บทคัดย่อ

จากการศึกษาลักษณะการทนอุณหภูมิของ M30 ต่อการหมักแอลกอฮอล์แบบ batch ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการพบว่า M30 สามารถหมักแอลกอฮอล์ที่ 35 °C ได้สูงถึง 8.91 %โดยปริมาตร ภายใน 36 ชั่วโมง และยังคงความสามารถในการตกตะกอนได้ดี (SE = 0.33) และเมื่อทำการหมักแบบ fed-batch พบว่าสามารถลดระยะเวลาการหมักลงเหลือ 24-36 ชั่วโมงต่อรุ่น โดยจำนวนครั้งของการเติมอาหาร (1 หรือ 2 หรือ 3 ครั้ง) ไม่มีผลต่อระยะเวลาการหมัก และค่า SE สูงกว่า 0.45 ในทุกการทดลอง

การหมักแอลกอฮอล์ในถังขนาดใหญ่ระดับกึ่งโรงงาน (ความจุ 100 ลิตร) โดย M30 ทั้งระบบ batch และ fed-batch ที่ 35°C ก็ได้ผลใกล้เคียงกับการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ คือการหมักแบบ batch ใช้เวลา 42 ชั่วโมงได้แอลกอฮอล์ 8.38 %โดยปริมาตร แต่เมื่อหมักแบบ fed-batch จะได้แอลกอฮอล์ 8.24 %โดยปริมาตร ภายใน 32 ชั่วโมง โดยที่ความสามารถในการตกตะกอนยังคงเดิมที่ค่า SE = 0.33

เมื่อนำข้อมูลที่ได้มาปรับใช้ในระบบ repeated fed-batch พบว่าการหมักในรอบแรกจะค่อนข้างช้า ใช้ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง และได้ปริมาณแอลกอฮอล์ค่อนข้างต่ำ (6.49% โดยปริมาตร) แต่ตั้งแต่รอบที่ 2 เป็นต้นไประยะเวลาการหมักจะลดลงมาเหลือ 24 ชั่วโมง และได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด (9.36 %โดยปริมาตร ใน repeat batch 1 แต่ค่อยๆลดลงมาจนถึง 7.13 %โดยปริมาตร ใน repeat batch 5) ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนเซลล์เริ่มต้นสูงขึ้น โดยที่ค่า OD เริ่มต้นในรอบแรกที่ 0.63 เพิ่มสูงเป็น 8.06, 11.51, 6.81, 9.61 และ 11.41 ในรอบต่อๆมาตามลำดับ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นสูงสุดของแอลกอฮอล์ที่ได้จะลดลงเป็นลำดับ ซึ่งน่าจะเป็นอิทธิพลร่วมของอุณหภูมิ แอลกอฮอล์ และการสะสมของสารพิษอื่นๆ จากการทดลองต่อมาด้วยเทคนิค double stage fed-batch fermentation ซึ่งทำ repeat batch หลังจากหมักไปได้ 12 ชั่วโมง โดยการปล่อยให้เซลล์ตกตะกอน 10 นาที แล้วแยกน้ำสาด้านบนออก ให้เหลือน้ำสาบริเวณก้นถัง 600 มล. จากนั้นเติมอาหารชุดใหม่ลงไป น้ำสาที่แยกออกมานำไปหมักต่ออีก 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ในรอบที่ทำ repeat batch ค่อนข้างคงที่อยู่ในระดับสูงกว่า 8 %โดยปริมาตร ภายใน 24 ชั่วโมงของการหมัก จึงสามารถสรุปได้ว่า M30 มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ในการหมักแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง โดยใช้เทคนิค repeated fed-batch ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ต่อรุ่นได้ภายใน 12 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็นประสิทธิภาพในการผลิตเท่ากับ 70.78 กรัม/ลิตร/สัปดาห์ เทียบกับโรงงานแอลกอฮอล์โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดาที่ทำได้อยู่เดิมเท่ากับ 7.9 กรัม/ลิตร/สัปดาห์

ทางด้านการผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ ใช้ถังหมักแบบ air-lift ในการศึกษานี้ได้พัฒนาต้นแบบถังหมักโดยใช้โหลแก้วทรงกระบอกขนาด 33 x 15 ซม. ความจุ 5 ลิตร ส่วน draught

tube ทำจากท่อพลาสติก PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. สูง 12 ซม. ด้านล่างสุดของท่ออยู่ห่างจากพื้นถัง 2.5 ซม. บริเวณก้นถังตรงมุมพอกเป็นแนวโค้ง เพื่อป้องกันการสะสมตะกอนเซลล์

ในการศึกษาเรื่องสภาวะที่เหมาะสมต่อระบบการหมักแบบ air-lift พบว่า ปริมาณอากาศที่เหมาะสม คือ 0.75 vvm ระดับความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วยน้ำตาล 4% ยูเรีย 0.1% และ KH_2PO_4 0.05% โดยใช้ pH เริ่มต้น 4.5 ซึ่งหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 36 ชั่วโมง จะได้เซลล์ยีสต์ 17.52 กรัม/ลิตร แต่ปริมาณโปรตีนต่ำมาก คือ 3.28 กรัม/ลิตร ซึ่งเมื่อคิดเป็นโปรตีนในเซลล์จะอยู่ที่ระดับเพียง 18.7 % แต่ในการทดลองเพิ่มปริมาณยูเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าไม่สามารถให้ได้มากกว่า 0.1% ซึ่งอาจจะเป็นผลมาจากความเป็นพิษของแอมโมเนียที่ได้มาจากการสลายตัวของยูเรีย จึงทำการเติมยูเรียเป็นระยะ (incremental feeding) ในอัตรา 0.3% แบ่งใส่ตามสัดส่วนและระยะเวลาที่ 12 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่ายังคงมีผลในเชิงลบต่อการเจริญของ M30 คือได้จำนวนเซลล์ลดลงจาก 17.99 กรัมต่อลิตรในชุดควบคุม เหลือเพียง 12.93 11.80 และ 13.39 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ปริมาณผลผลิตโปรตีนโดยรวมก็ลดลงด้วย จึงได้เปลี่ยนวิธีการเติมใหม่โดยลดปริมาณยูเรียที่เติมและเปรียบเทียบการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตแทนด้วย พบว่าเมื่อทำการเติมยูเรียในอัตรา 0.1% ในชั่วโมงที่ 12 และอีก 0.1% ในชั่วโมงที่ 24 จะสามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์ได้สูงขึ้นเป็น 45% แต่จากผลการใช้น้ำตาลเริ่มต้นเพียง 4% ทำให้ได้เซลล์เพียง 17.99 กรัม/ลิตร จึงได้ทดลองเพิ่มปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารอีกพบว่าการเพิ่มน้ำตาลตั้งแต่เริ่มต้นสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้เพียงเล็กน้อย แต่จะมีการสะสมของแอลกอฮอล์และน้ำตาลคงเหลือมากขึ้น ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนวิธีการให้น้ำตาลเป็นระยะที่อัตราและสัดส่วนต่างๆ พร้อมกับให้แหล่งไนโตรเจนด้วย พบว่าการให้น้ำตาลอีก 2 ครั้งๆละ 4% ในชั่วโมงที่ 12 และ 24 ร่วมกับการให้ยูเรียในอัตราครั้งละ 0.1% สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุดได้เป็น 25.86 กรัม/ลิตร แต่จะมีการสะสมของแอลกอฮอล์สูงถึง 20.6 กรัม/ลิตร ซึ่งแสดงว่าการเติมน้ำตาลยังไม่สัมพันธ์กับการเจริญ ดังนั้นจึงได้เปรียบเทียบรูปแบบการให้น้ำตาลใหม่ 3 แบบ คือ การเติมอัตราคงที่ (linear feeding) การเติมอัตราลอกาลิทึม (exponential feeding) และ การเติมตามอัตราการเจริญ (sigmoidal feeding) โดยเพิ่มจำนวนการเติมให้มากครั้งขึ้น (ทุก 2 ชั่วโมงหลังจากชั่วโมงที่ 14) ปรากฏว่า M30 มีอัตราการเจริญได้ใกล้เคียงกันทั้ง 3 แบบ โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุด 32.26 32.66 และ 33.91 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และได้ผลผลิตโปรตีน 16.22 16.05 และ 16.98 กรัม/ลิตรตามลำดับ ซึ่งเมื่อคำนวณเป็นปริมาณโปรตีนในเซลล์จะได้ 50.3 49.1 และ 50.1 % ตามลำดับ

ในการทดลองผลิตเซลล์ยีสต์ด้วยถังหมักระบบ air-lift ขนาดกึ่งโรงงาน ความจุ 100 ลิตร ใช้ถังหมักที่ประกอบจากถังพลาสติกใช้แล้ว นำมาดัดแปลงใส่ท่อ draught tube ที่ทำจาก fiber glass พบว่าสามารถผลิตเซลล์ยีสต์และปริมาณโปรตีนได้ใกล้เคียงกับที่ได้ในห้องปฏิบัติการภายในระยะเวลาการหมัก คือ 30.58 กรัม/ลิตร และในรุ่นที่ 2 ใช้เวลาเพียง 12 ชั่วโมงจะได้ปริมาณเซลล์สูงถึง 26.59 กรัม/ลิตร และปริมาณโปรตีน 13.83 กรัม/ลิตร

Abstract

Study on thermotolerant properties of *Saccharomyces cerevisiae* M30 for ethanol fermentation in 5-liter fermentor revealed that this strain could produce highest ethanol concentration at 8.91 %v/v at 35 °C after 36 hours and still showed good sedimentation efficiency at 0.33. Reduction of fermentation time to 24-36 hours could be obtained with fed-batch fermentation (1 to 3 times feeding) that yielded similar ethanol contents and SE values.

In pilot scale ethanol fermentation with 100-liter fermentor of both batch and fed-batch techniques at 35 °C the ethanol yields were comparable to those achieved in laboratory scale. Fed-batch fermentation reduced fermentation time from 42 hours to 32 hours with similar final ethanol content.

Repeated fed-batch fermentation in laboratory scale showed that the first batch was relatively slow in ethanol formation whereby 36 hours was needed to yield only 6.49% v/v. However, from second batch (repeat batch 1) onwards the fermentation times were reduced to 24 hours with final ethanol concentration from 9.36% v/v and gradually reduced to 7.13 %v/v in the last batch. The main cause of rapid fermentation was attributed to high initial cell content as can be seen from initial OD at 0.63 in the first batch and abruptly increased to 8.06, 11.51, 6.81, 9.61 และ 11.41 in the following batch. However, it should be noticed that the final ethanol concentration was lower in the succeeding batch which might be due to combine effect of high temperature and high ethanol content and accumulation of toxic substances from molasses. Therefore, double stage repeated fed-batch fermentation was introduced. In this system repeated batch was performed after 12 hours fermentation (where ethanol concentration was still low) where agitation was stopped for 10 minutes to allow sedimentation of yeast cells. The upper portion of fermentation broth (2,400 ml) was drawn out by suction leaving 600 ml concentrated broth in the fermentor. Fresh steriled molasses medium was added and the fermentation resumed. The previous fermented broth was collected in a glass jar and allowed to continue fermentation on a magnetic stirrer for 36 hours. With the technique, final ethanol yields in the repeated batch was considerably constant at 8 %v/v after 24 hours fermentation, however at only 12 hours fermentation time the ethanol concentration was nearly maximum and fermentation could be terminated.

In conclusion, *Saccharomyces cerevisiae* M30 is a potent strain for production of fuel alcohol under repeated fed-batch condition where fermentation time could be attained at 12 hours. Hence, the ethanol production efficiency could be achieved at 70.78 g/l/week as compared to 7.9 g/l/week normally obtained at the Chittarada Palace Alcohol Plant.

For fodder yeast production with air-lift fermentor, model vessel was fabricated from a cylindrical glass jar measured 33x15 cm with 5 liters total capacity. Draught tube was made from PVC pipe scale 9 cm in diameter by 12 cm long. The tube was position at 2.5 cm above the bottom of glass jar. Corner of the glass jar was filled with clay in the concave manner to prevent cell accumulation. Aeration rate of the fermentor was optimal at 0.75 vvm for molasses medium containing 4% sugars, 0.1% urea and 0.05% KH_2PO_4 with adjusted initial pH of 4.5. After 36 hours of fermentation, 17.52 g/l of yeast dry weight was obtained, however total protein was extremely low at 3.28 g/l which was equivalent to 18.7% protein content. Increasing of initial urea content in the medium higher than 0.1%seemed inappropriate due to toxicity of ammonium ion liberated from urea. Therefore, different urea supplement feeding regimes was carried out after fermentation for 12, 24 and 36 hours at the total urea addition of 0.3%. However, negative effects of urea remained where control (without additional urea) gave highest cell mass at 17.99 g/l and other treatments yielded only 12.93, 11.80 and 13.39 g/l. Modified feeding strategy was then developed (including ammonium sulfate as alternative nitrogen source). Results showed that addition of urea at 0.1% in 12 and 24 hours improved protein content of M30 to 45%. To improve final biomass initial sugar concentration was raised to 5.5%, but cell mass remained the same. In contrast higher the initial sugar contents higher the ethanol formations and residual sugar concentrations. Hence, addition of sugar was fed to the medium at 12 and 24 hours at the rate of 4% each together with 0.1% urea which could boost the final cell dry weight to 25.86 g/l. However, the ethanol concentration remained high at 20.6 g/l which clearly indicated that feeding time was not related to growth. Finally 3 feeding strategies, namely linear feeding, exponential feeding and sigmoidal feeding were developed where sugar was added at 2 hours interval (after 12 hours of fermentation) at predetermined amounts. Results showed that all feeding types gave similar biomass at 32.26, 32.66 and 33.91 g/l, respectively. In addition, total protein yields were also relatively high at 16.22, 16.05 and 16.98 g/l which were equivalent to 50.3, 49.1 and 50.1 %, respectively.

In pilot scale study of fodder yeast production by air-lift system, the fermentor was made of 100 liter recycled blue plastic container and draught tube was made from fiber glass. When fermentation conditions according to laboratory experiments were applied, biomass and protein yields were similar to those obtained at laboratory scale, i.e, 30.58 g/l and 15.29 g/l, respectively. Moreover, with repeated batch technique, the fermentation time could be reduced to 12 hours with cell yield at 26.59 g/l and total protein obtained at 13.83 g/l.