บทคัดย่อภาษาไทย

จาก *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ตกตะกอน 4 สายพันธุ์ คัดเลือกได้ *S. cerevisiae* M30 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการหมักเอธานอล ในอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง และตกตะกอนได้ดี โดย M30 หมักเอธานอลจากอาหารกากน้ำตาล ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 18% เมื่อหมักแบบ batch ที่ 35°ซ ได้สูงที่สุด 8.48 % โดยปริมาตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง เท่า ๆ กันกับ Sc90 ซึ่งให้เอธานอล 8.42% โดยปริมาตร ที่เวลาเดียวกัน โดย M30 มีอัตราการหมักเร็วกว่าเล็กน้อย ทั้ง M30 และ Sc90 หมักเอธานอลได้ที่ 37°ซ แต่ให้เอธานอลปริมาณลดลงเกือบครึ่งของการหมักที่ 35°ซ และทั้ง M30 และ Sc90 ไม่เจริญที่ 40°ซ การหมักอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง โดยการหมักแบบ batch ในฟลาสก์เขย่า แสดงว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน ไม่ได้ทำให้การหมักแตกต่างกัน การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารจาก 18 เป็น 20% โดยเพิ่มปริมาณกากน้ำตาล มีผลให้ M30 หมักเอธานอลได้สูงขึ้นเล็กน้อย ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 M30 หมักได้เร็วกว่าที่ pH 4.5 เล็กน้อย แต่เอธานอลสูงสุดที่หมักได้ไม่แตกต่างกัน ส่วนในอาหารที่มี pH 4.0 นั้น ทั้ง M30 และ Sc90 ไม่เจริญ การเติมโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นต่ำลงในอาหารนั้น M30 หมักเอธานอลได้ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเติมมากไปกลับทำให้การหมักเอธานอลลดลง

ทำการวิเคราะห์การตกตะกอนของ M30 เมื่อหมักเอธานอลจากอาหารกากน้ำตาล ในถังหมัก ที่อุณหภูมิสูง โดยการวัดทั้งในรูปของ sedimentation efficiency (S.E.) ความสูงของตะกอน รวมทั้งจำนวนและขนาดของตะกอน พบว่าเมื่อเชื้อมีอายุขึ้นมีการตกตะกอนเพิ่มขึ้น รวมทั้งการเพิ่มจำนวนและขนาดตะกอน จนช่วงท้ายของการหมัก 42-48 ชั่วโมง การตกตะกอนจึงลดลง เชื้อที่หมักเอธานอลที่ 30 33 35 และ 37°ซ นาน 48 ชั่วโมง มี S.E. เท่ากับ 0.35, 0.39, 0.33 และ 3.5 ตามลำดับ โดยเมื่อหมักที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 ชั่วโมง เซลล์ตกตะกอนได้ดีว่าที่เวลาอื่น (S.E. 0.59) การตกตะกอนเมื่อหมักเอธานอลในอาหารกากน้ำตาล 80 ลิตร ในถังหมัก 100 ลิตร ที่ 35°ซ แสดงว่าการตกตะกอน ในรูปของค่า S.E. นั้นสูงสุด (0.72) เมื่อเชื้อมีอายุ 42 ชั่วโมง สำหรับการวัดในรูปของความสูงของตะกอนนั้น เมื่อหมักเอธานอลนาน 30 ชั่วโมง วัดความสูงของตะกอนได้สูงสุด และความสูงของตะกอนค่อนข้างคงที่ ในระหว่างที่เชื้อมีอายุ 30-42 ชั่วโมง แต่ที่ 48 ชั่วโมง การตกตะกอนของเซลล์ลดลง สำหรับขนาดของตะกอนนั้น พบว่าเมื่ออายุของเชื้อเพิ่มขึ้น ขนาดของตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้น และเมื่อเชื้ออายุ 30 ชั่วโมง ตะกอนมีขนาดใหญ่สุด จากนั้นขนาดลดลงเล็กน้อย แต่คงที่ที่ 36-48 ชั่วโมง และในระหว่างการหมักในถังหมัก 5 ลิตร ที่ 33 และ 35°ซ ในช่วง 0-42 ชั่วโมงนั้น พบเซลล์ในถังหมักเป็นเซลล์ที่มีชีวิตสูง

กว่า 92% ของเซลล์ทั้งหมด แต่เมื่อหมักในถังหมักขนาด 100 ลิตร เฉพาะ 24 ชั่วโมงแรกเท่านั้น ที่พบเซลล์มีชีวิตสูงกว่า 92% ของเซลล์ทั้งหมด และเมื่อหมักนาน 30 ชั่วโมง เซลล์มีชีวิตลดลงเป็น 86.9% แต่ไม่ลดลงอีกจนหมักครบ 48 ชั่วโมง

นอกจากนั้นยังพบว่าเชื้อจากถังหมักอายุ 30 ชั่วโมง สามารถนำกลับไปหมักเอธานอลใหม่ ได้ดีกว่าเชื้ออายุ 24 และ 36 ชั่วโมง และในการหมักเอธานอลของ M30 ร่วมกับ Sc90 ไม่มีผลต่ออัตราการหมักและความเข้มข้นของเอธานอลที่ได้ แต่ทำให้การตกตะกอนลดต่ำลงมาก การตรวจจำนวนรอยแผลจากการแตกหน่อ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน แสดงว่าเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้น พบมีรอยแผลจากการแตกหน่อมากขึ้น และการเติมเอธานอล 5% โดยน้ำหนัก ลงในอาหารกากน้ำตาล และตรวจการเจริญในสภาวะการหมักเอธานอล มีผลให้การเจริญของ M30 ลดลงกว่าครึ่ง และเอธานอล 8% โดยน้ำหนัก ยับยั้งการเจริญ M30 ได้อย่างสมบูรณ์ โดยเอธานอลที่เติมลงในอาหารสำหรับหมัก มีผลต่อการเจริญในสภาวะการหมัก มากกว่าสภาวะการเจริญ

จากการคัดเลือก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีการเจริญและให้โปรตีนสูง เมื่อเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง (37°ซ) ได้ RL-6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ตกตะกอน AM12 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตกตะกอน และ M30 ที่มีความสามารถในการตกตะกอนสูงกว่าสายพันธุ์อื่น สำหรับการผลิตเซลล์ เมื่อเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาล ในฟลาสก์แบบเขย่าแรง ที่อุณหภูมิสูง พบยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ (RL-6, AM12 และ M30) เจริญเมื่อใช้ยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน ดีกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเมื่อใช้ยูเรีย 0.1% ทั้งสามสายพันธุ์เจริญดีที่สุด และ M30 และ AM12 มีโปรตีนทั้งหมด (total protein) สูงด้วย การปรับน้ำตาลของอาหารกากน้ำตาลให้เท่ากับ 4% ทั้ง 3 สายพันธุ์ให้เซลล์ความเข้มข้นสูงสุด รวมทั้งให้โปรตีนทั้งหมด และโปรตีนในเซลล์สูงสุดด้วย โดยที่ pH ของอาหารเท่ากับ 4.5 ทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้เซลล์สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH 4.0 และ 5.23 ประมาณ 1.5-2.6 เท่า ในขณะที่ให้โปรตีนทั้งหมดสูงกว่าประมาณ 1.9-3.5 เท่า อุณหภูมิที่มีผลให้ RL-6 มีการเจริญและโปรตีนทั้งหมดสูง คือ 33°ซ ส่วน AM12 การบ่มที่ 33 และ 35°ซ ให้เซลล์เท่ากัน แต่เมื่อเลี้ยงที่ 33°ซ มีโปรตีนทั้งหมดสูงกว่าที่ 35°ซ เล็กน้อย และสำหรับ M30 ผลิตเซลล์และให้โปรตีนทั้งหมดสูงสุด ที่ 30-33°ซ ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อการผลิตเซลล์และโปรตีนในเซลล์ โดย RL-6, AM12 และ M30 เมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นวัดเป็น OD_{660} เท่ากับ 1.5, 2 และ 1.5-2 ให้เซลล์และโปรตีนในเซลล์สูงสุด จากผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมแสดงว่า M30 ให้เซลล์ความเข้มข้นสูงเท่า ๆ กับ AM12 และต่ำกว่า RL-6 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ M30 ให้โปรตีนทั้งหมดสูงกว่า และยังตกตะกอนได้ดีกว่า AM12

การตกตะกอนของ M30 เมื่อหมักแบบให้อากาศ ในอาหารกากน้ำตาล โดยใช้ถังหมักแบบ air-lift ที่โครงการย่อยที่ 2 พัฒนาขึ้น ที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ พบว่า M30 มีการตก

ตะกอนสูงมาก (S.E.= 0.74) เมื่อสิ้นสุดการหมักแบบให้อากาศ (48 ชั่วโมง) แต่เมื่อวัดการตกตะกอนในรูปความสูงของตะกอนเมื่อตั้งไว้ กลับพบว่าเมื่อเชื้ออายุ 36 ชั่วโมง ตกตะกอนได้ดีกว่าเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง ประมาณ 2.5 เท่า และสำหรับจำนวนและขนาดของตะกอนเซลล์นั้น เพิ่มขึ้นเมื่อเชื้ออายุมากขึ้น โดยพบมากเมื่อเชื้อมีอายุตั้งแต่ 36 ชั่วโมง ในระหว่างการหมักแบบให้อากาศช่วง 0-36 ชั่วโมง เซลล์ทั้งหมดในอาหารเป็นเซลล์ที่มีชีวิต โดยเซลล์เพิ่มจาก 5.50×10^6 เซลล์/มล. เป็น 4.50×10^8 เซลล์/มล. และที่ 48 ชั่วโมง เซลล์มีชีวิตลดลงเหลือ 97.6%

การผลิตเซลล์ที่มีโปรตีนในเซลล์สูง เมื่อเลี้ยง M30 ร่วมกับ *Candida utilis* IFRPD6014 โดยการหมักแบบให้อากาศ ในอาหารกากน้ำตาล ในถังหมักแบบ air-lift ที่ไม่ปรับอุณหภูมิ แสดงว่าการใช้ M30 มีการผลิตเซลล์ในอัตราที่เร็วกว่าในช่วง 30 ชั่วโมงแรกของการหมักแบบให้อากาศ แต่เมื่อครบ 36 ชั่วโมง เซลล์ที่ผลิตได้มีความเข้มข้นเท่า ๆ กัน โดยการใช้ M30 ให้เซลล์ 18.10 กรัม/ลิตร เมื่อใช้ M30 ร่วมกับ *C. utilis* ให้เซลล์ 17.03 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้ *C. utilis* ให้เซลล์ 16.73 กรัม/ลิตร สำหรับโปรตีนทั้งหมด และโปรตีนในเซลล์ เมื่อเลี้ยง M30 นั้นสูงกว่า เมื่อใช้ M30 ร่วมกับ *C. utilis* หรือเมื่อใช้ *C. utilis* มาก และเมื่อใช้ M30 เซลล์มีการตกตะกอนสูงมาก แต่เมื่อใช้ M30 กับ *C. utilis* กลับไม่พบการตกตะกอน เช่นเดียวกับเมื่อใช้ *C. utilis*

เนื่องจากเซลล์ M30 ที่ได้จากการหมักแบบให้อากาศ ในอาหารกากน้ำตาล โดยใช้ถังหมักแบบ air-lift ซึ่งไม่ปรับอุณหภูมิ ตกตะกอนได้ดีมาก ดังนั้นการทดลองใช้สารอนินทรีย์ 4 ชนิด (aluminum sulfate, ferric chloride, ferrous sulfate และ potassium sulfate) เติมลงไปในเมื่อสิ้นสุดการหมัก จึงไม่ทำให้มีการตกตะกอนเพิ่มขึ้น

จากการคัดเลือก *S. cerevisiae* สำหรับผลิตยีสต์โปรตีน เมื่อใช้อาหารน้ำกากสา ได้ M30 ซึ่งมีการเจริญและตกตะกอนได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีโปรตีนทั้งหมดสูง ในการทดลองพบว่ายีสต์ใช้น้ำตาลไปเพียง 0.7-0.8% ซึ่งเท่ากับปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำกากสา ดังนั้นในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเซลล์ของ M30 ในอาหารน้ำกากสา จึงไม่ได้ปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น และทำการหมัก ในฟลาสก์แบบเขย่าแรง ที่อุณหภูมิสูง (37°ซ) พบว่า M30 มีการเจริญในอาหารน้ำกากสา ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน ไม่แตกต่างกันนัก ในอาหารน้ำกากสาที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 M30 มีการเจริญและโปรตีนทั้งหมดสูงกว่า การเลี้ยงในอาหารที่ปรับ pH เท่ากับ 4.5 และ 5 โดย M30 มีการเจริญและโปรตีนทั้งหมดสูงสุด เมื่อบ่มที่ 37 °ซ ในการศึกษาขนาดตะกอนของยีสต์ M30 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง ในอาหารน้ำกากสา แสดงว่าเมื่อเชื้ออายุ 24 ชั่วโมง ยีสต์ M30 สร้างตะกอนเซลล์ขนาดใหญ่ที่สุด ส่วนการเลี้ยง M30 ร่วมกับ *C. utilis* IFRPD6014 นั้น ทำให้มีมีการผลิตเซลล์เร็วกว่า และมากกว่า การใช้เฉพาะ M30 แต่มีการตกตะกอนลดลง

Abstract

Saccharomyces cerevisiae M30 was selected base on high efficiency of ethanol fermentation from molasses at high temperature. In batch fermentation using molasses mash contains 18% glucose equivalent sugar concentration at 35°C M30 could produce the same amounts of ethanol at the same fermentation rate as *S. cerevisiae* Sc90, a non-flocculent industrial ethanol fermenting strain. In shaking flask cultivation M30 produced 8.48 %v/v at 30 h of cultivation while Sc90 produced 8.42 %v/v. M30 and Sc90 could ferment ethanol at higher temperature, 37°C, however, the amount of ethanol obtained was about a half of ethanol obtained at 35°C. Both strains could not grow at 40°C. Ammonium sulfate and urea added as nitrogen source did not show any differences in ethanol fermentation by M30. Increasing of initial sugar concentration from 18 to 20% resulted in slightly increasing of ethanol concentration. M30 fermented ethanol in molasses mash that initial pH was 5.0 slightly faster than at pH 4.5 while at pH 4.0 both M30 and Sc90 could not grow at high temperature. Addition of low concentration of potassium hydrogen phosphate did not enhance ethanol fermentation of M30 but addition at high concentration resulted in inhibitory effect.

Flocculation of M30 during ethanol fermentation in 3 l of molasses mash in 5l fermentor was analyzed as sedimentation efficiency (S.E.), height of cell sediment after standing including number and size of floc cells. The result revealed that longer fermentation time resulted in increasing of flocculation of cells, however at 42-48 h flocculation decrease. At 48 h of ethanol fermentation at 30, 33, 35 and 37°C the sedimentation efficiency (S.E.) of cells of M30 were 0.35, 0.39, 0.33 and 3.5, respectively. Time-course of flocculation during ethanol fermentation at 35°C in 3 l fermentor indicated that the highest S.E. (0.59) was obtained at 30 h. During ethanol fermentation at 35°C but in 100 l fermentor with 80l of molasses mash cells of M30 showed the highest flocculation (S.E. 0.72) at 42 h. The flocculation analyzed as height of cell sediment was the highest at 30 h and did not change during 30-42 h but decreased at 48 h. Floc size was also largest at 30 h while at 36 h the size was slightly reduced and remained constant during 36-48 h. During 0-42 h of ethanol fermentation

of M30 in molasses mash in 5 l fermentor at 33 and 35°C as high as 92% was viable cell. In 100 l fermentor at 35°C only in the first 24 h of fermentation that 92% of the total cell was the viable cell. At 30 h the viable cell was reduced to 86.9% and remained constant until the end of fermentation at 48 h.

Cells at 30 h of fermentation showed better fermenting ability when used as inoculum for the next batch of fermentation than cells at 24 and 36 h. Ethanol fermentation by co-cultures of M30 and Sc90 did not showed any improvement of ethanol production. In contrast, the co-cultures reduced flocculation. Observation of bud scar by scanning electron microscope indicated that the number of bud scar increase with increasing in age of cells. Addition of 5% by weight of ethanol reduced growth of M30 to about half in ethanol fermenting condition and 8% by weight of ethanol inhibited growth completely.

Selection of *S. cerevisiae* for fodder yeast production in molasses mash at high temperature (37°C) obtained RL-6 (non flocculent strain), AM12 and M30 (flocculent strains). Production of cell mass in molasses medium using high speed shaking flask cultivation at high temperature of the 3 strains showed that urea was a better nitrogen source than ammonium sulfate. At 0.1% urea all 3 strains revealed the best growth while M30 and AM12 also gave high total protein. When glucose equivalent sugar concentration in molasses mash was adjusted to 4%, all 3 strains produced the highest cell mass with high total protein and protein content. Optimal initial pH for cell mass and total protein production of the molasses mash was 4.5. At pH 4.5 all 3 strains showed 1.5-2.6 times higher in cell mass production than at pH 4.0 and 5.23 (without pH controll) and 1.9-3.5 times higher in total protein. Cell mass and total protein production by RL-6 was the highest at 33°C. AM12 provided the high cell mass at 33 and 35°C with higher total protein at 33 °C than at 35°C. The highest cell mass and total protein production of M30 was obtained at 30-33°C. Initial cell concentration contributed to cell mass and total protein production, initial cell concentration as OD_{660} at 1.5, 2 and 1.5-2 were the optimal cell concentration for RL-6, AM12 and M30, respectively. The resulted of optimization for cell mass and total protein production indicated that though M30 provided the same amounts of cell mash as AM12 and slightly lower than RL-6 but its

total protein was the highest. Moreover, M30 showed stronger flocculation than AM12. Therefore M30 was selected as the best strains for fodder yeast production.

Flocculation of M30 cultivated in molasses mash by air-lift fermentor without temperature control was analyzed. The result showed that at the end of aerobic fermentation (48 h) flocculation of M30 was high (S.E.= 0.74). But by measurement of the height of cell sediment the flocculation at 36 was 2.5 time higher than at 48h. The number and size of floc cells were increased at longer cultivation time and at 36 h the highest number and biggest size were obtained. During 0-36 h of aerobic fermentation of M30 almost all cells in the fermenting mash were viable cells and the number of cells increased from 5.50×10^6 to 4.50×10^8 cells/ml after 48 h where 97.6% of cells were viable.

Production of cell mass with high protein content in molasses mash using air-lift fermentor by co-cultivation of M30 and *C. utilis* IFRPD6014 showed that the co-cultures and axenic culture of M30 and *C. utilis* produced almost the same amount of cell mass, 17.03, 18.10 and 16.73 g/l, respectively. Besides, co-cultivation of M30 and *C. utilis* caused non-flocculation of M30.

Cells of M30 showed very strong flocculation at the end of aerobic fermentation in molasses mash using air-lift fermentor therefore addition of some inorganic compounds (aluminum sulfate, ferric chloride, ferrous sulfate และ potassium sulfate) did not enhance the flocculation.

For the production of fodder yeast from slop waste mash *S. cerevisiae* M30 was also selected based on good growth and high protein production. The result revealed that yeast used only 0.7-0.8% of glucose equivalent sugar concentration which was the same as the concentration in the slop waste. Therefore, no addition of sugar was made in the other experiments. Optimization for cell mass and protein production of M30 in slop waste mash by shaking flask cultivation at 37°C revealed that there was not much different when ammonium sulfate or urea was added as nitrogen source, the optimal pH was 4 while optimal temperature was 37°C. Flocculation analysis of cells during strong shaking flask cultivation at optimal conditions indicated the biggest floc cell sized at 24 h. Co-cultivation of M30 and *C. utilis* IFRPD6014 in slop waste revealed faster rate and higher cell mass production than using M30 alone.