

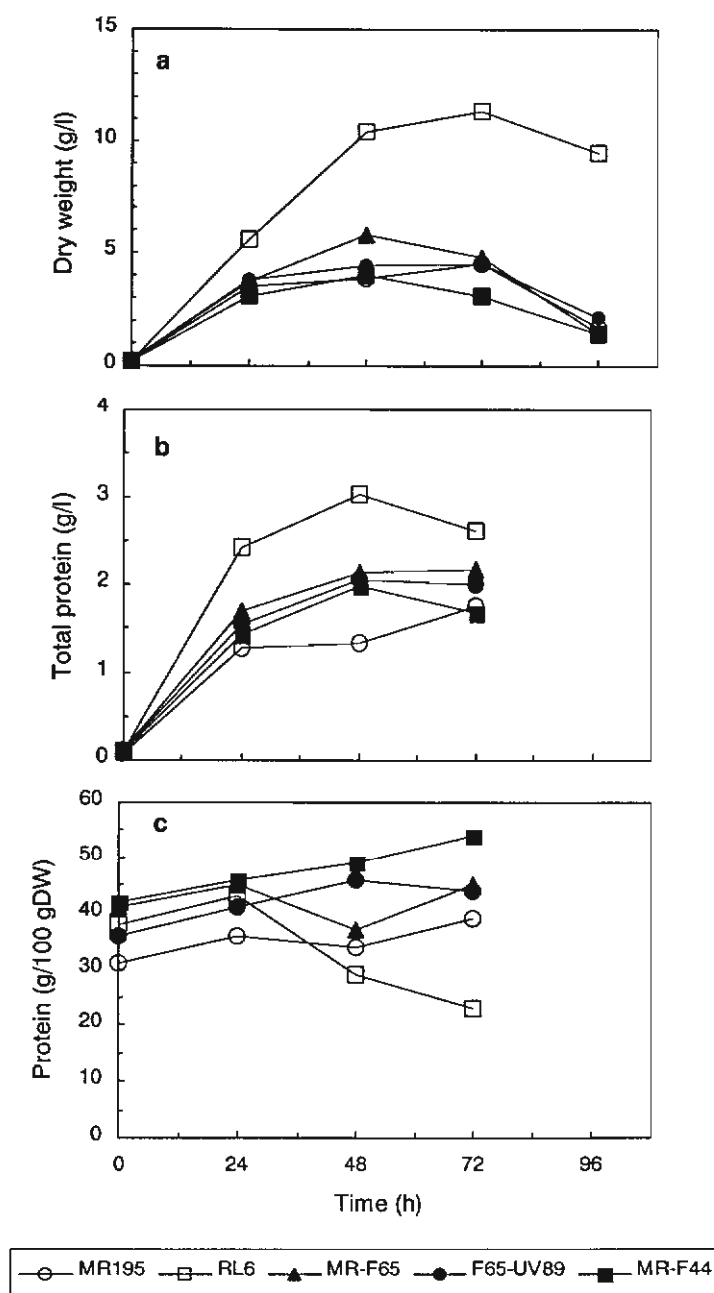


Figure 2.1 Growth (a), total protein (b) and protein content (c) of MR-195, RL-6, MR-F65, F65-UV89 and MR-F44 cultivated in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

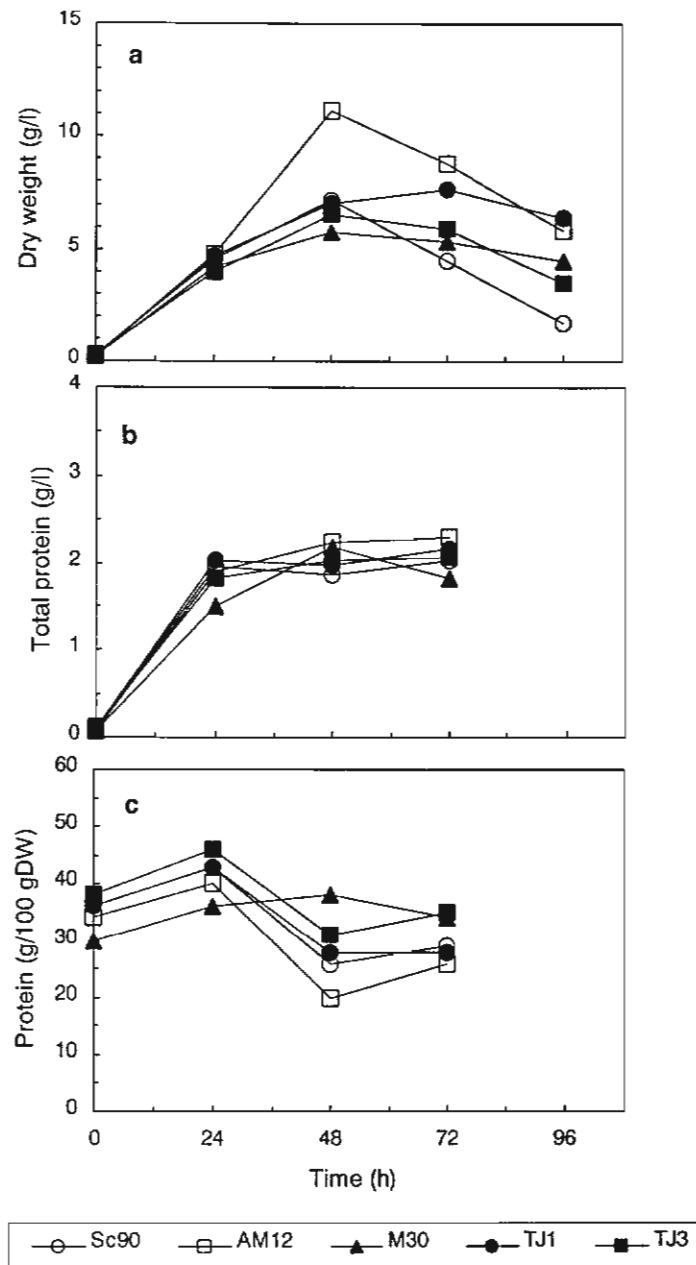


Figure 2.2 Growth (a), total protein (b) and protein content (c) of Sc90, AM12, M30, F65- TJ1 and TJ3 cultivated in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

2.1.2 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ โดยการหมักแบบให้อากาศ ในอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง ในห้องปฏิบัติการ

เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ของสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ RL-6, AM12 และ M30 โดยการหมักแบบให้อากาศ ในอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการผลิตในโครงการย่อยที่ 2 ต่อไป

2.1.2.1 การเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในอาหารกากน้ำตาลที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรียความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารกากน้ำตาล ที่ปรับให้มีน้ำตาลรีดิวซ์ 2% (glucose equivalent) และมีแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.05, 0.1 และ 0.2 % หรือ มียูเรียเข้มข้น 0.03, 0.05 และ 0.1 % เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับ pH ของอาหารให้เท่ากับ 4.5 ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นวัดเป็น OD₆₆₀ เท่ากับ 0.5 และปั่นบนเครื่องเขย่าแบบ rotary ที่ 37 °C

ผลการแสดงว่าสำหรับ RL-6 นั้น เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ทุกความเข้มข้นเชื้อมีการเจริญให้ชีวมวล (biomass) สูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ถึงแม้ว่าใน 24 ชั่วโมงแรก เชื้อเจริญช้ากว่า โดยเมื่อเจริญในอาหารที่มียูเรีย 0.1% นั้น RL-6 ให้เซลล์ 11.93 กรัม/ลิตร แต่เมื่อพิจารณาโปรตีนทั้งหมดพบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 % RL-6 ให้โปรตีนทั้งหมดสูงกว่าในอาหารอื่น ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ยูเรียส่งเสริมการเจริญของเชื้อได้ดีกว่าแอมโมเนียซัลเฟต ทำให้ได้เซลล์มากกว่า แต่เนื่องจากยูเรียที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอที่จะสังเคราะห์และสะสมในเซลล์ในรูปของโปรตีน มีผลให้โปรตีนในเซลล์ที่รายงานเป็นกรัมโปรตีน/น้ำหนักเซลล์ 100 กรัม (g/ 100gDW) มีค่าต่ำ (Figure 2.3c) และทำให้โปรตีนทั้งหมดต่ำด้วย RL-6 เมื่อเลี้ยงในยูเรีย มีการใช้น้ำตาลต่ำกว่า และ มีเอทานอลสร้างขึ้นมาน้อยในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และหายไปหลังจากนั้น อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าในอาหารที่มียูเรีย 0.1% RL-6 ให้โปรตีนทั้งหมดต่ำกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต แต่ก็ต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย ประกอบกับเมื่อพิจารณาในแง่ของราคา ยูเรียมีราคาเพียงประมาณ 10% ของแอมโมเนียมซัลเฟต ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงเลือกใช้ยูเรีย 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน (Table 2.4, 2.5 และ Figure 2.3)

Table 2.4 Growth and total protein of RL-6 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and various concentrations of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	Ammonium sulfate						Urea					
	0.05%		0.1%		0.2%		0.03%		0.05%		0.1%	
	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP
0	0.23	0.09	0.23	0.09	0.26	0.09	0.23	0.09	0.23	0.09	0.23	0.09
24	4.41	1.68	5.27	2.53	4.91	2.16	3.21	1.54	2.52	1.33	3.11	1.46
48	6.57	2.23	7.20	2.52	7.34	3.15	6.89	2.34	5.85	2.17	9.00	2.61
72	6.04	2.02	7.52	2.78	6.93	2.98	9.45	2.74	8.91	2.58	11.07	2.77
96	6.98	2.44	6.44	2.64	7.70	3.39	10.26	2.46	10.98	2.75	11.93	2.86

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

Table 2.5 Sugar utilization and ethanol production of RL-6 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and various concentrations of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	Ammonium sulfate						Urea					
	0.05%		0.1%		0.2%		0.03%		0.05%		0.1%	
	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH
0	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016
24	0.07	0	0.11	0	0.25	0	0.17	0.142	0.29	0.198	0.15	0
48	0.05	0	0.05	0	0.04	0	0.15	0	0.21	0	0.12	0
72	0.05	0	0.05	0	0.04	0	0.12	0	0.18	0	0.11	0
96	0.04	0	0.05	0	0.04	0	0.08	0	0.10	0	0.11	0

RS = reducing sugar; %

EtOH = ethanol; %w/v

สำหรับ AM12 พบว่าในอาหารกากน้ำตาลที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อเจริญให้เซลล์สูงกว่าและเร็วกว่า ในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต นอกจากนั้นโปรตีนทั้งหมดยังมีค่าสูงกว่าเล็กน้อย และเช่นเดียวกับที่พบใน RL-6 คือเมื่อใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน AM12 มีการใช้น้ำตาลต่ำกว่า และมีการสร้างเอทานอลในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และหายไปหลังจากนั้น (Table 2.6 และ Figure 2.4) โดยการเจริญและปริมาณโปรตีนทั้งหมดของ RL-6 ที่เลี้ยงในอาหารที่เติมยูเรีย 0.1% สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่น ดังนั้นสำหรับการทดลองต่อไปจะใช้ยูเรีย 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตาม เช่นเดียวกับที่พบใน RL-6 คือยูเรียส่งเสริมการเจริญ ซึ่งเมื่อได้เซลล์มากทำให้โปรตีนทั้งหมดสูง แต่เมื่อพิจารณาว่า

โปรตีนในเซลล์ พบว่ามีค่าต่ำกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นที่ให้ไนโตรเจนเท่า ๆ กัน (Figure 2.4c) ซึ่งน่าจะแสดงว่าไนโตรเจนในอาหารมีปริมาณจำกัด ไม่เพียงพอที่จะทำให้มีการสะสมโปรตีนในเซลล์

Table 2.6 Growth and total protein of AM12 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and various concentrations of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	Ammonium sulfate						Urea					
	0.05%		0.1%		0.2%		0.03%		0.05%		0.1%	
	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP
0	0.23	0.08	0.23	0.08	0.26	0.08	0.23	0.08	0.23	0.08	0.23	0.08
24	3.92	1.96	4.68	2.15	3.69	2.00	5.58	2.40	4.63	1.80	5.04	1.87
48	5.40	1.78	5.78	1.62	4.37	1.62	7.74	2.25	6.89	2.13	7.61	2.21
72	7.25	2.32	5.81	1.68	4.73	2.27	7.34	1.61	8.42	1.85	8.82	2.38
96	5.99	1.62	6.30	2.27	4.37	2.14	7.79	2.34	7.88	2.60	10.26	2.67

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

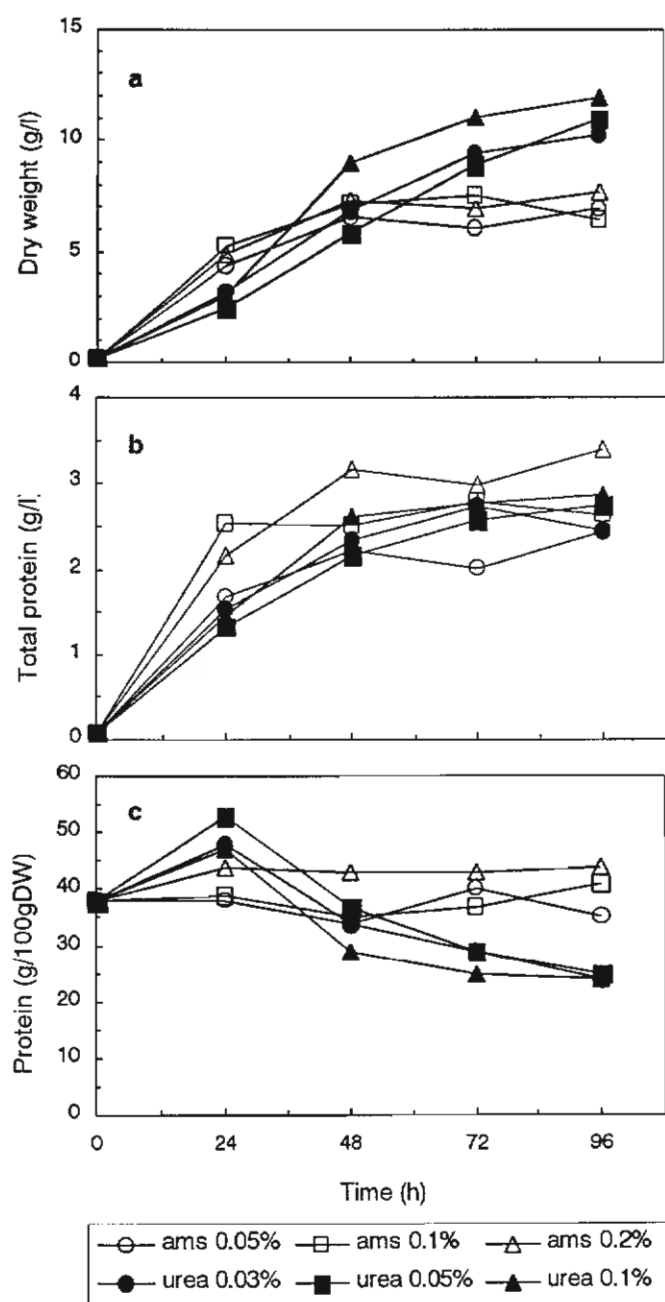


Figure 2.3 Growth (a), total protein (b) and protein content (c) of RL-6 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and various concentrations of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

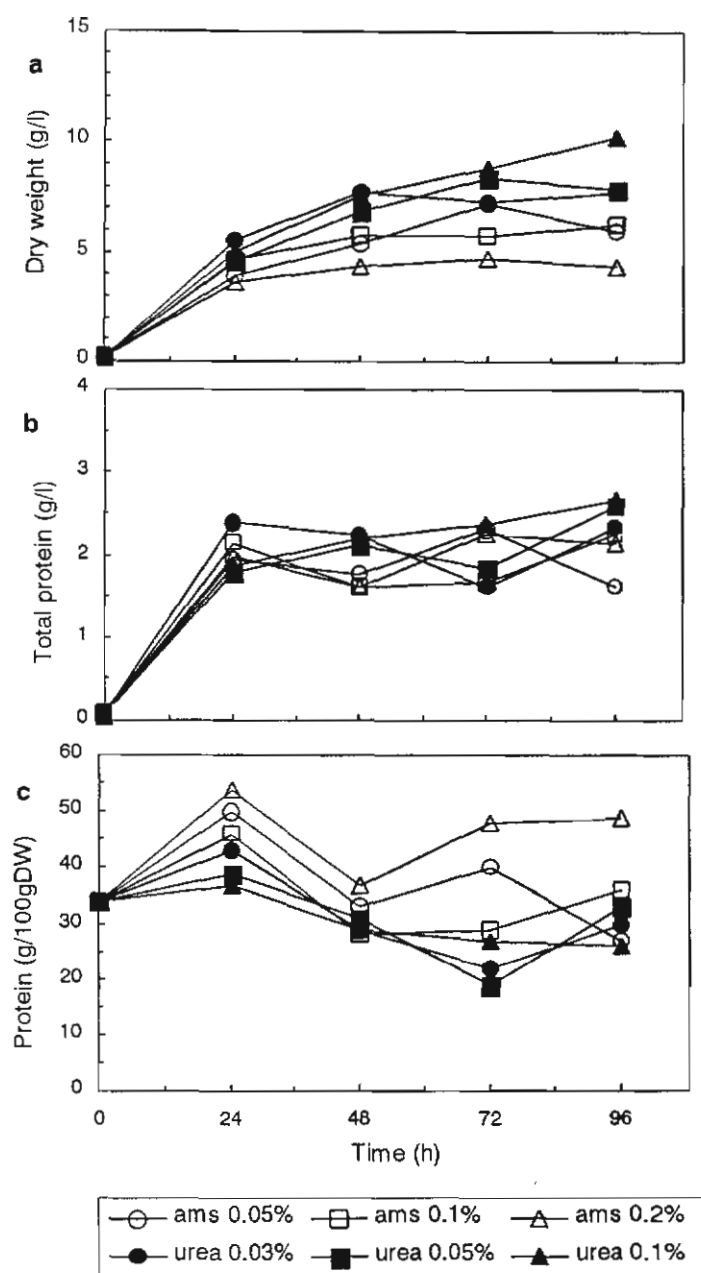


Figure 2.4 Growth (a), total protein (b) and protein content (c) of AM12 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and various concentrations of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Table 2.7 Sugar utilization and ethanol production of AM12 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and various concentrations of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	Ammonium sulfate						Urea					
	0.05%		0.1%		0.2%		0.03%		0.05%		0.1%	
	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH
0	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016
24	0.09	0	0.13	0	0.10	0	0.12	0.473	0.15	0.463	0.44	0.158
48	0.05	0	0.10	0	0.08	0	0.11	0	0.12	0	0.18	0
72	0.05	0	0.08	0	0.08	0	0.10	0	0.11	0	0.14	0
96	0.04	0	0.07	0	0.07	0	0.08	0	0.10	0	0.12	0

RS = reducing sugar; %

EtOH = ethanol; %w/v

สำหรับการเจริญของ M30 ในอาหารกากน้ำตาลที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นสูงกว่าในอาหารที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เช่นเดียวกับ RL-6 และ AM12 ในขณะที่มีโปรตีนทั้งหมดและการใช้น้ำตาลไม่แตกต่างกันนัก นอกจากนั้นมีการสร้างเอทานอลในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และหายไปหลังจากนั้น เช่นเดียวกับที่พบในเชื้ออีก 2 สายพันธุ์ (Table 2.8, 2.9 และ Figure 2.5) ถึงแม้ว่าเมื่อใช้ยูเรีย 0.05% นั้น M30 เจริญได้ดีกว่าในยูเรีย 0.1% เล็กน้อย แต่ให้โปรตีนทั้งหมดต่ำกว่าเล็กน้อยเช่นกัน ดังนั้น สำหรับการทดลองต่อไปจะใช้ยูเรีย 0.1% เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเลี้ยง M30 เช่นเดียวกัน และจากการพิจารณาโปรตีนในเซลล์ พบเช่นเดียวกับทั้งสองสายพันธุ์ข้างต้น คือ ในสภาพที่ยูเรียส่งเสริมการเจริญให้เซลล์มาก โปรตีนในเซลล์กลับต่ำซึ่งน่าจะเป็นข้อยืนยันว่าเป็นเพราะมีแหล่งไนโตรเจนจำกัด จึงทำให้การสะสมโปรตีนในเซลล์ต่ำ ซึ่งเป็นไปในทางตรงข้าม เมื่อแอมโมเนียมซัลเฟตถูกใช้สำหรับการเจริญน้อย จึงทำให้เหลือน้ำไปสังเคราะห์โปรตีนและสะสมในเซลล์ (Figure 2.5c)

Table 2.8 Growth and total protein of M30 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and various concentrations of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	Ammonium sulfate						Urea					
	0.05%		0.1%		0.2%		0.03%		0.05%		0.1%	
	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP
0	0.24	0.07	0.24	0.07	0.24	0.07	0.24	0.07	0.24	0.07	0.24	0.07
24	3.60	1.65	3.71	1.82	4.00	1.48	3.77	1.43	3.71	1.41	3.67	1.51
48	3.29	1.59	4.70	2.02	3.77	1.81	4.84	1.65	8.04	2.09	6.06	1.76
72	3.10	1.49	4.37	1.92	3.57	1.61	5.31	1.81	7.43	1.49	7.52	2.26
96	3.29	1.71	4.65	2.09	3.48	1.57	4.65	1.58	8.23	2.06	7.52	1.88

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

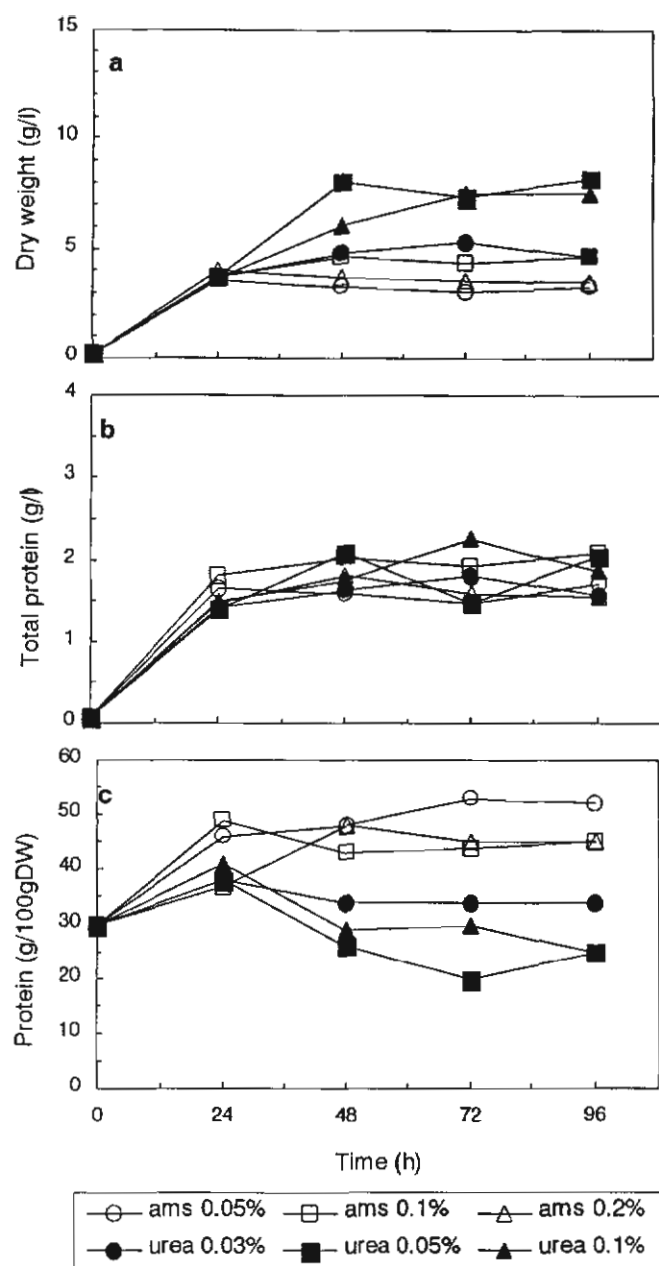


Figure 2.5 Growth (a), total protein (b) and protein content (c) of M30 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and various concentrations of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Table 2.9 Sugar utilization and ethanol production of M30 in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and various concentrations of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	Ammonium sulfate						Urea					
	0.05%		0.1%		0.2%		0.03%		0.05%		0.1%	
	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH	RS	EtOH
0	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016	2.11	0.016
24	0.16	0	0.11	0	0.11	0	0.13	0.534	0.13	0.495	0.09	0.503
48	0.10	0	0.11	0	0.10	0	0.10	0	0.10	0	0.07	0
72	0.09	0	0.10	0	0.09	0	0.09	0	0.09	0	0.06	0
96	0.07	0	0.08	0	0.08	0	0.08	0	0.08	0	0.06	0

RS = reducing sugar; % EtOH = ethanol; %w/v

สำหรับการตกตะกอนของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง ในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรีย ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจนนั้น พบว่า RL-6 ไม่ตกตะกอนตามปกติ ในขณะที่ AM12 และ M 30 ตกตะกอนได้เล็กน้อยในอาหารทุกชนิด โดยในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2% เชื้อตกตะกอนได้ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรีย ความเข้มข้นอื่น และ M30 ตกตะกอนได้สูงกว่า AM12 เล็กน้อย (Table 2.10)

Table 2.10 Flocculation of cells of RL-6, AM12 and M30 expressed as sedimentation efficiency cultivated in molasses medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and various concentrations of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Strain	Sedimentation efficiency					
	Ammonium sulfate			Urea		
	0.05%	0.1%	0.2%	0.03%	0.05%	0.1%
RL-6	0.08	0.06	0.07	0.08	0.07	0.07
AM12	0.21	0.21	0.17	0.23	0.22	0.20
M30	0.26	0.22	0.16	0.27	0.27	0.30

2.1.2.2 การเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการเลี้ยงยีสต์ในอาหารกากน้ำตาล ที่มียูเรีย 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับปริมาณกากน้ำตาลเพื่อให้อาหารมีน้ำตาลรีดิวซ์ 2, 3 และ 4 % (glucose equivalent) และปรับ pH ของอาหารให้เท่ากับ 4.5 ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นวัดเป็น OD₆₀₀ เท่ากับ 0.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C

ผลการทดลองแสดงว่า RL-6 เจริญในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ทั้ง 3 ความเข้มข้น ไม่ต่างกันมากนัก โดยในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% เชื้อเจริญให้เซลล์สูงสุด ถึงแม้ว่าในช่วง 48 ชั่วโมงแรก RL-6 มีการเจริญช้ากว่าในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 2 และ 3% แต่หลังจากนั้นอัตราการเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% ลดลงไม่มากเท่ากับในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 2 และ 3% และเมื่อพิจารณาโปรตีนทั้งหมดพบว่าในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% มีโปรตีนทั้งหมดสูงกว่าชัดเจน รวมทั้งมีโปรตีนในเซลล์สูงกว่า เมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นอื่น (Figure 2.6c) นอกจากนั้นอัตราการใช้น้ำตาลในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก สูงกว่าในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นอื่น และเชื้อสร้างเอทานอลในช่วง 48 ชั่วโมง แล้วจึงมีการใช้หลังจากนั้น ซึ่งต่างจากเมื่อเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้นต่ำกว่า ซึ่งสร้างเอทานอลในช่วง 24 ชั่วโมงแรก และเอทานอลหายไปหลังจากนั้น (Table 2.11 และ Figure 2.6)

Table 2.11 Growth, total protein, sugar utilization and ethanol production of RL-6 in molasses medium containing 2, 3 and 4% glucose equivalent sugar concentration and 0.1% urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	2 % reducing sugar				3 % reducing sugar				4 % reducing sugar			
	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH
0	0.23	0.09	2.11	0.16	0.23	0.09	3.32	0.16	0.23	0.09	4.24	0.16
24	4.11	1.73	0.22	0.84	5.22	2.09	0.45	2.59	3.02	1.57	0.61	2.88
48	11.07	3.99	0.09	0	12.69	4.70	0.19	0	10.22	4.29	0.24	0
72	12.20	3.90	0.09	0	12.20	4.88	0.17	0	13.95	6.56	0.16	0
96	13.10	2.62	0.09	0	13.82	4.01	0.14	0	14.76	5.90	0.13	0

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

RS = reducing sugar; %

EtOH = ethanol; %w/v

สำหรับการเจริญของ AM12 ในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นต่างกันนั้นไม่มีความแตกต่างกันมากนัก โดยในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% เชื้อเจริญได้ดีกว่าเล็กน้อย แต่ให้โปรตีนทั้งหมด

สูงกว่าเมื่อเจริญในอีกสองความเข้มข้นชัดเจน นอกจากนั้นยังแสดงว่ามีโปรตีนในเซลล์สูงกว่าเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นอื่นด้วย (Figure 2.7c) และเช่นเดียวกับที่พบใน RL-6 คือ อัตราการใช้น้ำตาลเมื่อเลี้ยงเชื้อในน้ำตาลรีดิวซ์ 4% สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 2 และ 3 นอกจากนี้ยังพบว่าในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นสูงขึ้นเชื้อสร้างเอทานอลได้มากขึ้น โดยพบว่าในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% AM12 ผลิตเอทานอลได้ถึง 1.11 %w/v ที่ 24 ชั่วโมง (Table 2.12 และ Figure 2.7)

Table 2.12 Growth, total protein, sugar utilization and ethanol production of AM12 in molasses medium containing 2, 3 and 4% glucose equivalent sugar concentration and 0.1% urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37 °C.

Time (h)	2 % reducing sugar				3 % reducing sugar				4 % reducing sugar			
	DW	TP	RS	EtOH	OD	TP	RS	EtOH	OD	TP	RS	EtOH
0	0.23	0.08	2.11	0.02	0.23	0.08	3.32	0.02	0.23	0.08	4.24	0.02
24	3.52	1.41	0.13	0.35	4.82	2.75	0.12	0.70	3.69	2.47	0.12	1.11
48	7.92	2.69	0.08	0	9.86	3.55	0.09	0	10.67	5.12	0.12	0.60
72	10.04	2.71	0.04	0	9.81	3.63	0.08	0	11.12	5.34	0.11	0
96	10.04	2.89	0.04	0	10.53	3.48	0.05	0	10.71	5.89	0.10	0

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

RS = reducing sugar; %

EtOH = ethanol; %w/v

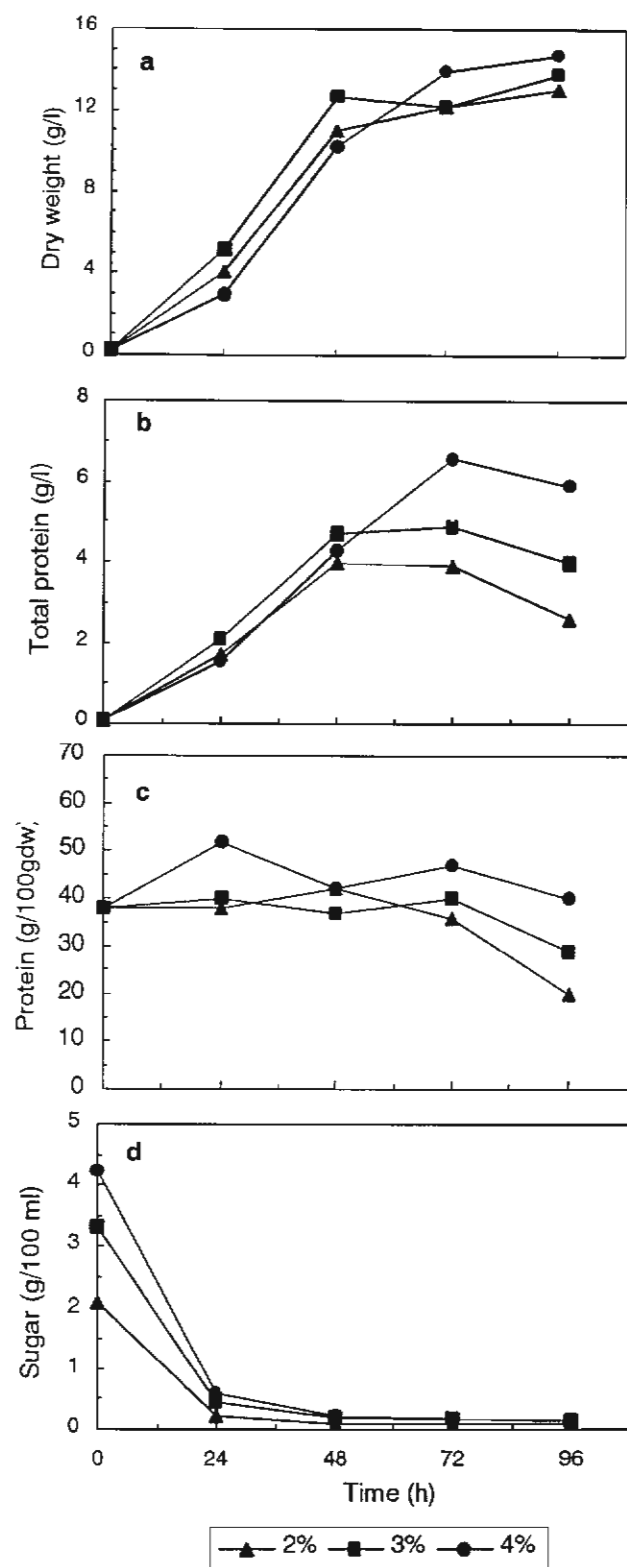


Figure 2.6 Growth (a), total protein (b) protein content (c) and sugar utilization (d) of RL-6 in molasses medium containing 2, 3 and 4% glucose equivalent sugar concentration and 0.1% urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

การเจริญของ M30 ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 2% ต่ำกว่าการเจริญ ในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 3 และ 4% ซึ่งมีการเจริญใกล้เคียงกัน เพียงแต่ในกรณีที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 3% เชื้อหยุดเจริญหลังจาก 48 ชั่วโมง แต่ในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% เชื้อยังคงมีการเจริญต่อเนื่องแม้ว่ามีอัตราการเจริญลดลง และสำหรับโปรตีนทั้งหมดพบว่าในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% M30 ให้โปรตีนทั้งหมดสูง 2-3 เท่าของเชื้อที่เจริญในที่มีอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ต่ำกว่าทั้งสองความเข้มข้น เช่นเดียวกับ RL-6 และ AM12 M30 มีโปรตีนในเซลล์สูงกว่าเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นอื่น และเช่นเดียวกับ RL-6 และ AM12 ที่เชื้อซึ่งเจริญในน้ำตาลรีดิวซ์ 4% มีอัตราการใช้น้ำตาลเร็วกว่า นอกจากนั้นยังพบการสร้างเอทานอลความเข้มข้นสูง เช่นเดียวกับ AM12 ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลเช่นกัน (Table 2.13 และ Figure 2.8)

Table 2.13 Growth, total protein, sugar utilization and ethanol production of M30 in molasses medium containing 2, 3 and 4% glucose equivalent sugar concentration and 0.1% urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	2 % reducing sugar				3 % reducing sugar				4 % reducing sugar			
	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH
0	0.24	0.07	2.11	0.16	0.24	0.07	3.32	0.16	0.24	0.07	4.24	0.02
24	3.81	1.79	0.06	0.46	5.12	2.15	0.09	0.70	5.69	3.30	0.25	1.06
48	5.45	1.15	0.06	0	11.93	2.63	0.07	0	11.09	5.10	0.2	0.51
72	7.33	1.69	0.05	0	11.28	2.71	0.07	0	12.97	5.32	0.18	0
96	7.90	1.58	0.05	0	11.61	2.90	0.07	0	13.54	5.28	0.16	0

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

RS = reducing sugar; %

EtOH = ethanol; %w/v

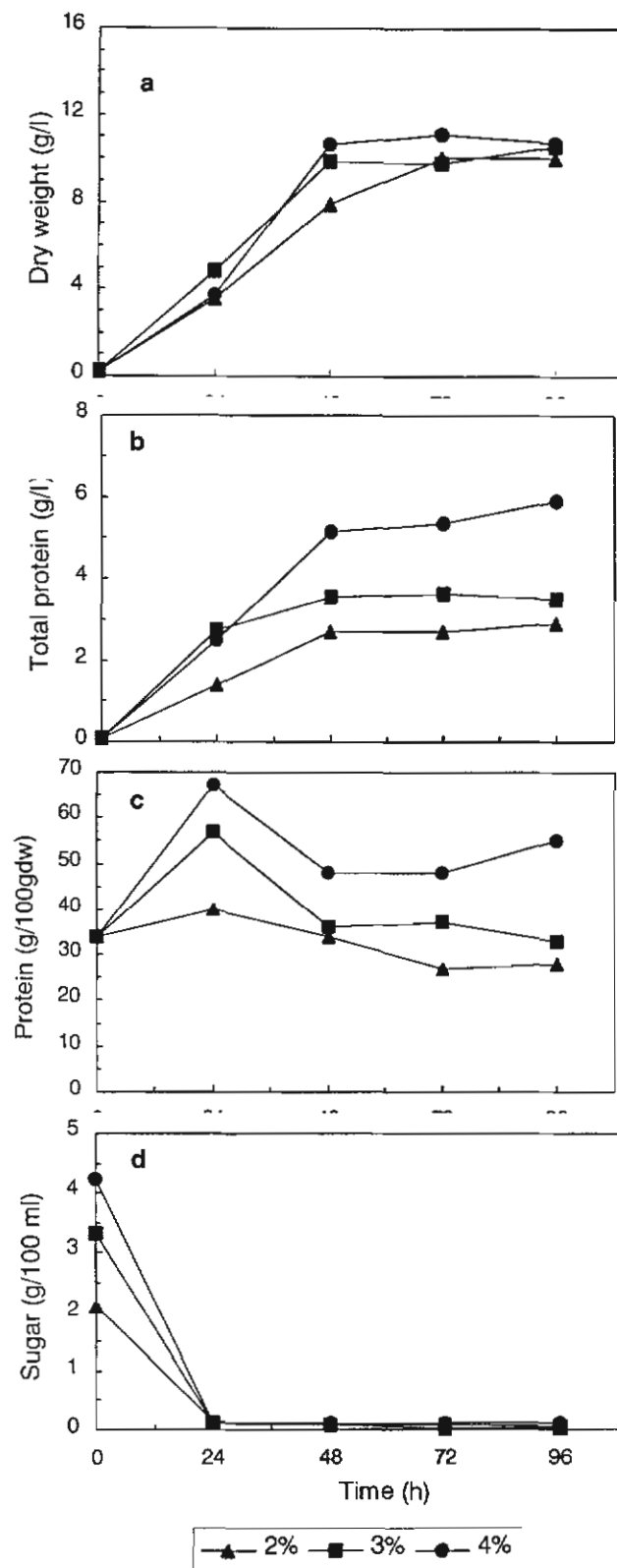


Figure 2.7 Growth (a), total protein (b) protein content (c) and sugar utilization (d) of AM12 in molasses medium containing 2, 3 and 4% glucose equivalent sugar concentration and 0.1% urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

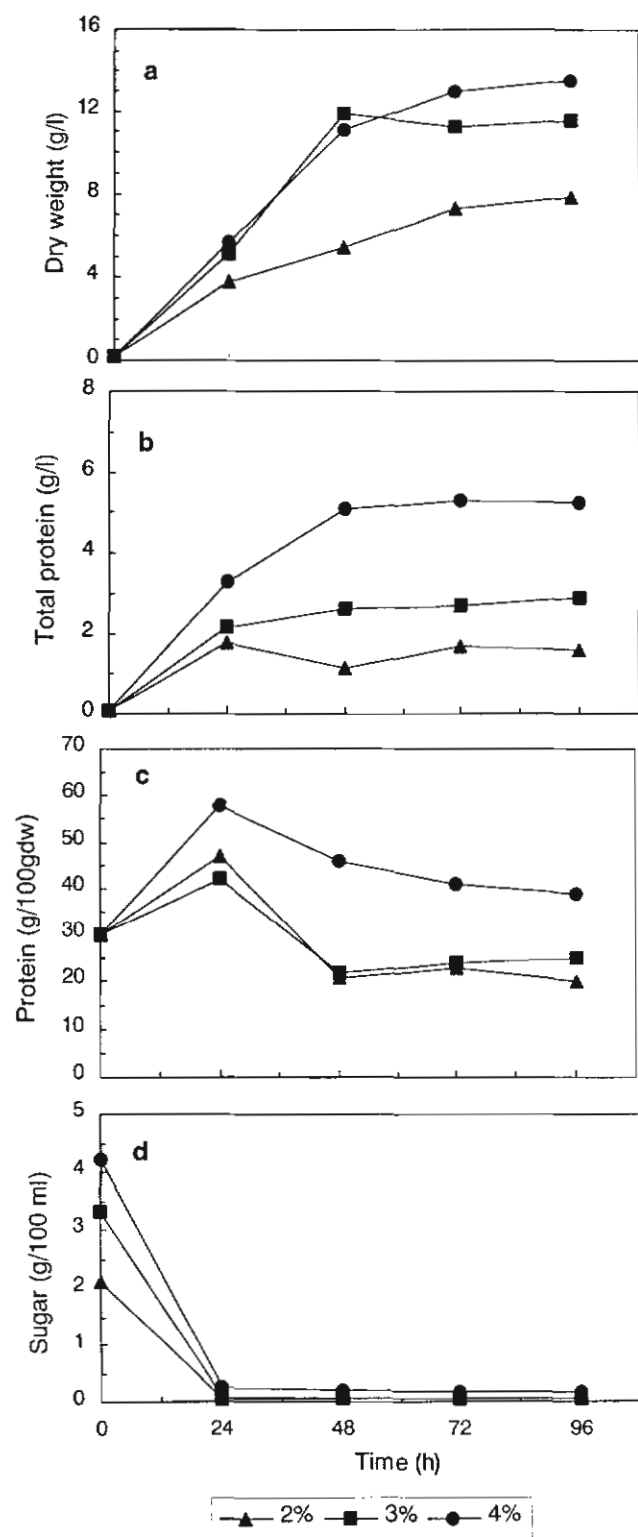


Figure 2.8 Growth (a), total protein (b) protein content (c) and sugar utilization (d) of M30 in molasses medium containing 2, 3 and 4% glucose equivalent sugar concentration and 0.1% urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

สำหรับการตกตะกอนของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์เข้มข้นต่างกันนั้น พบว่า RL-6 ไม่ตกตะกอน ในขณะที่ AM12 และ M30 ตกตะกอนได้ โดย M30 ตกตะกอนได้ดีกว่า AM12 และการตกตะกอนของ M30 ในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 3 % ดีกว่าในอาหารที่มี น้ำตาลรีดิวซ์อีก 2 ความเข้มข้นเล็กน้อย ส่วนเซลล์ของ AM12 ที่เลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% นั้น ตกตะกอนได้ดีกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์อีก 2 ความเข้มข้นเล็กน้อย (Table 2.14)

Table 2.14 Flocculation of cells of RL-6, AM12 and M30 expressed as sedimentation efficiency cultivated in molasses medium containing 2, 3 and 4% glucose equivalent sugar concentration and 0.1% urea, pH 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Strain	Sedimentation efficiency		
	2 % reducing sugar	3 % reducing sugar	4 % reducing sugar
RL-6	0.07	0.07	0.07
AM12	0.14	0.16	0.23
M30	0.21	0.30	0.24

2.1.2.2 การเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในอาหารกากน้ำตาล ที่ปรับให้มี pH เริ่มต้นต่างๆ

ทดลองเลี้ยงยีสต์ทั้งสามสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในอาหารกากน้ำตาล ที่ปรับปริมาณกากน้ำตาลที่ใช้เพื่อให้อาหารมีน้ำตาลรีดิวซ์ 4 % เติมนูเรีย 0.1% โดยไม่ปรับ pH ของอาหาร (pH = 5.23) หรือปรับ pH ให้เท่ากับ 4 และ 4.5 เพาะเชื้อให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นวัดเป็น OD₆₆₀ เท่ากับ 0.5 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37°C

ผลการทดลองแสดงว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ เจริญดีที่สุด ให้โปรตีนทั้งหมด และโปรตีนในเซลล์สูงสุด เมื่ออาหารมี pH 4.5 รวมทั้งมีการสร้างเอทานอลขึ้นมามากกว่าที่ pH 4 และ 5.23 (Table 2.15, 2.16, 2.17 และ Figure 2.9, 2.10, 2.11) สำหรับการตกตะกอนเป็นเช่นเดียวกับทุกการทดลองที่ผ่านมา คือ RL-6 ไม่ตกตะกอน ส่วน M30 ตกตะกอนดีกว่า AM12 เล็กน้อย (Table 2.18)

Table 2.15 Growth, total protein, sugar utilization and ethanol production of RL-6 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH was not adjusted (pH 5.23) or adjusted to pH 4 and 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	pH 4				pH 4.5				pH 5.23			
	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH
0	0.23	0.09	2.11	0.16	0.23	0.09	2.11	0.02	0.23	0.09	2.11	0.02
24	2.37	1.21	0.12	0.16	4.41	2.34	0.07	0.39	1.86	0.89	0.05	0.05
48	4.95	1.83	0.1	0	11.07	3.76	0.05	0	3.96	1.31	0.04	0
72	5.67	1.93	0.06	0	12.69	5.08	0.05	0	4.37	1.22	0.04	0
96	4.47	1.16	0.05	0	13.18	4.65	0.04	0	5.31	1.59	0.04	0

DW = dry weight; g/l

RS = reducing sugar; %

TP = total protein; g/l

EtOH = ethanol; %w/v

Table 2.16 Growth, total protein, sugar utilization and ethanol production of AM12 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH was not adjusted (pH 5.23) or adjusted to pH 4 and 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	pH 4				pH 4.5				pH 5.23			
	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH
0	0.23	0.09	2.11	0.16	0.23	0.09	2.11	0.02	0.23	0.09	2.11	0.02
24	2.37	1.18	0.12	0.56	3.92	2.35	0.09	0.73	1.86	0.88	0.13	0.54
48	4.95	2.23	0.1	0	9.90	4.26	0.05	0	3.96	1.07	0.11	0
72	5.67	1.64	0.11	0	11.70	5.38	0.05	0	4.37	1.40	0.11	0
96	7.74	2.86	0.07	0	10.35	4.87	0.04	0	5.31	1.54	0.11	0

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

RS = reducing sugar; %

EtOH = ethanol; %w/v

Table 2.17 Growth, total protein, sugar utilization and ethanol production of M30 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH was not adjusted (pH 5.23) and adjusted to pH 4 and 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	pH 4				pH 4.5				pH 5.23			
	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH
0	0.24	0.07	2.11	0.16	0.24	0.07	2.11	0.02	0.24	0.07	2.11	0.02
24	2.63	1.16	0.21	0.63	3.60	1.65	0.16	0.65	2.82	1.24	0.20	0.62
48	4.56	1.50	0.15	0	7.99	3.84	0.10	0	3.66	1.28	0.16	0
72	3.76	1.58	0.14	0	8.75	3.76	0.09	0	4.14	1.49	0.14	0
96	3.53	1.59	0.14	0	10.01	4.21	0.07	0	3.62	1.45	0.14	0

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

RS = reducing sugar; %

EtOH = ethanol; %w/v

Table 2.18 Flocculation expressed as sedimentation efficiency (S.E.) of cells of RL-6, AM12 and M30 cultivated in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea, pH was 4, 4.5 and 5.23, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Strain	Sedimentation efficiency		
	pH 4	pH 4.5	pH 5.23
RL-6	0.07	0.07	0.07
AM12	0.20	0.22	0.20
M30	0.30	0.36	0.30

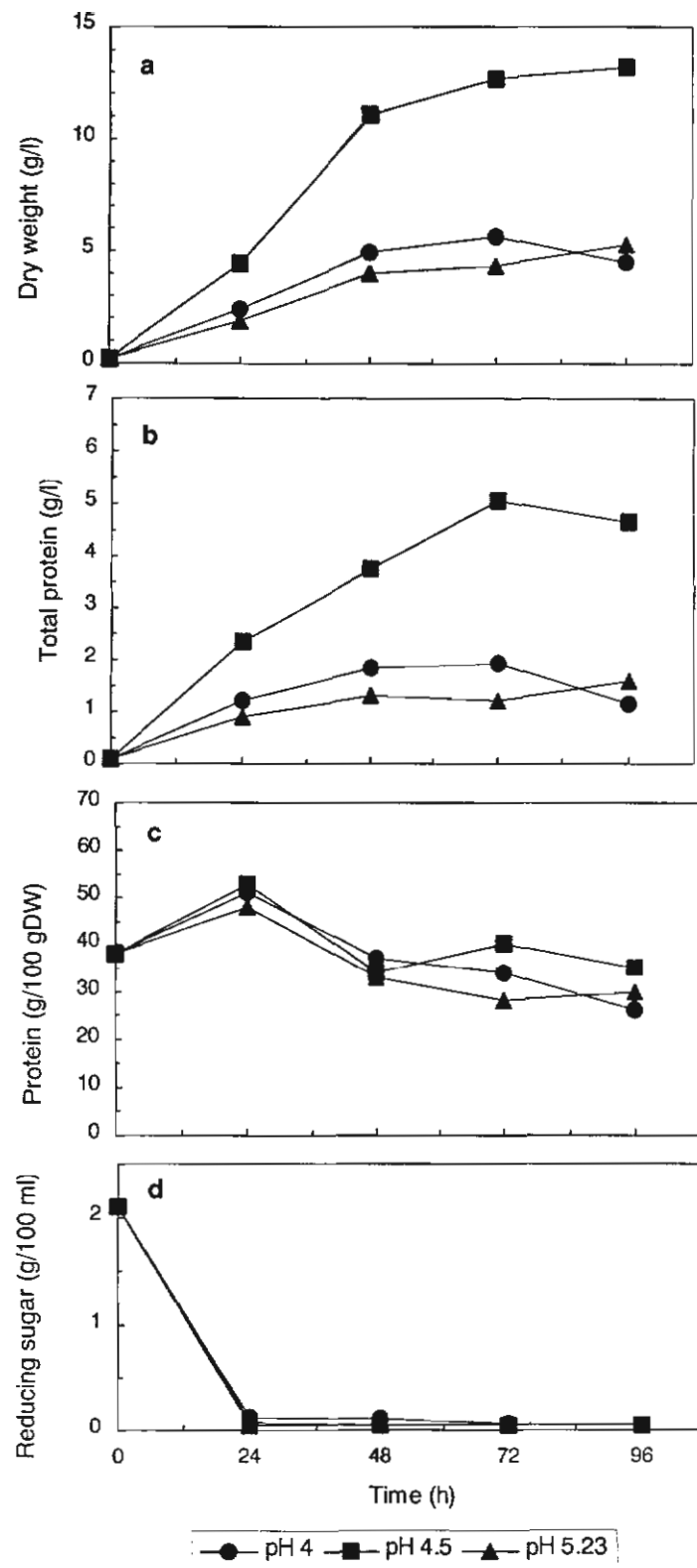


Figure 2.9 Growth (a), total protein (b), protein content (c) and sugar utilization (d) of RL-6 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH was not adjusted (pH 5.23) or adjusted to pH 4 and 4.5, 5.23, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

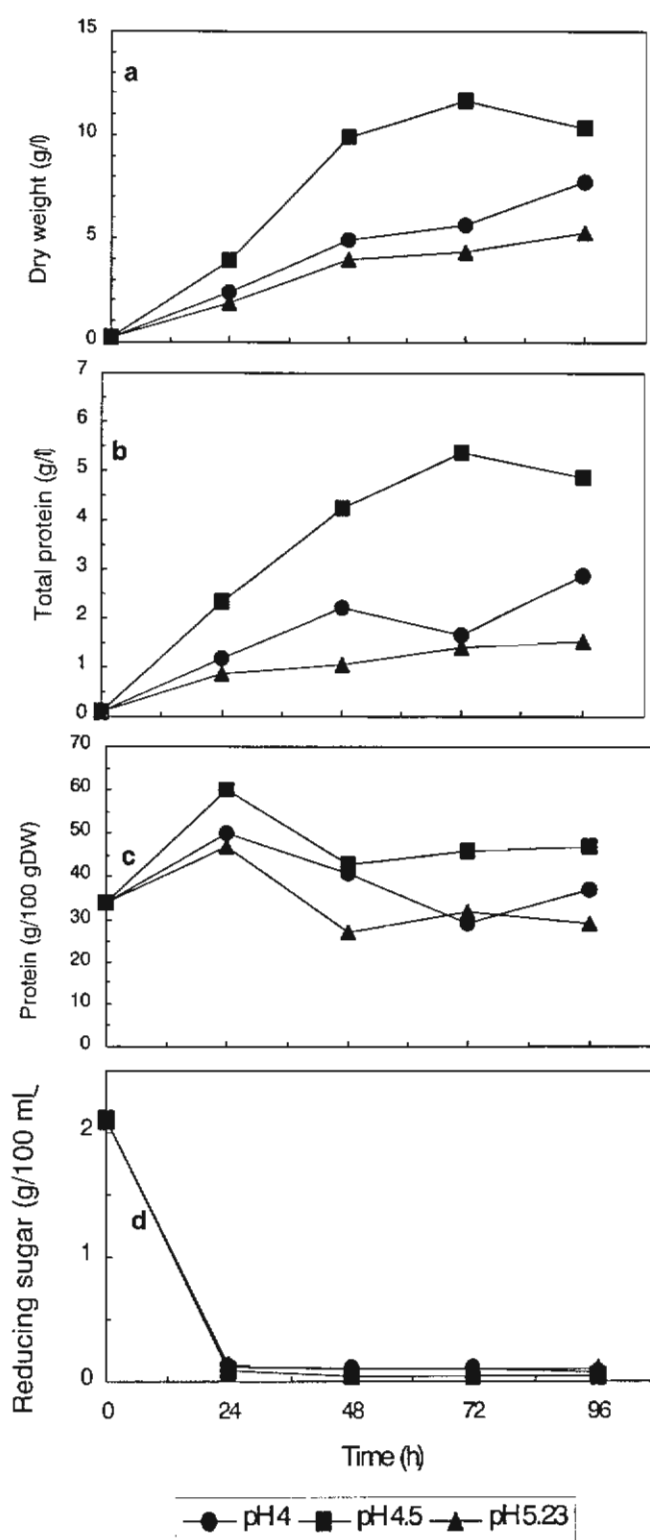


Figure 2.10 Growth (a), total protein (b), protein content (c) and sugar utilization (d) of AM12 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH was not adjusted (pH 5.23) or adjusted to pH 4 and 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

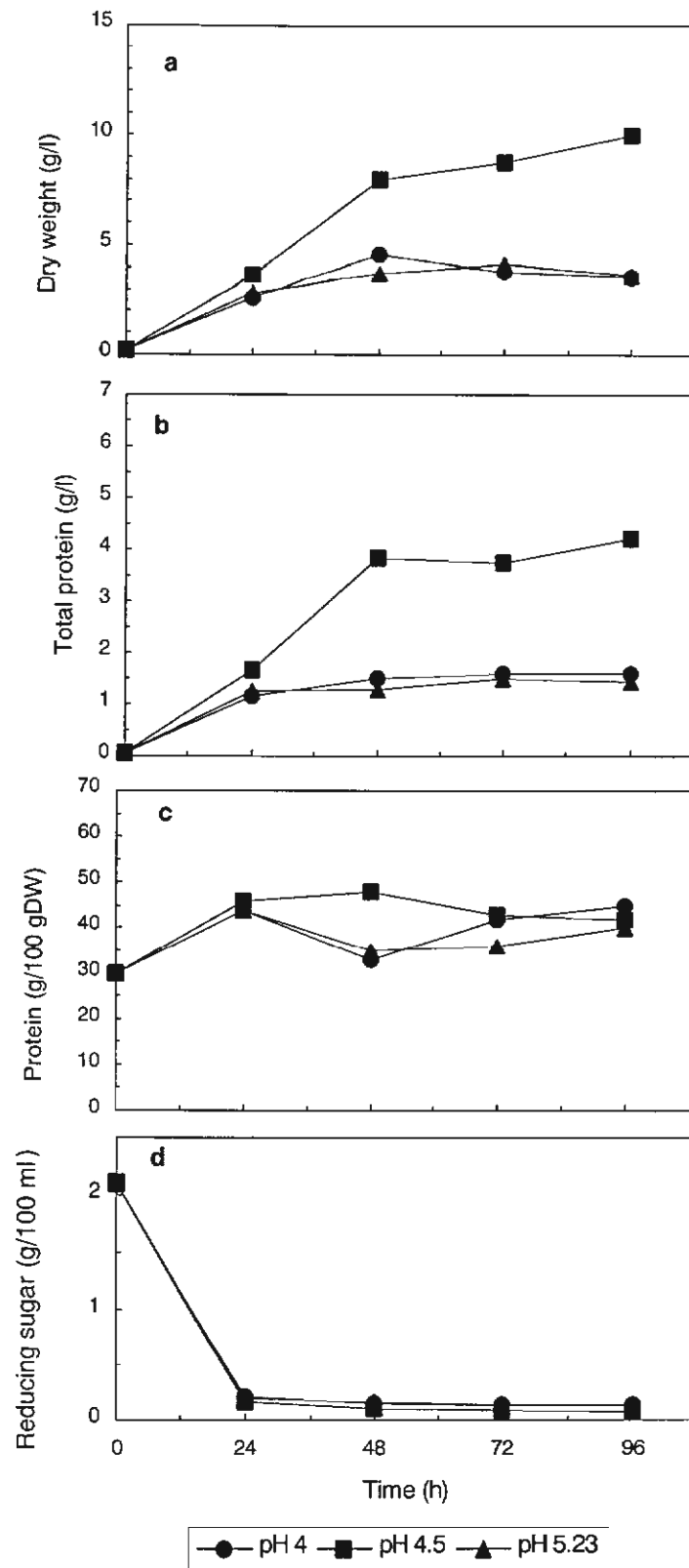


Figure 2.11 Growth (a), total protein (b), protein content (c) and sugar utilization (d) of M30 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH was not adjusted (pH 5.23) and adjusted to pH 4 and 4.5, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

1.1.2.4 การเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในอาหารกากน้ำตาล ที่ปรับให้มีเซลล์เริ่มต้น ความเข้มข้นต่าง ๆ

เลี้ยงยีสต์ที่คัดเลือกได้ในอาหารกากน้ำตาล ที่ปรับปริมาณกากน้ำตาลให้มีน้ำตาล ริตวิธ 4 % เตมียูเรีย 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH ของอาหาร ให้เท่ากับ 4.5 เพาะเชื้อให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นวัดเป็น OD₆₆₀ เท่ากับ 0.5, 1, 1.5 และ 2 บ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 °C ผลการทดลองแสดงว่าสำหรับ RL-6 นั้น เมื่อปรับเซลล์เริ่มต้นให้มีความเข้มข้นวัดเป็น OD₆₆₀ เท่ากับ 1.5 เชื้อสามารถเจริญได้สูงสุด และให้โปรตีนทั้งหมดสูงสุดด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามปริมาณเซลล์ และโปรตีนทั้งหมดที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก (Table 2.19 และ Figure 2.12)

Table 2.19 Growth, total protein, sugar utilization and ethanol production of RL-6 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH 4.5, with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5, 1, 1.5 and 2, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37 °C.

Time (h)	Initial OD ₆₆₀ = 0.5				Initial OD ₆₆₀ = 1				Initial OD ₆₆₀ = 1.5				Initial OD ₆₆₀ = 2			
	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH
0	0.23	0.10	4.19	0.02	0.45	0.20	4.19	0.02	0.68	0.30	4.19	0.02	0.90	0.40	4.15	0.02
24	0.56	0.32	0.72	0.29	0.41	0.20	0.68	0.35	0.50	0.24	0.52	0.39	0.78	0.34	0.51	0.40
48	3.47	1.87	0.21	0	4.46	2.26	0.13	0	4.68	2.91	0.13	0	4.46	2.65	0.15	0
72	11.56	4.09	0.11	0	10.15	6.19	0.12	0	12.79	6.78	0.11	0	12.14	5.95	0.10	0
96	12.87	4.95	0.10	0	11.12	4.83	0.12	0	15.79	6.16	0.10	0	13.80	5.57	0.10	0

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

RS = reducing sugar; %

EtOH = ethanol; %w/v

สำหรับ AM12 นั้น พบว่าเชื้อมีการเจริญให้เซลล์สูงสุด เมื่อใช้ OD₆₆₀ เริ่มต้นเป็น 0.5 แต่กลับให้โปรตีนทั้งหมดต่ำที่สุด ส่วนความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นที่ให้เซลล์มากรองลงมา คือ OD₆₆₀ 2 ซึ่งให้โปรตีนทั้งหมดสูงสุดด้วย (Table 2.20 และ Figure 2.12)

ส่วน M30 นั้น เจริญให้เซลล์ และโปรตีนทั้งหมดสูงสุดเมื่อใช้ OD₆₆₀ เริ่มต้นเป็น 2 ในขณะที่เมื่อใช้ OD₆₆₀ เริ่มต้นเท่ากับ 1.5 เชื้อเจริญให้เซลล์ และโปรตีนทั้งหมดต่ำกว่าเล็กน้อย แต่ให้โปรตีนในเซลล์สูงกว่า เมื่อใช้ OD₆₆₀ เริ่มต้นเท่ากับ 2 ชัดเจน (Table 2.21 และ Figure 1.13)

เมื่อพิจารณาการตกตะกอนของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่ามีลักษณะการตกตะกอนเช่นเดียวกับการทดลองอื่นๆ คือ RL-6 ไม่ตกตะกอน M30 ตกตะกอนได้ดีกว่า AM12 โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อด้วยการปรับ OD₆₆₀ เริ่มต้นเป็น 0.5 เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ตกตะกอนดีกว่าเมื่อใช้ OD₆₆₀ เริ่มต้นสูงขึ้น เล็กน้อย (Table 2.22)

Table 2.20 Growth, total protein, sugar utilization and ethanol production of AM12 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH 4.5, with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5, 1, 1.5 and 2, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	Initial OD ₆₆₀ = 0.5				Initial OD ₆₆₀ = 1				Initial OD ₆₆₀ = 1.5				Initial OD ₆₆₀ = 2			
	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH
0	0.23	0.11	4.19	0.02	0.45	0.21	4.19	0.02	0.68	0.32	4.19	0.02	0.90	0.42	4.19	0.02
24	5.45	3.48	0.14	0.69	5.20	3.10	0.14	0.53	5.52	3.65	0.13	0.51	5.38	3.39	0.12	0.61
48	13.68	4.09	0.13	0.36	12.38	6.91	0.12	0	13.86	7.09	0.11	0	12.96	7.20	0.1	0
72	17.69	5.43	0.11	0	15.17	7.96	0.12	0	13.59	6.65	0.1	0	14.13	8.05	0.1	0
96	16.69	5.35	0.11	0	13.37	6.01	0.11	0	14.31	6.65	0.1	0	16.07	6.52	0.09	0

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

RS = reducing sugar; %

EtOH = ethanol; %w/v

Table 2.21 Growth, total protein, sugar utilization and ethanol production of M30 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH 4.5, with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5, 1, 1.5 and 2, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Time (h)	Initial OD ₆₆₀ = 0.5				Initial OD ₆₆₀ = 1				Initial OD ₆₆₀ = 1.5				Initial OD ₆₆₀ = 2			
	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH	DW	TP	RS	EtOH
0	0.24	0.11	4.19	0.02	0.47	0.20	4.19	0.02	0.71	0.30	4.19	0.02	0.94	0.40	4.19	0.02
24	5.97	3.32	0.27	0.69	6.87	3.47	0.21	0.53	5.58	3.26	0.23	0.51	6.96	3.26	0.22	0.61
48	9.14	5.91	0.14	0.36	7.97	4.87	0.16	0	10.79	6.47	0.16	0	11.92	6.30	0.18	0
72	10.33	5.65	0.11	0	10.44	6.68	0.12	0	13.47	9.13	0.13	0	14.79	9.17	0.16	0
96	12.85	5.99	0.1	0	11.14	6.91	0.11	0	10.80	6.78	0.12	0	14.02	7.61	0.09	0

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

RS = reducing sugar; %

EtOH = ethanol; %w/v

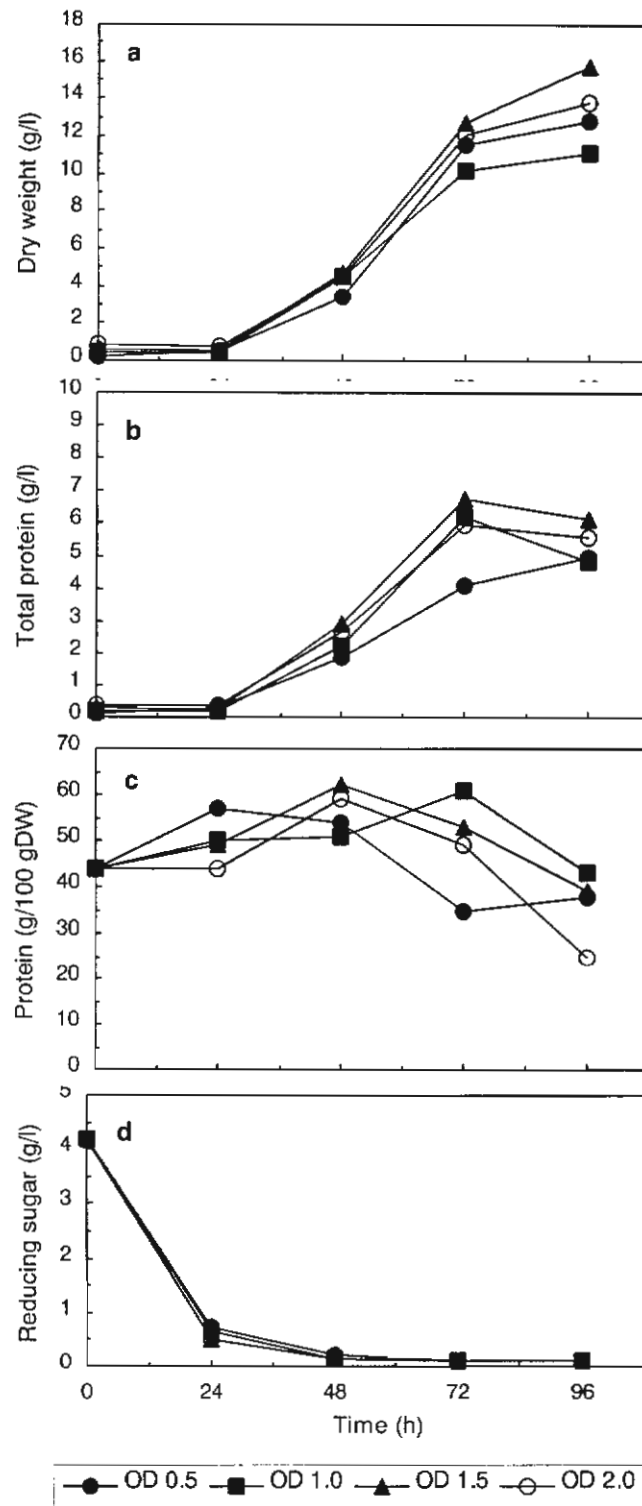


Figure 2.12 Growth (a), total protein (b), protein content (c) and sugar utilization (d) of RL-6 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH 4.5, with initial cell concentration as OD_{660} at 0.5, 1, 1.5 and 2, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

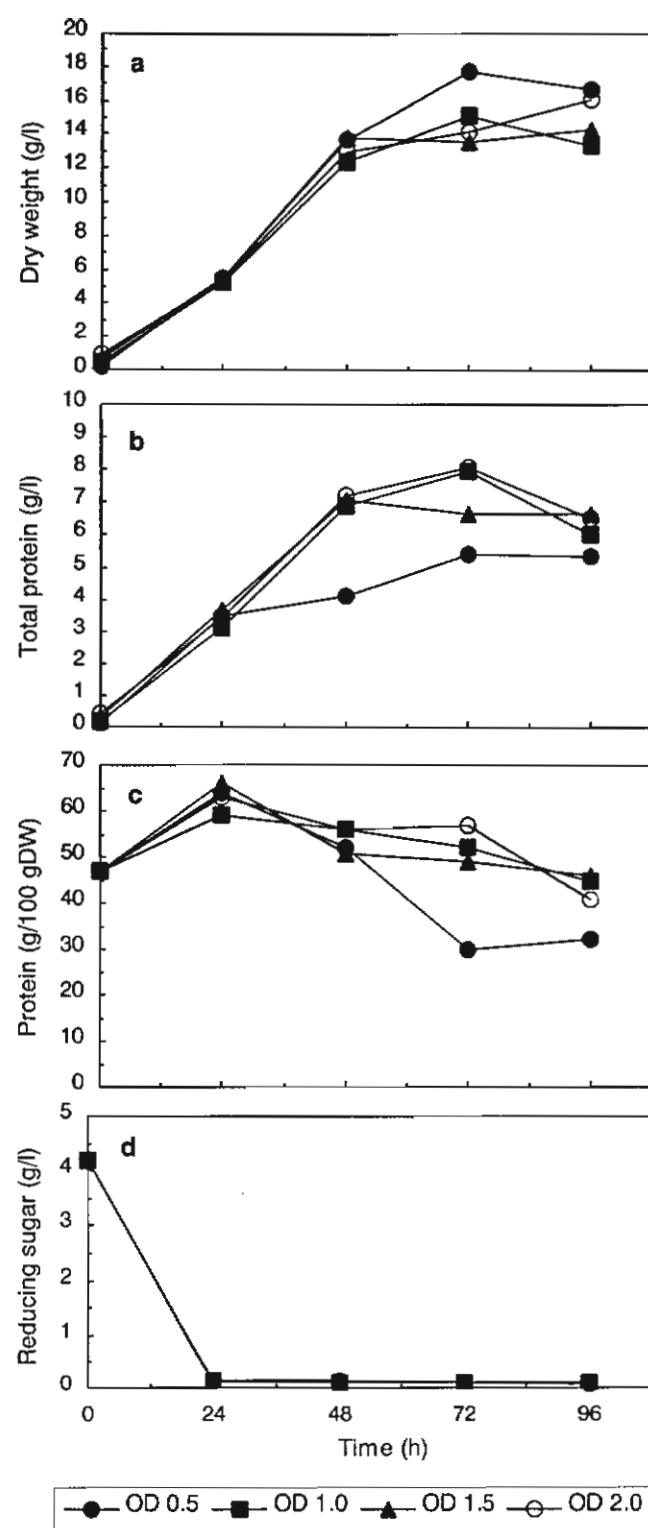


Figure 2.13 Growth (a), total protein (b), protein content (c) and sugar utilization (d) of AM12 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH 4.5, with initial cell concentration as OD_{660} at 0.5, 1, 1.5 and 2, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

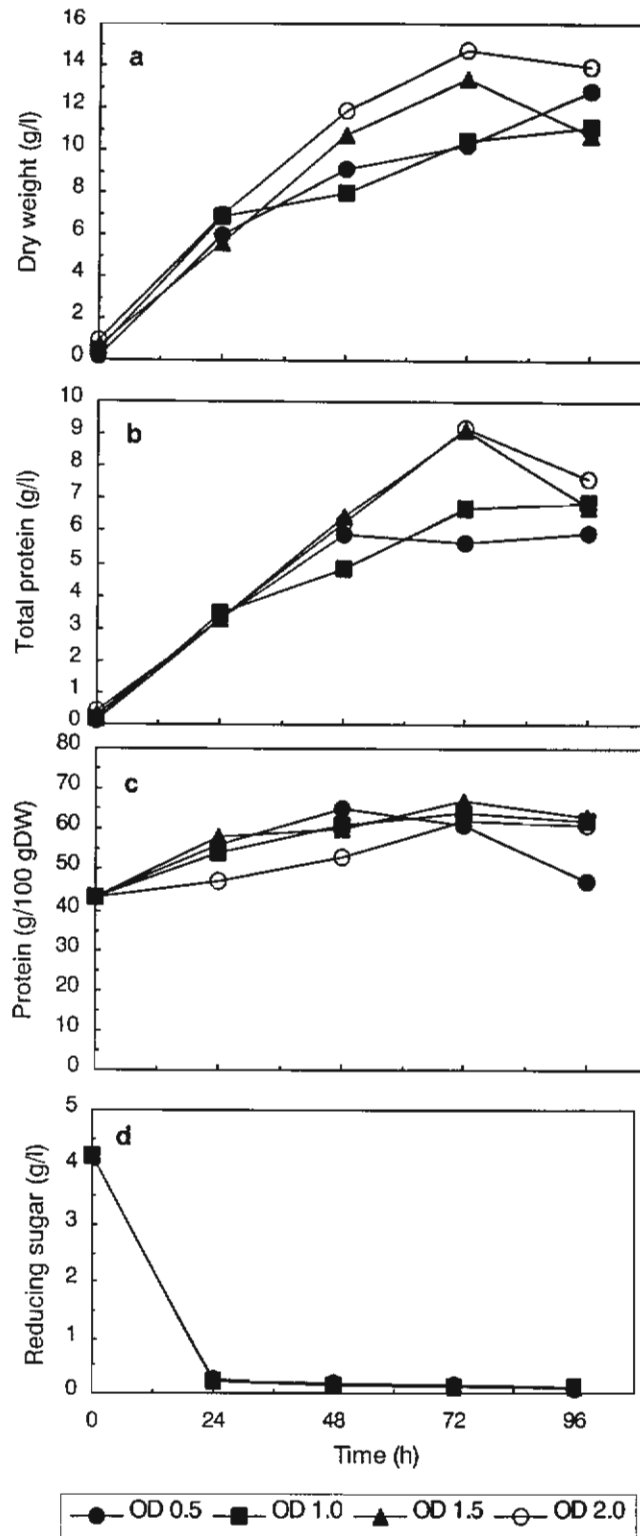


Figure 2.14 Growth (a), total protein (b), protein content (c) and sugar utilization (d) of M30 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH 4.5, with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5, 1, 1.5 and 2, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C.

Table 2.21 Flocculation expressed as sedimentation efficiency (S.E.) of cells of RL-6, AM12 and M30 cultivated in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH 4.5, with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5, 1, 1.5 and 2, and incubated in rotary shaker, 160 rpm, at 37°C for 48 h.

Strain	Sedimentation efficiency			
	Initial OD ₆₆₀ = 0.5	Initial OD ₆₆₀ = 1	Initial OD ₆₆₀ = 1.5	Initial OD ₆₆₀ = 2
RL-6	0.08	0.07	0.07	0.06
AM12	0.30	0.28	0.21	0.21
M30	0.48	0.39	0.36	0.37

2.1.2.5 การเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ในอาหารกากน้ำตาลที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ทำการเลี้ยงยีสต์ในอาหารกากน้ำตาล ที่มีปริมาณกากน้ำตาลที่ใช้เพื่อให้อาหารมีน้ำตาลรีดิวซ์ 4 % เติมนูเรีย 0.1% เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH ให้เท่ากับ 4.5 ในหลอดทดสอบรูปร่างตัวแอล เพาะเชื้อให้มีความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นวัดเป็น OD₆₆₀ เท่ากับ 0.5 บ่มโดยการเขย่าเบา ๆ ใน gradient temperature incubator อุณหภูมิ 33-45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการทดลองแสดงว่า RL-6 เจริญให้เซลล์และโปรตีนทั้งหมดสูงสุด เมื่อบ่มที่ 33°C และไม่เจริญที่ 40°C ส่วน AM12 เจริญได้สูงสุด เมื่อบ่มที่ 33-35°C และไม่สามารเจริญได้ที่ 43°C ในขณะที่โปรตีนทั้งหมดไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเลี้ยงที่ 30-37°C และสำหรับ M30 เจริญได้ดี และให้โปรตีนทั้งหมดสูงที่ 30-33°C และไม่เจริญที่ 43°C เช่นเดียวกับ AM12 ผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่า AM12 มีช่วงอุณหภูมิที่เป็น optimal temperature สูงกว่าเชื้ออื่น (Table 2.22 และ Figure 2.15)

Table 2.22 Growth, total protein, sugar utilization and ethanol production of RL-6, AM12 and M30 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH was not adjusted to pH 4, on gradient temperature incubator at various temperatures.

Temp (°C)	RL-6		AM12		M30	
	DW	TP	DW	TP	DW	TP
30	6.35	1.97	5.72	1.89	2.68	1.31
33	8.55	2.14	6.75	1.82	2.63	1.32
35	7.79	1.79	6.75	1.76	1.93	1.23
37	7.07	1.63	5.22	1.51	1.83	1.08
40	0.05	0	1.04	0.66	1.13	0.73
43	0.04	0	0.04	0	0.09	0
45	0.04	0	0.04	0	0.03	0

DW = dry weight; g/l

TP = total protein; g/l

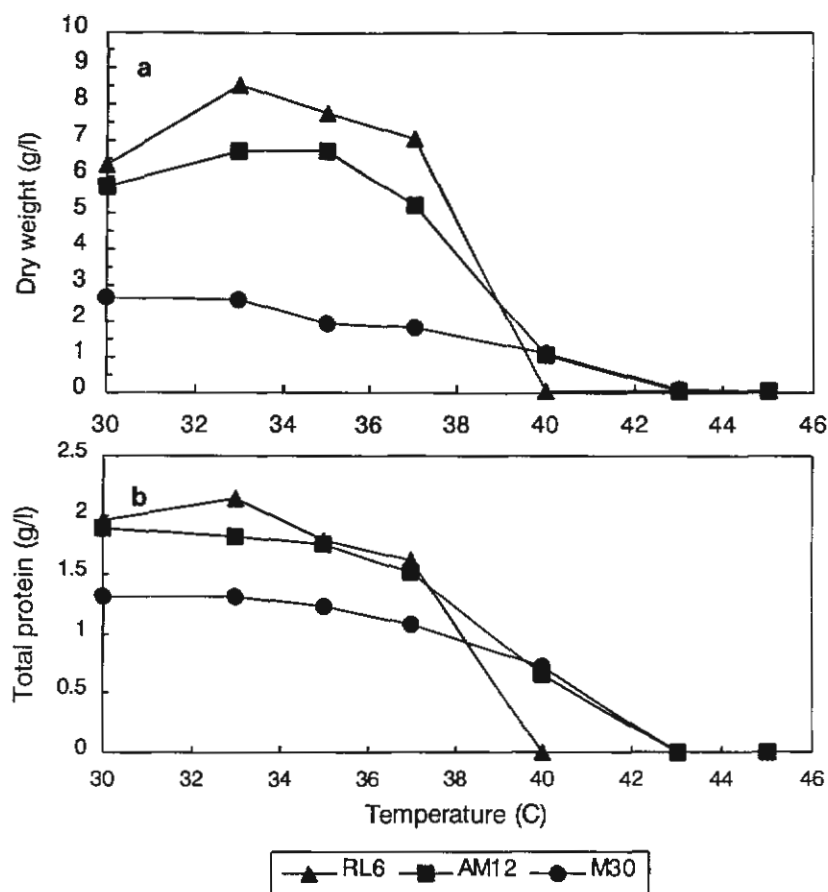


Figure 2.15 Growth (a) and total protein (b) of RL-6, AM12 and M30 in molasses medium containing 4% glucose equivalent sugar concentration, 0.1% urea and pH 4.5, and incubated in temperature gradient incubator for 48 h.

2.1.3 ศึกษาการตกตะกอนของ M30 ในระหว่างการหมักแบบให้อากาศ ในกากน้ำตาล โดยใช้ airlift fermentor

2.1.3.1 การเจริญและการหมักเอทานอล

ทำการทดลองโดยเลี้ยง M30 ในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลที่หมักได้ (วิเคราะห์โดย HPLC ในรูปของกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส) 4.88% ยูเรีย 0.1% และโปแตสเซียม ไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05% pH 4.5 ปริมาตร 3.5 ลิตร ใน airlift fermentor เซลล์เริ่มต้นวัดเป็น OD เท่ากับ 0.5 และให้อากาศระหว่างการหมัก 0.75 vvm (สภาวะที่ศึกษาเป็นสภาวะที่เหมาะสม จากโครงการย่อยที่ 2) จากการทดลองแสดงว่า M30 เจริญดี ให้เซลล์ 17.03 กรัม/ลิตร ที่ 36 ชั่วโมง โดยเซลล์มีโปรตีนในเซลล์สูง (36-47 กรัม/ลิตร) ตลอด 48 ชั่วโมงที่เลี้ยงเชื้อ (Table 2.23 และ Figure 2.16)

2.1.3.2 การตกตะกอนในรูปของ Sedimentation efficiency

สำหรับค่า S.E. ของเซลล์อายุ 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 0.32, 0.32 และ 0.74

(Table 2.24)

Table 2.23 Growth, protein content, total protein, ethanol concentration, fermentable sugar utilization and pH of M30 cultivated in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5 and aeration at 0.75 vvm.

Time (h)	DW	P	TP	FS	EtOH,	pH
0	0.25	43	0.14	4.88	0.15	4.5
12	1.88	47	0.96	0.32	0.65	4.73
24	8.98	36	2.21	0.28	1.40	4.76
36	17.03	45	3.96	0.26	0.57	4.73
48	17.06	44	3.77	0.12	0.24	4.55

DW = dry weight (g/l)

Protein content (g/ 100gDW)

TP = total protein (g/l)

FS = Fermentable sugar (%)

EtOH = ethanol (%w/v)

Table 2.24 Flocculation expressed as S.E. during cultivation.

Culture age (h)	Sedimentation efficiency
24	0.32
36	0.32
48	0.74

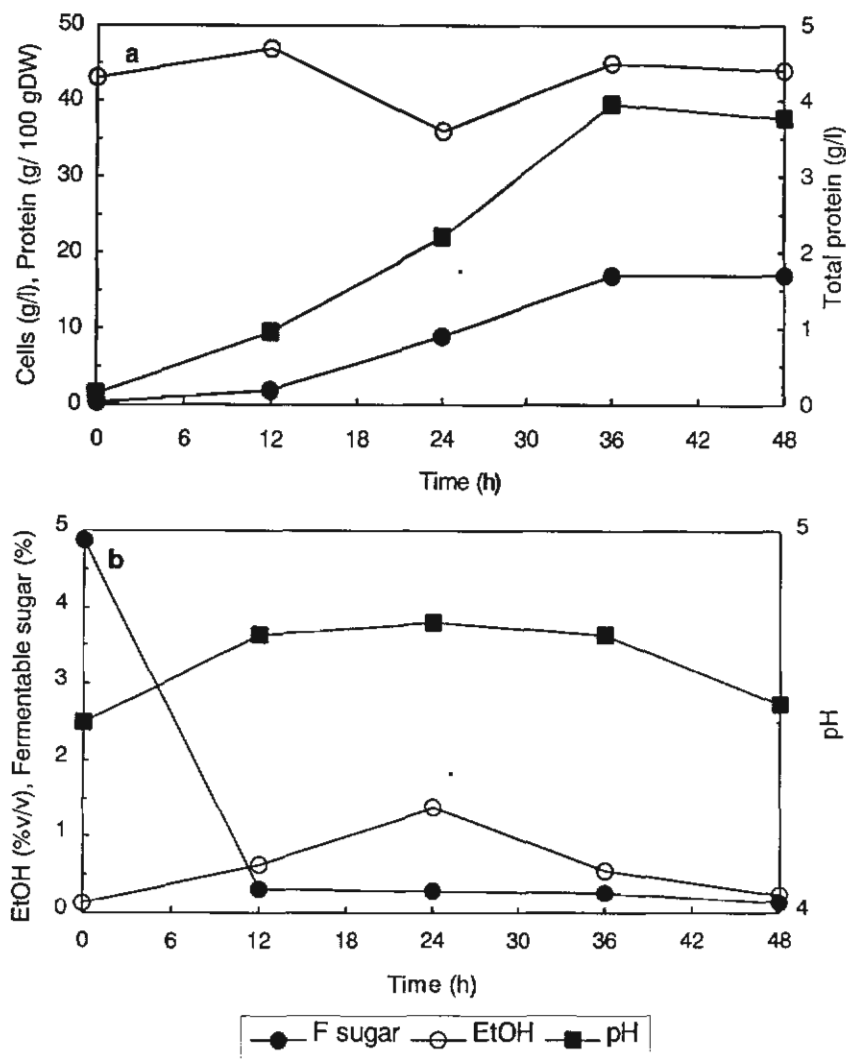


Figure 2.16 Growth, protein content, total protein (a), ethanol concentration, fermentable sugar utilization and pH (b) of M30 cultivated in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD_{660} at 0.5 and aeration at 0.75 vvm.

2.1.3.3 ความสูงของ sediment

สำหรับการวัดความสูงของตะกอนนั้น ได้นำ culture broth อายุ 36 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งมีเซลล์ความเข้มข้นเท่า ๆ กัน ใส่ใน cylinder ขนาด 25 มล. จับเวลา และวัดความสูงหลังจากตั้งไว้เวลาต่าง ๆ พบว่าที่สภาวะของการเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวข้างต้น เซลล์ของ M30 มีการตกตะกอนดีมาก สามารถสังเกตเห็นการรวมกลุ่มของเซลล์ทันทีที่เริ่มจับเวลา โดยพบว่าเซลล์ใน culture broth อายุ 36

ชั่วโมง มีการตกตะกอนดีกว่าเซลล์ใน culture broth อายุ 48 ชั่วโมง โดยเซลล์อายุ 36 ชั่วโมง เมื่อตั้งไว้ 15 วินาที วัดความสูงของตะกอนได้ 9.5 ซม. และที่ 30 วินาที วัดความสูงของตะกอนได้ 6.5 ซม. ซึ่งแสดงว่าในระยะ 15 วินาที นี้ ความสูงของตะกอนหายไปถึง 3 ซม. เซลล์อายุ 48 ชั่วโมง เมื่อตั้งไว้ 15 วินาที วัดความสูงของตะกอนได้ 8.5 ซม. และที่ 30 วินาที วัดความสูงของตะกอนได้ 7.3 ซม. ซึ่งแสดงว่าในระยะ 15 วินาที นี้ ความสูงของตะกอนหายไปเพียง 1.2 ซม. ซึ่งต่ำกว่าที่พบในเซลล์อายุ 36 ชั่วโมง จากนั้น ในกรณีของเซลล์อายุ 36 ชั่วโมง ความสูงของตะกอนที่หายไปจากวินาทีที่ 15 จนถึงนาทีที่ 1 นั้น เท่ากับ 6.5 ในขณะที่ความสูงของตะกอนที่หายไป ในช่วงเวลาเดียวกัน ในกรณีของเซลล์อายุ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 3.5 ซม. หลังจาก 1 นาที การลดลงของสูงของตะกอนตรวจพบได้เพียงเล็กน้อย และเซลล์อายุ 36 ชั่วโมง ความสูงของตะกอนลดลงน้อยกว่า ซึ่งน่าจะแสดงว่าเซลล์อายุ 36 ชั่วโมง ตกตะกอนเร็วกว่าเซลล์อายุ 48 ชั่วโมง (Table 2.25 และ Figure 2.17)

2.1.3.4 จำนวนและขนาดของตะกอน

จากการศึกษาจำนวน และขนาดของตะกอนเซลล์ พบว่าเมื่อเริ่มเพาะเชื้อจนถึง 24 ชั่วโมง มีตะกอนเซลล์น้อย เซลล์ส่วนใหญ่ยังอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวกระจายทั่วไป เมื่อเลี้ยงเชื้อนาน 36 ชั่วโมง จึงตรวจพบตะกอนเซลล์มากขึ้น และมีจำนวนไม่ต่างจากเซลล์อายุ 48 ชั่วโมง เมื่อพิจารณาขนาดของตะกอนแสดงว่า ขนาดของตะกอนเซลล์ไม่ใหญ่นัก โดยเซลล์อายุ 36 ชั่วโมง ขนาดของตะกอนเซลล์ที่วัดเป็นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ 1 / ขนาดของตะกอนเซลล์ที่วัดเป็นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ 2 มีค่าในช่วง 18.52-44.44 ไมโครเมตร / 25.92-51.84 ไมโครเมตร ส่วนเซลล์อายุ 48 ชั่วโมง ขนาดของตะกอนเซลล์ที่วัดเป็นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ 1 / ขนาดของตะกอนเซลล์ที่วัดเป็นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางที่ 2 มีค่าในช่วง 18.25-118.51 ไมโครเมตร / 18.52-125.92 ไมโครเมตร โดยผลดังกล่าวแสดงว่าพบตะกอนเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง มีขนาดใหญ่จำนวนเพิ่มขึ้นจากที่พบในเซลล์อายุ 36 ชั่วโมง (Table 2.27)

2.1.3.5 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต

จากการศึกษาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต โดยการทำ direct count ของเซลล์ที่ทำ wet mount ใน methylene blue พบว่าในช่วง 36 ชั่วโมงของการหมักแบบให้อากาศ โดยใช้ airlift fermentor นั้น เซลล์ทั้งหมดเป็นเซลล์ที่มีชีวิต โดยที่ 48 ชั่วโมง เท่านั้นจึงพบว่ามีเซลล์ตายไป 2.5% โดยเซลล์เพิ่มจำนวนจาก 5.50×10^6 เซลล์/มล. ที่ 0 ชั่วโมง ไปเป็น 4.50×10^8 เซลล์/มล. (โดยทั้งหมดของเซลล์เป็นเซลล์ที่มีชีวิต) ที่ 36 ชั่วโมง และ ลดลงเป็นเซลล์มีชีวิต 4.00×10^7 เซลล์/มล 48 ชั่วโมง (Table 2.26)

Table 2.25 Flocculation of cells of M30 cultivated in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5 and aeration at 0.75 vvm. The flocculation was measured as height of cells sediment after standing culture broth in 25 ml cylinder.

Time	Culture broth at 36 h		Culture broth at 48 h	
	Height of sediment(cm)	Height reduction (cm)*	Height of sediment(cm)	Height reduction (cm)*
15 second	9.5	-	8.5	-
30 second	6.5	3.0	7.3	1.2
45 second	3.8	2.7	6	1.3
1 min	3	0.8	5	1.0
1 min 15 second	2.2	0.8	4.8	0.2
1 min 30 second	2	0.2	4.3	0.5
1 min 45 second	1.8	0.2	4	0.3
2 min	1.7	0.1	3.8	0.2
3 min	1.5	0.2	3	0.8
4 min	1.4	0.1	2.8	0.2
5 min	1.4	0	2.5	0.3
10 min	1.4	0	2	0.5
15 min	1.4	0	2	0.5

Height reduction = sedimentation height at the previous time minus sedimentation height at the time that height reduction was indicated; e.g. height reduction at 30 second = height at 15 sec. - height at 30 sec. = 9.5-6.5 = 3.0 cm

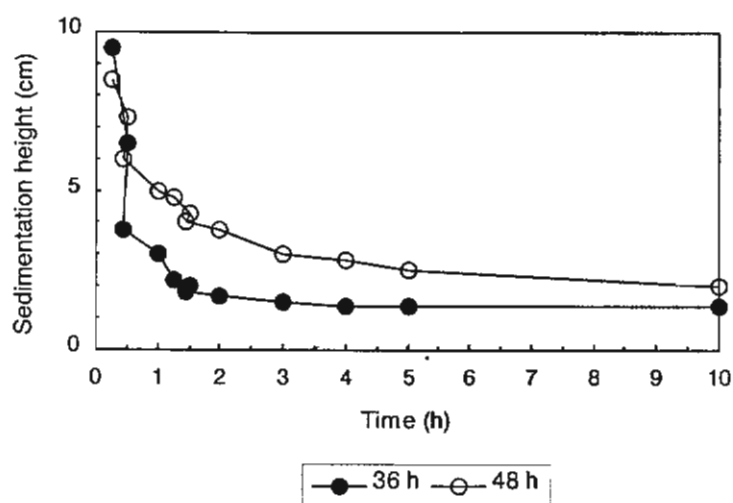


Figure 2.17 Flocculation of cells of M30 cultivated for 36 h and 48 h in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD_{660} at 0.5 and aeration at 0.75 vvm.

Table 2.26 Direct count of total and viable cells of M30 during aerobic fermentation in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD_{660} at 0.5 and aeration at 0.75 vvm.

Time (hr)	Number of cells/ml			Viable cell
	Viable	Dead	Total	%
0	5.50×10^6	-	5.50×10^6	100
12	1.15×10^8	-	1.15×10^8	100
24	3.00×10^8	-	3.00×10^8	100
36	4.50×10^8	-	4.50×10^8	100
48	4.00×10^7	1.0×10^7	4.10×10^7	97.6

Table 2. 27 Size of floc of M30 cultivated in molasses medium in airlift fermentor with 3.5 l working volume.

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	Floc no.11	Floc no.12
0	25.92/40.74	25.92/40.74										
12	22.22/29.63	22.22/37.04										
24	22.22/29.63	29.63/29.63										
36	18.52/25.92	18.52/25.92	18.52/25.92	18.52/29.63	22.22/22.22	25.92/25.92	25.92/37.04	29.63/29.63	29.66/33.33	29.66/33.33	29.63/55.55	44.44/51.84
48	18.52/22.22	18.52/18.52	18.52/29.63	18.52/29.63	18.52/25.92	18.52/33.33	22.22/33.33	22.22/37.04	62.96/81.48	88.88/125.92	118.51/125.92	

* Number of floc in 1 mm²

2.1.4 การผลิตเซลล์ของ *S. cerevisiae* M30 และ *C. utilis* เมื่อเลี้ยงร่วมกัน โดยการหมักแบบให้อากาศในภาคน้ำตาล ใน airlift fermentor

เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัว เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน ดังนั้นการใช้ภาคน้ำตาลสำหรับการผลิต อาจเหลือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัว ในอาหารภาคน้ำตาล ในขณะที่ *C. utilis* เป็นยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 ตัว รวมทั้งสารประกอบคาร์บอนอีกหลายชนิดได้ ดังนั้นจึงได้ทดลองเลี้ยง M30 ร่วมกับ *C. utilis* KY8 เพื่อให้ใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และสารประกอบคาร์บอนที่มีอยู่ในภาคน้ำตาลได้สมบูรณ์ ซึ่งอาจช่วยให้การผลิตเซลล์ได้ชีวมวลมากขึ้น ด้วยการใช้วัตถุดิบปริมาณเท่ากัน

ในการทดลองทำการเลี้ยง M30 ร่วมกับ *C. utilis* KY8 โดยใช้ airlift fermentor ที่ออกแบบโดยโครงการย่อยที่ 2 และใช้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ของ M30 ที่ได้จากการศึกษาในโครงการย่อยที่ 2 คือใช้อาหารภาคน้ำตาลที่มี fermentable sugar (วิเคราะห์โดย HPLC ในรูปของ กลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส) 4.88% ยูเรีย 0.1% และโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.05% pH 4.5 ปริมาตร 3.5 ลิตร โดยใช้เซลล์เริ่มต้นวัดเป็น OD เท่ากับ 0.5 และให้อากาศระหว่างการหมัก 0.75 vvm

2.1.4.1 การเจริญและปริมาณโปรตีนทั้งหมด

ผลการทดลองแสดงว่าเมื่อเลี้ยง M30 ร่วมกับ *C. utilis* IFRPD6014 มีการผลิตเซลล์เร็วกว่าเมื่อเลี้ยง M30 เดี่ยว ๆ แต่เมื่อ 36 ชั่วโมง เซลล์ที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นมาจนเท่ากัน ส่วน *C. utilis* IFRPD6014 เมื่อเลี้ยงเดี่ยว ๆ มีการเจริญผลิตเซลล์เร็ว และให้เซลล์มากเท่า ๆ กับเมื่อเลี้ยงร่วมกับ M30 (Table 2.28 และ Figure 2.18a) โดยเมื่อเลี้ยง M30 ร่วมกับ *C. utilis* ให้เซลล์สูงสุด 18.1 กรัม/ลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง ส่วน M30 และ *C. utilis* IFRPD6014 ที่เลี้ยงเดี่ยว ๆ ให้เซลล์ 17.03 และ 16.73 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ที่ 36 ชั่วโมง โดยที่ 48 ชั่วโมง *C. utilis* IFRPD6014 ให้เซลล์สูงสุด 19.41 กรัม/ลิตร ซึ่งแสดงว่าการเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ร่วมกันนั้น ได้ชีวมวลเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

สำหรับโปรตีนภายในเซลล์นั้น พบว่าเมื่อเลี้ยง M30 ร่วมกับ *C. utilis* IFRPD6014 ทำให้มี protein content และโปรตีนทั้งหมดต่ำกว่า เมื่อเลี้ยง M30 เดี่ยว ๆ และเท่า ๆ กับที่เลี้ยง *C. utilis* IFRPD6014 เดี่ยว ๆ (Figure 2.18b, 2.18c) สำหรับการให้ fermentable sugar นั้น M30 แสดงว่าใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วในระยะ 12 ชั่วโมงแรก เมื่อเทียบกับการเลี้ยง *C. utilis* IFRPD6014 เดี่ยว ๆ และการเลี้ยง M30 ร่วมกับ *C. utilis* (Table 2.28 และ Figure 2.18d)

สรุปได้ว่าปริมาณโปรตีนทั้งหมด และโปรตีนในเซลล์ เมื่อเลี้ยง M30 เดี่ยว ๆ นั้น มีค่าสูงกว่าเมื่อเลี้ยง *C. utilis* IFRPD6014 เดี่ยว ๆ หรือ เมื่อเลี้ยง M30 และ *C. utilis* IFRPD6014 ร่วมกัน โดยเฉพาะโปรตีนในเซลล์ของ M30 เมื่อเลี้ยงเดี่ยว ๆ มีค่าสูงตลอด 48 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อเลี้ยง *C. utilis* IFRPD6014 เดี่ยว ๆ และเมื่อเลี้ยง M30 และ *C. utilis* IFRPD6014 ร่วมกัน ปรากฏการลดลงของโปรตีนในเซลล์ตั้งแต่เลี้ยงเชื้อนาน 36 ชั่วโมง

Table 2.28 Growth, protein content, total protein, sugar utilization, ethanol production and pH of M30, *Candida utilis* IFRPD6014 and mix culture of M30 and *Candida utilis* in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, 0.05% potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5 and aeration at 0.75 vvm.

Time (h)	<i>S. cerevisiae</i> M30						<i>C. utilis</i>						<i>S. cerevisiae</i> M30 + <i>C. utilis</i>					
	DW	P	TP	FS	EtOH	pH	DW	P	TP	FS	EtOH	pH	DW	P	TP	FS	EtOH	pH
0	0.25	43	0.14	4.88	0.15	4.5	0.26	42	0.11	4.88	0.15	4.5	0.24	42	0.10	4.88	0.15	4.5
12	1.88	47	0.96	0.32	0.65	4.7	6.16	32	2.00	1.93	1.43	4.6	5.86	34	2.01	1.59	1.29	4.6
24	8.98	36	2.21	0.28	1.40	4.8	12.78	18	2.33	0.11	0.93	5.6	13.01	16	2.08	0.27	1.10	5.8
36	17.03	45	3.96	0.26	0.57	4.7	16.73	13	1.88	0.3	0.30	6.0	18.10	10	1.36	0.28	0.49	5.8
48	17.06	44	3.77	0.12	0.24	4.6	19.41	12	1.95	0.54	0.04	6.2	16.75	12	1.43	0.53	0.05	6.1

DW = dry weight (g/l)

FS = Fermentable sugar (%)

Protein content (g/ 100gDW)

EtOH = ethanol (%w/v)

TP = total protein (g/l)

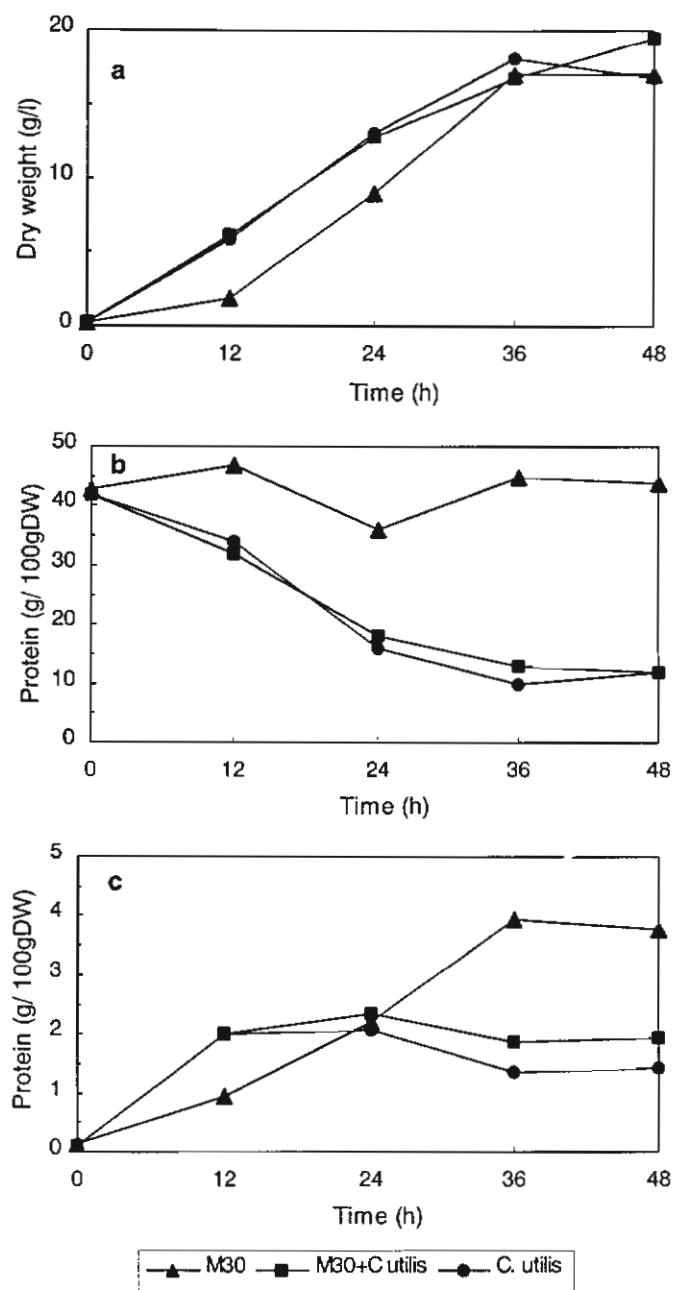


Figure 2.18 Growth (a), protein content (b), total protein (c), sugar utilization (d), ethanol production (e) and pH (f) of M30, *Candida utilis* and mixed culture of M30 and *C. utilis* in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, 0.05% potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD_{660} at 0.5 and aeration at 0.75 vvm.

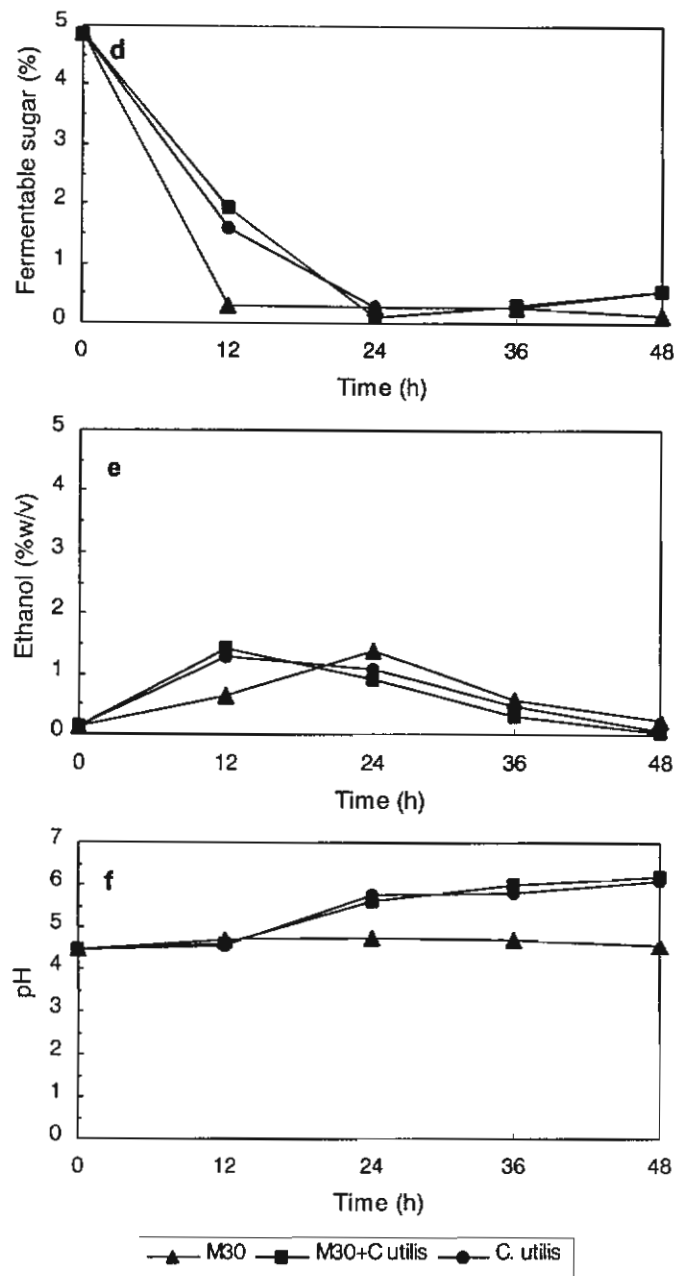


Figure 2.18 (continued)

2.1.4.2 การตกตะกอน

สำหรับการตกตะกอนที่วัดในรูปของ sedimentation efficiency พบว่า M30 เดี่ยว ๆ ตกตะกอนได้ดีมาก (S.E.=0.74) แต่เมื่อเลี้ยงร่วมกันกับ *C. utilis* IFRPD6014 กลับไม่มีความสามารถในการตกตะกอนเช่นเดียวกับเมื่อเลี้ยง *C. utilis* IFRPD6014 เดี่ยว ๆ (Table 2.29)

Table 2.29 Flocculation expressed as S.E. of cells of M30, *C. utilis* and M30 + *C. utilis* cultivated in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, 0.05% potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5 and aeration at 0.75 vvm.

Strain	Sedimentation efficiency		
	M30	<i>C. utilis</i>	M30 + <i>C. utilis</i>
24	0.317	0.142	0.097
36	0.324	0.031	0.096
48	0.737	0.027	0.097

2.1.4.3 จำนวนและขนาดของตะกอน

สำหรับการเลี้ยง M30 เดี่ยว ๆ พบว่ามีการสร้างตะกอนเซลล์จำนวนมาก ดังที่ได้รายงานไว้ในเรื่องการศึกษาการตกตะกอนของ M30 แต่เมื่อนำมาเลี้ยงร่วมกับ *C. utilis* IFRPD6014 พบว่าเมื่อเริ่มเพาะเชื้อมีตะกอน 2-3 ตะกอน/นั้นมี 1 มม.² เมื่ออายุ 12 ชั่วโมง จำนวนตะกอนไม่เพิ่มขึ้น และตะกอนที่พบมีขนาดเล็กลง และที่ 24 ชั่วโมง ตะกอนเซลล์กลับหายไป ผลการทดลองนี้ช่วยยืนยันว่า การเลี้ยง M30 ร่วมกับ *C. utilis* IFRPD6014 ทำให้ความสามารถในการตกตะกอนของ M30 หายไป *C. utilis* IFRPD6014 เป็นยีสต์ที่ไม่ตกตะกอน ซึ่งจากการทดลองก็ไม่พบการรวมกลุ่มของเซลล์ (Table 2.30)

Table 2.30 Size of floc of mix culture of M30 and *C. utilis* cultivated in molasses medium in airlift fermentor with 3.5 l working volume.

Time (h)	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
0	22.22/29.63	29.63/40.74	37.04/51.85	-	-	-
12	18.52/33.33	18.52/37.04	-	-	-	-
24	-	-	-	-	-	-
36	-	-	-	-	-	-
48	-	-	-	-	-	-

* Number of floc in 1 mm²

2.1.4.4 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต

จากการศึกษาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต เมื่อเลี้ยง M30 ร่วมกับ *C. utilis* IFRPD6014 เซลล์เพิ่มจำนวนจาก 6.5×10^6 เซลล์/มล. ไปเป็น 7.5×10^8 เซลล์/มล. ที่ 36 ชั่วโมง และที่ 48 ชั่วโมง เซลล์ลดจำนวนลง เหลือเซลล์ที่มีชีวิต 3.5×10^8 เซลล์/มล. ซึ่งเท่ากับ 94% ของเซลล์ทั้งหมด (Table 2.31) สำหรับ M30 เซลล์เพิ่มจำนวนจาก 5.5×10^6 เซลล์/มล. ที่ 0 ชั่วโมง เป็น 4.5×10^8 เซลล์/มล. ที่ 36 ชั่วโมง แต่ที่ 48 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงเหลือ 4.0×10^7 เซลล์/มล. ซึ่งเท่ากับ 97.6% ของเซลล์ทั้งหมดในขณะนั้น (Table 2.32) ในขณะที่เมื่อเลี้ยง *C. utilis* เดี่ยว ๆ เซลล์ทั้งหมดใน culture broth มีชีวิตตลอดระยะ 48 ชั่วโมง โดยเซลล์เพิ่มจำนวนจาก 4.50×10^6 เซลล์/มล. ไปเป็น 5.65×10^8 เซลล์/มล. ที่ 12 ชั่วโมง และเป็น 6.00×10^8 เซลล์/มล. ที่ 36 ชั่วโมง และลดลงที่ 48 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน (Table 2.33)

Table 2.31 Direct count of total and viable cells of mix culture of M30 and *C. utilis* during aerobic fermentation in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, 0.05% potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5 and aeration at 0.75 vvm.

Time (hr)	Number of cells (cells/ml)			Viable cell
	Viable	Dead	Total	%
0	6.50×10^6	-	6.50×10^6	100
12	5.50×10^8	-	5.50×10^8	100
24	6.50×10^8	-	6.50×10^8	100
36	7.50×10^8	-	7.50×10^8	100
48	3.50×10^8	6.00×10^6	3.56×10^8	94.0

Table 2.32 Direct count of total and viable cells of M30 during aerobic fermentation in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, 0.05% potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5 and aeration at 0.75 vvm.

Time (hr)	Number of cells/ml			Viable cell
	Viable	Dead	Total	%
0	5.50×10^6	-	5.50×10^6	100
12	1.15×10^8	-	1.15×10^8	100
24	3.00×10^8	-	3.00×10^8	100
36	4.50×10^8	-	4.50×10^8	100
48	4.00×10^8	1.00×10^7	4.10×10^8	97.6

Table 2.33 Direct count of total and viable cells of *C. utilis* during aerobic fermentation in molasses medium containing 4% fermentable sugar, 0.1% urea, 0.05% potassium dihydrogen phosphate and pH 4.5, in 3.5 l airlift fermentor with initial cell concentration as OD₆₆₀ at 0.5 and aeration at 0.75 vvm.

Time (hr)	Number of cells/ml			Viable cell %
	Viable	Dead	Total	
0	4.50x10 ⁶	-	4.50x10 ⁶	100
12	5.65x10 ⁸	-	5.65x10 ⁸	100
24	5.50x10 ⁸	-	5.50x10 ⁸	100
36	6.00x10 ⁸	-	6.00x10 ⁸	100
48	5.00x10 ⁷	-	5.00x10 ⁷	100

2.1.5 การคัดเลือกสารประกอบสำหรับช่วยตกตะกอนเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์

เพื่อคัดเลือกว่าสารใดสามารถช่วยให้การตกตะกอนของเซลล์ในกรณีที่เซลล์ M30 ไม่ตกตะกอน หรือตกตะกอนได้น้อย ในสภาพที่ใช้ผลิตเซลล์ ซึ่งจะช่วยให้การแยกเซลล์ออกจากอาหารที่ใช้เลี้ยงง่ายขึ้น จึงได้ทำการทดลองใช้สารอนินทรีย์ 4 ชนิด คือ aluminum sulfate, ferric chloride, ferrous sulfate และ potassium sulfate เติมลงใน culture broth ที่มีเซลล์ความเข้มข้นสูง ซึ่งได้จากการเลี้ยงยีสต์ในอาหารกากน้ำตาล แบบให้อากาศ ใน airlift fermentor ในการทดลองใช้เซลล์ที่เลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% ยูเรีย 0.1% และ โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.1% โดยใช้ airlift fermentor ที่มี working volume 3.5 ลิตร และให้อากาศ 0.75 vvm เวลาที่ใช้เลี้ยง 48 ชั่วโมง ซึ่งในขณะนั้น culture broth มีเซลล์ 15.5 กรัม/ลิตร มี S.E. เท่ากับ 0.71 และมี pH 4.91 สำหรับวิธีการทดลอง คือ ผสมสารอนินทรีย์แต่ละชนิดลงใน culture broth ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2% (โดยไม่มีการปรับความเข้มข้นของเซลล์ใน culture broth เนื่องจากไม่ต้องการให้มีการกระทบกระเทือนต่อเซลล์ ซึ่งอาจมีผลให้การตกตะกอนของเซลล์เปลี่ยนไปจากเดิม) จากนั้นเทลงใน cylinder ขนาด 25 มล. จับเวลา และวัดความสูงของตะกอนทุก ๆ นาที จนครบ 5 นาที และวัดอีกครั้งเมื่อตั้งไว้นาน 10 นาที

ผลการทดลองชี้ว่าเซลล์ที่ได้จากการเลี้ยงในสภาพให้อากาศดังกล่าวข้างต้น มีการตกตะกอนที่ดีมากอยู่แล้ว (S.E. = 0.71) และเมื่อตั้งไว้นานเพียง 1 นาที เห็นเซลล์มีการจับตัวกันอย่างชัดเจน และตกตะกอนลงสู่ก้น cylinder วัดความสูงของตะกอนได้ 11 ซม. และเมื่อตั้งไว้อีก 1 นาที ความสูงของตะกอนลดลงอย่างรวดเร็ว คือ เหลือความสูงของตะกอน เพียง 7.55 นาที ซึ่งเท่ากับว่า

ระหว่างนาที่ที่ 1 กับนาที่ที่ 2 ความสูงของตะกอน ลดไปถึง 3.45 ซม. ในขณะที่การลดลงของความสูงของตะกอนน้อยลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้น เช่น ระหว่างนาที่ที่ 2 และนาที่ที่ 3 ความสูงลดลง 1.15 ซม. ระหว่างนาที่ที่ 3 และนาที่ที่ 4 ความสูงของตะกอนลดลง 0.65 ซม. และ ระหว่างนาที่ที่ 5 กับนาที่ที่ 10 ความสูงของตะกอนลดลง 1.2 ซม. (1.2 ซม. / 5 นาที่) ซึ่งผลที่ได้จากการทดลองเป็นเครื่องยืนยันว่า เซลล์มีความสามารถในการตกตะกอนดีมาก (Table 2.34 และ Figure 2.19)

จากการเติม aluminum sulfate พบว่าทำให้การตกตะกอนของเซลล์ดีขึ้นเพียงเล็กน้อย เมื่อเทียบกับ culture broth ที่ไม่ได้เติมสารช่วยตกตะกอนลงไป โดยระหว่างนาที่ที่ 1 กับนาที่ที่ 2 ความสูงของตะกอนลดลง 5.15 ซม. โดยความสูงของตะกอนลดน้อยลงเมื่อเวลานานขึ้น และ ระหว่างนาที่ที่ 5 กับนาที่ที่ 10 ความสูงของตะกอนลดลง 1.25 ซม. (1.25 ซม. / 5 นาที่) (Table 2.34 และ Figure 2.19)

สำหรับการเติม ferrous sulfate และ potassium sulfate เป็นไปในทำนองเดียวกัน คือ ทำให้การตกตะกอนเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย โดยระหว่างนาที่ที่ 1 กับนาที่ที่ 2 ความสูงของตะกอนลดลง 4.9 ซม. เมื่อเติม ferrous sulfate และ ความสูงของตะกอนลดลง 4.23 ซม. เมื่อเติม potassium sulfate และเช่นเดียวกัน ความสูงของตะกอนลดน้อยลงเมื่อเวลานานขึ้น และ ระหว่างนาที่ที่ 5 กับนาที่ที่ 10 ความสูงของตะกอนลดลง 1.3 ซม. (1.3 ซม. / 5 นาที่) และ 1.14 (1.14 ซม. / 5 นาที่) ตามลำดับ (Table 2.33 และ Figure 2.19)

แต่สำหรับการเติม ferric chloride ให้ผลทางตรงข้าม เนื่องจากเมื่อเติมลงไป culture broth พบว่าทำให้ culture broth ชุ่มแบบน้ำโคลน ไม่สามารถวัดการตกตะกอนได้

ผลการทดลองนี้ชี้ว่า เซลล์ของ M30 ตกตะกอนดีมากในสภาวะที่ใช้ผลิตชีวมวลที่ใช้ในการเลี้ยงและเติมสารต่าง ๆ ไม่ได้ทำให้การตกตะกอนเพิ่มขึ้นมากนัก ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องเติมสารใด ๆ ช่วยการตกตะกอน เพื่อช่วยแยกเซลล์ออกมาใช้

Table 2.33 Sedimentation of cells in 48 h culture broth of M30 (cultivated in molasses mash containing 4% reducing sugar, 0.1% urea and 0.1% potassium dihydrogen phosphate in 3.5 l working volume with 0.75 vvm) after mixing with some inorganic compounds.

Standing Time (min)	Control		Aluminum sulfate		Potassium sulfate		Ferrous sulfate	
	Height of sediment (cm)	Height reduction (cm)	Height of sediment (cm)	Height reduction (cm)	Height of sediment (cm)	Height reduction (cm)	Height of sediment (cm)	Height reduction (cm)
1	11.3	NR	13.5	NR	12.0	NR	13.5	NR
2	7.8	3.5	8.4	5.2	7.8	4.3	8.6	4.9
3	6.6	1.2	6.9	1.5	6.6	1.2	7.1	1.5
4	6.0	0.6	6.4	0.5	6.0	0.6	6.6	0.6
5	5.5	0.5	5.8	0.7	5.2	0.5	6.1	0.5
10	4.3	1.2	4.5	1.3	4.3	1.1	4.8	1.3

Height reduction = sedimentation height at the previous time minus sedimentation height at the time that height reduction was indicated; e.g. height reduction at 30 second = height at 15 sec. - height at 30 sec. = 9.5-6.5 = 3.0 cm

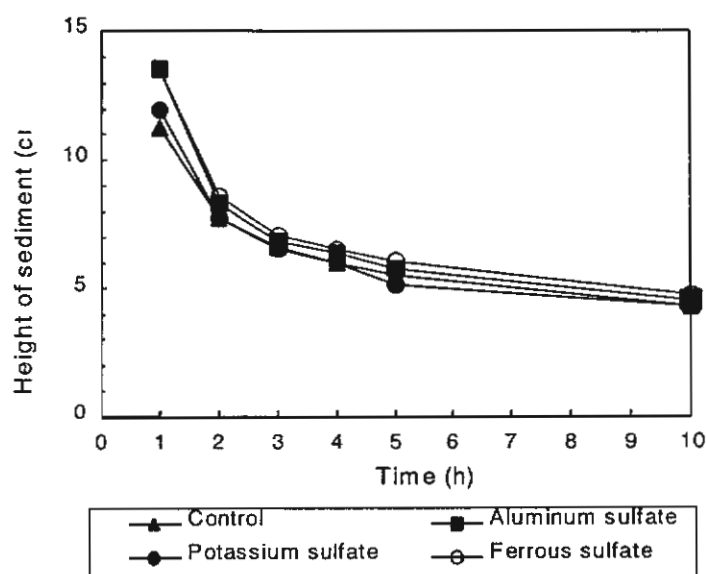


Figure 2.19 Sedimentation of cells in 48 h culture broth of M30 (cultivated in molasses mash containing 4% reducing sugar, 0.1% urea and 0.1% potassium dihydrogen phosphate in 3.5 l working volume with 0.75 vvm) after mixing with some inorganic compounds.

2.2 ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ เมื่อใช้น้ำกากส่าเป็นสับสเตรท

2.2.1 คัดเลือก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีการเจริญและโปรตีนสูง เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำกากส่า ที่อุณหภูมิสูง

ทำการเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* 10 สายพันธุ์ ในอาหารน้ำกากส่า ที่มีน้ำตาลรีดิวิซ์ 2% (glucose equivalent) และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ในฟลาสก์ ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 และปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น โดยวัดเป็นความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร (OD_{660}) เท่ากับ 0.5 (หลังจากหักลบปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในน้ำกากส่าที่ใช้เตรียมอาหารออกแล้ว) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °ซ ตรวจสอบการเจริญ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวิซ์และค่า sedimentation efficiency (S.E.) ทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 วัน

Table 2.34 Growth and total protein of Sc90, AM12, M30, TJ1 and TJ3 in slop waste medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5 and incubated in rotary shaker, 150 rpm at 37°C.

Time (h)	Sc90		AM12		M30		TJ1		TJ3	
	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP
0	0.25	0	0.22	0	0.23	0	0.22	0	0.32	0
24	2.54	0.02	0.49	0	5.35	0.08	0.31	0	2.13	0.02
48	10.27	0.42	1.60	0.13	4.60	1.12	1.13	0.17	2.44	0.18
72	8.19	0.58	4.93	0.83	4.75	0.32	1.45	0.31	2.18	0.38
96	8.23	0.59	7.28	0.89	9.73	0.02	2.13	0.58	0.69	0.46

DW : dry weight (g/l)

TP : total protein (g/l)

Table 2.35 Growth and total protein of MR195, RL6, MR-F44, MR-F65 and F65-UV89 in slop waste medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5 and incubated in rotary shaker, 150 rpm at 37°C

Time (h)	MR195		RL6		F44		F65		F65-UV89	
	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP
0	0.24	0	0.20	0	0.23	0	0.41	0	0.24	0
24	0.36	0	0.44	0	0.54	0	0.80	0	0.60	0
48	0.45	0	0.58	0	0.72	0	0.84	0	0.37	0
72	0.68	0.16	0.97	0	0.64	0	0.29	0	1.11	0
96	0.63	0.36	0.42	0	0.89	0	0.34	0	0.63	0

DW : dry weight (g/l)

TP : total protein (g/l)

เมื่อพิจารณาการเจริญและปริมาณโปรตีนของยีสต์ทั้ง 10 สายพันธุ์ที่ทำการศึกษา (Table 2.34, 2.35) พบว่ายีสต์ Sc90, AM12 และ M30 มีการเจริญสูงกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่นๆ (Figure 1a, 2a) และหลังจากที่เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ยีสต์ M30 มีปริมาณโปรตีนรวมสูงสุด เมื่อเทียบกับยีสต์สายพันธุ์อื่น คือมีค่าเท่ากับ 1.12 g/l (Figure 2.20b, 2.21b) และมีค่าโปรตีนภายในเซลล์เท่ากับ 24.32 g/100 gDW ซึ่งจะมีค่าต่ำกว่าค่าโปรตีนภายในเซลล์ยีสต์ TJ1 ที่เวลา 96 ชั่วโมงเพียงเล็กน้อย (Figure 2.20c) สำหรับค่าโปรตีนภายในเซลล์ที่สูงมากของยีสต์ TJ3 ที่เวลา 96 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงนั้น อาจเนื่องมาจากค่าการเจริญที่พบน้อยมาก (Figure 2.20a)

การทดสอบความสามารถในการตกตะกอน (Table 2.36, 2.37, Figure 2.22b, 2.23b) แสดงว่ายีสต์สายพันธุ์ AM12, M30, TJ1 และ TJ3 สามารถตกตะกอนได้ดี โดยแสดงในรูปของ sedimentation efficiency (S.E.) ที่มีค่าอยู่ระหว่าง 0.13-0.25 ในขณะที่ยีสต์สายพันธุ์อื่นคือ Sc90, MR195, RL6, MR-F44, MR-F65 และ F65-UV89 ไม่ตกตะกอน และเมื่อพิจารณาค่า S.E. สูงสุดของยีสต์กลุ่มที่ตกตะกอนได้ พบว่ายีสต์ M30 สามารถตกตะกอนได้ดีที่สุดโดยมีค่า S.E. สูงที่สุดคือ 0.25

Table 2.36 Sugar utilization and sedimentation efficiency of Sc90, AM12, M30, TJ1 and TJ3 in slop waste medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5 and incubated in rotary shaker, 150 rpm at 37°C.

Time (h)	Sc90		AM12		M30		TJ1		TJ3	
	RS	S.E.	RS	S.E.	RS	S.E.	RS	S.E.	RS	S.E.
0	1.36	ND	1.17	ND	1.24	ND	1.19	0.06	1.28	0.11
24	0.66	0.01	0.76	0.14	0.60	0.10	1.16	0.06	0.92	0.15
48	0.55	0.06	0.62	0.16	0.57	0.14	1.03	0.09	0.59	0.13
72	0.47	0.06	0.43	0.21	0.53	0.16	0.60	0.04	0.59	0.07
96	0.44	0.08	0.54	0.10	0.50	0.25	0.52	0.13	0.52	0.05

RS : reducing sugar (%)

S.E. : sedimentation efficiency

ND : not determined

Table 2.37 Sugar utilization and sedimentation efficiency of MR195, RL6, MR-F44, MR-F65 and F65-UV89 in slop waste medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5 and incubated in rotary shaker, 150 rpm at 37°C.

Time (h)	MR195		RL6		F44		F65		F65-UV89	
	RS	S.E.	RS	S.E.	RS	S.E.	RS	S.E.	RS	S.E.
0	1.01	0.06	1.87	0.03	1.85	0.03	1.83	0.02	1.85	0.04
24	1.25	0.03	1.39	0.02	1.37	0.03	1.63	0.03	1.62	0.03
48	1.20	0.08	1.22	0.04	1.33	0.02	1.43	0.07	1.46	0.05
72	1.19	0.04	1.30	0.03	1.09	0.03	1.30	0.06	1.34	0.05
96	1.02	0	1.08	0.02	0.96	0.03	1.28	0.04	1.39	0.04

RS : reducing sugar (%)

S.E. : sedimentation efficiency

ดังนั้นจึงได้คัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ M30 ไว้สำหรับศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ต่อไป อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดการทดลองจะพบว่าปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ Sc90, AM12, M30 และ TJ3 ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง (Table 2.37, Figure 2.22a) และหลังจากนั้นยีสต์จะใช้น้ำตาลต่อไปจนกระทั่งมีน้ำตาลเหลืออยู่ประมาณ 0.5 % เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4 วัน ซึ่งจะเห็นว่าตลอดระยะเวลาตั้งแต่ 48 – 96 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงนั้นปริมาณน้ำตาลไม่เปลี่ยนแปลงมากนัก ขณะที่สามารถพบการเจริญของเชื้อในรูป dry weight รวมทั้งปริมาณโปรตีนรวมที่เพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (Table 2.34-2.37 และ Figure 2.20-2.21) แสดงว่ายีสต์สายพันธุ์เหล่านี้ใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเพียง 0.7-0.8% ซึ่งเท่ากับปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำกากส่าที่ใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงไม่ปรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นในอาหารน้ำกากส่าก่อนทำการเพาะเลี้ยง นั่นคือจะคงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามที่มีอยู่ในน้ำกากส่าที่ใช้เตรียมอาหารคือ ประมาณ 0.7%

การที่ยีสต์สามารถเจริญโดยใช้แหล่งคาร์บอนในรูปของน้ำตาลเพียงปริมาณน้อยๆ นี้ อาจเนื่องมาจากการที่มีเซลล์ยีสต์ค้างอยู่ในน้ำกากส่าเป็นจำนวนมาก เมื่อนำมาเตรียมอาหารน้ำกากส่าจึงยังคงมีเซลล์ยีสต์เหล่านี้อยู่ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ค่าโปรตีนรวมของเซลล์ยีสต์เหล่านี้ พบว่ามีค่าสูงถึง 1.52 g/l ดังนั้นเซลล์ยีสต์เหล่านี้จึงอาจเป็นแหล่งของสารอาหารของเซลล์ยีสต์ที่นำมาทดลองได้เป็นอย่างดี

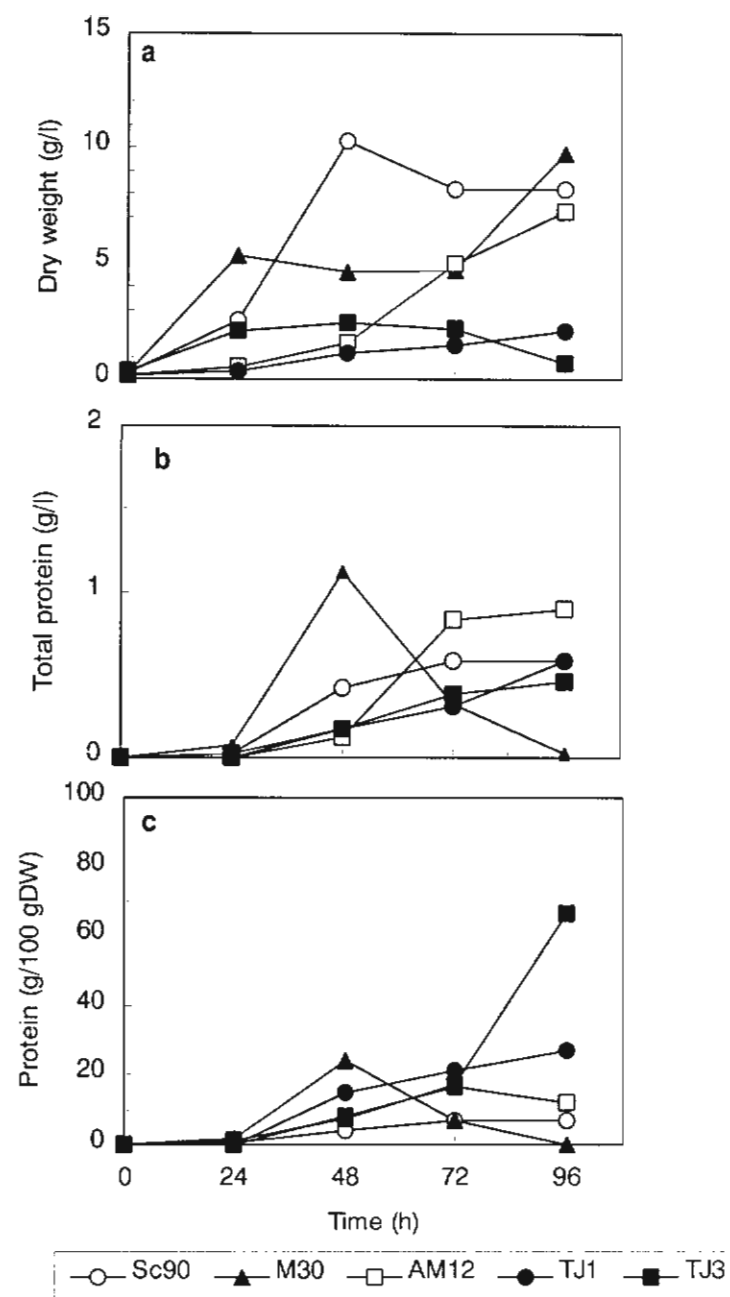


Figure 2.20 Growth (a), total protein (b) and protein content of the yeast Sc90, AM12, M30, TJ1 and TJ3 cultivated in slop waste medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5, and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

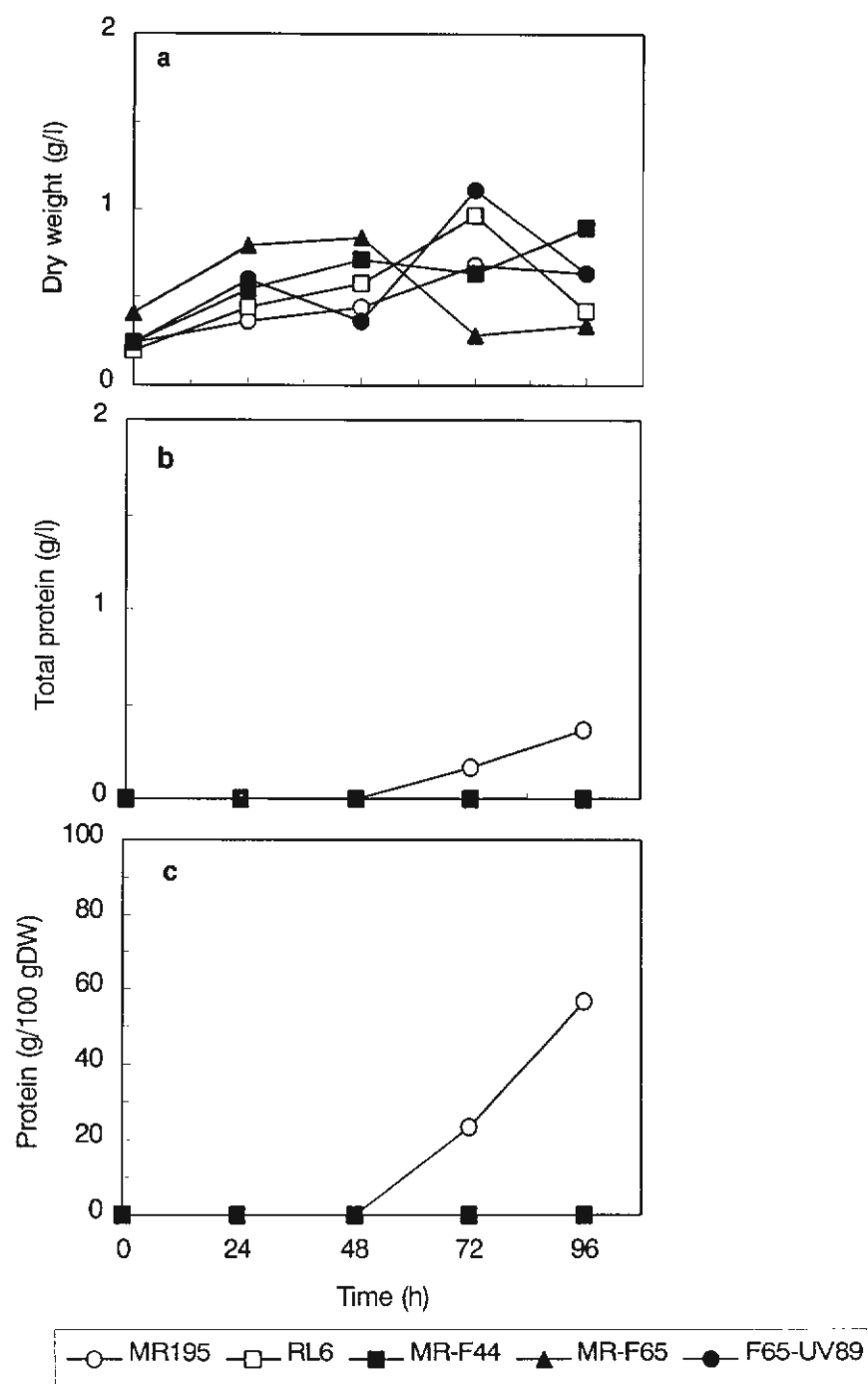


Figure 2.21 Growth (a), total protein (b) and protein content of the MR195, RL6, MR-F44, MR-F65 and F65-UV89 cultivated in slop waste medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5, and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

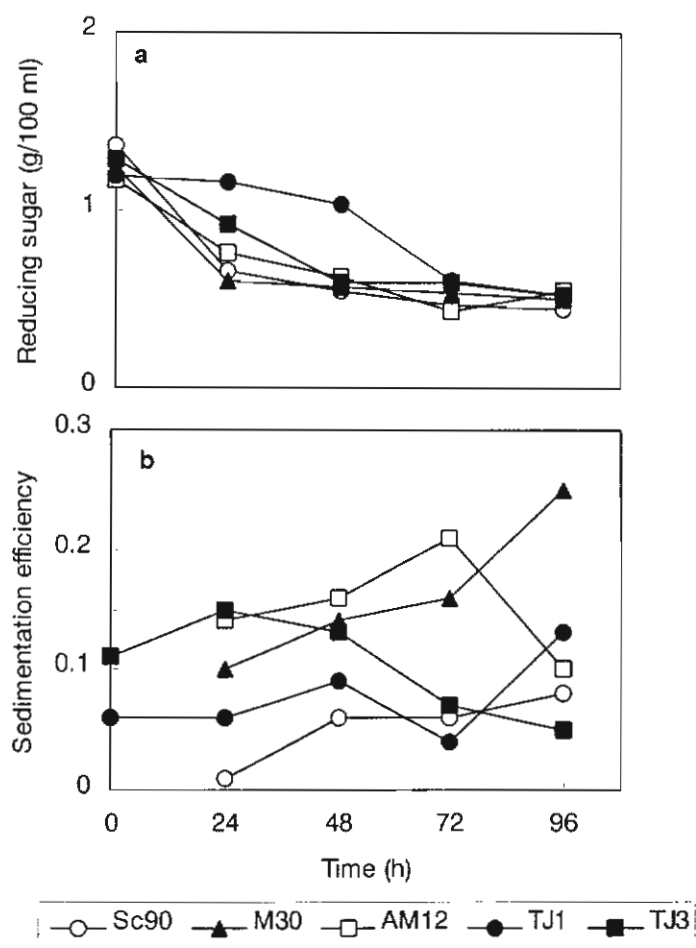


Figure 2.22 Sugar utilization (a) and sedimentation efficiency, S.E. (b) of the yeast Sc90, AM12, M30, TJ1 and TJ3 cultivated in slop waste medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5, and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

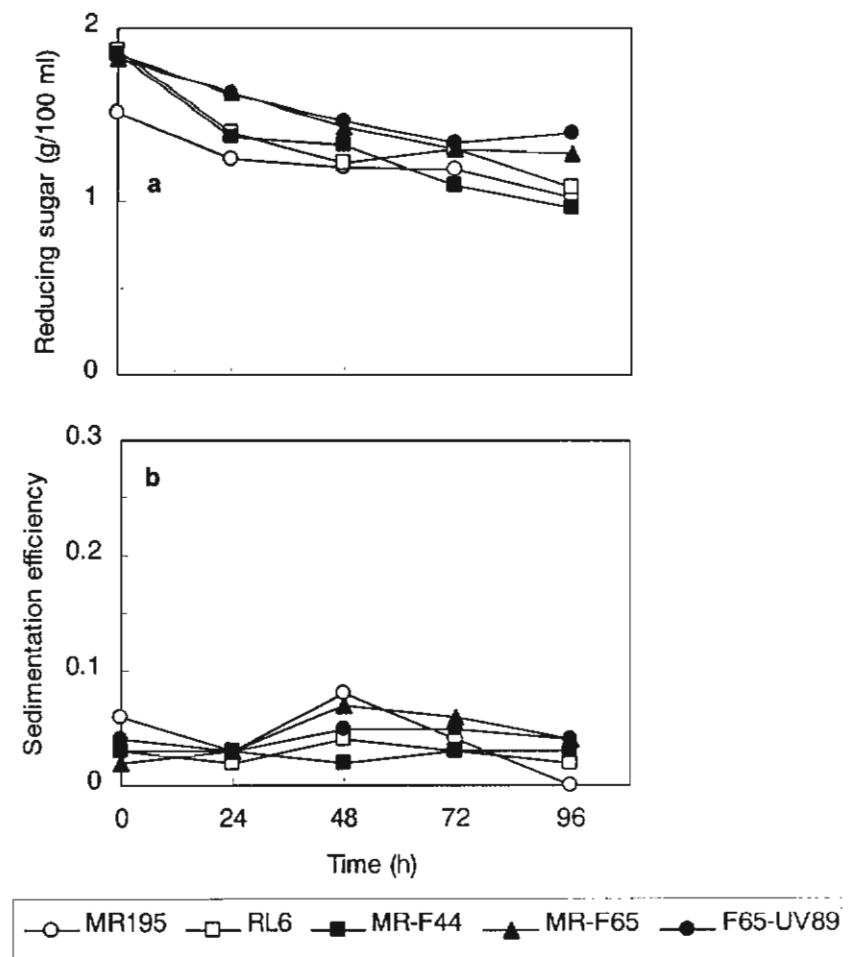


Figure 2.23 Sugar utilization (a) and sedimentation efficiency, S.E. (b) of the yeast MR195, RL6, MR-F44, MR-F65 and F65-UV89 cultivated in slop waste medium containing 2% glucose equivalent sugar concentration and 0.05% ammonium sulfate, pH 4.5, and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

2.2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ยีสต์ M30 โดยการหมัก
แบบให้อากาศ ในอาหารน้ำกากส่า ที่อุณหภูมิสูง ในห้องปฏิบัติการ

2.2.2.1 การเลี้ยงยีสต์ M30 ในอาหารน้ำกากส่าที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรีย

ความเข้มข้นต่างๆเป็นแหล่งไนโตรเจน

ทำการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ M30 ในอาหารน้ำกากส่า ที่มีแอมโมเนียม-ซัลเฟต ปริมาณ 0.05, 0.10 และ 0.20% หรือมียูเรีย ปริมาณ 0.03, 0.05 และ 0.10% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 4.5 ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น โดยวัดเป็นความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร (OD_{660}) เท่ากับ 0.5 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C ตรวจวัดการเจริญ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ การเปลี่ยนแปลง pH และค่า sedimentation efficiency (S.E.) ทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 วัน

Table 2.38 Growth and total protein of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing various concentration of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

Time (h)	Ammonium sulfate						Urea					
	0.05%		0.10%		0.20%		0.03%		0.05%		0.10%	
	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP	DW	TP
0	0.30	0	0.19	0	0.24	0	0.25	0	0.20	0	0.26	0
24	3.65	1.51	2.53	1.28	3.11	1.43	4.45	1.62	3.52	1.67	3.86	1.41
48	3.75	0	3.69	0	3.64	0.26	3.81	0	3.83	0	3.75	0
72	4.65	1.15	5.00	1.17	4.58	1.01	4.63	0.94	4.03	1.03	4.60	1.11
96	5.65	0.84	5.97	0.85	5.89	0.89	5.19	0.41	4.99	0.46	5.51	0.48

DW : dry weight (g/l)

TP : total protein (g/l)

Table 2.39 Sugar utilization and pH change of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing various concentration of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37 °C.

Time (h)	Ammonium sulfate						Urea					
	0.05%		0.10%		0.20%		0.03%		0.05%		0.10%	
	RS	pH	RS	pH	RS	pH	RS	pH	RS	pH	RS	pH
0	0.76	4.5	0.77	4.5	0.77	4.5	0.79	4.5	0.76	4.5	0.77	4.5
24	0.57	3.0	0.57	3.0	0.59	3.0	0.59	4.0	0.54	4.0	0.56	4.0
48	0.54	2.1	0.55	2.4	0.54	2.5	0.50	3.3	0.51	3.4	0.49	3.4
72	0.53	2.0	0.53	2.0	0.52	3.0	0.49	3.0	0.48	3.0	0.48	3.0
96	0.46	2.0	0.50	2.0	0.51	2.0	0.52	3.0	0.44	3.0	0.37	3.0

RS : reducing sugar (%)

ผลการทดลองเลี้ยงยีสต์ M30 ในอาหารน้ำกากส่าที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรีย ความเข้มข้นต่างๆ เป็นแหล่งไนโตรเจน (Table 2.38, 2.39) พบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยงนั้น ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเจริญในระดับที่สูงกว่าเล็กน้อย แต่การเจริญหลังจากนั้นก็ไม่ได้แตกต่างกันมากนัก (Figure 2.24a) เมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนที่ตรวจพบในแต่ละสภาวะที่ทดลอง พบว่ายีสต์ M30 มีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนภายในเซลล์สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในทุกการทดลอง โดยมีปริมาณโปรตีนรวมสูงสุดเท่ากับ 1.67 g/l เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มียูเรีย 0.05% เป็นแหล่งไนโตรเจน อย่างไรก็ตามค่าที่พบนี้ไม่แตกต่างจากค่าปริมาณโปรตีนรวมสูงสุดที่ตรวจพบจากการเลี้ยงยีสต์ M30 นี้ในอาหารที่มียูเรีย 0.03% เป็นแหล่งไนโตรเจนซึ่งมีค่าเท่ากับ 1.62 g/l และหากพิจารณาปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ยีสต์พบว่าแตกต่างกันน้อยมาก (Figure 2.24b, 2.24c)

การตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ หลังจากเลี้ยงเชื้อไปเป็นเวลา 4 วัน พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงไม่แตกต่างกันในทุกการทดลอง (Table 2.39, Figure 2.25a) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดระยะเวลาที่เพาะเลี้ยง (Figure 2.25b) พบว่า อาหารที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน มีค่า pH ลดลงไม่ต่ำกว่า 3 ตลอดระยะเวลาที่ทดลอง ในขณะที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนนั้นลดลงต่ำกว่า 2.5 ภายในเวลา 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงนอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์ M30 ที่เลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในอาหารที่มียูเรีย 0.03% เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถตกตะกอนได้ดีที่สุด โดยมีค่า S.E. เท่ากับ 0.50 (Table 2.40)

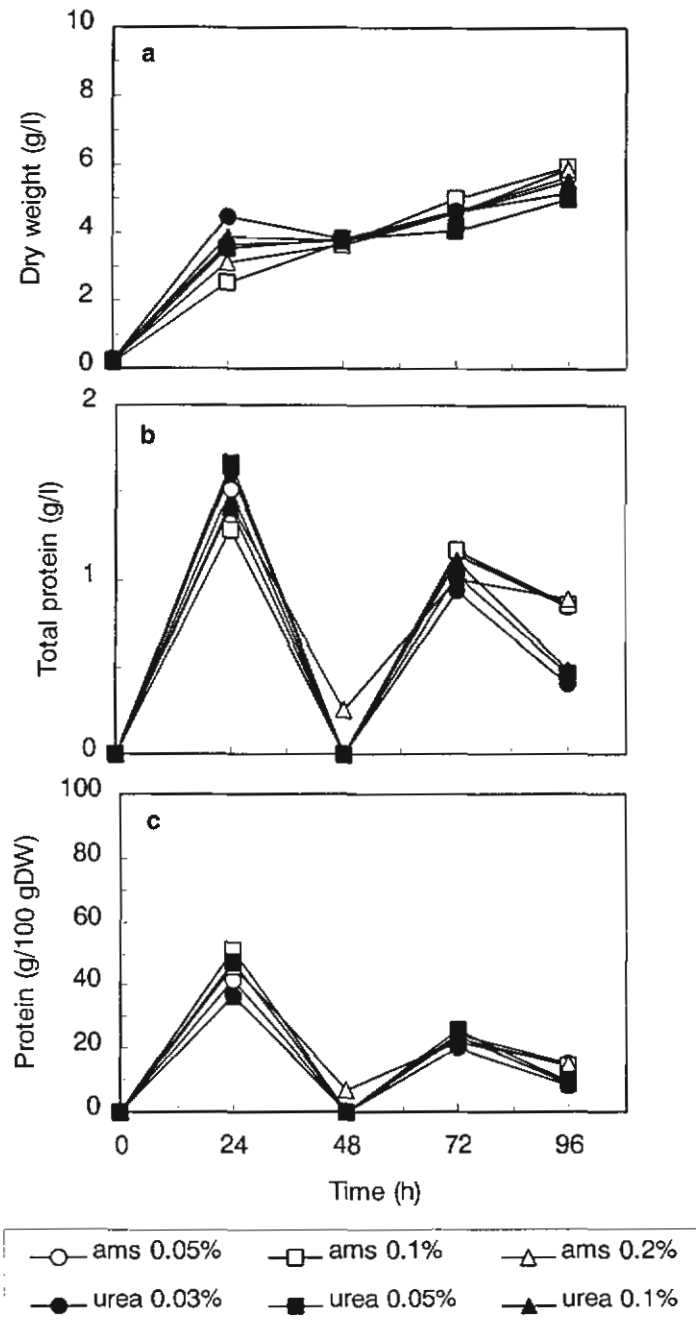


Figure 2.24 Growth (a), total protein (b) and protein content (c) of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing various concentration of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

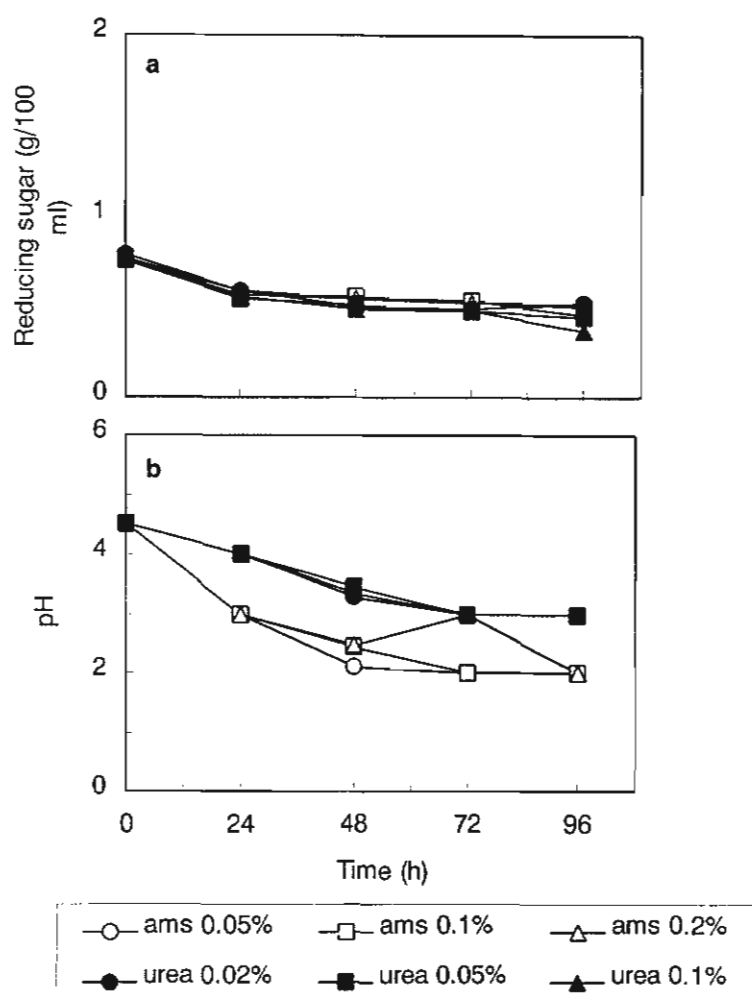


Figure 2.25 Sugar utilization (a) and pH change (b) of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing various concentration of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

Table 2.40 Sedimentation efficiency (S.E.) of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing various concentration of ammonium sulfate or urea, pH 4.5, and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

Nitrogen source	Sedimentation efficiency
0.05% Ammonium sulfate	0.47
0.10% Ammonium sulfate	0.20
0.20% Ammonium sulfate	0.24
0.03% Urea	0.50
0.05% Urea	0.12
0.10% Urea	0.28

2.2.2.2 การเลี้ยงยีสต์ M30 ในอาหารน้ำกากส่าที่ปรับค่า pH เริ่มต้นต่าง ๆ

ทำการเลี้ยงยีสต์ M30 ในอาหารน้ำกากส่า ที่มียูเรีย ความเข้มข้น 0.03% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 4, 4.5 และ 5 ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น โดยวัดเป็นความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร (OD₆₆₀) เท่ากับ 0.5 ปั่นบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C ตรวจวัดการเจริญ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ การเปลี่ยนแปลง pH และ sedimentation efficiency (S.E.) ทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 4 วัน

Table 2.41 Growth, total protein, sugar utilization and pH change of the yeast M30

cultivated in slop waste medium containing 0.03% urea, pH was adjusted to 4, 4.5 and 5; and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

Time (h)	pH 4				pH 4.5				pH 5			
	DW	TP	RS	pH	DW	TP	RS	pH	DW	TP	RS	pH
0	0.24	0	0.91	4	0.32	0.09	0.89	4.5	0.26	0	0.90	5
24	5.05	1.47	0.67	3.84	2.60	0.99	0.65	4.52	2.66	0.72	0.66	5.64
48	6.37	2.54	0.57	3.99	4.18	1.92	0.57	5.54	3.42	1.10	0.57	7.41
72	6.06	2.64	0.52	4.32	3.82	0.77	0.50	5.55	3.37	1.01	0.53	7.21
96	6.25	2.41	0.46	4.18	4.36	1.21	0.49	5.39	4.49	0.94	0.48	6.92

DW : dry weight (g/l)

TP : total protein (g/l)

RS : reducing sugar (%)

M30 ที่เลี้ยงให้เจริญในอาหารน้ำกากส่าที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 มีการเจริญและปริมาณโปรตีนรวมสูงกว่าค่าที่ได้จากการทดลองที่ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 และ 5 (Table 2.41, Figure 2.26a, 2.26b) และเมื่อพิจารณาปริมาณโปรตีนภายในเซลล์ยีสต์ที่เลี้ยงในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นต่างกัน พบว่ายีสต์ที่เลี้ยงในอาหารน้ำกากส่าที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 มีปริมาณโปรตีนภายในเซลล์สูงกว่ายีสต์ที่เลี้ยงในสภาวะที่มีค่า pH 4 และ 5 ในช่วง 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง แล้วลดต่ำลงหลังจากนั้น (Figure 2.26c) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับให้มี pH เริ่มต้นต่างกัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน โดยยีสต์ใช้น้ำตาลไปประมาณ 50% ของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่มีอยู่ในอาหารน้ำกากส่าภายในเวลา 72 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง (Figure 2.27a) อาหารน้ำกากส่าที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 มีการเปลี่ยนแปลง pH น้อยกว่าอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 5 (Figure 2.27b)

เนื่องจากเมื่อเลี้ยงยีสต์ M30 ในอาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 ได้พบการเจริญ และปริมาณโปรตีนรวมในระดับที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงที่ pH อื่น ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงปรับ pH เริ่มต้นของอาหารน้ำกากส่าเท่ากับ 4 ก่อนทำการเพาะเลี้ยง

อย่างไรก็ตามพบว่ายีสต์ M30 ที่เลี้ยงในอาหารน้ำกากส่าที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 สามารถตกตะกอนได้น้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีค่า pH 4 และ 5 ในช่วง 48 ชั่วโมงของการ เพาะเลี้ยง โดยตรวจวัดค่า S.E. ได้เท่ากับ 0.25 (Table 2.42)

Table 2.42 Sedimentation efficiency (S.E.) of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing 0.03% urea, pH was adjusted to 4, 4.5 and 5; and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C for 48 hour.

Initial pH of the media	Sedimentation efficiency
4	0.25
4.5	0.28
5	0.38

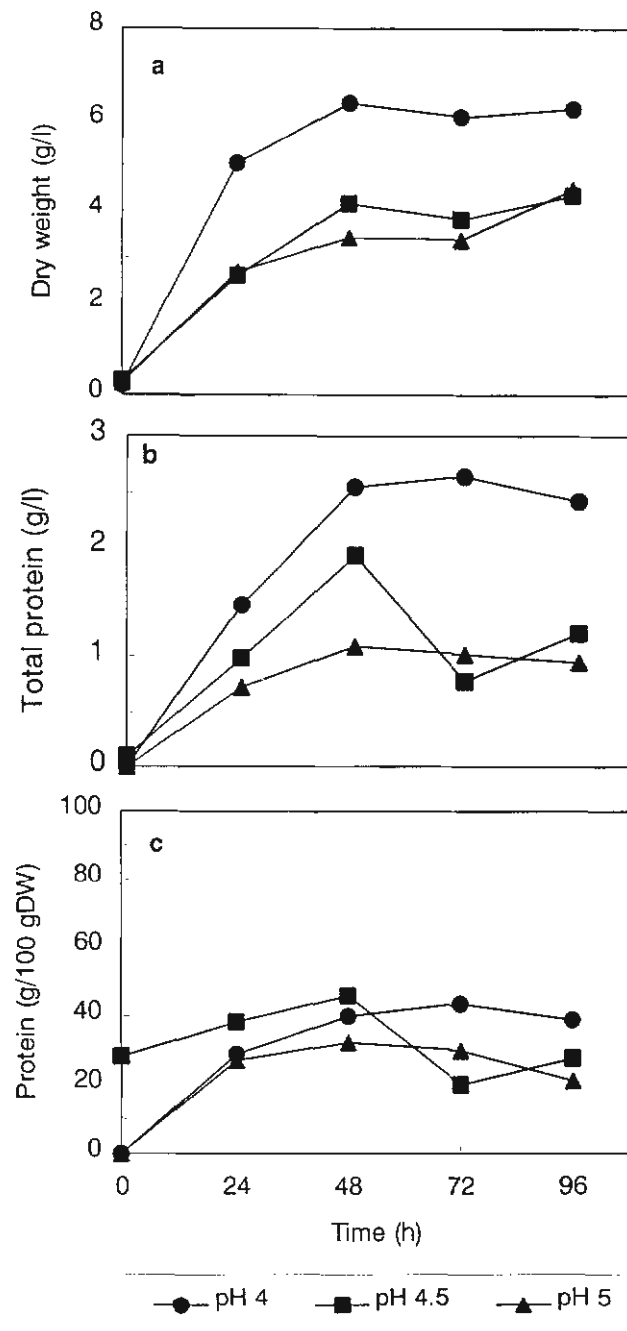


Figure 2.26 Growth (a), total protein (b) and protein content (c) of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing 0.03% urea, pH was adjusted to 4, 4.5 and 5; and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C

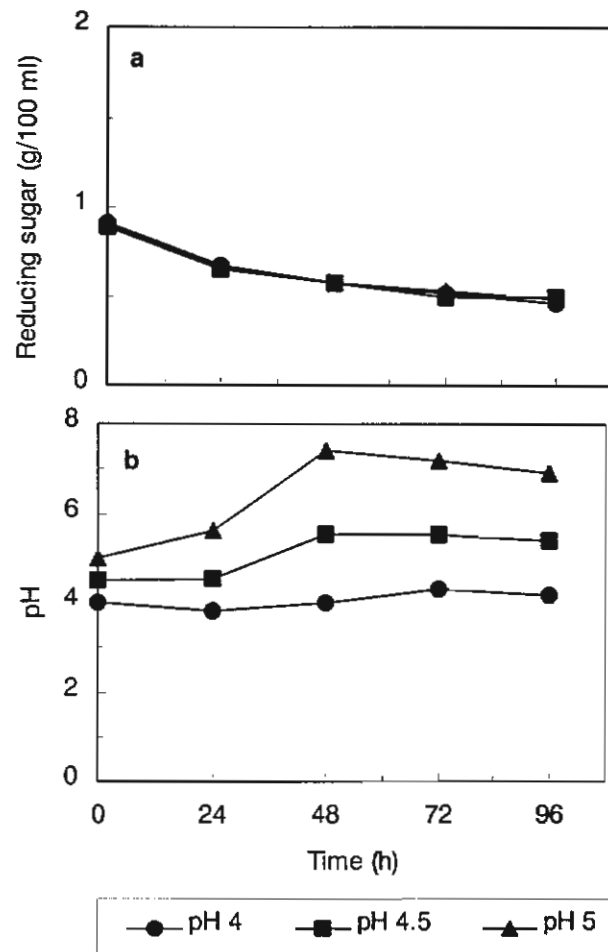


Figure 2.27 Sugar utilization (a) and pH change (b) of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing 0.03% urea, pH was adjusted to 4, 4.5 and 5; and incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

2.2.2.3 การเลี้ยงยีสต์ M30 ในอาหารน้ำกากส่าที่อุณหภูมิต่างๆ

ทำการเลี้ยงยีสต์ M30 ในอาหารน้ำกากส่า ที่มียูเรีย ความเข้มข้น 0.03% เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 4 ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นโดยวัดเป็นความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร (OD_{660}) เท่ากับ 0.5 บ่มบนเครื่องเขย่าในเครื่อง gradient temperature incubator อุณหภูมิ 30-45 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจวัดการเจริญ ปริมาณโปรตีน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ pH

Table 2.43 Growth, total protein, sugar utilization and pH change of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing 0.03% urea, pH 4, incubated on a gradient temperature incubator at various temperatures for 48 hours.

Temp (°C)	Dry weight (g/l)	Total protein (g/l)	Reducing sugar (%)	pH
30	4.16	3.24	0.50	5.4
33	3.95	3.44	0.49	5.4
35	3.40	3.37	0.50	5.4
37	3.86	3.79	0.47	4.7
40	1.12	2.75	0.48	3.9
43	1.20	2.65	0.50	3.9
45	0.93	3.03	0.52	4.0

ยีสต์ M30 มีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 30°C แต่พบว่ามีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนภายในเซลล์ต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33-37 °C ซึ่งที่อุณหภูมิ 37°C พบว่ามีปริมาณโปรตีนรวมและโปรตีนภายในเซลล์สูงสุด (Table 2.43, Figure 2.28a) เมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลืออยู่ในอาหารน้ำกากส่าภายหลัง 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงพบว่าไม่แตกต่างกันในแต่ละอุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงและมีค่าประมาณ 0.5% (Figure 9b) pH ของอาหารน้ำกากส่าที่เลี้ยงยีสต์ที่อุณหภูมิ 30-35 °C มีการเปลี่ยนแปลงจาก 4 เป็น 5.4 ส่วนที่อุณหภูมิ 37 °C มีการเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยคือเพิ่มขึ้นเป็น 4.7 ขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหารน้ำกากส่าที่อุณหภูมิ 40-45 °C (Table 2.43, Figure 2.28b)

เมื่อพิจารณาการเจริญและปริมาณโปรตีนรวมของยีสต์ M30 ที่เลี้ยงในอาหารน้ำกากส่าที่อุณหภูมิ 35-45°C ซึ่งจัดเป็นอุณหภูมิสูงสำหรับการเจริญของยีสต์ทั่วไป พบว่ายีสต์มีการเจริญดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37°C อาจกล่าวได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ยีสต์โดยการหมักในอาหารน้ำกากส่าแบบให้อากาศที่อุณหภูมิสูงคือ 37°C

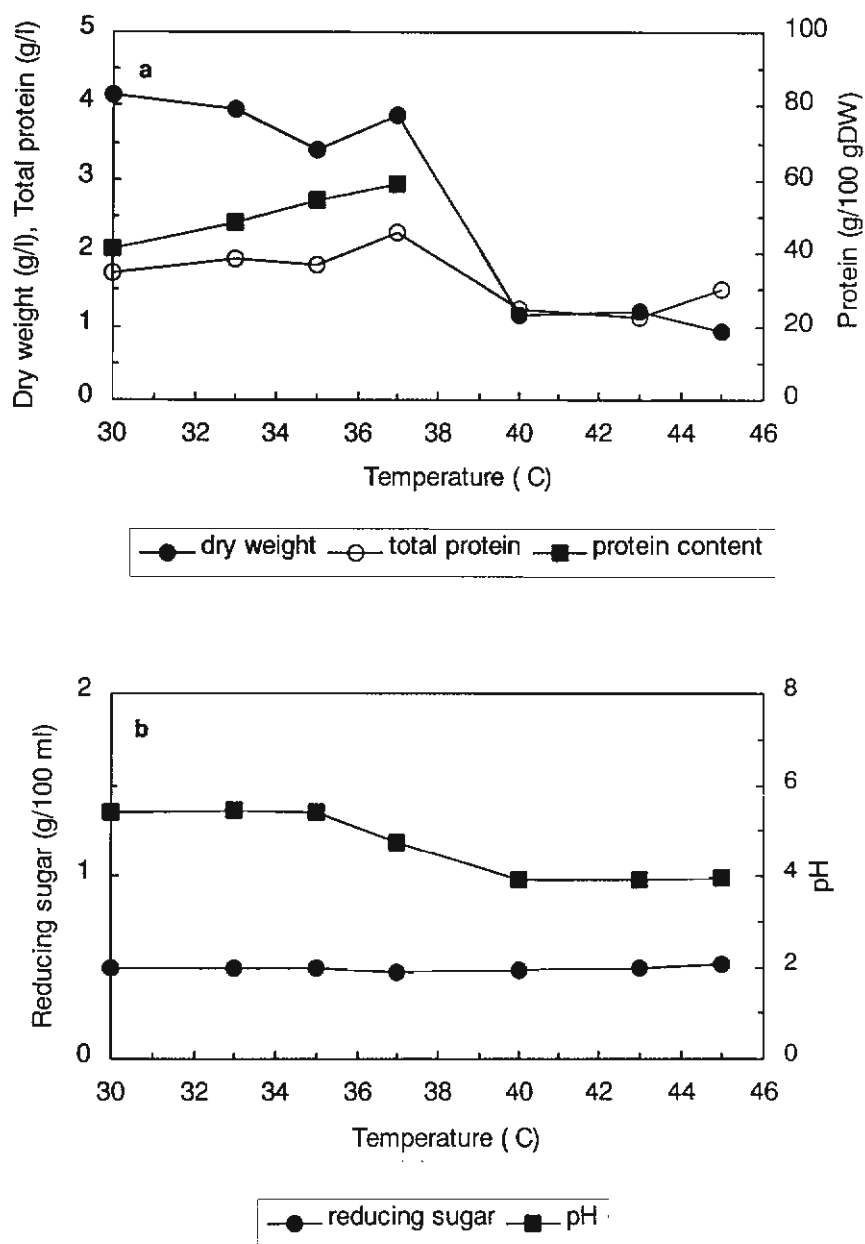


Figure 2.28 Growth, total protein and protein content (a); sugar utilization and pH change (b) of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing 0.03% urea, pH 4, incubated on a gradient temperature incubator at various temperatures for 48 hours.

2.2.3 การศึกษาลักษณะตะกอนของยีสต์ในระหว่างการหมักแบบให้อากาศ ในอาหารน้ำกากส่า ที่อุณหภูมิสูง ในห้องปฏิบัติการ

ทำการเลี้ยงยีสต์สายพันธุ์ M30 ในอาหารน้ำกากส่า ที่มียูเรีย ความเข้มข้น 0.03% เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 4 ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น โดยวัดเป็นความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร (OD_{660}) เท่ากับ 0.5 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 °C ศึกษาการเจริญ ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ค่า S.E. และขนาดของตะกอน

Table 2.44 Growth and viable cell number, sugar utilization, sedimentation efficiency and floc size of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing 0.03% urea, pH 4, incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

Time (h)	Dry weight (g/l)	Viable cell number (cell/ml)	Reducing sugar (%)	S.E.	Floc size* (μ)
0	0.30	1.06×10^7	0.64	0.07	-
6	1.09	1.26×10^7	0.56	0.12	-
12	1.73	1.86×10^7	0.48	0.11	30.7 x 30.4
24	2.97	3.10×10^7	0.43	0.11	41.0 x 28.6
30	3.27	1.56×10^7	0.43	0.11	30.2 x 25.1
36	1.76	1.83×10^7	0.43	0.14	26.9 x 21.0
48	1.54	1.76×10^7	0.40	0.11	31.1 x 19.2
54	1.89	1.55×10^7	0.38	0.12	31.6 x 24.8

* size of viable cell floc

ยีสต์ M30 มีการเจริญหลังเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เทียบเป็นค่า dry weight เท่ากับ 2.97 g/l และพบปริมาณเซลล์ยีสต์ M30 ที่มีชีวิตมีค่าสูงสุดคือ 3.10×10^7 cell/ml ขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงจาก 0.64% เหลือ 0.43% ซึ่งปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะคงที่อยูในระดับนี้ตลอดระยะเวลาที่เลี้ยงต่อไป ความสามารถตกตะกอนของยีสต์ M30 คงที่ตลอดระยะเวลาที่ทดลองโดยจะเห็นได้จากค่า S.E. ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปมากนัก นอกจากนี้ยังพบจากการศึกษาขนาดของตะกอนเซลล์ที่มีชีวิตว่าเมื่อเวลา 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงนั้น ยีสต์มีการสะสมตะกอนที่มีขนาดใหญ่ที่สุดด้วย (Table 2.44, Figure 2.29)

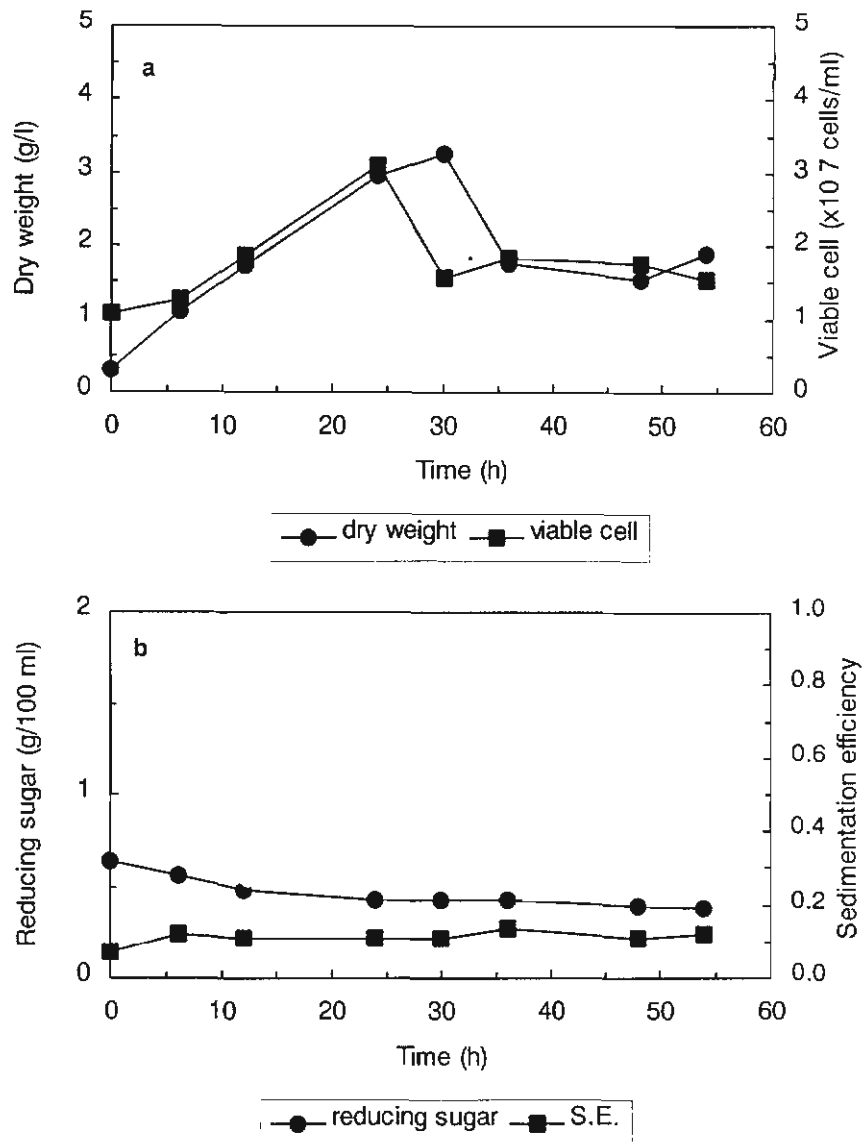


Figure 2.29 Growth and viable cell number (a); sugar utilization and sedimentation efficiency (b) of the yeast M30 cultivated in slop waste medium containing 0.03% urea, pH 4, incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C.

2.2.4 การศึกษาการผลิตเซลล์ยีสต์ M30 โดยการหมักแบบให้อากาศ ในน้ำกากส่า ที่อุณหภูมิสูงเมื่อเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* ร่วมกับ *Candida utilis*
 ทำการเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ M30 ร่วมกับ *C. utilis* สายพันธุ์ IFRPD6041 (อัตราส่วน 1:1) ในอาหารน้ำกากส่าที่มียูเรียความเข้มข้น 0.03% เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 4 ปรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น โดยวัดเป็น

ความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร (OD₆₆₀) เท่ากับ 0.5 บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่ อุณหภูมิ 37 °ซ ศึกษาการเจริญ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ ค่า S.E.

Table 2.45 Growth, total protein, sugar utilization and sedimentation efficiency (b) of the yeast M30 co-cultivated with *C. utilis* IFRPD6041 (1:1) in slop waste medium containing 0.03% urea, pH 4, incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37 ° C.

Time (h)	OD ₆₆₀	Reducing sugar (%)	Total protein (g/l)	S.E.
0	0.625	0.81	0.25	0.09
6	1.425	0.77	0.46	0.09
12	3.250	0.73	0.26	0.07
24	4.237	0.73	0.39	0.06
30	3.787	0.72	0.82	0.07
36	2.800	0.69	0.9	0.05
48	4.925	0.66	1.06	0.07
60	4.237	0.64	1.09	0.12

ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อผสมระหว่างยีสต์ M30 และ KY8 มีการเจริญสูงสุดวัดเป็นค่าความขุ่นที่ 660 นาโนเมตร (OD₆₆₀) เท่ากับ 4.327 แต่พบว่ามีปริมาณ โปรตีนรวมเท่ากับ 0.39 g/l ขณะที่พบปริมาณโปรตีนรวมสูงสุดเท่ากับ 1.09 g/l เมื่อเวลา 60 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ไม่มากนักตลอดระยะเวลาที่ ทดลอง ความสามารถในการตกตะกอนของยีสต์ มีการเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย โดยจะเห็นได้จาก ค่า S.E. ที่มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนักตลอดระยะเวลาที่ทดลอง (Table 2.45, Figure 2.40) แต่ เมื่อพิจารณาค่า S.E. ทั้งหมดที่ตรวจพบในการทดลองนี้พบว่ามีความต่ำกว่าค่าที่ได้จากการทดลองที่ ผ่านมาซึ่งเป็นการเลี้ยงยีสต์ M30 เพียงสายพันธุ์เดียวเท่านั้น อาจกล่าวได้ว่าการนำยีสต์ *C. utilis* IFRPD6041 ซึ่งเป็นยีสต์ที่ไม่ตกตะกอนแต่มีการผลิตโปรตีนภายในเซลล์สูงนั้นทำให้ความสามารถ ตกตะกอนของยีสต์ M30 ลดลง

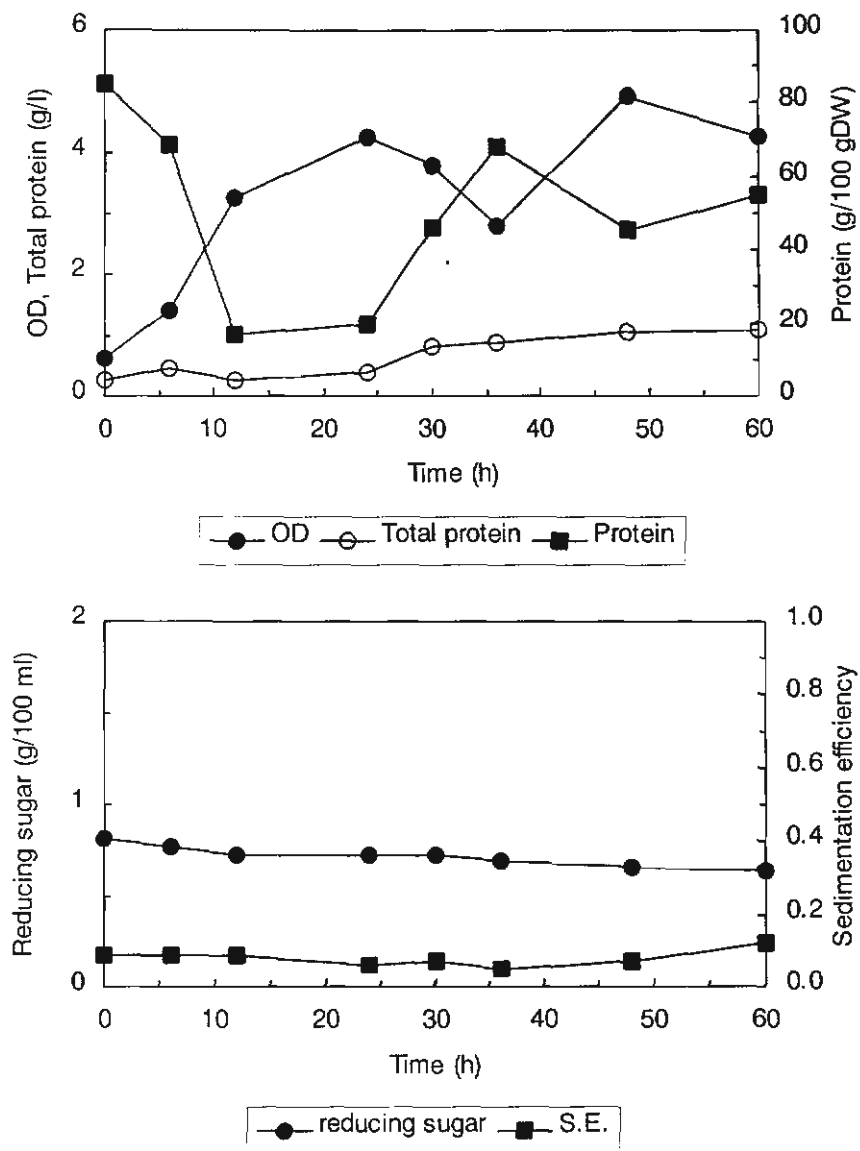


Figure 2.40 Growth, total protein and protein content (a); sugar utilization and sedimentation efficiency (b) of the yeast M30 co-cultivated with *C. utilis* IFRPD6041(1:1) in slop waste medium containing 0.03% urea, pH 4, incubated on a rotary shaker (150 rpm) at 37°C

สรุปผลการทดลอง

1. ยีสต์ตะกอนสำหรับการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล

1.1 นำ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 4 สายพันธุ์ มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการหมักเอทานอลและสามารถตกตะกอน โดยการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาลที่อุณหภูมิสูง จากผลการทดลองคัดเลือกได้สายพันธุ์ M30 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตกตะกอนที่หมักเอทานอลได้สูงสุด เพื่อใช้สำหรับศึกษาการหมักเอทานอลต่อไป นอกจากนั้นยังได้เลือกนำ AM12 ไปร่วมศึกษาในบางการทดลอง เพราะเป็นสายพันธุ์ตกตะกอนซึ่งหมักเอทานอลได้สูงจากกลูโคส ที่สร้างจากการทำโปรโตพลาสต์ฟิวชันระหว่างสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง กับสายพันธุ์ที่ตกตะกอน (Seki et al. 1983)

1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาล ของ *S. cerevisiae* M30 และ AM12 เทียบกับ *S. cerevisiae* Sc90 ซึ่งใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ของโรงงานส่วนใหญ่ในประเทศไทย ได้ผลดังนี้

1.2.1 การใช้แอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรีย เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารกากน้ำตาลนั้น ทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่ได้ทำให้การหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูงแตกต่างกัน

1.2.2 เมื่อปรับปริมาณกากน้ำตาลให้น้ำตาลอินเวอร์ทในอาหารกากน้ำตาล 20% ทั้ง 3 สายพันธุ์ หมักเอทานอลได้สูงกว่า เมื่อหมักในอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลอินเวอร์ท 18% เล็กน้อย และ M30 หมักเอทานอลได้สูงกว่า AM12 เล็กน้อย ในขณะที่หมักได้เท่า ๆ กับ Sc90

1.2.3 จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอล ในกากน้ำตาล แสดงว่าทั้ง M30, AM12 และ Sc90 หมักเอทานอลได้เอทานอลสูงสุด ที่ 33°C โดย M30 และ AM12 หมักได้เท่า ๆ กัน คือ 9.66 และ 9.69 %v/v ตามลำดับ ที่เวลา 36 ชั่วโมง ซึ่งต่ำกว่า Sc90 ที่หมักเอทานอลได้ 10.96 %v/v ที่เวลาเดียวกัน เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 35°C ทั้ง 3 สายพันธุ์ หมักเอทานอลได้เร็วกว่า แต่ให้เอทานอลสูงสุดต่ำกว่าเมื่อหมักที่ 33°C เล็กน้อย โดย M30 หมักเอทานอลสูงสุดได้ เท่า ๆ กันกับ Sc90 ที่เวลา 30 ชั่วโมง (8.48 และ 8.42 %v/v ตามลำดับ) โดยมีอัตราการหมักสูงกว่าเล็กน้อย ส่วน AM12 หมักได้ช้ากว่ามาก โดยให้เอทานอลปริมาณเท่า ๆ กันนี้ เมื่อใช้เวลาเพิ่มขึ้นอีกถึง 18 ชั่วโมง ส่วนการหมักที่ 37°C นั้น M30 และ Sc90 หมักเอทานอลได้ความเข้มข้นลดลงเกือบครึ่งของการหมักที่ 35°C นอกจากนั้นทั้ง M30 และ Sc90 ไม่เจริญที่ 40°C

1.2.4 ผลของ pH ต่อการหมักเอทานอลและการเจริญของ M30 ที่อุณหภูมิสูง พบว่าที่ pH 5.0 นั้น M30 หมักได้เร็วกว่าที่ pH 4.5 เล็กน้อย แต่เอทานอลสูงสุดที่หมักได้ไม่แตกต่างกัน ในขณะที่การเจริญที่ pH 4.5 ดีกว่า ที่ pH 5.0 ส่วนในอาหารที่มี pH 4.0 นั้น M30 ไม่เจริญ หรือ

เจริญและหมักเอธานอลได้น้อยมาก เช่นเดียวกับ Sc90 ไม่ว่าจะปรับ pH ด้วย กรดซัลฟูริกหรือ กรดไฮโดรคลอริก และหมักที่ 33 หรือ 35 °ซ

1.2.5 การหมักเอธานอลที่อุณหภูมิสูงนั้น พบว่าการเติมโปแตสเซียมไฮโดรเจน ฟอสเฟต เพื่อเพิ่มปริมาณฟอสเฟตในอาหารกากน้ำตาลนั้น เมื่อเติม 0.01 % การหมัก เอธานอลเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (จาก 7.4 เป็น 7.53 %v/v ที่ 36 ชั่วโมง) และเมื่อเติมโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้นสูง 0.05 % กลับทำให้การหมักเอธานอลลดลง ซึ่งน่าจะเกิดจากการที่โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตไปส่งเสริมการเจริญ ทำให้มีการหมักน้อยลง

1.3 การศึกษาการตกตะกอนในอาหารกากน้ำตาล แสดงว่า M30 ตกตะกอนได้ดีกว่า AM12 มาก ในขณะที่ Sc90 ไม่สามารถตกตะกอนในทุกสภาวะที่ทดลอง

1.4 การตกตะกอนของ M30 ในระหว่างการหมักอาหารกากน้ำตาล ในถังหมัก ที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 30 33 35 และ 37 °ซ

1.4.1 การตกตะกอนในรูปของ Sedimentation Efficiency (S.E.) ของ M30 นั้น พบว่าเมื่อหมักที่อุณหภูมิต่าง ๆ นาน 48 ชั่วโมง M30 ตกตะกอนได้ไม่สูงมากนัก แต่เมื่อศึกษาผลของเวลา (time course) ต่อการตกตะกอน เมื่อหมักเอธานอลที่ 35 °ซ พบว่าที่เวลา 30 ชั่วโมง M30 ตกตะกอนได้สูงสุด โดยมีค่า S.E สูงกว่าเชื้อที่มีอายุอื่น ๆ มาก

1.4.2 การตกตะกอนเมื่อวัดในรูปของความสูงของตะกอนหลังจากทิ้งไว้ พบว่าเมื่อหมักที่ 37 °ซ เซลล์มีการตกตะกอนดีที่ 24 ชั่วโมง และการตกตะกอนดีขึ้นเมื่อเพิ่มเวลาของการหมักขึ้น จนถึง 42 ชั่วโมง การตกตะกอนน้อยลง และเมื่อเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง การตกตะกอนลดต่ำลงมาก

เมื่อหมักที่ 35 °ซ เซลล์มีการตกตะกอนดี เมื่อหมักนาน 30 ชั่วโมง และตกตะกอนดีขึ้นเมื่อเชื้ออายุมากขึ้น จนถึง 48 ชั่วโมง เซลล์จึงตกตะกอนน้อยลง

เมื่อหมักที่ 33 °ซ เซลล์มีการตกตะกอนดี เมื่อหมักนาน 36 ชั่วโมง และการตกตะกอนดีขึ้นเมื่อหมักหมักนานขึ้น และที่เชื้อมีอายุ 48 ชั่วโมง การตกตะกอนยังไม่ลดลง แต่ความสูงของตะกอนของเซลล์ที่หมักเอธานอลที่ 33 °ซ ต่ำกว่าที่อุณหภูมิอื่น ถึงแม้ว่ามีความเข้มข้นของเซลล์เท่า ๆ กัน ซึ่งอาจเกิดจากการที่เซลล์ที่เลี้ยงที่ 33 °ซ มีขนาดของตะกอนเซลล์ใหญ่กว่าตกตะกอนได้เร็วและเซลล์เกาะกันแน่น ความสูงของตะกอนจึงน้อยกว่าที่อุณหภูมิอื่น ๆ

เมื่อหมักที่ 30 °ซ เซลล์มีการตกตะกอนดีที่ 48 ชั่วโมง โดยความสูงของตะกอนไม่แตกต่างกับเมื่อหมักที่ 35 และ 37 °ซ

1.4.3 สำหรับจำนวนและขนาดตะกอนเซลล์นั้น พบว่าเวลาของการหมักมีผลต่อขนาดของตะกอน โดยเมื่อหมักนานขึ้น ขนาดของตะกอนใหญ่ขึ้น และมีจำนวนมากขึ้น นอกจากนั้น เชื้อซึ่งหมักเอธานอลที่ 33 °ซ ขนาดตะกอนมีแนวโน้มใหญ่กว่าเชื้อซึ่งหมักที่ 35 °ซ

1.5 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมัก เพื่อให้ประกอบการพิจารณาว่าเชื้อที่หมักเอธานอลนั้น อายุเท่าใดที่เซลล์ส่วนใหญ่จึงยังคงมีชีวิต สามารถที่จะนำกลับไปใช้หมักเอธานอลในอาหารใหม่ ในกรณีที่ต้องการทำ cell recycle ผลการทดลองแสดงว่าเชื้อซึ่งหมักเอธานอล ที่ 33 และ 35 °ซ ในช่วง 0-42 ชั่วโมง นั้น พบเซลล์ที่มีชีวิตสูงกว่า 92% (92.9-98.8% เมื่อหมักที่ 33 °ซ และ 92.3-97.1% เมื่อหมักที่ 35 °ซ)

1.6 อายุของเชื้อที่หมักเอธานอลในถังหมัก ซึ่งสามารถนำกลับมาหมักเอธานอลที่อุณหภูมิสูงใหม่ เมื่อพิจารณาการหมักเอธานอล พบว่าเชื้อจากการหมักเอธานอลในถังหมักอายุ 30 ชั่วโมง สามารถหมักเอธานอลในอาหารกากน้ำตาลใหม่ ในฟลาสก์ ได้ดีกว่าเชื้ออายุ 24 และ 36 ชั่วโมง

1.7 การหมักเอธานอลแบบ repeated batch ในอาหารกากน้ำตาล ในฟลาสก์ ที่อุณหภูมิสูง ผลจากการหมัก repeated batch โดยใช้เวลาการหมักแต่ละรอบ 36 ชั่วโมง จำนวน 3 ครั้ง พบว่าความเข้มข้นของเอธานอลที่หมักได้ใน 3 batch นี้ยังไม่แตกต่างกัน

1.8 การหมักเอธานอลและการตกตะกอนเมื่อใช้ M30 ร่วมกับ Sc90 ในอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง พบว่าการใช้แต่ละเชื้อเดี่ยว ๆ และการใช้สองเชื้อร่วมกัน ไม่มีผลต่ออัตราการหมัก แต่การใช้สองเชื้อทำให้เอธานอลความเข้มข้นสูงสุดที่หมักได้ ต่ำกว่าการใช้เชื้อเดี่ยวเล็กน้อย นอกจากนั้นการใช้เชื้อที่ตกตะกอนหมักร่วมกับเชื้อที่ไม่ตกตะกอนนั้น ยังทำให้การตกตะกอนลดต่ำลงมาก

1.9 การตกตะกอนเมื่อหมักเอธานอลในกากน้ำตาล ปริมาตร 80 ลิตร ในถังหมักขนาด 100 ลิตร ที่ 35 °ซ พบว่าการตกตะกอนที่แสดงในรูปของค่า S.E. นั้นสูงสุด (0.72) เมื่อเชื้อหมักเอธานอลนาน 42 ชั่วโมง ส่วนเมื่อวัดในรูปของความสูงของตะกอนนั้น พบว่าวัดความสูงของตะกอนได้สูงเมื่อเชื้อหมักนาน 30 ชั่วโมง และความสูงไม่แตกต่างกันเมื่อเชื้ออายุ 30-42 ชั่วโมง แต่ที่ 48 ชั่วโมง การตกตะกอนของเซลล์ลดลง สำหรับขนาดของตะกอนนั้น พบว่าเมื่ออายุของเชื้อเพิ่มขึ้น ขนาดของตะกอนเซลล์เพิ่มขึ้น และเมื่อเชื้ออายุ 30 ชั่วโมง ตะกอนมีขนาดใหญ่สุด แต่ขนาดลดลงเล็กน้อย เมื่อเชื้ออายุ 36 ชั่วโมง โดยขนาดของตะกอนเซลล์ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมัก 36-48 ชั่วโมง

สำหรับเซลล์ที่มีชีวิตในระหว่างการหมักนั้น พบว่าเฉพาะ 24 ชั่วโมงแรกเท่านั้น ที่เชื้อภายในถังหมักมีเซลล์ซึ่งมีชีวิตสูงกว่า 92% และเมื่อหมักนาน 30 ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตลด

ลงต่ำเป็น 86.9% แต่จากนั้นเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตไม่แตกต่างกันนัก จนหมักครบ 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการหมักเอธานอลในถังหมักขนาดเล็ก เมื่อใช้อาหารและสภาวะของการหมักเดียวกัน พบว่าในระหว่างการหมักในถังหมักขนาดใหญ่ เซลล์มีชีวิตมีเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่า

1.10 การศึกษารอยแผลจากการแตกหน่อ (bud scar) โดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ อีเลคตรอน เพื่อหาว่าจำนวนรอยแผลจากการแตกหน่อ สัมพันธ์กับอายุของเซลล์หรือไม่ จึงได้นำเซลล์จากระหว่างการหมักเอธานอลจากกากน้ำตาล 80 ลิตร ในถังหมัก ขนาด 100 ลิตร มาศึกษารอยแผลจากการแตกหน่อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อีเลคตรอน พบว่าเมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้นมีรอยแผลจากการแตกหน่อมากขึ้น (ซึ่งหมายถึงเซลล์นั้นมีจำนวนครั้งของการแตกหน่อมาก) แต่ไม่สามารถนับจำนวนรอยแผลได้ เพราะเซลล์เกาะกลุ่มกันอย่างหนาแน่น

1.11 ผลของเอธานอลต่อการเจริญของ M30 เมื่อเลี้ยงในสภาวะสำหรับการเจริญ และการหมัก จากการศึกษาผลของเอธานอลต่อการเจริญเมื่อเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอธานอลในอาหารกากน้ำตาลชนิดแข็งเป็น 4 %w/v การเจริญของ M30 ลดลง แต่ M30 ยังคงเจริญได้ในอาหารมีเอธานอล 8 %w/v สำหรับผลของเอธานอล (5 และ 8 %w/v) ต่อการเจริญในสภาวะที่ใช้หมักเอธานอลในกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูงนั้น พบว่าเอธานอลที่เติมลงไป ในอาหาร 5 %w/v มีผลให้การเจริญลดลงกว่าครึ่ง และเอธานอล 8 %w/v ยับยั้งการเจริญได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งแสดงว่าเอธานอลมีผลต่อการเจริญในสภาวะการหมักมากกว่าในสภาวะสำหรับการเจริญ

2. ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรท

2.1 คัดเลือก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีการเจริญและให้โปรตีนสูง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่เตรียมจากกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง (37°C) ได้ยีสต์ 2 สายพันธุ์ คือ RL-6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ตกตะกอน AM12 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตกตะกอน นอกจากนั้นเนื่องจาก M30 มีความสามารถในการตกตะกอนสูงกว่าสายพันธุ์อื่น จึงได้คัดเลือกสำหรับศึกษาการผลิตเซลล์ที่มีโปรตีนสูงต่อไป

2.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ที่มีโปรตีนภายในเซลล์สูง ในอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง (37°C)

2.2.1 ผลจากการผันแปรชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจน คือ แอมโมเนียมซัลเฟต (0.05, 0.1 และ 0.3%) และ ยูเรีย (0.03, 0.05 และ 0.1%) ต่อการผลิตเซลล์ของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ (RL-6, AM12 และ M30) พบว่าเมื่อใช้ ยูเรีย 0.1% ทั้งสามสายพันธุ์เจริญดีที่สุด โดยในกรณีของ M30 และ AM12 นั้น ยูเรีย 0.1% มีผลให้มีโปรตีนทั้งหมด (total protein) สูงด้วย แต่เมื่อพิจารณาโปรตีนในเซลล์ (protein content) ของทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าการที่ยูเรีย

0.1% ส่งเสริมการเจริญ ทำให้ได้เซลล์ความเข้มข้นสูง แต่กลับมีผลให้โปรตีนในเซลล์ (g/100gDW) มีค่าลดลง ซึ่งอาจเป็นเพราะแหล่งไนโตรเจนมีปริมาณจำกัด เมื่อเซลล์ใช้สำหรับการเจริญ จึงเหลือไม่มากพอที่จะทำใช้สำหรับการสังเคราะห์และสะสมโปรตีนปริมาณสูงด้วย

2.2.2 จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ (2, 3 และ 4%) ในอาหารกากน้ำตาล ที่ได้จากการปรับปริมาณกากน้ำตาล ต่อการผลิตเซลล์และโปรตีน ของยีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ พบว่าในอาหารที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 4% ทั้ง 3 สายพันธุ์ให้เซลล์ความเข้มข้นสูงสุด รวมทั้งให้โปรตีนทั้งหมด และโปรตีนในเซลล์สูงสุดด้วย

2.2.3 สำหรับ pH เริ่มต้นของอาหารกากน้ำตาล นั้น พบว่าเมื่อปรับ pH ของอาหารให้เท่ากับ 4.5 ทั้ง 3 สายพันธุ์ ให้เซลล์สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี pH 4.0 และ 5.23 ประมาณ 1.5-2.6 เท่า ในขณะที่ให้โปรตีนทั้งหมดสูงกว่าประมาณ 1.9-3.5 เท่า

2.2.4 คุณสมบัติของการเลี้ยงเชื้อที่ทำให้ RL-6 มีการเจริญและโปรตีนทั้งหมดสูง คือ 33°C ส่วน AM12 การบ่มที่ 33 และ 35°C ให้เซลล์เท่ากัน โดยมีโปรตีนทั้งหมดเมื่อเลี้ยงที่ 33°C สูงกว่าที่ 35°C เล็กน้อย และสำหรับ M30 ผลผลิตเซลล์และให้โปรตีนทั้งหมดสูงสุด ที่ 30-33°C

2.2.5 สำหรับความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น (วัดในรูปของความขุ่น ที่ 660 นาโนเมตร) นั้น พบว่ามีผลต่อการผลิตเซลล์ และโปรตีนในเซลล์ โดยสำหรับ RL-6 เมื่อใช้เซลล์เริ่มต้นวัดเป็น OD₆₆₀ เท่ากับ 1.5 ให้เซลล์และโปรตีนในเซลล์สูงสุด ในขณะที่สำหรับ AM12 นั้นเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมวัดเป็น OD₆₆₀ เท่ากับ 2 ส่วน M30 เซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมวัดเป็น OD₆₆₀ เท่ากับ 1.5-2

นอกจากนั้นผลการทดลองนี้แสดงว่า M30 ให้เซลล์ความเข้มข้นสูงเท่า ๆ กับ AM12 และต่ำกว่า RL-6 เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่เมื่อพิจารณาโปรตีนทั้งหมดพบว่า M30 ให้โปรตีนทั้งหมดสูงกว่าอีก 2 สายพันธุ์พอสมควร ถึงแม้ว่าความเข้มข้นของเซลล์จะเท่า ๆ กัน นอกจากนั้น M30 ยังตกตะกอนได้ดีกว่า AM12 ส่วน RL-6 ไม่ตกตะกอน ดังนั้นในการจึงได้ตัดสินใจนำเฉพาะ M30 ไปศึกษาการผลิตเซลล์ที่มีโปรตีนสูงสำหรับใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยการหมักในอาหารกากน้ำตาล ใน airlift fermentor ในขั้นต่อไป

2.3 สำหรับการตกตะกอนของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า RL-6 ไม่ตกตะกอน ส่วน M30 ตกตะกอนได้ดีกว่า AM12 ในทุกสภาวะที่ทดสอบ

2.4 การตกตะกอนของ M30 โดยการหมักในอาหารกากน้ำตาล ในถังหมักแบบ airlift ที่อุณหภูมิห้อง โครงการย่อยที่ 2 ได้พัฒนาถังหมักแบบ airlift โดยใช้วัสดุและอุปกรณ์ ที่หาได้ง่าย และมีราคาถูก แต่ไม่มีระบบการควบคุมอุณหภูมิที่มีราคาแพง ดังนั้นจึงในการทดลองโดยใช้ถังหมักแบบ airlift จึงทำในสภาพที่ไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ

2.4.1 จากการศึกษาการตกตะกอนในรูปของ S.E. แสดงว่าเมื่อสิ้นสุดการหมักแบบให้อากาศ คือที่ 48 ชั่วโมง M30 มีการตกตะกอนสูงมาก (S.E.= 0.74) ในขณะที่เมื่อเชื้ออายุ 36 ชั่วโมง วัด S.E. ของเซลล์ได้เพียง 0.32

2.4.2 เมื่อวัดการตกตะกอนในรูปความสูงของตะกอนเมื่อตั้งไว้ กลับพบว่าเมื่อเชื้อ 36 ชั่วโมง ตกตะกอนได้ดีกว่าเชื้ออายุ 48 ชั่วโมง ประมาณ 2.5 เท่า

2.4.3 สำหรับจำนวนและขนาดของตะกอนเซลล์นั้น พบว่าเพิ่มขึ้นเมื่อเชื้ออายุมากขึ้น โดยจำนวนตะกอนเซลล์นั้นพบมากเมื่อเชื้อมีอายุ 36 ชั่วโมง แต่ที่ 48 ชั่วโมง จำนวนตะกอนเซลล์ไม่แตกต่างกันกับที่ 36 ชั่วโมง

2.4.4 สำหรับการหมักแบบให้อากาศในถังหมักแบบ airlift นี้ พบว่า ในช่วง 0-36 ชั่วโมง เซลล์ทั้งหมดในถังหมักเป็นเซลล์ที่มีชีวิต โดยเซลล์เพิ่มจาก 5.50×10^6 เซลล์/มล. เป็น 4.50×10^8 เซลล์/มล. และที่ 48 ชั่วโมง เซลล์มีชีวิตลดลงเหลือ 97.6%

2.5 การผลิตเซลล์ที่มีโปรตีนในเซลล์สูง เมื่อเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* M30 ร่วมกับ *Candida utilis* IFRPD6014 โดยการหมักแบบให้อากาศ ในกากน้ำตาล ใน airlift fermentor

เนื่องจากในกากน้ำตาลมีน้ำตาลชนิดคาร์บอนห้าตัว และสารประกอบอื่นที่ *S. cerevisiae* ใช้ไม่ได้ ซึ่งมีผลให้ของเหลือทิ้งจากการผลิตเซลล์ มีสารประกอบเหล่านั้นเหลืออยู่ อาจทำให้ยากต่อการกำจัด ดังนั้นจึงได้ทดลองนำยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลชนิดคาร์บอนห้าตัว ซึ่งมีโปรตีนในเซลล์สูงและสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์เช่นกัน มาเลี้ยงร่วมด้วย เพื่อลดปริมาณสารประกอบเหล่านั้น และยังได้เซลล์เพิ่มขึ้นไปพร้อม ๆ กัน ผลการทดลองแสดงว่าการเลี้ยง M30 เดี่ยว ๆ ทำให้มีการผลิตเซลล์ในอัตราที่เร็วกว่า ในช่วง 30 ชั่วโมงแรกของการหมักแบบให้อากาศ แต่เมื่อครบ 36 ชั่วโมงเซลล์ที่ผลิตได้มีความเข้มข้นเท่า ๆ กัน โดยจากการใช้ M30 เดี่ยว ๆ ให้เซลล์ 18.10 กรัม/ลิตร เมื่อใช้ M30 กับ *C. utilis* IFRPD6014 ให้เซลล์ 17.03 กรัม/ลิตร และเมื่อใช้ *C. utilis* IFRPD6014 เดี่ยว ๆ ให้เซลล์ 16.73 กรัม/ลิตร สำหรับโปรตีนทั้งหมด และโปรตีนในเซลล์ เมื่อเลี้ยง M30 เดี่ยว ๆ นั้นสูงกว่า เมื่อใช้ M30 กับ *C. utilis* IFRPD6014 และเมื่อใช้ *C. utilis* IFRPD6014 เดี่ยว ๆ อย่างชัดเจน

สำหรับการตกตะกอน นั้น เมื่อใช้ M30 เดี่ยว ๆ พบว่าตกตะกอนได้สูงมาก แต่เมื่อเลี้ยง M30 กับ *C. utilis* IFRPD6014 กลับไม่พบการตกตะกอน เช่นเดียวกับ *C. utilis* IFRPD6014 ที่เลี้ยงเดี่ยว ๆ

ผลการทดลองนี้แสดงว่า *C. utilis* IFRPD6014 ที่เลี้ยงร่วมกันกับ M30 ไม่ได้ทำให้เซลล์และโปรตีนทั้งหมด เพิ่มขึ้น แต่กลับทำให้ลดลง นอกจากนั้นยังทำให้ M30 สูญเสียการตกตะกอน

3. ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ เมื่อใช้น้ำกากสาเป็นสับสเตอร์

3.1 การคัดเลือกยีสต์ *S. cerevisiae* 10 สายพันธุ์ เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ โดยการเลี้ยงแบบให้อากาศ ในอาหารน้ำกากสาที่ปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 2% พบว่ายีสต์ M30 มีการเจริญและสามารถตกตะกอนได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบปริมาณโปรตีนสูงกว่ายีสต์สายพันธุ์อื่นที่ศึกษาเมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เนื่องจากพบว่ายีสต์ที่นำมาศึกษาใช้น้ำตาลไปเพียง 0.7-0.8% ซึ่งเท่ากับปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในน้ำกากสาที่นำมาใช้เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่แล้ว ดังนั้นในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเซลล์ยีสต์ M30 ในอาหารน้ำกากสา จึงไม่ได้ปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นแต่อย่างใด

3.2 สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ที่มีโปรตีนภายในเซลล์สูง ในอาหารน้ำกากสา ที่อุณหภูมิสูง (37 °C)

3.2.1 เมื่อศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ยีสต์ M30 ในอาหารน้ำกากสาพบว่า ยีสต์ M30 มีการเจริญในอาหารน้ำกากสาที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตหรือยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่เนื่องจากยูเรียมีราคาถูกกว่าแอมโมเนียมซัลเฟต ดังนั้นจึงเลือกใช้ยูเรีย ความเข้มข้น 0.03% เป็นแหล่งไนโตรเจน

3.2.2 ทดลองหา pH ของอาหารน้ำกากสาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ยีสต์ M30 ที่มีโปรตีนสูง พบว่า M30 เมื่อเลี้ยงในอาหารน้ำกากสาที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 มีการเจริญและปริมาณโปรตีนทั้งหมดสูงกว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ปรับ pH เท่ากับ 4.5 และ 5 ถึงแม้ว่าที่สภาวะนี้ยีสต์ M30 จะตกตะกอนได้น้อยกว่าก็ตาม

3.2.3 การทดลองเลี้ยงยีสต์ M30 ที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในอาหารน้ำกากสาที่มียูเรีย ความเข้มข้น 0.03% เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 และทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการเจริญและปริมาณโปรตีนรวมของ M30 ที่เลี้ยงในอาหารน้ำกากสาที่ 35-45 องศาเซลเซียส ซึ่งจัดเป็นอุณหภูมิสูงสำหรับการเจริญของยีสต์ทั่วไปนั้น M30 มีการเจริญดีที่สุดที่ 37 °C จึงอาจกล่าวได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ยีสต์โดยการหมักในอาหารน้ำกากสาแบบให้อากาศที่อุณหภูมิสูงคือ 37 °C

3.3 การศึกษาขนาดตะกอนของยีสต์ M30 เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C ในอาหารน้ำกากสาที่มียูเรีย ความเข้มข้น 0.03% เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมงยีสต์ M30 มีการเจริญสูงสุดและสะสมตะกอนขนาดใหญ่ที่สุดคือ 41.0 ไมโครเมตร x 28.6 ไมโครเมตร

3.4 การทดลองเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับ *C. utilis* IFRPD6014 ในอัตราส่วน 1:1 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้น พบว่าการใช้ M30 ร่วมกับ *C. utilis* IFRPD6014 นั้น มีผลให้ผลิตเซลล์ได้เร็วกว่า และสูงกว่า เมื่อใช้ M30 เดี่ยว ๆ แต่พบว่าเมื่อเลี้ยง 2 เชื้อร่วมกัน มีการตกตะกอนลดลง

4. การคัดเลือกสารประกอบที่เหมาะสมสำหรับช่วยตกตะกอนเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์

การใช้สารอนินทรีย์สำหรับการช่วยการตกตะกอนเซลล์ M30 ที่ได้จากการหมักแบบให้อากาศ ในอาหารกากน้ำตาล โดยใช้ airlift fermentor เพื่อช่วยให้การแยกเซลล์ทำได้ง่ายขึ้นจึงได้ทดลองใช้สารอนินทรีย์ 4 ชนิด (aluminum sulfate, ferric chloride, ferrous sulfate และ potassium sulfate) เติมลงไปใน culture broth เมื่อสิ้นสุดการหมัก ผลการทดลองแสดงว่า M30 ตกตะกอนได้ดีมากในสภาวะที่ใช้ผลิตเซลล์อยู่แล้ว จึงทำให้การเติมสารอนินทรีย์ไม่ได้ช่วยให้มีการตกตะกอนเพิ่มขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- จรรยา คำวนตา, ประดิษฐ์ ครัววัฒนา, จริญญา เจตนะจิตร, ปราโมทย์ ธรรมรัตน์, บุญเทียม พันธุ์เพ็ง, วิฑูพร ว่องสุวรรณเลิศ และ มณี ต้นตุงกิจ. 2523-2524. การคัดเลือกสายพันธุ์ราและยีสต์เพื่อหมักแอลกอฮอล์. หน้า 1/1-1/50. ใน รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่องการปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเพื่อผลิตแอลกอฮอล์. เสนอต่อสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.
- จรรยา คำวนตา, วิเชียร ยงมานิตชัย, ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และ ประดิษฐ์ ครัววัฒนา. 2526. ยีสต์สายพันธุ์ใหม่. วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย. ปีที่ 2. ฉบับที่ 2. หน้า 90.
- ชุติมา ดิษเย็น. 2542. การสร้างยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่มีเมทไธโอนีนและไลซีนสูงเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีน. คุณภาพสูง โดยเทคนิคโปรโตพลาสต์ฟิวชัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ธวัชพร รูปสุต. 2536. การปรับปรุงพันธุ์กรรม และการผลิตยีสต์ที่มีปริมาณไลซีนภายในเซลล์สูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- นางพางา คุณจักร, วิเชียร ยงมานิตชัย และสาวิตรี ลิ้มทอง. 2531. การสร้างยีสต์ทนเค็มสำหรับผลิตแอลกอฮอล์. รายงานผลงานวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 26. หน้า 169-181.
- บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2523. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล และน้ำอ้อย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ปราโมทย์ ธรรมรัตน์. 2521. การศึกษาเชื้อยีสต์ในน้ำตาลสด น้ำตาลเมา และการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อการหมักแอลกอฮอล์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ปราโมทย์ ศิริโรจน์. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์และการเลี้ยงยีสต์ที่มีโปรตีนสูงในน้ำทิ้งจากขบวนการแปรรูปอาหารถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- พรชัย นพนาศิพงษ์. 2527. การผลิตโปรตีนจากยีสต์โดยใช้น้ำทิ้งจากการผลิตเยื่อกระดาษเป็นวัตถุดิบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- รัฐดา จันทร์กลั่น. 2539. การปรับปรุงพันธุ์กรรมและศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- วรรณภา นัยบุตร. 2532. การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงเพื่อใช้ผลิตจุลินทรีย์โปรตีน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

- สฤณณี กุณทียะ. 2525. การเลี้ยงจุลินทรีย์ในน้ำสาโท. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สมคิด รื่นภาคภูมิ. 2521. การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์เพื่อผลิตเป็นอาหารสัตว์โดยใช้วัตถุดิบประเภทแป้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- สาวิตรี ลิ้มทอง, วิเชียร กิจปรีชาวนิช, มณี ดันต๊ะรุ่งกิจ และ วิเชียร ยงมานิตชัย. 2543. การปรับปรุงพันธุ์กรรมของยีสต์เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการและใช้เป็นยีสต์อาหารสัตว์. รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัย ครั้งที่ 4 เสนอต่อศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ. 63 หน้า.
- Bhattacharjee, J. E. 1970. Microorganism as potential sources of food. Adv. Appl. Microbiol. 13: 139-159.
- Brown, S.W., S.G. Oliver, D.E.F. Harrison and R.C. Righelato. 1981. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: Differences in the Magnitude and Complexity of the Effect. European J. Appl. Microbiol Biotechnol. 11: 151-155.
- Calleja, G.B. 1987. Cell Aggregation. In A.H. Rose and J.S. editors. The Yeasts. Vol.2. p 165-238. Academic Press. London.
- Chen, S. L. 1981. Optimization of batch alcoholic fermentation of glucose syrup substrate. Biotechnol. Bioeng. 23: 1827-1836.
- Chi, Z. and N. Arneborg. 2000. *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance exhibit different adaptive responses to produce ethanol. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology. 24: 75-78.
- Choi, M.H., G.E. Ji, K.H. Koh, Y.W., Ryu, D.H. Jo and Y.H. Park. 2002. Use of waste Chinese cabbage as a substrate for yeast biomass production. Bioresource Technology. 83: 251-253.
- Converti, A., P. Perego, A. Lodi, F. Parisi and M. del Bargahi. 1985. A kinetic study of *Saccharomyces* strains performance at high sugar concentrations. Biotechnol. Bioeng. 27: 1108-1114.
- Cubells, M. X., A. Narbad, A.T. Carter and M. Strafford. 1996. Flocculation of the yeast *Candida fatama* (*Debaryomyces hansenii*): An essential role for peptone. Yeast 12 (3): 415-423.
- Curto, R.B.L. and M.M. Tripodo. 2001. Yeast production from virgin grape marc. Bioresource Technology. 78: 5-9.

- Droste, R.L. 1997. Theory and practice of water and wastewater Treatment. John Wiley, New York. 800p.
- Esser, K. and U. Kues. 1983. Flocculation and its implication for biotechnology. *Proc. Biochem.* 18(6): 21-23.
- Fernandez, M. and P. F. Fox .1996. Fractionation of cheese nitrogen using chitosan. *Food Chem.* 58(4): 319-322.
- Gasner C.C. and D.I.C. Wang. 1970. Microbial recovery enhancement through flocculation. *Biotech. Bioeng.* 12, 873-887.
- Ghose, T. K., Tyagi, R.D. 1979. Rapid-ethanol fermentation of cellulose hydrolysate. II. Product and substrate inhibition and optimization of fermentation design. *Biotechnol. Bioeng.* 1: 1401-1420.
- Guerrero, L., F. Omil, R. Mendez and J.M. Lema. 1998. Protein recovery during the overall treatment of waste waters from fish-meal factories. *Bioresource Technol.* 63: 221-229.
- Hamer, G. 1979. Biomass from natural gas. *In*. *Economic Microbiology*, Vol 4, pp.415-360 (Editor, Rose, A.H.) Academic Press, London.
- Hautcourt, O. and K. A. Smart. 1999. Measurement of brewing yeast flocculation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 57(4): 123-128.
- Hohgson, J.A., D.R. Berry and J.R. Johnston. 1985. Discrimination by heat and proteinase treatments between flocculent phenotypes conferred on *S. cerevisiae* by
- Huang, C. and Y. Chen. 1996. Coagulation of colloidal particles in water by chitosan. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 66(3): 227-232
- Jayatissa, P.M. and A.H. Rose. 1976. Role of wall phosphomannan in flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.* 96: 165-174.
- Jin, Y.L., L. L. Ritcey and R. A. Speers. 2000. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58(3): 108-116.
- Jin, Y.L., L. L. Ritcey, R. A. Speers and P.J. Dolphin. 2001. Effect of cell surface hydrophobicity, charge and Zymolectin density on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59(1):1-9.

- Kim, J.K., K.-T. Tak and J.-H. Moon. 1998. A continuous fermentation of *Kluyveromyces fragilis* for the production of high nutritious protein diet. *Agricultural Engineering*. 18: 41-49.
- Kobayashi, O., H. Suda, T. Ohtani and H. Sone. 1996. Molecular cloning and analysis of the dominant flocculation gene *FLO8* from *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & General Genetics*. (6): 707-715.
- Komada, K. and M. Murata. 1984. On the mechanism of brewer's yeast flocculation. *Agric. Biol. Chem.* 48(10): 2423-2433.
- Kosaric, N., A. Wieczorek, G.P. Cosentino, R.J. Magee. 1983. Ethanol fermentation. In H. Dellweg (ed.). *Biotechnology*. Vol. 3. Verlag Chemie, Weinheim
- Kumnuanta, J., B. Punpeng, V. Vongsuvanlert, K. Komagata and H. Taguchi. 1981. Ethanol Fermentation by flocculating yeast. *Microbial Utilization of Renewable Resources*. Vol.2. JSPS-NRCT Seminar on Agro-Industry Including Microbial Technology, January 5-8, 1981. Songkhla. pp. 176-180.
- Kuriyama, H., H. Ishibashi, H. Miyagawa, H. Kobayashi and E. Mikami. 1993. Optimization of two-stage continuous ethanol fermentation using flocculating yeast. *Biotechnology Letters*. 15(4): 415-420.
- Limtong S., M. Nakata, H. Funahashi, T. Yoshida, T. Seki, J. Kumnuanta and T. Taguchi. 1984. Continuous ethanol production by concentrated culture of flocculating yeast. *J. Ferment. Technol.* 62 (1): 55-62.
- Limtong S., T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi. 1988. Simulation and characterization of fed-batch culture for ethanol production from molasses. *Bioprocess Engineering*. 2 (4): 141-147.
- Limtong S., T. Yoshida, T. Seki, M. Suwana-adth and H. Taguchi. 1986. Effect of some inorganic salts on growth and ethanol fermentation of *S. cerevisiae* AM12. *Kasetsart Journal (Science)* 20 (2):186-197.(in Thai)
- Limtong, S. 1987. Ethanol Fermentation by Flocculent Yeasts. Ph.D. Thesis. Osaka University. Japan.
- Limtong, S. 1987. Ethanol fermentation by flocculent yeasts. Ph.D. Thesis. Osaka University, Japan.

- Limtong, S., M. Nakata, H. Funahashi, T. Yoshida, T. Seki, J. Kumnuanta and T. Taguchi. 1984. Continuous ethanol production by concentrated culture of flocculating yeast. J. Ferment. Technol. 62: 55-62.
- Limtong, S., W. Yongmanichai, P. Thammarate and M. Tantirungkij. 1986a. Progress Report (August 1985-February 1986) on Hybridization of halotolerant yeast for alcohol fermentation. A research project USAID/PSTC Program. Grant no. 936-5542-G-00-5080-00.
- Limtong, S., W. Yongmanichai, P. Thammarate and M. Tantirungkij. 1986b. Progress Report no. 2 (March 1986-August 1986) on Hybridization of halotolerant yeast for alcohol fermentation. A research project USAID/PSTC Program. Grant no. 936-5542-G-00-5080-00.
- Limtong, S., W. Yongmanichai, P. Thammarate and M. Tantirungkij. 1987. Hybridization of halotolerant yeast for alcohol fermentation. p.163-171. Proceedings of His Majesty's Fifth Cycle Commemorative Conference of USAID Science Research Award Grantee Nakhon Pathom, Thailand.
- Lloyd, D. S. Morrell, H.N. Carlsen, H. Degn, P.E. James and C.C. Rowlands. 1993. Effects of growth with ethanol on fermentation and membrane fluidity of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. 9: 825-833.
- Loureiro, V. and N. va Uden. 1986. Roles of the specific growth rate and the ethanol concentration in the adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to ethanol. Biotechnol. Bioeng. 28: 1443-1445.
- Lyons, T.P. and J.S. Hough, 1970. Flocculation of brewer's yeast. J. Int. Brew. 76: 564-571.
- Miki, B.L.A., N.H. Poon, A.P. James and V.L. Seligy. 1982a. Possible mechanism for flocculation interaction governed by gene FLO1 in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 150(2): 878-889.
- Mortimer, R.K. and D. Schild. 1985. Genetic map of *Saccharomyces cerevisiae*. Ninth edition. Microbiol. Rev. 49(3): 181-212.
- Nahamura, H. 1961. Chemical separation methods for common microbes. J. Biochem. Microbiol. Technol. Eng. 3: 395-403.

- Paiva, T.C., S. Sato, A.V. Visconti and L.A. Castro. 1996. Continuous alcoholic fermentation process in tower reactor with recycling of flocculating yeast. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 57-58: 535-541.
- Pinotti, A., A. Bevilacqua and Zaritzky, N. 1997. Optimization of the flocculation stage in a model system of a food emulsion waste using chitosan as polyelectrolyte. *J. Food Eng.* 32: 69-81.
- Precott, S.C. and C.G. Dunn. 1969. *Industrial Microbiology*. 3rd edition. Tokyo.
- Reed, G. T.W. Nagodawithana. 1991. *Yeast Technology*. 2th edition. An AVI Book, New York.
- Rose, A.H. 1993. Composition of the envelope layers of *Saccharomyces cerevisiae* in relation to flocculation and ethanol tolerance. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 74: 110S-118S.
- Sattler, L. and F.W. Zerban. 1945. Unfermentable reducing substance in molasses. *Ind. Eng. Chem.* 37: 320-342.
- Seki T., S. Myoga, S. Limtong, S. Uedono, J. Kummnuata and H. Taguchi. 1983. Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. *Biotechnology Letters*. 5:351-356.
- Seki T., S. Myoga, S. Limtong, Uedono, J. Kummnuata and H. Taguchi. 1983. Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. *Biotechnology Letters*. 5: 351-356.
- Shepherd, R., S. Reader and A. Falshaw. 1997. Chitosan Functional Properties. *Glycoconjugate J.* 14 (4): 535-542.
- Singh, D., I.M. Banat, P. Nigam, R. Merchant. 1998. Industrial scale ethanol production using the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB 3 in an Indian distillery. *Biotechnol. Lett.* 20: 753-755.
- Soares, E.V. and J. Seynaeve. 2000a. The use of succinic acid, as a pH buffer, expands the potentialities of utilization of a chemically defined medium in *Saccharomyces cerevisiae* flocculation studies. *Biotechnology Letters*. 22(10): 859-863.
- Sree, N.K., M. Sridhar, K. Suresh, I.M. Banat and L. V. Rao. 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. *Bioresource Technology*. 72: 43-46.

- Sree, N.K., M. Sridhar, L. V. Rao and A. Pandey. 1999. Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. *Process Biochemistry*. 34; 115-119.
- Sridhar M., N.K. Sree and L. V. Rao. 2002. Effect of UV on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance *Saccharomyces cerevisiae* VS₁ and VS₃ strains. *Bioresource Technology*. 83: 199-202.
- Underkofler, L.A. and B.J. Hickley. 1954. Alcoholic fermentation of molasses. *Industrial fermentation*.
- Watson, K. 1982. Unsaturated fatty acid but not ergosterol is essential for high ethanol production in *Saccharomyces*. 1982. *Biotechnology Letters*. 4(6): 397-402.

ภาคผนวก

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกและศึกษาการตกตะกอนของยีสต์ตกตะกอน (flocculent yeast) สำหรับใช้ในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยการหมักแบบ fed-batch ร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่
2. เพื่อคัดเลือกและศึกษาการตกตะกอนของยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ (fodder yeast) จากกากน้ำตาล และน้ำกากส่า

ผลการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์

โครงการวิจัยนี้ได้ดำเนินการตามวัตถุประสงค์ และได้ผลตามวัตถุประสงค์ที่วางไว้ทั้ง 2 ประการ

กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ได้ดำเนินการมา

กิจกรรม	เดือน 1-6	เดือน 7-12
1. ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการหมักเอธานอล - ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอธานอลของ <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ตกตะกอน ในกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง - ศึกษาลักษณะตะกอนยีสต์ในระหว่างการหมักเอธานอล ในกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง		
2. ยีสต์ตกตะกอนสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ 2.1 เมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรท - คัดเลือก <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ที่มีโปรตีนในเซลล์สูงสุด และให้ cell mass สูงสุด เมื่อทำการหมักแบบให้อากาศ ในกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง - ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ โดยการหมักแบบให้อากาศ ในกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง - ศึกษาลักษณะตะกอนของยีสต์ในระหว่างการหมักแบบให้อากาศ ในกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง - ศึกษาการผลิตเซลล์ โดยการหมักแบบให้อากาศ ในกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง เมื่อเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> ร่วมกับ <i>C. utilis</i> / <i>C. tropicalis</i>		
2.2 เมื่อใช้น้ำกากส่าเป็นสับสเตรท - คัดเลือก <i>S. cerevisiae</i> สายพันธุ์ที่มีโปรตีนในเซลล์สูงสุด และให้ cell mass สูงสุด เมื่อทำการหมักแบบให้อากาศ ในน้ำกากส่า ที่อุณหภูมิสูง - ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ โดยการหมักแบบให้อากาศ ในน้ำกากส่าที่อุณหภูมิสูง - ศึกษาลักษณะตะกอนของยีสต์ในระหว่างการหมักแบบให้อากาศ ในน้ำกากส่า ที่อุณหภูมิสูง - ศึกษาการผลิตเซลล์ โดยการหมักแบบให้อากาศ ในน้ำกากส่า ที่อุณหภูมิสูง เมื่อเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> ร่วมกับ <i>C. utilis</i> หรือ <i>C. tropicalis</i>		
3. การคัดเลือกสารประกอบที่เหมาะสมสำหรับช่วยตกตะกอนเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์ - ทดสอบการช่วยการตกตะกอนในขณะที่ไม่เจือจาง - ทดสอบการช่วยการตกตะกอนในขณะเจือจาง		
4. การเขียนรายงาน		

←→ กิจกรรมที่วางแผนไว้

←→ กิจกรรมที่ได้ดำเนินการมาแล้ว

ผลที่คาดว่าจะได้รับเทียบกับผลที่ได้รับจริง

ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ผลที่ได้รับจริง
ได้สายพันธุ์ที่เหมาะสม และสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล	คัดเลือกได้ <i>S. cerevisiae</i> M30 เป็นสายพันธุ์ตกตะกอน ที่มีประสิทธิภาพสูง สำหรับการหมักเอทานอลจากอาหารกากน้ำตาล ที่อุณหภูมิสูง และได้สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล เมื่อหมักโดยการเขย่าเบา ๆ ในฟลาสก์ ที่อุณหภูมิสูง
ได้ข้อมูลลักษณะการตกตะกอนของสายพันธุ์สำหรับการผลิตเอทานอล จากกากน้ำตาลที่คัดเลือกได้	ได้ข้อมูลลักษณะการตกตะกอนของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ในระหว่างการหมักเอทานอล จากกากน้ำตาล เมื่อหมักโดยการเขย่าเบา ๆ ในฟลาสก์ ที่อุณหภูมิสูง
ได้สายพันธุ์และสภาวะที่เหมาะสมที่เหมาะสมสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์จากกากน้ำตาล	คัดเลือกได้ <i>S. cerevisiae</i> M30 เป็นการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ จากกากน้ำตาล และได้สภาวะที่เหมาะสมที่เหมาะสมสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ โดยการหมักอาหารกากน้ำตาล ด้วยการเขย่าแรง ในฟลาสก์ เพื่อให้อากาศ ที่อุณหภูมิสูง
ได้สายพันธุ์และสภาวะที่เหมาะสมที่เหมาะสมสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์จากน้ำกากส่า	คัดเลือกได้ <i>S. cerevisiae</i> M30 สำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ จากน้ำกากส่า และได้สภาวะที่เหมาะสมที่เหมาะสมสำหรับการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ โดยการหมักอาหารน้ำกากส่า ด้วยการเขย่าแรง ในฟลาสก์ เพื่อให้อากาศ ที่อุณหภูมิสูง
ได้ข้อมูลลักษณะการตกตะกอนของสายพันธุ์สำหรับการผลิตอาหารสัตว์จากกากน้ำตาล ที่คัดเลือกได้	ได้ข้อมูลลักษณะการตกตะกอนของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ในระหว่างการหมักอาหารกากน้ำตาล ด้วยการเขย่าแรง ในฟลาสก์ เพื่อให้อากาศ ที่อุณหภูมิสูง
ได้ข้อมูลลักษณะการตกตะกอนของสายพันธุ์สำหรับการผลิตอาหารสัตว์จากน้ำกากส่า ที่คัดเลือกได้	ได้ข้อมูลลักษณะการตกตะกอนของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ในระหว่างการหมักอาหารน้ำกากส่า ด้วยการเขย่าแรง ในฟลาสก์ เพื่อให้อากาศ ที่อุณหภูมิสูง
ได้ข้อมูลการเลี้ยงยีสต์อาหารสัตว์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ร่วมกับ <i>Candida utilis</i> / <i>C. tropicalis</i> ในกากน้ำตาล	ได้ข้อมูลว่าการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 เพื่อผลิตยีสต์อาหารสัตว์ ร่วมกับ <i>C. utilis</i> โดยการหมักอาหารกากน้ำตาล ด้วยการเขย่าแรง ในฟลาสก์ เพื่อให้อากาศ ที่อุณหภูมิสูง นั้น ไม่ทำให้การผลิตเซลล์เพิ่มขึ้น และยังทำให้การตกตะกอนน้อยลง
ได้ข้อมูลการเลี้ยงยีสต์อาหารสัตว์สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ร่วมกับ <i>C. utilis</i> / <i>C. tropicalis</i> ในน้ำกากส่า	ได้ข้อมูลว่าการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 เพื่อผลิตยีสต์อาหารสัตว์ ร่วมกับ <i>C. utilis</i> โดยการหมักอาหารน้ำกากส่า ด้วยการเขย่าแรง ในฟลาสก์ เพื่อให้อากาศ ที่อุณหภูมิสูง นั้นสามารถผลิตเซลล์ได้เพิ่มขึ้น แต่การตกตะกอนลดลง
ได้ข้อมูลของชนิดและวิธีการเติมสารช่วยตกตะกอนสำหรับยีสต์อาหารสัตว์	ได้ข้อมูลว่าไม่จำเป็นต้องเติมสารช่วยตกตะกอน สำหรับช่วยแยกเซลล์ในการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ เนื่องจากเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ตกตะกอนได้ดีมากอยู่แล้ว และการเติมสารอนินทรีย์ลงไปหลังจากการผลิตเซลล์แล้ว ไม่ได้ช่วยให้มีการตกตะกอนเซลล์ดีขึ้น