



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปรับปรุงการผลิตแอลกอฮอล์ของ โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา

โครงการย่อย 2 : การปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์โดย
เทคนิค fed-batch ร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้

Sub-project 2 : Improvement of ethanol fermentation efficiency by
fed-batch with cell recycle technique

โดย

ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สิงหาคม 2545

ร่างรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการย่อย 2 : การปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์โดย
เทคนิค fed-batch ร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้

คณะผู้วิจัย

1. ดร. วิเชียร ยงมานิตชัย

สังกัด

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โครงการ การปรับปรุงการผลิตแอลกอฮอล์
ของโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดา

สนับสนุนโดย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว.ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

บทสรุปผู้บริหาร.....	1
บทคัดย่อ.....	4
Abstract.....	6
เหตุผลและความสำคัญของโครงการ	9
รายงานผลงานที่มีผู้ทำมาแล้ว (Literature Review).....	9
แนวคิดของงานวิจัย (Research Concept/Design/Invention).....	11
วัตถุประสงค์.....	12
อุปกรณ์และวิธีการ	12
1. การเตรียมกล้าเชื้อ	12
2. การหมักในเฟอร์เมนเตอร์	12
3. การปรับปรุงการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลโดยเทคนิค fed-batch ร่วมกับ cell recycle	13
4. การผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์โดยระบบ air-lift fermentor ร่วมกับเทคนิค fed-batch....	14
4.1 การผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์โดยระบบ air-lift fermentor ร่วมกับเทคนิค fed- batch และ repeated fed-batch ในระดับห้องปฏิบัติการ	14
4.2 การผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์โดยระบบ air-lift fermentor ร่วมกับเทคนิค fed- batch และ repeated fed-batch ในระดับกึ่งโรงงาน	16
5. การวิเคราะห์ข้อมูลการหมัก.....	16
5.1 การวิเคราะห์การเจริญ	16
5.2 การวิเคราะห์โปรตีน.....	16
5.3 การวิเคราะห์น้ำตาล	16
5.4 การวิเคราะห์แอลกอฮอล์.....	18
ผลการทดลอง	19
1. การหมักแอลกอฮอล์แบบ batch ในถังหมักขนาด 5 ลิตร	19
2. การหมักแอลกอฮอล์แบบ Fed-batch ในห้องปฏิบัติการด้วยถังหมักขนาด 5 ลิตร	26
2.1 Fed-batch แบบเติมครั้งเดียว (Single feed fed-batch).....	26
2.2 Fed-batch แบบเติมสองครั้ง (Double feed fed-batch)	30
2.3 Fed-batch แบบเติมสามครั้ง (Triple feed fed-batch).....	34
2.4 การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเทคนิค repeated batch ในระดับ ห้องปฏิบัติการ	38

2.5 การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเทคนิค double stage ร่วมกับ repeated fed-batch ในระดับห้องปฏิบัติการ	41
2.6 การหมักแอลกอฮอล์แบบ batch และ fed-batch ในถังหมักระดับกึ่งโรงงาน ขนาดความจุ 100 ลิตร.....	48
3. การผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์โดยระบบ air-lift fermentor ร่วมกับเทคนิค fed-batch....	52
3.1 การพัฒนาถังหมัก air-lift ต้นแบบในระดับห้องปฏิบัติการ	52
3.2 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของถังหมัก air-lift ต้นแบบ.....	52
3.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์โดยระบบ air-lift fermentor	57
3.4 การผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์โดยระบบ air-lift fermentor ร่วมกับเทคนิค repeated fed-batch ในระดับกึ่งโรงงาน.....	112
เอกสารอ้างอิง	114
ภาคผนวก.....	116
แบบสรุปโครงการวิจัยฝ่ายอุตสาหกรรม (ฝ่าย 5).....	117
กิจกรรมที่วางแผนไว้และกิจกรรมที่ได้ดำเนินการมา	119
ผลที่คาดว่าจะได้รับกับผลที่ได้รับจริง	120
รายงานสรุปการเงินในรอบ 12 เดือน.....	121

บทสรุปผู้บริหาร

หลักการที่สำคัญเพื่อการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอธิลแอลกอฮอล์ คือการลดระยะเวลาการผลิตเอธิลแอลกอฮอล์ สามารถกระทำได้ด้วยการ (1) ลดระยะเวลาในการหมัก หรือ (2) เพิ่มความเข้มข้นของเอธิลแอลกอฮอล์ในน้ำส้ม ในกรณีที่ (1) อาจทำได้โดยการให้เทคนิคการหมักต่าง ๆ เช่น การหมักแบบต่อเนื่อง การหมักแบบ fed-batch และ การหมักแบบ repeated batch ส่วนในกรณีที่ (2) ทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำสัระหว่างหมักจะค่อนข้างสูง (สูงกว่า 35 องศาเซลเซียส) เนื่องจากความร้อนจากสภาพอากาศ และความร้อนที่เกิดจากเมแทบอลิซึมของยีสต์

โดยที่เทคนิค fed-batch จะมีความเหมาะสมต่อระบบการผลิตเอธิลแอลกอฮอล์ในประเทศไทย มากกว่าระบบการหมักต่อเนื่อง แต่เทคนิคนี้ก็ยังต้องมีการเตรียมกล้าเชื้อในการหมักแต่ละครั้งซึ่งทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายที่เป็นต้นทุนการผลิต ดังนั้นการใช้เทคนิค repeated fed-batch ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ตกตะกอน จะสามารถลดระยะเวลาในการหมักแต่ละรอบ และมีความเสถียรค่อนข้างสูง โดยที่ยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* Sc90 ที่ใช้ในโรงงานสุราทุกแห่งของประเทศไทยขาดคุณสมบัติทางด้านการตกตะกอน จึงได้มีการคัดเลือกยีสต์

สายพันธุ์ใหม่ ได้แก่ *S. cerevisiae* M30 ที่มีลักษณะเด่น คือตกตะกอนเร็วในช่วงท้ายการหมัก ทนอุณหภูมิและแอลกอฮอล์ได้ค่อนข้างสูง มาใช้ทดแทน Sc90 เนื่องจากแอลกอฮอล์ที่ได้จะนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงจึงไม่ต้องเกรงเรื่องกลิ่น-รส

จากการศึกษาการผลของอุณหภูมิสูงของ M30 ต่อการหมักแอลกอฮอล์แบบ batch ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า M30 สามารถหมักแอลกอฮอล์ที่ 35 องศาเซลเซียส ได้สูงถึง 8.91% โดยปริมาตร ภายใน 36 ชั่วโมง และยังคงความสามารถในการตกตะกอนได้ดี (S.E. = 0.33) และเมื่อทำการหมักแบบ fed-batch พบว่าสามารถลดระยะเวลาการหมักลงเหลือ 24-36 ชั่วโมงต่อรุ่น โดยจำนวนครั้งของการเติมอาหาร (1 หรือ 2 หรือ 3 ครั้ง) ไม่มีผลต่อระยะเวลาการหมัก และ S.E. มีค่าสูงกว่า 0.45 ในทุกการทดลอง

เมื่อนำ M30 ไปทดลองหมักแอลกอฮอล์ในถังขนาดใหญ่ระดับกึ่งโรงงาน (ความจุ 100 ลิตร) ทั้งระบบ batch และ fed-batch ที่ 35 องศาเซลเซียส ก็ได้ผลใกล้เคียงกับการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ คือในการหมักแบบ batch ต้องใช้เวลา 42 ชั่วโมงได้แอลกอฮอล์ 8.38 % โดยปริมาตร แต่เมื่อหมักแบบ fed-batch จะได้แอลกอฮอล์ 8.24 % โดยปริมาตร ภายใน 32 ชั่วโมง โดยที่ความสามารถในการตกตะกอนยังคงเดิมที่ค่า SE = 0.33

จากข้อมูลที่ได้เมื่อนำมาปรับใช้เป็นระบบ repeated fed-batch พบว่าการหมักในรอบแรกค่อนข้างช้า (ต้องใช้ระยะเวลาในการหมัก 36 ชั่วโมง) และปริมาณแอลกอฮอล์ค่อนข้างต่ำ (6.49 % โดยปริมาตร) แต่ตั้งแต่รอบที่ 2 เป็นต้นไป ระยะเวลาการหมักลดลงเหลือ 24 ชั่วโมง ให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด (9.36 % โดยปริมาตร ใน repeat batch 1 และค่อย ๆ ลดลงมาจนถึง 7.13 % โดย

ปริมาตร ใน repeat batch 5) ทั้งนี้เนื่องจากการสะสมของเซลล์ยีสต์เพิ่มมากขึ้น โดยที่จากค่าความขุ่น (OD) ของเซลล์เริ่มต้นในรอบแรกที่มีค่า 0.63 เพิ่มสูงเป็น 8.06, 11.51, 6.81, 9.61 และ 11.41 ในรอบต่อ ๆ มา ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นสูงสุดของแอลกอฮอล์ที่ได้จะลดลงเป็นลำดับ ซึ่งน่าจะเป็นอิทธิพลของอุณหภูมิ ความเข้มข้นของเอริธแอลกอฮอล์ และการสะสมของสารพิษที่มาจากกากน้ำตาล ดังนั้นในการทดลองต่อมาได้นำเทคนิค double stage fed-batch fermentation มาใช้นั้น คือหลังจากหมักไปได้ 12 ชั่วโมงจึงเริ่มทำ repeat batch โดยการปล่อยให้เซลล์ตกตะกอน 10 นาที แล้วแยกน้ำสาหร่ายด้านบนออก ให้เหลือน้ำสาหร่ายบริเวณก้นถึง 600 มล. แล้วเติมอาหารกากน้ำตาลชุดใหม่ลงไป น้ำสาหร่ายที่แยกออกมานำไปหมักต่ออีก 24 ชั่วโมง พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ในรอบที่ทำ repeat batch ค่อนข้างคงที่อยู่ในระดับสูงกว่า 8 % โดยปริมาตร เมื่อชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก

ดังนั้นโดยสรุป M30 จะมีศักยภาพสูงในการนำไปใช้ในการหมักเอริธแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิง โดยใช้เทคนิค repeated fed-batch ที่สามารถผลิตแอลกอฮอล์ต่อรุ่นได้ภายใน 12 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็นประสิทธิภาพในการผลิตเท่ากับ $8.0 \text{ (ค่าเฉลี่ยแอลกอฮอล์สูงสุดที่ได้)} \times 0.79 \text{ (ความหนาแน่น)} \times 0.8 \text{ (ปริมาณอาหารต่อรุ่น)} \times 14 \text{ (จำนวนรอบต่อสัปดาห์)} = 70.78 \text{ กรัม/ลิตร/สัปดาห์}$ เทียบกับโรงงานแอลกอฮอล์โครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดาที่ได้เดิมทำได้ $(10 \times 0.79 \times 1) = 7.9 \text{ กรัม/ลิตร/สัปดาห์}$

ทางด้านการผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ ที่ต้องทำการหมักในระบบให้อากาศ แต่ด้วยสถานะและข้อจำกัดของประเทศไทย การใช้ถังหมักระบบกวนด้วยใบพัดจะแพงและสิ้นเปลืองพลังงานมาก ถึงหมักแบบ air-lift จึงเป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเซลล์ยีสต์เพื่อใช้ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ขนาดกลางและเล็ก และเช่นเดียวกับการหมักเอริธแอลกอฮอล์ เทคนิค repeated fed-batch ก็จะช่วยร่นระยะเวลาการหมักให้สั้นลง นอกจากนี้การใช้ยีสต์ตกตะกอนจะเป็นตัวแปรที่สำคัญอย่างยิ่งเพราะนอกจากสามารถแก้ปัญหาเรื่องการเตรียมกล้าเชื้อแล้ว ยังลดปัญหาเรื่องการเก็บเกี่ยวเซลล์ที่แต่เดิมต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพงอีกด้วย

ถึงหมักแบบ air-lift อาศัยฟองอากาศที่พ่นเข้าไปบริเวณก้นถังลอยตัวขึ้นด้านบนแล้วทำให้น้ำหมักเกิดการเคลื่อนไหว ส่วนของ draught tube ทำหน้าที่บังคับทิศทางการเคลื่อนที่ของของเหลวให้ขึ้น-ลงในแนวดิ่ง ในการศึกษาถึงหมักแบบที่พัฒนาขึ้นนั้น ใช้โหลแก้วทรงกระบอกขนาด 33 x 15 ซม. ความจุ 5 ลิตร ส่วน draught tube ทำจากท่อพลาสติก PVC ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 9 ซม. สูง 12 ซม. ด้านล่างสุดของท่ออยู่ห่างจากพื้นถึง 2.5 ซม. บริเวณก้นถังตรงมุมพอกด้วยดินน้ำมันเป็นแนวโค้ง (เพื่อป้องกันการสะสมตะกอนเซลล์) ระบบฟุ้งอากาศประกอบด้วยท่ออ่อนพ่นอากาศขดซ้อนเป็นแผ่นกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ซม.

ในการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อระบบการหมักแบบ air-lift พบว่า ปริมาณอากาศที่เหมาะสม คือ 0.75 vvm ระดับความเข้มข้นของสารอาหารที่เหมาะสมประกอบด้วยน้ำตาล 4%

ยูเรีย 0.1% และ KH_2PO_4 0.05% โดยใช้ pH เริ่มต้น 4.5 ซึ่งหลังจากเพาะเลี้ยงได้ 36 ชั่วโมง จะได้ เซลล์ยีสต์ 17.52 กรัม/ลิตร แต่ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (total protein) ต่ำมาก คือ 3.28 กรัม/ลิตร ซึ่ง เมื่อคิดเป็นโปรตีนในเซลล์ (protein content) อยู่ที่ระดับเพียง 18.7 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ดังนั้นใน การทดลองต่อมาได้ศึกษาการเพิ่มยูเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าไม่สามารถให้ยูเรียได้สูงกว่า 0.1% ในระยะแรก (อาจจะเป็นผลมาจากความเป็นพิษของแอมโมเนียที่ได้มาจากการแตกตัวของยูเรีย) จึง ทำการเติมยูเรียเป็นระยะ (incremental feeding) ในอัตรา 0.3% แบ่งใส่ตามสัดส่วนและระยะเวลา ที่ 12 24 และ 36 ชั่วโมง พบว่ามีผลในเชิงลบต่อการเจริญของ M30 คือได้เซลล์ลดลงจาก 17.99 กรัม/ ลิตร ในชุดควบคุม เหลือเพียง 12.93 11.80 และ 13.39 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ปริมาณ โปรตีนทั้งหมดลดลงด้วย จึงได้เปลี่ยนวิธีการเติมใหม่ โดยลดปริมาณยูเรียที่เติม และเปรียบเทียบการ ใช้แอมโมเนียมซัลเฟตแทนยูเรียด้วย พบว่าเมื่อเติมยูเรียในอัตรา 0.1% ในชั่วโมงที่ 12 และอีก 0.1% ในชั่วโมงที่ 24 สามารถเพิ่มปริมาณโปรตีนในเซลล์ได้สูงขึ้นเป็น 45% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง แต่จาก ผลที่ใช้น้ำตาลเริ่มต้นค่อนข้างต่ำทำให้ได้เซลล์เพียง 17.99 กรัม/ลิตร จึงได้ทดลองเพิ่มปริมาณน้ำตาล เริ่มต้นในอาหารอีก พบว่าการเพิ่มน้ำตาลตั้งแต่เริ่มต้นสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้เพียงเล็กน้อย แต่มี การสะสมของแอลกอฮอล์และมีน้ำตาลเหลือมากขึ้น ดังนั้นจึงได้เปลี่ยนวิธีการให้น้ำตาลเป็นระยะ เวลาและปริมาณต่างๆ พร้อมกับเติมแหล่งไนโตรเจนด้วย พบว่าการให้น้ำตาลอีก 2 ครั้ง ๆ ละ 4% ใน ชั่วโมงที่ 12 และ 24 ร่วมกับการให้ยูเรียในอัตราครั้งละ 0.1% สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุดได้เป็น 25.86 กรัม/ลิตร แต่จะมีการสะสมของแอลกอฮอล์สูงถึง 20.6 กรัม/ลิตร ซึ่งแสดงว่าการเติมน้ำตาลยังไม่ สัมพันธ์กับการเจริญ ดังนั้นจึงได้วางแผนทดลองเปรียบเทียบรูปแบบการให้น้ำตาลใหม่ 3 แบบ คือ การเติมอัตราคงที่ (linear feeding) การเติมอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียล (exponential feeding) และ การ เติบโตตามอัตราการเจริญ (sigmoidal feeding) โดยเพิ่มจำนวนการเติมให้มากขึ้น (ทุก 2 ชั่วโมงหลัง จากชั่วโมงที่ 14) ปรากฏว่า M30 มีอัตราการเจริญได้ใกล้เคียงกันทั้ง 3 แบบ โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุด 32.26 32.66 และ 33.91 กรัม/ลิตร ตามลำดับ และได้ผลผลิตโปรตีนทั้งหมด 16.22 16.05 และ 16.98 กรัม/ลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อดำเนินเป็นปริมาณโปรตีนในเซลล์ได้ 50.3 49.1 และ 50.1% ของ น้ำหนักเซลล์แห้ง ตามลำดับ

สำหรับการทดลองผลิตเซลล์ยีสต์ด้วยถังหมักระบบ air-lift ขนาดกึ่งโรงงาน ความจุ 100 ลิตร ใช้ถังหมักที่ประกอบจากถังพลาสติกสำหรับการบรรจุเคมีภัณฑ์ที่ใช้แล้ว นำมาดัดแปลงใส่ท่อ draught tube ที่ทำจาก fiber glass ในสัดส่วนที่ใกล้เคียงกับถังหมัก air-lift ในห้องปฏิบัติการ พบว่า สามารถผลิตเซลล์ยีสต์ที่มีโปรตีนในเซลล์สูง และผลิตโปรตีนทั้งหมดได้ใกล้เคียงกับที่ได้ในห้องปฏิบัติ การภาย เมื่อใช้เวลามาก 34 ชั่วโมง คือให้เซลล์ 30.58 กรัม/ลิตร และในรุ่นที่ 2 ใช้เวลาเพียง 12 ชั่วโมง ให้เซลล์ปริมาณสูงถึง 26.59 กรัม/ลิตร และปริมาณโปรตีนทั้งหมด 13.83 กรัม/ลิตร โดยมีโปรตีน ในเซลล์ 1 เซลล์ 50.1 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง

บทคัดย่อ

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

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

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

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

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

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

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

Abstract

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

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

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

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

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

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

เหตุผลและความสำคัญของโครงการ

การใช้แอลกอฮอล์เป็นส่วนผสมในน้ำมันเชื้อเพลิงเป็นส่วนหนึ่งที่จะลดการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิง ซึ่งจะเป็นการสงวนเงินตราต่างประเทศทางหนึ่ง ประเทศไทยมีผลผลิตทางเกษตรกรรมที่มีราคาถูกเป็นจำนวนมากจนทำให้ราคาพืชผลตกต่ำเป็นปัญหาสำคัญระดับชาติที่ทุกรัฐบาลให้ความสนใจและพยายามดำเนินการแก้ไขด้านนโยบายและมาตรการต่างๆ ตลอดมา การหมักแอลกอฮอล์ที่ใช้น้ำมันล้าปะหลังหรือกากน้ำตาล (หรือการหมักจากน้ำอ้อยโดยตรง) เป็นวัตถุดิบเป็นกระบวนการที่มีการดำเนินมาอย่างต่อเนื่อง ทั้งในรูปงานวิจัยและการผลิตทางอุตสาหกรรม แต่ด้วยโครงสร้างภาษีสรรพสามิตที่สูงมากการนำแอลกอฮอล์มาใช้เป็นเชื้อเพลิงจึงไม่อาจเป็นไปได้ แต่จากวิกฤตการณ์ทางด้านราคาน้ำมันที่ผ่านมาโครงการเอธานอลแห่งชาติเริ่มได้รับความสนใจจากทุกวงการทั้งภาครัฐ เอกชน และหน่วยงานการศึกษา โครงการนำร่องต่างๆ ทะยอยออกมาเป็นระยะ เพื่อให้เกิดผลทางปฏิบัติอย่างจริงจัง โดยเฉพาะอย่างยิ่งโครงการส่วนพระองค์ที่สวนจิตรลดา พระราชวังดุสิต ได้รับการสนับสนุนจากภาคเอกชนทางด้านเทคโนโลยีและอุปกรณ์ เพื่อให้เกิดแอลกอฮอล์สำหรับใช้ผสมในน้ำมันสำหรับเติมรถยนต์หลวงได้ดำเนินมาอย่างเป็นรูปธรรม อีกด้านหนึ่งภาคเอกชนนำโดยการปิโตรเลียมแห่งประเทศไทยได้เปิดให้บริการแก๊สโซฮอล์ขึ้นเพื่อทดลองในเชิงธุรกิจ ตามด้วยน้ำมันบางจาก ทำให้โครงการผสมแอลกอฮอล์ในน้ำมันเชื้อเพลิงมีความเป็นไปได้ในเชิงธุรกิจอย่างชัดเจน ความต้องการแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นแหล่งเชื้อเพลิงทดแทน (บางส่วน) จึงมีแนวโน้มที่สดใสขึ้น

นอกจากนี้การใช้ยีสต์ที่เหลือจากการหมักแอลกอฮอล์ผสมในอาหารสัตว์บางส่วนเพื่อทดแทนปลาป่นและกากถั่วเหลือง เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะเพิ่มมูลค่าให้กับการผลิตแอลกอฮอล์เชื้อเพลิง เพราะยีสต์นอกจากจะมีปริมาณโปรตีนสูงแล้วยังมีวิตามินบีรวมในสัดส่วนที่สูงมาก ซึ่งน่าจะเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของอาหารสัตว์ให้สูงขึ้น

รายงานผลงานที่มีผู้ทำมาแล้ว (Literature Review)

จากการที่มีความต้องการแอลกอฮอล์ เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงและวัตถุดิบทางอุตสาหกรรมอื่นๆ ประกอบกับเทคโนโลยีการหมักแอลกอฮอล์ได้มีการพัฒนามาอย่างต่อเนื่องเพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุดแลพให้ได้ต้นทุนการผลิตต่ำที่สุด ปัจจุบันนี้ได้มีบริษัทหลายแห่ง เช่น Open Models Inc. (Canada), Technical Consultants, Inc. (Oregon, USA), Asian and Pacific Centre for Transfer of Technology (India) เป็นต้น ให้บริการปรึกษาในลักษณะการถ่ายทอดเทคโนโลยี และ turn-key project ในการผลิตแอลกอฮอล์ทั้งระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ และอุตสาหกรรมขนาดเล็กที่มีกำลังการผลิตแอลกอฮอล์ประมาณ 1,000 – 30,000 ลิตรต่อวัน

การเพิ่มประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์ด้วยการใช้เทคนิคต่างๆ ในกระบวนการหมัก เช่น การหมักแบบต่อเนื่อง (Tyagi and Ghose, 1980) (continuous fermentation) การหมักแบบต่อเนื่อง

ร่วมกับการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ (continuous fermentation with cell recycle) (Kuriyama *et al*, 1980; Kuriyama *et al*, 1985; Limtong *et al*, 1984) การตรึงเซลล์ (yeast cell immobilization) (Tyagi and Ghose 1982) การหมักแบบ fed-batch (Koshimizu *et al*, 1984; 62, del Rosario *et al*, 1979) และ การหมักแบบ repeated-batch (Nishihara *et al*, 1976) โดยที่เทคนิค fed-batch ที่มีการเติม(กาก)น้ำตาลเป็นระยะๆได้การนิยมนำไปปฏิบัติในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์มากที่สุด เนื่องจากสามารถลดผลของความเข้มข้นน้ำตาลในการยับยั้งการเจริญของยีสต์ เพราะโดยปกติแล้ว การหมักแอลกอฮอล์จะใช้น้ำตาลค่อนข้างสูงที่ความเข้มข้นเริ่มต้นประมาณ 20% ที่อาจมีผลทางด้านลบต่อการเจริญของยีสต์ นอกจากนี้ในการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ อาจเพิ่มโอกาสการยับยั้งโดยอินทรีย์สาร เช่นเกลือต่างๆ ด้วย

อย่างไรก็ตาม เทคนิคการหมัก fed-batch เพียงอย่างเดียวยังต้องมีการเตรียมกล้าเชื้อในการหมักแต่ละครั้งซึ่งทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายที่เป็นต้นทุนการผลิตส่วนหนึ่ง Savitree และคณะ ได้ศึกษาการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเทคนิค repeated fed-batch ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ AM12 ที่ได้จากการผสมพันธุ์ด้วยเทคนิค protoplast fusion ระหว่าง TJ1 กับ N1 (Seki *et al*, 1983) โดยการนำเซลล์ยีสต์ที่มีลักษณะการตกตะกอนเมื่อน้ำสาามีปริมาณแอลกอฮอล์สูง (ในช่วงท้ายของการหมัก) กลับมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักครั้งต่อไป โดยสามารถดำเนินการหมักได้มากกว่า 10 รอบ โดยในรอบที่ 1 ใช้ระยะเวลาในการหมักประมาณ 24 ชม. แต่ในรอบที่ 2-5 ใช้เวลาเพียง 12 ชม. โดยในแต่ละรอบจะได้แอลกอฮอล์สูงที่สุดมากกว่า 80 g/l ซึ่งแสดงว่าระบบการหมักด้วยเทคนิคนี้มีความเสถียรค่อนข้างสูง และน่าจะสามารถนำไปใช้ในทางปฏิบัติได้

เนื่องจากไทยประเทศเกษตรกรรมจึงมีวัตถุดิบ (แหล่งคาร์บอน) ที่สามารถนำมาใช้ในการผลิตแอลกอฮอล์มากมาย ซึ่งอาจแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มหลักคือ

1. วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด ปลายข้าว
2. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย และผลิตภัณฑ์จากอ้อย ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น

สำหรับวัตถุดิบประเภทแรกจะมีจุดอ่อนตรงที่ต้องทำการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลเสียก่อน แล้วจึงทำการหมักแอลกอฮอล์ อันเป็นการเพิ่มขึ้นขั้นตอนการผลิตและต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น แต่มีข้อดีคือ วัตถุดิบมีราคาถูกกว่า จากการประเมินของ Shleser (1994) ที่ศึกษาความคุ้มค่าของวัตถุดิบที่อาจนำมาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงแอลกอฮอล์ในรัฐฮาวาย โดยเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตจาก ชานอ้อย กากน้ำตาล ต้นอ้อย ใบและยอดอ้อย หญ้าเนเปียร์ ข้าวฟ่างหวาน พบว่า กากน้ำตาลมีต้นทุนการผลิตแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ต่ำที่สุด คือ \$1.01 ต่อแกลลอน หรือประมาณ 12.85 บาทต่อลิตร (โดยที่ต้นทุนจาก กากน้ำตาลคิดเป็น 22.5 บาทต่อแอลกอฮอล์ 1 แกลลอน) ในขณะที่ถ้าใช้ต้น(น้ำ)อ้อยจะมีต้นทุนการผลิต \$1.48 ต่อแกลลอน หรือประมาณ 19.03 บาทต่อลิตร

แนวคิดของงานวิจัย (Research Concept/Design/Invention)

ในอดีตกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ในประเทศไทยพัฒนามาเพื่อการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น สุราขาว และสุราสี ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่าสูง เมื่อเทียบกับต้นทุนการผลิต ประกอบกับกลิ่น-รสของสุราส่วนหนึ่งมาจากยีสต์ที่ใช้ในการหมัก โรงงานสุราทุกแห่งในประเทศ จึงใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* Sc. 90 ในการหมักแอลกอฮอล์ทั้งสิ้น และโดยภาพรวมแล้วยีสต์สายพันธุ์นี้มีประสิทธิภาพในการหมักแอลกอฮอล์ได้ในระดับที่น่าพอใจ การที่จะนำยีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่ดีถึงแม้ว่าจะมีประสิทธิภาพสูงกว่าในการหมักก็ไม่ได้ได้รับการยอมรับจากผู้ผลิตสุรา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ได้มีการวิจัยการหมักแอลกอฮอล์มาอย่างต่อเนื่อง ทั้งทางด้านการคัดเลือกและสร้างสายพันธุ์ยีสต์ใหม่ ให้มีความสามารถในการหมักแอลกอฮอล์ได้สูงขึ้น สามารถตกตะกอนได้ดีในช่วงท้ายของการหมัก (Limtong *et al.*, 1987) และทางด้านการปรับปรุงเทคนิคการหมักแบบ fed-batch ในระดับโรงงาน (วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์) แต่ก็ไม่ได้มีการนำไปใช้ในทางปฏิบัติเนื่องจากเหตุผลหลักข้างต้น อย่างไรก็ตามจากปัญหาของราคาน้ำมันเชื้อเพลิงที่อ่อนไหวจากการเมืองระหว่างประเทศ และน้ำมันมีแต่ราคาจะสูงขึ้น จึงได้มีความตื่นตัวในการที่จะหาพลังงานทดแทนในรูปของเชื้อเพลิงชีวภาพ (bio-fuel) โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับรถยนต์ด้วยแอลกอฮอล์ในสัดส่วนประมาณ 10% สามารถกระทำได้โดยไม่ลดสมรรถนะของเครื่องยนต์ลดลง ซึ่งถึงแม้ว่าราคาของแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักโดยยีสต์จะมีต้นทุนที่ใกล้เคียงกับราคาน้ำมันในปัจจุบัน แต่ก็ยังเป็นแนวทางหนึ่งในการลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศ และเป็นการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่จะมีผลกระทบโดยตรงต่อเกษตรกร

การผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงจึงคำนึงถึงต้นทุนการผลิตเป็นสำคัญในรูปของพลังงานที่ได้กลับคืนมา โดยไม่ต้องสนใจกับกลิ่น-รสจากสารประกอบรอง และปัจจัยหลักที่มีผลกระทบโดยตรงต่อประสิทธิภาพการผลิตคือ ยีสต์ที่สามารถหมักแอลกอฮอล์ได้สูง นอกจากนี้ผลพลอยได้ของการจากการหมักแอลกอฮอล์คือเซลล์ยีสต์ที่มีคุณค่าทางอาหารสูงในรูปของโปรตีนและวิตามิน บี สามารถนำไปใช้ทดแทนปลาป่นและกากถั่วเหลืองได้ระดับหนึ่ง แต่การเก็บเกี่ยวเซลล์ยีสต์ที่ใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ปัจจุบัน *Saccharomyces cerevisiae* กระทำได้ยากและมีค่าใช้จ่ายที่สูง เนื่องจากยีสต์สายพันธุ์นี้เจริญเป็นเซลล์เดี่ยวในน้ำสา การแยกเซลล์ยีสต์จึงต้องใช้เครื่องมือราคาแพง เช่น continuous centrifuge แนวความคิดในการนำยีสต์สายพันธุ์ที่ได้มีการวิจัยมาแล้วว่าสามารถผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงในกากน้ำตาล และสามารถตกตะกอนในช่วงท้ายของการหมัก จึงน่าจะเหมาะสมในการหมักแอลกอฮอล์เชื้อเพลิง เพราะเซลล์ยีสต์ที่ตกตะกอนนี้สามารถแยกออกจากน้ำสาได้ง่ายขึ้น โดยอาจใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า cyclone separator ก็สามารถทำให้เซลล์เข้มข้นได้ระดับหนึ่ง และถ้าต้องการมวลเซลล์ที่มีความเข้มข้นน้อยลงก็สามารถนำไปกรองด้วยระบบ filter press ได้โดยง่าย

เซลล์ยีสต์ที่แยกได้มาจากน้ำสาอาจจะนำย้อนกลับไปใช้เป็นน้ำเชื้อเพื่อเริ่มการหมักรอบใหม่ได้ โดยจะต้องพิจารณาถึงสภาวะทางสรีระของเซลล์ว่ายังมีกิจกรรมต่างๆ สูงอยู่ หรืออาจจะพัฒนาวิธีการเก็บกักเซลล์ในถังหมักให้มีความเข้มข้นสูงขึ้น ซึ่งก็จะมีผลโดยตรงทำให้ระยะเวลาการหมักสั้นลง และทำได้นทุนการผลิตต่ำลง

วัตถุประสงค์

1. เพื่อปรับปรุงกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ด้วยเทคนิคการหมักแบบ fed-batch และ repeated fed-batch โดยใช้ยีสต์สายพันธุ์ตกตะกอน โดยมีเป้าหมายของปริมาณแอลกอฮอล์ในน้ำสา 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร
2. เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์ ด้วยเทคนิคการหมักแบบ fed-batch และ repeated fed-batch โดยใช้ air-lift fermentor

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมกล้าเชื้อ

- เชื้อที่ใช้คือ *Saccharomyces cerevisiae* M30
- เตรียมโดย ถ่ายเชื้อที่เลี้ยงในอาหารแข็งจากน้ำตาลที่มี fermentable sugar 2% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ที่ 30°C นาน 1 วัน ลงในอาหารเหลวจากน้ำตาลที่มี fermentable sugar 5% และ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.1% (ปริมาตร 100 มล. ในฟลาสก์ 250 มล.) บ่มบนเครื่องเขย่าแบบ rotary 150-200 rpm นาน 24 ชม.
- ปริมาณกล้าเชื้อที่ใช้อัตรา 5 %

2. การหมักในเฟอร์เมนเตอร์

- อาหารสำหรับหมัก คือ อาหารจากน้ำตาลที่ประกอบ fermentable sugar 18% และแอมโมเนียมซัลเฟต 0.05% ปรับ initial pH เป็น 4.5 ปริมาตร 3 ลิตร ในเฟอร์เมนเตอร์ 5 ลิตร (Microferm[®], New Brunswick, New Jersey, USA)
- บ่มโดยควบคุมอุณหภูมิตามที่กำหนด กวนที่ 200 rpm ไม่ควบคุม pH และไม่มีการเติมออกซิเจน
- ทำการเก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง และวิเคราะห์การเจริญโดยการวัดความขุ่น (optical density) ที่ 660 นาโนเมตร ตัวอย่างที่ส่วนหนึ่งเก็บโดยการแช่แข็งที่ -18°C สำหรับการวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวส์ กับปริมาณแอลกอฮอล์

3. การปรับปรุงการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลโดยเทคนิค fed-batch ร่วมกับ cell recycle

3.1 การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเทคนิค fed-batch ในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการหมักแอลกอฮอล์โดยสายพันธุ์ยีสต์ตกตะกอนที่ได้ผ่านการคัดเลือกแล้ว โดยเทคนิค fed-batch ตามวิธีการของ Limtong (1987) ดังนี้

- อาหารที่ใช้มีกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ โดยปริมาณน้ำตาลที่ใช้ทั้งหมดคิดเป็น 20% เสริมด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในอัตรา 0.05%
- ใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร (New Brunswick, USA) โดยใช้ปริมาตรเริ่มต้น 2 ลิตร (หรือปริมาตรอื่นตามรูปแบบการเติมอาหารต่าง) และปริมาตรสุดท้าย 3.0 ลิตร
- อาหารกากน้ำตาลส่วนที่เหลือแบ่งใส่ตามระยะเวลาและปริมาณที่กำหนด
- สภาพการหมักได้แก่ การกวนที่ความเร็วรอบ 200 รอบนาที ควบคุมอุณหภูมิตามแผนการทดลอง pH เริ่มต้น 4.5 (ไม่มีการควบคุม)
- เก็บตัวอย่างตลอดการหมัก 36-48 ชั่วโมง โดยเก็บทุก 4-6 ชั่วโมง และวิเคราะห์ cell mass หรือ OD ที่ 660 นาโนเมตร จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) ปริมาณน้ำตาล (sugar content) โดยเทคนิค HPLC หรือ Nelson Somogyi และปริมาณแอลกอฮอล์ โดยเทคนิค GC

3.2 การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเทคนิค repeated fed-batch ในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการหมักแอลกอฮอล์โดยสายพันธุ์ยีสต์ตกตะกอนที่ได้ผ่านการคัดเลือกแล้ว โดยเทคนิค repeated fed-batch ตามวิธีการของ Limtong (1987) ดังนี้

- อาหารและสภาวะการหมักเช่นเดียวกับข้อ 1.1
- การหมักรอบแรกใช้เทคนิค fed-batch เช่นเดียวกับข้อ 1.1
- หลังจากสิ้นสุดการหมัก (ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ประมาณ 10% โดยปริมาตร) หยุดการกวนและรอให้เซลล์ตกตะกอน ดูดน้ำส่วนบนออกประมาณ 80% ของปริมาตรทั้งหมด
- ทำการหมักแบบ fed-batch ในรอบที่ 2 โดยคิดปริมาตรทั้งหมดของอาหารใหม่เท่ากับส่วนที่เอากออกในรอบแรก และใช้กากน้ำตาลเพียง 80% ของรอบแรกเช่นกัน ในรอบนี้แบ่งใส่กากน้ำตาล 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนที่ 1 ปริมาณ 35% ใส่ตอนต้นของการหมัก ส่วนที่ 2 ปริมาณ 35% ใส่ในชั่วโมงที่ 4 และส่วนที่ 3 ปริมาณ 10% ใส่ในชั่วโมงที่ 8 ดำเนินการหมัก จนได้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ประมาณ 10% โดยปริมาตร หยุดการกวนและรอให้เซลล์ตกตะกอน ดูดน้ำส่วนบนออกประมาณ 80% ของปริมาตรทั้งหมด

- ทำการหมักในรอบต่อไปตามวิธีการในรอบที่ 2 จนกระทั่งจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตเริ่มลดลง หรือความเข้มข้นของแอลกอฮอล์เริ่มลดลงอย่างชัดเจน จึงสิ้นสุดการซ้ำ

3.3 การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเทคนิค *double stage* ร่วมกับ *repeated fed-batch* ในระดับห้องปฏิบัติการ

ทำการหมักแอลกอฮอล์โดยสายพันธุ์ยีสต์ตกตะกอนที่ได้ผ่านการคัดเลือกแล้ว โดยเทคนิค *double stage* ร่วมกับ *repeated fed-batch* เพื่อลดอิทธิพลของแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นสูงต่อการเจริญของยีสต์ โดยพิจารณาถึงระดับความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตกตะกอนได้ แต่ไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์ที่มีกิจกรรมสูง (เซลล์ที่มีการแตกหน่อ) ตามวิธีการ ดังนี้

- อาหารและสภาวะการหมักเช่นเดียวกับข้อ 1.1
- การหมักรอบแรกใช้เทคนิค *fed-batch* เช่นเดียวกับข้อ 1.1
- เก็บตัวอย่างตามระยะเวลาที่เหมาะสม และวิเคราะห์ปริมาณแอลกอฮอล์ ปริมาณน้ำตาล ลักษณะตะกอนเซลล์ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และจำนวนเซลล์ที่มีการแตกหน่อ
- เมื่อได้สภาวะที่เหมาะสม ปล่อยให้เซลล์ยีสต์ตกตะกอน (หยุดการกวน) ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสตอนบนไปยังถังหมักที่ 2
- ถังหมักที่ 1 ที่มีตะกอนเซลล์เริ่มเติมอาหารโดยเทคนิค *fed-batch*
- ถังหมักที่ 2 ดำเนินการหมักต่อเพื่อให้ได้แอลกอฮอล์สูงสุด

3.4 การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเทคนิค *repeated fed-batch* ในระดับ กังโรงงาน

3.4.1 การปรับปรุงอุปกรณ์และเครื่องมือการหมักแอลกอฮอล์ในโรงงานต้นแบบ

3.4.2 การทดสอบเทคนิคและกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ที่เหมาะสม

4. การผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์โดยระบบ *air-lift fermentor* ร่วมกับเทคนิค *fed-batch*

4.1 การผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์โดยระบบ *air-lift fermentor* ร่วมกับเทคนิค *fed-batch* และ *repeated fed-batch* ในระดับห้องปฏิบัติการ

การผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์จะใช้เทคนิคเช่นเดียวกับการหมักแอลกอฮอล์โดยการควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลให้ต่ำกว่า 1% เพื่อควบคุมให้การสังเคราะห์แอลกอฮอล์ให้น้อยที่สุด และปริมาณกากน้ำตาลที่เติมลงไปในระบบจะต้องสัมพันธ์กับปริมาณเซลล์ที่มีอยู่ในขณะนั้น ทั้งนี้ถังหมักจะใช้ระบบ *air-lift* ที่ทำหน้าที่ในการผสมเซลล์และอาหารให้เป็นเนื้อเดียวกันและในขณะเดียวกันก็ให้อากาศกับยีสต์ด้วย parameter ที่เป็นปัจจัยหลักคือ สัดส่วนของถังหมักกับ draught tube ปริมาตรอากาศที่เหมาะสม ขนาดของ air bubble

4.1.1 การพัฒนาระบบ air-lift

ระบบการหมักแบบ air-lift อาศัยฟองอากาศ (air bubble) ที่พ่นลงไปในถังหมักบริเวณภายในของ draught tube (Figure 1) ลอยตัวขึ้นแล้วทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อ (ของเหลว) เกิดการเคลื่อนไหวในแนวตั้ง ซึ่งมีผลทำให้เกิดการกวนและผสม ระบบนี้เหมาะอย่างยิ่งสำหรับการหมักแบบให้อากาศ (aerobic fermentation) เนื่องจากก๊าซออกซิเจนในฟองอากาศที่พ่นลงไปแล้วจะละลายเข้าไปในอาหารในเวลาเดียวกัน ทำให้พลังงานที่ใช้ในการหมักลดลงอย่างมาก (2-8 เท่าในอัตราการละลายของออกซิเจนที่เท่ากัน) เมื่อเทียบกับ continuous stirred tank reactor โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบการหมักเพื่อผลิตโปรตีนเซลล์เดียว (Sittig, 1983)

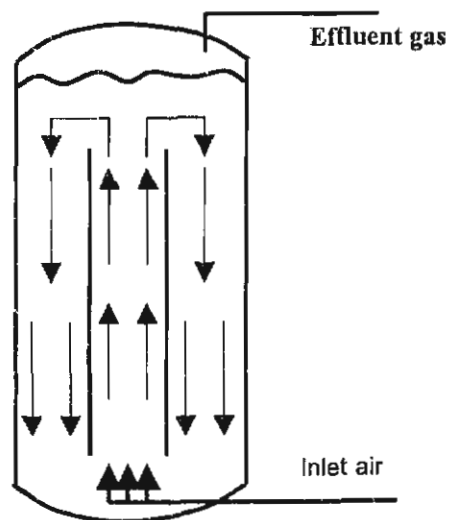


Figure 1 แสดงโครงสร้างของถังหมักระบบ air-lift

4.1.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักระบบ air-lift

- อัตราการให้อากาศ
- ปริมาณน้ำตาล
- ปริมาณและแหล่งไนโตรเจน
- ปริมาณฟอสเฟต
- การเติมน้ำตาลแบบ increment feeding
- อื่นๆ

4.2 การผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์โดยระบบ *air-lift fermentor* ร่วมกับเทคนิค *fed-batch* และ *repeated fed-batch* ในระดับกึ่งโรงงาน

นำข้อมูลที่ได้จากข้อ 4.1 มาออกแบบถังหมัก โดยใช้วัสดุที่หาง่ายในท้องถิ่น เช่น ปลูกซีเมนต์ (ท่อระบายน้ำ) หรือถังสแตนเลส (ถังเก็บน้ำ) มาใช้เป็นถังหมัก

5. การวิเคราะห์ข้อมูลการหมัก

5.1 การวิเคราะห์การเจริญ

- ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในหลอดเซนตริฟิวซ์ขนาด 16x100 มิลลิเมตร
- นำหลอดเข้าเครื่องเหวี่ยง
- บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- เทส่วนใสตอนบนทิ้ง
- ล้างเซลล์ด้วยกรดเกลือความเข้มข้น 0.1 N 10 มิลลิลิตร
- เขย่าด้วย vortex mixer ให้เซลล์กระจายเป็นซัสเพนชัน
- บั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- เทส่วนใสตอนบนทิ้ง
- เติมนormal saline solution ลงในหลอด 10 มิลลิลิตร
- เขย่าด้วย vortex mixer ให้เซลล์กระจายเป็นซัสเพนชัน
- นำเข้าเครื่องเหวี่ยงที่ความเร็วรอบเดิม
- ทำซ้ำตามข้อ 9 และ 10
- นำเซลล์ซัสเพนชันที่ได้ไปวัดความขุ่นด้วยเครื่อง spectrophotometer (Model 258,

Ciba Corning, Essex, England) ที่ช่วงคลื่น 660 นาโนเมตร

- นำค่า OD ที่อ่านได้ไปเทียบกับกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักระหว่าง OD

5.2 การวิเคราะห์โปรตีน

ตามวิธี Lowry *et al.* (1951)

5.3 การวิเคราะห์น้ำตาล

5.3.1 การหาน้ำตาลโดยวิธีของ Lane and Eynon ในน้ำสา

สารเคมี

- Fehling solution A (copper sulfate solution)
ละลาย CuSO_4 34.634 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยใช้

volumetric flask

- Fehling solution B (Alkaline tartrate solution)

ละลาย sodium potassium tartrate 173 กรัม และ NaOH 50 กรัม ในน้ำ 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยใช้ Volumetric flask

- HCl เข้มข้น หรือ HCl : H₂O เป็น 1:1
- NaOH 20%
- Methylene blue 1% (ในน้ำ)
- Invert sugar standard solution

ชั่ง sucrose ที่อบแห้งที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณ 0.5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งละเอียด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เติม HCl (1:1) 1 มิลลิลิตร แล้ว hydrolyze ที่ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วทำให้เป็นกลางหรือกรด เล็กน้อยด้วย NaOH 20% ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย volumetric flask

Standardization

- ดูด invert sugar standard solution มา 9 มิลลิลิตร เติม Fehling solution A และ Fehling solution B อย่างละ 5 มิลลิลิตร วางบน hot plate ให้เดือดเป็นเวลา 2 นาที ไตเตรตด้วย invert sugar standard solution จนได้เป็นสีน้ำตาล
- เติม methylene blue 1% 3-4 หยด ไตเตรตด้วย invert sugar standard solution จนสีฟ้าหมดไป และมีตะกอนแดงของ Cu₂O เกิดขึ้น

คำนวณหาค่า factor จากสมการ

$$\text{Factor} = \frac{360.312XY}{342.296(100)}$$

เมื่อ Y = titrant (ml)

X = น้ำหนัก sucrose เป็นกรัม (ทศนิยมสี่ตำแหน่ง)

การวิเคราะห์น้ำตาลในน้ำส้ม

- นำน้ำส้ม 2 มิลลิลิตร เติมกรดเกลือเข้มข้น 1 มิลลิลิตร
- ต้มในน้ำเดือด 10-15 นาที แล้วทำให้เย็น
- ปรับ pH เป็นกลางหรือกรดเล็กน้อยด้วย NaOH 20%
- ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย Volumetric flask
- เทใส่ flask ขนาด 250 มิลลิลิตร

- ดูดตัวอย่างมา 10 มิลลิลิตร แล้วเติม Felhing solution A และ Felhing solution B อย่างละ 5 มิลลิลิตร วางบน plate ให้เดือดเป็นเวลา 15 วินาที ไตเตรตด้วย invert sugar standard solution จนได้เป็นสีน้ำตาล

- เติม methylene blue 3-4 หยด ไตเตรตด้วย invert sugar standard solution จนสีฟ้าหมดไปและมีตะกอนแดงของ Cu_2O เกิดขึ้น จดปริมาตรที่ใช้ไปเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์น้ำตาลจากสมการ

$$\% \text{Total invert sugar} = \frac{\text{Factor} \times 100 \times 100}{\text{Vol sample (ml)} \times \text{Titre}}$$

5.3.2 การหาน้ำตาลโดยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC)

เครื่อง HPLC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) ประกอบด้วย Quaternary pump (Series 1100) พร้อมระบบ vacuum degasser (Series 1100), auto-injector (Series 1100), column oven (Series 1100) ควบคุมอุณหภูมิที่ 80°C , refractive index detector (Series 1100) และคำนวณปริมาณโดย software "HPLChemStation" สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์ ประกอบด้วย คอลัมน์ Shodex sugar column (SC1011, Showa Denko K.K., Tokyo, Japan) โดยมีน้ำเป็น mobile phase ที่อัตราการไหลคงที่ 1.0 มล./นาที

5.4 การวิเคราะห์แอลกอฮอล์

โดยเครื่อง gas chromatograph (GC- 9B, Shimadzu, Osaka, Japan) พร้อมเครื่องบันทึก (Chromatopac C-R3A, Shimadzu, Osaka, Japan) ด้วย glass column ขนาด 4 mm ID x 1 m บรรจุด้วย PEG 20 M on Shimalite ใช้ column temperature 70°C , injection temperature 120°C และ detector temperature 120°C มี FID เป็นเครื่องตรวจจับ การคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์ใช้เทคนิค internal standard ที่มี propanol 4% เป็นสารมาตรฐานภายใน

ผลการทดลอง

1. การหมักแอลกอฮอล์แบบ batch ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.1 อิทธิพลของอุณหภูมิ

สำหรับประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์ของ M30 ในเฟอร์เมนเตอร์ที่อุณหภูมิต่างโดยไม่มีการควบคุมปัจจัยการหมักอื่นนอกจากอุณหภูมิ พบว่าที่ 30 °C เชื้อ M30 หมักได้แอลกอฮอล์ 7.86 % โดยปริมาตร ที่ 42 ชั่วโมง (Table 1 และ Figure 2) ในขณะที่เมื่อหมักที่ 35 °C นั้น เชื้อ M30 หมักได้แอลกอฮอล์สูงกว่าและเร็วกว่าเมื่อหมักที่ 30 °C คือ ให้แอลกอฮอล์ 8.91 % โดยปริมาตร ที่ 36 ชั่วโมง (Table 2 และ Figure 3) อย่างไรก็ตามปริมาณเอทานอลที่ M30 สร้างได้ยังไม่ถึง 10 % โดยปริมาตร ทั้งนี้เนื่องมาจากน้ำตาลเริ่มต้นของการหมักอยู่ที่ 16.3 % เท่านั้น จึงคาดว่าถ้าน้ำตาลสูงถึง 18 % ปริมาณแอลกอฮอล์ที่สะสมจะต้องถึง 10 % โดยปริมาตร อย่างแน่นอน ในขณะที่การหมักที่ 37 °C ความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ลดลงอย่างชัดเจน นั่นคือที่ 30 ชั่วโมง M30 สร้างแอลกอฮอล์ได้สูงสุด 5.85 % โดยปริมาตร แต่การเจริญของเซลล์ยังคงเพิ่มได้อีกเล็กน้อยไปจนถึง 42 ชั่วโมงจึงได้เซลล์สูงสุดที่ OD₆₆₀ = 13.75 (Table 4 และ Figure 4) ซึ่งค่อนข้างจะผิดปกติเนื่องจากเมื่อเทียบกับที่ 30 °C และ 35 °C ที่ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดเพียง 8.63 และ 11.55 ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่าของ OD ที่ได้เกิดจากชิ้นส่วนของเซลล์ที่ตายไปทำให้สารแขวนลอยมีปริมาณมากขึ้น สำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ที่ 40 °C ยีสต์ M30 เกือบไม่สามารถสร้างแอลกอฮอล์ได้เลย เนื่องการเจริญก็หยุดชะงักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 (Table 6 และ Figure 5)

จากการวิเคราะห์การตกตะกอนของยีสต์เมื่อทำการหมักที่ 35 °C โดยการวัดความสูงของ sediment ที่เกิดจากการนำ culture broth มาใส่ใน cylinder ขนาด 25 มล. และตั้งทิ้งไว้จนมี sedimentation มีผลการทดลองดังแสดงใน (Table 3) พบว่าเริ่มเห็นและวัด sediment ได้ในน้ำสาที่ 18 ชั่วโมง และชัดเจนขึ้นที่ 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ความสูงของตะกอนที่ 24 ชั่วโมง มากกว่าที่ชั่วโมงอื่น ทั้ง ๆ ที่ปริมาณเซลล์ ในรูปของ OD ใกล้เคียงกัน เมื่อหมัก 18-42 ชั่วโมง นั้นน่าจะเนื่องมาจากที่เวลา 24 ชั่วโมง ขนาดของตะกอน (กลุ่มของเซลล์) มีขนาดเล็กกว่าที่ชั่วโมงอื่นๆ จึงทำให้ sedimentation เกิดขึ้นช้าและไม่ค่อยแน่น แต่เมื่อเวลานานขึ้นขนาดของตะกอน (กลุ่มของเซลล์) มีขนาดใหญ่ขึ้น จึงเกิด sedimentation ได้เร็วและแน่นขึ้น ความสูงของ sediment จึงลดลง ทั้งนี้ในการทดลองครั้งต่อไปจะตรวจ (วัด) ขนาดของตะกอน (กลุ่มของเซลล์) ที่เกิดขึ้นต่อไป สำหรับการตกตะกอนของเซลล์ยีสต์ M30 ที่ทำการหมักที่ 37 °C มีลักษณะคล้ายกับการหมักที่ 35 °C คือเริ่มเห็นตะกอนของตัวอย่างที่ 18 ชั่วโมงและชัดเจนขึ้นในตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง (Table 5) ส่วนที่ 40 °C ไม่สามารถตรวจสอบการตกตะกอนได้เนื่องจากยีสต์เกือบไม่มีการเจริญ (Figure 4)

Table 1 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 30°C and agitation speed at 250 rpm.

Time (h)	OD (660nm)	Reducing sugar (%)	Ethanol (%v/v)
0	2.13	16.35	0.06
6	0.10	15.50	0.11
12	2.63	15.10	0.41
18	4.38	14.03	1.68
24	5.58	13.39	3.71
30	6.43	2.18	6.07
36	8.38	1.10	7.61
42	8.63	0.52	7.86
48	8.50	0.65	7.72

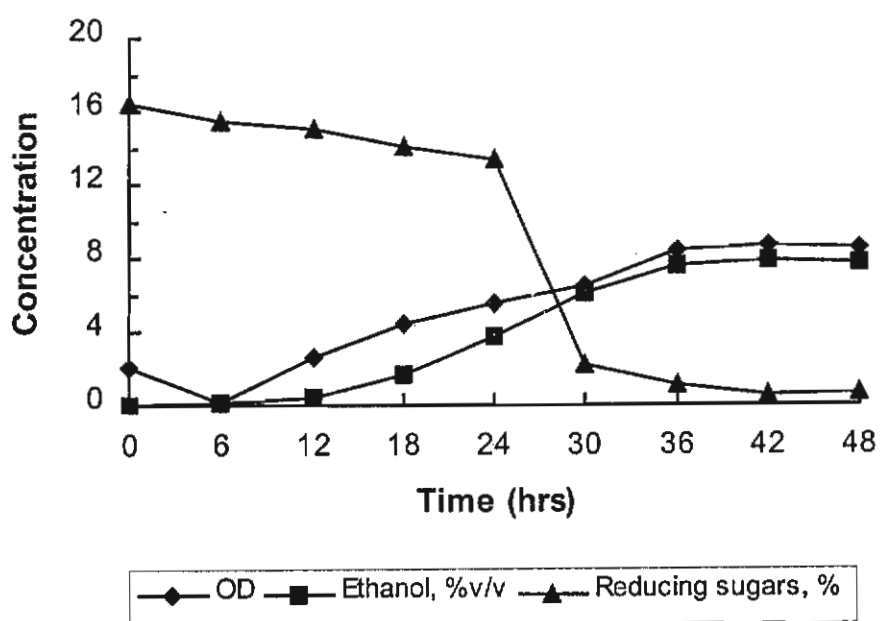


Figure 2 Growth (a) and ethanol fermentation (b) of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 30°C and agitation speed at 250 rpm.

Table 2 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35 °C and agitation speed at 250 rpm.

Time (h)	OD (660nm)	Reducing sugar (%)	Ethanol (%v/v)
0	0.80	16.37	0.10
6	1.10	15.18	0.24
12	5.15	15.13	1.40
18	12.55	13.03	5.14
24	11.35	12.79	7.25
30	10.40	3.48	8.09
36	11.50	1.40	8.91
42	11.55	1.11	8.62
48	9.00	1.08	7.99

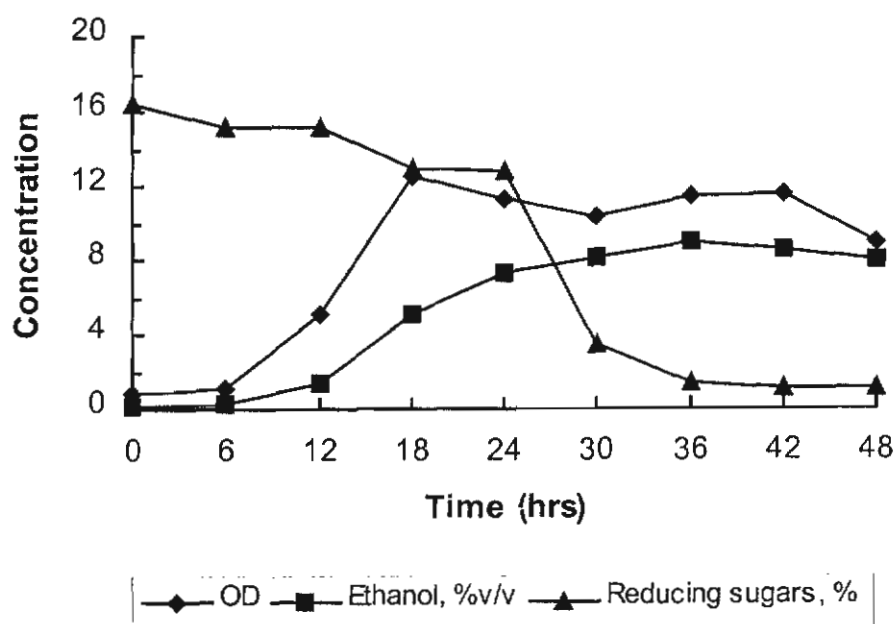


Figure 3 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Table 3 Flocculation of M30 cells cultivated in molasses medium in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35 °C determined by pour 25 ml of fermented broth into 25 ml cylinder, standing at various durations and then measured the height of cell sediment.

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

NS = no sediment

Sedimentation efficiency of M30 at 48 h of cultivation = 0.33

Table 4 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume, at 37 °C (with out temperature control) and 250 rpm agitation speed.

Time (h)	OD (660nm)	Reducing sugar (%)	Ethanol (%v/v)
0	0.45	18.75	0.05
6	3.50	18.02	0.12
12	1.00	17.08	0.60
18	10.90	15.99	1.60
24	8.95	6.41	4.52
30	7.25	4.17	5.85
36	8.95	3.34	5.34
42	13.75	2.45	4.06
48	8.20	1.64	4.64

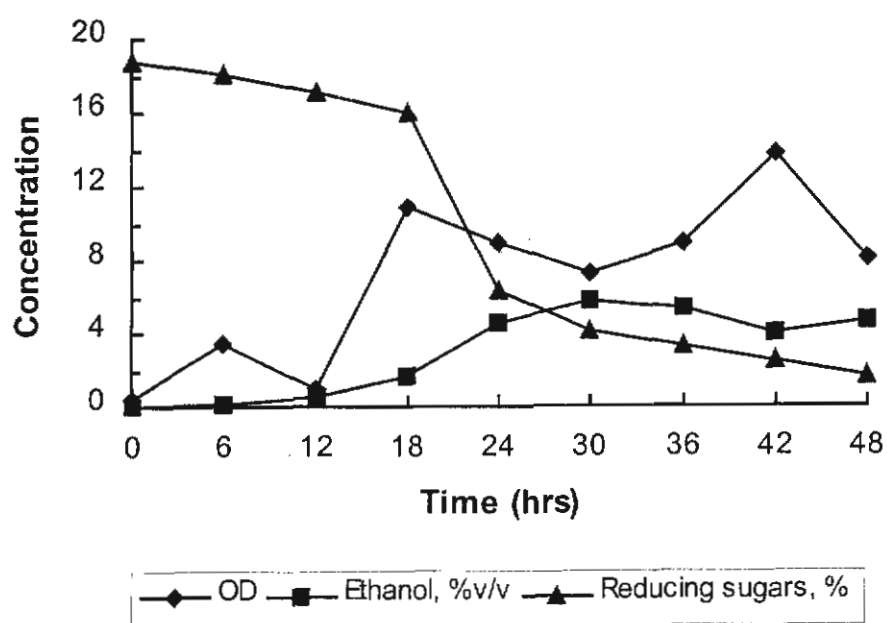


Figure 4 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 37°C and agitation speed at 150 rpm.

Table 5 Flocculation of M30 cells cultivated in molasses medium in 5 l fermentor with 3 l working volume at 37 °C determined by pour 25 ml of fermented broth into 25 ml cylinder, standing at various durations and then measured the height of cell sediment.

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

NS = no sediment

Sedimentation efficiency of M30 at 48 h of cultivation = 0.39

Table 6 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 40 °C and agitation speed at 250 rpm.

Time (h)	OD (660nm)	Reducing sugar (%)	Ethanol (%v/v)
0	2.50	ND	0.03
6	4.00	ND	0.08
12	3.10	ND	0.09
18	1.90	ND	0.03
24	1.25	ND	0.07
30	1.15	ND	0.20
36	1.70	ND	0.20
42	1.55	ND	0.29
48	2.15	ND	0.36

ND = Not determined

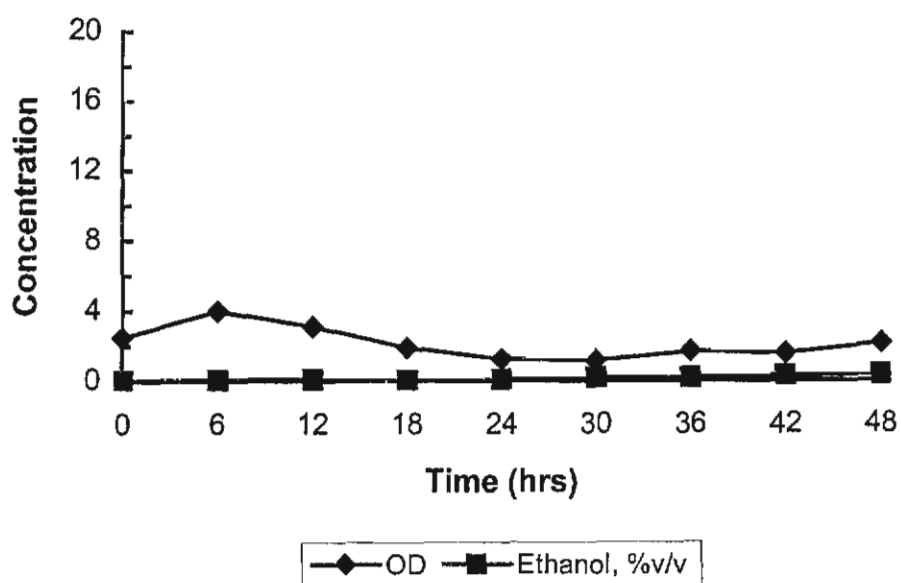


Figure 5 Growth and ethanol fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 40°C and agitation speed at 250 rpm.

2. การหมักแอลกอฮอล์แบบ Fed-batch ในห้องปฏิบัติการด้วยถังหมักขนาด 5 ลิตร

2.1 Fed-batch แบบเติมครั้งเดียว (Single feed fed-batch)

จากข้อมูลจากการหมักในระบบ batch ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ได้นำมาใช้ในการทดลองระบบ fed-batch โดยเตรียมอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 12 % แล้วเติมอาหารส่วนที่เหลือ (น้ำตาลที่เหลืออีกของทั้งหมด 6%) ครั้งเดียวในชั่วโมงที่ 12 จากผลการทดลอง (Table 7 และ Figure 6) พบว่าอัตราการเพิ่มของเซลล์ค่อนข้างช้ามาก โดยได้ค่า OD_{600} สูงสุดเพียง 8.25 ในชั่วโมงที่ 18 และจำนวนเซลล์ยีสต์ทั้งหมดก็มีจำนวนไม่มากนัก โดยที่ 12 ชั่วโมงอยู่ในระดับ 9.94×10^7 เซลล์/มล. (Table 8) แต่มากกว่า 95% เป็นเซลล์ที่มีชีวิต อย่างไรก็ตามหลังจากเติมน้ำตาลแล้วจำนวนเซลล์ยังคงเพิ่มขึ้นจนถึงระดับ 10^8 เซลล์/มล. ระดับของเซลล์ที่ค่อนข้างต่ำมีผลทำให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดเพียง 7.37 % โดยปริมาตร ในชั่วโมงที่ 33 ทั้งนี้อาจจะมีส่วนหนึ่งจากจังหวะการเติมน้ำตาลที่อาจช้าเกินไป โดยที่ชั่วโมงที่ 12 ปริมาณน้ำตาลในสาลดลงค่อนข้างมาก (3.50%) ทำให้เซลล์ยีสต์บางส่วนได้รับน้ำตาลไม่เพียงพอ สาเหตุอีกประการหนึ่งที่มาพบภายหลังอาจจะเนื่องมาจากกากน้ำตาลที่ใช้เป็นกากน้ำตาลบริเวณกันถังที่มีตะกอนของสารปนเปื้อนอยู่มาก ดังจะเห็นว่าค่า SE จะสูงมาก (0.526) ซึ่งส่วนหนึ่งอาจจะมาจากตะกอนเกลือแคลเซียมและแมกนีเซียม ที่มีผลยับยั้งการเจริญของยีสต์ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ในชั่วโมงที่ 24 ก็เกือบจะถึงจุดสูงสุด (7.06 % โดยปริมาตร) แล้ว ดังนั้นสรุปได้ว่าการเติมแบบครั้งเดียวยังไม่เหมาะสม

Table 7 Time course of single feed fed-batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Time (h)	OD(660nm)	% Sugar	Ethanol (%v/v)	S.E.
0	1.65	11.69	0.29	0.046
3	0.05	9.70	0.32	0.124
6	3.85	8.54	0.70	0.138
9	3.90	4.78	1.68	0.214
12 (before)	7.20	3.50	3.37	0.354
12 (after)	3.70	13.68	2.71	0.215
15	5.90	15.88	4.15	0.427
18	8.25	3.06	5.73	0.364
21	6.30	1.98	6.90	0.236
24	5.30	3.82	7.06	0.526
27	4.20	3.02	7.04	0.548
30	5.90	2.07	6.96	0.278
33	6.30	2.08	7.37	0.276
36	7.05	ND	7.35	0.26

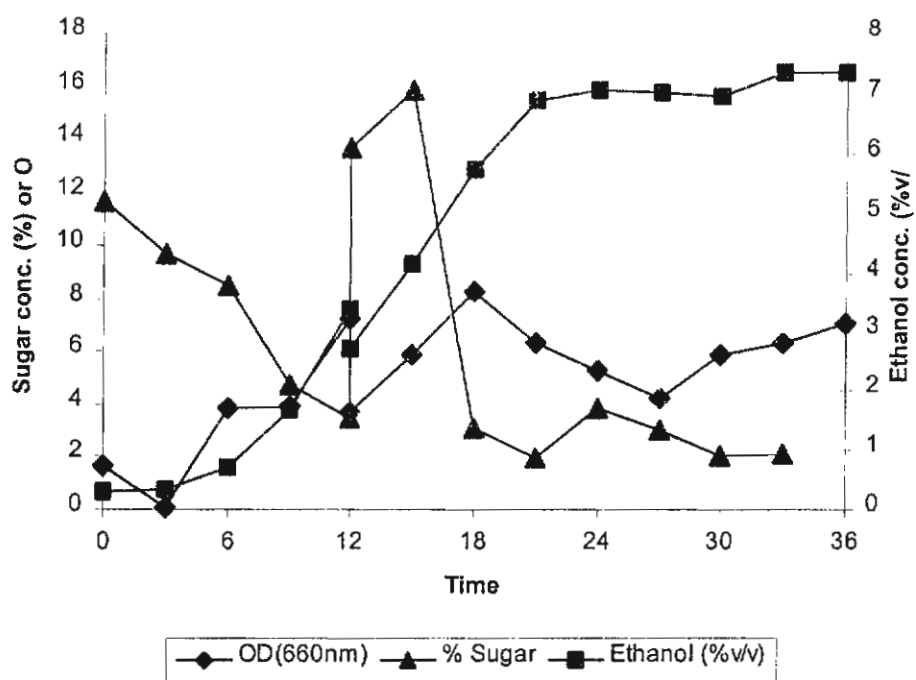


Figure 6 Time course of single feed fed-batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

2.2 Fed-batch แบบเติมสองครั้ง (Double feed fed-batch)

จากการทดลองในข้อ 2.1 ได้เปลี่ยนวิธีการเติมใหม่เป็นแบบให้ 2 ครั้ง กล่าวคือ เตรียมอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 9 % แล้วเติมอาหารส่วนที่เหลือ (น้ำตาลที่เหลืออีกของทั้งหมด 9%) แบ่งใส่ 2 ครั้งๆละเท่าๆกัน ในช่วงเวลาที่ 6 และ 12 ผลการทดลอง (Table 9 และ Figure 7) พบว่าวิธีการนี้ เซลล์ยีสต์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว (Table 10) โดยสังเกตได้จากจำนวนเซลล์ทั้งหมดสูงถึง 1.43×10^8 เซลล์/มล. และเกือบทั้งหมด (97.4%) เป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิต แต่ค่า OD สูงสุดที่ 16.22 อยู่ในชั่วโมงที่ 33 อย่างไรก็ตามค่า OD เริ่มใกล้จุดสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 แล้ว รวมทั้งค่าปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ก็ใกล้เคียงกับจุดต่ำสุด (2.83 %) และแอลกอฮอล์ที่ได้ก็เกือบสูงสุด (7.83 % โดยปริมาตร) นั่นแสดงว่าการเติมอาหารแบบ 2 ครั้งนี้สามารถเร่งการเจริญของยีสต์ได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเทียบกับการหมักแบบ batch ที่ชั่วโมงที่ 24 ได้เซลล์เพียงค่า OD 11.35 และปริมาณน้ำตาลคงเหลือในน้ำสาเกก็สูงมากด้วย เป็นที่น่าสังเกตว่าในชั่วโมงที่ 12 จำนวนเซลล์ทั้งหมดสูงถึง 1.46×10^8 เซลล์/มล. และเกือบทั้งหมด (98.9%) เป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิต นั่นแสดงว่ายีสต์มีอัตราการเพิ่มจำนวนที่สูงมาก ซึ่งถ้าพิจารณาระยะเวลาที่เหมาะสมอาจจะใช้ระยะเวลาการหมักเพียง 24 ชั่วโมง หรือไม่เกิน 30 ชั่วโมงก็ได้แอลกอฮอล์สูงสุดแล้ว จึงสามารถลดระยะเวลาการหมักลงได้ 12-6 ชั่วโมง

จึงพอจะสรุปได้ว่าการหมักแบบ fed-batch ที่มีการเติมอาหาร 2 ครั้ง สามารถเร่งการเจริญของยีสต์ให้เร็วขึ้น ทำให้การสังเคราะห์และการสะสมของแอลกอฮอล์สูงขึ้นในระยะเวลาอันสั้นด้วย

Table 9 Time course of double feed fed-batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Time (h)	OD(660nm)	% Sugar	Ethanol (%v/v)	S.E.
0	0.25	10.98	0.11	0.011
3	0.74	10.70	0.18	0.024
6 (before)	3.87	9.56	0.74	0.177
6 (after)	3.88	15.90	0.76	0.109
9	8.18	12.57	2.03	0.288
12 (before)	10.53	7.22	4.53	0.482
12 (after)	7.52	10.94	3.93	0.314
15	10.67	11.48	5.24	0.351
18	10.27	7.51	7.02	0.426
21	7.92	3.23	7.25	0.435
24	13.42	2.83	7.83	0.568
27	15.02	1.94	7.81	0.491
30	14.12	1.95	8.42	0.55
33	16.22	2.29	8.45	0.472
36	8.57	2.23	8.32	0.408

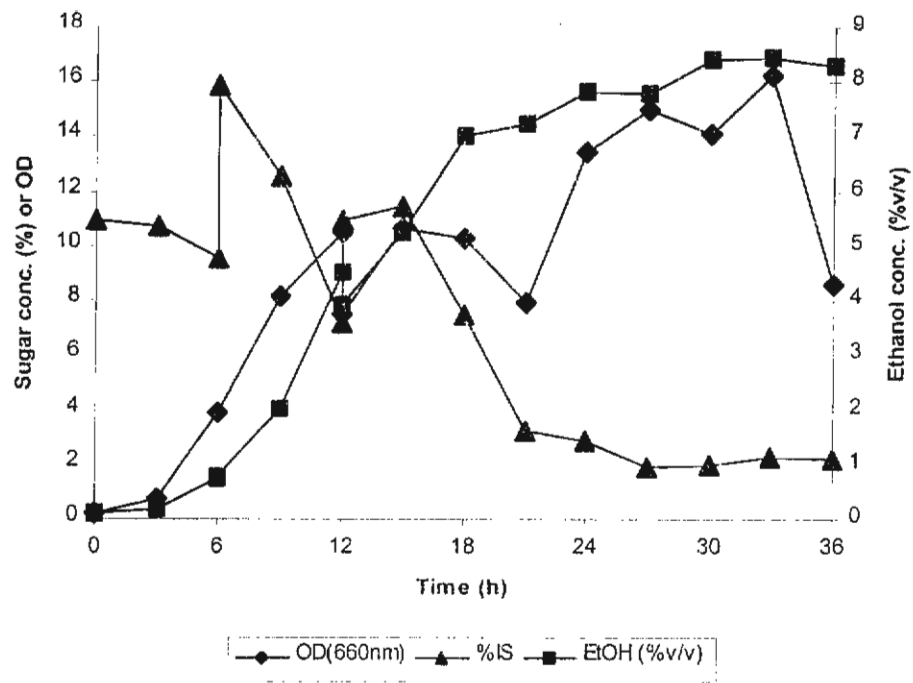


Figure 7 Time course of double feed fed-batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Table 8 Number of viable cell counts of M30 in single feed fed-batch fermentation for ethanol production in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Time (hr)	No. of cells/ml			Percentage of	
	Viable	Non-viable	Total	Viable	Non-viable
0	6.12×10^6	0	6.12×10^6	100.0	0.0
3	1.17×10^7	0	1.17×10^7	100.0	0.0
6	2.84×10^7	2.78×10^6	3.12×10^7	91.1	8.9
9	5.84×10^7	6.66×10^6	6.5×10^7	89.8	10.2
12 (before)	9.94×10^7	4.44×10^6	1.04×10^8	95.7	4.3
12 (after)	5.5×10^7	8.34×10^6	6.34×10^7	86.8	13.2
15	5.38×10^7	4.44×10^6	5.84×10^7	92.4	7.6
18	1.08×10^8	1.67×10^6	1.1×10^8	98.5	1.5
21	8.62×10^7	3.88×10^6	9.0×10^7	95.7	4.3
24	1.61×10^8	6.12×10^6	1.67×10^8	96.3	3.7
27	1.82×10^8	7.78×10^6	1.9×10^8	95.9	4.1
30	1.09×10^8	6.12×10^6	1.16×10^8	94.7	5.3
33	9.28×10^7	1.39×10^7	1.07×10^8	87.0	13.0
36	7.78×10^7	3.22×10^7	1.1×10^8	70.7	29.3

Table 10 Number of viable cell counts of M30 in double feed fed-batch fermentation for ethanol production in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Time (hr)	No. of cells/ml			Percentage of	
	Viable	Non-viable	Total	Viable	Non-viable
0	1.00×10^7	5.56×10^5	1.06×10^7	64.3	35.7
3	2.06×10^7	1.11×10^6	2.16×10^7	94.9	5.1
6 (before)	4.94×10^7	1.67×10^6	5.12×10^7	96.7	3.3
6 (after)	3.22×10^7	2.78×10^6	3.50×10^7	92.1	7.9
9	7.50×10^7	5.0×10^6	8.0×10^7	93.8	6.3
12 (before)	1.43×10^8	3.88×10^6	1.47×10^8	97.4	2.6
12 (after)	2.12×10^7	1.67×10^6	2.28×10^7	92.7	7.3
15	1.09×10^7	2.22×10^6	1.12×10^8	83.1	16.9
18	8.00×10^7	5.56×10^6	8.56×10^7	93.5	6.5
21	8.88×10^7	2.78×10^6	9.16×10^7	97.0	3.0
24	7.78×10^7	3.34×10^6	8.12×10^7	95.9	4.1
27	1.07×10^8	8.34×10^6	1.16×10^8	92.8	7.2
30	1.01×10^8	6.66×10^6	1.08×10^8	93.8	6.2
33	8.84×10^7	7.22×10^6	9.56×10^7	92.4	7.6
36	9.94×10^7	4.72×10^7	1.47×10^8	67.8	32.2

2.3 Fed-batch แบบเติมสามครั้ง (triple feed fed-batch)

ในการทดลองนี้ต้องการที่จะเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ให้เร็วขึ้นอีก จึงได้ทำการทดลองโดยเตรียมอาหารกากน้ำตาลที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 6.8 % แล้วเติมอาหารส่วนที่เหลือ (น้ำตาลที่เหลืออีกของทั้งหมด 11.2%) แบ่งใส่ 3 ครั้งๆละเท่าๆกัน ในช่วงเวลาที่ 6 12 และ 18 ผลการทดลอง (Table 11 และ Figure 8) พบว่าการเติมอาหารแบบนี้ให้ผลคล้ายกับ fed-batch แบบเติมสองครั้งมาก โดยจำนวนเซลล์สูงสุดและปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดที่ได้เท่ากับ 15.95 และ 7.96 % โดยปริมาตร ตามลำดับ ที่ช่วงเวลาที่ 27 รวมทั้งจำนวนเซลล์ทั้งหมดในช่วงเวลาที่ 12 ได้ 1.46×10^8 เซลล์/มล. และเกือบทั้งหมด (98.9%) เป็นเซลล์ที่ยังมีชีวิต (Table 12) และความสามารถในการตกตะกอนของเซลล์ก็อยู่ในเกณฑ์ที่สูงมากด้วย (SE = 0.454) ดังนั้นการเติมอาหารแบบ 3 ครั้งจึงไม่เพิ่มประสิทธิภาพในการหมักจากการหมัก fed-batch แบบเติม 2 ครั้งแต่อย่างใด

Table 11 Time course of triple feed fed-batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Time (h)	OD(660nm)	% Sugar	Ethanol (%v/v)	S.E.
0	0.52	6.92	0.30	0.003
3	2.62	6.83	0.40	-0.082
6 (before)	5.02	3.92	1.22	0.163
6 (after)	4.68	15.40	1.40	0.064
9	10.93	7.32	3.09	0.201
12 (before)	12.28	1.82	4.60	0.323
12 (after)	11.24	9.48	3.85	0.248
15	11.00	6.13	5.05	0.267
18 (before)	12.49	3.34	6.58	0.436
18 (after)	15.60	10.2	5.77	0.24
21	14.00	8.41	6.58	0.247
24	13.50	4.48	7.19	0.252
27	15.95	3.01	7.96	0.454
30	14.05	3.56	7.58	0.471
33	12.95	3.21	7.18	0.433
36	14.40	2.75	7.50	0.464

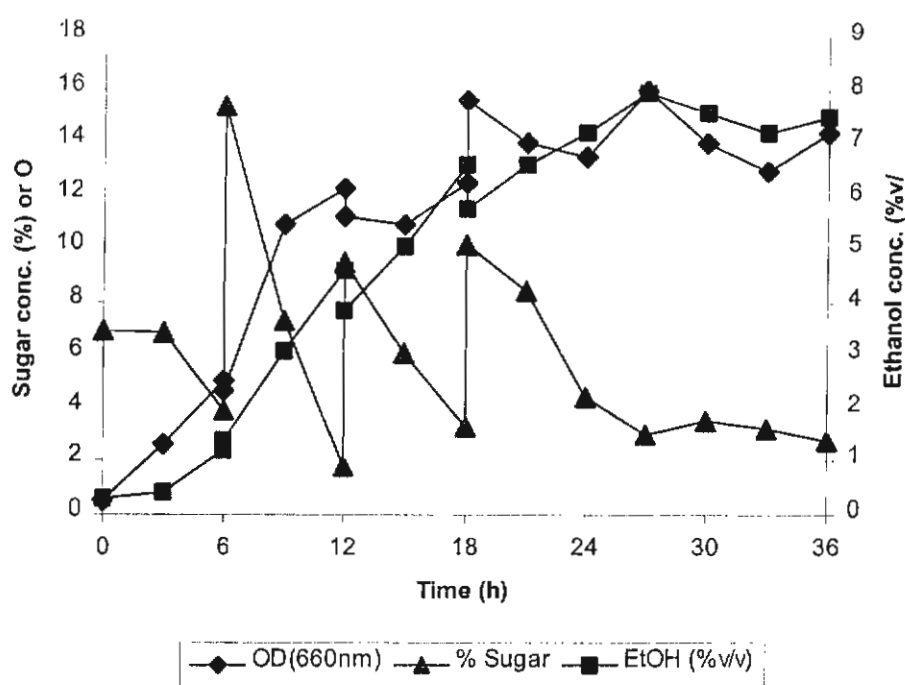


Figure 8 Time course of triple feed fed-batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Table 12 Number of viable cell counts of M30 in triple feed fed-batch fermentation for ethanol production in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Time (hr)	No. of cells/ml			Percentage of	
	Viable	Non-viable	Total	Viable	Non-viable
0	9.17×10^6	3.89×10^5	9.56×10^6	70.2	29.8
3	2.09×10^7	8.89×10^5	2.18×10^7	70.2	29.8
6 ก่อนfeed	6.21×10^7	1.77×10^6	6.39×10^7	97.2	2.8
6 หลังfeed	7.82×10^7	8.89×10^5	7.91×10^7	89.8	10.2
9	3.24×10^7	4.44×10^5	3.29×10^7	87.9	12.1
12 ก่อนfeed	1.46×10^8	1.56×10^6	1.47×10^8	98.9	1.1
12 หลังfeed	9.38×10^7	2.67×10^6	9.64×10^7	97.2	2.8
15	9.91×10^7	2.00×10^6	$1.0.1 \times 10^8$	98.0	2.0
18 ก่อนfeed	1.17×10^8	4.44×10^5	1.17×10^8	96.3	3.7
18 หลังfeed	1.41×10^8	2.67×10^6	1.44×10^8	98.1	1.9
21	1.16×10^8	2.00×10^6	1.18×10^8	98.3	1.7
24	1.10×10^8	2.22×10^6	1.12×10^8	98.0	2.0
27	8.17×10^7	3.06×10^6	8.47×10^7	96.4	3.6
30	1.04×10^8	1.94×10^6	1.06×10^8	98.2	1.8
33	1.09×10^8	4.72×10^6	1.14×10^8	95.8	4.2
36	8.42×10^7	4.17×10^6	8.83×10^7	95.3	4.7

2.4 การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเทคนิค *repeated batch* ในระดับ ห้องปฏิบัติการ

ในการหมักนี้ใช้น้ำตาลเริ่มต้นประมาณ 22% (ใกล้เคียงกับอัตราที่ใช้ในโรงงานสุราทั่วไป) ผลการทดลองดังแสดงใน Table 13 และ Figure 9 พบว่าการหมักได้ปริมาณแอลกอฮอล์ค่อนข้างต่ำเพียง 6.59 % โดยปริมาตร ในช่วงเวลาที่ 24 โดยได้จำนวนเซลล์สูงสุด คิดเป็น OD เท่ากับ 14.90 หลังจากนั้นทั้งปริมาณเซลล์และแอลกอฮอล์จะเริ่มลดลง ทั้งนี้อาจจะเนื่องมาจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่สูงถึง 25.36% มีผลต่อการเจริญและการสร้างแอลกอฮอล์ แต่หลังจากทำ repeat batch รอบที่ 1 พบว่ายีสต์เริ่มต้นมีปริมาณที่สูงมาก (OD = 14.4) ทำให้การหมักดำเนินไปได้อย่างรวดเร็ว โดยระยะเวลาการหมัก 36 ชั่วโมง ก็จะได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดถึง 9.18 % โดยปริมาตร แต่ที่จริงแล้วระยะเวลาเพียง 24 ชั่วโมงน่าจะเหมาะสมที่สุด เนื่องจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้สูงพอที่จะกลั่นได้แล้ว ใน repeat batch รอบที่ 2 มีลักษณะคล้ายกับในรอบแรก แต่ปริมาณแอลกอฮอล์ขึ้นถึง 7.86 % โดยปริมาตรเพียงแค่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง แสดงให้เห็นชัดเจนว่าจำนวนเซลล์เริ่มต้นมีผลอย่างยิ่งต่อระยะเวลาการหมัก และการบ่มยีสต์ (acclimatization) ให้คุ้นเคยกับความเข้มข้นแอลกอฮอล์ที่สูง น่าจะมีส่วนช่วยให้ยีสต์สามารถสังเคราะห์แอลกอฮอล์ได้อย่างต่อเนื่องในการหมักรอบใหม่ แต่ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงสุดในรอบต่อไปจะลดลงเล็กน้อย

Table 13 Time course of repeated batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (22% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Time (h)	OD(660nm)	% Sugar	Ethanol (%v/v)	S.E.
0	1.88	25.36	0.36	-0.191
12	11.20	11.05	2.85	0.533
24	14.90	6.68	6.59	0.685
30	12.55	3.72	6.40	0.792
33	12.78	0.30	6.22	0.710
35	13.23	5.75	6.20	0.634
Repeat batch 1				
0	14.4	13.9	1.53	0.456
12	15.2	2.44	6.84	0.505
24	13.3	3.45	8.16	0.577
36	12	4.55	9.18	0.494
Repeat batch 2				
0	11.95	12.74	2.03	0.477
12	16	4.4	7.86	0.578
24	15.3	5.06	7.93	0.566
36	18.3	2.64	8.21	0.32

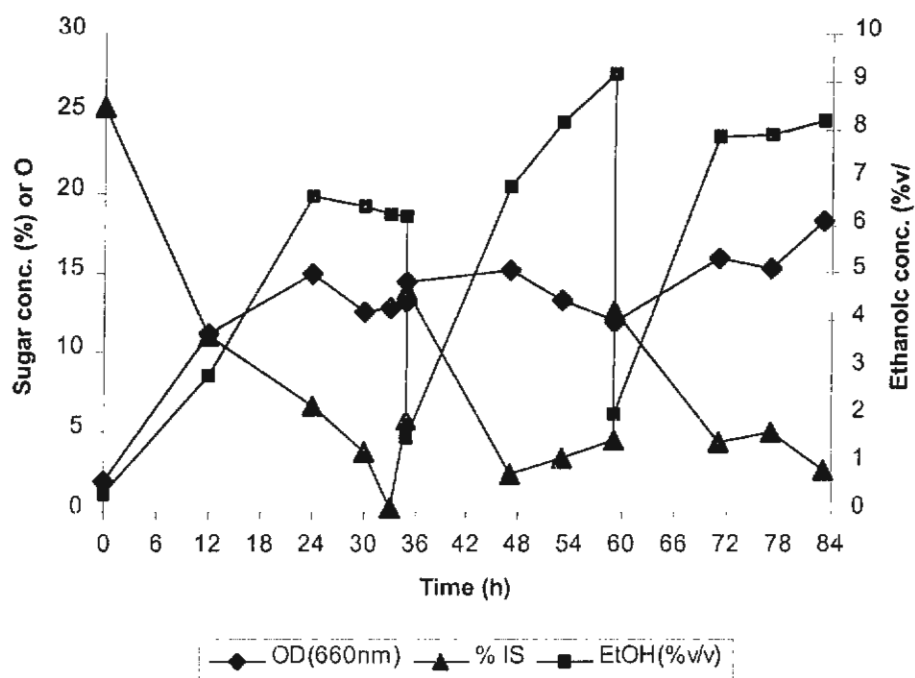


Figure 9 Time course of repeated batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (22% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

2.5 การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลด้วยเทคนิค *double stage* ร่วมกับ *repeated fed-batch* ในระดับห้องปฏิบัติการ

2.5.1 Repeated batch fermentation at 24 hours

ในการหมักนี้ใช้น้ำตาลเริ่มต้นประมาณ 22% (ลดลงจากการหมักครั้งที่แล้ว ให้ใกล้เคียงกับอัตราที่ใช้ในโรงงานสุราทั่วไป) และทำ repeat batch ที่ 24 ชั่วโมง โดยหยุดการกวนแล้วปล่อยให้เซลล์ตกตะกอนนาน 10 นาที จากนั้นดูดเอาน้ำส่วนบนออก 80% (2,400 มล.) แล้วเติมน้ำสาใหม่ลงไป 2,400 มล. น้ำสาที่ดูดออกมาปล่อยให้หมักต่ออีก 12 ชั่วโมงโดยไม่มีการกวน ผลการทดลองดังแสดงใน Table 14 และ Figure 10 พบว่าการหมักในรอบแรกยังคงค่อนข้างช้า โดยปริมาณแอลกอฮอล์ที่ 36 ชั่วโมงค่อนข้างต่ำ (6.49% โดยปริมาตร) โดยจะเห็นได้ชัดเจนว่าสาเหตุหลักน่าจะมาจากปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นช้ามาก โดยมีค่า OD สูงสุดเพียง 10.11 ในชั่วโมงที่ 24 แต่ตั้งแต่อรอบที่ 2 เป็นต้นไประยะเวลาการหมักจะลดลงมาเหลือ 24 ชั่วโมง ก็จะได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุด (9.36 % โดยปริมาตร ใน repeat batch 1 และค่อยๆลดลงมาจนถึง 7.13 % โดยปริมาตร ใน repeat batch 5) ทั้งนี้เนื่องจากการสะสมของจำนวนเซลล์ยีสต์สูงขึ้น โดยที่ค่า OD เริ่มต้นในรอบแรกที่ 0.63 เพิ่มขึ้นเป็น 8.06, 11.51, 6.81, 9.61 และ 11.41 ในรอบต่อมาตามลำดับ อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อจำนวนรอบเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นสูงสุดของแอลกอฮอล์ที่ได้จะลดลงเป็นลำดับ ซึ่งน่าจะเป็นอิทธิพลของอุณหภูมิ แอลกอฮอล์ และการสะสมของสารพิษที่มาจากกากน้ำตาล ลักษณะการหมักคล้ายกับการหมักครั้งที่แล้ว แสดงว่าการ repeat batch ที่ 24 ชั่วโมงยังช้าเกินไป และการปล่อยทิ้งไว้อีก 12 ชั่วโมง (ชั่วโมงที่ 24 - 36) ไม่ได้ทำให้เกิดแอลกอฮอล์มากขึ้น ในทางตรงกันข้ามความเข้มข้นแอลกอฮอล์กลับมีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด

Table 14 Time course of repeated fed-batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Time (h)	OD(660nm)	% Sugar	Ethanol (%v/v)	S.E.
0	0.63	21.54	0.25	0
12	6.76	15.20	2.37	-0.01
24	10.11	5.29	6.32	0.54
36	1.78	4.70	6.49	0.26
Repeat batch 1				
0	8.06	21.34	1.86	0.42
12	9.61	7.28	7.15	0.53
24	10.26	3.07	9.36	0.33
36	1.84	0.92	9.36	0.16
Repeat batch 2				
0	11.51	20.72	2.24	0.47
12	9.06	10.78	6.46	0.41
24	7.21	5.93	9.23	0.38
36	1.82	5.96	8.72	0.12
Repeat batch 3				
0	6.81	21.10	2.34	0.24
12	10.61	11.83	5.97	0.35
24	8.01	7.41	7.85	0.30
36	2.36	6.91	8.15	0.22
Repeat batch 4				
0	9.61	18.15	2.28	0.16
12	9.86	5.86	6.15	0.49
24	10.61	4.70	7.45	0.25
36	1.96	2.59	7.48	0.14
Repeat batch 5				
0	11.41	21.86	1.95	0.27
12	13.00	12.84	4.92	0.44
24	10.86	9.47	7.13	0.45
36	2.08	9.47	6.96	0.01

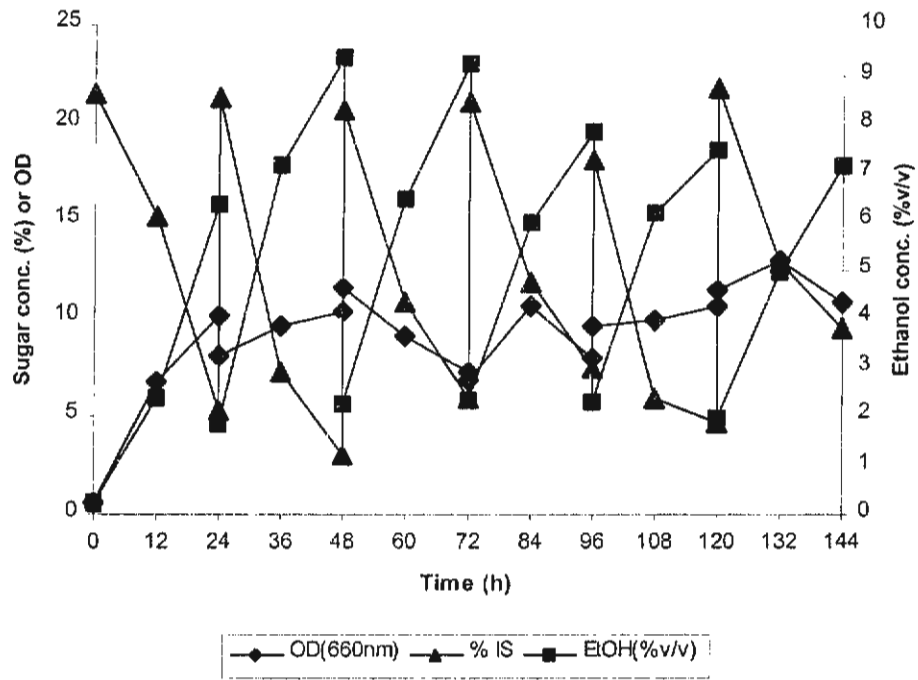


Figure 10 Time course of repeated fed-batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

2.5.2 Double stage repeated fed-batch fermentation (repeat batch at 12 hours)

ในการทดลองนี้ได้นำเทคนิค double stage repeated batch fermentation มาใช้ โดยวิธีการโดยทั่วไปจะเหมือนกับครั้งก่อนหน้า โดยมีการนำระบบ fed-batch แบบเติมอาหารครั้งเดียวที่ ชั่วโมงที่ 12 มาร่วมด้วย แต่การทำ repeat batch เร็วขึ้น คือหลังจากหมักไปได้ 12 ชั่วโมงจะเริ่มทำ repeat batch (ยกเว้นในรอบแรกที่ทำ fed-batch จะทำ repeat batch ในชั่วโมงที่ 24) และน้ำสาที่แยกออกมานำไปหมักต่ออีก 24 ชั่วโมง (ยกเว้นในรอบแรกที่ทำ fed-batch จะทำการหมักต่ออีก 12 ชั่วโมง) โดยตั้งบน magnetic stirrer ผลการทดลอง (Table 15 และ Figure 11) พบว่าการทำ fed-batch ในรอบเริ่มต้นจะช่วยให้การหมักเกิดเร็วขึ้น คือได้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดถึง 7.85 % โดยปริมาตร ทั้งนี้เนื่องจากจำนวนเซลล์ยีสต์เริ่มเข้าสู่จุดสูงสุด ($OD = 13.74$) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ที่เริ่มทำ fed-batch เทียบกับการหมักแบบ repeated batch ก่อนหน้าที่ปริมาณเซลล์ในชั่วโมงที่ 12 ยังต่ำอยู่ที่ $OD = 6.76$ ซึ่งมีผลกระทบโดยตรงต่อการผลิตแอลกอฮอล์ นอกจากนี้การทำ repeated batch ที่ 12 ชั่วโมง น่าจะเหมาะสม เนื่องจากปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้ในรอบที่ทำ repeat batch ค่อนข้างคงที่อยู่ในระดับสูงกว่า 8 % โดย ปริมาตร (ยกเว้น repeat batch 2 ที่ต่ำกว่า 8% โดยปริมาตรเล็กน้อย) เมื่อชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก อย่างไรก็ตามปริมาณแอลกอฮอล์เกือบถึงจุดสูงสุดตั้งแต่ 12 ชั่วโมง จึงน่าจะเป็นจุดที่สิ้นสุดการหมักและทำการกลั่นสาได้หากต้องการประสิทธิภาพในการหมักสูงสุด หรืออีกนัยหนึ่งสามารถทำการหมักแอลกอฮอล์ได้ภายใน 12 ชั่วโมง แต่ถ้าต้องการให้ได้ความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูงสุดในน้ำสา ก็สามารถกระทำได้โดยการพักน้ำสาในถังสำรอง อีกไม่เกิน 12 ชั่วโมง เพื่อให้เกิด second stage fermentation รวมเป็นระยะเวลาการหมักทั้งสิ้น 24 ชั่วโมง การหมักต่อจากนั้นมีผลทางลบต่อผลผลิตคือปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้จะลดลง

Table 15 Time course of double stage repeated fed-batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

Time (h)	OD(660nm)	% Sugar	Ethanol (%v/v)	S.E.
0	0.80	9.96	0.20	ND
3	1.34	9.74	0.31	ND
6	3.83	7.72	0.86	ND
9	8.93	7.18	2.56	ND
12 (before)	13.74	4.15	4.56	ND
12 (after)	11.45	13.15	3.68	ND
15	14.55	6.32	4.61	ND
18	15.25	4.92	6.31	ND
21	14.75	4.61	7.37	ND
24	15.15	4.02	7.85	0.538
36	2.52	4.13	7.77	ND
Repeat batch 1				
0	14.10	14.20	1.97	0.330
12	16.65	10.33	8.06	0.471
24	2.70	6.84	8.26	ND
36	3.91	6.22	7.44	ND
Repeat batch 2				
0	14.70	18.72	2.19	0.408
12	15.05	9.96	7.45	0.378
24	3.31	11.46	7.84	ND
36	2.89	7.62	8.13	ND
Repeat batch 3				
0	13.10	23.36	1.96	0.239
12	16.55	8.34	7.78	0.350
24	2.88	7.58	8.80	ND
36	2.68	9.52	7.29	ND

Table 15 (Continued).

Time (h)	OD(660nm)	% Sugar	Ethanol (%v/v)	S.E.
Repeat batch 4				
0	15.15	15.20	2.56	0.302
12	15.30	5.86	7.66	0.160
24	3.40	8.12	8.46	ND
36	2.97	7.61	7.78	ND
Repeat batch 5				
0	15.40	16.60	1.77	0.490
12	17.45	11.03	7.75	0.246
24	3.88	7.28	8.10	ND
36	2.01	10.98	8.29	ND

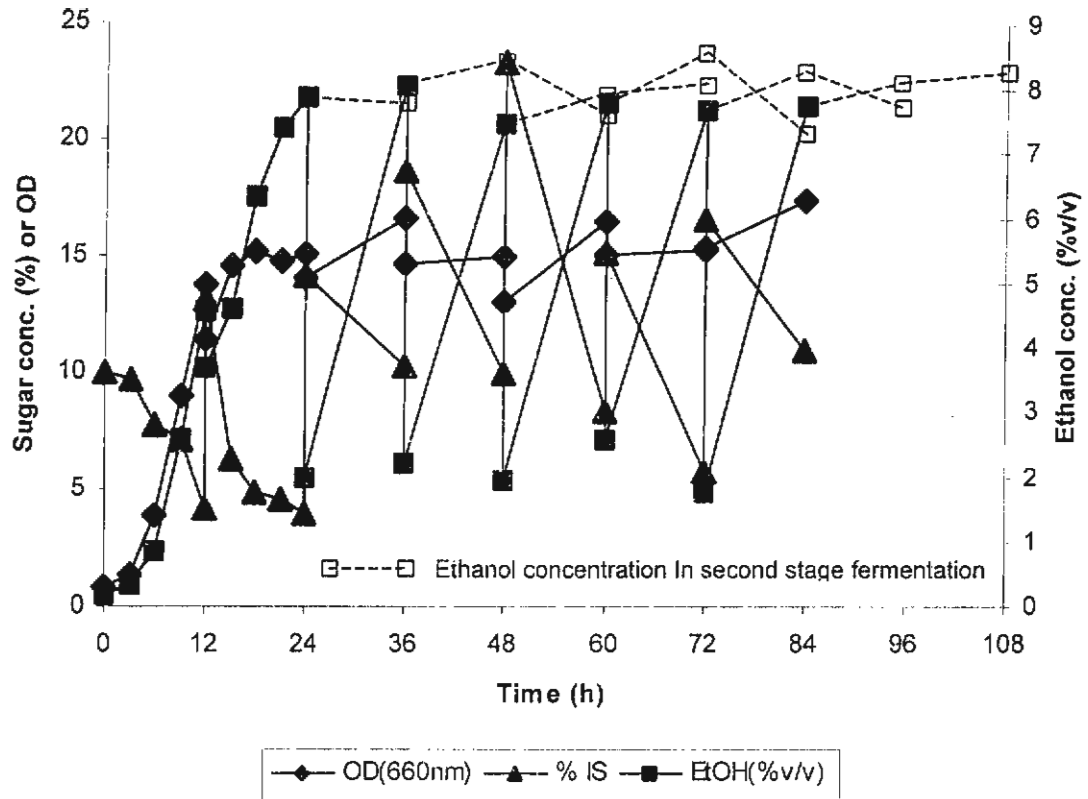


Figure 11 Time course of double stage repeated fed-batch fermentation for ethanol production by M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 5 l fermentor with 3 l working volume at 35°C and agitation speed at 250 rpm.

2.6 การหมักแอลกอฮอล์แบบ Batch และ Fed-batch ในถังหมักระดับกึ่งโรงงาน ขนาดความจุ 100 ลิตร

2.6.1 การหมักแบบ batch

เมื่อนำ M30 ไปทดลองหมักแอลกอฮอล์ในถังขนาดใหญ่ระดับกึ่งโรงงาน (ความจุ 100 ลิตร) ทั้งระบบ batch ที่ 35 °C ก็ได้ผลใกล้เคียงกับการหมักในระดับห้องปฏิบัติการ (Table 16 และ Figure 12) คือใช้เวลาในการหมัก 42 ชั่วโมงได้แอลกอฮอล์สูงสุดที่ 8.38 % โดยปริมาตร และการเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์ก็ค่อนข้างช้ามาก โดยได้จำนวนเซลล์สูงสุดเพียงได้ค่า OD เพียง 6.10 ที่ 30 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามความสามารถในการตกตะกอนยังคงเดิมที่ค่า SE = 0.33 (Table 17) จากข้อมูลแสดงให้เห็นแนวโน้มของการนำ M30 ไปใช้ในการหมักแอลกอฮอล์ในระดับโรงงานว่าน่าจะทำได้โดยไม่มีปัญหาใดใด และการใช้เทคนิค double stage repeated fed-batch ก็น่าจะดำเนินได้และให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ เพียงแต่ว่าระยะเวลาในการปล่อยให้เซลล์ตกตะกอนอาจจะเพิ่มขึ้นตามขนาดของถัง

Table 16 Time course of batch fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 100 l fermentor with 80 l working volume at 35 °C and agitation speed at 200 rpm.

Time (h)	OD (660nm)	Reducing sugar (%)	Ethanol (%v/v)
0	0.25	21.07	0.26
6	1.77	22.25	0.67
12	4.85	15.52	2.67
18	5.75	12.58	4.44
24	5.45	8.98	5.70
30	6.10	5.15	6.85
36	4.00	3.28	7.71
42	5.30	1.49	8.38
48	5.15	2.636	8.10

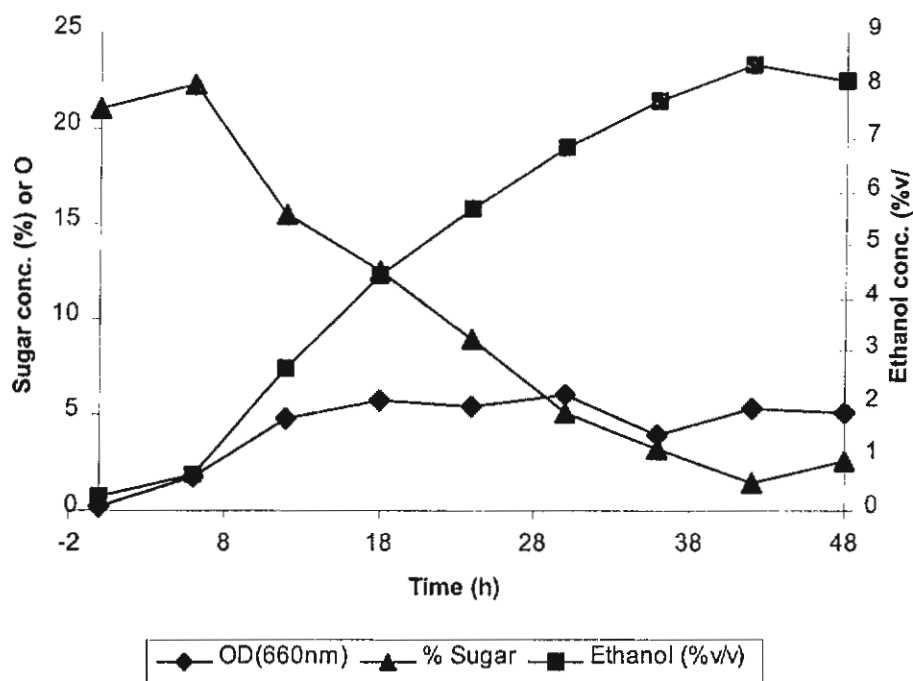


Figure 12 Time course of batch fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 100 l fermentor with 80 l working volume at 35°C and agitation speed at 200 rpm.

Table 17 Flocculation of M30 cells cultivated in molasses medium in 100 l fermentor with 80 l working volume at 35 °C.

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

NS = no sediment

Sedimentation efficiency of M30 at 48 h of cultivation = 0.33

2.6.2 การหมักแบบ fed-batch

เมื่อนำ M30 ไปหมักแอลกอฮอล์แบบ fed-batch ในถังขนาดใหญ่ระดับกึ่งโรงงาน (ความจุ 100 ลิตร) ที่ 35 °C ผลการหมัก (Table 18 และ Figure 13) จะได้แอลกอฮอล์ 8.24 % โดยปริมาตร ภายใน 32 ชั่วโมง โดยที่ความสามารถในการตกตะกอนยังคงเดิมที่ค่า SE = 0.33 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) ซึ่งยืนยันข้อสมมติฐานว่า ยีสต์ M30 มีความสามารถคงเดิมเมื่อขยายขนาดของถังหมักขึ้นและสามารถนำไปใช้ได้จริงในการผลิตแอลกอฮอล์เชื้อเพลิง

Table 18 Time course of fed-batch fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 100 l fermentor with 80 l working volume at 35 °C and agitation speed at 200 rpm.

Time (h)	OD (660nm)	Reducing sugar (%)	Ethanol (%v/v)
0	0.37	13.78	0.40
4	5.34	13.46	1.56
8	19.09	6.11	4.09
12	19.04	7.46	5.34
12	5.7	21.11	1.14
16	6.39	18.77	2.10
20	10.39	6.34	4.04
24	10.24	7.50	5.68
28	13.54	7.30	7.13
32	14.84	5.51	8.24
36	11.69	4.097	8.33

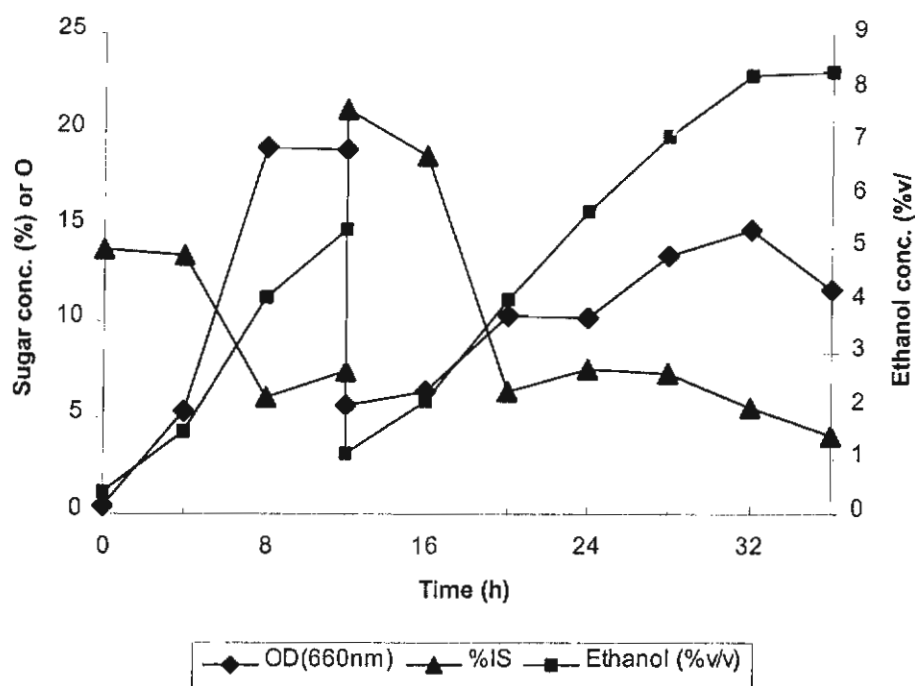


Figure 13 Time course of batch fermentation of M30 in molasses medium (18% reducing sugars and 0.05% ammonium sulfate) in 100 l fermentor with 80 l working volume at 35°C and agitation speed at 200 rpm.

3. การผลิตเซลล์ยีสต์อาหารสัตว์โดยระบบ air-lift fermentor ร่วมกับเทคนิค fed-batch

3.1 การพัฒนากลังหมัก air-lift ต้นแบบในระดับห้องปฏิบัติการ

ในการพัฒนากลังหมัก air-lift ต้นแบบที่ใช้ในการทดลองนี้ ต้องการใช้วัสดุที่หาซื้อได้ในประเทศ ดังนั้นกลังหมักต้นแบบในระดับห้องปฏิบัติการจะใช้ขวดโหลแก้วขนาด 33x15 ซม. (สูงxเส้นผ่าศูนย์กลาง) โดยมี draught tube ขนาด 12x9 ซม. (สูงxเส้นผ่าศูนย์กลาง) ด้านล่างสุดของท่ออยู่ห่างจากพื้นถึง 2.5 ซม. บริเวณก้นถังตรงมุมพอกด้วยดินน้ำมันเป็นแนวโค้ง (เพื่อป้องกันการสะสมตะกอนเซลล์) หัวพ่นอากาศทำด้วยท่ออ่อนพ่นอากาศชนิดขึ้นเป็นแผ่นกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. เพื่อให้ได้พองอากาศขนาดเล็ก อันจะช่วยให้การละลายของออกซิเจนดีขึ้น อากาศที่ใช้ได้จากเครื่องอัดอากาศ (air compressor) ขนาด 2 HP พร้อมระบบกรองไอน้ำมันและกรองฝุ่นขนาด 100 ไมโครเมตร ความดันอากาศที่ใช้ปรับที่ 1 bar นอกจากนี้ยังมีระบบกรองอากาศก่อนเข้าถังหมักด้วยถักรองอากาศขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

3.2 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของกลังหมัก air-lift ต้นแบบ

ในการผลิตยีสต์อาหารสัตว์ที่ใช้กลังหมัก air-lift ต้นแบบในระดับห้องปฏิบัติการ ใช้อาหารกากน้ำตาล 4 ลิตร โดยมีน้ำตาลเริ่มต้น 4% ยูเรีย 0.1% และปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้เท่ากับ 4.5 ด้วยกรดซัลฟูริก ในการทดลองชุดแรกให้อากาศเพียง 0.1 vvm จะเห็นได้ชัดเจนใน Table 19 ว่าปริมาณออกซิเจนที่ละลายลงไปไม่เพียงพอต่อการเจริญของยีสต์ทำให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเพียง 4.13 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 โดยปริมาณโปรตีนค่อนข้างคงที่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เป็นสัดส่วนประมาณ 50% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นค่อนข้างสูงที่ 4.22 % มีผลต่อเมตาบอลิซึมของเซลล์ในการก่อให้เกิด Crabtree effect (กีดการทำงานของ mitochondria) ที่ทำให้มีการสะสมของแอลกอฮอล์ถึง 1.2% โดยปริมาตร ในชั่วโมงที่ 12 และค่อนข้างคงที่จนถึงสิ้นสุดการหมักที่ 48 ชั่วโมง (Figure 14)

Table 19 Time course of fodder yeast fermentation in 3-liter air-lift fermentor using molasses medium containing 4% sugar, 0.1% urea, aeration at 0.1 vvm and initial pH 4.5.

Time (hrs)	Dry weight (g/l)	Protein (g/l)	Reducing sugar (%w/v)	Ethanol (%v/v)
0	1.00	0.53	4.22	0.30
6	2.31	1.50	2.12	1.09
12	2.81	1.89	1.27	1.20
18	3.64	2.13	1.20	1.05
24	4.13	2.01	1.07	1.17
30	3.59	1.96	1.33	1.12
36	3.59	2.03	1.08	1.08
42	3.58	1.98	1.22	1.09
48	3.46	1.60	1.35	1.05

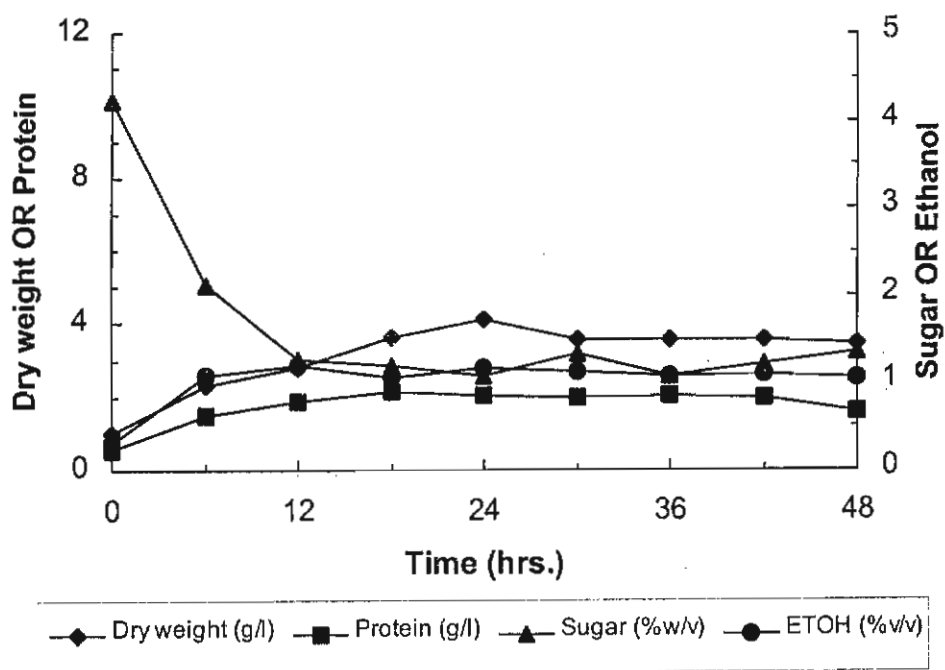


Figure 14 Time course of fodder yeast fermentation in 3-liter air-lift fermentor using molasses medium containing 4% sugar, 0.1% urea, aeration at 0.1 vvm and initial pH 4.5.

ในสภาวะการหมักเช่นเดียวกันแต่เพิ่มปริมาณการให้อากาศเป็น 1 vvm ปริมาณเซลล์แห้งได้เพิ่มขึ้นมาถึง 9.09 กรัมต่อลิตร ในช่วงเวลาที่ 24 ซึ่งมากกว่า 2 เท่าเมื่อเทียบกับการทดลองแรก (Table 20 และ Figure 15) แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนถึงอิทธิพลของออกซิเจนต่อการเจริญของยีสต์ หลังจากนั้นจำนวนเซลล์ยังคงเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยจนถึงชั่วโมงที่ 40 น้ำหนักเซลล์แห้งเริ่มลดลง ซึ่งเป็นผลมาจากการขาดแหล่งคาร์บอน (ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ที่ระดับประมาณ 0.7% ซึ่งคาดว่าจะจะเป็น non-fermentable sugars ในกลุ่มของ pentose ซึ่งมีรายงานว่ามียูอยู่ในกากน้ำตาลและ *Saccharomyces cerevisiae* ไม่สามารถใช้ได้) อย่างไรก็ตาม Crabtree effect ก็ยังคงเกิดขึ้นโดยที่ในช่วงเวลาที่ 12 มีแอลกอฮอล์สะสมถึง 1.33% โดยปริมาตร แต่แอลกอฮอล์ที่เกิดขึ้นยีสต์สามารถนำกลับไปใช้เป็นแหล่งของคาร์บอนได้ เพราะที่ 12 ชั่วโมงนี้ความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่ที่ระดับเพียง 0.96% และค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆ หลังจากนั้น เป็นที่น่าสังเกตว่าปริมาณโปรตีนเริ่มเข้าสู่ระดับสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 เช่นกัน ซึ่งเมื่อดำเนินการแล้วยีสต์ในขณะนั้นจะมีปริมาณโปรตีนสูงถึง 57.8% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง หลังจากนั้นปริมาณโปรตีนในเซลล์จะเริ่มลดลงจนถึงระดับต่ำสุดที่ 28 ชั่วโมงมีปริมาณโปรตีนเพียง 30.6% ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งแสดงให้เห็นว่ายูเรียในสูตรอาหารไม่เพียงพอสำหรับยีสต์ในการนำไปสร้างเป็นโปรตีน

Table 20 Time course of fodder yeast fermentation in 3-liter air-lift fermentor using molasses medium containing 4% sugar, 0.1% urea, aeration at 1.0 vvm and initial pH 4.5.

Time (hrs)	Dry weight (g/l)	Protein (g/l)	Reducing sugar (%w/v)	Ethanol (%v/v)
0	0.81	1.36	3.95	0.39
4	1.88	2.09	1.36	0.57
8	3.49	3.19	1.16	0.96
12	6.23	3.60	0.96	1.33
16	8.27	3.62	0.90	1.14
20	8.65	3.34	0.84	0.92
24	9.09	3.46	0.84	0.86
28	10.43	3.19	0.78	0.75
32	10.44	3.57	0.71	0.57
36	11.12	3.89	0.69	0.45
40	11.13	3.82	0.67	0.37
44	9.69	3.76	0.61	0.28
48	9.70	4.26	0.54	0.27

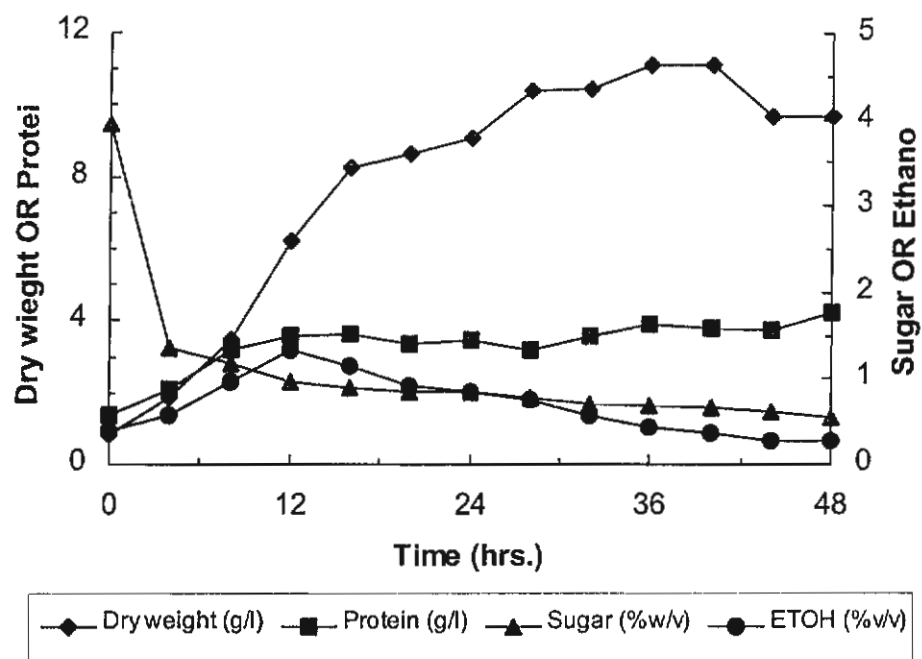


Figure 15 Time course of fodder yeast fermentation in 3-liter air-lift fermentor using molasses medium containing 4% sugar, 0.1% urea, aeration at 1.0 vvm and initial pH 4.5.