ผลของแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae*

นางสาวเกศกมล ไทยทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-784-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF CONTAMINATING BACTERIA ON CELL GROWTH AND ETHANOL PRODUCTION OF *Saccharomyces cerevisiae*

Miss Kedkamon Thaitong

A Thesis Submitted in Patial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Program of Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-334-784-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae*
โดย	นางสาวเกศกมล ไทยทอง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง)

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

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เกศกมล ไทยทอง : ผลของแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae* (EFFECTS OF CONTAMINATING BACTERIA ON CELL GROWTH AND ETHANOL PRODUCTION OF *Saccharomyces cerevisiae*) อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร. นลิน นิลอุบล, อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตฤศาสน์ และอาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง , 117 หน้า
ISBN 974-334-784-4

การปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในระดับอุตสาหกรรม ส่วนหนึ่งเป็นผลจากภาวะไม่ปลอดเชื้อของกากน้ำตาลที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการหมัก และอีกส่วนหนึ่งอาจมาจากการปนเปื้อนในกระบวนการหมัก จึงทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในกากน้ำตาลและจากน้ำหมัก โดยอาศัยลักษณะการเจริญบนผิวและภายในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งเป็นเกณฑ์เบื้องต้นในการแบ่งกลุ่ม พบว่าแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในกากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ ส่วนมากเป็นแบคทีเรียชนิดสร้างสปอร์ที่อยู่ในสกุล *Bacillus* แต่เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอล แบคทีเรียเหล่านี้เจริญได้ไม่ดี ดังนั้นแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลไม่น่าจะเป็นปัญหาในกระบวนการหมักเอทานอล จึงได้ตรวจสอบแบคทีเรียปนเปื้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก โดยแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในน้ำหมัก พบแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส และออกซิเดส สามารถจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* ให้ชื่อว่าแบคทีเรีย J แบคทีเรียดังกล่าวเจริญได้ดีในอาหารกากน้ำตาล เมื่อทำการแปรผันความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารสำหรับหมักเอทานอลเป็น 60 , 120 , 180 และ 220 กรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรีย J มีผลทำให้ปริมาณเอทานอลลดต่ำลงเมื่อหมักในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นต่ำที่ 60 และ 120 กรัมต่อลิตร เนื่องจากที่ความเข้มข้นดังกล่าวปริมาณน้ำตาลมีจำกัดจึงมีการแข่งขันกันใช้น้ำตาลระหว่างยีสต์และแบคทีเรีย J แต่ที่ความเข้มข้น 180 และ 220 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย J ไม่ทำให้การผลิตเอทานอลลดลง โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์และแบคทีเรีย J ลดลง แต่ไม่มีผลทำให้อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะลดลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....-.....
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีทางชีวภาพ.....
ปีการศึกษา...2542.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

3970143223 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORD : FERMENTATION / BACTERIAL CONTAMINATION / MOLASSES /ETHANOL

KEDKAMON THAITONG : EFFECTS OF CONTAMINATING BACTERIA ON CELL GROWTH AND ETHANOL PRODUCTION OF *Saccharomyces cerevisiae*. THESIS ADVISOR : ASS. PROF. NALINE NILUBOL , Ph. D. THESIS CO-ADVISOR : ASST. PROF. SURAPONG NAVANKASATTUSUS , Ph.D.VASANA TOLIENG , MSc.

117 pp. ISBN 974-334-784-4

Bacterial contamination in industrial ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* was due to the use of non-sterile molasses as a raw material and also the contamination during fermentation process. The present work reported on isolation of major contaminated bacteria in molasses and also in fermentation broth and using bacterial growth characters inside and on the surface of solid medium as a preliminary classification. It was found that the major contaminated bacteria in molasses was spore-forming bacteria belonging to genus *Bacillus*. However , it had poor growth in molasses medium , therefore , it had less effect on ethanol fermentation. The contaminated bacteria in fermentation broth was non-spore-forming bacteria with no catalase and oxidase activity. It was classified to be in genus *Lactobacillus* and designated as Bacteria J. It had good growth in molasses medium. Ethanol fermentation in the presence of varied initial molasses concentrations of 60 , 120 , 180 and 220 g/l showed that Bacteria J reduced ethanol production when molasses at 60 and 120 g/l were used. This was due to the competition between the yeast and Bacteria J for sugar utilization. However , at higher concentration of 180 and 220 g/l , Bacteria J had no effect on ethanol production and on specific ethanol production rate although the specific growth rates of both yeast and the bacteria were reduced.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....-..... ลายมือชื่อนิสิต.....

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

ปีการศึกษา .....2542..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาระดับปริญญามหาบัณฑิต และวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จด้วยความสมบูรณ์ โดยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ ดร. นลิน นิลอุบล ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรพงศ์ นวังคสัตถุศาสน์ และอาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง ที่รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ตลอดจนให้คำแนะนำแนวทางการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ด้วยดีตลอดมา ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุเมธ ตันตระเธียร และรองศาสตราจารย์ ดร.ไพเราะ ปิ่นพานิชการ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบุคลากรทุกท่านในสถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือในการสั่งซื้อและจัดหาสารเคมี รวมทั้งช่วยเหลือซ่อมบำรุงอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณสำนักงานวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติที่กรุณาให้ความช่วยเหลือเงินทุนอุดหนุนเพื่อทำงานวิจัยในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และน้องสาว ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจที่สำคัญในการทำวิจัยตลอดเวลาจนสำเร็จสมบูรณ์

และสุดท้ายนี้ขอขอบคุณเพื่อนทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยตลอดมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฐ

สารบัญรูป..... ค

คำย่อ..... ธ

บทที่

1 บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1

1.2 กระบวนการหมักเอทานอล..... 2

1.3 กากน้ำตาล.....

1.3.1 บทนิยามและชนิดของกากน้ำตาล..... 5

1.3.2 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย..... 6

1.3.4 องค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยชนิด blackstrap..... 8

1.4 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเอทานอล..... 11

1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อยีสต์ในการหมักเอทานอล.....

1.5.1 สารอาหาร..... 12

1.5.2 ความเป็นกรดด่าง (pH)..... 15

1.5.3 อุณหภูมิ 15

1.5.4 ปริมาณเชื้อตั้งต้น..... 15

1.5.5 ความเข้มข้นของเอทานอลและผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเอทานอล 16

1.6 จุลินทรีย์ปนเปื้อนในกระบวนการหมักเอทานอล..... 16

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.1.3.2 การเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอล.....	38
3.2	การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในระหว่างการหมักเอทานอล.....	
	3.2.1 การแยกแบคทีเรียปนเปื้อนจากน้ำหมัก.....	41
	3.2.2 การจัดกลุ่มและคัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่	43
	3.2.3 การเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในน้ำหมัก.....	44
	3.2.4 การวินิจฉัยแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่จากน้ำหมัก.....	45
3.3	ศึกษาภาวะการเจริญร่วมกันของยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในระหว่างการหมักเอทานอล.....	
	3.3.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นของยีสต์ *S. cerevisiae*.....	47
	3.3.2 การคัดเลือกสูตรอาหารสำหรับหมักเอทานอล.....	48
	3.3.3 การหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในภาวะที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย H และ J.....	50
	3.3.4 ศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นที่มีต่อค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการหมักเอทานอลแบบไม่ต่อเนื่องในระดับขวดโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย J.....	54
	3.3.4.1 ศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* และการเจริญของแบคทีเรีย J.....	55

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	3.3.4.2 วิเคราะห์ค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย J ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน.....	76
	3.4 การหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ.....	86
4	วิจารณ์ผลการทดลอง.....	88
5	สรุปผลการทดลอง.....	93
รายการอ้างอิง.....		94
ภาคผนวก		
	ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	100
	ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	103
	ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน.....	106
	ภาคผนวก ง การคำนวณ.....	111
	ภาคผนวก จ จำนวนแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่คิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบ.....	113
ประวัติผู้เขียน.....		117

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	องค์ประกอบของกากน้ำตาลชนิด blackstrap.....	9
3.1	เปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างกากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ.....	33
3.2	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM.....	34
3.3	แบคทีเรียปนเปื้อนกลุ่มที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ที่พบในตัวอย่างกากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ.....	36
3.4	ลักษณะทางสรีรวิทยาและผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่.....	38
3.5	จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอลที่ระยะเวลาต่างๆ.....	39
3.6	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่นับได้จากน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ.....	42
3.7	แบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ที่พบในระยะเวลาต่างๆ ในระหว่างการหมักเอทานอล.....	43
3.8	จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารกากน้ำตาลสำหรบหมักเอทานอลที่ระยะเวลาต่างๆ.....	44
3.9	น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ.....	47
3.10	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้โดยเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาล M1 และ M2 ที่ระยะเวลา0 , 48 , 60 และ72 ชั่วโมง.....	49
3.11	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* จำนวนเซลล์แบคทีเรีย H และ J ที่ระยะเวลาต่างๆ ในระหว่างการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมแบคทีเรียลงไป.....	51
3.12	เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้โดยเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ระยะเวลาต่างๆ ในระหว่างการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมแบคทีเรียลงไป.....	52

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.13 จำนวนเซลล์ยีสต์*S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม..... 57

3.14 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลโดยยีสต์*S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม..... 57

3.15 จำนวนเซลล์ยีสต์*S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม..... 61

3.16 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลโดยยีสต์*S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม..... 61

3.17 จำนวนเซลล์ยีสต์*S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม..... 65

3.18 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลโดยยีสต์*S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม..... 65

3.19 จำนวนเซลล์ยีสต์*S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม..... 69

3.20 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลโดยยีสต์*S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม..... 69

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

3.21 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน และภาวะที่ไม่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน (ควบคุม) ระหว่างการหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ..... 79

3.22 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย J ในระหว่างการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่มียีสต์ (ควบคุม) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ..... 80

3.23 ค่าอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์ในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน และภาวะที่ไม่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน (ควบคุม) ระหว่างการหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ..... 81

3.24 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอล จำนวนเซลล์ยีสต์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อ..... 86

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.1	การสร้างเอทานอลโดยผ่านวิถี Embden - Meyerhof - Parnas.....	3
1.2	ขั้นตอนการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล.....	4
1.3	ขั้นตอนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย.....	7
1.4	น้ำตาลและผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย.....	8
2.1	ลักษณะขวดหมักเอทานอลและกระเปาะแก้วที่ใช้ในการทดลอง.....	30
3.1	การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้จากตัวอย่างกากน้ำตาลโรงงานชลบุรี โดยวิธี pour plate.....	35
3.2	จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย A , B , C , D และ F ในระยะเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาล.....	40
3.3	จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย E และ G ในระยะเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาล.....	40
3.4	จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำหมักที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลในโรงงานสุรา.....	42
3.5	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย H , J และ K ในระยะเวลาต่างๆ ของการเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาล.....	45
3.6	ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย H (ก) และ J (ข) จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย1,000 เท่า.....	46
3.7	การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ.....	48
3.8	เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาล M1 และ M2 ที่ระยะเวลาต่างๆ.....	49
3.9	เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาล M1และ M2 ที่ระยะเวลาต่างๆ.....	50
3.10	จำนวนเซลล์ยีสต์ จำนวนเซลล์แบคทีเรีย H และ J ที่ระยะเวลาต่างๆ ในระหว่างการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมแบคทีเรียลงไป.....	53

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.11	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตโดยเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ระยะเวลาต่างๆ ในระหว่างการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมแบคทีเรียลงไป.....	54
3.12	เปรียบเทียบจำนวนยีสต์*S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม.....	58
3.13	เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลโดยยีสต์*S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม.....	59
3.14	เปรียบเทียบจำนวนยีสต์*S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม.....	62
3.15	เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลโดยยีสต์*S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตรในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม.....	63
3.16	เปรียบเทียบจำนวนยีสต์*S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม.....	66
3.17	เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลโดยยีสต์*S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตรในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม.....	67
3.18	เปรียบเทียบจำนวนยีสต์*S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม.....	70

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.19	เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตรในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม	71
3.20	เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้นโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการหมักเอทานอลที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน	73
3.21	เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้นโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการหมักเอทานอลที่ไม่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน (ภาวะควบคุม) ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน	73
3.22	เปรียบเทียบจำนวนยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการผลิตเอทานอลที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน	74
3.23	เปรียบเทียบจำนวนยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการผลิตเอทานอลที่ไม่มีแบคทีเรีย J (ภาวะควบคุม) ปนเปื้อนในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน	74
3.24	เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรีย J ที่เจริญระหว่างการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน	75
3.25	เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรีย J ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน (ภาวะควบคุม)	75
3.26	อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ในการหมักเอทานอลที่12 ชั่วโมง	82
3.27	อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ในการหมักเอทานอลที่ 24 ชั่วโมง	83
3.28	อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการหมักเอทานอลที่ 12 ชั่วโมง	84

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.29	อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์*S. cerevisiae* ระหว่างการหมักเอทานอลที่ 24 ชั่วโมง.....	85
3.30	เปรียบเทียบจำนวนยีสต์และแบคทีเรียในระหว่างการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อ.....	87
3.31	เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในระหว่างการหมักเอทานอลลจากอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อ.....	87

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำย่อและสัญลักษณ์

คำย่อและสัญลักษณ์	คำอธิบาย
%	เปอร์เซ็นต์
g/l	กรัมต่อลิตร
^	ยกกำลัง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

การหมักน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์หรือเอทานอลโดยยีสต์เป็นที่รู้จักกันมานานนับพันปีแล้ว จุดประสงค์ในตอนแรกเพื่อใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ซึ่งมีทั้งชนิดที่ไม่ผ่านการกลั่น เช่น เบียร์ (beer) , ไวน์ (wine) และ ไซเดอร์ (cider) เป็นต้น และชนิดที่ผ่านการกลั่น เช่น สุรา (potable spirit) , บรั่นดี (brandy) และ วิสกี้ (whisky) เป็นต้น (Margaritis and Merchant , 1987 ; Rose , 1977) ต่อมามีความต้องการใช้ประโยชน์จากเอทานอลเพื่อกิจการอื่นเพิ่มมากขึ้น คือใช้เป็นตัวทำละลายหรือสารตัวกลาง (intermediates) ในอุตสาหกรรมทางเคมี เช่น การผลิตน้ำหอม ยารักษาโรค และสารต้านจุลชีพ เป็นต้น (Harrison and Graham , 1970) นอกจากนี้ยังใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันปิโตรเลียมเพื่อแก้ปัญหาวิกฤตของราคาน้ำมัน ทั้งนี้เพราะเอทานอลราคาถูก บางประเทศได้มีการนำเอทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์ซึ่งเรียกว่าก๊าซโซฮอล์ (gasohol) (Reed and Nagodawithana , 1991) เช่น ประเทศบราซิลได้นำเอทานอลจากการหมักกากน้ำตาลอ้อยด้วยยีสต์มาใช้เป็นเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์บ้างแล้ว (Walker , 1998) กระบวนการผลิตเอทานอลจึงได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องมาจนถึงปัจจุบัน เพื่อให้ผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง นักวิจัยจากประเทศต่าง ๆ ได้เสนอผลงานวิจัยเกี่ยวกับการพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลออกมามากมาย จากกระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (batch fermentation) ซึ่งเป็นการหมักแบบดั้งเดิมที่นิยมใช้กันทั่วไปได้รับการพัฒนาไปเป็นกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) นอกจากนี้ยังมีการพัฒนาให้เซลล์ยีสต์ยึดเกาะกับวัสดุตัวกลาง (immobilized cell) เพื่อให้ยีสต์มีชีวิตรอดเป็นระยะเวลานาน และรักษาความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ในระหว่างการหมักแบบต่อเนื่องให้สูงคงที่ด้วย (Margaritis and Merchant , 1987) การพัฒนาออกแบบถังหมักแบบต่างๆ การนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ใหม่ (cell recycle) โดยการแยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมักด้วยวิธีปั่นเหวี่ยง (centrifugation) วิธีการนี้เรียกว่ากระบวนการMelle-Boinot ซึ่งเริ่มใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1948 (Boinot and Boige , 1948 cited in Margaritis and Merchant , 1987) ต่อมา Nishizawa และคณะ (1984 cited in Margaritis and Merchant , 1987) ได้ใช้วิธีการกรอง (microfiltration) แทนการปั่นเหวี่ยง หรือการใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ตกตะกอนได้

เอง (flocculant yeast) วิธีนี้จะลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการปั่นเหวี่ยงหรือกรองได้ (Reed and Nagodawithana , 1991) กระบวนการผลิตเอทานอลที่ใช้เทคโนโลยีชั้นสูงนี้มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้นที่ถูกนำไปใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากการผลิตในระดับอุตสาหกรรมย่อมคำนึงถึงความคุ้มค่าในเชิงเศรษฐศาสตร์เป็นสำคัญ (Chen and Mou , 1990) โดยเฉพาะกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องที่การขยายขนาดการผลิต (scale-up) ดำเนินการได้ยาก ต้องอาศัยผู้มีความรู้และทักษะสูงในการควบคุม เพราะการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องต้องการให้มีช่วงเวลาดำเนินการตลอดเวลานานจึงต้องรักษาระบบให้อยู่ภายใต้ภาวะปลอดเชื้อ (Chen , 1990) ถ้ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อระบบการหมักได้ จึงต้องเสียค่าใช้จ่ายสูงในการฆ่าเชื้อวัตถุดิบก่อนทำการหมัก อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องก็มีข้อดี คือ อัตราการผลิตต่อปริมาตรในหนึ่งหน่วยเวลา (productivity) จะสูงกว่ากระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Rose , cited in Margaritis and Merchant , 1987 ; Chen , 1990) ทำให้มีการศึกษาวิจัยเพื่อลดปัญหาที่พบในการหมักแบบต่อเนื่องโดยเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด โดยเฉพาะปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เพื่อที่จะได้นำระบบการหมักแบบต่อเนื่องไปใช้ได้จริงในระดับอุตสาหกรรม มีรายงานว่าประเทศรัสเซียได้ผลิตเอทานอลในระบบต่อเนื่องในระดับอุตสาหกรรมแล้วตั้งแต่ปี ค.ศ. 1960 (Hospodka , 1966 cited in Margaritis and Merchant , 1987) และเมื่อไม่นานมานี้บางประเทศแถบตะวันตกเริ่มใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่องบ้างแล้ว (Margaritis and Merchant , 1987)

1.2 กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักเอทานอลเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาพที่ไม่มีอากาศ โดยเชื้อยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* sp. ยีสต์สามารถสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทส (β-D-fructofuranosidase) ย่อยน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) เช่น น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) 2 โมเลกุล คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุคโตส (Young , 1987) แล้วจึงเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีคาร์บอน 6 อะตอม 1 โมเลกุล เป็นเอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 2 โมเลกุล ตามสมการของ Gay-Lussac ดังนี้

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2 \qquad \text{(Rose , 1977)}$$

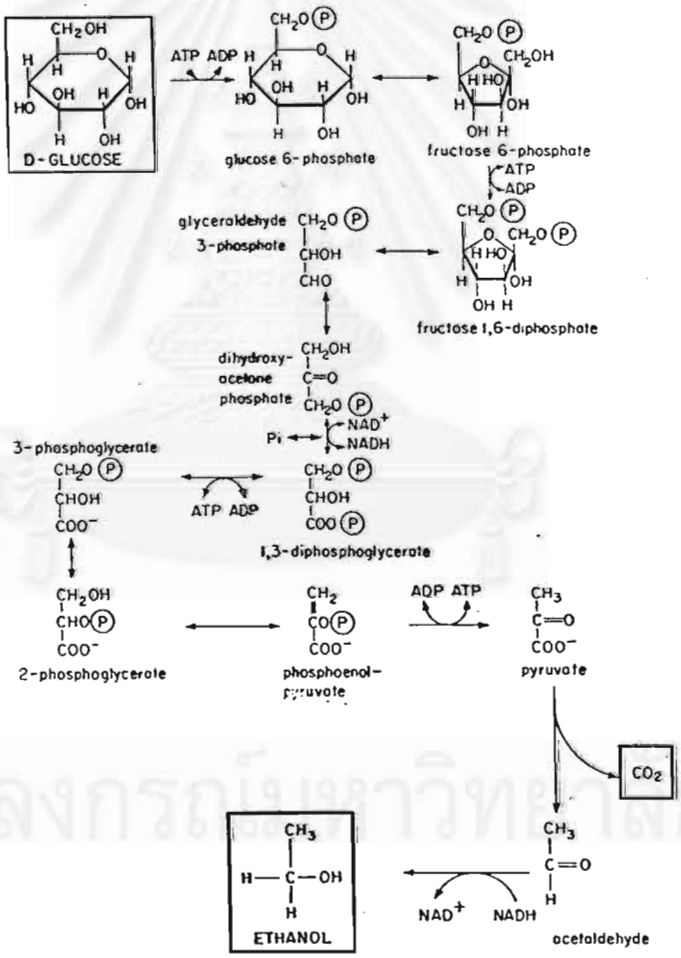
ซึ่งสอดคล้องกับทฤษฎีที่ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ได้ 51.1% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 % โดยน้ำหนักของน้ำตาล แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลประมาณ 95% เท่านั้นที่ถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล ที่เหลืออีก 5% ยีสต์ใช้สำหรับการเจริญและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่นๆ

ของกระบวนการหมักดังนั้น ผลผลิตที่ได้จากการหมักเอทานอลแสดงเป็นเปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลที่ถูกใช้ไปดังนี้

เอทานอล	48.4%
คาร์บอนไดออกไซด์	46.6%
กลีเซอรอล	3.3%
กรดซัคสินิก	0.6%
เซลลูโลส	1.2%

(Hodge and Hildebrandt , 1954)

แนวทางในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลโดยยีสต์อาศัยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ แสดงในรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 การสร้างเอทานอลโดยผ่านวิถี Embden - Meyerhof - Parnas (Harrison and Graham , 1970)

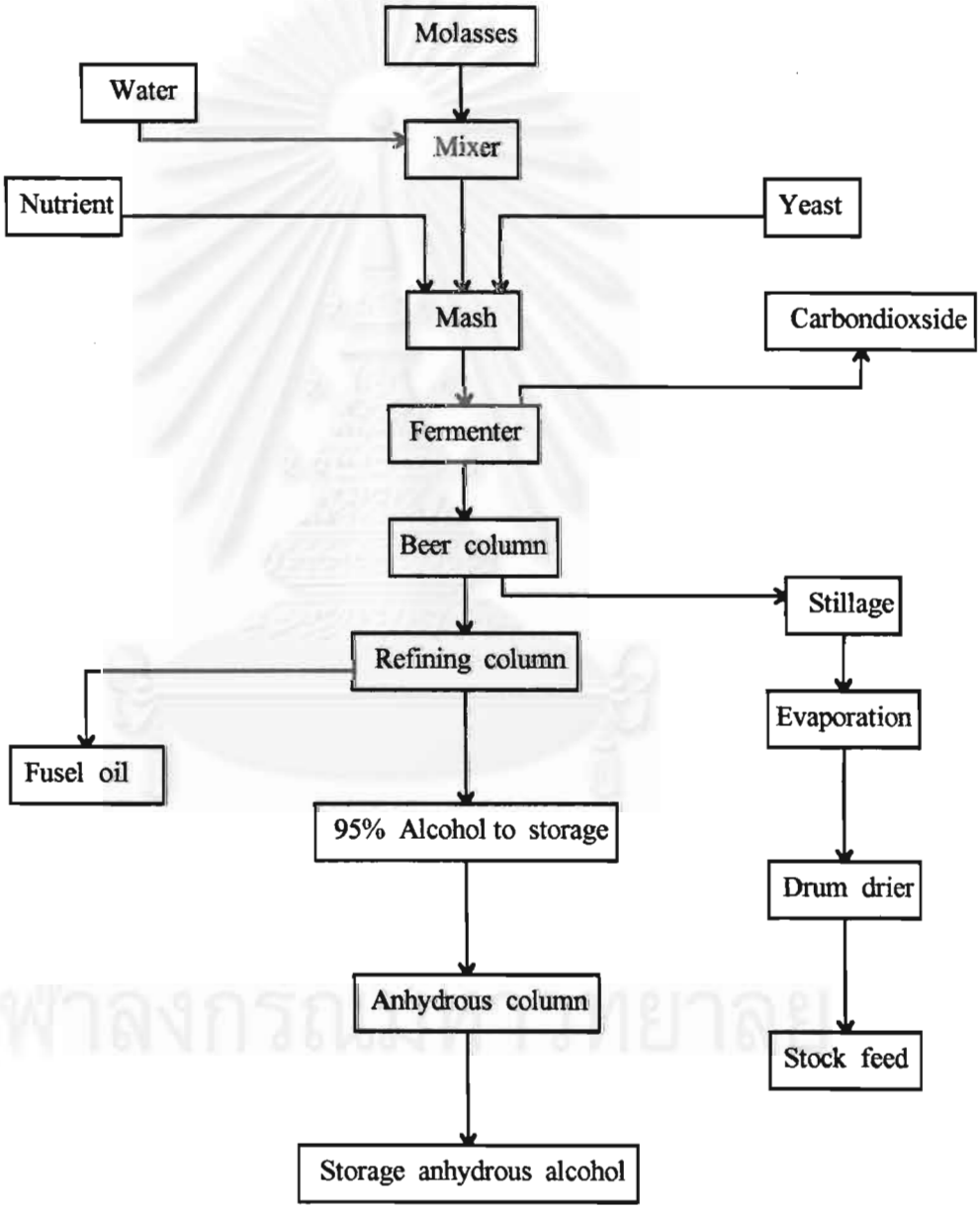
กระบวนการหมักเอทานอลประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 3 ส่วนคือ

1.2.1 การเตรียมวัตถุดิบ

1.2.2 การหมัก

1.2.3 การกลั่น

ขั้นตอนการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลแสดงในรูป 1.2



รูปที่ 1.2 ขั้นตอนการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล (Prescott and Dunn , 1959)

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.3 กากน้ำตาล (molasses)

1.3.1 บทนิยามและชนิดของกากน้ำตาล

ในการผลิตแอลกอฮอล์ทั้งที่เป็นเครื่องดื่มและเชื้อเพลิง มักนิยมใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากกระบวนการหมักดำเนินงานได้ง่าย ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้เลย (Hodge and Hildebrandt , 1954) กากน้ำตาลที่พบโดยทั่วไปแบ่งเป็น 2 ชนิด ตามแหล่งที่มาคือ กากน้ำตาลอ้อย (cane molasses) และ กากน้ำตาลบีท (beet molasses) (Harrison and Graham, 1970) การเลือกใช้กากน้ำตาลชนิดใดเป็นวัตถุดิบขึ้นอยู่กับสภาพภูมิอากาศของแต่ละประเทศ เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายซึ่งเป็นการแปรรูปจากผลผลิตทางการเกษตร เช่น อ้อย หรือ บีท ประเทศที่ผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยจะต้องมีสภาพภูมิอากาศร้อนชื้นเหมาะแก่การเจริญของอ้อย ส่วนบีทจะปลูกกันมากในประเทศที่มีลักษณะภูมิอากาศเย็น (Jenkins , 1966) ดังนั้นประเทศไทยที่มีสภาพอากาศร้อนชื้น จึงมีการเพาะปลูกอ้อยกันมาก และมีโรงงานผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยอยู่ในบริเวณแหล่งเพาะปลูกหลายโรงงาน กากน้ำตาลอ้อยที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจึงหาได้ง่าย ราคาถูก และมีปริมาณมาก สามารถนำไปเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้

กากน้ำตาลอ้อย ตามความหมายที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม หมายถึงผลิตผลพลอยได้ (by-product) ในการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยหลังจากตกผลึกและแยกน้ำตาลทรายออกแล้ว ลักษณะทั่วไปต้องเป็นของเหลวข้นเหนียว สีน้ำตาลปนดำ มีกลิ่นเฉพาะตัว ไม่บูดหรือมีกลิ่นเหม็น (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม , 2524)

กากน้ำตาลสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด

1.3.1.1 blackstrap molasses หรือ final molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวที่มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 50-60% การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจะใช้กากน้ำตาลชนิดนี้เป็นวัตถุดิบ

1.3.1.2 refinery molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ที่มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 48%

1.3.1.3 high test molasses หรือ invert syrup คือกากน้ำตาลที่ผลิตขึ้นโดยนำน้ำอ้อยมาเคี่ยวจนข้นเป็นน้ำเชื่อม ดังนั้น high test molasses จึงไม่ใช่กากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทราย มีปริมาณน้ำตาลประมาณ 77% (ภัทรา มณีธวัช , 2520 อ้างถึงใน ณัฐศิษฎ์ ไทยตระกูล ; Paturau , 1969 อ้างถึงใน ณัฐศิษฎ์ ไทยตระกูล , 2528 ; Harrison and Graham , 1970)

1.3.2 กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย

กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยแสดงในรูปที่ 1.3 ประกอบด้วยขั้นตอนหลักดังนี้

1.3.2.1 การสกัดน้ำอ้อย (extraction of juice) เริ่มต้นจากการเตรียมอ้อยเข้าสู่ราวลำเลียง (canal carrier) ผ่านชุดใบมีด (revolving knives) เพื่อสับอ้อยให้เป็นชิ้นเล็กๆ และผ่านเครื่องย่อยอ้อย (hammer - mill shredder) อ้อยที่ถูกย่อยแล้วก็จะถูกป้อนเข้าสู่เครื่องบีบอ้อย (milling tandem) ที่จัดเรียงกันรวม 6 ชุด เพื่อบีบน้ำอ้อยออกมาตั้งแต่ชุดแรกผ่านไปยังชุดสุดท้ายจนเหลือกากอ้อย (bagasse)

1.3.2.2 การทำน้ำอ้อยให้บริสุทธิ์โดยการทำให้ใส (purification of juice : clarification) น้ำอ้อยที่สกัดได้จากเครื่องบีบจะมีสีเขียวขุ่นคล้ำ มีความเป็นกรด จะถูกเติมปูนขาวให้มีความเป็นด่างอ่อนๆ และให้ความร้อน เพื่อทำให้น้ำอ้อยอยู่ในภาวะเป็นกลาง โดยจะเกิดเกลือของปูนขาวซึ่งส่วนใหญ่เป็นแคลเซียมฟอสเฟตที่ไม่ละลายน้ำ ตกตะกอนลงมาพร้อมกับสิ่งสกปรกในถังพักใส (clarifier) แล้วจึงกรองแยกตะกอนออกจากน้ำอ้อยด้วยเครื่อง vacuum filter

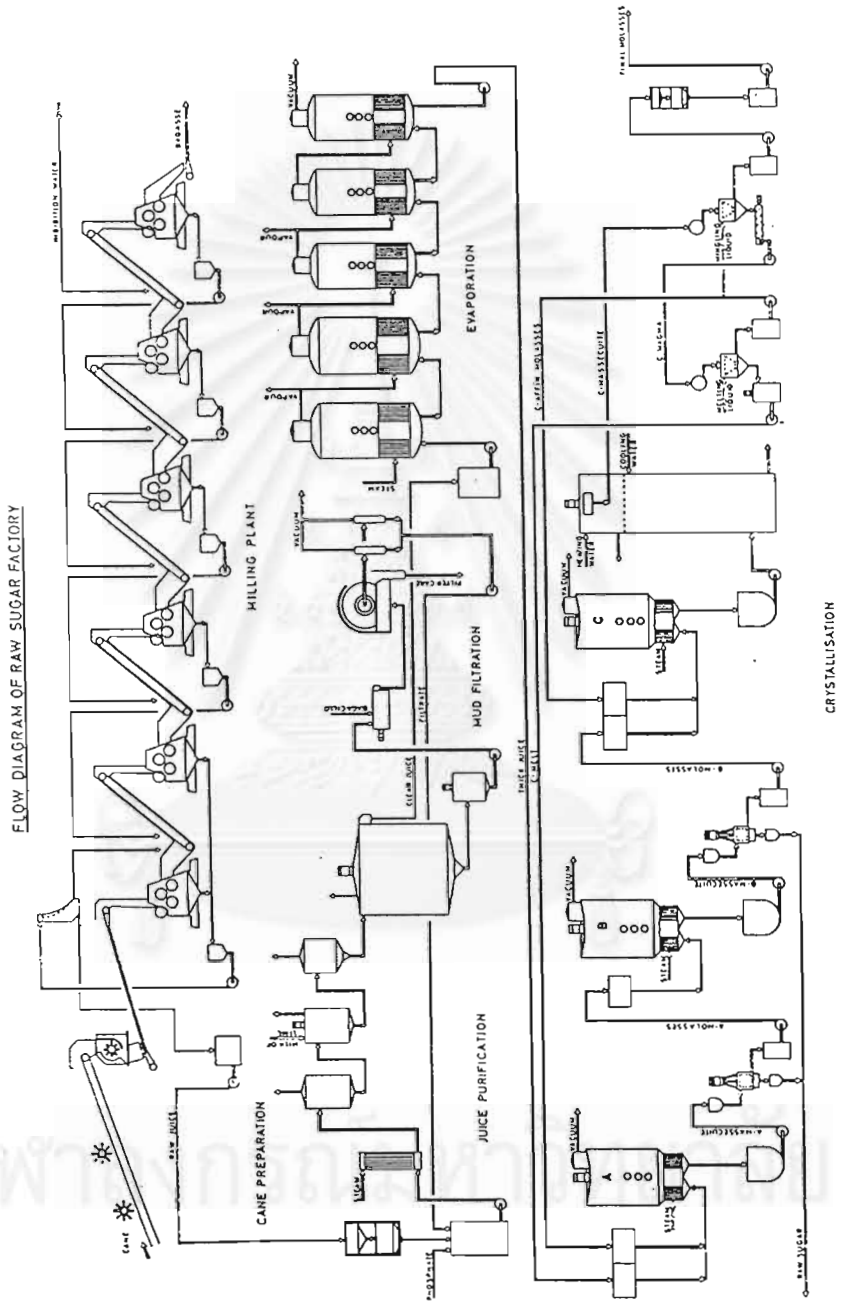
1.3.2.3 การระเหย (evaporation) น้ำอ้อยที่ใสมีส่วนประกอบด้วยน้ำประมาณ 85% จะถูกส่งไประเหยเอาน้ำออกในหม้อต้มระเหยความดัน (vacuum - boiling cell) ที่เรียงต่อเนื่องกันประมาณ 4 - 5 ชุดตามความดันที่สูงขึ้นเพื่อต้มเคี่ยวน้ำอ้อยให้กลายเป็นน้ำเชื่อม (syrup) ที่มีส่วนประกอบเป็นของแข็งและน้ำประมาณ 65% และ 35% ตามลำดับ

1.3.2.4 การทำน้ำเชื่อมให้ใส (clarification of raw syrup) ขั้นตอนนี้คล้ายกับขั้นตอนการทำน้ำอ้อยให้ใส โดยจะเติมปูนขาวและกรดฟอสฟอริกลงในน้ำเชื่อม เพื่อให้เกิดตะกอนในถังพักใส

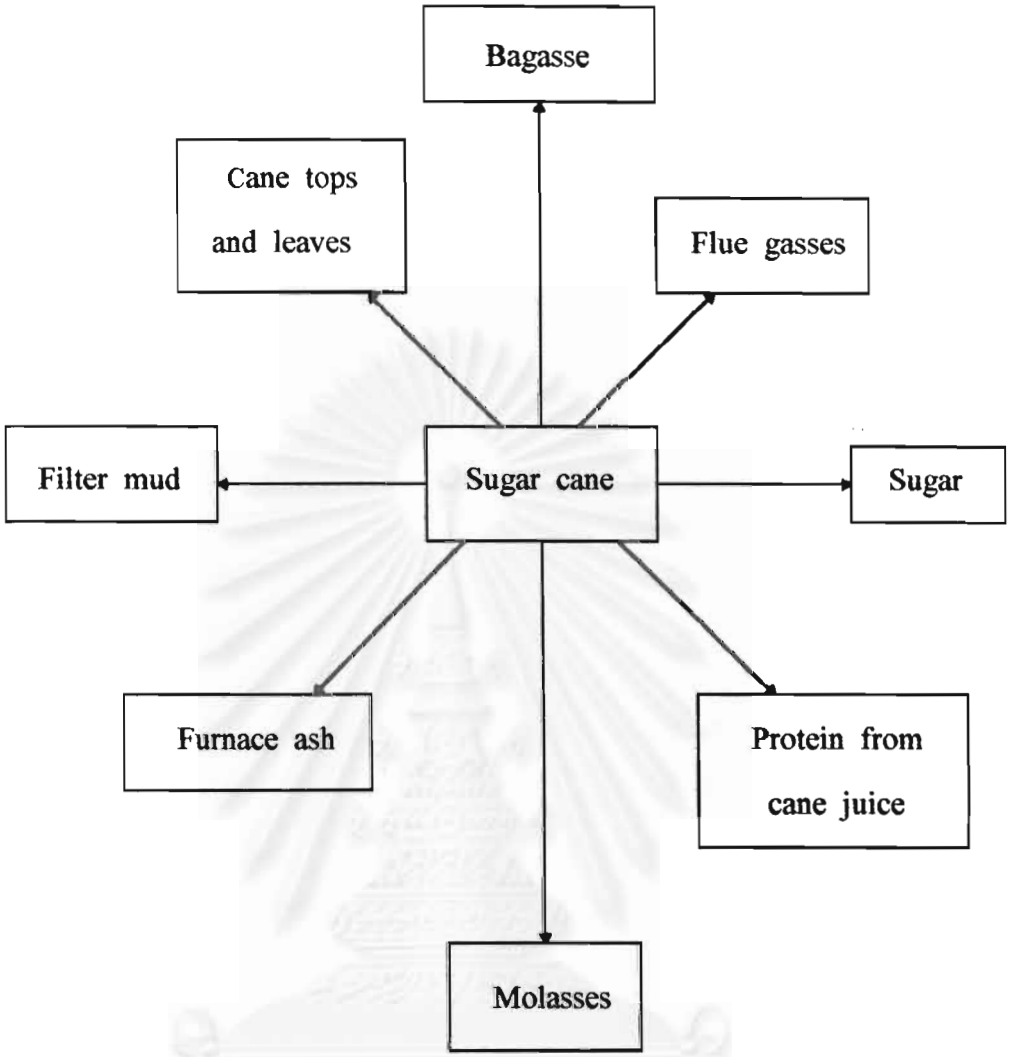
1.3.2.5 การตกผลึก (crystallization) น้ำเชื่อมที่ใสแล้วจะถูกส่งต่อไปยังหม้อเคี่ยว (vacuum pan) เพื่อเคี่ยวให้น้ำระเหยออกจนน้ำเชื่อมอิ่มตัวด้วยน้ำตาล และตกผลึกออกมาน้ำเชื่อมและผลึกในขั้นตอนนี้เรียกว่า A-massecuite

1.3.2.6 การปั่นแยกผลึก (centrifuging or purging) น้ำเชื่อมและผลึกที่ปนกันอยู่จะถูกนำไปปั่นแยกผลึกน้ำตาลออกมา ของเหลวที่เหลือเรียกว่า กากน้ำตาล (A-molasses) จะถูกส่งไปต้มอีกครั้งหนึ่งเพื่อให้เกิด B-massecuite แล้วจึงปั่นแยกผลึกออกมาเป็นครั้งที่ 2 ซึ่งจะไปรวมกับผลึกน้ำตาลในครั้งที่ 1 เพื่อส่งจำหน่ายต่อไป ของเหลวที่เหลือจากการตกผลึกในครั้งที่ 2 นี้เรียก B-molasses ซึ่งจะมีความบริสุทธิ์ต่ำมากสามารถนำไปตกผลึกอีกได้ แต่ต้องใช้เวลานานมากกว่า 1 วัน ของเหลวที่เหลือในขั้นตอนนี้ไม่สามารถตกผลึกน้ำตาลได้อีกเรียกว่า final

molasses หรือ blackstrap molasses นอกจากนี้ยังมีผลพลอยได้ชนิดอื่นๆ ที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อีก เช่น กากอ้อย (bagasse), filtercakes , furnace ash และ flue gas เป็นต้น แสดงในรูปที่ 1.4 (Chen and Chou , 1993)



รูปที่ 1.3 ขั้นตอนการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย (Chen and Chou , 1993)



รูปที่ 1.4 น้ำตาลและผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย (Chen and Chou , 1993)

1.3.3 องค์ประกอบของกากน้ำตาลอ้อยชนิด blackstrap

กากน้ำตาลอ้อยชนิด blackstrap เป็นผลิตผลพลอยได้จากการตกผลึกน้ำตาลครั้งสุดท้ายแล้วนำไปปั่นแยกเอาผลึกน้ำตาลออกในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย ของเหลวที่เหลือ (residual syrup) คือกากน้ำตาลมีลักษณะเหนียวข้น ไม่สามารถตกผลึกน้ำตาลซูโครสโดยกรรมวิธีง่ายๆ กากน้ำตาลชนิด blackstrap มีองค์ประกอบที่ซับซ้อนแสดงในตารางที่ 1.1 องค์ประกอบเหล่านี้จะแตกต่างกันตามลักษณะพันธุ์อ้อย สภาพภูมิอากาศ สภาพดินที่เพาะปลูก ฤดูกาลเก็บเกี่ยว

อายุและสภาพการเก็บ ท้องถิ่นที่ทำการผลิตน้ำตาล และกรรมวิธีการผลิตของโรงงาน เป็นต้น (Chen and Chou , 1993)

ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบของกากน้ำตาลชนิด blackstrap

Main Constituents	components		Normal Percentage Range
Water			17-25
Sugar	Sucrose		30-40
	Glucose (dextrose)		4-9
	Fructose (levulose)		5-12
	Other reducing substance (as invert)		1-4
	Total reducing substance (as invert)		10-25
Other carbohydrate	Gums , starch , pentosans , also traces of hexitols ; myoinositol , D-mannitol , and uronic acids (MeO, 2.0-3.0)		2-5
Ash	As carbonates		7-15
		Percent of Ash	
	Bases : K_2O	30-50	
	CaO	7-15	
	MgO	2-14	
	Na_2O	0.3-9	
	R_2O_2 (Fe)	0.4-2.7	
	Acids : SO_3	7-27	
	Cl	12-20	
	P_2O_5	0.5-2.5	
	SiO_2 and insol.	1-7	
Nitrogenous	"Crude protein" (as N × 6.25)		2.5-4.5
Compounds	True protein		0.5-1.5

ตารางที่ 1.1(ต่อ)

Main Constituents	components	Normal Percentage Range
	Amino acids , principally aspatic and glutamic acids , including some pyrrolidine carboxylic acid	0.3-0.5
	Unidentified nitrogenous compounds	1.5-3.0
Nonnitrogenous Acids	Aconitic acid (1-5%) , citric , malic , oxalic , glycolic	1.5-6.0
	Mesaconic , succinic , fumaric , tartaric	0.5-1.5
Wax , Sterols , and Phosphatides		0.1-1.0
Vitamins	Vitamin A , biotin , niacin , pantothenic acid , riboflavin , thiamine	Varying amounts

กากน้ำตาลชนิด blackstrap จะมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก และมีน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส ราฟฟิโนส เกลือแร่ต่างๆ และสารอื่นที่ไม่ใช่น้ำตาลที่ละลายได้ในด่าง (alkaline-soluble nonsugar ingredient) ซึ่งเหมาะสำหรับการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ (Hodge and Hildebrandt, 1954) ด้วยเหตุนี้อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลในประเทศไทยจึงนิยมใช้กากน้ำตาลชนิด blackstrap เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และคณะ , 2529)

นอกจากน้ำตาลซูโครส กลูโคส ฟรุคโตส และราฟฟิโนส ที่ยีสต์สามารถใช้ในการหมักได้แล้ว ในกากน้ำตาลชนิด blackstrap ยังมีสารอื่นที่แสดงสมบัติเป็นสารรีดิวซ์ที่ยีสต์ไม่สามารถใช้ในการหมักได้ (nonfermentable compound) จัดเป็น copper-reducing substance ส่วนใหญ่ได้แก่สารคาราเมล (caramel) ซึ่งเป็นสารที่ไม่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เกิดจากการที่น้ำตาลได้รับความร้อนมากเกินไปในระหว่างกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย และสารเมลานอยดิน (melanoidin) ซึ่งเป็นสารที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ เกิดจากการควบแน่นของน้ำตาลกับกรดอะมิโนในกากน้ำตาล จากการศึกษาของ El-Maghraby และ Hassan (1982 cited in Chen and Chou , 1993) พบว่าสารที่ก่อให้เกิดสี (coloring matter) โดยวิธีโครมาโทกราฟีเกิดจากสารเมลานอยดินซึ่งก่อให้เกิดสีดำ (dark-colored product) หรือเรียกว่า browning product

ปฏิกิริยาการเกิดสารเมลานอยดินทำให้เกิดการสลายตัวของน้ำตาลในกากน้ำตาลที่เก็บไว้ได้ และปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดยความร้อน (Hodge and Hildebrandt , 1954 ; Chen and Chou , 1993)

Satter และ Zerban (cited in Hodge and Hildebrandt , 1954) ได้รายงานเกี่ยวกับการศึกษาสารรีดิวซ์ที่ไม่สามารถหมักได้ ในกากน้ำตาล (unfermentable reducing substance) พบว่าในกากน้ำตาลชนิด blackstrap มีปริมาณของสารรีดิวซ์ที่ไม่สามารถหมักได้นี้สูงถึง 17% และในกากน้ำตาลชนิด high test มีเพียง 5% และสารรีดิวซ์ที่ไม่สามารถหมักได้ในกากน้ำตาลอ้อยประมาณ 10% เป็นสารที่ระเหยได้ซึ่งเกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลชนิดต่างๆ เช่น สารไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรัล (hydroxymethylfurfural) , อะซีโตอิน (acetoin) , กรดฟอร์มิก (formic acid) และกรดลีวูลินิก (levulinic acid) สารเหล่านี้เกิดจากการสลายตัวของน้ำตาลชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้อุณหภูมิสูงในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย และการเก็บกากน้ำตาลไว้ในที่มีอุณหภูมิสูง จะเพิ่มปริมาณของสารที่ไม่สามารถหมักได้โดยความร้อน เร่งให้เกิดการรวมตัวระหว่างน้ำตาลกลูโคส หรือฟรุคโตสกับกรดอะมิโน (Hodge and Hildebrandt , 1954 ; Chen and Chou , 1993)

1.4 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักเอทานอล

ลักษณะของยีสต์ที่ดีเหมาะสำหรับการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลควรจะมีลักษณะดังนี้

1.4.1 หมักน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงได้อย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ

1.4.2 ทนต่ออุณหภูมิสูงและทนต่อความเป็นกรด

1.4.3 ให้ผลผลิตเอทานอลสูง และทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูง

1.4.4 สามารถปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อผลิตเอทานอลได้ในปริมาณสูง และรักษาลักษณะพันธุกรรมนั้นให้เสถียรได้

1.4.5 ให้ผลผลิตอื่นที่ไม่ใช่เอทานอลจากกระบวนการหมักต่ำ

1.4.6 ทนต่อสารพิษหรือสารยับยั้งที่อาจมีอยู่ในวัตถุดิบ

1.4.7 ให้ความร้อนที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักต่ำ

1.4.8 สามารถเจริญแข่งกับจุลินทรีย์ปนเปื้อน เช่น แบคทีเรีย ได้ดี

1.4.9 เป็นสายพันธุ์ที่สามารถตกตะกอนได้เอง

(Hodge and Hildebrandt , 1954 ; Prescott and Dunn , 1959 ; Rose , 1977 ; Walker , 1998)

ยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญที่สุดในกระบวนการหมักเอทานอลคือ ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (Hodge and Hildebrandt , 1954 ; Rose , 1977) ลักษณะโดยทั่วไปมี

รูปร่างเป็นวงรีคล้ายไข่ขนาดประมาณ 7 ×11 ไมครอน สามารถขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) และขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้าง ascospore ภายใน ascus โดยแต่ละ ascus จะมี 1-4 ascospore (Reed and Peppler , 1973 ; Rose , 1977)

1.5 ปัจจัยที่มีผลต่อยีสต์ในการหมักเอทานอล

ในการทำให้ยีสต์เจริญและหมักเอทานอลให้ได้ดีสุด ขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญดังนี้

1.5.1 สารอาหาร

1.5.1.1 คาร์บอน

เป็นที่รู้กันว่ากระบวนการหมักเอทานอลในภาวะที่ขาดออกซิเจน เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนน้ำตาลหรือสารคาร์โบไฮเดรตอื่นไปเป็นเอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นสารประกอบอินทรีย์ เช่น น้ำตาลกลูโคส ที่ประกอบด้วย ธาตุคาร์บอน ออกซิเจน และไฮโดรเจนจึงเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของยีสต์ พบว่าประมาณ 50% ของน้ำหนักแห้งของยีสต์เป็นธาตุคาร์บอน (Berry and Brown , 1987) ยีสต์สามารถใช้สารคาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งคาร์บอนได้หลายชนิด เช่น น้ำตาล แป้ง และเซลลูโลส เป็นต้น แต่แหล่งคาร์บอนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอลคือกากน้ำตาลชนิด blackstrap ซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก กระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบเป็นกระบวนการที่ง่ายโดยไม่ต้องนำกากน้ำตาลไปผ่านขั้นตอนการเตรียมพร้อมก่อนการหมัก (pretreatment) หรือผ่านเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Harrison and Graham , 1970) ความเข้มข้นของกากน้ำตาลมีความสำคัญเพราะมีผลกระทบโดยตรงต่อปฏิกิริยาการหมัก เช่น ถ้าอาหารสำหรับหมักมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะทำให้เกิดแรงดันออสโมติกสูง ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ยีสต์ เพราะยีสต์จะขับเอทานอลออกจากเซลล์ได้ช้า ภายในเซลล์จึงมีเอทานอลปริมาณสูงจนเป็นพิษต่อตัวยีสต์เอง ขณะเดียวกันถ้าต้องการให้ยีสต์หมักเอทานอลได้ความเข้มข้นสูงก็จะต้องใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นเริ่มต้นสูงเช่นกัน (Harrison and Graham , 1970 ; Panchal and Stewart ,1981) ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะทำให้ระยะเวลาในการหมักนาน และมีน้ำตาลเหลืออยู่มาก แต่ถ้าใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำเกินไปก็จะให้ผลไม่คุ้มค่าในทางเศรษฐกิจ (Young , 1987) ดังนั้นการพิจารณาเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นจึงเป็นสิ่งสำคัญ ความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลชนิด blackstrap ที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจะอยู่ในช่วง 14-15% (Hodge and Hildebrandt , 1954 ; Reed and Peppler , 1973)

1.5.1.2 ไนโตรเจน

ไนโตรเจนเป็นส่วนประกอบของอาหารที่มีความสำคัญรองลงมาจากคาร์บอน ในความหมายของปริมาณความต้องการของยีสต์ แหล่งไนโตรเจนอาจอยู่ในรูปของกรดอะมิโน นิวคลีโอไทด์ ยูเรีย วิตามิน หรือเกลือไนโตรเจนอนินทรีย์ เป็นต้น (Berry and Brown , 1987) ถ้าขาดไนโตรเจนยีสต์ไม่สามารถเจริญได้ เพราะโปรตีน กรดนิวคลีอิก และส่วนประกอบของเซลล์ที่จำเป็นไม่สามารถถูกสังเคราะห์ขึ้นมาได้ (Harrison and Graham , 1970) แม้ว่ากากน้ำตาลจะประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่ยีสต์สามารถใช้ในการหมักเอทานอลแล้ว เช่น กรดอะมิโนต่างๆ แต่สามารถเติมแอมโมเนียมซัลเฟตหรือฟอสเฟต เพื่อเพิ่มอัตราและประสิทธิภาพของการหมักเอทานอล (Hodge and Hildebrandt , 1954) แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่นิยมใช้หมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม คือ แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ เนื่องจากสามารถใช้เป็นแหล่งของซัลเฟอร์ด้วย (Berry and Brown , 1987) พบว่ายีสต์ที่ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนจะเจริญได้เร็วกว่าใช้เกลือแอมโมเนียม (Young , 1987) และถ้าไม่มีกรดอะมิโน ยีสต์จะผลิตกลีเซอรอลและกรดอินทรีย์ในปริมาณมาก อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณไนโตรเจนที่มากเกินไปจะก่อให้เกิดผลเสียต่อการหมักเอทานอลโดยยีสต์ (Harrison and Graham , 1970) มีรายงานว่าถ้ามีแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารสำหรับหมักเอทานอลเข้มข้นสูงถึง 4 กรัมต่อลิตร จะมีผลทำให้การผลิตเอทานอลลดลงประมาณ 50% (Limtong , Seki , and Taguchi , 1985)

1.5.1.3 ฟอสฟอรัส

ฟอสฟอรัสในรูปของไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไอออน $(H_2PO_4^-)$ เป็นส่วนประกอบของน้ำตาลฟอสเฟต กรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอไซด์ ไดหรือ ไตรฟอสเฟต ซึ่งรวมตัวกันเป็นโพลีฟอสเฟต มีความสำคัญในการควบคุมการเผาผลาญอาหาร (metabolism) ของเซลล์ และเป็นแหล่งฟอสเฟตและพลังงานแก่เซลล์ ความเข้มข้นของฟอสเฟตไอออน (PO_4^{3-}) ภายในเซลล์ยังควบคุมการสังเคราะห์ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต แหล่งฟอสฟอรัสที่นิยมใช้ในการหมักเอทานอล คือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) เพราะโพแทสเซียมไอออนจะกระตุ้นให้ฟอสเฟตเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ได้ง่ายขึ้น ฟอสเฟตสามารถเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอลได้ แต่การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลชนิด blackstrap มีความจำเป็นน้อยมากที่จะเติมฟอสเฟตลงไป (Harrison and Graham , 1970) เพราะถ้ามีปริมาณฟอสเฟตมากเกินไปก่อให้เกิดผลเสียต่อการหมักเอทานอลโดยยีสต์เช่นเดียวกับไนโตรเจน (Berry and Brown , 1987)

1.5.1.4 ซัลเฟอร์

ซัลเฟอร์ประมาณ 60% จะเป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน และพบเป็นส่วนประกอบของวิตามิน เช่น ไบโอติน สารซัลเฟอร์อนินทรีย์ที่อยู่ในรูปซัลเฟตไอออน (SO_4^{2-}) เป็นแหล่งซัลเฟอร์ที่พบบ่อยในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ (Berry and Brown , 1987)

1.5.1.5 โพแทสเซียม

โพแทสเซียมมีบทบาทสำคัญในการเป็นศูนย์กลางทางสรีรวิทยาของเซลล์ แหล่งของโพแทสเซียมพบอยู่ในรูปของโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCL) , ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) สามารถเร่งการหมักเอทานอลได้ในภาวะที่มีค่า pH ต่ำ เพราะจะทำให้ระดับของ NADPH , ADP และสารฟอสเฟตอนินทรีย์สูงขึ้น (Berry and Brown , 1987)

1.5.1.6 แมกนีเซียม

แมกนีเซียมมีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ เพราะเป็นปัจจัยร่วม (cofactor) ในการทำงานของเอนไซม์มากกว่า 100 ชนิด ในปฏิกิริยาชีวเคมีต่างๆ ของยีสต์ (Reed and Nagodawithana , 1991)

1.5.1.7 แร่ธาตุต่างๆ (trace elements)

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ ได้แก่ เหล็ก แมงกานีส แคลเซียม คลอรีน แบเรียม ซิงค์ และคอปเปอร์ ถ้ามีในปริมาณมากจะมีผลไปยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ แร่ธาตุบางตัวมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอลโดยยีสต์ เช่น อาร์ซินิก ตะกั่ว อลูมิเนียม โครเมต และวาเนเดียม (Limtong et al. , 1985 ; Berry and Brown , 1987)

1.5.1.8 ปัจจัยส่งเสริมการเจริญ (growth factors)

ปัจจัยส่งเสริมการเจริญอาจเป็นวิตามินที่เป็นตัวควบคุมการเผาผลาญอาหารของยีสต์ โดยจะควบคุมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องเพราะเป็นโคเอนไซม์ (coenzymes) หรือสารเริ่มต้น (precursors) ที่ทำให้เอนไซม์สามารถทำงานได้เต็มที่เช่น วิตามินไบโอติน (biotin) และกรดเพนโทธีนิค (pantothenic acid) นอกจากนี้ยีสต์ยังมีความต้องการวิตามินอื่นๆ เช่น ไทอามีน (B_1) ไพริดีอกซิน (B_6) กรดโฟลิค (folic acid) กรดพาราอะมิโนเบนโซอิก (para-aminobenzoic acid) และไรโบฟลาวิน (riboflavin) ซึ่งส่วนใหญ่ยีสต์สามารถสังเคราะห์ได้เอง สำหรับปัจจัยส่งเสริมการเจริญอื่นๆ ที่สำคัญได้แก่ ไอโนซิทอล (inositol) ทำหน้าที่ในการรักษาสภาพเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) ของยีสต์ ซึ่งมีผลต่อการควบคุมอัตราการหมัก และกรดนิโคตินิก (nicotinic

acid) ที่เร่งการเจริญของยีสต์ สำหรับกรดไขมันไม่อิ่มตัวและสเตอรอยด์อาจถูกเติมลงไปในอาหารเพื่อใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล เพราะยีสต์ไม่สามารถสร้างขึ้นได้เองในภาวะไร้ออกซิเจน (Harrison and Graham , 1970 ; Berry and Brown , 1987 ; Young , 1987)

1.5.2 ความเป็นกรดด่าง (pH)

pH ที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลโดยยีสต์ คือ 4.8 - 5.0 แต่ยังไม่ต่ำพอสำหรับการยับยั้งแบคทีเรีย (Hodge and Hildebrandt , 1954 ; Reed and Peppler , 1973) กากน้ำตาลชนิด blackstrap เมื่อทำการเจือจางแล้วมักจะมีค่า pH อยู่ในช่วงประมาณ 4.7 - 5.2 และมีความสามารถในการรักษาระดับความเป็นกรดด่าง (buffering capacity) สูง (Hodge and Hildebrandt , 1954) นั่นคือการเปลี่ยนแปลง pH ระหว่างการหมักจะน้อยมาก การหมักเอทานอลนิยมปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 4 - 4.5 ด้วยกรดซัลฟุริก เพื่อช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อน แต่ยีสต์ยังสามารถเจริญได้ดี (Prescott and Dunn , 1959) ถ้าค่า pH ของน้ำหมักในช่วงท้ายของการหมักต่ำกว่า 4 บ่งชี้ได้ว่าอาจเกิดการปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดสร้างกรด (Reed and Peppler , 1973 ; Makanjuola , Tymon , and Springham , 1992)

1.5.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิระดับที่ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ดีไม่ควรเกิน 32 องศาเซลเซียส (Reed and Peppler , 1973) โรงงานทั่วไปมักควบคุมให้อยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส โดยใช้ระบบน้ำเย็นราดภายนอกถัง ในระหว่างหมักเอทานอลอุณหภูมิของระบบจะเพิ่มขึ้น ความร้อนที่เกิดขึ้นมาจากกิจกรรมของยีสต์ในการเผาผลาญสารอาหารเพื่อผลิตเอทานอล (Hodge and Hildebrandt , 1954) และสภาพอากาศร้อนภายนอกถังที่เพิ่มอุณหภูมิของน้ำหมัก โดยเฉพาะประเทศไทยที่มีสภาพภูมิอากาศร้อน การควบคุมอุณหภูมิจึงเป็นสิ่งจำเป็นเพราะมีผลต่อปริมาณเอทานอลที่จะได้ คือถ้าอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส การเจริญของยีสต์จะหยุดชะงัก ขณะที่แบคทีเรียปนเปื้อนเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ลดต่ำลง (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และคณะ , 2529 ; วราวฒิ ครูส่ง , 2529) ดังนั้นการใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ทนร้อนจะเหมาะกับภาวะการหมักเอทานอลในประเทศไทย โดยจะช่วยให้การหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและประหยัดค่าใช้จ่ายที่ต้องสูญเสียไปกับระบบหล่อเย็น (Mahamontri et al. , 1982) และถ้าอุณหภูมิต่ำเกินไประยะเวลาในการหมักจะนานขึ้น (Reed and Peppler , 1973)

1.5.4 ปริมาณเชื้อตั้งต้น

ปริมาณเชื้อตั้งต้นที่จะเติมลงในอาหารขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ และวัตถุดิบที่ใช้เป็นอาหารสำหรับหมักเอทานอล กล่าวคืออาหารกากน้ำตาลที่ฆ่าเชื้อแล้ว การใช้เชื้อตั้งต้น

ปริมาณน้อยก็เพียงพอที่จะทำให้การหมักดำเนินไปได้ดี ในการหมักแบบไม่ต่อเนื่องจะใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้น 5 - 10% โดยปริมาตร (Margaritis and Merchant , 1987) หรือจะใช้จำนวนเชื้อตั้งต้น 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Harrison and Graham , 1970)

1.5.5 ความเข้มข้นของเอทานอล และผลพลอยได้จากกระบวนการหมักเอทานอล

ถ้าเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักมีความเข้มข้นสูงอาจมีผลกระทบต่อการเจริญของยีสต์ เนื่องจากเอทานอลไปมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาของเซลล์ (Rose , 1977) พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่า 5% โดยปริมาตร มีผลกระทบเพียงเล็กน้อยต่อยีสต์ (Harrison and Graham , 1970) แต่ผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักได้แก่ ไอโซบิวทิลแอลกอฮอล์ และโพรพานอล ซึ่งจัดเป็นแอกอฮอล์หนัก (fusel oil) ที่มีความเข้มข้นต่ำเพียง 0.35% และ 1.2% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ จะมีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ และสารอะซิตัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 0.5 % โดยน้ำหนัก นอกจากจะทำให้การเจริญและการผลิตเอทานอลลดลงแล้ว ยังทำให้ยีสต์มีรูปร่างเปลี่ยนไปด้วย (Maiorella , Blanch and Wilke , 1983)

1.6 จุลินทรีย์ปนเปื้อนในกระบวนการหมักเอทานอล

กากน้ำตาลมีสารอาหารและแร่ธาตุหลายชนิดจึงเหมาะสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จุลินทรีย์ในกากน้ำตาลอาจปนเปื้อนมาตั้งแต่เริ่มเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย และมีชีวิตรอดจนกระทั่งหลงเหลืออยู่ในกากน้ำตาล ทั้งนี้เนื่องจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายไม่ได้อยู่ในภาวะปลอดเชื้อ น้ำอ้อยที่ได้จากการบีบสกัดมีน้ำตาลและแร่ธาตุต่างๆ ซึ่งเหมาะต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ซึ่งมีทั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรีย จุลินทรีย์ที่มีรายงานว่าพบในน้ำอ้อยและน้ำตาลดิบมีดังนี้คือ *Bacillus subtilis* , *Bacillus mesentericus vulgarus* , *Bacillus stearothermophilus* , *Aerobacter aerogines* , *Pseudomonas* , *Actinomyces* , *Saccharomyces* และ *Penicillium* เป็นต้น สำหรับราและยีสต์มักพบว่าปนเปื้อนหลังจากผ่านกระบวนการตกผลึกน้ำตาลทรายแล้ว แต่แบคทีเรียบางชนิดอาจจะปนเปื้อนมาตั้งแต่เริ่มเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายและสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ โดยเฉพาะแบคทีเรียชนิดสร้างสปอร์ หรือเป็นแบคทีเรียที่ทนร้อน (thermotolerant bacteria) หรือเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูง (thermophilic bacteria) (Chen , 1985 ; Chen and Chou , 1993) จุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยที่ผ่านเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายมีหลายชนิดและแต่ละชนิดอาจพบในปริมาณมากน้อยแตกต่างกัน ขึ้นอยู่กับความสามารถในการมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์นั้นเมื่อผ่านขั้นตอนการผลิตแต่ละขั้นตอน จากรายงานของบุญส่ง แสงอ่อน

และวิวัฒน์ แดงสุภา (2527) พบว่าน้ำอ้อยรวมที่ได้จากการหีบอ้อยผ่านลูกหีบ 4 ชุด จะมีปริมาณแบคทีเรียมากที่สุด รองลงมาคือน้ำอ้อยจากลูกหีบชุดที่หนึ่ง และน้ำอ้อยจากบ่อพักใส กล่าวคือมีค่าเฉลี่ย 1.9×10^8 , 1.26×10^7 และ 1.45×10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับระดับอุณหภูมิและค่า pH ของน้ำอ้อยในแต่ละขั้นตอน อุณหภูมิจากลูกหีบชุดที่หนึ่งและน้ำอ้อยรวมมีค่าเฉลี่ยประมาณ 29.3 องศาเซลเซียส และค่า pH เท่ากับ 5.25 และ 4.93 ตามลำดับ แบคทีเรียที่พบมากได้แก่ *Streptococcus* sp. รองลงมาได้แก่ *Lactobacillus fermentum* และ *Leuconostoc mesenteroides* ส่วนอุณหภูมิของน้ำอ้อยพักใสจะสูงกว่าน้ำอ้อยทั้งสองชนิดที่กล่าวมา คือมีค่าประมาณ 97.06 องศาเซลเซียส และมีค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 7.04 ซึ่งเซลล์ปกติของจุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญและมีชีวิตได้ในภาวะที่มีอุณหภูมิสูงเช่นนั้น มีเพียงเอนโดสปอร์ (endospore) เท่านั้นที่ทนได้ แบคทีเรียที่พบว่ามีจำนวนมากคือ *Bacillus subtilis* (บุญส่ง แสงอ่อน และวิวัฒน์ แดงสุภา , 2527) นอกจากนี้จุลินทรีย์ปนเปื้อนในกากน้ำตาลบางส่วนอาจปนเปื้อนจากสภาพแวดล้อม การขนส่ง การเก็บ และภาชนะบรรจุ

โดยปกติกระบวนการหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจะเจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำแล้วใช้หมักเอทานอลโดยไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (sterilization) เนื่องจากต้องเสียค่าใช้จ่ายสูง มีแต่ขั้นตอนการทำความสะอาดในถังหมักเท่านั้น (Mergaritis and Merchant , 1987 ; Essia Ngang , Letourneau , Wolniewicz et al. , 1990) ภาวะดังกล่าวจึงเอื้อต่อจุลินทรีย์ปนเปื้อนให้สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในระหว่างกระบวนการหมักอทานอลโดยยีสต์ ในจำนวนเชื้อปนเปื้อนทั้งหมดพบว่าแบคทีเรียชนิดสร้างกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นสาเหตุสำคัญที่สุดในการทำลายกระบวนการหมักเอทานอล (Essia Ngang , Letourneau , and Villa , 1989) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลส ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ และชอบอยู่ในสภาวะมีออกซิเจนน้อย (microaerophile) (Oliva- Neto and Yokoya, 1994) แบคทีเรียนี้จะสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก และสร้างสารเมตาบอไลต์อื่นด้วย เช่น กรดอะซิก (Maiorella et al. , 1983 ; Essia Ngang , Letourneau , Wolniewicz et al. ,1990) แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* , *Streptococcus* , *Betacoccus* หรือ *Leuconostoc* และ *Tetracoccus* หรือ *Pediococcus* (Priest , 1996) การปนเปื้อนของแบคทีเรียชนิดสร้างกรดแลคติกทำให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลง โดยในปี ค.ศ. 1979 Serra และคณะ พบว่าประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจะลดลง 15% (cited in Oliva-Neto and Yokoya , 1994) แบคทีเรียกลุ่มนี้นอกจากจะสร้างกรดแลคติก และสารเมตาโบไลต์ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยตรงแล้ว ตัวของแบคทีเรียเองยังก่อให้เกิดการตก

ตะกอน (flocculation) ของยีสต์ โดยจะเจริญเป็นเส้นสายยาวสานกันเป็นร่างแหจับพาเซลล์ยีสต์ตกตะกอนสู่ก้นถังหมักในระยะที่การหมักเอทานอลยังไม่สมบูรณ์ ทำให้รบกวนการแพร่เข้าและออกของสารอาหารและเอทานอลจากเซลล์ยีสต์ ยีสต์จึงไม่สามารถที่จะใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่อย่างเต็มที่ ดังนั้นปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จึงลดลง (Makanjuola et al. , 1992 ; Oliva- Neto and Yokoya , 1994) แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* สามารถทนอุณหภูมิได้สูงและทนต่อภาวะการหมักเอทานอล (Reed and Nagodawithana , 1991) จึงเจริญและปล่อยสารเมตาบอไลต์ออกมาโดยเฉพาะช่วงท้ายของการหมัก ซึ่งอาจเป็นพิษต่อยีสต์หรือสร้างเอนไซม์ที่สามารถเปลี่ยนกลไกการทำงานของยีสต์แทนที่การหมักเอทานอล แม้ว่าในตอนท้ายของการหมักปริมาณน้ำตาลจะน้อย แต่สารบางอย่างเช่น น้ำตาลเพนโทส และกลีเซอรอล ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักเอทานอล แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ ทำให้จำนวนแบคทีเรียมีปริมาณสูง (Harrison and Graham , 1970) ดังนั้นเมื่อนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ใหม่จึงมีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ด้วย ทำให้การเจริญและการมีชีวิตรอดของยีสต์ลดลง (Oliva- Neto and Yokoya , 1994) หรือในกรณีที่นำน้ำส่ากลับมาใช้ใหม่โดยละลายกากน้ำตาลเพิ่มเข้าไปเรียกว่ากระบวนการ back-slopping จะต้องหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่อาจสะสมอยู่ตามท่อวาล์ว ข้อต่อต่างๆ ของอุปกรณ์ภายในโรงงาน เพราะส่วนต่างๆ ดังกล่าวทำความสะอาดได้ยากจึงเป็นจุดรวมในการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมให้มีมากขึ้น (Hodge and Hildebrandt , 1954) จากการศึกษาของ Amorim และ Oliveira ในปี ค.ศ. 1982 พบว่าแบคทีเรียปนเปื้อนก่อให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลในกากน้ำตาลระหว่างการเก็บและในระหว่างการหมักเอทานอลด้วย (cited in Oliva-Neto and Yokoya , 1994 ; Klaushofer , Hollaus , and Pollach , 1971) สาเหตุสำคัญอีกประการหนึ่งที่ก่อให้เกิดการสะสมของแบคทีเรียปนเปื้อนในกากน้ำตาล คือ การเก็บกากน้ำตาลไว้นานเป็นกากน้ำตาลเก่า จากงานวิจัยของปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และคณะ ที่ได้ศึกษาปัญหาที่เกิดจากการหมักกากน้ำตาลเก่าของโรงงานผลิตเอทานอล พบว่ากากน้ำตาลเก่าเป็นสาเหตุใหญ่ที่ทำให้เกิดปัญหาผลผลิตเอทานอลตกต่ำ เพราะมีการสะสมของแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ก่อให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลและสร้างสารที่ไม่ต้องการ เช่น กรดและก๊าซ เป็นผลให้เอทานอลที่ผลิตได้ด้อยคุณภาพ แบคทีเรียกลุ่มนี้ทนอุณหภูมิสูง สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทนต่อเอทานอลและน้ำตาลที่ความเข้มข้นสูงได้ดี (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และคณะ , 2529)

การก่อปัญหาของแบคทีเรียปนเปื้อนในโรงงานผลิตเอทานอลจำเป็นที่จะต้องได้รับการป้องกันและแก้ไข เพราะหากเกิดการปนเปื้อนขึ้นย่อมแสดงว่าปริมาณและคุณภาพของเอทานอลที่ผลิตได้จะลดลง มีรายงานการวิจัยที่เสนอแนวทางการกำจัดการปนเปื้อนของแบคทีเรียอยู่หลาย

แนวทางที่ต่างกัน วิธีที่นิยมใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมคือ การปรับค่าความเป็นกรดด่างของอาหารกากน้ำตาลให้เป็นกรดประมาณ 4-4.5 เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Presscott and Dunn , 1959) บางครั้งระบบการหมักที่มีประสิทธิภาพคือยีสต์สามารถหมักเอทานอลได้เร็วในภาวะไร้ออกซิเจน เอทานอลที่เกิดขึ้นอาจยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดสร้างกรดแลคติกและชนิดสร้างกรดบิวทีลิก (butyric acid) (Hodge and Hildebrandt , 1954) การใช้เชื้อยีสต์ตั้งต้นปริมาณมากสำหรับหมักเอทานอล ขณะที่จำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนเริ่มต้นมีจำนวนน้อย แบคทีเรียจึงต้องใช้เวลานานในการเพิ่มจำนวนจนถึงระดับที่ก่อปัญหาได้ ดังนั้นกระบวนการหมักจึงเกิดขึ้นเร็วสามารถผลิตเอทานอลได้เกือบสมบูรณ์ก่อนที่แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนมากเป็นประชากรส่วนใหญ่ในระบบการหมัก แม้ว่าแบคทีเรียจะมีอัตราเจริญตามธรรมชาติที่เร็วกว่ายีสต์ก็ตาม แต่ก็มีบ่อยครั้งที่แบคทีเรียเผาผลาญสารหรือโลหะบางชนิดที่ยีสต์ไม่สามารถใช้ได้ ทำให้การเจริญของแบคทีเรียดำเนินต่อไปได้ยาวนาน (Harrison and Graham , 1970) การทดลองของ Essia Ngang และคณะ ได้ใช้ปริมาณยีสต์ตั้งต้นจาก 3×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลบีทที่มีการเติมกรดแลคติกลงไป สามารถเพิ่มอัตราจำเพาะของการผลิตเอทานอลได้ (Essia Ngang , Letourneau , and Villa ,1989)

อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีเรียปนเปื้อนสกุล *Lactobacillus* จำนวน 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะไม่มีผลต่ออัตราการเจริญและอัตราการผลิตเอทานอลของยีสต์ แต่ถ้ามีจำนวนถึง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ทันที (Essia Ngang , Letourneau , Wolniewicz et al. , 1990) แบคทีเรีย *Lactobacillus* จำนวนน้อยที่ปนเปื้อนในระหว่างหมักเอทานอลอาจสร้างสารเมตาโบไลต์ที่ก่อให้เกิดกลิ่นเฉพาะที่ดี เช่น สารไดอะซีติล (diacetyl) และเอสเทอร์ (ester) เหมาะสำหรับอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเครื่องดื่ม (Reed and Nagodawithana , 1991 ; Harrison and Graham , 1970)

บางโรงงานอาจมีการเติมสารฆ่าเชื้อเช่น โซเดียมหรือโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ลงในอาหารกากน้ำตาลก่อนหมัก สารเมตาไบซัลไฟต์นี้จะเปลี่ยนเป็นก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนแล้วระเหยไป (Gibbons and Westby , 1988) หรืออาจใช้สารแอมโมเนียมไบฟลูโอไรด์ แต่พบว่าไม่เป็นที่นิยมในกรณีที่นำน้ำกากส่ากลับมาใช้ใหม่ (Harrison and Graham , 1970) นอกจากนี้ยังมีการใช้ยาปฏิชีวนะ เช่นเพนนิซิลลินและเตตราไซคลิน เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอล โดยที่ยาปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิดนี้ไม่มีผลต่อกิจกรรมของยีสต์ (Aquarone , 1960)

การเลือกวิธีแก้ปัญหาการรบกวนของแบคทีเรียปนเปื้อนในระหว่างการหมักเอทานอลมาใช้ในโรงงานผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรมได้จริงนั้น จะต้องคำนึงถึงความเป็นไปได้ของวิธีการแก้ปัญหาที่จะต้องเหมาะสมกับการผลิตขนาดใหญ่ สามารถดำเนินงานได้ง่าย และเสียค่าใช้จ่ายน้อยที่สุด เนื่องจากมูลค่าของผลิตภัณฑ์ต่ำ ถ้าต้องใช้วิธีการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไรเซชั่นจะไม่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ

1.7 จลนพลศาสตร์ของการหมัก (fermentation kinetics) (สมใจ ศิริโภค , 2537 ; วราวุฒิ ครูส่ง , 2529 ; Stanbury , 1984 ; Gaden , 1977)

การศึกษาเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์ของการหมักเป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้ทราบถึงธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการหมักชนิดหนึ่งๆ อย่างละเอียด โดยศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ที่สำคัญเช่น อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ และอัตราการตายของจุลินทรีย์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น อุณหภูมิ pH ความเข้มข้นของสารอาหาร ฯลฯ ที่มีผลต่ออัตราการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาหาทางจลนพลศาสตร์เหล่านี้จะเป็นประโยชน์มากต่อการควบคุมปัจจัยต่างๆ และการจัดระบบของกระบวนการหมักให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

จลนพลศาสตร์ของการหมัก หมายถึง อัตราการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่มีเอนไซม์ ซึ่งได้มาจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป็นตัวเร่ง การเปลี่ยนแปลงของตัวแปรที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่การใช้สารอาหาร (substrate utulization) การสร้างผลิตผล (product formation) และการเพิ่มมวลของเซลล์ รวมทั้งการให้อากาศและการดูดซึมเอาออกซิเจนเข้าไปใช้ภายในเซลล์ ในทางปฏิบัติแล้วจลนพลศาสตร์ของการหมัก จะหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทั้งหมด (gross overall reaction rate)

จุดประสงค์หลักของการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการหมักมีอยู่ 2 ประการได้แก่

1. เพื่อเพิ่มอัตราการผลิต (productivity) ของกระบวนการหมักแบบครั้งคราว หรือไม่ต่อเนื่อง (batch process)

2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)

สำหรับในการศึกษาทางจลนพลศาสตร์จะต้องคำนึงถึงปัจจัยหลักสองประการด้วยกันคือ อัตราการผลิต (productivity) และอัตราการหมัก (fermentation rate) เป็นสำคัญ โดยกำหนดให้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัตราการผลิต หมายถึง ความเข้มข้นของผลผลิตที่ได้จากการหมักต่อระยะเวลาที่ใช้ตั้งแต่เริ่มใส่กล้าเชื้อจนสิ้นสุดการหมัก ซึ่งมีหน่วยเป็นมวลของผลผลิตต่อหน่วยปริมาตรต่อหน่วยเวลา ค่าที่ได้นี้จะเป็นอัตราโดยเฉลี่ยของการผลิต

อัตราการหมัก หมายถึง อัตราการเปลี่ยนแปลงโดยฉับพลันของความเข้มข้นของผลผลิต แต่ในบางกรณีอาจหมายถึงปัจจัยหรือลักษณะอื่นๆ ด้วยก็ได้ เช่น การหายใจ การเจริญเติบโตและการใช้สารอาหารหลัก เป็นต้น อัตราการหมักแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ

1. volumetric rate มีหน่วยเป็นกรัมของผลผลิตที่ได้ต่อลิตรต่อชั่วโมง หรือกรัมของน้ำตาลที่ใช้ต่อลิตรต่อชั่วโมง หรือกรัมของเซลล์ที่ได้ต่อลิตรต่อชั่วโมง

2. specific rate หมายถึงอัตราการเปลี่ยนแปลงของความเข้นข้นต่อหน่วยมวลเซลล์ ซึ่งสามารถคำนวณได้จากการหาร volumetric rate ด้วยความเข้มข้นของเซลล์ที่จุดนั้นๆ ดังนั้นหน่วยของ specific rate จะเป็นกรัมของผลผลิตที่ได้ต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์ หรือกรัมของน้ำตาลที่ใช้ต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์ หรือกรัมเซลล์ที่ได้ต่อชั่วโมงต่อกรัมเซลล์

Monod's Growth Equation

ในการหาอัตราการเจริญเติบโตอาศัย Monod's Growth Equation โดยกำหนดว่าในสภาพที่ภายในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของสารอาหารที่มีอยู่จำกัด (limiting substrate concentration) อัตราการเจริญเติบโตจะเป็นฟังก์ชั่นของความเข้มข้นของมวลของเซลล์ (cell mass) และความเข้มข้นของสับสเตรท (substrate concentration) ดังนั้น

$\frac{dx}{dt} = f(x,s)$ เมื่อ x = มวลเซลล์ต่อ 1 หน่วยปริมาตร

s = ความเข้มข้นของสับสเตรท

$\frac{dx}{dt}$ = อัตราการเจริญ

อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) หมายถึงอัตราการเพิ่มมวลเซลล์ต่อหน่วยเวลา ต่อหน่วยมวลเซลล์ ดังนั้น

$$\mu = \frac{1}{x} \cdot \frac{dx}{dt} \qquad (1)$$

mass doubling time หรือ generation time (td) หมายถึง ระยะเวลาที่ต้องการในการเพิ่มมวลเซลล์ให้เป็นสองเท่า

จากสมการที่ 1 นำมาอินทิเกรท จะได้

$$\ln \frac{x_2}{x_1} = \ln 2 = \mu td$$

$$td = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$

จากการศึกษาของ Monod พบว่า การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์มีลักษณะเช่นเดียวกับปฏิกิริยาของเอนไซม์ ซึ่งสามารถแสดงออกมาในรูปคล้าย Michaelis - Menten Equation คือ

$$\mu = \mu max \left(\frac{s}{K_s + s} \right) \qquad (2)$$

เมื่อ μmax = อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

K_s = ค่าคงที่ของการใช้สับสเตรท มีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรท เมื่อ μ เท่ากับ $\frac{1}{2}\ \mu max$ และเป็นค่าที่แสดงสัมพรรคภาพ (affinity) ของจุลินทรีย์ต่อสับสเตรท

จากสมการที่ (1) นำค่า μ มาแทนในสมการที่ 2 จะได้

$$\frac{dx}{dt} = \mu max \left(\frac{s}{K_s + s} \right) . x \qquad (3)$$

จากสมการที่ (3) แสดงความสัมพันธ์ของอัตราการเจริญของจุลินทรีย์กับความเข้มข้นของสารอาหารที่มีอยู่จำกัด และความเข้มข้นของเซลล์ในขณะนั้น ซึ่งจากสมการนี้เป็นประโยชน์มากในการนำไปใช้เป็นพื้นฐานในการออกแบบกระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง

อัตราจำเพาะต่างๆ ของการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง สามารถเขียนออกมาในรูปของสมการดังนี้

อัตราจำเพาะของการเจริญ (specific growth rate) $= \frac{1}{x} . \frac{dx}{dt}$

อัตราจำเพาะของการเกิดผลผลิต (specific production rate) $= \frac{1}{x} . \frac{dp}{dt}$

อัตราจำเพาะของการใช้สับสเตรท (specific substrate utilization rate) $= \frac{1}{x} . \frac{-ds}{dt}$

1.8 มูลเหตุในการทำวิจัย

การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลในระดับอุตสาหกรรม มักประสบปัญหาการปนเปื้อนของแบคทีเรีย ทำให้ปริมาณและคุณภาพของเอทานอลที่ผลิตโดยยีสต์ลดลง เนื่องจากไม่มีขั้นตอนการฆ่าเชื้ออาหารกากน้ำตาลก่อนการหมัก เพราะค่าใช้จ่ายสูง ปัญหานี้ส่งผลกระทบต่อการพัฒนาระบบการหมักแบบต่อเนื่อง ซึ่งเป็นระบบที่ให้อัตราการผลิตสูงกว่าแบบไม่ต่อเนื่อง งานวิจัยนี้จึงคัดเลือกแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในกากน้ำตาลและน้ำหมัก โดยคาดว่าอาจเป็นสาเหตุรบกวนการผลิตเอทานอลทำให้เกิดความเสียหายต่อระบบการหมัก เพื่อศึกษากลไกการเจริญของแบคทีเรียนั้นในภาวะที่อยู่ร่วมกันกับยีสต์ และหาปัจจัยจำกัดที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียนั้นในระหว่างการหมักเอทานอลโดยยีสต์ รวมทั้งศึกษาค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการหมักเอทานอล เพื่อใช้เป็นแนวทางในการควบคุมปริมาณแบคทีเรียปนเปื้อนให้ลดลงหรืออยู่ในระดับที่ไม่ส่งผลต่อการผลิตเอทานอล ข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้อาจนำไปประยุกต์ใช้สำหรับการหมักเอทานอลในระดับต่อเนื่อง และระบบที่นำยีสต์กลับมาใช้ใหม่ได้

1.9 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

1.9.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในกากน้ำตาล

1.9.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำหมัก

1.9.3 ศึกษาภาวะการเจริญร่วมกันของยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในระหว่างการหมักเอทานอล

1.9.4 การหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1.1 อุปกรณ์

เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (Gas Chromatograpy) รุ่น 163 พร้อมเครื่องตรวจวัดแบบ Flame-Ionization Detector (FID) บริษัท Hitachi, Ltd., Tokyo, ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวิเคราะห์ผล (Computer Integrater) รุ่น C-R4A Cromatopac บริษัท Shimazu,Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องปั่นหมุนเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge) รุ่น KR-20000T บริษัท Kubota Corporation ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic-21 บริษัท Baush & Lomb ประเทศสหรัฐอเมริกา

เครื่องชั่งแบบหยาบ (Electronic Balance) รุ่น FX-3000 บริษัท A&D, ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องชั่งแบบละเอียด (Electronic Balance) รุ่น FX-180 บริษัท A&D, ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) รุ่น F-13 บริษัท Horiba, Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) รุ่น HI 8424 บริษัท Hanna Instruments ประเทศอิตาลี

เครื่องเขย่าผสม (Vortex Mixer) รุ่น Vortex-Genie No.2 บริษัท Scientific Industries ประเทศสหรัฐอเมริกา

ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) รุ่น MIR 152 Sanyo Electric Co.,Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิแบบหมุน (Incubator Shaker) รุ่น RC-TK บริษัท Infors ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

ตู้อบไมโครเวฟ (Microwave) รุ่น MR-6650 บริษัท Hitachi, Ltd., ประเทศญี่ปุ่น

หม้อนึ่งอัดไอ (Autoclave) รุ่น KT-30SD บริษัท Omron Tateisi Electric Co., ประเทศญี่ปุ่น

ตู้อบฆ่าเชื้อแบบแห้ง (Hot Air Oven) รุ่น Contherm Series five บริษัท Contherm Scientific Ltd., ประเทศนิวซีแลนด์

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Hood) รุ่น NK System Clean Bench ประเทศญี่ปุ่น

ตู้อบแห้ง (Oven) รุ่น UL-80 บริษัท Memmert ประเทศ Germany

กล้องจุลทรรศน์ (Microscopy) รุ่น Alphaphot-2 YS2 บริษัท Nikon ประเทศญี่ปุ่น

2.1.2 สารเคมี

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต	
กรด 3,-5-ไดไนโตรซาลิไซลิก	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา
กรดอะซีติก	The East Asiatic	ประเทศไทย
โซเดียมอะซิเตต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
เดรกซ์โตรส	Commercial Grade	ประเทศไทย
เปปโตน	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
โพรพานอล	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	Commercial Grade	ประเทศไทย
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรท	MERCK	ประเทศเยอรมัน
แลคโตบาซิลไล (Lactobacilli) MRS	DIFCO	ประเทศสหรัฐอเมริกา
วุ้นผง	พัฒนสินเอ็นเตอร์ไพรส์	ประเทศไทย
สารสกัดจากยีสต์	IBGE	ประเทศไทย
สเตรปโตมัยซินซัลเฟต	SIGMA	ประเทศสหรัฐอเมริกา

สารสกัดจากมอลล์	NESTLE	ประเทศไทย
สารละลายซาฟรานิน	MERCK	ประเทศเยอรมัน
สารละลายไอโอดีน	MERCK	ประเทศเยอรมัน
เอทานอลสัมบูรณ์	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี
เอทานอล 95%	กมรสรรพสามิต	ประเทศไทย
เอนไซม์อินเวอร์เทส	Wako Pure Chemical	ประเทศไทย
แอคติไดโอน	FLUKA	ประเทศสวิตเซอร์แลนด์
แอมโมเนียมซัลเฟต	CARLO ERBA	ประเทศอิตาลี

2.2 กากน้ำตาลและน้ำหมักที่ใช้ในงานวิจัย

กากน้ำตาลที่ใช้เป็น blackstrap molasses

2.2.1 กากน้ำตาลสำหรับแยกเชื้อจุลินทรีย์ ได้รับอนุเคราะห์จากสำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทรายวังแดง ซึ่งเป็นกากน้ำตาลที่ได้รับจากโรงงานต่างๆ เมื่อปี พ.ศ.2541 ดังนี้

- โรงงานน้ำตาลเชียงใหม่
- โรงงานน้ำตาลวนชัยอุตสาหกรรม
- โรงงานน้ำตาลกำแพงเพชร
- โรงงานน้ำตาลมิตรสยาม
- โรงงานน้ำตาลรวมผลอุตสาหกรรมนครสวรรค์
- โรงงานน้ำตาลเกษตรไทย
- โรงงานน้ำตาลเกษตรผล
- โรงงานน้ำตาลนิวกว้างสุ้นหลี
- โรงงานน้ำตาลชลบุรี

2.2.2 น้ำหมักสำหรับแยกเชื้อจุลินทรีย์ ได้รับอนุเคราะห์จากโรงงานสุรากรมสรรพสามิต

2.2.3 กากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอล ได้รับอนุเคราะห์จาก

- โรงงานน้ำตาลหนองใหญ่
- โรงงานน้ำตาลมิตรผล

2.3 เชื้อจุลินทรีย์

ยีสต์ที่ใช้ในการทดลองเป็นยีสต์ *S. cerevisiae* จาก stock culture ของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.4 การเก็บรักษาเชื้อยีสต์

ถ่ายยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (loop) ลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งลาดเอียง (agar slant) สูตรอาหาร YM (ภาคผนวก ก-1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.5 การแยกเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่จากกากน้ำตาล

เทตัวอย่างกากน้ำตาลลงในกระบอกตวงที่ล้างด้วยน้ำขจัดไอออน (deionized water) นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมลงในน้ำขจัดไอออนและผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จะได้ตัวอย่างที่มีระดับการเจือจาง 1 : 10 จากนั้นเจือจางให้ลดลงทีละ 10 เท่า นำตัวอย่างที่เจือจางในระดับที่เหมาะสมมาแยกจุลินทรีย์แบบ viable plate count โดยวิธี pour plate ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.10.1 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง YM หรือ MRS (ภาคผนวก ก-2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ (cell number) ที่เจริญขึ้นมา

2.6 การจัดกลุ่มและคัดเลือกแบคทีเรียชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่

ศึกษาลักษณะต่างๆของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนผิวและภายในอาหารวุ้น เช่น รูปร่าง ขนาด สี ความโปร่งแสง ความทึบแสง ลักษณะขอบโคโลนี และลักษณะผิวโคโลนี เป็นต้น นับจำนวนเชื้อที่มีลักษณะเหมือนกันให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน และคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียแต่ละกลุ่มเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดตามวิธีคำนวณในภาคผนวก ง-1 เลือกแบคทีเรียปนเปื้อนกลุ่มที่มีเปอร์เซ็นต์มากที่สุดเป็นประชากรส่วนใหญ่จากกากน้ำตาล

2.7 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่

ทำเช่นเดียวกับการเก็บรักษาเชื้อยีสต์

2.8 การจัดจำแนก (classification) แบคทีเรียปนเปื้อนชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่เบื้องต้น

เลือกแบคทีเรียปนเปื้อนชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่มาทำเชื้อให้บริสุทธิ์ (pure culture) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อเก็บ (pick) เชื้อจากจานเพาะเชื้อมาลากบนอาหารแข็ง YM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีที่แยกเดี่ยวๆ มาลากลงบนอาหารแข็ง YM บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 36 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะรูปร่าง (morphology) ลักษณะสรีรวิทยา (physiology) และทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ซึ่งยึดตามรายงานของ Oliva-Neto และ Yokoya (1994) (Oliva-Neto and Yokoya, 1994) และแนวทางการจัดจำแนกแบคทีเรียจากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 ดังนี้

2.8.1 การย้อมสีแกรม (Gram stain) ตามวิธีของ Hucker (Doetsch , 1981)

เกลี่ย (smear) เชื้อแบคทีเรียบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ นำไปผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง หยดสีแกรมคริสตัลไวโอเล็ต (ภาคผนวก ข-1) ให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อเป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ หยดแกรมไอโอดีน (ภาคผนวก ข-2) ลงให้ท่วมนาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ และล้างสีออกด้วย 95% เอทานอล โดยเอียงสไลด์ให้ 95% เอทานอลไหลผ่าน สังเกตดูสีคริสตัลไวโอเล็ตที่ถูกชะออกมา พอเริ่มจางลง หยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มลงในน้ำ ซับน้ำให้แห้ง ย้อมสีซาฟรานินโอ (ภาคผนวก ข-3) ลงบนเชื้อนาน 20-30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน (oil-immersion objective)

2.8.2 การย้อมสีสปอร์ (endospore stain) ตามวิธีของ Schaeffer และ Fulton (Doetsch , 1981)

เกลี่ยเชื้อแบคทีเรียบนสไลด์ที่สะอาดทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ หยดมาลาไคท์กรีน (malachite green) เข้มข้น 5% (ภาคผนวก ข-4) ให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ใช้ไฟลนใต้สไลด์พอให้เกิดเป็นไอ 1-2 นาที คอยหยดสีเติมลงไปอย่าให้แห้ง ล้างสีออกด้วยน้ำที่ไหลจากก๊อกน้ำ 30 วินาที ย้อมสีทับด้วยสีซาฟรานินโอทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง นำไปตรวจดูสปอร์ด้วยกล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมันจะเห็นสปอร์สีเขียว ส่วนเซลล์ที่เหลือจะติดสีแดง

2.8.3 การทดสอบเอนไซม์คะตาเลส (Smibert and Krieg , 1981)

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3.0% (ภาคผนวก ข-5) ลงบนเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บนสไลด์ที่สะอาด ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าการทดสอบเป็นบวก คือ แบคทีเรียสร้างเอนไซม์คะตาเลสได้

2.8.4 การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (Smibert and Krieg , 1981)

หยดสารละลายเตตตระเมทิล พาราฟีนิล ไดเอมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 1.0 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข-6) ลงบนกระดาษกรองวอทแมน (Whatman) เบอร์ 1 พอหมาดๆ ใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบอายุ 24 ชั่วโมง ขีดบนกระดาษกรองเป็นเส้นยาวประมาณ 1-3 เซนติเมตร สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใน 30 วินาที ถ้าเกิดสีม่วงตามขอบที่ขีดเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ผลการทดสอบเป็นบวก

2.9 การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลในระดับขวดแบบ static culture

2.9.1 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* บนผิวอาหารแข็งลาดเอียง YM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เติมน้ำขจัดไอออนที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ลงไปในอาหารแข็งลาดเอียง 1 หลอด เขย่าให้ยีสต์หลุดกระจายออกมาปิเปตเซลล์แขวนลอยปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสูตร YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุในขวดแก้วรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงในตู้เขย่าแบบหมุน (rotary incubator shaker) ควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง นำไปวิเคราะห์หาน้ำหนักแห้งตามวิธีการวิเคราะห์ข้อ 2.10.2 เพื่อหาเวลาที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid-log phase)

2.9.2 การเตรียมอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอล

นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำที่ขจัดไอออนแล้วในอัตราส่วน 1:1 ปั่นตะกอนออกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที นำกากน้ำตาลที่ได้ไปวิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมดตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.10.4 กากน้ำตาลที่ได้ใช้เตรียมอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอล (ภาคผนวก ก-4)

2.9.3 การหมักเอทานอลในระดับขวด

ถ่ายเชื้อยีสต์ที่เตรียมจากข้อ 2.9.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (10% inoculum) ลงในอาหารกากน้ำตาลที่เตรียมจากข้อ 2.9.2 ปริมาตร 45 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดแก้วทรงกระบอกขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดขวดด้วยกระเปาะแก้ว (แสดงในรูปที่ 2.1) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่เขย่าขวด (static culture) เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ (cell number) แบบ viable plate count โดยวิธี pour plate ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.10.1 และนำสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการปั่นแยกให้เซลล์ตก

ตะกอนด้วยเครื่องหมุนปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.10.3 และ 2.10.4 และวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.10.5

2.9.4 การหมักเอทานอลในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนในระดับขวด

2.9.4.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรีย

เลี้ยงแบคทีเรียปนเปื้อนชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ บนผิวอาหารแข็งลาคเอียง YM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เติมน้ำขจัดไอออนและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในอาหารแข็งลาคเอียง 1 หลอด เขย่าให้แบคทีเรียหลุดกระจายออกมา

2.9.4.2 การหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาลที่เติมแบคทีเรียปนเปื้อน

ปิเปตแบคทีเรียแขวนลอยจากข้อ 2.9.4.1 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหารกากน้ำตาลที่เติมเชื้อยีสต์แล้วในข้อ 2.9.3 และทำการหมักเช่นเดียวกับข้อ 2.9.3

รูปที่ 2.1 ลักษณะขวดหมักเอทานอลและกระเปาะแก้วที่ใช้ในการทดลอง

2.10 วิธีวิเคราะห์

2.10.1 การวัดการเจริญของเซลล์โดยการนับจำนวนเซลล์แบบ viable plate count โดยวิธี pour plate

เลือกตัวอย่างที่มีระดับความเจือจางเหมาะสมมาทำการเพาะเชื้อโดยปิเปตตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ปลอดเชื้อ เทอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตรประมาณ 15-20 มิลลิลิตร ลงในจานเลี้ยงเชื้อนั้น หมุนจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้ตัวอย่างและอาหารผสมเข้าด้วยกันดี ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง โดยคว่ำจานเลี้ยงเชื้อ หลังการบ่มเชื้อแล้วทำการนับจำนวนโคโลนีเฉพาะระดับความเจือจางที่ได้จำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี คำนวณหาจำนวนโคโลนีทั้งหมดต่อ 1 มิลลิลิตรก่อนเจือจาง ถ้าตัวอย่างมียีสต์และแบคทีเรียเจริญอยู่ร่วมกันจะต้องเติมสารละลายแอคติไดโอนให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข-7) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่หลอมเหลวก่อนการเทลงจานเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียเจริญและยับยั้งการเจริญของยีสต์ และเติมสเตรปโตไมซินซัลเฟตให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข-8) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่หลอมเหลวก่อนการเทลงจานเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ยีสต์เจริญและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

2.10.2 การวัดการเจริญของเซลล์โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปิเปตน้ำหมักจากข้อ 2.9.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ไปปั่นแยกเซลล์ให้ตกตะกอนด้วยเครื่องปั่นหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำขจัดไอออน 2 ครั้ง นำเซลล์ที่ได้ใส่ในกระทงอลูมินัมฟอยล์ (aluminum foil) ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์ (desicator) ชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งแบบละเอียด หักน้ำหนักของกระทงอลูมินัมฟอยล์ออก จะได้น้ำหนักเซลล์แห้ง คิดน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เป็นกรัมต่อลิตร

2.10.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้กรดไดไนโตรซาลิไซลิก (Bernfeld , 1955 อ้างถึงใน ยุทธพงษ์ ประถมจินดา)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (ภาคผนวก ข-9) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม ปิดปากหลอดทดลองนำไปต้มในอ่างน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นแช่ในอ่างน้ำเย็น เติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร โดยใช้น้ำขจัด

ไอออนแทนสารละลายตัวอย่างเพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบ คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร จากกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 กรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ค-1)

2.10.4 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายอินเวอร์เทส (ภาคผนวก ข-10) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม นำไปแช่ในอ่างน้ำเย็นควบคุมอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีวิเคราะห์ในข้อ 2.10.3 คำนวณความเข้มข้นของน้ำตาล จากกราฟมาตรฐานของสารละลายน้ำตาลซูโครสในช่วงความเข้มข้น 0-2.0 กรัมต่อลิตร ที่ย่อยด้วยเอนไซม์ตามวิธีข้างต้น (ภาคผนวก ค-2) ค่าการวิเคราะห์ที่ได้จะเป็นปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ และเมื่อนำมาลบด้วยปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะได้เป็นปริมาณน้ำตาลซูโครส

2.10.5 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี

ปิเปตตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการปั่นแยกเอาเซลล์ยีสต์ออกแล้วปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเกลียว เติมสารละลายโพรพานอล (n-propanal) เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ภาคผนวก ข-11) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร เป็นสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard) ผสมให้เข้ากันและฉีดตัวอย่างเข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี 1.0 ไมโครลิตร คำนวณปริมาณเอทานอล จากกราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐานเอทานอลสัมบูรณ์ (ภาคผนวก ข-12 และ ภาคผนวก ค-3) ผลการวิเคราะห์จะบอกปริมาณเอทานอลโดยน้ำหนัก หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี (Chen , 1990)

ชนิดสารที่ใช้บรรจุในคอลัมน์ (column)	:	Porapak® type Q ขนาด 80-100 mesh
ขนาดของคอลัมน์แก้ว	:	เส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 2 มิลลิลิตร ยาว 2 เมตร
อุณหภูมิคอลัมน์	:	190 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิอินเจกเตอร์ (injector)	:	220 องศาเซลเซียส
ดีเทกเตอร์ (detector)	:	FID (flame-ionize detector)
ก๊าซพา (carier gas)	:	ไนโตรเจน
ความดันเกจ (pressure gauge)	:	1.2 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในกากน้ำตาล

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการแยกแบคทีเรีย

แยกแบคทีเรียจากตัวอย่างกากน้ำตาลที่นำมาจากสำนักงานอ้อยและน้ำตาลทรายวังแดงตามวิธีการทดลองข้อ 2.5 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดคืออาหาร YM (ภาคผนวก ก-1) และอาหาร MRS (ภาคผนวก ก-2) ได้ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างกากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่มาของตัวอย่างกากน้ำตาล	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนี/กากน้ำตาล 1 มล.)	
	อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS	อาหารเลี้ยงเชื้อ YM
1. โรงงานกำแพงเพชร	120	660
2. โรงงานมิตรสยาม	30	290
3. โรงงานรวมผลอุตสาหกรรมนครสวรรค์	30	430
4. โรงงานนิวกว้างสุ้นหลี	130	245
5. โรงงานเกษตรไทย	20	185

จากตารางที่ 3.1 พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีธาตุอาหารเหมาะสม (enriched medium) สำหรับการเจริญของแบคทีเรียชนิดสร้างกรดแลกติก มีจุลินทรีย์

เจริญจำนวนน้อยกว่าที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และเมื่อทำการศึกษารูปร่างลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสรีรวิทยาตามวิธีการทดลองข้อ 2.6 และข้อ 2.8 พบว่าแบคทีเรียปนเปื้อนที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มีทั้งชนิดที่เป็นท่อนสร้างสปอร์ และไม่สร้างสปอร์ โดยชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่นั้นเป็นชนิดที่สร้างสปอร์ ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* เช่นเดียวกับผลการศึกษาแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YM ในการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ เนื่องจากแบคทีเรียเจริญบนอาหาร YM ดีกว่า

3.1.2 การแยกแบคทีเรียชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่จากตัวอย่างกากน้ำตาล

แยกแบคทีเรียจากตัวอย่างกากน้ำตาลจากสำนักงานอ้อยและน้ำตาลทรายวังแดง ตามวิธีการทดลองข้อ 2.5 ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.2 และรูปที่ 3.1 พบว่าจุลินทรีย์ปนเปื้อนทั้งหมดที่แยกได้จากกากน้ำตาลในแต่ละแหล่งมีจำนวนประมาณ 10^2 โคโลนีต่อกากน้ำตาล 1 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3.2 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่นับได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM

แหล่งที่มาของตัวอย่างกากน้ำตาล	จำนวนจุลินทรีย์[1] (โคโลนีต่อกากน้ำตาล 1 มิลลิลิตร)	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1. โรงงานเชียงใหม่	3.50×10^3	4.55×10^3
2. โรงงานวนชัยอุตสาหกรรม	4.10×10^2	9.35×10^2
3. โรงงานกำแพงเพชร	7.60×10^2	5.80×10^2
4. โรงงานมิตรสยาม	3.70×10^2	3.50×10^2
5. โรงงานรวมผลอุตสาหกรรมนครสวรรค์	5.60×10^2	5.15×10^2
6. โรงงานเกษตรไทย	5.40×10^2	2.05×10^2
7. โรงงานเกษตรผล	5.70×10^2	5.45×10^2
8. โรงงานนิวกว้างสุ้นหลี	2.45×10^2	3.45×10^2
9. โรงงานชลบุรี	6.00×10^2	4.60×10^2

[1] จำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละครั้งเป็นค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

ตารางที่ 3.3 แบคทีเรียปนเปื้อนกลุ่มที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ที่พบในตัวอย่างกากน้ำตาลจากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่มาของตัวอย่างกากน้ำตาล	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2	
	ลักษณะโคโลนี	เปอร์เซ็นต์ที่พบ	ลักษณะโคโลนี	เปอร์เซ็นต์ที่พบ
1. โรงงานเชียงใหม่	ขาวกลม	33.33%	ขาวจางกลม	38.10%
2. โรงงานวนชัยอุตสาหกรรม	ขาวกลม	30.93%	จุดเล็กมีรัศมี	35.00%
3. โรงงานกำแพงเพชร	เอียง	43.53%	ดาว	42.35%
4. โรงงานมิตรสยาม	จุดเล็กมาก	23.26%	หยักเล็กมีรัศมีเข้ม	20.69%
5. โรงงานรวมผลอุตสาหกรรมนครสวรรค์	จุดเล็กมีรัศมี	24.07%	เอียงเล็ก	27.08%
6. โรงงานเกษตรไทย	ขาวกลม	48.00%	กลมหยักมีรัศมี	31.58%
7. โรงงานเกษตรผล	จุดใหญ่มีรัศมี	30.51%	เอียงหยัก	30.61%
8. โรงงานนิวกว้างสุ้นหลี	กลมหยัก	24.00%	ดาว	28.13%
9. โรงงานชลบุรี	ขาวกลมมีรัศมี	38.60%	ขาวจางกลม	26.53%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.1.3.1 การจัดจำแนก (classification) แบคทีเรียกลุ่มที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในระดับสกุล (genus) เบื้องต้น

คัดเลือกแบคทีเรียปนเปื้อนกลุ่มที่พบซ้ำกันและเป็นประชากรส่วนใหญ่จากตารางที่ 3.3 มาศึกษาลักษณะรูปร่าง ลักษณะสรีรวิทยา และทดสอบทางชีวเคมี โดยใช้หลักวิธีของ Bergey (Sneath et al. , 1986) ตามวิธีการทดลองข้อ 2.8 เพื่อเป็นการจำแนกชนิดของแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในระดับสกุลเบื้องต้น ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 3.4 การจำแนกแบคทีเรียชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่เบื้องต้นในระดับสกุลโดยใช้หลักการของ Bergey เป็นการจัดจำแนกกลุ่มโดยอาศัยข้อแตกต่างที่สำคัญระหว่างแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Lactobacillus* เนื่องจากมีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า แบคทีเรียปนเปื้อนที่ก่อปัญหาในระหว่างการหมักเอทานอล ทำให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลงคือแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* (Essia Ngang , Letourneau , Wolniewicz et al. , 1990 ; Makanjuola et al. , 1992) แบคทีเรียกลุ่มนี้มีรูปร่างเป็นท่อนยาว ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสและเอนไซม์คะตาเลส (Oliva-neto and Yokoya , 1994) จากตารางที่ 3.4 พบว่าแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ที่แยกได้จากตัวอย่างกากน้ำตาลแต่ละแหล่ง มีลักษณะเด่นเหมือนกันคือ มีรูปร่างเป็นท่อน สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก และสร้างเอนไซม์คะตาเลส ดังนั้นจึงไม่จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* แต่สามารถจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* (Sneath et al. , 1986) ได้แก่แบคทีเรีย A , B , D , E และ G สำหรับแบคทีเรีย C และ F ไม่พบการสร้างสปอร์ จึงยังไม่สามารถจัดอยู่ในสกุลใดได้สำหรับการจัดจำแนกเบื้องต้นนี้ สำหรับแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* พบจำนวนน้อยมาก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.4 ลักษณะทางสรีรวิทยาและผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่

ลักษณะโคโลนี	ชื่อ	%ที่พบ	morphology	Gram	spore	oxidase test	catalase test
เอียง	A	43.53%	rod	positive	พบ	weak positive	positive
ดาว	B	42.35%	rod	positive	พบ	negative	positive
ขาวกลมมีรัศมี	C	38.60%	rod	positive	ไม่พบ	negative	positive
ขาวจางกลม	D	38.10%	rod	positive	พบ	weak positive	positive
จุดเล็กมีรัศมี	E	35.00%	rod	positive	พบ	negative	positive
ขาวกลม	F	30.93%	rod	positive	ไม่พบ	negative	positive
จุดใหญ่มีรัศมี	G	30.51%	rod	positive	พบ	negative	positive
เอียงเล็ก	**	27.08%	rod	**	**	**	**

**ไม่สามารถทดสอบได้เนื่องจากเชื้อไม่เจริญภายหลังจากเก็บเชื้อบนอาหาร YM

3.1.3.2 การเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอล

การที่พบแบคทีเรียชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่มีหลายชนิด ดังนั้นจึงต้องคัดเลือกแบคทีเรียปนเปื้อนชนิดที่อาจก่อให้เกิดปัญหารบกวนการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยนำแบคทีเรียปนเปื้อนที่พบเป็นประชากรส่วนใหญ่จากน้ำตาลแหล่งต่าง ๆ กันจากตารางที่ 3.4 มาเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลตามวิธีการทดลองข้อ 2.9.4 แต่ไม่ได้เติมหัวเชื้อยีสต์ลงไป เพื่อต้องการดูว่าแบคทีเรียปนเปื้อนชนิดใดเจริญได้ดีในภาวะเดียวกันกับภาวะสำหรับหมักเอทานอล โดยคาดว่าแบคทีเรียชนิดนั้นน่าจะเป็นสาเหตุในการก่อปัญหารบกวนการหมักเอทานอล จนทำให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ลดต่ำลง ผลการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดแสดงในตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.2 และ 3.3 พบว่าที่ระยะเวลาต่างๆ จำนวนแบคทีเรียบางชนิดเปลี่ยนแปลงน้อยมากจนเกือบมี

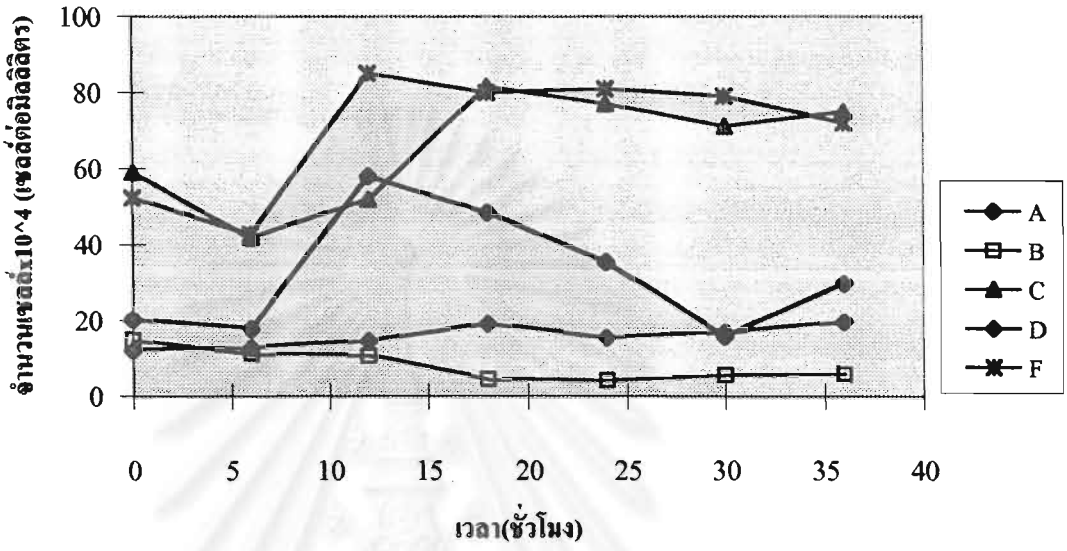
แนวโน้มคงที่ เช่น แบคทีเรีย B และ D และบางชนิดเจริญได้บ้างแต่ก็เข้าสู่ภาวะคงที่ (stationary phase) หรือลดลง (death phase) อย่างรวดเร็ว เช่นแบคทีเรีย A , C , F และ G แสดงว่าแบคทีเรียเจริญได้น้อยในอาหารกากน้ำตาลที่มีองค์ประกอบเช่นเดียวกันกับอาหารที่ใช้ในการหมักเอทานอล แต่ภาวะดังกล่าวก็ไม่สามารถที่จะทำลายแบคทีเรียนั้น แบคทีเรียยังคงมีชีวิตอยู่ โดยสังเกตได้จากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นกับเมื่อเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง มีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้นแบคทีเรีย E เท่านั้นที่ไม่สามารถทนอยู่ในภาวะดังกล่าวนี้ได้จึงมีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็วหลังชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยง

อย่างไรก็ตามแบคทีเรียปนเปื้อนในกากน้ำตาลชนิดที่ก่อปัญหาระหว่างการหมักเอทานอลจะต้องเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ดีใกล้เคียงกับยีสต์ หรือจะต้องเจริญดีกว่ายีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่ใช้สำหรับหมักเอทานอล จึงจะเป็นแบคทีเรียปนเปื้อนที่ก่อให้เกิดปัญหารบกวนการหมักเอทานอลอย่างแท้จริง ดังนั้นจึงทำการทดลองเพื่อหาแบคทีเรียปนเปื้อนที่เจริญได้ดีในอาหารกากน้ำตาลและอาจก่อปัญหารบกวนการหมักเอทานอลต่อไป โดยแยกแบคทีเรียจากน้ำส่าที่หมักเอทานอลด้วยยีสต์

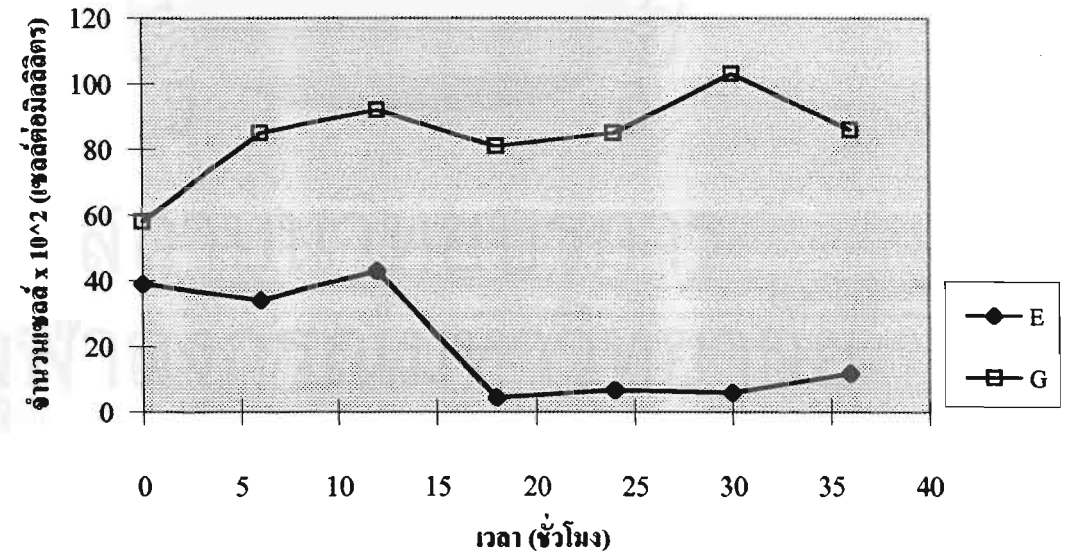
ตารางที่ 3.5 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอลที่ระยะเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)						
	แบคทีเรียA	แบคทีเรียB	แบคทีเรียC	แบคทีเรียD	แบคทีเรียE	แบคทีเรียF	แบคทีเรียG
0	2.04×10^{5}	1.49×10^{5}	5.90×10^{5}	1.23×10^{5}	3.90×10^{3}	5.25×10^{5}	5.80×10^{3}
6	1.81×10^{5}	1.15×10^{5}	4.20×10^{5}	1.31×10^{5}	3.40×10^{3}	4.30×10^{5}	8.50×10^{3}
12	6.60×10^{5}	1.09×10^{5}	5.20×10^{5}	1.48×10^{5}	4.30×10^{3}	8.50×10^{5}	9.20×10^{3}
18	4.85×10^{5}	4.70×10^{4}	8.15×10^{5}	1.93×10^{5}	4.40×10^{2}	8.00×10^{5}	8.10×10^{3}
24	3.55×10^{5}	4.20×10^{4}	7.70×10^{5}	1.57×10^{5}	6.60×10^{2}	8.10×10^{5}	8.50×10^{3}
30	1.62×10^{5}	5.55×10^{4}	7.10×10^{5}	1.71×10^{5}	5.80×10^{2}	7.90×10^{5}	1.03×10^{4}
36	3.65×10^{5}	6.00×10^{4}	7.50×10^{5}	1.98×10^{5}	1.18×10^{3}	7.20×10^{5}	8.60×10^{3}

รูปที่ 3.2[2] จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย A,B,C,D และ F ในระยะเวลาต่างๆของการเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาล



รูปที่ 3.3[2] จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย E และ G ในระยะเวลาต่างๆของการเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาล



[2] จำนวนเซลล์ในรูปที่ 3.2 และ 3.3 มีระดับสเกลที่ 10^4 และ 10^2 ตามลำดับ

3.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปนเปื้อนชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำหมัก

3.2.1 การแยกแบคทีเรียปนเปื้อนจากน้ำหมัก

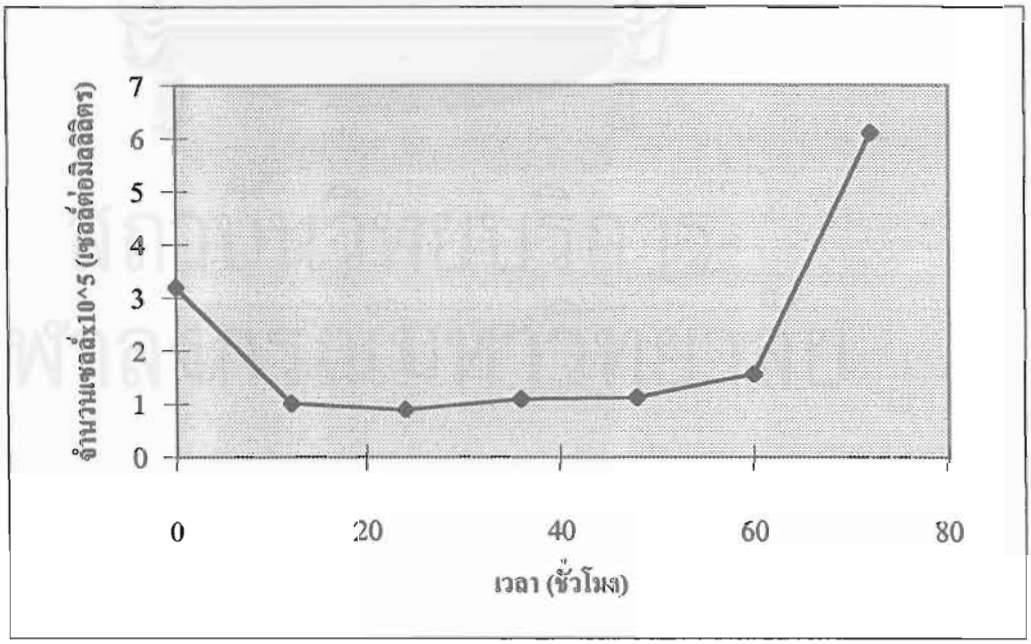
นำน้ำหมักที่ระยะเวลาต่าง ๆ ระหว่างการหมักเอทานอล จากโรงงานสุราของกรมสรรพสามิต มาแยกแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ ตามวิธีการทดลองข้อ 2.5 ได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.6 พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในถังหมักตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมงมีสูงถึง 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในกากน้ำตาลประมาณ 1,000 เท่า (จากผลการทดลองข้อ 3.1.2 ตารางที่ 3.2) แบคทีเรียปนเปื้อนเหล่านี้ส่วนหนึ่งอาจมาจากกากน้ำตาลและน้ำที่ใช้สำหรับเจือจาง และเกิดการสะสมของแบคทีเรียที่ทนแอลกอฮอล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นซึ่งอาจจะกระทบต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ได้ เพราะโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ไม่ได้ทำการฆ่าเชื้ออาหารที่มีกากน้ำตาลที่เป็นวัตถุดิบ และไม่ได้ทำความสะอาดถังหมักให้ปลอดเชื้อก่อนการหมัก จากรูปที่ 3.4 พบว่าในชั่วโมงที่ 0 จำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นจะมีปริมาณสูงแล้วค่อยๆลดจำนวนลง และมาเพิ่มจำนวนอีกในช่วงท้ายของการหมัก โดยเฉพาะชั่วโมงที่ 72 จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเกือบเป็น 2 เท่าตัวจากชั่วโมงที่ 0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่พบในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมักเอทานอล

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด (โคโลนีต่อน้ำหมัก 1 มิลลิลิตร)
0	3.20×10^5
12	1.02×10^5
24	0.90×10^5
36	1.10×10^5
48	1.13×10^5
60	1.57×10^5
72	6.10×10^5

รูปที่ 3.4 จำนวนแบคทีเรียที่พบในน้ำหมักที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของการหมักเอทานอลในโรงงานสุรา



3.2.2 การจัดกลุ่มและคัดเลือกแบคทีเรียชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่

ศึกษาลักษณะต่างๆของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำหมัก เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ตามวิธีการทดลองข้อ 2.6 พบว่าแบคทีเรียที่พบเป็นประชากรส่วนใหญ่ในแต่ละช่วงเวลาจะมีลักษณะแตกต่างกันบ้าง แสดงในตารางที่ 3.7 โดยแบคทีเรียกลุ่ม H เป็นประชากรส่วนใหญ่ในระยะเริ่มต้นของการหมักเอทานอลพบประมาณ 53.13% เมื่อระยะเวลาผ่านไปจะมีแบคทีเรียกลุ่ม I , K และ J เจริญขึ้นมาเป็นประชากรส่วนใหญ่แทน จนถึงระยะสิ้นสุดการหมักชั่วโมงที่ 72 พบแบคทีเรียกลุ่ม J มีจำนวนประมาณ 49.18% จากการศึกษาลักษณะรูปร่างโคโลนีและลักษณะสรีรวิทยาของเซลล์พบว่าแบคทีเรีย I และ J เป็นแบคทีเรียกลุ่มเดียวกัน

ตารางที่ 3.7 แบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ที่พบในระยะเวลาต่าง ๆ ในระหว่างการหมักเอทานอล

เวลา (ชั่วโมง)	ชื่อ	ลักษณะโคโลนี	เปอร์เซนต์ที่พบ	รูปร่าง	แกรม
0	H	ขาวกลม	53.13%	ท่อน	+
	I	กลมหยัก	25.00%	ท่อน	+
	K	เอียงเล็ก	9.38%	ท่อนรูปไข่	+
		อื่นๆ	12.49%	**	**
24	I	กลมหยัก	38.89%	ท่อน	+
	K	เอียงเล็ก	33.33%	ท่อน	+
	H	ขาวกลม	17.78%	ท่อนรูปไข่	+
		อื่นๆ	10.00%	**	**
48	K	เอียงเล็ก	33.63%	ท่อนรูปไข่	+
	I	กลมหยัก	23.89%	ท่อน	+
	H	ขาวกลม	21.24%	ท่อน	+
		อื่นๆ	14.16%	**	**
72	J	กลมหยัก	49.18%	ท่อน	+
	H	ขาวกลม	24.59	ท่อน	+
	K	เอียงเล็ก	16.39%	ท่อนรูปไข่	+
		อื่นๆ	9.84%	**	**

** ไม่ได้ทดสอบ

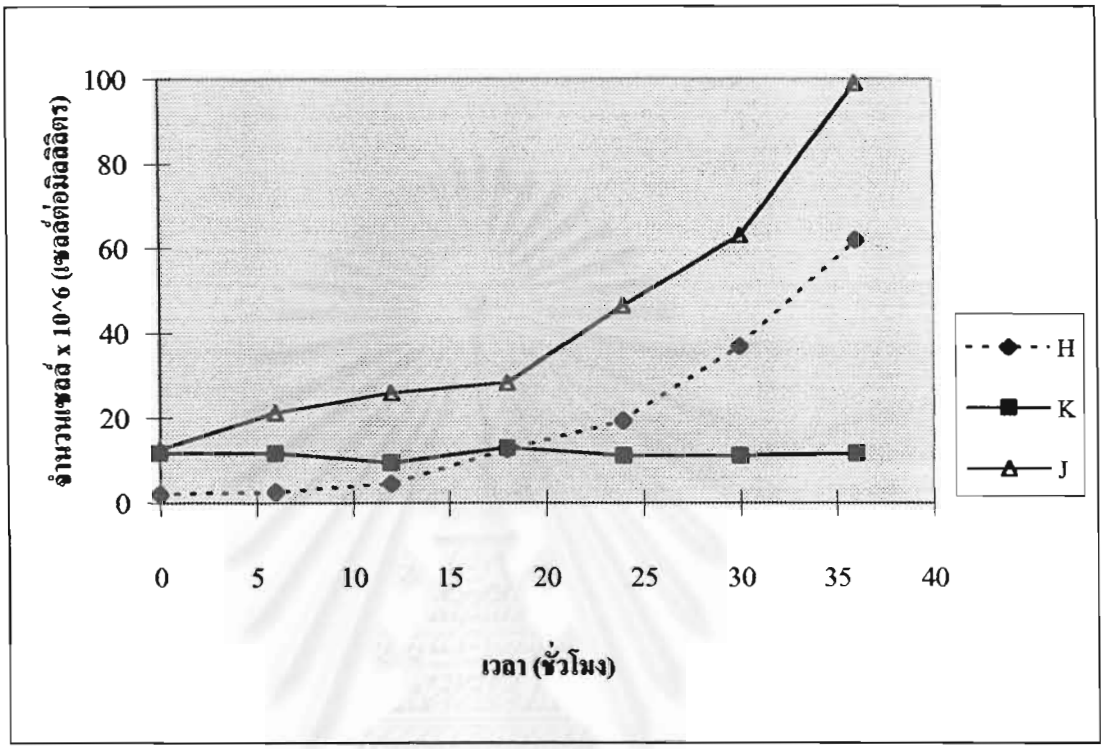
3.2.3 การเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในน้ำหมัก

นำแบคทีเรียปนเปื้อนชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ ที่พบในระหว่างการหมักเอทานอลจำนวน 3 เชื้อ คือแบคทีเรีย H , K และ J จากตารางที่ 3.7 มาเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาล ตามวิธีการทดลองที่ 2.9.4 แต่ไม่ต้องเติมหัวเชื้อยีสต์ลงไป เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิด ได้ผลแสดงในตารางที่ 3.8 และรูปที่ 3.5 พบว่าแบคทีเรียปนเปื้อน H และ J เจริญได้ดีในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอล ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดปัญหารบกวนการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยเฉพาะแบคทีเรีย J ที่พบจำนวนมากและเป็นประชากรส่วนใหญ่ในช่วงท้ายของการหมัก (ตารางที่ 3.7) ส่วนแบคทีเรีย K ไม่เพิ่มจำนวนแต่ยังคงมีชีวิตอยู่

ตารางที่ 3.8 จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอลที่ระยะเวลาต่างๆ

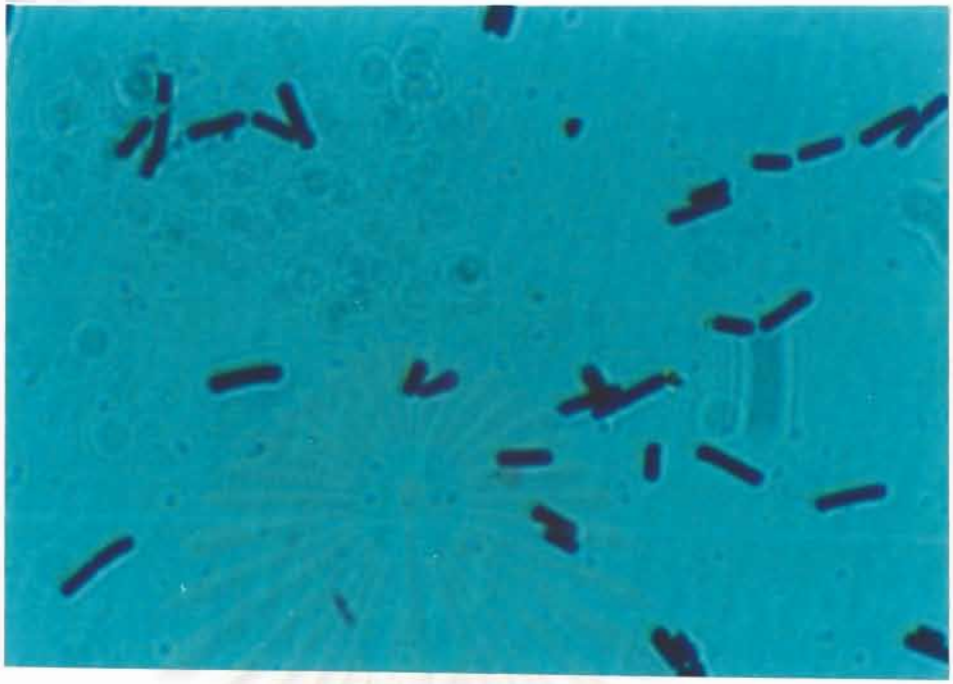
เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		
	แบคทีเรีย H	แบคทีเรีย K	แบคทีเรีย J
0	2.07×10^{6}	1.18×10^{7}	1.26×10^{7}
6	2.65×10^{6}	1.18×10^{7}	2.13×10^{7}
12	4.65×10^{6}	9.55×10^{6}	2.60×10^{7}
18	1.26×10^{7}	1.30×10^{7}	2.83×10^{7}
24	1.94×10^{7}	1.11×10^{7}	4.65×10^{7}
30	3.70×10^{7}	1.12×10^{7}	6.30×10^{7}
36	6.20×10^{7}	1.16×10^{7}	9.90×10^{7}

รูปที่ 3.5 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย H , J และ K ในระยะเวลาต่างๆของการเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาล

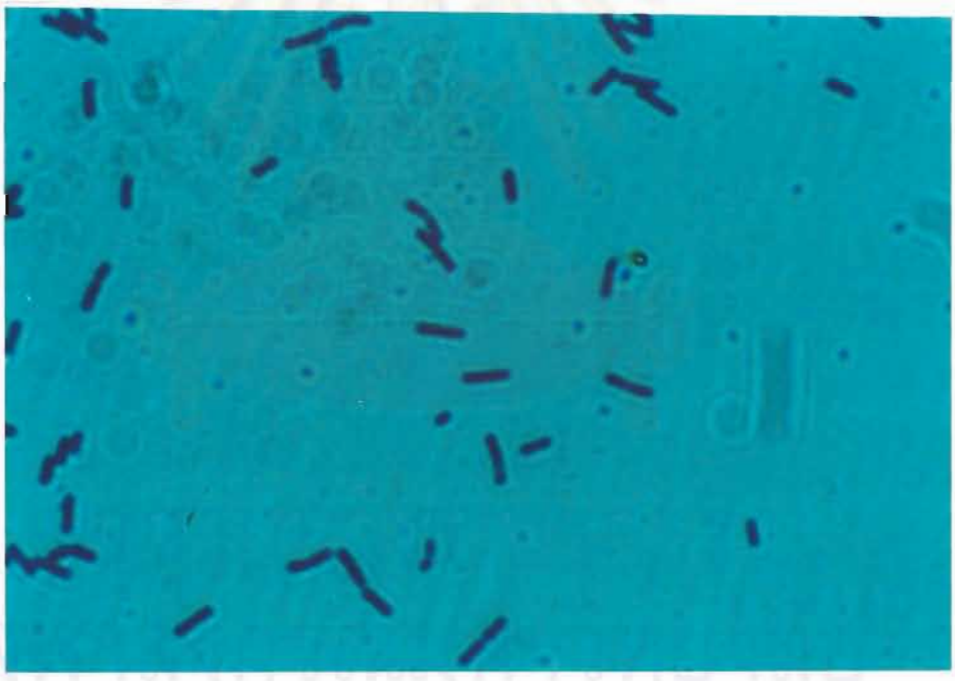


3.2.4 การจัดจำแนกสกุลแบคทีเรีย H และ J ที่เป็นประชากรส่วนใหญ่จากน้ำหมักเบื้องต้น

ดำเนินการจัดจำแนกแบคทีเรีย H และ J ซึ่งเจริญได้ดีในอาหารกากน้ำตาลตามวิธีทดลองข้อ 2.8 พบว่าแบคทีเรีย H และ J (แสดงในรูปที่ 3.6) มีลักษณะคล้ายกันคือ ไม่พบการสร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลสและเอนไซม์ออกซิเดส ลักษณะดังกล่าวนี้สามารถจัดแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้เหมือนกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*



(ก)



(ข)

รูปที่ 3.6 ลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย H (ก) และ แบคทีเรีย J (ข) จากภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.3 ศึกษาภาวะการเจริญร่วมกันของยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรียปนเปื้อนชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในระหว่างการหมักเอทานอล

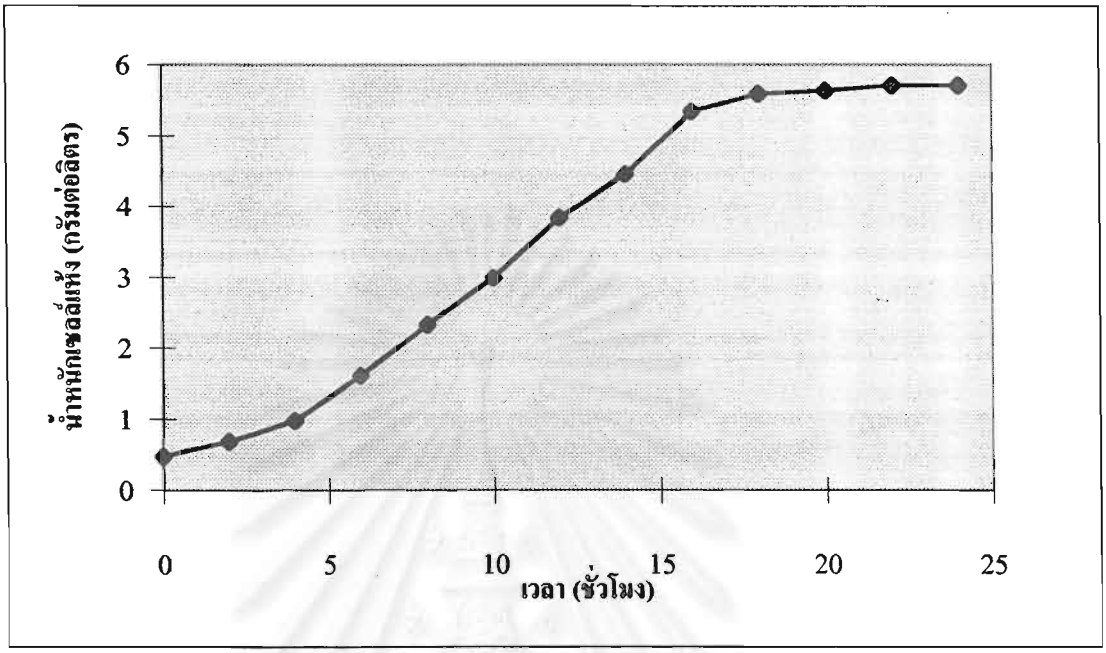
3.3.1 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นของยีสต์ *S. cerevisiae*

เลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อ ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.9.1 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษาลักษณะการเจริญโดยวิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้งตามวิธีวิเคราะห์ข้อ 2.10.2 ได้ผลแสดงในตารางที่ 3.9 และรูปที่ 3.7 พบว่าระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid-log phase) อยู่ที่ชั่วโมงที่ 10

ตารางที่ 3.9 น้ำหนกเซลล์แห้งของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
0	0.48
2	0.69
4	0.98
6	1.62
8	2.33
10	3.00
12	3.84
14	4.46
16	5.34
18	5.59
20	5.63
22	5.71
24	5.71

รูปที่ 3.7 การเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลวสำหรับเตรียมหัวเชื้อที่ระยะเวลาต่างๆ



3.3.2 การคัดเลือกสูตรอาหารสำหรับหมักเอทานอล

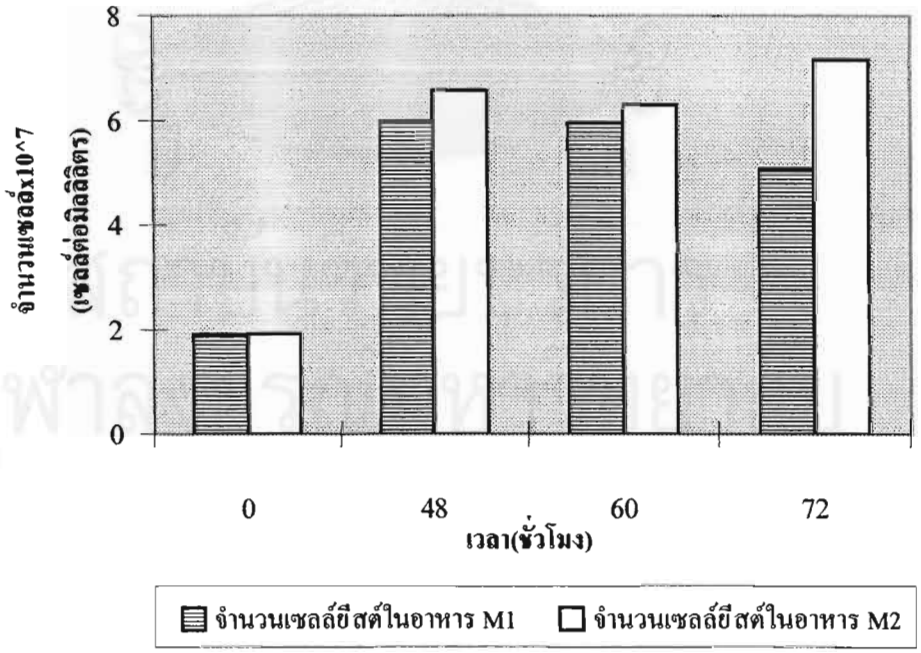
สูตรอาหารสำหรับหมักเอทานอลที่มีผู้รายงานไว้มีความหลากหลาย ในงานวิจัยนี้ได้คัดเลือกสูตรอาหาร 2 ชนิด โดยกำหนดสัญลักษณ์ M1 และ M2 (ภาคผนวก ก-3 และ ก-4) ทดสอบการหมักเอทานอลในอาหารทั้ง 2 ชนิด ตามวิธีการทดลองข้อ 2.9 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากอาหารแต่ละสูตร ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.10 รูปที่ 3.8 และ 3.9 พบว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* เจริญได้ดีและผลิตเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลสูตร M2 สูงกว่าอาหารกากน้ำตาลสูตร M1 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงคัดเลือกสูตรอาหาร M2 เป็นอาหารสำหรับหมักเอทานอล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

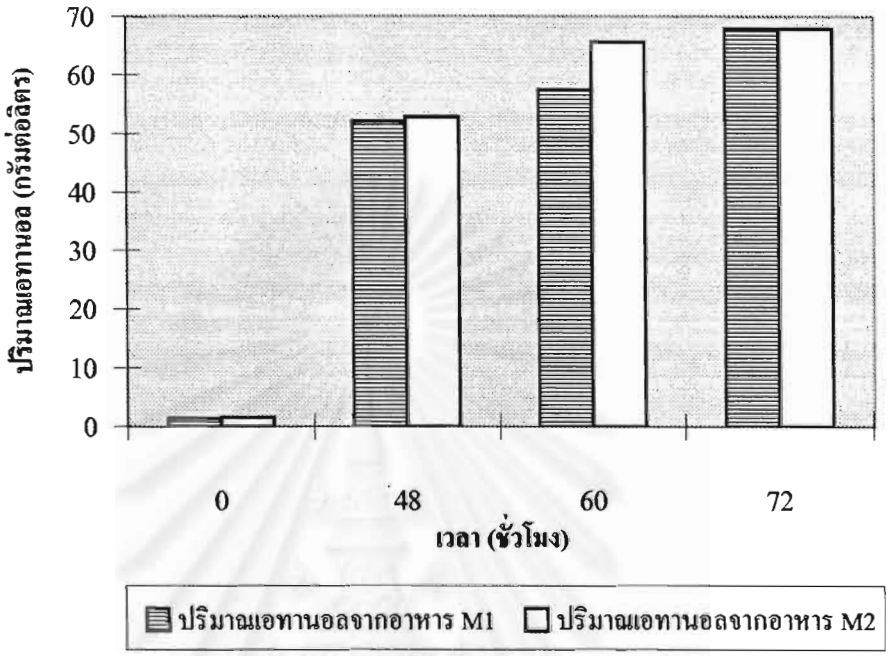
ตารางที่ 3.10 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ และปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้โดยเชื้อ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาล M1 และ M2 ที่ระยะเวลา 0 , 48 , 60 และ 72 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	
	อาหาร M1	อาหาร M2	อาหาร M1	อาหาร M2
0	1.91×10^7	1.92×10^7	1.373	1.569
48	5.98×10^7	6.58×10^7	52.157	52.863
60	5.95×10^7	6.30×10^7	57.529	65.686
72	5.08×10^7	7.17×10^7	67.882	67.922

รูปที่ 3.8 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ยีสต์ *S.cerevisiae* ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาล M1 และ M2 ที่ระยะเวลาต่างๆ



รูปที่ 3.9 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาล M1 และ M2 ที่ระยะเวลาต่างๆ



3.3.3 การหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในภาวะที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย H และ J

คัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ที่พบในน้ำหมัก จากการทดลองที่ 3.2.3 คือ แบคทีเรีย H และ J มาทดลองเลี้ยงร่วมกับยีสต์ *S. cerevisiae* ในระหว่างการหมักเอทานอลตามวิธีการทดลองข้อ 2.9 เปรียบเทียบว่าแบคทีเรียชนิดใด ที่เป็นสาเหตุทำให้การผลิตเอทานอลลดต่ำลง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.11 และ 3.12 และ รูปที่ 3.10 และ 3.11 พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากภาวะที่มีการเติมแบคทีเรีย H และ J ลงไปปนกับยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเพื่อผลิตเอทานอลนั้นมีปริมาณใกล้เคียงกันมากที่เวลา 60 ชั่วโมง คือภาวะที่มีการเติมแบคทีเรีย H ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้ 61.667 กรัมต่อลิตร และภาวะที่มีการเติมแบคทีเรีย J ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ 61.944 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับภาวะควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียลงไปด้วยคือ 61.587 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาปริมาณแบคทีเรียที่เจริญในระหว่างการผลิตเอทานอล พบว่าแบคทีเรีย J เจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย H จึงเลือกแบคทีเรีย Jเป็นตัวอย่างในการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงต่างๆในระหว่างการหมักเอทานอลที่มีแบคทีเรียการปนเปื้อนของแบคทีเรียต่อไป

ตารางที่ 3.11 เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ยีสต์*S. cerevisiae* จำนวนเซลล์แบคทีเรีย H และ J ที่ระยะเวลาต่างๆในระหว่างการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมแบคทีเรียลงไป

เวลา (ชั่วโมง)	ภาวะควบคุม	ภาวะที่เติมแบคทีเรีย H		ภาวะที่เติมแบคทีเรีย J	
	จำนวนเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนแบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)
0	2.19×10^{7}	1.89×10^{7}	1.53×10^{6}	2.02×10^{7}	1.82×10^{6}
6	4.15×10^{7}	4.17×10^{7}	2.84×10^{6}	3.90×10^{7}	3.33×10^{6}
12	4.25×10^{7}	4.50×10^{7}	5.25×10^{6}	5.08×10^{7}	5.50×10^{6}
18	4.55×10^{7}	4.90×10^{7}	1.10×10^{7}	5.40×10^{7}	7.65×10^{6}
24	5.80×10^{7}	6.35×10^{7}	3.39×10^{7}	4.90×10^{7}	2.48×10^{7}
30	5.45×10^{7}	7.25×10^{7}	4.40×10^{7}	4.30×10^{7}	4.55×10^{7}
36	4.15×10^{7}	1.08×10^{8}	5.65×10^{7}	4.30×10^{7}	8.60×10^{7}
42	4.20×10^{7}	8.3×10^{7}	7.08×10^{7}	7.50×10^{7}	1.27×10^{8}
48	4.30×10^{7}	6.20×10^{7}	1.23×10^{8}	6.08×10^{7}	1.62×10^{8}
60	5.10×10^{7}	4.65×10^{7}	1.50×10^{8}	6.33×10^{7}	1.78×10^{8}

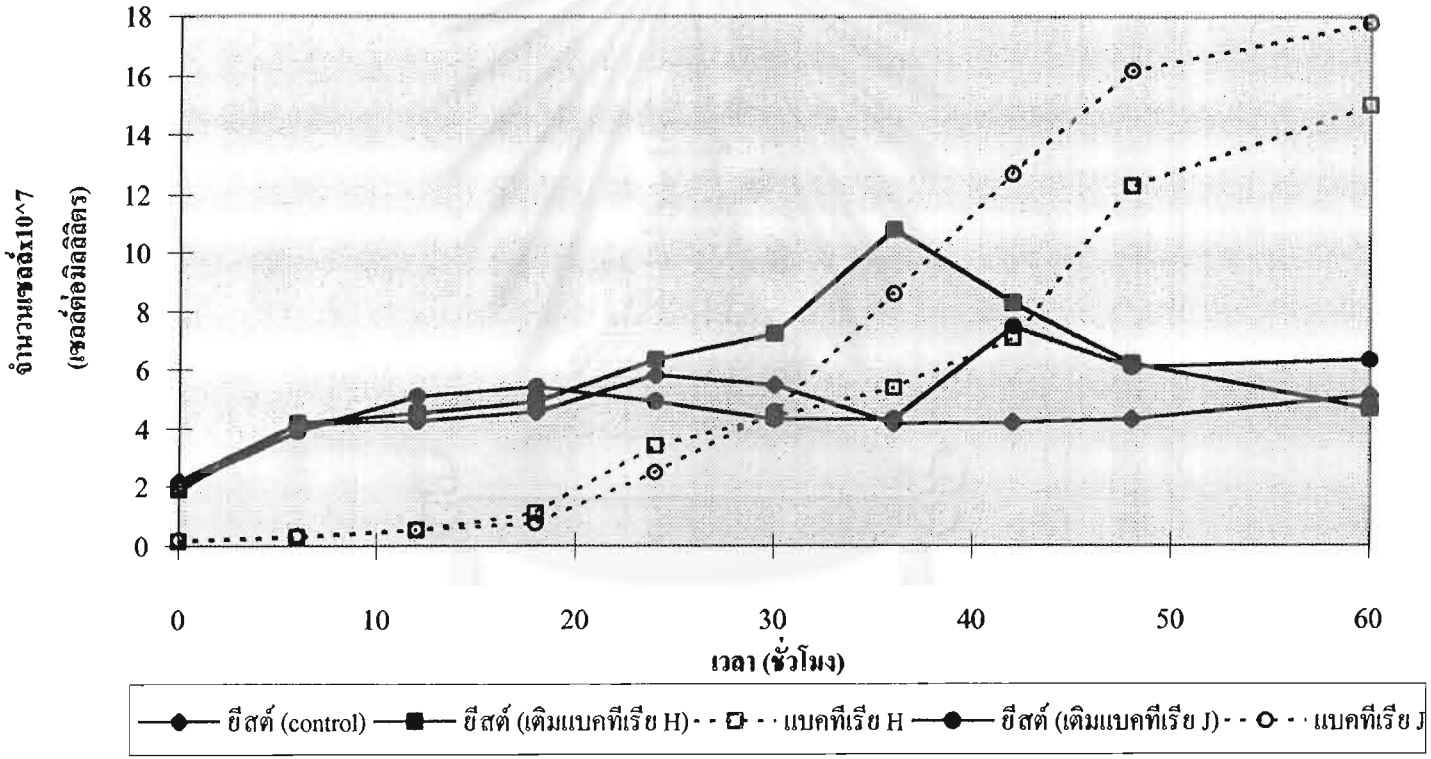
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.12 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตโดยเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ระยะเวลาต่างๆ ในระหว่างการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมแบคทีเรียลงไป

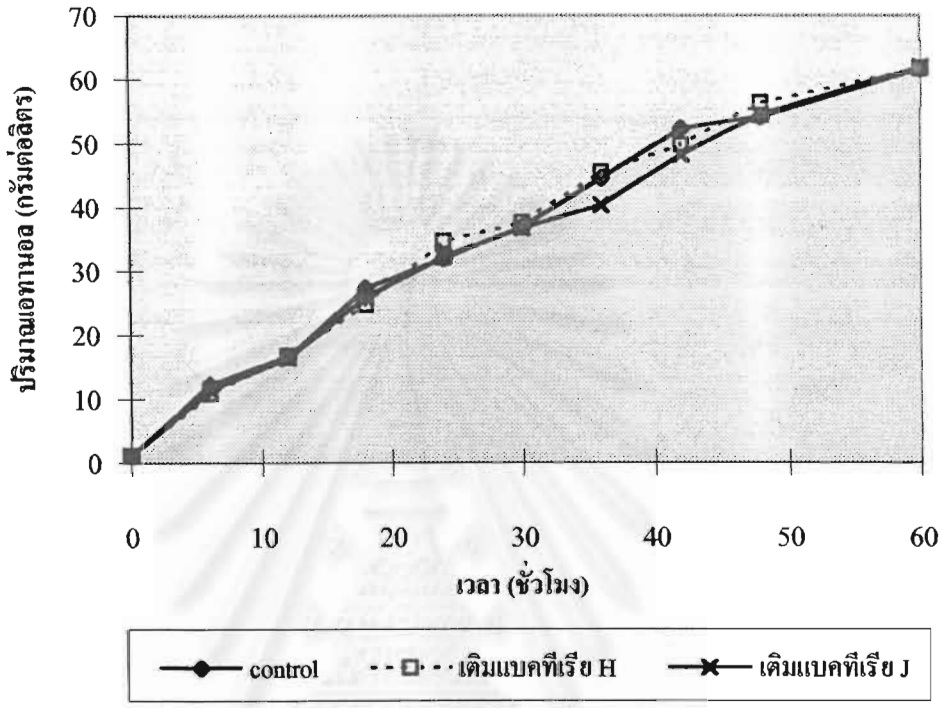
เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		
	ภาวะควบคุม	ภาวะที่เติมแบคทีเรีย H	ภาวะที่เติมแบคทีเรีย J
0	1.151	1.151	1.250
6	12.341	10.913	11.508
12	16.627	16.746	16.250
18	27.341	24.802	25.952
24	32.024	34.643	32.222
30	36.905	37.579	36.746
36	44.563	45.476	40.357
42	52.262	49.683	48.214
48	54.087	56.270	54.484
60	61.587	61.667	61.944

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.10 จำนวนเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* จำนวนเซลล์แบคทีเรีย H และ J ที่ระยะเวลาต่างๆในระหว่างการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมแบคทีเรียลงไป



รูปที่ 3.11 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตโดยเชื้อ *S. cerevisiae* ที่ระยะเวลาต่างๆในระหว่างการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีการเติมแบคทีเรียลงไป



3.3.4 ศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นที่มีต่อค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการหมักเอทานอลแบบไม่ต่อเนื่องในระดับขวดโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย J

สำหรับงานวิจัยนี้ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรีย J ซึ่งเป็นแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในน้ำหมักจากการทดลองที่ 3.3.3 มาเป็นตัวอย่างในการศึกษาภาวะการเจริญร่วมกันของยีสต์และแบคทีเรียในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกันว่ามีผลต่อระบบการหมักเอทานอลอย่างไร โดยพิจารณาจากค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการหมัก คือ อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* อัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย J และอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งจะทำให้เราทราบการเปลี่ยนแปลงต่างๆที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมัก เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนากระบวนการหมักเอทานอลให้มีประสิทธิภาพต่อไป ปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (batch fermentation) คือความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น เพราะการหมักแบบไม่ต่อเนื่องเป็น

ระบบที่มีปริมาณสารอาหารจำกัด ดังนั้นความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นในการหมักเอทานอลย่อมมีต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์

3.3.4.1 ศึกษาความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้น ที่มีต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* และการเจริญของแบคทีเรีย J

การทดลองนี้จึงทำการเจือจางกากน้ำตาลให้มีความเข้มข้นเริ่มต้นเป็น 60 , 120 , 180 และ 220 กรัมต่อลิตร แล้วทำการหมักเอทานอลโดยมีการเติมแบคทีเรีย J ลงไปในอาหารกากน้ำตาลพร้อมกับหัวเชื้อยีสต์ ตามวิธีการทดลองข้อ 2.9 แบคทีเรีย J ที่เติมลงไปนั้นอยู่ในสภาพของแบคทีเรียแขวนลอยตามวิธีการทดลองข้อ 2.9.4.1 เนื่องจากต้องการให้เกิดภาวะใกล้เคียงกับภาวะเป็นจริงที่แบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ในระบบการหมัก จึงไม่ต้องเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียให้เจริญเต็มที่ก่อนทำการหมักร่วมกับยีสต์ ปริมาณเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรีย J กำหนดไว้ประมาณ 1.5×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพราะมีงานวิจัยของ Essia Ngang และคณะ (1990) รายงานว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* จำนวนมากเกิน 10^{4} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขึ้นไปจะทำให้การเจริญและการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* จากกากน้ำตาลบีท (beet molasses) ลดลง (Essia Ngang , Letourneuau , Wolniewicz et al. , 1990) การทดลองหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ ได้ผลแสดงดังนี้

<u>การหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร</u>

จากตารางที่ 3.13 , 3.14 และรูปที่ 3.12 , 3.13 พบว่าภาวะการหมักเอทานอลที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนนั้น ยีสต์สามารถเจริญได้ใกล้เคียงกันกับยีสต์ในภาวะการหมักที่ไม่มีแบคทีเรีย J (ภาวะควบคุม) โดยยีสต์ผลิตเอทานอลได้สูงอย่างรวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมง ในทั้ง 2 ภาวะ คือในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนผลิตได้ 25.666 กรัมต่อลิตร และภาวะควบคุมผลิตได้ 27.550 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะต่างกันคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เท่ากับ 6.84% แต่หลังจากนั้นการผลิตเอทานอลของยีสต์ในทั้ง 2 ภาวะจะเข้าสู่ภาวะคงที่ อาจเนื่องจากน้ำตาลเริ่มหมด ปริมาณเอทานอลที่ผลิตโดยยีสต์ในการหมักที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย J จะน้อยกว่าในภาวะควบคุม อาจเป็นเพราะน้ำตาลมีปริมาณน้อยแบคทีเรีย J กับยีสต์ที่เจริญร่วมกันจึงแย่งกันใช้น้ำตาล โดยที่แบคทีเรีย J เจริญเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ทำให้ยีสต์ในภาวะที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย J มีน้ำตาลเหลือน้อยสำหรับใช้ในการผลิตเอทานอล ยีสต์จึงผลิตเอทานอลได้ลดลง โดยที่แบคทีเรีย J ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ พบว่าแบคทีเรีย J ที่เลี้ยงในภาวะที่ไม่ได้เจริญร่วมกับยีสต์ ใช้น้ำตาลรีดิวซ์

สำหรับการเจริญเท่านั้น เพราะชั่วโมงที่ 0 อาหารกากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 58.496 กรัมต่อลิตร และมีน้ำตาลรีดิวซ์ 23.226 กรัมต่อลิตร แสดงว่ามีน้ำตาลซูโครสที่ย่อยแล้วในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 35.270 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อสิ้นสุดการหมักมีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ 47.362 กรัมต่อลิตร เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 11.571 กรัมต่อลิตร เพราะฉะนั้นมีน้ำตาลซูโครสในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์เหลืออยู่ประมาณ 35.791 แสดงว่าแบคทีเรีย J ใช้น้ำตาลทั้งหมดไป 11.134 กรัมต่อลิตรซึ่งใกล้เคียงกับน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงไป 11.655 กรัมต่อลิตร ส่วนการหมักเอทานอลในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนนั้น แบคทีเรีย J ในภาวะที่ปนอยู่กับยีสต์สามารถเจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย J ในภาวะที่ไม่ได้อยู่ร่วมกับยีสต์ โดยเมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าแบคทีเรีย J ที่เจริญปนกับยีสต์มีจำนวนสูงถึง 3.35×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่แบคทีเรียที่ไม่ได้เจริญปนกับยีสต์มีจำนวนน้อยกว่าประมาณ 1 เท่า คือ 1.55×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรเท่านั้น ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตรมีปริมาณน้อย และแบคทีเรีย J ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ ดังนั้นแบคทีเรีย J ที่เลี้ยงในที่ไม่ได้เลี้ยงร่วมกับยีสต์จึงเจริญได้น้อย แต่แบคทีเรีย J ที่อยู่ร่วมกับยีสต์สามารถใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดจากกากย่อยน้ำตาลซูโครสโดยยีสต์ เพราะยีสต์สร้างเอนไซม์อินเวอร์เทสได้ แบคทีเรียจึงมีโอกาสใช้น้ำตาลรีดิวซ์สำหรับการเจริญได้มากกว่า นอกจากนี้แบคทีเรียอาจได้รับสารบางอย่างที่ยีสต์สร้างออกมาระหว่างการหมักเอทานอล และสารนั้นส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย J ให้แบคทีเรีย J เจริญได้ดีขึ้น สำหรับน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อน และภาวะควบคุมมีค่าใกล้เคียงกัน คือ 4.214 กรัมต่อลิตร และ 4.693 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำมาวิเคราะห์หาน้ำตาลรีดิวซ์แล้วมีค่าเท่ากับ 4.728 กรัมต่อลิตร และ 5.068 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงว่าเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ยีสต์และแบคทีเรียนำไปใช้ไม่ได้ (unfermentable sugar)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.13 จำนวนเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	control(y)[3]	mix[4]	control(b)[5]	mix
0	2.83×10^{7}	2.85×10^{7}	1.20×10^{7}	1.74×10^{7}
12	7.80×10^{7}	8.25×10^{7}	1.28×10^{8}	1.11×10^{8}
24	1.11×10^{8}	8.30×10^{7}	1.51×10^{8}	3.49×10^{8}
36	9.65×10^{7}	9.00×10^{7}	1.90×10^{8}	3.70×10^{8}
48	8.93×10^{7}	8.90×10^{7}	2.06×10^{8}	3.48×10^{8}
72	8.05×10^{7}	8.88×10^{7}	1.55×10^{8}	3.35×10^{8}

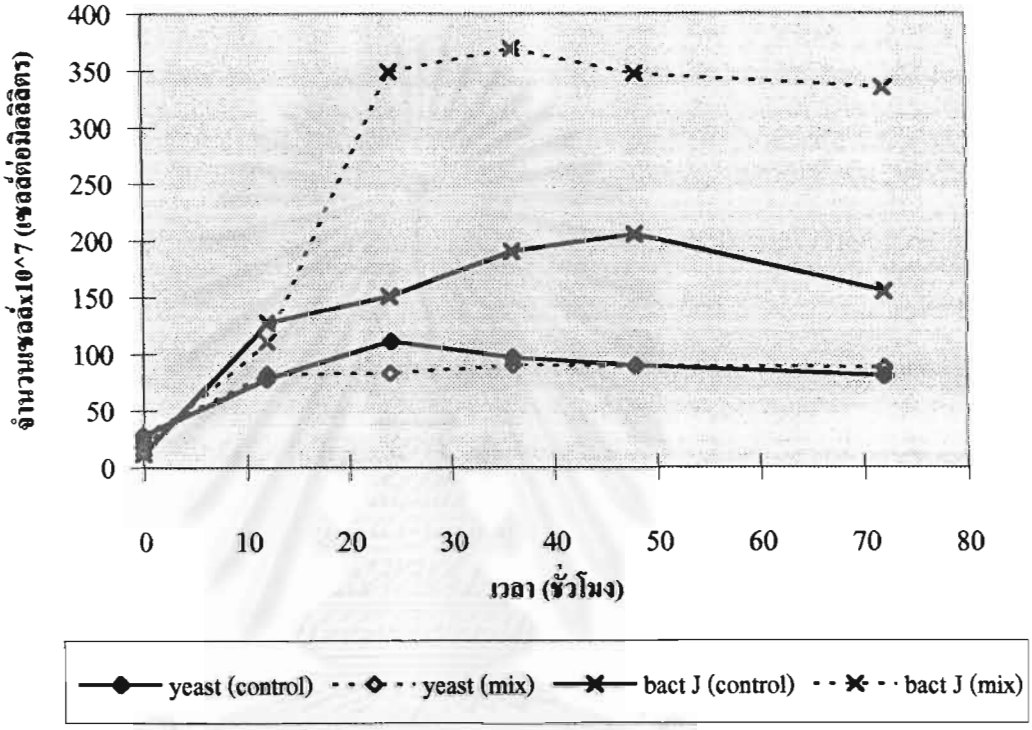
ตารางที่ 3.14 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม

เวลา ชั่วโมง	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		
	control(y)	mix	control(y)	mix	control(b)	control(y)	mix	control(b)
0	1.025	1.025	58.496	58.496	58.496	23.226	23.226	23.226
12	23.268	18.861	10.706	10.791	54.813	ND	ND	ND
24	27.550	25.666	5.310	4.848	49.675	ND	ND	ND
36	26.161	25.100	4.796	4.796	49.503	ND	ND	ND
48	27.104	25.836	4.728	4.454	48.732	ND	ND	ND
72	26.672	24.587	4.693	4.214	47.362	5.065	4.730	11.571

หมายเหตุ control(y)[3] การหมักเอทานอลที่ไม่เติมแบคทีเรีย J mix[4] การหมักเอทานอลที่เติมแบคทีเรีย J

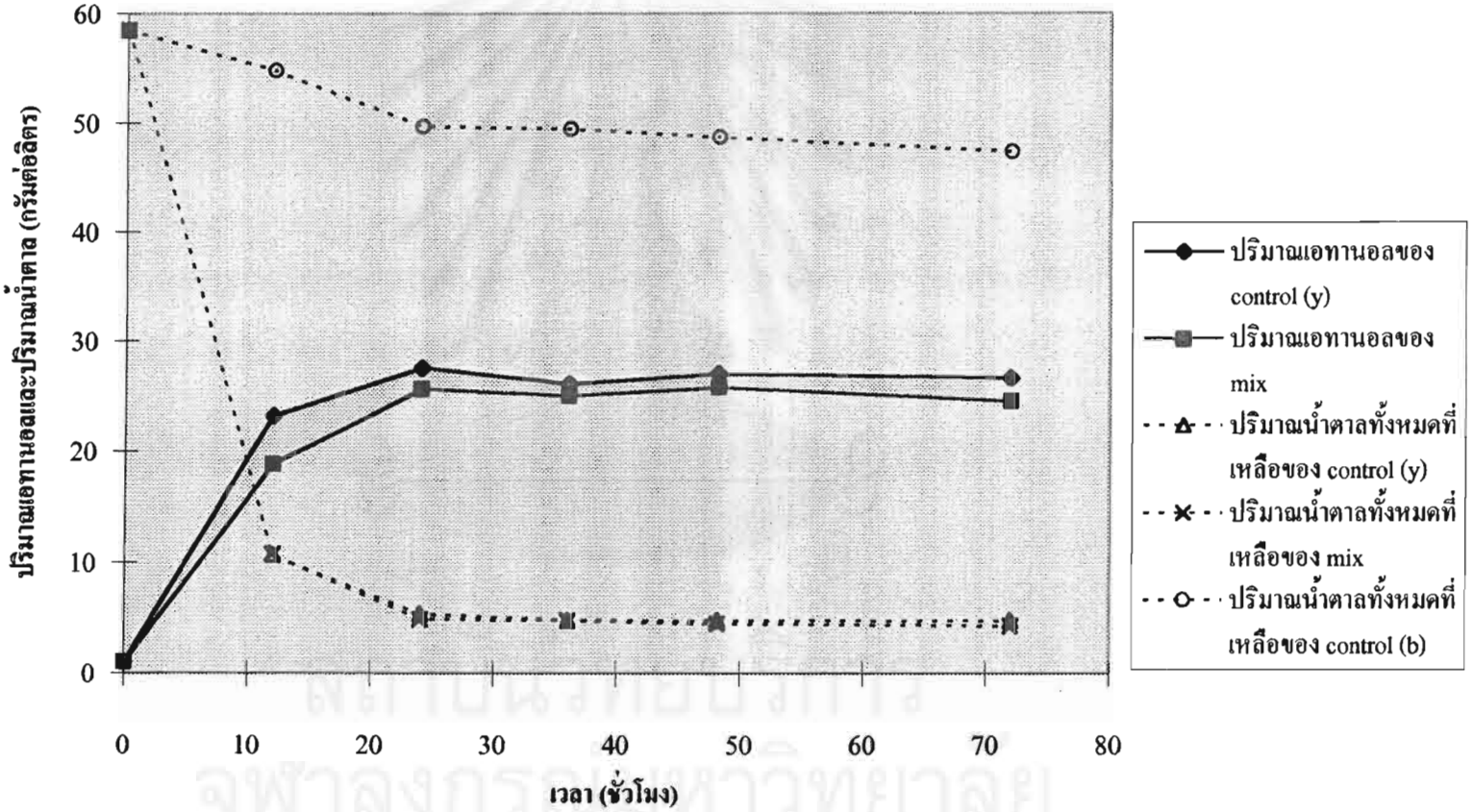
control(b)[5] การเลี้ยงแบคทีเรีย J ที่ไม่เติมยีสต์ ND ไม่ได้ตรวจวัด

รูปที่ 3.12 เปรียบเทียบจำนวนยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อน และภาวะควบคุม



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.13 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม



<u>การหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร</u>

จากตารางที่ 3.15 , 3.16 และรูปที่ 3.14 , 3.15 พบว่าการเจริญของยีสต์ในภาวะการหมักเอทานอลที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนจะลดลงเล็กน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญของยีสต์ในภาวะควบคุม สำหรับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนจะต่ำกว่าที่ผลิตได้จากภาวะควบคุม โดยในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนและภาวะควบคุมยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 45.834 กรัมต่อลิตร และ 51.783 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งต่างกัน 11.49% หลังจากชั่วโมงที่ 36 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ในทั้ง 2 ภาวะ จะเริ่มคงที่ จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในภาวะที่เลี้ยงแบคทีเรียโดยไม่มีเชื้อยีสต์พบว่ามีน้ำตาลทั้งหมดในตอนเริ่มต้นพบว่ามีปริมาณ 116.478 กรัมต่อลิตร ประกอบด้วยน้ำตาลรีดิวซ์ 46.453 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ 70.025 กรัมต่อลิตร สุดท้ายเหลือน้ำตาลทั้งหมด 92.497 กรัมต่อลิตร เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 23.649 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลซูโครสในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ 68.848 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับปริมาณน้ำตาลซูโครสเริ่มต้น แสดงว่าแบคทีเรีย J ใช้น้ำตาลรีดิวซ์สำหรับการเจริญไปประมาณ 22.804 กรัมต่อลิตร ภาวะการหมักเอทานอลที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย J มีน้ำตาลทั้งหมดเหลืออยู่ 9.935 กรัมต่อลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับภาวะควบคุมที่เหลืออยู่ 8.907 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลที่เหลืออยู่นี้เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ยีสต์และแบคทีเรียนำไปใช้ไม่ได้ สำหรับการเจริญของแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรีย J เจริญได้ดีในภาวะที่อยู่ร่วมกับยีสต์ โดยเจริญอย่างรวดเร็วเพิ่มจำนวนสูงถึง 7.00×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ 72 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าจำนวนแบคทีเรียในภาวะที่ไม่ได้อยู่ร่วมกับยีสต์เป็น 2 เท่า แสดงว่าแบคทีเรีย J ที่เจริญปนเปื้อนกับยีสต์ ใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยโดยยีสต์มาใช้ในการเจริญเพิ่มขึ้นทำให้ยีสต์มีน้ำตาลสำหรับผลิตเอทานอลน้อยลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

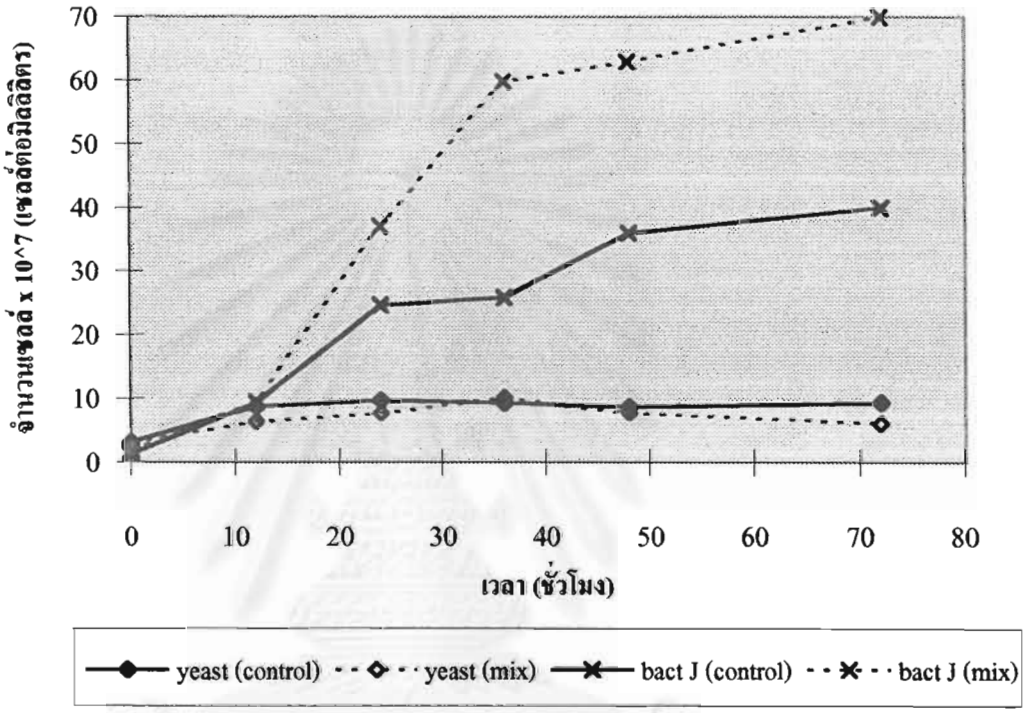
ตารางที่ 3.15 จำนวนเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	control(y)	mix	control(b)	mix
0	3.10×10^{7}	3.10×10^{7}	1.28×10^{7}	1.78×10^{7}
12	8.78×10^{7}	6.30×10^{7}	9.35×10^{7}	9.50×10^{7}
24	9.68×10^{7}	7.70×10^{7}	2.46×10^{8}	3.70×10^{8}
36	9.27×10^{7}	1.01×10^{8}	2.58×10^{8}	5.98×10^{8}
48	8.70×10^{7}	7.75×10^{7}	3.60×10^{8}	6.30×10^{8}
72	9.33×10^{7}	6.05×10^{7}	4.00×10^{8}	7.00×10^{8}

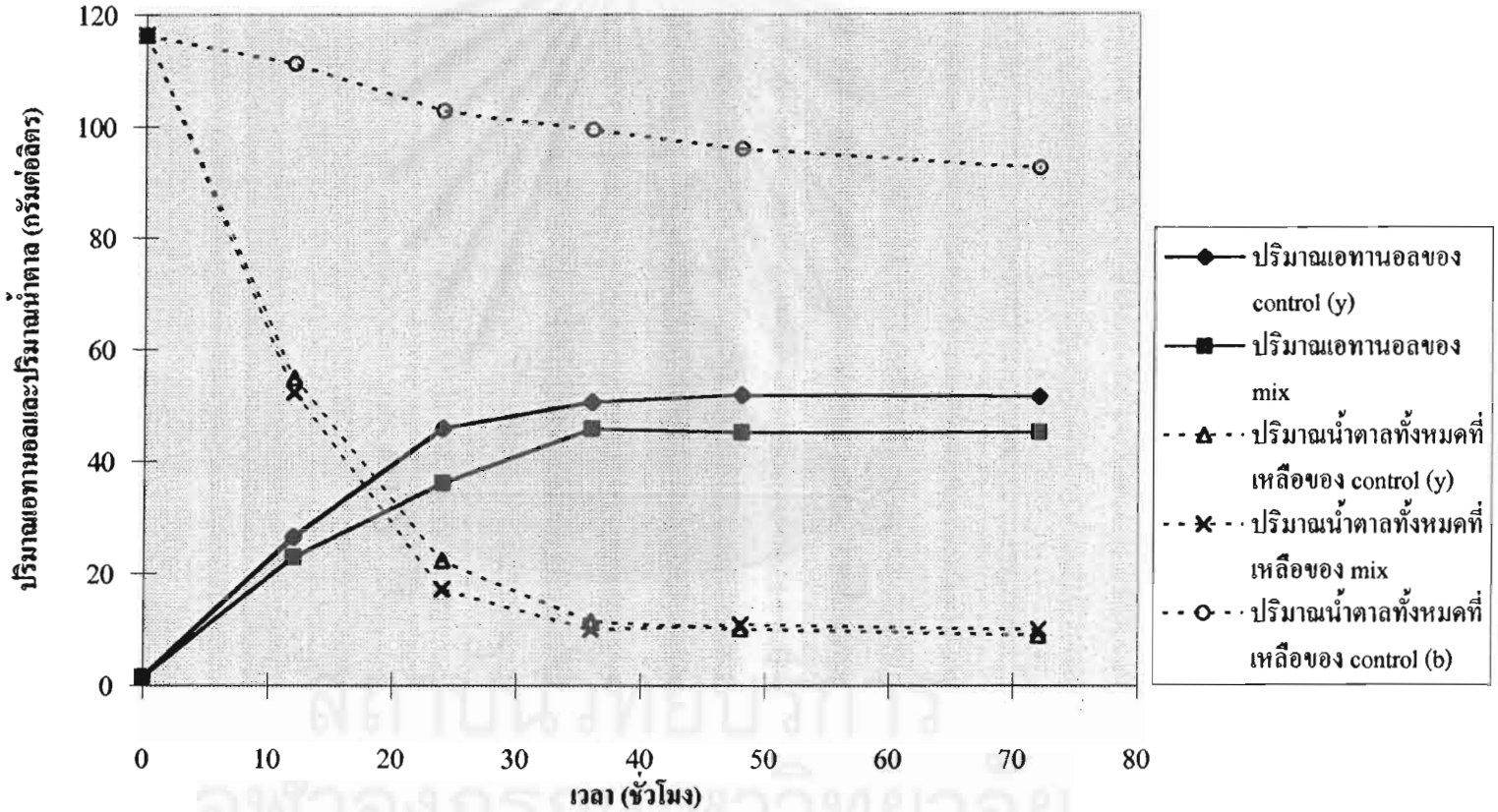
ตารางที่ 3.16 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม

เวลา ชั่วโมง	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		
	control(y)	mix	control(y)	mix	control(b)	control(y)	mix	control(b)
0	1.552	1.552	116.478	116.478	116.478	46.453	46.453	46.453
12	26.544	22.896	54.813	52.244	111.340	ND	ND	ND
24	45.884	36.062	22.268	17.129	102.775	ND	ND	ND
36	50.589	45.834	11.374	9.935	99.349	ND	ND	ND
48	51.783	45.174	10.003	10.791	95.923	ND	ND	ND
72	51.528	45.199	8.907	9.935	92.497	9.628	10.262	23.649

รูปที่ 3.14 เปรียบเทียบจำนวนยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม



รูปที่ 3.15 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม



การหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร

จากตารางที่ 3.17 , 3.18 และรูปที่ 3.16 , 3.17 พบว่าการเจริญของยีสต์ในภาวะการหมักเอทานอลแบคทีเรีย J ปนเปื้อนนั้นจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ที่เจริญในภาวะควบคุม แบคทีเรีย J เจริญได้ดีในภาวะที่อยู่ร่วมกับยีสต์ โดยในระยะสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง มีจำนวนเกือบเป็น 2 เท่าของแบคทีเรียที่เจริญในภาวะที่ไม่มียีสต์ คือ 6.05×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และ 3.60×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือจากภาวะการหมักที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนพบว่าเหลืออยู่ 19.442 กรัมต่อลิตร ซึ่งเหลือน้อยกว่าในภาวะควบคุมที่เหลืออยู่ 43.680 กรัมต่อลิตร น้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่นี้พบว่าเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ เพราะจากการวิเคราะห์หาน้ำตาลทั้งหมดและน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือจากการหมักมีค่าใกล้เคียงกัน ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในภาวะการหมักเอทานอลที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย J น้อยกว่าน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ในภาวะควบคุมเพราะน้ำตาลทั้งหมดที่หายไปนั้นส่วนหนึ่งอาจถูกแบคทีเรีย J นำไปใช้ในการเจริญในรูปของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เกิดจากการย่อยโดยยีสต์ และส่วนหนึ่งถูกยีสต์นำไปใช้ในการเจริญและผลิตเอทานอล เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณเอทานอลที่ถูกสร้างขึ้นที่ระยะสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง ในภาวะการหมักที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน และไม่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนเท่ากับ 69.191 กรัมต่อลิตร และ 67.701 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงว่าแบคทีเรีย J ไม่ได้รบกวนการผลิตเอทานอลของยีสต์ ทั้งนี้เป็นเพราะน้ำตาลมีมากพอที่ยีสต์จะนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลและแบคทีเรียจะนำไปใช้ในการเจริญขณะที่จุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดเจริญร่วมกัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

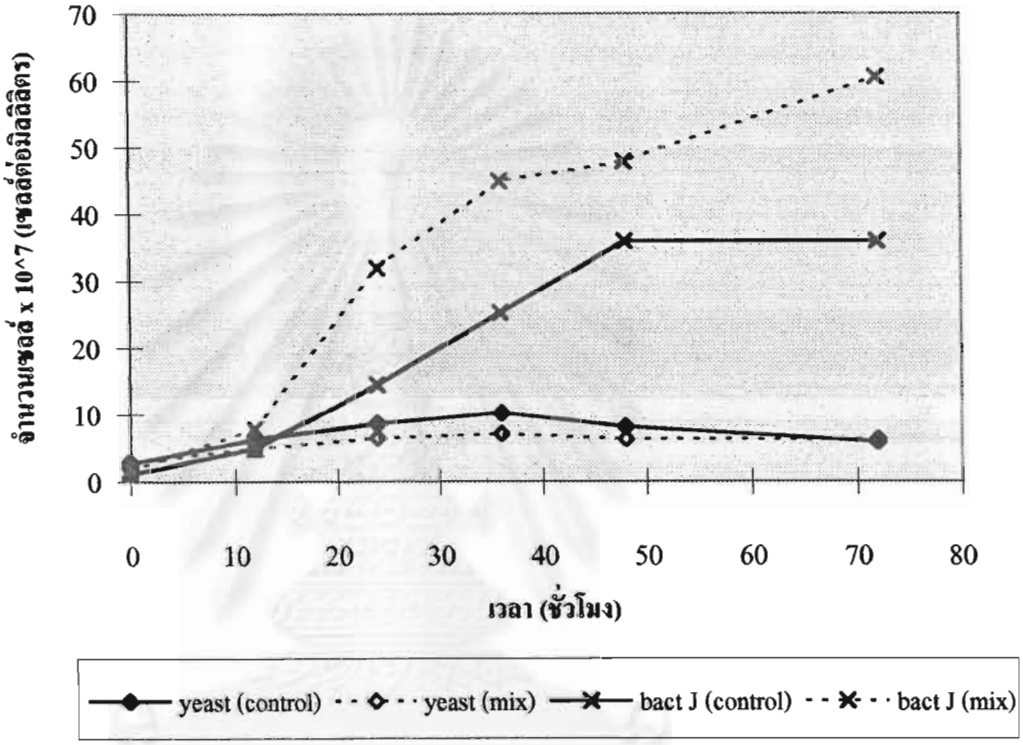
ตารางที่ 3.17 จำนวนเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	control(y)	mix	control(b)	mix
0	2.74×10^{7}	2.94×10^{7}	1.11×10^{7}	1.70×10^{7}
12	6.25×10^{7}	4.95×10^{7}	4.93×10^{7}	7.90×10^{7}
24	8.70×10^{7}	6.50×10^{7}	1.45×10^{8}	3.20×10^{8}
36	1.03×10^{8}	7.17×10^{7}	2.53×10^{8}	4.50×10^{8}
48	8.20×10^{7}	6.40×10^{7}	3.60×10^{8}	4.80×10^{8}
72	5.85×10^{7}	6.25×10^{7}	3.60×10^{8}	6.05×10^{8}

ตารางที่ 3.18 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม

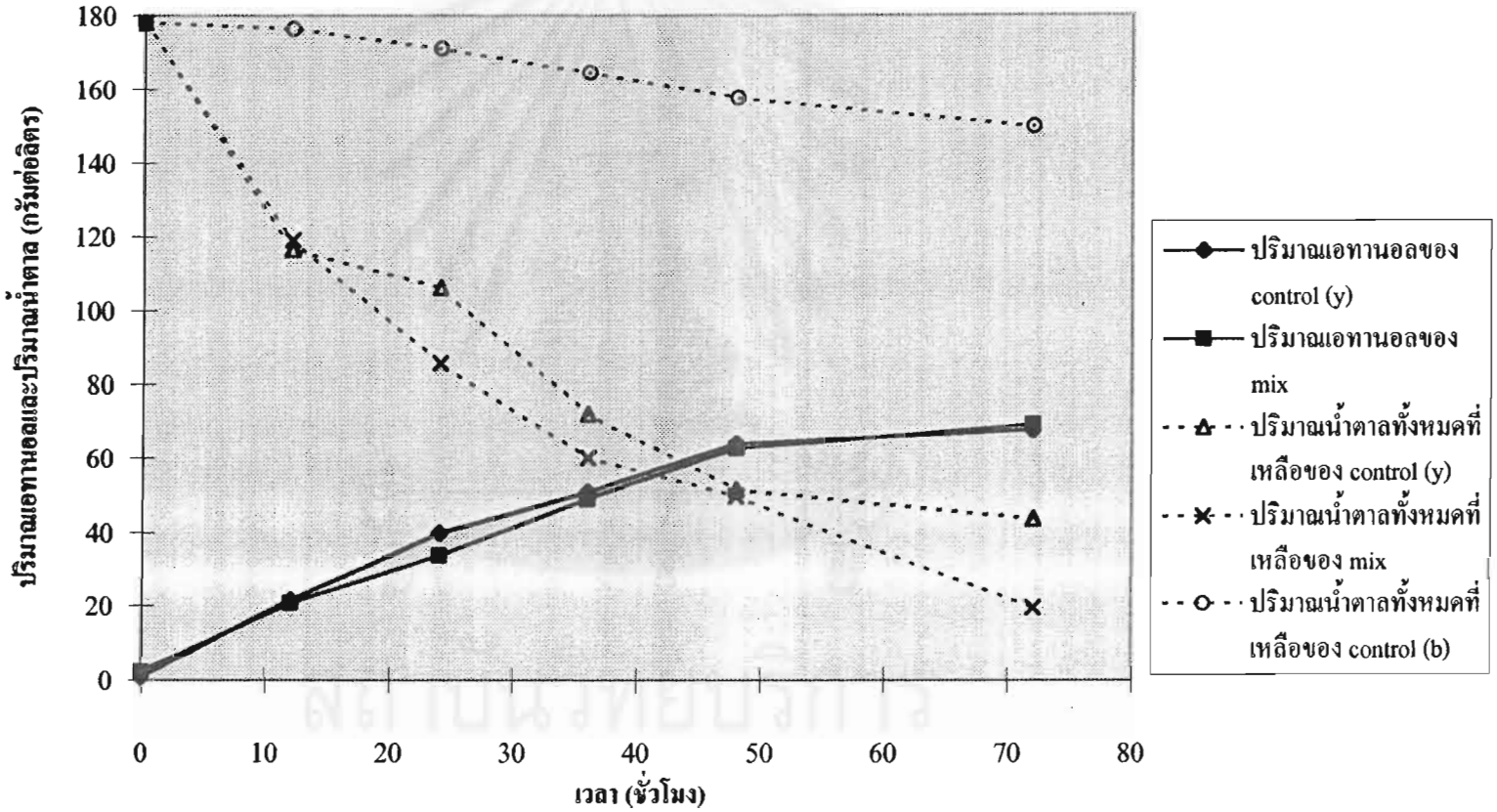
เวลา ชั่วโมง	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		
	control(y)	mix	control(y)	mix	control(b)	control(y)	mix	control(b)
0	0.975	2.187	178.143	178.143	178.143	72.635	72.635	72.635
12	21.560	20.639	116.478	119.048	176.430	ND	ND	ND
24	39.844	33.861	106.201	85.646	171.292	ND	ND	ND
36	50.685	49.039	71.942	59.952	164.440	ND	ND	ND
48	63.911	62.693	51.387	49.675	157.588	ND	ND	ND
72	67.701	69.191	43.680	19.442	149.880	43.919	22.804	43.750

รูปที่ 3.16 เปรียบเทียบจำนวนยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.17 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม



การหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร

จากตารางที่ 3.19 , 3.20 และรูปที่ 3.18 , 3.19 พบว่ายีสต์ในภาวะที่มีแบคทีเรีย J และภาวะควบคุมจะเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ใกล้เคียงกัน และพบว่าแบคทีเรีย J ในภาวะที่เจริญร่วมกับยีสต์มีการเพิ่มจำนวนมากกว่าแบคทีเรีย J ที่ไม่ได้เจริญร่วมกับยีสต์เพียงเล็กน้อยเท่านั้นแม้ว่าจะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพียงพอ ซึ่งจะแตกต่างกับการหมักที่ความเข้มข้น 60 , 120 , 180 กรัมต่อลิตร ที่แบคทีเรีย J ที่ปนเปื้อนอยู่กับยีสต์จะเพิ่มจำนวนมากเกือบเป็น 2 เท่าของแบคทีเรียที่ไม่ได้อยู่ร่วมกับยีสต์ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของน้ำตาลสูงมากจึงมีผลกระทบต่อแบคทีเรียเพราะแบคทีเรียเจริญได้ไม่ดีในภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (Tammarate , Taguchi and Kishimoto , 1987) เป็นผลให้เมื่อสิ้นสุดการหมักมีจำนวนแบคทีเรีย J 3.80×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับจำนวนแบคทีเรีย J ที่ไม่ได้อยู่ร่วมกับยีสต์ คือ 3.33×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมงพบว่าภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนยีสต์ผลิตเอทานอลได้ 73.087 กรัมต่อลิตร และภาวะควบคุมยีสต์ผลิตเอทานอลได้ 75.498 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่ต่างกันมากนักและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่จากภาวะการหมักที่มีและไม่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนมีค่าใกล้เคียงกันคือ 51.387 กรัมต่อลิตร และ 60.380 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงว่าในภาวะการหมักที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนมีน้ำตาลมากเกินพอที่ยีสต์จะใช้ในการเจริญและผลิตเอทานอลอย่างเต็มที่ และยังพอสำหรับใช้ในการเจริญของแบคทีเรีย J โดยไม่ได้ทำให้การผลิตเอทานอลลดลง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

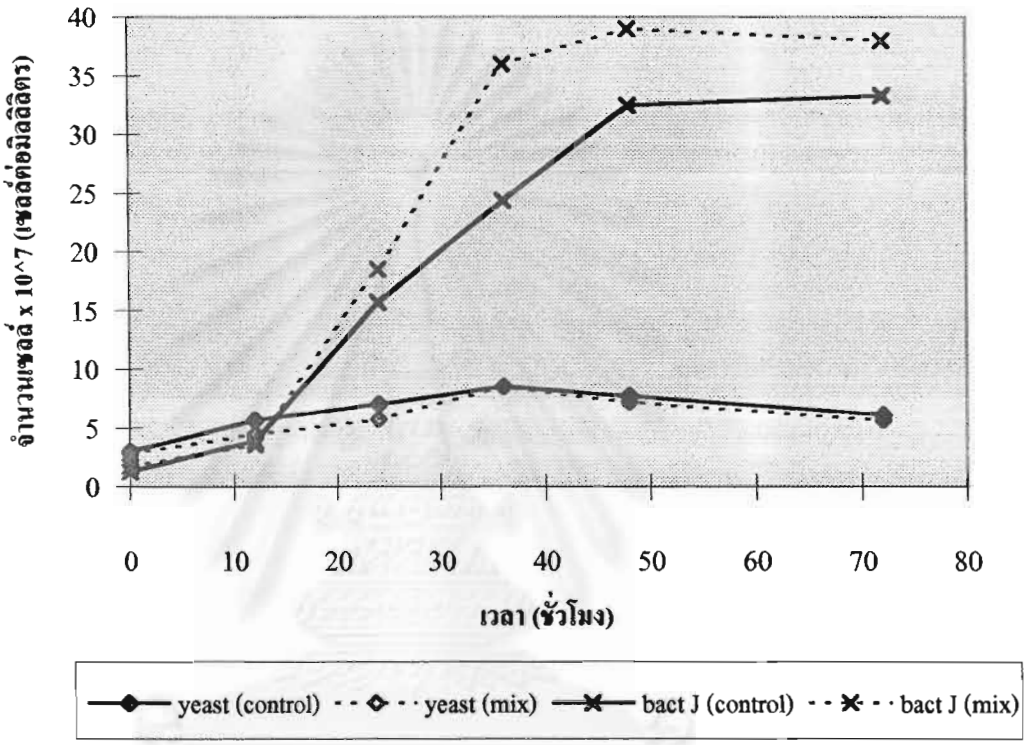
ตารางที่ 3.19 จำนวนเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม

เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)		จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	control(y)	mix	control(b)	mix
0	3.00×10^{7}	2.80×10^{7}	1.27×10^{7}	1.74×10^{7}
12	5.65×10^{7}	4.50×10^{7}	3.90×10^{7}	3.58×10^{7}
24	7.03×10^{7}	5.75×10^{7}	1.57×10^{8}	1.85×10^{8}
36	8.50×10^{7}	8.50×10^{7}	2.44×10^{8}	3.60×10^{8}
48	7.70×10^{7}	7.20×10^{7}	3.25×10^{8}	3.90×10^{8}
72	6.10×10^{7}	5.65×10^{7}	3.33×10^{8}	3.80×10^{8}

ตารางที่ 3.20 ปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เติมแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม

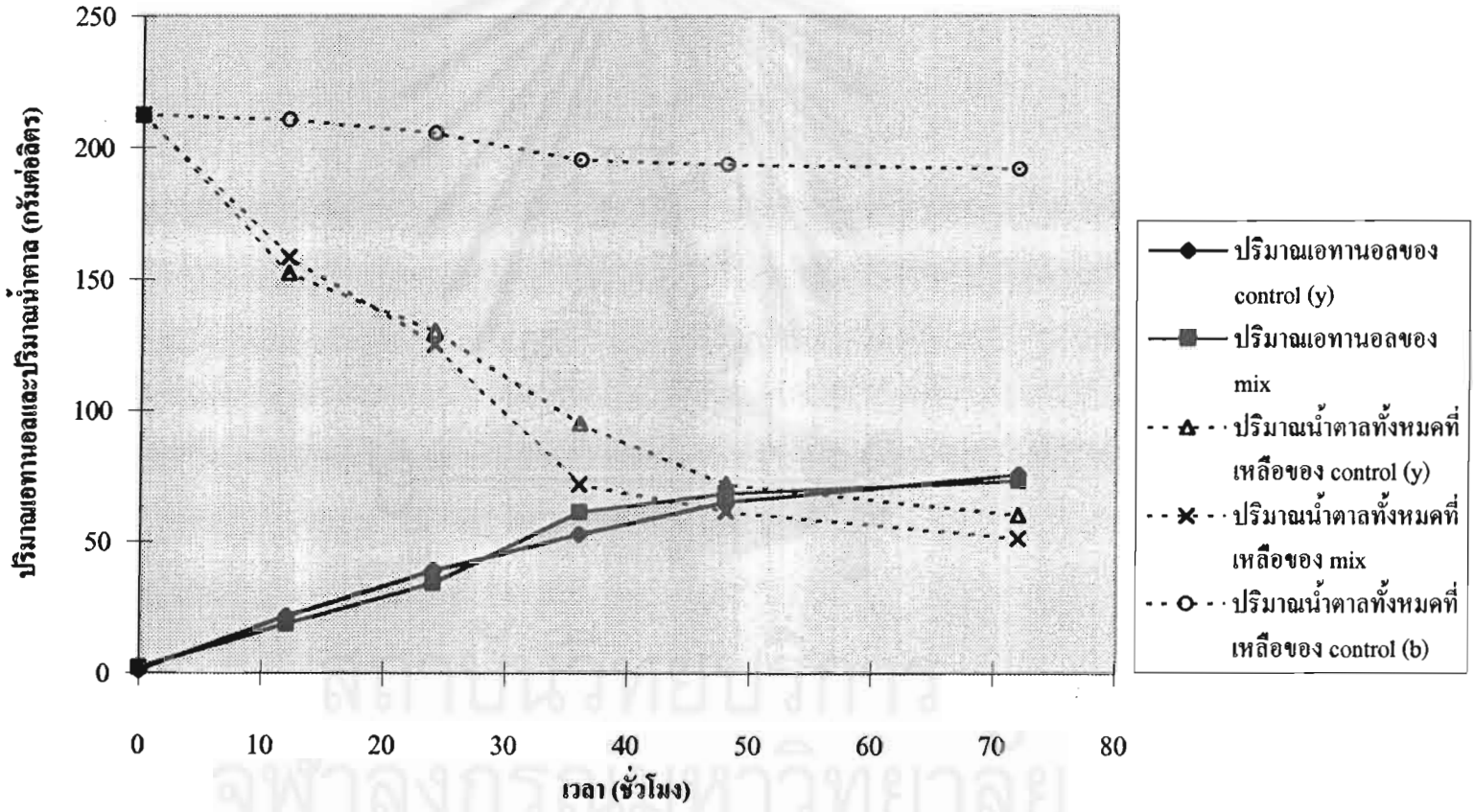
เวลา ชั่วโมง	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)		ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)		
	control(y)	mix	control(y)	mix	control(b)	control(y)	mix	control(b)
0	1.133	2.195	212.402	212.402	212.402	89.527	89.527	89.527
12	21.384	18.504	152.450	158.445	210.689	ND	ND	ND
24	38.797	34.019	130.182	125.043	205.550	ND	ND	ND
36	52.726	61.382	95.067	71.942	195.272	ND	ND	ND
48	65.234	68.407	71.942	61.665	193.560	ND	ND	ND
72	75.498	73.087	60.380	51.387	191.847	65.456	54.899	64.189

รูปที่ 3.18 เปรียบเทียบจำนวนยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

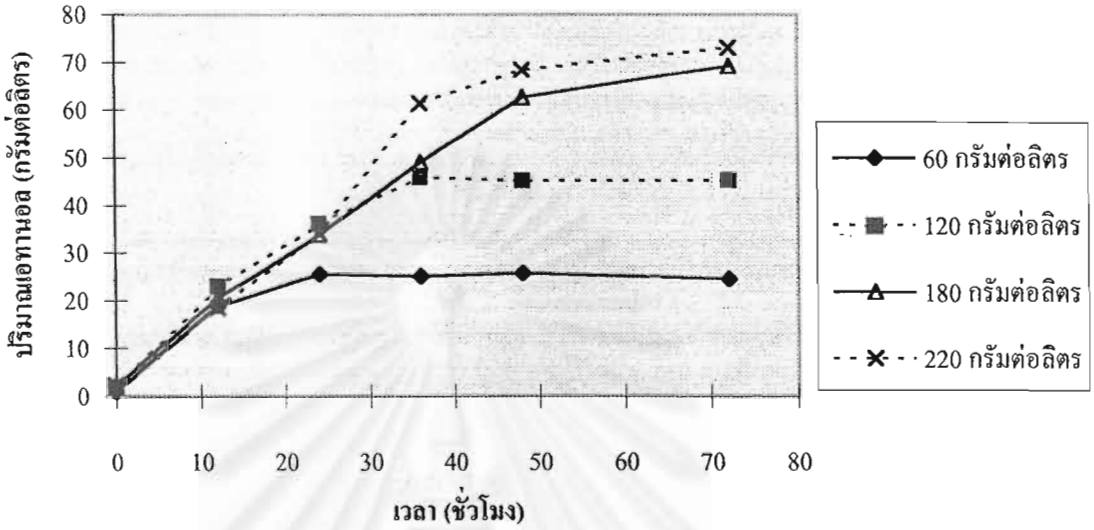
รูปที่ 3.19 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือ ที่ระยะเวลาต่างๆของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* จากอาหารกากน้ำตาลเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อนและภาวะควบคุม



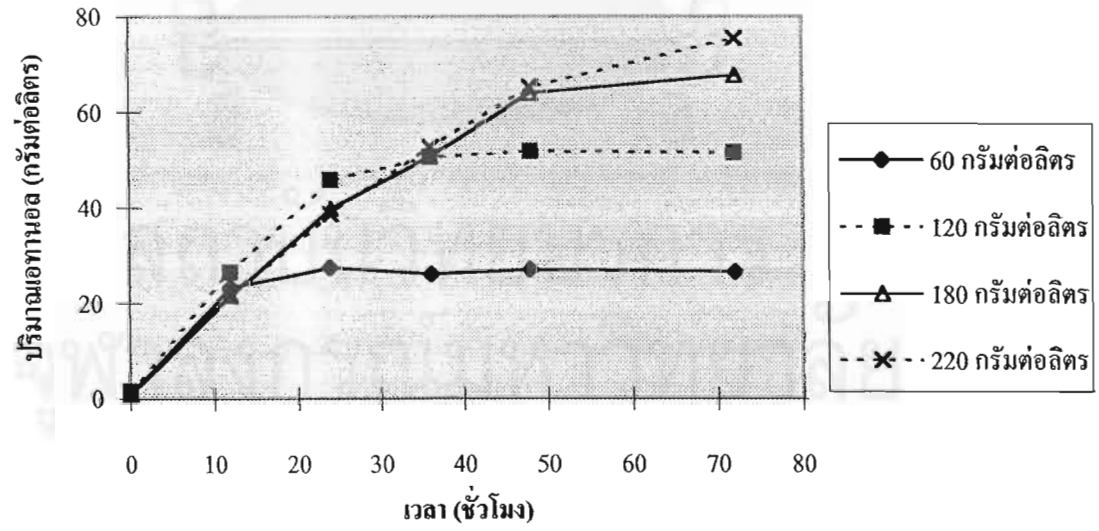
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ 60 , 120 , 180 และ 220 กรัมต่อลิตร พบว่ายีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้มากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้นทั้งในภาวะที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย J และภาวะควบคุม (รูปที่ 3.20 และ 3.21) ในทางตรงกันข้ามยีสต์มีจะเจริญได้ช้าลงเมื่อมีน้ำตาลเข้มข้นสูง (รูปที่ 3.22 และ 3.23) สำหรับการเจริญของแบคทีเรีย J พบว่าเจริญได้ดีที่สุดที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 120 กรัมต่อลิตร เพราะมีน้ำตาลรีดิวซ์มากพอที่จะใช้สำหรับการเจริญ เนื่องจากแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ พบว่าอัตราส่วนของน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาลที่ใช้สำหรับหมักเอทานอลมีค่าประมาณ 2:3 แบคทีเรีย J สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงโดยจะมีระยะพักตัว (lag phase) นานขึ้น (รูปที่ 3.24 และ 3.25) แต่อย่างไรก็ตามที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 220 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย J เจริญได้น้อยเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น ๆ เนื่องจากผลกระทบที่เกิดจากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงจนเกิดรบกวนการขนส่งสารอาหารเข้าและออกเซลล์ของแบคทีเรีย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

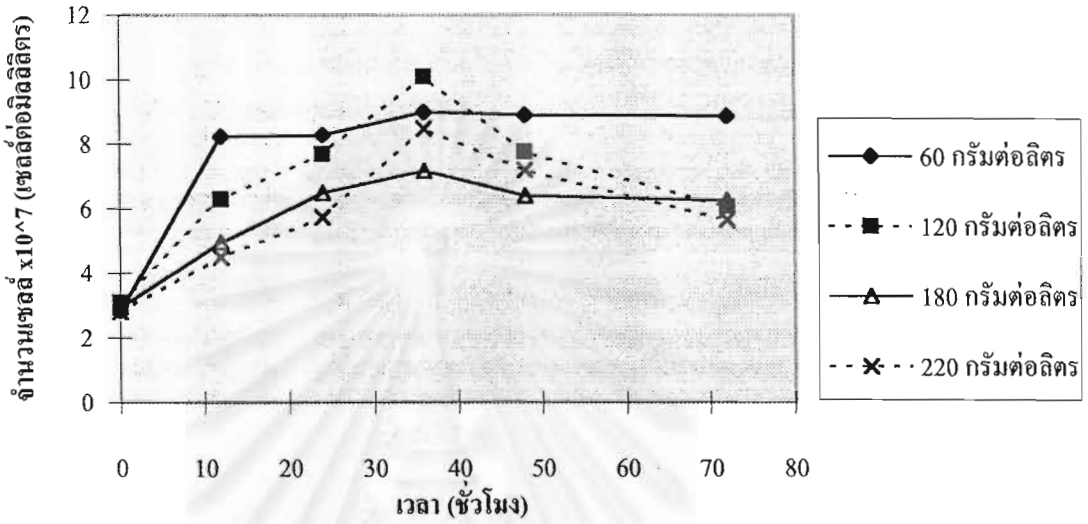
รูปที่ 3.20 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้นโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการหมักเอทานอลที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน



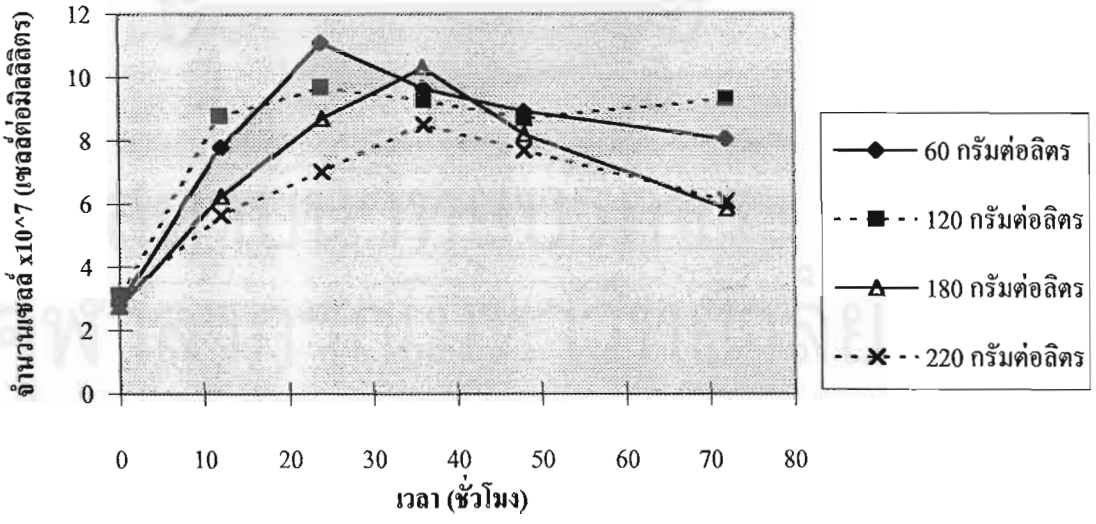
รูปที่ 3.21 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้นโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการหมักเอทานอลที่ไม่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน (ภาวะควบคุม) ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน



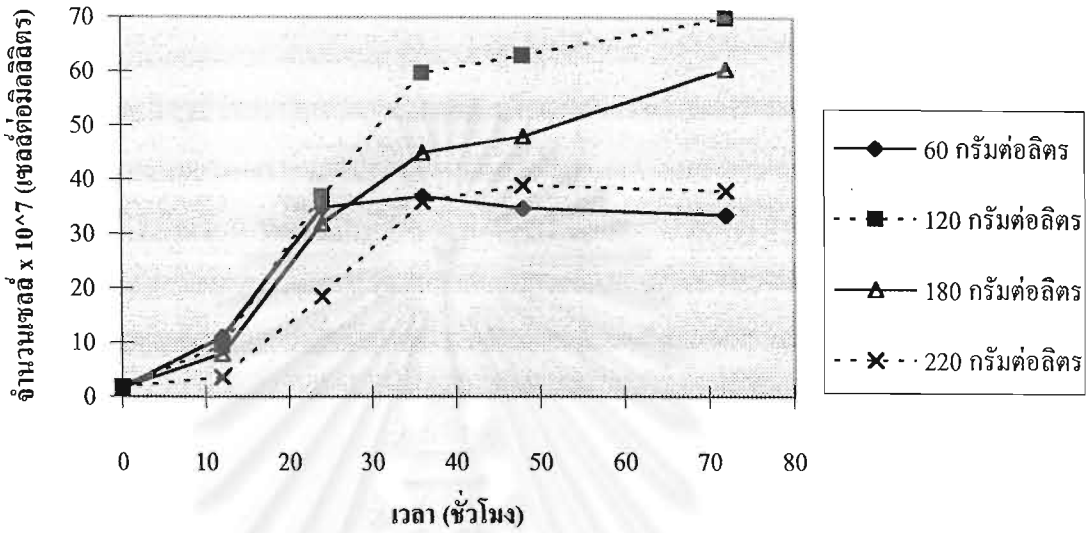
รูปที่ 3.22 เปรียบเทียบจำนวนยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการผลิตเอทานอลที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน



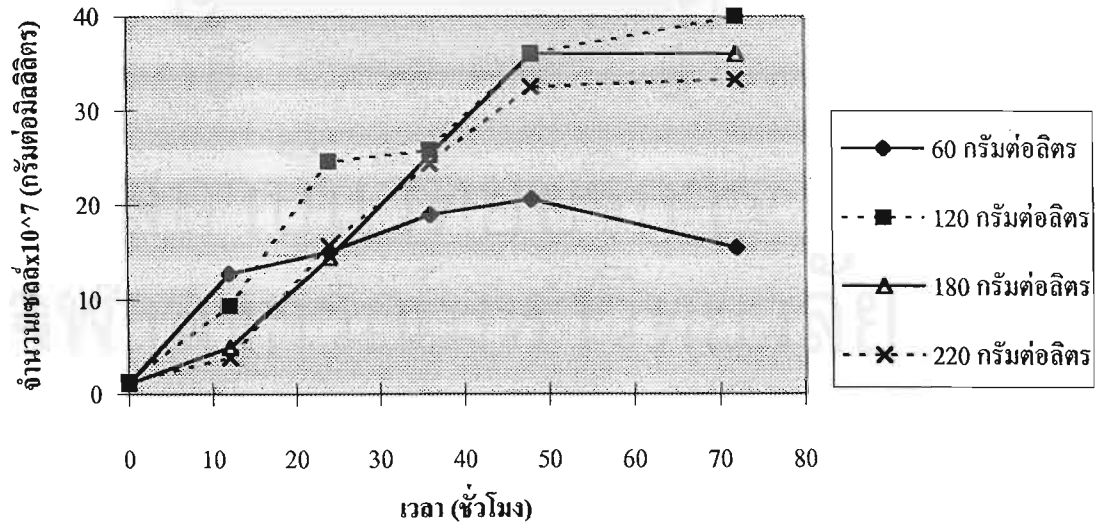
รูปที่ 3.23 เปรียบเทียบจำนวนยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการผลิตเอทานอลที่ไม่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน (ภาวะควบคุม) ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 3.24 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรีย J ที่เจริญระหว่างการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน



รูปที่ 3.25 เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรีย J ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน (ภาวะควบคุม)



3.3.4.2 วิเคราะห์ค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นของการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย J ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน

วิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการหมักเอทานอลในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม จากการทดลองที่ 3.3.4.1 โดยนำไปหาค่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์และแบคทีเรีย J และอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์ ตามวิธีคำนวณในภาคผนวก ง-2 พบว่าช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงมากที่สุดในระหว่างการหมักคือชั่วโมงที่ 12 และ 24 ดังนั้นจึงนำค่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์และแบคทีเรีย J และอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์ที่ชั่วโมงที่ 12 และ 24 มาทำการวิเคราะห์ถึงภาวะการอยู่ร่วมกันของยีสต์และแบคทีเรีย J จากตารางที่ 3.21 , 3.22 และรูปที่ 3.26 , 3.27 พบว่าที่ 12 ชั่วโมง อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์และแบคทีเรีย J ในภาวะการหมักที่เจริญร่วมกันและภาวะควบคุมจะต่ำลง เมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้น แสดงว่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นมีผลต่อการเจริญของยีสต์และแบคทีเรีย J คือถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูง ยีสต์และแบคทีเรีย J เจริญได้ไม่ดี สำหรับภาวะการหมักที่ยีสต์และแบคทีเรีย J เจริญร่วมกัน อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์จะต่ำกว่าของแบคทีเรีย J เสมอในทุกๆ ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น ทั้งนี้เพราะเป็นธรรมชาติของแบคทีเรียที่ใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์สั้นกว่ายีสต์ เมื่อพิจารณาค่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนเทียบกับภาวะควบคุมพบว่าที่ความเข้มข้น 120 , 180 และ 220 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนจะต่ำกว่าในภาวะควบคุม แต่ที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะมีค่าใกล้เคียงกัน โดยในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน ค่าอัตราการเจริญจำเพาะจะสูงกว่าเล็กน้อย เพราะปริมาณน้ำตาลต่ำ อาจเป็นผลให้การหมักเอทานอลในภาวะที่เจริญร่วมกับแบคทีเรียเกิดแย่งกันใช้น้ำตาล ยีสต์จึงใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญมากกว่าผลิตเอทานอล ทำให้อัตราการเจริญจำเพาะสูง แต่มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะต่ำ ส่วนอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย J ที่เจริญร่วมกับยีสต์ มีแนวโน้มต่ำกว่าภาวะที่ไม่ได้อยู่ร่วมกับยีสต์ในทุกความเข้มข้น โดยที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 และ 120 กรัมต่อลิตร จะมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย J ต่ำกว่าภาวะควบคุมอย่างชัดเจน เพราะความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ ในภาวะที่เจริญร่วมกับยีสต์ย่อมเกิดการแย่งกันใช้น้ำตาล การเจริญในระยะแรกนี้จึงต้องแข่งขันกับยีสต์ ทำให้เจริญได้ไม่ดี ขณะเดียวกันที่ความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำๆ นี้ไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย J ดังนั้นแบคทีเรีย J ที่ไม่ได้ปนเปื้อนอยู่กับยีสต์จึงเจริญได้มากกว่า ส่วนที่ความเข้ม

ข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย J ทั้ง 2 ภาวะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร แม้ว่าจะมีอัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย J ต่ำกว่าภาวะที่เจริญร่วมกับยีสต์ แต่ไม่ได้เป็นเพราะขาดแคลนน้ำตาล เช่นเดียวกับที่ความเข้มข้น 60 และ 120 กรัมต่อลิตร แต่อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในภาวะที่อยู่ร่วมกับยีสต์สูงกว่าภาวะที่ไม่มียีสต์ ทั้งนี้เนื่องจากยีสต์สามารถสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทสเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ได้ และเมื่อรวมกับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่มีอยู่เดิม ทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นสูงมาก จึงอาจมีผลทำให้แบคทีเรีย J ในภาวะที่เจริญร่วมกับยีสต์มีอัตราการเจริญจำเพาะต่ำกว่าภาวะที่ไม่ได้เจริญร่วมกับยีสต์ แต่เมื่อถึงเวลาที่ 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3.27) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตรนี้ แบคทีเรีย J ในภาวะที่เจริญปนเปื้อนอยู่กับยีสต์จะมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าภาวะที่ไม่ได้เจริญร่วมกับยีสต์ ซึ่ง ณ เวลานี้น้ำตาลส่วนหนึ่งถูกยีสต์ใช้ไปสำหรับการเจริญและผลิตเอทานอล ความเข้มข้นของน้ำตาลจึงลดต่ำลงจนไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญของแบคทีเรีย J จึงทำให้แบคทีเรีย J ในภาวะที่เจริญร่วมกับยีสต์เจริญได้ดี และที่เวลา 24 ชั่วโมงนี้อัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย J ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 , 120 และ 180 กรัมต่อลิตร ในภาวะที่เจริญร่วมกับยีสต์จะสูงกว่าที่ไม่ได้เจริญร่วมกับยีสต์เช่นเดียวกับที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร อาจเป็นเพราะแบคทีเรีย J ได้รับสารที่ยีสต์ปล่อยออกมาระหว่างการหมักเอทานอลที่ส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย J แบคทีเรีย J จึงเจริญได้เร็ว สำหรับการเจริญของยีสต์ที่ 24 ชั่วโมง เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่จึงทำให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์มีความคลาดเคลื่อนไปบ้าง

สำหรับอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะในงานวิจัยนี้คิดเป็นเทียบจากการนับจำนวนเซลล์ จึงมีหน่วยเป็น กรัมของเอทานอลที่ได้ต่อชั่วโมงต่อ 1 หน่วยเซลล์ จากตารางที่ 3.23 และรูปที่ 3.28 , 3.29 พบว่าชั่วโมงที่ 12 อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์ในภาวะการหมักที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนที่ความเข้มข้นข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 , 180 และ 220 กรัมต่อลิตรจะมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะจะต่ำ เพราะมีปริมาณน้ำตาลน้อยจึงเกิดการแข่งขันกันใช้น้ำตาลระหว่างยีสต์กับแบคทีเรีย J เมื่อเปรียบเทียบอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะในภาวะการหมักที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนกับภาวะควบคุม พบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 , 180 และ 220 กรัมต่อลิตร ค่าอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะในทั้ง 2 ภาวะใกล้เคียงกัน แต่ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะในภาวะที่มีแบคทีเรียปนเปื้อน J จะลดต่ำลงมาก เพราะเกิดการแข่งขันการใช้น้ำตาลกับยีสต์เช่นเดียวกัน และเมื่อพิจารณาชั่วโมงที่ 24 พบว่า

อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะจะสูงขึ้นถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงขึ้น โดยอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 120 และ 180 กรัมต่อลิตรจะต่ำกว่าภาวะควบคุมเล็กน้อย เนื่องจากปริมาณน้ำตาลเริ่มลดลง แต่ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนสูงกว่าในภาวะควบคุม เพราะปริมาณน้ำตาลยังมากพอที่ยีสต์จะใช้สำหรับเจริญและผลิตเอทานอล และแบคทีเรีย J ใช้สำหรับเจริญ แต่ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนสูงกว่าภาวะควบคุม เพราะในภาวะควบคุมยีสต์ผลิตเอทานอลได้เร็วตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 น้ำตาลจึงหมดเร็ว พอถึงชั่วโมงที่ 24 จึงผลิตเอทานอลได้น้อยลง และที่ชั่วโมงที่ 24 ยีสต์ในภาวะควบคุมยังคงเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มาก เห็นได้จากค่าอัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ยังคงมีค่าสูง จากค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นนี้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรีย J เจริญได้ดีกว่ายีสต์ทั้งในภาวะที่เจริญร่วมกันและไม่ได้เจริญร่วมกัน โดยแบคทีเรีย J ไม่ได้ทำให้การผลิตเอทานอลลดลงถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.21 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate ,μ) ของยีสต์ในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนและภาวะที่ไม่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน (ควบคุม) ระหว่างการหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ (ชั่วโมง$^{-1}$)							
	ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร		ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร		ความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร		ความเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร	
	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน	ภาวะควบคุม	ภาวะมีแบคทีเรีย
12	0.0845	0.0886	0.0868	0.0591	0.0687	0.0434	0.0528	0.0395
24	0.0294	0.0005	0.0081	0.0167	0.0276	0.0227	0.0182	0.0204
36	-0.0117	0.0067	-0.0035	0.0226	0.0141	0.0082	0.0158	0.0326
48	-0.0065	-0.0009	-0.0054	-0.0221	-0.0190	-0.0095	-0.0082	-0.0138
72	-0.0043	-0.0005	0.0029	-0.0103	-0.0141	-0.0099	-0.0097	-0.0101

ตารางที่ 3.22 ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate ,μ) ของแบคทีเรีย J ในระหว่างการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่มียีสต์ (ควบคุม) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่าง ๆ

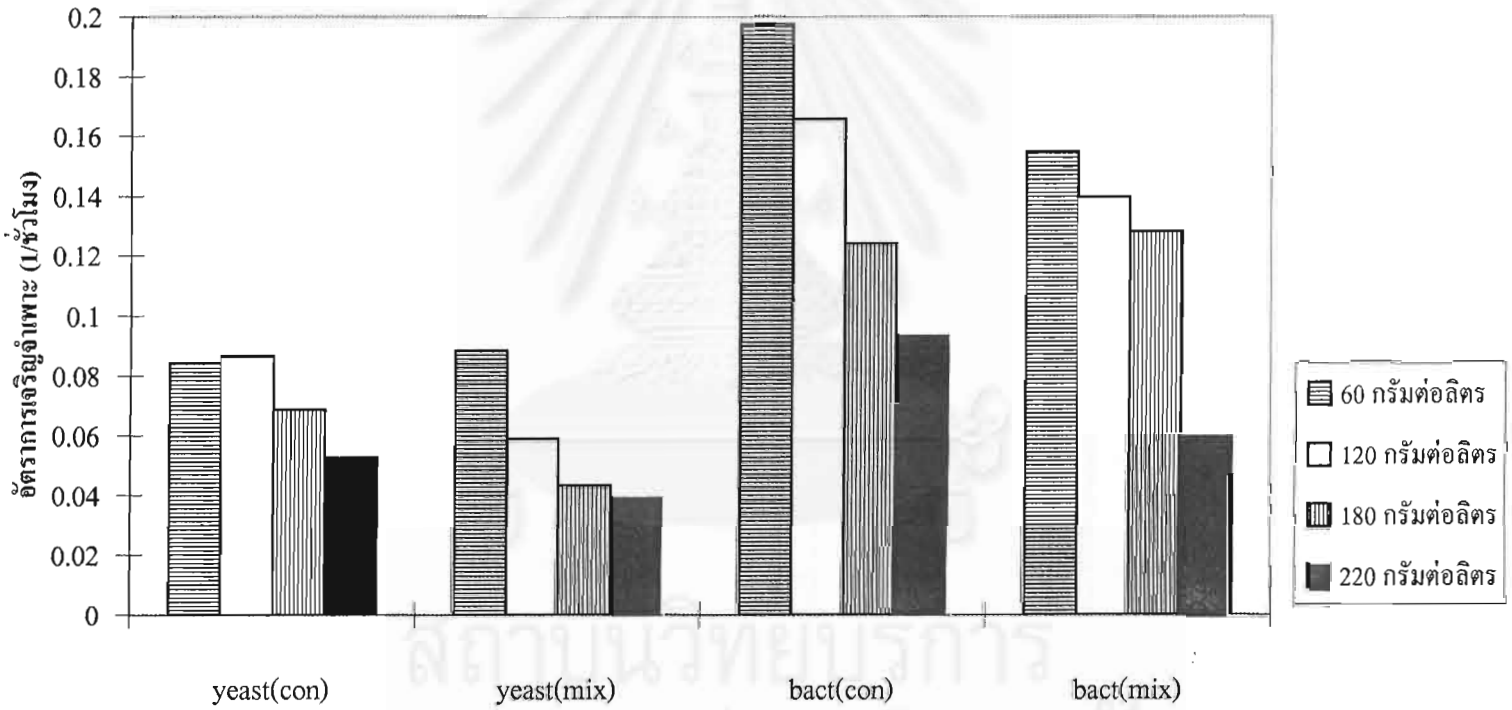
เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย (ชั่วโมง$^{-1}$)							
	ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร		ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร		ความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร		ความเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร	
	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน
12	0.1973	0.1544	0.1657	0.1396	0.1242	0.1280	0.0935	0.0601
24	0.0138	0.0955	0.0806	0.1133	0.0899	0.1166	0.1161	0.1369
36	0.0191	0.0049	0.0040	0.0400	0.0464	0.0284	0.0367	0.0555
48	0.0067	-0.0051	0.0278	0.0043	0.0294	0.0054	0.0239	0.0067
72	-0.0119	-0.0016	-0.0044	0.0044	0	0.0096	0.0010	-0.0011

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

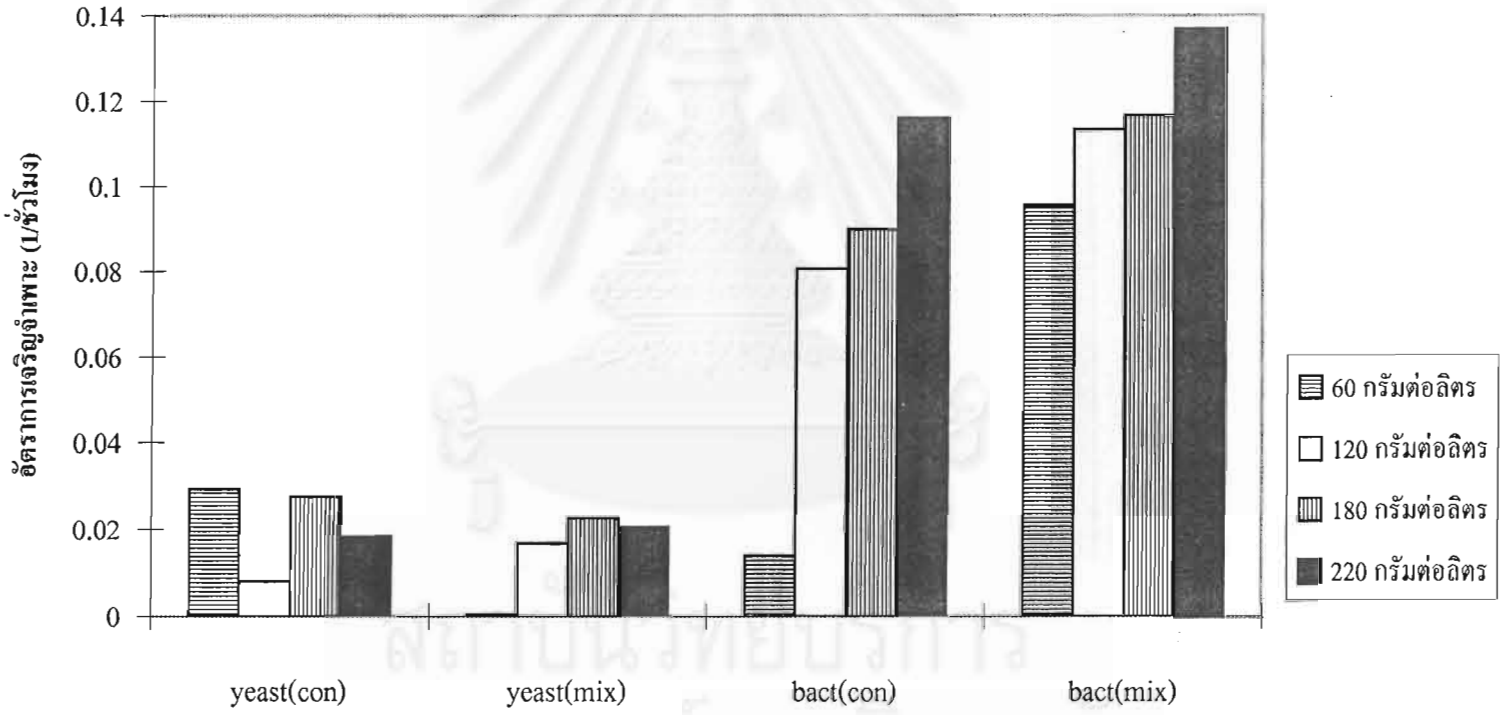
ตารางที่ 3.23 ค่าอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะ (specific production rate , ν) ของยีสต์ในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนและภาวะที่ไม่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อน (ควบคุม) ระหว่างการหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่าง ๆ

เวลา (ชั่วโมง)	อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์ $\times 10^{-7}$(กรัมต่อชั่วโมงต่อเซลล์)							
	ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร		ความเข้มข้น 120 กรัมต่อลิตร		ความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร		ความเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร	
	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน	ภาวะควบคุม	ภาวะปนเปื้อน
12	0.3782	0.2926	0.3819	0.3942	0.4029	0.3984	0.4035	0.3789
24	0.0381	0.0681	0.1741	0.1571	0.2060	0.1936	0.2297	0.2532
36	-0.0112	-0.0054	0.0402	0.0920	0.0955	0.1858	0.1497	0.3244
48	0.0085	0.0066	0.0113	-0.0062	0.1197	0.1685	0.1282	0.0746
72	-0.0021	-0.0312	-0.0012	0.0002	0.0227	0.4289	0.0622	0.0305

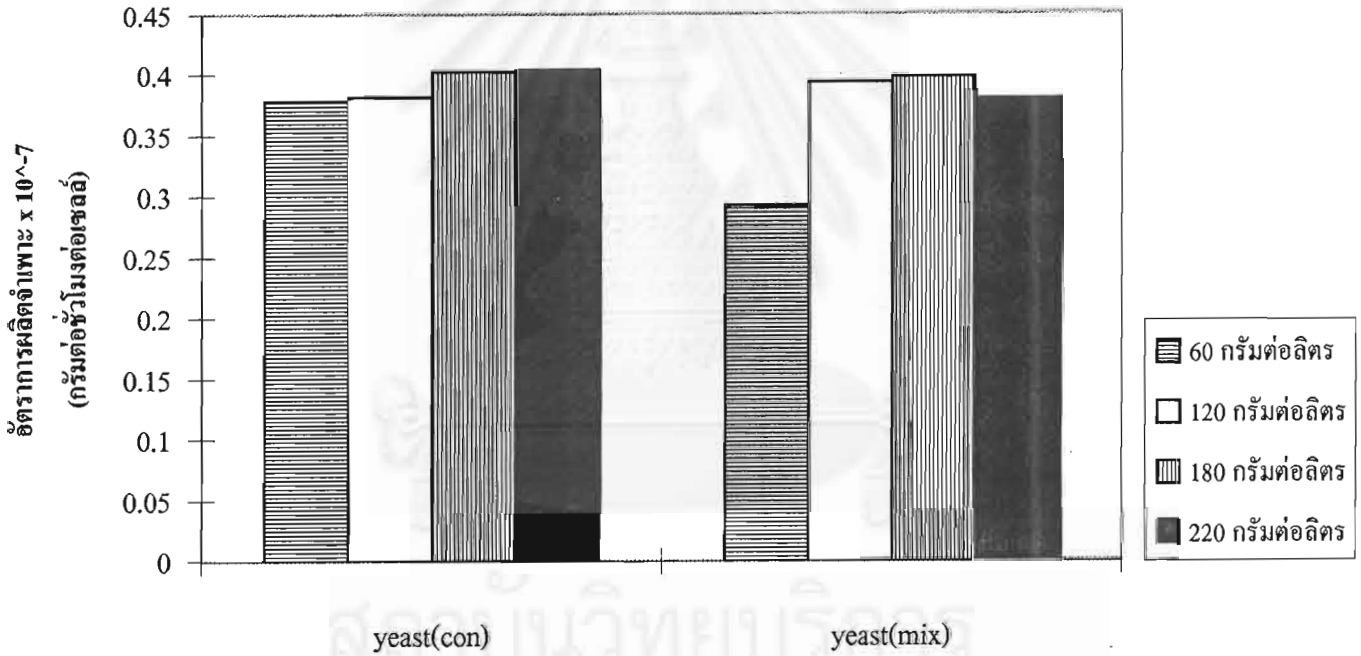
รูปที่ 3.26 อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ในการหมักเอทานอลที่ 12 ชั่วโมง



รูปที่ 3.27 อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย J ระหว่างการหมักเอทานอลที่ 24 ชั่วโมง

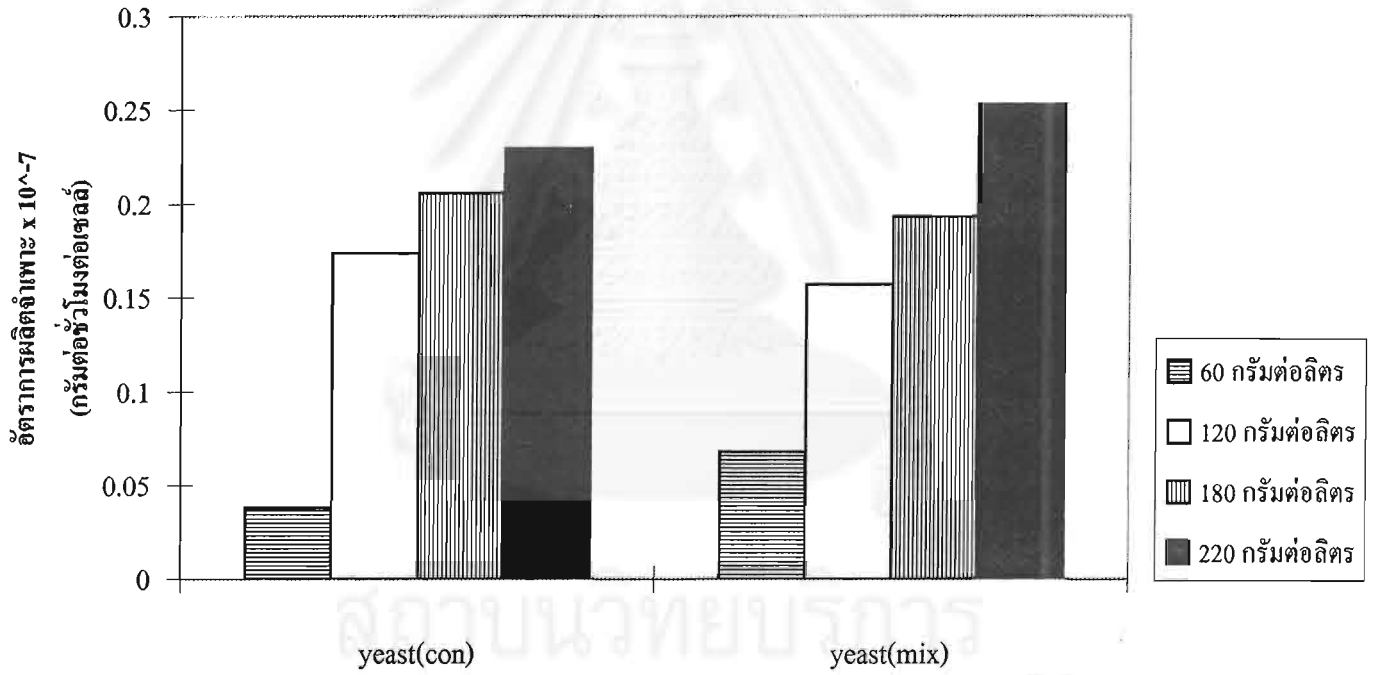


รูปที่ 3.28 อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการหมักเอทานอลที่ 12 ชั่วโมง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 3.29 อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* ระหว่างการหมักเอทานอลที่ 24 ชั่วโมง



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

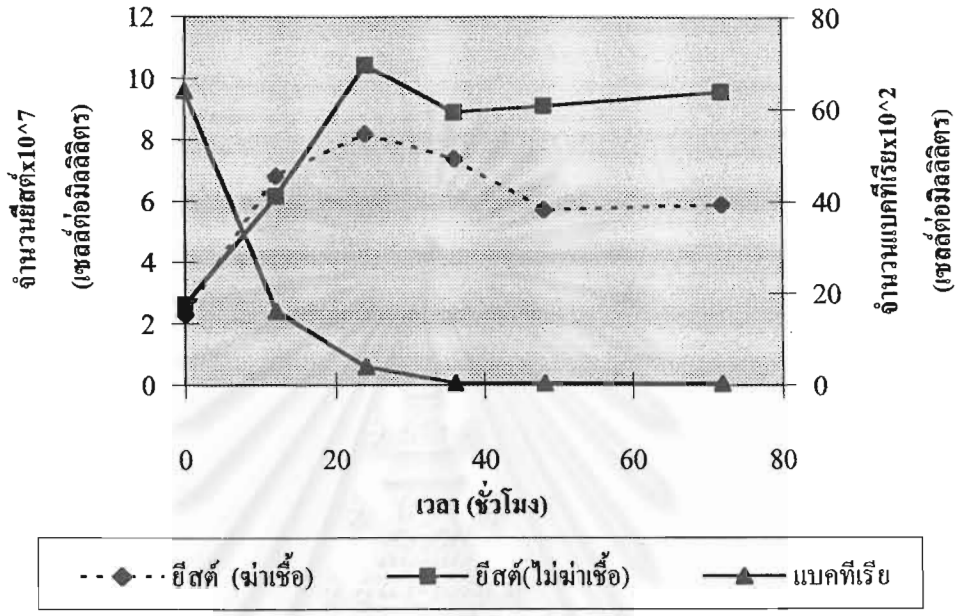
3.4 การหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

เตรียมอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้น 180 กรัมต่อลิตร ทำการหมักเอทานอลตามวิธีทดลองข้อ 2.9 โดยไม่ต้องฆ่าเชื้ออาหารกากน้ำตาลก่อนการหมัก เปรียบเทียบกับการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ได้ผลแสดงในตารางที่ 3.24 รูปที่ 3.30 และ 3.31 พบว่ายีสต์สามารถเจริญเพิ่มจำนวนและผลิตเอทานอลในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ฆ่าเชื้อได้มากกว่าอาหารกากน้ำตาลที่ฆ่าเชื้อ โดยผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงถึง 76.764 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากอาหารกากน้ำตาลฆ่าเชื้อที่ผลิตได้ 70.160 กรัมต่อลิตร จำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนในอาหารกากน้ำตาลเริ่มต้นนับได้ 6.4×10^{3} เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อสิ้นสุดการหมัก แบคทีเรียลดจำนวนลงเหลือประมาณ 49 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

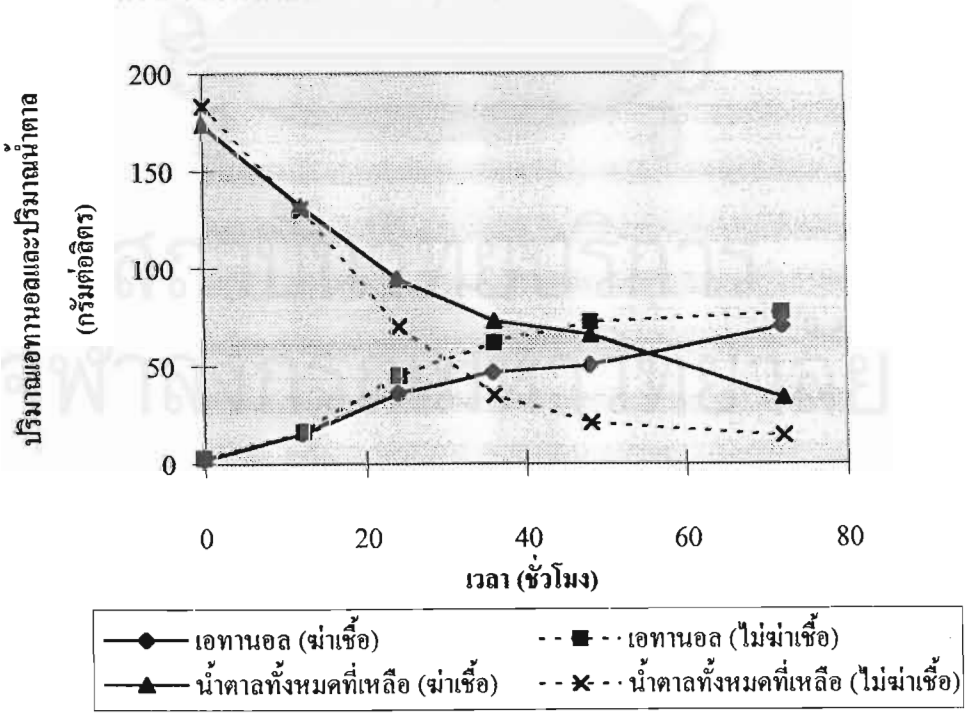
ตารางที่ 3.24 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอล จำนวนเซลล์ยีสต์ และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และผ่านการฆ่าเชื้อ

เวลา (ชั่วโมง)	อาหารกากน้ำตาลไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ				อาหารกากน้ำตาลผ่านการฆ่าเชื้อ		
	จำนวนเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	จำนวนเซลล์แบคทีเรีย (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)	จำนวนเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)
0	2.62×10^{7}	6.4×10^{3}	2.773	183.282	2.28×10^{7}	2.059	173.738
12	6.17×10^{7}	1.6×10^{3}	16.286	130.182	6.83×10^{7}	15.457	131.894
24	1.05×10^{8}	4.0×10^{2}	44.857	70.229	8.20×10^{7}	35.940	94.210
36	8.90×10^{7}	0.50×10^{2}	61.803	35.115	7.40×10^{7}	46.637	72.970
48	9.10×10^{7}	0.42×10^{2}	72.477	20.983	5.73×10^{7}	50.059	65.947
72	9.58×10^{7}	0.49×10^{2}	76.764	14.388	5.90×10^{7}	70.160	33.830

รูปที่ 3.30 เปรียบเทียบจำนวนยีสต์และแบคทีเรียในระหว่างการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อ



รูปที่ 3.31 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลือในระหว่างการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและผ่านการฆ่าเชื้อ



บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนจากกากน้ำตาลแหล่งต่างๆ ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YM และ MRS พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM ได้มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสำหรับแบคทีเรียชนิดสร้างกรดแลคติก แต่ชนิดของแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ที่แยกได้จากกากน้ำตาลด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS คล้ายกันกับที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ YM คืออยู่ในสกุล *Bacillus* และพบแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* น้อยมากจนถึงไม่พบเลย ดังนั้นจึงเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อ YM เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแยกแบคทีเรียชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ต่อไป

จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากกากน้ำตาลแหล่งต่างๆ ที่แยกด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YM มีจำนวนประมาณ 10^2 เซลล์ต่อกากน้ำตาล 1 มิลลิลิตร จากการศึกษาลักษณะรูปร่างและทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียที่แยกได้จากกากน้ำตาลที่มาจากแหล่งต่างๆ พบว่าจำนวนและชนิดของแบคทีเรียที่แยกได้ในแต่ละครั้งจะแตกต่างกัน มีความผันแปรค่อนข้างสูง แม้ว่าจะมาจากกากน้ำตาลแหล่งเดียวกันและบรรจุอยู่ในภาชนะเดียวกัน ลักษณะการปนเปื้อนของแบคทีเรียในกากน้ำตาลที่ทำให้จำนวนและชนิดของแบคทีเรียมีความผันแปรอาจแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ ลักษณะแรกเป็นการปนเปื้อนมาตั้งแต่กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย โดยเฉพาะขั้นตอนการหีบอ้อย จากรายงานของบุญส่ง แสงอ่อน และวิวัฒน์ แดงสุภา (2527) พบว่าแบคทีเรียที่พบในน้ำอ้อยในถังพักรวมก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายมีสูงถึง 1.9×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรถ้าแบคทีเรียใดสามารถมีชีวิตรอดจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายออกมาได้ก็จะตกค้างปนอยู่กับกากน้ำตาล ลักษณะการปนเปื้อนของแบคทีเรียเหล่านี้จึงน่าจะผสมอยู่อย่างสม่ำเสมอในกากน้ำตาลเพราะแบคทีเรียจะผสมคลุกเคล้ากับกากน้ำตาลตั้งแต่ออกจากกระบวนการผลิตใหม่ๆ ซึ่งกากน้ำตาลยังไม่เหนียวข้นมาก แบคทีเรียที่มีชีวิตรอดกลุ่มนี้จะต้องทนต่อสภาพแวดล้อมที่รุนแรงในกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายได้ เช่น ทนร้อนและทนต่อการเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดด่าง เป็นต้น ลักษณะของการปนเปื้อนแบบที่ 2 เป็นการปนเปื้อนภายหลังกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย แบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในกากน้ำตาลอาจแตกต่างกันได้ตามสภาพแวดล้อมภายในโรงงาน การขนส่ง อายุการเก็บและภาชนะที่ใช้บรรจุ ลักษณะการปนเปื้อนของ

แบคทีเรียเหล่านี้จะต่างกับแบบแรก คือการปนเปื้อนจะเป็นจุดๆ ขึ้นอยู่กับว่ามีแบคทีเรียใดตกลงมาในกากน้ำตาล การกระจายตัวของแบคทีเรียเหล่านี้จะไม่สม่ำเสมอ เนื่องจากสภาพของกากน้ำตาลที่มีลักษณะเหนียวข้น ยากต่อการที่จะผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนตักตัวอย่างจากภาชนะที่บรรจุ ทำให้ชนิดและจำนวนของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในตำแหน่งต่างๆ ของกากน้ำตาลในภาชนะบรรจุแตกต่างกันได้

งานวิจัยนี้พบว่าแบคทีเรียชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในกากน้ำตาลแต่ละแหล่ง ส่วนใหญ่อยู่ในสกุล *Bacilllus* เพราะมีลักษณะเด่นคือ รูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก สร้างสปอร์ และสร้างเอนไซม์คะตาเลส ผลการทดลองนี้แตกต่างจากงานวิจัยอื่นที่รายงานว่า แบคทีเรียปนเปื้อนในกากน้ำตาลที่ก่อปัญหาในการหมักเอทานอล คือแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* การปนเปื้อนของแบคทีเรียนี้พบมากในกากน้ำตาลเก่า (ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และคณะ , 2529) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกากน้ำตาลที่เก็บไว้นานแบคทีเรียย่อมมีโอกาสปนเปื้อนได้มาก โดยเฉพาะถ้าเก็บไว้ในภาชนะบรรจุปิดไม่สนิทหรือมีรอยรั่ว น้ำจากภายนอกอาจจะซึมเข้าไปเจือจางกากน้ำตาล ดังนั้นแบคทีเรียชนิดสร้างกรดแลคติกซึ่งเดิมอาจจะมีจำนวนน้อยในกากน้ำตาล อาจเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นและเมื่อนำไปใช้หมักเอทานอลก็สร้างปัญหารบกวนการหมักเอทานอล แต่งานวิจัยนี้พบแบคทีเรียชนิดสร้างกรดแลคติกน้อยมากจนถึงไม่พบเลย และพบแบคทีเรียสกุล *Bacillus* เป็นประชากรส่วนใหญ่ อาจเพราะกากน้ำตาลที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นกากน้ำตาลใหม่ที่ได้จากโรงงานผลิตน้ำตาล ซึ่งแบคทีเรียนี้อาจปนเปื้อนและมีชีวิตรอดมาจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายเพราะแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างสปอร์ซึ่งทนต่อภาวะอุณหภูมิสูงได้ หรืออาจเป็นเพราะกระบวนการผลิตน้ำตาลในปัจจุบันมีการเติมสารที่ระงับการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ที่มีประสิทธิภาพดีขึ้นลงในน้ำอ้อยตั้งแต่ก่อนเข้าสู่กระบวนการผลิตน้ำตาลทรายเพื่อลดการสูญเสียน้ำตาลในกระบวนการหีบอ้อย เช่น สาร Maquat-1416. ซึ่งเป็นสารเคมีประเภท quaternary ammonium compound (QAC) ปริมาณ 20 ppm. มีฤทธิ์ฆ่าแบคทีเรียชนิดสร้างกรดแลคติกได้ เช่น *Lactobacillus cellobius* และ *Lactobacillus fermentum* (บุญส่ง แสงอ่อน และวิวัฒน์ แดงสุภา , 2528) และอาจตกค้างมายังกากน้ำตาล เป็นเหตุให้แบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* ที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลที่เคยก่อปัญหาในการหมักเอทานอลมีจำนวนน้อยลง

เมื่อนำแบคทีเรียชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ชนิดต่างๆ กันที่แยกได้จากกากน้ำตาลมาทดลองเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอล โดยเลี้ยงในภาวะเดียวกันกับภาวะที่ใช้หมักเอทานอล เพื่อต้องการดูว่าแบคทีเรียชนิดใดเจริญได้ดีในภาวะดังกล่าว โดยคาดว่าแบคทีเรียชนิดนั้นน่าจะเป็นสาเหตุในการก่อปัญหารบกวนการหมักเอทานอลจนทำให้ปริมาณเอทานอลที่

ผลิตได้ลดต่ำลง แต่ผลการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ พบว่าเจริญได้น้อยมากหรือลดลงในบางชนิด แสดงว่าแบคทีเรียปนเปื้อนจากกากน้ำตาลเหล่านั้น ไม่อาจที่จะก่อปัญหารบกวนการผลิตเอทานอลได้ ดังนั้นจึงทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจากน้ำหมักที่นำมาจากโรงงานสุรา เพื่อศึกษาว่ามีแบคทีเรียปนเปื้อนชนิดใดบ้างที่พบเป็นประชากรส่วนใหญ่ พบว่ามีแบคทีเรียปนเปื้อนอยู่ประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบในกากน้ำตาลประมาณ 1,000 เท่า แบคทีเรียปนเปื้อนเหล่านี้อาจเกิดจากการสะสมของแบคทีเรียที่อาจปนเปื้อนมาจากกากน้ำตาล หรือน้ำที่ใช้เจือจาง โดยในตอนแรกอาจมีจำนวนน้อย แต่เกิดการสะสมจนมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ไม่ได้ทำการฆ่าเชื้ออาหารกากน้ำตาลที่เป็นวัตถุดิบ และไม่ได้ทำความสะอาดถังหมักให้ปลอดเชื้อก่อนการหมัก สภาพดังกล่าวจึงเอื้ออำนวยต่อการสะสมของแบคทีเรียที่ทนแอลกอฮอล์ภายในระบบอุปกรณ์การผลิตของโรงงาน ถ้าจำนวนแบคทีเรียสูงมากก็จะอาจทำให้การผลิตเอทานอลลดลง น้ำหมักที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้เก็บตัวอย่างมาจากชั่วโมงที่ 0 ,24 , 48 และ 72 เมื่อนำมาแยกแบคทีเรียปนเปื้อนพบแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่เป็น 3 ชนิด คือ ในชั่วโมงที่ 0 พบแบคทีเรียที่ให้ชื่อว่า H ชั่วโมงที่ 24 และ 72 พบแบคทีเรียที่ให้ชื่อว่า J และชั่วโมงที่ 48 พบแบคทีเรียที่ให้ชื่อว่า K พบว่าแบคทีเรีย H และ J เจริญได้ดีในอาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอล เมื่อศึกษาลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา และทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น แล้วพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด มีรูปร่างเป็นท่อน ติดสีแกรมบวก ไม่พบการสร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลสและเอนไซม์ออกซิเดส ซึ่งลักษณะเด่นนี้เหมือนกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* (Kandler and Weiss,1986 ; Oliva-Neto and Yokoya , 1994) แต่เมื่อทดลองเลี้ยงร่วมกับยีสต์ในการหมักเอทานอลพบว่า แบคทีเรีย J เจริญได้ดีกว่าแบคทีเรีย H โดยที่แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดไม่ได้ทำให้ปริมาณเอทานอลลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมาก จึงไม่เกิดภาวะแข่งขันกันใช้น้ำตาลระหว่างยีสต์กับแบคทีเรีย งานวิจัยนี้จึงเลือกแบคทีเรีย J มาเป็นตัวอย่างในการศึกษาภาวะการเจริญร่วมกันระหว่างยีสต์และแบคทีเรียในระหว่างการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างกัน เนื่องจากการหมักเอทานอลในระดับขวดแบบไม่เขย่า (static culture) เป็นการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง ทำให้ไม่สามารถเติมสารอาหารลงไปในระหว่างการหมักได้ จึงแปรผันปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเพื่อหาปัจจัยจำกัด (limiting factor) ที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยแปรผันปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารสำหรับหมักเอทานอลโดยยีสต์ในภาวะที่มีการเติมแบคทีเรีย J เป็น 60 , 120 , 180 และ 220 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย J ที่เตรียมไว้สำหรับปนเปื้อนกับยีสต์ในอาหารกาก

น้ำตาลอยู่ในสภาพของแบคทีเรียแขวนลอย ทั้งนี้เพราะต้องการให้ใกล้เคียงกับภาวะการปนเปื้อนจริงในโรงงานผลิตแอลกอฮอล์ จึงไม่จำเป็นต้องเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียให้เจริญพร้อมเต็มที่ก่อนการเติมลงไปปนเปื้อนในอาหารกากน้ำตาล จำนวนแบคทีเรียตั้งต้นที่เติมลงไปในอาหารกากน้ำตาลในงานวิจัยนี้ใช้จำนวนประมาณ 1.5×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพราะเคยมีรายงานว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus casei* จำนวนมากกว่า 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร สามารถทำให้การเจริญและการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลหัวบีทโดยยีสต์ลดลง (Essia Ngang, Letourneau, Wolniewicz et al. ,1990) ผลการทดลองหมักเอทานอลในภาวะที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนแสดงให้เห็นว่าถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้น ยีสต์จะเจริญได้น้อยลงแต่ผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น โดยที่แบคทีเรีย J จะเจริญได้มากขึ้นและมีช่วงระยะปรับตัว (lag phase) นานขึ้น และแบคทีเรีย J สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้มากกว่าภาวะที่ไม่ได้เจริญร่วมกับยีสต์ อาจเป็นเพราะมีข้อจำกัดเรื่องปริมาณน้ำตาลแบคทีเรีย J จะใช้น้ำตาลรีดิวซ์สำหรับการเจริญเท่านั้น โดยจะใช้น้ำตาลรีดิวซ์บางส่วนจากการย่อยน้ำตาลซูโครสโดยยีสต์ที่สามารถสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทสเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลฟรุคโตสอย่างละ 1 โมเลกุล ทำให้ยีสต์มีน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอลลดลง ดังนั้นในภาวะที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่ำคือ 60 และ 120 กรัมต่อลิตร ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะลดลง เพราะยีสต์กับแบคทีเรีย J แข่งขันกันใช้น้ำตาล และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงแบคทีเรีย J ไม่ได้ทำให้ยีสต์ผลิตเอทานอลลดลง นอกจากนี้แบคทีเรีย J ที่เจริญร่วมกับยีสต์อาจได้รับสารที่ยีสต์ปล่อยออกมาระหว่างหมักเอทานอลที่ส่งเสริมการเจริญ เป็นผลให้แบคทีเรีย J มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นกว่าที่ไม่ได้เจริญร่วมกับยีสต์

เป็นที่น่าสังเกตว่าค่า pH ของอาหารกากน้ำตาลที่มีแบคทีเรีย J ปนเปื้อนเปลี่ยนแปลงไปเพียงเล็กน้อยเท่านั้นเมื่อสิ้นสุดการหมัก เพราะโดยปกติแล้วแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* จะสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจึงน่าจะทำให้ pH ของน้ำหมักลดต่ำลงมาก ทั้งนี้อาจอธิบายได้ว่าอาหารกากน้ำตาลมีความสามารถในการรักษาความเป็นกรด-ด่าง (buffering capacity) สูง (Hodge and Hildebrandt , 1954) หรือแบคทีเรีย J ไม่ได้จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* แต่มีลักษณะเด่นเหมือนกันกับแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* เพราะการจัดจำแนกแบคทีเรียในงานวิจัยนี้เป็นการจัดจำแนกเบื้องต้นเท่านั้น

จากค่าจลนพลศาสตร์เบื้องต้นที่ 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่ายีสต์เสมอในทุกความเข้มข้น เนื่องจากเป็นธรรมชาติของแบคทีเรียที่เวลาในการเพิ่มจำนวน (doubling time) จะสั้นกว่ายีสต์ และงานวิจัยนี้ใช้วิธีการนับจำนวนเซลล์ในการวัดการเจริญของยีสต์และแบคทีเรีย ทำให้การเจริญของแบคทีเรียต่อ 1 หน่วยเวลาสูงกว่ายีสต์ แม้ว่า

ว่าจะอยู่ในภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูงก็ตาม ถ้าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นสูง อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์และแบคทีเรียจะลดลง แต่ไม่มีผลทำให้อัตราจำเพาะของการผลิตเอทานอลลดลง และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 จำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มคงที่ (stationary phase) แต่ยังมีอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะสูงขึ้นแม้ว่าแบคทีเรียจะมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงขึ้นเช่นกัน แสดงว่าแบคทีเรียกับยีสต์อยู่ร่วมกันแบบแบคทีเรียได้ประโยชน์จากยีสต์ โดยที่ยีสต์ไม่เสียประโยชน์ก็ต่อเมื่อมีปริมาณน้ำตาลมากพอ แต่ถ้ามีปริมาณน้ำตาลน้อยจะอยู่ร่วมกันแบบภาวะแข่งขัน โดยแบคทีเรียยังคงได้ประโยชน์จากยีสต์ แต่ยีสต์เสียประโยชน์เนื่องจากขาดแคลนน้ำตาล ทำให้ผลิตเอทานอลได้ลดลง

เมื่อทำการทดลองหมักเอทานอลโดยใช้อาหารกากน้ำตาลที่ไม่ฆ่าเชื้อก่อนการหมัก พบว่ายีสต์สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้มากกว่าการหมักในอาหารกากน้ำตาลที่ฆ่าเชื้อ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีสารที่ส่งเสริมการเจริญของยีสต์ ซึ่งจะถูกทำลายด้วยความร้อนในการฆ่าเชื้อ เช่น กรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ที่มีอยู่ในกากน้ำตาล แต่กรดอะมิโนเหล่านี้เมื่อถูกความร้อนจะรวมตัวกับน้ำตาลรีดิวซ์ เกิดเป็นสารให้สีน้ำตาล (browning product) ซึ่งจะทำให้สูญเสียกรดอะมิโน และน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาล (Chen and Chou , 1993) แบคทีเรียปนเปื้อนเริ่มต้นในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ฆ่าเชื้อมีประมาณ 6.4×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และลดลงจนเกือบหมดเมื่อสิ้นสุดการหมัก แสดงว่าแบคทีเรียปนเปื้อนในกากน้ำตาลไม่สามารถทนต่อปริมาณเอทานอลที่สูง จึงไม่รบกวนการผลิตเอทานอลของยีสต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

1. แบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในกากน้ำตาลแหล่งต่างๆ คือแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ซึ่งไม่ก่อปัญหารบกวนการผลิตเอทานอล
2. แบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในน้ำหมักคือแบคทีเรียที่มีลักษณะเหมือนกับแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus*
3. แบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในน้ำหมักชื่อ J มีผลทำให้ปริมาณเอทานอลลดต่ำลง เมื่อปนเปื้อนอยู่ในอาหารกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 และ 120 กรัมต่อลิตร
4. ที่ความเข้มข้นของอาหารกากน้ำตาลเริ่มต้น 180 และ 220 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย J ไม่ทำให้การผลิตเอทานอลลดลง
5. ที่ความเข้มข้นของอาหารกากน้ำตาลเริ่มต้น 180 และ 220 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญจำเพาะของยีสต์และแบคทีเรียจะลดลง แต่ไม่มีผลทำให้อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะของยีสต์ลดลง
6. การหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจะได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าอาหารกากน้ำตาลที่ฆ่าเชื้อ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ณัฐดิษฎ์ ไทยตระกูล. 2528. บทบาทของแบคทีเรียในการหมักแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรม. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุญส่ง แสงอ่อน และ วิวัฒน์ แดงสุภา. 2527. บักเตรีในน้ำอ้อยจากกระบวนการผลิตน้ำตาลทรายในประเทศไทย. วารสารเกษตรศาสตร์(วิทย.) 18: 153-161.

บุญส่ง แสงอ่อน และ วิวัฒน์ แดงสุภา. 2528. การควบคุมเชื้อบักเตรีในน้ำอ้อยโดยสารเคมี quaternay ammonium compompounds. วารสารเกษตรศาสตร์(วิทย.) 19: 213-220.

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, ประดิษฐ์ ครุวัณณา, วิเชียร ยงมานิตชัย, จรูญ คำนวนตา, พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์ และ พรทิพย์ สุมนพันธ์. 2529. การศึกษาปัญหาที่เกิดจากการหมักกากน้ำตาลเก่าของโรงงานแอลกอฮอล์. รายงานโครงการวิจัย. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี และหน่วยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี สำนักงานยูซด ประเทศไทย. (เอกสารไม่ตีพิมพ์)

มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, สำนักงาน. 2524. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมกากน้ำตาลชนิดผลพลอยได้. กรุงเทพมหานคร: สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม

ยุทธพงษ์ ประถมจินดา. 2540. การวิเคราะห์ปริมาณและผลของสารประกอบควอเทอร์นารีแอมโมเนียมในกากน้ำตาลอ้อยต่อการหมักเอทานอลด้วยยีสต์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โรงงานสุรากรมสรรพสามิต, สัมภาษณ์

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. 2,000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: โอเดียนสโตร์.

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพมหานคร: ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ

ภาษาอังกฤษ

Aquarone, E. 1960. Penicillin and tetracycline as contamination control agents in alcoholic fermentation of sugar cane molasses. Applied Microbiology 8: 263-268.

Berry, D. R. , and Brown, C. 1987. Physiology of yeast growth. In D. R. Berrey, I. Russell, and G. G. Stewart (eds.), Yeast biotechnology, pp. 159-187. London: Allen and Unwin.

Casida, L. E. , Jr. 1968. Industrail microbiology. New York: John Wiley and Sons.

Chen, H. C. 1990, June. Non- aseptic, multi-stage, multi-feeding, continuous fermentation of cane molasses to ethanol. Process Biochemistry International: 87-92.

Chen, H. C. , and Mou, D. G. 1990. Pilot-scale multi-stage multi-feeding continuous ethanol fermentation using non-sterile cane molasses. Biotechnology Letters 12 (5): 367-372.

Chen, J. C. P. 1985. Cane sugar handbook: A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 11th ed. New York: John Wiley and Sons.

Chen, J. C. P. , and Chou, C. 1993. Cane sugar handbook: A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 12th ed. New York: John Wiley and Sons.

Difco manual, 10th ed. Detroit.

Doetsch, R. N. 1981. Determinative methods of light microscopy. In P. Gerhardt, et al. (eds.), Manual of methods for general bacteriology., pp. 21-33. Washington: American Society for Microbiology.

Essia Ngang, J. J. , Letourneau, F. , and Villa, P. 1989. Alcoholic fermentation of beet molasses : effects of lactic acid on yeast fermentation parameters. Applied Microbiology and Biotechnology 31: 125-128.

Essia Ngang, J. J. , Letourneau, F. , Wolniewicz, E. , and Villa, P. 1990. Inhibition of beet molasses alcoholic fermentation by lactobacilli. Applied Microbiology and Biotechnology 33: 490-493.

Gaden, E. L. , Jr. 1977. Fermentation process kinetics. In R. W. Thoma (ed), Industrial microbiology, pp. 252-268. USA:Dowden, Hutchison and Ross.

Gibbons, W. R. , and Westby, C. A. 1988. Preventing contamination during diffusion fermentation of fodder beet cubes by pH control. Biomass 16: 119-132.

Harrison, J. S. , and Graham, J. C. J. 1970. Yeast in distillery practice. In A. H. Rose , and J. S. Harrison (eds.), The yeasts, vol. 3, pp. 283-348. London: Academic Press.

Hodge, H. M. , and Hildebrandt, F. M. 1954. Alcoholic fermentation of molasses. In L. A. Underkofler. , and R. J. Hickey (eds.), Industrial fermentations, vol. 1, pp.73-93. New york: Chemical.

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

Kandler, O. , and Weiss, N. 1986. Regular, nonsporing Gram-positive rods. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2 , section 14. Baltimore: Williams and Wilkins.

Klaushofer, H. Hollaus, F. , and Pollach, G. 1971, June. Microbiology of beet sugar manufacture. Process Biochemistry:39-41.

Limtong, S. Saki, T. , and Taguchi, H. 1985. Effect of inorganic salts on ethanol production, medium on flocculation and simulation of ethanol production. Annual Reports of ICME 8:315-321.

Mahamontri, V. , Chavanich, S. , Nilubol, N. Ohta, K. , and Hayashida, S. 1982. Ethanol tolerant thermophilic *Saccharomyces* species. Annual Reports of ICME 5: 247-248

Maiorella, B. , Blanch, H. W. , and Wilke, C. R. 1983. By-product inhibition effects ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae.* Biotechnology and Bioengineering 15: 103-121.

Makanjuola, D. B. , Tymon, A. , and Springham, D. G. 1992. Some effects of lactic acid bacterria on laboratory-scale yeast fermentations. Enzyme Microbial technology 14: 350-357.

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

Meade, G. P. , and Chen, J. C. P. 1977. Cane sugar handbook: A manual for cane sugar manufacturers and their chemists. 10th ed. New York: John Wiley and Sons.

Oliva-neto, P. , and Yokoya, F. 1994. Evaluation of bacterial contamination in a fed-batch alcoholic fermentation process. World Journal of Microbiology and Biotechnology 10: 697-699.

Panchal, C. J. , and Stewart, G. G. 1981. Regulatory factors in alcohol fermentations. In G. Stewart, and I. Russell (eds.), Current developments in yeast research, pp. 9-15. Canada: Pergamon Press.

Patil, S. G. , and Patil, B. G. 1989. Top and bottom yeasts together accelerate ethanol production in molasses fermentation. Biotechnology Letters 11(5):359-364

Prescott, S. C. , and Dunn, C. G. 1959. Industrial microbiology. 3rd ed. New York: Magraw-Hill Book.

Priest, F. G. 1996. Gram-positive brewery bacteria. In F. G. Priest, and I. Campbell (eds.), Brewing microbiology. 2nd ed. , pp. 127-157. London: Chapman and Hall.

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

Reed, G. ,and Peppler, H. J. 1973. Yeast technology. Connecticut: AVI.

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.

Smibert, R. M. , and Krieg, N. R. 1981. General characterization. . In P. Gerhardt, et al. (eds.), Manual of methods for general bacteriology, p. 413 and 420. Washington: American Society for Microbiology.

Sneath, P. H. A. 1986. Endospore-forming Gram-positive rods and cocci. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology, vol. 2. , section 13. Baltimore: Williams and Wilkins.

Stanbury, P. F. , and Whitaker, A. 1984. Principles of fermentation technology. Oxford: Pergamon Press.

Tammarate, P. Taguchi, H. , and Kishimoto, M. 1987. Simulation of fed-batch culture against bacteria in ethanol fermentation from molasses. Annual Reports of ICME 10: 322-324.

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

Young, T. W. 1987. The biochemistry and physiology of yeast growth. In F. G. Priest , and I. Campbell (eds.), Brewing microbiology, pp. 15-44. London: Elsevier Applied Science.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast-Malt Extract (YM)

1.1 อาหารเหลว

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	3.0	กรัม
สารสกัดจากมอล์ (malt extract)	3.0	กรัม
เปปโตน	5.0	กรัม
เดกซ์โตรส	10	กรัม

pH 6.2

ละลายอาหารในน้ำขจัดไอออน 1 ลิตร ละลายให้เข้ากัน ใส่อาหาร YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 อาหารวุ้นแข็ง

เตรียมโดยเติมวุ้นผงปริมาณ 20 กรัม ลงในสูตรอาหารเหลวข้อ 1.1 ต้มให้วุ้นละลาย ใส่อาหารวุ้น YM ที่หลอมเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง (agar slant)

ปิเปตอาหารวุ้นที่หลอมเหลวจากข้อ 1.2 ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยฝาเกลียว นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองมาวางเอียงให้ผิวหน้าของอาหารมีความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร รอจนอาหารแข็งตัวจึงเก็บไว้ใช้ต่อไป

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

2.1 อาหารวุ้นแข็ง

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

โปรติโอสเปปโตน (bacto proteose peptone No.3)	10.0	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (bacto beef extract)	10.0	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (bacto yeast extract)	5.0	กรัม
เดกซ์โตรส	20.0	กรัม
ทวีน 80 (tween®80)	1.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	2.0	กรัม
แอมโมเนียมซิเตรต	2.0	กรัม
โซเดียมอะซิเตต	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	กรัม

pH 6.2-6.4

ละลายอาหาร 55 กรัม ในน้ำขจัดไอออน 1 ลิตร เติมวุ้นผงปริมาณ 15 กรัม ลงไป ต้มให้วุ้นละลาย ใส่อาหารวุ้น MRS ที่หลอมเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2.2 อาหารวุ้นแข็งลาดเอียง

ปิเปตอาหารวุ้นที่หลอมเหลวจากข้อ 2.1 ใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 16×150 มิลลิเมตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ปิดหลอดด้วยฝาเกลียว นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำหลอดทดลองมาวางเอียงให้ผิวหน้าของอาหารมีความยาวประมาณ 12 เซนติเมตร รอจนอาหารแข็งตัวจึงเก็บไว้ใช้ต่อไป

3. อาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอลสูตร M1 (Patil and Patil , 1989)

ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย

กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (total molasses reducing sugar)	180.0	กรัม
ยูเรีย	2.5	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต เฮปตะไฮเดรท	0.5	กรัม

pH 5.0

ใส่อาหารกากน้ำตาลปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วทรงกระบอกขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

4. อาหารกากน้ำตาลสำหรับหมักเอทานอลสูตร M2 (โรงงานสุรา กรมสรรพสามิต , สัมภาษณ์)

ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย

กากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (total molasses reducing sugar)	180.0	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	1.0	กรัม

pH 5.0

ใส่อาหารกากน้ำตาลปริมาตร 45 มิลลิลิตร ลงในขวดแก้วทรงกระบอกขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1. สารละลายแกรมคริสตัลไวโอเลต

ประกอบด้วย สารละลาย A :

คริสตัลไวโอเลต	2.0	กรัม
เอทานอล 95%	20.0	กรัม
สารละลาย B :		
แอมโมเนียมออกซาเลต	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ให้เข้ากัน

2. สารละลายแกรมไอโอดีน

ไอโอดีน	1.0	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

บดไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ให้ละเอียดแล้วค่อยๆ เติมน้ำลงไปทีละน้อยจนไอโอดีนละลายหมด เก็บในขวดแก้วสีน้ำตาล

3. สารละลายซาฟรานินโอ

ซาฟรานินโอ	0.25	กรัม
เอทานอล 95%	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

4. สารละลายมาลาไคท์กรีน 5%

มาลาไคท์กรีน	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

5. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3%

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 35%	1.71	มิลลิลิตร
น้ำขจัดไอออน	18.29	มิลลิลิตร

บรรจุในขวดแก้วสีน้ำตาลและเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

6. สารละลายเตตตระเมทิล พาราฟีนิล ไดเอมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ 1%

เตตตระเมทิล พาราฟีนิล ไดเอมีน ไดไฮโดรคลอไรด์	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ก่อนนำไปใช้ เก็บรักษาในตู้เย็น

7. สารละลายแอคติไดโอน (Kandler and Weiss , 1986 ; Makanjuola et al. , 1992)

ชั่งแอคติไดโอน 0.1 กรัม ละลายในเอทานอล 95% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ผสมกัน ปิเปตสารละลายแอคติไดโอนปริมาตร 0.75 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารวุ้นหลอมเหลวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนการ pour plate จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารแอคติไดโอนเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

8. สารละลายสเตรปโตมัยซินซัลเฟต (Difco manual)

ละลายสเตรปโตมัยซินซัลเฟต 1 กรัม ในน้ำขจัดไอออนที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายที่ได้ลง 10 เท่า ปิเปตสารละลายสเตรปโตมัยซินซัลเฟตปริมาตร 0.60 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารวุ้นหลอมเหลวที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 150 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันก่อนการ pour plate จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสเตรปโตมัยซินเท่ากับ 40 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

9. สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (3,5-dinitrosalicylic acid : DNSA reagent)

ละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 20.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและเติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร แล้วเติมโพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรท ($KNaC_4H_4O_6 . 4H_2O$) 30.0 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100.0 มิลลิลิตร ด้วยน้ำขจัดไอออน เก็บในขวดสีชา

10. สารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทส

ปิเปตสารละลายเอนไซม์อินเวอร์เทสปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ pH 4.0 (ภาคผนวก ข-13) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน เก็บไว้ในตู้เย็น

11. สารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน (internal standard)

สารมาตรฐานเปรียบเทียบภายในที่ใช้คือ โพรพานอล (n-propanal) เข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งสารละลายโพรพานอลบริสุทธิ์ที่ใช้ (99.5%) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มี

น้ำหนักเท่ากับ 0.8040 กรัม ดังนั้นปิเปตสารละลายโพรพานอลบริสุทธิ์ 3.7313 มิลลิลิตร ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำขจัดไอออนให้ครบ 100 มิลลิลิตร

12. สารละลายเอทานอลสัมบูรณ์มาตรฐาน 0 - 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

สารละลายเอทานอลสัมบูรณ์ (absolute ethanol) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มีน้ำหนักเท่ากับ 0.7908 กรัม ดังนั้นปิเปตสารละลายเอทานอลสัมบูรณ์มา 0.6323 , 1.2645 , 1.8968 , 2.5291 และ 3.1614 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับด้วยน้ำขจัดไอออนให้ครบ 25 มิลลิลิตร จะได้สารละลายเอทานอลสัมบูรณ์มาตรฐานเข้มข้น 20 , 40 , 60 , 80 และ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ปิเปตสารละลายเอทานอลสัมบูรณ์มาตรฐานที่ความเข้มข้นระดับต่างๆ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเกลียว เติมสารละลายมาตรฐานเปรียบเทียบภายในจากข้อ 8 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี

13. สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ pH เท่ากับ 4

ชั่งโซเดียมอะซิเตต ($CH_3COONa.3H_2O$) 11.628 กรัม และปิเปตสารละลายกรดอะซิติก ปริมาตร 0.86 มิลลิลิตร เติมน้ำขจัดไอออนปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 4.0 ด้วยสารละลายกรดอะซิติก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

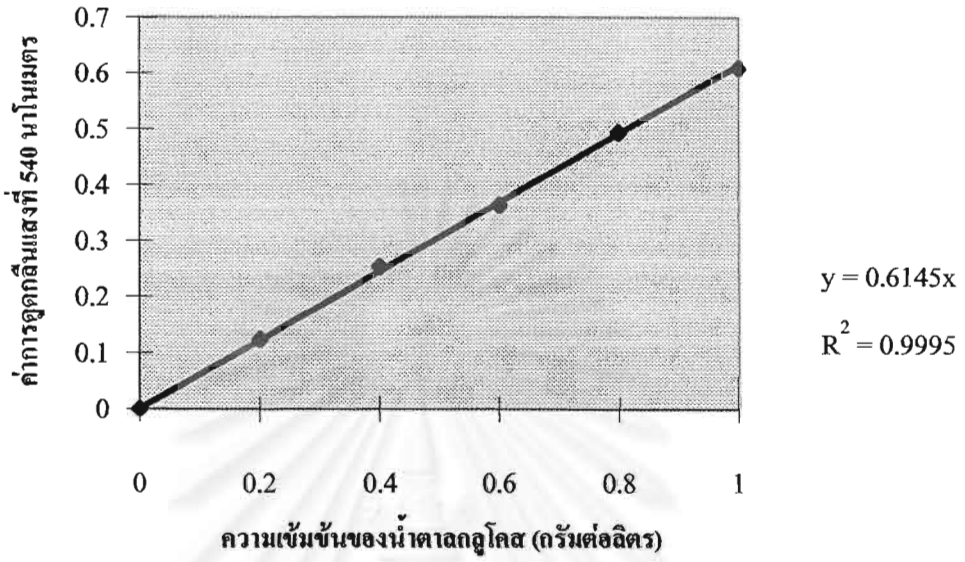
1. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ ค-1 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
0	0
0.2	0.125
0.4	0.255
0.6	0.365
0.8	0.495
1.0	0.610

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ ค-1 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 กรัมต่อลิตร



จากกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9995 ค่าความชันเท่ากับ 0.6145

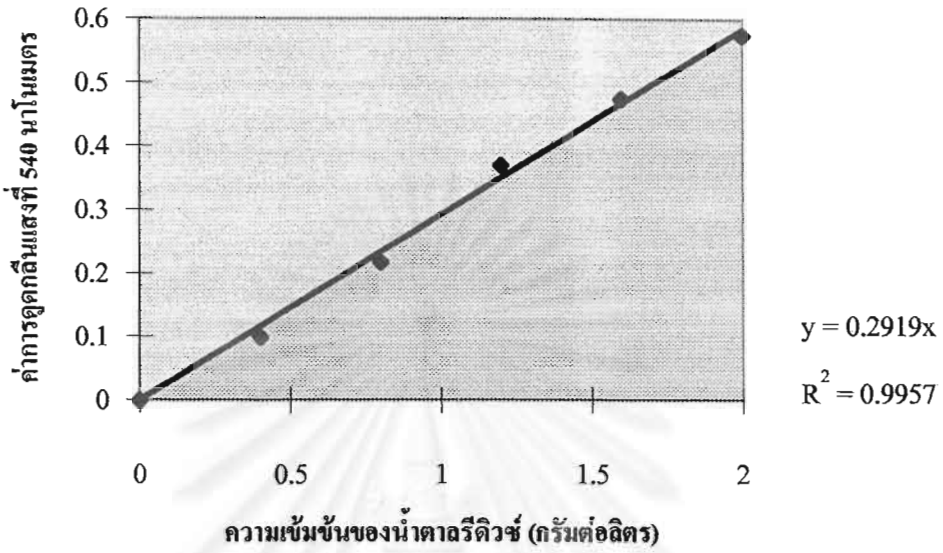
น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร × 1/ความชัน × ความเจือจาง

2. กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสโดยใช้เอนไซม์อินเวอร์เทส

ตารางที่ ค-2 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร

ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร
0	0
0.4	0.100
0.8	0.218
1.2	0.370
1.6	0.475
2.0	0.575

รูปที่ ค-2 กราฟมาตรฐานของน้ำตาลซูโครสในช่วงความเข้มข้น 0-2.0 กรัมต่อลิตร



จากกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณน้ำตาลซูโครสมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9957 ค่าความชันเท่ากับ 0.2919

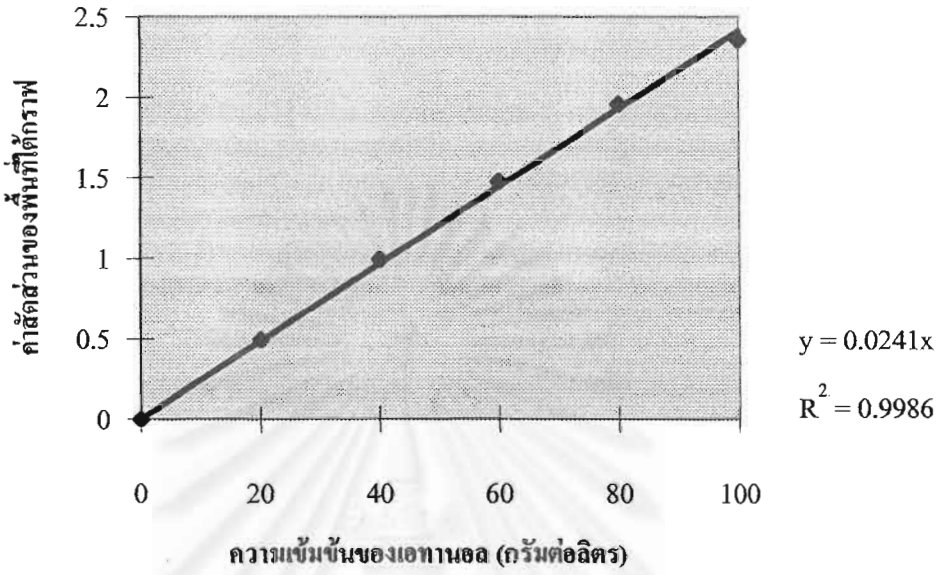
น้ำตาลซูโครสในรูปของน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร × 1/ความชัน × ความเจือจาง

3. กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอลสัมบูรณ์

ตารางที่ ค-3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอลกับค่าสัดส่วนของพื้นที่ใต้กราฟ

ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอลต่อพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายใน
0	0
20	0.4916
40	0.9912
60	1.4784
80	1.9578
100	2.3580

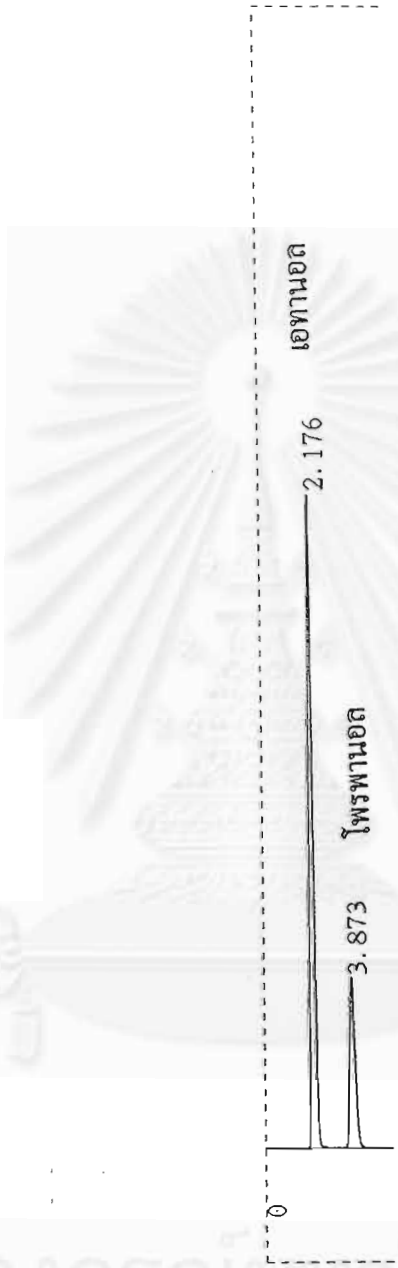
รูปที่ ค-3 กราฟมาตรฐานของเอทานอลสัมบูรณ์



จากกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณเอทานอลมีค่าสหสัมพันธ์เท่ากับ 0.9986 ค่าความชันเท่ากับ 0.0241

ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) = ค่าสัดส่วนพื้นที่ใต้ กราฟ × 1/ความชัน

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ ค-4 ลักษณะโครมาโทแกรมของเอทานอลเมื่อใช้โพรพานอลเป็นสารมาตรฐานเปรียบเทียบภายใน วิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง

การคำนวณ

1. เปอร์เซ็นต์ของแบคทีเรียเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น

$$\text{เปอร์เซ็นต์แบคทีเรียแต่ละกลุ่ม} = \frac{\text{จำนวนแบคทีเรียในแต่ละกลุ่ม}}{\text{จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด}} \times 100$$

2. ค่าจลนพลศาสตร์ของการหมักเอทานอล

การเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ log phase สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \qquad (1)$$

เมื่อ x = จำนวนเซลล์[6] (cell number) มีหน่วยเป็น เซลล์ต่อมิลลิลิตร

t = เวลา มีหน่วยเป็น ชั่วโมง

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็น ชั่วโมง$^{-1}$

เมื่ออินทิเกรท สมการ(1) จะได้

$$xt = x_0 e^{\mu t} \qquad (2)$$

x_0 = ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์เริ่มต้น

x_t = ความเข้มข้นของจำนวนเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา t ชั่วโมง

e = ฐานของ natural logarithm

ใส่ naturral logarithm ในสมการ (2) จะได้

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \qquad (3)$$

ดังนั้นอัตราการเจริญจำเพาะ $(\mu) = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{\Delta t}$

[6] งานวิจัยนี้วัดการเจริญโดยวิธีนับจำนวนเซลล์

การเกิด growth-linked product สามารถเขียนสมการได้ดังนี้คือ

$$\frac{dp}{dt} = \nu x \qquad (4)$$

เมื่อ p = ความเข้มข้นของผลผลิต

ν = อัตราจำเพาะของการเกิดผลผลิต (specific production rate)

นอกจากนี้การเกิดผลผลิตยังมีความสัมพันธ์กับการเกิดมวลเซลล์ซึ่งเขียนในรูปสมการได้ดังนี้

$$\frac{dp}{dx} = Y_{p/x} = \frac{\Delta p}{\Delta x} \qquad (5)$$

$Y_{p/x}$ = ปริมาณผลผลิต (yield of product) ต่อหน่วยสับเสตรทที่ถูกใช้ไป

เมื่อคูณสมการ (5) ด้วย $\frac{dx}{dt}$ จะได้

$$\frac{dp}{dt} = Y_{p/x} \cdot \frac{dx}{dt} \qquad (6)$$

แต่ $\frac{dx}{dt} = \mu x$

เพราะฉะนั้น

$$\frac{dp}{dt} = Y_{p/x} \cdot \mu x \qquad (7)$$

จากสมการ (4) และ (7) จะได้

$$\nu = Y_{p/x} \cdot \mu x$$

ดังนั้นอัตราการผลิตจำเพาะ (ν) = $\frac{\Delta p \cdot \mu}{\Delta x}$

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

ตารางที่ จ-1 จำนวนแบคทีเรียชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ คิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบ

โรงงานน้ำตาล	ครั้งที่ 1		ครั้งที่ 2	
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2
1. เชียงใหม่	กลมหยัก 15.00%	ขาวกลม 33.33%	ขาวจางกลม 38.10%	ขาวกลมมีจุดตรงกลาง 16.33%
	เอียงเล็ก 12.50%	จุดเล็กมีรัศมี 13.33%	ขาวกลมมีจุดตรงกลาง 14.29%	จุดขาวมีรัศมีแคบ 14.29%
	จุดเล็ก 10.00%	เอียงเล็ก 13.33%	ขาวมันไม่ย่น 14.29%	ขาวจางกลม 11.90%
	อื่นๆ 62.05%	อื่นๆ 40.00%	อื่นๆ 33.33%	อื่นๆ 59.18%
2.วนชัยอุตสาหกรรม	ขาวกลม 30.93%	ขาวกลม 22.22%	จุดเล็กมีรัศมี 35.0%	คาวมีรัศมี 26.19%
	คาวใหญ่ 9.28%	หยักกลมมีรัศมี 21.11%	ขาวกลม 17.5%	ขาวกลม 19.05%
	ขาวจาง กลม 8.25%	กลมเข้มมีรัศมีแคบ 6.67%	เอียงหยัก 12.5%	เอียงเล็ก 16.67%
	อื่นๆ 51.55%	อื่นๆ 50.00%	อื่นๆ 35.00%	อื่นๆ 38.10%

ตารางที่ จ-1 (ต่อ)

3.กำแพงเพชร	เอียง 43.53%	เอียง 43.28%	ดาว 42.35%	ขาวกลมเล็กมีรัศมี 35.82%
	จุดเล็กมีรัศมี 24.71%	จุดเล็กมีรัศมี 17.91%	ขาวกลม 9.41%	หยักเล็กมีรัศมี 8.96 %
	อื่นๆ 31.76%	อื่นๆ 38.81%	อื่นๆ 48.24%	อื่นๆ 55.22%
4.มิตรสยาม	จุดเล็กมาก 23.26%	ดาวจาง 22.58%	หยักเล็กมีรัศมีเข้ม 17.14%	หยักเล็กมีรัศมีเข้ม 20.69%
	ดาวจาง 16.28%	จุดเล็กมาก 19.35%	เอียงเล็ก 14.29%	เอียงเล็ก 20.69%
	ขาวกลมเข้ม 16.28%	โคโลนีด้านย่น 16.13%	กลมหยัก 14.29%	ขาวจางกลม 10.34%
	อื่นๆ 44.19%	อื่นๆ 41.94%	อื่นๆ 54.28%	อื่นๆ 48.28%
5.รวมผลอุตสาหกรรม นครสวรรค์	จุดเล็กมีรัศมี 24.07%	จุดเล็กมีรัศมี 13.79%	จุดขาวเข้มขนาดใหญ่ 20.0%	เอียงเล็ก 27.08%
	จุดเล็ก 16.67%	เอียงเล็ก 13.79%	จุดขาวเข้มขนาดเล็ก 12.73%	จุดเล็กมาก 12.5%
	เอียงเล็ก 14.81%	จุดเล็กปานกลาง 12.07%	หยักจางมีรัศมี 9.09%	ขาวกลมมีรัศมี 12.5%

ตารางที่ จ-1 (ต่อ)

	อื่นๆ 44.45%	อื่นๆ 60.34%	อื่นๆ 58.18%	อื่นๆ 47.92%
6.เกษตรไทย	ขาวกลม 48%	ขาวกลม 32.61%	กลมหยักมีรัศมี 31.58%	ขาวกลม 27.27%
	ขาวกลมมีรัศมี 17%	จุดเล็กจาง 23.91%	ขาวกลม 26.32%	เอียงหยัก 13.64%
	อื่นๆ 37.10%	อื่นๆ 43.48%	อื่นๆ 42.11%	อื่นๆ 59.09%
7.เกษตรผล	เอียงใหญ่ 29.10%	จุดใหญ่มีรัศมี 30.51%	เอียงหยัก 28.33%	เอียงหยัก 30.61%
	ขาวจางกลม 14.55%	ขาวกลม 16.95%	ขาวจางมีรัศมี 18.33%	กลมใสมีจุดเข้มตรงกลาง14.29%
	ดาว 9.09%	เอียงหยัก 5.25%	ดาว 11.67%	ขาวจางกลม 12.24%
	อื่นๆ 47.27%	อื่นๆ 37.29%	อื่นๆ 41.67%	อื่นๆ 42.86%
8.นิวกว้างสุ้นหลี	จุดเล็กมีรัศมี 16.67%	กลมหยัก 24%	ดาว 28.13%	ดาว 14.81%
	จุดใหญ่มีรัศมี 16.67%	จุดเล็กมีรัศมี 20%	ขาวกลม 12.5%	ขาวกลม 14.81%

ตาราง จ-1 (ต่อ)

	ขาวกลม 12.5%	เอียงหยัก 12%	กลมหยัก 9.38%	หยักจางมีรัศมี 14.81%
	อื่นๆ 54.17%	อื่นๆ 44%	อื่นๆ 49.99%	อื่นๆ 55.57%
9.ชลบุรี	ขาวกลมมีรัศมี 38.60%	จุดเล็กมีรัศมี 25.40%	หยักจางมีรัศมี 25.58%	ขาวจางกลม 26.53%
	ขาวกลม 22.81%	ขาวกลมมีรัศมี 14.29%	ขาวกลม 9.30%	เอียงจาง 8.16%
	อื่นๆ 38.60%	อื่นๆ 60.32%	อื่นๆ 65.12%	อื่นๆ 65.31%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวเกศกมล ไทยทอง เกิดวันที่ 3 เมษายน พ.ศ. 2517 ที่ อ. เมือง จังหวัดจันทบุรี สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2538 และได้เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต หลักสูตรเทคโนโลยีทางชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย