ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

ปริญญา

จุลชีววิทยา	จุลชีววิทยา
สาขา	**ภาควิชา**

เรื่อง การผลิตไบโอเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากน้ำอ้อยเข้มข้น โดยยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042

Bioethanol Production at High Temperature from Sugar Cane Syrup by Thermotolerant Yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042

นามผู้วิจัย นางสาวพจมาลย์ พิมพขันธ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์วิเชียร ยงมานิตชัย, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ศาสตราจารย์สาวิตรี ลิ่มทอง, Dr.Eng.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์ ร้อยเอกชัยวัฒน์ กิตติกูล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญจนา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ **เดือน** **พ.ศ.**

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การผลิตไบโอเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากน้ำอ้อยเข้มข้น โดยยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042

Bioethanol Production at High Temperature from Sugar Cane Syrup by Thermotolerant Yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042

โดย

นางสาวพจมาลย์ พิมพขันธ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พจมาลย์ พิมพขันธ์ 2555: การผลิตไบโอเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากน้ำอ้อยเข้มข้น โดยยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อาจารย์วิเชียร ยงมานิตชัย, Ph.D. 141 หน้า

Kluyveromyces marxisnus DMKU 3-1042 เป็นยีสต์ทนร้อนที่แยกได้ในประเทศไทย ซึ่งยีสต์ *K. marxisnus* DMKU 3-1042 มีความสามารถในการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง วัตถุประสงค์ของงานวิจัยเพื่อประเมินน้ำอ้อยเข้มข้นเป็นแหล่งคาร์บอนอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับการผลิตเอทานอลโดยน้ำอ้อยเข้มข้นคือ น้ำอ้อยความเข้มข้นที่มีน้ำตาลทั้งหมด 57.39 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย ซูโครส 53.62 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 2.27 เปอร์เซ็นต์ และฟรุกโทส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบแบทช์ พบว่ายีสต์ *K. marxisnus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้เท่ากับ 7.35 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 92.22 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎีในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 โดยไม่มีการให้อากาศ ในสภาวะที่อาหารไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งทำการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส สำหรับการหมักแบบเฟด-แบทช์ โดยใช้แผนการเติมอาหารแบบ sigmoidal increment feeding โดยหมักในสภาวะเดียวกัน พบว่า *K. marxisnus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้เท่ากับ 7.31 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเอทานอลเท่ากับ 93.59 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี สำหรับการหมักเอทานอลแบบรีพีทแบทช์ ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพในการหมักเนื่องจากช่วยลดระยะเวลาในการหมัก และหมักเอทานอลได้เร็วขึ้น ขณะที่การศึกษาการนำน้ำกากส่ากลับมาใช้ พบว่าการใช้น้ำกากส่า 30 เปอร์เซ็นต์ ช่วยปรับปรุงให้มีการผลิตเอทานอลที่เพิ่มขึ้น โดยให้เอทานอลได้เท่ากับ 6.90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเมื่อศึกษาการเก็บรักษาน้ำอ้อยเข้มข้นที่อุณหภูมิห้องโดยใช้สารกันบูด (preservative) ได้แก่ กรดเบนโซอิก โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ และการปรับลดพีเอชเท่ากับ 4.5 พบว่า ทั้ง 3 วิธีช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อยเข้มข้นได้

_____ _____ ___ / ___ / ___

ลายมือชื่อนิสิต ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Podchamarn Pimpakan 2012: Bioethanol Production at High Temperature from Sugar Cane Syrup by Thermotolerant Yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Mr. Wichien Yongmanitchai, Ph.D. 141 pages.

The thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 is a newly isolate strain from Thailand. It has an ability to produce ethanol in sugar cane syrup medium at elevated temperature. The objective of this study was to evaluate sugarcane syrup as an alternative carbon source for ethanol production. Sugarcane syrup is concentrated sugarcane juice containing 57.39 % total sugars, i.e. sucrose at 53.62 %, glucose 2.27 % and fructose 1.5 %. In batch fermentation, the results showed that *K. marxianus* DMKU 3-1042 produced 7.35 % (w/v) ethanol after 72 h., with productivity at 1.02 g/l/h and 92.22 % of theoretical yield in the medium containing 18 % sugar cane syrup, 0.05 % $(NH_4)_2SO_4$, 0.05 % KH_2PO_4, 0.1 % $MgSO_4.7H_20$ and initial pH at 4.5. Fermentation was carried out at 35°C without aeration and in non-sterile condition. In fed-batch fermentation using Sigmoid feeding scheme, *K. marxianus* DMKU 3-1042 produced 7.31 % (w/v) ethanol after 72 h., with productivity at 1.02 g/l/h and fermentation yield of 93.59 % of theoretical yield under the same condition. Repeated batch fermentation improved fermentation efficiency due to shorten fermentation time resulting in rapid ethanol fermentation. Recycling of spent liquor was determined in order to reduce the burden of high cost waste water treatment. Results showd that reuse of upto 30 % spent liquor improve ethanol yields to 6.90 % (w/v). Preservations of the syrup using benzoic acid, potassium metabisulphite and lowering pH to 4.5 inhibited contamination of bacteria in sugar cane syrup.

_____ _____ ___ / ___ / ___

Student's signature Thesis Advisor's signature

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.วิเชียร ยงมานิตชัย ประธานกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ศาสตราจารย์ ดร. สาวิตรี ลิ่มทอง กรรมการที่ปรึกษาสาขาวิชาเอก ที่ให้คำปรึกษา ความช่วยเหลือ และคำแนะนำในการแก้ไขปัญหาในการทำการทดลอง ตลอดจนตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆในวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประศาสตร์วิชาความรู้แก่ผู้วิจัย จนกระทั่งสำเร็จการศึกษา ขอขอบคุณบุคลากร เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ ขอขอบคุณเพื่อน พี่ น้อง ห้องแลป 4410 และห้อง 4408 ทุกท่าน ที่คอยให้การช่วยเหลือในเรื่องอุปกรณ์ และคอยเป็นกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยในระหว่างการทำวิจัย ขอขอบคุณ ศิริวัฒน์ คูเจริญไพบูลย์ ที่คอยให้คำแนะนำ การช่วยเหลือ และให้ความรู้เพิ่มเติมต่างๆในระหว่างที่ทำงานวิจัย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ป้า และพี่ชาย ที่ให้การสนับสนุนให้ผู้วิจัยได้มีโอกาสในการเรียนรู้ และเป็นกำลังใจสำคัญให้แก่ผู้วิจัยมาโดยตลอด ประโยชน์และความดีอันเนื่องมาจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่ คุณพ่อ คุณแม่ ป้า คณาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ได้เมตตาอบรมสั่งสอนและให้ความรู้ มาจนถึงปัจจุบัน

พจมาลย์ พิมพขันธ์

มีนาคม 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบาญ

หน้า

สารบาญ	(1)
สารบาญตาราง	(2)
สารบาญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	41
อุปกรณ์	41
วิธีการ	44
ผลและวิจารณ์	62
สรุปและข้อเสนอแนะ	121
สรุป	121
ข้อเสนอแนะ	123
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	124
ภาคผนวก	137
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	141

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบาญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1	การเจริญ ระยะเวลาในการหมักและปริมาณน้ำตาลที่เหลือต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารที่มีซูโครสความเข้มข้นต่างๆ	11
2	สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล	18
3	สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส	21
4	จำนวนโรงงานและกำลังการผลิตเอทานอล แบ่งตามชนิดของวัตถุดิบ	26
5	ลักษณะของน้ำกากส่าที่เกิดขึ้นจากการใช้ cane molasses และ beet molasses เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักเอทานอล	38
6	เวลาและปริมาตรของอาหารที่เติมแบบ linear increment feeding	49
7	เวลาและปริมาตรอาหารที่เติมแบบ exponential increment feeding	51
8	เวลาและปริมาตรของอาหารที่เติมแบบ sigmoidal increment feeding	53
9	ผลของแอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟต ต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042	73

ตารางผนวกที่

1	แสดงปริมาณน้ำกากส่าในสัดส่วนที่แตกต่างกัน	140

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบาญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	รูปแบบการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส	8
2	การหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส	9
3	การหมักเอทานอลจากกลูโคส	9
4	วิถี Embden-Meyerhof-Parnas pathway	10
5	กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย	29
6	การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลจากน้ำอ้อยดิบโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	64
7	การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	65
8	ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 จากอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 2 4 6 8 10 12 14 16 และ 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	67

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
9	การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* DMKU3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ (a) 30 องศาเซลเซียส (b) 35 องศาเซลเซียส และ(c) 40 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ	76
10	การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่มีอัตราการให้อากาศ (a) 0.1 vvm (b) 0.2 vvm และ (c) ไม่มีการให้อากาศ โดยหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที	81
11	การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ (a) พีเอช 4.0 (b) พีเอช 4.5 และ (c) พีเอช 5.0 โดยหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ไม่มีการให้อากาศ	85

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
12	การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 ไม่มีการให้อากาศ และมีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที (a) อาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (b) อาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ	89
13	เปรียบเทียบ การเจริญ (a) การใช้น้ำตาล (b) และการหมักเอทานอล (c) โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในการหมักแบบ batch และ linear feeding fed-batch ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร และบ่มบนเครื่องเขย่าที่ใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	92
14	เปรียบเทียบการเจริญ (a) การใช้น้ำตาล (b) และการหมักเอทานอล (c) โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในการหมักแบบ batch และ exponential feeding fed-batch ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร และบ่มบนเครื่องเขย่าที่ใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	95
15	เปรียบเทียบการเจริญ (a) การใช้น้ำตาล (b) และการหมักเอทานอล (c) โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในการหมักแบบ batch และ sigmoidal feeding fed-batch ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร และบ่มบนเครื่องเขย่าที่ใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส	98

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

16 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยใช้เทคนิคการหมักแบบ Exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 ครั้ง (a) และการหมักแบบ Sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง (b) ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ 103

17 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยการหมักแบบแบทช์ ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ 107

18 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยการหมักแบบ Sidmoidal feeding fed-batch ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ 108

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
19	การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3 -1042 โดยใช้การหมักแบบรีพีทแบทช์ ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่ให้อากาศ อาหารผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที	113
20	การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยใช้การหมักแบบรีพีทแบทช์ ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่ให้อากาศ โดยอาหารไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที	114
21	การหมักเอทานอล การเจริญ และน้ำตาลคงเหลือของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในอาหารหมักที่มีการผสมน้ำกากส่าในปริมาณ 10 20 30 40 50 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นน้ำตาลรวมกันทั้งหมด 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 อาหารที่ใช้หมัก 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที	117

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารบาญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	การเจริญของเซลล์แบคทีเรียในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นบนอาหาร nutrient agar (NA) โดยใช้วิธีการ spread plate เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยการปรับสภาพที่แตกต่างกันได้แก่ น้ำอ้อยเข้มข้น น้ำอ้อยเข้มข้นปรับพีเอช เท่ากับ 4.5 น้ำอ้อยเข้มข้นเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 200 พีพีเอ็ม และน้ำอ้อย เข้มข้นเติมกรดเบนโซอิก 200 พีพีเอ็ม	120

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การผลิตไบโอเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากน้ำอ้อยเข้มข้น โดยยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042

Bioethanol Production at High Temperature from Sugar Cane Syrup by Thermotolerant Yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042

คำนำ

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) คือสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ ประกอบไปด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน มีสูตรโครงสร้างทางเคมี C_2H_5OH สามารถนำมาใช้ประโยชน์เพื่อการบริโภค เช่น เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ได้แก่ ไวน์ สุรา และเบียร์ และใช้เพื่อเป็นพลังงานทางเลือก ได้แก่ การใช้เอทานอลเป็นแหล่งเชื้อเพลิงโดยตรง เรียกว่า อี 100 (E100) ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (gasohol) หรือผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์ (diesohol) นอกจากนั้นเอทานอลในรูปของ ethyl tertiary butyl ether (ETBE) ยังใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนของน้ำมันให้กับเครื่องยนต์

เอทานอลมีกระบวนการผลิต 2 วิธี ได้แก่ การสังเคราะห์ทางเคมี และการใช้วิธีการทางชีวภาพผ่านกระบวนการหมัก โดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบประเภทแป้ง น้ำตาล หรือเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบ และอาศัยเอนไซม์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ช่วยให้เกิด ปฏิกิริยาการเปลี่ยนวัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบได้เป็นเอทานอล เรียกว่า ไบโอเอทานอล (bioetanol)

ปัจจุบันหลายประเทศเช่น ประเทศบราซิล จีน ฝรั่งเศส อังกฤษ อินเดีย และแอฟริกาใต้ มีการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิง เนื่องจากภาวะเศรษฐกิจที่เกิดจากราคาน้ำมันดิบที่สูงขึ้น โดยกระบวนการผลิตเอทานอลนิยมใช้วิธีการหมัก พบว่า 60 เปอร์เซ็นต์ทั่วโลก มีการผลิตเอทานอลจากพืชที่มีน้ำตาล ได้แก่ กากน้ำตาล ขณะที่ประเทศแถบยุโรป ใช้ผักกาดหวาน (sugar beet) และข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum) เป็นวัตถุดิบ (Kumar *et al.,* 2010)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประเทศไทยก็ประสบปัญหาราคาน้ำมันจากปิโตรเลียมที่สูงขึ้นเช่นกัน เนื่องจากต้องนำเข้าจากต่างประเทศเกือบทั้งหมด รัฐบาลจึงมีนโยบายส่งเสริมให้ผู้บริโภคมีการใช้พลังงานทดแทน เช่น เอทานอลเพิ่มมากขึ้น ทำให้การผลิตและใช้เอทานอลเป็นพลังงานร่วมกับการใช้กับน้ำมันเบนซินในประเทศไทยได้รับความสนใจเพิ่มมากขึ้น และเนื่องจากเอทานอลเป็นแหล่งพลังงานที่สะอาดและช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม โดยสามารถช่วยลดการปล่อยก๊าซเรือนกระจกได้ จึงเป็นแหล่งพลังงานที่น่าสนใจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งประเทศไทยเป็นประเทศที่มีวัตถุดิบทางการเกษตรที่หลากหลายและสามารถนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลได้ เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด อ้อย กากน้ำตาล น้ำอ้อย และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร

ปัจจุบันการผลิตเอทานอลในประเทศไทยส่วนใหญ่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณกากน้ำตาลยังไม่เพียงพอต่อความต้องการที่จะนำไปใช้เป็นวัถตุดิบในกระบวนการหมักต่างๆ ได้แก่ อุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมอาหารสัตว์ ขณะที่มันสำปะหลังมีราคาถูก แต่มีความยุ่งยากในการนำมาใช้ เนื่องจากต้องมีการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล ซึ่งต้องมีต้นทุนในการผลิตเพิ่มขึ้น ขณะที่เทคโนโลยีในการหมักเอทานอลในประเทศไทยยังไม่สมบูรณ์ สำหรับน้ำอ้อยแม้จะยังไม่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอล แต่จากรายงานของปราโมทย์และคณะ (2536) พบว่าน้ำอ้อยสามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่ากากน้ำตาล และมีน้ำตาลคงเหลือในน้ำหมักน้อยกว่า อย่างไรก็ตามข้อเสียของน้ำอ้อยคือ มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 12–17 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ยากต่อการเก็บรักษา โดยเฉพาะการเก็บปริมาณมากตลอดทั้งปี ดังนั้นเพื่อแก้ปัญหาในเรื่องการเก็บรักษาน้ำอ้อย จึงได้นำน้ำอ้อยที่เกิดจากการระเหยเอาน้ำออก ที่เรียกว่าน้ำอ้อยเข้มข้น (syrup) จากกระบวนการผลิตน้ำตาลมาทดลองใช้สำหรับการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์หลักที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอลโดยทั่วไปได้แก่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง ดังนั้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจะลดลงอย่างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ประเทศไทยมีอุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ขณะที่ฤดูร้อนจะมีอุณหภูมิสูงประมาณ 35-40 องศาเซลเซียส ดังนั้นการใช้ยีสต์ทนร้อนซึ่งเจริญและหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง แต่ยังคงเจริญและหมักเอทานอลได้ถึงแม้มีอุณหภูมิสูงขึ้น (Limtong, 1987) จึงน่าจะเหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลในประเทศไทย Limtong *et al.* (2007) ได้มีการแยกยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 โดยเทคนิค

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

enrichment ในอาหารน้ำอ้อยที่เติมเอทานอล 4 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยยีสต์ชนิดนี้สามารถหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง 40–45 องศาเซลเซียส

ดังนั้นจึงควรมีการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่ทนอุณภูมิสูงที่คัดแยกได้ในประเทศไทย เพื่อสร้างเป็นต้นแบบเทคโนโลยีสำหรับการผลิตเอทานอลที่เหมาะสมกับประเทศไทย โดยการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมนั้น สิ่งสำคัญคือต้นทุนการผลิตต้องต่ำ ซึ่งเกิดได้จากการเพิ่มผลผลิตการหมัก (fermentation yield) และเพิ่มประสิทธิภาพการหมัก (productivity) รวมทั้งลดค่าใช้จ่ายในการผลิต เช่น การลดอุณหภูมิของถังหมัก การกลั่นที่มีประสิทธิภาพ และการลดปริมาณน้ำเสีย ซึ่งสิ่งเหล่านี้เกิดได้หากทำการหมักที่อุณหภูมิสูง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาหาสภาวะและกระบวนการหมักที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากน้ำอ้อยเข้มข้น โดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* DMKU3-1042

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดยการใช้เทคนิคการหมักแบบแบทช์ เฟด-แบทช์ และแบบรีพีทแบทช์ และการนำน้ำกากส่ากลับมาใช้ที่อุณหภูมิสูงในระดับห้องปฏิบัติการ

3. เพื่อศึกษาคุณภาพของน้ำอ้อยเข้มข้นที่เก็บในอุณหภูมิห้องโดยวิธีต่างๆ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การตรวจเอกสาร

เอทานอล

เอทานอล หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) คือสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ ที่ประกอบไปด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน มีสูตรโครงสร้างทางเคมี C_2H_5OH และมีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 เอทานอลเป็นของเหลวใสไม่มีสี จุดไฟติด ระเหยง่าย สามารถละลายน้ำ และสารอินทรีย์อื่นได้ดีให้ค่าพลังงานความร้อน (calorific value) โดยการเผาไหม้ประมาณ 12,800 บีทียูต่อปอนด์ มีจุดเดือด 78 องศาเซลเซียส จุดเยือกแข็ง -117.3 องศาเซลเซียส และมีค่าความถ่วงจำเพาะ 0.794 ที่ 60 องศาฟาเรนไฮด์

เอทานอลที่นำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเรียกว่า เอทานอลไร้น้ำ (anhydrous ethanol) หรือที่รู้จักว่า เอทานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol) ประกอบด้วยความเข้มข้นเอทานอลอย่างน้อย 99.5 เปอร์เซ็นต์ มีน้ำเป็นส่วนประกอบได้สูงสุด 0.5 เปอร์เซ็นต์ (Kumar *et al.,* 2010) โดยสามารถนำมาใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิงได้ 3 รูปแบบ ได้แก่

1. เอทานอลใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล
2. เอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (gasohol) หรือเอทานอลผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์ (diesohol)
3. เอทานอลมี ethyl tertiary butyl ether (ETBE) ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนของน้ำมันให้กับเครื่องยนต์

ข้อดีของเอทานอล คือ มีส่วนผสมของออกซิเจน ซึ่งในน้ำมันปิโตรเลียมไม่มี ดังนั้นเมื่อผสมเอทานอลในน้ำมันปิโตรเลียมเพื่อใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิง นอกจากจะใช้เป็นสารทดแทนปิโตรเลียมบางส่วนแล้วยังมีคุณสมบัติเป็นสารเติมออกซิเจนและช่วยเพิ่มค่าออกเทน สำหรับส่วนที่เหลือจากการเผาไหม้ เมื่อออกสู่บรรยากาศจะมีปริมาณออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น ส่วนมลพิษจากไฮโดรคาร์บอน คาร์บอนมอนนอกไซด์ ปริมาณฝุ่นและควันดำลดลง ด้วยเหตุนี้การเผาไหม้ของ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอทานอลจึงสะอาดกว่าการเผาไหม้ของน้ำมันเบนซิน นอกจากเอทานอลจะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงโดยการใช้เอทานอลผสมน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซล หรือใช้เอทานอลล้วนๆ เพื่อเป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันเบนซิน เอทานอลยังถูกนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้แก่

1. อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ต่างๆ ใช้เป็นส่วนผสมหลักในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น ไวน์ สุรา บรั่นดี และเบียร์
2. อุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้
3. อุตสาหกรรมเครื่องสำอางค์ เป็นส่วนประกอบในการทำเครื่องสำอางค์ เช่น น้ำหอม แชมพูสระผม และน้ำยาบำรุงผิว
4. อุตสาหกรรมอาหาร ใช้เป็นตัวทำละลายสีสำหรับใส่อาหาร และใช้เป็นสารเริ่มต้นในการทำกรดน้ำส้ม
5. ด้านการแพทย์ ใช้เป็นสารสำหรับเก็บรักษาอวัยวะต่างๆ ของร่างกายมิให้เน่าเปื่อย และตัวอย่างต่างๆ ที่ต้องใช้ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ รวมทั้งใช้เป็นตัวทำละลายเวชภัณฑ์ที่มีอำนาจในการฆ่าแมลง ฆ่าเชื้อโรค ฆ่าเชื้อรา และยาดับกลิ่น และใช้เป็นส่วนประกอบในการผสมยาต่างๆ
6. อุตสาหกรรมการผลิตสี เป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิตสี เป็นตัวทำละลายของน้ำยาเคลือบ น้ำมันชักเงา และน้ำยาแลกเกอร์

การผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรม สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีดังนี้

<u>วิธีที่ 1</u> ได้แก่ การใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์เอทานอล โดยใช้เอทิลีน (ethylene) เป็นวัตถุดิบ เอทานอลที่ได้จากกระบวนการนี้ เรียกว่า เอทานอลสังเคราะห์ (synthetic ethanol) ซึ่งวิธีการสังเคราะห์ทางเคมีทำได้โดย นำเอทิลีนซึ่งเป็นก๊าซที่เป็นผลพลอยได้จากการกลั่นน้ำมันดิบทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถัน ได้สารผสมของเอทิลซัลเฟต (ethylsulfate) จากนั้นนำไปไฮโดรไลซ์ (hydrolyze) จนได้เอทานอลกับกรดกำมะถันเจือจาง แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นอีกครั้งหนึ่ง นอกจากนี้ยังอาจสังเคราะห์ได้โดยการนำเอาเอทิลีนมาทำปฏิกิริยาไฮไดรชัน (hydration) โดยมีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังแสดงในสมการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$CH_2=CH_2 + H_2O \longrightarrow CH_3CH_2OH$$

เอทิลีน เอทานอล

<u>วิธีที่ 2</u> ได้แก่ การใช้วิธีการทางชีวเคมีหรือวิธีการหมักเพื่อการผลิตเอทานอล โดยใช้วัตถุดิบทางการเกษตรที่มีองค์ประกอบประเภทแป้ง น้ำตาล หรือเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบ และจุลินทรีย์ โดยอาศัยเอนไซม์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ช่วยให้เกิดปฏิกิริยา การเปลี่ยนวัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเป็นเอทานอล เอทานอลที่ได้จากวิธีการทางชีวเคมีนี้ เรียกว่า ไบโอเอทานอล (bioetanol)

ชีวเคมีการหมักเอทานอล

การหมักเอทานอลโดยใช้วิธีทางชีวเคมี เป็นกระบวนการที่อาศัยจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยที่น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล ซึ่งการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของจุลินทรีย์จะกระทำภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยและมีสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปจะใช้เวลาในการหมัก 2–3 วัน ซึ่งจะได้เอทานอลความเข้มข้น 8–12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (ยุทธศักดิ์, 2549)

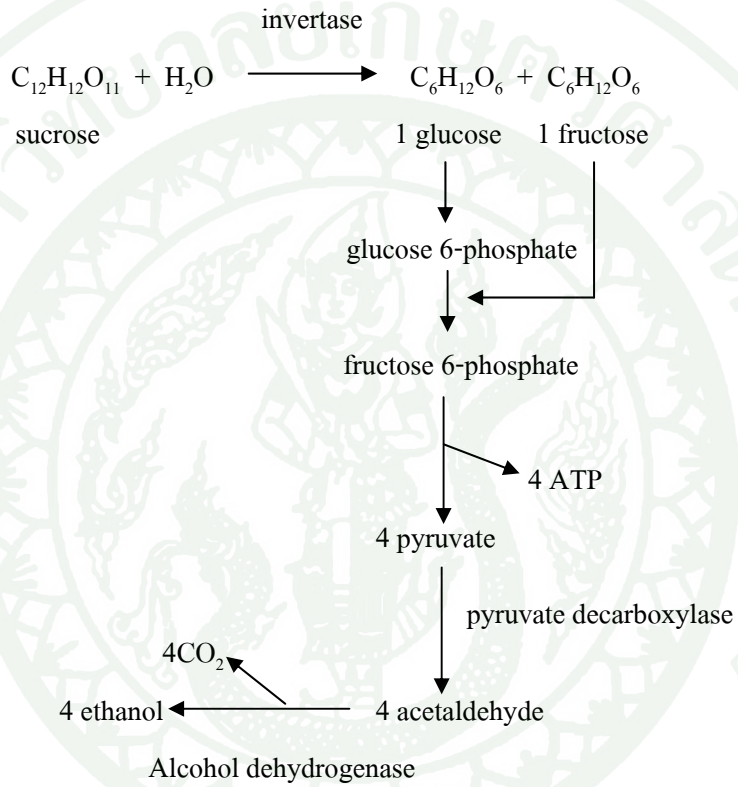
เอทานอลเกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลโดยจุลินทรีย์ ซึ่งอาจเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือโมเลกุลคู่ วัตถุดิบที่นำมาใช้สำหรับการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จะมีซูโครสเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ อ้อย (sugar cane) ผักกาดหวาน (sugar beet) ข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum) และกากน้ำตาล (molasses) เนื่องจากซูโครสไม่สามารถเข้าสู่กระบวนการหมักได้ ดังนั้นจึงต้องอาศัยปฏิกิริยาของเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในยีสต์ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการสลาย (hydrolysis) ซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้แก่กลูโคสและฟรุกโทส (Kumar *et al.,* 2010) ดังสมการที่ 1

$$C_{12}H_{12}O_{11} + H_2O \xrightarrow{\text{invertase}} C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6 \quad (1)$$

ซูโครส กลูโคส ฟรุกโทส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากนั้น กลูโคสและฟรุกโทสจะถูกหมักไปเป็นเอทานอลโดยผ่านวิถีทาง Embden-Meyerhof-Parnas pathway จะเกิดขึ้นภายในเซลล์ยีสต์โดยอาศัยเอนไซม์ต่างๆ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและเกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นไพรูเวท (pyruvate) จากนั้นไพรูเวทเกิด decarboxylation โดยอาศัยเอนไซม์ pyruvate decarboxylase เป็นตัวเร่งการสร้างacetaldehyde ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา



ภาพที่ 1 รูปแบบการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส

ที่มา: ดัดแปลงจาก Murphy and Mccarthy (2005)

กระบวนการหมักที่ได้ผลผลิตเป็นเอทานอลโดยยีสต์ จากวิถีทาง glycolysis ที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังแสดงในภาพที่ 2

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

$$C_{12}H_{12}O_{11} + H_2O \xrightarrow{\text{yeast}} C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 4C_2H_5OH + 4CO_2 + 4ATP$$

ซูโครส	น้ำ	กลูโคส	ฟรุกโทส	เอทานอล	คาร์บอนไดออกไซด์
342 กรัม		180 กรัม	180 กรัม	4×46 กรัม	4×44 กรัม
คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับน้ำตาลซูโครส				0.5380 กรัม	0.5146 กรัม

ภาพที่ 2 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส

ที่มา: ดัดแปลงจาก Murphy and Mccarthy (2005)

อย่างไรก็ตามในทางทฤษฎีการหมักเอทานอลจากกลูโคส 1 กรัม ให้เอทานอล 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.489 กรัม แสดงเป็นค่าผลผลิตทางทฤษฎี (theoretical yield) สำหรับการผลิตเอทานอลเท่ากับ 51.1 เปอร์เซ็นต์ แต่เนื่องจากอาจมีบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้บางชนิด เช่น กลีเซอรอล ซักซิเนต แอลกอฮอล์ที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ (higher alcohol) หรือฟลูเซลออลย์ (fusel oil) จึงทำให้เอทานอลที่ได้ต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎี ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ได้จะอยู่ในช่วงไม่เกิน 90–95 เปอร์เซ็นต์ของค่าผลผลิตทางทฤษฎี โดยผลผลิตพลอยได้ที่ถูกสร้างขึ้นจะเกิดจากการใช้สับสเตรต 4–5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถ้ามีการป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างผลผลิตพลอยได้ จะทำให้ได้เอทานอลเพิ่มขึ้น 2.7 เปอร์เซ็นต์ แต่ในปัจจุบันการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจะได้เอทานอลเพียง 80–90 เปอร์เซ็นต์ (สาวิตรี, 2549) ดังแสดงในภาพที่ 3

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{yeast}} 2\,C_2H_5OH + 2\,CO_2 + 2\,ATP$$

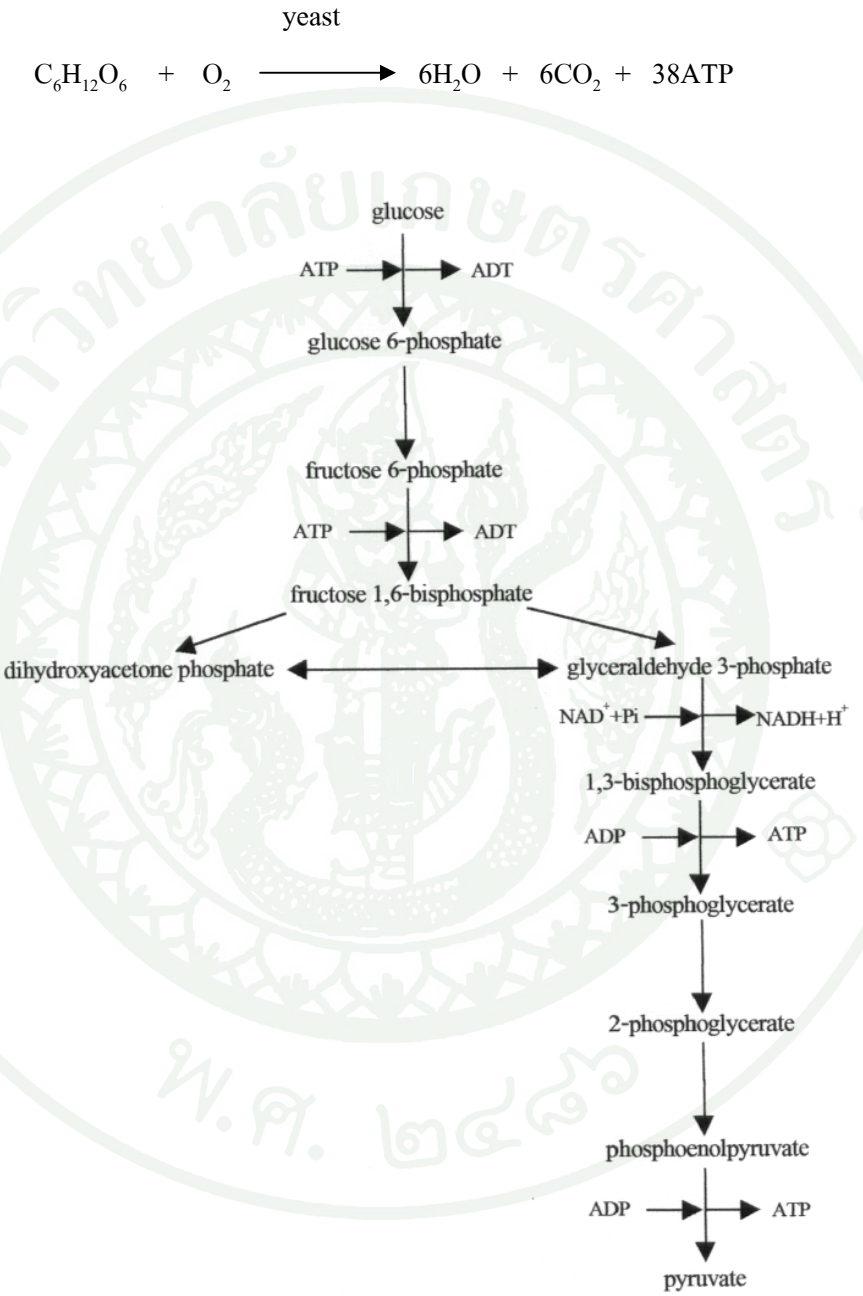
กลูโคส	เอทานอล	คาร์บอนไดออกไซด์
180 กรัม	2×46 กรัม	2×44 กรัม
คิดเป็นผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลกลูโคส	0.5110 กรัม	0.4890 กรัม

ภาพที่ 3 การหมักเอทานอลจากกลูโคส

ที่มา: สาวิตรี (2549)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขณะที่ในสภาวะที่มีอากาศยีสต์จะใช้กลูโคสในกระบวนการหายใจเพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ ได้เป็นน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานในรูป ATP ดังนี้



ภาพที่ 4 Embden-Meyerhof-Parnas pathway

ที่มา: Horton *et al.* (2002)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอล

1. ความเข้มข้นของน้ำตาล

การใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 14 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก มีผลในการยับยั้งการเจริญ ผลผลิตเอทานอล (yield) ซึ่งมีสาเหตุจากแรงดันออสโมซิสส่งผลกระทบต่อเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการขาดน้ำและปัญหาทางด้านการแพร่ การยับยั้งลักษณะนี้เรียกว่า Crabtree effect หรือ glucose effect (สาวิตรี, 2549)

การใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงจะมีผลกระทบต่อการลดกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีการหมัก (fermentative pathway) โดยการยับยั้งที่เกิดจากน้ำตาลขึ้นอยู่กับความทนต่อการยับยั้งน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างกันของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ โดยทั่วไปจะพบที่ 150 กรัมต่อลิตรกลูโคส ขณะที่บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูง 250 กรัมต่อลิตร หรือสูงกว่า 500 กรัมต่อลิตรน้ำตาล (Osho, 2005) อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูงกว่า 500 กรัมต่อลิตร พบว่ามีค่า water activity ต่ำมาก ซึ่งไม่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์

Breisha (2010) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของซูโครสต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่แตกต่างกันได้แก่ 50 100 150 200 250 กรัมต่อลิตร ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเจริญ ระยะเวลาในการหมักและปริมาณน้ำตาลที่เหลือจากการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* ในอาหารที่มีซูโครสความเข้มข้นต่างๆ

ซูโครส (กรัม/ลิตร)	ระยะเวลาที่ใช้หมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ cfu/ml)	น้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)
50	24	150	0	2.40
100	24	155	0	5.00

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ซูโครส (กรัม/ลิตร)	ระยะเวลาที่ใช้หมัก (ชั่วโมง)	จำนวนเซลล์ ($\times 10^6$ cfu/ml)	น้ำตาลที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)
150	38	120	0	6.80
200	72	100	0	8.70
250	72	22	130	4.50

ที่มา: Breisha (2010)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อปริมาณซูโครสเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นเอทานอลก็เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ จนกระทั่งที่ความเข้มข้นซูโครส 200 กรัมต่อลิตร หรือ 20 เปอร์เซ็นต์ ซูโครส ยีสต์ *S. cerevisiae* มีความสามารถในการหมักซูโครสได้อย่างสมบูรณ์และให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดเท่ากับ 8.7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในขณะที่เมื่อเพิ่มซูโครสเป็น 250 กรัมต่อลิตร การเจริญของยีสต์และความเข้มข้นเอทานอลลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นซูโครส 200 กรัมต่อลิตร ลักษณะนี้เกิดจากความเข้มข้นซูโครสสูงมีผลยับยั้งการเจริญของเซลล์และทำให้กระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ยีสต์ผิดปกติ เนื่องจากเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลภายในเซลล์ได้รับความเสียหาย ทำให้ยับยั้งปฏิกิริยาต่างๆ ภายในวิถี Embden-Meyerhof-Parnas โดยการยับยั้งเกิดจากแรงดันออสโมซิสมีผลให้เซลล์ยีสต์ขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการรักษาสภาพของเซลล์ เนื่องจากแรงดันออสโมซิสจะไปมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะแข็ง (rigid) จึงมีผลกระทบต่อการนำสารเข้าไปในเซลล์ การหมักเอทานอลจะลดลงเมื่อน้ำตาลมีความเข้มข้นสูงกว่า 22 เปอร์เซ็นต์ (Limtong *et al.,* 2007) และเกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์อย่างสมบูรณ์เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 40 เปอร์เซ็นต์ (Thatipamala *et al.,* 1992)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ความเข้มข้นของเอทานอล

เอทานอลเป็นผลิตผลที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ของเซลล์ยีสต์ ปริมาณความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงไม่เพียงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเซลล์และการผลิตเอทานอลเท่านั้น แต่ยังส่งผลในการยับยั้งระบบการขนส่งกลูโคสและกรดอะมิโนต่างๆ ซึ่งนำไปสู่ความผิดปกติของกระบวนการเมแทบอลิซึมและการจัดสรรพลังงานภายในเซลล์ยีสต์ (Santos *et al.,* 2008) โดยเป้าหมายหลักที่จะได้รับผลกระทบจากความเข้มข้นของเอทานอลในปริมาณที่สูงคือเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้อัตราการผลิตเอทานอลและการรอดชีวิต (viability) ลดลงเมื่อมีการสะสมของเอทานอลในน้ำหมัก อย่างไรก็ตามมีรายงานจำนวนมากพบว่า ความสามารถในการทนเอทานอลได้สูงจะเกี่ยวข้องกับองค์ประกอบต่างๆภายในเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) (Cot *et al.*, 2007) ปริมาณเออร์โกสเตอรอล (ergosterol) (Aguilera *et al.,* 2006)

You *et al.* (2003) พบว่า กรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดพาล์มิโตเลอิก (palmitoleic, C 16:1) และกรดโอเลอิก (oleic, C 18:1) จะเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ในการต่อต้านการยับยั้งที่เกิดจากปริมาณเอทานอลที่สูง ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้ง 2 ชนิดจะช่วยทดแทนสภาพของไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ (plasma membrane) ที่ลดลงให้เพิ่มขึ้น โดยจะพบปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้ง 2 ชนิดนี้ในสายพันธุ์ยีสต์ที่มีความสามารถในการทนเอทานอลได้สูง ซึ่งจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากความเครียดจากเอทานอล (ethanol stress) เกิดขึ้น นอกจากนั้นการเสริมด้วยธาตุโลหะไอออน (metal ion) เช่น สังกะสี ยังช่วยป้องกันเซลล์จากปริมาณความเข้มข้นเอทานอลที่สูงขึ้น โดยจะช่วยเพิ่มปริมาณทีฮาโลส (trehalose) และเออร์โกสเตอรอลส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่รอดชีวิต (Zhao *et al.,* 2009) นอกจากนั้นการทนเอทานอลได้สูง มักจะถูกนำไปใช้เป็นวิธีการในการหาสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล เพื่อให้สามารถผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น

3. สารอาหาร (nutrient) และโคแฟคเตอร์ (cofactor)

3.1 ไนโตรเจน เป็นสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยแต่ละสายพันธุ์ยีสต์จะมีความต้องการไนโตรเจนในปริมาณเหมาะสมที่แตกต่างกัน (Manginot *et al.,* 1998) ซึ่งจะช่วยเพิ่มการผลิตชีวมวล (biomass) และเอทานอล อย่างไรก็ตามการเติมไนโตรเจนเป็นปริมาณมากจะส่งผลให้มีความเสี่ยงในการผลิตกรดอะซิติก (acetic acid)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

(Bely *et al.*, 2003) แอลกอฮอล์โมเลกุลสูง (higher alcohols) (Beltran *et al.,* 2005) และเอทิลคาร์บาเมต (ethyl carbamate) หรือบางสภาวะอาจเกิดแก๊สไฮโดรเจนซัลไฟล์เพิ่มขึ้น (Wang *et al.*, 2003) Fiedurek *et al.* (2011) ศึกษาผลของแอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$ ต่อการผลิตชีวมวลและเอทานอล พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 1.0 เปอร์เซ็นต์ลงในอาหารที่ประกอบด้วยซูโครส 15 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) 1.0 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 0.1 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลให้การผลิตชีวมวลและเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้งสายพันธุ์ ER (parent) และสายพันธุ์กลาย (mutant) ER-A เพิ่มขึ้นจากชีวมวล 5.38 กรัมต่อลิตรเป็น 6.75 กรัมต่อลิตรใน *S. cerevisiae* ER และ 5.04 กรัมต่อลิตรเป็น 6.23 กรัมต่อลิตรใน *S. cerevisiae* ER-A สำหรับเอทานอล จากเอทานอล 6.30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็น 7.10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรใน *S. cerevisiae* ER และ 7.20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเป็น 8.00 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ใน *S. cerevisiae* ER-A ซึ่งโดยทั่วไปแหล่งไนโตรเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้ได้ง่าย มักถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักโดยยีสต์ โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตมักถูกนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งนอกจากจะได้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟอร์ด้วย (สาวิตรี, 2549)

3.2 ฟอสฟอรัส จัดเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการดำรงอยู่ของยีสต์ ซึ่งยีสต์จะใช้ฟอสฟอรัสในการสร้าง ATP การสังเคราะห์นิวคลีโอโปรตีนและสารอื่นๆภายในเซลล์ นอกจากนั้นยังช่วยเป็นบัฟเฟอร์รักษาพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย (สาวิตรี, 2549)

3.3 ซัลเฟอร์ ซัลเฟอร์ที่อยู่ในเซลล์ยีสต์จะอยู่ในกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบในโปรตีน จัดเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการดำรงอยู่ของยีสต์เช่นเดียวกับฟอสฟอรัส โดยทั่วไปซัลเฟอร์มักจะถูกใช้ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต (สาวิตรี, 2549)

3.4 จุลธาตุ (trace elements) เป็นแร่ธาตุที่มีสำคัญต่อการเจริญและเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ทุกชนิด Mg, P, K, S, Ca และ Cl เป็นแร่ธาตุที่จะต้องมีการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนั้นยังมีจุลธาตุชนิดอื่น เช่น Co, Cu, Fe, Mn, Mo และ Zn ที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ แต่โดยปกติมักจะพบจุลธาตุชนิดนี้เจือปนอยู่ในน้ำหรือสารประกอบเชิงซ้อนต่างๆที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ (สมใจ, 2537)

3.5 วิตามิน จัดเป็นสารอาหารเสริมที่สำคัญต่อเซลล์ ซึ่งยีสต์แต่ละสายพันธุ์จะมีความต้องการวิตามินที่แตกต่างกัน วิตามินจะช่วยป้องกันผลกระทบที่เกิดกับการเจริญ กระบวนการหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หรือการมีชีวิตรอดของเซลล์ นอกจากนั้นยังช่วยกระตุ้นอัตราการหมักและการผลิตเอทานอล Walker (1998) พบว่าไบโอตินเป็นส่วนสำคัญต่ออัตราการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งความเข้มข้นของไบโอติน 3-4 ไมโครกรัมต่อลิตรเพียงพอที่จะได้อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) ที่สูงสุด ในขณะที่การใช้ไทเอมีน (thiamine) ที่อัตรา 0.1 กรัมต่อลิตรช่วยจำกัดการเกิดผลิตผลพลอยได้ (by-product) เช่น แอลกอฮอล์โมเลกุลสูงและยังช่วยเพิ่มการผลิตเอทานอลอีกด้วย (Kotarska *et al.,* 2006) Alfenore *et al.* (2002) พบว่าการเสริมวิตามินลงในอาหารหมักช่วยให้สามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นและใช้ระยะเวลาในการหมักลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักเอทานอลโดยไม่เสริมด้วยวิตามิน อย่างไรก็ตามการใช้วิตามินที่มีความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นช้าลง

4. สภาวะแวดล้อม

4.1 อุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ ยีสต์แต่ละชนิดจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่แตกต่างกัน ซึ่งสำหรับกระบวนการหมัก อุณหภูมิจะเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลและเอทานอล เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการมีชีวิตรอดของเซลล์จะลดลงส่งผลให้การผลิตเอทานอลลดลงด้วยเช่นกัน ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้จะสูงกว่าอุณหภูมิสำหรับการเจริญของยีสต์ประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส (ชุติมา, 2548) เช่น *S. cerevisiae* ซึ่งใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล จะใช้อุณหภูมิในการหมักอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 20-35 องศาเซลเซียส (Jones and Ingledew, 1994) นอกจากนั้นการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นทำให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลงส่วนหนึ่งที่เกิดจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับวิถีที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (Pramanik, 2003)

4.2 ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนมีอิทธิพลอย่างมากในอุตสาหกรรรมการหมัก ที่ความเข้มข้นของไฮโดรเจนสูงๆ จะมีความสำคัญในการควบคุมการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย รวมถึงมีผลต่อการเจริญของยีสต์ อัตราการหมัก และการสร้างผลิตผลพลอยได้ (Pramanik, 2003) โดยทั่วไปพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์อยู่ในช่วงพีเอช 4.5-5.0 (ชุติมา, 2548) และพีเอชในช่วง 4.5-4.7 เป็นช่วงพีเอชที่ให้ผลิตผลเอทานอลที่ดีที่สุด ซึ่งความแตกต่างกันมากของพีเอชระหว่างภายใน (intracellular) และภายนอก (extracellular) เซลล์จะมีอิทธิพลอย่างมากต่อเซลล์ยีสต์และต้องการพลังงานจำนวนมากในการรักษาพีเอชภายในเซลล์เพื่อให้เซลล์สามารถเจริญและอยู่รอดได้ (อภิรดี, 2549) แต่อย่างไรก็ตามที่พีเอชมากกว่าหรือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เท่ากับ 7.0 โดยกรดอะซิติค (acetic acid) จะถูกสร้างขึ้นจากอะเซทิลดีไฮด์ (acetaldehyde) เนื่องจากกิจกรรมที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์แอลดีไฮด์ดีไฮด์โดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) จากการผลิตกลีเซอรอล (glycerol production) มีผลในการยับยั้งการหมักเอทานอล

4.3 ออกซิเจน เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญสำหรับการเจริญของยีสต์ โดยยีสต์ต้องการออกซิเจนเพื่อใช้ในการสังเคราะห์เออร์โกสเตอรอลและกรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งเป็นองค์ประกอบที่จำเป็นสำหรับความสมบูรณ์และมั่นคงของเยื่อหุ้มเซลล์ (Shang *et al.,* 2006) ดังนั้นในสภาวะการหมักที่มีการให้อากาศจะทำให้ชีวมวลหรือเซลล์ยีสต์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในขณะที่การผลิตเอทานอลจะลดลง ซึ่งเป็นเพราะออกซิเจนส่งเสริมให้เกิด Pasteur effect นอกจากนั้นยังช่วยลดการเกิดผลิตผลพลอยได้ซึ่งเป็นผลิตผลพลอยได้หลักที่จะเกิดขึ้นในกระบวนการหมักคือ กลีเซอรอล Alfenore *et al.* (2004) พบว่าการให้ออกซิเจนในกระบวนการหมักเอทานอลทำให้ชีวมวลเซลล์ยีสต์สูงขึ้นกว่า 23 เปอร์เซ็นต์และการยับยั้งที่เกิดจะความเข้มข้นของเอทานอลลดลง นอกจากนั้นพบว่าการผลิตกลีเซอรอลที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักลดลงด้วยเช่นกัน Breisha (2010) พบว่าการให้ออกซิเจนตลอดกระบวนการหมักช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์จาก 2×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตรไปเป็น 1.72×10^{8} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การหมักเอทานอลพบน้อยลงมาก อย่างไรก็ตามการให้อากาศร่วมกับการเสริมด้วยวิตามินและไบโอตินในกระบวนการหมัก นอกจากจะช่วยเพิ่มชีวมวลเซลล์ยีสต์แล้วยังช่วยเพิ่มการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้นในกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์ด้วย (Alfenore *et al*., 2004)

4.4 คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนในที่ความดันสูงกว่าบรรยากาศ คาร์บอนไดออกไซด์จะยับยั้งการเจริญและการหมักรุนแรงมากขึ้นเมื่ออยู่ร่วมกับสภาวะอื่นที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ยีสต์ เช่น เมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้น หรืออาหารหมักอยู่ในสภาวะที่พีเอชต่ำมาก ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบางอย่างของกิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึมได้ (permeability) และการขนส่งตัวถูกละลาย (สาวิตรี, 2549)

จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล

มีรายงานจำนวนมากที่ศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอทานอล ซึ่งใช้แบคทีเรียและยีสต์เป็นกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมัก เพื่อเปลี่ยนแหล่งคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ น้ำตาลไปเป็นเอทานอล ซึ่งเคยมี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

รายงานการเมื่อหลาย 10 ปีที่ผ่านมาในการใช้แบคทีเรีย *Z. mobilis* เพื่อการผลิตเอทานอล อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรีย *Z. mobilis* ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจาก *Z. mobilis* ผลิตชีวมวลได้ต่ำ มีความทนต่อเอทานอลน้อย มีความจำเพาะต่อสับสเตรตที่นำมาใช้ โดยสามารถเจริญได้ดีในกลูโคสบริสุทธิ์ ผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่ได้เท่ากับ 97 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และถึงแม้จะเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย แต่พบว่าชีวมวลที่ผลิตไม่ได้รับการยอมรับว่านำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ (Bai *et al.,* 2008) นอกจากนั้นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ช่วงพีเอชที่เป็นกลางคือ พีเอช 6-8 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างกระบวนการหมัก (Caballero, 2010) ดังนั้น ในปัจจุบันจึงนิยมใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

ยีสต์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมมีหลายสปีชีส์ เช่น *S. cerevisiae, S. uvarum (carisbergensis) , Schizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces fragilis* แต่ในปัจจุบันสปีชีส์ที่ได้รับความสนใจและถูกเลือกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลมากที่สุดได้แก่ *S. cerevisiae* และ *Kluyveromyces* spp. ดังแสดงในตางรางที่ 2 นอกจากการผลิตเอทานอลยีสต์ยังถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นได้แก่ อุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (alcoholic beverages) อุตสาหกรรมผลิตชีวมวล อุตสาหกรรมผลิตเอนไซม์ วิตามิน และโปรตีน (Kurtzman and Fell, 2006)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 2 สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล

สายพันธุ์ยีสต์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	พีเอช	แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	เอกสารอ้างอิง
Saccharomyces cerevisiae 27817	30	5.5	glucose (50-200)	5.1-91.8	Vallet *et al.* (1996)
S. cerevisiae L-041	30, 35	-	sucrose (100)	25-50	Leticia *et al.* (1997)
S. cerevisiae ATCC 24860	30	4.5	molasses (1.6-5.0)	5-18.4	Ergun and Mutlu (2000)
S. cerevisiae A3	30	5.0	galactose (20-150)	4.8-36.8	Cruz *et al.* (2003)
S. cerevisiae CMI237	30	4.5	sugar (160)	70	Navarro *et al.* (2000)
Kluyveromyces fragilis 27774	30	5.5	glucose (20-120)	48.96	Vallet *et al.* (1996)
Kluyveromyces marxianus 30016	30	5.5	glucose (100)	44.4	Vallet *et al.* (1996)
Candida utilis 30091	30	5.5	glucose (100)	44.4	Vallet *et al.* (1996)
Pachysolen tannophilus ATCC-32691	30	4.5	Glucose (0–25), xylose (0–25)	7.8	Sanchez *et al.* (1999)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อย่างไรก็ตามการคัดเลือกยีสต์ที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลควรมีลักษณะ (สาวิตรี, 2549) ดังนี้

1. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol ferment) สูง และให้ผลผลิต (ethanol yield) สูง
2. มีความทนเอทานอล (ethanol tolerance)
3. มีความทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
4. มีความทนต่อพีเอชต่ำหรือทนกรด (acid tolerance)
5. มีความทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerance)
6. มีความคงตัวภายใต้สภาวะต่างๆ ของการหมัก
7. มีความสามารถในการใช้แหล่งวัตถุดิบได้หลายชนิด
8. มีความสามารถในการจับกลุ่มตกตะกอน (flocculation)
9. มีพันธุกรรมที่ไม่ปลี่ยนแปลงได้ง่าย
10. มีอัตราการเจริญสูงแต่ให้ผลผลิตเซลล์ต่ำ
11. เซลล์มีความมีชีวิตสูง
12. เพิ่มจำนวนง่าย
13. ให้ความร้อนระหว่างการหมักน้อย

ยีสต์ทนร้อนสำหรับการผลิตเอทานอล

อุณหภูมิเป็นปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีความสำคัญต่อกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์จุลินทรีย์ (microbial acitivity) ซึ่งการที่ยีสต์มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงได้แสดงว่ายีสต์จะต้องมีกลไกพิเศษที่สามารถทำให้ยีสต์ทนและมีชีวิตอยู่ได้ที่อุณหภูมิสูง จากรายงานของ Ohta *et al.* (1988) พบว่าอุณหภูมิสูงเป็นสาเหตุทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อยู่ในสภาพของไหล (fluidity) เพิ่มขึ้น และยีสต์จะตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายภาพโดยการเปลี่ยนองค์ประกอบกรดไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ เนื่องจากการเพิ่มอุณหภูมิจะทำให้กรดไขมันอิ่มตัว เช่น พาล์มมิติก (palmitic acid) และพาล์มิโตเลอิค (palmitoleic acid) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์เปลี่ยนไปเป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น โอเลอิก (oleic acid) ลิโนเลอิก (linoleic acid) และลิโนเลนิก (linolenic acid) (Suutari *et al.*, 1990) โดยปกติกรดไขมันไม่อิ่มตัวจะมีความเกี่ยวข้องกับการลดลงของฟอสโฟลิพิดที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อรักษาสภาพของไหลของเยื่อหุ้มเซลล์ให้เหมาะสมต่อกิจกรรมต่างๆของเซลล์ ซึ่งคาดว่าจะ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เป็นการตอบสนองเพื่อการปรับตัวของเซลล์ยีสต์ให้ทนต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น (Rose, 1993; Lloyd *et al.,* 1993) โดยลักษณะการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดขึ้นในเซลล์ยีสต์นี้ก็มีลักษณะที่เหมือนกับการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์ที่เกิดขึ้นในเซลล์แบคทีเรีย *Z. mobilis* (Benschoter and Ingram, 1986)

Patrascu *et al.* (2009) รายงานว่า สภาวะกดดันเนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น เป็นปัจจัยที่มีการศึกษากันเป็นจำนวนมาก โดยพบว่าอุณหภูมิที่สูงหรือต่ำมากเกินไป จะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์และเกิดการสะสมโปรตีนกลุ่มหนึ่ง ซึ่งทำให้ยีสต์ทนต่ออุณหภูมิที่มากหรือต่ำเกินไปได้

Michel and Starka (1986) รายงานว่า การเพิ่มอุณหภูมิในการเจริญจะทำให้กระบวนการสังเคราะห์ heat shock proteins (HTPs) เกิดขึ้น ซึ่งมีบทบาทสำคัญในจุลินทรีย์หลายชนิดให้มีความทนต่ออุณหภูมิและเอทานอลที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การให้สารอาหารพิเศษบางชนิดแก่ยีสต์จะช่วยให้ยีสต์สามารถเจริญที่อุณหภูมิสูงได้ เช่น การเติมกรดไขมันอิ่มตัว และเออร์โกสเตอรอลในอาหารหมัก (Ohta and Hyshida, 1983)

การเจริญของยีสต์ที่อุณหภูมิสูงพบว่าเป็นคุณสมบัติประจำของแต่ละสายพันธุ์ นอกจากนั้นอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะมีผลให้การเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ลดลง เนื่องจากมีการสังเคราะห์สารสเตอรอลได้น้อยลงและเกิดจากโปรตีนหรือองค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ (Anderson *et at.*, 1986; Swan and Watson, 1997)

อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยจำนวนมากทดลองการปรับเปลี่ยนพันธุกรรม สร้างสภาวะสิ่งแวดล้อมใหม่หรือทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อให้ยีสต์มีความสามารถในการทนอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นได้ จากรายงานของ Rikhvanov *et al.* (2001) ทำการทดลองหมักโดย *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า *S. cerevisiae* มีความสามารถในการหมักที่อุณหภูมิทั้ง 2 ขณะที่บางงานวิจัยคัดเลือกยีสต์ทนร้อน จากการเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่มีชีวิตหลังจากที่ทำให้ยีสต์ช็อคที่อุณหภูมิสูง และการคัดเลือกยีสต์ทนร้อนจากการบ่มที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (Patrascu *et al.*, 2009)

สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล การใช้ยีสต์ทนร้อนจึงเป็นสิ่งสำคัญ เนื่องจากยีสต์ชนิดนี้มีความสามารถในการเจริญและหมักได้ในช่วงฤดูร้อนในแถบประเทศเขตร้อน (Ueno *et al*.,

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2001) เช่น ประเทศไทย นอกจากนั้นในระหว่างการหมักเอทานอลอุณหภูมิจะสูงขึ้นกว่าอุณหภูมิห้องประมาณ 5-10 องศาเซลเซียส การใช้ยีสต์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeasts) จะไม่สามารถทนอุณหภูมิที่สูงขึ้นได้ จึงนำไปสู่การลดลงของเซลล์ที่มีชีวิต ทำให้การผลิตเอทานอลลดลง และสิ่งสำคัญคือช่วยลดต้นทุนระบบหล่อเย็นในอุตสาหกรรมได้ อย่างไรก็ตาม นอกจากยีสต์ในจีนัส *Saccharomyces* แล้ว ยังสามารถพบยีสต์ในจีนัสอื่นได้อีกที่สามารถหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 สายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส

ยีสต์	เอทานอลที่ผลิตได้สูงสุด (เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร)	เอกสารอ้างอิง
Pichia kudriavzevii	7.19	Dhaliwal *et al*. (2011)
Kluyveromyces marxianus DMKU 3-1042	6.78	Limtong *et al*. (2007)
Kluyveromyces marxianus DMKU 3-p106	4.74	Limtong *et al*. (2007)
Kluyveromyces marxianus DMKU 3-118	4.78	Limtong *et al*. (2007)
Kluyveromyces marxianus DMKU 3p1402	4.59	Limtong *et al*. (2007)
Kluyveromyces fragilis YKL	4.00	Panchal (1990)
Kluyveromyces marxianus NCYC 587	5.03	Panchal (1990)
Candida lusitaniae Y-5394	4.57	Panchal (1990)
Candida tropicalis NCYC 405	3.43	Panchal (1990)
Saccharomyces cerevisiae ATCC 4132	4.39	Panchal (1990)
Saccharomyces cerevisiae Ysa86	6.38	Panchal (1990)
Saccharomyces cerevisiae NP3	7.58	Panchal (1990)
Saccharomyces cerevisiae Y24	10.27	Panchal (1990)
Saccharomyces sp. 1400	7.00	Panchal (1990)

ยีสต์ทนร้อน (thermotolerant yeast) เป็นยีสต์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางแต่ทนได้เมื่อเลี้ยงหรืออยู่ในที่อุณหภูมิสูง (สาวิตรี, 2549) การทดลองจำนวนมากมีการศึกษาโดยใช้ยีสต์ในการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง จึงนำมาใช้อ้างอิงว่า ยีสต์ทนร้อน คือยีสต์ที่มีความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส (Krouwel and Braber, 1979; Hacking *et al.*, 1984; Hughes *et al.*, 1984; D' Amore *et al.*, 1988, 1989; Lee *et al.,* 1993) ในขณะที่รายงานของ Kida *et al*. (1992) และ Morimura *et al.* (1997) จัดให้สายพันธุ์กลายของ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ทนร้อน เพราะมีความสามารถในการเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงที่สุดในช่วง 33–35 องศาเซลเซียส ขณะที่จีนัส *Kluyveromyces* มีรายงานว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสและเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 49 องศาเซลเซียส (Hughes *et al.*, 1984) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าจีนัสนี้ยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 52 องศาเซลเซียส (Banat *et al.,* 1992) ซึ่งสอดคล้องกับ Watson (1987) ที่กล่าวว่าอุณหภูมิสูงที่สุดที่ยีสต์นี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 48 องศาเซลเซียส ปัจจุบันมีการนำยีสต์ในจีนัส *Kluyveromyces* มาศึกษาและคาดว่าจะนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมเพิ่มขึ้น อุตสาหกรรมที่สำคัญและกำลังได้รับความสนใจ คือการผลิตเอทานอล เนื่องจากความสามารถในการเจริญและทนอุณหภูมิได้สูง ซึ่งช่วยในการลดต้นทุนในการใช้ระบบหล่อเย็น นอกจากนั้นยังมีความสามารถใช้แหล่งวัตถุดิบได้หลายชนิด

ยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus*

จากรายงานของ Lodi *et al.* (2001) อธิบายว่า *K. marxianus* เป็น respiratory yeast คือการหายใจไม่ถูกยับยั้งด้วยกลูโคส และพบเมแทบอลิซึมแบบการหมักและการใช้ออกซิเจนเกิดขึ้นได้พร้อมกัน ซึ่งมีวิวัฒนาการที่มีความสัมพันธ์กับ *S. cerevisiae* และมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสายพันธุ์ที่รู้จักเป็นอย่างดีคือ *K. lactis* ลักษณะหลักที่พบได้ทั่วไปใน *K. lactis* และ *K. marxianus* คือมีความสามารถในการเปลี่ยนแลคโตสให้เป็นสารที่สามารถดูดซึมได้และเปลี่ยนเป็นเอทานอล ซึ่งน้ำตาลที่ได้จากการเปลี่ยนจากแลคโตสจะถูกนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งลักษณะเฉพาะนี้จะไม่พบใน *S. cerevisiae* จึงทำให้ในเวลาต่อมา ได้มีการแยกยีสต์ชนิดนี้จากผลิตภัณฑ์นมหรืออาหารที่มีนมร่วมด้วย เช่น จากการหมักนม โยเกิร์ต และชีส (Lane and Morrissey, 2010) นอกจากนั้นพบว่า *K. marxianus* มีความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนที่หลากหลาย

Rodrussamee *et al.* (2011) ศึกษาความสามารถในการใช้และการหมักเอทานอลในน้ำตาลที่พบได้ในพืชจำพวกลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic) ซึ่งจะประกอบด้วยกลูโคส แมนโนส กาแลคโตส ไซโรส และอะราบิโนส ของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ที่อุณหภูมิสูง พบว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

K. marxianus DMKU 3-1042 สามารถหมักเอทานอลได้ในน้ำตาลทุกชนิด ยกเว้นอะราบิโนส ภายใต้สภาวะที่มีการเขย่า ขณะที่การหมักโดยไม่มีการเขย่า พบว่าสามารถหมักและใช้น้ำตาลเฮกโซสได้เท่านั้น และยังพบว่าเป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการเจริญและหมักเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง จากรายงานจำนวนมากที่ศึกษาการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *K. marxianus* ให้ผลการทดลองที่เหมือนกันคือ เป็นยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงในช่วง 45–52 องศาเซลเซียส และมีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลได้ในช่วงอุณหภูมิ 38–45 องศาเซลเซียส

Abdel-Banat *et al.* (2010) เปรียบเทียบการเจริญของ *S. cerevisiae* NCYC3233 *K. marxianus* DMKU 3-1042 และ *K. marxianus* สายพันธุ์อื่นที่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 28 และ 48 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์ทุกสายพันธุ์เจริญได้ดีบนอาหาร YPD ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิ 48 องศาเซลเซียส มีเพียง *K. marxianus* DMKU 3-1042 เท่านั้นที่สามารถเจริญบนอาหาร YPD ได้ นอกจากนั้นเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 35 40 และ 45 องศาเซลเซียสจากกากน้ำตาลระหว่าง *S. cerevisiae* NCYC3233 และ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่า *S. cerevisiae* NCYC3233 มีความสามารถในการเจริญและหมักเอทานอลได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และมีการเจริญและหมักเอทานอลได้น้อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่พบการเจริญและการหมักเอทานอลเลย ขณะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบการเจริญและการหมักเอทานอลได้ดีของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 และยังคงพบการเจริญและการหมักเอทานอลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสด้วย

จุดเด่นอีกประการหนึ่ง ได้แก่กลูโคสปริมาณพียงเล็กน้อย *K. marxianus* ก็สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลภายใต้สภาวะที่มีอากาศได้ ซึ่งต่างจากการหมักของ *S. cerevisiae* ที่ต้องอาศัยการมีน้ำตาลความเข้มข้นสูง อีกทั้งยังเป็นยีสต์ทนกรด ซึ่งในขั้นตอนการผลิตในระดับอุตสาหกรรมมักใช้กรดในการล้างทำความสะอาดถังหมักและอุปกรณ์เพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ที่เลือกใช้จำเป็นต้องทนต่อสภาวะพีเอชต่ำๆ ได้ดี ซึ่ง *K. marxianus* มีคุณสมบัตินี้ ทำให้เป็นยีสต์ชนิดที่น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อโรงงานอุตสาหกรรมในอนาคต โดยได้มีการรายงานว่า *K. marxianus var. marxianus* IMB3 มีพีเอชต่ำสุดสำหรับการเจริญเท่ากับ 2.5 ขณะที่รายงานของ Hack and Marchant (1998) พบว่ามีการตายของเซลล์เกิดขึ้นบ้างที่ค่าพีเอชนี้ และที่พีเอชต่ำกว่า 2.0 พบว่าบางเซลล์ยังคงสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 2 ชั่วโมง นอกจากนั้นยีสต์ในสกุล *Kluyveromyces* มีทั้งสายพันธุ์ที่มี kluyver positive ซึ่งไม่สามารถหมักแลกโทสได้ โดยในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไดแซคคาไรด์ส่งเสริมให้ยีสต์เข้าสู่วิถีของการหายใจได้ดีส่งผลให้ไม่เกิดการหมักเอทานอล และสายพันธุ์ที่มี kluyver negative ซึ่งสามารถหมักแลกโทสได้ทำให้ไม่มีแลกโทสไปส่งเสริมการหายใจ จึงทำให้เกิดการหมักเอทานอลได้ดี ตัวอย่างเช่น *K. marxianus* ATCC 10022 เป็นสายพันธุ์ kluyver negative ในขณะที่ *K. marxianus* CBS 7894 แสดงลักษณะ kluyver effect (Pinheiro *et al.*, 2000)

Limtong *et al.* (2007) ได้แยกยีสต์ *K. Marxianus* DMKU 3-1042 โดยเทคนิค enrichment ในอาหารน้ำอ้อยที่เติมเอทานอล 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่ 35 องศาเซลเซียส โดยเชื้อที่แยกได้นี้สามารถหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงถึง 40–45 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลโดยใช้อาหารน้ำอ้อยในฟลาสก์บ่มแบบเขย่าที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าหมักเอทานอลสูงสุดในอาหารน้ำอ้อยที่เติมซูโครสให้มีน้ำตาลทั้งหมด 22 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.15 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 พบว่าหมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 8.7 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 1.45 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลผลิตการหมักเท่ากับ 77.5 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี สำหรับที่ 40 องศาเซลเซียส ให้เอทานอลสูงสุด 6.78 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 1.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลผลิตการหมักเท่ากับ 60.4 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ในอาหารน้ำอ้อยที่มีองค์ประกอบแบบเดียวกัน ยกเว้นต้องปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.5 แต่เมื่อศึกษาการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยใช้การกวน และการให้อากาศในอัตราต่าง ๆ พบว่าสภาวะที่ดีที่สุด คือใช้การกวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศในอัตรา 0.2 vvm ตลอดการหมัก แต่อย่างไรก็ตามยังพบว่าการหมักเอทานอลที่ได้ยังต่ำคือให้เอทานอลเพียง 6.43 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 1.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและผลผลิตการหมักเท่ากับ 57.1 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี โดยพบว่าในระหว่างการหมักในถังหมัก เชื้อมีการเจริญน้อยทำให้เซลล์มีความเข้มข้นต่ำซึ่งเป็นผลให้การหมักไม่ดีเท่ากับการหมักในฟลาสก์

วัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบหลายชนิดที่เป็นผลิตผลทางการเกษตร ซึ่งมีส่วนประกอบจำพวก น้ำตาล แป้ง หรือเซลลูโลส (Gnansounou and Dauriat, 2005) วัตถุดิบที่เหมาะสำหรับนำมาผลิตเอทานอลแบ่งออกเป็น 4 ประเภท ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1. พืชที่มีน้ำตาล เช่น อ้อย ผักกาดหวาน (beet) และข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum) เป็นพืชที่สามารถนำมาเตรียมเป็นสับสเตรทเพื่อนำไปหมักได้ง่าย เนื่องจากน้ำตาลในพืชชนิดนี้ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ เช่น น้ำอ้อย ประกอบด้วยน้ำตาล 12-17 เปอร์เซ็นต์ โดยส่วนใหญ่ 90 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นน้ำตาลซูโครส สามารถนำมาใช้หมักได้โดยตรง

2. พืชที่มีแป้ง เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ และมันสำปะหลัง ส่วนประกอบหลักคือแป้ง ซึ่งจะถูกเก็บสะสมอยู่ในส่วนประกอบต่างๆของพืช จะประกอบด้วยแป้งประมาณ 60-75 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก พืชในกลุ่มนี้ไม่สามารถนำมาใช้ได้โดยตรง ต้องอาศัยการแปรสภาพเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสโดยใช้เอนไซม์หรือกรดในการย่อยแป้งก่อนนำมาใช้หมักโดยยีสต์

3. วัสดุที่มีลิกโนเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ เช่น ไม้ และส่วนเหลือของพืช เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ซึ่งเป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีความอุดมสมบูรณ์มากที่สุด มีราคาถูก เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นสับสเตรทในการหมักเอทานอล อย่างไรก็ตามการใช้กระบวนการทางชีวเคมีในการเปลี่ยนวัสดุที่มีลิกโนเซลลูโลสให้เป็นเอทานอลทำได้ยากมากกว่าพืชที่มีน้ำตาลและแป้ง และเทคโนโลยีในการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสยังไม่สมบูรณ์

4. ผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการต่างๆ เช่น waste sulfite liquor หางนม (whey) และกากน้ำตาล (molasses) โดยเฉพาะ กากน้ำตาลจะถูกนำมาใช้เป็นสับสเตรทในการหมักเอทานอลเป็นจำนวนมาก ซึ่งจะประกอบด้วยน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 50-55 เปอร์เซ็นต์ และสามารถหมักได้โดยตรงเช่นเดียวกับพืชที่มีน้ำตาล (Patrascu *et al.,* 2009; Kumar *et al.,* 2010)

สำหรับประเทศไทย ปัจจุบันมีโรงงานที่ได้รับอนุญาติให้ผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงทั้งหมด 45 โรงงาน ซึ่งมีกำลังการผลิตทั้งหมดเท่ากับ 11,345,000 ลิตรต่อวัน โดยจะแยกตามชนิดของวัตถุดิบ (กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน, 2554) ตามตารางที่ 4 ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 4 จำนวนโรงงานและกำลังการผลิตเอทานอล แบ่งตามชนิดของวัตถุดิบ

ประเภทของวัตถุดิบ	จำนวนโรงงาน	กำลังการผลิตรวม (ลิตรต่อวัน)
มันสำปะหลัง	24	8,000,000
กากน้ำตาล	3	375,000
อ้อยและกากน้ำตาล	9	1,600,000
มันสำปะหลังและกากน้ำตาล	5	770,000
อ้อยและมันสำปะหลัง	1	200,000
กากน้ำตาล/มันสำปะหลัง/อ้อย	2	250,000
กากมันสำปะหลัง	1	100,000

ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน (2554)

โดยในปีพ.ศ. 2554 มีโรงงานที่เปิดดำเนินการแล้ว 19 โรงงาน ซึ่งส่วนใหญ่ใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ อย่างไรก็ตามพบว่าปริมาณกากน้ำตาลที่ผลิตได้ในแต่ละฤดูยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องได้แก่ โรงงานสุรา อาหารสัตว์และผงชูรส

สำหรับมันสำปะหลัง พบว่ามีการเพาะปลูกในหลายพื้นที่ของประเทศไทย เป็นพืชทนแล้ง ปลูกได้ง่าย ไม่ต้องการการดูแลมาก และมีราคาถูก เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล อย่างไรก็ตามมันสำปะหลังเป็นพืชที่มีการสะสมแป้งเป็นจำนวนมาก ซึ่งไม่สามารถนำมาหมักได้โดยตรง ดังนั้นจึงต้องมีการแปรสภาพโดยผ่านการไฮโดรไลซ์เพื่อเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปสังเคราะห์เป็นเอทานอลได้ จึงทำให้การผลิตเอทานอลมีต้นทุนเพิ่มขึ้น

สำหรับอ้อย (*Saccharum officinarum*) จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่มีความสำคัญต่อประเทศไทย และมีการเพาะปลูกในหลายพื้นที่ของประเทศไทย ทั้งภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง อ้อยเป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย ซึ่งประเทศไทยจัดเป็นผู้ผลิตและส่งออกน้ำตาลทรายที่สำคัญของโลก ดังนั้นจึงยังไม่ค่อยมีผู้นำน้ำอ้อยมาใช้ในการผลิตเอทานอล อย่างไรก็ตาม มีรายงานจำนวนไม่น้อย ที่แสดงให้เห็นว่า น้ำอ้อยเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตเอทานอล ซึ่งจากรายงานของ Limtong *et al.* (2007) พบว่าน้ำอ้อยสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลิตเอทานอลและเหมาะที่จะเป็นแหล่งคาร์บอนทางเลือกหนึ่งในประเทศไทย เนื่องจากน้ำอ้อยประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสและแร่ธาตุอาหารที่เพียงพอสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด

บุญเทียม (2523) คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลและน้ำอ้อย ได้สายพันธุ์ *S. cerevisiae* 313 หมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในถังหมักขนาด 5 ลิตร จากอาหารกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.04 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต.7 น้ำ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และอาหารน้ำอ้อยที่มีปริมาณน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.04 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โดยอาหารหมักทั้ง 2 ชนิด มีการปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 ผลการทดลองพบว่ายีสต์เจริญได้ดีและมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมากที่สุดในอาหารน้ำอ้อย และสามารถหมักเอทานอลได้เท่ากับ 9.24 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นอกจากนั้นพบว่าการหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยจะมีน้ำตาลเหลืออยู่ในน้ำหมักน้อยที่สุด ขณะที่กากน้ำตาลหมักเอทานอลได้เท่ากับ 7.02 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ปราโมทย์และคณะ (2536) ศึกษาการหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยโดยทดลองหมักในถังหมักขนาด 10 ลิตร โดยไม่เติมสารอาหารเลย พบว่ามีอัตราการหมักที่รวดเร็วมาก สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 10.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในเวลา 24 ชั่วโมง และน้ำอ้อยที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 17.8 เปอร์เซ็นต์ โดยพบน้ำตาลคงเหลือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการหมัก โดยปริมาณยีสต์เพิ่มจาก 1.7×10^7 เป็น 2.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในเวลา 12 ชั่วโมง และพีเอชลดลงจาก 5.0 เหลือเท่ากับ 4.0 ซึ่งผลการหมักนี้ไม่แตกต่างกับการหมักที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตและโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตอย่างละ 0.05 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อเทียบกับการหมักในอาหารกากน้ำตาลที่มีการเติมสารอาหารในปริมาณที่เหมาะสมคือ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.04 เปอร์เซ็นต์ พบว่าน้ำอ้อยสามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่ากากน้ำตาลและมีน้ำตาลเหลือตกค้างน้อยกว่า

ถึงแม้น้ำอ้อยจะมีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตเอทานอล แต่พบว่าต้องมีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อป้องการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เนื่องจากน้ำอ้อยมีความเข้มข้นน้ำตาลในปริมาณที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ซึ่งทำให้น้ำอ้อยเสียได้ง่าย โดยจากรายงานของ Tilbury (1975) ทำการศึกษาจุลินทรีย์ในน้ำอ้อย พบว่าจุลินทรีย์ก่อให้เกิด

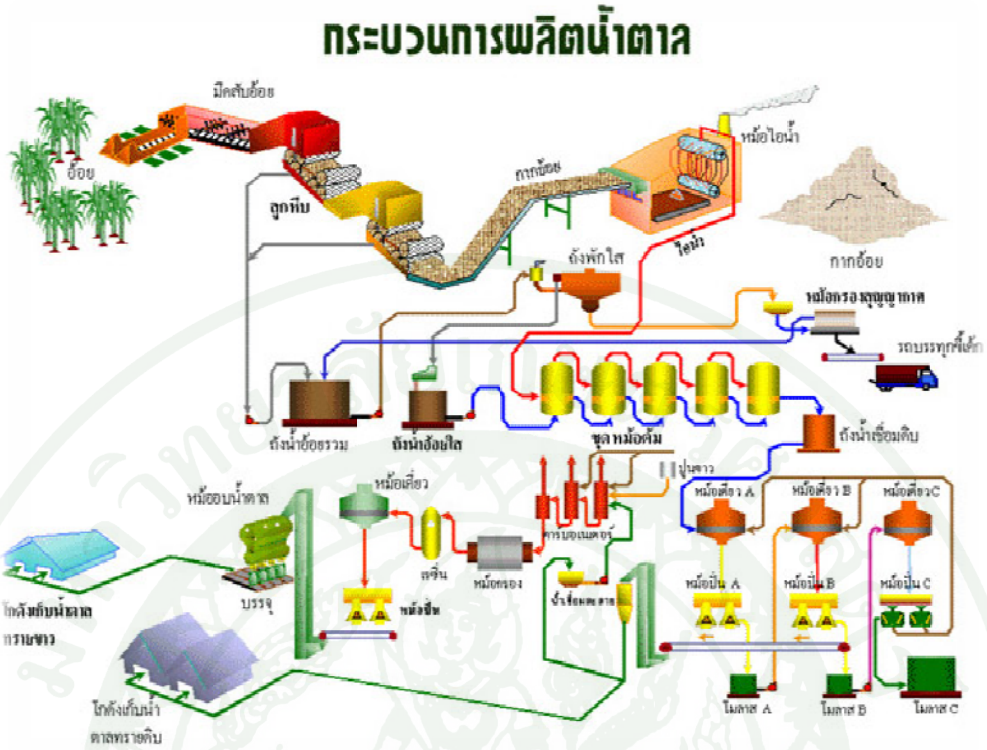
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การสูญเสียน้ำตาลในช่วงการตัดอ้อยและขนส่งเข้าสู่โรงงานของประเทศจาไมก้าคิดเป็นมูลค่าราว 17 ล้านบาทต่อปีการผลิต

บุญส่งและวิวัฒน์ (2527) ศึกษาชนิดและปริมาณแบคทีเรียในน้ำอ้อย โดยเก็บตัวอย่างน้ำอ้อยมาศึกษา 3 ชนิดคือ น้ำอ้อยจากลูกหีบชุดที่หนึ่ง น้ำอ้อยรวม และ น้ำอ้อยพักใส ปริมาณแบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมดพบว่า แบคทีเรียของน้ำอ้อยรวมมีจำนวนมากที่สุด รองลงมาคือน้ำอ้อยจากลูกหีบชุดที่หนึ่ง และน้ำอ้อยพักใส โดยมีค่าเฉลี่ย 1.9×10^8, 1.26×10^7 และ 1.45×10^2 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และชนิดของแบคทีเรียที่พบเป็นปริมาณมาก พบได้ทั้งในน้ำอ้อยจากลูกหีบชุดที่หนึ่งและน้ำอ้อยรวม ได้แก่ *Streptococcus* sp., *Lactobacillus fermentum, Leuconostoc mesenteroides* และ *Erwinia herbicola* พบแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* เป็นจำนวนมากในน้ำอ้อยพักใส เมื่อศึกษาบทบาทของแบคทีเรีย 4 ชนิดคือ *Streptococcus* sp., *Lactobacillus fermentum, Leuconostoc mesenteroides* และ *Lactobacillus cellobiosus* ในน้ำอ้อย พบว่า แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญและสามารถทำลายน้ำตาลซูโครสได้มากที่สุด คือ *Streptococcus* sp. โดยก่อให้เกิดการสูญเสียน้ำตาลซูโครสไป 0.61 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 20 นาที คิดเป็นมูลค่าประมาณ 95 ล้านบาทต่อปีการผลิต นอกจากนั้น แบคทีเรียชนิดนี้ยังสามารถสร้างกรด ทำให้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น อีกทั้งยังสร้างสารเมือกพวกเด็กซ์แตรน โดยก่อให้เกิดปัญหาในขบวนการผลิตและทำให้ผลผลิตของน้ำตาลซูโครสลดลง เพื่อลดการสูญเสียน้ำตาลและการเสียของน้ำอ้อยในระหว่างการขนส่งและการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตเอทานอล ดังนั้นการระเหยน้ำจากน้ำอ้อยให้เป็นน้ำอ้อยเข้มข้นจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่เหมาะจะนำมาใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการผลิตเอทานอล

น้ำอ้อยเข้มข้น (raw syrup) คือน้ำอ้อยที่ผ่านการทำใสโดยการตกตะกอนด้วยวิธีทางกล เพื่อแยกสารแขวนลอยด์ออก และวิธีทางเคมี คือการให้ความร้อนและผสมปูนขาวแล้ว จะถูกนำเข้าสู่ชุดหม้อต้ม (multiple evaporation) เพื่อระเหยเอาน้ำออก จนได้น้ำอ้อยที่มีน้ำตาลเข้มข้นประมาณ 65 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส กลูโคส และฟรุกโทสดังแสดงในภาพที่ 5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 5 กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย

ที่มา: บริษัทไทยชูการ์ มิลเลอร์ จำกัด (2555)

วิธีการเก็บรักษาน้ำอ้อยเข้มข้น

ถึงแม้น้ำอ้อยเข้มข้นจะมีความเข้มข้นน้ำตาลสูง แต่เมื่อมีการเก็บรักษาน้ำอ้อยเข้มข้นที่อุณหภูมิ พบว่าอาจมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่สามารถเจริญได้ เช่น แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ดังนั้นการป้องกันและควบคุมหรือยับยั้งจุลินทรีย์ที่อาจปนเปื้อนมากับน้ำอ้อยเข้มข้นให้อยู่ในปริมาณที่ต่ำ และมีอายุยาวนานพอที่จะนำน้ำอ้อยเข้มข้นมาใช้เป็นวัตถุดิบและสามารถเก็บไว้ได้นาน ณ อุณหภูมิห้อง โดยสิ่งสำคัญคือระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำอ้อยต้องนานพอจนกว่าจะถึงฤดูเปิดหีบอ้อยใหม่ ซึ่งวิธีการในการเก็บรักษานั้นมีหลายวิธี เช่น การปรับพีเอช หรือการเติมสารกันบูด (preservative) นอกจากนั้นการเก็บรักษาน้ำอ้อยดิบที่อุณหภูมิต่ำเคยมีการศึกษาว่าสามารถยืดอายุของผลิตภัณฑ์ให้เพิ่มขึ้นได้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากรายงานของ Yusof *et al.* (2000) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำอ้อยดิบในระหว่างการเก็บรักษา โดยทำการทดลองเก็บน้ำอ้อยดิบที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และ 27 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (ซูโครส กลูโคสและฟรุกโทส) ในน้ำอ้อยดิบและวิเคราะห์จุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในน้ำอ้อย พบว่าเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำอ้อยดิบเพิ่มขึ้น ปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยดิบที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จะค่อยๆลดลงภายใน 15 วัน และสามารถเก็บรักษาน้ำอ้อยดิบได้นาน 4 วัน ขณะที่ปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อยดิบที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส จะลดลงภายใน 3 วัน และเก็บไว้ได้เพียง 1 วัน การลดลงของน้ำตาลซูโครสที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เกิดจากจุลินทรีย์ที่มีการปนเปื้อน ทำให้เกิดการใช้น้ำตาลในน้ำอ้อยดิบ การลดลงของปริมาณซูโครสที่เกิดขึ้นทั้ง 2 อุณหภูมิ เกิดจากการเปลี่ยนสภาพทำให้ปริมาณซูโครสลดลง ในขณะที่ปริมาณกลูโครสและฟรุกโทสเพิ่มขึ้น การที่ซูโครสจะลดลงเท่าไหร่ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำอ้อยดิบ สำหรับการวิเคราะห์จุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่ายีสต์และราที่เกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาน้ำอ้อยมีปริมาณที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส จะพบการเจริญของราเท่านั้นในวันที่ 6 ส่วนที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส สามารถพบการเจริญของยีสต์และราได้ เมื่อเก็บรักษาน้ำอ้อยดิบตั้งแต่วันที่ 6 เป็นต้นไป

การใช้สารเคมีหรือที่เรียกว่า สารกันบูด (preservative) เป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ในการควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน (Ihekoronye and Ngoddy, 1995) นอกจากนั้นสารกันบูดอาจจะทำลายเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย จึงเป็นการป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์อย่างง่ายและช่วยยืดอายุของผลิตภัณฑ์ให้นานขึ้น (Fawole and Osho, 2002) สารกันบูดที่นิยมใช้ในปัจจุบันมีดังนี้

1. กรดอินทรีย์ กรดเบนโซอิค เกลือเบนโซเอท นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์ เครื่องดื่ม น้ำผลไม้ แยม เยลลี่ เนย มาการีน และผักดองชนิดต่างๆ
2. ซัลเฟอร์ไดออกไซด์และเกลือซัลไฟต์ ส่วนใหญ่ใช้ในผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้แห้ง ผลไม้สด เครื่องดื่ม ไวน์ น้ำตาลทราย แป้ง และน้ำหวานชนิดต่างๆ
3. สารประกอบไนไตรต์ และไนเตรท ส่วนใหญ่นิยมใช้ในผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น แฮม ไส้กรอก และผลิตภัณฑ์จากปลา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นอกจากสารทั้ง 3 ประเภทจะนำมาใช้ร่วมกับอาหาร ยังสามารถนำมาใช้กับน้ำอ้อยดิบได้ โดยการจะเลือกสารชนิดไหนขึ้นอยู่กับทัศนคติของผู้ใช้ ชนิดจุลินทรีย์ที่ต้องการยับยั้งหรือควบคุม เนื่องจากสารบางชนิดอาจมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน

1. กรดและเกลือของกรดเบนโซอิค

กรดเบนโซอิค (C_6H_5COOH) และเกลือของกรดเบนโซอิคถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร มีความสำคัญซึ่งใช้เป็นสารกันเสียที่มีการใช้มานานและยังคงนิยมนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง (Chipley, 1983; Davidson, 1997; Lueck, 1980) เพราะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยขึ้นอยู่กับค่าพีเอช นอกจากนั้นยังถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆ เช่น อุตสาหกรรมยาและเครื่องสำอางค์ เนื่องจากกรดเบนโซอิคเป็นกรดแก่สามารถแตกตัวได้มากและมีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุดภายใต้สภาวะที่เป็นกรด ซึ่งมีพีเอชอยู่ในช่วง 2.5–4 ที่พีเอชต่ำกรดจะไม่แตกตัวเป็นอิออน (Macris, 1975) กรดที่ไม่แตกตัวจะซึมผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไม่สามารถขนส่งกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อเซลล์ และรบกวนการทำงานของเอนไซม์ ทำให้เอนไซม์เสียสภาพไม่สามารถทำงานได้ เบนโซเอตอิคออนจะยับยั้งกระบวนการ glycolysis โดยเฉพาะอย่างยิ่งจะทำให้เอนไซม์ phosphofructokinase ไม่สามารถทำงานได้ (Pelczar *et al.*, 1993) ในสภาวะที่อาหารเป็นกรดสูง แบคทีเรียจะไม่สามารถเจริญอยู่ได้ ขณะที่ยีสต์และราบางชนิดสามารถเจริญได้ในอาหารที่เป็นกรดสูง ดังนั้นกรดและเกลือของกรดเบนโซอิคจึงทำหน้าที่เป็นสารที่ช่วยยับยั้งการเจริญของราและยีสต์ (สุมาลี, 2541) จากรายงานของ Warth (1988) พบว่ากรดเบนโซอิคที่ความเข้มข้น 0.2–0.3 กรัมต่อลิตร เพียงพอในการป้องกันการเจริญของ *S. cerevisiae* โดยทั่วไปความเข้มข้นของกรดเบนโซอิคที่ใช้ในการยับยั้งยีสต์และราคือ 0.002–0.7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก (Tfouni and Toledo, 2002)

2. โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์

โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ ($K_2S_2O_5$) เป็นสารกันบูดที่จัดอยู่ในกลุ่มซัลเฟอร์ไดออกไซด์และซัลไฟต์ มีคุณสมบัติเป็น reducing agent ซึ่งเป็นสารที่ว่องไวในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เมื่อละลายในน้ำจะอยู่ในสภาพที่เป็นกรดแตกตัวให้ซัลไฟต์อิสระคือ กรดกำมะถัน (H_2SO_3) ไบซัลไฟต์ (HSO_3^-) และซัลไฟต์ (SO_3^{2-}) ไอออน ซึ่งซัลไฟต์อิสระเหล่านี้สามารถทำปฏิกิริยากับโปรตีน คีโตน อัลดีไฮด์ และวิตามินบี 1 ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์ ซัลไฟต์อิสระสามารถยับยั้ง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จุลินทรีย์ได้โดยกลไกที่ ซัลไฟต์อิสระไปทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบของผนังเซลล์ ทำให้อาหารผ่านเข้าเซลล์ได้น้อยหรือไม่ได้เลย จึงทำให้จุลินทรีย์ถูกยับยั้งได้ หรืออาจเกิดจากการที่ซัลไฟต์อิสระไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ภายในเซลล์ซึ่งเป็นโปรตีน ทำให้โปรตีนเสียสภาพไม่สามารถดำเนินต่อไปได้ จุลินทรีย์จึงมีชีวิตอยู่ไม่ได้ นอกจากนั้นพบว่ากำมะถันจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าซัลไฟต์อิสระอื่นๆ และเมื่อพีเอชของอาหารยิ่งต่ำ ประสิทธิภาพของซัลไฟต์อิสระยิ่งสูงขึ้น
(ศิวาพร, 2529)

โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ นิยมนำมาใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมเครื่องดื่ม เช่น ไวน์และเบียร์ โดยจะทำหน้าที่ยับยั้งการเจริญของยีสต์ รา และแบคทีเรีย จากรายงานของกนกรัตน์และคณะ (2542) ศึกษาการควบคุมการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* 102566 โดยใช้สารกันเสีย 3 ชนิดคือ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ กรดเบนโซอิค และโซเดียมเบนโซเอต ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 0.06 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ในอาหารเหลว Malt extract agar, Corn extract agar และเมล็ดข้าวโพด พบว่าโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Aspergillus parasiticus* 102566 ได้ทุกระดับความเข้มข้นในอาหาร Malt extract agar ได้นาน 7 วัน ขณะที่การยับยั้งการเจริญของ *A. parasiticus* 102566 ในอาหาร Corn extract agar พบว่าโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์และกรดเบนโซอิคมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ใกล้เคียงกันที่ระดับความเข้มข้น 0.06 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการควบคุมการเจริญของเชื้อราในเมล็ดข้าวโพด พบว่าสารเคมีทั้ง 3 ชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยสามารถยับยั้งได้ที่ระดับความเข้มข้น 0.02 เปอร์เซ็นต์ เป็นระยะเวลา 28 วัน

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำลายหรือยับยั้งการเจริญและกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยการใช้สารกันบูด
(ศิวาพร, 2546)

1. ชนิดของสารกันบูด สารกันบูดแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่แตกต่างกัน
2. ความเข้มข้นของสารกันบูด สารกันบูดที่มีความเข้มข้นสูงจะทำลายแบคทีเรีย แต่เมื่อมีความเข้มข้นต่ำจะมีผลยับยั้งการเจริญหรืออาจไม่มีผลใดๆ ต่อแบคทีเรีย ซึ่งถ้าเชื้อมีปริมาณมากขึ้น ปริมาณสารที่ใช้ในการทำลายเซลล์ต้องมากขึ้นเช่นเดียวกัน
3. ชนิด อายุ จำนวน และประวัติของจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ที่มีความว่องไว (active) ในการเจริญจะถูกทำลายง่าย ส่วนจุลินทรีย์ที่มีอายุมากขึ้นและเชื้อเริ่มไม่ว่องไวในการเจริญนั้นจะทนต่อสารกันบูดเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4. อุณหภูมิ ถ้าเก็บอาหารไว้ในที่ที่มีอุณหภูมิต่ำ จะเกิดการเสียได้น้อยลง เนื่องจากความเย็นจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

5. ลักษณะทางกายภาพของสับสเตรตที่จุลินทรีย์อาศัยอยู่ (ความชื้น พีเอช อุณหภูมิ ชนิดและปริมาณของตัวถูกละลาย)

สารกันบูดจำนวนมากจะมีประสิทธิภาพมากขึ้นในอาหารที่เป็นกรดและสารกันบูดที่มีประสิทธิภาพดี ควรมีคุณสมบัติ (ศิวาพร, 2546) ดังนี้

1. ต้องไม่เป็นพิษ
2. ควรเป็นสารที่ทำลายจุลินทรีย์ได้ดี ไม่ใช่เพียงยับยั้งการเจริญเท่านั้น
3. ต้องเป็นสารที่ยังคงมีประสิทธิภาพอยู่เสมอ โดยไม่ถูกยับยั้งด้วยอาหาร หรือผลิตผลที่เกิดจากจุลินทรีย์
4. ต้องเป็นสารที่ไม่กระตุ้นให้จุลินทรีย์เกิดการผ่าเหล่า หรือดื้อต่อสารที่ใช้
5. ไม่ควรเป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาโรค
6. ไม่ควรเป็นพวกที่ถูกทำลายด้วยความร้อน
7. ไม่ควรทำให้กลิ่นรสของอาหารเปลี่ยนแปลงไป

3. การปรับพีเอชอาหาร

การลดพีเอชในน้ำอ้อยเข้มข้น จัดเป็นวิธีการอย่างง่ายที่ช่วยควบคุมและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เพราะจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีพีเอชต่ำ ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 ในขณะที่ราส่วนใหญ่และยีสต์เจริญได้ดีที่พีเอชต่ำและพีเอชที่เหมาะสมคือ 5.0 แต่อาจเจริญได้ที่พีเอชมากกว่า 7.0 ได้ จากรายงานของ ประดิษฐ์และคณะ (2525) ศึกษาการยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ในน้ำอ้อยดิบ โดยการลดพีเอชน้ำอ้อยดิบให้อยู่ที่พีเอช 2.0 และ 2.5 และเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรียเกิดขึ้นแต่สามารถพบการเจริญของยีสต์

Oladipo *et al.* (2010) ศึกษาผลกระทบของพีเอชต่อการเจริญของแบคทีเรียซึ่งถูกแยกได้จากน้ำผลไม้ในประเทศไนจีเรีย แบคทีเรียที่แยกได้ ได้แก่ *Bacillus licheniformis, Aeromonas hydrophila, B. circulans, Proteus morganii, Pseudomonas cepacia, B. alvei* และ *P. chlororaphis*

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ทดลองที่พีเอชเท่ากับ 3.0 5.0 7.0 และ 9.0 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดเจริญได้น้อยมากหรือไม่สามารถเจริญได้เลยที่พีเอชเท่ากับ 3.0 และ 5.0

กระบวนการหมัก

กระบวนการหมักโดยทั่วไปประกอบไปด้วยขั้นตอนสำคัญ 6 ขั้นตอน (สมใจ, 2537) ดังนี้คือ

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. การทำอาหารเลี้ยงเชื้อ ถังหมัก อุปกรณ์ที่เกี่ยวข้อง ให้ปราศจากเชื้อ
3. การผลิตเชื้อเริ่มต้นที่บริสุทธิ์ และว่องไว (active) ให้อยู่ในปริมาณที่มากพอสำหรับใช้ในกระบวนการหมัก
4. การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในถังหมัก ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตสารที่ต้องการ
5. การสกัดผลผลิตและการทำให้บริสุทธิ์
6. การกำจัดของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทั้งหมด

กระบวนการหมักแบ่งออกเป็น 3 แบบ (สมใจ, 2537; สาวิตรี, 2549) ดังนี้คือ

1. การหมักแบบแบทช์ (Batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักระบบปิด เติมอาหารลงในถังหมักเพียงครั้งเดียวและมีปริมาณสารอาหารที่เริ่มต้นจำกัด

2. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยที่มีการเติมสารอาหารเข้าสู่ถังหมัก ในขณะเดียวกันมีการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่ออกจากถังหมักในปริมาณและอัตราที่เท่ากัน

3. การหมักแบบเฟด-แบทช์ (Fed-batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบแบทช์ มีการเติมอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องหรือให้อาหารเป็นลำดับ โดยที่ไม่มีการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีจุลินทรีย์เจริญอยู่ออกจากถังหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระบวนการหมักเอทานอลแบบแบทช์

การผลิตเอทานอลในปัจจุบันส่วนใหญ่ผลิตโดยกระบวนการหมักแบบแบทช์ ซึ่งได้มีการใช้และพัฒนาเพื่ออุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์มาเป็นเวลานาน เป็นกระบวนการหมักซึ่งทำในถังหมักแบบระบบปิด มีปริมาณสารอาหารเริ่มต้นจำกัด ทำสับสเตรตให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม โดยทั่วไปมักปรับความเข้มข้นของน้ำตาลให้อยู่ที่ประมาณ 14-18 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหาร ระยะแรกเซลล์จะอยู่ในช่วงปรับสภาพและยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่า lag phase ในระดับอุตสาหกรรมจะต้องทำให้ระยะนี้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนในการผลิต จากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับ จนจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ เรียกระยะนี้ว่า log หรือ exponential phase หลังจากนั้นการเจริญของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดด้วยสารอาหารและสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะค่อยๆลดลงจนกระทั่งหยุดเจริญเพิ่มจำนวนและลดลงจนเป็นศูนย์ระยะนี้เรียกว่า stationary phase (สาวิตรี, 2549)

การหมักแบบแบทช์ ใช้ได้ทั้งในการผลิตมวลเซลล์ สารเมแทบอไลท์ปฐมภูมิ และสารเมแทบอไลท์ทุติยภูมิ ซึ่งข้อดีของการหมักแบบแบทช์คือ การควบคุมทำได้ง่าย ไม่ต้องต้องใช้เทคโนโลยีระดับสูง ไม่ต้องทำให้วัตถุดิบหรืออุปกรณ์ปลอดเชื้อ และมีความเสี่ยงต่อการกลายพันธุ์น้อย เพราะระยะเวลาที่ใช้เลี้ยงเชื้อสั้น (Roehr, 2001)

กระบวนการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ที่การเจริญของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดด้วยปริมาณสารอาหาร แต่ไม่ถูกจำกัดด้วยสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น เนื่องจากมีการนำอาหารออกจากภาชนะและมีการใส่อาหารใหม่เข้าไปในปริมาณและอัตราที่เท่ากัน ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่อง และเกิดสภาวะคงที่ (steady state) คือปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่เท่ากับปริมาณเซลล์ในอาหารเก่าที่ปล่อยออกจากภาชนะ ดังนั้นการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่อง จึงเป็นเทคนิคที่ทำให้เพิ่มความสามารถในการหมัก สามารถหมักได้อย่างต่อเนื่อง ค่าใช่จ่ายแรงงานต่ำ การควบคุมและการดำเนินการง่ายกว่าการหมักแบบแบทช์ ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้การหมัก (vessels) ติดต่อกัน 3-5 ครั้ง โดยจะพบเอทานอลเพิ่มขึ้น 4 เปอร์เซ็นต์ในครั้งแรก จนมีเอทานอลเพิ่มขึ้นถึง 10 เปอร์เซ็นต์ในครั้งสุดท้าย (Patrascu *et al.,* 2009)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องแบ่งออกเป็น 2 แบบ (สมใจ, 2537) ได้แก่

1. Chemostat เป็นการหมักแบบต่อเนื่อง ที่เกิดจากอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ถูกควบคุมโดยสภาพแวดล้อมทางเคมี เช่น ความเข้มข้นของสับสเตรตในอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. Turibidostat เป็นการหมักแบบต่อเนื่อง ที่เกิดจากการควบคุมอัตราการไหลของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม เพื่อให้เซลล์มีความเข้มข้นคงที่

อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักแบบต่อเนื่องมักเกิดปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นจากภายนอก และอาจเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นเองของเชื้อที่ใช้หมัก รวมถึงการที่จะรักษาอัตราการหมักให้สูงอยู่ตลอดเวลา (สาวิตรี, 2549)

กระบวนการหมักเอทานอลแบบเฟด-แบทช์

กระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในระดับอุตสาหกรรม นอกจากจะนำมาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล ยังถูกนำไปพัฒนาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักต่าง เช่น การผลิตเซลล์ชีวมวล กรดอินทรีย์ สารปฏิชีวนะ วิตามิน และเอนไซม์ เป็นต้น (Rouaks, 1996)

Yoshida *et al*. (1973) และ Rouaks (1996) ได้อธิบายกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์ว่าเป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบแบทช์ ที่มีการเติมอาหารเข้าไปอย่างต่อเนื่องหรือเป็นระยะๆ โดยไม่มีการนำอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเจริญของจุลินทรีย์ออกจากระบบ ดังนั้นปริมาตรของอาหารจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นจนได้ปริมาตรสุทธิ

นอกจากนั้นกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์ยังสามารถควบคุมปริมาณสับสเตรตได้ การเติมสับสเตรตในกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์ (Lee and Kim, 2001) แบ่งออกได้ 3 แบบ ดังนี้

1. การเติมสับสเตรตแบบ linear increment feeding เป็นการแบ่งเติมสับสเตรตตามระยะเวลาในแต่ละช่วงที่มีปริมาณสับสเตรตที่เท่ากัน โดยไม่คำนึงถึงอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. การเติมสับสเตรตแบบ exponential increment feeding เป็นการเติมสับสเตรตตามระยะเวลาในแต่ละช่วงในอัตราแบบก้าวหน้า โดยอัตราการเติมคำนวณจากค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด

3. การเติมสับสเตรตแบบ sigmoidal increment feeding เป็นการเติมสับสเตรตตามระยะเวลาแต่ละช่วงตามกราฟการเจริญของจุลินทรีย์ โดยอัตราการเติมคำนวณจากการเปลี่ยนแปลงค่าอัตราการเจริญจำเพาะในระหว่างการหมัก

โดยทั่วไปการเลี้ยงยีสต์ในกระบวนการหมักแบบแบทช์ ปัญหาที่พบเมื่อเลี้ยงในน้ำตาลที่ระดับความเข้มข้นสูงคือการยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ ซึ่งกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์เป็นเทคนิคที่มีผลในการลดการเกิดกลไกในการควบคุมของเซลล์ (cellular regulatory mechanisms) เช่น Crabtree effect catabolic repression และการถูกยับยั้งจากผลิตภัณฑ์ (product inhibition) นอกจากนั้นยังมีข้อดีอื่นอีก เช่น มีความเข้มข้นน้ำตาลคงเหลือในปริมาณต่ำ มีปริมาณออกซิเจนละลายในอาหารสูง ลดระยะเวลาในการหมัก มีความสามารถในการผลิตสูง ลดการเกิดพิษซึ่งเป็นผลกระทบที่เกิดจากองค์ประกอบของสับสเตรต โดยจะแสดงเมื่อมีความเข้มข้นน้ำตาลสูงๆ ให้ผลผลิตสูง และมีความเสี่ยงต่อการเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นต่ำ ดังนั้นกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์จึงนิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอล เพื่อช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการหมักในอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงและช่วยเพิ่มการผลิตเอทานอลได้

น้ำกากส่า

น้ำกากส่าเป็นน้ำเสียที่เกิดขึ้นหลังจากผ่านกระบวนการกลั่นในระหว่างกระบวนการผลิตเอทานอล ซึ่งโดยทั่วไปการหมักน้ำตาล 1 ตัน จะสามารถผลิตเอทานอลบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ได้ 260 ลิตร และมีปริมาณน้ำกากส่าเหลืออยู่ประมาณ 2,600 ลิตร หรือ 2.6 ลูกบาศก์เมตร (ทัศนีย์และสมบูรณ์, 2546) สุจินต์ (2542ก) รายงานว่า น้ำกากส่า หรือที่เรียกว่า spent wash liquor หรือ stillage distillery มีค่าพีเอชประมาณ 4.1-4.5 ค่า BOD (biological oxygen demand) เท่ากับ 35,000-40,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่า COD (chemical oxygen demand) เท่ากับ 100,000-120,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนโตรเจน (N) เท่ากับ 1,500-2,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟอรัส (P) เท่ากับ 150-200 มิลลิกรัมต่อลิตร โพแทสเซียม (K) เท่ากับ 3,500-8,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ทองแดง (Cu) เท่ากับ 2.3 มิลลิกรัมต่อลิตร ของแข็งทั้งหมด (TS, total solid) เท่ากับ 80,000-120,000 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีอุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

37-40 องศาเซลเซียส จากคุณสมบัติดังกล่าว การบำบัดน้ำกากส่าให้ได้เกณฑ์มาตรฐานที่กำหนดก่อนปล่อยลงสู่แหล่งน้ำ จึงเป็นเรื่องที่ยากและต้องใช้เทคโนโลยีที่ทันสมัยซึ่งมีราคาแพง จากรายงานของ Satyawali and Balakrishnan (2008) พบว่าในประเทศอินเดีย น้ำหมัก (fermentation broth) ที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอลมีลักษณะสีน้ำตาลเข้มและให้ค่า BOD 36,500 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่า COD 82,080 มิลลิกรัมต่อลิตร มากที่สุด โดยลักษณะของน้ำกากส่าที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับการใช้วัตถุดิบในกระบวนการหมัก (Mall and Kumar, 1997) ตารางที่ 5 เป็นการเปรียบเทียบน้ำกากส่าที่เกิดขึ้นจากการใช้วัตถุดิบที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 5 ลักษณะของน้ำกากส่าที่เกิดขึ้นจากการใช้ cane molasses และ beet molasses เป็นวัตถุดิบในกระบวนการหมักเอทานอล

ลักษณะ	วัตถุดิบที่ใช้		
	Cane molasses[1,2]		Beet molasses[3]
COD (mg/l)	65,000 - 130,000	104,000 - 134,000	91,100
BOD (mg/l)	30,000 - 70,000	46,100 - 96,000	44,900
COD/BOD ratio	2.49	*	1.95
Total solids (mg/l)	30,000 - 100,000	*	*
Total suspended solids (mg/l)	350	*	*
Total dissolved solids (mg/l)	80,000	79,000 - 87,990	*
Total nitrogen (mg/l)	1,000 - 2,000	1,660 - 4,2000	3,569
Total phosphorus (mg/l)	800 - 1,200	225 - 3038	163
Potassium (mg/l)	8,000 - 12,000	9,600 - 17,475	10,030

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 5 (ต่อ)

ลักษณะ	วัตถุดิบที่ใช้		
	Cane molasses[1,2]		Beet molasses[3]
Sulfur as SO4 (mg/l)	2,000 - 6,000	3,240 - 3,425	3,716
pH	3.0 - 5.4	3.9 - 4.3	5.35

หมายเหตุ * ไม่มีข้อมูล

ที่มา: Pathade (1999)[1]; Wilkie *et al*.(2000)[3]**;** Mahimairaja and Bolan (2004)[2] ; Satyawali and Balakrishnan. (2008)

จากตารางข้างต้นพบว่า น้ำกากส่าที่เกิดขึ้นจากการใช้ cane molasses เป็นวัตถุดิบมีระดับ COD BOD และอัตราส่วนระหว่าง COD/BOD ในระดับที่สูง เช่นเดียวกับปริมาณสารอาหารได้แก่ ไนโตรเจน ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียม นอกจากนั้นน้ำกากส่าที่เกิดขึ้นจากการใช้ cane molasses เป็นวัตถุดิบประกอบด้วยสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น กรดแลคติก (lactic acid) กลีเซอรอล เอทานอล และกรดอะซีติก (acetic acid) (Wilkie *et al.*, 2000)

ดังนั้นการจัดการน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการหมักเอทานอลจึงเป็นปัญหาหลักที่เกิดขึ้นกับอุตสาหกรรมการหมักเอทานอล โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเพิ่มข้อจำกัดทางกฎหมายเกี่ยวกับการปล่อยน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมสู่สิ่งแวดล้อม (Ferguson *et al*., 1998) นอกจากนั้นยังเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายในการจัดการน้ำเสียก่อนปล่อยลงสู่สิ่งแวดล้อม

Barron *et al.* (1996) ได้ศึกษาโดยการใช้น้ำกากส่า (fermentation broth) ร่วมกับการใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรต เช่น กลูโคสและเซลลูโลส ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงยีสต์ทนร้อนในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดปริมาณน้ำเสีย

Ferguson *et al.* (1998) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* IMB3 เปรียบเทียบการเจริญและการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำกากส่าร่วมกับการเติมซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และ 10 เปอร์เซ็นต์ในอาหารสำหรับการหมัก กล้าเชื้อที่ใช้แบ่งเป็น 2 ประเภทได้แก่ แบบเซลล์ยีสต์อิสระ และแบบตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต (alginate-immobilized) พบว่าความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดคิดเป็นผลผลิตเท่ากับ 75–99 เปอร์เซ็นต์ค่าทางทฤษฎี ซึ่งความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดในทุกการทดลองได้จากการใช้น้ำหมักร่วมกับการเติมซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเลี้ยงในอาหารที่เสริมการเจริญของยีสต์ นอกจากนั้นพบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดได้จากการใช้กล้าเชื้อที่มีการตรึงเซลล์ด้วยอัลจิเนต

อย่างไรก็ตาม น้ำกากส่าที่เกิดขึ้นหลังจากกระบวนการกลั่น พบว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ และมีปริมาณสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญดังตารางที่ 5 ซึ่งถ้าสามารถนำกลับมาใช้สำหรับกระบวนการหมักในครั้งต่อไป จะช่วยลดปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้น และเป็นการเพิ่มกล้าเชื้อได้อีกด้วย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ช่วยลดต้นทุนในการจัดการน้ำเสียที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สายพันธุ์ยีสต์

Kluyveromyces marxianus DMKU 3-1042 เป็นยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ที่แยกได้ใหม่ในประเทศไทยโดย Limtong *et al.* (2007)

2. ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

น้ำอ้อยดิบและน้ำอ้อยเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัทสหการน้ำตาลชลบุรี จำกัด อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและอาหารสำหรับหมัก

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 อาหารวุ้น YPD (yeast extract peptone dextrose agar)

เป็นอาหารที่ใช้สำหรับเพาะเลี้ยง ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ 10 กรัม เปปโทน 20 กรัม เด็กซ์โทรส 20 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

3.1.2 อาหารเหลว YPD (yeast extract peptone dextrose broth)

เป็นอาหารที่ใช้สำหรับเตรียมกล้าเชื้อ ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ 10 กรัม เปปโทน 20 กรัม เด็กซ์โทรส 20 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.3 อาหารวุ้น NA (nutrient agar)

เป็นอาหารที่ใช้สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ รา ประกอบด้วย สารสกัดเนื้อ 3 กรัม เปปโทน 5 กรัม วุ้น 15 กรัม และน้ำกลั่น 1 ลิตร

3.2 อาหารสำหรับหมัก

3.2.1 อาหารเหลวน้ำอ้อย

เป็นอาหารที่ใช้สำหรับการหมัก ประกอบด้วย น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และเติมน้ำ 1.5 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.0 (Limtong *et al.,* 2007)

3.2.2 อาหารเหลวน้ำอ้อยเข้มข้นสูตรที่ 1

เป็นอาหารที่ใช้สำหรับการหมัก ประกอบด้วย น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และเติมน้ำ 1.5 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 5.0

3.2.3 อาหารเหลวน้ำอ้อยเข้มข้นสูตรที่ 2

เป็นอาหารที่ใช้สำหรับการหมัก ประกอบด้วย น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ และเติมน้ำ 1.5 ลิตร ปรับพีเอชเป็น 4.5

4. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

4.1 เครื่องแก้ว เช่น ฟลาสก์ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

4.2 ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar airflow)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.3 ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 2.5 ลิตรจำนวน 2 ชุด ได้แก่ Mini-jar fermenter ชนิด Eyela M-100 (Tokyo Rikakikai, Tokyo, Japan) และชนิด Marubishi MD-250 (B.E. Marubishi, Japan)

4.4 เครื่อง Gas Chromatography (Shimadzu GC-9A พร้อมเครื่องบันทึก CR-3A)

4.5 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Agilent 1100, USA)

4.6 เครื่องเขย่า (Vortexgenie 2 ^{TM} Model 6-560E, Genie Scientific Industries, INC., USA)

4.7 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงช่วงคลื่นยูวี (UV-visible Spectrophotometer, UV-PharmaSpec 1700, Shimuzu, Japan)

4.8 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Labofuge 200, Hereaus, Germany)

4.9 เครื่องวัดกรด-ด่าง (pH meter ORION Model SA520, USA)

4.10 เครื่องบ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker TAITEC Bio-Shaker BR-300 LF, Japan)

4.11 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave TOMY SS-325, TOMY SEIKO CO., LTD, Japan)

4.12 เครื่องชั่ง 3 ตำแหน่ง (Satorius AG Göttingen Model LC621S, Germany)

4.13 เครื่อง Auto analyzer (α Bran+Luebbe Auto analyzer II Single-channel Colorimeter)

4.14 เครื่อง Total organic carbon analyzer (TOC-V CHP, Shimuzu, Japan)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิธีการ

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* DMKU 3-1042 ระหว่างน้ำอ้อยดิบและน้ำอ้อยเข้มข้น

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทำการหมักเอทานอล โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารน้ำอ้อยและอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น ดังนี้

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายยีสต์ที่เจริญบนอาหารแข็งเอียง YPD เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลงในอาหารเหลว YPD ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดยีสต์ 1 เปอร์เซ็นต์ และเปปโทน 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยอัตราเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้เป็นกล้าเชื้อเพาะลงในอาหารสำหรับหมัก

1.2 การหมัก

ทำการทดลองในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยปริมาตรอาหารที่ใช้เท่ากับ 1.5 ลิตร เทกล้าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 ลงในอาหารเหลวน้ำอ้อยดิบ ซึ่งประกอบด้วยน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ ใช้น้ำตาลทรายแดงในการปรับความเข้มข้น แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 ด้วย 1 M NaOH ขณะที่อาหารเหลวน้ำอ้อยเข้มข้น ประกอบด้วยน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 ด้วย 1 M H_2SO_4 ตามผลการทดลองที่ได้ทำมาก่อนแล้วจากการทดลองในฟลาสก์ (Limtong *et al*., 2007) นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จากนั้นทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส ไม่มีการให้อากาศ และใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์การเจริญ น้ำตาลที่เหลือ และเอทานอลที่ได้ เพื่อที่จะนำไปใช้ทำการทดลองต่อในขั้นตอนต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. ศึกษาสูตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* DMKU 3-1042

สารอาหารที่มีปริมาณที่เหมาะสมในสูตรอาหาร มีความสำคัญต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ รวมถึงความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น และจากผลการทดลองที่ผ่านมา (Limtong *et al*., 2007) มีการปรับปริมาณสารอาหารให้เหมาะสมกับสูตรอาหารน้ำอ้อย ด้วยเหตุนี้จึงทำการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของสารอาหารให้เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลในสูตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น จึงทำการทดลองดังนี้

ทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรของอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 50 มิลลิลิตร ใช้กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 ฟลาสก์ละ 1 มิลลิลิตร ทำการหมักโดยนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จนครบ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณเอทานอล และน้ำตาลที่เหลือ โดยศึกษาตามปัจจัยต่างๆ ดังนี้

2.1 ผลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล

ทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 50 มิลลิลิตร โดยเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลที่ 2 4 6 8 10 12 14 16 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ทำการหมักโดยนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง จนครบ 48 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์การเจริญ ปริมาณเอทานอล และน้ำตาลที่เหลือ

2.2 ผลของความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล

แบ่งประเภทของสารอาหารออกเป็น 3 แหล่งที่สำคัญ ได้แก่ ไนโตรเจน โพแทสเซียม และแมกนีเซียม เตรียมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นปริมาตร 50 มิลลิลิตร โดยเตรียมอาหารให้มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความเข้มข้นของสารอาหารที่ศึกษา ยังคงใช้ความเข้มข้นที่ได้ทำการทดลองมาก่อนหน้านี้ (Limtong *et al*., 2007) จากนั้นทำการหมักที่อุณหภูมิห้อง โดยนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที จนครบ 48 ชั่วโมง โดยศึกษาผลของสารอาหาร 3 แหล่ง ดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.2.1 ผลของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ที่ความเข้มข้น 0.05 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เลือกความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำให้ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

2.2.2 ผลของแหล่งโพแทสเซียม

แหล่งโพแทสเซียมที่ใช้คือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) ที่ความเข้มข้น 0.05 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เลือกความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ทำให้ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

2.2.3 ผลของแหล่งแมกนีเซียม

แหล่งแมกนีเซียมที่ใช้คือ แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) ที่ความเข้มข้น 0.05 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ เลือกความเข้มข้นแมกนีเซียมซัลเฟตที่ทำให้ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

3. ศึกษาปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ด้วยการหมักแบบแบทช์ที่อุณหภูมิสูง โดยใช้ถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่มีปริมาตรของอาหารที่ใช้เท่ากับ 1.5 ลิตร เตรียมกล้าเชื้อตามข้อ 1.1 เติมแหล่งไนโตรเจน โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ตามที่เลือกได้ในข้อ 2.2.1 2.2.2 และ 2.2.3 ใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก ๆ 4 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง ทำการทดลองซ้ำหลายๆ ครั้ง จนการผลิตเอทานอลเริ่มคงที่ วิเคราะห์การเจริญ ความเข้มข้นของเอทานอล และความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลือ นำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาเพื่อนำไปใช้กับการหมักครั้งต่อไป โดยเลือกสภาวะการหมักที่ให้เอทานอลสูง ประสิทธิภาพการหมัก และผลผลิตการหมักสูง โดยมีปัจจัยที่ศึกษาดังนี้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1 ผลของอุณหภูมิ

เตรียมกล้าเชื้อดังข้อ 1.1 ใช้ถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยมีปริมาตรของอาหารที่ใช้เท่ากับ 1.5 ลิตร อาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 18 เปอร์เซ็นต์ นำอาหารไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 ดังการทดลองก่อนหน้านี้ (Limtong *et al*., 2007) อุณหภูมิที่ใช้ทำการทดลอง เป็นอุณหภูมิที่อยู่ในระดับอุณหภูมิในบรรยากาศของประเทศไทย คือ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการให้อากาศ เลือกอุณหภูมิที่ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

3.2 ผลของอัตราการให้อากาศ

เตรียมกล้าเชื้อดังข้อ 1.1 ใช้ถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยมีปริมาตรของอาหารที่ใช้เท่ากับ 1.5 ลิตร อาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 18 เปอร์เซ็นต์ นำอาหารไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 ดังการทดลองก่อนหน้านี้ (Limtong *et al*., 2007) เลือกอุณหภูมิจากข้อ 3.1 ที่ให้ผลการผลิตเอทานอลที่สูงที่สุด โดยใช้อัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.1 0.2 vvm และไม่มีการให้อากาศตลอดระยะเวลาของการหมัก เลือกอัตราการให้อากาศที่ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

3.3 ผลของพีเอช

เตรียมกล้าเชื้อดังข้อ 1.1 ใช้ถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยมีปริมาตรของอาหารที่ใช้เท่ากับ 1.5 ลิตร อาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 18 เปอร์เซ็นต์ นำอาหารไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยเลือกอุณหภูมิที่ให้การผลิตเอทานอลสูงที่สุดจากข้อ 3.1 และ เลือกอัตราการให้อากาศที่ให้การผลิตเอทานอลสูงที่สุดจากข้อ 3.2 จากนั้นทำการหมักโดยปรับพีเอชอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 4.5 และ 5.0 โดยไม่มีการควบคุมพีเอชในระหว่างการหมัก เลือกพีเอชเริ่มต้นที่ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4 ผลของการฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้ออาหารน้ำอ้อยเข้มข้น

นำผลการทดลองจากข้อ 3.1 3.2 และ 3.3 ที่ให้ผลการผลิตเอทานอลสูงที่สุด มาทำการหมักโดยเปรียบเทียบกับการเตรียมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นแบบไม่ผ่านการฆ่าเชื้อก่อนนำไปหมัก

4. ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ด้วยการหมักแบบเฟด-แบทช์ที่อุณหภูมิสูงในฟลาสก์

ทำการหมักเอทานอลด้วยเทคนิคแบบเฟด-แบทช์ โดยทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรของอาหารที่ใช้คือ 100 มิลลิลิตร เติมแหล่งไนโตรเจน โพแทสเซียมและแมกนีเซียม ตามที่เลือกได้ในข้อ 2.2.1 2.2.2 และ 2.2.3 และมีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 18 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิตามข้อ 3.1 โดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นจึงเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ความเข้มข้นเอทานอล และน้ำตาลที่เหลือ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 แบบ ตามปริมาตรการเติมอาหารและระยะเวลาที่เติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น โดยวิธีการคำนวณหาอัตราการเติมอาหารในการหมัก 3 แบบ ตามวิธีของ Lee and Kim (2001) และ Hoek *et al.* (1999) ดังนี้

4.1 การเติมอาหารแบบ linear increment feeding

ทำการทดลองโดยการเตรียมอาหารให้มีน้ำตาลเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิลิตร โดยปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเริ่มต้นที่ใช้คือ 50 มิลลิลิตร จากนั้น คำนวณปริมาณน้ำตาลที่เหลือ แล้วแบ่งการเติมน้ำตาลที่เหลือออกเป็น 4 แบบ โดยเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นทุก 6 ชั่วโมง ดังนี้

4.1.1 การเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นครั้งเดียว แบ่งเติมน้ำตาลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเพิ่มอีก 50 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นน้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ ในชั่วโมงที่ 6 จากนั้นทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง

4.1.2 การเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสองครั้ง แบ่งเติมน้ำตาลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 2 ครั้ง ปริมาณอาหารที่ใช้เติมในแต่ละครั้งคือ 25 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นน้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นชั่วโมงที่ 6 และ ชั่วโมงที่ 12 จากนั้นทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง

4.1.3 การเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสามครั้ง แบ่งเติมน้ำตาลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 3 ครั้ง ปริมาณอาหารที่ใช้เติมในแต่ละครั้งคือ 16.7 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นน้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นชั่วโมงที่ 6 ชั่วโมงที่ 12 และชั่วโมงที่ 18 จากนั้นทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง

4.1.4 การเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสี่ครั้ง แบ่งเติมน้ำตาลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 4 ครั้ง ปริมาณอาหารที่ใช้เติมในแต่ละครั้งคือ 12.5 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นน้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้น 16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นชั่วโมงที่ 6 ชั่วโมงที่ 12 ชั่วโมงที่ 18 และชั่วโมงที่ 24 จากนั้นทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 เวลาและปริมาตรของอาหารที่เติมแบบ linear increment feeding

Time	linear 1 time		linear 2 times		linear 3 times		linear 4 times	
(h)	Va	Vf	Va	Vf	Va	Vf	Va	Vf
6	50	50	50	25	50	16.7	50	12.5
12		100	75	25	66.7	16.7	62.5	12.5
18				100	83.3	16.7	75	12.5
24						100	87.5	12.5
								100

หมายเหตุ Vf = ปริมาตรอาหารที่เติม (มิลลิลิตร)

Va = ปริมาตรอาหารสะสม ณ เวลาที่เติมอาหาร (มิลลิลิตร)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

4.2 การเติมอาหารแบบ exponential increment feeding

ทำการทดลองโดยการเตรียมอาหารให้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นปริมาณต่ำ เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการหมักแบบแบทช์มาคำนวณ ตามสมการนี้

$$V_f = \frac{e^{\mu_{max}}}{\sum e^{\mu_{max}}} \cdot V_a$$

โดยที่: Va = ปริมาตรอาหารสะสม ณ เวลาที่เติมอาหาร (มิลลิลิตร)

Vf = ปริมาตรอาหารที่เติม (มิลลิลิตร)

μ_{max} = อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (h^{-1}) = 0.296 h^{-1}

เพื่อหาการเติมปริมาณน้ำตาลแบบ exponential increment feeding โดยให้มีปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสุดท้าย 100 มิลลิลิตร และเติมอาหารทุก 6 ชั่วโมง เช่นเดียวกับข้อ 4.1 พบว่าการเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นแบบ exponential increment feeding แบ่งออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

4.2.1 การเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสองครั้ง เตรียมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นโดยให้มีน้ำตาลเริ่มต้น 1.6 กรัม และมีปริมาตรของอาหารเริ่มต้น 40 มิลลิลิตร สำหรับน้ำตาลที่เหลือทำการเจือจางน้ำอ้อยเข้มข้น 60 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 27.3 เปอร์เซ็นต์ (คิดเป็นปริมาณน้ำตาล 16.4 กรัม) โดยเติมปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 26.28 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 34.84 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 จากนั้นทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง

4.2.2 การเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสามครั้ง เตรียมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นให้มีน้ำตาลเริ่มต้นและมีปริมาตรของอาหารเริ่มต้นเช่นเดียวกับข้อ 4.2.1 และทำการเจือจางน้ำตาลที่เหลือในน้ำอ้อยเข้มข้น 60 มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 27.3 เปอร์เซ็นต์ โดยแบ่งการเติมปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเป็น 3 ครั้งคือ 14.78 มิลลิลิตร 20.24 มิลลิลิตร และ 27.71 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 12 และ 18 ตามลำดับ จากนั้นทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง

4.2.3 การเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสี่ครั้ง เตรียมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นให้มีน้ำตาลเริ่มต้น 1 กรัม และมีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางน้ำตาลในน้ำอ้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เข้มข้น 75 มิลลิลิตร โดยให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 22.7 เปอร์เซ็นต์ (คิดเป็นปริมาณน้ำตาล 17 กรัม) โดยแบ่งการเติมปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเป็น 4 ครั้งคือ 7.21 มิลลิลิตร 9.29 มิลลิลิตร 11.97 มิลลิลิตร และ 53.46 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 12 18 และ 24 ตามลำดับ จากนั้นทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 เวลาและปริมาตรอาหารที่เติมแบบ exponential increment feeding

Time	exponential 2 times		exponential 3 times		exponential 4 times	
(h)	Va	Vf	Va	Vf	Va	Vf
6	40	26.3	40	14.8	25	7.2
12	66.3	34.8	54.8	20.2	32.2	9.3
18		101.1	75	27.7	41.5	12
24				102.7	53.5	53.5
						106.9

หมายเหตุ Vf = ปริมาตรอาหารที่เติม (มิลลิตร)
Va = ปริมาตรอาหารสะสม ณ เวลาที่เติมอาหาร (มิลลิลิตร)

4.3 การเติมอาหารแบบ sigmoidal increment feeding

ทำการทดลองเตรียมอาหารให้มีน้ำตาลเริ่มต้นปริมาณต่ำเช่นเดียวกับข้อ 5.2 และเมื่อคำนวณตามสมการข้างล่างนี้

$$V_f = \frac{\mu_{max}}{Y_{x/s}} \cdot XV_a \cdot e^{\mu t}$$

โดยที่: VF = ปริมาตรอาหารที่เติม (มิลลิลิตร)
μ_{max} = อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ชั่วโมง$^{-1}$)
$Y_{x/s}$ = ค่าคงที่ผลผลิตเซลล์จากสับสเตรท = 0.494 กรัมเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

X = น้ำหนักเซลล์แห้ง ณ เวลาที่เติมอาหาร (กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร)

Va = ปริมาตรอาหารสะสม ณ เวลาที่เติมอาหาร(มิลลิลิตร)

μ = อัตราการเจริญจำเพาะ ณ เวลาที่เติมอาหาร (ชั่วโมง$^{-1}$)

t = ระยะเวลาที่เริ่มเติมอาหาร (ชั่วโมง)

โดยทำการแบ่งเติมน้ำตาลที่เหลือออกเป็น 3 แบบ ซึ่งเมื่อคำนวณพบว่าแต่ละแบบมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นและปริมาณอาหารเริ่มต้นไม่เท่ากัน เติมปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นทุก 6 ชั่วโมง เช่นเดียวกับข้อ 4.1 และ 4.2 จากการคำนวณแบ่งการเติมน้ำตาลออกเป็น 3 แบบ ดังนี้

4.3.1 การเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสองครั้ง เตรียมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 2.92 กรัม และมีปริมาตรของอาหารเริ่มต้น 78 มิลลิลิตร สำหรับน้ำตาลที่เหลือทำการเจือจางน้ำอ้อยเข้มข้น 21.50 มิลลิลิตร โดยเติมปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 5.20 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 และเติมปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 16.30 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 12 จากนั้นทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง

4.3.2 การเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสามครั้ง เตรียมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 2.00 กรัม และมีปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเริ่มต้น 50 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางน้ำตาลที่เหลือกับน้ำอ้อยเข้มข้น 52 มิลลิลิตร โดยแบ่งการเติมปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเป็น 3 ครั้งคือ 4.3 มิลลิลิตร 13.90 มิลลิลิตร และ 33.80 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 12 และ 18 ตามลำดับ จากนั้นทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง

4.3.3 การเติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสี่ครั้ง เตรียมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 1.5 กรัม และมีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 30 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางน้ำตาลในน้ำอ้อยเข้มข้น 70 มิลลิลิตร โดยให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 28.9 เปอร์เซ็นต์ (คิดเป็นปริมาณน้ำตาล 16.50 กรัม) โดยแบ่งการเติมปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเป็น 4 ครั้งคือ 2.60 มิลลิลิตร 8.30 มิลลิลิตร 20.30 มิลลิลิตร และ 39.20 มิลลิลิตร ที่ชั่วโมงที่ 6 12 18 และ 24 ตามลำดับ จากนั้นทำการหมักจนครบ 72 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 8 เวลาและปริมาตรของอาหารที่เติมแบบ sigmoidal increment feeding

Time	sigmoidal 2 times		sigmoidal 3 times		sigmoidal 4 times	
(h)	Va	Vf	Va	Vf	Va	Vf
6	78	5.2	56	3.7	40	2.7
12	83.2	16.3	59.7	11.7	42.7	8.4
18		99.5	71.4	27.1	51	19.3
24				98.5	70.4	34.5
						104.9

หมายเหตุ Vf = ปริมาตรอาหารที่เติม (มิลลิตร)

Va = ปริมาตรอาหารสะสม ณ เวลาที่เติมอาหาร (มิลลิลิตร)

ทุกการทดลองทำอย่างละ 3 ซ้ำ เลือกการหมักแบบเฟด–แบทช์ที่ให้ผลในการผลิตเอทานอลสูงที่สุด เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไปในถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

5. ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้น โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ด้วยการหมักแบบเฟด-แบทช์ที่อุณหภูมิสูง โดยใช้ถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

เลือกการหมักแบบเฟด–แบทช์ ที่ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงที่สุดจากข้อ 4.1 4.2 และ 4.3 มาทำการทดลองในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร เตรียมกล้าเชื้อตามข้อ 1.1 โดยมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ ส่วนปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเริ่มต้นอยู่ในช่วงระหว่าง 500–1,000 มิลลิลิตร เติมแหล่งไนโตรเจน โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ตามที่เลือกได้ในข้อ 2.2.1 2.2.2 และ 2.2.3 อุณหภูมิที่เลือกจากข้อ 3.1 อัตราการให้อากาศที่เลือกจากข้อ 3.2 พีเอชเริ่มต้นที่เลือกจากข้อ 3.3 และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ทำการหมักในสภาวะอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล และน้ำตาลที่เหลือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

6. ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ด้วยการหมักแบบแบทช์และแบบเฟด-แบทช์ ที่อุณหภูมิสูง ในสภาวะอาหารไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (non-sterile) โดยใช้ถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการทดลองเพื่อศึกษาการหมักเอทานอลระหว่างการหมักแบบแบทช์และแบบเฟด-แบทช์ ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยการหมักแบบแบทช์ เตรียมน้ำตาลเริ่มต้น 18 เปอร์เซ็นต์ เติมแหล่งไนโตรเจน โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ตามที่เลือกได้ ในข้อ 2.2.1 2.2.2 และ 2.2.3 อุณหภูมิที่เลือกจากข้อ 3.1 อัตราการให้อากาศที่เลือกจากข้อ 3.2 พีเอชเริ่มต้นที่เลือกจากข้อ 3.3 และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที สำหรับการหมักแบบเฟด-แบทช์ เลือกการหมักแบบเฟด-แบทช์ที่ให้เอทานอลและการเจริญสูงสุดในข้อ 6 ซึ่งทำการทดลองในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล และน้ำตาลที่เหลือ

7. ศึกษาการผลิตเอทานอลแบบรีพีทแบทช์จากน้ำอ้อยเข้มข้น โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042ในถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการทดลองในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรของอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ใช้ 1.5 ลิตร เตรียมกล้าเชื้อจากข้อ 1.1 โดยมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 18 เปอร์เซ็นต์ เติมแหล่งไนโตรเจน โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ตามที่เลือกได้ในข้อ 2.2.1 2.2.2 และ 2.2.3 อุณหภูมิที่เลือกจากข้อ 3.1 อัตราการให้อากาศที่เลือกจากข้อ 3.2 พีเอชเริ่มต้นที่เลือกจากข้อ 3.3 และอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ทำการหมักในสภาวะอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีโดยทำการทดลองไปพร้อมกัน เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งจะทำการทดลองแบบต่อเนื่องเป็นจำนวน 3 แบทช์ โดยแบทช์แรกใช้เวลา 72 ชั่วโมง และแบทช์ที่ 2 และ 3 ใช้เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 1 แบทช์จะเตรียมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นใหม่ทุกครั้ง และนำอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเก่าออก 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารทั้งหมด นำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล และน้ำตาลที่เหลือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8. ศึกษาองค์ประกอบในกากส่าและการนำกากส่ากลับมาใช้ในการผลิตเอทานอล

นำอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสุดท้ายชั่วโมงที่ 72 ที่ได้จากการหมักแบบแบทช์และการหมักแบบเฟด–แบทช์ ต้มไล่เอทานอลเป็นเวลา 30 นาที และนำน้ำกากส่าที่ไล่เอทานอลแล้วมาปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์และส่วนใส

8.1 องค์ประกอบของน้ำกากส่า

นำตัวอย่างส่วนใสของน้ำกากส่าที่ผ่านการแยกตะกอนเซลล์ ไปวิเคราะห์เพื่อหาองค์ประกอบ เพื่อใช้เป็นข้อมูลในการนำไปใช้ในการทดลองต่อไป โดยศึกษาองค์ประกอบ ดังนี้

8.1.1 น้ำตาลที่เหลือจากการหมักเอทานอล นำตัวอย่างส่วนใสของน้ำกากส่าที่ผ่านการแยกตะกอนเซลล์ออก ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือด้วยเครื่อง HPLC เพื่อใช้ในการเตรียมเป็นส่วนผสมในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ใช้ในการหมักเอทานอลครั้งต่อไป

8.1.2 ปริมาณความเข้มข้นแอมโมเนียม (NH_4-N) ที่เหลือจากการหมักเอทานอล นำตัวอย่างส่วนใสของน้ำกากส่าที่ผ่านการแยกตะกอนเซลล์ออกไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง auto analyzer เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่เหลือ

8.1.3 ปริมาณความเข้มข้นไนไตร์และความเข้มข้นไนเตรต (NO_2–N, NO_2+NO_3–N) ที่เหลือจากการหมักเอทานอล นำตัวอย่างส่วนใสของน้ำกากส่าที่ผ่านการแยกตะกอนเซลล์ออกไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง auto analyzer เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของไนไตร์ และความเข้มข้นของไนไตร์–ไนเตรตที่เหลือ นำผลการวิเคราะห์ที่ได้มาหักลบกันจะได้เป็นความเข้มข้นของไนเตรตที่เหลือ

8.1.4 ปริมาณความเข้มข้นฟอสเฟต (PO_4–P) ที่เหลือจากการหมักเอทานอลนำตัวอย่างส่วนใสของกากส่าที่ผ่านการแยกตะกอนเซลล์ออกไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง auto analyzer เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตที่เหลือ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.1.5 ปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดที่ละลายน้ำ (total dissolved phosphate, TDP) ที่เกิดขึ้นจากการหมักเอทานอล นำตัวอย่างส่วนใสของน้ำกากส่าที่ผ่านการแยกตะกอนเซลล์ออกไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง auto analyzer เพื่อหาปริมาณความเข้มข้นของฟอสเฟตทั้งหมดที่ละลายน้ำ

8.1.6 ปริมาณคาร์บอนทั้งหมดที่ประกอบอยู่ในสารอินทรีย์ (total organic carbon, TOC) ที่เกิดขึ้นจากการหมักเอทานอล นำตัวอย่างส่วนใสของน้ำกากส่าที่ผ่านการแยกตะกอนเซลล์ออกไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง TOC เพื่อหาปริมาณคาร์บอนทั้งหมดที่ประกอบอยู่ในสารอินทรีย์

8.2 ผลของน้ำกากส่าต่อการผลิตเอทานอล

ทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร เตรียมกล้าเชื้อได้จากข้อ 1.1 โดยใช้กล้าเชื้อปริมาณ 5 มิลลิลิตร เติมแหล่งไนโตรเจน โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ตามที่เลือกได้ในข้อ 2.2.1 2.2.2 และ 2.2.3 อุณหภูมิที่เลือกได้จากข้อ 3.1 โดยนำน้ำหมักที่ผ่านการระเหยเอทานอลมาผสมกับอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสดในสัดส่วน 10 20 30 40 50 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเตรียมให้มีน้ำตาลเข้มข้นทั้งหมด 18 เปอร์เซ็นต์ นำอาหารไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และบ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ โดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทำการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมง 72 จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล และน้ำตาลที่เหลือ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

9. ศึกษาคุณภาพของน้ำอ้อยเข้มข้นที่เก็บในอุณหภูมิห้องโดยวิธีต่างๆ

ทำการทดลองโดยนำน้ำอ้อยเข้มข้นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ลงในภาชนะที่ปิดฝาสนิท แต่ละภาชนะมีวิธีการเก็บรักษาน้ำอ้อยเข้มข้นที่แตกต่าง 4 แบบ ดังนี้

แบบที่ 1 น้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่มีการเติมสารเคมี
แบบที่ 2 น้ำอ้อยเข้มข้นที่มีการปรับพีเอช 4.5
แบบที่ 3 น้ำอ้อยเข้มข้นที่มีการเติมโพแทสเซียม เมตาไบซัลไฟต์ 200 พีพีเอ็ม
แบบที่ 4 น้ำอ้อยเข้มข้นที่มีการเติมกรดเบนโซอิค 200 พีพีเอ็ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยเก็บตัวอย่างวันละครั้งทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 4 เดือน นำตัวอย่างมาทดลองโดยใช้วิธีการ spread plate ลงบนอาหาร nutrient agar (NA) เก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรและทำการเจือจางกับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

10. การวัดการเจริญจากการวัดความขุ่นของเซลล์

วัดการเจริญของเซลล์ โดยการนำเซลล์ที่แยกได้จากน้ำหมักด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) นำเซลล์มาล้าง 2 ครั้งด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำให้เซลล์กระจายและเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์อีกครั้ง จึงนำเซลล์ที่เจือจางไปวัดความขุ่น (optical density; OD) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Shimuzu, Japan) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

11. การวิเคราะห์เอทานอล

วิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่อง Gas Chromatography (Shimadzu GC-9A พร้อมเครื่องบันทึก (CR-3A) โดยใช้ n-propanol เป็น internal standard ตามวิธีของ Komagata และ Ohmomo (1984)

11.1 สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์

packing material	: 10% polyethylene glycol 20M ขนาด 100-120 mesh เคลือบบน shimalite (silica oxide)
column size	: ท่อแก้วเส้นผ่าศูนย์กลางภายใน 3.2 มิลลิเมตร ยาว 1.1 เมตร
column temperature	: 90 องศาเซลเซียส
injection temperature	: 150 องศาเซลเซียส
detector	: FID (flame-ionized detector) 150 องศาเซลเซียส
carrier gas	: ไนโตรเจน
flow rate	: 50 มิลลิลิตรต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

11.2 สารมาตรฐาน

11.2.1 เตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐานเข้มข้น 2 และ 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยชั่งเอทานอลบริสุทธิ์ (99.5 เปอร์เซ็นต์) 2 และ 8 กรัม ใส่ใน volumetric flask ขนาด 100มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันและปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

11.2.2 เตรียมสารละลายมาตรฐาน n-propanol เข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เพื่อใช้เป็น internal standard โดยชั่ง n-propanol บริสุทธิ์ (99.0 เปอร์เซ็นต์) 10 กรัม ใส่ใน volumetric flaskขนาด 250 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน และปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

11.2.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของเอทานอลที่ 2 และ 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยใช้ n-propanol 4 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก เป็น internal standard

สร้างกราฟมาตรฐานตามวิธี two-point calibraton curve method (internal standard method) (Chromatopac C-R3A Instruction Manual Analytical instruments plant. Tokyo, Japan) โดยใช้สารละลายเอทานอลมาตรฐาน 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักผสมกับสารละลายโพรพานอล 4 เปอร์เซ็นต์ใน อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เป็น standard ที่ 1 และใช้สารละลายเอทานอลมาตรฐาน 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักผสมกับสารละลายโพรพานอล 4 เปอร์เซ็นต์ใน อัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร เป็น standard ที่ 2 inject เข้าเครื่อง gas chromatography โดยปริมาตรที่ใช้เท่ากับ 1 ไมโครลิตร จากนั้นบันทึก retention time และความเข้มข้นของเอทานอลมาตรฐานกับ n-propanol แต่ละชุดไว้ในเครื่อง

12. การวิเคราะห์น้ำตาล

วิเคราะห์น้ำตาลโดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC, Agilent 1100, USA)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

12.1 สภาพที่ใช้ในการวิเคราะห์

column	: Shodex SC1010
packing material	: Sulfonic acid type polystyrene cation exchange resin(Ca type)
column size	: 300 x 8.0 มิลลิเมตร
mobile phase	: deionized water
flow rate	: 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที
detector	: Refractive Index Detector (RID)

12.2 การเตรียม stock standard mixture ของน้ำตาลที่ต้องการวิเคราะห์

เตรียมสารละลายมาตรฐานผสมของซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส ที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้เย็นใน desicator เป็นเวลา 1 ชั่วโมง อย่างละ 1 เปอร์เซ็นต์ โดยละลายน้ำตาลทั้งหมดรวมกันใน volumetric flask ขนาด 25 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำที่ทำให้ปราศจากไอออน (deionized water) จากนั้นนำสารละลายมาตรฐานที่ได้ไปกรองด้วยตัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.2 ไมโครเมตร

12.3 การเตรียม calibration curve

ฉีด stock standard mixture (ซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส ผสมกัน) โดยน้ำตาลแต่ละชนิดเตรียมความเข้มข้นอย่างละ 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตรด้วยเครื่อง HPLC ทำการปรับเทียบ (calibrated) ระหว่างพื้นที่ของ peak กับความเข้มข้นของน้ำตาลให้เท่ากับปริมาตรของน้ำตาลแต่ละชนิดที่เตรียม stock standard mixture

12.4 การวิเคราะห์น้ำตาลในตัวอย่างอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ได้จากการหมัก

ทำการเจือจางตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการเหวี่ยงแยกเอาเซลล์ยีสต์ออกแล้วด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนที่ผ่านการกรองแล้ว และกรองผ่านตัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.2 ไมโครเมตร ฉีดตัวอย่างที่ผ่านการกรองปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าเครื่อง HPLC เครื่องจะทำการวิเคราะห์ retention

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

time ของ peak ที่ได้แล้วเทียบกับ calibration curve และรายงานความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดออกมาในรูปเปอร์เซ็นต์ นำความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้คูณกับระดับการเจือจางตัวอย่างข้างต้น ก็จะได้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด (ซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส) ที่มีอยู่ในตัวอย่าง จากนั้นนำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ไปหาค่าอัตราของการผลิตเอทานอล และผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี ด้วยสูตรต่อไปนี้ (Morimura *et al.,* 1997)

Productivity (g/l/h) = $(P_f - P_i)/t$

Fermentation yield (% of thereotical yield)

$$\% \text{ Theoretical yield} = \frac{\text{Final ethanol concentration}}{\left[\frac{(SCi \times 360)}{342} + GCi + FCi\right] - \left[\frac{(SCf \times 360)}{342} + GCf + FCf\right] \times \frac{92}{180}} \times 100$$

โดยที่

P_f = ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)

P_i = ความเข้มข้นเอทานอลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)

SCi = ความเข้มข้นซูโครสเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)

GCi = ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)

FCi = ความเข้มข้นฟรุกโทสเริ่มต้น (เปอร์เซ็นต์)

SCf = ความเข้มข้นซูโครสสุดท้าย (เปอร์เซ็นต์)

GCf = ความเข้มข้นกลูโคสสุดท้าย (เปอร์เซ็นต์)

FCf = ความเข้มข้นฟรุกโทสสุดท้าย (เปอร์เซ็นต์)

t = ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

สถานที่ทำการวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาทำการวิจัย

ทำการวิจัยตั้งแต่เดือนเมษายน พ.ศ. 2552 จนถึงเมษายน พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ผลและวิจารณ์

น้ำอ้อยดิบและน้ำอ้อยเข้มข้นที่นำมาใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท สหการน้ำตาลชลบุรี จำกัด อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี เมื่อพิจารณาลักษณะทางกายภาพน้ำอ้อยดิบ พบว่ามีลักษณะเป็นของเหลวสีเทาเข้มและมีตะกอนแขวนลอยอยู่เป็นจำนวนมาก จากการสังเกตพบตะกอนส่วนใหญ่เป็นเศษชานอ้อยที่มาจากการหีบอ้อย นอกจากนั้นยังมีเศษดินและผงถ่านบางส่วนอยู่ในน้ำอ้อย ซึ่งคาดว่าน่าจะมาจากการเผาอ้อยก่อนการเก็บเกี่ยว นอกจากนั้นเมื่อวัดพีเอชเริ่มต้นในน้ำอ้อยดิบ พบว่ามีพีเอชค่อนข้างเป็นกรดประมาณเท่ากับ 4.80 ส่วนลักษณะทางกายภาพของน้ำอ้อยเข้มข้นที่นำมาใช้ในการทดลอง พบว่ามีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีน้ำตาล ซึ่งเป็นน้ำอ้อยดิบที่ผ่านการตกตะกอนและการระเหยน้ำออก เมื่อวัดพีเอชเริ่มต้น พบว่าน้ำอ้อยเข้มข้นมีพีเอชเป็นกรดเล็กน้อยประมาณ 6.20

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบน้ำตาลในน้ำอ้อยดิบและน้ำอ้อยเข้มข้นเพื่อใช้เตรียมเป็นอาหารสำหรับหมักตลอดการทดลองด้วยเครื่อง HPLC พบว่าในน้ำอ้อยดิบและน้ำอ้อยเข้มข้นประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิดรวมกันได้แก่ ซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส โดยน้ำอ้อยดิบและน้ำอ้อยเข้มข้นจะมีซูโครสเป็นส่วนใหญ่คิดเป็น 80.5 และ 93.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำตาลทั้งหมดตามลำดับ น้ำอ้อยดิบมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 15.84 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยซูโครส 12.75 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 1.58 เปอร์เซ็นต์ และฟรุกโทส 1.51 เปอร์เซ็นต์ สำหรับน้ำอ้อยเข้มข้นมีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 57.39 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วยซูโครส 53.62 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส 2.27 เปอร์เซ็นต์ และฟรุกโทส 1.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่วิเคราะห์จะนำไปใช้คำนวณในการเตรียมน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมดในการทดลองต่อไป

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพแหล่งวัตถุดิบที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* DMKU3-1042 ระหว่างน้ำอ้อยดิบและน้ำอ้อยเข้มข้น

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถหมักเอทานอลในอาหาร น้ำอ้อยดิบและน้ำอ้อยเข้มข้นในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ใช้ปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร โดยเจือจางความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำอ้อยเข้มข้นให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ และเติมน้ำตาลทรายแดงลงในอาหารที่ใช้น้ำอ้อยดิบให้มีความเข้มข้นน้ำตาลเท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาหารทั้ง 2 ชนิดจะเติม

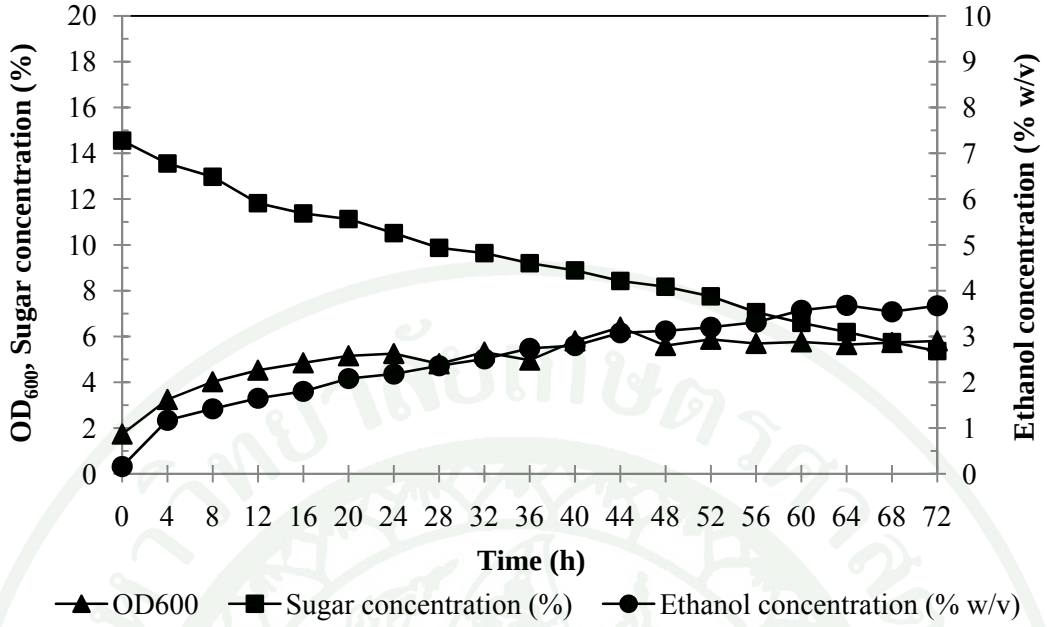
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สารอาหารเหมือนกันได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 (Limtong *et al*., 2007) หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที

ผลการทดลอง พบว่าการหมักในอาหารน้ำอ้อยดิบ *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 3.68 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 64 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 75.5 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี โดยพบว่ายีสต์หมักเอทานอลค่อนข้างช้า จึงทำให้เมื่อสิ้นสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง หมักได้เอทานอลเพียง 3.67 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และมีน้ำตาลคงเหลือในปริมาณที่สูงเท่ากับ 5.36 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาการเจริญจากการวัดความขุ่นที่ OD_{600} พบว่ายีสต์มีการเจริญต่ำโดยจะพบการเจริญให้ความขุ่นเพียง 6.4 ที่เวลา 44 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจะลดลงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่ายีสต์มีการเจริญช้าในอาหารน้ำอ้อยดิบ จึงทำให้มีความเข้มข้นของเซลล์ไม่เพียงพอที่จะหมักเอทานอลในปริมาณสูง สำหรับการหมักในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น พบว่า *K. marxianus* DMKU3-1042 มีความสามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 6.20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.86 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 84.87 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี โดยยีสต์จะมีอัตราการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นได้เร็วกว่าในอาหารน้ำอ้อยดิบ เมื่อพิจารณาการเจริญ (OD_{600}) พบว่ายีสต์มีการเจริญอย่างช้าๆ และสม่ำเสมอ ซึ่งจะพบการเจริญสูงเท่ากับ 13.91 ที่เวลา 56 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญจะลดลงเช่นเดียวกับการเจริญในอาหารน้ำอ้อยดิบ อย่างไรก็ตาม ยังพบน้ำตาลคงเหลือในอาหารหมักเท่ากับ 4.16 เปอร์เซ็นต์

สรุปผลการทดลองการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยดิบและน้ำอ้อยเข้มข้น พบว่า *K. marxianus* DMKU3-1042 มีความสามารถในการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นได้ดีกว่าอาหารน้ำอ้อยดิบ และยีสต์มีการเจริญที่ดีกว่า ดังนั้นจึงเลือกอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นมาศึกษาในการทดลองต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

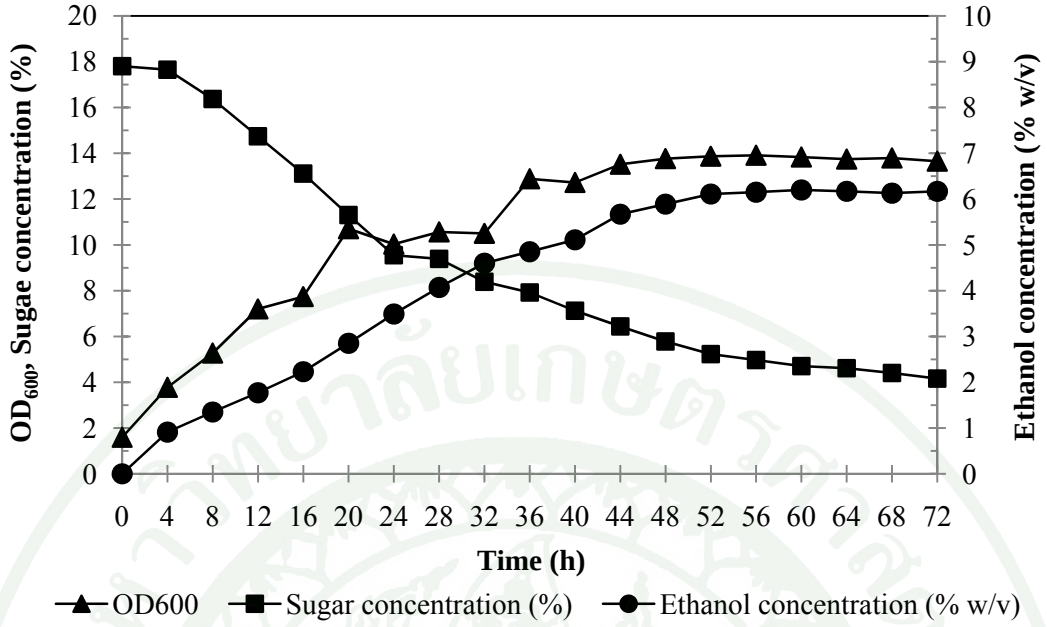


$EtOH_{max}$ = 3.68 % w/v, productivity = 0.51 g/l/h,

Fermentation yield = 75.5 % of theoretical yield

ภาพที่ 6 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลจากน้ำอ้อยดิบโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



$EtOH_{max}$ = 6.20 % w/v, productivity = 0.86 g/l/h,
Fermentation yield = 84.87 % of theoretical yield

ภาพที่ 7 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้น โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

2. ศึกษาสูตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* DMKU 3-1042

2.1 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการเจริญและการหมักเอทานอล

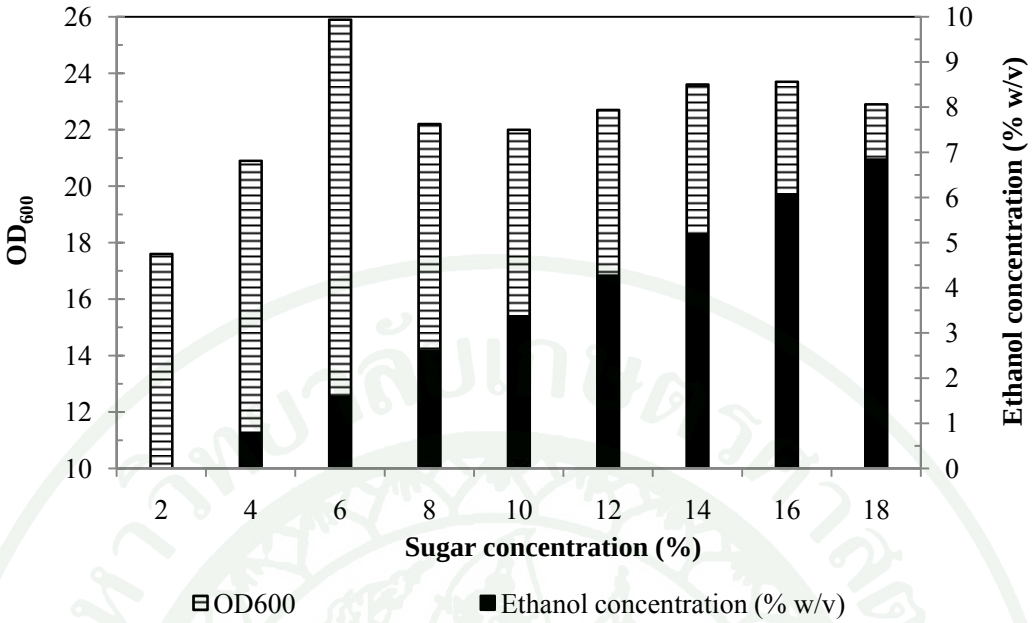
นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถในการเจริญและหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 2 4 6 8 10 12 14 16 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 (Limtong *et al*., 2007) ปริมาตรของอาหารที่ใช้

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เท่ากับ 50 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ผลการทดลอง พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 สามารถเจริญได้ดีที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์มีการเจริญ (OD_{600}) สูงสุดเท่ากับ 25.9 และเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 48 ชั่วโมง พบว่ายีสต์หมักเอทานอลได้เท่ากับ 1.59 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร สำหรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ พบการเจริญน้อยที่สุดเท่ากับ 17.6 และไม่พบการหมักเอทานอลเกิดขึ้น ขณะที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นเท่ากับ 20.9 และเริ่มพบว่ามีการหมักเอทานอลเกิด โดยหมักเอทานอลได้เท่ากับ 0.79 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์ใช้น้ำตาลทั้งหมดเพื่อเป็นแหล่งพลังงานเพิ่มมวลเซลล์ เนื่องจากเมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีสต์มีการเจริญที่เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้นเป็น 8 10 12 14 16 และ 18 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีสต์มีการการเจริญลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการเจริญที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ โดยให้ค่าการเจริญที่ไม่แตกต่างกันคือ 22.2 22.0 22.7 23.6 23.7 และ 22.9 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการหมักเอทานอลเมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นน้ำตาล 8 10 12 16 และ 18 เปอร์เซ็นต์ พบว่ายีสต์มีการหมักและสะสมเอทานอลเกิดขึ้นคือ 0.79 1.59 2.61 3.37 4.27 5.18 6.07 และ 6.84 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ ดังแสดงภาพที่ 8 ซึ่งสรุปได้ว่ายีสต์หมักให้เอทานอลสูงขึ้น เมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นสูงขึ้นจะส่งผลให้ยีสต์มีการเจริญลดลง เนื่องจากแรงดันออสโมซิสจากการใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงจะส่งผลกระทบต่อเซลล์ ทำให้เซลล์เกิดการขาดน้ำ จึงทำให้ยีสต์มีการเจริญลงลง ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 เจริญได้สูงสุด โดยความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของยีสต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 8 ผลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 จากอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 2 4 6 8 10 12 14 16 และ 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2 ผลของความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล

2.2.1 ผลของแหล่งไนโตรเจน

นำยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถในการเจริญและการหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.05 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับอาหารสำหรับหมักที่ใส่แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ อย่างละ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (Control 2) และเทียบกับอาหารสำหรับหมักที่ใส่แอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

และแมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ อย่างละ 0.05 เปอร์เซ็นต์และสารสกัดยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (Control 1) ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 ปริมาตรของอาหารที่ใช้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 9 ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.075 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 6.38 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 72.67 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำตาลคงเหลือ 0.82 เปอร์เซ็นต์ ส่วนความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 6.48 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.35 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 73.97 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำตาลคงเหลือ 0.87 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ Control 2 เมื่อสิ้นสุดการหมักให้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 6.33 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.32 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 73.26 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และมีน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 1.1 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ Control 1 เมื่อสิ้นสุดการหมักให้เอทานอลสูงสุด 6.94 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.45 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 75.85 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และมีน้ำตาลคงเหลือ 0.09 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาการเจริญจากการวัดค่า OD_{600} พบว่าอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำอย่างละ 0.05 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญจากการวัดค่า OD_{600} เท่ากับ 27.8 ซึ่งมีการเจริญสูงกว่าการหมักในอาหารที่มีสารสกัดยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์เพียงเล็กน้อย (OD_{600} เท่ากับ 26.6) ซึ่งเกิดจากยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเป็นส่วนใหญ่ ทำให้การเจริญจากการวัดค่า OD_{600} มีค่าสูง จึงทำให้หมักเอทานอลได้น้อยเมื่อสิ้นสุดการหมัก

จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่า สารสกัดยีสต์มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ เนื่องจากทำให้ยีสต์มีการหมักเอทานอลและมีอัตราการผลิตเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ซึ่งจากรายงานของอรุณ (2553) อธิบายว่า สารสกัดยีสต์ ประกอบด้วยสารอาหารที่สำคัญนิยมใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและวิตามิน ทำให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตและผลิตสารตามต้องการได้ดีขึ้น โดยทั่วไปจะถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในกระบวนการหมัก เพราะเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เจริญของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้ยีสต์มีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน ทำให้มีการเจริญและการผลิตเอทานอลสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม สารสกัดยีสต์ มีราคาแพง จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากทำให้ต้นทุนในการผลิตเอทานอลสูงขึ้น

เมื่อพิจารณาจากผลการทดลอง จึงเลือกระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ ตามที่เคยมีการทดลองไว้แล้ว (Limtong *et al*., 2007) เพราะนอกจากจะให้ปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์แล้ว การเจริญจากการวัดค่า OD_{600} ก็มีการเจริญที่สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น

ชุติมา (2548) ศึกษาผลของความเข้มข้นและชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในอาหารน้ำอ้อย ผลการทดลองพบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 สามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดเมื่อใช้ยูเรียเข้มข้น 0.04 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน หมักเอทานอลได้เท่ากับ 10.43 และ 8.41 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ขณะที่การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเข้มข้น 0.05 เปอร์เซ็นต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้น้อยกว่า มีค่าเท่ากับ 9.32 และ 8.36 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ แต่พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งไนโตรเจน ยีสต์มีอัตราการผลิตเอทานอลที่สูงกว่าและหมักเอทานอลได้เร็ว เมื่อเทียบกับยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นอื่น ดังนั้นจึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลการหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดยยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ให้ผลที่คล้ายกับรายงานของชุติมา (2548) เนื่องจากที่แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์หมักเอทานอลได้น้อยกว่าที่ความเข้มข้นอื่นเล็กน้อยและมีอัตราการผลิตเอทานอลที่ไม่แตกต่างกัน นอกจากนั้นการเพิ่มความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้ยีสต์มีการเจริญลดลง

Breisha (2010) ศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครส 25 เปอร์เซ็นต์ โดย *S. cerevisiae* อาหารที่ใช้หมัก (กรัมต่อลิตร) ประกอบด้วย สารสกัดยีสต์ 3 กรัม แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.5 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 1.5 กรัม และเปปโทน 5 กรัม พบว่า *S. cerevisiae* ใช้น้ำตาลได้อย่างสมบูรณ์ที่ 48 ชั่วโมงและหมักเอทานอลได้เท่ากับ 11.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และมีการเจริญมาก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่สุดเท่ากับ 1.34×10^8 cfu/ml แสดงให้เห็นว่า แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญและการหมักเอทานอลในสภาวะที่น้ำตาลมีความเข้มข้นสูง ซึ่งผลการทดลองหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ให้ผลที่สอดคล้องกับรายงานของ Gaber (2010) เนื่องจากการเติมแหล่งไนโตรเจนมากกว่าหนึ่งแหล่งช่วยส่งเสริมให้ยีสต์มีการเจริญได้ดีและผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีสารสกัดยีสต์และแอมโมเนียมซัลเฟต

2.2.2 ผลของแหล่งโพแทสเซียม

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถในการเจริญและการหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 ปริมาตรของอาหารที่ใช้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ผลการทดลอง ที่ความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 6.43 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.34 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 72.90 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และมีน้ำตาลคงเหลือ 0.75 เปอร์เซ็นต์ สำหรับที่ความเข้มข้น 0.075 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.38 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 72.67 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี จากผลการทดลองหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่แตกต่างกัน พบว่าหมักเอทานอลได้แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อเทียบกับอาหารหมักที่มีการเสริมสารสกัดยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (Control 2) พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้น้อยกว่า 0.51 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาการเจริญจากการวัดค่า OD_{600} พบว่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเจริญสูงสุดเท่ากับ 28.3 รองลงมาคือที่ความเข้มข้น 0.05 และ 0.075 เปอร์เซ็นต์ มีค่าการเจริญเท่ากับ 27.8 และ 25.1 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9 เนื่องจากเอทานอลและการเจริญมีค่าที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แสดงให้เห็นว่า การเพิ่มความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไม่ได้ช่วย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ส่งเสริมให้ยีสต์มีการผลิตเอทานอลและการเจริญที่เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ดังนั้นจึงยังคงใช้ที่ระดับความเข้มข้นเดิมที่มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้คือ ความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์

Limtong *et al*. (2007) ศึกษาหาความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 22 เปอร์เซ็นต์ โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยศึกษาโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างกัน ได้แก่ 0 0.025 0.05 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ หมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่ความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 7.65 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ผลผลิตการหมักเท่ากับ 68.1 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ดังนั้นจึงเลือกความเข้มข้นโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ให้ผลที่สอดคล้องกับรายงานของ Limtong *et al*. (2007) เนื่องจากเอทานอลที่ได้จากการหมักที่ความเข้มข้มโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลที่ไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นอื่น

2.2.3 ผลของแหล่งแมกนีเซียม

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถในการเจริญและการหมักเอทานอลที่ระดับความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.075 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 ปริมาตรของอาหารที่ใช้เท่ากับ 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ใน ฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 6.61 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมัก 74.94 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และมีน้ำตาลคงเหลือ 0.74 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่ความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟต 0.075 และ 0.05 เปอร์เซ็นต์ หมักเอทานอลได้ 6.46 และ 6.33 เปอร์เซ็นต์โดย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปริมาตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อเทียบกับอาหารหมักที่เสริมสารสกัดยีสต์ 0.05 เปอร์เซ็นต์ (Control 2) พบว่าเอทานอลที่ได้มีค่าน้อยกว่า 0.33 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มความเข้มข้นของแมกนีเซียมซัลเฟตช่วยส่งเสริมให้การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น เนื่องจากแมกนีเซียมมีความเกี่ยวข้องกับลักษณะทางกายภาพของเซลล์ กิจกรรมและหน้าที่ต่างๆ ที่ช่วยให้ยีสต์การเจริญและการแบ่งเซลล์ รวมถึงการทำงานของเอนไซม์เพิ่มขึ้น (Walker, 1998) นอกจากนั้นแมกนีเซียมมีความสำคัญในการป้องกันเซลล์ที่เกิดจากความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงขึ้น ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ยีสต์ และเมื่อพิจารณาการเจริญจากการวัดค่า OD_{600} พบว่าการเจริญที่เกิดจากการหมักที่มีการเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 3 ความเข้มข้น มีค่าการเจริญที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟตอย่างละ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ยังคงให้ค่าการเจริญสูงที่สุดเท่ากับ 27.8 ขณะที่การเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญจากการวัดค่า OD_{600} เท่ากับ 26.1 ดังแสดงในตารางที่ 9 เมื่อพิจารณาผลการทดลองต้องการเอทานอลในปริมาณสูงเป็นส่วนสำคัญ ดังนั้นจึงเลือกแมกนีเซียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

Birch and Walker (2000) ศึกษาบทบาทของแมกนีเซียมในการขัดขวางสภาวะกดดันที่เกิดจากอุณหภูมิและเอทานอลต่อการมีชีวิต (viability) ของไวน์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* L-2226 พบว่า *S. cerevisiae* L-2226 มีการรอดชีวิตได้สูงเมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิและเอทานอลเพิ่มขึ้น เมื่อมีการเติมแมกนีเซียมในปริมาณที่เหมาะสม แสดงให้เห็นว่าแมกนีเซียมมีความสำคัญ ซึ่งช่วยป้องกันความเสียหายที่เกิดกับเซลล์ยีสต์ ทำให้ยีสต์สามารถทนต่ออุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักได้ในกรณีที่ไม่มีการใช้ระบบหล่อเย็นและเอทานอลที่เพิ่มขึ้นได้ จากผลการทดลองหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ให้ผลที่สอดคล้องกับรายงานของ Birch and Walker (2000) เนื่องจากการเพิ่มปริมาณแมกนีเซียม ทำให้ยีสต์มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางที่ 9 ผลของแอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042

	ปริมาณ (%)	OD600nm	น้ำตาลที่เหลือ (%)				Ethanol (%, w/v)
			Sucrose	**Glucose**	**Fructose**	**Total sugars**	
Control 1*	-	26.6	-	-	0.09	0.09	6.94
Control 2**	-	27.8	-	-	1.10	1.10	6.33
$(NH_4)_2SO_4$	0.075	26.4	-	-	0.82	0.82	6.38
	0.10	20.5	-	-	0.87	0.87	6.48
KH_2PO_4	0.075	25.1	-	-	0.83	0.83	6.38
	0.10	28.3	-	-	0.75	0.75	6.43
$MgSO_4$	0.075	25.8	-	-	0.76	0.76	6.46
	0.10	26.1	-	-	0.74	0.74	6.61

หมายเหตุ *Control 1 ประกอบด้วยน้ำอ้อยเข้มข้นเข้มข้นปรับให้มีน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดยีสต์ 0.5 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.05 เปอร์เซ็นต์

**Control 2 ประกอบด้วยน้ำอ้อยเข้มข้นเข้มข้นปรับให้มีน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.05 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. ศึกษาปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ด้วยการหมักแบบแบทช์ (Batch) โดยใช้ถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

3.1 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอล

นำยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 มาทำการหมักในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 1.5 ลิตร เตรียมน้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้นทั้งหมด 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 และใช้อัตราเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส

ผลการทดลองพบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคืออุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 6.95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.97 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีผลผลิตการหมักเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ซึ่งในช่วงระยะแรก *K. marxianus* DMKU 3-1042 จะหมักเอทานอลเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย ซึ่งต่างจากการเจริญ (OD_{600}) ที่เกิดขึ้น พบว่าในช่วงระยะเวลา 12 ชั่วโมงแรก *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง และค่อยๆเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนกระทั่งมีการเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 40 มีการเจริญเท่ากับ 13.3 หลังจากนั้น การเจริญลดลงจนสิ้นสุดการหมัก เนื่องจากในระยะแรกของการหมัก ยีสต์มีการปรับตัวเพื่อให้เข้ากับสภาวะของอาหารหมัก ดังนั้นสารอาหารในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นจึงถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญและส่วนประกอบต่างๆภายในเซลล์ จึงทำให้ในช่วงแรกพบการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนกระทั่งยีสต์เข้าสู่ระยะ stationary phase ที่เวลา 44 ชั่วโมง จึงผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นหลังจาก 44 ชั่วโมงผ่านไป การเจริญจะลดลงเล็กน้อย แต่การหมักเอทานอลยังคงเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง (ภาพที่ 9 ข) อาจเกิดจากเอทานอลที่มีการสะสมในระดับหนึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญ ทำให้ยีสต์มีการเจริญลดลง เช่นที่มีการศึกษาผลของน้ำตาลเริ่มต้นก่อนหน้านี้ สำหรับที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงรองลงมาเท่ากับ 6.20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.86 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 84.87 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี จากการวัดค่า OD_{600} พบว่าในระยะแรกของการหมัก *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีการเจริญสูงใน 20 ชั่วโมงแรก และลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 32 จากนั้นการเจริญค่อยๆเพิ่มขึ้นจนมีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 13.91 ที่เวลา 56 ชั่วโมง และลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก(ภาพที่ 9ก) ยีสต์เจริญได้สูงและใช้เวลานานเช่นเดียวกับการเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

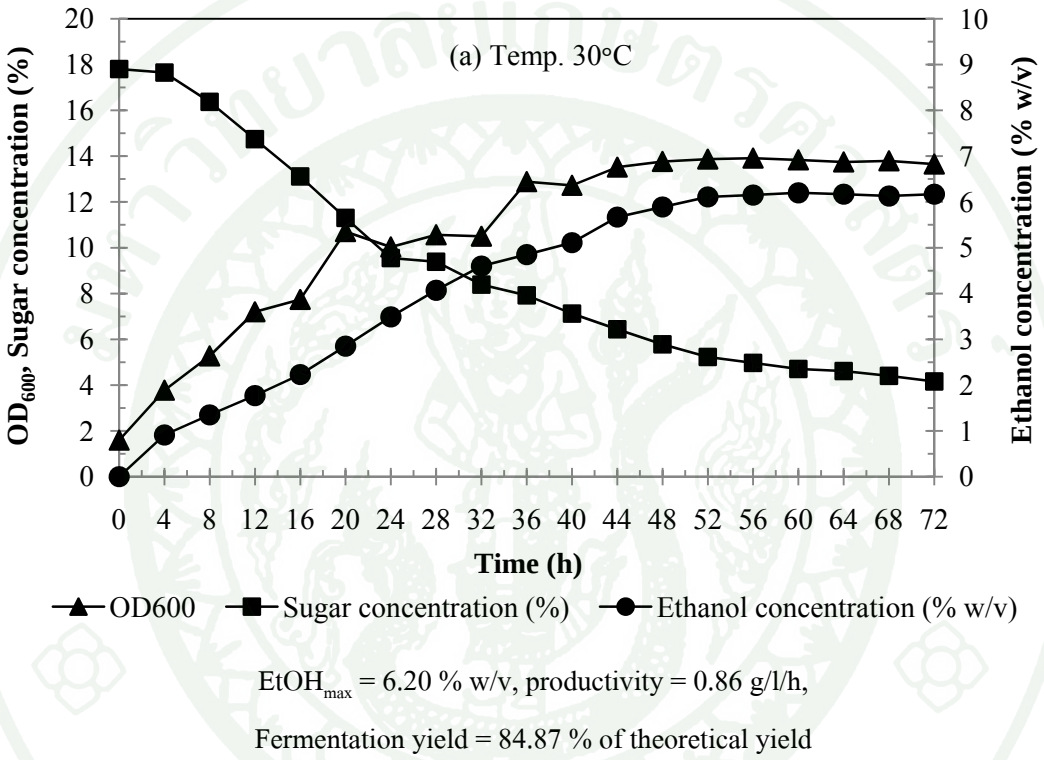
เซลเซียส ทำให้น้ำตาลบางส่วนถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญเพิ่มมวลเซลล์ในช่วงแรก ในขณะที่การหมักเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนใน 44 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่จนสิ้นสุดการหมัก โดยเอทานอลที่เกิดขึ้นในอาหารหมักใน 44 ชั่วโมงแรกอาจมีผลกระทบต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ จึงทำให้ความเข้มข้นเอทานอลที่สูงในอาหารหมักมีผลในการยับยั้งการผลิตเอทานอลของยีสต์ในช่วงท้ายของการหมัก ทำให้การหมักเอทานอลเริ่มลดลง ด้วยเหตุนี้จึงเป็นสาเหตุทำให้ยีสต์มีอัตราการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ส่วนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีการหมักเอทานอลที่ช้า ทำให้ที่เวลา 72 ชั่วโมง ให้เอทานอลได้เท่ากับ 5.51 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.77 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 83.87 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ซึ่งการหมักเอทานอลเกิดขึ้นอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการหมัก สำหรับการเจริญ (OD_{600}) พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีการเจริญอย่างต่อเนื่องและเร็วใน 24 ชั่วโมงแรกมีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 10.6 และลดลงอย่างชัดเจนจนกระทั่งอยู่ในสภาวะคงที่ (ภาพที่ 9ค) จากผลการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่า นอกจากสภาวะกดดันจากน้ำตาลความเข้มข้นสูงแล้ว การเพิ่มอุณหภูมิในการหมักให้สูงขึ้นทำให้ความสามารถในการเจริญและการหมักลดลงด้วย

สรุปผลการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลคือ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 6.95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แต่มีการเจริญ (OD_{600}) ต่ำกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเล็กน้อย ขณะที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เซลล์มีการเจริญได้น้อยที่สุดและหมักเอทานอลได้เพียง 5.51 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แสดงให้เห็นว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 เป็นยีสต์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงปานกลาง แต่สามารถทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส สำหรับการทดลองต่อไป

Pramanik (2003) ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอลโดยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces* ที่แยกได้จาก Toddy ทำการทดลองในอาหารกลูโคส โดยใช้ถังหมักขนาด 1 ลิตร ศึกษาการหมัก 3 อุณหภูมิคือ 30, 35 และ 38 องศาเซลเซียส พบว่า ความเข้มข้นเอทานอลค่อยๆ เพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces* หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 48 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น การหมักเอทานอลของยีสต์ลดลงโดยที่อุณหภูมิ 35 และ 38 องศาเซลเซียสหมักเอทานอลได้ 46 และ 42 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยผลการทดลองที่เกิดขึ้นมีลักษณะที่สอดคล้องกับการทดลองหมักเอทานอล

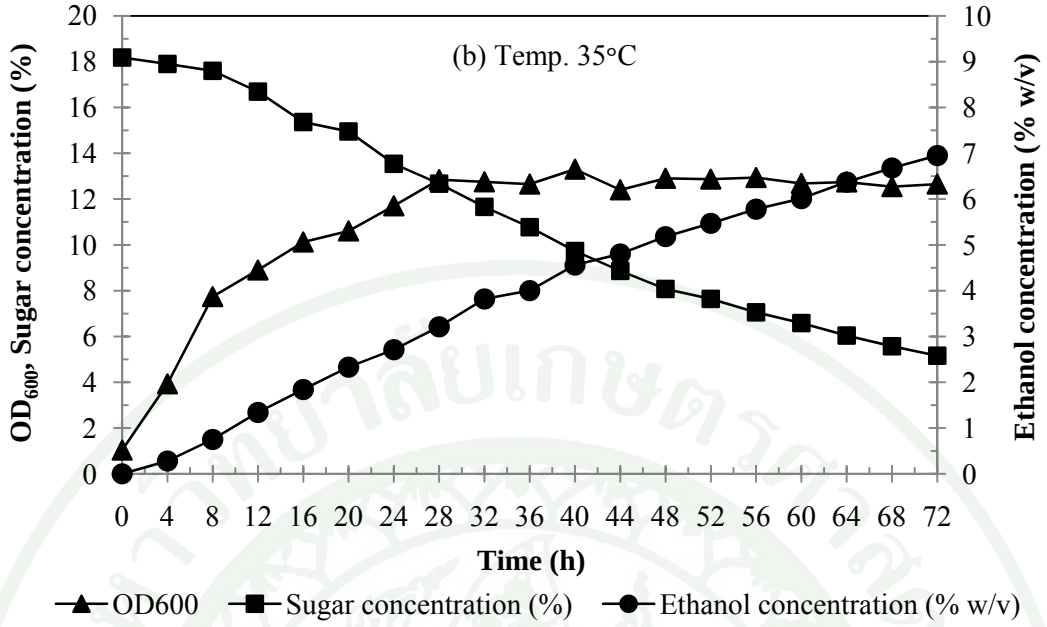
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

จากน้ำอ้อยเข้มข้นของยีสต์ *K. marxianus* DMKU3-1042 คือเมื่อยีสต์หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมัก ยีสต์มีการเจริญลดลง จึงทำให้ประสิทธิภาพในการหมักลดลง เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจึงส่งผลกระทบให้กิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักเอทานอลลดลง โดยจะมีผลมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความทนอุณหภูมิของแต่ละสายพันธุ์



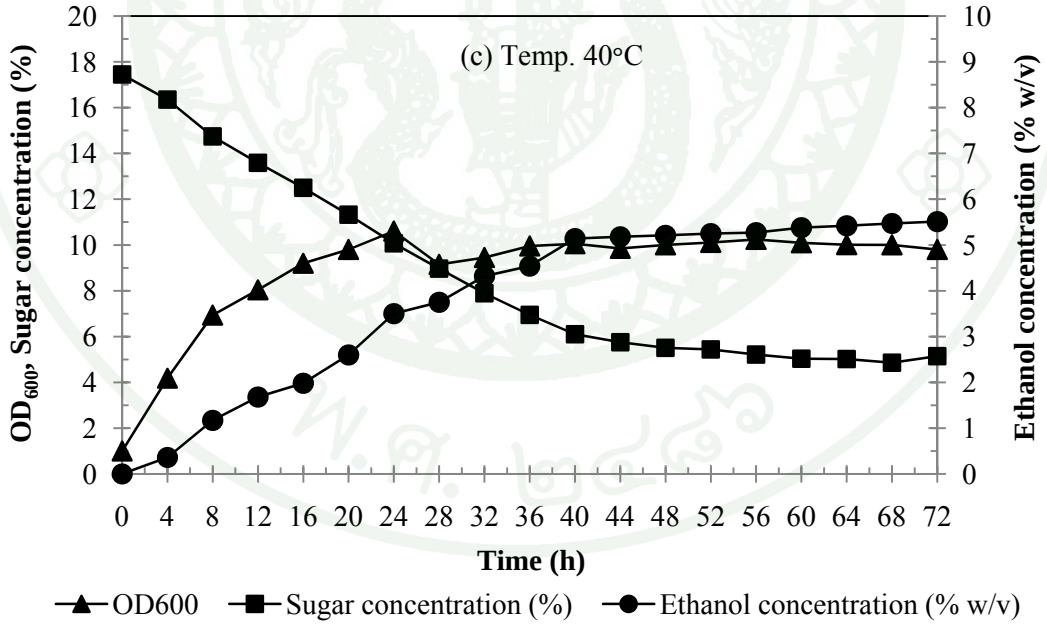
ภาพที่ 9 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* DMKU3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่อุณหภูมิ (a) 30 องศาเซลเซียส (b) 35 องศาเซลเซียส และ(c) 40 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7 น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



$EtOH_{max}$ = 6.95 % w/v, productivity = 0.97 g/l/h,

Fermentation yield = 100 % of theoretical yield



$EtOH_{max}$ = 5.51 % w/v, productivity = 0.77 g/l/h,

Fermentation yield = 83.87 % of theoretical yield

ภาพที่ 9 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2 ผลของอัตราการให้อากาศต่อการหมักเอทานอล

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทำการหมักในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 1.5 ลิตร ประกอบด้วยน้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้นทั้งหมด 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 อุณหภูมิในการหมัก 35 องศาเซลเซียส และใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 0.1 0.2 vvm ตลอดการหมักและไม่ให้อากาศในการหมัก

ผลการทดลองพบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้เพียงเล็กน้อยเมื่อมีการให้อากาศ โดยที่อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้เพียง 4.78 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.66 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ภาพที่ 10ข) หลังจากนั้นเอทานอลที่ได้ค่อยๆลดลงเหลือ 3.62 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรเมื่อหมักครบ 72 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาการเจริญพบว่า ยีสต์มีการเจริญสูงสุด (OD_{600}) เท่ากับ 37.56 ที่เวลา 20 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญค่อยๆลดลง โดยไม่พบการหมักเอทานอลใน 4 ชั่วโมงและเริ่มมีการหมักเอทานอลชั่วโมงที่ 8 จนกระทั่งน้ำตาลเริ่มหมดที่เวลา 44 ชั่วโมง ในเวลาต่อมาเอทานอลที่เกิดขึ้นเริ่มลดลง เนื่องจากยีสต์มีการผลิตมวลเซลล์เพิ่มขึ้น ขณะที่น้ำตาลเหลืออยู่ค่อนข้างน้อย จึงทำให้ยีสต์นำเอทานอลที่หมักได้มาใช้เป็นแหล่งพลังงานแทน สำหรับที่อัตราการให้อากาศ 0.1 vvm พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้น โดยให้เอทานอล 5.68 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 40 ชั่วโมง มีอัตราการหมักเอทานอลเท่ากับ 0.79 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ภาพที่ 10ก) ซึ่งใช้เวลาในการหมักเอทานอลนานกว่าการหมักที่อัตราการให้อากาศ 0.2 vvm อยู่ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเอทานอลลดลงเพียงเล็กน้อย เมื่อพิจารณาการเจริญ (OD_{600}) เซลล์มีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 34.8 ที่เวลา 16 ชั่วโมง และหลังจากที่เวลา 16 ชั่วโมง พบว่า การเจริญลดลงเพียงเล็กน้อยเช่นกัน ขณะที่การไม่ให้อากาศในถังหมัก พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงเมื่อเทียบกับที่อัตราการให้อากาศ 0.1 และ 0.2 vvm ให้เอทานอล 6.95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีอัตราการหมักเอทานอลเท่ากับ 0.97 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ภาพที่ 10ค) เมื่อพิจารณาการเจริญ (OD_{600}) *K. marxianus* DMKU 3-1042 ใช้เวลาในการเจริญสูงสุดนานกว่าและมีการเจริญต่ำกว่าการเจริญที่มีการให้อากาศทั้ง 2 อัตราคือ 13.3 ที่เวลา 40 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า การให้อากาศมีความสำคัญต่อการเจริญ ซึ่งทำให้ยีสต์มีการสร้างพลังงานและผลิตมวลเซลล์เพิ่มขึ้น โดยส่วนใหญ่เมื่อมีการให้อากาศ การผลิตมวลเซลล์เป็นสิ่งสำคัญมากกว่าการหมักเอทานอล

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ดังนั้นยีสต์จึงมีการหมักเอทานอลลดลงเมื่อเทียบกับการหมักที่ไม่มีการให้อากาศ นอกจากนั้นพบน้ำตาลคงเหลือในอาหารหมักที่มีการให้อากาศ (2.97 และ 3.56 เปอร์เซ็นต์) น้อยกว่าการหมักที่ไม่มีการให้อากาศ (5.16 เปอร์เซ็นต์) เกิดจากยีสต์ใช้น้ำตาลส่วนใหญ่เพื่อการเจริญและเพิ่มมวลเซลล์ จึงเป็นสาเหตุให้มีน้ำตาลคงเหลือในน้ำหมักในการหมักที่มีการให้อากาศน้อยกว่าการหมักในน้ำหมักที่ไม่มีการให้อากาศ

สรุปผลการหมักเอทานอลที่มีการให้อากาศที่อัตรา 0.1 0.2 vvm และที่ไม่มีการให้อากาศ พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีการเจริญสูงและใช้ระยะเวลาในการเจริญสั้น เมื่อมีการให้อากาศที่อัตรา 0.1 และ 0.2 vvm ขณะที่เอทานอลที่ได้จากการทดลองให้อากาศมีปริมาณต่ำคือ 5.68 และ 4.78 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม แม้การหมักแบบไม่ให้อากาศ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีการเจริญต่ำและใช้ระยะเวลานานที่จะเจริญได้สูงสุด แต่เอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นสูงเท่ากับ 6.95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เมื่อเทียบกับการหมักที่มีการให้อากาศทั้ง 2 อัตรา ดังนั้นจึงเลือกการไม่ให้อากาศ สำหรับการทดลองต่อไป

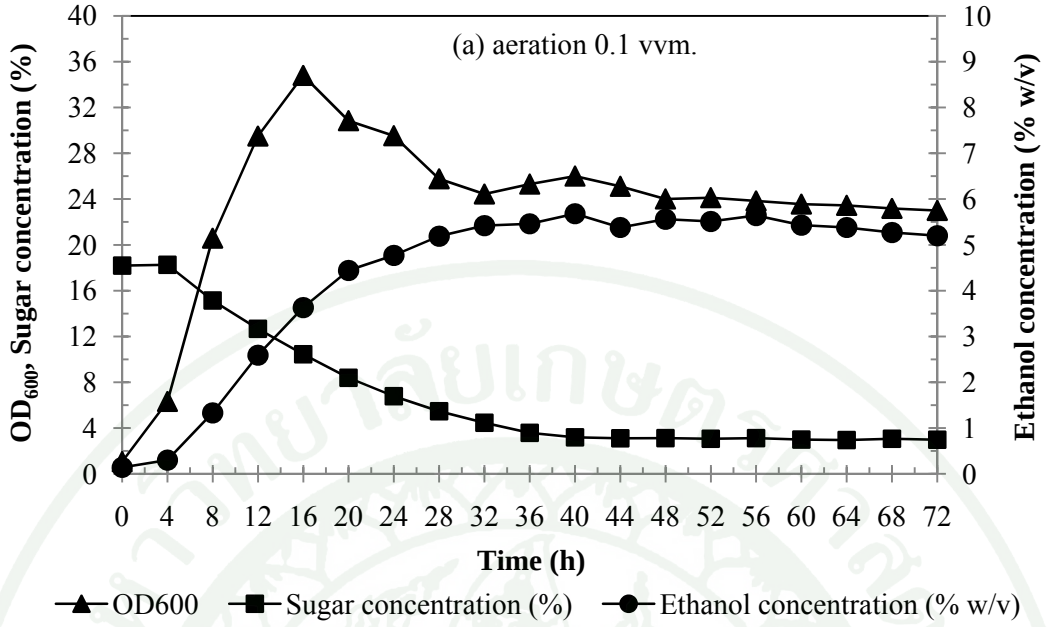
Breisha (2010) ศึกษาผลของออกซิเจนต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นซูโครส 35 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรอาหารที่ใช้เท่ากับ 3 ลิตร หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่า *S. cerevisiae* ใช้น้ำตาลได้อย่างสมบูรณ์ที่เวลา 48 ชั่วโมง และ *S. cerevisiae* มีกรเจริญเพิ่มขึ้นจาก 2×10^{6} cfu/ml เป็น 1.72×10^{8} cfu/ml จากนั้นการเจริญค่อยๆลดลง ขณะที่การหมักเอทานอลเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยให้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 2.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง และเอทานอลค่อยๆลดลงจนเป็นศูนย์ เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลองให้อากาศต่อการหมักเอทานอล *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นมีลักษณะที่สอดคล้องกับรายงานของ Breisha (2010) คือเมื่อมีการให้อากาศในการหมัก ยีสต์จะใช้น้ำตาลเพื่อสร้างพลังงานและผลิตมวลเซลล์ ทำให้ยีสต์มีมวลเซลล์สูงกว่าการหมักโดยไม่มีการให้อากาศ ดังนั้นยีสต์จึงหมักเอทานอลได้ลดลง

Alfenore *et al*. (2004) ศึกษาผลของการให้อากาศต่อการผลิตเอทานอล การเจริญ โดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* CBS8066 ในการหมักแบบเฟด-แบทช์ โดยเปรียบเทียบระหว่างการให้อากาศและไม่ให้อากาศตลอดการหมัก และมีการเติมไบโอตินและวิตามิน ตามการเจริญของยีสต์ในระยะ exponential phase (Alfenore *et al.,* 2002) ผลการทดลองพบว่า การให้อากาศตลอดการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

หมัก ทำให้เซลล์ชีวมวลและความเข้มข้นเอทานอลเพิ่มขึ้นเท่ากับ 23 และ 10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยให้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 147 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 45 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 3.3 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่การหมักในถังหมักที่จำกัดอากาศ หมักเอทานอลได้ 131 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 45 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 2.6 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่า *S. cerevisiae* CBS8066 หมักเอทานอลต่อ 1 กรัมสับสเตรตได้สูงในการหมักแบบไม่ให้อากาศ แต่เนื่องจากยีสต์มีการเจริญต่ำ จึงทำให้เอทานอลที่ได้ต่ำกว่าการหมักแบบให้อากาศเมื่อสิ้นสุดการหมัก ซึ่งจากผลการทดลองการให้อากาศต่อการหมักเอทานอลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีลักษณะที่สอดคล้องกับรายงานของ Alfenore *et al* (2004) คือเมื่อมีการให้อากาศในการหมักจะช่วยส่งเสริมให้ยีสต์มีการผลิตมวลเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ยีสต์หมักเอทานอลได้น้อยกว่า ซึ่งผลที่แตกต่างอาจเกิดจากการให้อากาศควบคู่กับการเติมไบโอตินและวิตามิน

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

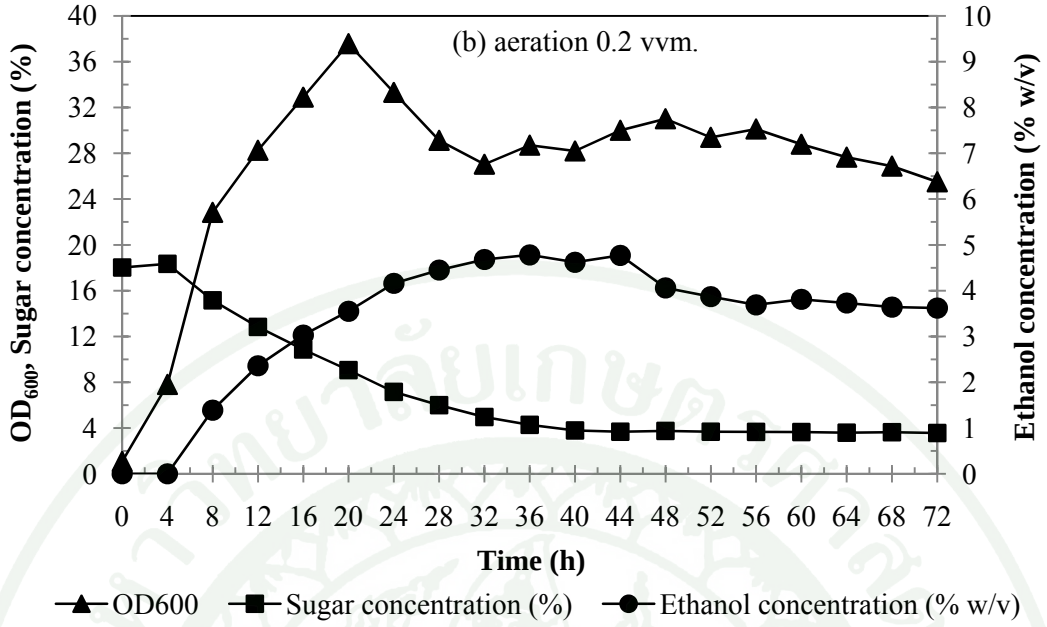


$EtOH_{max}$ = 5.68 % w/v, productivity = 0.72 g/l/h,

Fermentation yield = 64.28 % of theoretical yield

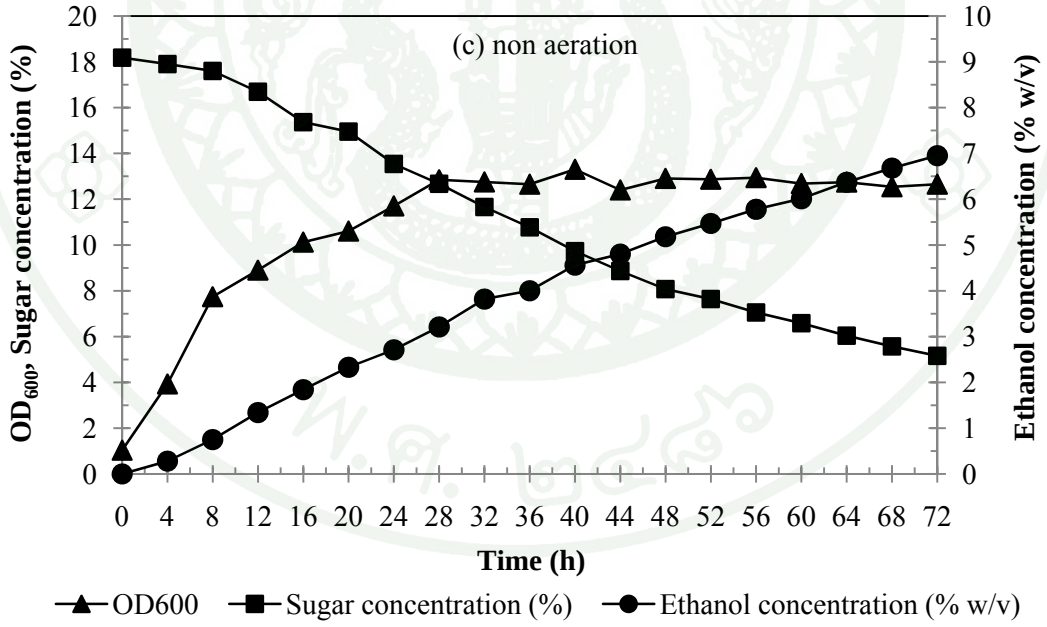
ภาพที่ 10 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่มีอัตราการให้อากาศ (a) 0.1 vvm (b) 0.2 vvm และ (c) ไม่มีการให้อากาศ โดยหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



$EtOH_{max}$ = 4.78 % w/v, productivity = 0.50 g/l/h,

Fermentation yield = 47.20 % of theoretical yield



$EtOH_{max}$ = 6.95 % w/v, productivity = 0.97 g/l/h,

Fermentation yield = 100 % of theoretical yield

ภาพที่ 10 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.3 ผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอล

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทำการหมักในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 1.5 ลิตร ประกอบไปด้วย น้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้นทั้งหมด 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.0 4.5 และ 5.0อุณหภูมิในการหมัก 35 องศาเซลเซียส และใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ

ผลการทดลองหมักเอทานอล พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 11ค) เท่ากับ 6.95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.97 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำตาลคงเหลือ 5.16 เปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์จะเริ่มหมักที่เวลา 4 ชั่วโมงแรก (0.28 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) และค่อยๆหมักอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณากราฟการเจริญ พบว่าใน 8 ชั่วโมงแรก ยีสต์มีการเจริญ (OD_{600}) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากนั้นการเจริญค่อยๆเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนกระทั่งมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 40 ชั่วโมง ซึ่งมีการเจริญเท่ากับ 13.3 หลังจากนั้นการเจริญจะลดลงและใกล้เคียงกันจนสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง ขณะที่อาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4.0 หมักเอทานอลได้สูงรองลงมา (ภาพที่ 11ก) เท่ากับ 6.46 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.90 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 80.71 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำตาลคงเหลือ 4.04 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มหมักเอทานอลที่เวลา 8 ชั่วโมง (0.87 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) การหมักที่เกิดขึ้นมีรูปแบบเช่นเดียวกับการหมักที่มีการปรับพีเอชอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเท่ากับ 5.0 ซึ่งเมื่อพิจารณากราฟการเจริญ พบว่าในช่วง 8 ชั่วโมงแรก ยีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นค่อยๆเจริญจนกระทั่งที่เวลา 48 ชั่วโมง มีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 15 และลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง สำหรับอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้ต่ำที่สุด (ภาพที่ 11ข) เท่ากับ 6.26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.87 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 92.33 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำตาลคงเหลือ 5.80 เปอร์เซ็นต์ และเริ่มหมักเอทานอลที่ 8 ชั่วโมง (0.86 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) จนได้

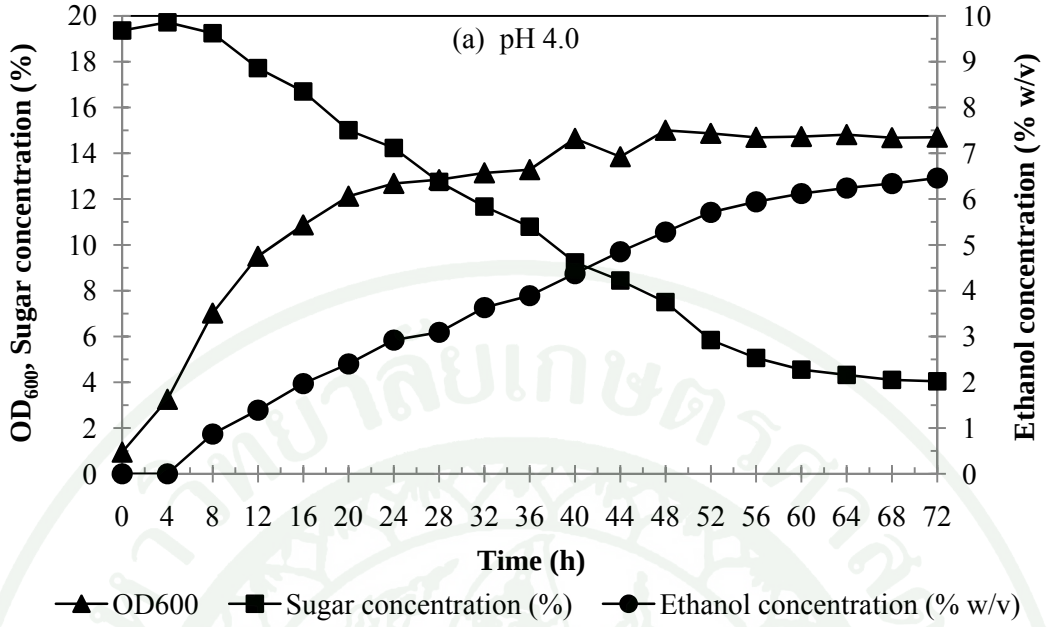
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอทานอลสูงสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาการเจริญ ยีสต์มีการเจริญรวดเร็วใน 8 ชั่วโมงแรก และค่อยๆเพิ่มขึ้นจนมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 28 ชั่วโมง วัดการเจริญได้เท่ากับ 13.45 หลังจากนั้นลดลงเพียงเล็กน้อย จนสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลการหมักเอทานอลในอาหารที่ปรับพีเอชแตกต่างกัน พบว่าที่พีเอช 5.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในการหมักเอทานอล ในขณะที่อาหารที่ปรับพีเอช 4.0 ให้เอทานอลสูงกว่าที่พีเอช 4.5 เล็กน้อย (0.2 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) แต่ที่น่าสังเกตุคือ ยีสต์มีการเจริญสูงกว่าและมีน้ำตาลคงเหลือน้อยที่สุดเมื่อเทียบกับที่พีเอช 5.0 และ 4.5 ซึ่งอาจเกิดจาก ยีสต์ใช้น้ำตาลส่วนใหญ่ในการเจริญและรักษาสภาพต่างๆภายในเซลล์ให้ทนต่อสภาพแวดล้อมภายนอกเซลล์ เช่น ความเข้มข้นน้ำตาล ความเป็นกรดของอาหาร และความเข้มข้นเอทานอล

สรุปผลการหมักเอทานอลที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.0 4.5 และ 5.0 พบว่าพีเอช 5.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมสำหรับ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในการหมักเอทานอล อย่างไรก็ตาม ในการหมักทางอุตสาหกรรม การปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียเป็นปัญหาใหญ่ เนื่องจากไม่มีการฆ่าเชื้อในอาหารก่อนการหมัก ซึ่งการปรับพีเอชให้เป็นกรดจะช่วยชะลอหรือยับยั้งแบคทีเรียปนเปื้อนได้ จากผลการทดลอง เมื่อปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 รูปแบบการเจริญของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 จะไม่แตกต่างจากเมื่อปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 5.0 ดังนั้นจึงเลือกพีเอชที่ 4.5 สำหรับการทดลองต่อไป

อภิรดี (2549) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ *Candida krusei* ในอาหาร minimal ที่มีกลูโคส 5 เปอร์เซ็นต์และแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่พีเอชแตกต่างกันตั้งแต่พีเอชเท่ากับ 1.0 ถึง พีเอช 9.0 พบว่า ยีสต์ *Candida krusei* หมักเอทานอลได้สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 ขณะที่รายงานของ Roukas (1994) ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลจาก carob pod โดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ผลการทดลองพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* หมักเอทานอล ผลผลิตการหมัก และประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลสูงที่พีเอชเท่ากับ 4.5 นอกจากนั้นมีรายงานเกี่ยวกับผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังด้วยการเลี้ยงเชื้อร่วมกันระหว่าง *Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในการหมักแบบแบทช์ พบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือพีเอช 5.5 (Manikandan and Viruthagiri, 2010) ซึ่งจากรายงานข้างต้น พบว่ายีสต์มีความสามารถในการหมักเอทานอลได้ดีในอาหารหมักที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็นกรด ซึ่งให้ผลที่สอดคล้องกับการหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดยยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

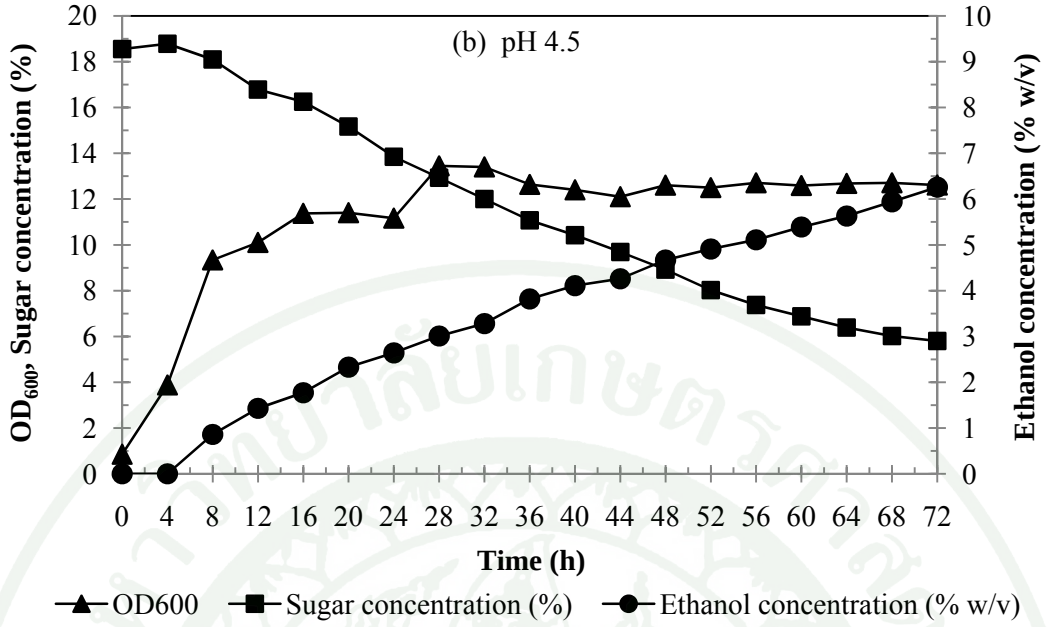


$EtOH_{max}$ = 6.46 % w/v, productivity = 0.90 g/l/h,

Fermentation yield = 80.71 % of theoretical yield

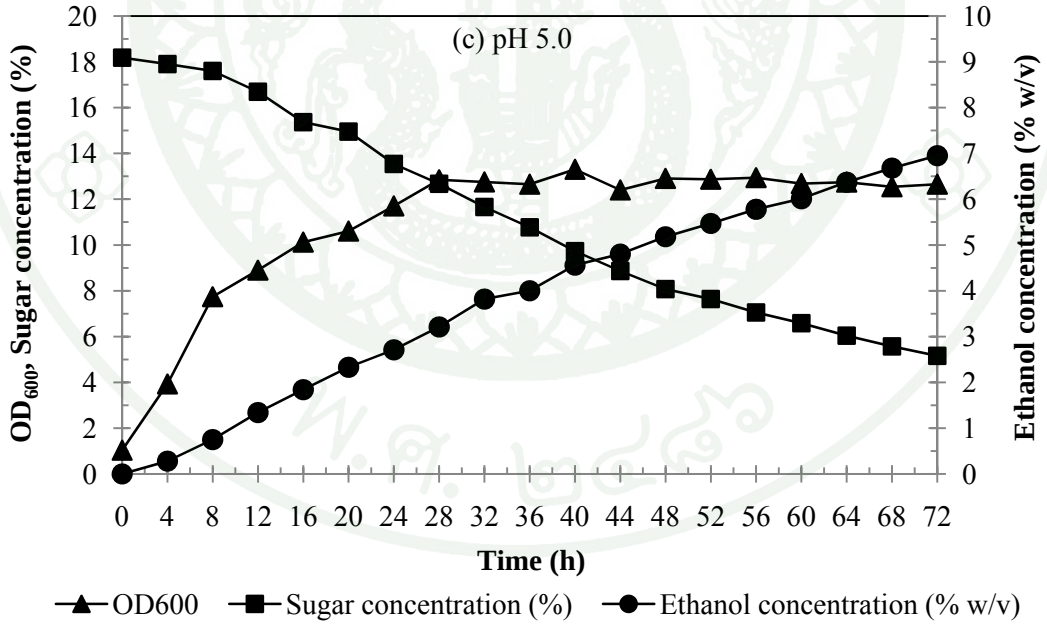
ภาพที่ 11 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ (a) พีเอช 4.0 (b) พีเอช 4.5 และ (c) พีเอช 5.0 โดยหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการกวน 300รอบต่อนาที ไม่มีการให้อากาศ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



$EtOH_{max}$ = 6.26 % w/v, productivity = 0.87 g/l/h,

Fermentation yield = 92.33 % of theoretical yield



$EtOH_{max}$ = 6.95 % w/v, productivity = 0.97 g/l/h,

Fermentation yield = 100 % of theoretical yield

ภาพที่ 11 (ต่อ)

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.4 ผลของการไม่ผ่านการฆ่าเชื้ออาหารน้ำอ้อยเข้มข้นต่อการหมักเอทานอล

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทำการหมักในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร โดยใช้ปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 1.5 ลิตร ที่มีน้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้นทั้งหมด 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 อุณหภูมิในการหมัก 35 องศาเซลเซียส ใช้อัตรากวน 300 รอบต่อนาทีและไม่มีการให้อากาศ โดยอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ผลการทดลองพบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อได้ดีกว่าในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (ภาพที่ 12ข) เท่ากับ 7.35 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 92.22 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำตาลคงเหลือ 2.57 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อให้เอทานอลเท่ากับ 6.26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร พบว่าใน 40 ชั่วโมงแรก เอทานอลที่ได้น้อยกว่าเพียงเล็กน้อย แต่หลังจากนั้น *K. marxianus* DMKU 3-1042 สามารถหมักเอทานอลได้เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง เมื่อพิจารณากราฟการเจริญ พบว่า การเจริญในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีการเจริญสูงกว่าอย่างเห็นได้ชัดเจน โดยใน 12 ชั่วโมงแรก เซลล์จะมีการเจริญอย่างรวดเร็วและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งมีการเจริญสูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง เท่ากับ 18 และจะลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง ขณะที่การเจริญในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบการเจริญสูงสุดที่เวลา 28 ชั่วโมง เท่ากับ 13.45 ซึ่งลักษณะที่พบอาจเกิดจากการใช้ความร้อนมีผลต่อการสลายตัวของสารอาหารบางชนิด โดยเฉพาะวิตามินบี และยังเป็นตัวเร่งให้เกิดปฏิกิริยาระหว่างสารประกอบอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโนกับน้ำตาลรีดิวส์ เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ยีสต์ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ จึงเป็นสาเหตุให้มีการเจริญได้น้อยในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ

สรุปผลการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีการเจริญได้สูงในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งเมื่อยีสต์มีมวลเซลล์เพิ่มขึ้น จึงทำให้ยีสต์หมักเอทานอลได้เพิ่มขึ้น

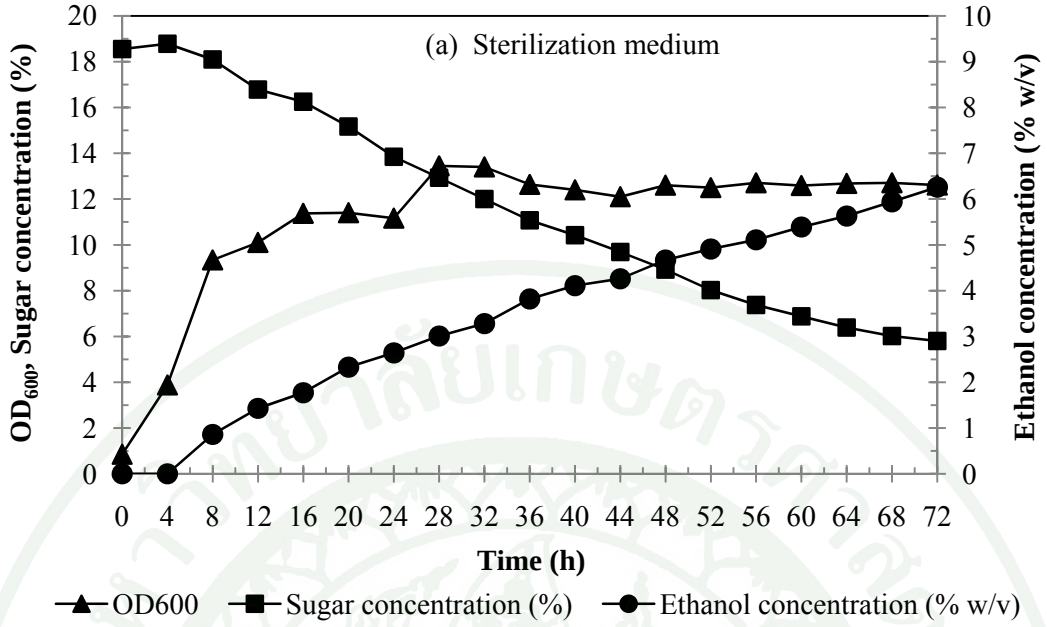
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ซึ่งถือเป็นข้อดี เนื่องจากการหมักเอทานอลในอุตสาหกรรมต้องมีการฆ่าเชื้ออาหารหมัก ซึ่งเป็นการเพิ่มต้นทุนในการผลิตเอทานอล ดังนั้นถ้าอาหารสำหรับหมักไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อ ก็จะช่วยลดต้นทุนการผลิตเอทานอลได้

จากการหมักเอทานอลแบบแบทช์โดย *K. marxianus* DMKU3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ปริมาตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 1.5 ลิตร น้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้นทั้งหมด 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 อุณหภูมิในการหมัก 35 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาทีและไม่มีการให้อากาศ อาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ใช้สำหรับหมักไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ให้ผลการทดลองดีที่สุด จึงนำผลการทดลองนี้มาคำนวณค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate (μ)) พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 4 ชั่วโมงแรก โดยมีค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.296 ต่อชั่วโมง ซึ่งค่านี้จะนำไปใช้ในการคำนวณการทดลองการหมักแบบเฟด-แบทช์ ต่อไป

ชุติมา (2548) ศึกษาการฆ่าเชื้อของอาหารน้ำอ้อยต่อการหมักเอทานอลของยีสต์สายพันธุ์ DMKU3-1042 โดยการกำจัดเชื้อด้วยวิธีต่างๆ และนำน้ำอ้อยไปหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า วิธีการฆ่าเชื้อทุกวิธี ยกเว้นน้ำอ้อยที่เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลเฟต์ 200 พีพีเอ็ม ไม่มีผลต่อการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้เอทานอล อัตราการผลิตเอทานอล และผลผลิตทางทฤษฎีที่ใกล้เคียงกัน ผลการทดลองจากรายงานของชุติมา (2548) ให้ผลการทดลองที่แตกต่างกับการหมักเอทานอลโดย *K. marxianus* DMKU3-1042 ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เนื่องจากการฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น ใช้ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อที่นานกว่า ซึ่งอาจทำให้สารอาหารบางชนิดในน้ำอ้อยเข้มข้นได้รับความร้อนนานเกินไป จึงทำให้เกิดการสลายตัวหรืออยู่ในรูปที่ยีสต์ไม่สามารถใช้ได้ ต่างจากรายงานของชุติมา (2548) ที่ใช้ระยะเวลาในการฆ่าเชื้อน้อยกว่า จึงอาจทำให้สารอาหารบางชนิดไม่เกิดการสลายตัว แม้ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิเดียวกัน จึงทำให้การหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ยีสต์มีการเจริญได้ดีกว่า จึงหมักเอทานอลได้สูงขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

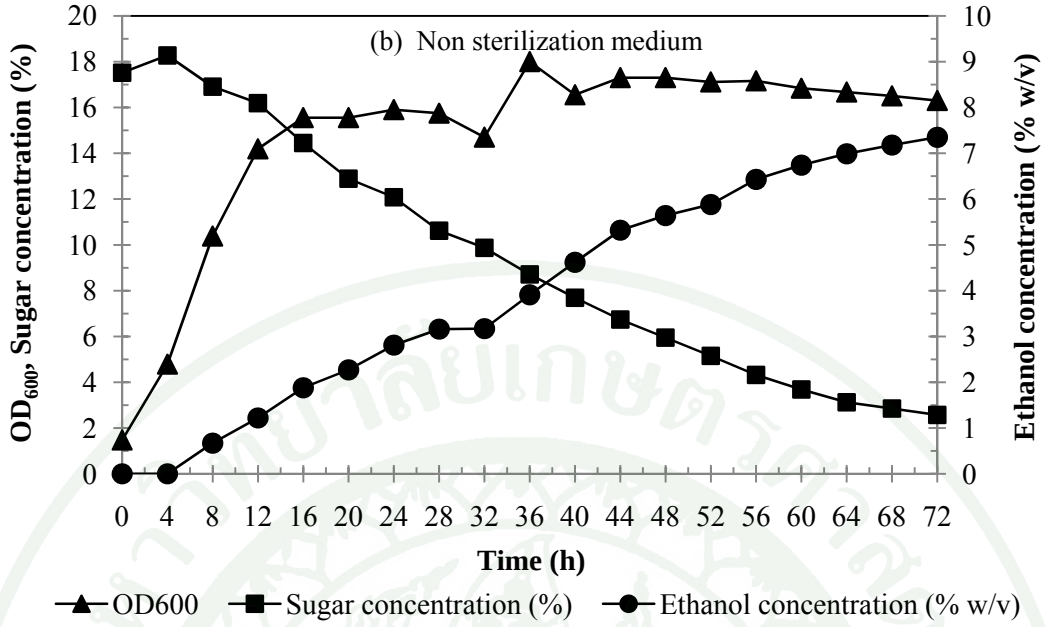


$EtOH_{max}$ = 6.26 % w/v, productivity = 0.87 g/l/h,

Fermentation yield = 92.33 % of theoretical yield

ภาพที่ 12 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 ไม่มีการให้อากาศ และมีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที (a) อาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (b) อาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



$EtOH_{max}$ = 7.35 %, productivity = 1.02 g/l/h,

Fermentation yield = 92.22 % of theoretical yield

ภาพที่ 12 (ต่อ)

4. ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้น โดย *K. marxianus* DMKU3-1042 ด้วยการหมักแบบเฟด-แบทช์ ที่อุณหภูมิสูงในฟลาสก์

4.1 การเติมอาหารแบบ Linear Increment Feeding

นำ *K. marxianus* DMKU3-1042 มาทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลด้วยการหมักแบบ linear feeding fed-batch ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 ทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส โดยเตรียมน้ำตาลเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ในปริมาตรอาหารเริ่มต้น 50 มิลลิลิตร แบ่งการเติมอาหารออกเป็น 4 แบบได้แก่ (1) เติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นครั้งเดียว 50 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 ชั่วโมง (2) เติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 2 ครั้ง ครั้งละ 25 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง (3) เติม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

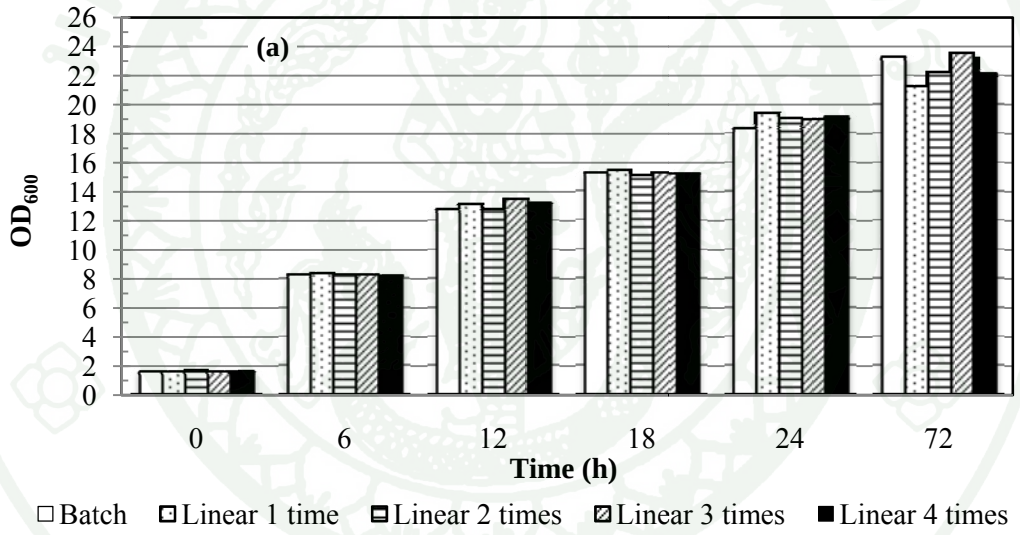
อาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 3 ครั้ง ครั้งละ 16.7 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 12 และ 18 ชั่วโมง และ (4) เติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 4 ครั้ง ครั้งละ 12.5 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า การหมักเอทานอลแบบ linear feeding fed-batch โดยแบ่งการเติมอาหาร 4 แบบให้ความเข้มข้นเอทานอลเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาในการหมักที่ 72 ชั่วโมงแตกต่างกันเล็กน้อย โดยการหมักแบบ linear feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง ให้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 7.02 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ0.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 76.47 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และมีน้ำตาลคงเหลือ 0.04 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ แบบ linear feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 1 ครั้ง หมักเอทานอลเท่ากับ 6.89 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.96 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 74.89 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และมีน้ำตาลคงเหลือ 0.01 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการหมักเอทานอลแบบ linear feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 และ 4 ครั้ง หมักเอทานอลสุดท้ายได้เท่ากับ 6.78 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.94 กรัมต่อลิตรต่ออชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 73.94 และ 74.18 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ มีน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 0.05 และ 0.11 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การหมักแบบแบทช์ หมักเอทานอลเท่ากับ 6.85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 74.46 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และมีน้ำตาลคงเหลือ 0.08 เปอร์เซ็นต์ ถึงแม้เอทานอลที่ได้ในการหมักแบบ linear feeding fed-batch ทุกแบบมีค่าใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับการหมักแบบแบทช์ แต่พบว่า การหมักแบบ linear feeding fed-batch ทุกแบบมีอัตราการผลิตเอทานอลเร็วกว่าการหมักแบบแบทช์ เช่นที่เวลา 12 ชั่วโมงเท่ากัน การหมักแบบแบทช์ (1.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) และการหมักแบบ linear feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 1 2 3 และ 4 ครั้ง มีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.32 1.47 1.49 และ 1.47 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำตาลคงเหลือในการหมักแบบ linear feeding fed-batch ทุกแบบและการหมักแบบแบทช์มีน้ำตาลคงเหลือในปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับการหมักในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ซึ่งอาจเกิดจากการหมักในฟลาสก์และบนเครื่องเขย่า ทำให้ยีสต์ได้รับออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งเมื่อพิจารณาการเจริญ (ภาพที่ 13) พบว่าเซลล์มีการเจริญอย่างรวดเร็วและเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยการเจริญ (OD_{600}) สูงสุดของยีสต์จะได้จาก การหมักแบบ linear feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 ครั้ง เท่า กับ 23.57 รองลงมาคือการหมักแบบแบทช์ เท่ากับ 23.26 สำหรับการเจริญของยีสต์ในการหมักแบบ linear feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 และ 4 ครั้ง มีการเจริญที่ใกล้เคียงกันคือ 22.19 และ 22.10 ตามลำดับ ขณะที่การหมักแบบ linear feeding fed-batch ที่มีการ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

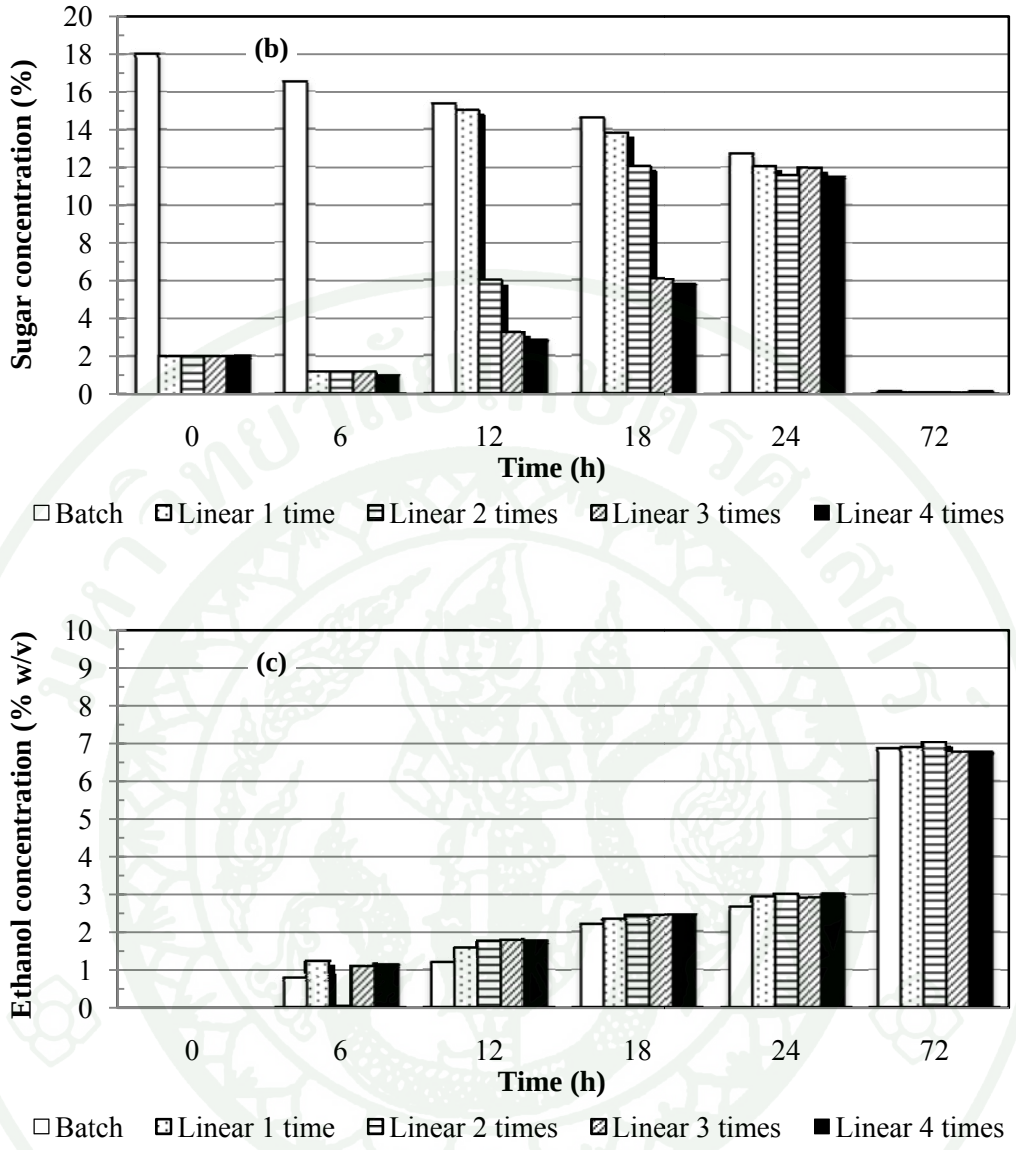
เติมอาหาร 1 ครั้ง มีการเจริญต่ำสุดเท่ากับ 21.21 จากการเจริญของยีสต์แสดงให้เห็นว่า ยีสต์นำน้ำตาลไปใช้สำหรับการเจริญเพิ่มมากขึ้นกว่าการหมักในถังหมัก 2.5 ลิตร เนื่องจากได้รับอากาศมากกว่าในถังหมักซึ่งเป็นถังระบบปิด จึงทำให้ยีสต์มีการเจริญมาก ส่งผลให้ยีสต์มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

สรุปผลการหมักแบบ linear feeding fed-batch เป็นเทคนิคการหมักเพื่อลดสภาวะกดดันเนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงต่อเซลล์ยีสต์ โดยออกแบบการหมักที่มีการเติมอาหารออกเป็น 4 แบบ ได้แก่ การเติมอาหาร 1 2 3 และ 4 ครั้ง พบว่า การหมักแบบ linear feeding fed-batch ทั้ง 4 แบบไม่มีผลกับการเจริญและการหมักเอทานอล ดังนั้นการหมักแบบ linear feeding fed-batch จึงไม่นำไปทดลองต่อในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร



ภาพที่ 13 เปรียบเทียบ การเจริญ (a) การใช้น้ำตาล (b) และการหมักเอทานอล (c) โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในการหมักแบบ batch และ linear feeding fed-batch ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร และบ่มบนเครื่องเขย่าที่ใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 13 (ต่อ)

4.2 การเติมอาหารแบบ Exponential Increment Feeding

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลด้วยการหมักแบบ exponential feeding fed-batch ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 ทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

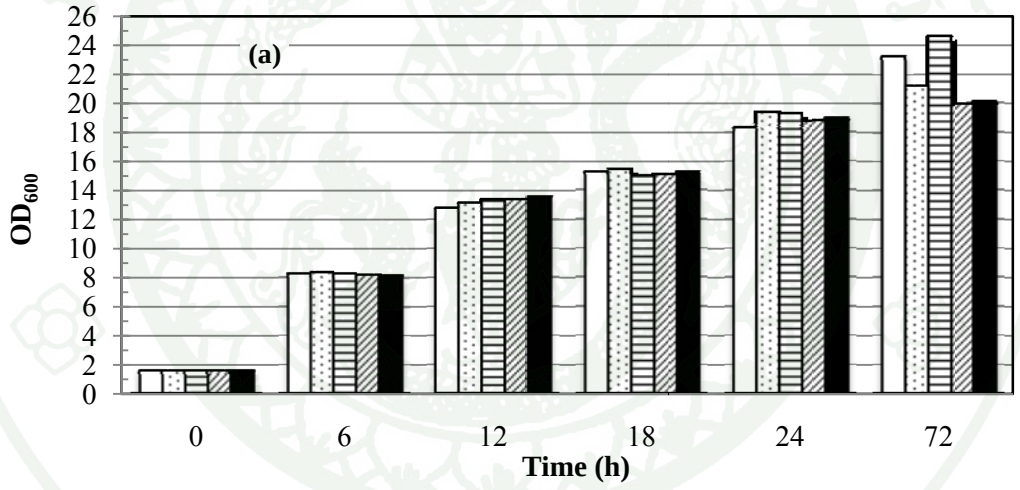
ที่ 35 องศาเซลเซียส แบ่งการเติมอาหารออกเป็น 3 แบบ โดยแบบที่ 1 และ 2 มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 40 มิลลิลิตร และแบบที่ 3 มีปริมาตรอาหารเริ่มต้น 25 มิลลิลิตร ได้แก่ (1) เติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 2 ครั้ง ครั้งแรก 26.28 มิลลิลิตร และ 34.84 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ (2) เติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 3 ครั้งคือ 14.78 มิลลิลิตร 20.24 มิลลิลิตร และ 27.71 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 12 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ และ (3) เติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 4 ครั้งคือ 7.21 มิลลิลิตร 9.29 มิลลิลิตร 11.97 มิลลิลิตร และ 53.46 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่า การเติมอาหารแบบ exponential feeding fed-batch ทุกแบบส่งให้ยีสต์มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น เนื่องจาก *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีความสามารถในการหมักเอทานอลสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการหมักแบบแบทช์และแบบ linear feeding fed-batch (ภาพที่ 14c) โดยการหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 และ 4 ครั้ง หมักเอทานอลได้ใกล้เคียงกันคือ 7.26 และ 7.28 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่ามีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากัน เท่ากับ 1.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 79 และ 79.22 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ ขณะที่การหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง หมักเอทานอลเท่ากับ 7.09 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.98 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 77.32 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อพิจรณาการเจริญ (OD_{600}) (ภาพที่ 14a) ของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 พบว่า การหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง มีการเจริญ (OD_{600}) สูงสุดเท่ากับ 24.64 เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลส่วนใหญ่เพื่อการเจริญของเซลล์ จึงทำให้เมื่อสิ้นสุดการหมักได้เอทานอลสุดท้ายเพียง 7.09 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แตกต่างจากการการเติมอาหาร 3 และ 4 ครั้ง ซึ่งพบว่ายีสต์มีการเจริญลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการหมักแบบแบทช์และแบบ linear feeding fed-batch ที่มีการเจริญเท่ากับ 23.26 และ 21.21 ตามลำดับ เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญพร้อมกับค่อยๆหมักเอทานอลอย่างช้าๆ ใน 24 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญเริ่มช้าลง ในขณะที่ยีสต์มีการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามพบว่าน้ำตาลคงเหลือ (ภาพที่ 14b) ในทุกแบบของการหมักแบบ exponential feeding fed-batch มีปริมาณน้อยเช่นเดียวกับการทดลองหมักแบบ linear feeding fed-batch

สรุปผลการหมักแบบ exponential feeding fed-batch เป็นเทคนิคการหมัก ซึ่งการเติมอาหารจะมีความสอดคล้องกับอัตราการเจริญของยีสต์ที่อยู่ในระยะ exponential phase ดังนั้นจึงออกแบบการหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหารออกเป็น 4 แบบ ได้แก่ การ

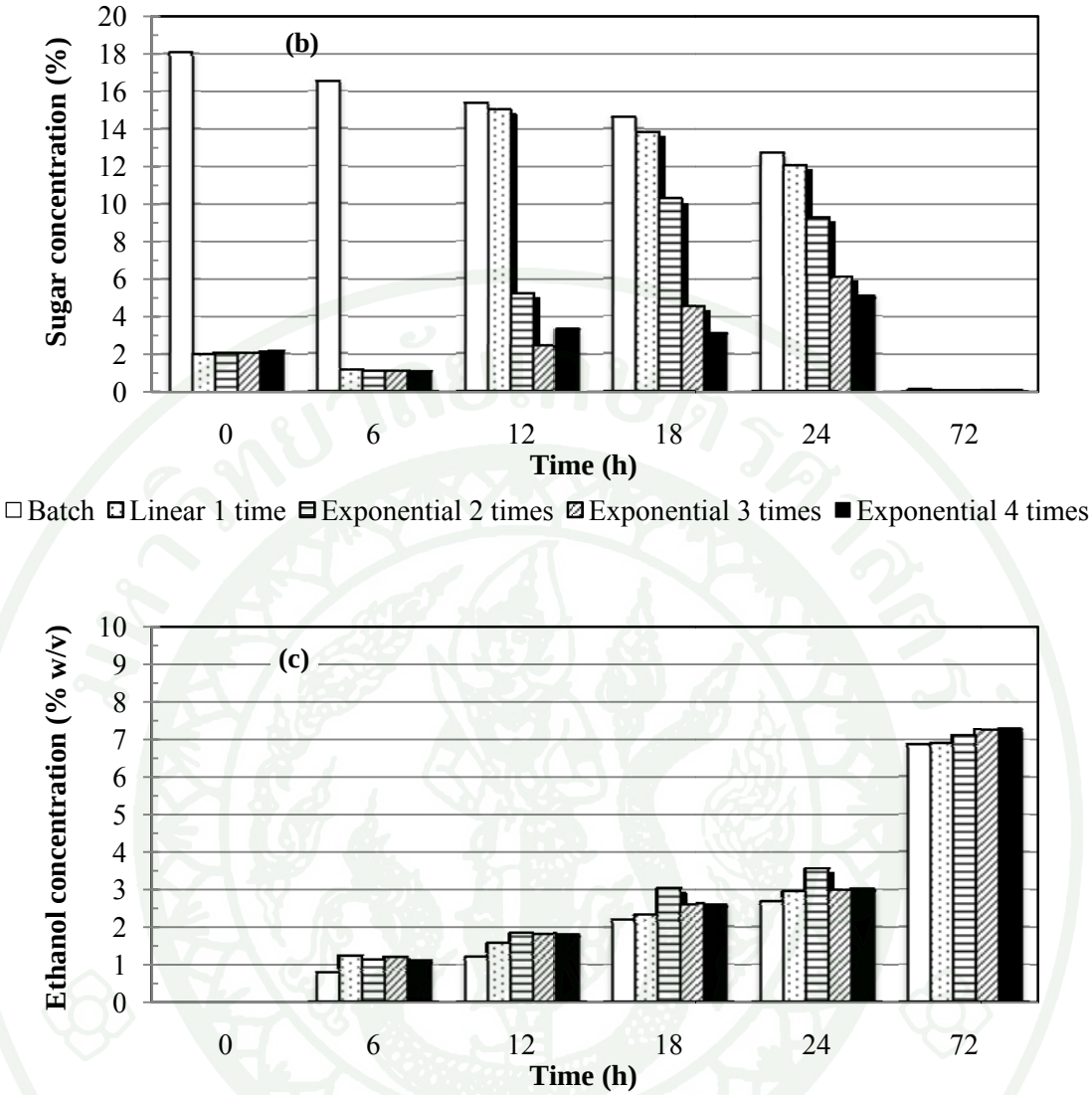
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เติมอาหาร 2 3 และ 4 ครั้ง พบว่าการผลิตเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 เมื่อสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการหมักแบบแบทช์และแบบ linear feeding fed-batch นอกจากนั้นยีสต์ยังมีการเจริญลดลง สำหรับการหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง ยีสต์มีการเจริญสูงสุด แต่เอทานอลที่ได้น้อยกว่าการหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 และ 4 ครั้ง อย่างไรก็ตามการหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 และ 4 ครั้ง ให้เอทานอลที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย และเมื่อพิจารณาอัตราการผลิตเอทานอล พบว่ามีค่าเท่ากันเท่ากับ 1.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นแม้จะแบ่งการเติมอาหารเพิ่มขึ้น เพื่อลดสภาวะกดดันกับเซลล์ยีสต์ และเติมอาหารให้สอดคล้องกับอัตราการเจริญของยีสต์ แต่พบว่าการเจริญและการผลิตเอทานอลเมื่อสิ้นสุดเวลาที่ 72 ชั่วโมง ให้ค่าที่ใกล้เคียงกัน จึงเลือกการหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 ครั้ง เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไปในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร



ภาพที่ 14 เปรียบเทียบการเจริญ (a) การใช้น้ำตาล (b) และการหมักเอทานอล (c) โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในการหมักแบบ batch และ exponential feeding fed-batch ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร และบ่มบนเครื่องเขย่าที่ใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 14 (ต่อ)

4.3 การเติมอาหารแบบ Sigmoidal Increment Feeding

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลด้วยการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชของอาหารเท่ากับ 4.5 ทำการทดลองในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิ

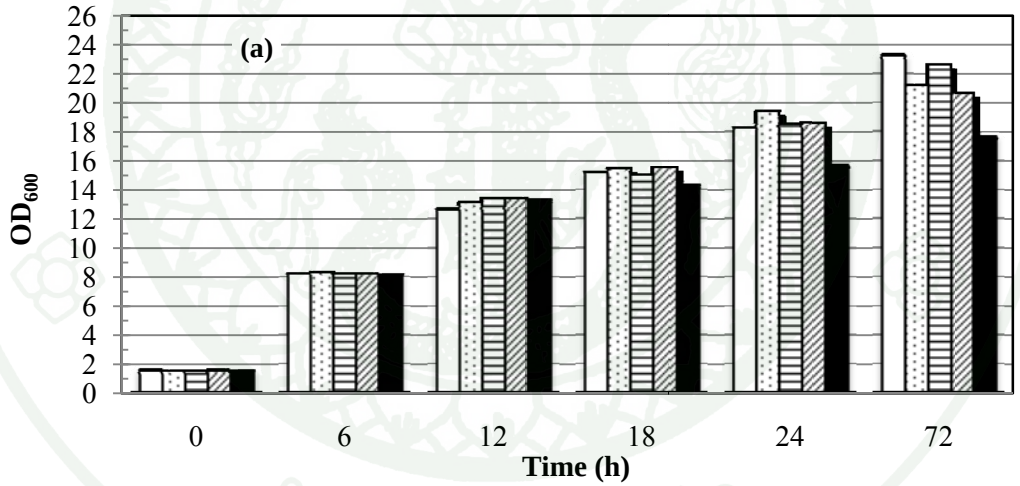
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ที่ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งแต่ละแบบจะมีความเข้มข้นน้ำตาลและปริมาตรอาหารเริ่มต้นแตกต่างกัน โดยแบ่งการเติมอาหารออกเป็น 3 แบบได้แก่ (1) เติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 2 ครั้ง ครั้งแรก 5.20 มิลลิลิตร และ 16.30 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ (2) เติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 3 ครั้งคือ 3.70 มิลลิลิตร 11.70 มิลลิลิตร และ 27.10 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 12 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ และ (3) เติมอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 4 ครั้งคือ 2.70 มิลลิลิตร 8.40 มิลลิลิตร 19.30 มิลลิลิตร และ 34.50 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 7.84 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.09 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 85.78 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ในการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 4 ครั้ง (ภาพที่ 15c) รองลงมาคือแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง เท่ากับ 7.61 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 83 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และ 7.18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 78.3 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ในการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 ครั้ง อย่างไรก็ตาม การหมักเอทานอลโดยใช้เทคนิคการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch มีแนวโน้มการเพิ่มขึ้นของเอทานอลสูงขึ้นเมื่อเทียบกับการหมักแบบแบทช์ (6.89 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) การหมักแบบ linear feeding fed-batch (6.85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) และแบบ exponential feeding fed-batch (7.28 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) เมื่อพิจารณาการเจริญ พบว่ายีสต์มีการเจริญลดลง โดยที่การหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 4 ครั้ง ให้เอทานอลสูงสุด ขณะเดียวการการเจริญในระยะเวลา 24 ชั่วโมงแรก ยีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว จากนั้นการเจริญจะช้าลงจนสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งจะพบการเจริญลักษณะนี้ได้ทุกแบบของการหมักโดยใช้เทคนิคการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch (ภาพที่ 15a) เนื่องยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อการหมักเอทานอลมากขึ้น ซึ่งผลที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการเติมน้ำตาลในปริมาณน้อยใน 12 ชั่วโมงแรก ทำให้ยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อการสร้างมวลเซลล์ ขณะเดียวกัน ยีสต์ไม่ถูกกดดันในสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง จึงทำให้มีการเจริญอย่างรวดเร็วและเซลล์เพิ่มขึ้นในช่วงแรก ดังนั้นเมื่อมีการเติมน้ำตาลครั้งต่อไป โดยน้ำตาลที่เติมลงไปมีปริมาณเพิ่มขึ้น ทำให้น้ำตาลส่วนนี้ยีสต์นำไปใช้เพื่อผลิตเอทานอล อย่างไรก็ตาม น้ำตาลคงเหลือในน้ำหมักพบได้ในปริมาณที่น้อยไม่แตกต่างจากการหมักโดยใช้เทคนิคการหมักแบบแบทช์ แบบ linear feeding fed-batch และแบบ exponential feeding fed-batch ที่ทำการทดลองในฟลาสก์

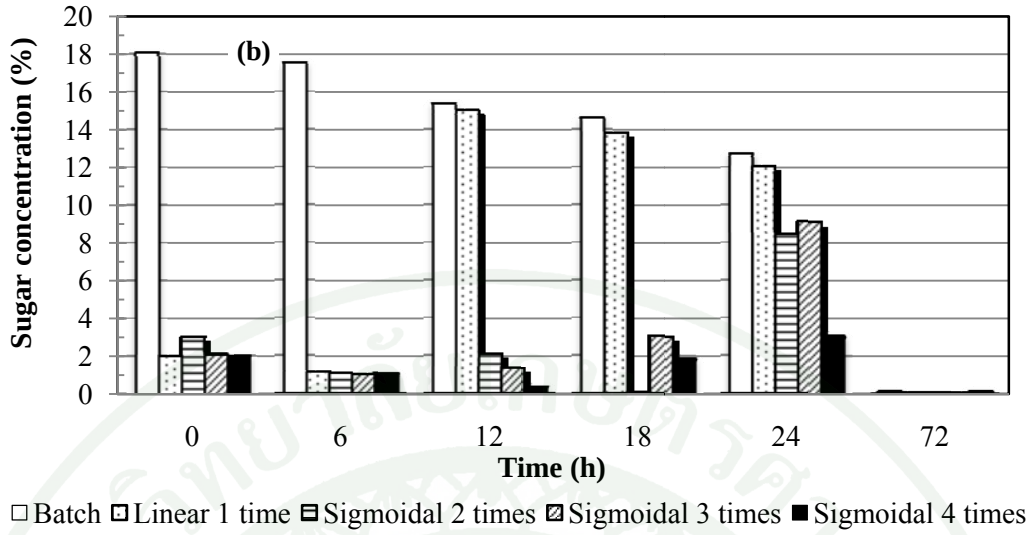
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

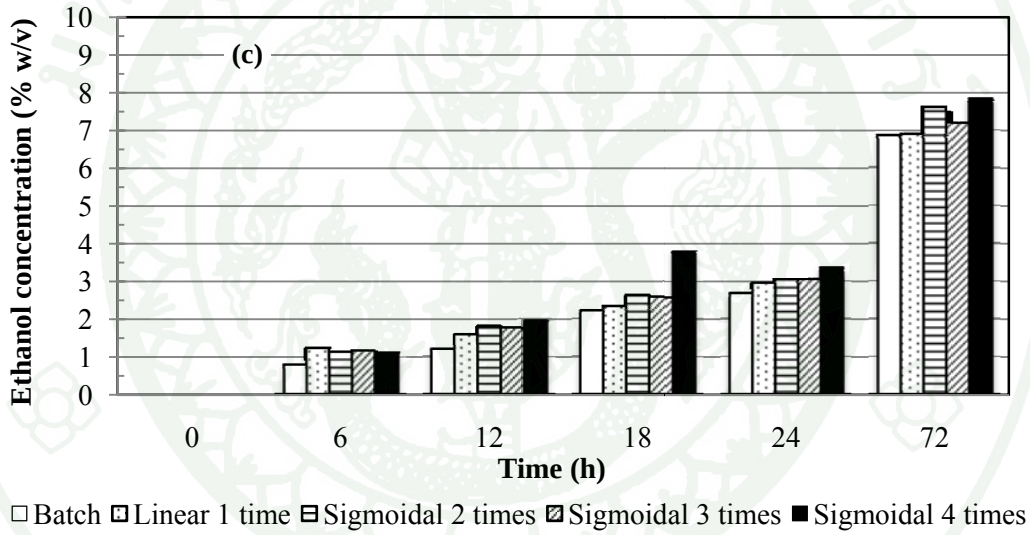
สรุปผลการหมักเอทานอลโดยใช้เทคนิคการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch เป็นการหมัก เป็นการเติมน้ำตาลที่มีลักษณะสอดคล้องกับวงจรการเจริญของยีสต์ โดยแบ่งการเติมอาหารออกเป็น 3 แบบได้แก่ การเติมอาหาร 2, 3 และ 4 ครั้ง พบว่า ทุกแบบที่มีการเติมอาหาร ยีสต์หมักเอทานอลได้สูงขึ้นเมื่อเทียบกับการหมักแบบแบทช์ แบบ linear feeding fed-batch และแบบ exponential feeding fed-batch โดยการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 4 ครั้ง ให้เอทานอลสูงสุด เท่ากับ 7.84 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แต่ยีสต์มีการเจริญต่ำ ขณะที่การหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง ให้เอทานอลต่ำกว่าเล็กน้อยอยู่ 0.23 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แต่ยีสต์มีการเจริญที่สูงกว่า ซึ่งโดยทั่วไปเซลล์ที่มีปริมาณมากจะสามารถทำให้การผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น และเมื่อพิจารณาอัตราการผลิตเอทานอล พบว่าการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหารทั้ง 2 แบบ มีอัตราการผลิตเอทานอลที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงเลือกการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง เพื่อใช้ทำการทดลองต่อไปในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร



ภาพที่ 15 เปรียบเทียบการเจริญ (a) การใช้น้ำตาล (b) และการหมักเอทานอล (c) โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในการหมักแบบ batch และ sigmoidal feeding fed-batch ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร และบ่มบนเครื่องเขย่าที่ใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์





ภาพที่ 15 (ต่อ)

5. ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ด้วยการหมักแบบเฟด-แบทช์ ที่อุณหภูมิสูง โดยใช้ถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่มีการนึ่งฆ่าเชื้อ ที่มีปริมาตรอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้นรวมทั้งหมด 18 เปอร์เซ็นต์เท่ากับ 1.5 ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ ยูเรีย 0.1 เปอร์เซ็นต์ และยีสต์สกัด 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเร็วรอบในการกวน 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5 ที่ควบคุมด้วยแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ที่มีการให้อากาศ 1 vvm ที่ความดันภายในถังหมัก 0.5 บาร์ ที่มีการป้อนอาหารเข้าถังหมักแบบเฟด-แบทช์ ที่มีอัตราการป้อนอาหารเข้าถังหมักเท่ากับ 0.1 ลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเข้มข้นน้ำตาลในอาหารป้อนเข้าถังหมักเท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์ ที่ปริมาตรสุดท้ายในถังหมักเท่ากับ 2.5 ลิตร ที่ระยะเวลาในการหมักเท่ากับ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นเซลล์สุดท้ายเท่ากับ 3.5 กรัมต่อลิตร ที่ความเข้มข้นน้ำตาลสุดท้ายเท่ากับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายเท่ากับ 7.8 เปอร์เซ็นต์ ที่ผลได้ของเอทานอลเทียบกับน้ำตาลเท่ากับ 0.46 กรัมต่อกรัม ที่ผลได้ของเอทานอลเทียบกับน้ำตาลคิดเป็นร้อยละของค่าทางทฤษฎีเท่ากับ 90 ที่ผลได้ของเซลล์เทียบกับน้ำตาลเท่ากับ 0.02 กรัมต่อกรัม ที่ผลได้ของเซลล์เทียบกับน้ำตาลคิดเป็นร้อยละของค่าทางทฤษฎีเท่ากับ 3 ที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เทียบกับน้ำตาลเท่ากับ 0.48 กรัมต่อกรัม ที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เทียบกับน้ำตาลคิดเป็นร้อยละของค่าทางทฤษฎีเท่ากับ 94 ที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เทียบกับเซลล์เท่ากับ 16.25 กรัมต่อกรัม ที่ผลได้ของผลิตภัณฑ์เทียบกับเซลล์คิดเป็นร้อยละของค่าทางทฤษฎีเท่ากับ 3,250 ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเร็วในการผลิตเซลล์เท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.03 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์เท่ากับ 0.01 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.03 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเร็วในการผลิตเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.03 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์สูงสุดเท่ากับ 0.01 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ 0.03 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเร็วในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 0.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเท่ากับ 0.03 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 0.01 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.03 กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลสูงสุดเทียบกับความเร็วในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วในการผลิตเซลล์สูงสุดเทียบกับความเร็วในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุดเทียบกับความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลสูงสุดเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์สูงสุดเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุดเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเทียบกับความเร็วในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเทียบกับความเร็วในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเทียบกับความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลสูงสุดเทียบกับความเร็วในการผลิตเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.2 ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลสูงสุดเทียบกับความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ 1 ที่ความเร็วในการผลิตเซลล์สูงสุดเทียบกับความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ 0.5 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลสูงสุดเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์สูงสุดเท่ากับ 2.2 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลสูงสุดเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ 1 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์สูงสุดเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์สูงสุดเท่ากับ 0.5 ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเทียบกับความเร็วในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 2.2 ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเทียบกับความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเทียบกับความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.5 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 2.2 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.5 ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลสูงสุดเทียบกับความเร็วในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 2.2 ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลสูงสุดเทียบกับความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วในการผลิตเซลล์สูงสุดเทียบกับความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.5 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลสูงสุดเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 2.2 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลสูงสุดเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์สูงสุดเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.5 ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเทียบกับความเร็วในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 2.2 ที่ความเร็วในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเทียบกับความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเทียบกับความเร็วในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.5 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเท่ากับ 2.2 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเอทานอลเฉลี่ยเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 1 ที่ความเร็วจำเพาะในการผลิตเซลล์เฉลี่ยเทียบกับความเร็วจำเพาะในการผลิตผลิตภัณฑ์เฉลี่ยเท่ากับ 0.5

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที ด้วยการหมักแบบ fed-batch ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองในฟลาสก์ ได้แก่ การหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 ครั้ง โดยเตรียมน้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้นเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 600 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งการเติมอาหารออกเป็น 3 ครั้ง ได้แก่ 220 300 และ 420 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 12 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ และการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง โดยเตรียมน้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้นเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1,100 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งการเติมอาหารออกเป็น 2 ครั้ง ได้แก่ 95 และ 306 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการทดลองพบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลโดยใช้เทคนิคการหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 ครั้งได้เท่ากับ 6.59 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 97.92 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี (ภาพที่ 16a) โดยยีสต์มีการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ และมีค่าลดลงเล็กน้อยหลังจากมีการเติมอาหารที่เวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งการเติมอาหารในปริมาณสูงอาจทำให้ความเข้มข้นเอทานอลมีความเจือจางลง จากนั้นการหมักเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงเวลา 6 ชั่วโมงแรกที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ โดยยีสต์น้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญ ซึ่งจากกราฟการเจริญและการใช้น้ำตาล (ภาพที่ 16a) ที่เวลา 6 ชั่วโมง เซลล์มีการเจริญ (OD_{600}) สูงสุดเท่ากับ 18.18 และมีน้ำตาลคงเหลืออยู่ในปริมาณน้อยเช่นเดียวกัน โดยน้ำตาลในช่วงระยะแรก ยีสต์มีการนำไปใช้เพิ่มมวลเซลล์ ขณะที่การหมักเอทานอลเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย หลังจากมีการเติมน้ำตาลครั้งที่ 1 ลงไป เมื่อเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ากราฟการเจริญค่อยๆลดลง ซึ่งลักษณะที่เกิดขึ้นอาจเกิดจากการเติมน้ำตาลที่ช้าเกินไป เนื่องจากเมื่อพิจราณากราฟการใช้น้ำตาลของยีสต์ พบว่าที่ 6 ชั่วโมงมีน้ำตาลคงเหลือในปริมาณน้อย โดยจากการศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะนั้นยีสต์จะมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ 4 ชั่วโมงแรก ทำให้ยีสต์อยู่ในสภาวะที่ขาดสารอาหารในระยะหนึ่งจึงทำให้มีเซลล์ยีสต์บางส่วนตายลงหรือเกิดเกิดการช็อคและไม่เจริญต่อ แม้มีสารอาหารเติมลงไป จึงอาจเป็นสาเหตุให้ยีสต์มีการเจริญค่อยๆลดลง อย่างไรก็ตาม การหมักเอทานอลมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง หลังจากเติมอาหารที่เวลา 12 และ 18 ชั่วโมง พบว่าการเจริญค่อยๆลดลงจนกระทั่งหลัง 24 ชั่วโมง พบว่ามีการเจริญที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมักที่เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อทำการทดลองในถังหมัก 2.5 ลิตร พบว่าการเจริญ การผลิตเอทานอลต่ำกว่าและมีน้ำตาลคงเหลือสูงกว่าเมื่อเทียบกับการทดลองหมักในฟลาสก์ (4.47 กรัมต่อลิตร 7.26 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และ0.03

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งอาจเกิดจากการไม่ให้อากาศในถังหมัก และอาจมีสารอาหารบางชนิดที่ยีสต์ไม่สามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ เมื่อมีการฆ่าเชื้ออาหารหมัก ดังเช่นการทดลองก่อนหน้านี้

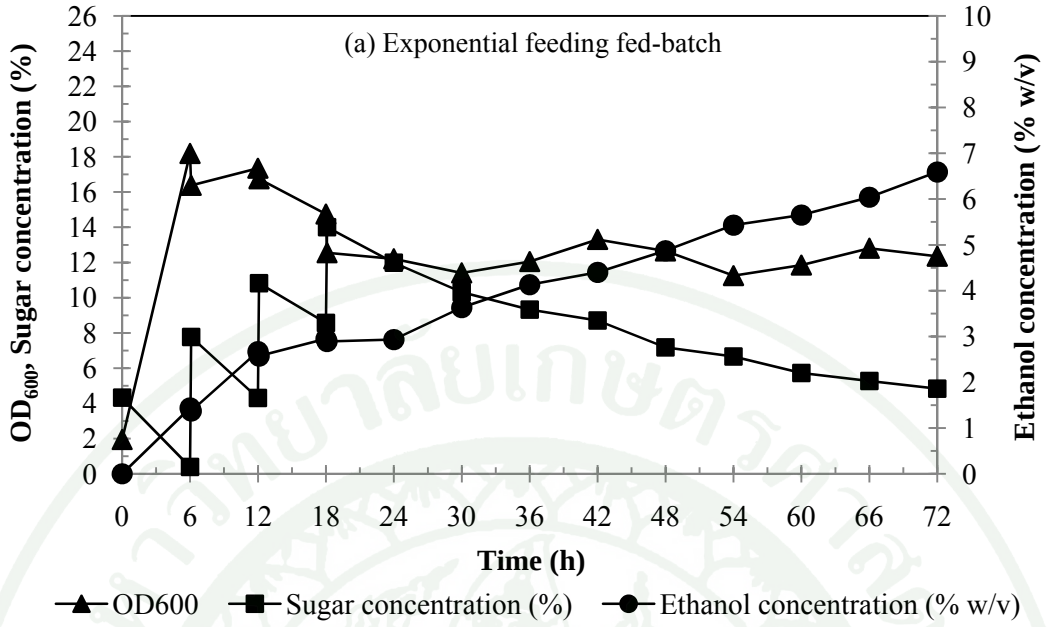
สำหรับการหมักเอทานอลโดยเทคนิคการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง ผลการทดลองพบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้เท่ากับ 7.42 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี (ภาพที่ 16b) โดยใน 6 ชั่วโมงแรกเอทานอลถูกผลิตขึ้นเพียงเล็กน้อย ขณะที่เมื่อ 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป การผลิตเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ขณะที่การเจริญมีการลดลง เนื่องจากน้ำตาลที่เติมที่เวลา 12 ชั่วโมง ยีสต์นำไปหมักเป็นเอทานอลมากกว่านำไปใช้เพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญ ซึ่งพบว่ากราฟการหมักเอทานอลด้วยการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีความชันกว่าการหมักแบบ exponential feeding fed-batch และเริ่มหมักอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก ขณะที่น้ำตาลใน 6 ชั่วโมงแรก ยีสต์นำไปใช้เพื่อการเจริญเพียงครึ่งหนึ่งของน้ำตาลเริ่มต้น โดยพบการเจริญสูงสุดเท่ากับ 19.7 ที่เวลา 12 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญลดลงเล็กน้อยที่เวลา 18 ชั่วโมง โดยกราฟการเจริญที่เกิดขึ้นในการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch จะมีลักษณะที่คล้ายกับกราฟการเจริญที่พบในการหมักแบบ exponential feeding fed-batch ด้วย นอกจากนั้นมีน้ำตาลคงเหลือปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน

สรุปผลการหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ที่ใช้เทคนิคการหมักแบบเฟด-แบทช์คือ การหมักแบบ exponential feeding fed-batch และ การหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch พบว่า การหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้งหมักเอทานอลได้ดีกว่าการหมักแบบ exponential feeding fed-batch โดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีความสามารถหมักเอทานอลได้สูงเท่ากับ 7.42 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่การหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 ครั้ง หมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.59 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตเอทานอลพบว่า การหมักเอทานอลแบบ sigmoidal feeding fed-batch มีอัตราการผลิตเอทานอลที่เร็วกว่าและหมักเอทานอลได้สูงกว่า

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิศัลย์ (2546) ศึกษาผลของการเติมน้ำตาลร่วมกับยูเรียในรูปของอาหารกากน้ำตาลแบบ linear incremental feeding exponential incremental feeding และ sigmoidal incremental feeding ต่อการเจริญและการผลิตโปรตีนในเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* M30 โดยแบ่งเติมอาหารทั้งหมด 8 ครั้ง ทุก 2 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่า การเติมอาหารกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding นั้น *S. cerevisiae* M30 มีการเจริญและผลิตเซลล์ได้สูงสุดเท่ากับ 33.91 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ขณะที่ผลิตโปรตีนเกิดการสะสมตามการเจริญ ดังนั้นการเติมอาหารกากน้ำตาลแบบ sigmoidal incremental feeding จึงให้โปรตีนในเซลล์ทั้งหมดสูงกว่าการเติมแบบอื่น โดยมีโปรตีนสะสมในเซลล์ทั้งหมด 16.22 กรัมน้ำหนักแห้งต่อลิตร ที่เวลา 22 ชั่วโมง และมีอัตราการผลิตโปรตีนในเซลล์ทั้งหมดสูงสุดเท่ากับ 0.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากการผลการทดลองหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ให้ผลที่สอดคล้องกับรายงานของวิศัลย์ (2546) เนื่องจากการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ช่วยส่งเสริมให้ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีการเจริญและหมักเอทานอลได้ดีกว่าการหมักแบบ exponential feeding fed-batch

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

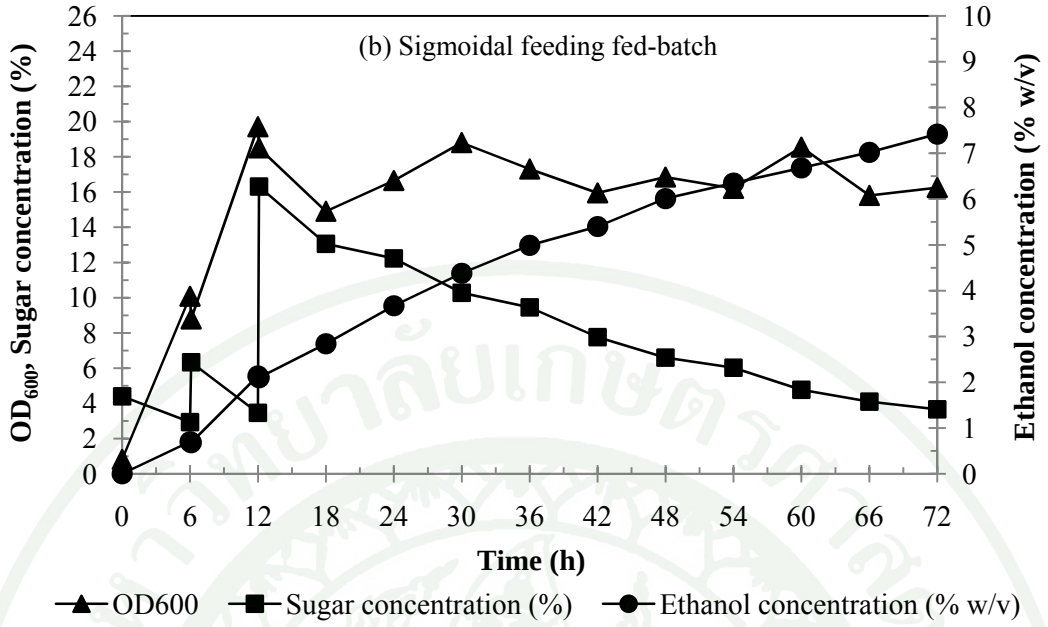


$EtOH_{max}$ = 6.59 % w/v, productivity = 0.92 g/l/h,

Fermentation yield = 97.92 % of theoretical yield

ภาพที่ 16 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยใช้เทคนิคการหมักแบบ Exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 ครั้ง (a) และการหมักแบบ Sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง (b) ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



$EtOH_{max}$ = 7.42 % w/v, productivity = 1.03 g/l/h,

Fermentation yield = 100 % of theoretical yield

ภาพที่ 16 (ต่อ)

6. ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ด้วยการหมักแบบแบทช์และแบบเฟด-แบทช์ ที่อุณหภูมิสูง ในสภาวะอาหารไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (non-sterile) โดยใช้ถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ

นำยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถหมักเอทานอลในสภาวะอาหารไม่ปลอดเชื้อ (non-sterile) ในการหมักแบบแบทช์และแบบเฟด-แบทช์ ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมอาหารให้มีน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร และเฟด-แบทช์ที่ใช้การหมักแบบ Sigmoidal feeding fed-batch เตรียมให้มีน้ำตาลเริ่มต้น 4 เปอร์เซ็นต์ ในปริมาตรอาหารเริ่มต้น 1.1 ลิตร และแบ่งเติมอาหาร 2 ครั้งคือ 95 และ 306 มิลลิลิตร ที่เวลา 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ บรรจุอยู่ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

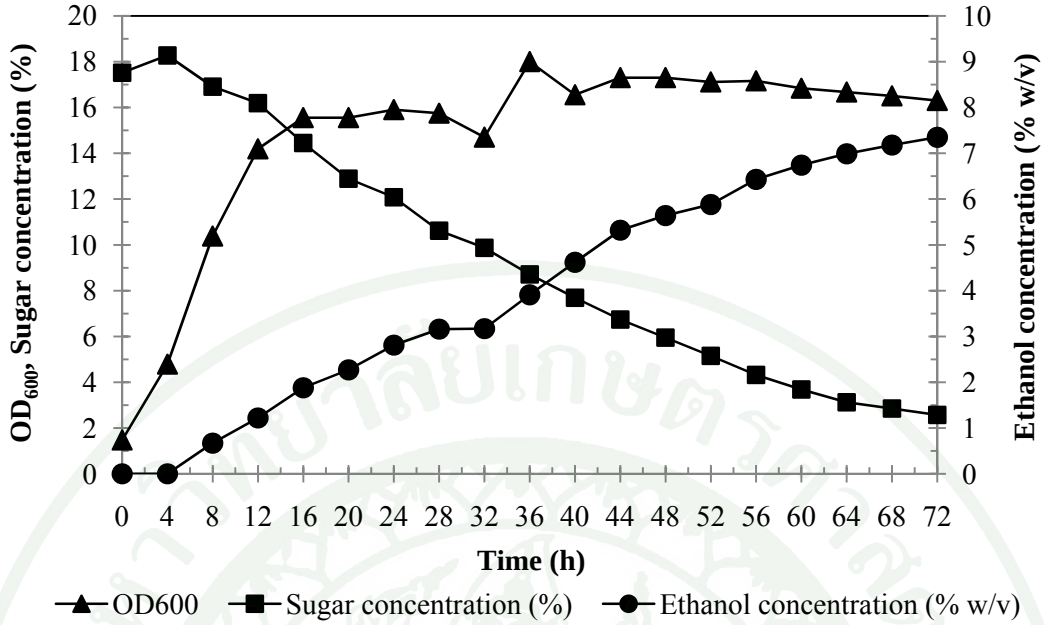
ผลการทดลอง หมักเอทานอลจากอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นในสภาวะอาหารไม่ผ่านการเชื้อแบบ sigmoidal feeding fed-batch พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีความสามารถในการหมักเอทานอลได้เท่ากับ 7.31 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเอทานอลเท่ากับ 93.59 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี (ภาพที่ 18) โดยยีสต์จะเริ่มหมักเอทานอลที่ 6 ชั่วโมงแรกและมีอัตราการผลิตเอทานอลสูงในช่วง 18 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการหมักเอทานอลจะเกิดขึ้นต่อเนื่องอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดที่เวลา 72 ชั่วโมง โดยที่เวลา 66 ชั่วโมง พบว่าเอทานอลมีค่าลดลงเล็กน้อยและเพิ่มขึ้นที่เวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ที่เวลา 60 ชั่วโมง พบว่ามีน้ำตาลคงเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 3.99 เปอร์เซ็นต์ และที่เวลา 66 ชั่วโมง มีน้ำตาลคงเหลือ 3.20 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ายีสต์มีการใช้น้ำตาลน้อยมาก โดยน้ำตาลคงเหลือในน้ำหมักคือน้ำตาลฟรุกโทส ซึ่งยีสต์มีความชอบน้อยกว่าน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นจึงอาจเป็นสาเหตุทำให้ยีสต์นำเอทานอลมาใช้เป็นแหล่งให้พลังงานเพื่อการเจริญ จึงทำให้เอทานอลที่สะสมในน้ำหมักลดลง อย่างไรก็ตามที่เวลา 72 ชั่วโมง น้ำตาลคงเหลือในน้ำหมักลดลงเพียงเล็กน้อยซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.72 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่เอทานอลสุดท้ายมีค่าเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาการเจริญจากการวัดความขุ่นที่ OD_{600} พบว่ายีสต์มีการเจริญได้รวดเร็วและใช้ระยะเวลาในการเจริญสูงสุดสั้นลง ซึ่งอาจเกิดจากยีสต์มีการเจริญอยู่ในระยะ log phase และไม่ถูกกดดันจากสภาวะน้ำตาลมีความเข้มข้นสูง จึงทำให้ยีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกที่มีการเติมอาหารลงในถังหมัก โดยพบว่ายีสต์มีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 24.7 ที่เวลา 36 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญลดลงเล็กน้อยจนถึงที่เวลา 60 ชั่วโมง และการเจริญสูงขึ้นเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมักอีกครั้ง ซึ่งอาจเกิดจากยีสต์ใช้เอทานอลที่สะสมเป็นแหล่งพลังงานควบคู่กับการใช้น้ำตาลที่เหลืออยู่เพื่อการเจริญ สำหรับการหมักเอทานอลในสภาวะอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบแบทช์ พบว่า ยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีความสามารถหมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.81 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเอทานอลเท่ากับ 82.95 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี (ภาพที่ 17) การหมักเอทานอลเริ่มเกิดขึ้น เมื่อยีสต์เริ่มมีการเจริญในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น อย่างไรก็ตาม น้ำตาลส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญ เนื่องจากเมื่อพิจารณากราฟการเจริญ พบว่ายีสต์มีการเจริญสูงในช่วง 12 ชั่วโมงแรกอย่างชัดเจน จากนั้นการเจริญจะไม่คงที่ จนกระทั่งยีสต์มีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 19.85 ที่เวลา 48 ชั่วโมง และการเจริญลดลงจนสิ้นสุดการหมัก ขณะที่การหมักเอทานอลที่เกิดขึ้นเมื่อยีสต์มีการเจริญสูงสุด พบว่ายีสต์เริ่มหมักเอทานอลได้ช้าลง นอกจากนั้นพบน้ำตาลคงเหลือในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น 2.04 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปผลการทดลอง พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 เจริญได้ดีในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อทั้งการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch และการหมักแบบแบทช์ เมื่อเทียบกับการเจริญในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แต่ยีสต์ *K. marxianus* DMKU3-1042 เจริญได้ดีกว่าเมื่อใช้การหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch เนื่องจากมีสภาวะกดดันน้ำตาลน้อย ทำให้มีอัตราการผลิตเอทานอลที่สูงกว่า ถึงแม้ว่าเอทานอลที่เกิดขึ้นจะมีค่าต่ำกว่าการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อเพียงเล็กน้อย

Lukondeh *et al.* (2005) ศึกษาการผลิตชีวมวลโดย *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 ในกระบวนการหมักแบบแบทช์และแบบเฟด-แบทช์ ทำการทดลองในอาหารเวย์ที่ขจัดโปรตีน (deproteinized whey) พบว่า *K. marxianus* FII 510700 ผลิตชีวมวลได้สูงสุดเท่ากับ 105 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตรในการหมักแบบเฟด-แบทช์ และมีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 2.90 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่การหมักแบบแบทช์ ผลิตชีวมวลได้เท่ากับ 15 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร และมีอัตราการผลิตชีวมวลเท่ากับ 1.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากผลการทดลองหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 ให้ผลที่สอดคล้องกับรายงานของ Lukondeh *et al.* (2005) เนื่องจากการหมักแบบเฟด-แบทช์ให้เอทานอลและการเจริญสูงกว่าการหมักแบทช์ และไม่ถูกกดดันในสภาวะความเข้มข้นน้ำตาลสูง และเอทานอลที่เกิดการสะสมมีการเจือจาง จากการแบ่งเติมอาหาร ทำให้ยีสต์ไม่ถูกยับยั้งจากเอทานอลที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

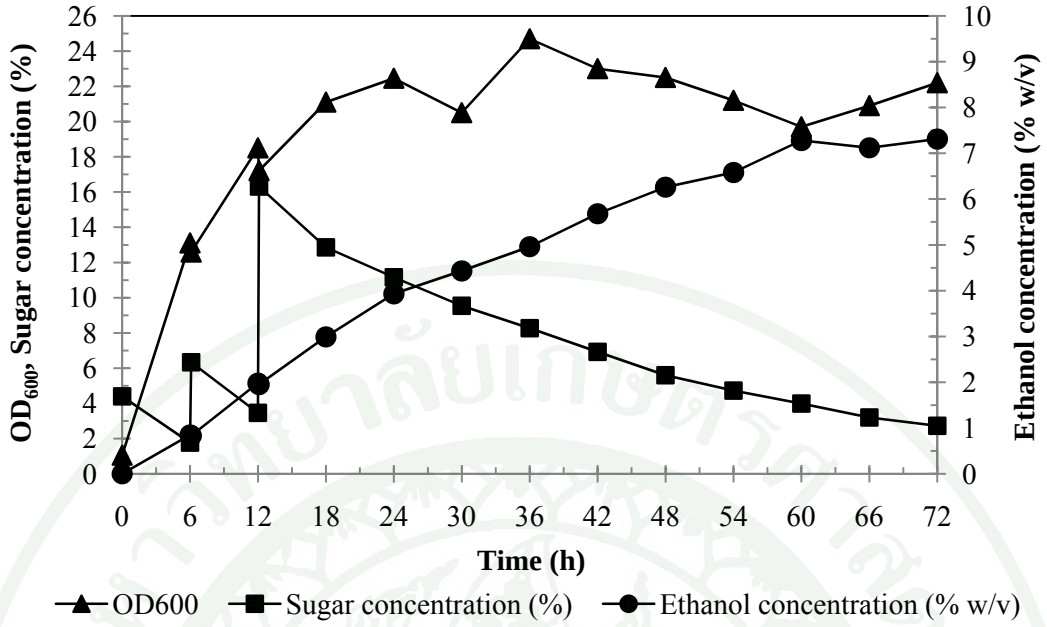


$EtOH_{max}$ = 6.81 % w/v, productivity = 0.95 g/l/h,

Fermentation yield = 82.95 % of theoretical yield

ภาพที่ 17 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยการหมักแบบแบทช์ ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



$EtOH_{max}$ = 7.31 % w/v, productivity = 1.02 g/l/h,
Fermentation yield = 93.59 % of theoretical yield

ภาพที่ 18 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยการหมักแบบ Sidmoidal feeding fed-batch ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

7. ศึกษาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลแบบรีพีทแบทช์ของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการในสภาวะอาหารผ่านการฆ่าเชื้อ (sterile) และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ (non-sterile)

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้น ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ที่มีปริมาตรอาหาร 1.5 ลิตร เตรียมอาหารให้มีน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีอัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่มีการให้อากาศ ทำการหมักในอาหารที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ผลการทดลองหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยหมักแบบแบทช์เป็นจำนวน 3 แบทช์ต่อกัน ผลการทดลองพบว่า ยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลในแบทช์แรกได้เท่ากับ 6.24 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.87 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แบทช์ที่ 2 หมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.19 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.29 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และแบทช์ที่ 3 หมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.91 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเทียบเวลาเดียวกันที่ 48 ชั่วโมง *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีอัตราการผลิตเอทานอลได้เร็วขึ้น โดยในแบทช์ที่ 1 หมักเอทานอลได้เท่ากับ 4.57 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร มีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.95 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และแบทช์ที่ 2 และ 3 มีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.29 และ 1.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการเจริญ (OD_{600}) พบว่ายีสต์มีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 14.2 ที่เวลา 72 ชั่วโมงในแบทช์แรก โดยยีสต์มีการเจริญเร็วที่ 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนพบการเจริญสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ขณะที่แบทช์ที่ 2 และ 3 มีการเจริญลดลงเล็กน้อย ซึ่งพบการเจริญสูงสุดเท่ากับ 11.9 ในแบทช์ที่ 2 และ 13.95 ในแบทช์ที่ 3 ที่เวลาเดียวกันคือ 42 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามแม้ในแบทช์ที่ 2 และ 3 จะมีการเจริญต่ำกว่าแบทช์ที่ 1 แต่พบว่ายีสต์มีเซลล์ช่วงเริ่มต้นในแบทช์ที่ 2 และ 3 สูงกว่าคือเท่ากับ 3.49 และ 3.42 ตามลำดับ ขณะที่แบทช์แรกความเข้มข้นของเซลล์เพียง 0.66 ซึ่งการที่ยีสต์มีการเจริญสูงในแบทช์ที่ 2 และ 3 ส่วนหนึ่งมาจากการเจริญในแบทช์ที่ 1 จึงทำให้ยีสต์มีอัตราการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น ทำให้การหมักเอทานอลสูงขึ้นด้วย นอกจากนั้นยังพบน้ำตาลคงเหลือในปริมาณที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อยคือเหลือเท่ากับ 6.08 6.33 และ 5.91 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ในแบทช์ที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ การที่ยีสต์มีการเจริญสูงสุด 14.2 ส่วนหนึ่งมาจากยีสต์ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยเพื่อการเจริญ จึงทำให้ยีสต์ใช้น้ำตาลในปริมาณที่น้อย ขณะที่น้ำตาลในน้ำอ้อยเข้มข้นส่วนใหญ่เป็นซูโครส ดังนั้นเมื่อเจอความร้อนจากการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส จึงทำให้ซูโครสเปลี่ยนเป็นกลูโคสและฟรุกโทส โดยยีสต์ส่วนใหญ่จะมีความชอบกลูโคสมากกว่าฟรุกโทส ทำให้น้ำตาลที่คงเหลือในน้ำหมักเป็นน้ำตาลฟรุกโทสทั้งหมด

สำหรับการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีความสามารถในการหมักเอทานอลได้สูงสุดในแบทช์แรก หมักเอทานอลได้เท่ากับ 7.91 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.10 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง แบทช์ที่ 2 หมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.01 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.25 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และแบทช์ที่ 3 หมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.66 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยยีสต์มีอัตราการผลิตเอทานอลได้เร็วขึ้นเช่นเดียวกับในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดย 12 ชั่วโมงแรก ยีสต์จะหมักเอทานอลได้อย่างช้าๆ และเริ่มหมักอย่างรวดเร็วที่เวลา 18 ชั่วโมงเป็นต้นไป ขณะที่เมื่อพิจารณากราฟการเจริญ (OD_{600}) ในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ยีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว และเพิ่มขึ้นอย่างสม่ำเสมอ หลังเวลา 18 ชั่วโมง การเจริญจะมีลักษณะที่สอดคล้องกับการหมักเอทานอล เนื่องจากในช่วงแรก *K. marxianus* DMKU 3-1042 ใช้น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญและเพิ่มมวลเซลล์ จากนั้นจึงเริ่มหมักเอทานอลเกิดขึ้น พร้อมกับมีการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆควบคู่กัน โดยพบการเจริญสูงสุดในแบทช์แรกเท่ากับ 19.2 ที่เวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจน สำหรับน้ำตาลคงเหลือในน้ำหมักเท่ากับ 1.43 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการที่ยีสต์มีการเจริญลดลงอาจมาจากมีน้ำตาลเหลืออยู่ในปริมาณน้อย ขณะที่ในน้ำหมักเริ่มมีการสะสมเอทานอลเพิ่มขึ้น รวมทั้งยีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว ทำให้อาหารหมักมีความเป็นกรดมากขึ้น จึงอาจเป็นสาเหตุทำให้ในช่วง 12 ชั่วโมงหลัง ยีสต์มีการเจริญลดลงอย่างเห็นได้ชัดเจนในแบทช์ที่ 1 ขณะที่การเจริญ (OD_{600}) ในแบทช์ที่ 2 ยีสต์มีการเจริญรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นการเจริญเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ จนมีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 15.8 ที่เวลา 36 ชั่วโมง และลดลงเล็กน้อย เมื่อสิ้นสุดเวลาหมัก 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามน้ำตาลคงเหลือในน้ำหมักมีปริมาณสูงเท่ากับ 4.92 เปอร์เซ็นต์ และในแบทช์ที่ 3 ยีสต์มีการเจริญช้าและใช้ระยะเวลานานในการเจริญสูงสุด พบว่ายีสต์มีการเจริญไม่คงที่ โดยพบการเจริญสูงสุดเท่ากับ 17.15 ที่เวลา 42 ชั่วโมง แต่มีการเจริญดีกว่าเมื่อเทียบกับการเจริญในแบทช์ที่ 2 เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม ยีสต์มีการเจริญสูงสุดในชั่วโมงท้ายๆของการหมักในแต่ละแบทช์ จึงทำให้ยีสต์มีประสิทธิภาพในการผลิต

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอทานอลไม่สูงพอ เนื่องจากต้องนำน้ำตาลไปใช้เพื่อการเจริญก่อน สาเหตุอาจเกิดจากการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เช่นแบคทีเรีย รา เนื่องจากการหมักเป็นระบบเปิด และไม่มีการฆ่าเชื้ออาหารน้ำอ้อยเข้มข้นก่อนการหมัก หรืออาจเกิดจากระยะเวลาในการหมักที่นานและต่อเนื่อง ทำให้มียีสต์บางส่วนเริ่มตาย เมื่อมีการสะสมของเอทานอลในน้ำหมักเกิดขึ้น ดังนั้นยีสต์จึงไม่สามารถทนเอทานอลได้เท่ากับเซลล์ที่มีการหมักในแบทช์ที่ 1 และในแบทช์ที่ 3 พบน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 3.85 เปอร์เซ็นต์

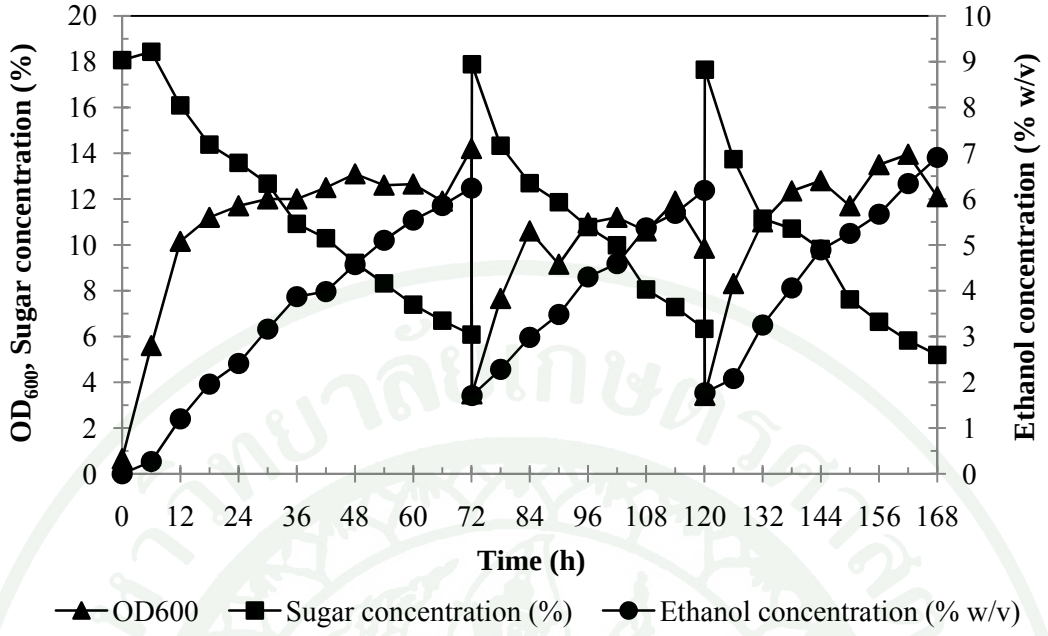
สรุปผลการทดลอง พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีความสามารถในการหมักเอทานอลได้เร็วขึ้นเมื่อเทียบอัตราการผลิตเอทานอลที่เวลาเดียวคือ 48 ชั่วโมง ซึ่งพบได้ทั้งในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยการหมักในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ยีสต์หมักเอทานอลได้ช้าในแบทช์แรก ซึ่งส่วนใหญ่น้ำตาลจะนำไปใช้เพื่อการเจริญ ขณะที่แบทช์ที่ 2 และ 3 ยีสต์มีอัตราการผลิตเอทานอลที่เร็วขึ้น หมักเอทานอลได้สูงขึ้น เมื่อปรับลดระยะเวลาในการหมักเอทานอลให้สั้นลง และเมื่อพิจราณาการเจริญ (OD_{600}) ยีสต์มีการเจริญแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ซึ่งจะพบการเจริญได้ดีในแบทช์แรก อย่างไรก็ตามน้ำตาลคงเหลือในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่าที่ใกล้เคียงกันทั้ง 3 แบทช์คือ 6.08 6.33 และ 5.19 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงเท่ากับ 7.91 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในแบทช์แรก ขณะที่แบทช์ที่ 2 และ 3 ถึงแม้จะมีอัตราการผลิตเอทานอลและหมักเอทานอลได้สูงขึ้น เมื่อปรับลดระยะเวลาในการผลิตเอทานอลให้สั้นลง แต่พบว่าหมักเอทานอลได้ต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ขณะที่ยีสต์มีการเจริญได้ดีในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จึงทำให้พบน้ำตาลคงเหลือในอาหารน้อยเท่ากับ 1.43 4.92 และ 3.85 เปอร์เซ็นต์ ในแบทช์ที่ 1 2 และ 3

Nuanpeng *et al.* (2010) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำข้าวฟ่างหวาน (sweet sorghum juice) โดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* NP01 ภายใต้สภาวะ very high gravity ด้วยการหมักแบบรีพีทแบทช์ ทำการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร เตรียมอาหารหมักให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 280 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเชื้อติดต่อกันเป็นจำนวน 8 แบทช์ ในแต่ละแบทช์เมื่อสิ้นสุดการหมัก จะนำน้ำหมักออก 50 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรทั้งหมดพร้อมกับเติมอาหารใหม่ลงในถังหมัก พบว่า *S. cerevisiae* NP01 หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 12.95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 4.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และพบน้ำตาลคงเหลือในปริมาณน้อยในแบทช์ที่ 1 สำหรับแบทช์ที่ 2-8 พบว่ายีสต์หมักเอทานอลได้ลดลงและมีค่าที่ใกล้เคียงกัน มีอัตรา

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

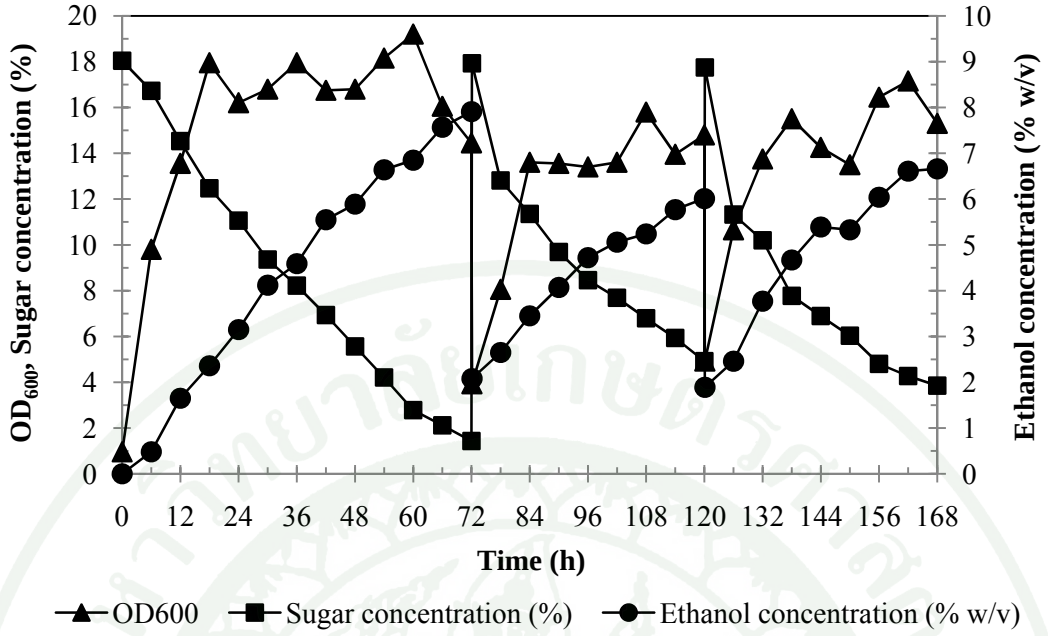
การผลิตเอทานอลลดลงเช่นกัน นอกจากนั้นยังพบว่า ยีสต์ใช้ระยะเวลาในการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง และสามารถเจริญได้น้อย เนื่องจากการนำอาหารเก่าออกในปริมาณที่สูง จึงทำให้มีความหนาแน่นของเซลล์ในถังหมักต่ำกว่าในแบทช์ที่ 1 ดังนั้นยีสต์จึงใช้น้ำตาลในช่วงแรกเพื่อการเจริญเพิ่มจำนวนเซล์ ทำให้การหมักเอทานอลเกิดได้ช้าและใช้ระยะเวลานานขึ้น จากผลการทดลองหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีโดย *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีลักษณะที่สอดคล้องกับรายงานของ Nuanpeng *et al.* (2010) เนื่องจากการทดลองนำอาหารเก่าออก 80 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรอาหารทั้งหมด ซึ่งอาจเป็นปริมาณที่มากเกินไป ทำให้เซลล์ในถังหมักมีจำนวนต่ำ ขณะที่อาจมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่น เพราะเป็นอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 19 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU3-1042 โดยใช้การหมักแบบรีพีทแบทช์ ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่ให้อากาศ อาหารผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 20 การหมักเอทานอล การเจริญ และการใช้น้ำตาลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยใช้การหมักแบบรีพีทแบทช์ ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เตรียมให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 หมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 300 รอบต่อนาที และไม่ให้อากาศ โดยอาหารไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

8. ศึกษาองค์ประกอบในกากส่าและการนำน้ำกากส่ากลับมาใช้ในการผลิตเอทานอล

ทำการทดลองโดยนำอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการหมักแล้วกลับมาใช้ในการหมักแบบแบทช์ในครั้งต่อไป เพื่อช่วยลดปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก และลดต้นทุนสำหรับการบำบัดน้ำเสียก่อนปล่อยสู่สิ่งแวดล้อม รวมถึงลดปริมาณสารอาหาร เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต ฟอสเฟต ที่ต้องเติมในการหมักครั้งต่อไป

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

8.1 องค์ประกอบบางประการของน้ำกากส่า

นำอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการหมักมาต้มเป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้เอทานอลระเหยและนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ออก นำส่วนใสไปวิเคราะห์เพื่อหาองค์ประกอบ ได้แก่ น้ำตาลคงเหลือ ความเข้มข้นแอมโมเนียม (NH_4-N) ความเข้มข้นไนไตรท์ (NO_2–N) ความเข้มข้นไนเตรต (NO_3–N) ความเข้มข้นฟอสเฟต (PO_4–P) ความเข้มข้นฟอสเฟตทั้งหมดที่ละลายน้ำ (TDP) และปริมาณคาร์บอนทั้งหมดที่ประกอบอยู่ในสารอินทรีย์ (TOC) ที่คงเหลืออยู่ในน้ำหมัก

ผลการทดลองพบว่า อาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านการหมักและต้มเพื่อไล่เอทานอลมีน้ำตาลคงเหลือเท่ากับ 2.49 เปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย กลูโคส 0.15 เปอร์เซ็นต์ และฟรุกโทส 2.34 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่พบซูโครสคงเหลือ สำหรับความเข้มข้นแอมโมเนียมที่เหลือในอาหารหมัก พบว่ามีความเข้มข้นแอมโมเนียมคงเหลือในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเท่ากับ 60.47 มิลลิกรัมต่อลิตร มีความเข้มข้นไนไตรท์และไนเตรตที่เหลือในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นเท่ากับ 0.068 และ 1.0043 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณฟอสเฟตทั้งหมดที่ละลายน้ำมีความเข้มข้นที่เหลือในน้ำหมักเท่ากับ 138.97 มิลลิกรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณฟอสเฟตเท่ากับ 119.79 มิลลิกรัมต่อลิตร และความเข้มข้นคาร์บอนทั้งหมดที่ประกอบอยู่ในสารอินทรีย์ที่เหลือในอาหารหมักเท่ากับ 25,280 มิลลิกรัมต่อลิตร

8.2 ผลของการนำน้ำกากส่ากลับมาใช้ในการผลิตเอทานอล

นำ *K. marxianus* DMKU 3-1042 มาทดสอบความสามารถหมักเอทานอลในอาหารหมักที่มีการนำน้ำกากส่ามาผสมในสัดส่วนที่ต่างกัน โดยเตรียมอาหารหมักให้มีความเข้มข้นน้ำตาลรวมกันทั้งหมดเท่ากับ 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยไม่คำนึงถึงความเข้มข้นสารอาหารต่างๆที่วิเคราะห์ได้จากอาหารที่ผ่านการหมักแล้วจากข้อ 8.1 ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 อาหารที่ใช้หมัก 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที โดยสัดส่วนของน้ำกากส่าที่ทดลองมีดังนี้ 10 20 30 40 50 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์

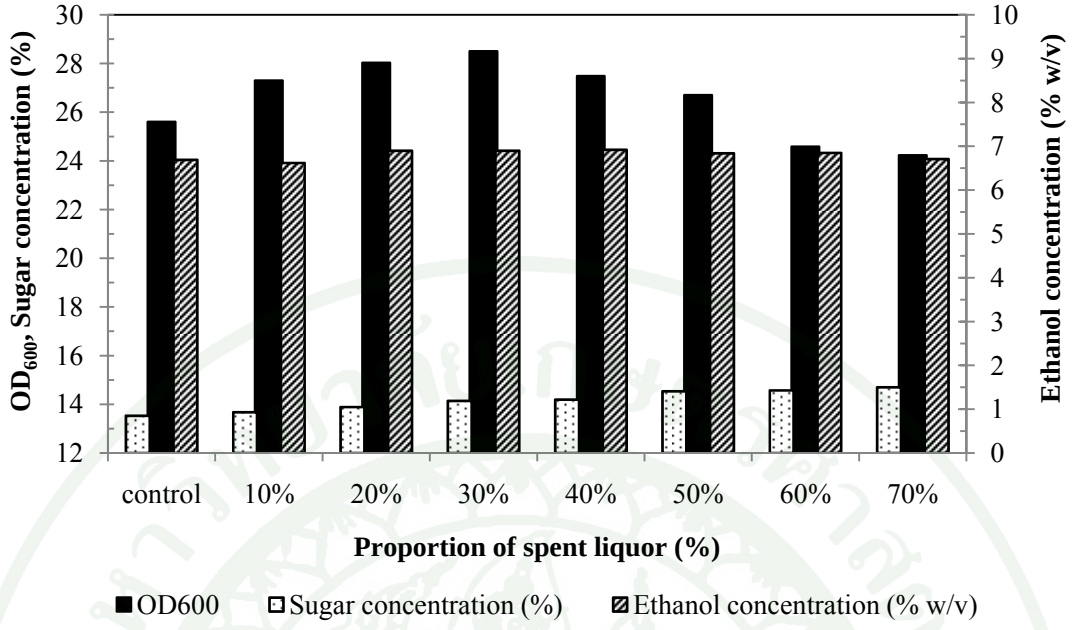
ผลการทดลองพบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 สามารถหมักเอทานอลในอาหารหมักที่มีการผสมน้ำกากส่าปริมาณต่างๆ โดยยีสต์สามารถหมักเอทานอลได้สูงกว่าในอาหารน้ำอ้อย

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เข้มข้นที่ไม่มีการผสมน้ำกากส่า (control) ที่หมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.69 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.39 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (ภาพที่ 21) ยกเว้นเมื่อใช้น้ำกากส่าในสัดส่วน 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบว่าหมักเอทานอลได้ใกล้เคียงกันเท่ากับ 6.62 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.38 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่การใช้น้ำกากส่า 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงกว่า control และมีค่าใกล้เคียงกันเท่ากับ 6.90 6.90 และ 6.92 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง และมีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากันเท่ากับ 1.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การหมักโดยใช้น้ำกากส่าสูงกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการผลิตเอทานอลลดลงเล็กน้อย (แต่ยังคงสูงกว่า control) โดยการใช้น้ำกากส่า 50, 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ให้เอทานอลที่เวลา 48 ชั่วโมงเท่ากับ 6.84 6.85 และ 6.71 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการเจริญจากการวัดความขุ่น (OD_{600}) พบว่าอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่มีการผสมน้ำกากส่า (control) มีการเจริญเท่ากับ 25.6 ขณะที่การเจริญสูงขึ้นเรื่อยๆ จนมีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 28.5 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารหมักที่ใช้น้ำกากส่า 30 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเพิ่มสัดส่วนของน้ำกากส่า พบว่ายีสต์มีการเจริญลดลง ซึ่งพบการเจริญเท่ากับ 27.48 26.7 24.58 และ 24.23 ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารหมักที่ใช้น้ำกากส่า 40 50 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำกากส่ามีส่วนช่วยเพิ่มการผลิตเอทานอลและอัตราการผลิตเอทานอล

สรุปผลการทดลอง พบว่าสัดส่วนการผสมน้ำกากส่า 20 30 และ 40 เปอร์เซ็นต์ เป็นสัดส่วนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* DMKU3-1042 ซึ่งหมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.9 6.9 และ 6.92 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยพบว่าทั้ง 3 สัดส่วนมีอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.44 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และเมื่อพิจารณาการเจริญพบว่าที่สัดส่วนการใช้น้ำกากส่า 30 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์มีการเจริญสูงสุดเท่ากับ 28.5 ขณะที่เมื่อสัดส่วนการใช้น้ำกากส่าเพิ่มขึ้น ยีสต์มีการเจริญลดลง ดังนั้นการใช้น้ำกากส่า 30 เปอร์เซ็นต์ จึงเป็นสัดส่วนที่เหมาะสมในการนำกลับมาใช้เตรียมเป็นอาหารสำหรับหมักในการหมักครั้งต่อไป ซึ่งจะช่วยลดปริมาณน้ำอ้อยเข้มข้นสด และช่วยลดปริมาณน้ำเสียที่เกิดขึ้น

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 21 การหมักเอทานอล การเจริญ และน้ำตาลคงเหลือของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในอาหารหมักที่มีการผสมน้ำกากส่าในปริมาณ 10 20 30 40 50 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นน้ำตาลรวมกันทั้งหมด 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ แมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 อาหารที่ใช้หมัก 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที

9. ศึกษาคุณภาพของน้ำอ้อยเข้มข้นที่เก็บในอุณหภูมิห้องโดยวิธีต่างๆ

เนื่องจากน้ำอ้อยเข้มข้นเป็นผลิตผลที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตน้ำตาลทราย จากการนำน้ำอ้อยสดมาผ่านการระเหยน้ำออก ทำให้น้ำอ้อยเข้มข้นมีความเข้มข้นของน้ำตาล จึงทำให้มีปริมาตรลดลงทำให้เสียยาก อย่างไรก็ตามอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลอาจต้องใช้น้ำอ้อยเข้มข้นเป็นปริมาณมากต่อการหมักเอทานอลหนึ่งครั้ง ดังนั้นหากต้องเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำจึงเป็นการทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น เคยมีรายงานการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ในการหมักเอทานอลที่มาจากการปนเปื้อนอยู่ในวัตถุดิบที่นำมาใช้เช่น น้ำอ้อย และกากน้ำตาล โดยส่วนใหญ่จะพบการปนเปื้อนจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ ดังนั้นเพื่อลดและควบคุมการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดผลเสียต่อ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กระบวนการผลิตเอทานอล จึงทำการทดลองเพื่อหาวิธีการเก็บที่เหมาะสม โดยการปรับสภาพน้ำอ้อยเข้มข้นได้แก่ (1) น้ำอ้อยเข้มข้นสด (2) น้ำอ้อยเข้มข้นที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 (3) น้ำอ้อยเข้มข้นที่เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 200 พีพีเอ็ม (4) น้ำอ้อยเข้มข้นที่เติมกรดเบนโซอิก 200 พีพีเอ็ม โดยทั้งหมดนำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 4 เดือน

ผลการทดลองพบว่า ทั้ง 3 วิธี สามารถยับยั้งการปนเปื้อนจากแบคทีเรียในน้ำอ้อยเข้มข้น ดังแสดงในภาพที่ 22 พบว่าน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีค่า log การเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร NA สูงอย่างชัดเจนใน 6 สัปดาห์แรก โดยพบค่า log การเจริญของแบคทีเรียได้สูงเท่ากับ 4.60 และ 4.61 ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ขณะที่ในสัปดาห์หลังค่า log การเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร NA เริ่มลดลง แต่ยังคงมีค่า log การเจริญของแบคทีเรียสูงกว่าน้ำอ้อยที่มีการปรับสภาพทุกวิธี เนื่องจากน้ำอ้อยเข้มข้นมีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.2 ซึ่งพีเอชเกือบเป็นกลาง ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ จากการสังเกตุลักษณะน้ำอ้อยเข้มข้นซึ่งเริ่มมีลักษณะเป็นเมือก เหนียวข้นเกิดขึ้น ขณะที่น้ำอ้อยเข้มข้นที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 มีค่า log การเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร NA ลดลงตามระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำอ้อยเข้มข้นเพิ่มขึ้น โดยค่า log การเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร NA มีค่าไม่แตกต่างกันและคงที่หลังจากสัปดาห์ที่ 11 เป็นต้นไป โดยมีค่าเท่ากับ 3.85 3.95 3.90 3.90 3.90 และ 3.90 ในสัปดาห์ที่ 11 12 13 14 15 และ 16 ขณะที่น้ำอ้อยเข้มข้นที่เติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 200 พีพีเอ็ม พบว่ามีค่า log การเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร NA ไม่แตกต่างกันตั้งแต่สัปดาห์แรกจนถึงสัปดาห์สุดท้าย มีค่า log การเจริญของแบคทีเรียอยู่ในช่วง 4.00-4.36 โดยก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ที่ไม่แตกตัว ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีที่พีเอชต่ำ ขณะที่พีเอชเป็นกลาง ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์จะอยู่ในรูปไบซัลไฟต์ที่ไม่ว่องไว ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียลดลง ดังนั้นเมื่อนำมาเติมลงในน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีพีเอช 6.20 ทำให้ยับยั้งแบคทีเรียได้ไม่สมบูรณ์ เนื่องจากน้ำอ้อยมีพีเอชเกือบเป็นกลาง แต่ยังให้ค่า log การเจริญของแบคทีเรียลดลงเมื่อเทียบกับน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่มีการแปรสภาพ โดยผลการทดลองนี้ให้ผลที่คล้ายกับน้ำอ้อยเข้มข้นที่เติมกรดเบนโซอิก 200 พีพีเอ็ม พบว่าในช่วงสัปดาห์แรกค่า log การเจริญของแบคทีเรียมีค่าที่ใกล้เคียงกัน ขณะที่ในสัปดาห์หลังพบว่าค่า log การเจริญของแบคทีเรียมีค่าลดลง เนื่องจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของกรดเบนโซอิกเกิดจากกรดที่ไม่แตกตัว ซึ่งจะยับยั้งได้ดีในอาหารเป็นกรดมีพีเอชอยู่ในช่วง 2.5-4.0 โดยกรดที่ไม่แตกตัวจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สูญเสียการขนส่งกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อเซลล์ ซึ่งที่พีเอชต่ำ กรดจะไม่แตกตัวเป็นอิออนที่พีเอช 4.0 จะมีกรดที่ไม่แตกตัวประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่พีเอช 6.0 จะมีกรดที่ไม่แตกตัวเพียง 1.5 เปอร์เซ็นต์ และเนื่องจากน้ำอ้อยเข้มข้นมีพีเอชเริ่มต้น 6.20 จึงทำให้มีกรดเบนโซอิกที่ไม่แตกตัวอยู่

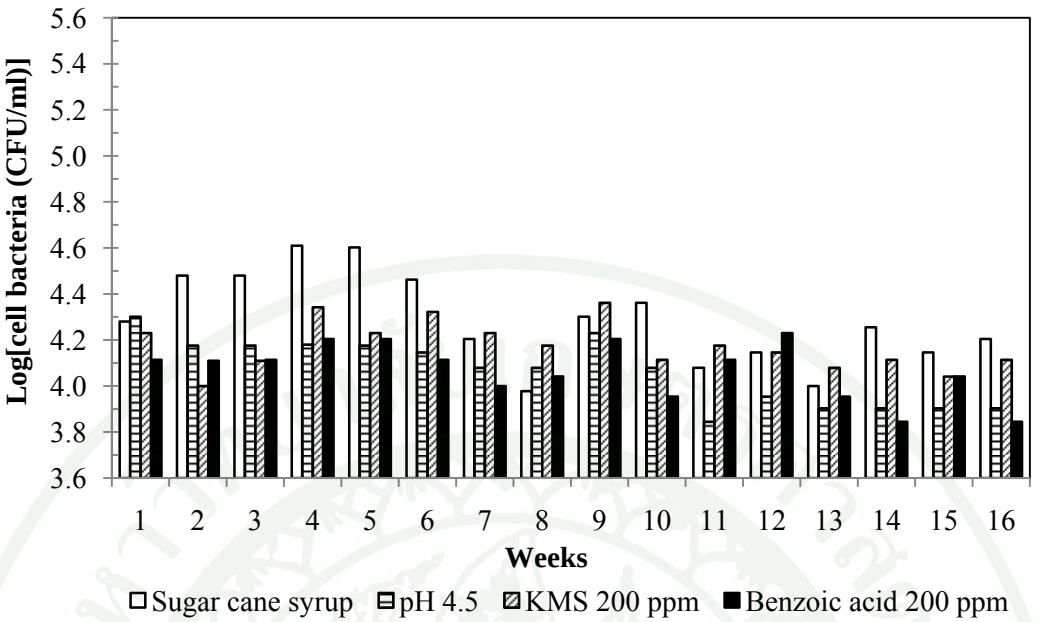
ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

น้อย ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ไม่ดีเท่าที่ควร จึงเป็นสาเหตุให้ยังคงพบการเจริญของแบคทีเรียได้ไม่แตกต่างกันในสัปดาห์แรก ขณะที่เมื่อแบคทีเรียมีการเจริญเกิดขึ้น ทำให้น้ำอ้อยเข้มข้นมีสภาพเป็นกรด จึงทำให้ในสัปดาห์หลัง พบค่า log การเจริญของแบคทีเรียลดลง

สรุปผลการทดลองเก็บรักษาน้ำอ้อยเข้มข้นโดยปรับสภาพด้วยวิธีต่างๆคือ ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 เติมสารโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 200 พีพีเอ็ม และเติมกรดเบนโซอิก 200 พีพีเอ็มลงในน้ำอ้อยเข้มข้น พบว่าทั้ง 3 วิธีช่วยยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อยเข้มข้นได้ โดยมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ต่างกัน โดยพบว่าสารกันบูดที่นำมาใช้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่อาหารมีพีเอชเป็นกรด ขณะที่น้ำอ้อยเข้มข้นมีพีเอชเท่ากับ 6.20 จึงทำให้สารกันบูดมีประสิทธิภาพได้ไม่เต็มที่ และเมื่อเรียงลำดับประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อยเข้มข้นได้แก่ น้ำอ้อยเข้มข้นที่มีการปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 รองลงมาคือ น้ำอ้อยเข้มข้นที่มีการเติมกรดเบนโซอิค 200 พีพีเอ็ม และน้ำอ้อยเข้มข้นที่มีการเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 200 พีพีเอ็ม ขณะที่ยังคงพบการเจริยของแบคทีเรียได้สูงในน้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่มีการปรับสภาพ

Oladipo *et al.* (2010) ศึกษาผลกระทบของกรดเบนโซอิกต่อการเจริญของแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำผลไม้ในประเทศไนจีเรีย โดยแบคทีเรียที่แยกได้คือ *Bacillus licheniformis Aeromonas hydrophila B. circulans Proteus morganii Pseudomonas cepacia Bacillus alvei* และ *P. chlororaphis* เลี้ยงในอาหารเหลวที่มีการเติมกรดเบนโซอิค ความเข้มข้น 250 750 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอัตราการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 7 ชนิดลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดเบนโซอิคมีปริมาณเพิ่มขึ้น ซึ่งผลการทดลองศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำอ้อยเข้มข้นให้ผลที่แตกต่างกัน เนื่องจากการใช้กรดเบนโซอิกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย กรดที่ไม่แตกตัวทำงานได้ดีที่อาหารมีพีเอชต่ำ ขณะที่น้ำอ้อยเข้มข้นที่ใช้ในการทดลองมีพีเอชค่อนข้างเป็นกลาง จึงเป็นสาเหตุให้กรดเบนโซอิก 200 พีพีเอ็มยับยั้งแบคทีเรียไม่ดีเท่าที่ควร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์



ภาพที่ 22 การเจริญของเซลล์แบคทีเรียในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นบนอาหาร nutrient agar (NA) โดยใช้วิธีการ spread plate เป็นระยะเวลา 16 สัปดาห์ เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง โดยการปรับสภาพที่แตกต่างกันได้แก่ น้ำอ้อยเข้มข้น น้ำอ้อยเข้มข้นปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 น้ำอ้อยเข้มข้นเติมโพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 200 พีพีเอ็ม และน้ำอ้อยเข้มข้นเติมกรดเบนโซอิก 200 พีพีเอ็ม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การทดสอบเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการหมักเอทานอลของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในอาหารหมักระหว่างน้ำอ้อยดิบและน้ำอ้อยเข้มข้น พบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 มีความสามารถในการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นได้ดีกว่าอาหารน้ำอ้อยดิบ โดยผลิตเอทานอล 6.20 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.86 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 84.8 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และมีการเจริญได้ดีกว่าในอาหารน้ำอ้อยดิบเช่นเดียวกัน

การศึกษาสูตรอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น และความเข้มข้นของสารอาหาร 3 ชนิดได้แก่ แหล่งไนโตรเจน แหล่งโพแทสเซียม และแหล่งแมกนีเซียม พบว่า ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 6 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มข้นน้ำตาลที่ยีสต์มีการเจริญได้ดี ขณะที่การศึกษาความเข้มข้นของสารอาหาร พบว่า แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอล โดยหมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.61 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

การศึกษาปัจจัยหลักที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอ้อยเข้มข้นของ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ด้วยการหมักแบบแบทช์ โดยใช้ถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ซึ่งปัจจัยที่นำมาศึกษาทั้งสิ้น 4 ปัจจัย ได้แก่ อุณหภูมิ อัตราการให้อากาศ พีเอชเริ่มต้น และสภาวะการไม่ผ่านการเชื้ออาหารก่อนใช้ในการหมัก พบว่ายีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (6.95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร) ในขณะที่การให้อากาศตลอดการหมักไม่ช่วยให้ยีสต์มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น แต่ส่งเสริมให้ยีสต์มีการเจริญได้ดีเมื่อมีการให้อากาศเพียงเล็กน้อย และที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 พบว่าหมักเอทานอลได้ต่ำกว่าที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 แต่พบว่ายีสต์มีการเจริญและการผลิตเอทานอลในรูปแบบเดียวกัน ซึ่งที่พีเอชเริ่มต้น 4.5 จะช่วยลดการปนเปื้อนจากแบคทีเรียในกระบวนการหมักได้ดีกว่าที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 จากสภาวะที่ศึกษานี้ พบว่ายีสต์สามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 7.35 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 92.22 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ในอาหารหมักที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

การศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยเทคนิคการหมักแบบเฟด-แบทช์ในฟลาสก์ของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 โดยแบ่งแผนการเติมอาหารออกเป็น 3 แบบ ได้แก่ แบบ linear increment feeding exponential increment feeding และ sigmoidal increment feeding และเปรียบเทียบกับผลการหมักเอทานอลแบบแบทช์ พบว่าการหมักแบบเฟด-แบทช์ โดยการเติมอาหารแบบ linear increment feeding ไม่เพิ่มการผลิตเอทานอล เนื่องจากค่าเอทานอลที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับการหมักแบบแบทช์ (6.8–6.9 เปอร์เซ็นต์โดยต่อปริมาตร) ขณะที่พบว่า การหมักแบบเฟด-แบทช์ โดยการเติมอาหารแบบ exponential increment feeding และ sigmoidal increment feeding มีผลให้เอทานอลเพิ่มขึ้น โดยให้เอทานอล 7.1-7.3 และ 7.2-7.8 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ

เปรียบเทียบการหมักเอทานอลด้วยเทคนิคการหมักแบบเฟด-แบทช์ที่ได้ผลการทดลองดีในฟลาสก์ คือการหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 ครั้ง และแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง ของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักในระดับห้องปฏิบัติการ ซึ่งพบว่าหมักเอทานอลได้สูงเท่ากับ 7.42 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง ในขณะที่การหมักแบบ exponential feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 3 ครั้ง หมักเอทานอลได้เท่ากับ 6.59 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เปรียบเทียบการหมักเอทานอลในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ระหว่างการหมักเอทานอลแบบ sigmoidal feeding fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้งกับการหมักแบบแบทช์ในสภาวะที่อาหารไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที พบว่าการหมักแบบ sigmoidal feeding fed-batch เป็นเทคนิคที่ส่งเสริมให้ยีสต์มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลได้เพิ่มขึ้น ซึ่งยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 สามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 7.31 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มีค่าผลผลิตการหมักเอทานอลเท่ากับ 93.59 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การศึกษาการหมักเอทานอลแบบรีพีทแบทช์ในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นของยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 ในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ในสภาวะที่อาหารผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยหมักเป็นระยะเวลา 168 ชั่วโมง พบว่าการหมักแบบรีพีทแบทช์ช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพในการหมัก เนื่องจากยีสต์หมักเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ลดระยะเวลาในการหมักสั้นลง และไม่ต่องเตรียมกล้าเชื้อใหม่ทุกครั้ง โดยพบว่า *K. marxianus* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลได้เพิ่มขึ้นทั้งในอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ

การศึกษาองค์ประกอบในน้ำกากส่า พบว่ามีน้ำตาล 2.49 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียม 60.47 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตรท์ 0.068 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนเตรต 1.0043 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสเฟตทั้งหมดที่ละลายน้ำ 138.97 มิลลิกรัมต่อลิตร และอินทรีย์คาร์บอนทั้งหมด 25,280 มิลลิกรัมต่อลิตร

การศึกษาผลของน้ำกากส่าต่อการผลิตเอทานอล โดยการใช้น้ำกากส่าผสมกับอาหารน้ำอ้อยเข้มข้นสดในสัดส่วนที่แตกต่างกันคือ 10 20 30 40 50 60 และ 70 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการใช้น้ำกากส่า 30 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์ให้เอทานอลเท่ากับ 6.90 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร และเจริญ (OD_{600}) ได้ดีเท่ากับ 28.5 เมื่อเทียบกับการใช้น้ำอ้อยเข้มข้นที่ไม่มีการผสมน้ำกากส่า

การศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำอ้อยเข้มข้นที่อุณหภูมิห้อง โดยศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำอ้อยเข้มข้น โดยการเปรียบเทียบค่า log การเจริญของแบคทีเรียบนอาหาร NA จากการใช้สารกันบูด 2 ชนิดได้แก่ โพแทสเซียมเมตาไบซัลเฟต์ 200 พีพีเอ็ม กรดเบนโซอิก 200 พีพีเอ็ม และการปรับลดพีเอชเท่ากับ 4.5 พบว่าทั้ง 3 วิธี ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อยเข้มข้นได้ โดยน้ำอ้อยเข้มข้นที่ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 ช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับวิธีอื่น

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาข้างต้น แสดงให้เห็นว่า น้ำอ้อยเข้มข้นมีความเป็นไปได้ในการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบแหล่งใหม่สำหรับการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงแทนการใช้กากน้ำตาลหรือมันสำปะหลัง โดยยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* DMKU3-1042 ที่แยกได้ในประเทศไทย ซึ่งควรที่จะมีการศึกษาทำการทดลองในระดับกึ่งอุตสาหกรรมและอุตสาหกรรมต่อไป เพื่อพัฒนาไปสู่การผลิตทางอุตสาหกรรม

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กนกรัตน์ ป้องประทุม, ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และวรารัตน์ เรืองรัตนเมธี. 2542. การควบคุมการเจริญและการสร้างสารพิษอะฟลาทอกซินของเชื้อรา Aspergillus parasiticus 102566 โดยสารกันเสียบางชนิด, น. 183-188. ใน **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาลัยวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 37 (สาขาวิทยาศาสตร์).** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. 2554. **ข้อมูลโรงงานผลิตเอทานอล ปี 2554.** แหล่งที่มา: http://www.dede.go.th/dede/index.php?option=com_content&view=article&id=902%3Agasohol-page2&catid=61&Itemid=68&lang=th, 17 เมษายน พ.ศ. 2555.

ชุติมา ศรีงิ้ว. 2548. **การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ทนอุณหภูมิสูง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทัศนีย์ ดิฐกมล และสมบูรณ์ แก้วปิ่นทอง. 2546. **รายงานการวิจัยประโยชน์ของน้ำกากส่าสำหรับการผลิตข้าวจังหวัดขอนแก่น.** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง.

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2532. **การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลและน้ำอ้อย.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

บริษัทไทยชูการ์ มิลเลอร์ จำกัด. 2555. **กระบวนการผลิตน้ำตาลทราย.** แหล่งที่มา: http://www.thaisugarmillers.com/tsmc-02-02.html, 12 พฤษภาคม พ.ศ. 2555.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, ฉกามาศ วงศ์ข้าหลวง, มาลัย บุญรัตนกรกิจ, พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์, ปทุมพร ฉิมเอนก และ ประดิษฐ์ คุรุวัณณา. 2536. การศึกษาขบวนการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำอ้อยกากน้ำตาล มันสำปะหลัง และวัสดุการเกษตรอื่น ๆ, น. 34-35. **รวมงานวิจัยการผลิตแอลกอฮอล์ที่ทำในประเทศ ไทย. 2526-2534.** สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา, ปทุมพร ฉิมอเนก, พรทิพย์ เจริญธรรมวัฒน์ และลาวัณย์ ไกรเดช. 2525. **การคัดเลือกเชื้อและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล ขบวนการที่เหมาะสมสหรับหมักแอลกอฮอล์จากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล 2524-2525.** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ยุทธศักดิ์ คณาสวัสดิ์. 2549. การพัฒนาเทคโนโลยีด้านเอทานอล. **ว. ส่งเสริมการลงทุน.** 17 (5): 34-38.

วิศัลย์ อินชนบท. 2546. **การผลิตยีสต์อาหารสัตว์ด้วยถังหมักระบบอากาศลอยตัวร่วมกับการหมักแบบเฟด-แบทช์ โดยใช้ยีสต์ตกตะกอนที่ทนอุณหภูมิสูง**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ศิวาพร ศิวเวชช. 2529. **วัตถุเจือปนอาหารเล่ม 1**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

สมใจ ศิริโภค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก**. ศูนย์สื่อสารกรุงเทพ. กรุงเทพฯ

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. **ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี**. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สุจินต์ พนาปวุฒิกุล. 2542ก. ไม่มีน้ำเสียในประเทศไทย. **ว. ที่ปรึกษาสิ่งแวดล้อมไทย** 3 (1): 22-28.

อภิรดี ศรีภิรมย์รักษ์. 2549. **การคัดแยกและแสดงลักษณะเฉพาะของยีสต์ทนร้อนเพื่อผลิตเอทานอล.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. 2553. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract). **ว. ก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์.** 10 (2): 84-89.

Abdel-Banat, B. M, H. Hoshida, A. Ano, S. Nonklang and R. Akada. 2010. High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperature become superior to the traditional process using mesophilic yeast?. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 85: 861-867.

Aguilera, F., R. A. Peinado, C. Millan, J. M. Ortega and J. C. Mauricio. 2006. Relationship between ethanol tolerance H^+-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. **Int. J. Food Microbiol**. 110: 34–42.

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

Alfenore, S., X. Cameleyre, L. Benbadis, C. Bideaux, J. L. Uribelarrea, G. Goma, C. Molina-Jouve and S. E. Guillouet. 2004. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 63: 537-542.

Anderson, P. J., K. Mcneil and K. Watson. 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation of ethanol at temperature above 40°C by *Kluveromyces marxianus* var. *marxianus***.** isolated from sugar mills. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 1314-1320.

Bai, F. W., W. A. Anderson and M. Moo-Young. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstock. **Biotechnol. Adv.** 26: 89-105.

Banat, I. M., P. Nigam and R. Marchant. 1992. The isolation of thermotolerant fermentative yeasts capable of growth at 52 °C and ethanol production at 45 °C and 50 °C. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 8: 259-263.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Barron, N., A. Rollan, R. Marchant, D. Higgins and A. P. McHale. 1996. Use of carbohydrate-supplemented distillery spent wash as a medium for ethanol production by a thermotolerant strain of yeast at 45 °C. **Biotech. Techniques.** 10: 349-352.

Beltran, G., B. E. Zarzoso, N. Rozes, A. Mas and JM. Guillamom. 2005. Influence of the timing of nitrogen addition during synthetic grape must fermentation on fermentations kinetic and nitrogen consumption. **J. Agric. Food. Chem.** 53: 996-1002.

Bely, M., A. Rinaldi and D. Dubourdieu. 2003. Influence of assimilable nitrogen on volatile acidity production by Saccharomyces cerevisiae during high sugar fermentation. **J. Biosci. Bioeng.** 96: 507-512.

Benschoter, A. S. and L. O. Ingram. 1986 Thermal tolerance of *Zymomonas mobilis*: Temperature-induced changes in membrane composition. **Appl. Environ. Microbiol.** 51: 1278-1282.

Birch, R. and G. M. Walker. 2000. Influence of magnesium ion on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae.* **Enz. Microbiol. Technol.** 26: 678-687.

Breisha, G. Z. 2010. Production of 16% ethanol from 35% sucrose. **Biomass and Bioenergy.** 34: 1243-1249.

Chipley, J. R. 1983. Sodium benzoate and benzoic acid. **Antimicrobials in Foods.** New York.

Cot, M., M. O. Loret, J. Francois and L. Benbadis. 2007. Physiological behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. **FEMS Yeast. Res.** 7: 22–32.

Cruz,de, S. H., M. Batistote and J. R. Ernandes. 2003. Effect of sugar catabolite repression in correlation with the structural complexity of the nitrogen source on yeast growth and fermentation. **J. Inst. Brew.** 109: 349–355.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

D'Amore, T., C. J. Panchal and G. G. Stewart. 1988. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. **Appl. Environ. Microbiol.** 54: 110-114.

Davidson, P. M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. **Food microbiology—fundamentals and frontiers.** Washington DC.

Dhaliwal, S.S., H.S. Oberoi., S.K. Sandhu., D. Nanda., D. Kumar and S.K. Uppal. 2011. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of a newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. **J. Biotechnol**. 102: 5968– 5975.

Ergun, M, and SF. Mutlu. 2000. Application of a statistical technique to the production of ethanol from sugar beet molasses by *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresour. Technol**. 73:251–255.

Fawole, M. O. and Osho. 2002. **Laboratory Manual of Microbiology.** Spectrum Books Lmd., Ibadan.

Ferguson, P., H. Mulholland, N. Barron, D. Brady and A. P. McHale. 1998. Sucrose-supplemented distillery spent wash as a medium for production of ethanol at 45 °C by free and alginate-immobilized preparation of *Kluyveromyces marxianus* IMB3. **Bioprocess Eng.** 18: 257-259.

Fiedurek, J., M. Skowronek and A. Gromada. 2011. Selection and Adaptation of Saccharomyces cerevisiae to increased ethanol tolerance and production. **Polish J. Microbiol.** 60: 51-58.

Gnansounou, E. and A. Dauriat. 2005. Ethanol fuel from biomass: A review. **J. Sci. Ind. Res.** 64: 822-831.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Hack, C. J. and R. Marchant. 1998. Characterization of a Novel Thermotolerant Yeast, *Kluyveromyces marxianus var. marxianus*: Development of an Ethanol Fermentation Process. **Ind. Microbiol. Biotechnol**. 20: 323-327.

Hacking, A. J., I. W. F. Taylor and C. M. Hanas. 1984. Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40 °C. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 19: 361-363.

Hoek, P.V., E. D. Hulster., J. P. Van Dijken and J. T. Pronk. 1999. Fermentation capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. **Biotechnol. Bioeng.** 68: 517-523

Horton, H. R., L. A. Moran, R. S. Ochs, J. D. Rawn and K. G. Scrimgeour. 2002. **Principle of Biochemistry. 3rd ed**. Prentice-Hall, Inc., USA.

Hughes, D. B., N. J. Tudroszen and C. J. Moye. 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain *of Kluyveromyces marxianus*. **Biotechnol. Letters**. 6: 1-6.

Ihekoronye, A.I. and P.O. Ngoddy. 1995. **Integrated Food Science and Technology for the Tropics.** Macmillan Educational Ltd., Australia.

Jone A. M. and W. M. Ingledew. 1994. Fuel ethanol production: appraisal of nitrogenous yeast foods for very high gravity wheat mash fermentation. **Process. Biochem**. 29: 483-488.

Kida, K., K. Kume, S. Norimura and Y. Sonoda. 1992. Repeated-Batch fermentation process using a thermotolerant flocculating yeast constructed by protoplast fusion. **J. Fer. Biotechnol.** 74: 169-173.

Kotarska, K., B. Czuprynski and G. Klosowski. 2006. Effect of various activators on the course of alcoholic fermentation. **J. Food. Eng.** 77: 965-971.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Krouwel, P. G. and L. Braber. 1979. Ethanol production by yeast at supraoptimal temperatures. **Biotechnol. Letters.** 1: 403-408.

Kumar, S., S. Neetu and P. Ram. 2010. Anhydrous ethanol: A renewable source of energy. **Renewable and Sus. Energy Reviews.** 14: 1830-1844.

Kurtzman, C. P. and J. W. Fell. 2006. "Yeast Systematics and Phylogeny-Implications of Molecular Identification Methods for Studies in Ecology." Biodiversity and Ecophysiology of Yeast. **The Yeast Handbook**, **Springer**. Retrieved January 7, 2007.

Lane, M. M. and P. J. Morrissey. 2010. *Kluyveromyces marxianus*: a yeast emerging from its sister's shadow. **Fungal. Biol. Rev.** 24: 17-26.

Lee, C., T. Yamakawa. and T. Kodama. 1993. Rapid growth of a thermotolerant yeast on palm oil. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 9: 187-190.

Lee, B. Y. and J. K. Kim. 2001. Production of *Candida utilis* biomass on molasses in different culture types. **Aquacultural Eng**. 25: 111-124.

Leticia, P., C. Miguel, G. Humberto and AJ. Jaime. 1997. Fermentation parameters influencing higher alcohol production in the tequila process. **Biotechnol Letters** 19: 45–47.

Limtong, S. 1987. **Ethanol fermentation by flocculant yeast**. Ph.D. Thesis. Osaka University. Japan.

Limtong, S., C. Sringiew and W. Yongmanitchai. 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresour. Technol**. 98: 3367-3374.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Lloyd, D., S. Morell, H. N. Carlsen, H. Degn, P. E. James and C. C. Towlands. 1993. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae.* **Yeast**. 9: 825-833.

Lodi, T., M. Saliola, C. Donnini and P. Goffrini. 2001. Three target genes for the transcriptional activator Cat8p of *Kluyveromyces lactis*: acetyl coenzymeA synthetase genes KIACS1 and KIACS2 and lactase permease gene KIJEN1. **J. Bacteriol.** 183: 5257-5261.

Lueck, E. 1980. **Antimicrobial food additives**. New York.

Lukondeh, T., N.J. Ashbolt and P. L. Rogers. 2005. Fed-batch fermentation for production of *Kluyveromyces marxianus* FII 510700 cultivated on a lactose-based medium. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** 32: 284-288.

Macris, B. J. 1975. Mechanism of benzoic acid uptake by *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied. Microbiol.** 30: 503–506.

Mahimairaja, S. and N. S. Bolan. 2004. Problems and prospects of agricultural use of distillery spentwash in India. In: Third Australian and New Zealand Soil Science Societies. **Conference Sydney, Australia**: 5–9 December 2004.

Mall, I. D. and V. Kumar. 1997. Removal of organic matter from distillery effluent using low cost adsorbent. **Chemical Engineering World XXXII** 7: 89–96.

Manikandan, K. and T. Viruthagiri. 2010. Optimization of C/N ratio of the medium and Fermentation conditions of Ethanol Production from Tapioca Starch using Co-Culture of *Aspergillus niger* and *Sachormyces cerevisiae.* **International J. Chem. Tech. Research**. 2: 947-955.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Manginot, C., J.L. Roustan and J.M. Sablayrolles. 1998. Nitrogen demand of different yeast strains during alcoholic fermentation. importance of the stationary phase. **Enz. Microb. Technol**. **23**: 511–517.

Michel, G. P. and J. Starka. 1986. Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*. **J. Bact.** 165: 1040-1045.

Morimura, S., Z. L. Ling and K. Kida. 1997. Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt-tolerance. **J. Fer. Bioeng.** 83: 271-274.

Murphy, J.D. and K. McCarthy. 2005. The optimal production of biogas for use as a transport fuel in Ireland. **Renewable Energy**. 30: 2111-2127.

Navarro, AR., MC. Sepulveda and MC. Rubio. 2000. Bio-concentration of vinasse from the alcoholic fermentation of sugar cane molasses. **Waste. Manag.** 20: 581–585.

Nuanpeng, S., L. Laopaiboon, P. Srinophakun, P. Klanrit, P. Jaisil and P. Laopaiboon. 2010. Ethanol production from sweet sorghum juice under very high gravity conditions: Batch, repeated-batch and scale up fermentation**.** (Research article) **J. Biotechnol.**

Ohta, K., S. C. Wijeyaratne and S. Hayashida. 1988. Temperaturesensitive mutants of a thermotolerant yeast, *Hinsenula polymorpha*. **J. Fer. Technol.** 66: 455-459.

Oladipo, I. C., D. T. Adeleke and A. O. Adebiyi. 2010. The effect of pH and chemical Preservative on the growth of bacterial isolates from some nigerian packaged fruit juices. **J. Biol. Sci. Pakistan**. 13: 16-21.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Osho, A. 2005. Ethanol and sugar tolerance of wine yeasts isolated from fermenting cashew apple juice. **Afr. J. Biotechnol**. 4: 660–662.

Ohta, K., S. C. Wijeyaratne and S. Hayashida. 1988. Temperature sensitive mutants of a thermotolerant yeast*, Hinsenula polymorpha*. **J. Fer. Technol.** 66: 455-459

Panchal, C. T. 1990. **Yeast Strain Selection**. Vetro Gen Corporation, London, Ontario, Canada Marcel Dekker, New York.

Pathade, G. R. 1999. A review of current technologies for distillery wastewater treatment. **Advances in Industrial WastewaterTreatment**. Technoscience Publications, Rajasthan, India.

Patrascu, E., G. Rapeanu And T. Hopulele. 2009. Current approaches to efficient biotechnological production of ethanol. **Innovative Romanian Food Biotechnology** Issue of March 2009.

Pelczar, M. J. Jr., E. C. S. Chan and N. R. Krieg. 1993. **Microbiology: Concepts and applications.** New York.

Pinheiro, R., I. Belo and M. Mota. 2000. Air pressure effects on biomass yield of two different *Kluyveromyces* strains. **Enz. Microbiol. Technol**. 26: 756-762.

Pramanik, K. 2003. Parametric studies on batch alcohol fermentation using *Saccharomyces* yeast extracted from toddy. **J. Chin. Inst. Chem. Engrs.** 34: 487-492.

Rikhvanov, E., N. Varakina, T. Rusaleva, E. Rachenko, V. Kiseleva and V. Voinikov. 2001. Heat shock-induced changes in the respiration of the yeast *Saccharomyces cerevisiae.* **Microbiol**. 70: 462-465.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Rodrussamee, N., N. Lertwattanasakul, K. H. Suprayogi, S. Limtong, T. Kosaka and M. Yamada. 2011. Growth and ethanol fermentation ability on hexose and pentose sugar and glucose effect under various condition in thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 90: 1573-1586.

Roehr, M. 2001. **The biotechnology of ethanol**: Classical and Future Application. WILEY-VCH: Weinheim–New York–Chichester–Brisbane–Singapore–Toronto.

Rose, A. H. 1993. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance**. J. Appl. Bact. Symposium Supplement**. 74: 110-118.

Roukas, T. 1994. Solid state fermentation of carob pods for ethanol production. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 41: 296-301.

Rouaks,T. 1996. Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. **J. Food Eng.** 21: 87-96.

Sanchez, S., V. Bravo, E. Castro, AJ. Moya and F. Camacho. 1999. Comparative study of the fermentation of D-glucose/D-xylose mixtures with Pachysolen tannophilus and Candida shehatae. **Bioprocess Eng.** 21: 525–532.

Santos, J., M.J. Sousa, H. Cardoso, J. Inacio, S. Silva, I. Spencer-Martins and C. Leao 2008. Ethanol tolerance of sugar transport and the rectification of stuck wine fermentations. **Microbiol.** 154: 422-430.

Satyawali, Y. and M. Balakrishnan. 2008. Wastewater treatment in molasses-based alcohol distilleries for COD and color removal: A review**. J. Environ. Manag.** 86: 481–497.

Shang, F., S. Wen, X. Wang and T. Tan. 2006. High cell density fermentation for ergosterol production by Saccharomyces cerevisiae. **J. Biosci. Bioeng.** 101: 38-41.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Suutari, M., K. Liukkonen and S. Laakso. 1990. Temperature adaptation in yeasts: the role of fatty acids. **J. Gen. Microbiol.** 136: 1469-1474.

Swan, T. and K. Watson. 1997. Membrane Fatty Acid Composition and Membrane Fluidity as Parameter of Stress Tolerance in Yeast. **J. Microbiol**. 43: 70-77.

Tfouni, S. A. V. and M. C. F. Toledo. 2002. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. **Food Control**. 13: 117–123.

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

Tilbury, R. H. 1975. Post-harvest biodeterioration of harvested sugarcane and economic appraisal. **Lactic acid bacteria in beverages food**. Academic press, New York.

Ueno, R., N. Urano and S. Kimura. 2001. Characterization of thermotolerant fermentative yeasts from hot spring drainage. **Fisheries Science**. 67: 138-145.

Vallet, C., R. Said, C. Rabiller and ML. Martin. 1996. Natural abundance isotopic fractionation in the fermentation reaction: influence of the nature of the yeast. **Bioorg. Chem**. 24: 319–330

Yoshida, F., T. yamane and K. nakamoto. 1973. Fed-batch hydrocarbon fermentations with colloidal emulsion feed. **Biotechnol**. 15: 257-270.

You, K. M., C. L. Rosenfield and D. C. Knipple. 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. **Appl. Environ. Microbiol**. 69: 1499–1503.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Yusof, S., L. S. Shian and A. Osman. 2000. Changes in quality of sugar-cane juice upon delayed extraction and storage. **Food Chem.** 68: 395-401.

Walker, G. 1998. Yeast growth. **Yeast: physiology and biotechnology**. Wiley, New York.

Warth, A. D. 1988. Effect of benzoic acid on growth yield of yeasts differing in their recistance to preservatives. **Appl. Environ. Microbiol**. 54: 2091–2095.

Watson, K. 1987. Temperature relations. In: **The Yeasts. Vol. 2 (Yeast and the environment)** Academic Press, London.

Wilkie, A. C., K. J. Riedesel and J. M. Owens. 2000. Stillage characterization and anaerobic treatment of ethanol stillage from conventional and cellulosic feedstocks. **Biomass and Bioenergy**. 19: 63–102.

Zhao, X.Q., C. Xue, X. M. Ge, J. Y. Wang, W. J. Yuan and F.w. Bai. 2009. Impact of zinc supplementation on the improvement of ethanol tolerance of self-flocculating yeast in continuous ethanol fermentation. **J. Biotechnol.** 139: 55-60.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ภาคผนวก

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract peptone dextrose (YPD) agar

Yeast extract	1	เปอร์เซ็นต์
Peptone	2	เปอร์เซ็นต์
Dextrose	2	เปอร์เซ็นต์
Agar	1.5	เปอร์เซ็นต์

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. Yeast extract peptone dextrose (YPD) broth

เตรียมเช่นเดียวกับ YPD agar (ข้อ 1) แต่ไม่เติมวุ้น

3. Beef peptone (NA) agar หรือ Nutrient agar

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
Agar	1.5	เปอร์เซ็นต์

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1 ลิตร หลังจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. อาหารเหลวน้ำอ้อยเข้มข้น สำหรับการหมัก

เป็นอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักขนาด 2.5 ลิตร ประกอบด้วย

น้ำอ้อยเข้มข้นที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล (วิเคราะห์โดย HPLC ในรูปของซูโครส กลูโคส และฟรุกโทส รวมกัน)	18	เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

แอมโมเนียมซัลเฟต	0.05	เปอร์เซ็นต์
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.05	เปอร์เซ็นต์
แมกนีเซียมซัลเฟต.7 น้ำ	0.1	เปอร์เซ็นต์
ปรับค่าพีเอชเป็น 4.5 ด้วย 1M HCl		

ชั่งน้ำอ้อยเข้มข้นให้มีความเข้มข้นน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ จากสูตรคำนวณ $C_1V_1 = C_2V_2$ เตรียมให้มีปริมาตรอาหารหมัก 1.5 ลิตร และชั่งแอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และแมกนีเซียมซัลเฟต 7น้ำ ให้มีปริมาณที่ใช้ในอาหารหมักที่มีปริมาตร 1.5 ลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 4.5 นำไปผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที

5. อาหารหมักที่เติมน้ำกากส่าในสัดส่วนที่ต่างกันในอาหารเหลวน้ำอ้อยเข้มข้น

เตรียมอาหารเหลวให้มีความเข้มข้นของน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากน้ำกากส่า เมื่อวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC พบน้ำตาลคงเหลือในน้ำหมัก 2.5 เปอร์เซ็นต์ ทำการเตรียมโดยใช้ปริมาตรอาหารทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ซึ่งเตรียมได้ตามตารางผนวกที่ 1

	น้ำตาลทั้งหมดในน้ำอ้อยเข้มข้น	57.8	เปอร์เซ็นต์
	ต้องการความเข้มข้นของน้ำตาล	18	เปอร์เซ็นต์
ดังนั้น	ต้องเตรียมน้ำอ้อยเข้มข้น	31.3	มิลลิลิตร
	เตรียมน้ำกลั่น	68.7	มิลลิลิตร
	ปริมาตรทั้งหมด	100	มิลลิลิตร

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ตารางผนวกที่ 1 แสดงปริมาณน้ำกากส่าในสัดส่วนที่แตกต่างกัน

สัดส่วนน้ำกากส่า (%)	น้ำตาลในน้ำกากส่า (%)	น้ำตาลจากน้ำอ้อยเข้มข้น (%)	ปริมาณน้ำอ้อยเข้มข้นที่ต้องการ (กรัม)	ปริมาณน้ำกลั่นที่ต้องการ (มิลลิลิตร)
10	0.25	17.75	30.92	59.08
20	0.50	17.50	30.49	49.51
30	0.75	17.25	30.05	39.95
40	1.00	17.00	29.62	30.38
50	1.25	16.75	29.18	20.82
60	1.50	16.50	28.75	11.25
70	1.75	16.25	28.31	1.69
80	2.00	16.00	27.87	-7.87
90	2.50	15.75	27.44	-17.44
100	2.75	15.50	27.00	-27.00

เนื่องจากสัดส่วนน้ำกากส่าที่ 80 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์ จากการคำนวณไม่สามารถเติมน้ำกลั่นลงในอาหารหมักได้ ดังนั้นจึงเตรียมได้เพียงสัดส่วนน้ำกากส่าที่10–70 เปอร์เซ็นต์

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวพจมาลย์ พิมพขันธ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	8 กันยายน 2526
สถานที่เกิด	อำเภอเมือง จังหวัดลพบุรี
ประวัติการศึกษา	1. จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายจาก โรงเรียนสิงห์สมุทร 2. จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วท.บ. (วิทยาศาสตร์สุขภาพ) จากมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	Bioethanol Production from Sugar Cane Syrup by Thermotolerant Yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 using Fed-batch and Repeated batch Fermentation in Non-sterile System. (In press) ในวิทยาสารเกษตรศาสตร์ สาขาวิทยาศาสตร์ ปีที่ 46 ฉบับที่ 4 พ.ศ. 2555

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์