทวีคูณ (exponential feeding) ให้สัมพันธ์กับการเพิ่มของชีวมวล หรือเติมทุกๆชั่วโมง

7.2 ข้อได้เปรียบของวิธีการเลี้ยงแบบ เฟด-แบตช์

1) สามารถใช้สารที่ยับยั้งการเจริญหรือเป็นพิษต่อเซลล์เช่น กรดอินทรีย์ เมธานอล สารอโรมาติกบางชนิดเป็นสารตั้งต้นได้

2) สามารถเพิ่มชีวมวลได้มากกว่าการเลี้ยงแบบ แบตช์ รวมทั้งสามารถเพิ่มผลผลิตโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่เป็น growth associated products

3) การผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งมีการผลิตไม่

สัมพันธ์กับการเจริญ (non growth-related production) เช่น ผลิตสารเมื่อจุลินทรีย์เริ่มเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบคงที่ ในกรณีนี้อัตราการเติมสารอาหารสามารถควบคุมในช่วงเริ่มต้นให้ผลิตชีวมวลสูง หลังจากนั้นเมื่อจุลินทรีย์เข้าสู่ช่วงการเจริญแบบคงที่ และเจริญช้าลง จึงเติมอาหารให้เพียงพอสำหรับเป็นพลังงานเพื่อรักษากิจกรรมของเซลล์ไว้ขณะที่การสร้างสารผลิตภัณฑ์กำลังเกิดขึ้น

4) ไม่เกิด catabolite repression

5) ลดความหนืดของอาหาร เช่น การผลิต dextran และ xanthan gum

6) ไม่เกิดปัญหาการปนเปื้อน การกลายพันธุ์ และความไม่คงตัวของพลาสมิด ซึ่งพบในการเลี้ยงแบบต่อเนื่อง

7.3 ข้อเสียเปรียบของวิธีการเลี้ยงแบบ เฟด-แบตช์

1) อุปกรณ์การเลี้ยงแบบ feed back control ค่อนข้างมีความซับซ้อนและมีราคาสูง

2) ในระบบ without feed back control การเติมอาหารจะต้องมีการหารูปแบบการเจริญไว้ก่อนแล้ว เพื่อเป็นการคาดคะเนถึงรูปแบบของการเบี่ยงเบนการเจริญของเชื้อ เช่น time course อาจไม่เป็นไปตามรูปแบบที่คาด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และเคมีภัณฑ์

1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น 3400CX	Varian, USA.
แพค คอลัมน์ (packed column) ชนิด 10%OV-101 Chromosorb W AW-DMCS ขนาด 2 m. x 1/8"(I.D.)	Varian, USA.
เครื่องผลิตก๊าซไฮโดรเจน (hydrogen generator) รุ่น 9200	Packard, USA.
เครื่องผลิตอากาศ (air compressor) รุ่น WL505000AJ	Campbell Hausfeld, USA.
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psycrotherm incubator shaker) รุ่น G27 แบบ rotary	New Brunswick Scientific, USA.
ถังหมัก (fermentor) ขนาด 5 ลิตร รุ่น MBF500-ME ชุดควบคุม รุ่น EPC1000 และ เครื่องอัดอากาศ รุ่น MAU-2	Eyela, Tokyo, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (digital Water Bath) รุ่น SB-651	Eyela, Tokyo, Japan
อุปกรณ์หล่อเย็น (circulation Cooler) รุ่น CA-1111	Tokyo Rikakikai, Japan
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น L2200P	Sartorius, Germany
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น PG2002-S	Beckman, USA
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น AG285	Beckman, USA
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น A200S	Hettich,Germany
เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น KS-3000P	Kubota, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ รุ่น J-30I	Beckman, USA

1.1 อุปกรณ์ (ต่อ)

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น genesys 20	USA
อุปกรณ์หล่อเย็น (circulation Cooler) รุ่น CA-1100	Tokyo Rikakikai, Japan
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น 2000	Cyberscan, Singapore
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	ISSCO, USA.
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60	Memmert, Germany
ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL60	Memmert, Germany
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy, Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) รุ่น W760	Memmert, Germany

1.2 เคมีภัณฑ์

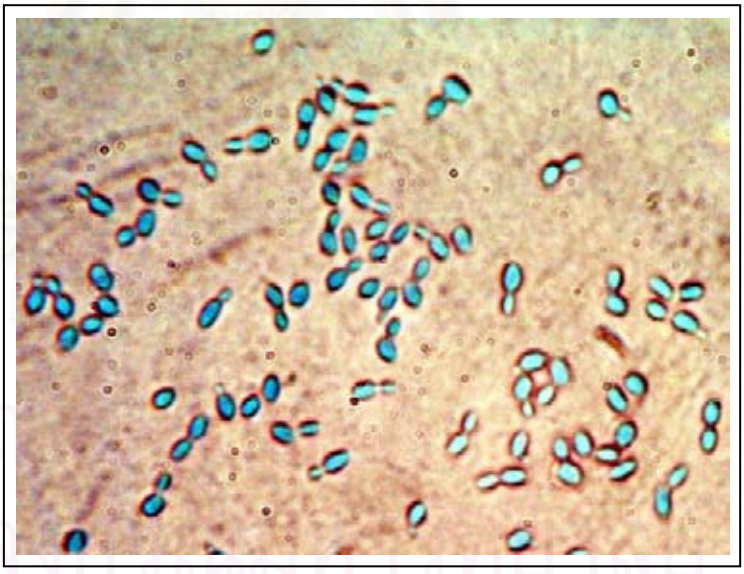
สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
กากน้ำตาลอ้อย	หจก. ว.ภัทร, ประเทศไทย
กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4)	E. Merk Damstadt, Germany
กลูโคส (analytical grade)	Fluka, Germany
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต ($CaCl_2.2H_2O$)	E. Merk Damstadt, Germany
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($ZnSO_4.7H_2O$)	Carlo Erba, Italy
ซูโครส ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	E. Merk Damstadt, Germany
ซูโครส (น้ำตาลทราย)	มิตรผล ประเทศไทย
โซเดียมกลูตาเมต ($NaC_5H_8O_4$)	E. Merk Damstadt, Germany
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	ปรุงทิพย์ ประเทศไทย
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)	Carlo Erba, Italy
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคาไฮเดรต ($Na_2HPO_4.12H_2O$)	E. Merk Damstadt, Germany
บิวทานอล (C_4H_9OH)	E. Merk Damstadt, Germany
พอลิเปปโตน (polypeptone)	Difco, USA

1.2 เคมีภัณฑ์ (ต่อ)

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต,ประเทศ
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Univar, Australia
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	Carlo Erba, Italy
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Difco, USA
เอทานอล (C_2H_5OH)	E. Merk Damstadt, Germany
เอนไซม์อินเวอร์เทส (gradeV EC3.2.1.26)	Sigma Chemical, USA
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	E. Merk Damstadt, Germany
แอมโมเนียมเฟอรัสซัลเฟตเฮกซาไฮเดรต $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$	E. Merk Damstadt, Germany

2. จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ คือ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SKP1 ดังรูปที่ 6



รูปที่ 6 ลักษณะรูปร่างของ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ SKP1 ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาเชื้อ (stock culture medium) คือ YPD medium (Yeast peptone dextrose medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
พอลิเปปโตน	20	กรัม
กลูโคส	20	กรัม
วุ้นผง	18	กรัม

ปรับ pH เป็น 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium) คือ อาหาร BSM (Basal salt medium) ใช้สูตรของ Winter, Luret และ Uribelarrea (1989) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต	3	กรัม
โซเดียมกลูตาเมต	1	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคาไฮเดรต	3	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.25	กรัม
แมกนีเซียมเฮปตาไฮเดรต	0.25	กรัม
แอมโมเนียมเฟอรัสซัลเฟตเฮกซาไฮเดรต	1.5	มิลลิกรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	5	มิลลิกรัม
กลูโคส	40	กรัม

ปรับ pH เป็น 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอทานอล คือ

กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลรวม	165	กรัม/ลิตร

(วิธีการเตรียมดังภาคผนวก ก)

ปรับ pH เป็น 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. วิธีการเก็บรักษาเชื้อและเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

4.1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษากล้าเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำมาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ (sub culture) ทุก 3 เดือน

4.2 การทำให้เชื้อบริสุทธิ์

นำเชื้อที่เก็บรักษาไว้มาเขี่ยลากเชื้อ (streak) ลงบนอาหารแข็ง YPD medium ในจานเพาะเชื้อ (ที่มีการเติมเอทานอล 95%(v/v)หลังจากนึ่งฆ่าเชื้อแล้วทิ้งให้เย็น 45-50 องศาเซลเซียส ให้มีเอทานอลในอาหาร 5 เปอร์เซ็นต์ (จรัญ เจตนะจิตร, 2525)) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.3 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ

นำเชื้อบริสุทธิ์มาเขี่ยลากเชื้อลงบนอาหารใหม่ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ กระจายเชื้อ (resuspend) แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4

5. วิธีดำเนินการวิจัย

การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 เพื่อผลิตเอทานอล

5.1 อาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อและศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

ถ่ายกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 จากข้อ 4.3 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (8 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ) ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนโดยแปรผันความเข้มข้น 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณกลูโคสที่เหลือ แล้วเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อ

การผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ในถังหมักแบบแบตช์

5.2 pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลในถังหมัก

เลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ตามข้อ 5.1 โดยเปลี่ยนชนิดของแหล่งคาร์บอนจากกลูโคสมาใช้กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเทียบเท่ากับปริมาณกลูโคสตามข้อ 5.1 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหาร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตเอทานอล (มีกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 3 ลิตร โดยปรับ pH เริ่มต้นตั้งแต่ 4.0 4.5 5.0 อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ ค่า pHของน้ำหมัก และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้

5.3 อัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

เลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ในภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล จากข้อ 5.1 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหาร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตเอทานอล (มีกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 3 ลิตร ปรับ pH เริ่มต้น จากผลการศึกษาในข้อ 5.2 โดยแปรผันอัตราการกวนเท่ากับ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ ค่า pHของน้ำหมัก และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้

5.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

เลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ในภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล จากข้อ 5.1 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหาร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตเอทานอล (มีกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลรวมเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 3 ลิตร ปรับ pH และอัตราการกวนที่ได้จากข้อ 5.2 และ 5.3 โดยแปรผันอุณหภูมิเท่ากับ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ ค่า pHของน้ำหมัก และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้

5.5 ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

เลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ในภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล จากข้อ 5.1 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหาร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตเอทานอล ปริมาตร 3 ลิตร ปรับ pH ,อัตราการกวน และอุณหภูมิที่ได้จากข้อ 5.2, 5.3 และ 5.4 โดยแปรผันความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 220 260 และ 280 กรัมต่อลิตร เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ ค่า pHของน้ำหมัก และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้

การปรับปรุงการหมักเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ด้วยกระบวนการหมักแบบ รีพีท-แบตช์ และเฟด-แบตช์

5.6 การผลิตเอทานอลในการหมักแบบ รีพีท-แบตช์

เลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ในภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล จากข้อ 5.5 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหาร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตเอทานอล ปริมาตร 3 ลิตร อาหารที่ใช้สำหรับป้อนคือกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 672 กรัมต่อลิตร การเลือกช่วงเวลาของการเติมนั้นพิจารณาจากความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหลือในน้ำหมัก จึงได้ป้อนกากน้ำตาลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการป้อนกากน้ำตาลทั้งสองช่วงเวลาให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในถังหมักให้ได้ใกล้เคียงกับความเข้มข้นเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ (165 กรัมต่อลิตร) วิธีดังกล่าวทำโดย ช่วงแรกป้อนกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 672 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ลงในถังหมักที่มีปริมาตรของน้ำหมักเท่ากับ 3150 มิลลิลิตร (ไม่ได้นำน้ำหมักออกเนื่องจากปริมาตรน้ำหมักเวลานั้นไม่มากเกินไป เมื่อเทียบกับปริมาตรถังหมัก) ทำให้ปริมาตรของน้ำหมักหลังจากป้อนกากน้ำตาลเท่ากับ 3750 มิลลิลิตร และช่วงเวลาที่สองป้อนกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 672 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ลงในถังหมักที่มีปริมาตรของน้ำหมักเท่ากับ 3690 มิลลิลิตร โดยก่อนการป้อนกากน้ำตาลมีการนำน้ำหมักออกจากถังหมักเท่ากับปริมาตรที่เติม (450 มิลลิลิตร) ทำให้ปริมาตรของน้ำหมักในถังหมักหลังจากป้อนกากน้ำตาลเท่ากับ 3690 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยที่ชั่วโมงที่มีการป้อนกากน้ำตาล มีการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ ก่อนป้อนกากน้ำตาลและหลังจากป้อนกากน้ำตาล นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ ค่า pHของน้ำหมัก และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้

5.7 การปรับปรุงการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ด้วยการหมักแบบเฟด-แบตช์ เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารสำหรับป้อนเข้า

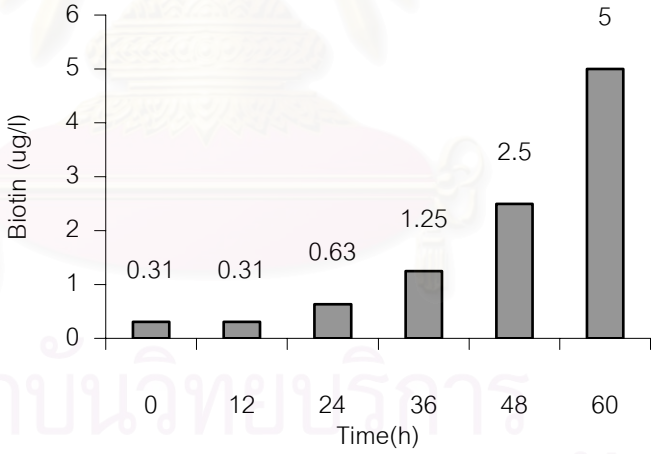
เลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ในภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล จากข้อ 5.5 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหาร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตเอทานอล ปริมาตร 3 ลิตร อาหารที่ใช้สำหรับป้อนคือกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 672 กรัมต่อลิตร กรัมต่อ โดยป้อนกากน้ำตาลปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับที่เวลา 96 ชั่วโมง ปริมาตรของกากน้ำตาลที่เติมพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลที่เหลือและเอทานอลที่ผลิตได้ (เป็นวิธีการควบคุมแบบ direct feedback control แบบ off-line) จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยที่ชั่วโมงที่มีการป้อนกากน้ำตาล มีการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ ก่อนป้อนกากน้ำตาล และหลังจากป้อนกากน้ำตาล นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ ค่า pHของน้ำหมัก และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้

5.8 การปรับปรุงการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ด้วยการหมักแบบเฟด-แบตช์ เมื่อใช้กลูโคสเป็นอาหารสำหรับป้อนเข้า

เลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ในภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล จากข้อ 5.5 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหาร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตเอทานอล ปริมาตร 3 ลิตร เนื่องจากพบว่าข้อจำกัดของความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลสำหรับเติม ไม่สามารถเพิ่มขึ้นให้สูงกว่านี้เพื่อลดปริมาตรของน้ำตาลที่ใช้เติม ซึ่งปริมาตรของน้ำตาลที่ใช้เติมมีผลต่อการเจือจางความเข้มข้นของเอทานอลในถังหมัก ดังนั้นจึงแก้ปัญหาโดยเปลี่ยนอาหารที่ใช้สำหรับเติมจากกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 672 กรัมต่อลิตร มาเป็นกลูโคสเข้มข้น 800 กรัมต่อลิตร ทำโดยป้อนกากน้ำตาลปริมาตร 400 มิลลิตลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยที่ชั่วโมงที่มีการป้อนกากน้ำตาล มีการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ ก่อนป้อนกากน้ำตาล และหลังจากป้อนกากน้ำตาล นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ ค่า pHของน้ำหมัก และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้

5.9 การปรับปรุงการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ด้วยการหมักแบบเฟด-แบตช์ เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารสำหรับป้อนเข้าร่วมกับการป้อนไบโอติน

Winter และคณะ (1989) รายงานว่า *S. cerevisiae* 1 กรัมต้องการไบโอติน 1.8 ไมโครกรัม และการใช้ไบโอตินเริ่มต้น 3-4 ไมโครกรัมต่อลิตร เพียงพอให้เซลล์มีการเจริญและมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด Afenore และคณะ (2002) ศึกษาวิธีการเติมวิตามิน เพื่อช่วยในด้านการปรับปรุงการมีชีวิตของเซลล์ เพื่อทำให้สร้างเอทานอลได้มากขึ้น วิธีการเติมวิตามิน วิธีการหนึ่งคือ การเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล (exponential feeding) คือ การเติมวิตามินเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณจากปริมาณเริ่มต้นที่เติม โดยหาปริมาณวิตามินที่เซลล์ต้องการจากความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด จากนั้นคำนวณหาปริมาณวิตามินที่ใช้จากรายงานของ Winter และคณะ(1989) การคำนวณหาปริมาณวิตามินทั้งหมดที่เซลล์ต้องการจึงเท่ากับ 10.15 ไมโครกรัมต่อลิตร (5.64 กรัมต่อลิตร (คือน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ได้จากกรเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์) x 1.8 ไมโครกรัม/ยีสต์ 1กรัม (จากผลงานวิจัยของ Winter และคณะ 1989 พบว่ายีสต์ 1 กรัม ต้องการไบโอตินในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1.8 ไมโครกรัม) จากนั้นหาปริมาณไบโอตินที่จะในแต่ละช่วง ปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 ปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมสำหรับป้อนที่ระยะเวลาต่างๆระหว่างการเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟด-แบตช์

เลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ในภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล จากข้อ 5.5 ถ่ายกล้าเชื้อให้มีปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น 10 เปอร์เซ็นต์ต่อปริมาตรอาหาร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่มีอาหารเพื่อการผลิตเอทานอล ปริมาตร 3 ลิตร อาหารที่ใช้สำหรับป้อนคือกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 672 กรัมต่อลิตร โดยป้อนกากน้ำตาลปริมาตร 600

มิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง และมีการเติมไบโอตินแบบเอ็กโพเนนเชียล ดังแสดงในรูปที่ 32 เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยที่ชั่วโมงที่มีการป้อนกากน้ำตาล มีการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ ก่อนป้อนกากน้ำตาล และหลังจากป้อนกากน้ำตาล นำมาหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ ค่า pHของน้ำหมัก และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้

6. การวิเคราะห์

6.1 การวัดการเจริญเติบโตของ *S. cervisiae* SKP1 โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ที่ความเร็วรอบและเวลาเท่าเดิม นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส นาน 24 - 48 ชั่วโมง จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ ชั่งหาน้ำหนักเซลล์แห้ง คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

6.2 การหาปริมาณน้ำตาลรวมในรูปน้ำตาลรีดิวซ์

นำน้ำหมักหลังจากปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายอินเวอร์เทส 1.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เท่ากับ 4.5 บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Bernfeld (1955) โดยเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และน้ำตาลซูโครส (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6.3 การหาค่า pH

นำน้ำหมักหลังจากปั่นแยกเซลล์แล้ววัดค่า pH ด้วยเครื่องวัดค่า pH (pH meter)

6.4 การหาปริมาณเอทานอลโดยวิธี Gas Chromatography (GC)

นำน้ำหมักหลังจากปั่นแยกเซลล์แล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 0.01 มิลลิลิตร ใส่ในหลอด eppendoff เติมสารละลาย internal standard (บิวทนอล) 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย vortex จากนั้นฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร วิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธีก๊าซโครมาโตรกราฟีภายใต้ภาวะดังนี้

ชนิดของ column	:	แพคคอลัมน์ (packed column) ชนิด 10%OV-101 Chromosorb W AW-DMCS 60/60 mesh ขนาด 2 m. x 1/8”
อุณหภูมิของ column	:	50 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ injector	:	120 องศาเซลเซียส
ชนิดของ detector	:	FID
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	:	N_2 (อัตราการไหล 7.5 psi)
ปริมาตรฉีด	:	1 ไมโครลิตร

นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟ (เอทานอล/บิวทานอล) และความเข้มข้นของเอทานอล (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร คำนวณหาปริมาณเอทานอล (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

6.5 การคำนวณหาค่าพารามิเตอร์และค่าประสิทธิภาพการหมัก (fermentation efficiency)

นำข้อมูลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ได้แก่ น้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณเอทานอล และปริมาณน้ำตาลที่เหลือ มาพลอตกราฟหาค่าพารามิเตอร์ μ $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$, และ q_P โดยใช้โปรแกรม Excel 2000 จากสูตรดังนี้

$$\mu = \frac{\ln Xt - \ln Xo}{t}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$$

$$q_p = \frac{P_t - P_0}{xdt}$$

สำหรับค่า Q_p และค่า fermentation efficiency คำนวณได้จากสมการดังนี้

$$Q_p = \frac{\text{ปริมาณเอทานอลสูงสุด (กรัมต่อลิตร)}}{\text{เวลา (ชั่วโมง)}}$$

$$\text{Fermentation efficiency} = \frac{Y_{p/s}}{0.51}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

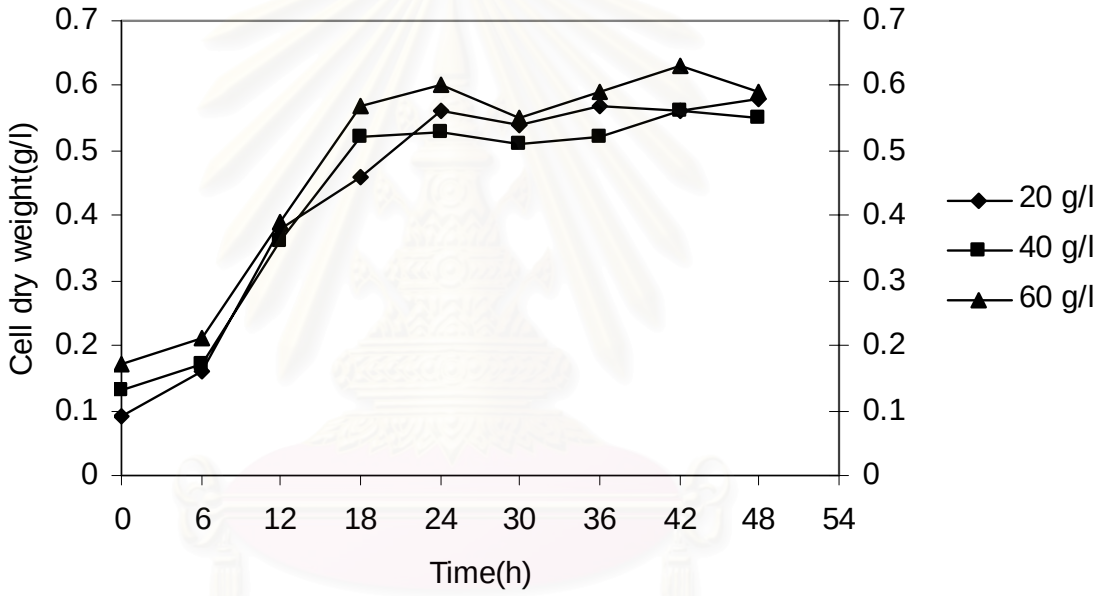
การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 เพื่อผลิตเอทานอล

อาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อและศึกษาอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

เนื่องจากคุณภาพของกล้าเชื้อเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพดีขึ้น คุณสมบัติของกล้าเชื้อที่ดีเช่น เซลล์อยู่ในลักษณะที่แข็งแรงและมีกิจกรรมที่ดี ส่งผลให้มีระยะ lag phase ในขั้นตอนการผลิตสั้นลง นอกจากนี้กล้าเชื้อที่ดีควรมีปริมาณเพียงพอสำหรับการผลิตในระดับถังหมักและปราศจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพของกล้าเชื้อคือ อาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ พบว่าการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อให้เหมาะสมต่อการเจริญของกล้าเชื้อสามารถช่วยลดระยะ lag phase ให้สั้นลงได้ สำหรับอายุของกล้าเชื้อนั้นมีความสำคัญต่อคุณภาพของกล้าเชื้อ เพราะกล้าเชื้อที่อยู่ในช่วงที่มีกิจกรรมของเซลล์ที่ดี (active) ส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ดีในขั้นตอนการผลิต โดยกล้าเชื้อที่อยู่ในระยะการเจริญช่วง exponential จะมีอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) สูง (Mansi และ Charlie, 1999)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอล ทำโดยเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร อาหารที่ใช้มี 3 สูตร คือ BSM medium ที่เติมกลูโคสให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 8 เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *S. cerevisiae* SKP1 โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัม/ลิตร พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของ *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่มีกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (μ = 0.0974 h^{-1}) มีค่ามากกว่าในอาหารที่มีกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร (μ = 0.0821 h^{-1}) และในอาหารที่มีกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 60 (μ = 0.0797 h^{-1}) กรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 9 ปริมาณกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่มีกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร (กลูโคสที่เหลือ =0.31 กรัมต่อลิตร) มีค่าน้อยกว่าที่มีกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร (กลูโคสที่เหลือ =17.2 กรัมต่อลิตร) และที่มี

กลูโคสเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร (กลูโคสที่เหลือ =33.3กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ ดังตารางที่ 5 สาเหตุดังกล่าวเป็นไปได้ว่าความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในอาหารสูตร 2 และ 3 อาจทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญมากกว่าอาหารสูตรที่ 1 ปรากฏการณ์ดังกล่าวมักพบในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* (Baker และ Ariff, 1992) ดังนั้นในการวิจัยจึงเลือกอาหาร BSM medium ที่มีกลูโคส 20 กรัม/ลิตร เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ โดยเลือกกล้าเชื้ออายุ 12 ชั่วโมง เนื่องจากให้อัตราเจริญจำเพาะสูงที่สุด (μ_{max} = 0.176 h^{-1}) ดังตารางที่ 6 สำหรับการวิจัยขั้นต่อไป



รูปที่ 8 การเจริญของ *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่มีกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัม/ลิตร

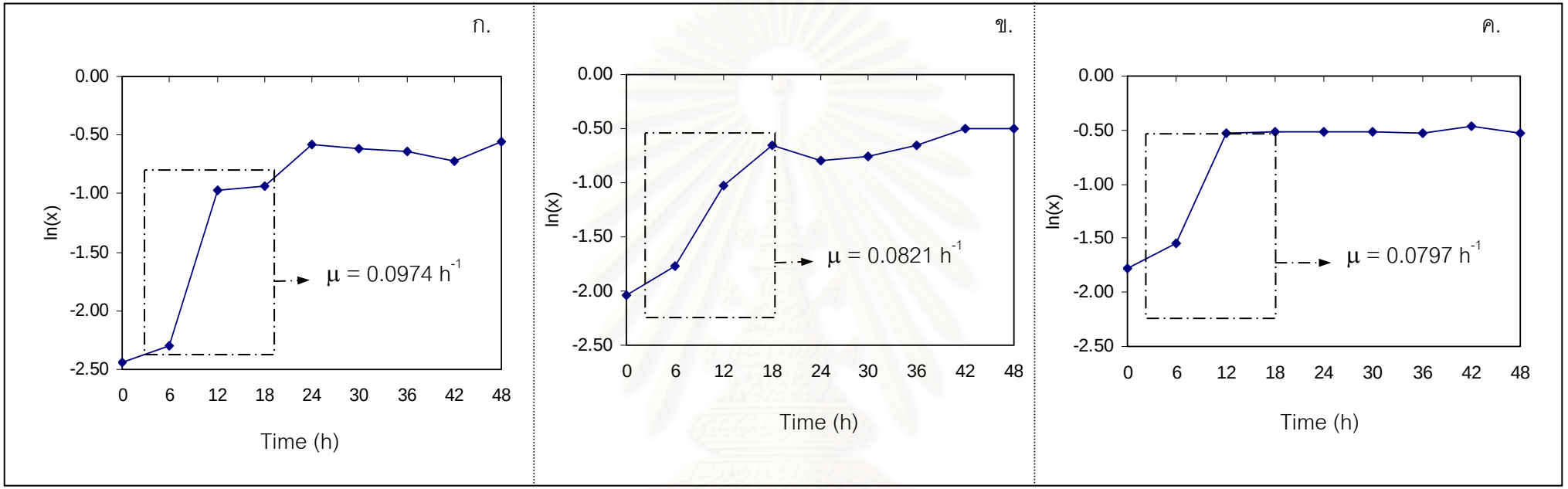
ตารางที่ 5 ปริมาณกลูโคสที่เหลือเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่มีกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 40 และ 60 กรัม/ลิตร

Time (h)	Residual glucose (g/l)		
	Initial glucose 20 (g/l)	Initial glucose 40 (g/l)	Initial glucose 60 (g/l)
0	22.36	41.83	59.60
6	18.92	40.2	57.60
12	11.35	35.74	51.68
18	12.05	32.75	45.04
24	9.21	31.28	42.84
30	8.64	24.02	41.20
36	3.39	21.76	40.39
42	2.72	21.34	33.34
48	**0.31**	**17.2**	**33.30**

ตารางที่ 6 อัตราการเจริญจำเพาะของ *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่มีกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัม/ลิตร

Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Specific growth rate (h^{-1})
0	0.09	-
6	0.16	0.0959
12	0.38	**0.1760**
18	0.46	0.0328
24	0.56	-0.0061
30	0.54	0.0090
36	0.57	-0.0029
42	0.56	0.0058
48	0.58	0.0000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 9 เปรียบเทียบอัตราการเจริญจำเพาะของ *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM medium ที่มีกลูโคสความเข้มข้นต่างกัน

ก. กลูโคส 20 กรัม/ลิตร

ข. กลูโคส 40 กรัม/ลิตร

ค. กลูโคส 60 กรัม/ลิตร

$(NH_4)_2SO_4$ 3 กรัม/ลิตร เป็น N-source

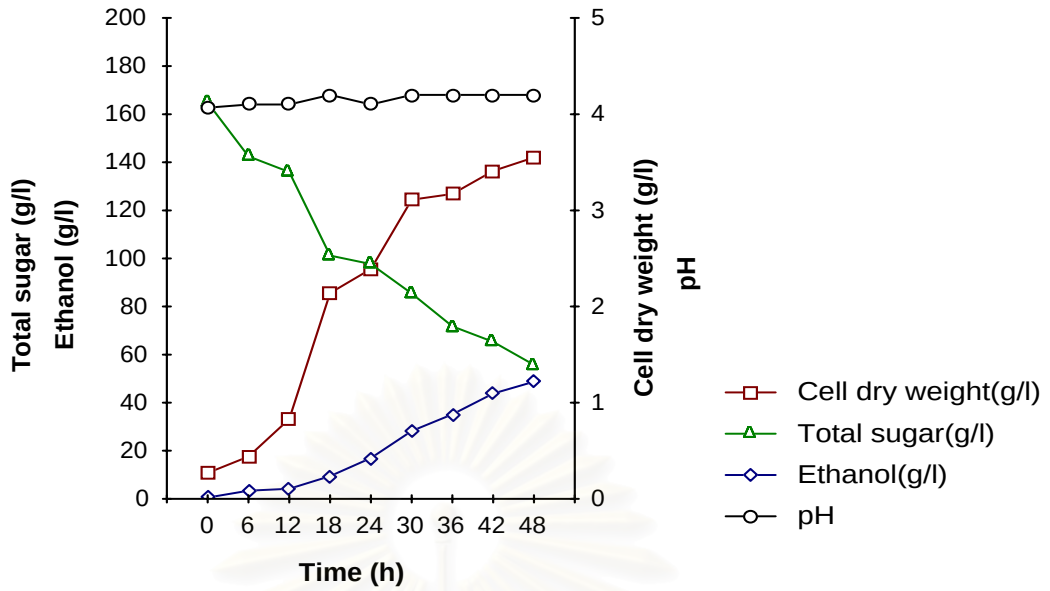
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ในถังหมักแบบแบตช์

1. pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

เนื่องจาก pH มีผลต่อการเจริญของยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์เจริญได้ดีในช่วง pH 3.5-4.5 เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการสร้างกรดโดยยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญอยู่ด้วย (Rose และ Harrison, 1970) โดยพบว่ากากน้ำตาลใหม่ๆ จะมีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ประมาณ 10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ถ้าเป็นกากน้ำตาลเก่าที่เก็บค้างไว้นานเป็นปีจะตรวจพบแบคที่เรียมากถึง 8.4×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียปนเปื้อนจำนวนมากเหล่าที่จะเจริญและสร้างกรด ทำให้เกิดสภาพความเป็นกรดสูง เป็นเหตุให้ประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลของยีสต์ลดลง ผลผลิตเอทานอลจึงต่ำกว่าปกติ (จรูญ คำนวนตา และคณะ, 2525) จึงต้องมีการปรับ pH เพื่อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสมและเพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญอยู่ด้วย ดังนั้นจึงปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4.0-4.5 (Bazas และคณะ, 1989 ; Sitton และ Goddy, 1980) หรือ 4.0-5.0 (Paturau, 1987)

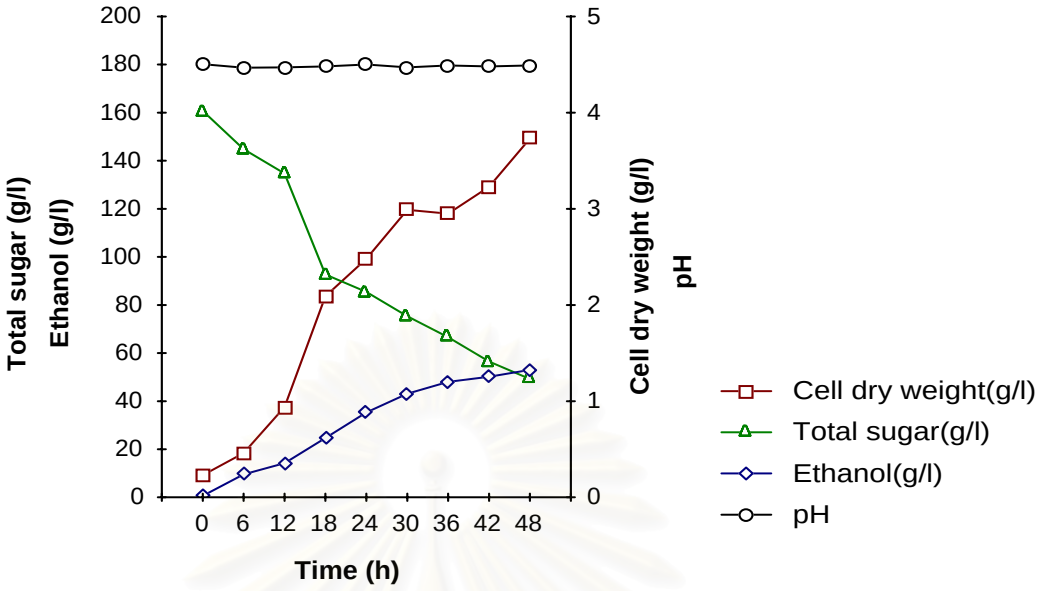
ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษา pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล โดยแปรค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 4.5 และ 5.0 เลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ ใช้กล้าเชื้อที่มีอายุ 12 ชั่วโมง และเลี้ยงในอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่ได้จากการศึกษาในผลการทดลองข้างต้น คือ อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BSM medium ป้อนกากน้ำตาลให้มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร รูปแบบการหมักดังแสดงในรูปที่ 10-12 และ ตารางที่ 7-9 พบว่าในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 *S. cerevisiae* SKP1 สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 45.40 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 4.54%(w/v) หรือ 5.75% (v/v) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.55 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลเหลือเท่ากับ 55.41 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 10 และตารางที่ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้น 4.5 และ 5.0 (ดังแสดงในรูปที่ 11 และ 12 ตารางที่ 8 และ 9) พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 53.02 กรัมต่อลิตร และ 53.25 กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.73 และ 4.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีน้ำตาลเหลือเท่ากับ 49.23 และ 47.28 กรัมต่อลิตร และพบว่าค่า pH ค่อนข้างคงที่ระหว่างการหมัก



รูปที่ 10 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0

ตารางที่ 7 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0

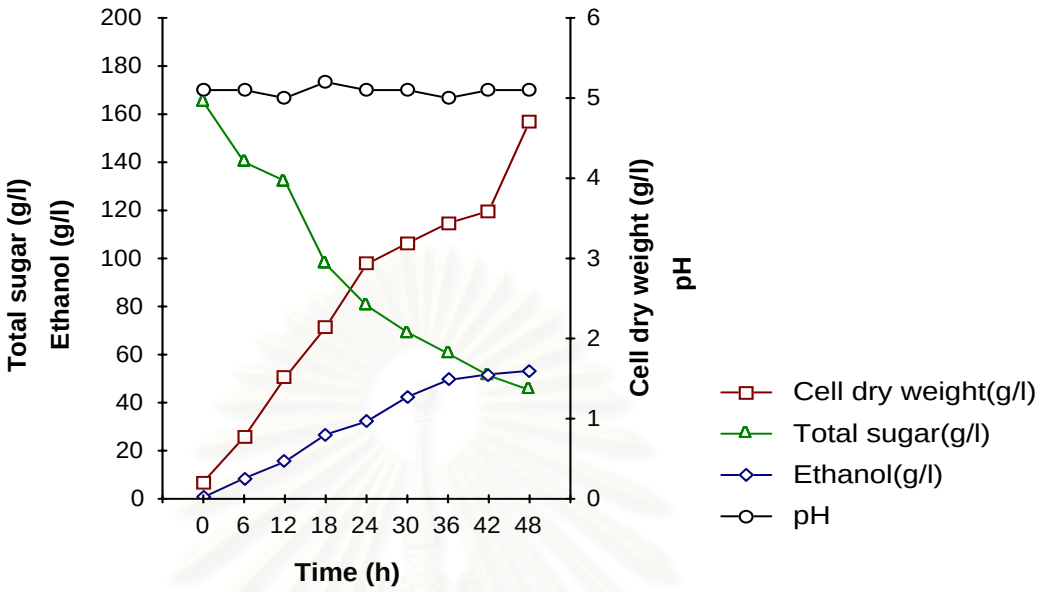
Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.27	167.83	0.55	0.06	0.07
6	0.44	142.44	3.39	0.34	0.43
12	0.83	137.61	4.19	0.42	0.53
18	2.14	101.20	9.48	0.95	1.20
24	2.19	97.69	16.99	1.70	2.15
30	3.11	85.40	28.2	2.82	3.57
36	3.17	71.77	35.16	3.52	4.45
42	3.41	65.30	43.69	4.37	5.53
48	3.55	55.41	45.4	4.54	5.75



รูปที่ 11 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5

ตารางที่ 8 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5

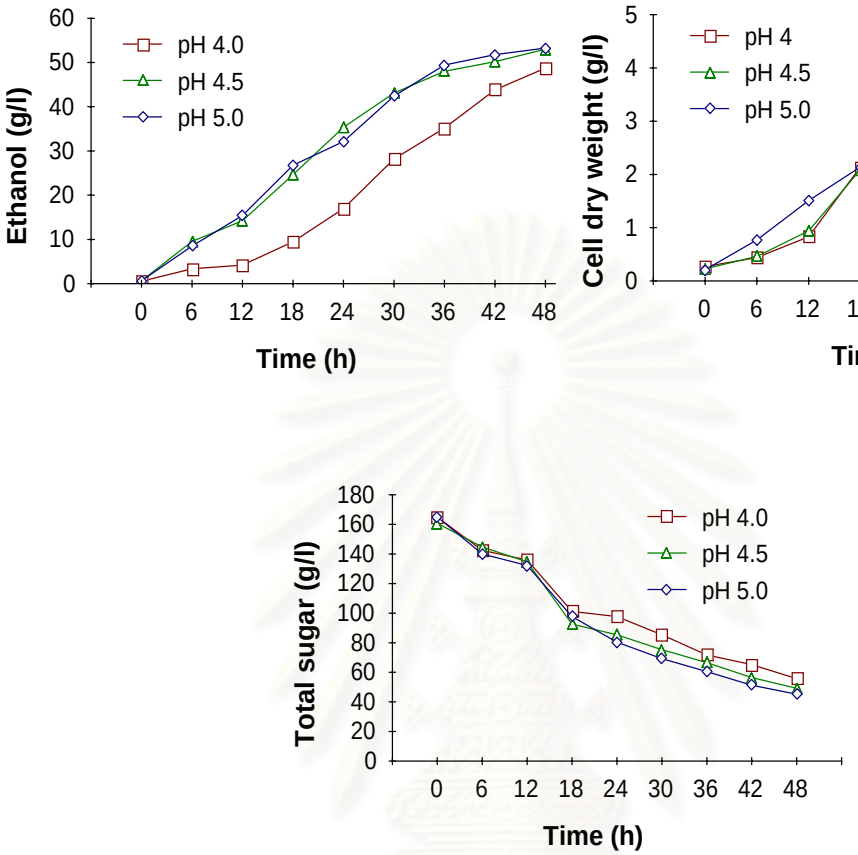
Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.23	160.73	0.66	0.07	0.08
6	0.46	144.80	9.57	0.96	1.21
12	0.94	134.67	14.22	1.42	1.80
18	2.09	92.67	24.66	2.47	3.12
24	2.48	85.43	35.34	3.53	4.47
30	2.99	75.30	43.10	4.31	5.46
36	2.95	66.61	48.02	4.80	6.08
42	3.23	56.47	50.17	5.02	6.35
48	**3.73**	**49.23**	**53.02**	**5.30**	**6.71**



รูปที่ 12 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0

ตารางที่ 9 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0

Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.21	163.11	0.64	0.06	0.08
6	0.47	137.04	8.51	0.85	1.08
12	1.51	130.25	15.55	1.56	1.97
18	2.14	97.67	26.48	2.65	3.35
24	2.87	82.42	32.14	3.21	4.07
30	3.19	69.26	42.4	4.24	5.37
36	3.44	60.47	49.43	4.94	6.26
42	3.59	51.29	51.79	5.18	6.56
48	**4.71**	**47.28**	**53.25**	**5.33**	**6.74**



รูปที่ 13 เปรียบเทียบผลของ pH เริ่มต้น 4.0 4.5 และ 5.0 ที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในภาวะอัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที น้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาล ดังรูปที่ 13 พบว่าในภาวะที่เลี้ยงในอาหารที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 5.0 การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลพบว่าใกล้เคียงกัน โดยการเลี้ยงในภาวะที่เลี้ยงในอาหารที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 เชื้อผลิตเอทานอลได้ปริมาณน้อยกว่าที่ pH 4.5 และ 5.0 ตั้งแต่ช่วงเวลาแรกของการหมัก

จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก และปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือช่วงหลังของการเลี้ยงเชื้อที่ pH 4.0 พบว่าสูงกว่าที่ค่า pH 4.5 และ 5.0 เล็กน้อย ในขณะที่การเจริญพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ pH 5.0 มีค่ามากกว่าที่ pH4.0 และ 4.5 เพื่อแสดงผลของ pH ที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญและการใช้น้ำตาลของ *S. cerevisiae* SKP1 จึงนำค่าเอทานอลสูงสุด น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ มาเปรียบเทียบ โดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติดังตารางที่ 10 พบว่า ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ *S. cerevisiae* SKP1 ผลิตได้และปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 แตกต่างกับที่ pH 4.5 และ 5.0 อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเจริญเติบโตพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ pH 5.0 มีค่ามากกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่ pH 4.5 และ 5.0

ตารางที่ 10 ผลการทดสอบทางสถิติของการศึกษาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1

pH	เอทานอลสูงสุด (g/l)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (g/l)	น้ำตาลรวมที่เหลือ (g/l)
4.0	45.40[a]	3.55[a]	55.41[a]
4.5	53.02[b]	3.73[a]	49.23[b]
5.0	53.25[b]	4.71[b]	47.28[b]

หมายเหตุ a และ b บอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1ที่ pH เริ่มต้นต่างกัน

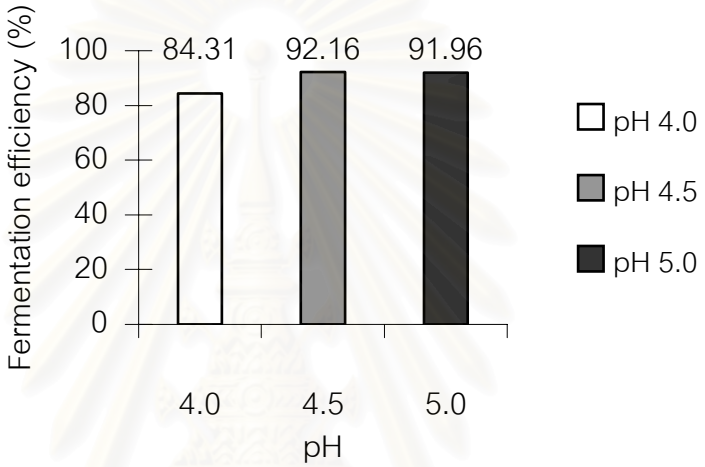
PH	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	$Y_{p/s}$ (g_p/g_s)	q_p ($g_p/g_x.h$)	Q_p ($g_p/l.h$)
4.0	0.081	0.033	0.430	0.466	0.95
4.5	0.079	0.033	0.470	0.465	1.10
5.0	0.096	0.035	0.469	0.429	1.11

หมายเหตุ μ หมายถึง อัตราการเจริญจำเพาะ q_p หมายถึง อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ
$Y_{x/s}$ หมายถึง ผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาล Q_p หมายถึง อัตราการผลิตเอทานอล
$Y_{p/s}$ หมายถึง ผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาล

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ μ $Y_{x/s}$ $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p ได้ผลแสดงในตารางที่ 11 พบว่าในด้านการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อพิจารณาจากค่า μ ในการเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 มีค่ามากกว่าการเลี้ยงที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 และ 4.5 สำหรับค่า $Y_{x/s}$ ในการเลี้ยงที่ pH เริ่มต้น 4.0 4.5 และ 5.0 มีค่าใกล้เคียงกัน ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์(2540) ได้ศึกษาการเลี้ยง *S. cerevisiae* ทั้งหมด 9 สายพันธุ์ เพื่อหมักเอทานอลจากกลูโคสที่ pH เริ่มต้น 3.7 และ 4.1 โดยใช้กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 นอร์มัล สำหรับควบคุมค่า pH ระหว่างการหมัก พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ทั้งในภาวะการเลี้ยงที่ pH 3.7 และ 4.1 และพบว่าทั้ง 9 สายพันธุ์มีค่า μ ที่แตกต่างกัน

ในด้านการผลิตเอทานอลเมื่อพิจารณาค่า $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p พบว่าในการเลี้ยงที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 4.5 และ 5.0 มีค่าใกล้เคียงกัน งานวิจัยของ Pramanik (2004) ที่ทำการศึกษาผลของ pH ต่อการหมักเอทานอลโดย *Saccharomyces* ซึ่งใช้ซูโครส 100 กรัมต่อลิตร เป็นสับสเตรตที่ pH 3.75 4.25 5.0 และ 5.5 ได้ค่า $Y_{p/s}$ ใกล้เคียงกัน

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาล($Y_{p/s}$) ของผลที่ได้จากงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎี ดังแสดงในรูปที่ 14 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในการเลี้ยงเชื่อที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.50 ให้ผลดีที่สุดคือ 92.16 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกภาวะการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ไปศึกษาขั้นต่อไป นอกจากนี้กากน้ำตาลที่นำมาใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงเมื่อเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่า pH เริ่มต้นประมาณ 4.5 อยู่แล้ว



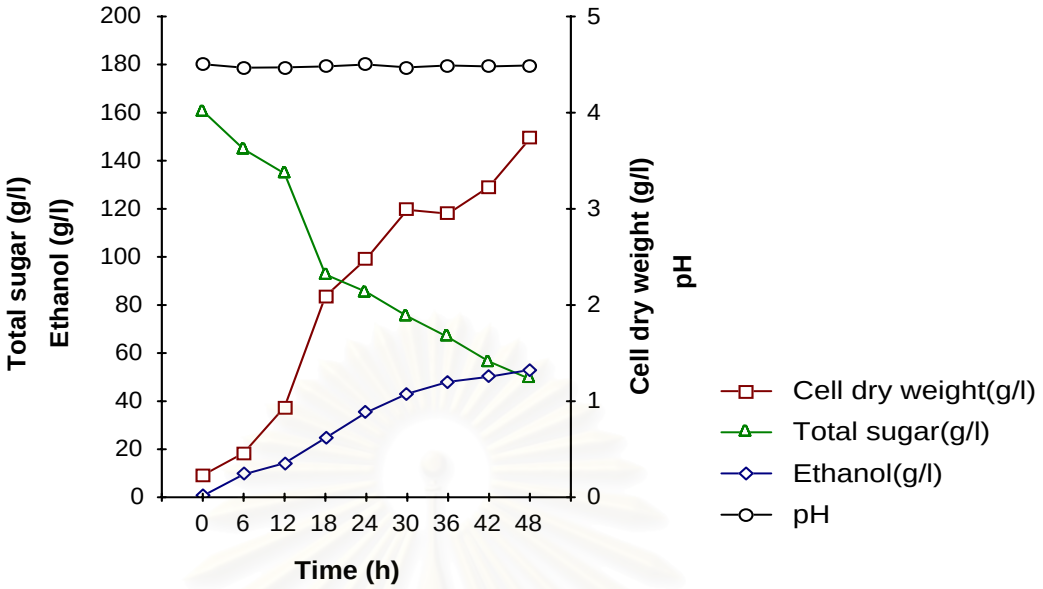
รูปที่ 14 ค่า $Y_{P/S}$ ของการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าจากทฤษฎี ($Y_{P/S}$=0.51) เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ pH เริ่มต้น 4.0 4.5 และ 5.0 อัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที น้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

การศึกษาผลของอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 โดยใช้อัตราการกวน 100 150 และ 200 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ รูปแบบการหมักดังแสดงในรูปที่ 15-17 และตารางที่ 12-14 ได้พบว่า ภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที *S. cerevisiae* SKP1 สามารถผลิตเอทานอลสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 53.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 5.30%(w/v) หรือ 6.71% (v/v) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.73 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลเหลือเท่ากับ 49.23 กรัมต่อลิตร การผลิตเอทานอลเกิดขึ้นพร้อมกับการเจริญ โดยช่วง 24 ชั่วโมงแรกการผลิตเอทานอลเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและเพิ่มขึ้นตามเวลาการหมัก ซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นได้อีกหลังชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในรูปที่ 15 และตารางที่ 12 เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 150 และ 200 รอบต่อนาที (ดังแสดงในรูปที่ 16 และ 17 ตารางที่ 13 และ 14) พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 38.94 กรัมต่อลิตร และ 34.3 กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.70 และ 4.33 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลเหลือเท่ากับ 53.85 และ 56.82 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

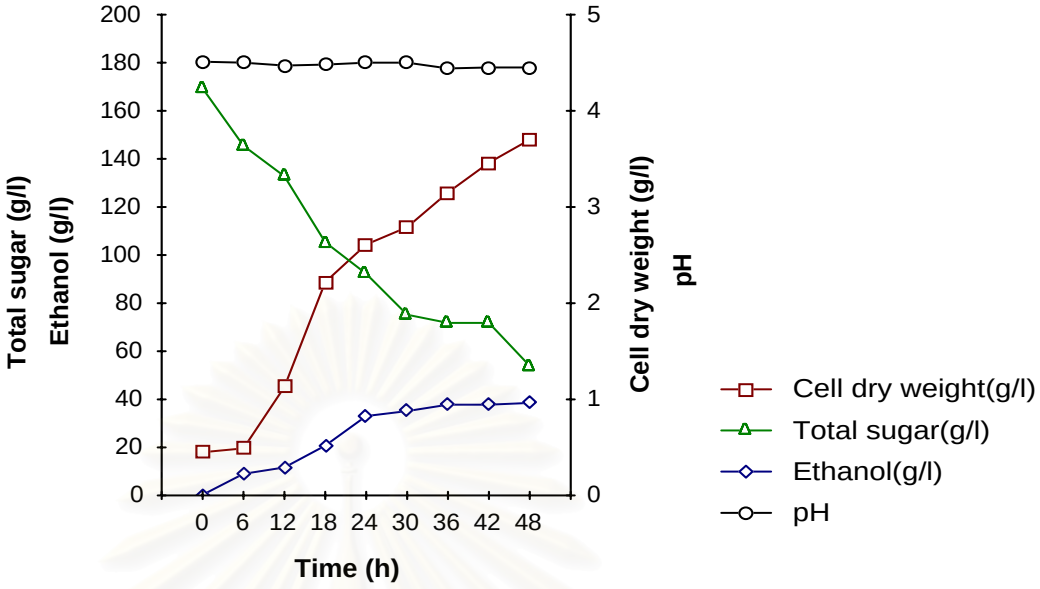
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 15 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที

ตารางที่ 12 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที

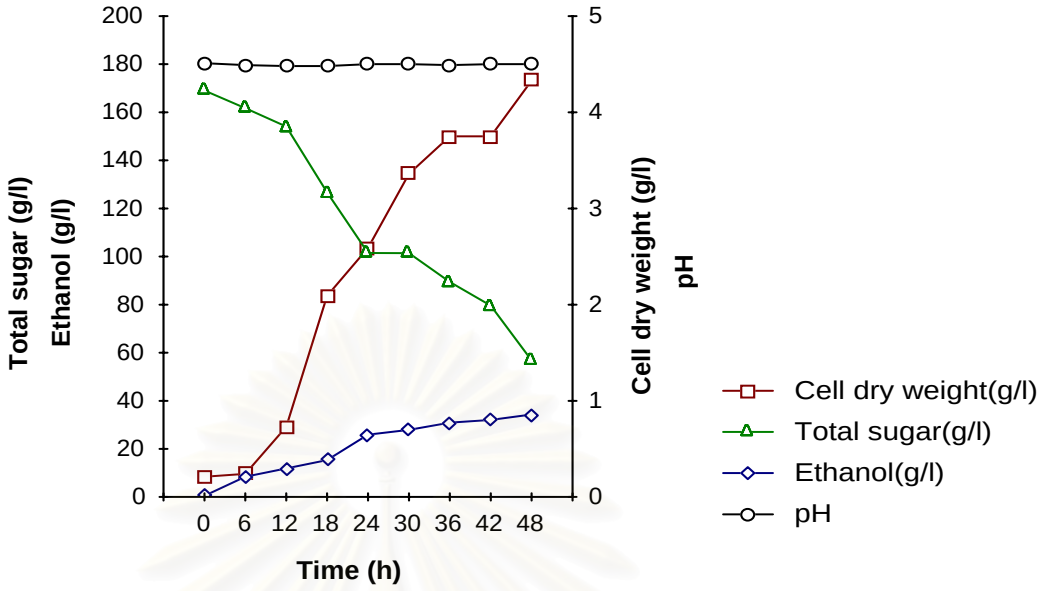
Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.23	160.73	0.66	0.07	0.08
6	0.46	144.80	9.57	0.96	1.21
12	0.94	134.67	14.22	1.42	1.80
18	2.09	92.67	24.66	2.47	3.12
24	2.48	85.43	35.34	3.53	4.47
30	2.99	75.30	43.10	4.31	5.46
36	2.95	66.61	48.02	4.80	6.08
42	3.23	56.47	50.17	5.02	6.35
48	**3.73**	**49.23**	**53.02**	**5.30**	**6.71**



รูปที่ 16 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

ตารางที่ 13 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

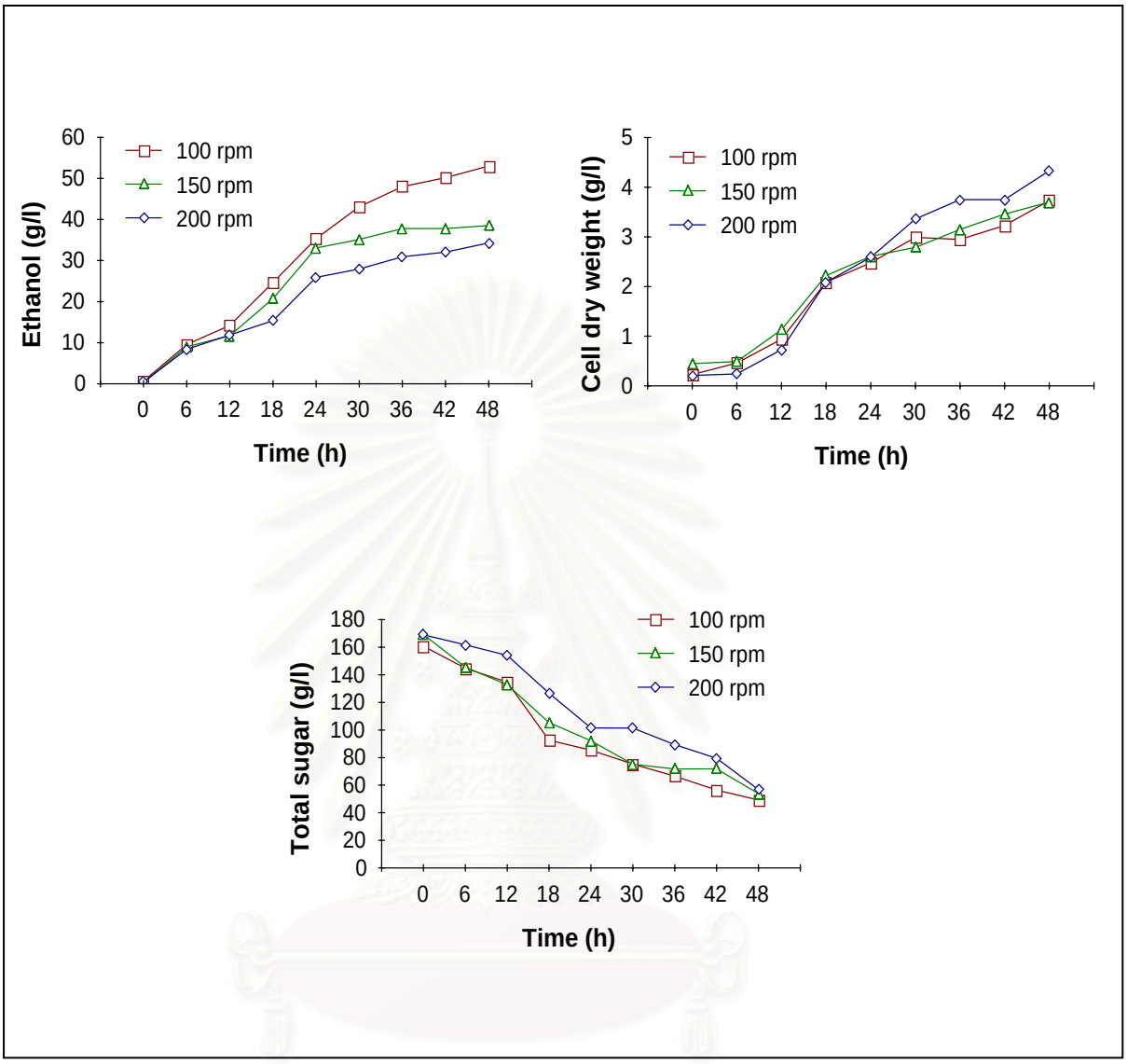
Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.45	169.31	0.29	0.03	0.04
6	0.49	145.47	9.02	0.90	1.14
12	1.13	132.78	11.69	1.17	1.48
18	2.22	105.38	20.74	2.07	2.63
24	2.61	92.23	33.06	3.31	4.18
30	2.79	75.20	35.15	3.52	4.45
36	3.15	71.80	37.78	3.78	4.78
42	3.46	71.81	38.51	3.85	4.87
48	3.70	53.85	38.94	3.89	4.93



รูปที่ 17 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

ตารางที่ 14 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.21	169.05	0.49	0.05	0.06
6	0.24	161.73	8.39	0.84	1.06
12	0.73	154.07	11.86	1.19	1.50
18	2.09	126.74	15.37	1.54	1.95
24	2.59	100.53	25.93	2.59	3.28
30	3.36	101.41	27.96	2.80	3.54
36	3.75	89.41	30.93	3.09	3.92
42	3.75	79.55	32.04	3.20	4.06
48	**4.33**	**56.82**	**34.30**	**3.43**	**4.34**



รูปที่ 18 เปรียบเทียบผลของอัตราการกวนที่ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที ที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในภาวะน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตเอทานอลของเชื้อที่อัตราการกวนเท่ากับ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที ดังแสดงในรูปที่ 18 พบว่า ในช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ผลิตเอทานอลได้ปริมาณใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลที่สร้างขึ้นที่อัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที มากกว่าที่อัตราการกวนเท่ากับ 150 และ 200 รอบต่อ

นาที อย่างชัดเจน การเจริญเติบโตพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที หลังจาก 24 ชั่วโมง สูงกว่า 100 และ 150 รอบต่อนาที เล็กน้อย และพบว่าที่อัตรากวน 200 รอบต่อนาที มีน้ำตาลรวมเหลือสูงกว่า 100 และ 150 รอบต่อนาที เพื่อแสดงผลของอัตราการกวนที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาล ของ *S. cerevisiae* SKP1 จึงนำค่าเอทานอลสูงสุด น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยสูงสุด และปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ มาเปรียบเทียบ โดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติดังตารางที่ 15 พบว่า ปริมาณเอทานอลเอทานอลสูงสุดที่ *S. cerevisiae* SKP1 ผลิตได้ที่ อัตราการกวน 100 150 และ 200 รอบต่อนาที แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่อัตรากการกวน 200 รอบต่อนาที มีค่ามากกว่าที่อัตราการกวน 100 และ 150 รอบต่อนาที และปริมาณน้ำตาลรวมเหลือที่อัตราการกวน 100 มีค่าน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในภาวะการกวน 150 และ 200 รอบต่อนาที

ตารางที่ 15 ผลการทดสอบทางสถิติของการศึกษาอัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1

อัตราการกวน (rpm)	เอทานอลสูงสุด (g/l)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (g/l)	น้ำตาลรวมที่เหลือ (g/l)
100	53.02[a]	3.73[a]	49.23[a]
150	38.94[b]	3.70[a]	53.85[b]
200	34.30[c]	4.33[b]	56.82[b]

หมายเหตุ a, b และ c บอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

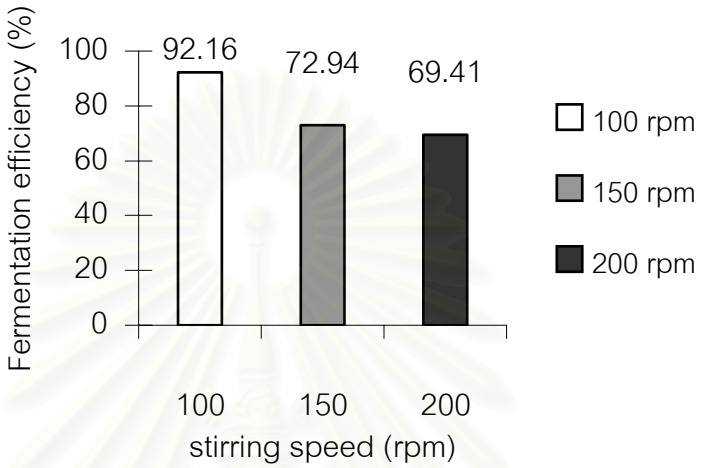
ตารางที่ 16 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อัตราการกวนต่างกัน

stirring speed (rpm)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	$Y_{p/s}$ (g_p/g_s)	q_p ($g_p/g_x.h$)	Q_p ($g_p/l.h$)
100	0.079	0.033	0.470	0.465	1.10
150	0.095	0.031	0.372	0.335	0.81
200	0.138	0.040	0.354	0.323	0.71

หมายเหตุ μ หมายถึง อัตราการเจริญจำเพาะ q_p หมายถึง อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ
$Y_{x/s}$ หมายถึง ผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาล Q_p หมายถึง อัตราการผลิตเอทานอล
$Y_{p/s}$ หมายถึง ผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาล

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ μ $Y_{x/s}$ $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p ได้ผลแสดงในตารางที่ 16 ในด้านการเจริญของ *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อพิจารณาจากค่า μ และ $Y_{x/s}$ พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่ภาวะการกวน 200 รอบต่อนาที มีค่ามากกว่าการเลี้ยงในภาวะการกวน 150 และ 100 รอบต่อนาที และพบว่าในด้านการผลิตเอทานอลเมื่อพิจารณาจากค่า $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p ในการเลี้ยงเชื้อที่ภาวะการกวน 100 รอบต่อนาที ค่าพารามิเตอร์ทั้ง 3 มีค่ามากกว่าเมื่อเลี้ยงในภาวะการกวนที่ 150 และ 200 รอบต่อนาที อย่างเห็นได้ชัด แสดงให้เห็นว่าเซลล์ *S. cerevisiae* SKP1 สามารถนำสับสเตรตไปใช้เพื่อการผลิตเอทานอลได้ดีที่อัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที การเพิ่มอัตราการกวนมีผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์ดีขึ้น สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่า การกวนมีความสำคัญต่อการผสม(mixing)ระหว่างเซลล์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณออกซิเจน (เท่าที่มี) โดยการกวนช่วยให้ฟองอากาศแตกเป็นเม็ดเล็กๆ ซึ่งช่วยให้ออกซิเจนเข้ากับเซลล์ได้ดี และยังส่งผลให้ CO_2 ที่เชื้อสร้างขึ้นอยู่ห่างจากเซลล์มากขึ้น Jones และ Greenfield (1982) รายงานว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชั่น (decarboxylation) โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ pyruvate decarboxylase ที่เร่งปฏิกิริยาการดึง CO_2 จาก pyruvate ได้เป็น acetaldehyde ดังสมการ

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลของผลที่ได้จากงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎี ดังแสดงในรูปที่ 19 พบว่าประสิทธิภาพในการหมักในการเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที ให้ผลดีที่สุดคือ 92.16 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ดังนั้นจึงเลือกใช้ภาวะการกวน 100 รอบต่อนาที สำหรับการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 19 ค่า $Y_{P/S}$ ของการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าจากทฤษฎี ($Y_{P/S}$=0.51) เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อัตราการกวนเท่ากับ 100 150 และ 200 รอบต่อนาที น้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

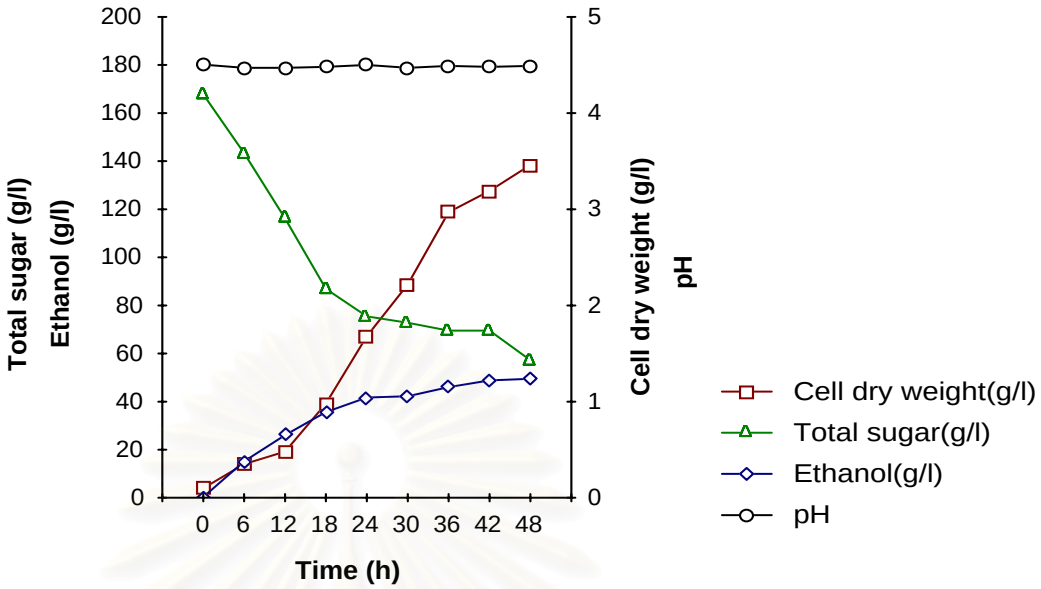
เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strain) มีอัตราการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิปานกลาง อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้ คือ 5-10 องศาเซลเซียส และไม่มีการเจริญที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความทนต่ออุณหภูมิสูงมากขึ้นเมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่สมบูรณ์ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลพบว่าสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส (Rose และ Harison, 1970)

Nagodawithana และคณะ (1974) รายงานว่า อุณหภูมิมีผลต่อการมีชีวิต และการตายของเซลล์ *S. cerevisiae* ยีสต์มีการเจริญเติบโตช้าและหมักเอทานอลได้ต่ำที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นในการหมักควรควบคุมอุณหภูมิการหมักไว้ไม่ให้เกิน 37 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 40 องศาเซลเซียส และ 43 องศาเซลเซียส ปริมาณเอทานอลที่ได้จะลดลงอย่างมาก นอกจากอุณหภูมิจะมีผลต่อการหมักแล้ว ยังมีผลทำให้จำนวนเซลล์ลดลง ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะใช้อุณหภูมิในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมและที่เชื้อทนได้สูงสุดสำหรับการเจริญและการหมักเอทานอลพบว่าขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ (Pramanik, 2004)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแปรอุณหภูมิเท่ากับ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร ใช้อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที (จากผลการศึกษาในข้อ 2) pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 รูปแบบการหมักเอทานอลดังแสดงในรูปที่ 20-22 และตารางที่ 17-19 พบว่าในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 68.04 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ คิดเป็น 6.80%(w/v) หรือ 8.61% (v/v) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.23 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลรวมเหลือเท่ากับ 20.10 กรัมต่อลิตร การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และพบว่าสามารถเพิ่มขึ้นได้อีกหลังชั่วโมงที่ 48 (ข้อมูลไม่ได้แสดง) เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณเอทานอลสูงสุดที่เชื้อผลิตได้เท่ากับ 49.48 กรัมต่อลิตร และ 53.02 กรัมต่อลิตร ที่ 48 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.46 และ 3.73 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลเหลือเท่ากับ 57.2 และ 49.23 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ งานวิจัยของ ปนิดา กิตติรัตน์ (2546) ศึกษาการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* M30 จากกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 180 กรัมต่อลิตร

โดยศึกษาในระดับฟลาสก์พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลอยู่ในช่วง 33- 35 องศาเซลเซียส และเมื่อศึกษาในระดับถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* M30 โดยได้เอทานอลเท่ากับ 70.39 กรัมต่อลิตร

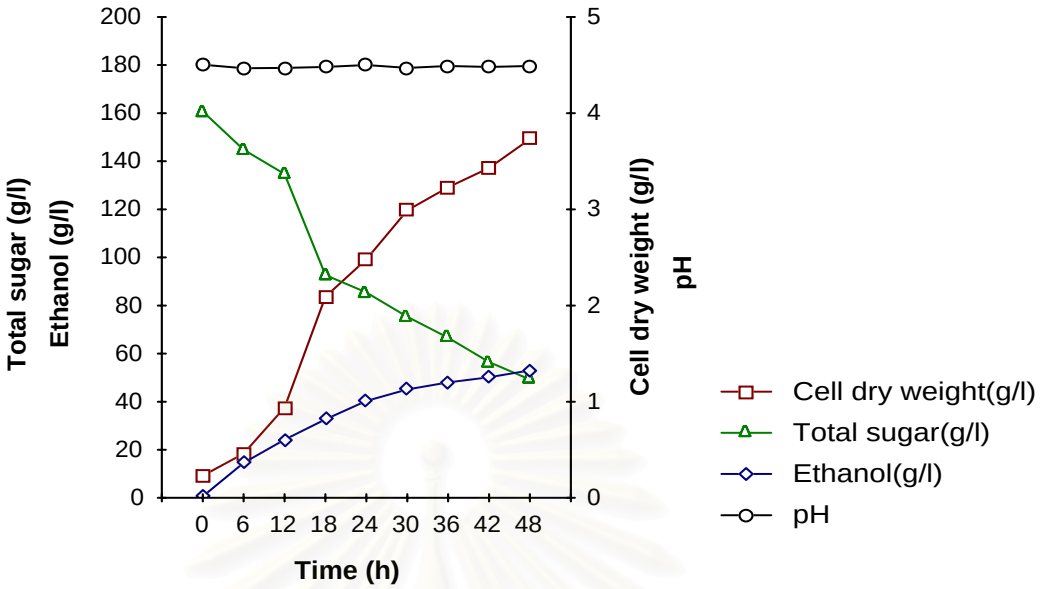
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 20 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 17 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

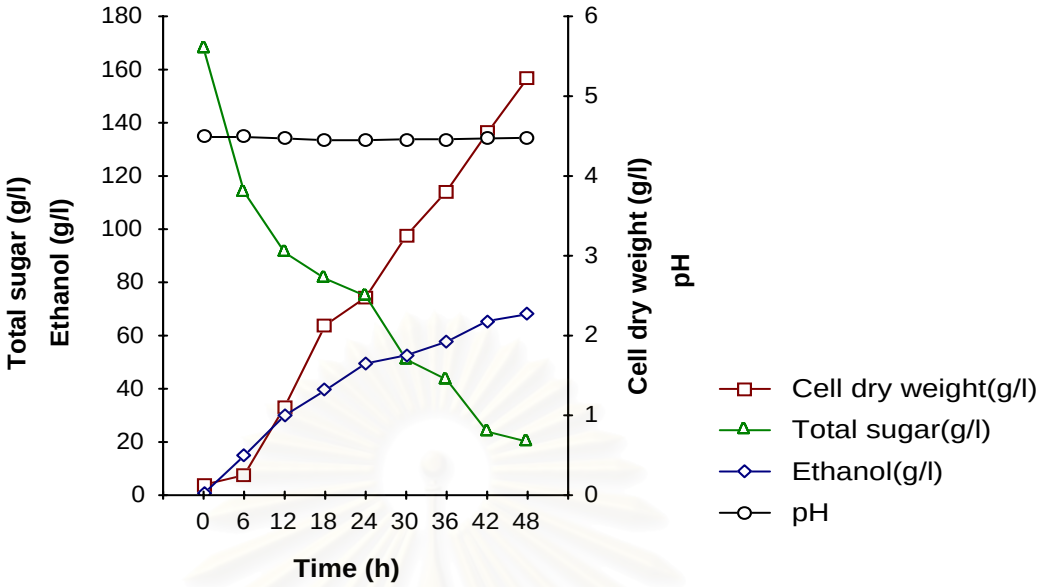
Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.10	167.80	0.32	0.03	0.04
6	0.15	143.35	15.15	1.52	1.92
12	0.48	116.20	26.05	2.61	3.30
18	0.98	86.88	35.63	3.56	4.51
24	1.68	75.48	41.68	4.17	5.28
30	2.22	72.76	42.27	4.23	5.35
36	2.97	69.50	46.05	4.61	5.83
42	3.19	69.50	48.80	4.88	6.18
48	3.46	57.20	49.48	4.95	6.26



รูปที่ 21 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 18 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

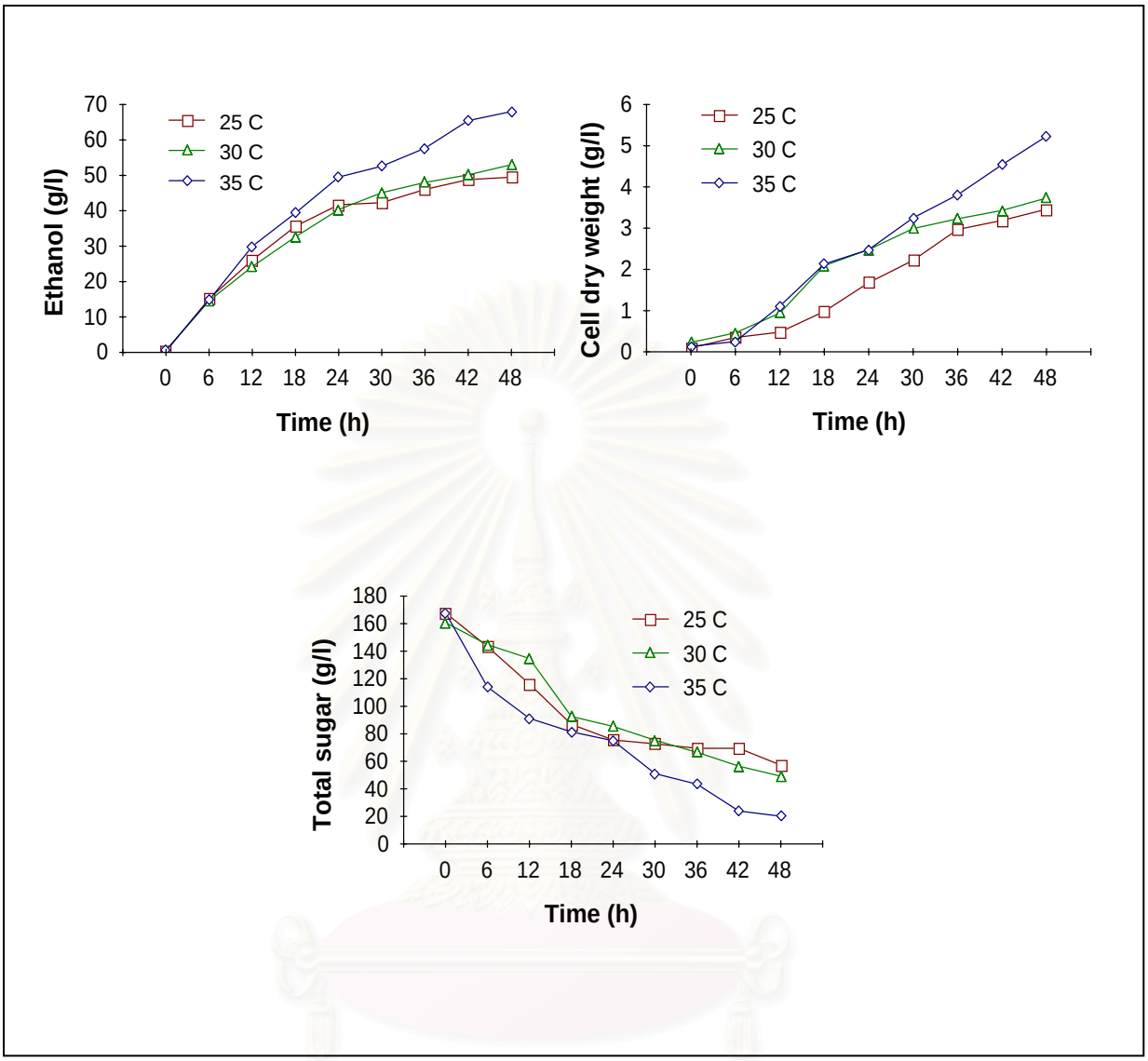
Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.23	160.73	0.66	0.07	0.08
6	0.46	144.80	14.57	1.46	1.85
12	0.94	134.67	24.22	2.42	3.06
18	2.09	92.67	32.66	3.27	4.14
24	2.48	85.43	40.34	4.03	5.10
30	2.99	75.30	45.10	4.51	5.71
36	3.23	66.61	48.02	4.80	6.08
42	3.43	56.47	50.17	5.02	6.35
48	**3.73**	**49.23**	**53.02**	**5.30**	**6.71**



รูปที่ 22 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 19 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.13	167.98	0.56	0.06	0.07
6	0.25	114.03	14.78	1.48	1.87
12	1.11	91.23	29.98	2.60	3.29
18	2.13	81.45	39.40	3.44	4.35
24	2.48	74.94	49.54	4.25	5.38
30	3.25	51.04	52.61	5.26	6.66
36	3.81	43.44	57.70	5.77	7.30
42	4.54	23.89	65.46	6.55	8.29
48	**5.23**	**20.10**	**68.04**	**6.80**	**8.61**



รูปที่ 23 เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิ 25 30 และ35 องศาเซลเซียส ที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในภาวะน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร อัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5

เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตเอทานอลในการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 23 ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส การ

เจริญเติบโตพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เพิ่มสูงขึ้นมากกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส หลังจาก 24 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ และปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เพื่อแสดงผลของอุณหภูมิที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาล ของ *S. cerevisiae* SKP1 จึงนำค่าเอทานอลสูงสุด น้ำหนักเซลล์สูงสุด และปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ มาเปรียบเทียบ โดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติดังตารางที่ 20 พบว่า ปริมาณเอทานอลเอทานอลสูงสุดที่เชื้อผลิตได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลคือ 35 30 และ 25 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เช่นเดียวกับน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดมีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณน้ำตาลรวมเหลือที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส มีค่ามากกว่าที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกภาวะการเลี้ยงที่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 20 ผลการทดสอบทางสถิติของการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1

อุณหภูมิ (^{o}C)	เอทานอลสูงสุด (g/l)	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (g/l)	น้ำตาลรวมที่เหลือ (g/l)
25	49.48^{a}	3.46^{a}	57.20^{a}
30	53.02^{b}	3.73^{a}	49.23^{b}
35	68.04^{c}	5.23^{b}	20.10^{c}

หมายเหตุ a, b และ c บอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ง)

ตารางที่ 21 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ที่อุณหภูมิต่างกัน

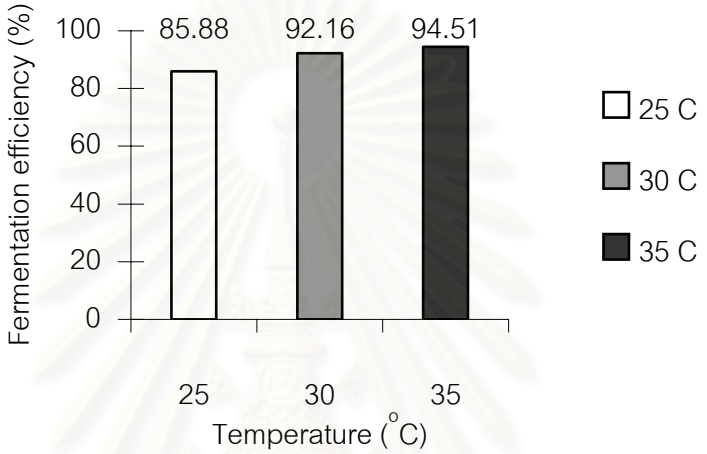
อุณหภูมิ (^{o}C)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	$Y_{p/s}$ (g_p/g_s)	q_p ($g_p/g_x.h$)	Q_p ($g_p/l.h$)
25	0.075	0.030	0.438	0.418	1.03
30	0.079	0.033	0.470	0.465	1.10
35	0.081	0.037	0.482	0.712	1.42

หมายเหตุ μ หมายถึง อัตราการเจริญจำเพาะ q_p หมายถึง อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ
$Y_{x/s}$ หมายถึง ผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาล Q_p หมายถึง อัตราการผลิตเอทานอล
$Y_{p/s}$ หมายถึง ผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาล

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ μ $Y_{x/s}$ $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 21 พบว่าในด้านการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อพิจารณาจากค่า μ และ $Y_{x/s}$ ในภาวะการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส เล็กน้อย เช่นเดียวกับในด้านการผลิตเอทานอล เมื่อพิจารณาค่า $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p พบว่ามีค่าสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงเชื้อเพิ่มสูงขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักของผลที่ได้จากงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎี ดังแสดงในรูปที่ 24 พบว่าประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ให้ผลดีที่สุดคือ 94.51 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงเลือกใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ในการทดลองขั้นต่อไป



รูปที่ 24 ค่า $Y_{P/S}$ ของการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าจากทฤษฎี ($Y_{P/S}$=0.51) เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส น้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร อัตราการกวน และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น

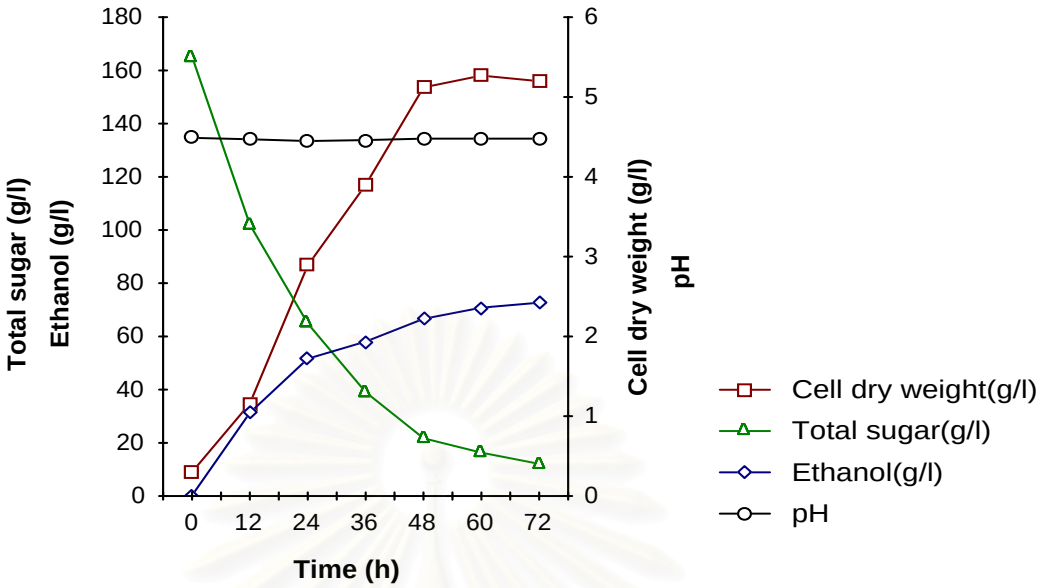
กากน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้สุดท้ายจากกระบวนการแปรรูปน้ำตาลอ้อย เป็นน้ำตาลทราย น้ำตาลรวมที่เหลือในกากน้ำตาลมีประมาณ 50-60 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) 60 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลรวมอยู่ในรูปของซูโครส (Gough และคณะ, 1996) ดังนั้นจึงต้องเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนการนำไปใช้ เนื่องจากเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงมีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์และการผลิตเอทานอล การยับยั้งส่วนหนึ่งเกิดจากแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ทำให้เซลล์เกิดพลาสโมไลซิส (plasmolysis) เมื่ออยู่ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลมากกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนัก) สำหรับปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลที่ยับยั้งการหมักขึ้นอยู่กับลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ของยีสต์ โดยผลการยับยั้งเนื่องมาจากเอทานอลความเข้มข้นสูงมีมากกว่าผลจากความเข้มข้นน้ำตาลสูง และผลการยับยั้งจากน้ำตาลและเอทานอลที่ความเข้มข้นสูงเป็นปัจจัยร่วมที่ส่งเสริมให้เกิดการยับยั้งมากขึ้น (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2536)

Gough และคณะ (1996) ศึกษาผลของความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่อการผลิตเอทานอลโดย *Kluyveromyces marxianus* IMB3 พบว่าเมื่อใช้กากน้ำตาลเข้มข้นเป็น 23 เปอร์เซ็นต์ปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งมีน้ำตาลรวม 140-180 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดเท่ากับ 58.46 กรัมต่อลิตร ให้ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 84 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้หากเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากกว่า 23 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะส่งผลให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดและความเข้มข้นของเซลล์ลดลง

ในงานวิจัยนี้ศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอล ทำโดยเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารเพื่อการผลิตเอทานอล โดยแปรผันปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นให้มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 220 260 และ 280 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที และจากการศึกษาผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล พบว่าการสร้างเอทานอลเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง และยังมีแนวโน้มสามารถเพิ่มขึ้นได้อีกหลังชั่วโมงที่ 48 ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อนานขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง รูปแบบของการหมักที่เกิดขึ้นดังแสดงในรูปที่ 25-28 และ ตารางที่ 22-25

พบว่าในภาวะการเลี้ยงเชื้อในอาหารเพื่อการผลิตเอทานอลที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร *S. cerevisiae* SKP1 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 72.7 กรัมต่อลิตร ที่ 72 ชั่วโมง คิดเป็น 7.27%(w/v) หรือ 9.20% (v/v) ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.47 กรัมต่อลิตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 220 260 และ 280 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าต่ำลง โดยผลิตเอทานอลสูงสุดได้เท่ากับ 68.18 62.73 และ 52.73 กรัมต่อลิตร ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.54 5.05 และ 4.09 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการเลี้ยงเชื้อในทั้ง 4 การทดลอง เท่ากับ 12.11 72.37 107.07 และ 125.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

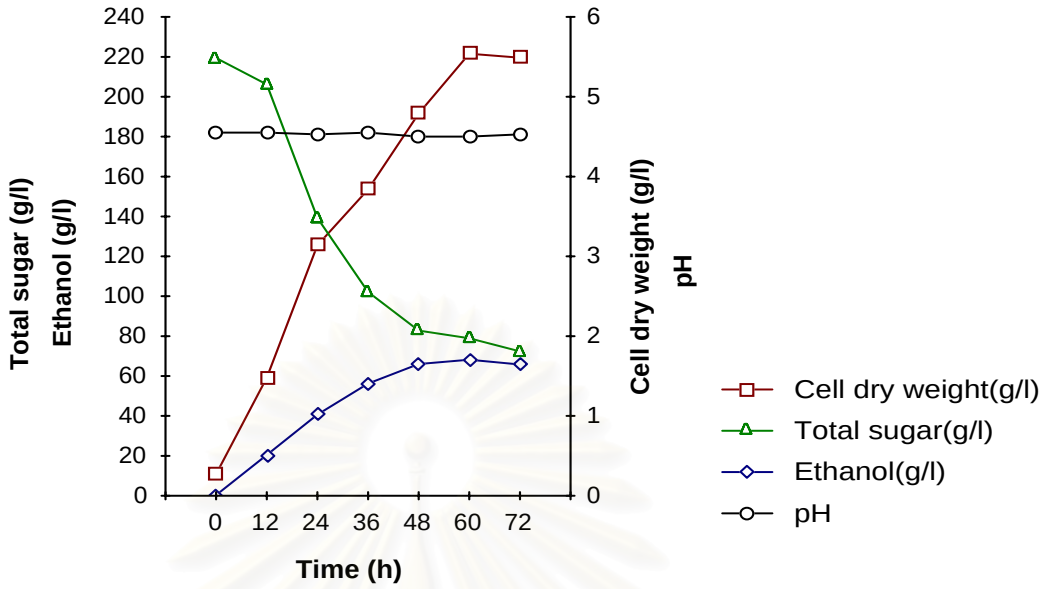
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 25 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 22 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร

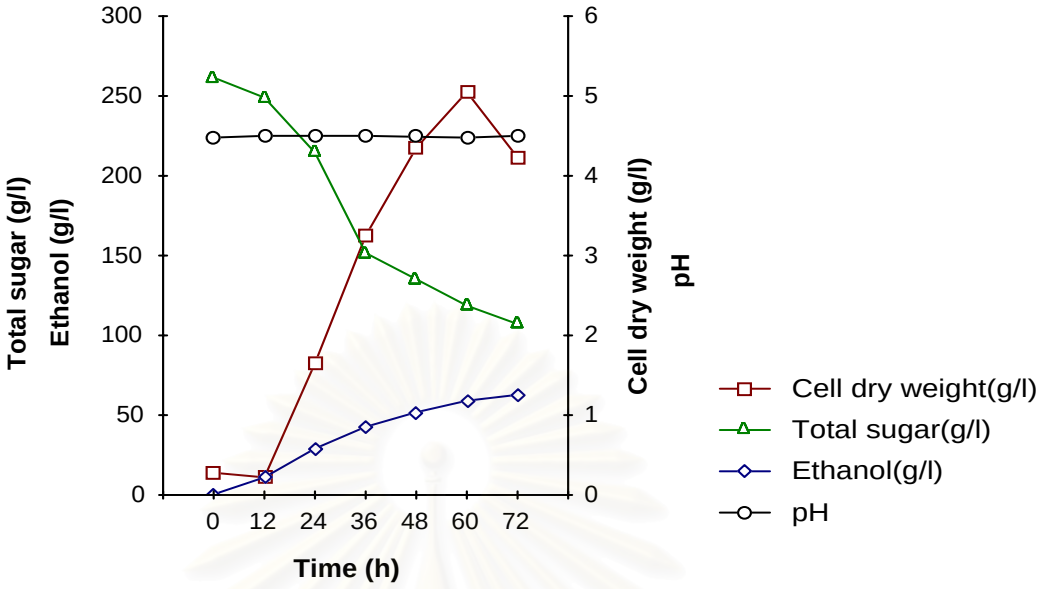
Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.3	165.14	0.21	0.02	0.03
12	1.16	102.09	31.30	3.13	3.96
24	2.89	64.90	51.60	5.16	6.53
36	3.9	39.09	58.05	5.81	7.35
48	5.12	21.72	66.60	6.66	8.43
60	**5.47**	16.29	70.80	7.08	8.96
72	5.30	**12.11**	**72.70**	**7.27**	**9.20**



รูปที่ 26 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 23 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร

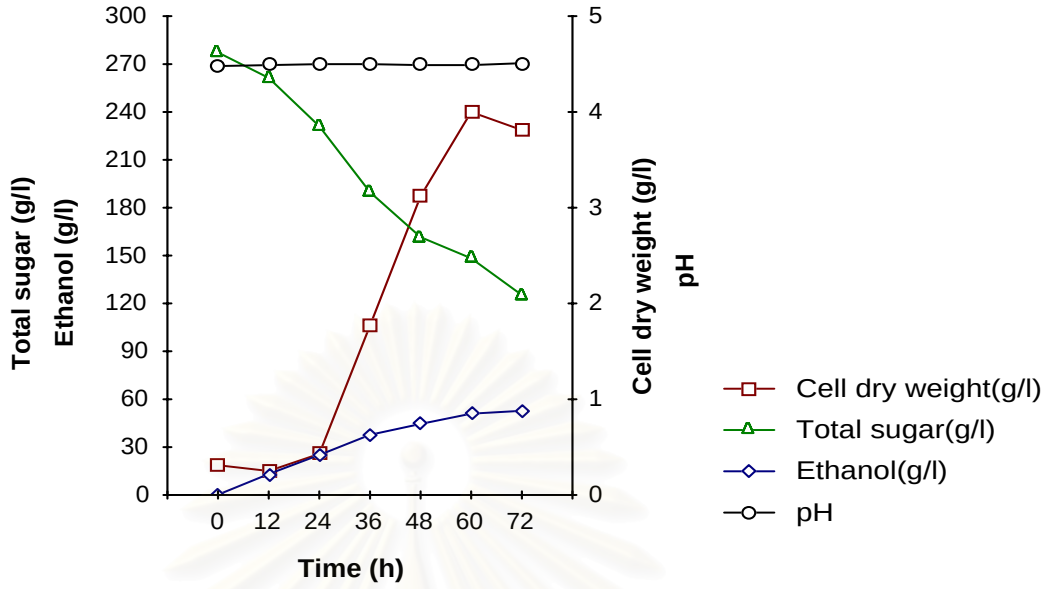
Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.27	219.44	0.31	0.03	0.04
12	1.48	206.22	20.45	2.05	2.59
24	3.14	139.30	40.69	4.07	5.15
36	3.84	102.12	56.23	5.62	7.12
48	4.79	82.84	66.00	6.60	8.35
60	**5.54**	78.98	**68.18**	**6.82**	**8.63**
72	5.49	**72.37**	65.82	6.58	8.33



รูปที่ 27 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 24 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร

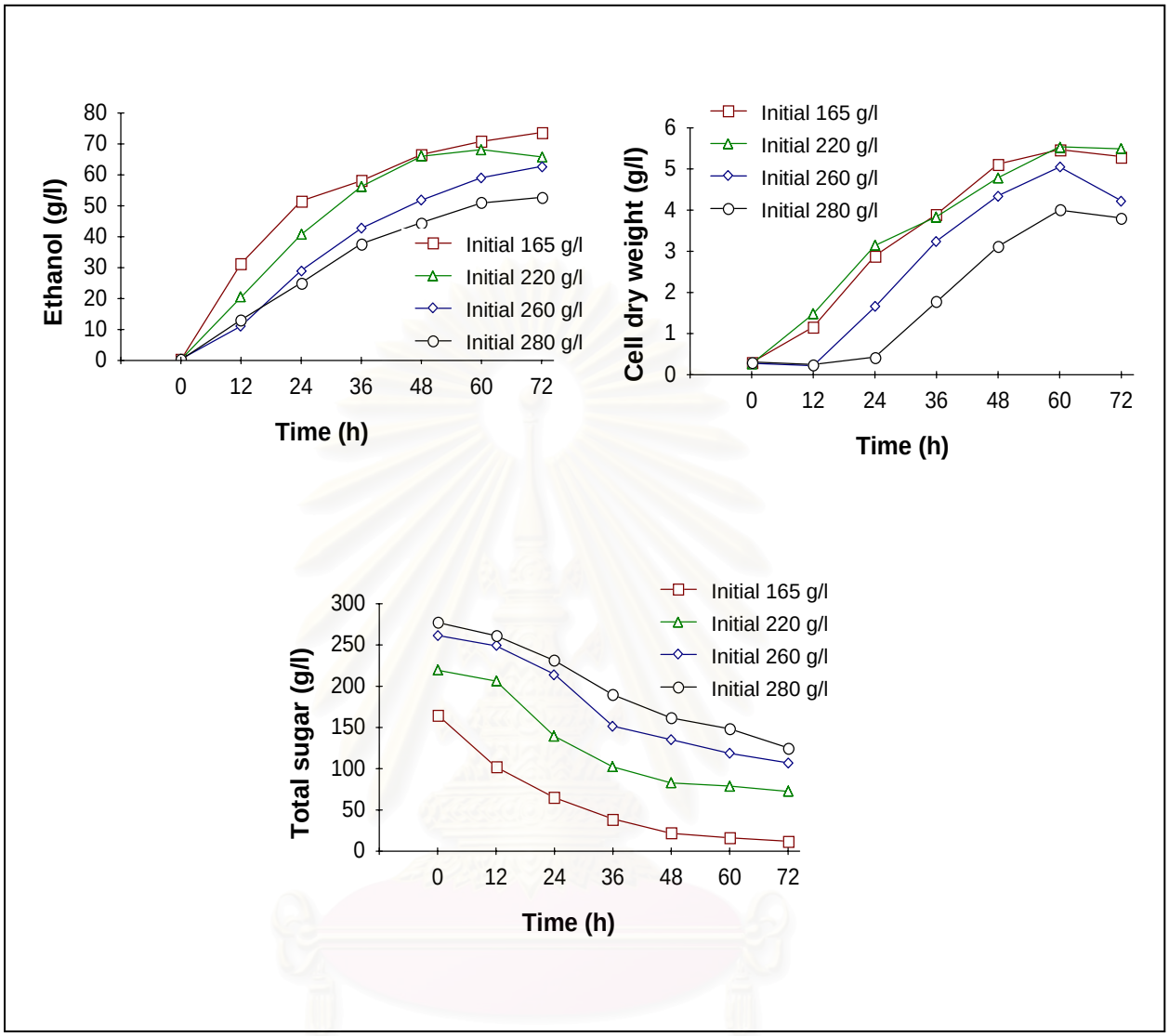
Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.28	261.57	0.41	0.04	0.05
12	0.22	249.02	11.09	1.11	1.40
24	1.65	214.48	29.1	2.91	3.68
36	3.25	161.6	42.73	4.27	5.41
48	4.35	135.16	51.82	5.18	6.56
60	**5.05**	118.64	59.09	5.91	7.48
72	4.23	**107.07**	**62.73**	**6.27**	**7.94**



รูปที่ 28 รูปแบบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 25 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร

Time (h)	Cell dry weight (g/l)	Total sugar (g/l)	Ethanol		
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)
0	0.31	277.26	0.23	0.02	0.03
12	0.25	261.32	13.11	1.31	1.66
24	0.43	231.11	25.09	2.51	3.18
36	1.77	189.7	37.73	3.77	4.78
48	3.12	161.6	44.55	4.46	5.64
60	4.09	148.4	50.91	5.09	6.44
72	3.81	125.3	52.73	5.27	6.67



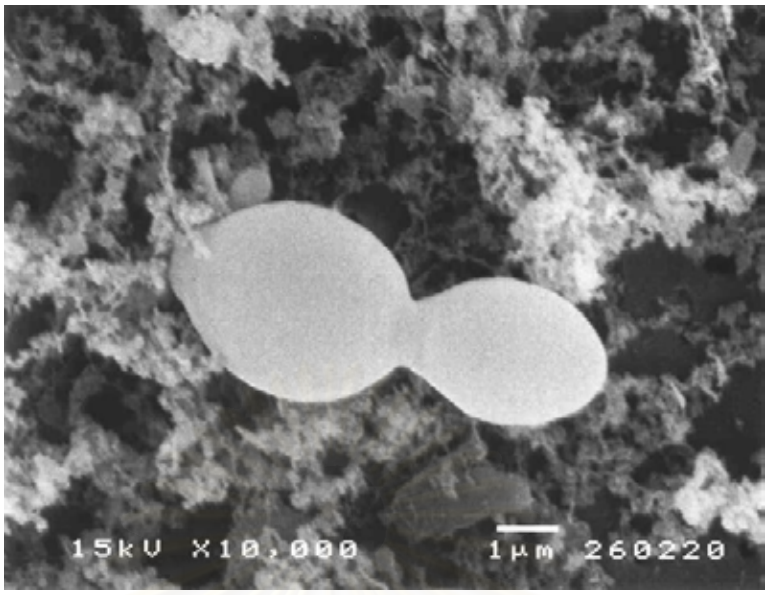
รูปที่ 29 เปรียบเทียบเทียบผลของน้ำตาลเริ่มต้น 165 220 260 และ 280 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในภาวะอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวนเท่ากับ 100 รอบต่อนาที และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5

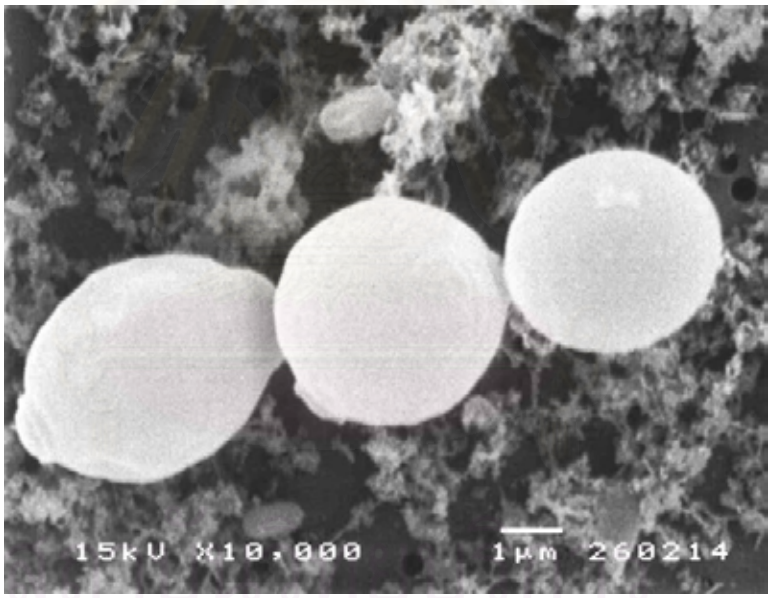
เมื่อเปรียบเทียบรูปแบบการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นเท่ากับ 165 220 260 และ 280 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในรูปที่ 29 พบว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 และ 220 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิต

เอทานอลได้มากกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 260 และ 280 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับการเจริญเติบโตพบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 165 และ 220 กรัมต่อลิตร มีค่ามากกว่า 260 และ 280 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 และ 280 กรัมต่อลิตร มีค่ามากกว่า 165 และ 220 กรัมต่อลิตร

การยับยั้งการผลิตเอทานอลเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง อาจเป็นผลจากแรงดันออสโมติก ที่เกิดจากความเข้มข้นของน้ำตาลและเกิดจากการทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance) (Golias และคณะ, 2002) ที่เซลล์ผลิตขึ้น โดยยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล (Takeshige และ Ouchi, 1995) การเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 260 และ 280 กรัมต่อลิตร พบว่าปริมาณเอทานอลที่เซลล์ผลิตขึ้นน้อยมาก เนื่องจากการเจริญเติบโตลดลง โดยสาเหตุดังกล่าวอาจเกิดมาจากเซลล์เกิดพลาสโมไลซิสจากความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่สูง ข้อสัณนิษฐานดังกล่าวยืนยันได้จากรูปเซลล์ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) ดังแสดงในรูปที่ 30-31 พบว่าเซลล์เกิดการแตกที่เวลา 72 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาจเกิดจากเซลล์เกิด autolysis ดังแสดงในรูปที่ 32

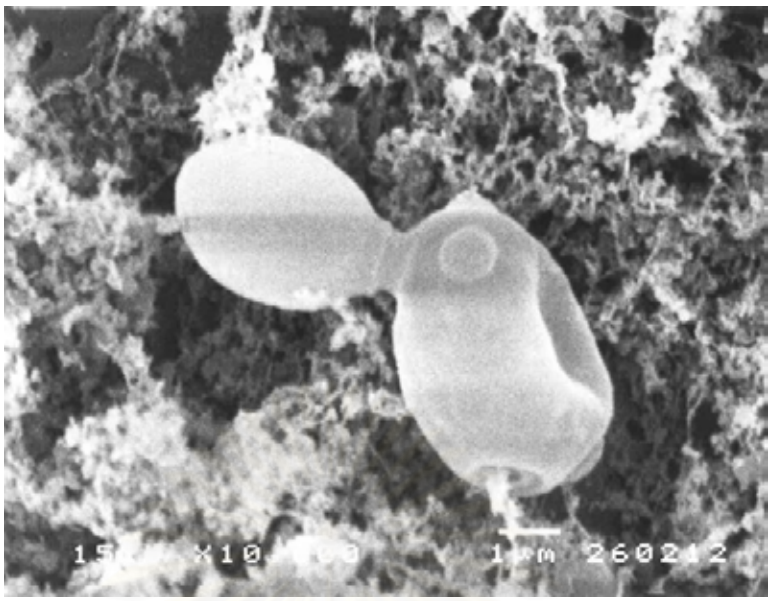
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



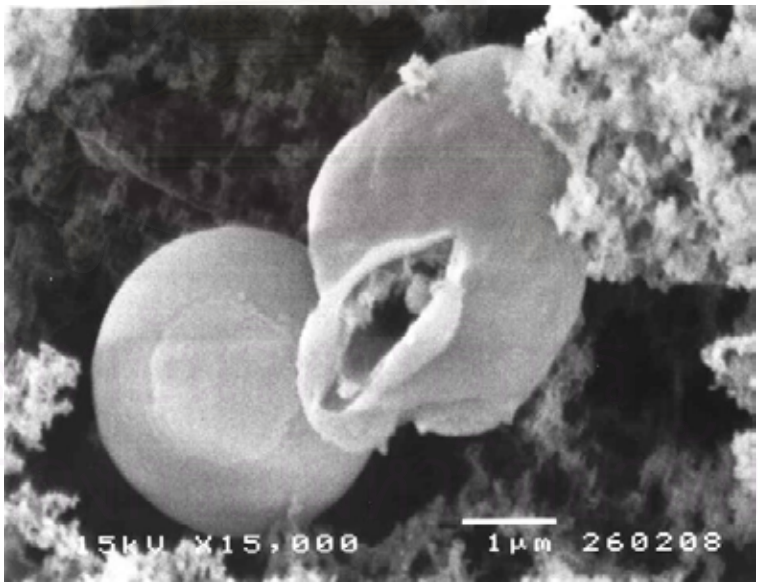


รูปที่ 30 ลักษณะเซลล์ *S. cerevisiae* SKP1 ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ (กำลังขยาย 10,000 เท่า)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 31 ลักษณะเซลล์ *S. cerevisiae* SKP1 ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ (กำลังขยาย 10,000 เท่า)



รูปที่ 32 ลักษณะเซลล์ *S. cerevisiae* SKP1 ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอน เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ (กำลังขยาย 15,000 เท่า)

เพื่อแสดงผลของน้ำตาลเริ่มต้นที่มีต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาล ของ *S. cerevisiae* SKP1 จึงนำค่าเอทานอลสูงสุด น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด และปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ มาเปรียบเทียบ โดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติสถิติดังตารางที่ 26 พบว่าปริมาณเอทานอลสูงสุดที่เชื้อผลิตได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยพบว่าเชื้อสามารถผลิตเอทานอลเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร ได้มากกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 220 260 และ 180 กรัมต่อลิตร ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 165 และ 220 กรัมต่อลิตร มีค่ามากกว่า 260 และ 280 กรัมต่อลิตร และปริมาณน้ำตาลรวมเหลือที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาล 280 กรัมต่อลิตร มีค่ามากกว่า 165 220 และ 260 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 26 ผลการทดสอบทางสถิติของการศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1

น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	เอทานอลสูงสุด (g/l)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (g/l)	น้ำตาลรวมที่เหลือ (g/l)
165	72.70[a]	5.47[a]	12.11[a]
220	65.82[b]	5.54[a]	72.37[b]
260	62.73[c]	5.05[b]	107.07[c]
280	52.73[d]	4.09[c]	125.30[d]

หมายเหตุ a, b, c และ d บอกความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 27 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นต่างกัน

อัตราการกวน (rpm)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	$Y_{p/s}$ (g_p/g_s)	q_p ($g_p/g_x.h$)	Q_p ($g_p/l.h$)
165	0.072	0.035	0.465	0.292	1.01
220	0.073	0.032	0.421	0.224	0.91
260	0.060	0.030	0.377	0.169	0.87
280	0.063	0.028	0.336	0.125	0.73

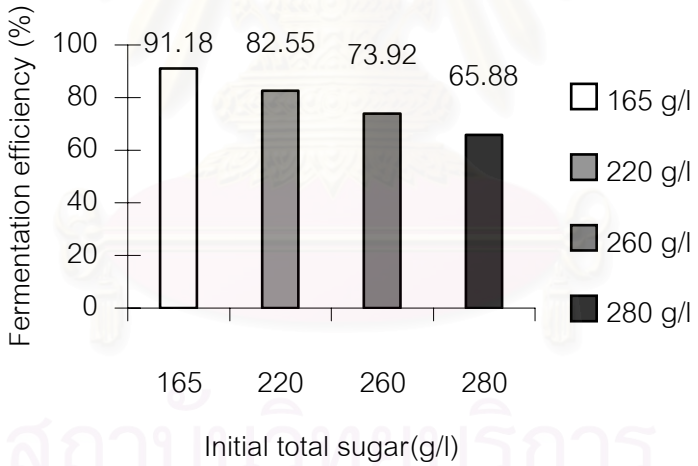
หมายเหตุ μ หมายถึง อัตราการเจริญจำเพาะ q_p หมายถึง อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ
$Y_{x/s}$ หมายถึง ผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาล Q_p หมายถึง อัตราการผลิตเอทานอล
$Y_{p/s}$ หมายถึง ผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาล

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ μ $Y_{x/s}$ $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 27 พบว่าในด้านการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* SKP1 เมื่อพิจารณาจากค่า μ ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 และ 220 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 260 และ 280 กรัมต่อลิตร สำหรับ $Y_{x/s}$ พบว่ามีค่าต่ำสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นสูงกว่า 220 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 มีค่าลดลง และผลการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญต่ำกว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 165 และ 220 กรัมต่อลิตร

ในด้านการผลิตเอทานอลเมื่อพิจารณาจากค่า $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p พบว่ามีค่าลดลงเมื่อปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเพิ่มขึ้น อาจกล่าวได้ว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นมากเกินไปนอกจากเชื้อไม่นำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญแล้ว ยังไม่นำไปใช้เพื่อผลิตเอทานอลด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยที่มีรายงานว่า เมื่อมีปริมาณน้ำตาลมากเกินไป มีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตเอทานอล อาจเนื่องจาก catabolite repression (Roukas และคณะ, 1996) Thatipamala และคณะ (1992) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของสับสเตรตต่อ $Y_{p/s}$ ในกระบวนการหมักเอทานอลแบบขั้นตอนเดียวด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่าการเพิ่มความเข้มข้น

ของกลูโคสเริ่มต้นในการหมักจาก 150 เป็น 280 กรัมต่อลิตร ทำให้ผลได้ของเอทานอลลดลงจาก 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส เหลือเพียง 0.30 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส

เมื่อพิจารณาค่า $Y_{p/s}$ จากการทดลองของการใช้น้ำตาลรวมเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร มีค่า 0.465 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสูงกว่าผลการวิจัยของ เทพปัญญา เจริญรัตน์ (2545) ซึ่งศึกษาการหมักเอทานอลโดย *S. cerevisiae* จากกากมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 164.54 กรัมต่อลิตร ได้ค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.427 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส และการทดลองของ Thatipamala และคณะ (1992) ได้ค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส จากการเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักของผลที่ได้จากงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎี ดังแสดงในรูปที่ 33 ประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดคือ 91.18 ดังนั้นจึงเลือกภาวะการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร สำหรับการวิจัยต่อไป



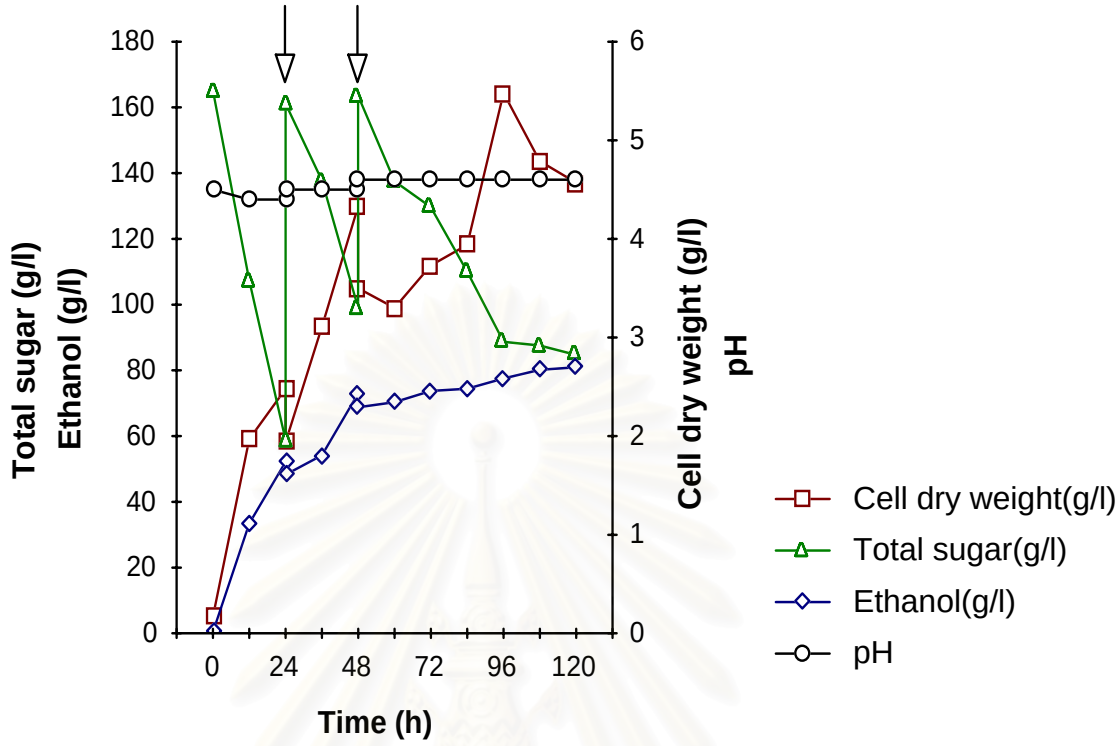
รูปที่ 33 ค่า $Y_{P/S}$ ของการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1เมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าจากทฤษฎี ($Y_{P/S}$=0.51) ของการเลี้ยงในภาวะที่ใช้น้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 220 260 และ 280 กรัมต่อลิตร อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5

5. การปรับปรุงการหมักเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบ รีพีท-แบตช์ และ เฟด-แบตช์

จากผลการวิจัยที่ผ่านมา พบว่าปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร ตามทฤษฎีกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 51.1 กรัมต่อลิตร (ดังหน้าที่ 8) ดังนั้นการเพิ่มปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น จึงน่าจะเป็นการเพิ่มปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ Bravo, Mahn และ Shene (2000) พบว่า การเลี้ยง *Z. mobilis* เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในการหมักแบบเฟดแบตช์จาก 40 กรัมต่อลิตร เป็น 52 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดเพิ่มขึ้นจาก 27 กรัมต่อลิตร เป็น 33 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับผลงานวิจัยของ เทพปัญญา เจริญรัตน์ (2545) ที่พบว่า เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นจาก 104.70 กรัมต่อลิตร เป็น 164.32 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่หมักเพิ่มขึ้นจาก 55.46 เป็น 70.37 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 64 ชั่วโมง แต่สำหรับงานวิจัยนี้ พบว่าเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 โดยเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นจาก 165 กรัมต่อลิตร เป็น 220 260 280 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ผลิตได้ลดลงเมื่อปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้นเท่ากับ 72.27 68.16 62.73 และ 52.33 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ได้ค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.499 0.421 0.377 และ 0.336 ตามลำดับ) ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับ Koshimizu และคณะ (1984) ที่พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในช่วง 200-300 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ผลได้ของเอทานอลต่อสับสเตรตลดลง ซึ่งอาจเกิดจาก catabolite repression และการเกิดพลาสโมไลซิสของเซลล์ (Roukas และคณะ, 1996) การวิจัยนี้ใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นสูงกว่างานวิจัยที่กล่าวมา เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอล โดยพิจารณาจากปริมาณเอทานอลสูงสุด (กรัมต่อลิตร) วิธีการที่นำมาใช้คือ การเพาะเลี้ยงแบบ รีพีท-แบตช์ และเฟดแบตช์ ที่มีการเติมอาหารเป็นครั้งคราว ข้อดีของวิธีการหมักแบบรีพีท-แบตช์ และเฟดแบชต์ คือ สามารถลดปัญหาการยับยั้งที่เกิดจากความเข้มข้นของสับสเตรตที่สูงต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ และให้อัตราการผลิตเอทานอลสูง (Echegaray และคณะ, 2000 ; Nishizawa และคณะ , 1984)

การศึกษาการเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 โดยวิธี รีพีท-แบตช์ ทำโดยการป้อนสับสเตรต คือ กากน้ำตาล ระหว่างระยะเวลาของการเลี้ยงเชื้อ การเลือกช่วงเวลาของการเติมนั้นอาศัยข้อมูลจากการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ (ตารางที่ 24) โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือในน้ำหมัก จึงได้ป้อนกากน้ำตาลที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งพบว่าการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีน้ำตาลรวมเหลือเพียง 64.90 และ 21.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยการป้อนกากน้ำตาลทั้งสองช่วงเวลาให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในถังหมักใกล้เคียงกับความเข้มข้นเมื่อเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ (165 กรัมต่อลิตร) วิธีดังกล่าวทำโดย ช่วงแรกป้อนกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 672 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ลงในถังหมักที่มีปริมาตรของน้ำหมักเท่ากับ 3150 มิลลิลิตร (ไม่ได้นำน้ำหมักออก เนื่องจากปริมาตรน้ำหมักเวลานั้นไม่มากเกินไป เมื่อเทียบกับปริมาตรถังหมัก) ทำให้ปริมาตรของน้ำหมักหลังจากป้อนกากน้ำตาลเท่ากับ 3750 มิลลิลิตร และช่วงเวลาที่สองป้อนกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 672 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 450 มิลลิลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง ลงในถังหมักที่มีปริมาตรของน้ำหมักเท่ากับ 3690 มิลลิลิตร โดยก่อนการป้อนกากน้ำตาลมีการนำน้ำหมักออกจากถังหมักเท่ากับปริมาตรที่เติม (450 มิลลิลิตร) ทำให้ปริมาตรของน้ำหมักในถังหมักหลังจากป้อนกากน้ำตาลเท่ากับ 3690 มิลลิลิตร จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยชั่วโมงที่มีการป้อนกากน้ำตาล มีการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ ก่อนป้อนกากน้ำตาล และหลังจากป้อนกากน้ำตาล ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 34 และตารางที่ 28

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 34 รูปแบบการหมักเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ รีพีท-แบตช์ โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการเติมน้ำตาล 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 28 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดย *S. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงแบบ รีพีท-แบตช์ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการป้อนกากน้ำตาล 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ 48

Time(h)	Cell dry weight(g/l)	Total sugar(g/l)	Ethanol			Volume of medium(ml)	Volume of feeding nutrient (ml)
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)		
0	0.17	165.13	0.45	0.05	0.06	3240	-
12	1.97	107.32	33.43	3.34	4.23	3210	-
$24_{ก่อนเติม}$	2.48	58.75	52.19	5.22	6.61	3150	600
$24_{หลังเติม}$	1.94	161.14	48.28	4.83	6.11	3750	-
36	3.11	137.80	54.18	6.42	8.13	3690	-
$48_{ก่อนเติม}$	4.33	99.10	72.98	7.30	9.24	3240	450
$48_{หลังเติม}$	3.50	163.61	68.80	6.88	8.71	3690	-
60	3.30	137.54	70.34	7.03	8.90	3630	-
72	3.73	129.71	73.75	7.38	9.34	3600	-
84	3.94	110.03	74.42	7.44	9.42	3570	-
96	5.48	88.72	77.56	7.76	9.82	3540	-
108	4.79	87.59	80.19	8.02	10.15	3510	-
120	4.57	84.70	80.96	8.10	10.25	3480	-

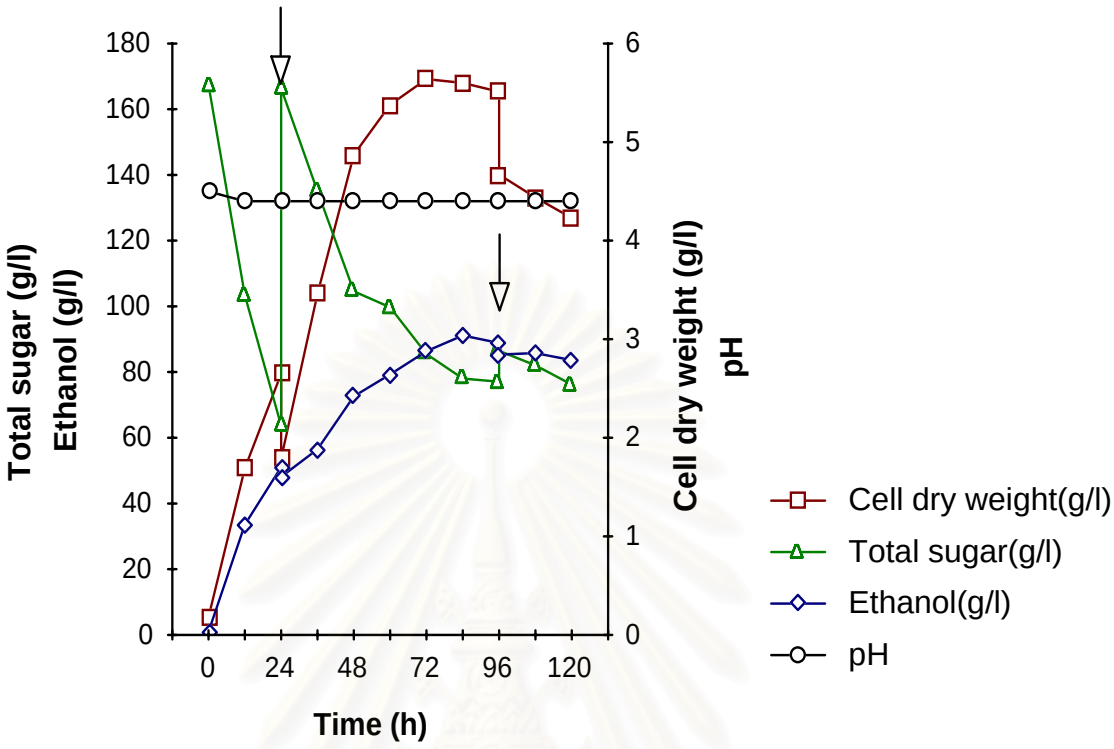
จากผลการทดลองพบว่า ในการเลี้ยงเชื้อแบบ รีพีทแบตช์ ที่มีการป้อนกากน้ำตาล 2 ระยะคือ ที่ชั่วโมงที่ 24 และ 48 ปริมาณเอทาอลสูงสุดที่ *S. cerevisiae* SKP1 ผลิตได้ คือ 80.96 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 8.09 %(w/v) หรือ 10.25% (v/v) ที่เวลา 120 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.48 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลเหลือเท่ากับ 84.70 กรัมต่อลิตร (ดังตารางที่ 28) พบว่าข้อดีของการป้อนกากน้ำตาลในการทดลองนี้ คือ *S. cerevisiae* SKP1 สามารถผลิตเอทานอลได้ในเวลาเร็วขึ้น กล่าวคือได้ 72.98 กรัมต่อลิตร ในเวลา 48 ชั่วโมง ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ได้เอทานอลเท่ากับ 72.70 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง การป้อนกากน้ำตาลไม่ส่งผลต่อการเพิ่มการผลิตเอทานอลหลังจาก 48 ชั่วโมง ปริมาณเอทานอลค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่อเลี้ยงเชื้อนานขึ้น โดยได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 80.96 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 120 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเชื้อสามารถทนความเข้มข้นของเอทานอลได้ในระดับหนึ่ง ถึงแม้จะยังมีน้ำตาลเหลืออยู่ แสดงว่าการทนต่อความเข้มข้นเอทานอลของเซลล์เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากจุลินทรีย์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในปี 2002 Alfenore และคณะ ได้ศึกษาการปรับปรุงการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* ด้วยวิธีการป้อนวิตามินระหว่างการหมักแบบ เฟด-แบตช์ โดยใช้กลูโคสในถังหมักเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร และกลูโคสสำหรับป้อนเข้า 700 กรัมต่อลิตร วิธีที่ใช้ควบคุมการป้อนกลูโคสระหว่างการหมักใช้วิธีออนไลน์ คือ เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสน้อยกว่า 20 กรัมต่อลิตร กลูโคสถูกป้อนเข้าถังหมักอย่างต่อเนื่อง ให้มีความเข้มข้นของกลูโคสในถังหมักเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร และเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 90 กรัมต่อลิตร กลูโคสถูกป้อนในอัตราต่ำลงให้มีความเข้มข้นของกลูโคสในถังหมักเพียง 50 กรัมต่อลิตร ส่วนในงานวิจัยนี้พบว่า การเติมน้ำตาลให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในถังหมักเท่ากับเริ่มต้นช่วยให้ *S. cerevisiae* SKP1 ผลิตเอทานอลได้เร็วขึ้น และได้เอทานอลเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ แต่ปริมาณเอทานอลสูงสุดไม่เพิ่มขึ้นมากนัก ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อสามารถทนเอทานอลได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Golias และคณะ (2002)

การศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ เฟดแบตช์ ทำโดยป้อนกากน้ำตาล 2 ระยะ คือที่เวลา 24 และ 96 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ โดยใช้กากน้ำตาลสำหรับป้อนเข้าที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวม 672 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 600 มิลลิลิตร สำหรับเติมที่ชั่วโมงที่ 24 และ 35 มิลลิลิตร สำหรับเติมที่ชั่วโมงที่ 96 ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 35 และตารางที่ 29

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 35 รูปแบบการหมักเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟดแบตช์ โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการเติมน้ำตาล 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 29 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดย *S. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงแบบ เฟด-แบตช์ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการป้อนกากน้ำตาล 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ 96

Time(h)	Cell dry weight(g/l)	Total sugar(g/l)	Ethanol			Volume of medium(ml)	Volume of feeding nutrient (ml)
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)		
0	0.18	167.39	0.98	0.10	0.12	3240	-
12	1.69	103.39	33.56	3.36	4.25	3210	-
$24_{\text{ก่อนเติม}}$	2.65	63.67	51.09	5.11	6.47	3150	600
$24_{\text{หลังเติม}}$	1.79	167.34	48.13	4.81	6.09	3750	-
36	1.86	135.02	56.50	5.65	7.15	3690	-
48	3.46	104.60	72.63	7.26	9.19	3660	-
60	5.38	99.75	79.31	7.93	10.04	3630	-
72	**5.64**	85.49	86.38	8.64	10.94	3600	-
84	5.60	78.04	**91.12**	**9.11**	**11.53**	3570	-
$96_{\text{ก่อนเติม}}$	5.51	77.07	88.87	8.90	11.26	3510	35
$96_{\text{หลังเติม}}$	4.67	86.45	85.35	8.54	10.81	3545	-
108	4.44	82.09	85.77	8.58	10.86	3485	-
120	4.23	76.20	83.62	8.36	10.58	3455	-

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ เฟด-แบตช์ โดยเติมกากน้ำตาล 2 ช่วง พบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลให้สูงขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยได้สูงสุดเท่ากับ 91.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 11.53% (v/v) ในเวลา 84 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.64 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลเหลือ 76.2 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 30 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟด แบตช์ มีการป้อนกากน้ำตาล 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ 96

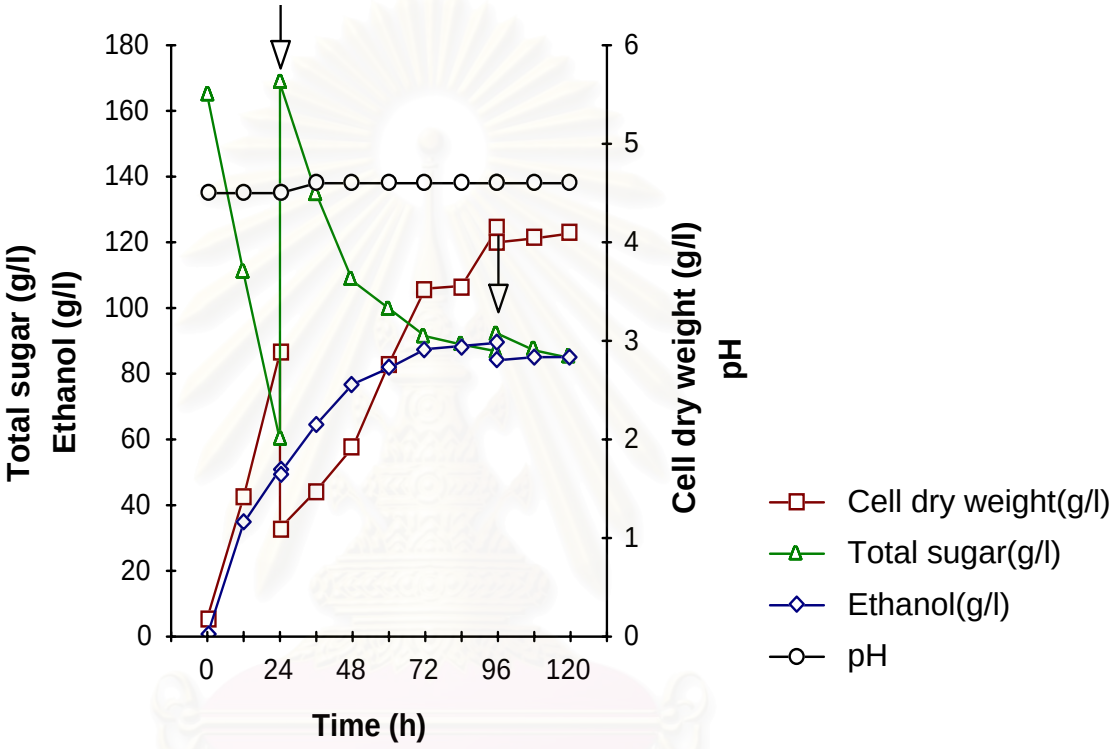
Cultivation time (h)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	$Y_{p/s}$ (g_p/g_s)	q_p ($g_p/g_x.h$)	Q_p ($g_p/l.h$)
0-24	0.112	0.024	0.486	1.227	2.01
24-96	0.030	0.043	0.476	0.100	0.93
96-120	-0.004	-0.043	0.096	-0.008	0.70

หมายเหตุ μ หมายถึง อัตราการเจริญจำเพาะ q_p หมายถึง อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ
$Y_{x/s}$ หมายถึง ผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาล Q_p หมายถึง อัตราการผลิตเอทานอล
$Y_{p/s}$ หมายถึง ผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาล

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ μ $Y_{x/s}$ $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p ผลแสดงในตารางที่ 30 ในด้านการนำน้ำตาลมาใช้เพื่อการเจริญและการผลิตเอทานอลจากค่า $Y_{x/s}$ และ$Y_{p/s}$ พบว่า $Y_{x/s}$ มีค่าเพิ่มขึ้นหลังจากป้อนกากน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 24 และ $Y_{p/s}$ มีค่าค่อนข้างคงที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์ยังคงสามารถสามารถนำน้ำตาลมาใช้ในการเจริญและผลิตเอทานอลเมื่อมีการเติมน้ำตาล ในขณะ μ q_p และ Q_p มีค่าลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

เนื่องจากพบว่าข้อจำกัดของความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลรวมในกากน้ำตาลสำหรับเติมไม่สามารถเพิ่มขึ้นให้สูงกว่านี้สำหรับปริมาตรของกากน้ำตาลต่อปริมาตรถังหมักที่ใช้เพื่อลดปริมาตรของกากน้ำตาลที่ใช้เติม จึงทดลองเปลี่ยนอาหารที่ใช้สำหรับเติมจากกากน้ำตาลมาเป็นกลูโคสบริสุทธิ์ การเลือกใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตสำหรับป้อนเข้าเนื่องมาจาก สามารถเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสที่ใช้สำหรับเติมได้โดยปริมาตรไม่มากเท่ากับการใช้กากน้ำตาล

การทดลองขั้นต่อไป ศึกษาการลดปริมาตรของอาหารที่ใช้ป้อนเพื่อแก้ปัญหาการเจือจางของน้ำหมักและเอทานอล ทำโดยเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร มีการป้อนอาหาร 2 ระยะ คือที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง อาหารสำหรับป้อนเข้าได้แก่กลูโคสเข้มข้น 800 กรัมต่อลิตร ปริมาตรเท่ากับ 400 มิลลิลิตร ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 36 และตารางที่ 31



รูปที่ 36 รูปแบบการหมักเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟดแบตช์ โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการป้อนกลูโคสบริสุทธิ์ 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ ชั่วโมงที่ 96 ของการเลี้ยงเชื้อ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 31 การเปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงแบบ เฟด-แบตช์ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร มีการป้อนกลูโคสบริสุทธิ์ 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ 96

Time(h)	Cell dry weight(g/l)	Total sugar(g/l)	Ethanol			Volume of medium(ml)	Volume of feeding nutrient (ml)
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)		
0	0.19	164.68	0.45	0.55	0.69	3240	-
12	1.42	110.54	34.58	3.46	4.38	3210	-
$24_{ก่อนเติม}$	2.88	59.72	50.92	4.99	6.32	3150	400
$24_{หลังเติม}$	1.10	168.42	49.71	4.97	6.29	3550	-
36	1.48	134.71	64.62	6.46	8.18	3490	-
48	1.92	108.25	76.83	7.68	9.72	3460	-
60	2.77	99.84	81.73	8.17	10.34	3430	-
72	3.53	91.43	87.50	8.75	11.08	3400	-
84	3.59	88.91	88.46	8.85	11.20	3370	-
$96_{ก่อนเติม}$	**4.15**	86.75	**89.42**	**8.94**	**11.32**	3310	35
$96_{หลังเติม}$	4.00	92.18	84.10	8.31	10.52	3345	-
108	4.04	87.13	85.04	8.40	10.63	3285	-
120	4.09	84.77	85.13	8.50	10.76	3255	-

การศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ เฟด-แบตช์ โดยเติมกลูโคสบริสุทธิ์ พบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ *S. cerevisiae* SKP1 ผลิตได้คือ 89.42 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 8.94%(w/v) หรือ 11.32% (v/v) ที่เวลา 96 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 4.15 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลเหลือเท่ากับ 84.77 กรัมต่อลิตร ส่วนการใช้กากน้ำตาลสำหรับป้อนเข้า ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่เชื้อผลิตได้คือ 92.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 9.21%(w/v) หรือ 11.66% (v/v) ที่เวลา 84 ชั่วโมงลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.64 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลเหลือเท่ากับ 76.20 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเติมกลูโคสได้มวลเซลล์ต่ำกว่าการป้อนกากน้ำตาล ทั้งนี้อาจเป็นผลจาก catabolite repression ของน้ำตาลกลูโคสบริสุทธิ์ และ *S. cerevisiae* SKP1 สามารถผลิตเอทานอลได้เร็วขึ้นตั้งแต่เวลาที่ 36 ชั่วโมง และมากกว่าการป้อนกากน้ำตาลเล็กน้อย แต่ได้เอทานอลสูงสุดน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการป้อนกากน้ำตาล

ตารางที่ 32 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟด แบตช์ มีการป้อนกลูโคสบริสุทธิ์ 2 ช่วง คือชั่วโมงที่ 24 และ 96

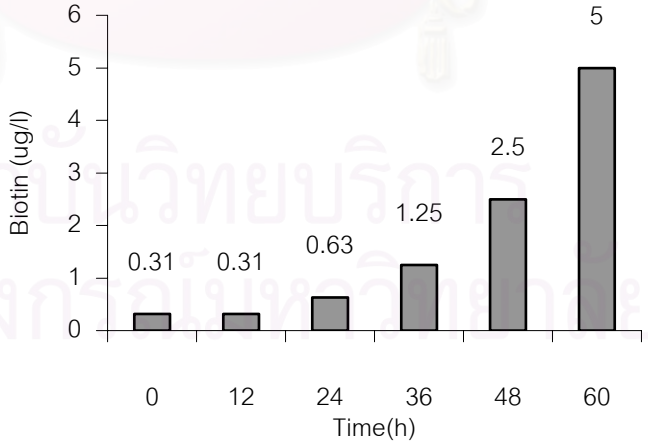
cultivation time (h)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	$Y_{p/s}$ (g_p/g_s)	q_p ($g_p/g_x.h$)	Q_p ($g_p/l.h$)
0-24	0.113	0.026	0.483	1.260	2.12
24-96	0.025	0.035	0.490	0.123	0.93
96-120	0.001	0.015	0.146	0.002	0.71

หมายเหตุ μ หมายถึง อัตราการเจริญจำเพาะ q_p หมายถึง อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ
$Y_{x/s}$ หมายถึง ผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาล Q_p หมายถึง อัตราการผลิตเอทานอล
$Y_{p/s}$ หมายถึง ผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาล

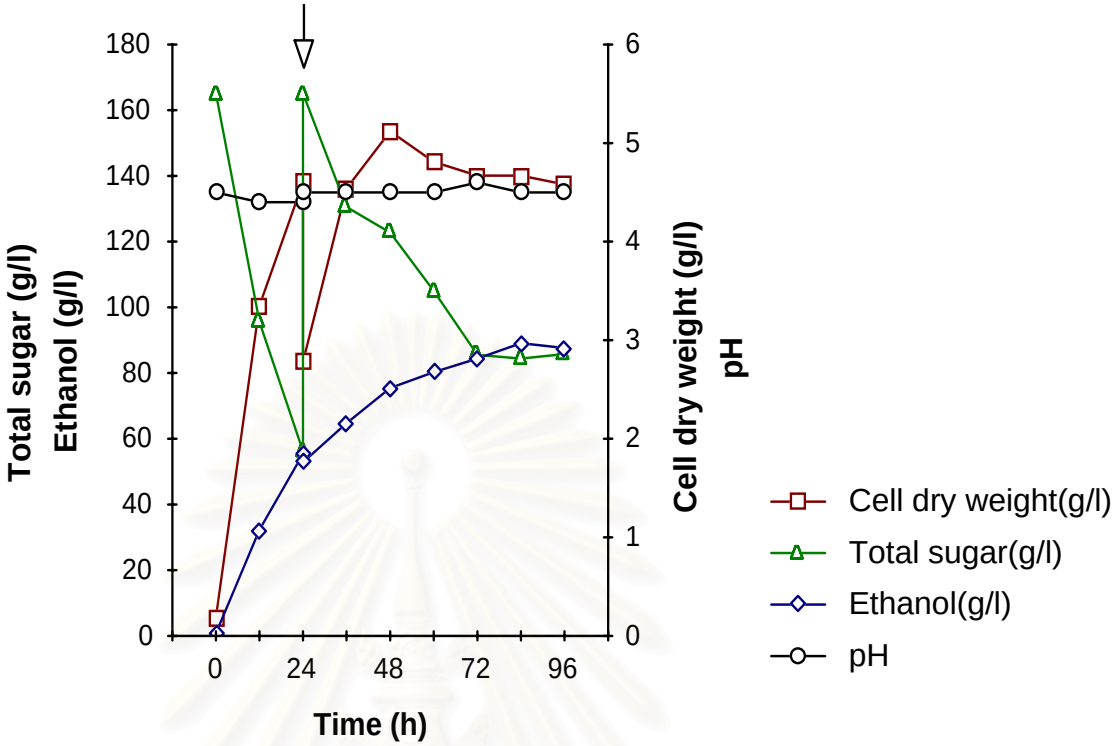
เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ μ $Y_{x/s}$ $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p ผลแสดงในตารางที่ 32 ในด้านการนำน้ำตาลมาใช้เพื่อการเจริญและการผลิตเอทานอลจากค่า $Y_{x/s}$ และ$Y_{p/s}$ พบว่า $Y_{x/s}$ มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากป้อนกากน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 24 และ $Y_{p/s}$ มีค่าค่อนข้างคงที่แสดงให้เห็นว่าเซลล์ยังคงสามารถสามารถนำน้ำตาลมาใช้ในการเจริญและผลิตเอทานอลเมื่อมีการป้อนกลูโคสบริสุทธิ์ ในขณะ μ q_p และ Q_p มีค่าลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

Winter และคณะ (1989) รายงานว่ายีสต์ (*S. cerevisiae*) 1 กรัมต้องการไบโอติน 1.8 ไมโครกรัม และการใช้ไบโอตินเริ่มต้น 3-4 ไมโครกรัมต่อลิตร เพียงพอให้เซลล์มีการเจริญมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด และเซลล์สามารถนำไบโอตินไปใช้ได้ดีที่ความเข้มข้นของเอทานอลต่ำ การนำไบโอตินไปใช้ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่า 84 กรัมต่อลิตร Alfenore และคณะ (2002) ศึกษาวิธีการเติมวิตามิน เพื่อช่วยปรับปรุงการมีชีวิตของเซลล์เพื่อให้สร้างเอทานอลได้มากขึ้น วิธีการเติมวิตามินวิธีการหนึ่งคือ การเติมแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล คือ การเติมวิตามินเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณจากปริมาณเริ่มต้นที่เติม โดยหาปริมาณวิตามินที่เซลล์ต้องการจากความเข้มข้นของเซลล์สูงสุด จากนั้นคำนวณหาปริมาณวิตามินที่ใช้จากรายงานของ Winter และคณะ(1989)

จากรายงานดังกล่าวจึงตั้งสมมุติฐานว่าการเติมวิตามินแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล อาจจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล ในงานวิจัยนี้จากผลการทดลองในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์ ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารป้อนเข้าที่ชั่วโมงที่ 24 และ 96 พบว่าปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 5.64 กรัมต่อลิตร (การป้อนกากน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 96 ไม่เพิ่มการผลิตเอทานอล ดังนั้นในการศึกษาขั้นนี้จึงไม่มีการเติมน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 96) การคำนวณหาปริมาณวิตามินทั้งหมดที่เซลล์ต้องการจึงเท่ากับ 10.15 ไมโครกรัมต่อลิตร (5.64 กรัมต่อลิตร x 1.8 ไมโครกรัมต่อ1 กรัมยีสต์) แล้วจึงหาปริมาณไบโอตินที่เติมในแต่ละช่วง ปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมที่หาได้แสดงในรูปที่ 37



รูปที่ 37 ปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมสำหรับป้อนระหว่างการเลี้ยง *S.cerevisiae* SKP1 แบบ เฟด-แบตช์



รูปที่ 38 รูปแบบการหมักเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบ เฟดแบตช์ โดยใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร โดยป้อนกากน้ำตาลที่เวลา 24 ชั่วโมง และเติมไบโอตินแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล

การศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ เฟด-แบตช์ ที่มีการป้อนกากน้ำตาลที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และเติมไบโอตินแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 38 และตารางที่ 33

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 33 การเปลี่ยนแปลงนระหว่างการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงแบบ เฟด-แบตช์ เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัม/ลิตร โดยเติมกากน้ำตาลที่เวลา 24 ชั่วโมง และเติมไบโอตินแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล

Time(h)	Cell dry weight(g/l)	Total sugar(g/l)	Ethanol			Volume of medium(ml)	Volume of feeding nutrient (ml)
			(g/l)	%(w/v)	%(v/v)		
0	0.16	166.42	0.79	0.08	0.1	3240	-
12	3.35	95.59	32.28	3.23	4.09	3210	-
$24_{\text{ก่อนเติม}}$	4.60	56.18	55.38	5.54	7.01	3150	600
$24_{\text{หลังเติม}}$	2.78	165.14	52.82	5.28	6.69	3750	-
36	3.47	130.55	64.75	6.48	8.20	3690	-
48	4.54	121.77	75.48	7.55	9.55	3660	-
60	**5.12**	105.00	80.29	8.03	10.16	3630	-
72	4.81	85.55	84.41	8.44	10.68	3600	-
84	4.67	84.41	**89.08**	**8.91**	**11.28**	3570	-
96	4.58	84.17	87.65	8.77	11.09	3510	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ เฟด-แบตช์ โดยเติมกากน้ำตาลร่วมกับไบโอติน พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ผลิตได้คือ 89.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 8.91%(w/v) หรือ 11.28% (v/v) ที่เวลา 84 ชั่วโมงลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.12 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลเหลือ 84.17 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองระหว่างการเติมไบโอติน และไม่เติมไบโอติน พบว่าการเติมไบโอตินส่งผลให้การเจริญของเซลล์ดีขึ้นในช่วงต้นของการเจริญ (12 และ 24 ชั่วโมง) และ *S. cerevisiae* SKP1 สามารถผลิตเอทานอลได้เร็วขึ้นที่ 36 ชั่วโมง ส่วนปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ได้เมื่อเติมและไม่เติมไบโอตินใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 34 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ fed-batch ที่มีการป้อนกากน้ำตาล 1 ครั้ง คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเติมไบโอติน

cultivation time (h)	μ (h^{-1})	$Y_{x/s}$ (g_x/g_s)	$Y_{p/s}$ (g_p/g_s)	q_p ($g_p/g_x.h$)	Q_p ($g_p/l.h$)
0-24	0.140	0.041	0.489	0.741	2.31
24-96	0.012	0.024	0.430	0.080	0.91

หมายเหตุ μ หมายถึง อัตราการเจริญจำเพาะ q_p หมายถึง อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ
$Y_{x/s}$ หมายถึง ผลได้ของเซลล์ต่อน้ำตาล Q_p หมายถึง อัตราการผลิตเอทานอล
$Y_{p/s}$ หมายถึง ผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาล

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาคำนวณค่าพารามิเตอร์ ได้แก่ μ $Y_{x/s}$ $Y_{p/s}$ q_p และ Q_p ผลแสดงในตารางที่ 34 การศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ เฟด-แบตช์ โดยเติมกลูโคสบริสุทธิ์ จากค่า $Y_{x/s}$ และ$Y_{p/s}$ พบว่า พารามิเตอร์ทั้งสองค่ามีค่าลดลงเล็กน้อยหลังจากป้อนกากน้ำตาลร่วมกับไบโอติน ในขณะ μ q_p และ Q_p มีค่าลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

เมื่อนำผลงานวิจัยนี้เปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น สามารถแสดงได้ดังตารางที่ 36

ตารางที่ 35 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากงานวิจัยกับงานวิจัยอื่น

Substrate	Type of fermentation	Microorganism	Yield ($Y_{p/s}$)	Ethanol %(v/v)	References
cane molasses	fed-batch	*S. cerevisiae* SKP1	0.48	11.53	งานวิจัยนี้
cane molasses	repeated-batch	*S. cerevisiae* M30	-	9.0	ปนิดา กิตติรัตน์ (2546)
cassava	fed-batch	*S. cerevisiae* TISTR 5013	0.42	10.93	เทพปัญญา เจริญรัตน์ (2545)
glucose	batch	*S. cerevisiae*	0.31	12.5	Najafpour, Younesei และ Ismail (2004)
sucrose	batch	Saccharomyces yeast extracred from toddy palm	0.46	11.39	Pramanik (2004)
glucose	fed-batch	*S. cerevisiae*	0.43	18.61	Alfenore (2003)
acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate	batch	*S. cerevisiae*	0.44	5.09	Yu และ Zhang (2003)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 35 (ต่อ)

Substrate	Type of fermentation	Microorganism	Yield ($Y_{p/s}$)	Ethanol %(v/v)	References
cheese whey (lactose)	continuous	genetically modified *S.cerevisiae*	-	6.33	Domingues, Lina และ Teixeira (2001)
pineapple cannery	continuous	*S. cerevisiae* ATCC 24553	0.47	4.75	Nigam (1999)
beet molsses	fed-batch (immobilized cells)	*S. cerevisiae*	-	6.71	Roukas (1996)
tamarind waste and cane molasses	batch	*S. cerevisiae* NCIM 3526	-	9.7	Patil (1998)
glucose	fed-batch	*Zymomonas mobilis*	-	14.3	Silman (1984)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลในถังหมักแบบแบตช์

1. ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP1 คือ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร

2. เมื่อผลิตเอทานอลโดยใช้ภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาข้อที่ 1 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 72.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 9.20 %(ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เวลา 72 ชั่วโมง ได้ผลได้ของเอทานอลต่อการใช้น้ำตาล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.465 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และมีอัตราการผลิต (Q_p) เท่ากับ 1.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

3. เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 220-280 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ลดลง โดยได้เอทานอลเท่ากับ 52.73 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 6.67 %(ปริมาตร/ปริมาตร) เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 280 กรัมต่อลิตร

การปรับปรุงการผลิตเอทานอลในถังหมักแบบ รีพีทแบตช์

1. การป้อนกากน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 24 ส่งผลให้ผลิตเอทานอลได้ในเวลาเร็วขึ้นโดยได้เท่ากับ 72.98 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง

2. เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ ซึ่งได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 72.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 9.20 %(ปริมาตร/ปริมาตร) การเติมกากน้ำตาลมีผลให้การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นโดยได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 80.96 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 10.25 %(ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เวลา 120 ชั่วโมง

การปรับปรุงการผลิตเอทานอลในถังหมักแบบ เฟด-แบตช์

การป้อนกากน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 24 เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมในถังหมักใกล้เคียงกับเริ่มต้น พบว่าได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 91.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 11.53 %(ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เวลา 84 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.64 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{p/s}$ เท่ากับ 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล คิดเป็นค่าประสิทธิภาพการหมักโดยเทียบกับค่าทฤษฎีเท่ากับ 94.12% และ Q_p เท่ากับ 1.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งการป้อนกากน้ำตาลเป็นวิธีที่ดีกว่าการป้อนกลูโคสบริสุทธิ์ และการป้อนกากน้ำตาลและไบโอติน

ข้อสรุปของการปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์ พบว่าสามารถเพิ่มปริมาณเอทานอลจาก 53.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 6.71%(ปริมาตร/ปริมาตร) ได้สูงขึ้นถึง 91.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 11.53 %(ปริมาตร/ปริมาตร)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

จรัญ เจตนะจิตร. 2525. การแยกเชื้อบริสุทธิ์และการตรวจนับ. เอกสารประกอบการอบรมภาคฤดูร้อน เรื่อง การควบคุมขบวนการหมักแอลกอฮอล์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์ นครปฐม.

เทพปัญญา เจริญรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังแบบครั้งคราวโดยการเติมสับสเตรตขึ้นกับพีเอช. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

ปนิดา กิตติรัตน์. 2546. การปรับปรุงประสิทธภาพการหมักเอทานอลโดยยีสต์ตกตะกอนและเทคนิครีพีทเฟดแบตช์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

พิสิษฐ คงกำเนิด. 2540. ผลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญเติบโตของ *Bacillus sp.* BA-019 และการผลิตพอลิ (3-ไฮดรอกซีบิวทิเรต-โค-3-ไฮดรอกซีวาเลอเรต). วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทายาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2536. ยีสต์และชีวเคมีของการหมักเอธิลแอลกอฮอล์. น.1-6 ในเทคนิคการหมักแบบ fed-batch และการประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรม. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธวัชชัย สุ่มประดิษฐ์. 2540. การหมักเอทานอลของยีสต์ที่สามารถหมักไซโลสในสภาพที่มีกรดแอซีติก และการสร้างทรานสฟอร์แมนต์ของ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ทนกรดแอซีติกให้สามารถหมักเอทานอลจากไซโลส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

ภาษาอังกฤษ

Aiba, S., Humphrey, A., and Millis, S. 1973. Biochemical engineering. Academic press.

Alfenore, S., Molina-Joune, C., Guillouet, S.E., Uribelarrea, J.-L., Goma, G. and Benbadis,L, 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:67-72.

Asenjo, J.A., and Merchuk, J.(ed). 1995. Bioreactor system design. Marcel Dekkar. Inc.

Bakar, F.A., and Ariff, A, 1992. Growth kinetics study of baker's yeast. ASEAN Food J. 7:205-206.

Bazas, Zs., Dallmann, K., and Szajani, B. 1989. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells. Biotechnol. Bioeng. 34:882 - 884

Bernfeld, F. 1955. Amylase α and β. In P.S. Colowich, and O.N. Kaplan (eds.), Method in enzymology, p.149. London:Academic Press.

Bravo, S., Mahn, A., and Shene, C. 2000. Effect of feeding strategy on *Zymomonas mobilis* CP4 fed-batch fermentation and mathematical modeling of the system. Appl. Microbiol. Biotechnol, 54:487-493.

Brown, S.W., Oliver S.G., Harriso, D.E.F., and Righelato, R.C. 1981. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation : differences in the magnitude and complexity of the effect. Appl. Microbiol. Biotechnol. 11:151-155.

Domingues, L., Lina, N., and Teixeira, L.J. 2001. Alcohol production from cheese whey permeate using genetically modified flocculant yeast cells. Biotechnol. Bioeng. 72:507-514.

Esser, K., and Karsch, T. 1984. Bacterial ethanol production : advantages and disadvantage. Process Biochem. 116-121.

Echegaray, O.F., Carvalho, J.C.M., Fernandes, A.N.R., Sato, S., Aquarone, M., and Vitolo, M. 2000. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cells in ethanol fermentation. Biomass and Bioenergy. 19:39-50.

Golias, H., Dumsday, G.J., Stanley, G.A.. and Pamment, N.B. 2002. Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccarification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*. J. Biotechnol. 96:155-168.

Gough, S., Flynn, O., Hack, C.J., and Marchant, R. 1996. Fermentation of molasses using a thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 : simplex optimisation of media supplements. Appl. Microbiol. 46:187-190.

Harrison, J.S., and Graham, J.C.J. 1970. Yeast in distillery practice. In A.H. Rose, and J.S. Harrison (eds.), The yeast, vol.3, pp.283-348. London:Academic Press. อ้างถึงใน เกศกมล ไทยทอง. ผลของแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ*Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทายาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย, 2542.

Hodge. J.S., and Hildebrandt, F.M. 1954. Alcoholic fermentation of molasses. In L.A. Underkolfer, and R.J. Hickey (eds.), Industrial fermentation, vol.1, pp.73-93. New York:Chemical. อ้างถึงใน เกศกมล ไทยทอง. ผลของแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ*Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทายาลัย จุฬาลงกรณมหาวิทยาลัย, 2542.

Holzberg, I., Finn, R.K., and Steinkrans, K.H. 1967. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. Biotechnol. Bioeng. 9:413-427.

Hutter, A., and Oliver, S.G. 1998. Ethanol production using nuclear petite yeast mutants. Appl. Microbiol Biotechnol. 49:511 – 516.

Jenkins, G.H. 1966. Introduction to cane sugar technology. Amsterdam:Elsevier.

Jones, R.P., and Greenfield, P.F. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. Enzyme Microb. Technol. 4: 210-223.

Jones, R.P., Pamment, N., and Greenfield, P.F. 1981. Alcohol fermentation by yeasts-the effect of environmental and other variables. Process Biochemistry. 16(3) : 42-49.

Kim, S., and Dale, B.E. 2004. Global potential bioethanol production from wasted crop and crop residues. Biomass and Bioenergy. 26: 361-375.

Koshimizu, L.H., Gomez, E.I., Netto, C.L., Gruz, M.R., Vario, M.L.R., and Borzani, W. 1984. Constant fed-batch ethanol fermentation of molasses. J. Ferment. Technol. 62:205-210.

Mansi, E.I., and Charlie, B. 1999. Fermentation microbiology and biotechnology. London : Taylor&Francis.

Margaritis, A., and Merchant, F.J.A. 1987. The technology of anaerobic yeast growth. In D.R. Berry, I. Russell and G.C. Stewart (eds.), Yeast biotechnology, pp.231-276. London:Allen and Unwin.

Minier, M., and Goma, G.1982. Ethanol production by extractive fermentation.Biotechnol. Bioeng. 24:1565-1579.

Mota, M., Besie, J.M., Strehaiano, P., and Goma, G. 1987. A simple device for fed-batch control in alcoholic fermentation. Biotechnol. Bioeng. 24:775–777.

Nagodawithana, T.W., Castellano, C., and Steinkrans, K.H. 1974. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentation. Appl. Microbiol. 28(3):383-391.

Najafpour, G., Younesei, H, and Ismail, K.S.K. Ethanol fermentation in an Immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae.* Bioresource Technology[online].(n.d.). Available from : http://www.sciencedirect.com [2004, March 18]

Nigam, J.N. 1999. Continuous ethanol production from pineapple cannery waste. J. Biotechnol. 72 : 197-202.

Nishizawa, Y., Mitani, Y., Fukunishi, K., and Nagai, S. 1984. Ethanol production by repeated batch culture with hollow fibers. J. Ferment. Tech. 62(1) : 41-47.

Novak, M., Strehaiano, P., Moreno, M., and Goma, G. 1981. Alcoholic fermentation : on the inhibitory effect of ethanol. Biotechnol. Bioeng. 23:201–211.

Patil, B.G., Gokhale, D.V., Bastawde, K.B., Puntambekar, U.S., and Patil, S.G. 1998. The use of tamerind waste to improve ethanol production from cane molasses. J. Indus. Micro. Biotechnol. 21 : 307-310.

Paturau, J.M. 1987. By-products of cane sugar industry. Amsterdams:Elsevier.

Pramanik, K. Parametric studies on batch alcohol fermentaion using Saccharomyces yeast extracred from toddy.[online].(n.d.) Available from : http://www.cape.canterbury.ac.nz/webdb/Apcche_Proceedings/APCCHE/135REV.pdf [2004, August 7].

Reed, G., and Nagodawithana, T.W. 1991. Yeast technology. 2rd ed. New York:AVI.

Rose, A.H., and Harrison, J.S. 1970. Yeast technology. The yeast vol.3. London : Academic Press.

Rose, A.H., 1977. History and scientific basis of alcoholic beverage production. In A.H. Rose (ed.), Economic microbiology, vol.1:Alcoholic beverages, pp.1-37. London:Academic Press.

Rosen, K. 1977. Production of baker's yeast. Process Biochem. 12(3):10 – 12.

Roukas, T. 1996. Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. J. Food Eng. 27:87-96.

Scragg, A.H. 1988. Biotechnology for Engineers : biological systems in technological processes. New York:John Willey and Sons. pp.187-189.

Silman, R.W. 1984. Ethanol production by *Zymmonas mobilis* in fed-batch fermentation. Biotechnol. Bioeng. 26:247-251.

Sitton, O.C., and Gaddy, J.L. 1980. Ethanol production in an immobilized-cell reactor. Biotechnol. Bioeng. 22: 1735-1748.

Stowell, J.D., Beardsmore, A.J., Keevil, C.W., and Woodward, J.R. 1987.Carbohydrate feedstocks : availability and utikization of molasses and whey. In J. Coombs (eds.), Carbohydrate substrates in biotechnology, pp.33-39. Washington DC : Academic press.

Takeshige, K., and Ouchi, K, 1995. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. J. Ferment. Bioeng. 79(5):513-515

Thatipamala, R., Rohani, S., and Hill, G.A. 1992. Effects of high product and substrate inhibition on the kinetics and biomass and product yields during ethanol batch fermentation. Biotechnol. Bioeng. 40:289-297.

Tyagi, R.D., and Ghose, T.K. 1982. Studies on immobilized *Saccharomyces cerevisiae* analysis of continuous rapid ethanol fermentation in immobilized cell reactor. Biotechnol. Bioeng. 24:781-795.

Waites, M.J., Morgan, N.L., Rockey, J.S., and Higton, G. 2001. Fuels and industrial chemicals. Industrial microbiology : an introduction. London: Blackwell science.

Walker, G.M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. England:John Wiley and Sons.

Wang, D.I.C., Cooney, C.L., Demain, A.L., Dunnill, P., Humphrey, A.E. and Lilly, M.D. 1979. Fermentation and enzyme technology. USA.:John Willey and Sons. pp. 57-137

Wheals, A.E., Basso, L.C., Alves, D.M., and Amorim, H.V. 1999. Fuel ethanol after 25 years. Trends Biotechnol. 17:482–487.

Winter, J.F., Loret, M.O., and Uribelarrea, J.L. 1989. Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae.* Curr. Microbiol. 18:247-252.

Yu, Z., and Zhang, H. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology[online].(n.d.). Available from : www.sciencedirect.com [2004, April 7]

Zaldivar, J., Nielsen, J., and Olsson, L. 2001.Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:17–34.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมวัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมกากน้ำตาล

1.1 นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำอุ่นอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วน 1 : 1

1.2 แบ่งกากน้ำตาลที่เจือจางแล้วใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์ดังแสดงในรูปที่ 39

1.3 นำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที

รูปที่ 39 กากน้ำตาลเจือจางด้วยน้ำอุ่นบรรจุในหลอดเซนตริฟิวก์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.4 กากน้ำตาลที่ผ่านการปั่นแยกตะกอนดังแสดงในรูปที่ 40 นำมาเทแยกเอาตะกอนออก

รูปที่ 40 กากน้ำตาลหลังการปั่นแยกตะกอน ก่อนแยกตะกอนออก

นำกากน้ำตาลที่ผ่านการแยกเอาตะกอนออกมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด แล้วเจือจางให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสม

2. การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล

2.1 การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน โดย ปิเปตสารละลาย absolute ethanol (99.8%,0.7908 กรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 0.5 0.9 1.4 2.0 และ 2.6 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 37.58 65.16 96.92 131.54 และ 162.85 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.2 การเตรียมสารละลาย internal standard โดย ปิเปตสารละลาย n-butanol (99.5%) ปริมตร 0.01 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. การเตรียมสารละลายอินเวอร์เทส (invertase)

3.1 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ เตรียมจากการละลายโซเดียมอะซิเตตปริมาณ 9.10 กรัม ในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร เติมกรดอะซิติก 1.90 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 4.5 ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3.2 สายละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส เตรียมจากการละลายเอนไซม์อินเวอร์เทสปริมาณ 0.15 กรัม ในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 100 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

4. การเตรียมสารละลายกรดไนโตรซาลิไซลิก (DNSA reagent)

สารละลายกรดไนโตรซาลิไซลิก เตรียมจากการละลายกรดกรดไนโตรซาลิไซลิกปริมาณ 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโพแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรต 30 กรัม ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สูตรคำนวณ และการประเมินค่าพารามิเตอร์

1. การคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{A - B}{10} \times 1000$$

A คือ น้ำหนักกระทงที่มีเซลล์ + ตะกอนในกากน้ำตาล

B คือ น้ำหนักกระทงเปล่า + ตะกอนในกากน้ำตาล

2. การคำนวณหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

$$\text{ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)} = \frac{1}{\text{ความชัน}} \times OD_{540} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

3. การคำนวณหาปริมาณเอทานอล

$$\text{ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \text{อัตราส่วนของพื้นที่ใต้กราฟ}$$

$$\text{ปริมาณเอทานอล \%(น้ำหนัก/ปริมาตร)} = \text{ปริมาณเอทานอล(กรัมต่อลิตร)} / 10$$

$$\text{ปริมาณเอทานอล \%(ปริมาตร/ปริมาตร)} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอล \%(น้ำหนักต่อปริมาตร)}}{\text{ค่าความถ่วงจำเพาะของเอทานอล (0.79 กรัม/มิลลิลิตร)}}$$

4. การคำนวณหา μ $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$, และ q_P

$$\mu = \frac{\ln Xt - \ln Xo}{t}$$

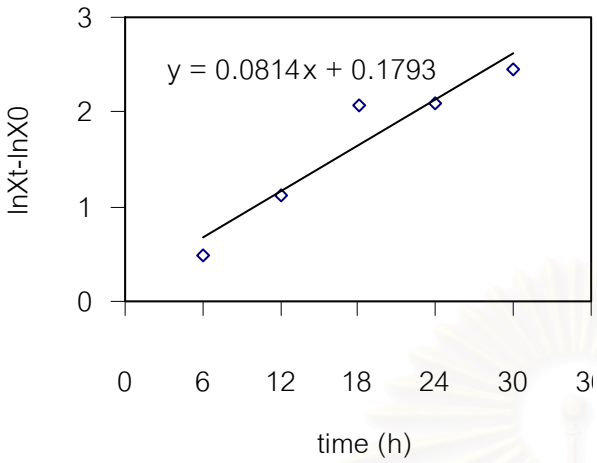
$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

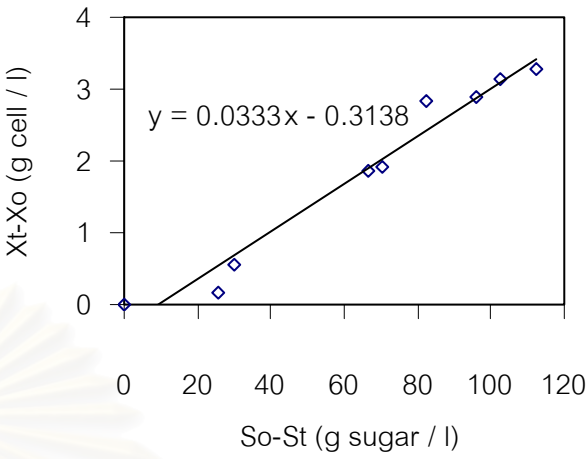
$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$$

$$q_p = \frac{P_t - P_0}{xdt}$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

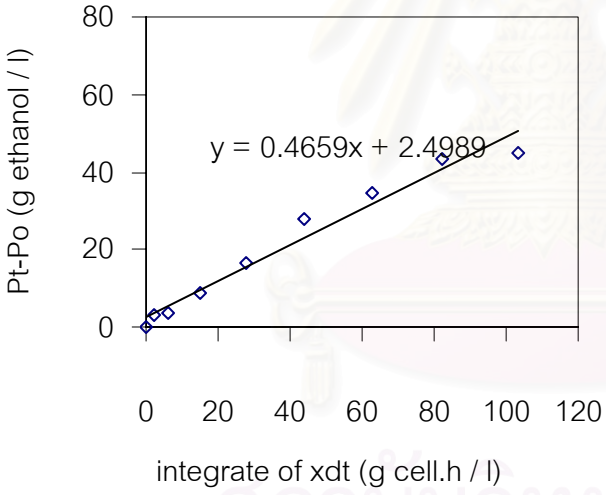
5. การคำนวณหา μ $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$, และ q_P จากกราฟ

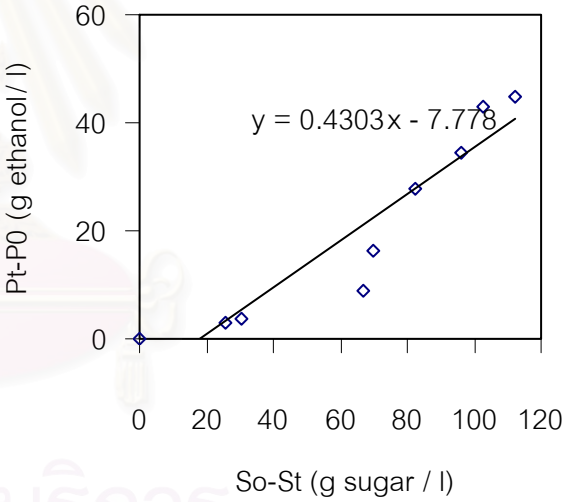




μ = 0.081 h^{-1}

Yx/s = 0.033 g cell / g sugar



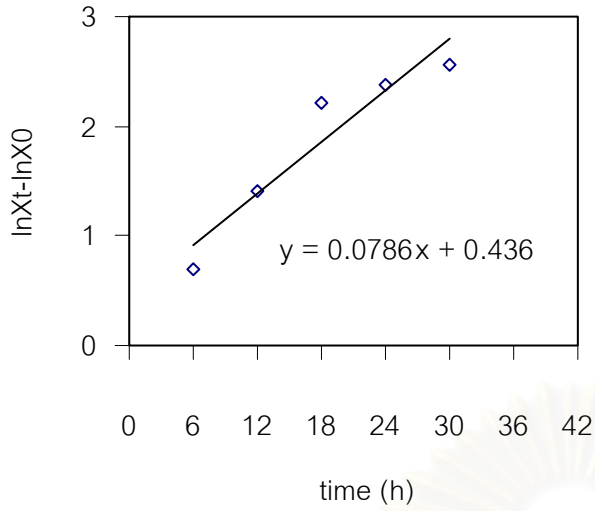


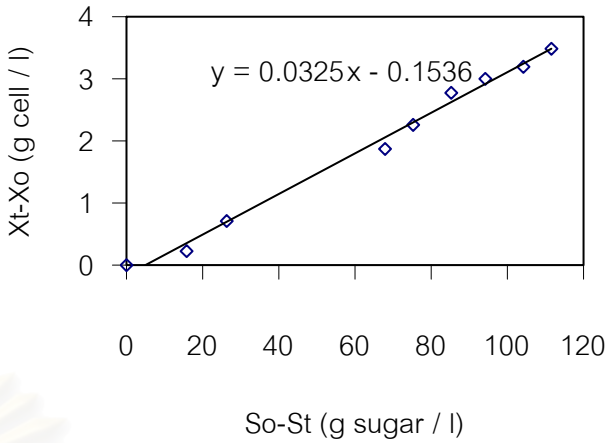
q_p = 0.466 g ethanol / g cell . h

Yp/s = 0.430 g ethanol / g sugar

รูปที่ 41 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ pH เริ่มต้น 4.0 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร

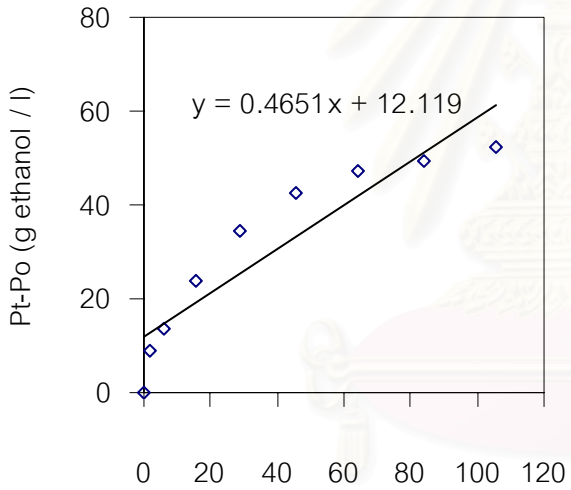
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

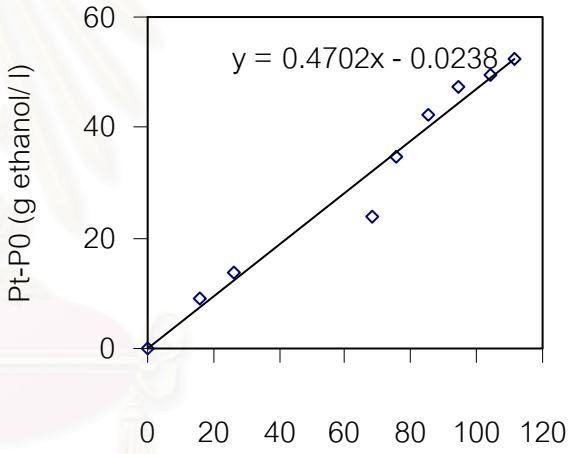




μ = 0.079 h^{-1}

Yx/s = 0.033 g cell / g sugar



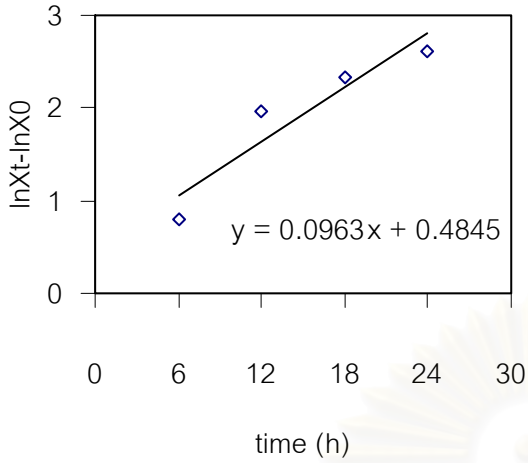


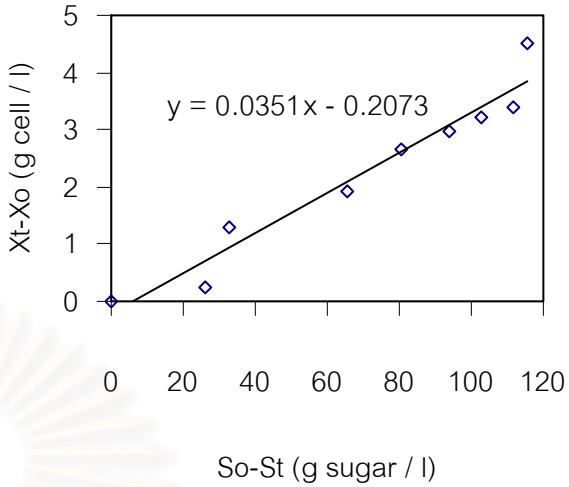
q_p = 0.465 g ethanol / g cell . h

Yp/s = 0.470 g ethanol / g sugar

รูปที่ 42 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร

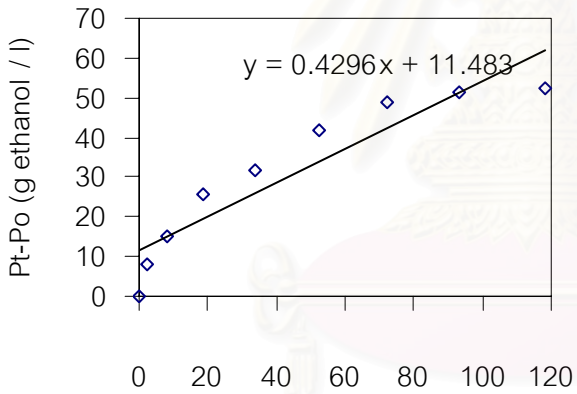
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

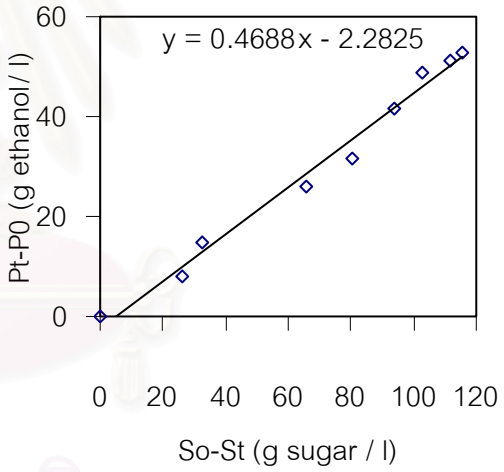




μ = 0.096 h^{-1}

Yx/s = 0.035 g cell / g sugar



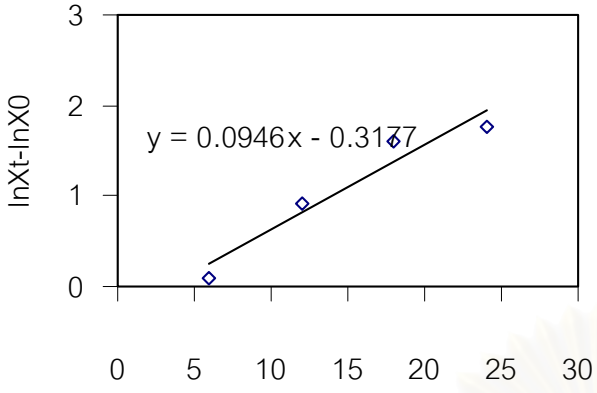


q_p = 0.429 g ethanol / g cell . h

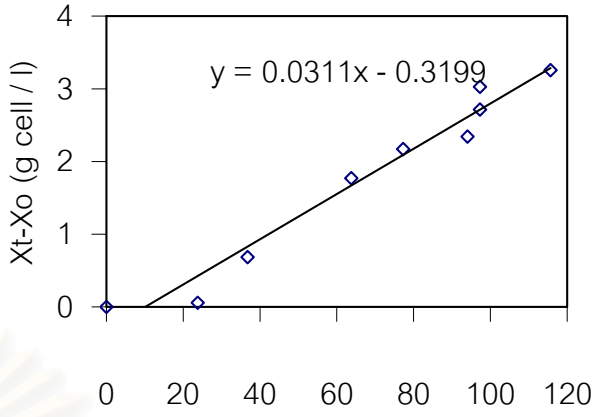
Yp/s = 0.469 g ethanol / g sugar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

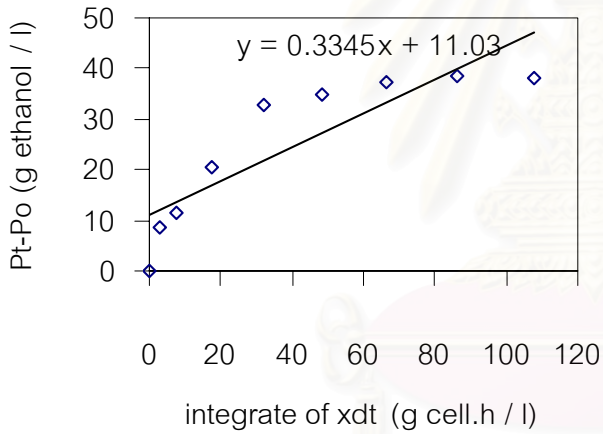
รูปที่ 43 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ pH เริ่มต้น 5.0 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร



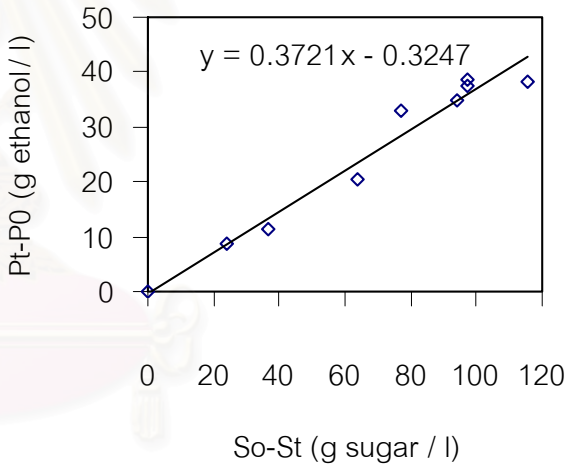
μ = 0.095 h^{-1}



Yx/s = 0.031 g cell / g sugar

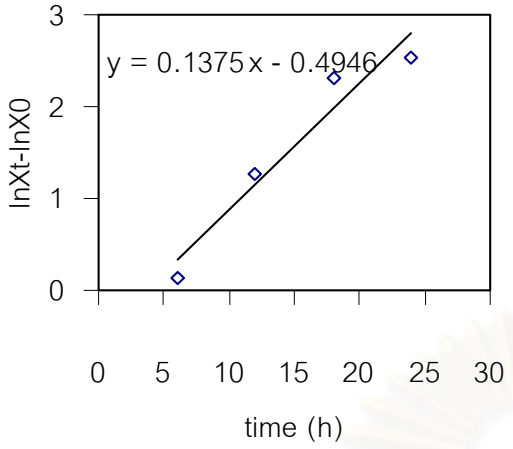


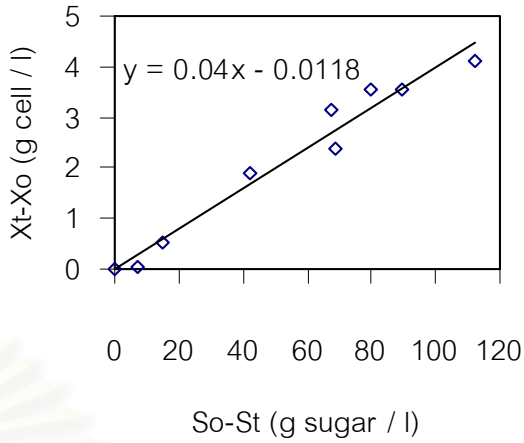
q_p = 0.335 g ethanol / g cell . h



Yp/s = 0.372 g ethanol / g sugar

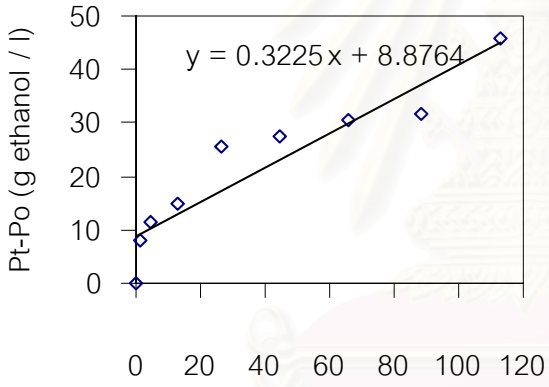
รูปที่ 44 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้อัตราการกวน 150 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5

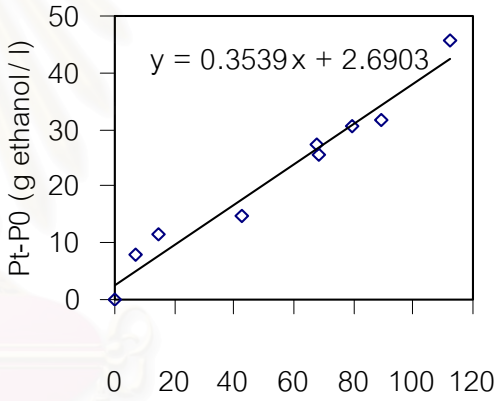




μ = 0.138 h^{-1}

Yx/s = 0.040 g cell / g sugar



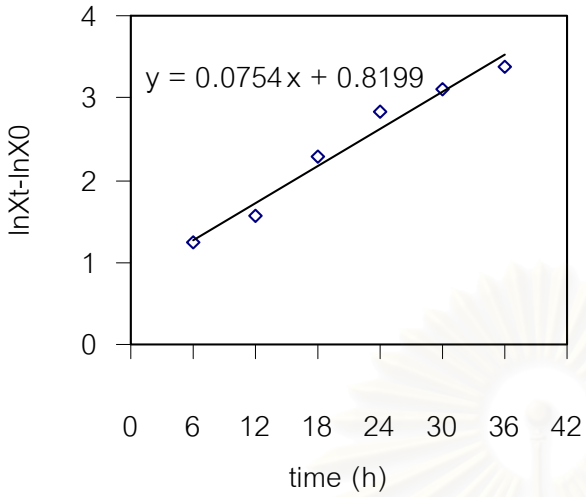


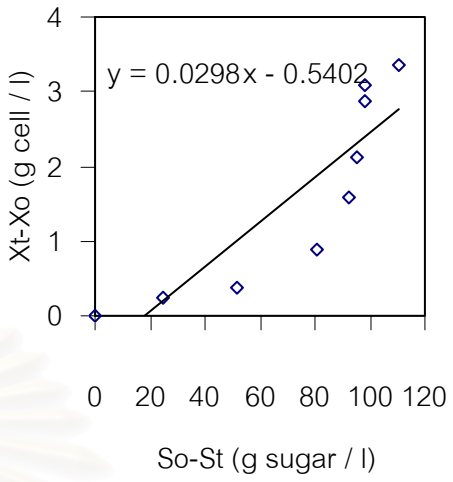
q_p = 0.323 g ethanol / g cell . h

Yp/s = 0.354 g ethanol / g sugar

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

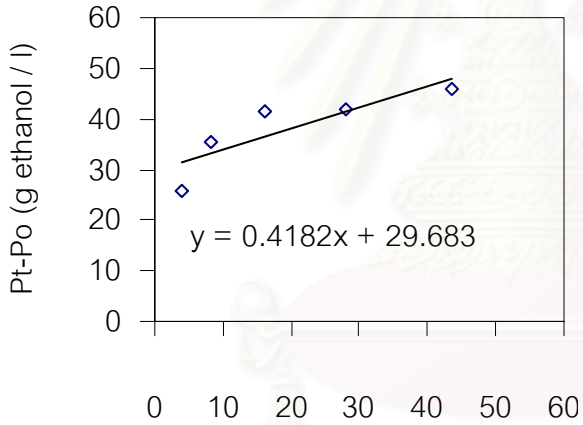
รูปที่ 45 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้อัตราการกวน 200 rpm อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5

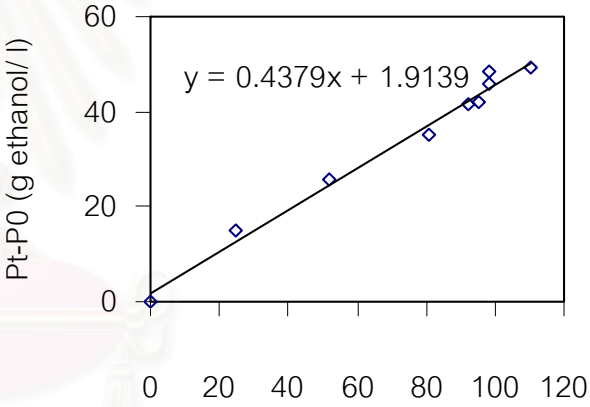




$\mu = 0.075\ h^{-1}$

Yx/s = 0.030 g cell / g sugar



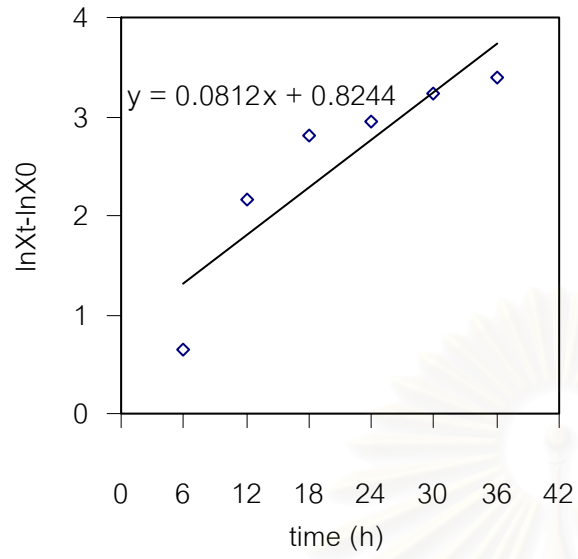


$q_p = 0.418$ g ethanol / g cell . h

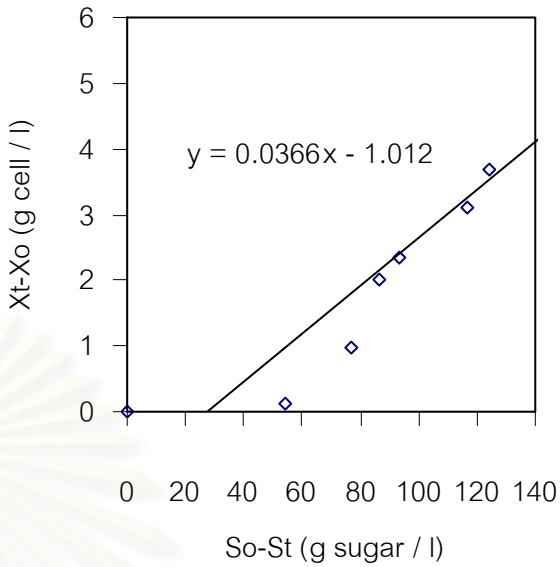
Yp/s = 0.438 g ethanol / g sugar

รูปที่ 46 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm

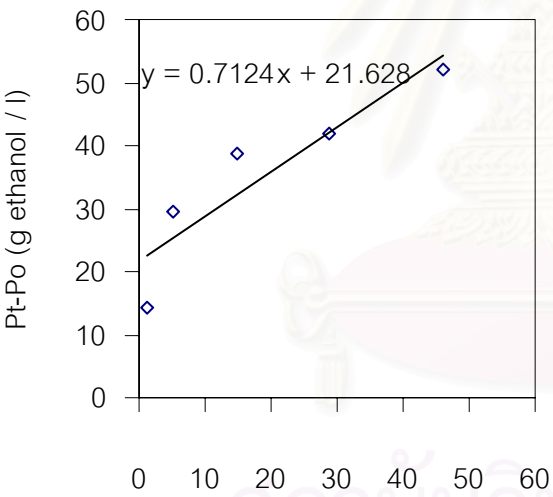
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



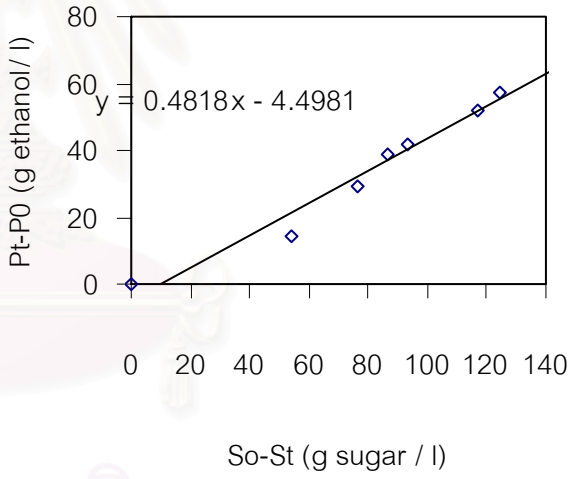
μ = 0.812 h^{-1}



Yx/s = 0.037 g cell / g sugar



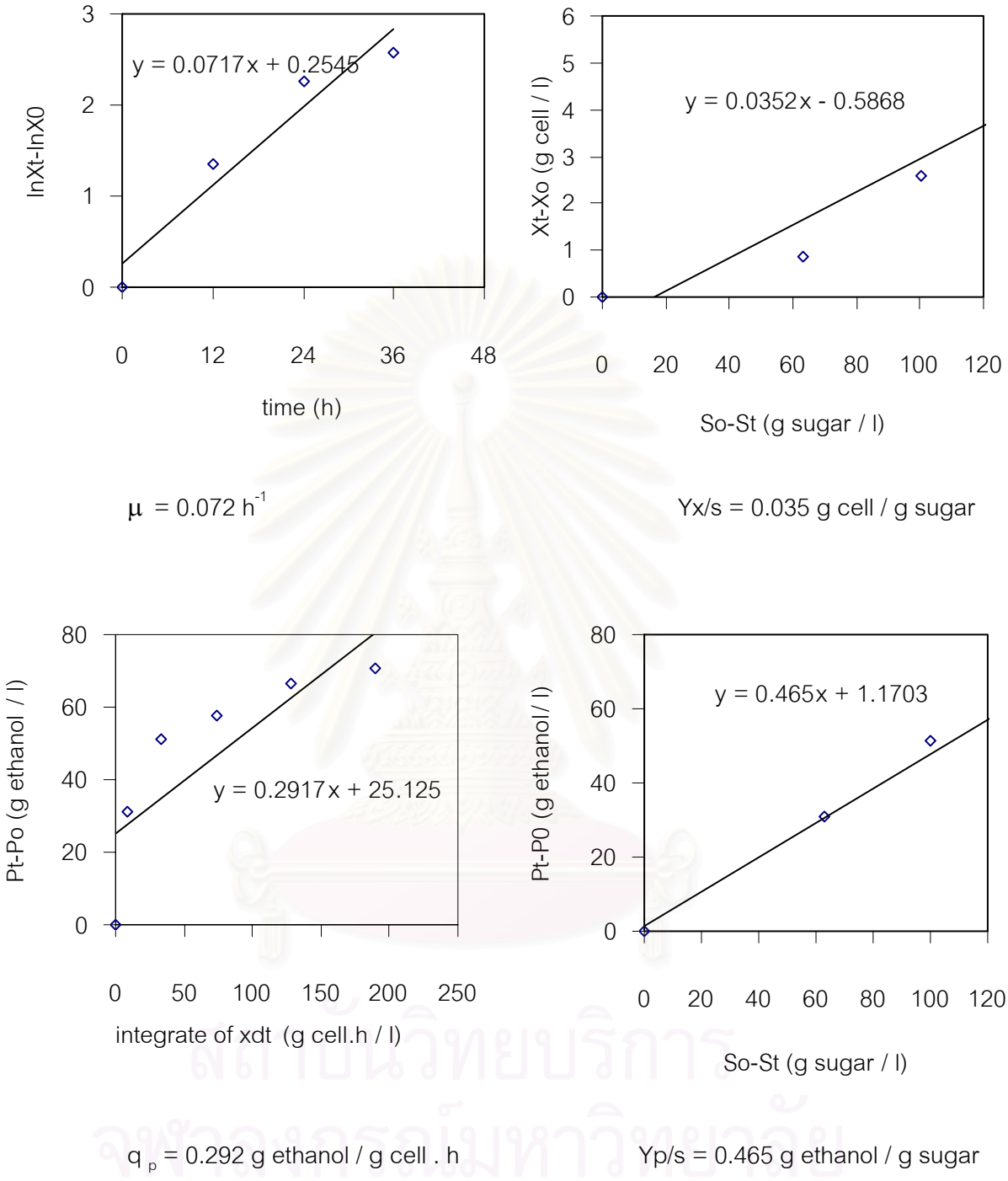
q_p = 0.712 g ethanol / g cell . h



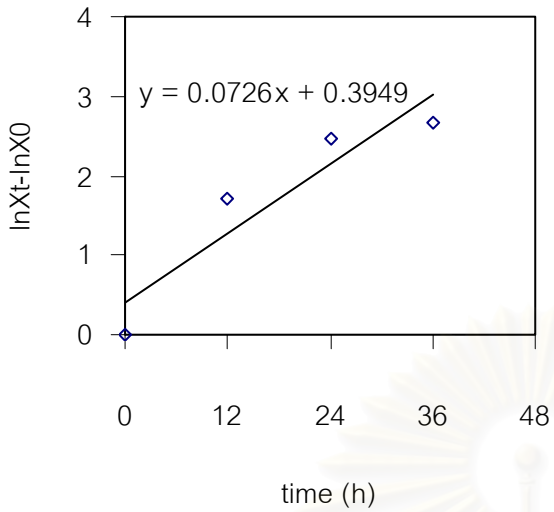
Yp/s = 0.482 g ethanol / g sugar

รูปที่ 47 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm

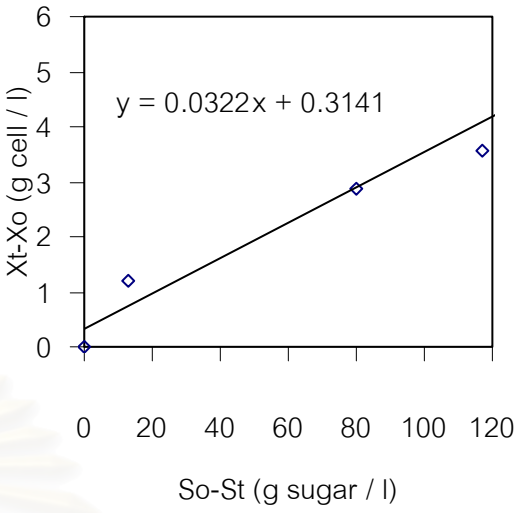
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



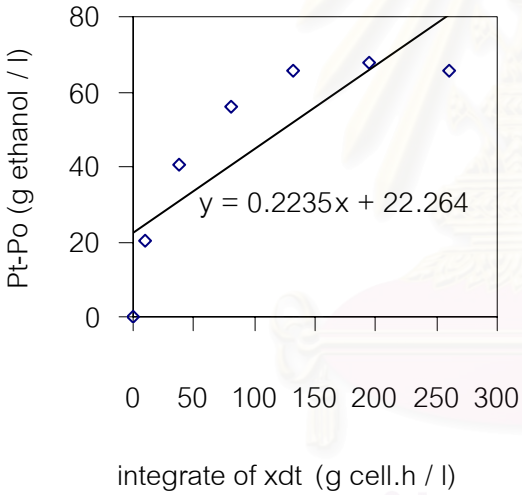
รูปที่ 48 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 165 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส



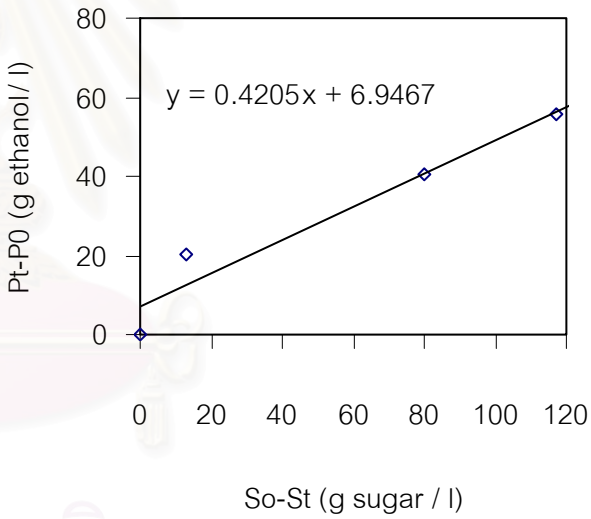
μ = 0.073 h^{-1}



Yx/s = 0.032 g cell / g sugar



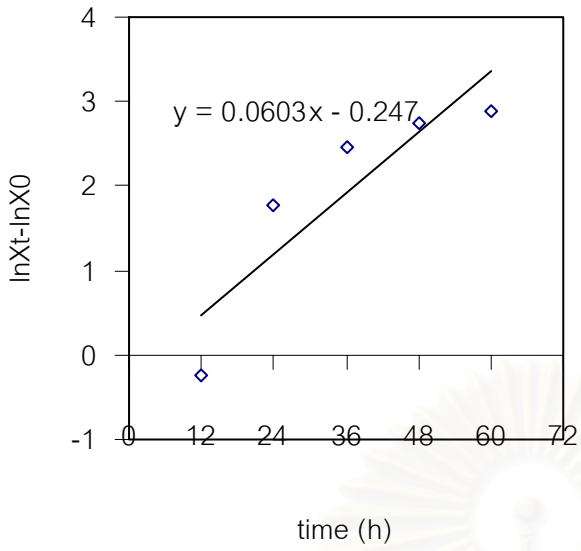
q_p = 0.224 g ethanol / g cell . h



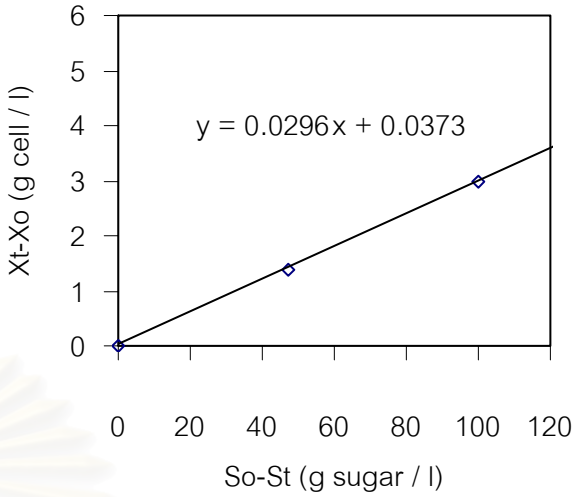
Yp/s = 0.421 g ethanol / g sugar

รูปที่ 49 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

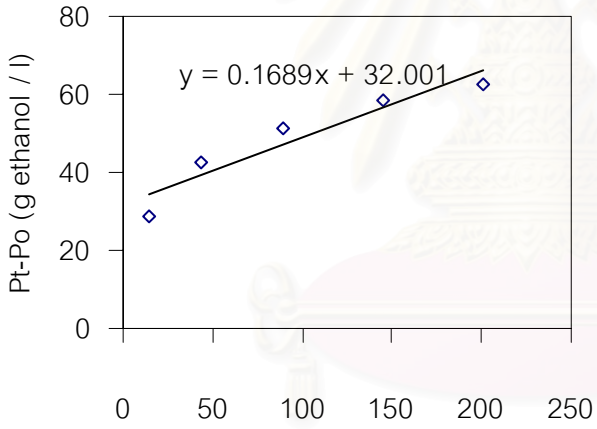
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



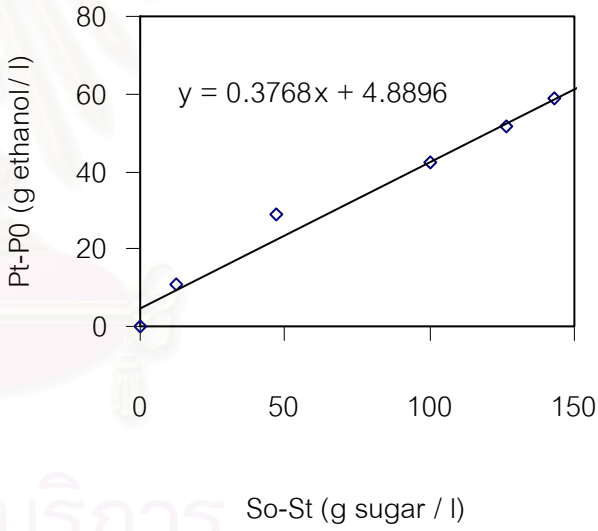
μ = 0.060 h^{-1}



Yx/s = 0.030 g cell / g sugar

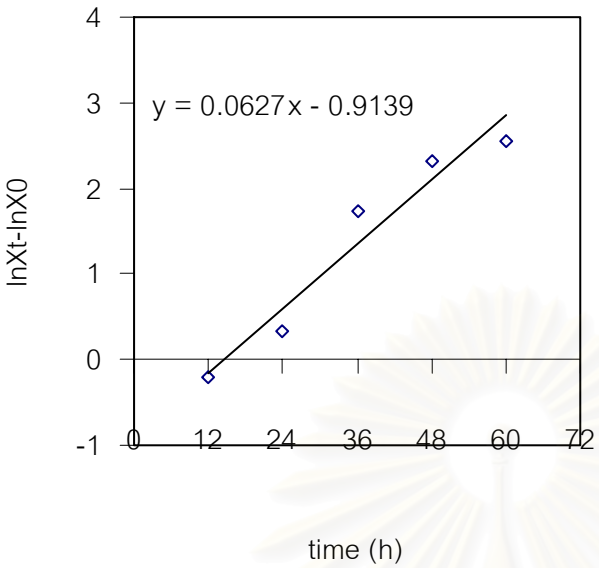


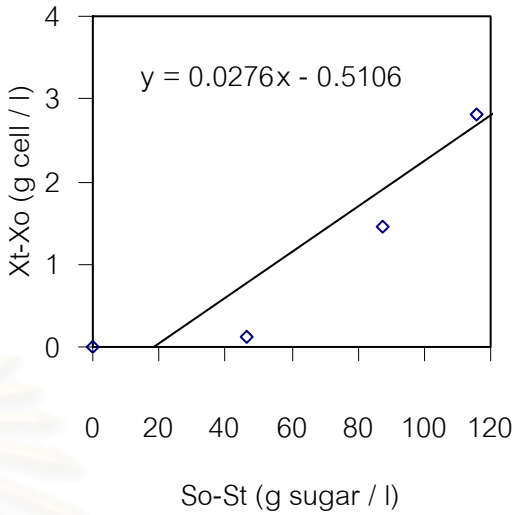
q_p = 0.169 g ethanol / g cell . h



Yp/s = 0.377 g ethanol / g sugar

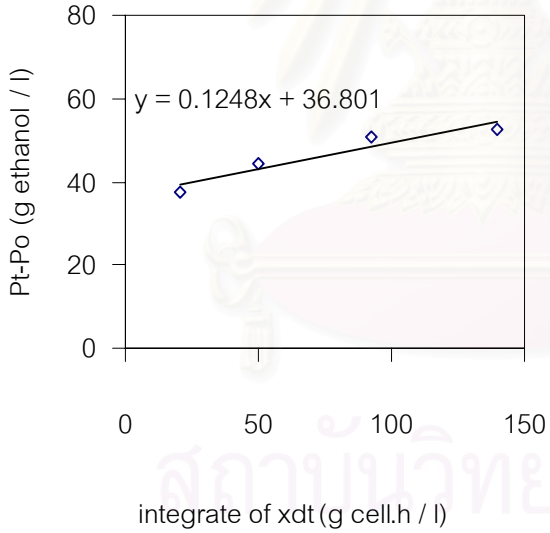
รูปที่ 50 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 260 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

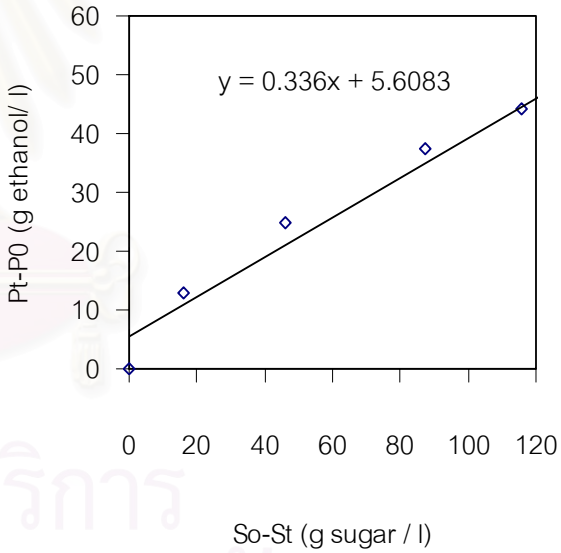




μ = 0.063 h^{-1}

Yx/s = 0.028 g cell / g sugar

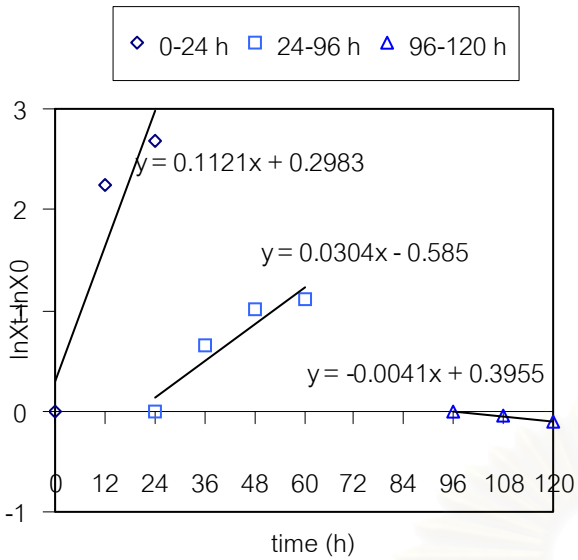


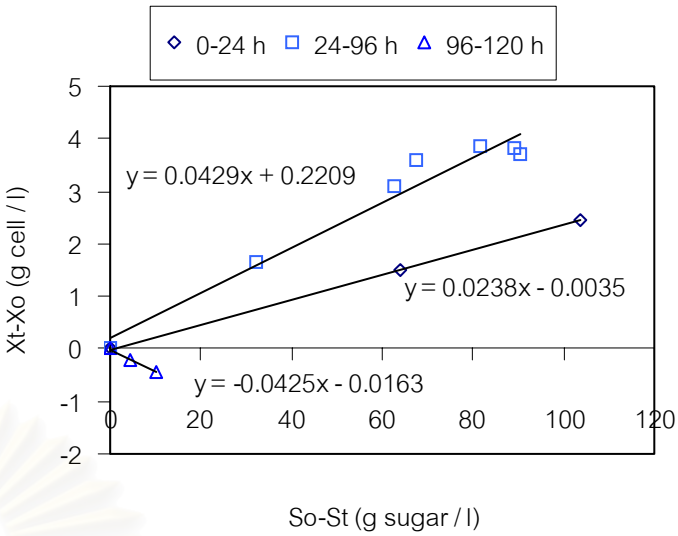


q_p = 0.125 g ethanol / g cell . h

Yp/s = 0.336 g ethanol / g sugar

รูปที่ 51 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบแบตช์ในถังหมัก โดยใช้น้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 280 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้น 4.5 อัตราการกวน 100 rpm อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส





0-24 h, μ = 0.112 h^{-1}

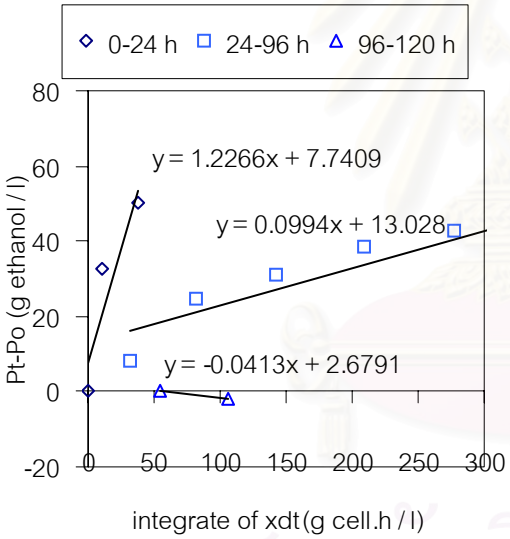
24-96 h, μ = 0.030 h^{-1}

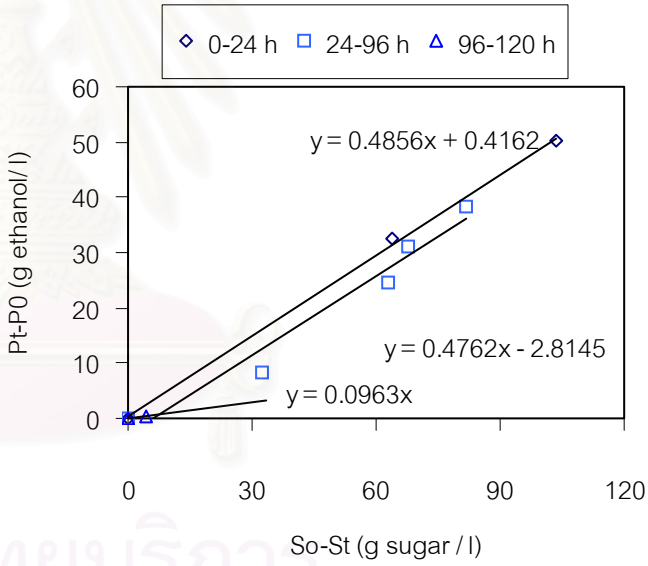
96-120 h, μ = μ = -0.0041 h^{-1}

0-24 h,Yx/s = 0.024 g cell / g sugar

24-96 h,Yx/s = 0.043 g cell / g sugar

96-120 h,Yx/s= -0.043 g cell / g sugar





0-24 h, q_p = 1.227 g ethanol / g cell . h

24-96 h, q_p = 0.100 g ethanol / g cell . h

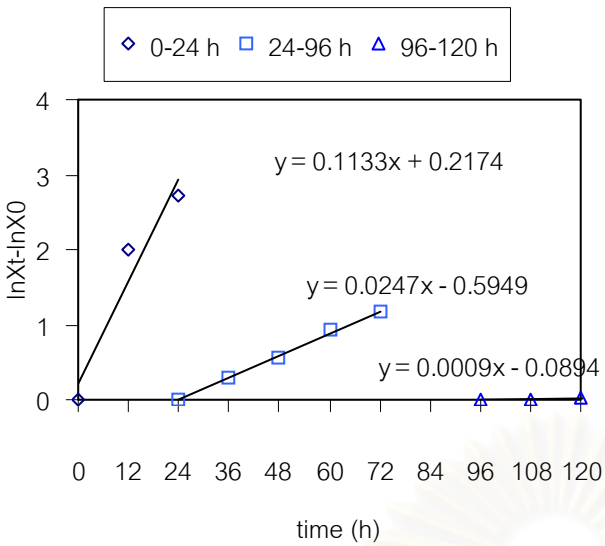
96-120 h, q_p = -0.041 g ethanol / g cell . h

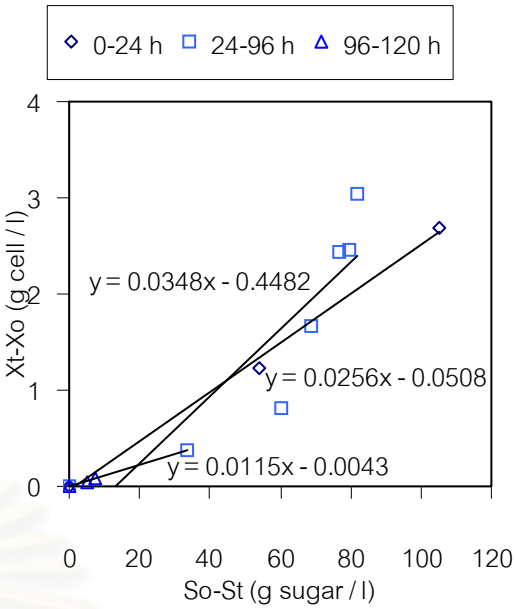
0-24 h, Yp/s = 0.486 g ethanol / g sugar

24-96 h, Yp/s = 0.476 g ethanol / g sugar

96-120 h, Yp/s = 0.096 g ethanol / g sugar

รูปที่ 52 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบเฟด-แบตช์ ที่มีการเติมกากน้ำตาล 2 ช่วง คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมงและ 96 ชั่วโมง





0-24 h, μ = 0.113 h^{-1}

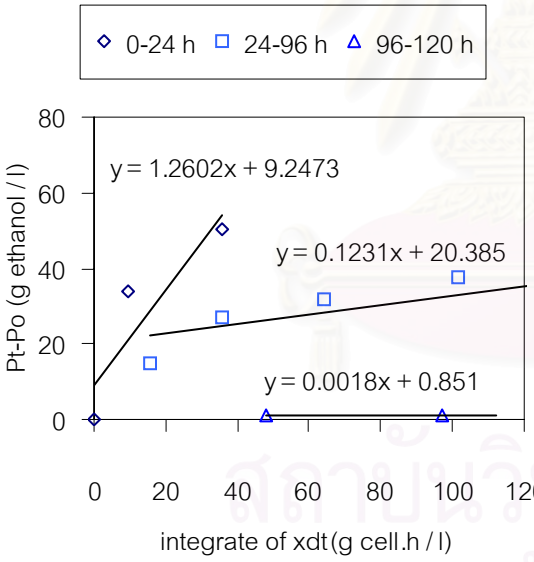
24-96 h, μ = 0.025 h^{-1}

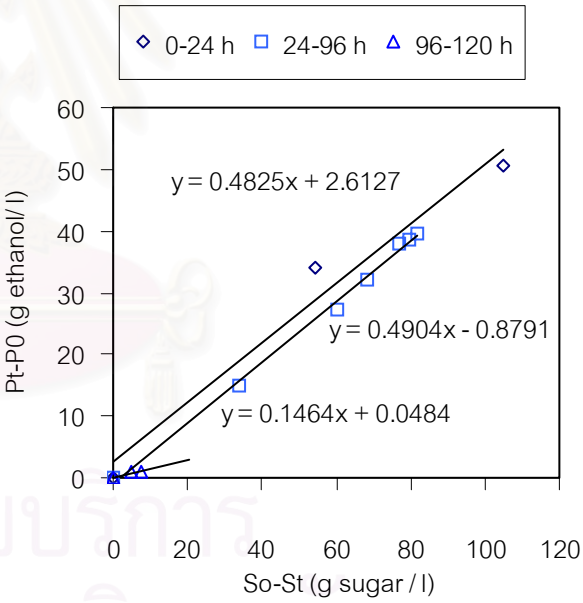
96-120 h, μ = 0.001 h^{-1}

0-24 h,Yx/s = 0.026 g cell / g sugar

24-96 h,Yx/s = 0.035 g cell / g sugar

96-120 h,Yx/s = 0.015 g cell / g sugar





0-24 h, q_p = 1.260 g ethanol / g cell . h

24-96 h, q_p = 0.123 g ethanol / g cell . h

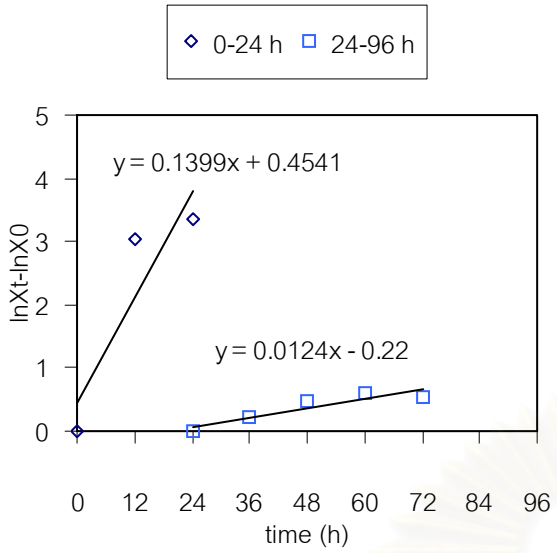
96-120 h, q_p = 0.002 g ethanol / g cell . h

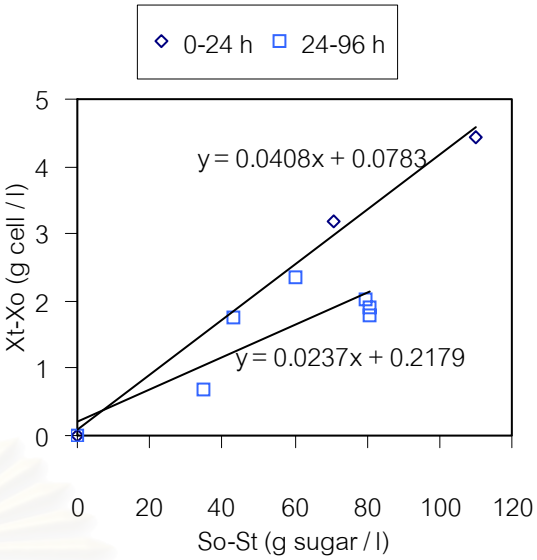
0-24 h, Yp/s = 0.483 g ethanol / g sugar

24-96 h, Yp/s = 0.490 g ethanol / g sugar

96-120 h, Yp/s = 0.146 g ethanol / g sugar

รูปที่ 53 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบเฟด-แบตช์ ที่มีการเติมน้ำตาลกลูโคส 2 ช่วง คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 96 ชั่วโมง



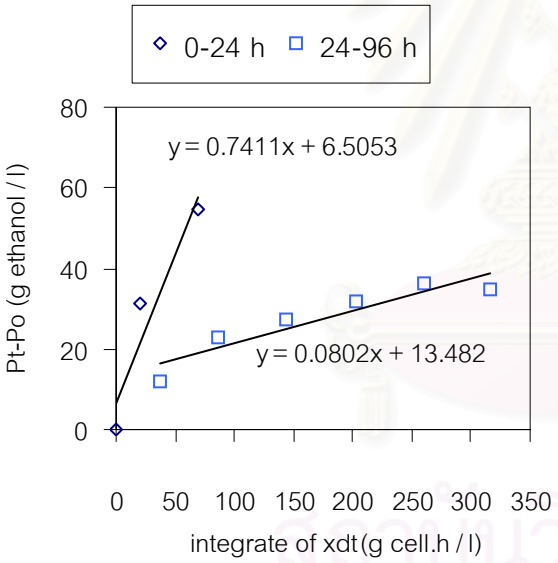


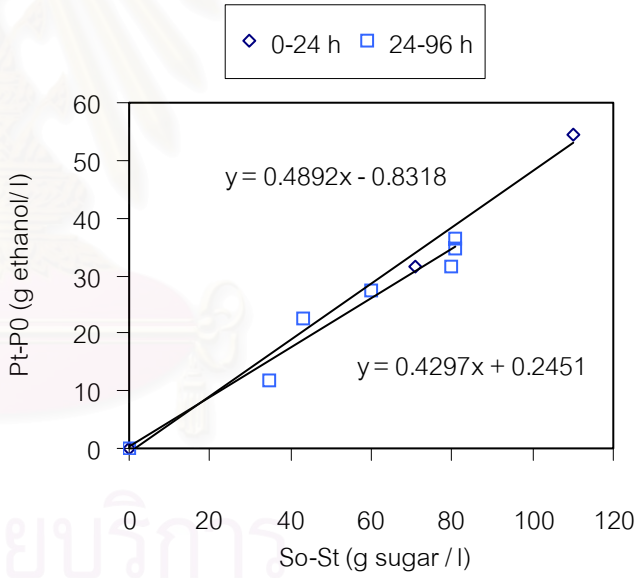
0-24 h, μ = 0.140 h^{-1}

24-96 h, μ = 0.012 h^{-1}

0-24 h,Yx/s = 0.041 g cell / g sugar

24-96 h,Yx/s = 0.024 g cell / g sugar





0-24 h, q_p = 0.741 g ethanol / g cell . h

24-96 h, q_p = 0.080 g ethanol / g cell . h

0-24 h, Yp/s = 0.489 g ethanol / g sugar

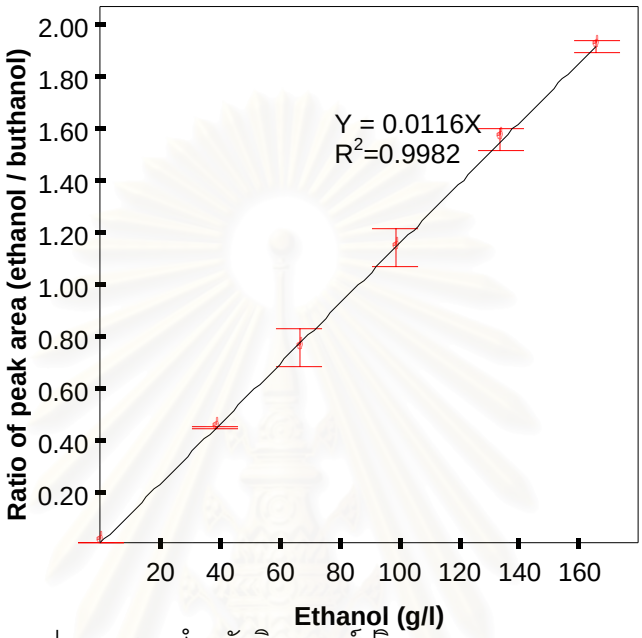
24-96 h, Yp/s = 0.430 g ethanol / g sugar

รูปที่ 54 การประเมินค่าพารามิเตอร์จากกราฟ ในการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SKP1 แบบเฟด-แบตช์ ที่มีการเติมกากน้ำตาล 1 ช่วง คือ ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเติมไบโอตินแบบเอ็กซ์โพเนนเชียล

ภาคผนวก ค

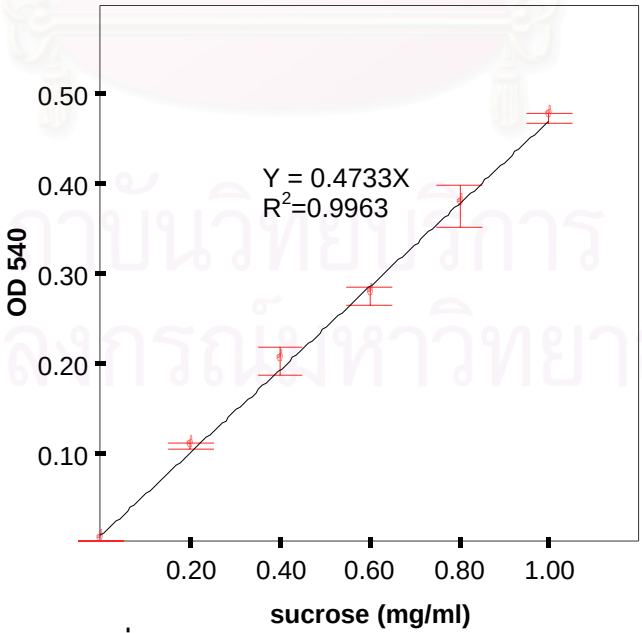
กราฟมาตรฐาน

1. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล



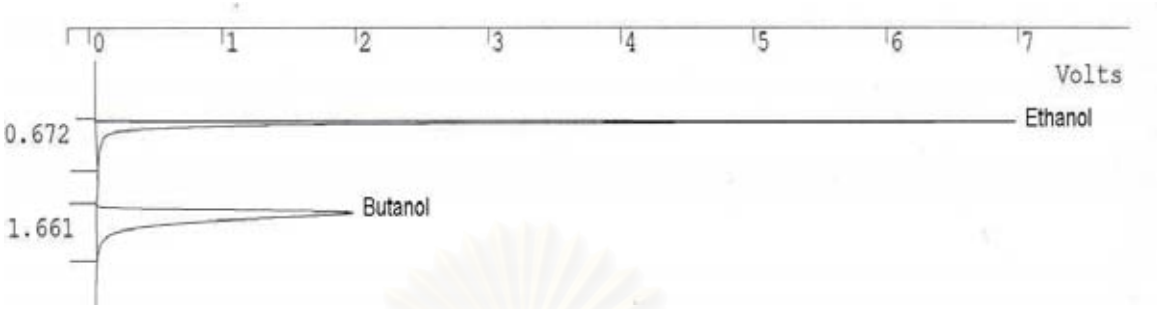
รูปที่ 55 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

2. กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณซูโครส



รูปที่ 56 กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณซูโครส

3. **โครมาโตแกรมของเอทานอลมาตรฐานและ** internal standard



รูปที่ 57 โครมาโตรแกรมของเอทานอลมาตรฐานและ internal standard (บิวทานอล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การทดสอบทางสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS version 10.01

1. pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

1.1 การทดสอบผลของ pH เริ่มต้นที่มีต่อปริมาณเอทานอลสูงสุด

ANOVA

ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	119.691	2	59.845	114.871	.000
Within Groups	3.126	6	.521		
Total	122.816	8			

ethanol

Duncan[a]

pH	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
pH 4.0	3	45.4000	
pH 4.5	3		53.0167
pH 5.0	3		53.2500
Sig.		1.000	.706

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

1.2 การทดสอบผลของ pH เริ่มต้นที่มีต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* SKP1

ANOVA

cell dry weight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.338	2	1.169	57.596	.000
Within Groups	.122	6	2.0E-02		
Total	2.460	8			

cell dry weight

Duncan[a]

pH	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
pH 4.0	3	3.5500	
pH 4.5	3	3.7300	
pH 5.0	3		4.7100
Sig.		.173	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 การทดสอบผลของ pH เริ่มต้นที่มีต่อปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ

ANOVA

total sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	108.092	2	54.046	19.471	.002
Within Groups	16.655	6	2.776		
Total	124.746	8			

total sugar

Duncan[a]

pH	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
pH 5.0	3	47.2800	
pH 4.5	3	49.2300	
pH 4.0	3		55.4100
Sig.		.202	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. อัตราการกวนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

2.1 การทดสอบผลของอัตราการกวนที่มีต่อปริมาณเอทานอลสูงสุด

ANOVA

ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	569.996	2	284.998	8186.98	.000
Within Groups	.209	6	3.5E-02		
Total	570.205	8			

ethanol

Duncan[a]

stirring	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
200 rpm	3	34.3000		
150 rpm	3		38.9400	
100 rpm	3			53.0167
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

2.2 การทดสอบผลของอัตราการกวนที่มีต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* SKP1

ANOVA

cell dry weight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.758	2	.379	108.257	.000
Within Groups	2.1E-02	6	3.5E-03		
Total	.779	8			

cell dry weight

Duncan[a]

stirring	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
150 rpm	3	3.7000	
100 rpm	3	3.7300	
200 rpm	3		4.3300
Sig.		.557	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 การทดสอบผลของอัตราการกวนที่มีต่อปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ

ANOVA

total sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	87.703	2	43.852	15.679	.004
Within Groups	16.781	6	2.797		
Total	104.484	8			

total sugar

Duncan[a]

stirring	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
100 rpm	3	49.2300	
150 rpm	3		53.8500
200 rpm	3		56.8167
Sig.		1.000	.073

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

3.1 การทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อปริมาณเอทานอลสูงสุด

ANOVA

ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	582.682	2	291.341	1160.82	.000
Within Groups	1.506	6	.251		
Total	584.188	8			

ethanol

Duncan[a]

temperature	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
25 C	3	49.4800		
30 C	3		53.0167	
35 C	3			68.0400
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 การทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* SKP1

ANOVA

cell dry weight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.456	2	2.728	62.855	.000
Within Groups	.260	6	4.3E-02		
Total	5.716	8			

cell dry weight

Duncan[a]

temperature	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
25 C	3	3.4600	
30 C	3	3.7300	
35 C	3		5.2300
Sig.		.164	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 การทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ

ANOVA

total sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2288.49	2	1144.24	742.694	.000
Within Groups	9.244	6	1.541		
Total	2297.73	8			

total sugar

Duncan[a]

temperature	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
35 C	3	20.1000		
30 C	3		49.2300	
25 C	3			57.2000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. น้ำตาลเริ่มต้นเหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

4.1 การทดสอบผลของน้ำตาลเริ่มต้นที่มีต่อปริมาณเอทานอลสูงสุด

ANOVA

ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	677.304	3	225.768	152.610	.000
Within Groups	11.835	8	1.479		
Total	689.139	11			

ethanol

Duncan[a]

initial sugar	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
280.0	3	52.7300			
260.0	3		62.7300		
220.0	3			65.8200	
165.0	3				73.7000
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การทดสอบผลของน้ำตาลเริ่มต้นที่มีต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* SKP1

ANOVA

cell dry weight

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.542	3	1.514	221.036	.000
Within Groups	5.5E-02	8	6.8E-03		
Total	4.597	11			

cell dry weight

Duncan[a]

initial sugar	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
280.00	3	4.0000		
260.00	3		5.0500	
165.00	3			5.4700
220.00	3			5.5400
Sig.		1.000	1.000	.331

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การทดสอบผลของน้ำตาลเริ่มต้นที่มีต่อปริมาณน้ำตาลรวมที่เหลือ

ANOVA

total sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22349.0	3	7449.66	744.778	.000
Within Groups	80.020	8	10.003		
Total	22429.0	11			

total sugar

Duncan[a]

initial sugar	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
165.00	3	12.1100			
220.00	3		72.3700		
260.00	3			107.070	
280.00	3				125.300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์ เกิดวันที่ 21 มกราคม 2522 ที่อำเภอเมือง จังหวัดปราจีนบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยม สาขาวิชาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมเกษตร คณะวิทยาศาสตร์ประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ เมื่อปีการศึกษา 2544 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2544 ระหว่างการศึกษาได้ร่วมเสนอผลงานในงานจุฬาฯวิชาการครั้งที่ 9 ผลการทดลองส่วนหนึ่งได้เผยแพร่ในงานประชุมวิชาการครั้งที่ 12 ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย