



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การปรับปรุงการผลิตแอลกอฮอล์ของ
โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา

โครงการย่อยที่ 1 ยีสต์ตะกอนสำหรับการผลิตเอทานอลและ
ยีสต์อาหารสัตว์

โดย รองศาสตราจารย์ สาวิตรี ลิ้มทอง และคณะ

สิงหาคม 2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การปรับปรุงการผลิตแอลกอฮอล์ของ
โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา

โครงการย่อยที่ 1 ยีสต์ตะกอนสำหรับการผลิตเอทานอลและยีสต์อาหารสัตว์

คณะผู้วิจัย

1. รศ. ดร.สาวิตรี ลิ้มทอง
2. ดร.นันทนา สีสุข

สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

เรื่อง	หน้าที่
บทสรุปของผู้บริหาร	1
บทคัดย่อภาษาไทย	5
Abstract	8
เหตุผลและความสำคัญของโครงการ	11
รายงานผลงานที่มีผู้ทำมาแล้ว (Literature Review)	12
รายงานผลการวิจัย	27
1. ยีสต์ตะกอนสำหรับการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล	27
2. ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์	84
2.1 ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ เมื่อใช้ กากน้ำตาลเป็นสับสเตรท	86
2.2 ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ เมื่อใช้ น้ำกากส่าเป็นสับสเตรท	131
สรุปผลการทดลอง	152
เอกสารอ้างอิง	160
ภาคผนวก	167

บทสรุปของผู้บริหาร

สำหรับการผลิตเอธิลแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล คัดเลือกได้สายพันธุ์ตกตะกอนที่มีประสิทธิภาพการหมักสูง คือ *Saccharomyces cerevisiae* M30 โดยมีประสิทธิภาพในการหมักเท่าเทียมกับ *S. cerevisiae* Sc90 ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ในประเทศไทย และมีข้อเด่นกว่า คือสามารถตกตะกอนได้ ซึ่งจะช่วยในการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ที่จะมีผลทำให้ค่าใช้จ่ายสำหรับพลังงานในการกลั่นต่ำกว่าการกลั่นพร้อมเซลล์ยีสต์ นอกจากนี้ยีสต์ที่ได้ยังสามารถนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ เป็นการใช้ของเหลือใช้อย่างมีคุณค่า โดยเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอธิลแอลกอฮอล์ เมื่อทดลองหมักในกากน้ำตาล ในฟลาสก์ โดยการเขย่าเบา ๆ เพื่อให้เชื่อมผลกับอาหารทั่วถึง ที่อุณหภูมิสูง (37 องศาเซลเซียส) ของ M30 พบว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน มีผลอย่างเดียวกันต่อการหมักเนื่องจากแอมโมเนียมซัลเฟตมีราคาสูงกว่ายูเรียเกือบสิบเท่า ดังนั้นหากใช้ยูเรียในการหมัก จะมีผลให้ต้นทุนการผลิตลดลง M30 หมักได้ดีเมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้น 18 และ 20% โดยเอธิลแอลกอฮอล์ที่หมักเมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้น 20% สูงขึ้นเพียงเล็กน้อย สำหรับการหมักที่อุณหภูมิสูงนั้น M30 หมักได้ดีที่สุดที่ 33-35 องศาเซลเซียส พีเอชของเริ่มต้นสำหรับการหมักที่เหมาะสม คือ 4.5-5.0 แต่การเติมฟอสเฟตไม่ได้ช่วยให้การหมักเพิ่มขึ้น แสดงว่ากากน้ำตาลความเข้มข้นที่ใช้เตรียมอาหารนั้น มีฟอสฟอรัสเพียงพอสำหรับการเจริญ และการหมักของยีสต์อยู่แล้ว โดยในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักที่อุณหภูมิสูงนั้นได้ศึกษาพร้อมกับ Sc90 และให้ผลไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงว่า M30 มีประสิทธิภาพดีเท่ากับ Sc90

การตกตะกอนของ M30 เมื่อหมักกากน้ำตาลในถังหมัก ทั้งโดยการวัดในรูปของ sedimentation efficiency (S.E.) ความสูงของตะกอน รวมทั้งจำนวนและขนาดของตะกอน แสดงว่าการตกตะกอนในรูปของ S.E. เมื่อหมักนาน 48 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันไม่ว่าจะหมักที่อุณหภูมิสูงหรือต่ำ (30-37 องศาเซลเซียส) โดยเมื่อหมักที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 ชั่วโมง เซลล์ตกตะกอนได้ดีกว่าที่เวลาอื่น เช่นเดียวกับเมื่อวัดในรูปความสูงของตะกอน โดยความสูงของตะกอนนั้นพบว่าย่อย ๆ เพิ่มขึ้นเมื่อหมักนานขึ้น แต่ช่วงท้ายของการหมักอาจมีความสูงของตะกอนคงเดิมหรือลดลงเล็กน้อย และสำหรับขนาดของตะกอนนั้น เมื่อเพิ่มเวลาของการหมักตะกอนจะมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยขนาดไม่ลดลงตลอดการหมัก นอกจากนี้ยังพบในระหว่างการหมักในถังหมักขนาดเล็ก (5 ลิตร) ที่อุณหภูมิสูงนั้น เซลล์ในระหว่างการหมัก 42 ชั่วโมงแรกเป็นเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่า 92% ของเซลล์ทั้งหมด ในขณะที่เชื้อที่กำลังหมักในถังหมักใหญ่ (100 ลิตร) ที่อุณหภูมิเดียวกัน ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกเท่านั้น ที่พบเซลล์มีชีวิตมากกว่า 92% ของเซลล์ทั้งหมด จนที่ 30 ชั่วโมง มีเซลล์มีชีวิต 86.9% ของเซลล์ทั้งหมด แต่จะไม่ลดลงอีกหลังจากนั้น ดังนั้นการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่สามารถทำได้หลายเวลา แต่เมื่อลองนำเซลล์

จากการหมักอายุต่าง ๆ กัน ไปใช้สำหรับการหมักใหม่พบว่าเซลล์อายุ 30 ชั่วโมง หมักได้ดีกว่า เซลล์อายุ 24 หรือ 36 ชั่วโมง ส่วนการศึกษารอยแผลจากการแตกหน่อ (bud scar) นั้น แสดงว่ายิ่งเซลล์มีอายุมากขึ้น พบรอยแผลจากการแตกหน่อมากขึ้น นอกจากนั้นยังพบว่าการหมักโดยใช้ M30 ร่วมกับ Sc90 ไม่เพียงแต่ไม่ช่วยให้การหมักเอธิลแอลกอฮอล์ดีขึ้น แต่ยังทำให้การตกตะกอนของเซลล์ในถังหมักลดลง

คัดเลือกสายพันธุ์สำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์จากกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง ได้ 3 สายพันธุ์ คือ *S. cerevisiae* M30 และ AM12 ซึ่งเป็นยีสต์ตะกอน และ RL-6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไม่ตกตะกอน จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ที่มีโปรตีนภายในเซลล์สูง ในกากน้ำตาล ในฟลาสก์แบบเขย่าแรง ที่อุณหภูมิสูง (37 องศาเซลเซียส) พบว่าเมื่อใช้ยูเรีย 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ทั้งสามสายพันธุ์เจริญดีที่สุด โดยในกรณีของ M30 และ AM12 นั้น ยูเรีย 0.1% มีผลให้มีโปรตีนทั้งหมด (total protein) สูงด้วย แต่เมื่อพิจารณาโปรตีนในเซลล์ (protein content) ที่รายงานเป็นกรัมโปรตีน/100 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้ง หรือเปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง พบว่าการที่ยูเรีย 0.1% ส่งเสริมการเจริญ ทำให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง แต่กลับมีผลให้โปรตีนในเซลล์มีค่าลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณไม่เพียงพอ เมื่อเซลล์ใช้ส่วนหนึ่งเพื่อการเจริญ จึงเหลือไม่มากพอที่จะทำใช้สำหรับการสังเคราะห์และสะสมโปรตีนปริมาณสูงด้วย ดังนั้นจึงควรมีการเพิ่มปริมาณแหล่งไนโตรเจนให้พอเพียงต่อการเจริญและการสะสมโปรตีน ซึ่งได้ดำเนินการในโครงการย่อยที่ 2 จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหาร ที่ได้จากการปรับปริมาณกากน้ำตาล พบว่าการใช้น้ำตาลรีดิวซ์ 4% มีผลให้ได้เซลล์ โปรตีนทั้งหมด และโปรตีนในเซลล์สูงสุด ในทั้ง 3 สายพันธุ์ สำหรับ pH เริ่มต้นของอาหารกากน้ำตาล นั้น พบว่าเมื่อปรับ pH ของอาหารให้เท่ากับ 4.5 ทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้เซลล์สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH 4.0 และ 5.23 มาก อุณหภูมิที่ทำให้ RL-6 มีการผลิตเซลล์ และโปรตีนทั้งหมดสูง คือ 33 องศาเซลเซียส ส่วน AM12 ที่ 33 และ 35 องศาเซลเซียส ให้เซลล์เท่ากัน แต่โปรตีนทั้งหมดเมื่อหมักที่ 33 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่ 35 องศาเซลเซียส เล็กน้อย และสำหรับ M30 ผลิตเซลล์และให้โปรตีนทั้งหมดสูงสุดที่ 30-33 องศาเซลเซียส ปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อการผลิตเซลล์ และโปรตีนในเซลล์ โดยเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมวัดเป็น OD₆₆₀ ควรอยู่ในช่วง 1.5-2.0 ผลการทดลองทั้งหมดแสดงว่า M30 ให้เซลล์ได้เท่า ๆ กับ AM12 และต่ำกว่า RL-6 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่ให้โปรตีนทั้งหมดสูงกว่าอีก 2 สายพันธุ์พอสมควร แสดงว่ามีโปรตีนในเซลล์สูงกว่า และยังคงตะกอนได้ดีกว่า AM12 ส่วน RL-6 ไม่ตกตะกอน ดังนั้นในโครงการย่อยที่ 2 จึงนำเฉพาะ M30 ไปศึกษาการผลิตเซลล์ที่มีโปรตีนสูงสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยการหมักในอาหารกากน้ำตาล ในถังหมักแบบ airlift เนื่องจากโครงการย่อยที่ 2 ได้พัฒนาดังหมักแบบ air-lift โดยใช้วัสดุและอุปกรณ์ ที่หาได้ง่ายและมีราคาถูก แต่ไม่มีระบบการควบคุมอุณหภูมิที่มีราคาแพง ดังนั้นในการ

ศึกษาการตกตะกอนของ M30 โดยใช้ถังหมักแบบ air-lift ที่พัฒนาขึ้น จึงทำในสภาพที่ไม่มี การควบคุมอุณหภูมิ สำหรับการตกตะกอน ในรูปของ S.E. พบว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักแบบให้อากาศ ที่ 48 ชั่วโมง มีการตกตะกอนสูงมาก และสูงกว่าที่เวลาอื่น ๆ แต่เมื่อวัดการตกตะกอนในรูป ความสูงของตะกอนหลังจากวางไว้ กลับพบว่าเชื้ออายุ 36 ชั่วโมง ตกตะกอนได้ดีกว่าอายุ 48 ชั่วโมง ส่วนจำนวนและขนาดของตะกอนเซลล์นั้นเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้ออายุมากขึ้น และค่อนข้างคงที่ หลังจาก 36 ชั่วโมง นอกจากนั้นในการหมักแบบให้อากาศ เซลล์เพิ่มจาก 5.50×10^6 เซลล์/มล. เป็น 4.50×10^8 เซลล์/มล. โดยในช่วง 0-36 ชั่วโมง ทั้งหมดเป็นเซลล์ที่มีชีวิต นอกจากนั้นเนื่องจากในกากน้ำตาลมีน้ำตาลชนิดคาร์บอนห้าตัว และสารประกอบอื่นที่ *S. cerevisiae* ใช้ไม่ได้ ซึ่งมีผลให้ของเหลือทิ้งจากการผลิตเซลล์ มีสารประกอบเหล่านั้นเหลืออยู่ อาจยากต่อการกำจัด ดังนั้นจึงได้นำยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลชนิดคาร์บอนห้าตัว มีโปรตีนในเซลล์สูง และสามารถใช้เป็น อาหารสัตว์มาเลี้ยงร่วมด้วย เพื่อลดปริมาณสารประกอบเหล่านั้น และยังได้เซลล์เพิ่มขึ้นไปพร้อม ๆ กัน พบว่า เมื่อเลี้ยง M30 เดี่ยว ๆ นั้นโปรตีนทั้งหมด และโปรตีนในเซลล์ สูงกว่า เมื่อใช้ M30 กับ *C. utilis* IFRPD6014 และเมื่อใช้ *C. utilis* IFRPD6014 เดี่ยว ๆ อย่างชัดเจน ผลที่ได้แสดงว่า *C. utilis* IFRPD6014 ที่เลี้ยงร่วมกันกับ M30 ไม่ได้ทำให้เซลล์ และโปรตีนทั้งหมดเพิ่มขึ้น แต่ กลับทำให้ลดลง เพื่อเทียบกับการใช้ M0 เดี่ยว ๆ นอกจากนั้นยังทำให้ M30 สูญเสียการตก ตะกอน

สำหรับการใช้สารอนินทรีย์สำหรับช่วยการตกตะกอนเซลล์ของ M30 นั้น เนื่องจาก M30 ตกตะกอนได้ดีมากในสภาวะที่ใช้ผลิตเซลล์อยู่แล้ว จึงทำให้การเติมสารอนินทรีย์บางชนิด (aluminum sulfate, ferric chloride, ferrous sulfate และ potassium sulfate) ลงไปจึงไม่ได้ช่วย ให้มีการตกตะกอนเพิ่มขึ้น

ส่วนสายพันธุ์สำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์จากน้ำกากสำนั้น คัดเลือกได้ *S. cerevisiae* M30 เช่นกัน เนื่องจากนอกจากเจริญและตกตะกอนได้ดีที่สุดแล้ว ยังให้โปรตีนทั้งหมดสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ในการศึกษาพบว่ายีสต์ใช้น้ำตาลไปเพียง 0.7-0.8% ซึ่งเท่ากับน้ำตาล ที่มีอยู่ในน้ำกากสำที่นำมาใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่แล้ว ดังนั้นในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเซลล์ยีสต์ M30 ในอาหารน้ำกากสำ โดยทดลองหมักในฟลาสก์ แบบ เขย่าแรง ที่อุณหภูมิสูง จึงไม่ได้ปรับเพิ่มปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น M30 เจริญในอาหารที่มี แอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ได้ไม่แตกต่างกัน แต่เนื่องจากยูเรียมีราคาถูกกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตมาก ดังนั้นจึงเลือกใช้ยูเรีย 0.03% เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่การใช้ ยูเรียความเข้มข้นสูงกว่านี้ กลับทำให้เซลล์และโปรตีนทั้งหมดลดลง ซึ่งน่าจะเป็นเพราะความ ไม่สมดุลระหว่างแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหาร สำหรับ pH เริ่มต้นของอาหารน้ำกาก สำนั้นที่ pH 4 M30 มีการผลิตเซลล์ และโปรตีนทั้งหมดสูงกว่า ที่ pH 4.5 และ 5 นอกจากนั้น M30 มีการผลิตเซลล์สูงสุดเมื่อป้อนที่ 37 องศาเซลเซียส จากการศึกษาขนาดตะกอนของ M30

เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำกากส่า ที่มียูเรีย 0.03% และ pH 4 ที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 24 ชั่วโมง M30 ให้เซลล์สูงสุด และมีตะกอนขนาดใหญ่สุด นอกจากนั้นเมื่อเลี้ยง M30 ร่วมกับ *C. utilis* IFRPD6014 มีการผลิตเซลล์ได้เร็วกว่าและสูงกว่าการใช้ M30 เดี่ยว ๆ ซึ่งแสดงว่าในน้ำกากส่ามีแหล่งคาร์บอนที่ *C. utilis* ใช้ได้ แต่ *S. cerevisiae* ใช้ไม่ได้ ทำให้มีการผลิตเซลล์เพิ่มขึ้น แต่การใช้สองเชื้อร่วมกันมีผลให้การตกตะกอนลดลง

บทคัดย่อภาษาไทย

จาก *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ตกตะกอน 4 สายพันธุ์ คัดเลือกได้ *S. cerevisiae* M30 ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดสำหรับการหมักเอธานอล ในอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง และตกตะกอนได้ดี โดย M30 หมักเอธานอลจากอาหารกากน้ำตาล ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 18% เมื่อหมักแบบ batch ที่ 35°C 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°C แต่ให้เอธานอลปริมาณลดลงเกือบครึ่งของการหมักที่ 35°C และทั้ง M30 และ Sc90 ไม่เจริญที่ 40°C การหมักอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง โดยการหมักแบบ batch ในพลาสติกซีล แสดงว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรีย 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°C นาน 48 ชั่วโมง มี S.E. เท่ากับ 0.35, 0.39, 0.33 และ 3.5 ตามลำดับ โดยเมื่อหมักที่ 35 องศาเซลเซียส นาน 30 ชั่วโมง เซลล์ตกตะกอนได้ดีกว่าที่เวลาอื่น (S.E. 0.59) การตกตะกอนเมื่อหมักเอธานอลในอาหารกากน้ำตาล 80 ลิตร ในถังหมัก 100 ลิตร ที่ 35°C 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°C 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 โดยให้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 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°C) 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°C ส่วน AM12 การบ่มที่ 33 และ 35°C ให้เซลล์เท่ากัน แต่เมื่อเลี้ยงที่ 33°C มีโปรตีนทั้งหมดสูงกว่าที่ 35°C เล็กน้อย และสำหรับ M30 ผลิตเซลล์และให้โปรตีนทั้งหมดสูงสุด ที่ 30-33°C ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อการผลิตเซลล์และโปรตีนในเซลล์ โดย RL-6, AM12 และ M30 เมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นวัดเป็น OD₆₆₀ 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) เติมน้ำตาลลงไปเมื่อสิ้นสุดการหมัก จึงไม่ทำให้มีการตกตะกอนเพิ่มขึ้น

จากการคัดเลือก *S. cerevisiae* สำหรับผลิตยีสต์โปรตีน เมื่อใช้อาหารน้ำกากส่า ได้ M30 ซึ่งมีการเจริญและตกตะกอนได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังมีโปรตีนทั้งหมดสูง ในการทดลองพบว่า ยีสต์ใช้น้ำตาลไปเพียง 0.7-0.8% ซึ่งเท่ากับปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำกากส่า ดังนั้นในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเซลล์ของ M30 ในอาหารน้ำกากส่า จึงไม่ได้ปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น และทำการหมัก ในฟลาสก์แบบเขย่าแรง ที่อุณหภูมิสูง (37 °C) พบว่า M30 มีการเจริญในอาหารน้ำกากส่า ที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจน ไม่แตกต่างกันนัก ในอาหารน้ำกากส่าที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 M30 มีการเจริญและโปรตีนทั้งหมดสูงกว่า การเลี้ยงในอาหารที่ปรับ pH เท่ากับ 4.5 และ 5 โดย M30 มีการเจริญและโปรตีนทั้งหมดสูงสุด เมื่อปรับที่ 37 °C ในการศึกษาขนาดตะกอนของยีสต์ M30 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง ในอาหารน้ำกากส่า 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 control) 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 OD₆₆₀ 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 and 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.

เหตุผลและความสำคัญของโครงการ

ยีสต์ตกตะกอน (flocculent yeast) คือยีสต์ที่มีความสามารถในการตกตะกอน (flocculation) โดยสร้างกลุ่มของเซลล์จำนวนมากภายใต้สภาวะทางสรีรวิทยาที่เหมาะสม ทำให้สามารถแยกตัวออกจากอาหารเหลวอย่างรวดเร็ว การใช้ยีสต์ตกตะกอนในอุตสาหกรรมต่างๆ รวมทั้งอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลและอุตสาหกรรมการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ (fodder yeast) จะได้เปรียบในแง่ที่สามารถแยกเซลล์ออกจากสับสเตรทที่ใช้เลี้ยงได้โดยง่าย มีค่าใช้จ่ายต่ำ ซึ่งหมายถึงต้นทุนการผลิตจะลดลง สำหรับการผลิตเอทานอลนั้นการรักษาเซลล์ยีสต์ให้มีความเข้มข้นสูงตลอดการหมักจะทำให้มี productivity สูงกว่าการหมักโดยใช้เซลล์ความเข้มข้นปกติ จึงทำให้ระยะเวลาการหมักลดลงและผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น การทำให้เซลล์ยีสต์มีความเข้มข้นสูงตลอดการหมักอาจทำได้หลายวิธี เช่น การตรึงเซลล์ (cell immobilization) หรือการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ (cell recycle/ reuse) เซลล์ยีสต์ที่นำกลับมาใช้ใหม่มักได้หลังจากแยกออกจากสับสเตรทที่ใช้เลี้ยงเชื้อโดยวิธีต่างๆ เช่น centrifugation หรือ membrane filtration นอกจากนั้นการใช้ความสามารถในการตกตะกอนของยีสต์ตกตะกอนยังเป็นวิธีแยกเซลล์ที่มีประสิทธิภาพสูง ที่มีค่าใช้จ่ายในการลงทุนและดำเนินการต่ำ

การผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง (fuel ethanol) เริ่มขึ้นตั้งแต่สมัยสงครามโลกครั้งที่ 2 แต่หลังจากสงครามโลกครั้งนั้นปิโตรเลียมมีปริมาณมากและมีราคาถูก ทำให้การผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงไม่ได้รับความสนใจมากนัก หลังจากนั้นการผลิตเอทานอลกลับมาได้รับความสนใจทั่วโลกอีกครั้งหนึ่ง เมื่อมีวิกฤตการณ์น้ำมันในปี พ.ศ. 2516 ประเทศไทยเองก็มีการตื่นตัวและพยายามหาแหล่งพลังงานต่างๆ มาทดแทนน้ำมัน โดยเอทานอลเป็นแหล่งพลังงานชนิดหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในขณะนั้น แต่อาจเนื่องจากการค้นพบและนำแก๊สธรรมชาติมาใช้ในประเทศไทย ทำให้ความสนใจที่จะพัฒนาการผลิตเอทานอลเป็นพลังงานทดแทนมีน้อย ไม่มีความต่อเนื่อง และไม่ได้รับการสนับสนุนอย่างจริงจัง จนในระยะ 2-3 ปี ที่ผ่านมามีทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยประสบปัญหาจากราคาปิโตรเลียมที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง การผลิตและใช้เอทานอลทดแทนหรือร่วมกับการใช้เบนซิน จึงกลับมาได้รับความสนใจอีกครั้ง โดยในครั้งที่รัฐบาลได้ให้การสนับสนุนอย่างจริงจัง สิ่งสำคัญสำหรับการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรม ต้นทุนการผลิตต้องต่ำ ซึ่งการลดต้นทุนการผลิตทำได้จากการเพิ่มผลผลิตการหมัก (fermentation yield) และเพิ่ม productivity รวมทั้งลดค่าใช้จ่ายการลดอุณหภูมิของถังหมัก และการกลั่น การลดปริมาณน้ำเสีย ซึ่งสิ่งเหล่านี้ได้จากการหมักในอุณหภูมิสูง และการใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูง

แหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสูงทั้งในแง่ปริมาณโปรตีนและคุณค่าทางโภชนาการสำหรับอาหารสัตว์ที่ใช้กันอยู่ภายในประเทศ เช่น ถั่วเหลือง หรือ ปลาป่น นับวันจะมีราคาสูงขึ้น และเริ่มขาดแคลน ต้องมีการนำเข้าจากต่างประเทศ ดังนั้นจึงควรหาแหล่งโปรตีนที่มีคุณภาพสูงชนิดอื่น ๆ มาเสริมหรือทดแทนแหล่งโปรตีนที่ใช้อยู่เดิม ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพสูง เนื่องจากมีโปรตีนทั้งหมดปริมาณสูงและมีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน โดยเฉพาะมีไลซีนปริมาณสูง ถึงแม้ว่ามีปริมาณเมทไธโอนีนค่อนข้างต่ำเช่นเดียวกับจุลินทรีย์อื่น นอกจากนั้นเซลล์ของยีสต์ยังประกอบด้วยเกลือแร่หลายชนิด เช่น โครเมียม ซีลีเนียม โมลิบดีนัม และสังกะสี รวมทั้งวิตามินหลายชนิดโดยเฉพาะวิตามินบีรวม ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสัตว์ ยิ่งกว่านั้นยีสต์ยังมีกลิ่นรสดี ช่วยเพิ่มความน่าบริโภคของอาหาร

เนื่องจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้ทำการศึกษาในด้านการผลิตเอทานอลและยีสต์อาหารสัตว์ มาเป็นเวลานาน โดยได้ทำการแยกคัดเลือกและรวบรวมยีสต์ที่มีคุณลักษณะสำหรับการผลิตเอทานอลและใช้เป็นอาหารสัตว์ ซึ่งรวมทั้งยีสต์ที่ตกตะกอน และเห็นว่ายีสต์เหล่านี้น่าจะมีศักยภาพสูงต่อการพัฒนาการผลิตเอทานอลและยีสต์อาหาร ในระดับกึ่งอุตสาหกรรมจึงได้เสนอโครงการนี้เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตเอทานอล และยีสต์อาหารสัตว์ในห้องปฏิบัติการ รวมทั้งศึกษาลักษณะต่างๆ ของตะกอนของยีสต์เพื่อสิ้นสุดการผลิตผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิด โดยข้อมูลและเชื้อที่คัดเลือกได้จะนำไปใช้ร่วมกับข้อมูลที่ได้จากโครงการอื่นๆ ในชุดโครงการพลังงานจากเอทานอลนี้สำหรับการพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดในระดับกึ่งอุตสาหกรรมที่โรงงานแอลกอฮอล์ โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา ซึ่งหลังจากนั้นจะให้เป็นต้นแบบการสำหรับโรงการผลิตเอทานอลและยีสต์อาหารสัตว์ที่มีขนาดเล็กต่อไป

รายงานผลงานที่มีผู้ทำมาแล้ว (Literature Review)

การตกตะกอนและยีสต์ตกตะกอน

การตกตะกอน (flocculation) ของยีสต์นั้น มีผู้ให้คำจำกัดความไว้หลายประการ เช่น Stewart (1975) และ Suzzi *et al.* (1984) ให้คำจำกัดความว่าเป็นการที่เซลล์ยีสต์เข้ามารวมกันเป็นกลุ่มที่เรียกว่า clumps หรือ flocs แล้วตกตะกอนอย่างรวดเร็วสู่ส่วนล่างของอาหารเหลวที่เจริญอยู่ ส่วน Esser และ Kues (1983) ให้นิยามของคำว่า flocculation คือ ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์เดี่ยวๆ หลายเซลล์ที่อยู่ในอาหารเหลวมารวมกลุ่มกันทำให้เกิด flocs หรือ clumps ซึ่งจะตามด้วยการตกตะกอนหรือการลอยตัวก็ได้ โดยที่การลอยตัวอาจเกิดเนื่องจากการรวมตัวกับฟองแก๊สที่สร้างขึ้นจากการหมัก ซึ่งนอกจากคำว่า flocculation แล้ว ยังมีรายงานการใช้คำอื่นๆ เช่น clumping, agglutination, coagulation, adhesion, association, agglomeration, aggregation และ floc-formation ส่วน Johnson และคณะ (1987) รายงานว่า ในการรวมกลุ่ม

ของเซลล์ถ้าเกิดจากเซลล์ของสายพันธุ์เดียวกันเรียกว่า autoflocculation หรือ self-flocculation แต่ถ้าการรวมกลุ่มเกิดจากเซลล์ต่างสายพันธุ์หรือต่างสปีชีส์ เรียกว่า co-flocculation หรือ mutual flocculation ซึ่งการตกตะกอนที่กล่าวมาจะหมายถึงเฉพาะการตกตะกอนของเซลล์ปกติโดยทั่วไป ไม่รวมถึงการตกตะกอนเพื่อการสืบพันธุ์ นอกจากนั้น Kamada และ Murata (1984) พบว่าการตกตะกอนดังกล่าวยังเป็นแบบผันกลับได้ โดยการตะกอนและการกระจายของเซลล์จะผันแปรตามสภาวะแวดล้อม ซึ่งแสดงว่าการจับกันของเซลล์เป็นแบบหลวม ๆ เท่านั้น

จนถึงปัจจุบันกลไกการตกตะกอนของยีสต์ยังไม่ทราบสามารถอธิบายได้อย่างสมบูรณ์ แต่อาจกล่าวได้ว่าการตกตะกอนของยีสต์เป็นลักษณะที่ควบคุมโดยพันธุกรรม มียีนหลายชนิดที่พบในยีสต์ที่ตกตะกอนซึ่งเกี่ยวข้องกับการตกตะกอน โดยเฉพาะ *FLO* genes เช่น *FLO1*, *FLO8* และ *New FLO* (Esser and Kues, 1983; Miki *et al.*, 1982a; Mortimer and Schild, 1985; Hohgson *et al.*, 1985; Kobayashi *et al.*, 1996; Hautcourt and Smart, 1999) นอกจากนั้นการตกตะกอนยังขึ้นอยู่กับการดูดอาหารและปริมาณอนุมูลของสับสเตรท โดยเป็นที่ยอมรับว่าอนุมูลแคลเซียม (Ca^{2+}) มีบทบาทต่อการตกตะกอน โดยช่วยให้เซลล์ยีสต์จับกันเป็นกลุ่ม (aggregation) และการตกตะกอนมีลักษณะเป็น cell-cell interaction หรือ wall-wall interaction (Calleja, 1987) นอกจากนี้ Soares and Seynaeve (2000b) พบว่าความเข้มข้นของ Ca^{2+} ในอาหารเลี้ยงเชื้อและค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสัมพันธ์กันอย่างมาก และเป็นปัจจัยที่จำเป็นอย่างยิ่งต่อการตกตะกอนของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae*

การตกตะกอนของยีสต์อาจเกิดโดยอนุมูลที่มีประจุลบ (anionic group) ของผนังเซลล์ที่อยู่ใกล้กัน เชื่อมกันโดยมีอนุมูลแคลเซียมเข้าร่วม แต่ยังไม่รู้ว่าอนุมูลที่มีประจุลบเหล่านั้นคือกลุ่มใด โดยอาจเป็น carboxyl groups ของ acidic protein ที่ผนังเซลล์ phosphate groups ของ phospho-mannan นอกจากนั้นยังอาจมีพันธะไฮโดรเจนในคาร์โบไฮเดรตและไฮดรอกซิลบนผนังเซลล์เกิดขึ้นเพื่อเชื่อมเซลล์ด้วย (Layons and Hough, 1971; Jayatissa and Rose, 1976; Esser and Kues, 1983; Kamada and Murata, 1984)

Taylon and Orton (1978) และ Miki *et al.* (1982a) เสนอ protein-carbohydrate model หรือ lectin mechanism โดยเซลล์ที่ตกตะกอนจะมีตำแหน่ง (site) ที่เกี่ยวข้องกับการตกตะกอนที่ผนังเซลล์ 2 ชนิด คือ protein site ที่มี s-s bond คือ lectin-like protein หรือที่เรียกว่า zymolectins หรือ flocculins (carbohydrate /sugar binding protein) สร้างโดยการควบคุมโดย *FLO* genes (<http://www.crc.dk/flab/newpag4.htm>.; Jin *et al.*, 2001) และเป็นตำแหน่งที่เกาะกับอนุมูลแคลเซียม แล้วทำให้ conformation เปลี่ยนแปลงไปสามารถเกาะกับ mannan site ซึ่งเป็นตำแหน่งที่สองบนผนังเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการตกตะกอนได้ mannan site เป็น α -branched mannan carbohydrates ซึ่งพบได้ในผนังเซลล์ของยีสต์ทั่วไปเป็นผลผลิตของ *MNN* genes การ

จับกันของเซลล์สายพันธุ์ที่ตกตะกอนจะเกิดโดย bilateral connection ระหว่าง lectin-like protein กับ mannan (Calleja, 1987) โดย Jin *et al.* (2001) รายงานว่าการที่ยีสต์สายพันธุ์ต่างๆ มีการตกตะกอนต่างกัันนั้น ขึ้นอยู่กับ zymoelectins density และ affinity

Komada and Murata (1984) เสนอกลไกการตกตะกอนของ brewer's yeast ว่าเกิดจากการมี hydrophobic interaction และ ionic bonds เนื่องจากพบว่าการตกตะกอนหรือการกระจายของเซลล์ตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลง เช่น pH ความเข้มข้นของน้ำตาลและสารชักนำการตกตะกอน โดยเมื่อเร็วๆ นี้มีรายงานว่า cell surface hydrophobicity (CHP) เป็นปัจจัยสำคัญในการตกตะกอนของ brewer's yeast (Straver *et al.*, 1993; Straver and Kijine, 1996)

การตกตะกอนของยีสต์อาจขึ้นกับปัจจัยทางชีววิทยาโดยเซลล์ที่มีอายุน้อย มีความสามารถตกตะกอนต่ำ และการตกตะกอนเพิ่มขึ้นทีละน้อยในระหว่างการเจริญและการหมัก (Eddy and Phil, 1995 a; Rainbow, 1966) และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงหลังของ log phase (Mill, 1964) และการตกตะกอนเป็นแบบ growth associate (Brohen and McLoughlin, 1985) นอกจากนั้นธาตุอาหารหลายชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ ตลอดจนสภาวะแวดล้อมของการเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการตกตะกอนแต่อย่างไรก็ตามผลของธาตุอาหาร หรือสภาวะแวดล้อมที่มีต่อการตกตะกอนขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ เช่น น้ำตาลแมนโนสป้องกันการสร้างกลุ่มของเซลล์ในยีสต์บางสายพันธุ์ (Stewart *et al.*, 1975; Stratford, 1992) ส่วนมัลโตสทำให้เซลล์ยีสต์ที่จับกันเป็นกลุ่มกระจายตัว (Hough, 1957) และเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสหรือซูโครส แสดงการตกตะกอน (Nishihara *et al.*, 1976; Limtong, 1987) สำหรับแหล่งไนโตรเจนพบว่าแอมโมเนียทำให้การตะกอนเกิดช้าลง ส่วนยูเรียที่เติมลงในเซลล์ยีสต์ โดยไม่มีการเจริญจะทำให้เซลล์ที่จับตัวเป็นกลุ่มกระจายตัวอย่างสมบูรณ์ (Mill, 1964) ในขณะที่ Nishihara *et al.* (1976) พบว่า *S. cerevisiae* IFO2018 ตกตะกอนมากขึ้นเมื่อเจริญในอาหารที่มีแอมโมเนียซัลเฟต ยูเรีย และ Casamino acid แต่ตกตะกอนน้อยในอาหารที่มีแอมโมเนียฟอสเฟต

เอทานอลซึ่งเป็น metabolite ของ anaerobic growth ของยีสต์มีผลต่อการตกตะกอน โดยมีผู้รายงานว่าถ้าเติมเอทานอล 10 และ 20% ลงในเซลล์ยีสต์โดยไม่มีการเจริญ ทำให้เซลล์ตกตะกอน แต่ถ้าเติมเพียง 5% ทำให้เกิดการกระจายตัวของเซลล์ ส่วน Limtong (1987) พบว่าเอทานอลที่สร้างขึ้นระหว่างการเจริญของ *S. cerevisiae* AM12 ทำให้เซลล์ตกตะกอนอย่างชัดเจน ในขณะที่ Jin and Speers (2000) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอลในบัฟเฟอร์ที่ใช้เตรียมซัสเพนชันของยีสต์ เพิ่มการตกตะกอนของ *S. cerevisiae* ที่มี *NewFlo phenotype* แต่ไม่มีผลต่อเซลล์ที่มี *Flo1 phenotype*

Soares and Seynaeve (2000a) รายงานการใช้ 50 mM succinic acid และ 3.1 mM Ca^{2+} เป็นสารบัฟเฟอร์ เพื่อเพิ่มศักยภาพของการใช้สารอาหารของเซลล์ของ *S. cerevisiae* NCYC 1214 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดสังเคราะห์ (yeast nitrogen base medium) ให้มีการเจริญและการตกตะกอนเช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยงในอาหารชนิดสมบูรณ์ (yeast extract peptone dextrose medium)

ส่วนสภาวะแวดล้อมสำหรับการเลี้ยงเชื้อนั้น Mill (1964) พบว่าการตกตะกอนของ brewer's yeast จะคงทนที่อุณหภูมิ 20-50 °ซ. และลดลงอย่างรวดเร็วที่ 50-60 °ซ. และยังพบว่าการตกตะกอนเกิดขึ้นน้อยที่ pH 2.0 แต่เพิ่มขึ้นเมื่อ pH เพิ่มขึ้นโดยมีการตกตะกอนสูงสุดที่ pH 4.5-5.5 ส่วน Nishihara *et al.*, (1976) รายงานว่า brewer's yeast ไม่ตกตะกอนที่ pH ต่ำกว่า 3 ส่วน Jin and Speers (2000) แสดงว่าเซลล์ของ *S. cerevisiae* ที่มี *NewFlo* phenotype ตกตะกอนเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่ม pH

ยีสต์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvarum* (*carlsbergensis*), *Schizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces fragilis* สำหรับ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่า *S. uvarum* และยีสต์ชนิดอื่น ดังนั้นในปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* นอกจากนั้นในปัจจุบันมีการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียสกุล *Zymomonas* คือ *Z. mobilis* และสกุล *Clostridium* คือ *Cl. Thermocellum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียไม่ต้องการออกซิเจน สามารถหมักเซลลูโลส และเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้งสองยีสต์ดังกล่าว มีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์

ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอล มีหลายประการ (Kosaric *et al.*, 1983) เช่น

1. ให้ผลผลิตสูง
2. มีอัตราการหมักเอทานอล สูง
3. มีความทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
4. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
5. ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)
6. มีความสามารถในการตกตะกอน (flocculation)
7. ทน (pH) ต่ำ หรือทนกรด (acid tolerance)
8. มีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย

9. ไม่เปลี่ยนแปลงง่ายในสภาวะต่างๆ ของการหมัก

สำหรับการให้ผลผลิตสูง และมีอัตราการหมักเอทานอลสูง (rate of ethanol fermentation) นั้นเป็นเรื่องที่ต้องให้ความสำคัญเป็นอันดับแรก เมื่อพิจารณาคัดเลือกจุลินทรีย์มาใช้สำหรับการผลิตเอทานอล นอกจากนั้นลักษณะอื่นที่ได้รับความสนใจ เวลาการคัดเลือกยีสต์ที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง หรือ สารเคมี ในระยะที่ผ่านมา จนถึงขณะนี้ คือ ความสามารถในการตกตะกอน (flocculation) ความทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance) ความทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance) และ ความทนแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)

ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตเอทานอล (Flocculating Yeasts for Ethanol Production)

การใช้ยีสต์ตกตะกอนในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล มีประโยชน์ในแง่ที่สามารถแยกเซลล์ออกจากผลิตภัณฑ์ได้โดยง่าย ทำให้สามารถแยกเซลล์ส่วนใหญ่ออกไปได้ก่อนการกลั่น ทำให้พลังงานที่ต้องใช้สำหรับการกลั่นลดลง เป็นผลให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลลดลง มีรายงานการคัดเลือก และสร้างยีสต์ที่มีความสามารถในการตกตะกอน ทั้งในประเทศและต่างประเทศ จำนวนมาก

จรูญ และคณะ (2524) ได้คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้สำหรับหมักเอทานอล พบว่า *S. cerevisiae* M30 ซึ่งเป็น flocculent yeast สามารถหมักเอทานอล ที่อุณหภูมิสูง คือ 40 °ซ ได้สูงกว่า *S. cerevisiae* Sc90 ซึ่งใช้ในโรงงานสุราอยุธยา และโรงงานสุราทั่วไป ในขณะที่ 37 °ซ หมักได้เท่าๆ กับ *S. cerevisiae* Sc90

Kumnuanta et al., (1981) แยกยีสต์ที่หมักเอทานอลและตกตะกอนได้ จากกากน้ำตาลในโรงงานแอลกอฮอล์และโรงงานน้ำตาล จำนวน 200 ไอโซเลท และเมื่อคัดเลือกเชื้อไอโซเลทที่หมักเอทานอลจากกากน้ำตาลได้สูง พบว่า no. 327 หมักเอทานอลได้สูงกว่าไอโซเลทอื่น ที่ 35-37 °ซ นอกจากนั้นยังได้เสนอการหมักเอทานอลโดยใช้อุปกรณ์ง่ายๆ ซึ่งเหมาะสมสำหรับโรงงานขนาดเล็กในชนบท

Seki et al. (1983) นำ *S. cerevisiae* TJ1 ที่หมักเอทานอลได้สูงที่อุณหภูมิสูง ทนเอทานอล และสามารถตกตะกอน ซึ่งแยกได้จากโรงงานแอลกอฮอล์ในประเทศไทย มาผสมพันธุ์โดยใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์ฟิวชันกับ *S. cerevisiae* N1 ซึ่งแยกจากกากเหลือของการหมักที่ Awamori brewing ประเทศญี่ปุ่น เมื่อคัดเลือก fusant ที่สร้างได้ พบว่า fusant AM12 ทนเอทานอลได้สูง และให้เอทานอลถึง 12.4% โดยน้ำหนัก ที่ 40 °ซ ส่วนการหมักที่ 30 °ซ ให้เอทานอล 16.3 % โดยน้ำหนัก และ AM12 ตกตะกอนได้ดีกว่า TJ1 นอกจากนั้นภายหลังได้ศึกษาการตกตะกอนของ fusant AM12 พบว่าเกิดจากการเหนี่ยวนำของเอทานอลที่ยีสต์สร้างขึ้นระหว่างการ

เจริญ (Limtong, 1987) รวมทั้งได้ทำการศึกษาผลของเกลือนิยัตริย์หลายชนิดต่อการเจริญ และการตกตะกอนของ AM12 นี้ (Limtong et al., 1986)

Limtong et al. (1984) รายงานการนำ *S. cerevisiae* TJ1 มาศึกษาการผลิตเอทานอล โดยการหมักแบบต่อเนื่องร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ (continuous culture with cell recycle) โดยใช้ simple system และ multiple system เพื่อเพิ่ม productivity พบว่า เมื่อใช้ three-vessel system ให้ productivity สูงสุดถึง 30.1 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ในขณะที่การหมักแบบต่อเนื่องธรรมดา TJ1 มี ethanol productivity เพียง 3.9 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง

การใช้ยีสต์ที่ตกตะกอนเหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักเอทานอล ที่ใช้เซลล์ความเข้มข้นสูง โดยใช้ระบบการนำเซลล์กลับมาใช้อีก สำหรับการผลิตเอทานอลนั้น การใช้เซลล์ความเข้มข้นสูงตลอดระยะเวลาการหมัก ทำให้การหมักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วผลก็คือ productivity สูงกว่าการหมักแบบที่ใช้เซลล์เข้มข้นปกติ การทำให้มียีสต์ความเข้มข้นสูงตลอดการหมักอาจทำได้หลายวิธี โดยการแยก และนำเซลล์ที่หมักแล้วกลับไปใช้อีก (cell reuse/cell recycle) เป็นวิธีหนึ่ง การแยกเซลล์โดยอาศัยความสามารถในการตกตะกอนของยีสต์เอง เป็นวิธีการแยกเซลล์ที่มีค่าใช้จ่ายในการลงทุนต่ำ

ตัวอย่างรายงานการใช้ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตเอทานอล เช่น การใช้ยีสต์ที่ตกตะกอนในการหมักเอทานอลอย่างต่อเนื่องร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ (continuous culture with cell recycle) (Kuriyama et al., 1985; Limtong et al., 1984) การหมักแบบกึ่งต่อเนื่องร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ (Joson et al., 1985) ในปี ค.ศ. 1993 Kuriyama et al. ใช้ flocculent yeast ใน two stage two stream continuous fermentation สำหรับการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล และพบว่า stage แรกให้ cell yield ดีโดยไม่ลด ethanol yield อย่างมีนัยสำคัญ โดยเอทานอลสุดท้ายที่ได้ คือ 92.0-93.5 กรัม/ลิตร ที่ dilution rate 0.10 ลิตร/ชั่วโมง Suzzi et al. (1996) รายงานการใช้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ตกตะกอนได้ดีซึ่งแยกได้จากไวน์ตรังใน calcium alginate bead ใช้สำหรับการหมักไวน์โดย cell-recycle batch fermentation Paiva et al. (1996) ทดลองใช้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ตกตะกอน ในการหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยความเข้มข้นต่าง ๆ โดย continuous fermentation ร่วมกับการนำเซลล์มาใช้ใหม่ ใน tower reactor ทำการหมักโดยใช้ dilution rate คงที่ ที่ 0.2 ชั่วโมง⁻¹ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ pH 3.3 พบว่าเมื่อใช้น้ำตาล 200 กรัม/ลิตร เพื่อให้ ethanol productivity สูงสุด 18 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง ด้วย substrate conversion rate 99% ความเข้มข้นของเอทานอล 90 กรัม/ลิตร ส่วน Vicente et al. (1999) ใช้ยีสต์ตกตะกอนในการหมักเอทานอลจากกลูโคส โดยใช้ถังหมักแบบ air lift และพบว่า ethanol productivity เกิดจากการลดลงของขนาดตะกอน การออกแบบท่อที่นำ fermented mash ออก และการลดอัตราการเติมอากาศ (aeration rate) ในขณะที่ Olivira et al.

(1999) ใช้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ตกตะกอน ผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบต่อเนื่องร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ ใน tower reactor

ยีสต์ทนเอทานอล ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง และ ยีสต์ทนแรงดันออสโมซิส สำหรับการผลิตเอทานอล (Ethanol Tolerant Yeast, Thermotolerant Yeast and Osmotolerant Yeast for Ethanol Fermentation) โดยทั่วไปการเจริญ และการหมักเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอล โดยพบว่าเอทานอลความเข้มข้น 1-2% โดยน้ำหนัก ทำให้การเจริญของยีสต์ลดลง และการเจริญของยีสต์โดยทั่วไปจะหยุดเมื่อมีเอทานอล 4.7-7.8% โดยน้ำหนัก ดังนั้นเอทานอลเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งที่จำกัดการผลิตเอทานอลของยีสต์

จากการศึกษาของ Brown และคณะ (1981) ซึ่งว่าผลการยับยั้งการเจริญช้าลง และไม่ได้เป็นไปตามแบบการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน โดยมีผลต่อการยับยั้งอัตราการเจริญและลดความมีชีวิตของเซลล์การเติมเอทานอลลงไปในช่วงที่เชื้ออยู่ในช่วง exponential phase มีผลทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับอัตราของการสังเคราะห์เอทานอล แต่ผลของเอทานอลต่ออัตราการเจริญจะมีมากกว่าผลต่ออัตราการหมัก นอกจากนั้นยังมีผู้รายงานว่าเอทานอลยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และโปรตีน ซึ่งผลนี้ทำให้อัตราการเจริญลดลง ในขณะที่การที่เซลล์ยีสต์ตายเกิดจากปฏิกิริยาที่เอทานอลทำให้โปรตีนในเซลล์เสื่อมสภาพ (denature) ส่วนการยับยั้งการหมักโดยเอทานอลนั้นพบว่าเป็นการยับยั้งแบบไม่แข่งขันเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ต่าง ๆ และสรีรวิทยาของเซลล์ โดยมีการตั้งสมมุติฐานว่าเอทานอลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหาย หรือมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป ส่วนในระดับเอนไซม์การยับยั้งอาจจะมีผลต่อเอนไซม์ dehydrogenase และ hexokinase นอกจากนั้นระดับการยับยั้งจะสัมพันธ์กับสภาวะแวดล้อมอื่น โดยเฉพาะเมื่อมีน้ำตาลความเข้มข้นสูง และอุณหภูมิสูงทำให้การยับยั้งรุนแรงขึ้น ความทนเอทานอล (ethanol tolerance) เป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ ในบรรดา yeast ชนิดต่าง ๆ พบว่ามีเพียงบางสปีชีส์ของ *Saccharomyces* และ *Schizosaccharomyces* ที่แสดงลักษณะนี้ โดย *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนเอทานอลมากกว่ายีสต์ชนิดอื่น (Rose et al, 1993) และ *S. cerevisiae* ที่มีความทนต่อเอทานอลต่างระดับกัน แสดงการปรับตัวเพื่อผลิตเอทานอลต่างกัน (Chi and Arneborg, 2000) ถึงแม้ปัจจุบันความเข้าใจผลการยับยั้งของเอทานอลในระดับโมเลกุลยังมีน้อยมาก แต่เชื่อกันว่าความทนต่อเอทานอลของยีสต์นั้น ขึ้นอยู่กับองค์ประกอบส่วนที่เป็นกรดไขมันที่มีพันธะคู่ (unsaturated fatty acid) ในฟอสโฟลิปิด (phospholipid) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีผู้พบว่าไขมันส่งเสริมการผลิตเอทานอลใน *Saccharomyces* spp. และ *Kluyveromyces lactis* ส่วน Watson (1981) รายงานว่าใน *S. cerevisiae* กรดไขมันที่มีพันธะคู่ในฟอสโฟลิปิด ที่เยื่อหุ้มเซลล์จำเป็นต่อการผลิตเอทานอลความเข้มข้นสูง โดยเซลล์ที่มีเออร์กอสเตอรอล (ergosterol) ต่ำ แต่มีกรดไขมันที่มีพันธะคู่สูง ผลิตเอทานอลได้สูงถึง 13-15.5% โดยน้ำหนัก มีผู้รายงานว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหาร

เลี้ยงเชื้อที่มี linoleic acid ($C_{18:2}$) ทนต่อเอธานอลซึ่งเดิมลงไปมากกว่าเชื้อที่เลี้ยงในที่มี oleic acid ($C_{18:1}$) ทั้งนี้เข้าใจกันว่ากรดไขมันที่มีพันธะคู่ในฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ ช่วยส่งเสริมการขับถ่าย (excretion) เอธานอลจากเซลล์ ทำให้ปริมาณเอธานอลที่จะเป็นพิษภายในเซลล์ลดลง และมีผู้พบว่าเอธานอลที่เชื้อสร้างขึ้นเองในระหว่างการหมัก มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ที่กำลังหมักมากกว่าเอธานอลที่เติมลงไป และเซลล์ที่เลี้ยงในที่มีเอธานอล ทนเอธานอลได้มากกว่าเซลล์ที่เจริญในที่ไม่มีเอธานอล (Loureiro and Uden, 1986; Lloyd et al., 1993)

ความทนต่ออุณหภูมิสูงของยีสต์ และจุลินทรีย์อื่น เป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ เช่น *Saccharomyces* สายพันธุ์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strain) ให้เซลล์ปริมาณสูงสุด และมีอัตราการเจริญสูงสุด ที่อุณหภูมิช่วง 28-35 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิสูงสุด (maximal temperature) สำหรับการเจริญประมาณ 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิสูงสุดซึ่งเชื้อเจริญได้นี้จะสูงขึ้นเล็กน้อย เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ ส่วนยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic yeast) จะมีระดับอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimal temperature) สำหรับการเจริญที่ 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญ 50 องศาเซลเซียส นอกจากนั้นยังมียีสต์ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerant yeast) ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง แต่ทนได้เมื่อเลี้ยง หรืออยู่ในที่อุณหภูมิสูงสำหรับการหมักเอธานอล พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักจะสูงกว่า สำหรับการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส และการเมตาบอลิซึมของยีสต์ในที่มีออกซิเจนจะเบนไปทางการหมักเมื่ออุณหภูมิเพิ่มจาก 25 เป็น 38 องศาเซลเซียส เนื่องจากเกิด inactivation ของเอนไซม์ที่สำคัญสำหรับการออกซิเดชัน 4 ชนิด ทำให้เกิดการสะสมไพรูเวตและเอธานอล มีรายงานหลายฉบับที่แสดงให้เห็นว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มเป็น 40 องศาเซลเซียส อัตราการหมักเอธานอลในช่วงแรกจะเพิ่ม ทั้งนี้อาจเนื่องจากกิจกรรมของเอนไซม์ alcohol dehydrogenase เกิดได้สูงสุดที่อุณหภูมิใกล้เคียง 40 องศาเซลเซียส (ลาวิตรี ลิ้มทอง, 2540)

การหมักเอธานอลที่มีอัตราการหมักสูงจะมีความร้อนเกิดขึ้นในอัตราที่สูง การหมักด้วยยีสต์ที่ใช้ทั่วไป ซึ่งมักเป็นยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ethanol productivity ลดลงอย่างมาก เนื่องจากการยับยั้งด้วยเอธานอลมีมากขึ้น แนวทางการแก้ปัญหาอย่างหนึ่ง คือ การใช้ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง ซึ่งเจริญและหมักเอธานอลได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ แต่ยังคงเจริญและหมักเอธานอลได้ถึงแม้มีอุณหภูมิสูงขึ้น (Limtong, 1987; Sree et al., 1999)

ประโยชน์ของการใช้ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง สำหรับการผลิตเอธานอลในอุตสาหกรรม คือ ลดการใช้ระบบหล่อเย็น (cooling system) ทำให้ค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลดลง เป็นผลให้ต้นทุนการผลิตลดลง นอกจากนั้นการหมักในที่อุณหภูมิสูงยีสต์มักมีอัตราการหมักสูง ทำให้สามารถผลิตได้

เร็ว นอกจากนั้นยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของเชื้ออื่น (contamination) (Seki et al., 1983; Singh et al., 1998; Sree et al., 1999)

การใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูงในการหมักเอธานอล ทำให้ปริมาณน้ำที่ใช้ทำให้สับสเตรทเจือจางจนถึงระดับที่เหมาะสมลดลง และลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ ที่มากับสับสเตรท โดยถ้าสามารถกำจัดการยับยั้งของเอธานอลได้จะทำให้ผลิตเอธานอลได้ความเข้มข้นสูงขึ้น อันจะทำให้ค่าใช้จ่ายในการกลั่นลดลง แต่การใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอธานอล การยับยั้งส่วนหนึ่งเกิดจากแรงดันออสโมซิส ซึ่งเซลล์ของยีสต์จะเกิดพลาสโมไลซิสเมื่ออยู่ในน้ำตาลความเข้มข้นสูงกว่า 14% โดยน้ำหนัก สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ยับยั้งการหมักที่แท้จริงนั้นเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ ทั้งนี้ถ้าน้ำตาลมีความเข้มข้นสูงกว่า 14% โดยน้ำหนัก อัตราการหมักเริ่มต้นลดลง แต่ผลการยับยั้งของน้ำตาลความเข้มข้นสูงนั้นน้อยกว่าผลของเอธานอล นอกจากนั้นผลการยับยั้งของน้ำตาลและเอธานอลนั้นส่งเสริมกัน ยีสต์ทนแรงดันออสโมซิสมีประโยชน์ในอุตสาหกรรมการหมักเอธานอล เพราะสามารถเจริญและหมักเอธานอล ในน้ำตาลความเข้มข้นสูง ซึ่งไม่เพียงแต่ลดการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ แต่ยังให้เอธานอลได้ความเข้มข้นสูง ซึ่งช่วยลดค่าใช้จ่ายในการกลั่น

สำหรับการศึกษายีสต์สายพันธุ์ ที่มีลักษณะทนเอธานอล ทนอุณหภูมิสูง และทนแรงดันออสโมซิส เพื่อใช้ในการผลิตเอธานอลมีการศึกษากันมาเป็นเวลานาน เช่น บุญเทียม (2523) คัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อการหมักเอธานอลจากกากน้ำตาลและน้ำอ้อย จากยีสต์ 904 ไอโซเลท ซึ่งแยกได้ที่อุณหภูมิห้อง 558 ไอโซเลท อุณหภูมิ 40 °ซ 141 ไอโซเลท และอุณหภูมิ 45 °ซ 205 ไอโซเลท เมื่อนำมาคัดเลือกโดยการหมักเอธานอล จากกากน้ำตาลที่อุณหภูมิ 40 °ซ ได้ *S. cerevisiae* 313 และ *S. cerevisiae* 281 โดย *S. cerevisiae* 281 เป็นยีสต์ที่ตกตะกอนดี แต่หมักเอธานอลได้ต่ำกว่า *S. cerevisiae* 313 ส่วนยีสต์ที่คัดเลือกได้ที่ 45 °ซ คือ *Kluyveromyces marxianus* ซึ่งหมักเอธานอลได้ความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ Sree et al. (1999) ทดลองผลิตเอธานอลสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงจากข้าวฟ่างหวานและมันฝรั่ง โดย *S. cerevisiae* (V₃) สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูง และ *Bacillus* sp. (VB₉) ที่ย่อยแป้งได้ โดยการเลี้ยงที่ 37 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้เชื้อทั้งสองร่วมกัน (co-culture) และใช้สับสเตรททั้งสองชนิดผสมกันให้เอธานอลมากกว่าการใช้ยีสต์อย่างเดียว และเอธานอลสูงสุดที่ผลิตได้ คือ 5 กรัม/ลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส และ 3.5 กรัม/ลิตร ที่ 42 องศาเซลเซียส นอกจากนั้น Sree et al. (2000) รายงานการแยก *S. cerevisiae* 4 สายพันธุ์ ที่ทนอุณหภูมิสูง ทนแรงดันออสโมซิส และตกตะกอน โดยทุกสายพันธุ์เจริญได้ที่ 44 องศาเซลเซียส โดยสายพันธุ์ V₃ ให้เอธานอลสูงสุดจากกลูโคส 150 กรัม/ลิตร เท่ากับ 60 กรัม/ลิตร ที่ 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่ให้เอธานอล 75 กรัม/ลิตร ที่ 30 องศาเซลเซียส ส่วน Sridhar et al. (2002) ปรับปรุงความทนแรงดันออสโมซิส ความทนอุณหภูมิสูง และ ความ

ทนเอทานอล โดยใช้ UV mutagenesis พบว่า mutant ที่คัดเลือกได้ผลิตเอทานอลได้สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ wild type เมื่อหมักที่ 42 องศาเซลเซียส ส่วนความทนแรงดันออสโมซิสนั้น พบว่าสูงขึ้นเฉพาะเมื่อเลี้ยง mutant ที่ 30 องศาเซลเซียส

ยีสต์อาหารสัตว์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพสำหรับใช้เป็นแหล่งของโปรตีน เนื่องจากมีโปรตีนปริมาณสูง โดยมีโปรตีนทั้งหมด (total protein) 40-50% ของน้ำหนักแห้งของเซลล์ นอกจากนั้นคุณค่าทางโภชนาการของโปรตีนยังสูงอีกด้วย เพราะมีกรดอะมิโนจำเป็นครบถ้วน มีคาร์โบไฮเดรต 30-35% ซึ่งประกอบด้วยไกลโคเจน กลูแคน และแมน มีไนโตรเจน 7.5-9% กรดนิวคลีอิก 6-12% ไขมัน 5-9.5% และไขมัน 2-6% ยิ่งกว่านั้นเซลล์ของยีสต์ยังประกอบด้วยเกลือแร่หลายชนิดที่เป็น trace element สำหรับคนและสัตว์ เช่น โครเมียม (chromium) ซีลีเนียม (selenium) โมลิบดีนัม (molybdenum) และสังกะสี (zinc) รวมทั้งวิตามินหลายชนิดโดยเฉพาะวิตามินบีรวม ครบถ้วน (Reed and Nagodawithana, 1991) นอกจากนั้นยีสต์ยังมีกลิ่นรสดีช่วยเพิ่มความน่ารับประทานของอาหาร ดังนั้นยีสต์จึงถูกใช้เป็นส่วนหนึ่งของอาหารสัตว์ และใช้เป็นแหล่งธาตุอาหารเสริมหรือเพิ่มกลิ่นรสของอาหารคนและสัตว์มาเป็นเวลานาน

Bhattacharjee (1970) สรุปไว้ว่ายีสต์มีความเหมาะสมที่สุดในบรรดาจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีน เนื่องจากเจริญได้ในวัตถุดิบราคาถูก และอาหารที่มีองค์ประกอบอย่างง่าย ๆ มีความต้องการ growth factor ต่าง ๆ น้อย ใช้แหล่งพลังงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ มีความต้านทานต่อการปะปนของจุลินทรีย์อื่น แยกและเก็บเซลล์ง่าย มีของเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิตน้อย คงลักษณะทางพันธุกรรมดี ไม่กลายพันธุ์ง่ายเมื่อเลี้ยงเป็นระยะเวลานานติดต่อกัน เข้าใจลักษณะทางพันธุกรรมและสรีรวิทยา ทำให้สามารถปรับปรุงพันธุกรรมได้สะดวก ไม่เป็นพิษหรือก่อให้เกิดอาหารภูมิแพ้ ให้โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตปริมาณสูง และเก็บรักษาง่าย เช่น โดยการทำแห้ง

ด้วยคุณลักษณะต่าง ๆ ของยีสต์ข้างต้น ยีสต์ถูกใช้เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของอาหารสัตว์ ซึ่งเรียกว่า feed หรือ fodder yeast และอาจใช้เป็นแหล่งธาตุอาหารเสริม (nutritional supplement) หรือสิ่งเพิ่มกลิ่นรส (flavour additive) ในอาหารสำหรับสัตว์ ยีสต์ถูกใช้เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของอาหารสัตว์ ซึ่งเรียกว่า feed หรือ fodder yeast และอาจใช้เป็นแหล่งธาตุอาหารเสริม (nutritional supplement) หรือสิ่งเพิ่มกลิ่นรส (flavour additive) ในอาหารสำหรับคน มาเป็นเวลานาน

ยีสต์อาหารคนและอาหารสัตว์แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามวิธีการผลิต คือ Primary Yeast และ secondary yeast สำหรับ primary yeast หมายถึงยีสต์ที่ตั้งใจเลี้ยงขึ้นมาเพื่อนำไปใช้เป็นอาหาร คนหรือสัตว์โดยตรง มียีสต์หลายชนิดที่สามารถใช้ สำหรับการผลิต primary yeast เช่น

ยีสต์ในยีสต์ *Candida*, *Endomycopsis*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Torulopsis* และ *Lipomyces* เป็นต้น ในขณะนี้ยังคงมีความพยายามที่จะหาสายพันธุ์ที่ดีขึ้น โดยเฉพาะให้ชีวมวลเพิ่มขึ้น เช่น Kim et al. (1998) ศึกษาผลิตชีวมวลของ *Kluyveromyces fragilis* โดยทำการเลี้ยงเชื้อแบบให้อากาศอย่างต่อเนื่อง (aerobic continuous culture) ใน 2.5% fructose medium ซึ่งผลที่ได้ คือ ค่า productivity สูงสุดเท่ากับ 4.81 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง (dilution rate < 0.17 ชั่วโมง⁻¹) ผลผลิตชีวมวลสูงสุดที่ได้ คือ 0.42 กรัม/กรัมชีวมวล และมีโปรตีนในเซลล์ (protein content) 50-55% ส่วน secondary yeast เป็นผลผลิตพลอยได้หลังจากการใช้ผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ มาแล้ว เช่น ยีสต์จากการผลิตเบียร์ (brewers' dried yeast) และยีสต์จากการผลิตสุรากลั่น (distiller's dried yeast) ซึ่งส่วนใหญ่มักใช้เป็นอาหารสัตว์มากกว่าอาหารคน

วัตถุดิบที่ใช้สำหรับการผลิต primary yeast ในระดับอุตสาหกรรมมีหลายชนิด เช่น ซัลไฟท์เลเซอร์จากโรงงานกระดาษ กากน้ำตาล เวย์จากโรงงานผลิตเนย สารปิโตรเคมี (Petrochemical substance) เช่น n-alkane และเอธานอล แป้ง และวัสดุเหลือใช้ที่มีแบ่งเป็นองค์ประกอบ และปัจจุบันได้มีการศึกษาใช้วัตถุดิบอื่น ๆ สำหรับการผลิต เช่น Curto และ Tripodo (2001) ทดลองใช้ virgin grape marc (VGM) ซึ่งมีมากในประเทศที่ปลูกองุ่นสำหรับผลิตเอธานอล เช่น อิตาลี และ ฝรั่งเศส สำหรับผลิตโปรตีนเซลล์เดี่ยวจาก *S. cerevisiae* โดยใช้ fed batch fermentation ที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่า productivity ที่ได้เหมือนกับที่ได้จากกากน้ำตาล ส่วน Choi et al. (2002) ใช้ Chinese cabbage ซึ่งมีน้ำตาลทั้งหมดค่อนข้างสูง (1.89-1.94%) และมีปริมาณมากในเกาหลี เป็นสับสเตรทสำหรับการผลิตชีวมวลของยีสต์ชนิดต่าง ๆ คือ *C. utilis*, *Pichia stipitis*, *Kluyveromyces marxianus* และ *S. cerevisiae* ที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าทุกสายพันธุ์ยกเว้น *C. utilis* แสดงการผลิตโปรตีนทั้งหมด (total protein) ในน้ำที่สกัดจาก Chinese cabbage ในระดับเดียวกับที่เลี้ยงในอาหารเหลว YM

สำหรับยีสต์ที่ใช้เป็นแหล่งโปรตีนนั้น นักวิจัยของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้ทำการแยกและคัดเลือก ยีสต์ที่มีโปรตีนภายในเซลล์สูงสำหรับใช้เป็นยีสต์อาหารสัตว์มาอย่างต่อเนื่อง (สมคิด, 2521; ปราโมทย์, 2521; สกุนธร, 2525; พรชัย, 2527, วรณภา, 2532) นอกจากนั้นในระยะหลังได้ทำการปรับปรุงพันธุกรรมของ *S. cerevisiae* เพื่อให้มีคุณค่าทางโภชนาการสูงขึ้น เพื่อนำไปใช้เป็นยีสต์อาหารสัตว์ โดยทำการคัดเลือก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีไลซีนอิสระ (free lysine หรือ lysine pool) ในเซลล์สูง จาก *S. cerevisiae* TJ1, TJ3, M30, N1, B120, Sc90 191, 281 พบว่า *S. cerevisiae* B120 มีไลซีนในเซลล์สูงสุด จากนั้นนำมาทำการกลายพันธุ์ และคัดเลือก thialysine resistant mutant ได้ mutant RL-6 ที่มีไลซีนในเซลล์สูงกว่า B120 ถึง 4.7 เท่า แต่ RL-6 มีโปรตีนในเซลล์ค่อนข้างต่ำ คือ 37.98 กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ (ธวัชร, 2536) นอกจากนั้น รัฐดา (2539) คัดเลือกได้ *S. cerevisiae* N1 ซึ่งมีเมทไธโอนีนอิสระในเซลล์สูง และทำ

การปรับปรุงพันธุ์กรรมโดยการกลายพันธุ์ด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตและคัดเลือก ethionine resistant mutant ที่มีเมธไทโอนีนอิสระ (free methionine หรือ methionine pool) สูงสุด แล้วจึงทำการกลายพันธุ์ ethionine resistant mutant ที่คัดเลือกได้อีกครั้งหนึ่ง แล้วคัดเลือก ethionine resistant mutant ที่มีเมธไทโอนีนอิสระสูงขึ้น พบว่า mutant MR-195 มีเมธไทโอนีนอิสระสูงกว่า mutant อื่น โดยพบว่า MR-195 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีองค์ประกอบ และสภาวะที่เหมาะสม มีเมธไทโอนีนอิสระสูงกว่า *S. cerevisiae* N1 เมื่อเลี้ยงในอาหารและสภาวะที่เหมาะสมมากถึง 33.3 เท่า นอกจากนั้นยังได้พยายามสร้างยีสต์สายพันธุ์ใหม่ทีนอกจากจะมีโปรตีนภายในเซลล์สูงแล้ว ยังมีทั้งไลซีนอิสระและเมธไทโอนีนอิสระสูงด้วย โดยเริ่มจากการผสมพันธุ์โดยใช้เทคนิคโปรโตพลาสต์ ฟิวชันระหว่าง mutant RL-6 และ mutant MR-195 แต่พบว่า fusant ที่สร้างได้ทั้งหมดมีเมธไทโอนีนอิสระต่ำกว่า MR-195 แต่เมื่อนำ MR-195 มาทำโปรโตพลาสต์ฟิวชันกันเองเพื่อเพิ่ม dose ของยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์เมธไทโอนีนและไลซีน สามารถสร้าง fusant MR-F44 และ MR-F65 ที่มีโปรตีนและเมธไทโอนีนอิสระในเซลล์สูงขึ้นกว่า MR-195 โดย MR-F44 และ MR-F65 มีโปรตีน 53.74 และ 57.85 42 กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ ตามลำดับ ในขณะที่ MR-195 มี 41.42 กรัม/100 กรัมน้ำหนักแห้งของเซลล์ อย่างไรก็ตามไลซีนอิสระในเซลล์ยังคงต่ำกว่า mutant RL-6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีไลซีนอิสระในเซลล์สูงที่มีอยู่ขณะนี้ (ชุตินา, 2542 และ สวัสดิ์ และคณะ, 2543)

วัตถุดิบสำหรับการผลิตเอธานอล

วัตถุดิบเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อต้นทุนการผลิตโดยมีค่าประมาณ 60-70% ของต้นทุนการผลิตของโรงงาน ดังนั้นในการผลิตเอธานอลจึงสมควรให้ความสำคัญต่อวัตถุดิบ วัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับนำมาผลิตเอธานอล คือ พืชที่มีน้ำตาล เช่น อ้อย และผักกาดหวาน (beet) รวมทั้งกากน้ำตาล พืชที่มีแป้ง เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ ข้าว มันฝรั่ง และมันสำปะหลัง วัสดุที่มีเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ เช่น ไม้ และส่วนเหลือของพืช และผลผลิตพลอยได้จากกระบวนการต่าง ๆ เช่น waste sulfite liquor หางนม (whey) และของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมอาหาร สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตเอธานอลในปัจจุบัน ส่วนมากใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ

กากน้ำตาลชนิด black strap molasses เป็นส่วนเหลือหลังจากตกผลึกซูโครสออกจากน้ำอ้อยที่ผ่านกรรมวิธีแล้ว เป็นของเหลวที่มีลักษณะเหนียวข้น สีเข้ม มีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบ-ไฮเดรตทั้งหมด 50-60% โดยน้ำหนัก โดยประกอบด้วยซูโครส กลูโคส และฟรุคโตส มีธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ค่อนข้างสมบูรณ์ (ตารางที่ 1) กากน้ำตาลเสียยาก เพราะมีคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นสูง ทำให้เก็บไว้ใช้ได้นาน เมื่อต้องการนำมาใช้หมักเอธานอลก็เจือจางด้วยน้ำให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลตามที่ต้องการ แต่เนื่องจากกากน้ำตาลอาจมีปริมาณธาตุอาหารที่ยีสต์ต้องการบางชนิดไม่พอเพียง ดังนั้นในการนำมาผลิตเอธานอล อาจต้องเติมธาตุ

อาหารบางอย่าง เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต หรือ แอมโมเนียมฟอสเฟต เพื่อแก้ปัญหาคาราคา
ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส สำหรับ pH ที่ใช้ในการหมัก มักปรับให้ได้ 4-5 ด้วยกรดซัลฟูริก

ในกากน้ำตาลมีสารรีดิวซ์หลายชนิดที่ยีสต์ไม่สามารถใช้สำหรับการหมักได้ ซึ่งใน
black strap molasses อาจมีสูงถึง 17% ของสารรีดิวซ์ทั้งหมด เช่น caramel, melanoidine,
acetoin, hydroxymethylfurfural และ formic acid levulonic acid นอกจากนั้น ไซโลส และ
เซลโลไบโอส เป็นสารรีดิวซ์ที่ไม่สามารถหมักได้สำหรับ *S. cerevisiae* นอกจากนั้นในกากน้ำตาล
ยังมีสารบางชนิดที่ยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ เช่น sulfur dioxide และ
hydroxymethyl-furfural รวมทั้ง inorganic ions บางชนิด (Sattler and Zerban, 1945;
Underkofler, 1954; Prescott, 1959)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบของกากน้ำตาลจากอ้อย และผักกาดหวาน (ที่ 75% น้ำหนักแห้ง)
(Kosaric et al., 1983)

		Cane	Beet
Total sugars	%	48-56	48-52
Non sugar organic matter	%	9-12	12-17
Sulfated ash	%	10-15	10-12
Total organic matter	%	60-65	63-65
Protein i.e.N x 6.25	%	2-4	6-10
Sodium	%	0.1-0.4	0.3-0.7
Potassium	%	1.5-5.0	2.0-7.0
Calcium	%	0.4-0.8	0.1-0.5
chlorine	%	0.7-3.0	0.5-1.5
phosphorus	%	0.6-2.0	0.02-0.07
Biotin	mg/kg	1.2-3.2	0.04-0.13
Folic acid	mg/kg	ca.0.04	ca.0.2
Inositol	mg/kg	ca.6000	ca.5800-8000
Ca-pantothenate	mg/kg	54-65	50-100
Pyridoxine	mg/kg	2-6.5	ca.5.4
Riboflavin	mg/kg	ca.2.5	ca.0.4
Thiamine	mg/kg	ca. 1.8	ca. 1.3
Nicotinic acid	mg/kg	20/800	20-45
choline	mg/kg	600-800	400-600

การใช้สารเคมีช่วยตกตะกอนเซลล์ยีสต์

ความสามารถในการตกตะกอนของเซลล์ยีสต์นั้น นอกจากจะเป็นลักษณะที่เกิดขึ้น
ตามสายพันธุ์หรือสภาวะแวดล้อมที่มีการเหนี่ยวนำ เช่น อุณหภูมิ แล้วยังอาจเกิดขึ้นได้เนื่องจาก
ปัจจัยอื่นอีกด้วยเช่น การเปลี่ยนแปลง pH รวมทั้งการเติมสารประกอบซึ่งอาจทำให้เกิดการเปลี่ยน

แปลงประจุ เช่น สารประกอบที่มีหมู่คาร์บอกซิล (carboxyl group) และหมู่ฟอสเฟต (phosphate group) ซึ่งทำให้เกิด neutralization ของประจุลบ (anionic charges) บนผิวเซลล์ได้ Nakamura (1961) รายงานการนำสารประกอบหลายชนิดมาช่วยตกตะกอนเซลล์ของแบคทีเรีย ยีสต์ และสาหร่าย สารช่วยการตกตะกอน (flocculent) อาจอยู่ในรูปของสารประกอบทั้งที่เป็นสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ สารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ โคติน ไคโตซาน และ เปปโตน ส่วนสารประกอบอนินทรีย์ ได้แก่ สารประกอบที่มีอนุมูลของ calcium, alum, ferric, tannic acids, titanium tetrachloride, quaternary ammonium compounds, alkyl amines, alkyl pyridinium salts

Fernandez และ Fox (1996) ทำการศึกษาการตกตะกอนโปรตีนที่ละลายน้ำได้ในเนยแข็ง ในช่วง pH 2.0-7.0 และเสนอว่าอาจใช้ไคโตซานเป็นทางเลือกหนึ่งทีนอกเหนือไปจากการกรองด้วยเทคนิค ultrafiltration และการแยกส่วนโดยใช้เอธานอล ส่วน Guerrero และคณะ (1998) ทดลองเติมสารที่ทำหน้าที่เป็น coagulants ทั้งชนิดสารอินทรีย์เช่น ไคโตซาน และสารอนินทรีย์เช่น ferrous และ aluminium salt [FeCl_3 , FeSO_4 , $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$] ในกระบวนการตกตะกอนโปรตีนจากน้ำทิ้งของโรงงานผลิตอาหารปลา พบว่าไคโตซานมีประสิทธิภาพในการตกตะกอนดีและมีช่วงการทำงานที่เหมาะสมใน pH ที่เป็นกลางระหว่าง คือ 7-8 มีผลการศึกษาที่แสดงถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นของสารแขวนลอยและปริมาณไคโตซานที่เหมาะสมที่จะนำมาตกตะกอนสารแขวนลอยได้ (Huang and Chen, 1996; Pinotti *et al.*, 1997) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อเปรียบเทียบความสามารถในการตกตะกอนของไคโตซานที่เตรียมจากแกนหมึกและกระดองปูหรือเปลือกหอย พบว่าไคโตซานที่ได้ในกรณีหลังมีประสิทธิภาพดีกว่า แต่อาจเพิ่มประสิทธิภาพของไคโตซานจากแกนหมึกได้โดยการลดกระบวนการเติมหมู่ acetyl ในกระบวนการผลิตไคโตซานจากโคตินในแกนหมึก (Shepherd *et al.*, 1997)

สำหรับอนุมูลโลหะหนักที่นิยมนำมาใช้เป็นสารช่วยการตกตะกอนมากที่สุด คือ aluminum, Al^{+3} และ iron, Fe^{+3} (Tillman, 1996 และ Droste, 1997) โดยสารประกอบ aluminum ใช้ในรูปของ aluminum sulfate หรือ liquid alum สารประกอบกลุ่มนี้สามารถตกตะกอนอนุภาคได้หลายชนิดโดยทำงานได้ในช่วง pH 5.5-7.5 ส่วนสารประกอบของเหล็กนั้น มีการใช้รูปของสารประกอบ ferric sulfate, ferrous sulfate หรือ ferric chloride ซึ่งมีราคาถูกกว่า สามารถทำให้เกิดการเกาะกลุ่มของเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่า และสารประกอบกลุ่มนี้มีการทำงานได้ในช่วง pH ที่กว้างกว่า สารประกอบในกลุ่มของ aluminum

สำหรับยีสต์นั้น Gasner and Wang (1970) พบว่าการตกตะกอนของเซลล์ยีสต์ *Candida intermedia* ขึ้นอยู่กับชนิดของสารช่วยตกตะกอน ปริมาณที่ใช้ และสภาวะการเกิดตะกอน โดยพบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการตกตะกอนได้มากถึง 99% ส่วนในกระบวนการ

ผลิตโปรตีนเซลล์เดียว มีการใช้กรดฟอสฟอริกซึ่งสามารถใช้เป็นสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ด้วย เป็นสารช่วยตะกอน (Hamer, 1979)

Weir *et al.* (1993) พบว่าโคโตแซนซึ่งเป็น cationic flocculant สามารถใช้ตกตะกอนเซลล์ยีสต์ใน complex medium ในขณะที่ปริมาณโคโตแซนต่ำสุดซึ่งจำเป็นสำหรับการตกตะกอนยีสต์ใน complex medium ไม่ได้เป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของเซลล์ แต่ขึ้นอยู่กับวิธีการเติมโคโตแซนลงไป ในชั้นเฟ้นของเซลล์ยีสต์ (Weir *et al.*, 1993) โดยแรงยึดเหนี่ยว (strength) ของตะกอนที่สร้างขึ้นโดยโคโตแซนนั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติของ suspending medium ส่วนการเติมโพลีเมอร์ที่มีประจุลบลงไป ใน suspending medium ก่อนการตกตะกอนด้วยโคโตแซนทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของการตกตะกอนมากขึ้น (Weir *et al.*, 1994)

Cubells *et al.* (1996) รายงานการเติมเปปโตเนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์ *Candida famata* (*Debaryomyces hansenii*) พบว่าเซลล์ยีสต์สามารถตกตะกอนได้อย่างรวดเร็วภายในเวลาเพียง 10 นาทีภายหลังจากการเติมเปปโตเน ทั้งการเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือเติมภายหลังจากการเก็บเกี่ยวเซลล์แล้วก็ตาม

รายงานผลการวิจัย

1. ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตเอธานอลจากกากน้ำตาล

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง

Saccharomyces cerevisiae สายพันธุ์ตกตะกอน (flocculent strain) คือ M30, AM12, TJ1, TJ3

Saccharomyces cerevisiae Sc90 สายพันธุ์ไม่ตกตะกอน (non-flocculent strain) ที่ใช้ในอุตสาหกรรมหมักแอลกอฮอล์ในประเทศไทย

2. การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อที่เลี้ยงในอาหารแข็งกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ (reducng sugar) 2% และ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ที่ 30°C นาน 1 วัน ลงในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 5% และ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% pH 4.5 (ปริมาตร 100 มล. ในฟลากล 250 มล.) บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 150-200 rpm นาน 24 ชั่วโมง สำหรับปริมาณกล้าเชื้อที่ใช้สำหรับการหมักต่อ 250 มล. อาหารหมักต้องไม่เกิน 5 มล. ถ้าใช้เกินกว่านี้ต้องทำให้กล้าเชื้อเข้มข้นขึ้นโดยการปั่นแยกเซลล์ และเตรียมเซลล์แขวนลอย (cell suspense) ใน 0.85% normal saline

3. การหมักเอธานอลในอาหารกากน้ำตาล

อาหารสำหรับหมัก คือ อาหารกากน้ำตาลที่ประกอบด้วยกากน้ำตาลปริมาณต่าง และ แอมโมเนียมซัลเฟต (0.05%) หรือยูเรีย (0.0227%) ปริมาตร 250 มล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 4.5 หรือ pH อื่น ๆ ตามที่กำหนด บรรจุใน Erlenmeyer flask 500 มล. ส่วนการบ่มทำที่ 37°C หรืออุณหภูมิอื่น ๆ ตามที่กำหนด ในเครื่องบ่มเชื้อเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 120-150 rpm หรือใน water bath reciprocal ความเร็ว 110 stroke/min

4. การวิเคราะห์

- การเจริญ: วิเคราะห์อย่างรวดเร็วโดยการวัดความขุ่น (optical density) ด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร หลังจากล้างเซลล์ด้วย 0.1N HCl 2 ครั้ง และเตรียมเซลล์แขวนลอยใน 0.85% normal saline และการหาน้ำหนักแห้ง
- เอธานอล: วิเคราะห์โดยใช้ Gas chromatography (Shimadzu GC9A with C-R3A recorder) และใช้ propanol เป็น internal standard
- น้ำตาลรีดิวซ์: ในกากน้ำตาล วิเคราะห์โดยใช้วิธีของ Lane and Eynon หรือ HPLC (Hewlett Packard, Series 1100) หลังจากทำ hydrolysis

- การตกตะกอน วัดในรูปของ Sedimentation Efficiency (S.E.) : ตามวิธีของ Limtong (1987) ดังนี้ นำ culture broth 8 มล. มาผสมกับ 0.1M EDTA 1 มล. เพื่อกระจายเซลล์ และเติมน้ำกลั่น 1 มล. วัดความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ค่าที่ได้กำหนดให้เป็นค่า A นำ culture broth อีก 8 มล. มาผสมกับ 0.1M EDTA 1 มล. และ 1M CaCl_2 , pH 5.0 เพื่อเหนียวนำให้เซลล์ รวมกลุ่มกันอีกครั้ง ตั้งไว้ 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนลงสู่ก้น นำของเหลวส่วนบนมาวัดความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ค่าที่ได้กำหนดให้เป็นค่า B คำนวณค่าการตกตะกอนตามสูตรต่อไปนี้ $S.E. = 1 - B/A$ สำหรับ S.E. มีค่า 0-1 โดย ถ้า S.E. มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าเซลล์ตกตะกอนได้สูงสุด และเมื่อค่าต่ำลงจาก 1 แสดงว่าการตกตะกอนลดลง
- การตกตะกอน วัดในรูปความสูงของตะกอน: นำ culture broth มาใส่ cylinder ขนาด 25 มล. จับเวลา และวัดความสูงของตะกอน (sediment) หลังจากตั้งไว้ 3, 6, 9, 12, 15, 30 และ 60 นาที
- วัดขนาดตะกอน โดยหยดอาหารกากน้ำตาลซึ่งหมักที่เวลาต่าง ๆ ลงบน hemacytometer ปิดด้วย cover glass ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ objective กำลังขยาย 20 เท่า และใช้วิธีวัดโดยภาพขึ้นจอทีวี นับจำนวนตะกอนเซลล์ และวัดขนาดของตะกอนโดยใช้ไม้บรรทัดวัดจากจอทีวี แล้วเทียบเป็นขนาดที่แท้จริง โดยทำ calibration ระหว่างไม้บรรทัดกับ stage micrometer
- นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยการทำ wet mount ใน methylene blue นับเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งไม่ติดสีเมื่อย้อมด้วย methylene blue และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ซึ่งติดสีน้ำเงินของ methylene blue

ผลการทดลอง

1.1 การคัดเลือก *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ตกตะกอนที่หมักเอธานอลได้สูง

จากการนำ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ตกตะกอน คือ M30, AM12, TJ1, TJ3 มาทดลองหมักเอธานอลในอาหารกากน้ำตาล เทียบกับ *S. cerevisiae* Sc90 สายพันธุ์ไม่ตกตะกอน ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ พบว่าสายพันธุ์ M30 หมักเอธานอลได้สูงใกล้เคียงกับ Sc90 ในขณะที่สายพันธุ์อื่นหมักได้ต่ำกว่า (Figure 1.1) ดังนั้นจึงได้คัดเลือก M30 สำหรับศึกษาการหมักเอธานอลและการตกตะกอนต่อไป

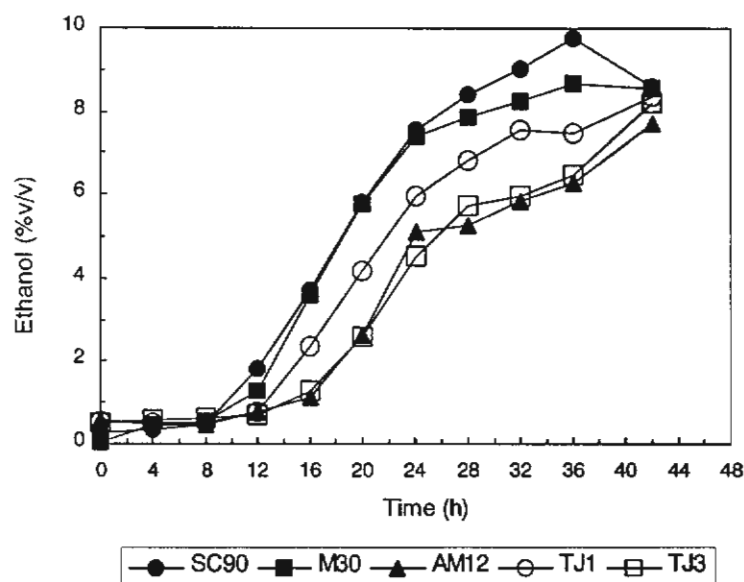


Figure 1.1 Ethanol fermentation of flocculent strains of *S. cerevisiae*, M30, AM12, TJ1 and TJ3 compared with non-flocculent ethanol fermenting strain, Sc90, in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated on rotary shaker, 150 rpm, at 37°C.

Table 1.1 Growth and ethanol fermentation of M30 and AM12 compared with Sc90 in molasses medium containing 18 % sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated on rotary shaker, 120 rpm, at 37°C.

Time (h)	Sc90		M30		AM12	
	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)
0	1.80	0.48	2.20	0.47	2.68	0.48
6	1.70	0.88	3.35	1.29	1.33	0.86
12	6.23	2.77	10.60	4.70	8.10	3.46
18	9.68	5.08	14.00	5.51	12.50	4.94
24	9.65	6.18	16.70	6.93	17.10	6.33
30	9.55	7.56	14.60	7.21	13.90	7.10
36	10.5	7.73	14.30	7.94	10.90	7.09
42	11.10	7.20	13.40	7.62	11.90	7.82
48	13.50	8.05	13.00	7.61	13.20	7.19
54	12.50	7.70	11.80	7.78	14.30	7.58
60	11.80	6.78	11.30	9.59	13.80	7.09
66	11.50	6.99	11.10	6.78	12.90	6.75

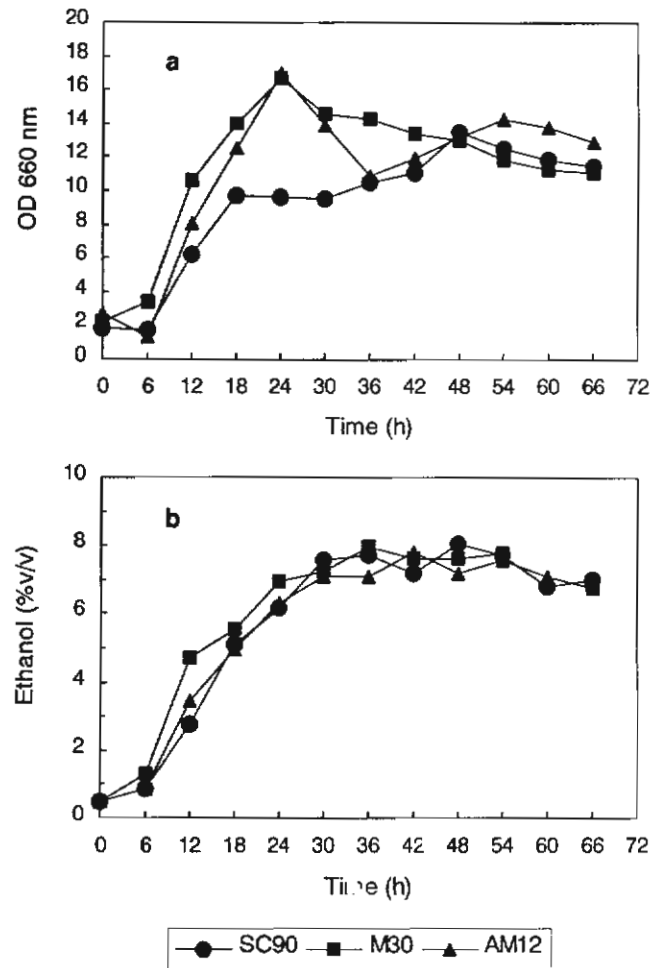


Figure 1.2 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 and AM12 compared with Sc90 in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated on rotary shaker, 120 rpm, at 37°C.

Table 1.2 Growth and ethanol fermentation of M30 and AM12 compared with Sc90 in molasses medium contained 20 % sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated on rotary shaker, 120 rpm, at 37°C.

Time (h)	Sc90		M30		AM12	
	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)
0	1.30	0.46	4.05	0.47	2.38	0.53
6	1.73	0.90	4.15	1.37	1.45	1.12
12	6.03	3.94	10.5	4.04	7.68	3.02
18	10.4	4.75	13.3	6.06	12.5	4.88
24	11.7	6.14	12.5	7.12	15.4	6.33
30	9.50	7.44	15.6	7.07	13.4	7.51
36	9.05	7.72	17.2	7.80	10.8	7.45
42	10.3	8.15	12.6	8.34	10.6	7.92
48	14.5	8.63	12.5	7.58	11.2	7.57
54	11.7	7.98	13.0	7.70	16.2	7.06
60	13.1	6.94	11.2	9.79	14.3	6.94
66	12.3	6.81	11.0	6.99	13.1	7.15

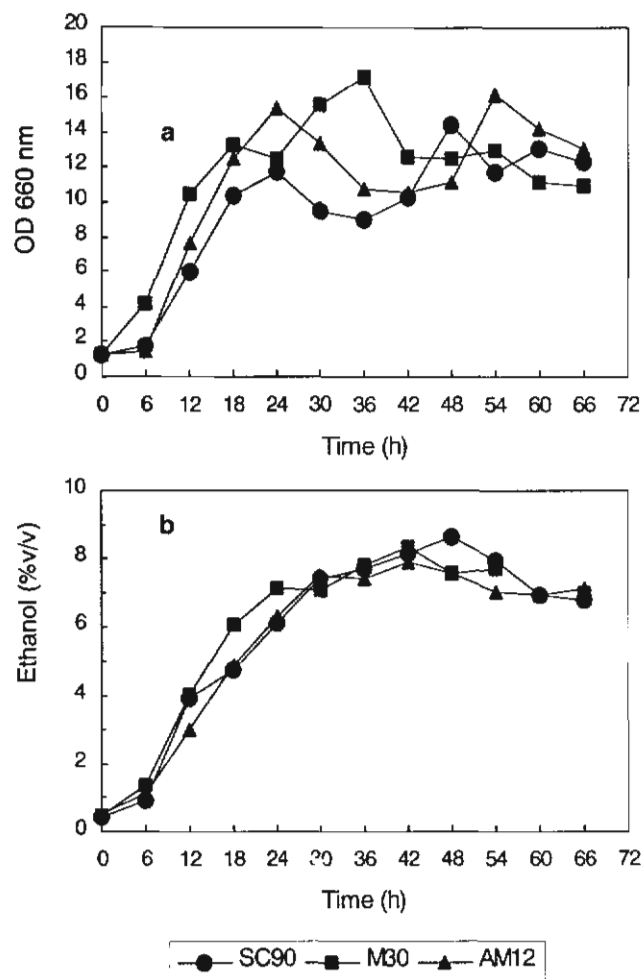


Figure 1.3 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 and AM12 compared with Sc90 in molasses medium containing 20% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated on rotary shaker, 120 rpm, at 37°C.

สำหรับการหมักในอาหารกากน้ำตาลที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน นั้น พบว่าในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 20% ยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ หมักเอทานอลได้สูงกว่าในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18% เล็กน้อย เช่นกัน โดยในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ ทั้ง 2 ความเข้มข้น เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ หมักเอทานอลได้สูงสุดที่ 36 ชั่วโมง และเมื่อหมักในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 20% w/v เป็นเวลา 36 ชั่วโมง เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ หมักเอทานอลได้สูงกว่าเมื่อหมักในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18% โดย Sc90 กับ M30 ยังคงผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง แสดงว่าอัตราการหมักเอทานอลในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 20% w/v ยังคงเท่ากับการหมักในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18% โดยทั้ง 3 สายพันธุ์ หมักเอทานอลได้สูงสุดที่ 36 ชั่วโมง ให้เอทานอลใกล้เคียงกัน คือ M30 ให้

เอทานอล 7.68%v/v Sc90 และ AM12 ให้เอทานอล 7.45 และ 7.42%v/v ตามลำดับ (Table 1.3, 1.4 และ Figure 1.4, 1.5)

จากผลการทดลองข้างต้นแสดงว่าการหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาลที่มีแหล่งไนโตรเจน เป็นแอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรีย ไม่มีความแตกต่างที่ชัดเจน แต่การเจริญของ Sc90 และ AM12 ในอาหารกากน้ำตาลที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนสูงกว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเล็กน้อย ในขณะที่ M30 เจริญเท่า ๆ กันในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนทั้ง 2 ชนิด

Table 1.3 Growth and ethanol fermentation of M30 and AM12 compared with Sc90 in molasses medium containing 18 % sucrose equivalent sugar concentration and 0.0227% urea, and incubated on rotary shaker, 120 rpm, at 37°C.

Time (h)	Sc90		M30		AM12	
	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)
0	2.2	0.56	3.0	0.52	4.7	0.50
6	2.2	1.19	6.6	2.01	4.7	1.02
12	6.2	3.15	10.7	4.35	10.6	3.30
18	10.5	5.29	10.6	6.25	15.5	5.08
24	12.9	6.27	14.3	6.55	17.7	6.14
30	15.1	7.01	16.3	7.36	17.3	6.37
36	17.7	7.45	16.0	7.68	17.6	7.42
42	16.3	7.08	13.2	6.45	18.4	6.44
48	14.8	7.11	10.3	6.55	16.6	6.37
54	13.3	6.47	14.2	6.65	17.3	6.66
60	14.5	6.59	11.8	7.29	14.9	7.16
66	15.7	6.20	11.0	6.43	14.6	5.88

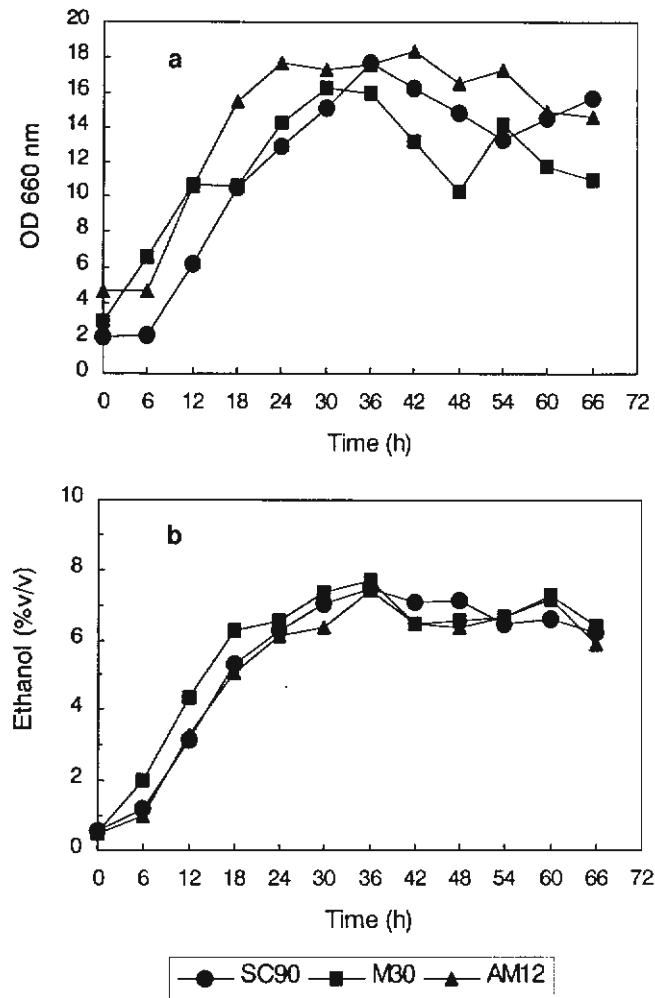


Figure 1.4 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 and AM12 compared with Sc90 in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.0227%, and incubated on rotary shaker, 120 rpm, at 37°C.

Table 1.4 Growth and ethanol fermentation of **M30** and **AM12** compared with **Sc90** in molasses medium containing 20 % sucrose equivalent sugar concentration and 0.0227% urea, and incubated on rotary shaker, 120 rpm, at 37°C.

Time (h)	Sc90		M30		AM12	
	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)
0	2.1	0.60	1.7	0.52	1.7	0.52
6	2.2	0.92	4.1	1.34	3.1	0.87
12	7.6	2.60	7.9	4.09	9.2	3.11
18	12.3	4.71	8.3	5.55	14.1	4.71
24	12.9	6.06	12.9	6.42	17.2	5.85
30	13.9	7.00	14.5	7.26	18.5	7.04
36	16.7	8.11	13.8	8.04	18.1	8.05
42	14.2	7.74	11.7	7.42	16.1	7.25
48	14.2	7.56	11.6	7.54	16.1	7.33
54	11.4	7.07	12.5	7.53	15.7	7.51
60	15.4	7.48	8.6	6.65	14.3	7.39
66	14.8	6.59	9.2	6.84	13.7	7.06

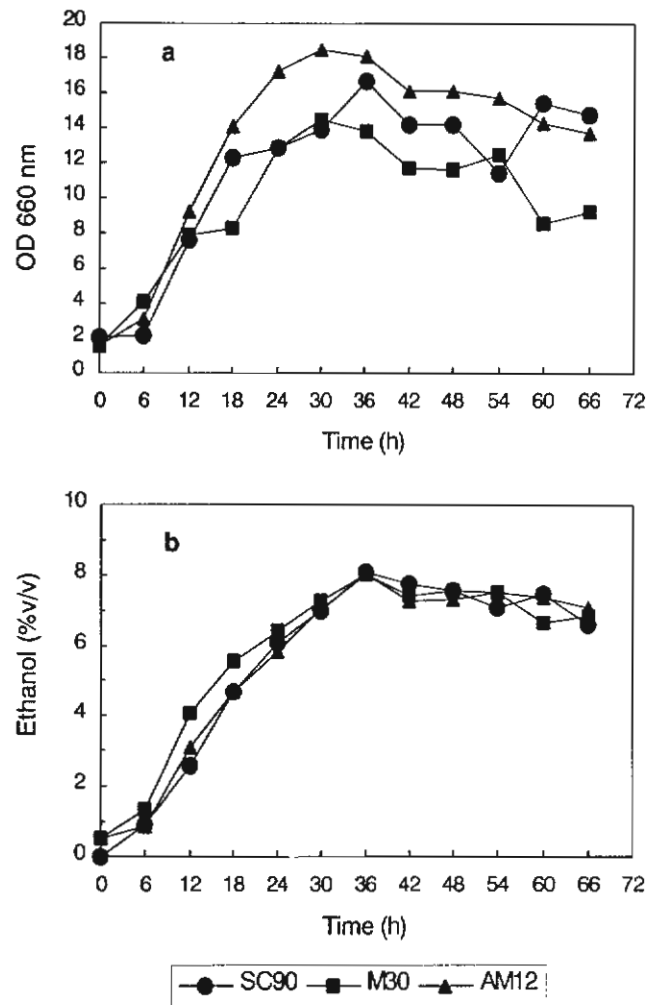


Figure 1.5 Growth (a) ethanol fermentation (b) of M30 and AM12 compared with Sc90 in molasses medium containing 20% sucrose equivalent sugar concentration and 0.0227% urea, and incubated on rotary shaker, 120 rpm, at 37°C.

สำหรับการตกตะกอนเมื่อวัดในรูปของ S.E. นั้น แสดงว่า M30 ตกตะกอนได้ปานกลาง ในขณะที่ AM12 ตกตะกอนต่ำ และ SC90 ไม่ตกตะกอน และผลการตกตะกอน ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้น 18 และ 20% ไม่มีความแตกต่างกัน (Table 1.5 และ 1.6)

Table 1.5 Flocculation expressed as S.E. of cells of M30, AM12 and Sc90 after cultivation in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.0227% urea in rotary shaker, 120 rpm, at 37°C, for 66 h.

Strain of <i>S. cerevisiae</i>	S.E.
Sc90	0.018
M30	0.45
AM12	not determine (error)

Remark: S.E. = 1.0 was the highest flocculation

Table 1.6 Flocculation expressed as S.E. of M30 and AM12 compared with Sc90 after cultivation in molasses medium containing 20% w/v sucrose equivalent sugar concentration and 0.0227% urea in rotary shaker, 120 rpm, at 37°C, for 66 h.

Strain of <i>S. cerevisiae</i>	S.E.
Sc90	0.00
M30	0.45
AM12	0.10

Remark: S.E. = 1.0 indicated the highest flocculating ability

1.3 การหมักเอธานอลในอาหารกากน้ำตาลที่ อุณหภูมิต่างๆ

ทดสอบการหมักเอธานอลของ *S. cerevisiae* M30 และ AM12 เทียบกับ Sc90 ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18% และมีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ที่อุณหภูมิ 33, 35, 37 และ 40 °C

สำหรับการหมักที่ 33°C นั้น พบว่าทุกสายพันธุ์หมักเอธานอลได้สูงสุดที่เวลา 36 ชั่วโมง โดย Sc90 ให้เอธานอลสูงสุด คือ 10.96 % v/v ในขณะที่ M30 และ AM12 ให้เอธานอลเท่า ๆ กัน คือ 9.66 และ 9.69 % v/v ตามลำดับ ส่วนการเจริญนั้นพบว่า AM12 เจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น (Table 1.7 และ Figure 1.6) ส่วนการตกตะกอนซึ่งวัดเป็นค่า S.E. เมื่อสิ้นสุดการทดลอง คือเมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 48 ชั่วโมง พบว่า M30 ตกตะกอนได้สูงกว่า AM12 (Table 1.8)

Table 1.7 Growth and ethanol fermentation of M30 and AM12 compared with Sc90 in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated in water bath reciprocal shaker, 110 stroke/min, at 33°C.

Time (h)	Sc90			M30			AM12		
	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	RS (%w/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	RS (%w/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	RS (%w/v)
0	2.63	0.06	18.41	1.98	0.04	18.99	3.50	0.06	19.42
6	2.95	0.54	17.85	3.30	0.61	18.44	4.35	0.31	18.04
12	8.55	2.66	16.76	7.78	2.30	16.94	9.78	1.76	17.81
18	13.85	5.70	14.06	11.50	4.84	14.36	13.35	4.53	14.06
24	15.28	7.76	6.56	13.00	6.65	7.85	17.00	6.64	7.98
30	16.38	9.12	2.70	12.90	8.26	3.43	20.05	7.89	3.87
36	18.08	10.96	1.78	19.05	9.66	2.90	20.68	9.69	2.39
42	15.98	9.61	2.38	16.53	8.97	2.78	24.05	8.99	1.87
48	16.85	8.27	2.52	14.33	8.44	3.35	24.75	8.66	2.42

Table 1.8 Flocculation expressed as S.E. of cells of M30 and AM12 compared with Sc90 after cultivation in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate in water bath reciprocal shaker, 110 stroke/min, at 33°C for 48 h.

Strain of <i>S. cerevisiae</i>	Sedimentation efficiency
Sc90	0.12
M30	0.68
AM12	0.27



Flocculent strain

Non-flocculent strain



Flocculation of flocculent strain of *S. cerevisiae* in yeast extract peptone glucose broth.



Sedimentation of flocculent



Sedimentation of non-flocculent strain



Flocculation of *S. cerevisiae* M30 in molasses medium.



Clump of cells on Erlenmeyer flask's wall of *S. cerevisiae* M30 cultivated in molasses medium.

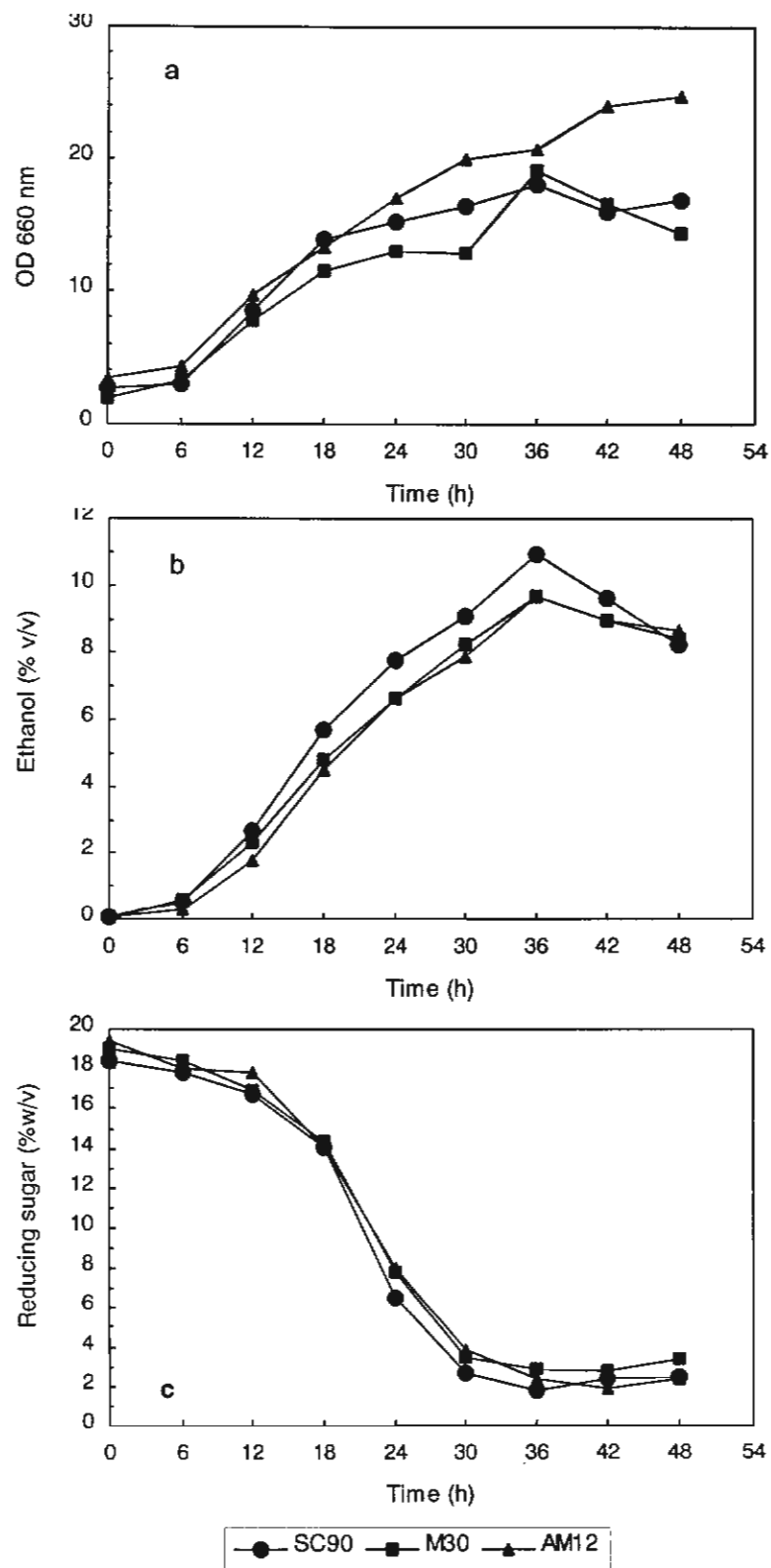


Figure 1.6 Growth (a), ethanol fermentation (b) and sugar utilization (c) of M30 and AM12 compared with Sc90 in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated in water bath reciprocal shaker, 110 stroke/min, at 33°C.

จากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 35 °C นั้น เมื่อหมัก M30 นาน 30 ชั่วโมง ให้เอทานอล 8.48 % v/v ซึ่งเท่า ๆ กับที่ Sc90 หมักได้สูงสุด 8.42 % v/v ที่เวลา 30 ชั่วโมง ในขณะที่ AM12 หมักได้ช้ากว่า คือ ให้เอทานอล 8.41% v/v ที่ 48 ชั่วโมง สำหรับการเจริญนั้นพบว่า AM12 เจริญได้สูงกว่าอีก 2 สายพันธุ์ มาก (Table 1.9 และ Figure 1.7) สำหรับการตกตะกอนที่แสดงโดยค่า S.E. เมื่อสิ้นสุดการทดลอง คือ 60 ชั่วโมงนั้น พบว่า M30 ตกตะกอนได้ดีกว่า AM12 ในขณะที่ Sc90 ไม่ตกตะกอนเช่นเดียวกับในสภาวะอื่น ๆ (Table 1.10)

Table 1.9 Growth and ethanol fermentation of M30 and AM12 compared with Sc90 after cultivation in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate in reciprocal shaker, 110 stroke/min, at 35 °C.

Time (h)	Sc90			M30			AM12		
	OD (660nm)	EtOH (%v/v)	RS (%w/v)	OD (660nm)	EtOH (%v/v)	RS (%w/v)	OD (660nm)	EtOH (%v/v)	RS (%w/v)
0	1.40	0.16	17.45	1.36	0.12	18.18	2.03	0.18	17.54
6	1.90	0.61	16.98	1.80	1.13	17.64	2.28	0.05	17.22
12	6.30	2.61	11.06	10.00	3.45	10.28	6.45	1.84	11.97
18	12.10	4.71	6.93	16.10	5.69	7.02	12.00	5.00	9.32
24	16.10	7.91	6.78	18.00	7.51	7.14	16.30	6.67	5.55
30	18.90	8.42	6.28	18.40	8.48	7.17	19.80	7.92	3.36
36	16.60	8.18	6.71	14.60	8.17	1.62	23.40	8.10	2.54
42	17.10	8.27	6.84	15.50	8.32	2.10	27.00	8.26	2.82
48	14.70	8.41	6.85	15.50	8.57	1.50	21.50	8.41	2.84
54	18.20	6.71	6.78	24.90	6.61	1.33	21.50	6.60	1.85
60	15.20	6.88	6.67	14.80	6.82	1.66	19.40	6.73	2.34

Table 1.10 Flocculation expressed as S.E. of cell of M30 and AM12 compared with Sc90 after cultivation in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate in reciprocal shaker, 110 stroke/min, at 33 °C for 60 h.

Strain of <i>S. cerevisiae</i>	S.E.
Sc90	0.072
M30	0.462
AM12	0.210

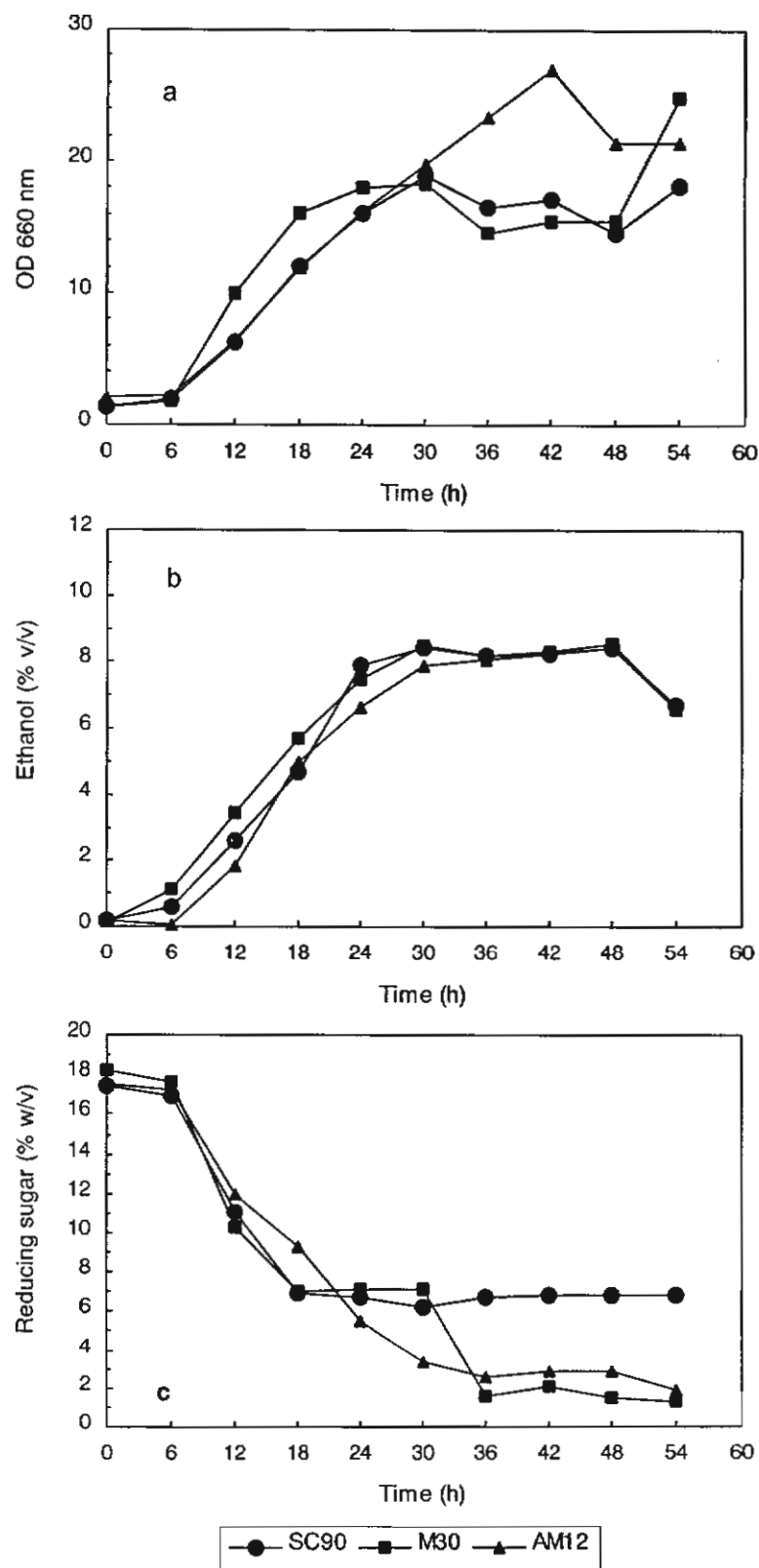


Figure 1.7 Growth (a), ethanol fermentation (b) and sugar utilization (c) of M30 and AM12 compared with Sc90 in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated on reciprocal shaker, 110 stroke/min, at 35°C.

สำหรับการหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาลที่อุณหภูมิ 37°C นั้นยังไม่ได้นำ AM12 มาทดลองด้วย เนื่องจากแสดงการตกตะกอนต่ำกว่า M30 มาก จากการทดลองพบว่าการเลี้ยงทั้ง M30 และ Sc90 ที่อุณหภูมิสูง 37°C มีผลให้ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีการเจริญต่ำลงประมาณครึ่งหนึ่งของการเจริญที่ 35°C เมื่อพิจารณาการหมักเอทานอลของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ลดลงประมาณครึ่งหนึ่งเช่นกัน โดย M30 ให้เอทานอลสูงสุด 5.00 %v/v ที่ 36 ชั่วโมง และให้เอทานอล 4.75 %v/v ที่ 30 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับ Sc90 ที่ให้เอทานอลสูงสุด 4.73 %v/v ที่ 30 ชั่วโมง (Table 1.11 และ Figure 1.8) สำหรับการตกตะกอนนั้น M30 ยังคงแสดงการตกตะกอนได้ตามปกติ (Table 1.12)

Table 1.11 Growth and ethanol fermentation of M30 compared with Sc90 in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated on reciprocal shaker, 110 stroke/min, at 37°C.

Time (h)	Sc90		M30	
	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)	OD (660 nm)	EtOH (%v/v)
0	2.13	0.09	2.15	0.10
6	0.10	0.16	0.15	0.30
12	2.63	0.47	3.75	1.16
18	4.38	0.91	9.55	1.99
24	5.58	2.24	9.75	3.28
30	6.43	4.73	5.80	4.75
36	8.38	4.51	9.10	5.00
42	8.63	4.20	8.88	4.84
48	8.50	4.07	6.95	3.76

Table 1.12 Flocculation expressed as S.E. of cells of M30 compared with Sc90 after cultivation in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate in reciprocal shaker, 110 stroke/min, at 37°C for 48 h.

Strain of <i>S. cerevisiae</i>	S.E.
Sc90	0.06
M30	0.50

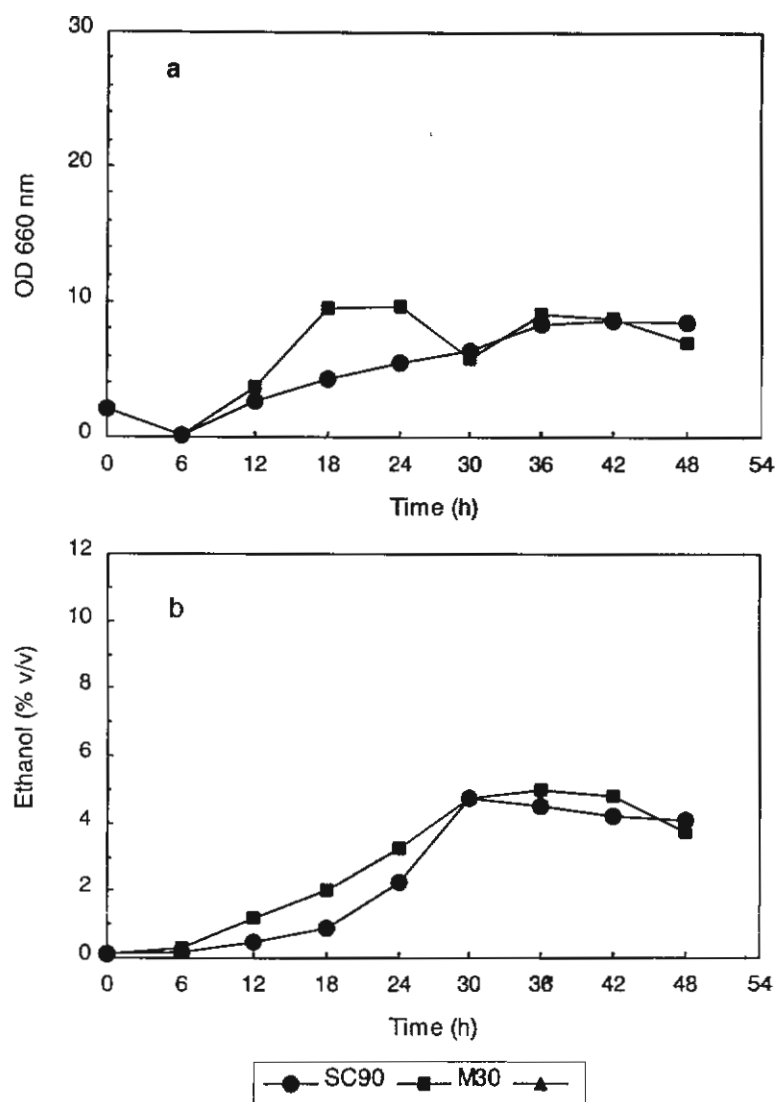


Figure 1.8 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 compared with Sc90 in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated in water bath reciprocal shaker, 110 stroke/min, at 37°C.

สำหรับที่ 40°C นั้น พบว่าทั้ง M30 และ Sc90 ไม่สามารถเจริญได้ (Figure 1.9)

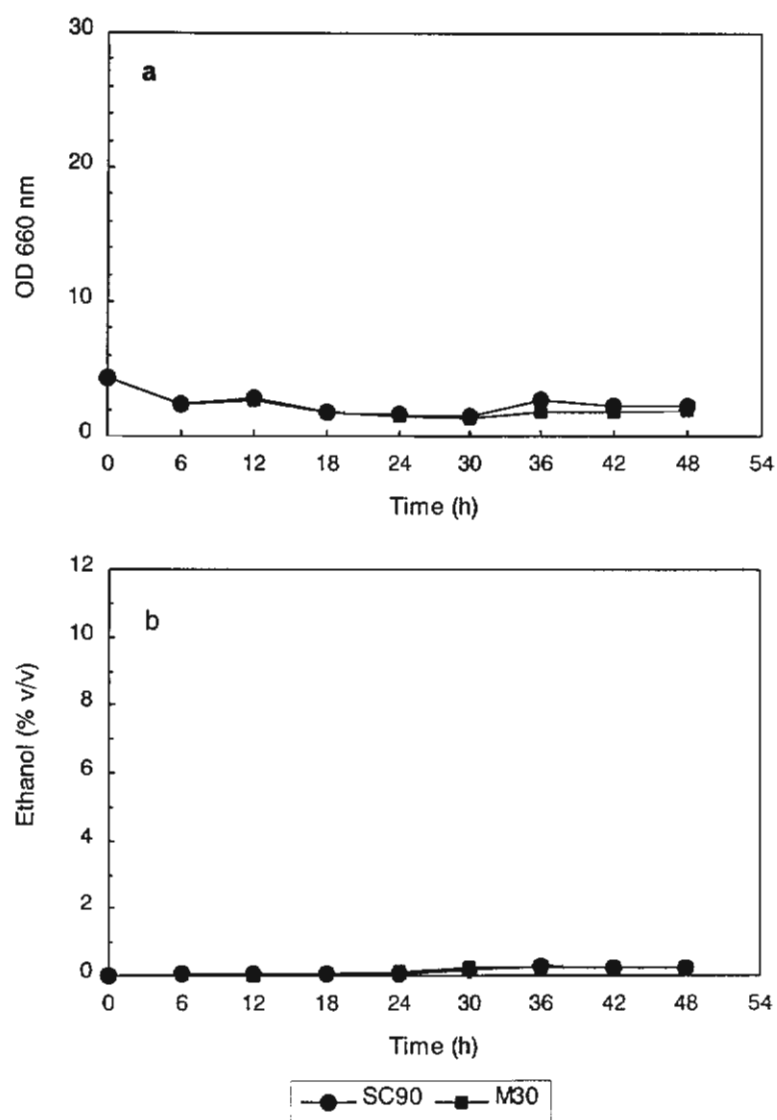


Figure 1.9 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 compared with Sc90 in molasses medium containing 18% sucrose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, and incubated on reciprocal shaker, 110 stroke/min, at 40°C.

1.4 การหมักเอทานอลของ M30 ในอาหารกากน้ำตาล ที่ pH 4.0, 4.5 และ 5.0 ที่ 33 °C

เพื่อให้รู้ถึงผลของ pH ต่อการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* M30 จึงทดลองนำ มาหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีเวิร์ซ 18% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% โดยปรับ pH ของอาหารให้เท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 โดยใช้ hydrochloric acid และ sulfuric acid ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ สำหรับการปรับ pH ทำการหมักในฟลาสก์ และ บ่มใน water bath shaker ที่ 110 ครั้ง/นาที

1.4.1 การหมักเอทานอลของ M30 ในอาหารกากน้ำตาล ที่ปรับ pH ด้วย 50% HCl และ บ่มที่ 33 °C

จากการทดลองหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาลที่ปรับ pH เริ่มต้นด้วย 50% HCl ให้เท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 และบ่มใน water bath shaker ที่ 33 °C พบว่าในอาหารที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 เชื้อ M30 เจริญได้ดี่มาก ส่วนอาหารกากน้ำตาลที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 นั้น M30 เจริญได้สูงกว่า pH 5.0 สำหรับการหมักเอทานอลนั้น พบว่าที่ pH เริ่มต้น 5.0 M30 หมักเอทานอลได้ดีกว่าที่ pH 4.5 เล็กน้อย โดยให้เอทานอลสูงกว่าในระยะ 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก แต่หลังจากนั้นความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้ไม่แตกต่างกัน (Table 1.13 and Figure 1.10)

Table 1.13 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate) that pH was adjusted to 4.0, 4.5 and 5.0 by HCl. Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 33°C.

Time (h)	pH 4.0		pH 4.5		pH 5.0	
	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v
0	2.20	0.07	2.10	0.08	2.33	0.07
6	3.60	0.10	5.48	0.63	4.45	1.19
12	4.15	0.04	12.98	3.55	9.98	5.54
18	4.30	0.01	22.98	6.14	16.78	6.88
24	3.35	0.05	28.00	6.64	18.45	7.28
30	3.90	0.27	16.93	6.85	12.75	6.46
36	4.65	0.11	16.50	7.72	15.23	7.89
42	5.18	0.16	24.33	7.83	11.30	7.65
48	5.15	0.43	17.35	7.37	8.65	7.38

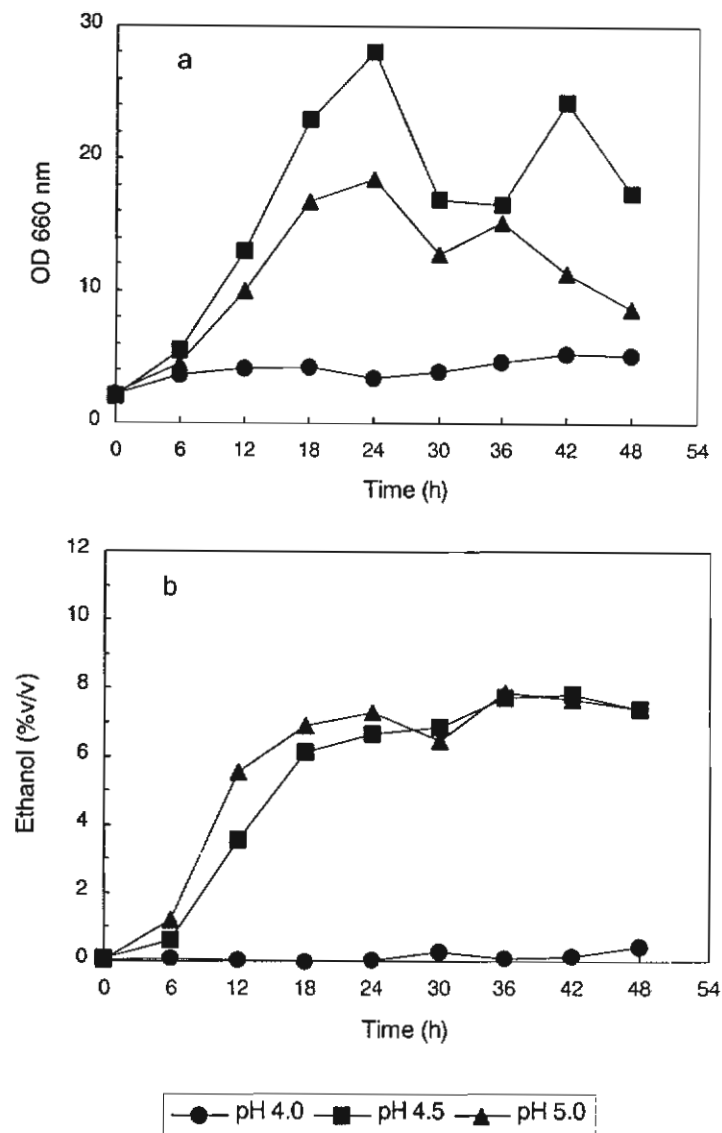


Figure 1.10 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate) that pH was adjusted to 4.0, 4.5 and 5.0 by 50% HCl. Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 33°C.

1.4.2 การหมักเอทานอลของ M30 ในอาหารกากน้ำตาล ที่ปรับ pH ด้วย H_2SO_4 และบ่มที่ 33 °ซ

ได้ทดลองการหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาลที่ปรับให้มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 ด้วย 10% H_2SO_4 ในฟลasks และบ่มใน water bath shaker ที่ 33 °ซ เพื่อยืนยันว่าการปรับ pH ด้วย HCl ความเข้มข้นสูงถึง 50% ไม่ได้ทำให้ M30 มีการเจริญ และการหมักเอทานอลผิดไป โดยเฉพาะที่ pH 4.0 ซึ่งพบว่า M30 มีการเจริญต่ำมาก

ผลจากการทดลองแสดงว่าที่ pH 4.0 นั้น M30 เกือบไม่มีการเจริญ ในขณะที่การเจริญในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5.0 ดีกว่าที่ pH 4.5 ซึ่งต่างจากอาหารกากน้ำตาลที่ปรับ pH ด้วย 50% HCl สำหรับการหมักเอทานอลนั้น ในอาหารที่มี pH 5.0 M30 หมักเอทานอลได้เร็วกว่า ที่ pH 4.5 ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก แต่หลังจากนั้นความเข้มข้นสูงสุดของเอทานอลที่ M30 ผลิตได้ เมื่อหมักในอาหารที่มี pH 4.5 และ 5.0 เท่ากัน เช่นเดียวกับที่พบในอาหารกากน้ำตาลที่ปรับ pH ด้วย 50% HCl (Table 1.14 and Figure 1.11).

Table 1.14 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate) that pH was adjusted to 4.0, 4.5 and 5.0 by 10% H₂SO₄. Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 33°C.

Time (h)	pH 4.0		pH 4.5		pH 5.0	
	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v
0	2.46	0.15	1.23	0.16	1.98	0.18
6	2.85	0.23	3.65	1.01	3.70	2.55
12	3.60	0.33	6.65	2.89	14.85	5.70
18	3.85	1.00	8.48	5.06	13.83	6.77
24	3.15	1.95	7.80	6.62	14.90	7.08
30	3.08	3.17	6.90	7.07	16.30	6.95
36	3.60	4.25	12.75	6.99	10.48	7.34
42	3.95	5.80	11.73	7.06	14.33	7.29
48	3.45	6.65	12.93	6.33	20.25	6.74

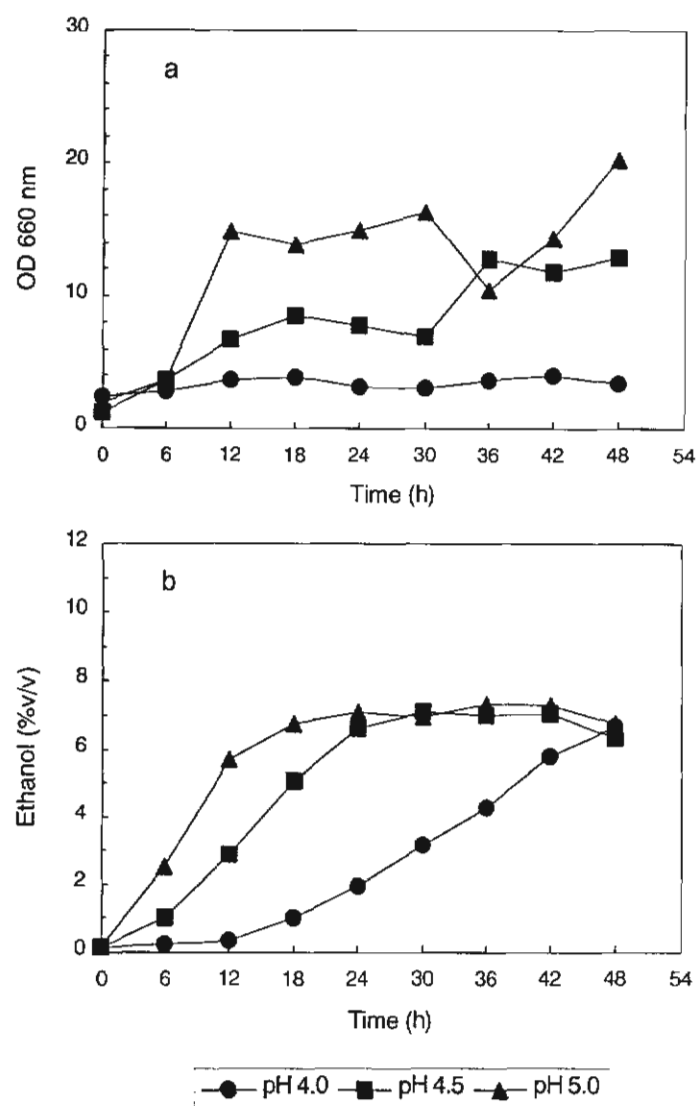


Figure 1.11 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate) that pH was adjusted to 4.0, 4.5 and 5.0 by 10% H_2SO_4 . Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 33°C.

1.4.3 การหมักเอทานอลของ M30 และ Sc90 ในอาหารกากน้ำตาล ที่ปรับ pH เป็น 4.0 ด้วย H_2SO_4 ที่ 33 °ซ

จุดประสงค์ของการทดลองนี้ คือ เพื่อหา Sc90 สามารถเจริญหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาลที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 โดย 10% H_2SO_4 ได้หรือไม่ หรือเฉพาะ M30 เท่านั้นที่ไม่เจริญหรือเจริญน้อยมากใน pH ดังกล่าว ผลจากการทดลองแสดงว่า ทั้งสองสายพันธุ์เจริญได้ดีมาก ๆ เช่นเดียวกับ M30 ในการทดลองที่ผ่านมา (Table 1.15)

Table 1.15 Growth and ethanol fermentation of M30 and Sc90 in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate) that pH was adjusted to 4.0 by 10% H_2SO_4 . Incubation was performed in water bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 33 °C.

Time (h)	M30		Sc90	
	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v
0	1.75	0.22	1.33	0.23
6	1.63	0.24	1.50	0.25
12	1.68	0.27	1.75	0.26
18	1.98	0.29	1.90	0.29
24	2.20	0.31	2.00	0.33
30	2.18	0.32	2.20	0.31
36	1.43	0.33	1.70	0.37
42	1.55	0.33	1.80	0.34
48	1.33	0.37	1.78	0.41
54	1.90	0.39	1.50	0.49

1.4.4 การหมักเอทานอลของ M30 ในอาหารกากน้ำตาล ที่ปรับ pH ด้วย 10% HCl และ บ่มที่ 35 °ซ

ได้ทดลองนำ M30 มาหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาลที่ปรับ pH เริ่มต้นให้เท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 อีกครั้งหนึ่ง โดยใช้ 10% HCl เป็นตัวปรับ pH และหมักที่อุณหภูมิ 35 °ซ พบว่าผลการทดลองเป็นไปในทำนองเดียวกันกับที่ใช้ 50% HCl และ 10% H_2SO_4 ปรับ pH

เพียงแต่ว่าในอาหารที่ปรับให้เริ่มต้น pH เท่ากับ 4.0 นั้น M30 เจริญ และหมักเอธานอลได้เล็กน้อย ในขณะที่การเจริญในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเป็น 5.0 เร็วกว่า และให้เซลล์มากกว่าที่ pH 4.5 เช่นเดียวกับการเจริญในอาหารที่เริ่มต้นเท่ากับ pH 5.0 นั้น M30 หมักเอธานอลได้เร็วกว่าที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ใน 30 ชั่วโมงแรกของการหมัก แต่เมื่อหมักนาน 36 ชั่วโมง เอธานอลที่ M30 ผลิตได้ในอาหารที่มี pH 4.5 เพิ่มขึ้นมาเท่ากับในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้น เท่ากับ 5.0 คือ 7.37 และ 7.30 %v/v โดยในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 นั้น M30 ยังคงหมักให้เอธานอลเพิ่มเป็น 7.61 %v/v ที่ 42 ชั่วโมง ในขณะที่ในอาหารที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 นั้น หยุดหมักและมีความเข้มข้นของเอธานอลลดลง (Table 1.16 and Figure 1.12)

Table 1.16 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate) that pH was adjusted to 4.0, 4.5 and 5.0 by 10% HCl. Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 35°C.

Time (h)	pH 4.0		pH 4.5		pH 5.0	
	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v
0	1.04	0.38	0.98	0.35	1.99	0.35
6	1.09	0.37	1.89	1.40	5.25	2.37
12	2.04	0.53	4.97	2.76	8.05	4.15
18	2.72	0.94	6.19	4.30	6.10	6.38
24	3.52	0.99	6.60	6.10	9.90	6.60
30	4.39	1.62	8.24	6.60	7.30	7.16
36	4.57	3.33	7.49	7.37	6.53	7.30
42	6.69	3.94	4.59	7.61	6.80	5.51
48	6.72	5.60	6.14	5.51	6.63	4.76

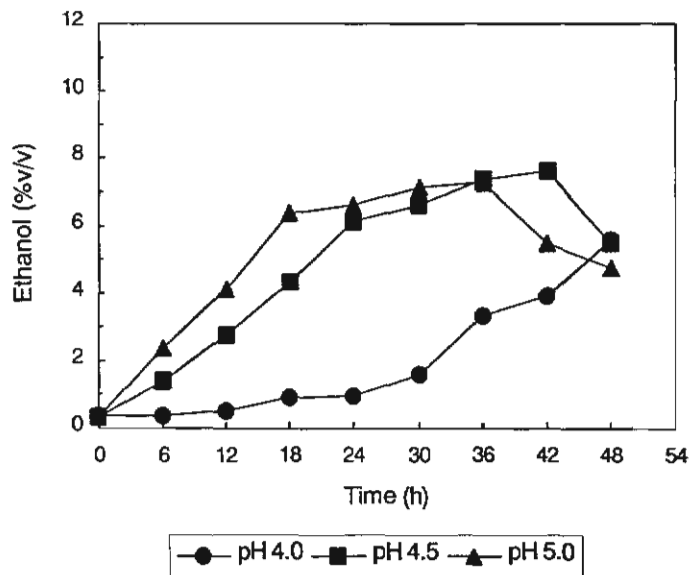


Figure 1.12 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate) that pH was adjusted to 4.0, 4.5 and 5.0 by 10% HCl. Incubation was performed in water bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 35°C.

1.5 การหมักเอทานอลของ M30 ในอาหารกากน้ำตาล ที่เติมโปแตสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต ที่ 35 °ซ

ฟอสฟอรัสเป็น ionic factor ที่มีความสำคัญต่อการหมัก ปกติใส่ลงในอาหารในรูปของ ฟอสเฟต เนื่องจากในอาหารกากน้ำตาลอาจมีปริมาณฟอสฟอรัสไม่เพียงพอความต้องการ สำหรับการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* M30 ดังนั้นจึงทดลองเติมโปแตสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต 0.01 และ 0.05 % ลงในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ที่ปรับ pH เท่ากับ 4.5 ทำการหมักในฟลาสก์ และบ่มใน water bath shaker 110 ครั้ง/นาที ที่ 35°C

ผลการทดลองที่แสดงว่าเติมโปแตสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต 0.01 และ 0.05 % ลงในอาหารกากน้ำตาล มีผลให้เชื้อเจริญเพิ่มขึ้นจากอาหารที่ไม่ได้เติมโปแตสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต แต่เมื่อพิจารณาการหมักพบว่า การเติมโปแตสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต 0.01% M30 หมักเอทานอลได้เท่า ๆ กับในอาหารที่ไม่ได้เติมโปแตสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต โดยให้เอทานอล 7.35 และ 7.52% v/v ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนในอาหารที่ไม่ได้เติมโปแตสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต ให้เอทานอล 7.03 และ 7.46% v/v ที่เวลา 24 และ 36 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการเติม

โปแตสเซียมไดไฮโดรฟอสเฟต 0.05% นั้น เชื้อกลับหมักเอทานอลได้ช้าลง โดยให้เอทานอล 7.28% v/v เมื่อหมักนานถึง 48 ชั่วโมง (Table 1.4 และ Figure 1.13) ส่วนการตกตะกอนของเซลล์นั้น พบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่เติม โปแตส-เซียมไดไฮโดรฟอสเฟต 0.01 และ 0.05 % อายุ 48 ชั่วโมง มีการตกตะกอนวัดในรูปของ S.E. เท่ากับ 0.56, 0.44 และ 0.57 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันนัก

ผลการทดลองชี้ว่าฟอสฟอรัสที่มีอยู่ในอาหารกากน้ำตาลเพียงพอกับความต้องการเจริญสำหรับ และการหมักของเอทานอล และการมีฟอสฟอรัสในรูปของฟอสเฟตมากเกินไปน่าจะมีผลยับยั้งการหมักเอทานอลของ M30

Table 1.17 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate pH 4.5) containing , 0.01 and 0.05% potassium dihydrogen phosphate. Incubation was performed in water bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 35°C.

Time (h)	0% KH ₂ PO ₄		0.01% KH ₂ PO ₄		0.05% KH ₂ PO ₄	
	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v
0	0.14	0.24	1.53	0.18	1.81	0.20
12	18.48	3.93	15.13	4.19	13.56	4.16
24	21.61	7.03	18.73	7.35	19.48	6.68
36	29.00	7.40	16.00	7.53	20.80	6.81
48	29.35	7.14	13.13	6.90	25.63	7.28

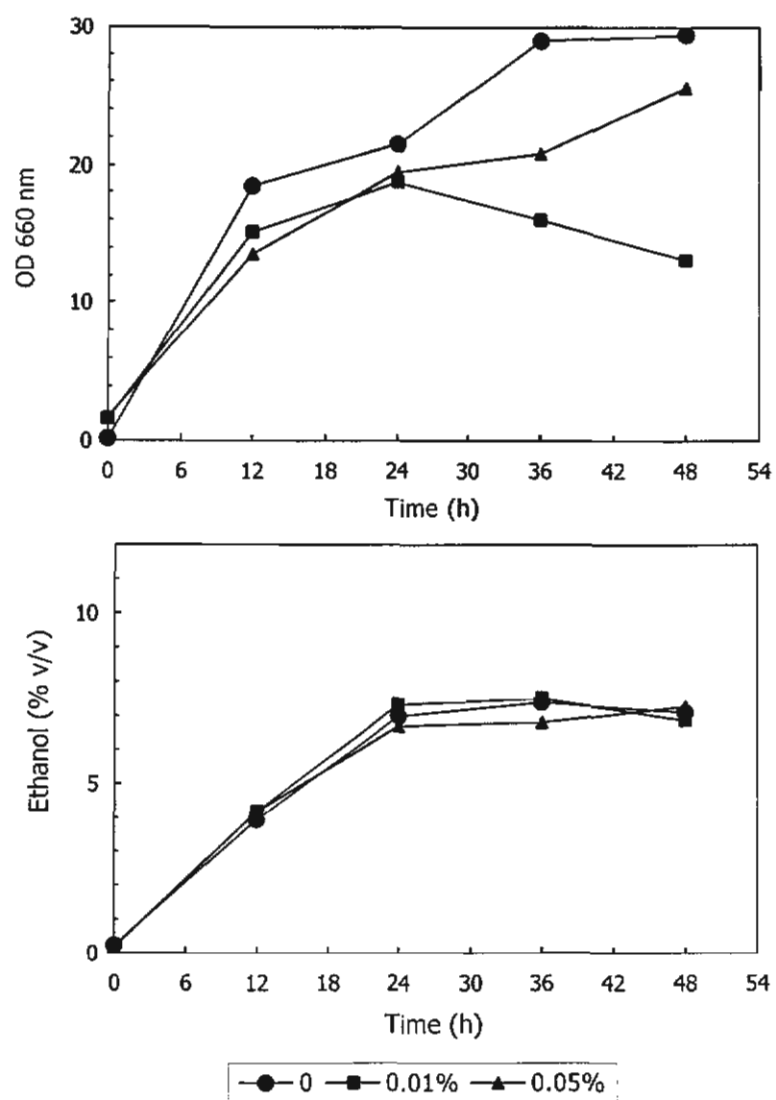


Figure 1.13 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate pH 4.5) containing , 0.01 and 0.05% potassium dihydrogen phosphate. Incubation was performed in water bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 35°C.

1.6 การตกตะกอนของ M30 ระหว่างการหมักเอธานอล ในกากน้ำตาลที่อุณหภูมิสูง

ศึกษาการตกตะกอนของของ M30 เมื่อหมักในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% และ pH 4.5 ในถังหมัก ที่อุณหภูมิ 37, 35, 33 และ 30 °C โดยการวิเคราะห์ตกตะกอนโดยการวัดความสูงของตะกอน ที่เกิดจากการนำ culture broth มาใส่ใน cylinder ขนาด 25 มล. และตั้งไว้จนมีการตกตะกอนวัดความสูงของตะกอน ที่เวลาต่าง ๆ และหา sedimentation efficiency ในการทดลองไม่ได้ปรับให้เซลล์ใน culture broth มีความเข้มข้นเท่ากัน เนื่องจากไม่ต้องการทำให้เซลล์ได้รับความกระทบกระเทือน ที่อาจมีผลต่อการเกาะกลุ่มซึ่งหมายถึงการตกตะกอนของเซลล์ได้

ในกรณีของการหมักที่ 33 และ 35 °C นอกจากวัดความสูงของตะกอนแล้ว ยังได้ทำการวัดขนาดตะกอน โดยหยดอาหารกากน้ำตาลซึ่งหมักที่เวลาต่าง ๆ ลงบน hemacytometer ปิดด้วย cover glass ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ objective กำลังขยาย 20 เท่า และใช้วิธีไดอะแกรมพลาซิมโฟทมิ นับจำนวนตะกอนเซลล์ และวัดขนาดของตะกอนโดยใช้ไม้มบรรทัดวัดจากจอทวิ แล้วเทียบเป็นขนาดที่แท้จริง โดยทำ calibration ระหว่างไม้มบรรทัดกับ stage micrometer นอกจากนั้นนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยการทำ wet mount ใน methylene blue นับเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งไม่ติดสีเมื่อย้อมด้วย methylene blue และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ซึ่งติดสีน้ำเงินของ methylene blue เพื่อให้รู้เปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่ยังคงมีชีวิตในขณะที่ทำการหมัก เพื่อให้ประเมินว่าเซลล์ที่มีอายุช่วงใดยังคงเหมาะที่จะนำกลับไปใช้ใหม่ (recycle) เพื่อใช้เป็นข้อมูลสำหรับการพัฒนาประสิทธิภาพการหมักเอธานอลของโครงการย่อยที่ 2

1.6.2 ศึกษาการตกตะกอนของของ M30 เมื่อหมักในอาหารกากน้ำตาล ในเฟอร์เมนเตอร์ที่อุณหภูมิ 37 °C

สำหรับการหมักเอธานอลในอาหารกากน้ำตาลของที่อุณหภูมิ 37 °C พบว่าให้เอธานอล 5.85 และ 5.34 % v/v ที่เวลา 36 และ 30 ชั่วโมง ตามลำดับ (Table 1.17 และ Figure 1.14) และ S.E. ของเซลล์เมื่อเลี้ยงที่ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.39

จากการวัดความสูงของตะกอนหลังจากนำอาหารกากน้ำตาลที่หมักเป็นเวลาต่าง ๆ กันมาใส่ cylinder และตั้งไว้ พบว่าเมื่อเชื้อมีอายุ 12 ชั่วโมง สามารถวัดความสูงของ ตะกอน ได้เมื่อตั้งไว้นานถึง 60 นาที ซึ่งแสดงว่าเซลล์ยีสต์ยังมีการตกตะกอนน้อย และ/หรือมีความเข้มข้นของเซลล์น้อย ในขณะที่เมื่อหมักนาน 24 ชั่วโมง เซลล์มีการตกตะกอนดีขึ้น โดยวัดความสูงของตะกอนหลังจากตั้งไว้ 9 นาที ได้ 3 ม.ม. ซึ่งความสูงตะกอนของเซลล์อายุ 24 ชั่วโมงนี้ คงที่ถึงแม้ว่าจะตั้งไว้นานถึง 30 นาที ส่วนเซลล์อายุ 30 ชั่วโมง พบว่ามีการตกตะกอนมากขึ้น โดยเมื่อตั้งไว้นาน 3 นาที ความสูงของตะกอนเท่ากับ 10 ม.ม. ทั้ง ๆ ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่วัดในรูป

OD ของอาหารหมักไม่แตกต่างกันกับที่ 18 และ 24 ชั่วโมง มากนัก แต่เมื่อนำเชื้ออายุ 36 ชั่วโมง มาวัดการตกตะกอน โดยวัดความสูงของตะกอน กลับพบว่าความสูงของตะกอนมีค่าลดลง ซึ่งสันนิษฐานว่าขนาดของตะกอนเซลล์ในอาหารที่กำลังหมักนาน 30 ชั่วโมงนั้น ยังมีขนาดค่อนข้างเล็ก มีผลทำให้ตะกอนยังไม่อัดตัวกันแน่น แต่เมื่ออายุมากขึ้นขนาดของตะกอนเซลล์ใหญ่ขึ้นทำให้เกิดการตกตะกอนเร็ว และอัดตัวกันแน่นขึ้นทำให้ความสูงของตะกอนลดลง (Table 1.19)

Table 1.18 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 37°C and 300 rpm agitation speed.

Time (h)	OD(660nm)	Ethanol (%v/v)	Fermentable sugar (%)
0	0.45	0.05	18.75
6	3.50	0.12	18.02
12	1.00	0.60	17.08
18	10.90	1.60	15.99
24	8.95	4.53	6.41
30	7.25	5.85	4.17
36	8.95	5.34	3.34
42	13.75	4.06	2.45
48	8.20	4.64	1.64

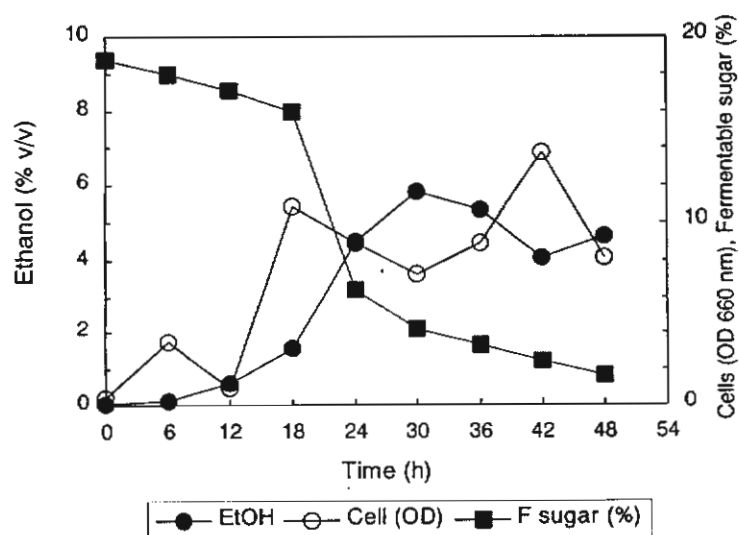


Figure 1.14 Growth, ethanol fermentation and fermentable sugar utilization of M30 in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 37°C and 300 rpm agitation speed.

Table 1.19 Flocculation of cells of M30 cultivated in molasses medium in 5 l fermentor with 3 l working volume at 37°C. The flocculation was measured as height of cells sediment after standing culture broth in 25 ml cylinder.

Time (h)	Height of cell sediment (mm)						
	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	30 min	60 min
0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
12	NS	NS	NS	NS	NS	NS	5
18	NS	NS	NS	NS	NS	NS	5
24	NS	NS	3	3	3	3	2
30	10	10	7	7	6	5	4
36	6	5	5	5	5	4	4
42	2	2	2	2	2	2.5	2.5
48	NS	NS	NS	NS	NS	2	2

NS = not sediment

1.6.2 .ศึกษาการตกตะกอนของของ M30 เมื่อหมักในอาหารกากน้ำตาล ในเฟอร์เมนเตอร์ ที่อุณหภูมิ 35 °ซ

สำหรับการหมักเอธานอลของ M30 ในถังหมัก ที่ 35°C นั้น พบว่า M30 หมักให้เอธานอล 8.27 %v/v ที่ 36 ชั่วโมง (Table 1.20 และ Figure 1.15) สำหรับการตกตะกอน เมื่อวัดในรูปของ S.E. นั้น พบว่าเซลล์ที่มีอายุมากขึ้นมี S.E. สูงขึ้น และเซลล์อายุ 30 ชั่วโมง มี S.E. สูงสุดเท่ากับ 0.59 แต่หลังจากนั้น S.E. ลดลง (Table 1.20)

Table 1.19 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 35°C and 300 rpm agitation speed.

Time (h)	OD(660nm)	Ethanol (%v/v)	Fermentable sugar (%)	S.E.
0	0.57	0.29	17.27	0.02
6	1.08	0.41	14.40	0.02
12	5.69	2.21	13.15	0.15
18	11.49	5.23	8.23	0.17
24	10.14	6.90	6.48	0.33
30	10.51	7.73	2.50	0.59
36	10.91	8.27	2.75	0.44
42	10.09	8.14	2.08	0.38
48	9.00	7.72	2.40	ND

Remark: - result from 3 independent experiments

- ND = not determine

1.6.2.1 การวัดความสูงของตะกอน: สำหรับเซลล์ที่ได้จากการหมักที่ 35°C นั้น เริ่มเห็น และวัดตะกอนได้หลังจากการหมัก 18 ชั่วโมง และชัดเจนขึ้นเมื่อมีอายุ 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ ความสูงของตะกอนของเซลล์อายุ 24 ชั่วโมง มากกว่าเซลล์ชั่วโมงอื่น ทั้ง ๆ ที่ปริมาณเซลล์ ในรูปของ OD ใกล้เคียงกัน เมื่อหมัก 18-42 ชั่วโมง นั้น น่าจะเนื่องมาจากที่เซลล์อายุ 24 ชั่วโมง มีการตกตะกอนดีกว่าเซลล์อายุ 18 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดการตกตะกอนในรูปของ sedimentation efficiency แต่การที่ความสูงของตะกอนลดลงเมื่ออายุของเชื้อมากขึ้นนั้น อาจเป็นเพราะเซลล์มีการตกตะกอนได้ลดลง หรือตะกอนเซลล์มีขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้น จึงเกิดการตกตะกอน ได้เร็ว และอัดกันแน่นขึ้น ความสูงของตะกอนจึงลดลง (Table 1.21)

1.6.2.2 การศึกษาจำนวนและขนาดของตะกอนเซลล์: จากการนับจำนวนตะกอนเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ objective 20 เท่า ส่องดู และนับจำนวนตะกอนเซลล์ในพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร พบว่าผลที่ได้แสดงแนวโน้มว่าเชื้อที่มีอายุน้อย 0-6 ชั่วโมง มีการสร้างตะกอนเซลล์น้อยกว่า เชื้อที่มีอายุตั้งแต่ 12 ชั่วโมง และเมื่อพิจารณาขนาดของตะกอนเซลล์ พบว่าเซลล์ที่มีอายุน้อย 6 และ 12 ชั่วโมง มีขนาดของตะกอนเซลล์ค่อนข้างเล็กใกล้เคียงกัน และเมื่อเซลล์มีอายุเพิ่มขึ้น ขนาดของตะกอนเซลล์ใหญ่ขึ้นตาม (Table 1.22)

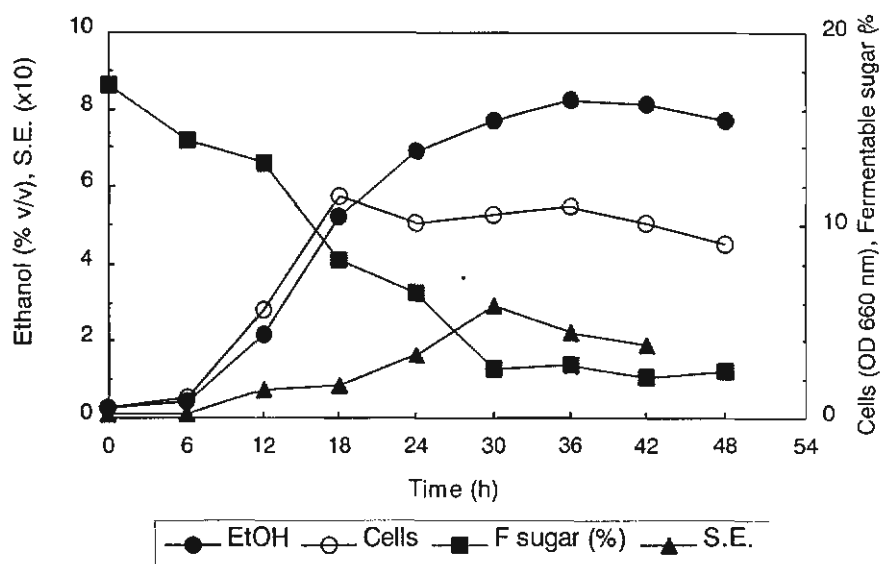


Figure 1.15 Growth, ethanol fermentation, fermentable sugar utilization and S.E. of M30 in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 35°C and 300 rpm agitation speed (result from 3 independent experiments)

Table 1.21 Flocculation of cells of M30 cultivated in molasses medium in 5 l fermentor with 5 l working volume at 35°C was measured as height of cells sediment after standing culture broth in 25 ml cylinder.

Time (h)	Height of cell sediment (mm)						
	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	30 min	60 min
0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
12	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
18	NS	NS	2	2	2	2	2
24	10	13	11	9	8	6	4
30	11	8	8	6	6	4	4
36	6	6	5	5	5	5	3
42	7	7	6	6	5	5	3
48	6	5	5	5	4	4	2

NS = no sediment; Result of the first experiment that M30 was cultivated at 35°C.

Table 1.22 Size of floc of M30 cultivated in molasses medium in 5 l fermentor with 5 l working volume at 35°C.

Time (h)	No. of floc*	Floc size = 1 st diameter / 2 nd diameter (μ)											
		Floc no.1	Floc no.2	Floc no.3	Floc no.4	Floc no.5	Floc no.6	Floc no.7	Floc no.8	Floc no.9	Floc no.10	Floc no.11	Floc no.12
6	4	7.4/18.8	7.4/18.8	22.2/37.0	29.6/29.6								
12	8	14.8/22.2	14.8/29.6	14.8/29.6	18.8/37.0	22.2/22.2	22.2/22.2	22.2/26.0	22.2/33.4				
18	11	14.8/26.0	14.8/29.6	14.8/74.1	14.8/81.5	22.2/22.2	22.2/22.2	22.2/34.8	22.2/66.7	23.7/82.9	29.6/29.6	37.0/37.0	
24	9	18.8/26.0	18.8/26.0	22.2/37.0	22.2/37.0	26.0/66.7	29.6/33.4	29.6/66.7	29.6/37.0	33.4/37.0			
30	9	14.8/44.4	18.8/81.5	29.6/44.4	29.6/44.4	29.6/40.8	29.6/82.9	33.4/37.0	37.0/85.2	51.9/74.1			
36	11	14.8/66.7	18.8/44.4	18.8/55.6	22.2/22.2	22.2/29.6	22.2/66.7	22.2/66.7	26.0/29.6	26.0/44.4	26.0/55.6	29.6/82.9	
42	8	18.8/44.4	18.8/44.4	22.2/118.5	29.6/63.0	29.6/66.7	48.2/63.0	51.9/155.6	82.9/82.9				

* Number of floc in 1 mm²; Result of the second experiment that M30 was cultivated at 35°C.

1.6.2.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตระหว่างการหมัก: ผลจากการศึกษาเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย ในระหว่างการหมักเอธานอลที่ 35°C แสดงว่าในช่วงการหมัก 0-36 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิต มีจำนวนสูงถึง 96.0-99.4% และ ถึงแม้ที่เวลา 42 ชั่วโมง ใน culture broth ยังคงมีเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่า 90% (Table 1.23)

Table 1.23 Direct count of total and viable cells of M30 during fermentation in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 35°C and 300 rpm agitation speed.

Time	Number of cells (cells/ml)			Viable cell
(hr)	Viable	Dead	Total	%
0	7.06×10^6	5.6×10^4	7.10×10^6	99.4
6	1.45×10^7	5.6×10^5	1.51×10^7	96.0
12	4.27×10^7	1.67×10^6	4.43×10^7	96.4
18	8.25×10^7	3.06×10^5	8.56×10^7	96.4
24	7.22×10^7	8.3×10^5	7.31×10^7	98.8
30	7.50×10^7	1.94×10^6	7.69×10^7	97.5
36	8.28×10^7	2.22×10^6	8.50×10^7	97.4
42	6.89×10^8	5.28×10^6	7.42×10^7	92.9

Result from the second experiment that M30 was cultivated at 35°C.

1.6.2.4 ผลของอายุของเซลล์จากการหมักเอธานอล เมื่อนำกลับไปใช้หมักเอธานอลใหม่: ได้ทดลองนำเซลล์ของ M30 ที่ได้ระหว่างการหมักเอธานอล ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ซึ่งปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ในถังหมัก ที่อุณหภูมิ 35°C โดยการใช้ culture broth ปริมาตร 50 มล. เพาะลงในอาหารกากน้ำตาลชนิดเดิม ปริมาตรรวม 250 มล. ในฟลasks ขนาด 500 มล. และบ่มใน incubator shaker ความเร็ว 110 ครั้ง/นาที ที่ 35°C ตรวจการเจริญ และการหมัก เพื่อประเมินว่าหากจะนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่นั้น ควรใช้เซลล์ที่มีอายุในช่วงใด จึงยังคงมีประสิทธิภาพในการหมักเอธานอลเท่าเดิม จากการทดลองใช้เซลล์ที่มีอายุ 24, 30 และ 36 ชั่วโมง ซึ่งได้จากการหมักเอธานอลในถังหมัก ได้ผลการเจริญและการหมักเอธานอล ดังแสดงใน Table 1.24 โดยเซลล์อายุ 24 ชั่วโมง ซึ่งนำกลับมาใช้ใหม่นั้น เจริญในอาหารใหม่ได้เร็วกว่าและให้เซลล์มากกว่าเซลล์อายุ 30 และ 36 ชั่วโมง ซึ่งเจริญได้เท่า ๆ กัน แต่เซลล์อายุ 30

ชั่วโมง ให้เซลล์มากกว่าเซลล์อายุ 36 ชั่วโมง (Table 1.25 และ Figure 1.15) และเมื่อพิจารณาการหมักเอธานอล พบว่า เซลล์อายุ 30 ชั่วโมง หมักเอธานอลในอาหารใหม่ได้เร็วกว่าเซลล์อายุ 24 และ 36 ชั่วโมง โดยให้เอธานอล 7.42%v/v ที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเซลล์อายุ 24 และ 36 ชั่วโมง เมื่อนำมาใช้เป็นก้ำเชื้อสำหรับการหมักเอธานอลใหม่ ให้เอธานอล 6.08 และ 5.17%v/v ที่เวลาเดียวกันคือ 24 ชั่วโมง แต่เซลล์อายุ 24 ชั่วโมง ให้เอธานอลสูงกว่า คือ 8.21%v/v เมื่อหมักนาน 42 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์อายุ 36 ชั่วโมง เมื่อนำกลับมาหมักเอธานอลใหม่ ให้เอธานอลสูงสุดเพียง 6.56 %v/v ที่เวลา 36 ชั่วโมงของการหมัก (Table 1.23 และ Figure 1.16)

Table 1.24 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 35°C and 300 rpm agitation speed.

Time (h)	OD(660nm)	Ethanol (%v/v)
0	0.64	0.34
12	6.65	2.29
24	8.55	5.33
36	10.50	6.66
48	9.90	6.61

Table 1.25 Growth and ethanol fermentation in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5) when culture broth of M30 at various ages that obtained from ethanol fermentation in molasses mash at 35 °C was used as inoculum. Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 35°C.

Time (h)	24 h culture broth		30 h culture broth		36 h culture broth	
0	1.34	1.65	1.28	2.34	1.89	2.14
6	1.83	2.33	2.85	2.77	2.23	2.25
12	2.82	3.89	4.00	3.80	3.90	3.03
18	4.78	4.64	2.64	5.16	2.75	4.64
24	5.45	6.08	3.24	7.42	2.80	5.17
30	4.15	6.66	3.21	7.40	3.07	6.23
36	3.36	7.44	4.31	7.40	2.59	6.56
42	6.02	8.21	5.00	7.07	3.62	6.07

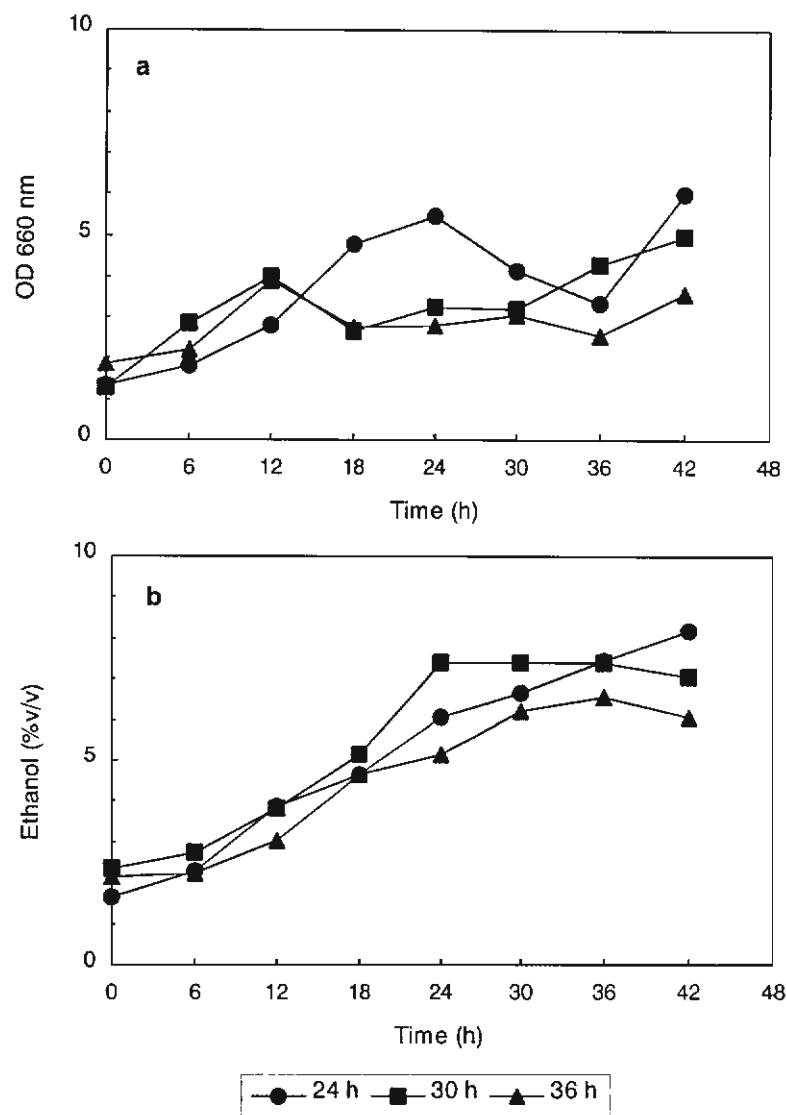


Figure 1.16 Growth (a) and ethanol fermentation (b) in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5) when culture broth of M30 at various ages that obtained from ethanol fermentation in molasses mash at 35 °C was used as inoculum. Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 35 °C.

1.6.3 ศึกษาการตกตะกอนของของ M30 เมื่อหมักในอาหารกากน้ำตาล ในเฟอร์เมนเตอร์ ที่อุณหภูมิ 33 °C

สำหรับการหมักที่ 33 °C นั้น พบว่า M30 หมักได้เอทานอล 6.72% v/v ที่เวลา 36 ชั่วโมง (Table 1.26 and Figure 1.17) และเซลล์อายุ 48 ชั่วโมง มี S.E. เท่ากับ 0.23

Table 1.26 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 33°C and 300 rpm agitation speed.

Time (h)	OD(660nm)	Ethanol (%v/v)	Fermentable sugar (%)
0	0.35	0.22	18.26
6	0.85	0.28	16.84
12	0.75	0.77	15.24
18	3.30	2.77	10.19
24	6.55	4.51	7.46
30	18.15	6.18	4.71
36	7.65	6.72	2.05
42	7.10	6.63	4.02
48	6.40	6.71	1.60

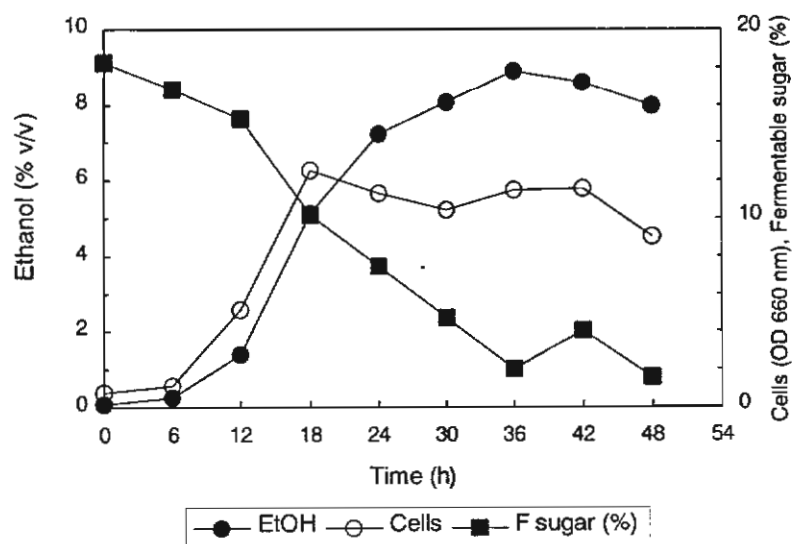


Figure 1.17 Growth, ethanol fermentation and fermentable sugar utilization of M30 in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 33°C and 300 rpm agitation speed.

1.6.3.1 การวัดความสูงของตะกอน: ความสูงของตะกอนนั้น เริ่มวัดได้เมื่อหมักนาน 18 ชั่วโมง โดยต้องตั้งไว้ นานถึง 12 นาที จึงวัดตะกอนได้ เช่นเดียวกับที่ 24 และ 30

ชั่วโมง โดยเชื้อมีที่อายุ 36 ชั่วโมง มีการตกตะกอนดีกว่าเชื้ออายุ 30 ชั่วโมง โดยวัดความสูงของตะกอนได้ ตั้งแต่ตั้งไว้นาน 3 นาที และความสูงของตะกอนเพิ่มมากขึ้น ส่วนเชื้อมีที่อายุ 42 ชั่วโมง ตะกอนมีความสูงเพิ่มขึ้นอีก ซึ่งน่าจะเป็นเพราะตะกอนเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ทำให้มีการตกตะกอนเร็วขึ้น และมากขึ้น (Table 1.27)

เมื่อเทียบค่าการตกตะกอนในรูปของความสูงของตะกอน พบว่าเซลล์ที่เจริญในอาหารกากน้ำตาล ในสภาวะการหมักเอธานอล ที่อุณหภูมิ 33 °C นั้น มีความสูงของตะกอนน้อยกว่าเซลล์ซึ่งหมักที่ 35 °C เล็กน้อย ในขณะที่มากกว่าเซลล์ซึ่งหมักที่ 37 °C เล็กน้อย แต่เมื่อเทียบ S.E. ของเซลล์ที่หมักเอธานอลนาน 48 ชั่วโมงนั้น พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน โดยเซลล์ที่เลี้ยงหมักเอธานอลที่ 30, 33 และ 37 °C มี S.E. เท่ากับ 0.35, 0.33 และ 0.39 ตามลำดับ

Table 1.27 Flocculation of cells of M30 cultivated in molasses medium in 5 l fermentor with 5 l working volume at 33 °C was measured as height of cells sediment after standing culture broth in 25 ml cylinder.

Time (h)	Height of cell sediment (mm)						
	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	30 min	60 min
0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
12	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
18	NS	NS	NS	5	5	3	3
24	NS	NS	NS	4	4	4	3
30	NS	NS	NS	4	4	3	3
36	1	1	6	6	5	5	4
42	5	5	4	4	4	4	3
48	5	5	5	4	4	4	4

NS = no sediment

1.6.3.2 จำนวนและขนาดของตะกอนเซลล์: สำหรับการนับจำนวน และวัดขนาดของตะกอนเซลล์ของเซลล์ที่มีอายุตั้งแต่ 24 ชั่วโมง นั้น พบว่าเซลล์อายุ 24 ชั่วโมง มีตะกอนขนาดเล็กกว่าเซลล์อายุตั้งแต่ 30 ชั่วโมง โดยเซลล์อายุ 30-54 ชั่วโมง มีขนาดไม่แตกต่างกันนัก ยกเว้นเซลล์อายุ 30 ชั่วโมง พบว่ามีตะกอนใหญ่กว่าตะกอนอื่นๆ มากจำนวน 2 ตะกอน (จาก 11 ตะกอน) ส่วนจำนวนตะกอนเซลล์ผันแปรตั้งแต่ 4 จนถึง 11 ตะกอน/พื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร ส่วนขนาดของตะกอนนั้น ไม่เห็นแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน ในช่วงที่ศึกษาขนาดเช่นกัน คือ 24-54 ชั่วโมง ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าขนาดของตะกอนเซลล์ใหญ่ที่สุดตั้งแต่เซลล์อายุ 24 ชั่วโมง (Table 1.28)

Table 1.27 Size of floc of M30 cultivated in molasses medium in 5 l fermentor with 5 l working volume at 33°C.

Time (h)	No. of floc*	Floc size = 1 st diameter / 2 nd diameter (μ)											
		Floc no.1	Floc no.2	Floc no.3	Floc no.4	Floc no.5	Floc no.6	Floc no.7	Floc no.8	Floc no.9	Floc no.10	Floc no.11	Floc no.12
24	9	7.4/11.2	7.4/14.8	11.2/14.8	11.2/14.8	14.8/14.8	14.8/22.2	14.8/29.6	18.6/26.0	26.0/22.2			
30	11	7.4/11.2	7.4/11.2	12.6/18.6	14.8/19.2	14.8/22.2	18.6/25.2	22.2/51.9	29.6/70.4	66.7/59.3	88.8/162.5	155.9/362.6	
36	8	7.4/112.5	8.8/20.0	12.6/14.8	18.6/26.0	25.2/29.6	26.0/88.9	37.0/44.4	37.0/74.1				
42	5	22.2/22.2	26.0/118.5	37.0/44.4	37.0/48.2	59.3/162.5							
48	4	14.8/14.8	14.8/14.8	18.6/24.8	88.9/129.7								
54	6	14.8/29.6	29.6/37.0	55.6/100.1	63.01/192.4	66.7/66.7	88.9/111.7						

* Number of floc in 1 mm²

1.6.3.3 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมัก: สำหรับการศึกษานับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมัก โดยเริ่มตั้งแต่ 24 ชั่วโมง พบว่าที่ 24 ถึง 42 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ทั้งหมด (total count) เพิ่มขึ้นจาก 4.78×10^7 เซลล์/มล. เป็น 2.50×10^8 เซลล์/มล. โดยในระหว่างนั้น culture broth มีเซลล์ที่มีชีวิต 92.3-96.7% ซึ่งผลที่ได้สอดคล้องกับผลเมื่อหมักที่ 35 °C คือเซลล์อายุ 0-42 ชั่วโมงนั้น พบเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่า 90% แต่เมื่อหมักนาน 48 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ทั้งหมดลดลงเหลือ 6.72×10^7 เซลล์/มล. และเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตลดลงมากด้วยเช่นกัน คือเหลือเซลล์ที่มีชีวิตเพียง 83.5% (Table 1.29)

Table 1.29 Direct count of total and viable cells of M30 during fermentation in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 33 °C and 300 rpm agitation speed.

Time (hr)	Number of cells (cells/ml)			Viable cell
	Viable	Dead	Total	%
24	4.61×10^7	1.67×10^6	4.78×10^7	96.4
30	5.61×10^7	1.67×10^6	5.78×10^7	97.1
36	7.33×10^7	5.56×10^6	7.89×10^7	92.3
42	2.35×10^8	1.50×10^7	2.50×10^8	94.0
48	5.61×10^7	1.11×10^7	6.72×10^7	83.5
54	3.39×10^7	1.67×10^7	5.06×10^7	67.0

1.6.4 ศึกษาการตกตะกอนของของ M30 เมื่อหมักในอาหารกากน้ำตาล ในเฟออร์เมนเตอร์ที่อุณหภูมิ 30 °C

สำหรับการหมักเอธานอล ในอาหารกากน้ำตาลที่ 30 °C พบว่าให้เอธานอลสูงสุด 7.86%v/v ที่เวลา 42 ชั่วโมง และให้เซลล์สูงกว่าการหมักที่อุณหภูมิอื่น (Table 1.30 และ Figure 1.18)

Table 1.30 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 30°C and 300 rpm agitation speed.

Time (h)	OD(660nm)	Ethanol (%v/v)	Fermentable sugar (%)
0	9.1	0.06	16.35
6	9.1	0.11	15.50
12	9.4	0.41	15.10
18	13.3	1.68	14.03
24	13.9	3.71	13.39
30	19.9	6.07	2.18
36	18.4	7.61	1.10
42	22.3	7.86	0.52
48	20.7	7.72	0.65
54	11.5	5.91	1.76

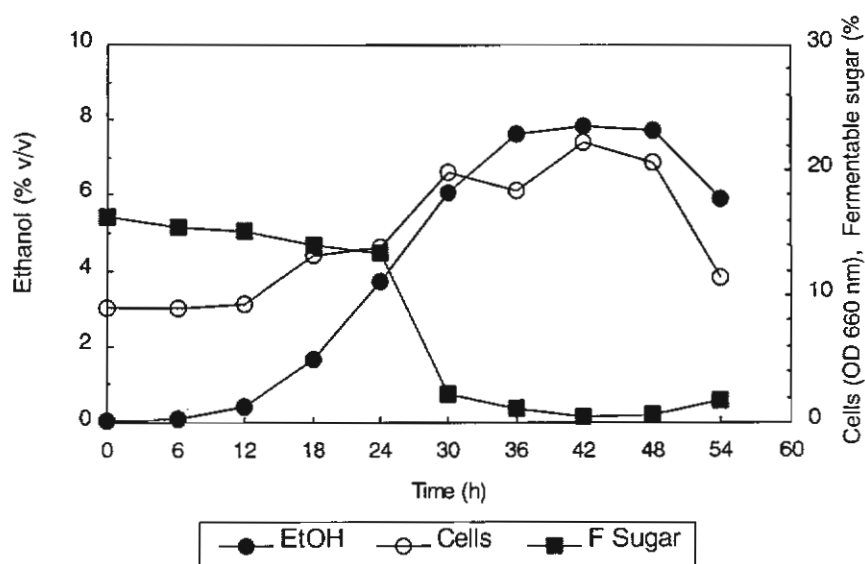


Figure 1.18 Growth, ethanol fermentation and fermentable sugar utilization of M30 in molasses medium (18% FS and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 30°C and 300 rpm agitation speed.

สำหรับการวัดความสูงของตะกอนของเซลล์นั้น พบว่าเริ่มวัดได้เมื่อเซลล์มีอายุ 24 ชั่วโมง โดยต้องตั้งไว้นาน 12 นาที ทั้งที่เวลาดังกล่าวเซลล์ใน culture broth มีความเข้มข้นสูงกว่าในการหมักที่อุณหภูมิอื่น ๆ ซึ่งน่าจะเป็นตัวบ่งชี้ว่าเซลล์ที่ได้จากการหมักเอธานอลที่ 30 °C มีความสามารถตกตะกอนน้อยกว่าเซลล์ที่หมักที่อุณหภูมิอื่น ๆ และเมื่ออายุ 48 ชั่วโมง จึงเห็นการตกตะกอนของเซลล์ที่ชัดเจนขึ้น แสดงว่าเป็นอายุเซลล์ที่มีการตกตะกอนดี (Table 1.31) โดยเซลล์อายุ 48 ชั่วโมงมี S.E. เท่ากับ 0.35

Table 1.31 Flocculation of cells of M30 cultivated in molasses medium in 5 l fermentor with 3 l working volume at 30 °C was measured as height of cells sediment after standing culture broth in 25 ml cylinder.

Time (h)	Height of cell sediment (mm)						
	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	30 min	60 min
0	N	N	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N	N	N
12	N	N	N	N	N	N	N
18	N	N	N	N	N	N	N
24	N	N	N	2	2	2	2
30	N	N	N	N	4	5	6
36	N	N	N	2	4	4	4
42	N	N	N	3	5	6	6
48	10	10	8	7	7	5	5
54	8	8	8	8	8	5	5

NS = no sediment

1.7 การหมักเอธานอลและการตกตะกอนของ M30 เมื่อเลี้ยงร่วมกับ Sc90 ในอาหารกากน้ำตาล

เพื่อศึกษาว่าเมื่อเลี้ยง M30 ร่วมกับ Sc90 จะทำให้สามารถผลิตเอธานอลเพิ่มขึ้นหรือไม่ และ M30 จะช่วยทำให้ Sc90 ตกตะกอนหรือไม่ จึงทดลองนำ M30 และ Sc90 มาหมักเอธานอลร่วมกัน เปรียบกับการหมักโดย M30 และ Sc90 เดี่ยว ๆ โดยใช้อาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และบ่มบน water bath shaker ที่ 33 °C ผลการทดลองแสดงว่า M30 ให้เซลล์ที่สูงสุด (OD 16.68) ที่เวลา

18 ชั่วโมง ส่วน Sc90 เจริญให้เซลล์สูงสุด (OD 15.85) ที่ 24 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเลี้ยง M30 และ Sc90 ร่วมกัน ให้เซลล์สูงสุด (OD 15.73) ที่เวลา 30 ชั่วโมง สำหรับการหมักเอทานอลของ M30 และ Sc90 ที่เลี้ยงเดี่ยว ๆ นั้น พบว่าหมักเอทานอลได้เท่า ๆ กัน และเท่า ๆ กับการหมักเอทานอลเมื่อใช้ M30 และ Sc90 ร่วมกัน ในช่วง 30 ชั่วโมงแรก แต่ที่ 36 ชั่วโมง การหมักเอทานอลของเชื้อผสมหยุด ในขณะที่ M30 และ Sc90 ยังคงหมักต่อ และผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

(Table 1.32 และ Figure 1.19)

ส่วนการตกตะกอนของเซลล์ที่หมักเอทานอลนาน 48 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ของ M30 ที่เลี้ยงเดี่ยว ๆ มีการตกตะกอนดีที่สุด โดยมี S.E. เท่ากับ 0.50 และเช่นเดียวกับการทดลองอื่น ๆ ที่ผ่านมา Sc90 ไม่ตกตะกอน (S.E. = 0.05) และเมื่อเลี้ยง M30 ร่วมกับ Sc90 วัดค่า S.E. ได้เท่ากับ 0.36 ซึ่งต่ำกว่าค่า S.E. ของ M30 เมื่อเลี้ยงเดี่ยว ๆ (Table 1.33)

ผลการทดลองนี้ชี้ว่า การหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อสองชนิด คือ M30 และ Sc90 ร่วมกันนั้น ไม่ได้ช่วยให้การหมักเอทานอลดีขึ้น ให้เอทานอลมากขึ้น นอกจากนั้น M30 ไม่ได้ส่งเสริมให้ Sc90 ตกตะกอน การที่มีทั้ง M30 และ Sc90 อยู่ด้วยกัน ทำให้การตกตะกอนต่ำลง

Table 1.31 Growth and ethanol fermentation of M30, Sc90 and mixture M30 and Sc90 of in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate and pH 4.5). Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 33°C.

Time (h)	M30		Sc90		M30+Sc90	
	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v	Growth OD660	EtOH %v/v
0	0.09	0.63	1.83	0.61	2.44	0.60
6	0.39	1.11	4.13	0.97	3.85	1.04
12	12.23	3.21	6.33	2.24	11.20	2.96
18	16.68	5.92	12.80	5.01	13.48	5.28
24	12.70	6.52	15.85	6.23	13.88	6.07
30	12.50	6.55	13.75	6.60	15.73	6.72
36	14.65	7.13	14.63	7.11	14.43	6.65
48	24.88	7.76	17.33	7.36	16.25	6.69

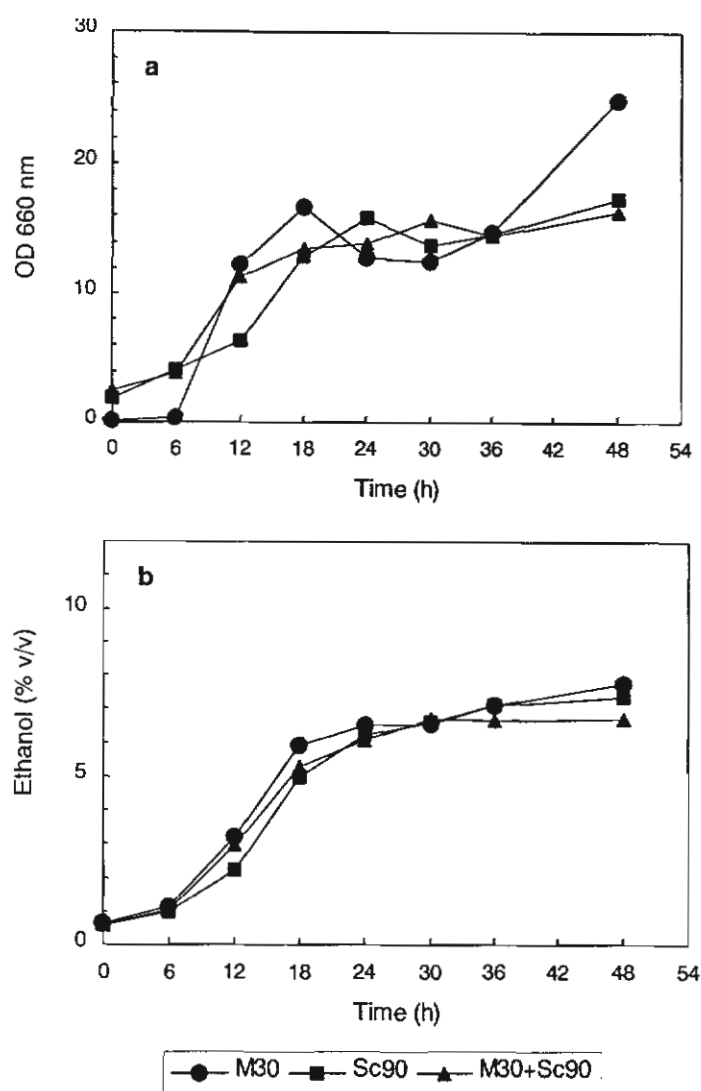


Figure 1.19 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30, Sc90 and mixture M30 and Sc90 of in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate and pH 4.5). Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 33°C.

Table 1.33 Flocculation expressed as S.E. of cells of M30, Sc90 and mixture M30 cultivated in molasses mash containing 18% RS and 0.05% ammonium sulfate and pH 4.5. Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 33°C for 48 h.

Strain	S.E.
M30	0.50
Sc90	0.05
M30 + Sc90	0.36

1.8 การหมักเอทานอลแบบ repeated batch ของ M30 ในอาหารกากน้ำตาลในฟลาสก์

ได้ทดลองหมักเอทานอล ด้วยวิธีการหมักแบบ repeated batch ของ M30 โดยทำการทดลองในฟลาสก์ เพื่อเป็นการประเมินความเป็นไปได้ในการทำ repeated batch ในถังหมัก ซึ่งจะดำเนินการโดยโครงการย่อยที่ 2 ในการทดลองใช้อาหารกากน้ำตาล ปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 ลิตร ที่มีน้ำตาลรีเวิร์ส 18% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% pH 4.5 ปั่นใน water bath shaker 110 ครั้ง/นาที ที่ 35 °C และเมื่อหมักนาน 36 ชั่วโมง วิเคราะห์การเจริญ และความเข้มข้นของเอทานอล จากนั้นตั้งไว้นิ่ง ๆ เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนนาน 30 นาที ปิเปิด culture broth ส่วนบนออก ให้เหลือ culture broth ที่มีเซลล์ตกตะกอนอยู่ 100 มล. เติมน้ำกากน้ำตาลใหม่ ให้ได้ปริมาตรรวม 250 มล. และทำการหมักจนครบ 36 ชั่วโมง ทำแบบเดิมซ้ำอีก 2 ครั้ง

ผลการทดลองแสดงว่าจากการทำ repeated batch ทั้งหมด 3 ครั้งนั้น ปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นในการทำ repeated batch ไม่แตกต่างกันนัก โดยในการทำ repeated batch ครั้งที่ 1 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ คือ 3.74%v/v (เอทานอลในอาหารที่ 0 ชั่วโมง - เอทานอลในอาหารใหม่ที่ 36 ชั่วโมง) ส่วนการทำ repeated batch ครั้งที่ 2 และ ครั้งที่ 3 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ คือ 3.13 และ 3.31 %v/v ตามลำดับ (Table 1.34 และ Figure 1.20) อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับการหมักเอทานอลใน batch แรก ที่ใช้กล้าเชื้อที่ active นั้น พบว่าผลิตเอทานอลได้ต่ำกว่า ซึ่งอาจเป็นเพราะเซลล์อยู่ในระยะที่ไม่ active เท่ากับเซลล์ที่อายุน้อยที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ ในการหมัก batch แรก

ดังนั้นสิ่งที่ต้องคำนึงถึง และความสนใจในการหมักแบบ repeated batch คือ อายุของเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการทำ repeated batch ซึ่งต้องเป็นเวลาของการหมักที่สามารถให้เอทานอลความเข้มข้นสูงด้วย

Table 1.34 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses mash (18% RS and 0.05% ammonium sulfate and pH 4.5) in repeated batch fermentation. Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 35°C.

Time (h)	Batch		Repeat batch 1		Repeat batch 2		Repeat batch 3	
	Growth	EtOH	Growth	EtOH	Growth	EtOH	Growth	EtOH
	OD660	%v/v	OD660	%v/v	OD660	%v/v	OD660	%v/v
0	2.82	0.19	8.72	2.65	4.78	2.49	9.75	2.11
36	14.88	7.09	14.97	6.39	14.76	5.62	15.87	5.42

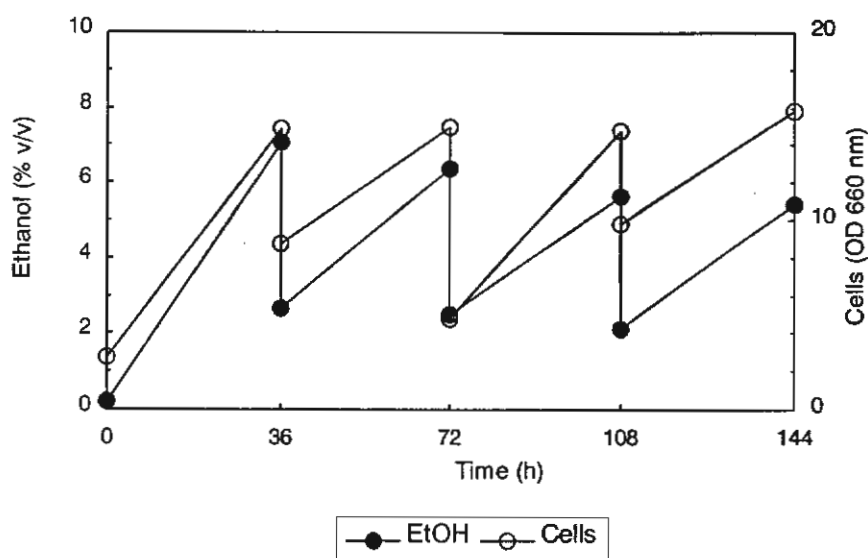


Figure 1.20 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 in molasses mash (18% FS and 0.05% ammonium sulfate and pH 4.5) in repeated batch fermentation. Incubation was performed in water-bath reciprocal shaker, 110 stroke/min at 35°C.

1.9 การตกตะกอนระหว่างการหมักเอทานอล ในอาหารกากน้ำตาล ในเฟออร์เมนเตอร์ ขนาด 100 ลิตร ที่ 35 °C

1.9.1 การเจริญและการหมักเอทานอล

ได้ศึกษาการตกตะกอนในระหว่างการหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาล ที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 18% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.01% pH 4.5 ปริมาณ 80 ลิตร ในเฟออร์เมนเตอร์ ขนาด 100 ลิตร โดยในระหว่างการหมักควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 35°C และ agitation เท่ากับ 200 รอบต่อนาที ซึ่งดำเนินการโดยโครงการย่อยที่ 2 จากการทดลอง พบว่าเชื้อมีการเจริญค่อนข้างต่ำ และให้เอทานอล 8.38%v/v ที่เวลา 42 ชั่วโมง (Table 1.35 และ Figure 1.21) (สำหรับรายละเอียดผลการเจริญ การหมัก และการวิเคราะห์ผลการทดลอง ให้ดูจากโครงการย่อยที่ 2)

1.9.1 การตกตะกอนในรูปของ S.E.

1.9.2.1 การตกตะกอนในรูปของ S.E. : เมื่อวิเคราะห์การตกตะกอนในรูปของ S.E. พบว่าเซลล์ใน culture broth อายุ 42 ชั่วโมง มีการตกตะกอนสูงสุด ให้ S.E. เท่ากับ 0.72 (Table 1.35 และ Figure 1.22) ซึ่งสูงกว่าการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตร และใช้อาหารชนิด

เดียวกัน 3 ลิตร และควบคุมอุณหภูมิตลอดการหมักให้เท่ากับ 35 °C ซึ่งให้ S.E. 0.59 ที่ 30 ชั่วโมง (Table 1.20)

Table 1. 35 Growth, ethanol fermentation, fermentable sugar utilization and S.E. of M30 in molasses medium (21% fermentable sugar, 0.05% ammonium sulfate and 0.01% potassium dihydrogen phosphate) in 100 l fermentor with 80 l working volume, at 35°C and 200 rpm agitation speed.

Time (h)	OD (660nm)	EtOH (%v/v)	Fermentable sugar (%)	S.E.
0	0.25	0.26	21.07	0.15
6	1.77	0.67	22.25	0.19
12	4.85	2.67	15.52	0.15
18	5.75	4.44	12.58	0.14
24	5.45	5.70	8.98	0.24
30	6.10	6.85	5.15	0.49
36	4.00	7.71	3.28	0.53
42	5.30	8.38	1.49	0.72
48	5.15	8.10	2.64	0.47

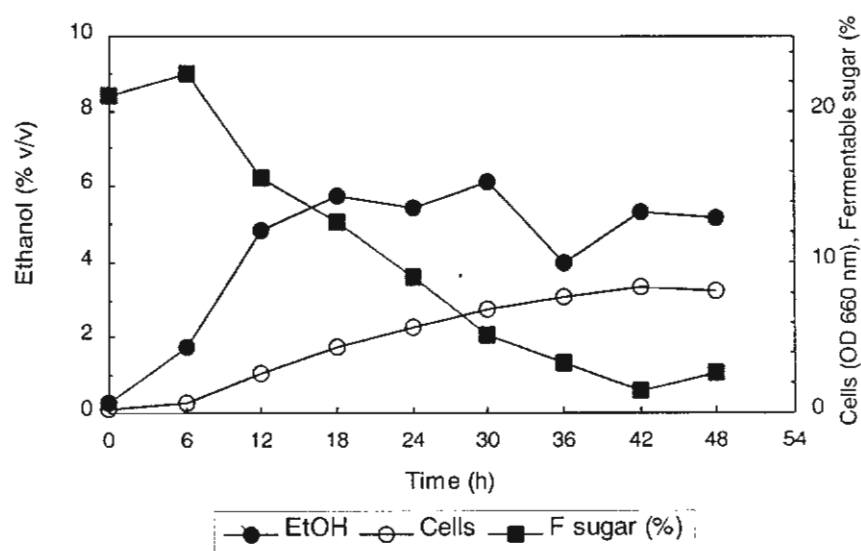


Figure 1.21 Growth, ethanol fermentation, fermentable sugar utilization and S.E. of M30 in molasses medium (21% fermentable sugar, 0.05% ammonium sulfate and 0.01% potassium dihydrogen phosphate) in 100 l fermentor with 80 l working volume, at 35°C and 200 rpm agitation speed.

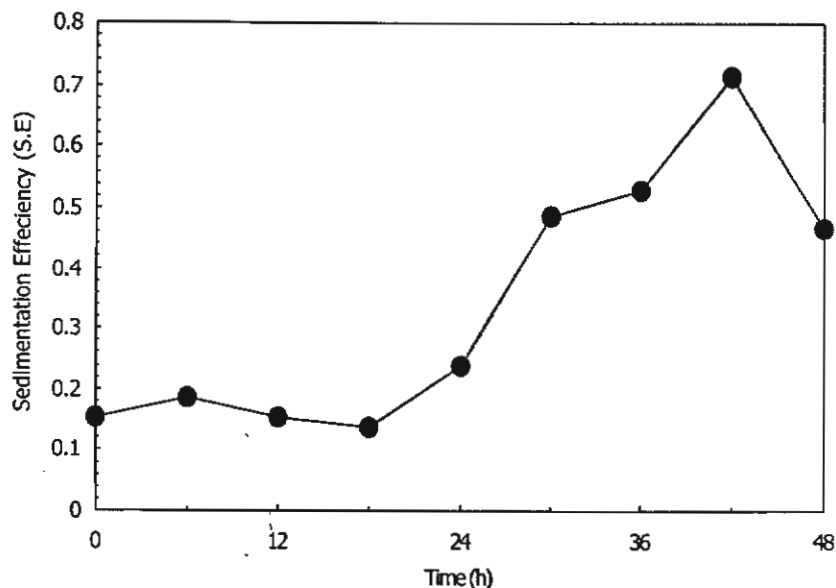


Figure 1.22 Flocculation expressed as S.E. of M30 cultivated in molasses medium in 100 l fermentor with 80 l working volume at 35°C.

1.9.2.2 ความสูงของตะกอน: จากการนำ culture broth ที่มีอายุต่าง ๆ กัน มาใส่ cylinder ขนาด 25 มล. และวัดความสูงของตะกอนที่เวลาต่าง ๆ พบว่าเริ่มเห็นการจับตัวของเซลล์ และตกตะกอน เมื่อ culture both อายุ 12 ชั่วโมง โดยวัดความสูงได้หลังจากตั้งไว้ 30 นาที ส่วน culture broth อายุ 18 ชั่วโมง มีการตกตะกอนดีขึ้น โดยประเมินจากการที่วัดความสูงของตะกอนได้ตั้งแต่ 12 นาที และหลังจากนั้นเซลล์มีการตกตะกอนเพิ่มขึ้น เนื่องจากสามารถวัดความสูงของตะกอน ได้ตั้งแต่ตั้งไว้นาน 3 นาที (Table 1.35) จากการวัดความสูงของ culture broth อายุ 48 ชั่วโมง พบว่ามีความสูงของตะกอน มากกว่าที่เวลาอื่นทั้ง ๆ ที่ใน culture broth เซลล์มีความเข้มข้นเท่า ๆ กับที่ 42 ชั่วโมง ดังนั้นจึงน่าจะเกิดเพราะเซลล์มีการตกตะกอนน้อยกว่า ซึ่งสอดคล้องกับค่า S.E. ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าน้อยกว่า S.E. ของเซลล์อายุ 42 ชั่วโมง

1.9.2.3 จำนวนและขนาดของตะกอน: ผลการนับจำนวน และวัดขนาดของตะกอน เซลล์ แสดงว่ามีตะกอนเซลล์จำนวนน้อยในระยะ 0-6 ชั่วโมง แต่เมื่อหมักนาน 12 ชั่วโมง พบมีจำนวนตะกอนเซลล์มากขึ้นชัดเจน นอกจากนั้นเมื่อเชื้อมีอายุมากขึ้น ตะกอนเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และมีจำนวนมากขึ้น โดย culture broth อายุ 0 ชั่วโมง พบตะกอนเซลล์ 3 ตะกอน/พื้นที่ 1 มม.² ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางสองเส้นซึ่งวัดตั้งฉากกันเท่ากับ 14.81-18.57 / 25.98-37.04 ไมโครเมตร และเมื่อ culture broth อายุมากขึ้น ขนาดของตะกอนใหญ่ขึ้น และเซลล์อายุ 30 ชั่วโมง ตะกอนของเซลล์มีขนาดใหญ่ที่สุด และขนาดลดลงเล็กน้อย เมื่อเซลล์อายุ 36 ชั่วโมง และหลังจากนั้นขนาดของตะกอนไม่ค่อยแตกต่างกัน

น้อย 42 ชั่วโมง พบตะกอนเซลล์ 8 ตะกอน/พื้นที่ 1 มม.² ตะกอนเซลล์มีขนาด 14.81/14.81 - 44.44/66.66 ไมโครเมตร (Table 1.37)

Table 1.36 Flocculation of cells of M30 cultivated in molasses medium in 100 l

fermentor with 80 l working volume at 35 °C was measured as height of cells sediment after standing culture broth in 25 ml cylinder.

Time (h)	Height of cell sediment (mm)						
	3 min	6 min	9 min	12 min	15 min	30 min	60 min
0	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
6	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
12	NS	NS	NS	NS	NS	8	9
18	NS	NS	NS	6	6	6	8
24	NS	NS	NS	Error	8	6	6
30	4	4	4	3	5	6	5
36	4	Error	Error	3	5	6	5
42	3	4	4	4	4	3	2
48	7	6	7	7	7	6	5

NS = no sediment

1.9.2.4 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมัก: จากการศึกษาจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยการทำ wet mount ใน methylene blue นับเซลล์ที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต ซึ่งติดสีฟ้าของ methylene blue พบว่าเมื่อเริ่มต้นการหมัก จำนวนเซลล์ทั้งหมดเท่ากับ 6.72×10^6 เซลล์/มล. โดยทั้งหมดเป็นเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อหมักนาน 6 ชั่วโมง เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 2.95×10^7 เซลล์/มล. โดยในจำนวนนี้เป็นเซลล์ที่มีชีวิต 2.91×10^7 เซลล์/มล. (เท่ากับ 98.64% ของเซลล์ทั้งหมด) จากนั้นเมื่ออายุ 12, 18 และ 24 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างกัน คือ 4.60×10^7 , 4.92×10^7 , 4.38×10^7 เซลล์/มล. ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ทั้งหมดแล้ว พบว่าเป็นเซลล์ที่มีชีวิต 99.35, 96.66 และ 92.4 1% ตามลำดับ แสดงว่า ใน culture broth มีเซลล์มีชีวิตในสัดส่วนที่ต่ำลง และเมื่อหมักนาน 30 ชั่วโมง เซลล์ลดจำนวนลงเช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตในเซลล์ทั้งหมดลดลง เมื่อเทียบกับเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิต ระหว่างการหมักของ M30 ในถังหมักขนาดเล็ก ที่อุณหภูมิเดียวกัน พบว่าในถังหมักใหญ่เซลล์มีชีวิต มีเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่า (Table 1.38)

Table 1.37 Size of floc of M30 cultivated in molasses medium in 100 l fermentor with 80 l working volume at 35°C.

Time	Floc size = 1 st diameter / 2 nd diameter (μ)									
(h)	Floc no.1	Floc no.2	Floc no.3	Floc no.4	Floc no.5	Floc no.6	Floc no.7	Floc no.8	Floc no.9	Floc no.10
0	14.81/25.98	18.57/25.98	18.57/37.04							
6	11.17/18.57	11.7/22.22	11.17/25.98	18.57/25.98	22.22/25.98	22.22/29.63				
12	11.17/22.11	14.81/14.81	14.81/14.81	14.81/16.25	14.81/18.57	14.81/22.22	14.81/37.04	14.81/44.44	18.57/37.04	22.22/33.39
18	14.81/22.22	14.81/25.98	14.81/29.63	18.57/33.39	18.57/37.04	22.22/29.63	22.22/33.39	22.22/44.44	23.66/49.64	29.63/44.44
24	11.17/25.98	11.17/29.63	14.81/25.98	14.81/44.44	14.81/59.26	18.57/18.57	22.22/29.63	22.22/29.63	22.22/48.2	37.04/44.44
30	11.17/16.25	18.57/29.63	22.22/59.26	25.98/55.61	25.98/64.45	31.51/100.1	37.04/70.42	44.44/151.8		
36	7.41/22.22	18.57/22.22	22.22/29.63	22.22/33.39	22.22/33.39	22.22/33.39	22.22/44.44	22.22/44.44	44.44/66.66	
42	14.81/14.81	14.81/18.57	14.81/51.85	18.57/18.57	18.57/37.04	25.98/29.63	29.63/29.63	44.44/66.66		
48	18.57/22.22	14.81/22.22	14.81/29.63	22.22/22.22	22.22/44.44	29.63/37.04	29.63/37.04	29.63/44.44	33.39/40.79	44.44/55.61

* Number of floc in 1 mm²

Table 1. 38 Direct count of total and viable cells of M30 during fermentation in molasses medium (21% fermentable sugar, 0.05% ammonium sulfate and 0.01% potassium dihydrogen phosphate) in 100 l fermentor with 80 l working volume, at 35°C and 200 rpm agitation speed.

Time (hr)	Number of cells (cells/ml)			Viable cell
	Viable	Dead	Total	%
0	6.72×10^6	0	6.72×10^6	100
6	2.91×10^7	3.89×10^5	2.95×10^7	98.64
12	4.60×10^7	3.33×10^6	4.63×10^7	99.35
18	4.92×10^7	1.67×10^5	5.09×10^7	96.66
24	4.38×10^7	3.67×10^5	4.74×10^7	92.41
30	3.98×10^7	6.00×10^6	4.58×10^7	86.90
36	2.63×10^7	4.33×10^6	3.07×10^7	86.67
42	3.47×10^7	8.50×10^6	4.32×10^7	80.32
48	4.46×10^7	6.89×10^6	5.15×10^7	86.60

1.9.2.4 การนับจำนวนรอยแผลจากการแตกหน่อ (bud scare): เพื่อศึกษาอายุของเซลล์โดยใช้หลักการว่าเซลล์ที่มีอายุมากมีการแตกหน่อหลายครั้ง ทำให้มีรอยแผลจากการแตกหน่อมากขึ้น จึงได้ทดลองนำเซลล์จากการหมักเอธานอลในอาหารกากน้ำตาล ในถังหมักขนาด 100 ลิตร ที่ 35°C ไปตรวจรอยแผลจากการแตกหน่อ โดยใช้ electron microscope ผลการตรวจเป็นไปตามที่คาดคะเนไว้ คือ เซลล์ที่มีอายุน้อยมีการแตกหน่อน้อยครั้ง จำนวนรอยแผลจากการแตกหน่อ มากกว่าเซลล์อายุมาก ที่มีการแตกหน่อมาจำนวนหลายครั้ง แต่ในการทดลองไม่สามารถนับจำนวนรอยแผลได้ เนื่องจากเซลล์มีจำนวนมากและเกาะกลุ่มหนาแน่น (Figure 1.22 และ Figure 2.23)

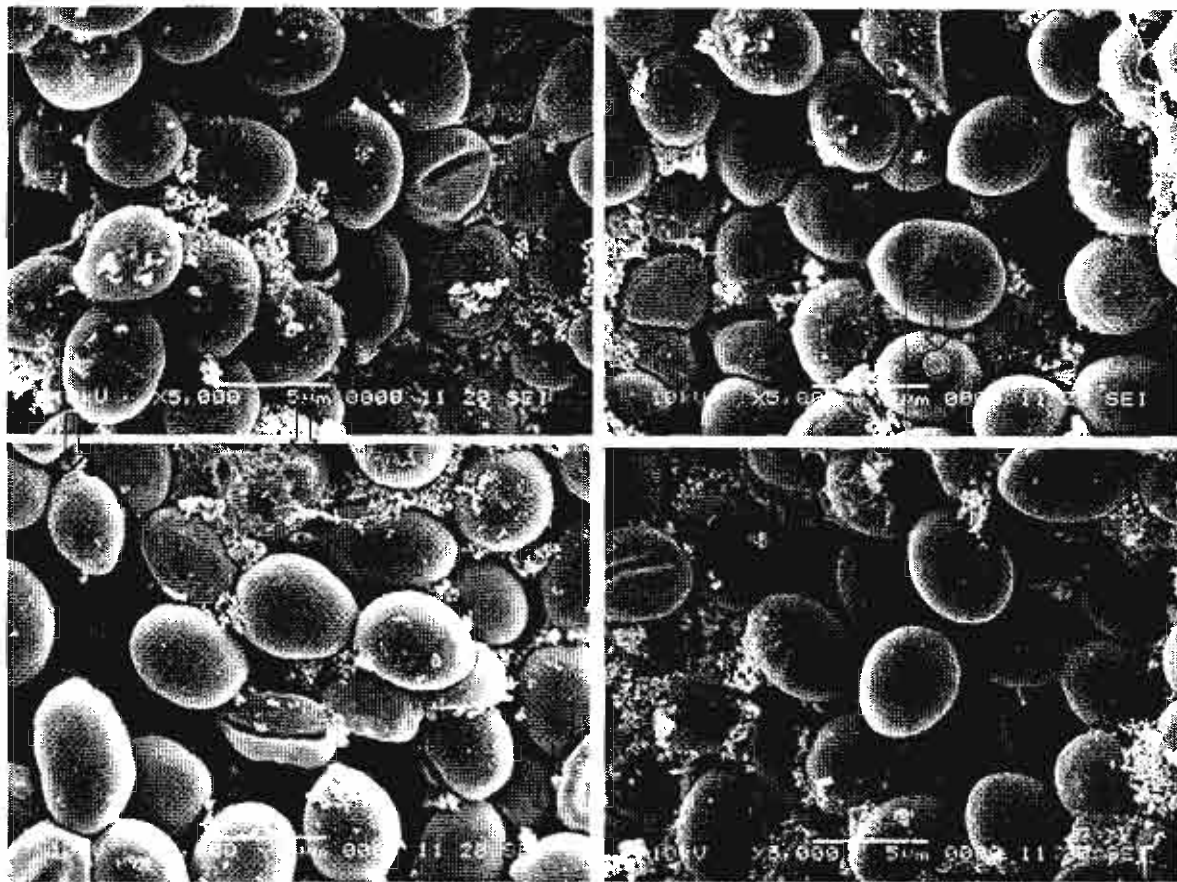


Figure 1.22 Electron micrographs of cells and some bud scars of M30 cultivated for 30 h in molasses medium (21% fermentable sugar, 0.05% ammonium sulfate and 0.01% potassium dihydrogen phosphate) in 100 l fermentor with 80 l working volume, at 35°C and 200 rpm agitation speed. (arrow = bud scar)

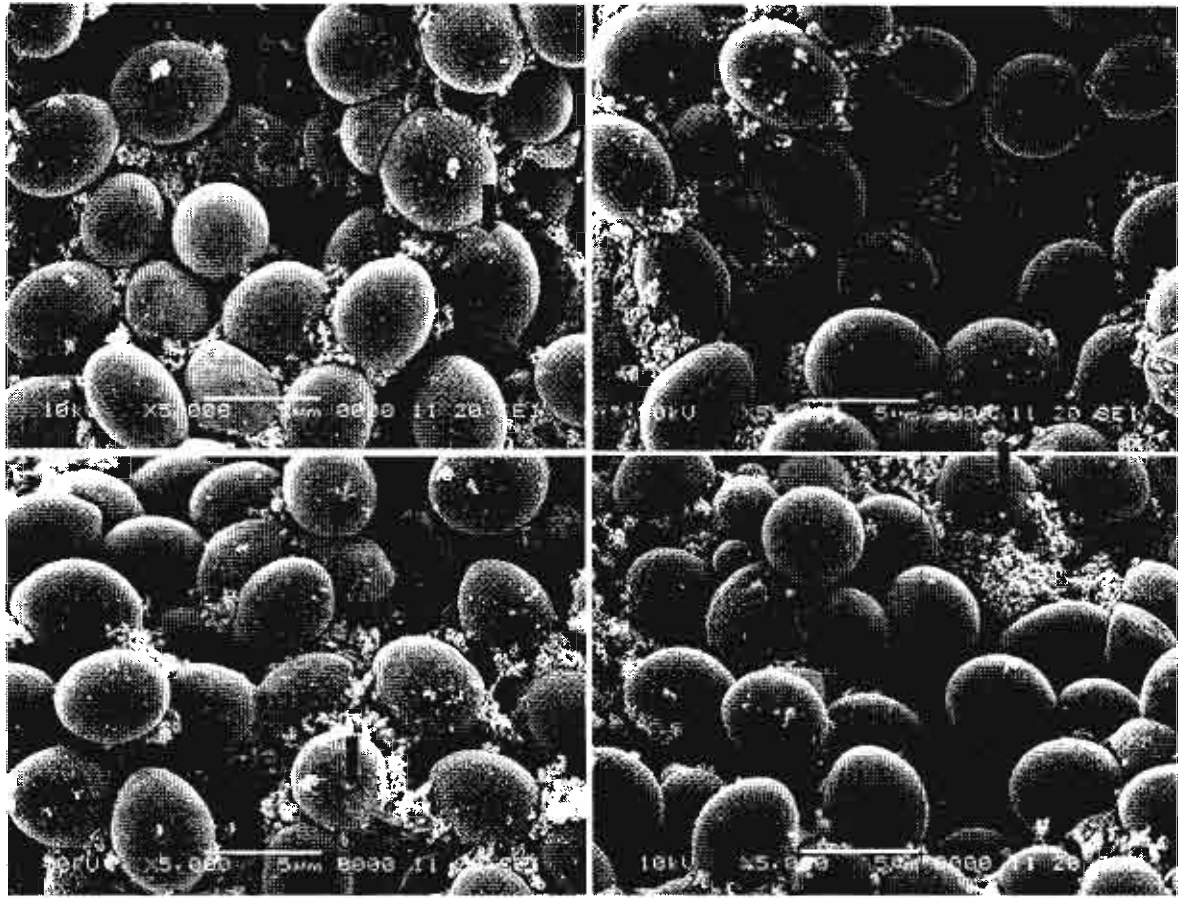


Figure 1.23 Electron micrographs of cells and some bud scars of M30 cultivated for 36 h in molasses medium (21% fermentable sugar, 0.05% ammonium sulfate and 0.01% potassium dihydrogen phosphate) in 100 l fermentor with 80 l working volume, at 35°C and 200 rpm agitation speed. (arrow = bud scar)

1.10 การศึกษาผลของเอทานอลต่อการเจริญของ M30

เนื่องจากเอทานอลความเข้มข้นสูงมีผลต่อการเจริญ และการหมักเอทานอลของยีสต์ ดังนั้นยีสต์สายพันธุ์ที่ทนเอทานอลความเข้มข้นสูง จะเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล เนื่องจากเอทานอลความเข้มข้นสูงที่สายพันธุ์นั้น ๆ ผลิตได้ ไม่ยับยั้งการเจริญและการหมัก หรือยับยั้งเพียงเล็กน้อย ดังนั้นจึงได้ศึกษาผลของเอทานอลที่เติมลงไปต่อการเจริญของ M30 ทั้งการเจริญบนอาหารแข็ง ซึ่งมีออกซิเจนเต็มที่ และในสภาพที่ใช้หมักเอทานอล

สำหรับผลของเอทานอลที่เติมลงไปต่อการเจริญของ M30 ศึกษา โดยทำการ streak เพื่อบนอาหารแข็งกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 2% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% และเติมเอทานอล 0-8%v/v และบนอาหารแข็ง YPD ที่เติมเอทานอล 0-8%v/v ปกติ 28-30°C ตรวจการเจริญที่ 2, 4, 6 และ 8 วัน ผลการทดลองแสดงว่า บนอาหารแข็งกากน้ำตาลที่เติมเอทานอล 0-3 %v/v การเจริญของ M30 ไม่มีความแตกต่างชัดเจน แต่การเจริญลดลงเมื่อเติมเอทานอลในอาหารกากน้ำตาล 4% โดยการเจริญจะช้าลงอีกเมื่อเติมเอทานอล 5 %v/v (Table 1.39) ส่วนอาหารแข็ง YPD ที่เติมเอทานอล 0-5 %v/v การเจริญของ M30 ไม่แตกต่างกัน แต่ลดลงเมื่อเติมเอทานอล 6%v/v ผลแสดงว่าการยับยั้งของเอทานอลที่เติมลงในอาหารกากน้ำตาลมากกว่า ซึ่งน่าจะมีสาเหตุจากการที่ในกากน้ำตาลเองมีสารที่มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์อยู่แล้ว ดังนั้นผลรวมของสารยับยั้งที่มีอยู่ในกากน้ำตาลกับเอทานอล จะส่งผลให้การยับยั้งที่รุนแรงขึ้น

Table 1.39 Growth of M30 in molasses (M) agar and YPD agar containing 0-8%v/v ethanol at room temperature.

Ethanol added (%v/v)	Incubation (days)							
	2		4		6		8	
	M	YPD	M	YPD	M	YPD	M	YPD
0	++	+++	++	++++	+++	++++	+++	++++
1	++	+++	++	++++	+++	++++	+++	++++
2	++	+++	++	++++	+++	++++	+++	++++
3	++	+++	++	++++	+++	++++	+++	++++
4	++	+++	++	++++	++	++++	++	++++
5	+	+++	++	+++	++	++++	++	++++
6	+	++	++	+++	++	+++	++	+++
7	+	++	+	+++	++	+++	++	+++
8	+	++	+	+++	++	+++	++	+++

M = molasses agar

YPD = yeast extract peptone dextrose agar

++++ = very good growth

+++ = good growth

++ = growth

+ = low growth

ส่วนการเจริญในสภาพการหมักเอธานอลนั้น ทดลองโดยใช้อาหารเหลวกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 5% แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% และเติมเอธานอล 0, 5 และ 8%v/v และอาหารเหลว YPD ที่เติมเอธานอล 0-8%v/v ปั่นใน water bath shaker 110 ครั้ง/นาที ที่ 35 °C ตรวจการเจริญทุก ๆ 12 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงว่าอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมเอธานอล 5%v/v M30 มีการเจริญต่ำกว่าในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมเอธานอลมากกว่าครึ่ง (ลดลงประมาณ 67%) โดยที่ 36 ชั่วโมง ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่เติมเอธานอล 5%v/v เชื้อเจริญให้ความขุ่น 6.41 ในขณะที่ในอาหารกากน้ำตาลที่ไม่เติมเอธานอล M30 เจริญได้ความขุ่นถึง 19.79 และในอาหารที่เติม เอธานอล 8%v/v เชื้อไม่เจริญ สำหรับการเจริญในอาหารเหลว YPD ที่เติมเอธานอล พบผลการยับยั้งการเจริญต่อ M30 เป็นไปในทำนองเดียวกัน โดยเมื่อเติมเอธานอล 5% การเจริญลดลงถึง 75% ของการเจริญในอาหารที่ไม่เติมเอธานอล เมื่อเทียบการเจริญ ในอาหารเหลวกากน้ำตาลกับอาหาร YPD พบว่าเชื้อเจริญในอาหารกากน้ำตาลได้ต่ำกว่าอาหารเหลว YPD มาก ในอาหารที่ไม่เติมเอธานอล แต่เมื่อเติมเอธานอล การเจริญลดลงมาเท่า ๆ กัน ไม่ว่าในอาหารที่เติมเอธานอล 5 หรือ 8%v/v (Table 1.39 และ Figure 1.22)

Table 1.39 Growth of M30 in molasses mash and YPD broth containing 0, 5 and 8%v/v ethanol in water bath shaker, 110 strokes/min at 35 °C.

Time (h)	0%v/v ethanol		5%v/v ethanol		8%v/v ethanol	
	M	YPD	M	YPD	M	YPD
0	1.51	0.90	1.39	0.70	1.45	0.66
12	13.39	34.53	2.72	4.31	2.11	0.74
24	13.76	31.60	4.89	7.78	1.89	0.62
36	13.79	30.90	6.42	7.23	1.40	1.40
48	19.79	17.65	4.49	2.63	1.33	1.33

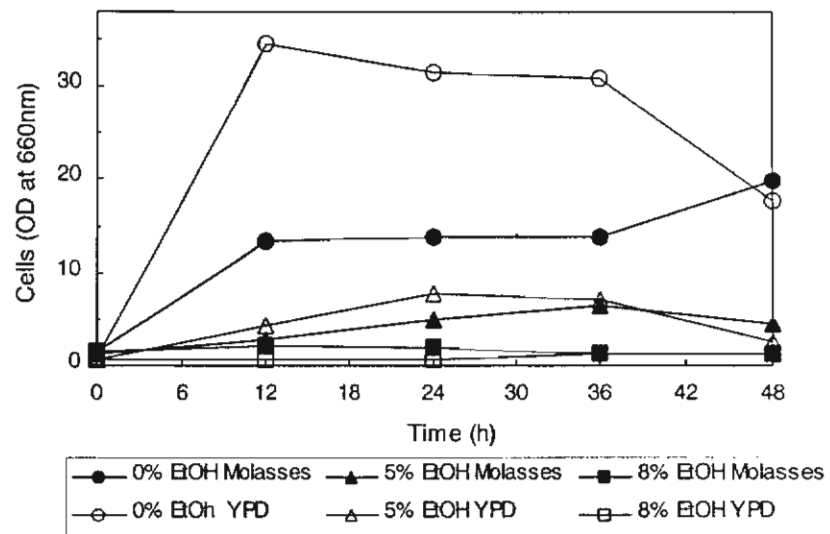


Figure 1.22 Growth of M30 in molasses mash and YPD broth containing 0, 5 and 8%v/v ethanol in water bath shaker, 110 strokes/min at 35 °C.

2. ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง คือ

- *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ตกตะกอนจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ AM12, TJ1, TJ3 และ M30
- *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ยังไม่มีการศึกษาการตกตะกอน สายพันธุ์ คือ RL-6, MR-195, MRF-44, MRF-65 และ MRF-65-UV89
- *S. cerevisiae* Sc90 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไม่ตกตะกอนที่ใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ในประเทศไทย
- *Candida utilis* IFRPD6014 (ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร)

2. การเตรียมกล้าเชื้อ

ถ่ายเชื้อจาก stock ลงใน Yeast extract peptone dextrose (YPD) agar slant บ่มที่อุณหภูมิห้องประมาณ 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายลง YPD broth ที่มีกลูโคส 1 % ปริมาตร 25 มล. ใน Erlenmeyer flask 250 มล. บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 160 rpm ที่ 37°C ประมาณ 24 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ด้วย centrifuge 5,000 rpm 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง และทำซ้ำขั้นตอนในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ วัดความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ใช้เป็นกล้าเชื้อ

3. การเลี้ยงเชื้อในอาหารกากน้ำตาล

ทำการเลี้ยงเชื้อแบบให้อากาศใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. บรรจุอาหาร 50 มล. โดยใช้อาหารกากน้ำตาลที่ปรับปริมาณให้มีน้ำตาลรีดิวซ์ และเติมชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง รวมทั้งมีการปรับ pH เริ่มต้น ตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง การบ่มเชื้อทำบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 160 rpm และควบคุมอุณหภูมิตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง

4. การเลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำกากส่า

ทำการเลี้ยงเชื้อแบบให้อากาศใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มล. บรรจุอาหาร 50 มล. โดยใช้อาหารน้ำกากส่าที่เติมน้ำตาลกลูโคส เพื่อปรับปริมาณให้มีน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 2% หรือไม่เติมน้ำตาล ซึ่งจะระบุในแต่ละการทดลอง และเติมชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง รวมทั้งมีการปรับ pH เริ่มต้น ตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง การบ่มเชื้อทำบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ความเร็ว 160 rpm และควบคุมอุณหภูมิตามที่กำหนดในแต่ละการทดลอง

5. การวิเคราะห์

- การเจริญ โดยวัดความขุ่นของเซลล์ด้วย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร และ การหาน้ำหนักแห้ง
- ปริมาณของโปรตีนในเซลล์ โดยใช้วิธีของ Lowery-Folin (Norris and Ribbon, 1971)
- ความเข้มข้นน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Nelson Somogyi (Norris and Ribbon, 1971) และโดยการใช้ HPLC (Hewlett Packard, Series 1100) หลังจากทำ hydrolysis
- ความเข้มข้นเอธานอลโดยใช้ Gas Chromatography (Shimadzu GC9A with C-R3A recorder) และใช้ propanol เป็น internal standard
- การตกตะกอน วัดในรูปของ Sedimentation Efficiency (S.E.) : ตามวิธีของ Limtong (1987) ดังนี้ นำ culture broth 8 มล. มาผสมกับ 0.1M EDTA 1 มล. เพื่อกระจายเซลล์ และเติมน้ำกลั่น 1 มล. วัดความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ค่าที่ได้กำหนดให้เป็นค่า A นำ culture broth อีก 8 มล. มาผสมกับ 0.1M EDTA 1 มล. และ 1M CaCl_2 , pH 5.0 เพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์รวมกลุ่มกันอีกครั้ง ตั้งไว้ 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนลงสู่ก้น นำของเหลวส่วนบนมาวัดความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร ค่าที่ได้กำหนดให้เป็นค่า B คำนวณค่าการตกตะกอนตามสูตรต่อไปนี้ $\text{S.E.} = 1 - \text{B/A}$ สำหรับ S.E. มีค่า 0-1 โดย ถ้า S.E. มีค่าเท่ากับ 1 แสดงว่าเซลล์ตกตะกอนได้สูงสุด และเมื่อค่าต่ำลงจาก 1 แสดงว่าการตกตะกอนลดลง
- การตกตะกอน วัดในรูปความสูงของตะกอน: นำ culture broth มาใส่ cylinder ขนาด 25 มล. จับเวลา และวัดความสูงของตะกอน (sediment) หลังจากตั้งไว้ 3, 6, 9, 12, 15, 30 และ 60 นาที
- วัดขนาดตะกอน โดยหยดอาหารภาคน้ำตาลซึ่งหมักที่เวลาต่าง ๆ ลงบน hemacytometer ปิดด้วย cover glass ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยใช้ objective กำลังขยาย 20 เท่า และใช้วิธีโอออยภาพขึ้นจอทีวี นับจำนวนตะกอนเซลล์ และวัดขนาดของตะกอนโดยใช้ไม้บรรทัดวัดจากจอทีวี แล้วเทียบเป็นขนาดที่แท้จริง โดยทำ calibration ระหว่างไม้บรรทัดกับ stage micrometer
- นับจำนวนเซลล์ทั้งหมดโดยการทำ wet mount ใน methylene blue นับเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งไม่ติดสีเมื่อย้อมด้วย methylene blue และเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ซึ่งติดสีน้ำเงินของ methylene blue

ผลการทดลอง

2.1 ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรท

2.1.1 คัดเลือก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีการเจริญดีและโปรตีนสูงเมื่อเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง

เพื่อคัดเลือกยีสต์สำหรับใช้ผลิตยีสต์อาหารสัตว์ ได้นำยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้งสายพันธุ์ที่ตกตะกอนและไม่ตกตะกอน มาคัดเลือกโดยการเลี้ยงยีสต์ในอาหารกากน้ำตาล และคัดเลือกสายพันธุ์ที่เจริญได้ดี มีโปรตีนจากเซลล์ทั้งหมด (total protein) ใน culture broth หลังจากที่ทำให้เซลล์ทั้งหมดใน culture broth นั้นแตก ซึ่งจะเรียกว่าโปรตีนทั้งหมดสูง และมีโปรตีนในเซลล์ (protein content) สูง

ทำการเลี้ยงยีสต์ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 2% (glucose equivalent) และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% pH 4.5 ในฟลาสก์ โดยปรับ pH ของอาหารให้เท่ากับ 4.5 ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น วัดเป็นความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร (OD_{660}) เท่ากับ 0.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C ผลการทดลองแสดงว่าเซลล์ของ MR-195, RL-6, MRF-44, MRF-65 และ MRF-65-UV89 มีค่า S.E. ต่ำมาก เท่า ๆ กับเซลล์ของ Sc90 ซึ่งไม่ตกตะกอน (0.07) ดังนั้นจึงจัดว่ายีสต์สายพันธุ์เหล่านี้เป็นยีสต์ไม่ตกตะกอน ในขณะที่ M30 มีการตกตะกอน ให้ S.E. เท่ากับ 0.36 เมื่อเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์ตกตะกอนอื่นทุกสายพันธุ์ (Table 2.1)

Table 2.1 Flocculation expressed as sedimentation efficiency (S.E.) at 48 h cultivation.

Strain	Sedimentation efficiency
MR-195	0.07
RL-6	0.08
MRF-44	0.06
MRF-65	0.05
MRF-65-UV89	0.04
Sc90	0.07
AM12	0.12
M30	0.36
TJ1	0.14
TJ3	0.28

เมื่อพิจารณาการเจริญของยีสต์สายพันธุ์ที่ไม่ตกตะกอน พบว่า RL-6 มีการเจริญให้เซลล์สูงสุด คือ 11.36 กรัม/ลิตร ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์อื่นประมาณ 2 เท่า (Table 2.2, Figure 2.1a) และเนื่องจากมีการเจริญสูง ดังนั้นจึงมีผลให้ค่าปริมาณโปรตีนจากเซลล์ทั้งหมดใน culture broth หลังจากที่ทำ

ให้เซลล์ทั้งหมดใน culture broth นั้นแตก ซึ่งจะเรียกว่าโปรตีนทั้งหมด สูงตามไปด้วย ถึงแม้ว่าค่าโปรตีนในเซลล์ไม่มีความแตกต่างอย่างชัดเจน (Table 2.2, Figure 2.1b และ 2.1c) ดังนั้นจึงคัดเลือก RL-6 สำหรับศึกษาต่อไป

Table 2.2 Growth and total protein of MR-195, RL-6, MR-F65, F65-UV89 and MR-F44 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	MR-195		RL-6		MR-F65		F65-UV89		MR-F44	
	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP
0	0.24	0.07	0.23	0.09	0.27	0.11	0.30	0.11	0.23	0.10
24	3.53	1.27	5.63	2.42	3.76	1.69	3.78	1.55	3.09	1.42
48	3.90	1.33	10.44	3.03	5.78	2.14	4.48	2.06	4.03	1.97
72	4.51	1.76	11.36	2.61	4.81	2.16	4.54	2.00	3.09	1.67
96	1.72	ND	9.47	ND	1.43	ND	2.18	ND	1.42	ND

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

สำหรับการเจริญและโปรตีนของยีสต์ที่ตกตะกอนรวมทั้ง Sc90 ซึ่งเป็นสายพันธุ์เปรียบเทียบกับพบว่า AM12 เจริญให้เซลล์สูงสุดสูงกว่าเชื้ออื่นๆ เกือบสองเท่า โดยให้เซลล์ 11.16 กรัม/ลิตร เท่าๆ กับ RL-6 และถึงแม้ว่าค่าโปรตีนภายในเซลล์ของ AM12 ที่เวลา 40 ชั่วโมง ค่อนข้างต่ำ แต่ค่าโปรตีนทั้งหมดยังสูงกว่าสายพันธุ์อื่น (Table 2.3 และ Figure 2.2) ดังนั้นจึงคัดเลือก AM12 สำหรับการศึกษาต่อไป นอกจากนั้นเนื่องจาก M30 มีการตกตะกอนดีกว่าสายพันธุ์อื่น จึงจะทำการศึกษาเพื่อการผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์ด้วย

Table 2.3 Growth and total protein of Sc90, AM12, M30, TJ1 and TJ3 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	Sc90		AM12		M30		TJ1		TJ3	
	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP
0	0.26	0.09	0.23	0.08	0.24	0.07	0.25	0.09	0.32	0.12
24	4.52	1.95	4.75	1.90	4.16	1.50	4.70	2.02	3.97	1.83
48	7.17	1.87	11.16	2.23	5.76	2.19	7.03	1.97	6.52	2.02
72	4.51	2.03	8.82	2.29	5.34	1.81	7.69	2.15	5.92	2.07
96	1.72	ND	5.85	ND	4.47	ND	6.42	ND	3.50	ND

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l