การพัฒนาสูตรอาหารผลิตกล้าเชื้อเพื่อลดต้นทุนกระบวนการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

Development of Inoculum Production Medium for Cost Reduction of Ethanol Production Process at an Industrial Scale

สิรินันท์ สิทธิชัย

มหาวิทยาลัยบูรพา

2563

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

60910100_3119683100

การพัฒนาสูตรอาหารผลิตกล้าเชื้อเพื่อลดต้นทุนกระบวนการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

สิรินันท์ สิทธิชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2563
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

Development of Inoculum Production Medium for Cost Reduction of Ethanol Production Process at an Industrial Scale

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

SIRINUN SITTHICHAI

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF

THE REQUIREMENTS FOR MASTER OF SCIENCE

IN ENVIRONMENTAL SCIENCE

FACULTY OF SCIENCE

BURAPHA UNIVERSITY

2020

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ สิรินันท์ สิทธิชัย ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(ผู้ช่วยศาสตรจารย์ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดวงใจ โอชัยกุล)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ภูมิพัฒน์ ภาชนะ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 19 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2563

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

60910100: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ: Saccharomyces cerevisiae SC90, กล้าเชื้อยีสต์

สิรินันท์ สิทธิชัย : การพัฒนาสูตรอาหารผลิตกล้าเชื้อเพื่อลดต้นทุนกระบวนการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม. (Development of Inoculum Production Medium for Cost Reduction of Ethanol Production Process at an Industrial Scale) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์, เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ ปี พ.ศ. 2563.

การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 เพื่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม โดยทำการทดลองในระดับฟลาสก์พบว่าอาหาร BUU 2D ประกอบด้วย (กรัมต่อลิตร) กากน้ำตาล 40 ยีสต์สกัด 5, $(NH_4)_2 SO_4$ 5, K_2HPO_4 3.6, $KH_2 PO_4$ 3 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 ตามลำดับ ความเข้มข้นหัวเชื้อ $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นเซลล์ 346 x 10^6± 2.89 เซลล์ต่อมิลลิลิตรมากกว่าสูตรอาหารดั้งเดิมขององค์การสุราฯ ถึง 4.7 เท่า จากนั้นจึงนำมาขยายขนาดในถังเพาะเลี้ยงขนาด 5 75 และ 750 ลิตรของโรงงานต้นแบบ โดยใช้อาหารสูตร 2D ที่เพิ่มความเข้มข้นกากน้ำตาลเป็น 2 เท่า โดยเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 อัตรากวนผสม 550 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที ผลการเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ความเข้มข้นเซลล์ถึง 330 x 10^6± 0.89 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าที่ระยะเวลา 15 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์มีความสมบูรณ์ แข็งแรง และเหมาะสมสำหรับเป็นหัวเชื้อเริ่มต้นที่ดี เพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 75 ลิตร เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 ชั่วโมง พบว่าให้ความเข้มข้นของจำนวน 410 x 10^6± 8.84 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการนำหัวเชื้อจากถังหมักขนาด 75 ลิตร มาขยายขนาดต่อในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ พบว่าสามารถขยายกล้าเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น 360 x 10^6± 10.61 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลการวิจัยนี้นำไปสู่การทดสอบในระดับอุตสาหกรรมที่องค์การสุราฯ โดยเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อยีสต์ ด้วยอาหารสูตร 2D ในถังหมักขนาด 6 ลิตร เพื่อนำใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับถังหมัก Stater A ขนาด 500 ลิตร (300 ลิตร) เลี้ยงด้วยอาหารสูตรปรับปรุง ประกอบด้วย กากน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร เพื่อปรับสูตรให้มีความเหมาะสมในระดับอุตสาหกรรม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง สามารถได้ความเข้มข้นจำนวนเซลล์ 275x10^6 ± 7.07 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงในถังหมัก Stater A แบบดั้งเดิมขนาด 500 ลิตร (300 ลิตร) ที่สามารถผลิตกล้าเชื้อได้เพียง 5.46 x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำหัวเชื้อที่ได้จากถังหมัก Stater A ถ่ายใส่ถังหมัก Stater B ขนาด 6,500 ลิตร (3,000 ลิตร) ที่ใช้อาหารสูตรเช่นเดียวกับถังหมัก

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

Stater A เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง สามารถวัดจำนวนเซลล์ได้เท่ากับ 433.33 x 10^6±40.72 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการทดลองทำให้ได้ความเข้มข้นกล้าเชื้อสูงกว่าสูตรดั้งเดิมขององค์การสุราฯ ที่สามารถผลิตกล้าเชื้อได้เพียง 4.83 x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาต้นทุนการผลิต พบว่าการพัฒนาสูตรอาหาร BUU 2D ปรับปรุงและปรับปรุงปัจจัยทางกายภาพมีประสิทธิภาพดีกว่าถึง 50 เท่า ดังนั้นการปรับปรุงสูตรอาหารจึงช่วยลดต้นทุนการผลิตและเพิ่มประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมได้เป็นอย่างดี

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

60910100: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M.Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: Saccharomyces cerevisiae SC90, inoculum

SIRINUN SITTHICHAI : DEVELOPMENT OF INOCULUM PRODUCTION MEDIUM FOR COST REDUCTION OF ETHANOL PRODUCTION PROCESS AT AN INDUSTRIAL SCALE. ADVISORY COMMITTEE: KRONGCHAN RATANAPHADIT, Ph.D., SAETHAWAT CHAMSART, Ph.D. 2020.

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

The development of medium for the production of *Seccharomyces cerevisiae* SC90 inoculum for the industrial ethanol production. The cultivation was carried out with three medium formulae for 24 h. It was found that the BUU 2D medium, composed of molasses, yeast extract, $(NH_4)_2SO_4$, K_2HPO_4, KH_2PO_4, and $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ at 40, 5, 3.6, 3 and 1 g/l respectively, with inoculum at $1X10^7$ cell/ml, 35°C, 200 rmp agitation rate, gave the maximum yeast cell growth at a concentration of $364X10^6 \pm 2.89$ cells/ml. The BUU 2D gave 4.7 times higher efficacy than that of the classical formula of the Liquor disillery organization. The BUU 2D medium was selected for the scale up 5 L, 75 L and 750 L (Reactors of ofour pilot plant essay). Then, BUU 2D medium culturing molasses with at 2x condition pH 5.5, at 35°C, 200 rpm agitation rate, pH 5.5, 2vvm aeration rate. The results show that cultivation in 5-L fermenter at and feed that at 15 h, 24 hours gave a cell number concentraton $330\ X10^6 \pm 0.89$ cells/ml is sutable. The cultivation in 75-L fermenter at 15 h, gave the maximum yeast cell growth at a concentration of $410X10^6 \pm 0.89$ cell/ml. The inoculum of 75 L. above was use for fulther 750 L cultivation. giving the maximum yeast cell growth at a concentration of $360X10^6 \pm 10.61$ cell/ml. There results led department to the industrial experiment of Liquor organization. The cultivation were done using BUU 2D-adaptaive media, composed of molasses 80 g/l and $(NH_4)_2SO_4$ 10 g/l in a 6 L fermenter using at the medium for the Starter-A 500-L fermenter (waking volume of 300-L), with 5% v/v inoculum, gave the maximum yeast cell growth at a concentration of $364X10^6 \pm 2.89$ cell/ml at 16 h. After that, the medium above was reactored to the Starter-B 6,000-L fermenter (waking volume of 3,000-L) at 5% v/v inoculum. The rusult show that the Starter-B cell number at a concentration of $433X10^6 \pm 40.72$ cell/ml at 16 h. Compared to the normal getterthan, it could produce cells only $4.83X10^6 \pm 40.72$ cell/ml. The production cost consideretion, developments of medium and

some physical factors resulted 50 times higher efficacy than the classical method. Therefore, the development of inoculcm production medium can reduce the cost and increase the efficacy for industrial ethanol production.

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี เนื่องจากผู้วิจัยได้รับความกรุณาความช่วยเหลือดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดีจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำทางที่ถูกต้อง ตรวจแก้ไข ให้ข้อเสนอแนะ และติดตามความก้าวหน้าในการดำเนินงานวิจัย ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง และขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ผู้ทรงคุณวุฒิ ผศ.ดร.ภูมิพัฒน์ ภาชนะกรรมการสอบปากเปล่า ดร. พัชรนนท์ อมรรัตนพันธ์ กรรมสอบเค้าโครงวิทยานิพนธ์ และผู้เชี่ยวชาญทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สละเวลาตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่อง และให้แนวคิดต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้มีความถูกต้องเหมาะสม และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณองค์การสุรา กรมสรรพสามิต จ.ฉะเชิงเทรา คุณสุนันท์ พูลธนกิจ หัวหน้าฝ่ายผลิต และเจ้าหน้าที่ทุกท่านที่สละเวลาช่วยเหลือ ดูแลตลอดการทำวิจัย จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบคุณ คุณขวัญฤทัย มาลัยเรือง คุณกัญญาวีร์ คูคำ และครอบครัว ญาติพี่น้องทุกท่านที่ให้กำลังใจ ที่คอยช่วยเหลือสนับสนุนทั้งแรงกายแรงใจในระหว่างการทำวิจัยด้วยดีเสมอมา

อนึ่ง ผู้วิจัยหวังว่า งานวิจัยฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่ไม่น้อย จึงขอมมอบส่วนดีทั้งหมดนี้ให้แก่เหล่าคณาจารย์ ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาจนทำให้ผลงานวิจัยนี้เป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง สำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้วิจัยขอน้อมรับผิดเพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนางานวิจัยต่อไป

สิรินันท์ สิทธิชัย

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....ฉ

กิตติกรรมประกาศ .....ซ

สารบัญ .....ฌ

สารบัญภาพ .....ช

สารบัญตาราง .....ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย 2

1.3 สมมติฐานการวิจัย 2

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 2

1.5 ขอบเขตการวิจัย 3

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

2.1 เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม 4

2.2 ความรู้ทั่วไปของยีสต์ 5

2.3 คุณลักษณะของยีสต์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอล 7

2.4 การผลิตกล้าเชื้อยีสต์ 8

2.5 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์ 9

2.8 วัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล 17

2.9 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ 18

2.11 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 20

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย.....22
3.1 วัตถุดิบ.....22
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....22
3.3 สารเคมี.....23
3.4 เชื้อจุลินทรีย์.....24
3.5 วิธีการทดลอง.....24
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....31
ส่วนที่ 1 การพัฒนาสูตรอาหาร ในระดับห้องปฏิบัติการ และโรงงานต้นแบบ โครงการวิจัยผลิตกรดอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ชีวภาพ เพื่องานระดับอุตสาหกรรม ที่มหาวิทยาลัยบูรพา.....31
4.1 ศึกษาจลนศาสตร์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมกล้าเชื้อ.....31
4.2 การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกล้าเชื้อ.....33
4.3 การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....37
4.4 การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 75 ลิตร.....40
4.5 การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ.....43
ส่วนที่ 2 การศึกษาการผลิตกล้าเชื้อในระดับอุตสาหกรรม ที่องค์การสุรา กรมสรรพสามิต.....46
4.6 การทดลองการผลิตกล้าเชื้อยีสต์ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยการใช้ปริมาตร 300 ลิตร ในถังหมักขนาด 500 ลิตร ขององค์การสุราฯ (Starter A).....46
4.7 การทดลองการผลิตกล้าเชื้อยีสต์ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยการใช้ปริมาตร 3,000 ลิตร ในถังหมักขนาด 6,500 ลิตร ขององค์การสุราฯ (Starter B).....50
ส่วนที่ 3 การศึกษาต้นทุนการผลิต.....54
4.8 การศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตของสูตรอาหารเพื่อการผลิตกล้าเชื้อ.....54
บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุปผลการทดลอง.....57
5.1 การศึกษาจลนศาสตร์ของยีสต์ *S.cerevisiae* SC90.....57
5.2 การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกล้าเชื้อ.....57

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

5.3 การขยายขนาดในถังหมักขนาด 5 และ 75 ลิตร 59
5.4 การขยายขนาดในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ 60
5.5 การขยายขนาดในถังหมัก Starter A และ Starter B ระดับอุตสาหกรรม 60
5.6 การศึกษาต้นทุนการผลิต 61
บรรณานุกรม 62
ภาคผนวก 67
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 68
ภาคผนวก ข วิธีวิเคราะห์ 69
ประวัติย่อของผู้วิจัย 72

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2- 1 ลักษณะเซลล์ยีสต์และโครงสร้างที่สำคัญต่าง ๆ ภายในเซลล์.....5

ภาพที่ 2- 2 แสดงกลไกการแตกหน่อของยีสต์.....6

ภาพที่ 2- 3 การเตรียมเชื้อสำหรับถังหมัก.....13

ภาพที่ 2- 4 การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลขององค์การสุรา.....14

ภาพที่ 2- 5 กระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway.....16

ภาพที่ 4- 1 การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90.....32

ภาพที่ 4- 2 การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสม.....35

ภาพที่ 4- 3 การเปลี่ยนแปลงของค่าการเจริญของ *S. cerevisiae* SC90.....36

ภาพที่ 4- 4 การเปรียบเทียบพารามิเตอร์ในการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....38

ภาพที่ 4- 5 การขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร.....39

ภาพที่ 4- 6 การเปรียบเทียบพารามิเตอร์ของการขยายขนาดกล้าเชื้อ
ในถังหมักขนาด 75 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ.....41

ภาพที่ 4- 7 ผลการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมัก 75 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ.....42

ภาพที่ 4- 8 การเปรียบเทียบพารามิเตอร์ของการขยายขนาดกล้าเชื้อ
ในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ.....44

ภาพที่ 4- 9 ผลการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมัก 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ.....45

ภาพที่ 4- 10 ผลการเพาะกล้าเชื้อในถังหมัก Starter A แบบดั้งเดิม.....46

ภาพที่ 4- 11 การเปรียบเทียบผลทุกพารามิเตอร์ของการขยายขนาดกล้าเชื้อ
ในถังหมักขนาด 500 ลิตร ขององค์การสุรา (Starter A) ปรับปรุง.....48

ภาพที่ 4- 12 ผลการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมัก 500 ลิตร ขององค์การสุรา.....49

ภาพที่ 4- 13 ผลการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อในถัง Starter B ดั้งเดิม.....50

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ภาพที่ 4- 14 การเปรียบเทียบผลทุกพารามิเตอร์ของการขยายขนาดกล้าเชื้อ
ในถังหมักขนาด 6,500 ลิตร ขององค์การสุรา (Starter B).....51
ภาพที่ 4- 15 ผลการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมัก 6,500 ลิตร ขององค์การสุรา.....52
ภาพที่ ข- 1 การนับเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์.....69
ภาพที่ ข- 2 กราฟมาตรฐานการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90.....70
ภาพที่ ข- 3 เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้.....71

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 2- 1 องค์ประกอบของกากน้ำตาล 17

ตารางที่ 2- 2 ปริมาณการผลิตเอทานอลจำแนกตามวัตถุดิบ (ล้านลิตร) 19

ตารางที่ 3- 1 การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกล้าเชื้อ 25

ตารางที่ 4- 1 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์การเจริญของ *S. cerevisiae* SC90 32

ตารางที่ 4- 2 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ 34

ตารางที่ 4- 3 ประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 75 และ750 ลิตร
ปริมาตรเพาะเลี้ยง 3 50 และ 500 ลิตร 44

ตารางที่ 4- 4 ประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 500 ลิตร (Starter A)
และ 6,500 ลิตร (Starter B) ปริมาตรเพาะเลี้ยง 300 ลิตร (Starter A)
และ 3,000 ลิตร (Starter B) 53

ตารางที่ 4- 5 เปรียบเทียบต้นทุนส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ
ต่อประสิทธิภาพของการผลิตกล้าเชื้อ 54

ตารางที่ 4- 6 การเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตในถังหมัก Starter A และ
ในถังหมัก Starter B 55

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เอทานอลหรือเอธิลแอลกอฮอล์ที่ถูกนำมาใช้ในประเทศไทยมี 2 ประเภทหลัก ๆ คือ การใช้เป็นแอลกอฮอล์บริสุทธิ์สำหรับการผลิตยาและเวชภัณฑ์ (ตัวทำละลาย) เป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางอุตสาหกรรมอาหาร ใช้ล้างเครื่องมือเครื่องจักรและชิ้นส่วนอิเล็กทรอนิกส์ และอีกประการหนึ่งเป็นแอลกอฮอล์แปลงสภาพที่ถูกนำมาใช้ในการล้างแผล ล้างเครื่องมือแพทย์ อุตสาหกรรมสี (ทินเนอร์ ชแล็ก แล็คเกอร์) เป็นต้น การผลิตเอทานอลในปัจจุบันนิยมผลิตด้วยกระบวนการชีวภาพ โดยนำผลผลิตทางการเกษตร เช่น อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าวฟ่างหวาน และวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น เปลือกไม้ ซังข้าวโพด กากน้ำตาล ฟางข้าว กากอ้อย เป็นต้น มาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิต อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความคุ้มค่าทางด้านเศรษฐศาสตร์ พบว่ากากน้ำตาลและมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบหลักที่ถูกนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล ซึ่งส่งผลต่อการสร้างเสถียรภาพของราคาผลผลิตทางการเกษตรของประเทศ อีกทั้งมีส่วนช่วยเสริมสร้างความมั่นคงทางเศรษฐกิจให้กับเกษตรกร (กระทรวงพลังงาน, 2554) สำหรับในประเทศไทย *Saccharomyces cerevisiae* SC90 เป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่ถูกนำมาใช้เพื่อผลิตเอทานอลขององค์การสุรา กรมสรรพสามิต มาอย่างยาวนาน ทั้งนี้เนื่องจากให้ผลผลิตสูงและทนต่อสภาพแวดล้อมได้ดี ทนต่อเอทานอลและปริมาณน้ำตาลที่สูง สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไร้ออกซิเจน จึงถูกนำมาใช้ศึกษาวิจัยอย่างหลากหลาย เช่น การพัฒนากระบวนการหมักในสภาวะความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (very high gravity: VGH) จากวัตถุดิบหลายชนิด (ลักขณา เหล่าไพบูลย์, กุลเชษฐ์ เพียรทอง, วรวุฒิ ศรีดี, ประสิทธิ์ ใจศิล, มัลลิกา บุญมี และ พัฒนา เหล่าไพบูลย์, 2011)

ประเทศไทยได้ตั้งเป้าในการเพิ่มผลผลิตเอทานอลในปี พ.ศ. 2561 – 2565 เป็น 4.46, 4.98, 5.55, 6.19 และ 6.91 ล้านลิตรต่อวัน ตามลำดับ เพื่อตอบสนองต่อความต้องการเอทานอลที่เพิ่มขึ้น กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน (2562) ดังนั้นกระบวนการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจึงต้องมีการปรับตัวเพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอลให้เพียงพอกับความต้องการของตลาด ทั้งนี้ผลผลิตของเอทานอลที่ผลิตได้นั้นขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ได้แก่ สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล อัตราการให้อากาศ อัตราการกวนผสม คุณสมบัติของถังหมัก ชนิดและคุณลักษณะของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต ตลอดจนกระบวนการใน

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

การเตรียมกล้าเชื้อเพื่อใช้สำหรับการหมักที่เป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างยิ่งเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอลที่สูง ในการเตรียมและขยายขนาดกล้าเชื้อแบบเดิมขององค์การสุราฯ คือ การเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อโดยใช้ความเข้มข้นกากน้ำตาลในระดับห้องปฏิบัติการสูงถึง 250 กรัมต่อลิตร และในถังหมัก starter A ที่ความเข้มข้นกากน้ำตาล 500 กรัมต่อลิตร และถังหมัก starter B ความเข้มข้นกากน้ำตาล 300 กรัมต่อลิตร โดยไม่มีการเติมอากาศ ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง และไม่มีการควบคุมอุณหภูมิ ทำให้ประสบปัญหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้มีปริมาณน้อย หัวเชื้อที่ได้มีความเข้มข้นต่ำกว่าที่ควร คือ ได้เพียง 80 - 100 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งค่าที่ควรจะเป็นคือ ต้องได้มากกว่า 300 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร อีกทั้งอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้อยู่เดิม และสภาวะการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อที่ไม่เหมาะสม ทำให้ระยะเวลาเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อนาน ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อผลผลิตของเอทานอล และต้นทุนในการเพิ่มผลผลิตที่มากขึ้น ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการปรับปรุงกระบวนการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อให้เหมาะสม รวมถึงการพัฒนาสูตรอาหารที่มีโดยใช้สารอาหารราคาถูกและเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เพื่อลดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นการช่วยลดต้นทุนการผลิต อีกทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1. เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตกล้าเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรม สามารถนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อที่ดีต่อการผลิตเอทานอล

1.2.2. เพื่อศึกษาเศรษฐศาสตร์ในกระบวนการหมักเอทานอล ต้นทุนการผลิตทั้งก่อนและหลังการปรับปรุงสูตรอาหาร ทั้งในกระบวนการผลิตกล้าเชื้อในห้องปฏิบัติการจนถึงในระดับอุตสาหกรรม

1.3 สมมติฐานการวิจัย

การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตกล้าเชื้อ โดยการพัฒนาเรื่องหัวเชื้อเริ่มต้น ปริมาณสารอาหารที่เหมาะสม การเติมอากาศ การกวน การควบคุมอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง มีผลโดยตรงต่อการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1. สามารถผลิตกล้าเชื้อยีสต์ที่ความเข้มข้นมากกว่า 300 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

1.4.2. ช่วยลดระยะเวลาและลดต้นทุนการผลิตกล้าเชื้อลงได้

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

1.4.3. ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในกระบวนการผลิตเอทานอล

1.4.4. สามารถนำสูตรอาหารที่มีประสิทธิภาพไปพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมได้จริง

1.5 ขอบเขตการวิจัย

1.5.1 การศึกษาจลนศาสตร์ของยีสต์ เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมกล้าเชื้อ

1.5.2 การศึกษาพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกล้าเชื้อ

1.5.3 การศึกษาการขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อจากสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาตร 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.5.4 การศึกษาการขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อจากสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาตร 50 ลิตร ในถังหมักขนาด 75 ลิตร

1.5.5 การศึกษาการขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อจากสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาตร 500 ลิตร ในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ

1.5.6 การทดลองการผลิตกล้าเชื้อยีสต์ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยใช้ปริมาตร 300 ลิตร ในถังหมักขนาด 500 ลิตร ขององค์การสุราฯ (Starter A)

1.5.7 การทดลองการผลิตกล้าเชื้อยีสต์ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยใช้ปริมาตร 3,000 ลิตร ในถังหมักขนาด 6,500 ลิตร ขององค์การสุราฯ (Starter B)

1.5.8 การศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตของสูตรอาหารเพื่อการผลิตกล้าเชื้อ

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เชื้อจุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม

การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมนิยมยีสต์หลายชนิด เช่น *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum, Schizosacharomyces pombe, Kluyveromyces fragilis, K. marxianus, Candida lusitaniae, C. psuedotropicalis* และ *C. trppicalis* (Panchal, C. J., 1990) แต่ *S. cerevisiae* ได้รับความนิยมมากในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่สูงกว่าร้อยละ 90 ตามทฤษฎี และมีความทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลในกระบวนการหมักได้มากกว่า 40 กรัมต่อลิตร (Azhar et al., 2017) นอกจากนี้ในปัจจุบันมีการนำแบคทีเรีย เช่น *Clostridium sporogenes, C. sphenoides, Zymomonas mobilis* subsp. *pomaceae, Spirochaeta stenosterpta, S. litoralis, Sterptococcus lactis, Sarcina ventriculi, Thermoanaerbacter ethanolicus* และ *Bacillus stearothermophilus* มาใช้ในการผลิต (Roehr, M., Kosaric, N., Vardar-Sukan, F., Pieper, H. J., & Senn, T., 2001) เอทานอลอีกด้วย นอกจากนี้มีรายงานการใช้แบคทีเรียในกระบวนการหมัก ได้แก่ *Z. mobilis* และ *C. boliviensis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนสามารถหมักเซลลูโลสและเจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส แต่พบว่าแบคทีเรียดังกล่าวมีความทนต่อเอทานอลต่ำกว่ายีสต์ (Patrascu, E., Rapeanu, G., & Hopulele, T., 2009)

ในการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์มาใช้สำหรับการผลิตเอทานอลสิ่งแรกที่ต้องคำนึง คือ มีอัตราการหมักเอทานอลสูง ซึ่งเป็นเรื่องที่ควรให้ความสำคัญเป็นอันดับแรก และต้องมีข้อพิจารณาปัจจัยอย่างอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น ความทนเอทานอล ความทนอุณหภูมิสูง ความทนแรงดันออสโมซิสและความสามารถในการตกตะกอน ซึ่งปัจจัยดังกล่าวเหล่านี้จะมีผลโดยตรงต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ กระบวนการหมักระดับอุตสาหกรรมขององค์การสุราได้ใช้ *S. cerevisiae* SC90 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงเมื่อใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ จากการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง *S. cerevisiae* SC90 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5048 โดยใช้น้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเป็นวัตถุดิบ โดยนำยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มาเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนผสม 100 รอบต่อนาที พบว่า *S. cerevisiae* SC90 มีอัตราการใช้น้ำตาลและอัตราการผลิตเอทานอลสูงกว่าสายพันธุ์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในทุกสภาวะการทดลอง ลักขณา เหล่าไพบูลย์ และ

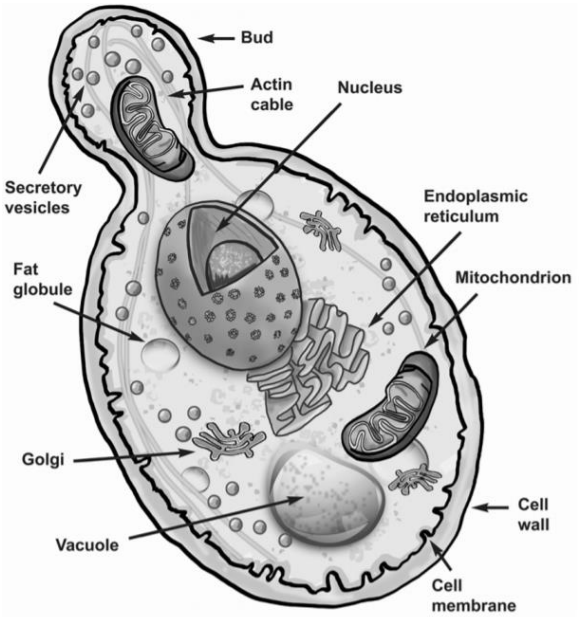
คณะ (2011) และจากรายงานที่นำ *S. cerevisiae* SC90 มาหมักในสภาวะ Very High Gravity (VHG) ยีสต์สามารถทนต่อสภาวะที่มีน้ำตาลมีความเข้มข้นสูงกว่า 200 กรัมต่อลิตร และทนอุณหภูมิได้ถึง 35 องศาเซลเซียส ซึ่งสูงกว่าที่เคยรายงานไว้ว่าอุณหภูมิระหว่าง 30-32 องศาเซลเซียส เป็นช่วงที่เหมาะสม ซึ่งแตกต่างจากรายงาน Pornpukdeewattana, S., Chalearmkit P., & Iamsamang, P. (2014) กล่าวว่า *S. cerevisiae* SC90 สามารถเจริญได้ดีที่อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 340 กรัมต่อลิตร โดยมีอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35 องศาเซลเซียส และให้ผลผลิตเอทานอลที่มีความเข้มข้นถึง 97.03 กรัมต่อลิตร

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

2.2 ความรู้ทั่วไปของยีสต์

2.2.1 สัณฐานวิทยาของยีสต์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

ยีสต์เป็นราชนิดที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยว (unicellular form) มีรูปร่างหลากหลายรูปแบบ เช่น กลมรี และรูปไข่ สำหรับ *Saccharomyces cerevisiae* ลักษณะของเซลล์มีรูปร่างรีความกว้างของเซลล์ 1 - 7 ไมโครเมตร และความยาวของเซลล์ 5 - 10 ไมโครเมตร ปริมาตรเฉลี่ยของเซลล์ที่มีโครโมโซมหนึ่งชุดประมาณ 30 ลูกบาศก์ไมโครเมตร และเซลล์ที่มีโครโมโซมสองชุดมีปริมาตร ประมาณ 55 ลูกบาศก์ไมโครเมตร โดยโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์ที่ แสดงดังภาพที่ 2-1

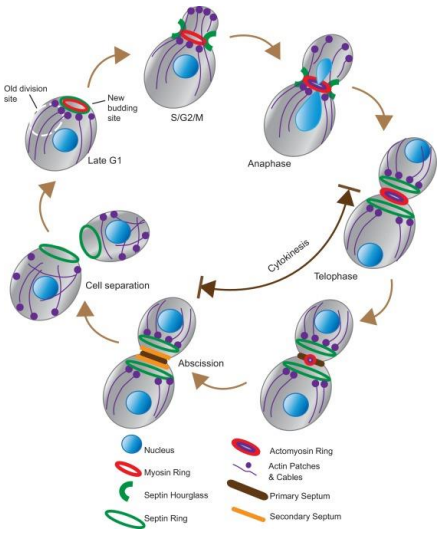


ภาพที่ 2- 1 ลักษณะเซลล์ยีสต์และโครงสร้างที่สำคัญต่าง ๆ ภายในเซลล์
ที่มา : Walker, G. M. & Stewart, G. G. (2016)

2.2.2 การเจริญและการแบ่งเซลล์ของยีสต์

ยีสต์มีการเจริญโดยการแบ่งตัวแบบแตกหน่อ (budding) และการฟิสชัน (fission) หรือการสร้างสปอร์ ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ สำหรับ *S. cerevisiae* ในสภาวะปกติจะสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อเป็นการแบ่งเซลล์ที่มีลักษณะค่อนข้างจำเพาะซึ่งต่างจากการแบ่งเซลล์ของยูคาริโอตชนิดอื่น ๆ การแตกหน่อของยีสต์แบ่งตามตำแหน่งที่เกิดหน่อได้เป็น 3 แบบ คือ การแตกหน่อขั้วเดียว (monopolar budding) การแตกหน่อสองขั้ว (bipolar budding) และการแตกหน่อหลายขั้ว (multipolar หรือ multilateral budding) การแตกหน่อจะเกิดขึ้นในช่วงปลายของการแบ่งเซลล์ในระยะ G1 โดยยีน Cdc 42 จะทำหน้าที่ในการควบคุมกำหนดบริเวณที่เซลล์จะมีการแตกหน่อโดยมีการสร้าง Myosin ring ขึ้นมาหลังจากนั้นยีน Myo 1 จะทำให้เกิดการ polarization ของไมโอซินทำให้เกิด actomyosin ring หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์จนกระทั่งระยะเทโลเฟส เซลล์ทั้งสองจะสร้าง Septum ring ขั้นแรกขึ้นมา ต่อจากนั้นจะเกิด Septum ring ขั้นที่สอง จนทำให้เกิดการแยกของเซลล์ในที่สุด ดังแสดงในภาพที่ 2-2 (Bhavsar-Jog, Y. P., & Bi, E., 2017)

ในบางครั้งอาจพบการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์เพื่อแลกเปลี่ยนระหว่างเซลล์ ทำให้เซลล์ที่ได้มีโครโมโซมสองชุดและเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ จะแตกหน่อเพื่อเพิ่มจำนวนแอสโคสปอร์ได้ แต่เมื่อย้ายลงในอาหารสำหรับสร้างสปอร์ การแตกหน่อจะหยุดและจะเริ่ม สร้างแอสโคสปอร์ การสร้างสปอร์จะใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อม (Knop, 2011; สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)



ภาพที่ 2- 2 แสดงกลไกการแตกหน่อของยีสต์

ที่มา : Bhavsar-Jog & Bi, 2017

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

2.3 คุณลักษณะของยีสต์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์สำหรับการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม เช่น *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum, Schizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces fragilis* แต่สำหรับ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น ดังนั้นในปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงเลือกใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* ลักษณะของยีสต์ที่ดีสำหรับการผลิตเอทานอลมีหลายประการ ดังนี้ (Kosaric, N., A., Wieczorek, G. P., Cosentino, R. J., & Magee., R. J., 1983)

2.3.1 ให้ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) สูง

2.3.2 มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง

2.3.3 มีความทนเอทานอล (ethanol tolerance)

2.3.4 มีความทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)

2.3.5 มีความทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)

2.3.6 มีความสามารถในการจับกลุ่มตกตะกอน (flocculation) ซึ่งขึ้นอยู่กับกระบวนการว่า ต้องการลักษณะการจับกลุ่มตกตะกอนนี้หรือไม่

2.3.7 ทนพีเอชต่ำหรือทนกรด (acid tolerance)

2.3.8 มีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย

รายงานการศึกษาของ Techaparin, A., Thanonkeo, P., & Klanrit, P. (2017) ได้ทำการคัดเลือกยีสต์จาก 234 ไอโซเลส ซึ่งเก็บตัวอย่างเชื้อจากประเทศไทย ลาวและเวียดนาม เพื่อหายีสต์ที่สามารถทนความร้อนได้สูง พบว่ามียีสต์จำนวน 5 สายพันธุ์ ที่สามารถทนอุณหภูมิสูงมากกว่า 45 องศาเซลเซียส และให้ผลผลิตเอทานอลในปริมาณที่สูง ได้แก่ *S. cerevisiae* KKU-VN8, KKU-VN201 และ KKU-VN 27 กับ *Pichia kudriavzevii* KKU-TH33 และ KUU-TH 43 จากนั้นนำมาหมักเอทานอลพบว่า *S. cerevisiae* KKU-VN8 ให้ผลผลิตเอทานอล 72.69 กรัมต่อลิตร หรือ 1.59 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง มากกว่าผลผลิตที่หมักโดยใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5606 ที่ใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรม

กระบวนการคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ทนร้อนนับว่าสำคัญระดับหนึ่งในประเทศโซนร้อนอย่างประเทศไทย เนื่องจากในการหมักจะเกิดความร้อนจึงจำเป็นต้องใช้ระบบหล่อเย็นในการรักษาอุณหภูมิของระบบการหมัก หากยีสต์ที่ทำการคัดเลือกทนอุณหภูมิสูงได้ดี ก็สามารถลดค่าใช้จ่ายในระบบหล่อเย็นได้

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

2.4 การผลิตกล้าเชื้อยีสต์

การเตรียมกล้าเชื้อมีความสำคัญมากต่อการสร้างผลิตภัณฑ์ให้ได้ปริมาณสูง ซึ่งเชื้อที่จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ควรมีลักษณะต่าง ๆ ตามที่ (Stanbury, P. F., Whitaker A., & Hall, S. J., 1999)ได้สรุปไว้ดังนี้

2.4.1 ต้องมีความสมบูรณ์และแข็งแรง ซึ่งจะทำให้ระยะปรับตัวสั้นลง

2.4.2 ต้องมีปริมาณมากพอเพื่อให้ได้ปริมาณกล้าเชื้อที่เหมาะสม

2.4.3 ต้องมีสัณฐานวิทยาที่เหมาะสม

2.4.4 ต้องปราศจากการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น

2.4.5 ต้องยังคงมีความสามารถในการผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูง

กระบวนการที่เหมาะสมเพื่อผลิตกล้าเชื้อที่มีลักษณะข้างต้นเรียกว่า การพัฒนากล้าเชื้อ โดยการพัฒนากล้าเชื้อที่เหมาะสมนั้นมีความจำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นการเพาะเลี้ยงขนาดเล็กหรือใหญ่ ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกล้าเชื้อที่เหมาะสม คือ การเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกล้าเชื้อ โดยความเหมาะสมของอาหารสำหรับการผลิตกล้าเชื้อสามารถวัดได้จากจลนพลศาสตร์ของการเจริญของเชื้อยีสต์ ซึ่งอยู่ในช่วงการเจริญก้าวหน้า (log phase) โดยปกติอาหารสำหรับการผลิตกล้าเชื้อควรเหมือนกับอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อลดเวลาที่เชื้อต้องปรับตัว มีผลให้เวลาของระยะปรับตัวและการหมักลดลง นอกจากนี้ค่าความเป็นกรดด่าง แรงดันออสโมซิส และไอออนที่มีประจุลบมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอัตราการนำสารอาหารเข้าเซลล์โดยทันที ซึ่งอาจมีผลต่ออัตราการรอดชีวิต

ระยะเวลาของการหมักส่งผลต่อสรีรวิทยาของกล้าเชื้อ กล่าวคือเมื่อถ่ายเชื้อลงในการเลี้ยงเชื้อ ในระยะเวลาที่เหมาะสม เซลล์ยีสต์จะมีลักษณะทางสรีรวิทยาที่ถูกต้องเหมาะสม โดยระยะเวลาที่เหมาะสมในการถ่ายเชื้อนี้สามารถหาได้จากการทดลอง และเกณฑ์ที่ถูกนำมาใช้มากที่สุดในการพิจารณาเวลาการหมักที่เหมาะสมสำหรับถ่ายเชื้อ คือ ชีวมวลและพารามิเตอร์ เช่น ปริมาตรของเซลล์ที่อยู่ร่วมกัน (pack cell) น้ำหนักแห้ง น้ำหนักเปียก ความขุ่น การหายใจ ความเข้มข้นสารอาหารที่เหลือ และรูปแบบของสัณฐานวิทยาของเซลล์ ปริมาณกล้าเชื้อที่ใช้โดยทั่วไปอยู่ในช่วงร้อยละ 3-10 ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งการใช้กล้าเชื้อปริมาณมากช่วยลดเวลาของระยะปรับตัว (lag phase) และทำให้ได้ชีวมวลสูงในเวลาที่สั้นลง เป็นผลให้ความสามารถในการผลิตเพิ่มขึ้น

การผลิตกล้าเชื้อเริ่มจากนำเชื้อที่เก็บรักษามาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง จากนั้นจึงนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวหลายขั้นตอนเพื่อเพิ่มชีวมวลให้มากพอที่จะเพาะลงในอาหารในขั้นตอนการผลิต ซึ่งประกอบด้วยการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์บ่มแบบเขย่า 2-3 ขั้นตอน และใน

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 1-3 ซึ่งปัจจัยที่กำหนดในแต่ละขั้นตอนคือ ขนาดของถังหมักในขั้นตอนการผลิต หากการผลิตกล้าเชื้อมีหลายขั้นตอนอาจประสบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ๆ และการเสื่อมของเชื้อที่ใช้ ดังนั้นจึงควรหาจุดที่เหมาะสมของขั้นตอนในกระบวนการผลิตและควรคำนึงถึงความเหมาะสมทางเศรษฐศาสตร์ร่วมด้วย

การผลิตกล้าเชื้อยีสต์สำหรับกระบวนการผลิตขนาดใหญ่ เช่น ในกระบวนการอุตสาหกรรมโดยนำเชื้อที่เก็บรักษาอยู่มาเลี้ยงให้เซลล์มีปริมาณมากพอ โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นไปเป็นลำดับ โดยทั่วไปการเพิ่มปริมาณอาหารเลี้ยงเชื้อใน 2-3 ครั้งแรกมักเพิ่มครั้งละ 10 เท่า เช่น จากเชื้อที่เก็บรักษานำไปเพาะลงในอาหารเหลวปริมาณ 10 มิลลิลิตร จากนั้นเพาะลงในอาหารเหลวปริมาตร 100 มิลลิลิตร และเพิ่มมากขึ้นไปเป็นลำดับ ปริมาณและคุณภาพของกล้าเชื้อมีอิทธิพลต่อการเจริญ และการหมักของยีสต์ ถ้าใช้กล้าเชื้อยีสต์น้อยเกินไปมีผลให้การเจริญของยีสต์ไม่ดี เนื่องจากสัญญาณภายในเซลล์ (intracellular signal) มีไม่เพียงพอที่จะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ ลักษณะที่สำคัญของกล้าเชื้อยีสต์คือระดับของสเตอรอลในเซลล์ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ โดยสเตอรอลจะถูกสังเคราะห์เฉพาะในสภาวะที่มีออกซิเจนดังนั้นหากกระบวนการขั้นต่อไปเป็นกระบวนการที่ปราศจากออกซิเจน เช่น การผลิตเบียร์ จำเป็นต้องทำให้เซลล์ยีสต์มีสเตอรอลมากพอซึ่งอาจทำได้โดยการให้อากาศ เวิร์ต (Wort) ก่อนการเพาะ ทำให้ยีสต์สร้างสเตอรอลมากเพียงพอในช่วงต้นของการหมัก เพื่อสนับสนุนการเจริญของยีสต์ตลอดกระบวนการ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.5 อาหารสำหรับเพาะเลี้ยงยีสต์

การเจริญของเชื้อยีสต์ต้องการสารอาหารเป็นแหล่งพลังงานรวมทั้งธาตุอาหารหลัก ได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส นอกจากนี้ยังต้องการธาตุอาหารบางชนิดในปริมาณมาก ประกอบด้วย แมกนีเซียม และโพแทสเซียม และต้องการสารอาหารบางชนิดในปริมาณต่ำ ได้แก่ แคลเซียม เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี นิเกิล โคบอลต์ และโมลิบดินัม นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการสารประกอบบางชนิดเพื่อทำหน้าที่เป็น growth factor เช่น วิตามิน พิวรีน ไพริมิดีน และ นิวคลีโอไทป์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.5.1 คาร์บอน ภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 50 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งสารประกอบคาร์บอนส่วนใหญ่ของยีสต์มาจากพลังงาน กลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถใช้กลูโคสได้ แต่ในการหมักระดับอุตสาหกรรม ส่วนใหญ่นิยมใช้น้ำตาลมอลโทส ซูโครส ฟรุกโทส ไซโลส และ แลกโทส เนื่องจากกลูโคสมักมีแรงกดดัน (Glucose repression effect) และมีผลยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อ (inhibitory effect) (Azhar et al., 2017)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

2.5.2 ไนโตรเจน เป็นองค์ประกอบของอาหารที่มีปริมาณรองลงมาจากคาร์บอน สารหลายชนิดถูกนำมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียมไนเตรด แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต ระดับอุตสาหกรรมนิยมใช้แอมโมเนียมซัลเฟต เพราะนอกจากจะได้รับไนโตรเจนจากแอมโมเนียแล้วยังได้รับซัลเฟตด้วย ในการเลี้ยงยีสต์ในระดับอุตสาหกรรม ยีสต์จะนำแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุดมาใช้เป็นอันดับแรก แหล่งไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบที่เซลล์ยีสต์ต้องการรองจากคาร์บอนในรูปของอะมิโนไนโตรเจนอิสระ free amino nitrogen (FAN) ประมาณ 140-150 มิลลิกรัมต่อลิตร (O'Connor-Cox, E. S. C., J. Paik., & Ingledew, W. N., 1991) จากการศึกษาพบว่า การเติมไนโตรเจนลงถังหมักช่วยส่งผลในการเพิ่มผลผลิตเอทานอลและมีการใช้น้ำตาลในปริมาณสูงเป็นระยะเวลานาน (Arrizon, J., & Gschaedler, A., 2002)

2.5.3 ซัลเฟอร์ แหล่งซัลเฟอร์ได้จากสารประกอบซัลเฟต ซัลไฟต์ และสารประกอบไทโอซัลเฟต ยีสต์จะนำซัลเฟตเข้าสู่เซลล์เพื่อสร้างซีสเทอีน โดยซัลเฟตจะเปลี่ยนเป็นซัลไฟต์ทันทีแล้วจึงถูกเมทาบอไลซ์ต่อไป

นอกจากนี้สารอาหารบางชนิดที่ยีสต์ต้องการในระดับต่ำยังมีบทบาทสำคัญต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล เช่น การเติมสังกะสี (Zn), ทองแดง (Cu) และ แมงกานีส (Mn) มีผลเชิงบวกต่อกระบวนการหายใจและการเจริญเติบโตใน *S. cerevisiae* ทำให้มวลชีวภาพเพิ่มขึ้นร้อยละ 10 และผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นร้อยละ 20 หลังจากกระบวนการหมัก (Stehlik-Tomas, V., Zetic, V., Stanzer, D., Grba, S., & Vahcic, N., 2004) อีกทั้งพบว่าไอออนของโลหะในอาหารส่งผลต่อปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมัก เนื่องจากไอออนของโลหะมีผลต่ออัตราของปฏิกิริยาในกระบวนการไกลโคไลซิสในการเปลี่ยนไพรูเวทเป็นเอทานอล (Azenha, M., Vasconcelos, M., & Moradas-Ferreira, P., 2000)

2.5.4 สังกะสี ในสิ่งมีชีวิตจะอยู่ในรูป Zn^{2+} มีบทบาทเป็นโคแฟคเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิด เช่น แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) และอัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) เป็นต้น ช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของสังกะสีอยู่ในช่วง 5-15 μM ซึ่งจะช่วยเร่งการเจริญของยีสต์และก่อให้เกิดผลดีต่ออัตราการผลิตเอทานอล (Blackwell et al., 1995) และมีรายงานของ ณภักดิ์ษร คำอิน (2560) พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* SC90 สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 370 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาตรเอทานอลคิดเป็นร้อยละ 10.65 โดยปริมาตรต่อปริมาตร และเมื่อทำการเติมธาตุอาหาร คือ สังกะสี แมงกานีส และทองแดงร่วมกับการเลี้ยงด้วยกากน้ำตาล พบว่าการเติมสังกะสีเพียงอย่างเดียว ช่วยส่งเสริมให้ยีสต์มีการผลิตเอทานอลได้สูงสุดคิดเป็นร้อยละ 11.33 โดยปริมาตรต่อปริมาตร แต่หากมีมากเกินไปจะก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีผลต่อคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ (Liu et al., 1997)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

2.5.5 ทองแดง เป็นองค์ประกอบของโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิด เช่น ไซโทรโครม ซี ออกซิเดส (cytochrome c oxidase) และแลกเตส (lactase) เป็นต้น (Ochiai, 1983) ความเข้มข้นที่เหมาะสมของทองแดงอยู่ในช่วง 1-10 μM จะส่งผลดีต่อการเจริญของเซลล์และกิจกรรมการหมัก (Blackwell et al., 1995) หากมีมากจะเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์

2.5.6 แมงกานีส เซลล์ยีสต์มีความต้องการแมงกานีสที่ความเข้มข้นประมาณ 2-10 μM ซึ่งแมงกานีสมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ยีสต์และเป็นส่วนประกอบของเอนไซม์บางชนิด

2.6 ปัจจัยทางกายภาพที่มีผลต่อสภาวะการเจริญของยีสต์

2.6.1 อุณหภูมิ

ยีสต์ที่ใช้ศึกษาในห้องปฏิบัติการและใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง คือ 20-30 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามบางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำในช่วง 12-15 องศาเซลเซียส บางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงในช่วง 40-50 องศาเซลเซียส ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 35-43 องศาเซลเซียส อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2558) จากการศึกษาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมของ *S. cerevisiae* SC90 พบว่าทนอุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 97.03 กรัมต่อลิตร (Pornpukdeewattana et al., 2014)

2.6.2 ค่าความเป็นกรดด่าง

ปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญต่อการเจริญของยีสต์อีกปัจจัยหนึ่ง คือ ค่าความเป็นกรดด่างซึ่งมีผลต่อปฏิกิริยาของเซลล์น้อยกว่าอุณหภูมิ เพราะเซลล์สามารถควบคุมไฮโดรเจนไอออนได้เป็นอย่างดีเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่างภายนอกเซลล์ โดยค่าความเป็นกรดด่างของอาหารภายนอกอาจมีผลต่อโครงสร้าง และสภาพให้ซึมผ่านได้ของเซลล์ จึงมีบทบาทช่วยลดการปะปนของจุลินทรีย์อื่นในระหว่างการหมัก โดยทั่วไปอาหารที่ใช้สำหรับการเจริญของยีสต์จะมีค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วงประมาณ 4.5-6.5 อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์ (2558) ในระหว่างกระบวนการหมักจะมีสภาวะเป็นกรดเล็กน้อยเนื่องจากมีการขับโปรตอนออกมาจากเซลล์ในกระบวนการขนส่งอาหารเข้าสู่เซลล์ หรือมีการผลิตกรดบางชนิดขึ้น เช่น กรดซัคซินิค กรดแลกติก เป็นต้น (Walker & Stewart, 2016)

2.6.3 ปริมาณออกซิเจน

ออกซิเจนเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการเจริญของยีสต์ เนื่องจากยีสต์ส่วนใหญ่ต้องการอากาศ (aerobic) ยีสต์ต้องการออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในการขนส่งอิเล็กตรอน และทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์ในการสังเคราะห์กรดโอลีอิก

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

(Oleic acid) เออร์กอสเตอรอล (ergorsteral) และกรดนิโคตินิก (nicotinic acid) ผลกระทบของปริมาณออกซิเจนและน้ำตาลในสภาพแวดล้อมต่อเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตของยีสต์ ได้แก่ ผลกระทบพาสเจอร์ (Pasteur effect) มักพบได้เมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะที่มีปริมาณออกซิเจนและน้ำตาลต่ำหรือมีสารอาหารจำกัด ผลกระทบแครบทรี (Crabtree effect) สามารถหมักเอทานอลภายใต้สภาวะที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงและเจริญในสภาวะมีออกซิเจน และผลกระทบคลูเออร์ (Kluyver effect) ซึ่งยีสต์จะไม่ผลิตเอทานอลทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (Walker & Stewart, 2016)

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

2.6.4 คาร์บอนไดออกไซด์

S. cerevisiae ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่ำ สำหรับกระบวนการบางอย่างในเซลล์ เช่น การสร้างสารประกอบสี่คาร์บอน และไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) พบว่าการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เพียงร้อยละ 2.5 ของอากาศทั้งหมด จะสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อากาศร้อยละ 100 แต่ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมที่ดีที่สุดของยีสต์ คือ ร้อยละ 5 ของอากาศทั้งหมด (Lasztity, 2017)

2.7 การผลิตเอทานอล

2.7.1 กระบวนการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมมีวิธีการผลิต 2 วิธี คือ

2.7.1.1 การสังเคราะห์ทางเคมี โดยสังเคราะห์เอทานอลจากเอทิลีน (Ethylene) ด้วยวิธี direct hydration ซึ่งใช้โลหะเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาทำให้ผลผลิตเอทานอลที่ได้มีความบริสุทธิ์สูง แต่มักจะเกิดการปนเปื้อนของโลหะที่ใช้เป็นตัวเร่งในปฏิกิริยา จึงไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้ในการบริโภค อีกทั้งทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีราคาสูงตามไปด้วย (Hidzir, N. S., Som A. M., & Abdullah, Z., 2014)

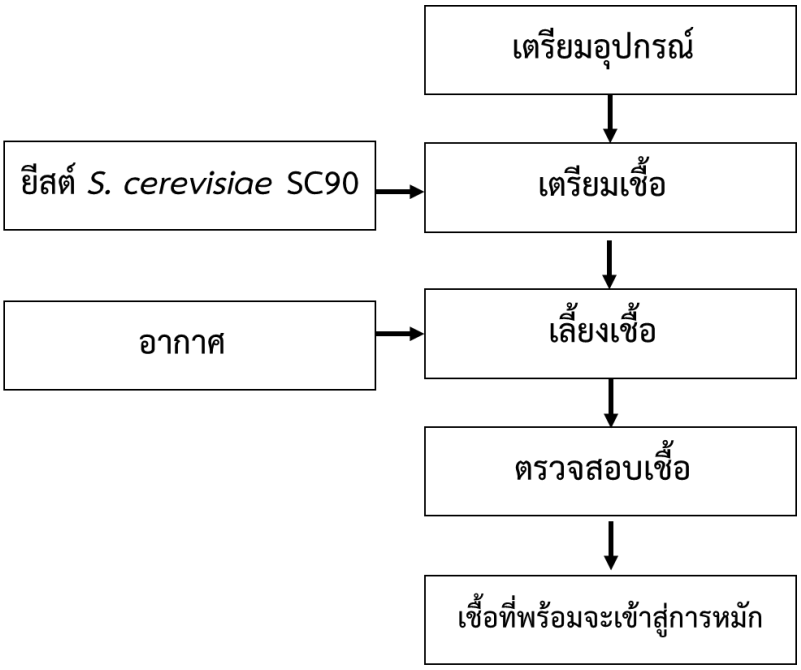
2.7.1.2 การผลิตทางชีวภาพหรือ การผลิตโดยวิธีการหมักทางชีวภาพ ซึ่งเป็นวิธีที่เป็นที่นิยมมากในปัจจุบัน เนื่องจากราคาต้นทุนในการผลิตต่ำ ในกระบวนการหมักจะใช้จุลินทรีย์ทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลจากวัตถุดิบชนิดต่าง ๆ ให้เป็นเอทานอล ผลิตภัณฑ์ที่ได้เหมาะสำหรับใช้เป็นอาหารและสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนได้ (Hidzir et al., 2014)

2.7.2 การผลิตเอทานอลด้วยวิธีการหมักทางชีวภาพ

ในปัจจุบันวิธีการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการหมักเป็นที่นิยมมากในระดับอุตสาหกรรม ในประเทศไทยนิยมใช้วัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาลเป็นหลัก ได้แก่ แป้งมัน สำปะหลัง และกากน้ำตาล ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 4 ขั้นตอนได้แก่ (กระทรวงพลังงาน, 2554)

2.7.2.1 ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ วัตถุดิบที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลจะต้องมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ เช่น กากน้ำตาล แป้งมันสำปะหลัง หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งถือเป็นทางเลือกใหม่ในปัจจุบัน ซึ่งวัตถุดิบที่เป็นโครงสร้างที่มีความซับซ้อนจะต้องทำการย่อย วัตถุดิบเหล่านั้นให้กลายเป็นน้ำตาลเสียก่อน เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้ในกระบวนการหมัก

2.7.2.2 ขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อและการหมัก ขั้นตอนเตรียมกล้าเชื้อเป็นขั้นตอนการเตรียมเชื้อให้มีความเข้มข้นที่มีความเหมาะสม แข็งแรง และมีจำนวนมากเพียงพอสำหรับกระบวนการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 2-3 เมื่อมีความเหมาะสมแล้วจึงนำหัวเชื้อที่ได้ลงในถังหมักที่มีวัตถุดิบ ซึ่งต้องควบคุมปัจจัยต่าง ๆ เช่น การเติมอากาศ ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง เป็นต้น ดังแสดงในภาพที่ 2-4

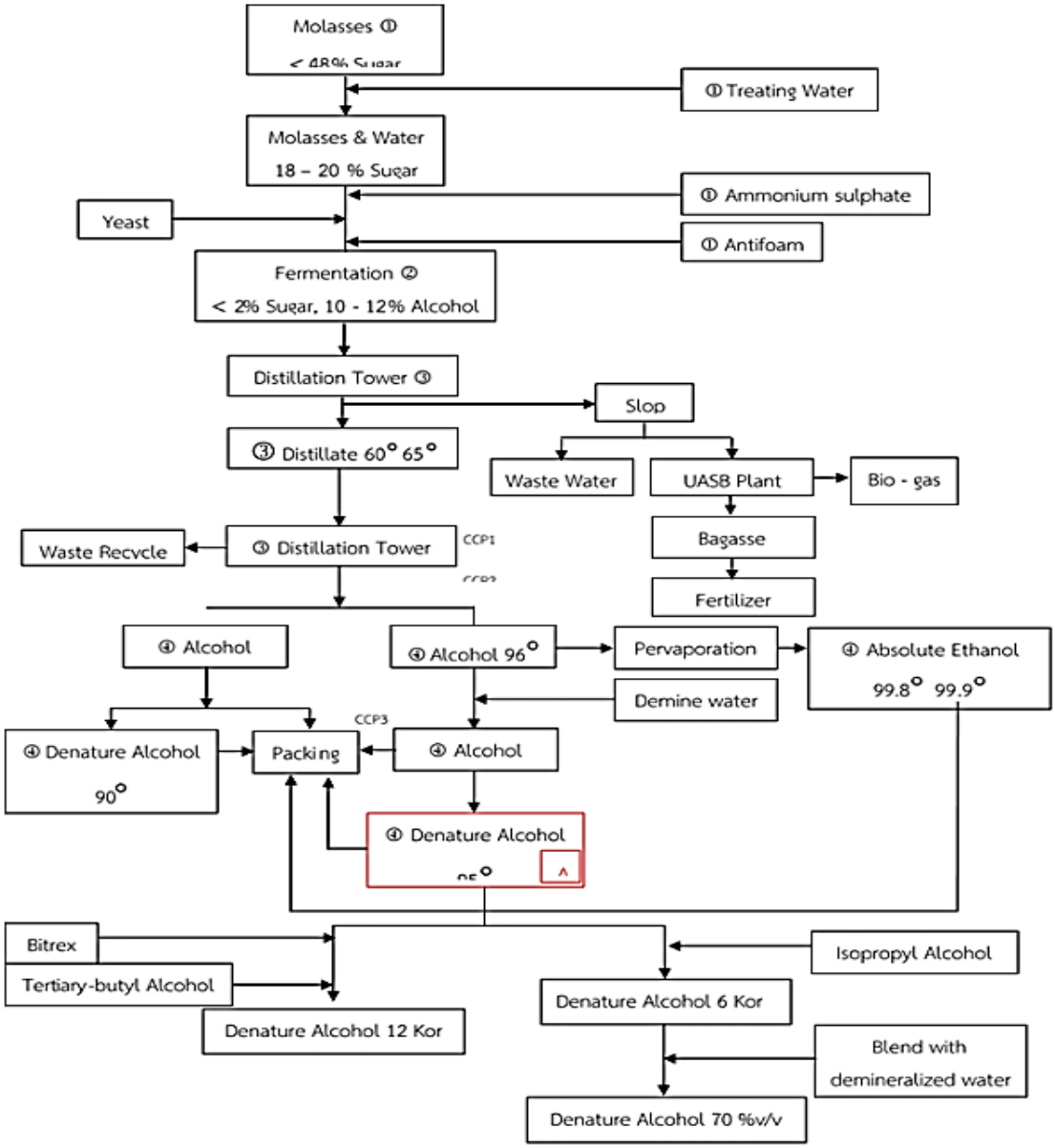


ภาพที่ 2- 3 การเตรียมเชื้อสำหรับถังหมัก
ที่มา : ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย (2560)

สำหรับการเตรียมกล้าเชื้อมีดังนี้ เริ่มต้นจากจัดเตรียมอุปกรณ์จะต้องทำความสะอาดอุปกรณ์ รวมถึงเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ และทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่องนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเตรียมหัวเชื้อจากห้องปฏิบัติการโดยเริ่มทำในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร 50 มิลลิลิตร นำมาเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

รอบ 200 รอบต่อนาที แล้วถ่ายลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 32-35 องศาเซลเซียส เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเพียงพอสำหรับการนำไปเลี้ยงในถังหมัก การเลี้ยงเชื้อในถังหมักต้องเตรียมอาหารให้เพียงพอ และนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายหัวเชื้อที่เตรียมไว้ลงในถังหมัก จากนั้นกวนผสมโดยมีการเติมอากาศ ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการเจริญของเชื้อ จากนั้นเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบปริมาณยีสต์ก่อนนำไปใช้ในกระบวนการหมักต่อไป



ภาพที่ 2- 4 การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลขององค์การสุรา

ที่มา : ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย, 2560

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

2.7.2.3 กระบวนการหมักเอทานอล เป็นกระบวนการที่ยีสต์เปลี่ยนแปลงน้ำตาลให้กลายเป็นแอลกอฮอล์ตามวิถีไกลโคไลซิส หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway จนได้ไพรูเวต ดังภาพที่ 2-5 จากนั้นจะเกิดกระบวนการดึงคาร์บอนไดออกไซด์ออก (decarboxylation) โดยมีเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส (pyruvate decarboxylase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาสร้างแอลซีทาลดีไฮด์ ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล เนื่องจากไม่มีตัวรับไฮโดรเจนจากภายนอก จึงมีขั้นตอนการสร้างและใช้ $NADH_2$ ในขณะที่เอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสจะรีดิวซ์แอลซีทาลดีไฮด์ไปเป็นเอทานอลและเกิดการออกซิไดส์ $NADH_2$ ที่ได้จากวิถี EMP (Piskur et al., 2006 ; สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

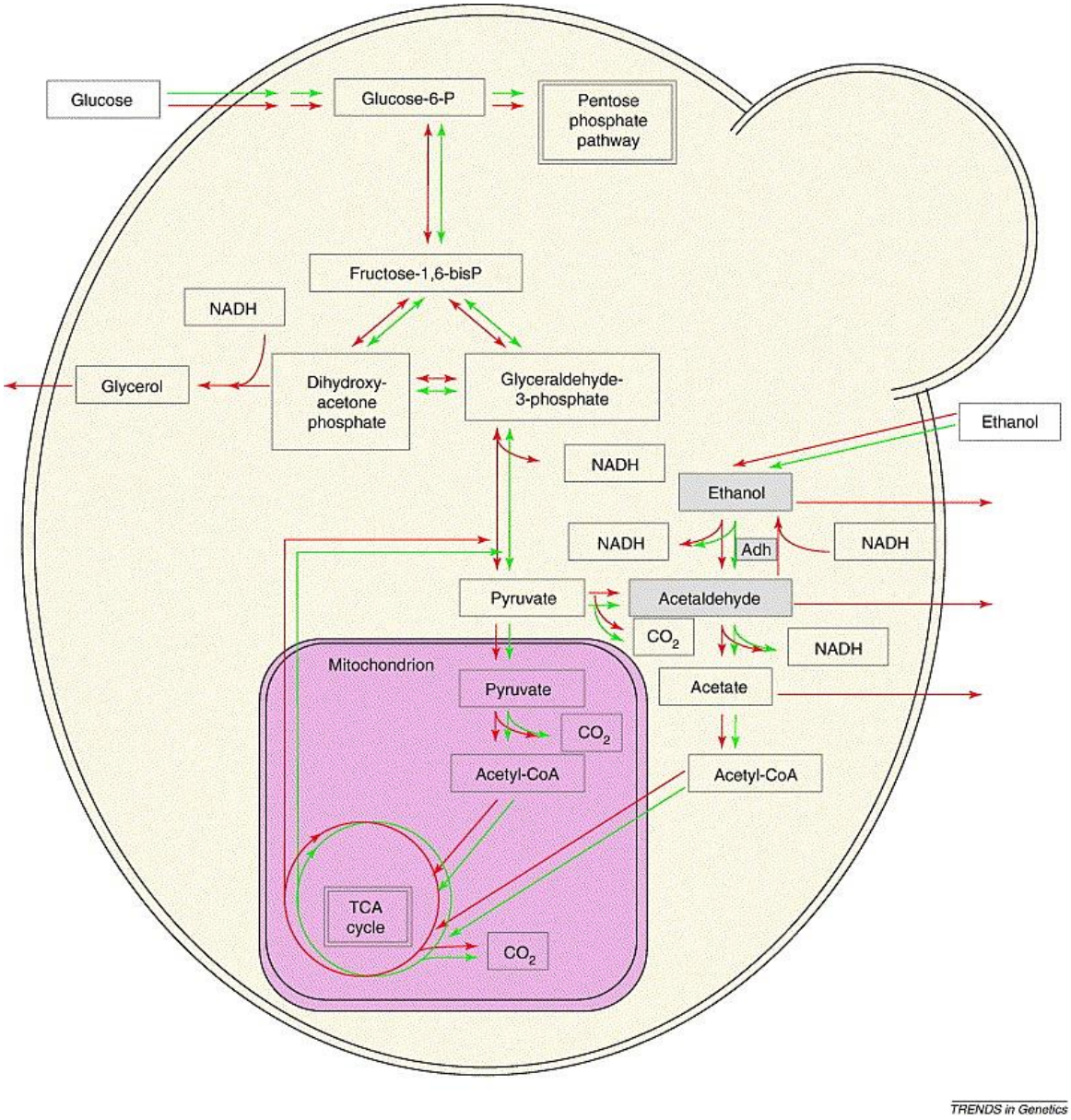
Gay-Lussac ได้เสนอสมการการผลิตเอทานอลที่เกิดจากกระบวนการหมักดังนี้

ปฏิกิริยา $C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \rightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6 \rightarrow 4C_2H_5OH + 4CO_2$

	ซูโครส	น้ำ	กลูโคส	ฟรุกโทส	เอทานอล	คาร์บอนไดออกไซด์
Molar mass balance Kmol x kg/kmol	1 x 342	18	180	180	4 x 46	4 x 44
Mass balance (%)	100				53.80	46.20

จากสมการผลิตเอทานอลที่เกิดจากกระบวนการหมัก พบว่า วัตถุดิบประเภทน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และบีทน้ำตาล ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ประกอบด้วย น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโทส ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสนั้นมีขั้นตอนดังนี้คือ ขั้นแรกน้ำตาลซูโครสจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ได้น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโทสอย่างละโมเลกุล จากนั้นน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโทสจะถูกยีสต์เปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 4 โมเลกุล แต่ผลผลิตเอทานอลที่ได้จะไม่ตรงตามทฤษฎี เนื่องจากเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตอย่างอื่น เช่น กรดอินทรีย์ กลีเซอรอล และแอลกอฮอล์ที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ทำให้ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ได้จะอยู่ในช่วงร้อยละ 90-95 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก (Lavarack, 2003)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101



ภาพที่ 2- 5 กระบวนการ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway

ที่มา : Piskur et al., 2006

2.7.2.4 ขั้นตอนการแยกเอทานอลและทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ เป็นการแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8-12 โดยประมาณ ออกจากน้ำหมักหรือน้ำกากส่า โดยใช้การกลั่นลำดับส่วน เอทานอลที่ได้จะมีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95.6 โดยปริมาตร ในความดันบรรยากาศปกติ (กระทรวงพลังงาน, 2554)

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

2.8 วัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล

วัตถุดิบที่นำมาผลิตเอทานอลในปัจจุบันสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ด้วยกันคือ

2.8.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และบีทน้ำตาล เป็นวัตถุดิบที่จุลินทรีย์โดยเฉพาะยีสต์สามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้โดยตรง ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่นิยมใช้กากน้ำตาล (molasses) ที่เป็นของเหลวเหนียวข้นสีน้ำตาลดำซึ่งเป็นผลพลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล กากน้ำตาลมีองค์ประกอบตามตารางที่ 2-1 การนำวัตถุดิบชนิดนี้มาใช้ไม่ต้องผ่านกระบวนการใด ๆ เพียงนำมาเจือจางให้น้ำตาลมีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 10-20 และปรับค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ในช่วง 4-5 ซึ่งเมื่อผ่านกระบวนการหมักประมาณ 1-3 วัน ที่อุณหภูมิระหว่าง 20-32 องศาเซลเซียส จะให้เอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 6-10 ปริมาตรต่อปริมาตร

ตารางที่ 2- 1 องค์ประกอบของกากน้ำตาล

องค์ประกอบของกากน้ำตาล	ประมาณร้อยละ	ที่มา
น้ำตาลทั้งหมด	49.9	Abubaker และคณะ (2012)
เถ้า	10.25	
พีเอช	5.6	
สารประกอบต่าง ๆ	0.28-0.58	
น้ำตาลซูโครส	35-40	Osunkoya & Okwudinka, (2011)
กลูโคสและฟรุกโทส	15-20	
ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล	28-35	
ของแข็งทั้งหมด	73-80	Patil (2017)
น้ำตาลรีดิวซ์	48.5-52	
Unfermentable sugar	4.0-4.5	

2.8.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าว และเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นวัตถุดิบที่นิยมใช้โดยเฉพาะประเทศการเกษตร โดยวัตถุดิบประเภทนี้ก่อนนำไปสู่กระบวนการหมักต้องนำแป้งมาย่อย (Hydrolysis) ให้กลายเป็นน้ำตาลก่อน การย่อยแบ่งได้เป็น 2 วิธี คือการย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) และการย่อยด้วยเอนไซม์ (enzyme hydrolysis) ซึ่งการย่อยด้วยเอนไซม์

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

เป็นที่นิยมเนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก ควบคุมสภาวะการย่อยได้ง่ายกว่า และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยด้วยเอนไซม์มีความบริสุทธิ์มากกว่า

2.8.3 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (lignocellulose) เป็นการนำวัตถุดิบที่เหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ เช่น ฟางข้าว ซังข้าวโพด เปลือกถั่ว เศษไม้ เป็นต้น วัตถุดิบประเภทนี้มีองค์ประกอบเป็น เซลล์ลูโลส (Cellulose) เฮมิเซลลูโลส (Hemicellulose) และลิกนิน (Lignin) ดังนั้นก่อนนำวัตถุดิบชนิดนี้ไปใช้ในกระบวนการหมักต้องผ่านกระบวนการปรับสภาพ (pretreatment) เพื่อทำลายโครงสร้างของลิกโนเซลลูโลสเสียก่อน ทำให้จุลินทรีย์ย่อยวัสดุได้มากขึ้นในขั้นตอนการย่อย (hydrolysis) ที่ทำการเปลี่ยนเฮมิเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลรีดิวส์ (reducing sugar) เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และอะราบิโนส (Arabinose) ซึ่งเป็นน้ำตาลที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอล ผลผลิตของเอทานอลที่ได้จะขึ้นอยู่กับปริมาณขององค์ประกอบของวัตถุดิบที่ใช้ (Cheng, Hasan, Kumoro, Ling C. F. &, Tham, 2009; รัชพล พะวงศ์รัตน์, 2558)

2.9 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์

2.9.1 ความเข้มข้นของเอทานอล

ความเข้มข้นของเอทานอลเป็นปัจจัยอันดับแรกที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยส่งผลต่อการเจริญของยีสต์และกระบวนการหมักเอทานอล การยับยั้งเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นมีผลให้อัตราการเจริญลดลง ความสามารถในการทนต่อเอทานอลความเข้มข้นสูงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ซึ่งเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ของยีสต์เพียงบางจีนัส ได้แก่ *Saccharomyces* และ *Schizosaccharomyces* โดยพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่มีผลต่อการเจริญ และการหมัก คือร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และร้อยละ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ (Brown, W. F., Klopfenstein, T. J., Merrill, J. K., & McDonnell, M. L., 1981)

2.9.2 ความเข้มข้นของน้ำตาล

ความเข้มข้นของน้ำตาลมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ หากมีกลูโคสหรือแป้งในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นสูง จะทำให้ความสามารถในการหายใจของยีสต์เสียไป หรือที่เรียกว่า Crabtree หรือ Glucose effect ซึ่งเป็นการกดดันเมแทบอลิซึม (Metabolism) ที่เกิดขึ้น เมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นร้อยละ 0.02-0.1 โดยมวล จะทำให้การหายใจ และการหมักเอทานอลถูกยับยั้งอย่างรุนแรง สาวิตรี ลิ่มทอง (2549) การยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้ส่วนหนึ่งเกิดจากแรงดันออสโมซิส ซึ่งเซลล์ยีสต์จะเกิด plasmolysis เมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ร้อยละ 14 น้ำหนักต่อปริมาตร สารอาหาร และโคแฟกเตอร์ สารอาหารบางอย่างอาจมีไม่เพียงพอสำหรับการหมัก ซึ่งรวมถึงแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ เช่น แอมโมเนียมไอออน (Ammonium ion) วิตามิน หรือ แร่ธาตุต่าง ๆ เช่น สังกะสี ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แมกนีเซียม และแคลเซียม การเติมสารอาหารให้กับยีสต์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะเมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้นความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 16 (Rose & Harrison, 1993)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

2.10 อุตสาหกรรมเอทานอลในประเทศไทย

ปี 2562 ความต้องการเอทานอลของไทยอยู่ที่ 4.2 ล้านลิตรต่อวัน เพิ่มขึ้นร้อยละ 24.4 จากระยะเวลาเดียวกับปีก่อน โดยเฉพาะเอทานอลที่ผลิตจากมันสำปะหลัง เนื่องจากต้นทุนการผลิตอยู่ในระดับต่ำ จึงทำให้มีการเร่งผลิตเพื่อสต็อก การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในปลายปี 2562 โดยข้อมูลครึ่งปี 2562 แรกคิดเป็นเอทานอลที่ผลิตจากกากน้ำตาล 554.67 ล้านลิตร จากน้ำอ้อย 42.51 ล้านลิตร และจากมันสำปะหลัง 212.22 ล้านลิตร ดังตารางที่ 2-2 (ธนาคารแห่งประเทศไทย, 2562)

ตารางที่ 2- 2 ปริมาณการผลิตเอทานอลจำแนกตามวัตถุดิบ (ล้านลิตร)

ปี	กากน้ำตาล	น้ำอ้อย	มันสำปะหลัง	รวม
2557	694.2	66.2	297.9	1,058.3
2558	759.2	68.6	346.0	1,173.8
2559	754.36	59.05	400.15	1,213.56
2560	867.31	71.18	522.64	1,461.13
2561	787.67	59.11	344.65	1,191.43
2562*	554.67	42.51	212.22	809.39

หมายเหตุ * ข้อมูลเอทานอลตั้งแต่ มกราคม-มิถุนายน 2562
ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน, 2562

2.11 รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

นพวรรณ ด่านบำรุงตระกูล, ธีรพร ตังเจริญ และ ประมุข ภระกูลสุขสถิตย์ (2014) ได้ทำการศึกษาการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนราคาถูกแทนยีสต์สกัดและเปปโทน หมักโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* SC 90 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเข้มข้นยูเรียที่ 2 4 7 และ 10 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับอาหารดัดแปลง yeast extract peptone dextrose (YPD) ที่เป็นชุดควบคุม พบว่าความเข้มข้นของยูเรียที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ 2 กรัมต่อลิตร เมื่อปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 79.93 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตามความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จากการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนยังน้อยกว่าชุดควบคุมประมาณร้อยละ 3.23

ลักขณา เหล่าไพบูลย์ และคณะ (2011) ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของเชื้อ *S. cerevisiae* SC 90 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5048 เพื่อคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์เอ็กแทร็กซ์มอลท์เอ็กแทร็กซ์ (Yeast extract-Malt extract, YM) และในน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานปลอดเชื้อที่มีปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด (TSS) 15 องศาบริกซ์ พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ในอาหารทั้งสองชนิดไม่แตกต่างกัน เมื่อหมักเอทานอลจากน้ำคั้นปลอดเชื้อที่มีปริมาณ TSS 15 18 และ 24 องศาบริกซ์ (คิดเป็นน้ำตาลทั้งหมด 130 162 และ 225 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) พร้อมทั้งศึกษาการผลิตเอทานอลแบบกะภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีการฆ่าเชื้อ เมื่อทำการหมักในฟลาสก์ป้องกันอากาศเข้าขนาด 500 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวนผสม 100 รอบต่อนาที โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น $2x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่า *S. cerevisiae* SC 90 มีอัตราการใช้น้ำตาลและผลิตเอทานอลสูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ในทุกสภาวะการทดลอง ดังนั้นจึงใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* SC 90 ในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นที่มีปริมาณของแข็งทั้งหมด (TSS) 15 องศาบริกซ์ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยแปรผันวิธีฆ่าเชื้อที่ปนเปื้อน 3 วิธี พบว่าการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที วิธีที่ 1 ให้ประสิทธิภาพของการหมักเอทานอลสูงสุดในแง่ของความเข้มข้น (P) เท่ากับ 60.87 ± 4.58 กรัมต่อลิตร อัตราผลผลิต (Q_p) เท่ากับ 1.27 ± 0.10 กรัมต่อลิตร และผลพลอยได้เอทานอล ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 0.49 ± 4.58 กรัมต่อลิตร

Pornpukdeewattana, Chalearmkit, & Iamsamang (2014) ทำการศึกษาความเหมาะสมของอุณหภูมิในสภาวะการหมักแบบ Very High Gravity (VGH) โดยใช้ *S.cerevisiae* SC 90 ในการหมักโดยใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น $3x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล โดยให้ผลผลิตเอทานอล

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

97.03 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาดังกล่าวจึงสามารถบ่งชี้ได้ว่าเชื้อชนิดนี้มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดี

Laopaiboon, Nuanpeng, Srinophakun, Klanrit, & Laopaiboon (2009) ได้ทำการศึกษาผลของคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในสภาวะ VHG ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 280 กรัมต่อลิตร โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 1.3 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจนเสริมในอาหารเลี้ยงเชื้อ ประกอบด้วยยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร และเปปโตน 5 กรัมต่อลิตร ใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่ากลุ่มที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตให้ผลผลิตเอทานอลต่ำกว่า และเกิดผลพลอยได้ (by product) มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้เติม ดังนั้นการเติม แอมโมเนียมซัลเฟตจึงไม่เหมาะสมนำมาเป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมสำหรับการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวาน

Cao & Liu (2013) ทำการศึกษาประสิทธิภาพของสารอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อยที่ส่งผลต่อการหมักโดยเติมแมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$), โคบอลต์คลอไรด์เฮกตระไฮเดรต ($CoCl_2.4H_2O$) และไบโอติน (Biotin) ในน้ำข้าวฟ่างหวาน ทำการวิเคราะห์ปริมาณที่เหมาะสมด้วยวิธี Plackett-Burman พบว่าการเติมแมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$) โคบอลต์คลอไรด์เฮกตระไฮเดรต ($CoCl_2.4H_2O$) และไบโอติน (Biotin) ปริมาณ 7.70 15.74 และ 11.97 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ช่วยเพิ่มผลผลิตเอทานอลร้อยละ 5.63 ปริมาตรต่อปริมาตร

Duhan, Kumar, & Tanwar (2013) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งที่ได้จากส่วนหัวมันฝรั่งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α- amylase) ความเข้มข้น 300 U/ml โดยใช้ *S. cerevisiae* MTCC-170 ที่มีความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่ความเป็นกรดด่างเท่ากับ 6 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้มีความเข้มข้นร้อยละ 7.89 ปริมาตรต่อปริมาตร นอกจากนี้ยังได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนจาก 3 แหล่งคือ ยีสต์สกัด เปปโทน และแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่าเปปโทนที่ความเข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด สามารถให้ผลผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 7.58 ปริมาตรต่อปริมาตร

Wanderlay, Soares, & Gouveia (2014) ทำการศึกษาความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 0.4 4.0 และ 8.0 กรัมต่อลิตร ของยีสต์ *S. cerevisiae* 2 สายพันธุ์ ได้แก่ UFPEDA 1238 และ UFPEDA 1238 ในการกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกันของชานอ้อย พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อทั้งสองชนิดเท่ากับ 8.0 กรัมต่อลิตร ให้ความเข้มข้นของผลผลิตเอทานอล 37.16 และ 24.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าผลผลิตของเอทานอลแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของเชื้อ

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

บทที่ 3

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบ

กากน้ำตาล ได้รับความอนุเคราะห์จากองค์การสุรา กรมสรรพสามิต เลขที่ 67 หมู่ 4 ตำบลปากน้ำ อำเภอบางคล้า จังหวัดฉะเชิงเทรา

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.2.1 กระบอกตวงขนาด 50, 100 และ 1,000 มิลลิลิตร (Cylinder)

3.2.2 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) บริษัท Olympus ประเทศญี่ปุ่น

3.2.3 ขวดปรับปริมาตรขนาด 1,000 มิลลิลิตร (Volumetricflask) ประเทศเยอรมนี

3.2.4 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmayer flask) บริษัท schott duran ประเทศเยอรมนี

3.2.5 คิวเวต (Cuvette)

3.2.6 เครื่องชั่งสาร 2 ตำแหน่ง (Digital Balances) รุ่น Sartorious cp 224s บริษัท Sartorious Machanics ประเทศเยอรมนี

3.2.7 เครื่องเลี้ยงเชื้อแบบเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (orbital shaker incubator) รุ่น LS35004M บริษัท Lab Tech ประเทศอินเดีย

3.2.8 เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter) รุ่น Mi151 บริษัท Milwaukee ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.2.9 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น CT15E บริษัท Hitachi ประเทศญี่ปุ่น

3.2.10 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น CE1011 1000 series บริษัท Cecil

3.2.11 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น LS-75 บริษัท Jibimed ประเทศจีน

3.2.12 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100-1,000 มิลลิลิตร บริษัท schott duran ประเทศเยอรมนี

3.2.13 เครื่องปั่นผสม (Vortex Mixer)

3.2.14 ปิเปต (Auto pipette) ขนาด 100-1,000 ไมโครลิตร

3.2.15 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol Burner)

3.2.16 ลวดเขี่ยเชื้อ (Needle and Loop)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

3.2.17 ชุดวัดความหวานของน้ำตาล (Refractometer) รุ่น PAL-1 บริษัท ATAGO ประเทศญี่ปุ่น

3.2.18 หลอดทดลอง (Test tube)

3.2.19 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge Tube) ขนาด 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร

3.2.20 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer) บริษัท BOECO ประเทศเยอรมนี

3.2.21 ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 5 ลิตร พร้อมชุดควบคุม รุ่น Biostat B บริษัท B. Braun Biotech International ประเทศเยอรมนี

3.2.22 ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 75 ลิตร พร้อมชุดควบคุม ของโรงงานต้นแบบโครงการวิจัยผลิตกรดอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ชีวภาพ เพื่องานระดับอุตสาหกรรม

3.2.23 ถังหมัก (Fermenter) ขนาด 750 ลิตร พร้อมชุดควบคุม ของโรงงานต้นแบบโครงการวิจัยผลิตกรดอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ชีวภาพ เพื่องานระดับอุตสาหกรรม

3.2.24 ถังหมัก Starter A ขนาด 600 ลิตร พร้อมชุดควบคุม ขององค์การสุราฯ กรมสรรพสามิต

3.2.25 ถังหมัก Starter B ขนาด 6,500 ลิตร พร้อมชุดควบคุม ขององค์การสุราฯ กรมสรรพสามิต

3.3 สารเคมี

3.3.1 กากน้ำตาล (Molasses)

3.3.2 น้ำตาลกลูโคส (Glucose)

3.3.3 ผงยีสต์สกัด (Yeast Extract)

3.3.4 มอลต์สกัด (Malt extract)

3.3.5 เปปโทน (Peptone)

3.3.6 แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

3.3.7 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4)

3.3.8 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)

3.3.9 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)

3.3.10 สารละลายกรดซัลฟูริก 1 นอร์มอล ($1N\ H_2SO_4$)

3.3.11 สารละลายแอมโมเนียมเหลว (NH_3OH)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

3.4 เชื้อจุลินทรีย์

ในการศึกษาใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากองค์การสุรา กรมสรรพสามิต โดยมีขั้นตอนในการเตรียมหัวเชื้อและเก็บรักษาเชื้อ ดังนี้ นำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ซึ่งเก็บรักษาบนอาหารวุ้นเอียง YM ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มาเขี่ยหมดหลอด (full slant) ลงในบัฟเฟิลฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว YM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร (ภาคผนวก) จำนวน 2 ครั้ง เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโต บ่มเชื้อในตู้บ่มแบบเขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในขั้นตอนต่อไป

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การศึกษาจลนศาสตร์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมกล้าเชื้อ

ศึกษาจลนศาสตร์ของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 โดยเตรียมอาหารสูตร YM (ภาคผนวก) ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ในบัฟเฟิลฟลาสก์ (baffled flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 5 ลงในอาหาร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 3 6 9 12 18 24 และ 30 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) วัดการเจริญของเชื้อโดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง นำข้อมูลจลนศาสตร์ที่ได้ไปใช้ในการศึกษาการขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อ

3.5.2 การศึกษาพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกล้าเชื้อ

เตรียมอาหารสูตรองค์การสุราฯ ดั้งเดิม, BUU 2C, BUU 2CD และ BUU 2D (แสดงดังตารางที่ 3-1) ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร ในบัฟเฟิลฟลาสก์ (baffled flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ปล่อยทิ้งไว้ให้เย็น ถ่ายหัวเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงในอาหาร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 200

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 3 6 9 12 18 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) การเจริญของเชื้อโดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เพื่อหาสูตรอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการศึกษาขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อในข้อต่อไป

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ตารางที่ 3- 1 การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกล้าเชื้อ

ส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร)	สูตรองค์การสุราฯ ดั้งเดิม	BUU 2C	BUU 2CD	BUU 2D
กากน้ำตาล	240	80	40	40
ยีสต์สกัด	-	0.5	5	5
แอมโมเนียมซัลเฟต	-	1.0	10	5
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต	-	-	-	3.6
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	-	-	-	3
แมกนีเซียมซัลเฟต	-	0.1	1	1

3.5.3 การศึกษาขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อจากสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาตร 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อโดยเขี่ยเชื้อยีสต์ที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงหมดหลอด (full slant) เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ด้วยอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในบัฟเฟิลฟลาสก์ (baffled flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาถ่ายเชื้อจากฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ลงบัฟเฟิลฟลาสก์ (baffled flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะการเพาะเลี้ยงตามการศึกษาจลนศาสตร์ในข้อ 3.5.1 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลอง

เตรียมอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 3 ลิตร แยกละลายสารแต่ละชนิดจนหมด ก่อนเทผสมกัน จากนั้นเทใส่ถังหมักปรับปริมาตรเป็น 2,850 มิลลิลิตร จัดเตรียมอุปกรณ์

ของถังหมักให้เรียบร้อย จากนั้นทำการปรับเทียบ (calibration) อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรดด่าง พร้อมทั้งตั้งค่า (set points) สภาวะการทำงานต่าง ๆ ของถังหมัก ตามสภาวะที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำถังหมักที่บรรจุอาหารเพาะเลี้ยงแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในกรณีที่อาหารเพาะเลี้ยงที่ศึกษามีการใช้กากน้ำตาลให้แยกนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ติดตั้งถังหมักบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ต่อเข้าเครื่องควบคุม โดยตั้งค่าให้ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตรากวนผสม 550 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) จากนั้นเติมสารอาหารต่าง ๆ ที่แยกนึ่งฆ่าเชื้อไว้ลงในถังหมัก เปิดใบกวนผสมสารอาหารในถังหมัก เป็นเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อให้สารอาหารต่าง ๆ ผสมเข้ากัน พร้อมทั้งเปิดระบบควบคุมสภาวะต่าง ๆ ตามที่กำหนด แล้วเติมหัวเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงในถังหมัก โดยใช้ความเข้มข้นหัวเชื้อร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร คิดเป็นปริมาตร 150 มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับปริมาตรการทำงานในถังหมักทั้งหมด 3 ลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 3 6 9 12 15 18 21 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) วัดการเจริญของเชื้อ โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

3.5.4 การศึกษาการขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อจากสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาตร 50 ลิตร ในถังหมักขนาด 75 ลิตร

เตรียมหัวเชื้อโดยเขี่ยเชื้อยีสต์ที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงหมดหลอด (full slant) เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ด้วยอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในบัฟเฟิลฟลาสก์ (baffled flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ระยะการเพาะเลี้ยงตามการศึกษาจลนศาสตร์ในข้อ 3.5.1 เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตกล้าเชื้อขยายขนาดในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ทำการเตรียมอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร จัดเตรียมอุปกรณ์ของถังหมักให้เรียบร้อย จากนั้นทำการปรับเทียบ (calibration) อุปกรณ์วัดค่าความเป็นกรดด่าง พร้อมทั้งตั้งค่า (set points) สภาวะการทำงานต่าง ๆ ของถังหมัก ตามสภาวะที่ต้องการศึกษา จากนั้นนำถังหมักที่บรรจุอาหารเพาะเลี้ยงแล้วไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในกรณีที่อาหารเพาะเลี้ยงที่ศึกษามีการใช้กากน้ำตาล ยีสต์สกัด และสารกำจัดฟอง ให้แยกนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่อ

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

อุณหภูมิลดลงให้ติดตั้งถังหมักบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ต่อเข้าเครื่องควบคุม โดยตั้งค่าให้ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตรากวนผสม 550 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) จากนั้นเติมสารอาหารต่าง ๆ ที่แยกนึ่งฆ่าเชื้อไว้ลงในถังหมัก เปิดใบกวนกวนผสมสารอาหารในถังหมัก เป็นเวลาประมาณ 5 นาที เพื่อให้สารอาหารต่าง ๆ ผสมเข้ากัน พร้อมทั้งเปิดระบบควบคุมสภาวะต่าง ๆ ที่กำหนด แล้วเติมหัวเชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้ข้างต้นลงในถังหมัก โดยใช้ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร คิดเป็น 150 มิลลิลิตร เมื่อเทียบกับปริมาตรการทำงานในถังหมักทั้งหมด 3 ลิตร เพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์เป็นเวลา 15 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในถังหมักขนาด 75 ลิตร

ในการเตรียมอาหารในถังหมักขนาด 75 ลิตร โดยเตรียมอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากข้อ 3.5.2 แยกละลายสารอาหารแต่ละชนิดละลายจนหมด ก่อนเทผสมกันลงในถังหมักปรับปริมาตรเป็น 30 ลิตร เตรียมอุปกรณ์ของถังหมักให้เรียบร้อย โดยเชื่อมต่อระบบต่าง ๆ เข้าถังหมัก ได้แก่ pH sensor ปั๊มกรดและเบส ระบบเติมอากาศ ทำการต้มฆ่าเชื้อโดยการเติมไอน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำการลดอุณหภูมิของถังหมักลงประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส เติมกากน้ำตาล ยีสต์สกัด และสารกำจัดฟอง ที่แยกฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ลงในถังหมัก จากนั้นตั้งค่า (set points) ให้ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตราการกวนผสม 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) เปิดระบบควบคุมต่าง ๆ ให้สภาวะได้ตามที่กำหนด แล้วเติมกล้าเชื้อยีสต์ร้อยละ 5 คิดเป็นปริมาตร 2.5 ลิตร เมื่อเทียบกับปริมาตรการทำงานในถังหมักทั้งหมด 50 ลิตร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมัก 5 ลิตร ผ่านการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์เป็นเวลา 15 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 3 6 9 12 และ 15 ชั่วโมง เพื่อนำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) วัดการเจริญของเชื้อ โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

3.5.5 การศึกษาการขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อจากสภาวะที่เหมาะสมโดยใช้ปริมาตร 500 ลิตร ในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ

เตรียมอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.2 แยกละลายสารแต่ละชนิดละลายจนหมดก่อนเทผสมกัน จากนั้นเทใส่ถังหมักปรับปริมาตรเป็น 450 ลิตร จัดเตรียมอุปกรณ์ของถังหมักให้เรียบร้อย ทำการต้มฆ่าเชื้อโดยการเติมไอน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และทำการลดอุณหภูมิของถังหมักลงประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส เติมกากน้ำตาล ยีสต์สกัดและสารกำจัดฟอง ที่แยกฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ตั้งค่า (set points) ให้

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตราการกวนผสม 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) เปิดระบบควบคุมต่าง ๆ ให้สภาวะได้ตามที่กำหนด เติมกล้าเชื้อยีสต์ปริมาตร 25 ลิตร ที่ได้จากถังหมักขนาด 75 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 750 ลิตร จากข้อ 3.5.4 และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 3 6 9 12 และ 15 ชั่วโมง เพื่อนำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) วัดการเจริญของเชื้อ โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

3.5.6 การทดลองการผลิตกล้าเชื้อยีสต์ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยการใช้ปริมาตร 300 ลิตร ในถังหมักขนาด 500 ลิตร ขององค์การสุราฯ (Starter A)

เตรียมอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากข้อ 3.5.2 หัวเชื้อโดยเขี่ยเชื้อยีสต์ที่เจริญอยู่บนผิวหน้าอาหารวุ้นเอียงหมดหลอด (full slant) เพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ด้วยอาหาร ปริมาตร 50 และ 100 มิลลิลิตร ในบัฟเฟิลฟลาสก์ (baffled flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการทดลอง

ในการเตรียมอาหารสูตรที่ดีที่สุดจากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 4.5 ลิตรลงในถังหมักขนาด 6 ลิตร ทำการเทียบค่า (calibration) sensors ต่าง ๆ คือ pH sensor และ dissolved oxygen sensor ให้ทำก่อนนำถังหมักไปนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเมื่อเทียบค่าแล้ว ให้เสียบ sensors ต่าง ๆ เข้ากับถังหมักจากนั้นบรรจุอาหารแล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในกรณีที่อาหารเพาะเลี้ยงที่ศึกษามีการใช้กากน้ำตาล ยีสต์สกัด และสารกำจัดฟอง ให้แยกนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เมื่ออุณหภูมิลดลงให้ติดตั้งถังหมักบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ต่อเข้าเครื่องควบคุม โดยตั้งค่าให้ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตรากวนผสม 800 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) จากนั้นเติมสารอาหารต่าง ๆ ที่แยกนึ่งฆ่าเชื้อไว้ลงในถังหมัก เปิดระบบควบคุมต่าง ๆ ให้สภาวะได้ตามที่กำหนด แล้วเติมกล้าเชื้อยีสต์ปริมาตร 400-450 มิลลิลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 4-5 ปริมาตรต่อปริมาตร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์แล้วทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้กล้าเชื้อที่สมบูรณ์เหมาะสมสำหรับการใช้งานต่อไป

จากนั้นเตรียมอาหารที่เหมาะสมจากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 300 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 500 ลิตร โดยทำการเติมน้ำลงในถังหมักประมาณ 250 ลิตร จากนั้นเติมกากน้ำตาล 24 ลิตร กวนผสมให้เข้ากัน จัดเตรียมอุปกรณ์ของถังหมักให้พร้อม โดยเชื่อมต่อระบบต่าง ๆ เข้าถังหมัก ได้แก่ pH sensor, ปั๊มกรดและเบส, ระบบเติมอากาศ ทำการต้มฆ่าเชื้อโดยการเติมไอน้ำร้อนที่ความ

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ดัน 1.5 บาร์ อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิของถังหมักลง ทำการตั้งค่า (set points) ให้ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตราการกวนผสม 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) เติมกล้าเชื้อปริมาตร 9 ลิตร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมัก 6 ลิตร จำนวน 2 ใบ เลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 4 8 12 และ 16 ชั่วโมง เพื่อนำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) การเจริญของเชื้อ โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และค่าความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

3.5.7 การทดลองการผลิตกล้าเชื้อยีสต์ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยการใช้ปริมาตร 3,000 ลิตรในถังหมักขนาด 6,500 ลิตร ขององค์การสุราฯ (Starter B)

เตรียมอาหารที่เหมาะสมจากขั้นตอนการศึกษาสูตรอาหารในข้อ 3.5.2 ปริมาตร 3,000 ลิตร ลงในถังหมัก 6,500 ลิตร โดยทำการเติมน้ำลงในถังหมักประมาณ 1,500 ลิตร จากนั้นเติมกากน้ำตาล กวนผสมให้เข้ากัน จัดเตรียมอุปกรณ์ของถังหมักให้พร้อม โดยเชื่อมต่อระบบต่าง ๆ เข้าถังหมัก ได้แก่ pH sensor ปั๊มกรดและเบส ระบบเติมอากาศ ทำการต้มฆ่าเชื้อโดยการเติมไอน้ำร้อนที่ความดัน 1.5 บาร์ อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิของถังหมักลง ทำการตั้งค่า (set points) ให้ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตราการกวนผสม 100 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) เติมกล้าเชื้อปริมาตร 300 ลิตร ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมัก 500 ลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 4 8 12 และ 16 ชั่วโมง เพื่อนำตัวอย่างที่ได้ไปวัดค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) วัดการเจริญของเชื้อ โดยการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ และวัดความขุ่นของเซลล์โดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พร้อมทั้งบันทึกผลการทดลอง

3.5.8 การศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตของสูตรอาหารเพื่อการผลิตกล้าเชื้อ

ทำการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างวิธีการผลิตกล้าเชื้อแบบดั้งเดิมขององค์การสุรากับวิธีการผลิตกล้าเชื้อแบบใหม่ที่ปรับปรุง โดยเปรียบเทียบต้นทุนราคาระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละสูตรที่ใช้ในการศึกษา เพื่อคัดเลือกอาหารที่มีความคุ้มทุนมากที่สุดสำหรับการขยายกล้าเชื้อและเปรียบเทียบต้นทุนแรงงานและเวลาในการเตรียมกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมัก

3.5.8.1. เปรียบเทียบต้นทุนส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของการผลิตกล้าเชื้อ ในการศึกษาการขยายขนาดกล้าเชื้อ

ส่วนประกอบ (กรัมต่อลิตร)	สูตรองค์การสุราฯ ดั้งเดิม	BUU 2C	BUU 2CD	BUU 2D
กากน้ำตาล				
ยีสต์สกัด				
แอมโมเนียมซัสเฟต				
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต				
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต				
แมกนีเซียมซัลเฟต				
ราคารวมต่อหน่วย				

3.5.8.2. เปรียบเทียบในขั้นตอนการผลิตกล้าเชื้อเริ่มต้น (Starter A และ Starter B) สามารถนำไปใช้ในการผลิตเอทานอลได้ โดยใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมกับสูตรดั้งเดิมขององค์การสุราฯ

ต้นทุนการผลิต Starter A	ผลิตกล้าเชื้อแบบเดิม	สูตรอาหารที่พัฒนา
ต้นทุนวัตถุดิบ (บาท/500ลิตร)		
ต้นทุนแรงงาน (บาท/คน/วัน)		
ต้นทุนไฟฟ้า (บาท/ชั่วโมง/วัน)		
รวมราคาต้นทุนการผลิต		

ต้นทุนการผลิต Starter B	ผลิตกล้าเชื้อแบบเดิม	สูตรอาหารที่พัฒนา
ต้นทุนวัตถุดิบ (บาท/5,000ลิตร)		
ต้นทุนแรงงาน (บาท/คน/วัน)		
ต้นทุนไฟฟ้า (บาท/ชั่วโมง/วัน)		
รวมราคาต้นทุนการผลิต		

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

บทที่ 4

ผลการวิจัย

ส่วนที่ 1 การพัฒนาสูตรอาหาร ในระดับห้องปฏิบัติการ และโรงงานต้นแบบ โครงการวิจัยผลิตกรดอินทรีย์และผลิตภัณฑ์ชีวภาพ เพื่องานระดับอุตสาหกรรม ที่มหาวิทยาลัยบูรพา

4.1 ศึกษาจลนศาสตร์ของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเตรียมกล้าเชื้อ

จากการศึกษาจลนศาสตร์เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเตรียมกล้าเชื้อ โดยการเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารสูตร YM (ภาคผนวก) ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในบัฟเฟิลฟลาสก์ (baffled flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร ถ่ายหัวเชื้อยีสต์ที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 5 ลงในอาหาร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการเจริญของยีสต์ พบว่า เชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ log phase ในช่วง 6 ถึง 18 ชั่วโมงแรก ที่เวลา 18 ชั่วโมงมีความเข้มข้นเซลล์สูงสุด 227 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นการเจริญจะลดลงเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) สามารถวัดค่าความขุ่นของเซลล์และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ที่เวลา 0 ชั่วโมง ค่าความขุ่นของเซลล์และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.49 และ 0.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงค่าความขุ่นของเซลล์และค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเท่ากับ 13.95 และ 8.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ เริ่มต้น 0 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 5.67 องศาบริกซ์ หลังจากนั้นปริมาณของแข็งที่ละลายได้จะลดลงและคงที่ และหลังจากสิ้นสุดที่ 30 ชั่วโมง เท่ากับ 2.00 องศาบริกซ์ และค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 3.90-5.00 ดังแสดงในภาพที่ 4-1

จากข้อมูลการทดลองนำมาคำนวนค่าพารามิเตอร์ทางจลนศาสตร์ พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ_x) เท่ากับ 0.29 กรัมต่อชั่วโมง อัตราการเจริญจำเพาะ (μ_N) เท่ากับ 0.40 เซลล์ต่อชั่วโมง อัตราผลิตมวลเซลล์ (Q_X) เท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และอัตราเพิ่มจำนวนเซลล์ (Q_N) เท่ากับ 13.13 $x10^6$ เซลล์ต่อลิตรต่อชั่วโมง (ตารางที่ 4-1)

ตารางที่ 4- 1 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์การเจริญของ *S. cerevisiae* SC90 ที่เวลา 12 ชั่วโมง

X (g/l)	**N** ($x10^6$ cells/ml)	μ_x (h^{-1})	μ_N (h^{-1})	Q_x (g/l/h)	Q_N ($x10^6$cell/l/h)
6.19 ± 0.28	157.50 ± 6.61	0.29	0.40	0.52	13.13

X คือ ปริมาณมวลเซลล์ คิดจากน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

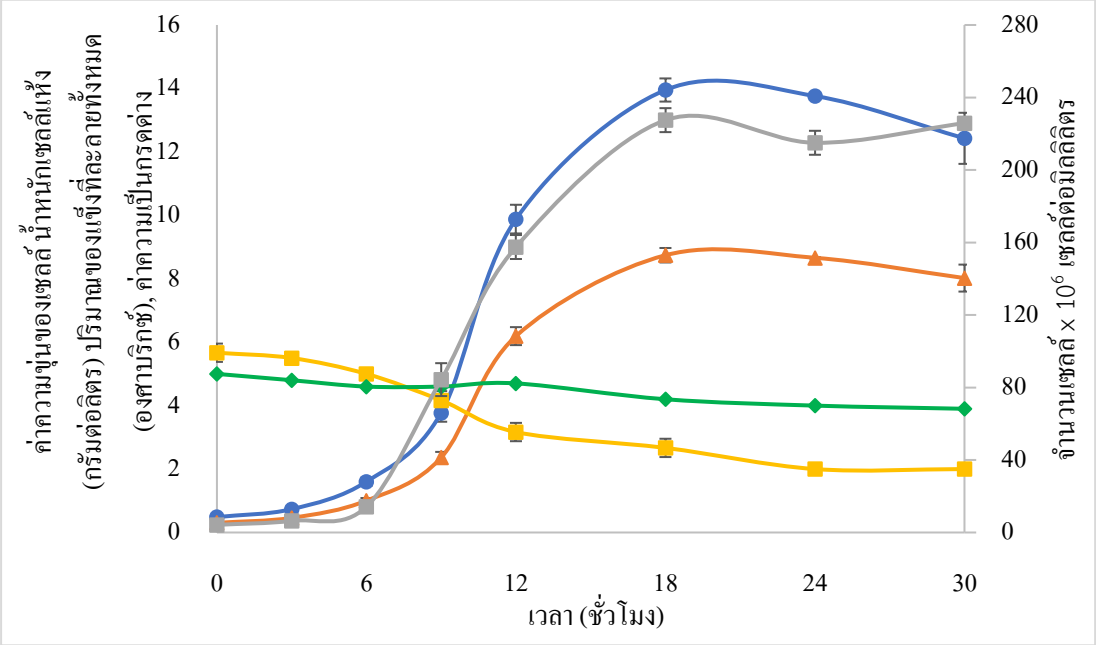
N คือ ปริมาณเซลล์ คิดจากจำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

μ_x คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (กรัมต่อชั่วโมง)

μ_N คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (เซลล์ต่อชั่วโมง)

Q_X คือ อัตราการผลิตมวลเซลล์ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

Q_N คือ อัตราเพิ่มจำนวนเซลล์ (เซลล์ต่อลิตรต่อชั่วโมง)



ภาพที่ 4- 1 การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 โดยตรวจสอบ ค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) จำนวนเซลล์ $x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) ค่าความเป็นกรดด่าง

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

จากการศึกษาจลนศาสตร์ของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกล้าเชื้อที่มีความแข็งแรงและกำลังเจริญอย่างรวดเร็ว มีปริมาณกล้าเชื้อมากเพียงพอ โดยเชื้อที่อยู่ในระยะการเจริญก้าวหน้า (log phase) เพื่อให้มีระยะปรับตัว (lag phase) อาหารใหม่สั้นที่สุด โดยระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับผลิตกล้าเชื้อ คือ 12 ชั่วโมง เพื่อใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อในการทดลองขั้นต่อไป

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

4.2 การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกล้าเชื้อ

ในการพัฒนาสูตรอาหารจากสูตรดั้งเดิมขององค์การสุราฯ และสูตรอาหารพัฒนาจำนวน 3 สูตร ได้แก่ BUU 2C, BUU 2CD และ BUU 2D โดยมีส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3-1 นำอาหารในแต่ละสูตรการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SC90 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในบัฟเฟิลฟลาสก์ (baffled flask) ขนาด 500 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรดั้งเดิมขององค์การสุราฯ เป็นชุดควบคุม จากนั้นถ่ายหัวเชื้อที่มีความเข้มข้นเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่ผ่านการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 5 ลงในอาหาร นำไปเลี้ยงในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และเขย่าที่อัตราเร็ว 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 3 6 9 12 18 และ 24 ชั่วโมง เพื่อตรวจสอบการเจริญของยีสต์

อาหารสูตรดั้งเดิมขององค์การสุราฯ เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 5.48 ± 0.33 3.44 ± 0.21 กรัมต่อลิตร และ 73.33 x 10^6± 3.82 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งให้ปริมาณเซลล์น้อยมาก จะเห็นได้ว่าระยะปรับตัว (lag phase) นานประมาณ 12 ชั่วโมง และมีระยะทวีคูณ (log phase) ที่ 18-24 ชั่วโมง ดังนั้นจึงพัฒนาสูตรอาหาร BUU2C จากสูตรอาหารดั้งเดิมขององค์การสุราฯ โดยลดปริมาณกากน้ำตาลเหลือ 80 กรัมต่อลิตร หรือคิดปริมาณน้ำตาลที่แท้จริงประมาณ 40 กรัมต่อลิตร แล้วเพิ่มยีสต์สกัด 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมปริมาตร 0.1 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 15.83 ± 1.10 9.90 ± 0.97 กรัมต่อลิตร และ 233.33 x 10^6 ± 0.97 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าระยะปรับตัว (lag phase) ลดลง และมีระยะทวีคูณ (log phase) ที่ 6-12 ชั่วโมง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ลดลงจาก 5.33 เหลือ 2.5 องศาบริกซ์ ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 4.7-5.4 ซึ่งจะเห็นได้ว่าปริมาณของแข็งยังเหลือในปริมาณค่อนข้างสูง จึงพัฒนาต่อเป็นอาหารสูตร BUU2CD โดยลดปริมาณกากน้ำตาลลงเหลือ 40 กรัมต่อลิตร หรือคิดปริมาณน้ำตาลที่แท้จริงประมาณ 20 กรัมต่อลิตร และเพิ่มปริมาณยีสต์สกัด แอมโมเนียซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟต 10 เท่า จากสูตรอาหาร BUU2C เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความขุ่นของเซลล์

น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 18.97 ± 0.38 11.88 ± 0.24 กรัมต่อลิตร และ 247.5 x 10^6 ± 0.50 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าระยะปรับตัว (lag phase) สั้นลง และมีระยะทวีคูณ (log phase) ที่ 6-12 ชั่วโมง ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ลดลงจาก 4.33 เหลือ 2.55 องศาบริกซ์ ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ระหว่าง 5.3-4.7 ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรดด่างมีความแปรผันอยู่ จึงทำการพัฒนาอาหารเป็นสูตร BUU2D ซึ่งประกอบด้วย กากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 3.6 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 1.0 กรัมต่อลิตร เลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 22.4 ± 0.28 14.04 ± 0.18 กรัมต่อลิตร และ 346 x 10^6 ± 0.89 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จะเห็นว่าระยะปรับตัว (lag phase) สั้นลง มีระยะทวีคูณ (log phase) ตั้งแต่ 6 ชั่วโมงเป็นต้นไป ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ลดลงจาก 5 เหลือ 3.5 ค่าความเป็นกรดด่างอยู่ในช่วง 5.3-5.1 (ภาพที่ 4-2 และภาพที่ 4-3)

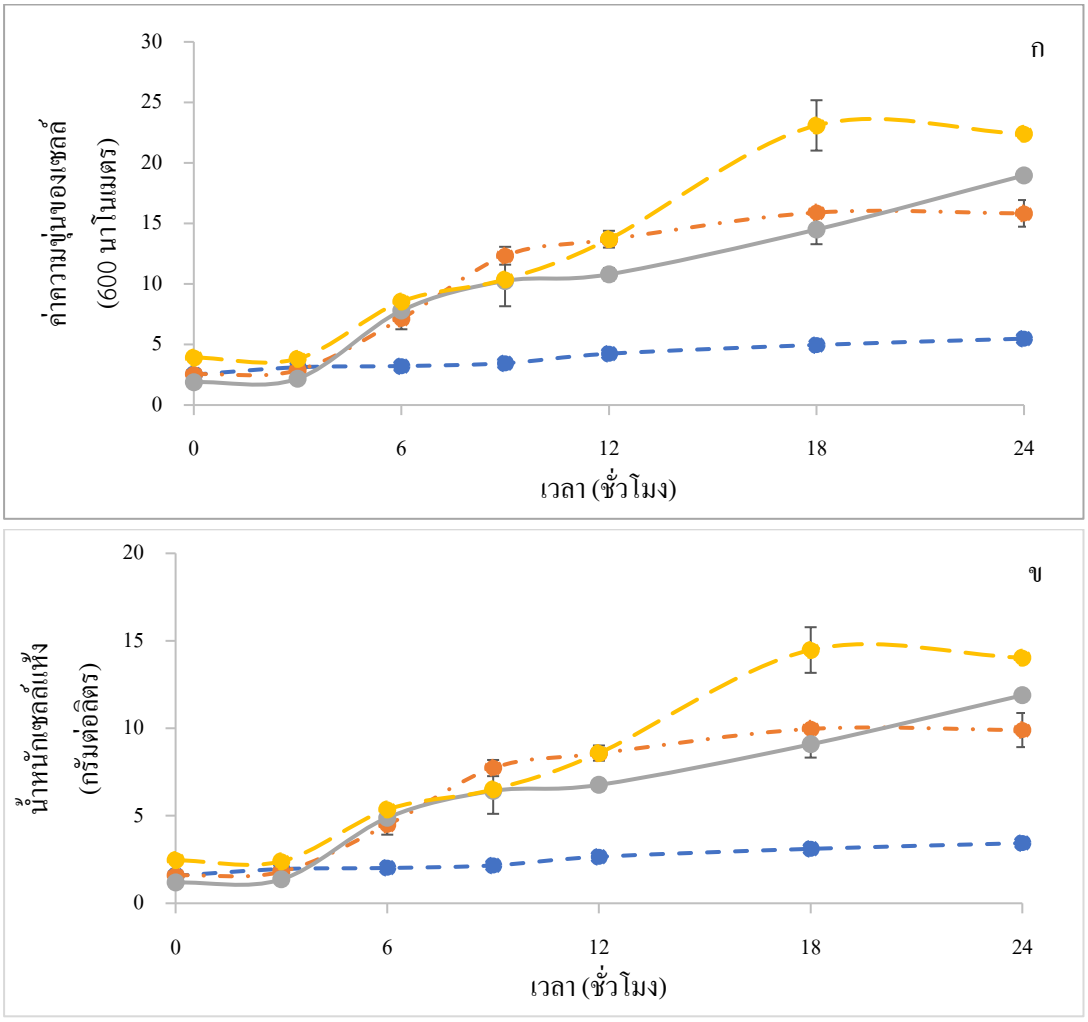
ตารางที่ 4- 2 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่เวลา 0 และ 24 ชั่วโมง

พารามิเตอร์	เวลา ชั่งโมง	สูตรอาหาร			
		ดั้งเดิม	BUU 2C	BUU 2CD	BUU 2D
ความขุ่นของเซลล์	0	2.51±0.02	2.55±0.02	1.89±0.26	3.39±0.26
	24	5.48±0.33	15.83±1.10	18.97±0.38	22.4±0.28
น้ำหนักเซลล์แห้ง	0	1.57±0.01	1.16±0.01	1.19±0.05	2.46±0.16
(กรัมต่อลิตร)	24	3.46±0.21	9.90±0.97	11.88±0.24	14.04±0.18
ความเข้มข้นเซลล์ x10^6	0	2.23±0.01	2.00±0.50	2.50±0.50	2.00±0.87
(เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	24	73.33±3.82	223.33±7.70	247.50±0.50	346.00±0.89
ปริมาณของแข็งที่	0	16.00	5.33	4.33	5.00
ละลายได้ (องศาบริกซ์)	24	9.00	2.50	2.55	3.50

จากผลการศึกษาโดยพิจารณาค่าพารามิเตอร์ (ตารางที่ 4-2) พบว่าอาหารสูตร BUU 2D ที่พัฒนาขึ้น สามารถทำให้หัวเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 1.5 เท่าจากสูตร BUU2C และเพิ่มขึ้น 4.7 จากอาหารสูตร

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

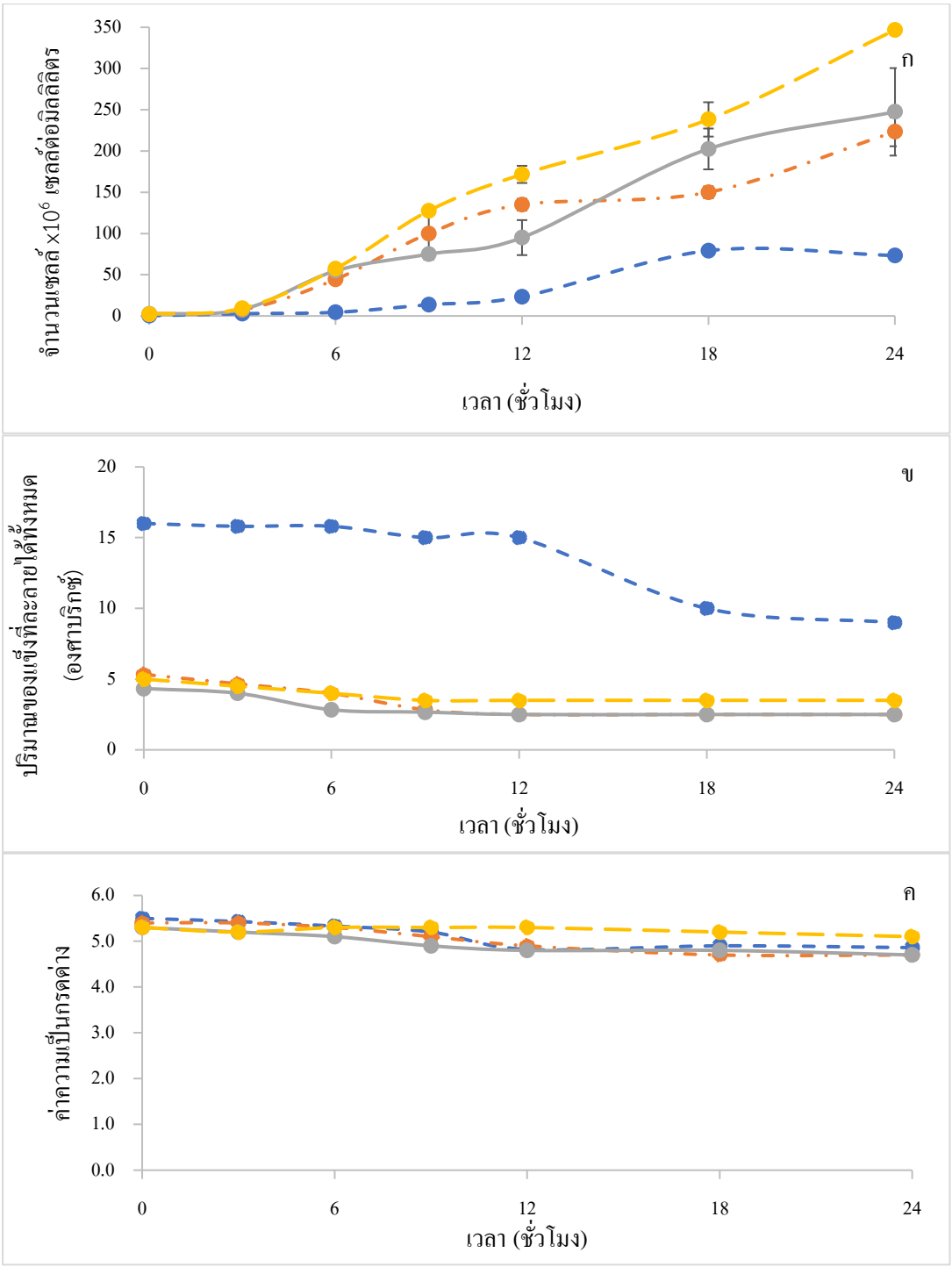
ดั้งเดิมขององค์การสุราฯ แต่เนื่องจากการเจริญในฟลาสก์ถูกจำกัดโดยปริมาณของอากาศที่มีอยู่เพียงในฟลาสก์เท่านั้น ดังนั้นจึงใช้อาหารสูตร BUU 2D มาศึกษาระดับขยายขนาดเพื่อนำผลการศึกษาไปใช้ในการเตรียมหัวเชื้อในระดับอุตสาหกรรม



ภาพที่ 4- 2 การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยแสดงค่าความขุ่นของเซลล์ (ก) และ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ข) ซึ่งประกอบด้วยอาหาร 4 สูตร คือ

สูตรองค์การสุรา ดั้งเดิม — BUU 2C — BUU 2CD — BUU 2D

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101



ภาพที่ 4- 3 การเปลี่ยนแปลงของค่าจำนวนเซลล์ x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ก), ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (องศาบริกซ์) (ข) และค่าความเป็นกรดด่างในการเจริญของ *S. cerevisiae* SC90 ที่เลี้ยงในสูตรอาหารต่าง ๆ กันคือ

สูตรองค์การสุรา ดั้งเดิม — BUU 2C — BUU 2CD — BUU 2D

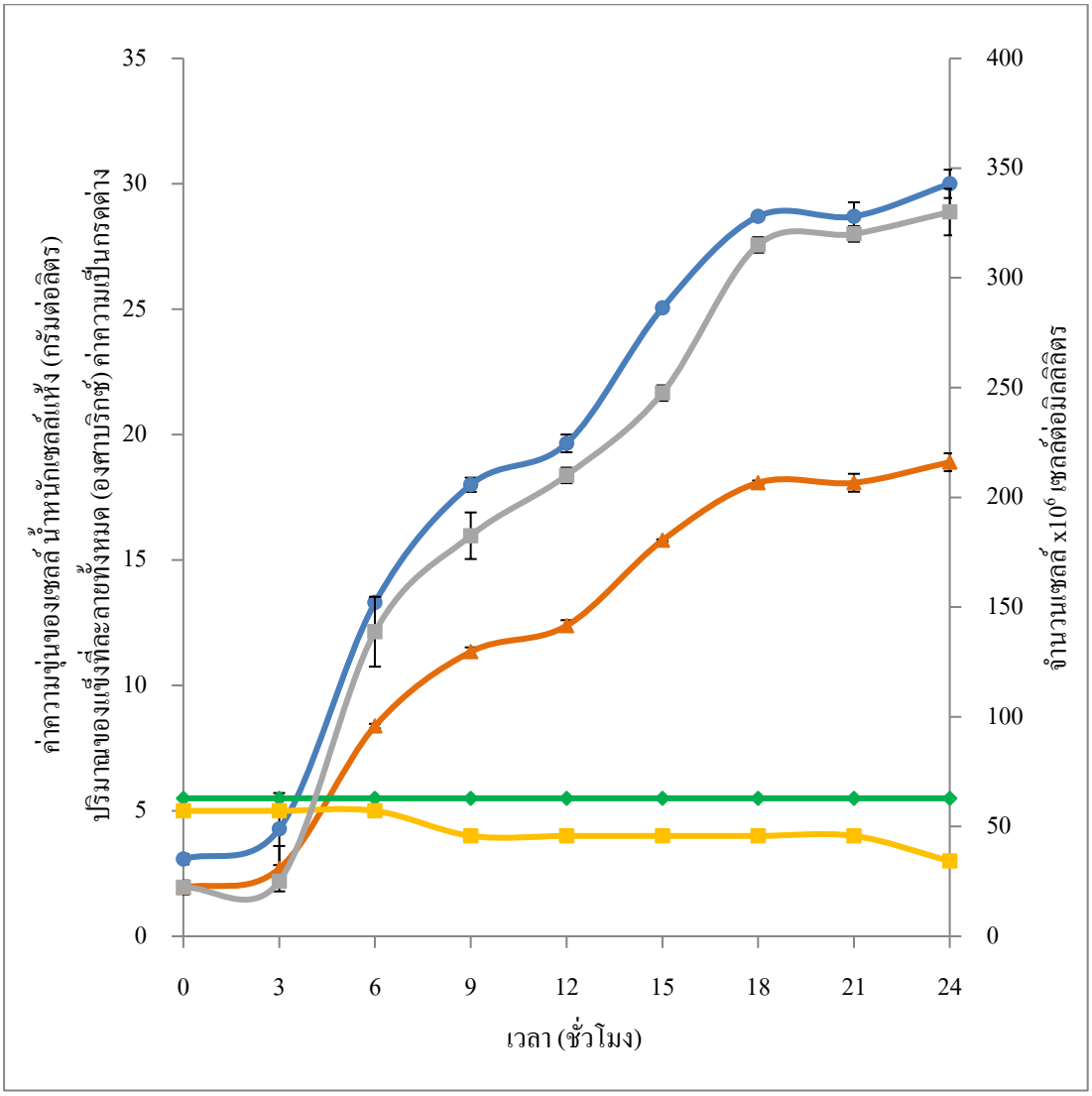
3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

4.3 การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกล้าเชื้อ พบว่าอาหารสูตร BUU 2D เหมาะสมผลิตกล้าเชื้อ เนื่องจากมีจำนวนเซลล์เพิ่มสูงกว่าอาหารสูตรอื่น และมากกว่าอาหารสูตรดั้งเดิมขององค์การสุรา ฯ ถึง 4.7 เท่า ดังนั้นจึงนำอาหารสูตร BUU2D มาใช้ในการเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดปริมาตร 3 ลิตร ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยจะเพิ่มปริมาณกากน้ำตาลเป็น 2 เท่า (คิดเป็นกากน้ำตาลประมาณ 80 กรัมต่อลิตร) เนื่องจากถังหมักมีประสิทธิภาพมากกว่าการเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์ ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตรากวนผสม 550 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

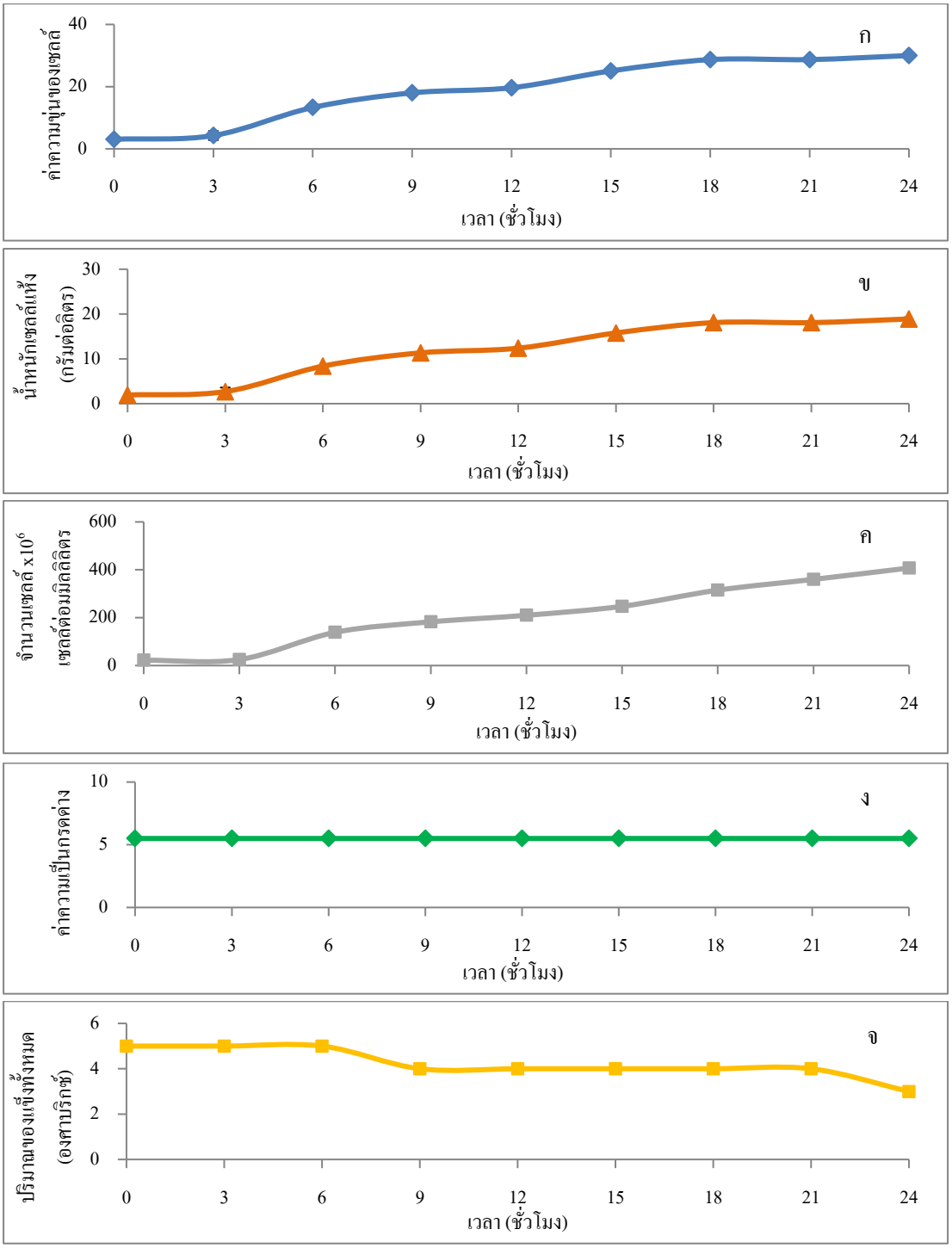
จากการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* SC90 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่าเชื้อเข้าสู่ระยะการเจริญก้าวหน้า (log phase) ในช่วง 6 -15 ชั่วโมง และหลังจาก 18 ชั่วโมงเข้าสู่ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) พบว่าที่เวลาเริ่มต้นเท่ากับ 0 ชั่วโมง ความขุ่นของเซลล์ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์ มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 3.08 ± 0.20 1.93 ± 0.12 กรัมต่อลิตร และ $22.25 \times 10^6 \pm 3.18$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ความขุ่นของเซลล์ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์ มีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ 30.00 ± 0.56 18.08 ± 0.35 กรัมต่อลิตร และ $330 \times 10^6 \pm 5.08$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4-1 ซึ่งการเจริญเติบโตมีการเพิ่มขึ้นจำนวนเซลล์ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น แต่จะถูกจำกัดด้วยสารอาหารที่ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งละลายได้ พบว่าเริ่มต้นสามารถวัดได้ 5.0 องศาบริกซ์ และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการวัดได้ 3.0 องศาบริกซ์ ซึ่งจากการทดลองทำให้ทราบว่าเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกล้าเชื้อในระดับการขยายขนาดอยู่ระหว่าง 9 -15 ชั่วโมง และที่เวลา 15 ชั่วโมง มีความชันของกราฟสูงที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ระยะเวลาที่ 15 ชั่วโมงในการศึกษาในระดับการขยายขนาดอื่น ๆ ต่อไป (ภาพที่ 4-4 และ 4-5)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101



ภาพที่ 4- 4 การเปรียบเทียบพารามิเตอร์ในการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดย ค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) จำนวนเซลล์ x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) และ ค่าความเป็นกรดด่าง

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101



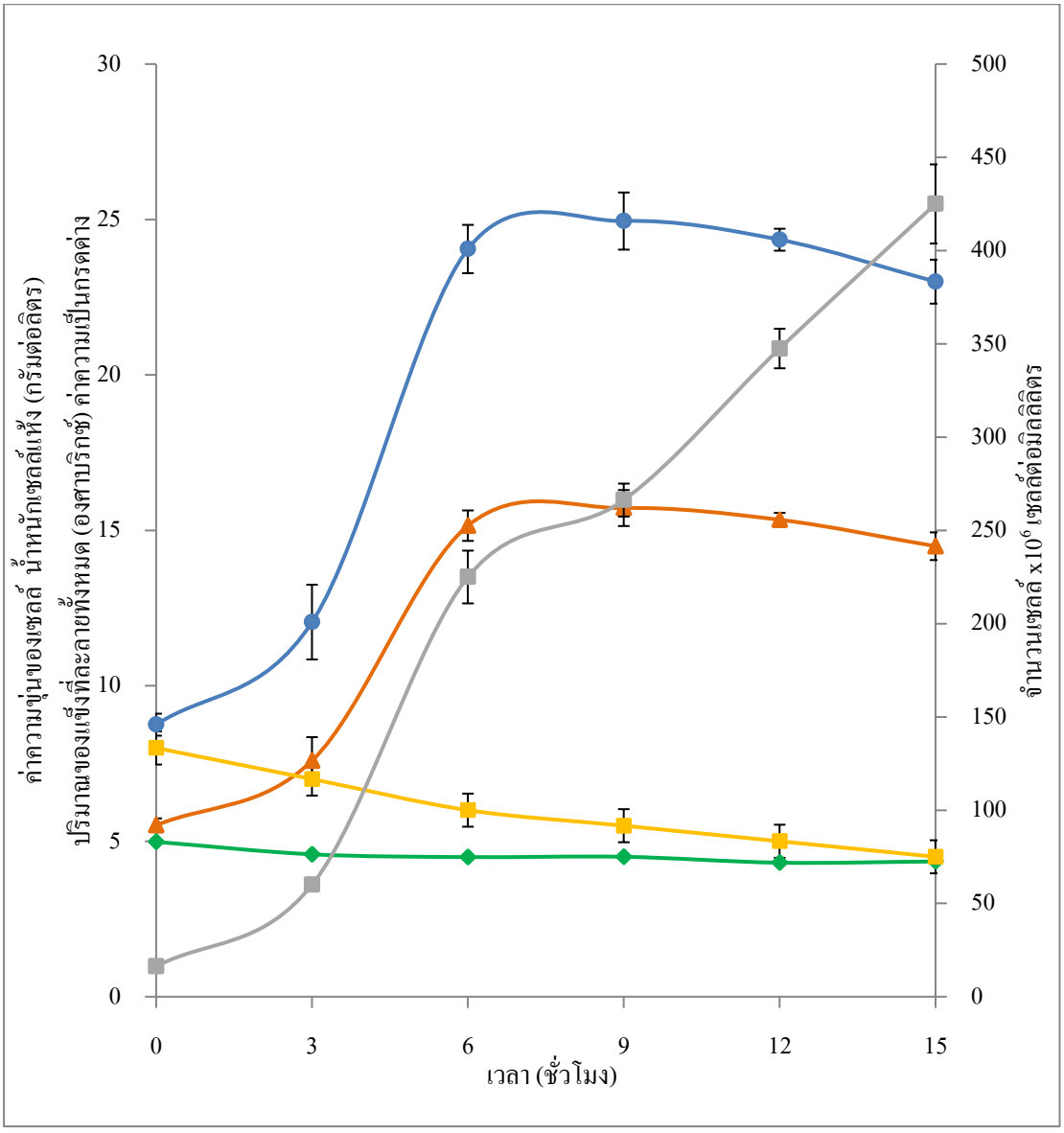
ภาพที่ 4- 5 การขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 5 ลิตร ในแต่ละพารามิเตอร์ โดย ค่าความขุ่นของเซลล์ (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ข) จำนวนเซลล์ $x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร(ค) ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) (ง) และ ค่าความเป็นกรดด่าง (จ)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

4.4 การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 75 ลิตร

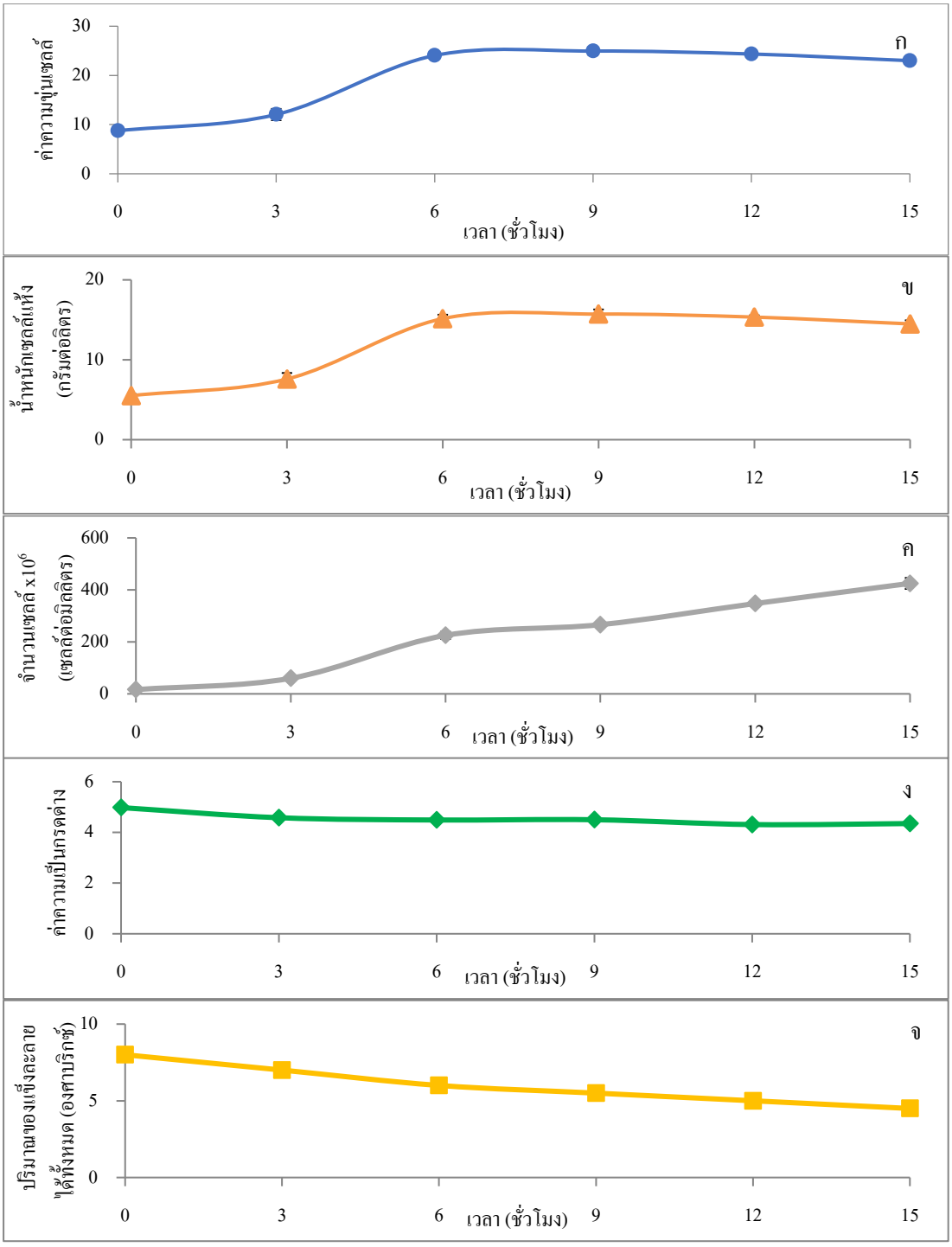
การผลิตกล้าเชื้อในระดับขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมัก 5 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3 ลิตร เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่เวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นนำกล้าเชื้อมาขยายขนาดผลิตกล้าเชื้อปริมาตร 50 ลิตร ในถังหมักขนาด 75 ลิตร ด้วยอาหารสูตร BUU 2D โดยเพิ่มความเข้มข้นขององค์ประกอบต่าง ๆ 2 เท่า เนื่องจากถังหมักที่ใช้มีขนาดใหญ่และมีประสิทธิภาพในการทำงานมากกว่าเดิม จึงมีการเพิ่มความเข้มข้นของอาหารเพื่อให้สัมพันธ์กับปัจจัยดังกล่าว เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตรากวนผสม 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) แล้วเติมกล้าเชื้อร้อยละ 5 คิดเป็นปริมาตร 2.5 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 ชั่วโมง พบว่าเชื้อเข้าสู่ระยะการเจริญก้าวหน้า (log phase) ในช่วง 3 ชั่วโมงแรกเป็นต้นไป เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ที่เวลาเริ่มต้น 0 ชั่วโมง ความขุ่นของเซลล์ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์ มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 8.75 ± 0.35 5.51 ± 0.22 กรัมต่อลิตร และ $16.25 \times 10^{6} \pm 0.35$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ความขุ่นของเซลล์ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับเวลามีค่าเท่ากับ 23.00 ± 0.71 14.49 ± 0.45 กรัมต่อลิตร และ $410 \times 10^{6} \pm 8.84$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แต่เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งละลายได้ พบว่าเริ่มต้นสามารถวัดได้ 8.0 องศาบริกซ์ และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการวัดได้ 4.5 องศาบริกซ์ (ภาพที่ 4-6 และภาพที่ 4-7)

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101



ภาพที่ 4- 6 การเปรียบเทียบพารามิเตอร์ของการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 75 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ ในการเลี้ยงเชื้อ 50 ลิตร โดย ค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) จำนวนเซลล์ x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) และ ค่าความเป็นกรดด่าง

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101



ภาพที่ 4- 7 ผลการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมัก 75 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ ในแต่ละพารามิเตอร์ ค่าความขุ่นของเซลล์ (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ข) จำนวนเซลล์ x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ค) ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) (ง) และ ค่าความเป็นกรดด่าง (จ)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

4.5 การขยายขนาดการผลิตกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ

จากการศึกษาการขยายขนาดกล้าเชื้อทั้งสองขนาดข้างต้น เชื้อสามารถเจริญได้ดีและกล้าเชื้อที่ได้แข็งแรงดี จึงมาทำขยายขนาดในถังหมัก 750 ลิตร โดยใช้กล้าเชื้อปริมาตร 25 ลิตร จากถังหมักขนาด 75 ลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 5 ของปริมาตรอาหาร เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการเพาะเลี้ยงปริมาตร 500 ลิตรของโรงงานต้นแบบ โดยใช้อาหารสูตร BUU 2D ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเพิ่มขึ้น 2 เท่า เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ควบคุมค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตรากวนผสม 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) เป็นเวลา 15 ชั่วโมง พบว่าเชื้อเข้าสู่ระยะการเจริญก้าวหน้า (log phase) ในช่วง 3 ชั่วโมงแรกเป็นต้นไป เมื่อทำการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ที่เวลาเริ่มต้นเท่ากับ 0 ชั่วโมง ความขุ่นของเซลล์ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์ มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 6.20 ± 0.42 3.91 ± 0.27 กรัมต่อลิตร และ 34.25 x 10^6 ± 1.06 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 15 ชั่วโมง ความขุ่นของเซลล์ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์เพิ่มมากขึ้นสัมพันธ์กับเวลา มีค่าเท่ากับ 24.50 ± 2.12 15.44 ± 1.34 กรัมต่อลิตร และ 360 x 10^6 ± 10.61 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณของแข็งละลายได้ พบว่าเริ่มต้นสามารถวัดได้ 5.0 องศาบริกซ์ และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการวัดได้ 4.0 องศาบริกซ์ (ภาพที่ 4-8 และภาพที่ 4-9)

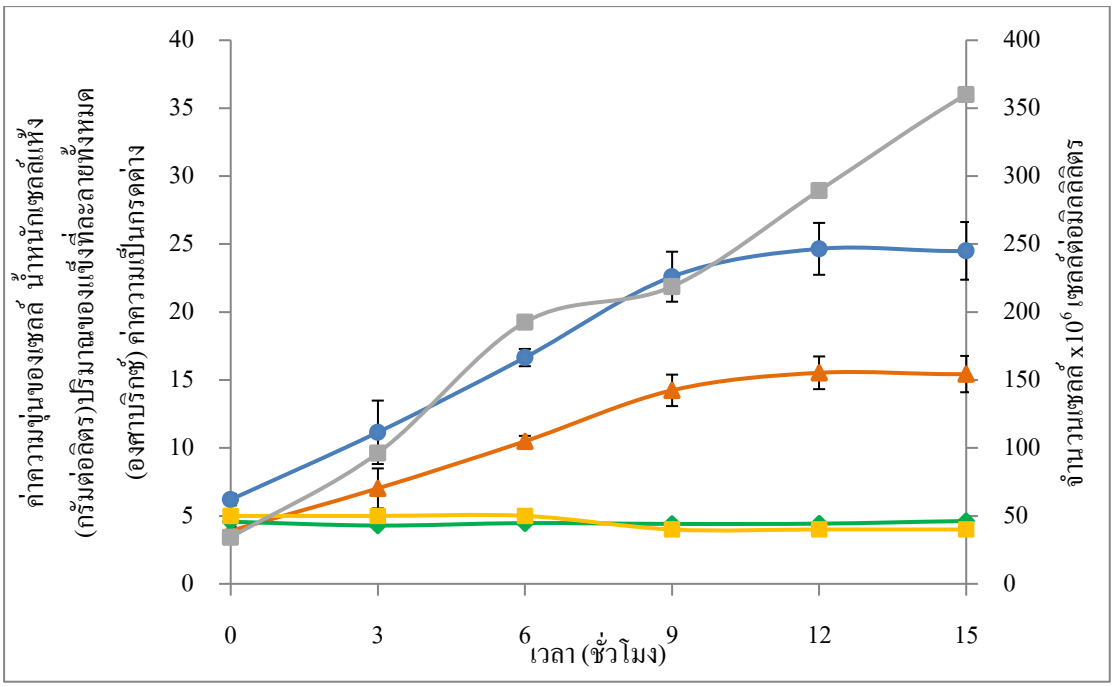
ในการศึกษาการขยายขนาดการผลิตโดยการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 75 และ 750 ลิตร โดยมีปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3 50 และ 500 ลิตร ตามลำดับ ทำการเปรียบเทียบกับการผลิตกล้าเชื้อขององค์การสุราฯ ในถังหมักขนาด 500 ลิตร ปริมาตรการหมัก 300 ลิตร ที่ไม่มีการเติมอากาศ พบว่าการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อในระดับขยายขนาดที่มหาวิทยาลัยบูรพา ด้วยอาหารสูตร BUU 2D เลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตรากวนผสม 300 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 2 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) เป็นเวลา 15 ชั่วโมง มีปริมาณของกล้าเชื้อสูงกว่ากล้าเชื้อที่ผลิตด้วยอาหารสูตรดั้งเดิมที่เลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีการเติมอากาศดังแสดงในตารางที่ 4-3 ดังนั้นจึงนำอาหารสูตร 2D และสภาวะการเลี้ยงไปใช้ในการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรม

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ตารางที่ 4- 3 ประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 5 75 และ750 ลิตร ปริมาตรเพาะเลี้ยง 3 50 และ 500 ลิตร

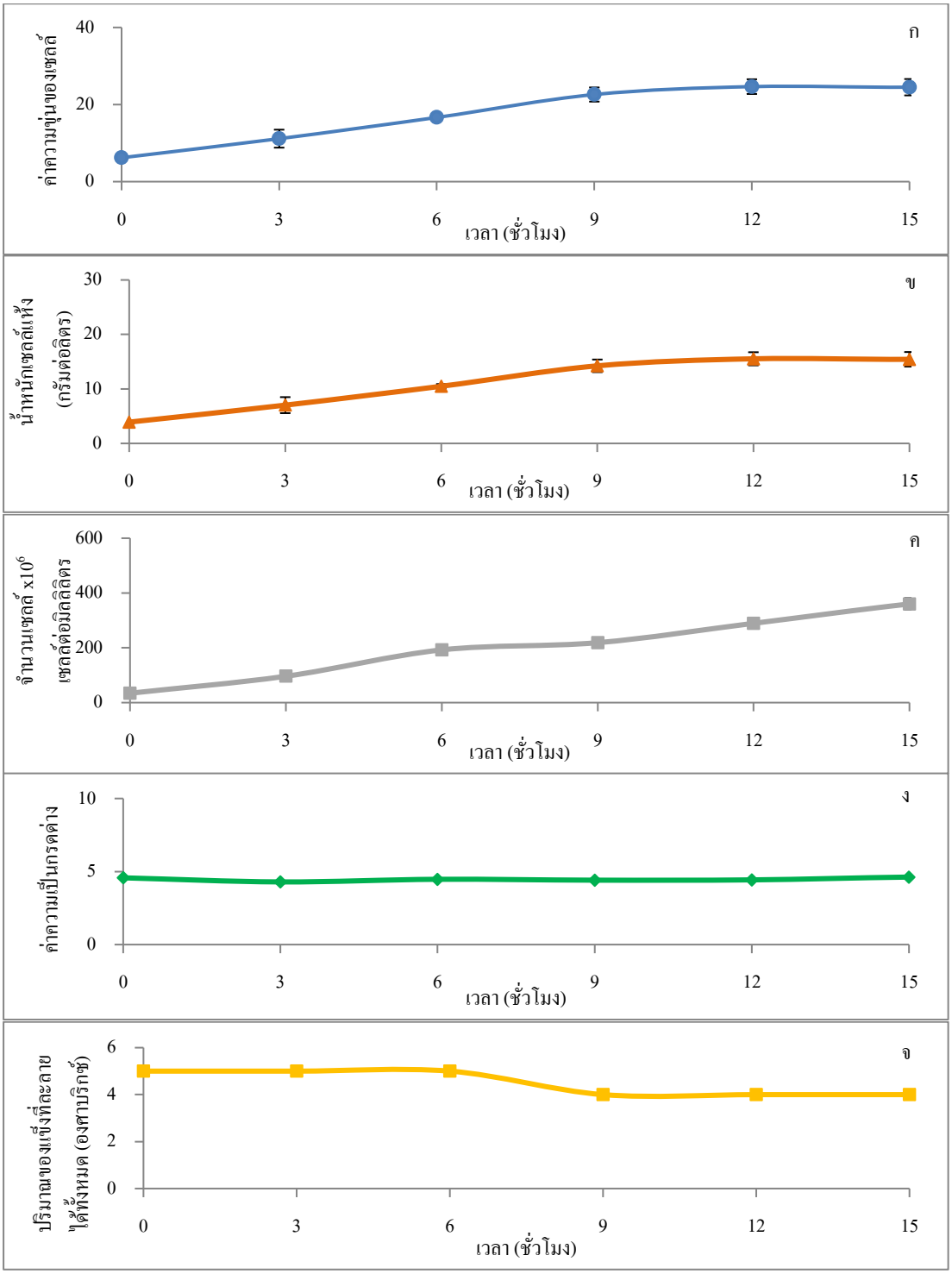
ปริมาตรเพาะเลี้ยง	เวลา (ชั่วโมง)	ความขุ่นของเซลล์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นเซลล์x10^6 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (%brix)
300 ลิตร*	0	-	-	0.12	17
(องค์การสุรา)	16	-	-	5.46	16.6
3 ลิตร	0	3.08 ± 0.20	1.93 ± 0.12	22.25 ± 3.18	5.0
	24	30.00 ± 0.56	18.08 ± 0.35	330.00 ± 5.08	3.0
50 ลิตร	0	8.75 ± 0.35	5.51 ± 0.12	16.25 ± 0.35	8.0
	15	23.00 ± 0.71	14.49 ± 0.45	410.00 ± 8.80	4.5
500 ลิตร	0	6.20 ± 0.42	3.91 ± 0.27	34.25 ± 1.06	5.0
(โรงงานต้นแบบ)	15	24.50 ± 2.12	15.46 ± 1.34	360.00 ± 10.61	4.0

*ข้อมูลจากองค์การสุรา



ภาพที่ 4- 8 การเปรียบเทียบพารามิเตอร์ของการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ โดย ค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) จำนวนเซลล์ x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) และ ค่าความเป็นกรดด่าง

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101



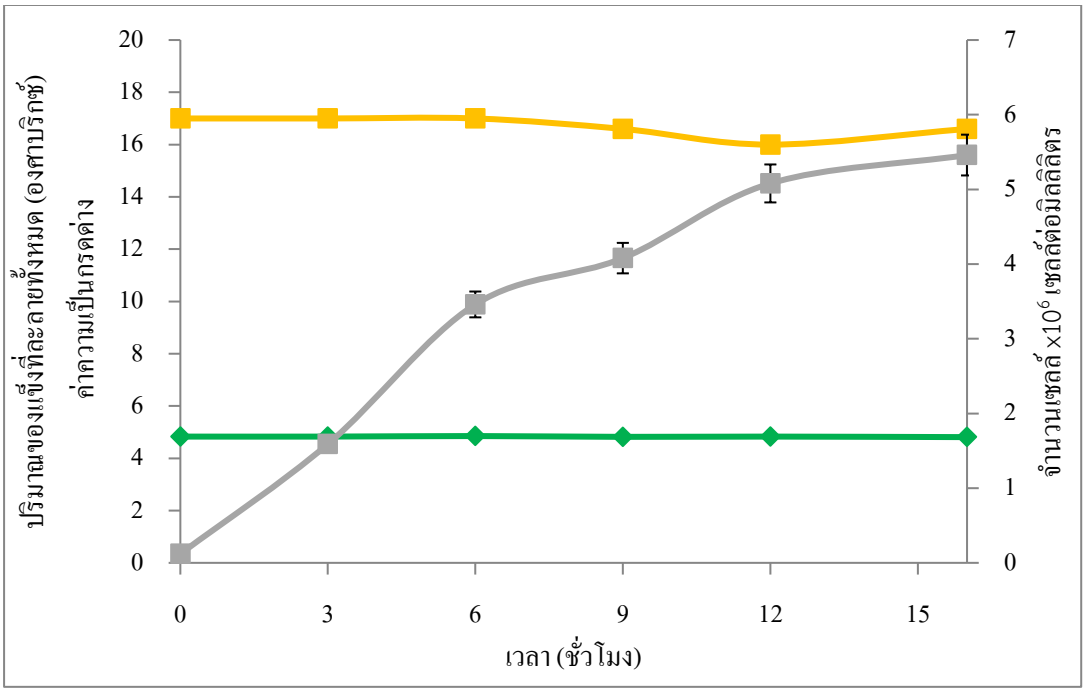
ภาพที่ 4- 9 ผลการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมัก 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ ในแต่ละพารามิเตอร์ โดย ค่าความขุ่นของเซลล์ (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ข) จำนวนเซลล์ x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ค) ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) (ง) และ ค่าความเป็นกรดด่าง (จ)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ส่วนที่ 2 การศึกษาการผลิตกล้าเชื้อในระดับอุตสาหกรรม ที่องค์การสุรา กรมสรรพสามิต

4.6 การทดลองการผลิตกล้าเชื้อยีสต์ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยการใช้ปริมาตร 300 ลิตร ในถังหมักขนาด 500 ลิตร ขององค์การสุราฯ (Starter A)

ในการผลิตหัวเชื้อในถังหมัก Starter A แบบดั้งเดิมขององค์การสุราฯ ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง สามารถผลิตกล้าเชื้อได้เพียง 5.46 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 17 องศาบริกซ์ และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 16.6 องศาบริกซ์ แสดงว่ามีอัตราการใช้น้ำตาลในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำ (ภาพที่ 4-10)



ภาพที่ 4- 10 ผลการเพาะกล้าเชื้อในถังหมัก Starter A แบบดั้งเดิม โดย — จำนวนเซลล์ x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร — ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) และ — ค่าความเป็นกรดด่าง

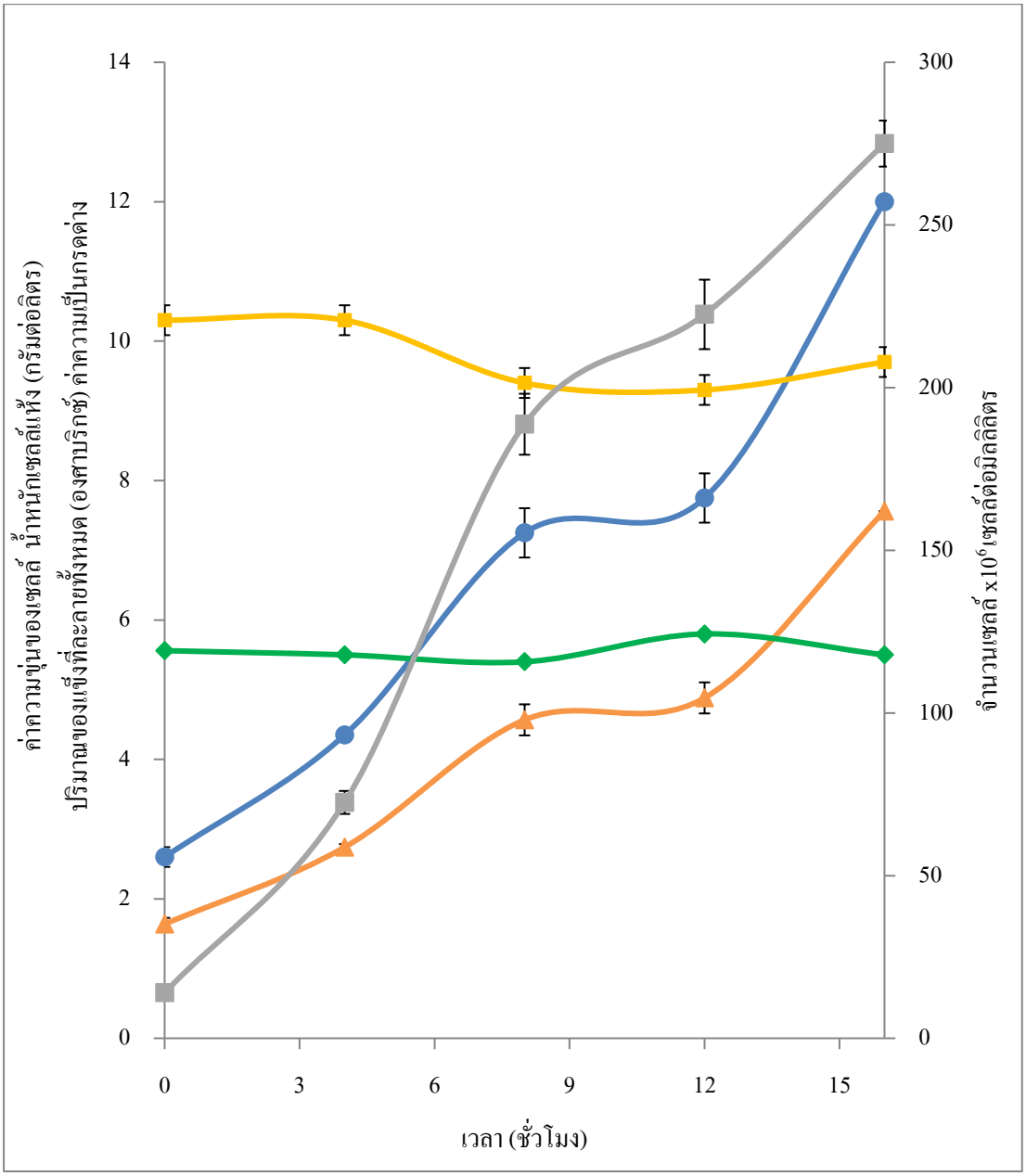
จากการศึกษาเบื้องต้นในระดับฟลาสก์ และระดับขยายขนาดที่โรงงานต้นแบบมหาวิทยาลัยบูรพา พบว่า อาหารสูตร 2D เหมาะสมสำหรับการเตรียมกล้าเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอล ดังนั้นจึงนำอาหารสูตร 2D มาเพาะเลี้ยงในถังหมัก Starter A ที่ผ่านการปรับปรุงถังหมักให้มีสภาวะ

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ที่เหมาะสมต่อการผลิตกล้าเชื้อ แต่เนื่องจากอาหารสูตร BUU 2D มีต้นทุนค่อนข้างสูง เนื่องจากราคาของยีสต์สกัด อีกทั้งการปรับปรุงมีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส จึงได้นำอาหารสูตร 2D มาทำการดัดแปลงเพื่อลดต้นทุนการผลิตเป็นอาหารสูตร BUU 2D ดัดแปลง มีส่วนประกอบ คือ กากน้ำตาล 80 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 10 กรัมต่อลิตร เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาระดับอุตสาหกรรม โดยมีการเตรียมหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 6 ลิตร จำนวน 2 ชุด โดยเตรียมอาหารปริมาตร 4.5 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 6 ลิตร แล้วทำการถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ลงในถังหมักขนาด 6 ลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง จะได้กล้าเชื้อที่สมบูรณ์เหมาะสมเพื่อนำไปใช้ในการขยายเพาะเลี้ยงในถัง Starter A

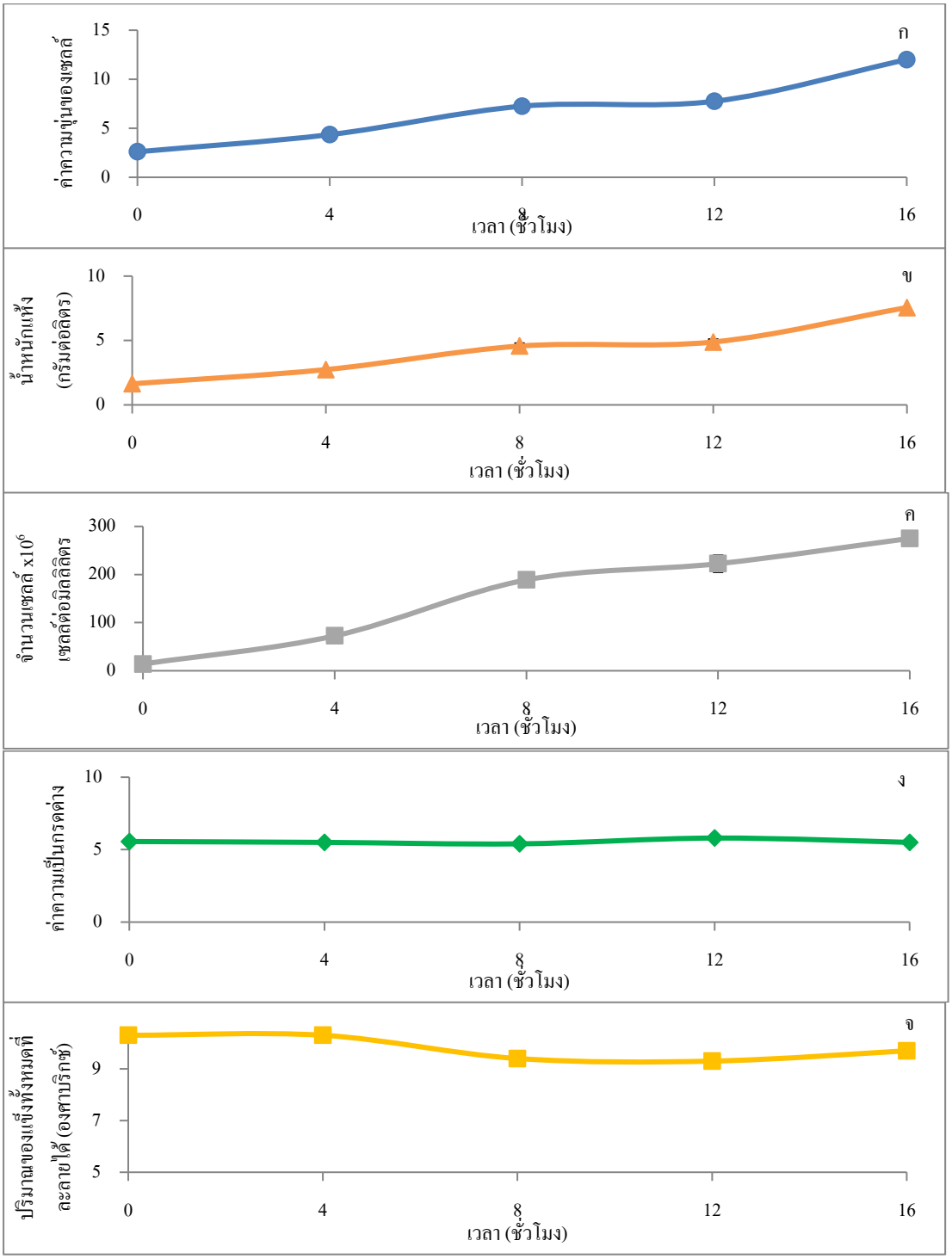
ในการเตรียมอาหารสูตร BUU 2D ดัดแปลง ปริมาตร 300 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 500 ลิตร โดยทำการเติมน้ำลงในถังหมักประมาณ 250 ลิตร จากนั้นเติมกากน้ำตาล 24 กิโลกรัม กวนผสมให้เข้ากัน จัดเตรียมอุปกรณ์ของถังหมักให้พร้อม โดยเชื่อมต่อระบบต่าง ๆ เข้าถังหมัก ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง sensor ปั๊มกรดและเบส ระบบเติมอากาศ ทำการต้มฆ่าเชื้อโดยการเติมไอน้ำร้อนที่ความดัน 1.5 บาร์ อุณหภูมิ 160 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นลดอุณหภูมิของถังหมักแล้วตั้งค่า (set points) ให้ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตราการกวนผสม 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) เติมกล้าเชื้อร้อยละ 3 คิดเป็นปริมาตร 9 ลิตร (เมื่อเทียบกับปริมาตรการทำงานในถังหมักทั้งหมด 300 ลิตร) ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในถังหมัก 6 ลิตร จำนวน 2 ชุด เลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 4 8 12 และ 16 ชั่วโมง จากนั้นนำไปวิเคราะห์การเจริญของยีสต์ ที่เวลาเริ่มต้น 0 ชั่วโมง ความขุ่นของเซลล์ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 2.60 ± 0.14 1.64 ± 0.09 กรัมต่อลิตร และ $14.00 \times 10^6 \pm 1.41$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ความขุ่นของเซลล์ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับเวลาการเพาะเลี้ยง 12.00 ± 0.00 7.56 ± 0.00 กรัมต่อลิตร และ $275.00 \times 10^6 \pm 7.07$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ค่าความเป็นกรดด่างควบคุมตลอดการทดลองให้เท่ากับ 5.5 ± 0.10 ดังแสดงในภาพที่ 4-11 และ 4-12 (ง)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101



ภาพที่ 4- 11 การเปรียบเทียบผลทุกพารามิเตอร์ของการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 500 ลิตร ขององค์การสุรา (Starter A) ปรับปรุง โดย ค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) จำนวนเซลล์ x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) และ ค่าความเป็นกรดด่าง

BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101
3119683100

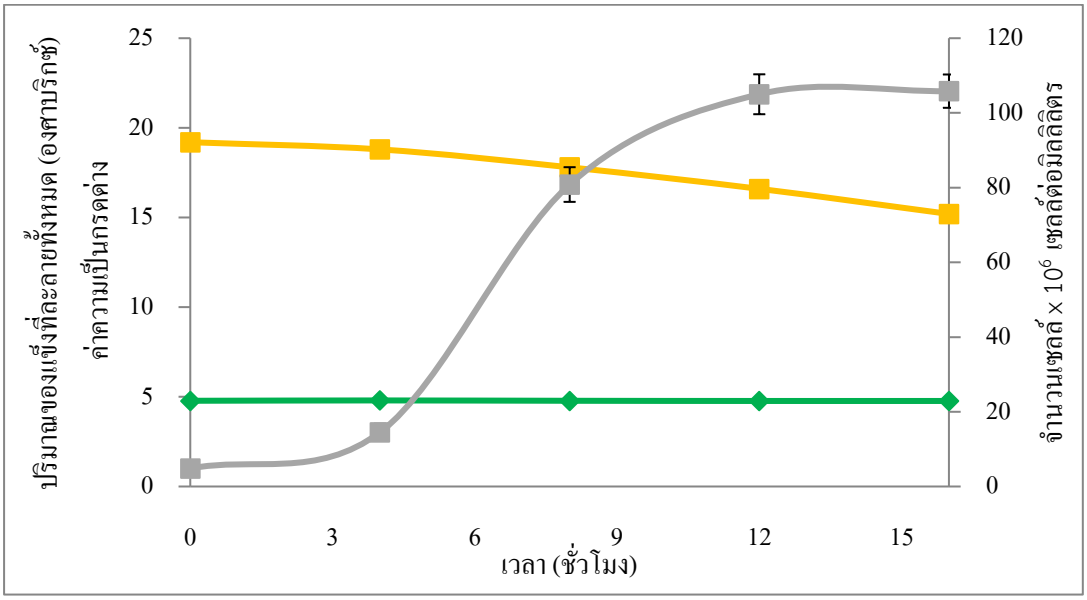


ภาพที่ 4- 12 ผลการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมัก 500 ลิตร ขององค์การสุรา ในแต่ละพารามิเตอร์ โดย ค่าความขุ่นของเซลล์ (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ข) จำนวนเซลล์ x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ค) ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) (ง) และ ค่าความเป็นกรดด่าง (จ)

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

4.7 การทดลองการผลิตกล้าเชื้อยีสต์ด้วยสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยการใช้ปริมาตร 3,000 ลิตร ในถังหมักขนาด 6,500 ลิตร ขององค์การสุราฯ (Starter B)

การผลิตหัวเชื้อถังหมัก Starter B แบบดั้งเดิม เพาะเลี้ยงด้วยอาหารที่มีความเข้มข้นกากน้ำตาลสูง อีกทั้งเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ไม่มีการเติมอากาศ ระบบควบคุมอุณหภูมิไม่ดี การกวนไม่ดี รวมถึงการไม่ควบคุมความเป็นกรดด่าง เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง พบว่าที่เวลา 0 ชั่วโมง มีความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 4.83 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อสิ้นสุดกระบวนการ กล้าเชื้อมีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 105.83 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งหัวเชื้อที่ผลิตได้มีปริมาณที่ต่ำมาก (ดังแสดงในภาพที่ 4-13)

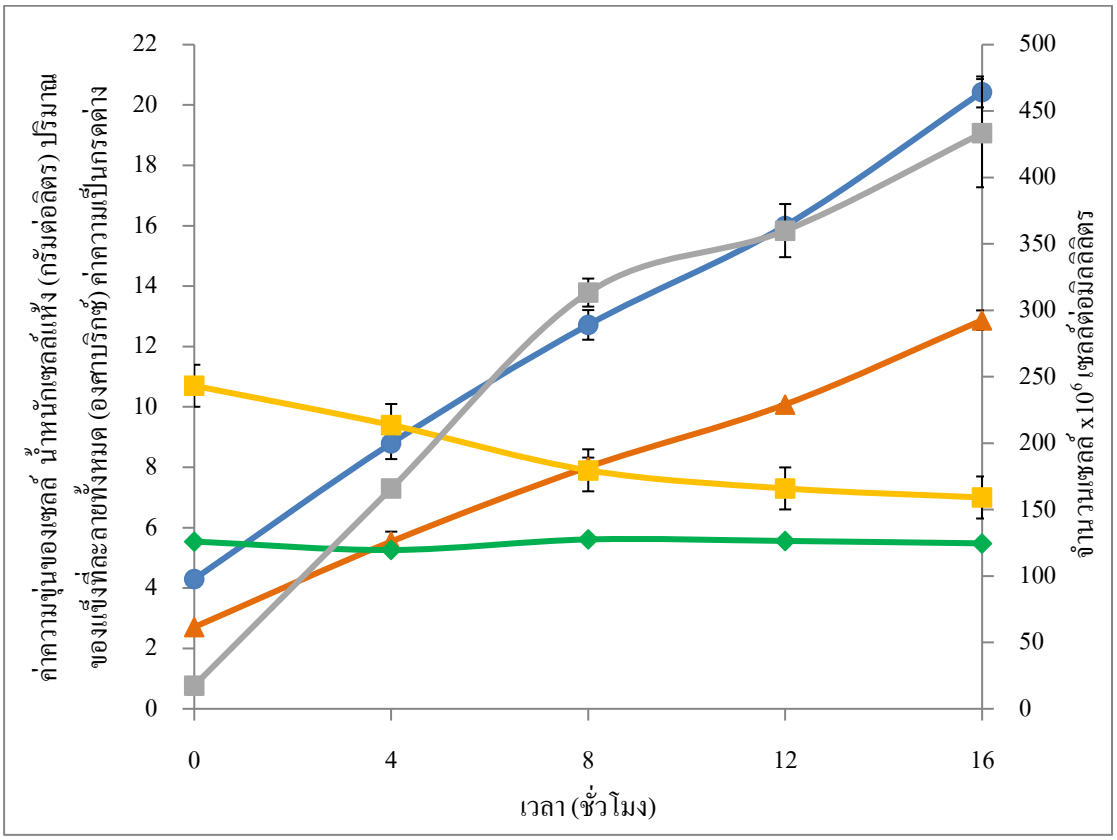


ภาพที่ 4- 13 ผลการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อในถัง Starter B ดั้งเดิม โดย —■— จำนวนเซลล์ x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร —■— ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) และ —◆— ค่าความเป็นกรดด่าง

ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงขยายกล้าเชื้อจากถังหมัก Starter A ความเข้มข้นร้อยละ 6 หรือคิดเป็นปริมาตร 300 ลิตร และอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2D ปรับปรุงเช่นเดียวกับถัง starter A เติมหัวเชื้อลงในถังหมักขนาด 6,500 ลิตร ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 3,000 ลิตร ที่มีการควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 อัตราการกวนผสม 220 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที (vvm) เลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 0 4 8 12 และ 16 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่เก็บไปวิเคราะห์พารามิเตอร์การเจริญ

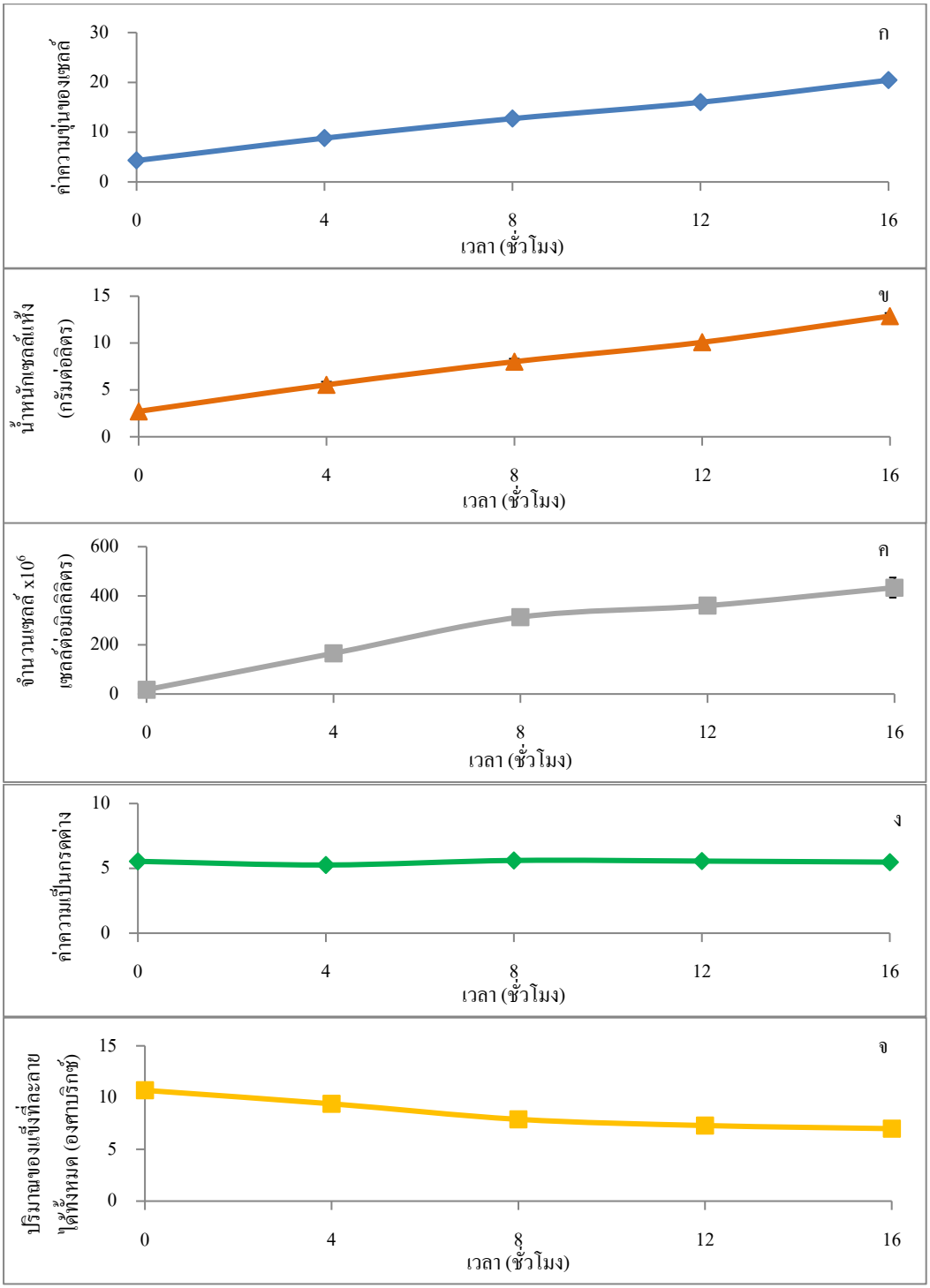
3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

จากวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ที่เวลาเริ่มต้นเท่ากับ 0 ชั่วโมง ความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์ มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 4.29 ± 0.20 2.71 ± 0.12 กรัมต่อลิตร และ 17.50 x 10^6 ± 1.80 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ความขุ่นของเซลล์ ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับเวลาการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 20.43 ± 0.51 12.87 ± 0.32 กรัมต่อลิตร และ 433.33 x 10^6 ± 40.72 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมงวัดได้ 10.3 องศาบริกซ์ เมื่อเวลาผ่านไปการตรวจสอบปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดจะลดลงและคงที่ หลังจากสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงที่เวลา 16 ชั่วโมง วัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้ 9.7 องศาบริกซ์ (ดังแสดงในภาพที่ 4-14 และภาพที่ 4-15) จากผลการทดลองจะพบว่าเมื่อมีการปรับเปลี่ยนสูตรอาหารและปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงทำให้ปริมาณกล้าเชื้อที่ผลิตได้สูงกว่าเดิมถึง 4 เท่า



ภาพที่ 4- 14 การเปรียบเทียบผลทุกพารามิเตอร์ของการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมักขนาด 6,500 ลิตร ขององค์การสุรา (Starter B) โดย ค่าความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) จำนวนเซลล์ x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) และ ค่าความเป็นกรดด่าง

BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101
3119683100



ภาพที่ 4- 15 ผลการขยายขนาดกล้าเชื้อในถังหมัก 6,500 ลิตร ขององค์การสุรา ในแต่ละพารามิเตอร์ โดย ค่าความขุ่นของเซลล์ (ก) น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) (ข) จำนวนเซลล์ x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ค) ของแข็งที่ละลายทั้งหมด (องศาบริกซ์) (ง) และ ค่าความเป็นกรดด่าง (จ)

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ตารางที่ 4- 4 ประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 500 ลิตร (Starter A) และ 6,500 ลิตร (Starter B) ปริมาตรเพาะเลี้ยง 300 ลิตร (Starter A) และ 3,000 ลิตร (Starter B)

ปริมาตรเพาะเลี้ยง	เวลา (ชั่วโมง)	ความขุ่นของเซลล์	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นเซลล์x10^6 (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ (%brix)
300 ลิตร*	0	-	-	0.12	17.0
(Starter A ดั้งเดิม)	16	-	-	5.46	16.6
300 ลิตร	0	2.60 ± 0.14	1.64 ± 0.09	14.00 ± 1.41	10.3
(Starter A ปรับปรุง)	16	12.00 ± 0.00	7.56 ± 0.00	275.00 ± 7.07	9.7
3,000 ลิตร*	0	-	-	4.83 ± 0.38	19.2
(Starter B ดั้งเดิม)	16	-	-	105.83 ± 9.46	15.2
3,000 ลิตร	0	4.30 ± 0.20	2.71 ± 0.12	17.50 ± 1.80	10.7
(Starter B ปรับปรุง)	16	20.43 ± 0.51	12.87 ± 0.32	433.33 ± 40.72	7.0

*ข้อมูลจากองค์การสุรา

จากการตารางที่ 4-4 พบว่าประสิทธิภาพของถังหมัก Starter A และ Starter B ที่ได้ปรับปรุงโดยใช้อาหารสูตร 2D ปรับปรุงและปรับปรุงสภาวะการเลี้ยงมีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีการเตรียมกล้าเชื้อแบบเดิม โดยในถังหมัก starter A ปริมาตรการเพาะเลี้ยง 300 ลิตร ความเข้มข้นของเซลล์สามารถเพิ่มขึ้นถึง 53 เท่า เมื่อเทียบกับการเตรียมหัวเชื้อแบบดั้งเดิม และในถังหมัก starter B ความเข้มข้นของเซลล์สามารถเพิ่มขึ้นถึง 26 เท่า เมื่อเทียบกับการเตรียมหัวเชื้อแบบดั้งเดิม ดังนั้น วิธีการเตรียมกล้าเชื้อที่ผ่านปรับปรุงนับว่ามีประสิทธิภาพสูง และสามารถนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

BUU ithesis 6091010O thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101
3119683100

ส่วนที่ 3 การศึกษาต้นทุนการผลิต

4.8 การศึกษาเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตของสูตรอาหารเพื่อการผลิตกล้าเชื้อ

ตารางที่ 4- 5 เปรียบเทียบต้นทุนส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อต่อประสิทธิภาพของการผลิตกล้าเชื้อ

ส่วนประกอบ	สูตรองค์การสุราฯ		BUU 2C		BUU 2CD		BUU 2D		BUU 2D ปรับปรุง	
(ต่อกิโลกรัม)	กรัมต่อลิตร	บาท	กรัมต่อลิตร	บาท	กรัมต่อลิตร	บาท	กรัมต่อลิตร	บาท	กรัมต่อลิตร	บาท
กากน้ำตาล 11 บาท	240	2.64	80	0.88	40	0.44	40	0.44	80	0.88
ยีสต์สกัด 1,250 บาท	-	-	0.5	0.63	5	6.25	5	6.25	-	-
แอมโมเนียมซัลเฟต 28 บาท	-	-	1.0	0.03	10	0.28	5	0.14	10	0.28
ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 56 บาท	-	-	-	-	-	-	3.6	0.20	-	-
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 40 บาท	-	-	-	-	-	-	3	0.12	-	-
แมกนีเซียมซัลเฟต 50 บาท	-	-	0.1	0.005	1	0.05	1	0.05	-	-
ราคารวมต่อหน่วย	-	2.64	-	1.55	-	7.02	-	7.20	-	1.16

จากตารางที่ 4-5 พบว่าสูตรดั้งเดิม มีราคาเท่ากับ 2.64 บาทต่อลิตร สูตรอาหาร BUU 2C ราคา 1.55 บาทต่อลิตร สูตรอาหาร BUU 2CD ราคา 7.02 บาทต่อลิตร สูตรอาหาร BUU 2D ราคา 7.20 บาทต่อลิตร และสูตรอาหาร BUU 2D ดัดแปลง ราคา 1.16 บาทต่อลิตร จากตารางเปรียบเทียบพบว่า อาหารที่ได้รับการพัฒนาเป็นสูตรอาหาร BUU 2D ดัดแปลง มีราคาที่ต่ำกว่าอาหารสูตร BUU 2D เนื่องจากราคาส่วนใหญ่ของอาหารจะอยู่ที่ยีสต์สกัด ดังนั้นในสูตรดัดแปลงจึงไม่เติมยีสต์สกัด ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต มีหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ ซึ่งในการทดลองได้มีควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง ทำให้ต้นทุนของสูตรอาหารลดลง

จากนั้นทำการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตระหว่างวิธีการผลิตกล้าเชื้อแบบดั้งเดิมขององค์การสุราฯ กับวิธีการผลิตกล้าเชื้อแบบใหม่ที่ปรับปรุง โดยเปรียบเทียบต้นทุนราคาระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละสูตรที่ใช้ในการศึกษา เพื่อคัดเลือกอาหารที่มีความคุ้มทุนมากที่สุดสำหรับการขยายกล้าเชื้อและ เปรียบเทียบต้นทุนแรงงานและเวลาในการเตรียมกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมัก (ตารางที่ 4-6)

ตารางที่ 4- 6 การเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตในถังหมัก Starter A และ ในถังหมัก Starter B

ต้นทุนการผลิต Starter A	ผลิตกล้าเชื้อแบบเดิม	สูตรอาหารที่พัฒนา
ต้นทุนวัตถุดิบ (บาท/ 300ลิตร)	901.50	232.50
ต้นทุนแรงงาน (บาท/ คน/ วัน)	681.81	681.81
ต้นทุนไฟฟ้า (บาท/ 16 ชั่วโมง)	5.82	148.62
รวมราคาต้นทุนการผลิต	1,589.13	1,062.93

ต้นทุนการผลิต Starter B	ผลิตกล้าเชื้อแบบเดิม	สูตรอาหารที่พัฒนา
ต้นทุนวัตถุดิบ (บาท/ 3,000ลิตร)	9,015.00	2,325.00
ต้นทุนแรงงาน (บาท/ คน/ วัน)	681.81	681.81
ต้นทุนไฟฟ้า (บาท/ 16 ชั่วโมง)	198.91	1,307.71
รวมราคาต้นทุนการผลิต	9,895.72	4,313.52
ต้นทุนการผลิตรวม starter A และstarter B	11,484.85	5,376.45

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

จากการศึกษาสูตรอาหารที่พัฒนาในถังหมัก Starter A มีต้นทุนวัตถุดิบลดลง เนื่องจากใช้ความเข้มข้นกากน้ำตาลลดลง ราคาสูตรอาหารลิตรละ 0.78 บาท หรือ 232.50 บาทต่อการเพาะเลี้ยง 1 batch (ปริมาตร 300 ลิตร) ต้นทุนแรงงานคิดจากนักวิทยาศาสตร์ระดับปริญญาตรี 1 คน ทำงาน 22 วันต่อเดือน ทำงานวันละ 8 ชั่วโมง เท่ากับ 681.81 บาทต่อวัน จากต้นทุนไฟฟ้าจะเห็นได้ว่าค่าไฟที่เพิ่มขึ้น จากการเพิ่มระบบการกวนผสม การให้อากาศ ระบบปั๊มอัตโนมัติเพื่อรักษาความกรดด่าง ระบบควบคุมอุณหภูมิ ซึ่งต้องใช้กระแสไฟฟ้าในการทำงาน รวมไปถึงระบบฆ่าเชื้อ ดังนั้นต้นทุนไฟฟ้าคิดรวมทั้งหมดเท่ากับ 148.62 บาทต่อครั้ง รวมราคาต้นทุนการผลิตถังหมัก Starter A พัฒนาทั้งหมดเท่ากับ 1,062.93 บาทต่อการเพาะเลี้ยง 1 batch เมื่อทำการเปรียบเทียบกับถังหมัก Stater A แบบดั้งเดิม ที่มีราคาต้นทุนการผลิต 1,589.13 บาทต่อการเพาะเลี้ยง 1 batch ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายต่อการเพาะเลี้ยง 1 batch ได้ 526.20 บาท ส่วนการปรับปรุงสูตรอาหารในถังหมัก Starter B มีต้นทุนวัตถุดิบลดลง เนื่องจากใช้ความเข้มข้นกากน้ำตาลลดลง ราคาสูตรอาหารลิตรละ 0.78 บาท หรือ 2,325.00 บาทต่อการเพาะเลี้ยง 1 batch (ปริมาตร 3,000 ลิตร) และมีการใช้ระบบควบคุมต่าง ๆ เหมือนในถังหมัก Starter A ที่กล่าวในข้างต้น ดังนั้นต้นทุนค่าไฟฟ้าทั้งหมดเท่ากับ 1,307.71 บาทต่อครั้ง รวมราคาต้นทุนการผลิตถังหมัก Starter B พัฒนาทั้งหมดเท่ากับ 4,313.52 บาทต่อการเพาะเลี้ยง 1 batch เมื่อทำการเปรียบเทียบกับถังหมัก Stater B แบบดั้งเดิม ที่มีราคาต้นทุนการผลิต 9,895.72 บาทต่อการเพาะเลี้ยง 1 batch ทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายต่อการเพาะเลี้ยง 1 batch ได้ 5,582.2 บาท ซึ่งจะเห็นได้ว่าการปรับปรุงสูตรอาหารจากสูตรอาหารดั้งเดิมเป็นสูตรอาหารสูตร 2D ปรับปรุง ทำให้สามารถลดต้นทุนการผลิตรวม starter A และ starter B ได้เท่ากับ 6,108.4 บาทต่อการเตรียมกล้าเชื้อ 1 ครั้ง หรือประหยัดได้ถึงร้อยละ 55.7 เมื่อเปรียบกับการหมักด้วยอาหารสูตรดั้งเดิมขององค์การสุรา

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

บทที่ 5

อภิปรายผลและสรุปผลการทดลอง

5.1 การศึกษาจลนศาสตร์ของยีสต์ *S.cerevisiae* SC90

จากการศึกษาจลนศาสตร์ของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้หัวเชื้อเริ่มต้น $1x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 0.4 เซลล์ต่อชั่วโมง ในอาหารสูตร YM ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของลักขณา เหล่าไพบูลย์และคณะ (2011) พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* SC90 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) 0.36 เซลล์ต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่า ซึ่งเกิดจากการใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Pornpukdeewattana et al. (2014) ได้ทำการศึกษาความเหมาะสมของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 พบว่า สามารถเจริญได้ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการสร้างผลิตภัณฑ์อีกด้วย

5.2 การพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกล้าเชื้อ

การพัฒนาสูตรอาหารจากสูตรดั้งเดิมขององค์การสุราที่มีองค์ประกอบของน้ำตาลสูงถึง 250 กรัมต่อลิตร ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูง ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อข้นหนืดส่งผลต่อการละลายของออกซิเจนในกระบวนการผลิตกล้าเชื้อ ทำให้เซลล์เกิดความเครียดและหยุดการเจริญเติบโต จากการศึกษาของ Laopaiboon et al. (2007) การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักแบบกะจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานภายใต้สภาวะความเข้มข้นน้ำตาล 18 20 และ 24 องศาบริกซ์ และการเติมแอมโมเนียซัลเฟต 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมมีค่าประมาณ 24 องศาบริกซ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ผ่านมาพบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมระหว่างน้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร ต่อยีสต์ 30 กรัมต่อลิตร สำหรับการผลิตเอทานอล (Louhichi, B., Belgaib, J., benamor, H., & Hajji, N., 2013) ซึ่งความเข้มข้นน้ำตาลในสูตรอาหารดั้งเดิมเหมาะสมสำหรับผลิตเอทานอลมากกว่าการผลิตกล้าเชื้อ ทำให้เมื่อเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ $73.33 \times 10^6 \pm 3.82$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาในครั้งนี้ จะเห็นได้จากภาพที่ 4-2 แสดงว่าเจริญเติบโตของอาหารสูตรดั้งเดิมมีช่วงระยะปรับตัว (lag phase) นานประมาณ 12 ชั่วโมง ซึ่งควรเป็นระยะที่จะต้องทำให้สั้นที่สุดในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมเพื่อลดต้นทุนการผลิต (กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์, 2553) และมีช่วงระยะทวีคูณ (log phase) เพียง 18-24 ชั่วโมง ทำให้ได้

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

จำนวนเซลล์ยีสต์น้อย เมื่อทำการเปรียบเทียบกับอาหารสูตร BUU 2C โดยลดปริมาณกากน้ำตาลลงเหลือ 80 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 5.33 องศาบริกซ์ หรือคิดค่าประมาณน้ำตาลที่แท้จริง 40 กรัมต่อลิตร (กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์, 2553) และมีการเติมยีสต์สกัด 0.5 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 ทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเลี้ยงด้วยอาหารสูตร BUU 2C หัวเชื้อเจริญได้ดีกว่าอาหารสูตรดั้งเดิมถึง 3 เท่า และช่วงระยะเวลาปรับตัวลดลงเหลือเพียง 6 ชั่วโมง และมีระยะทวีคูณเพิ่มขึ้น แสดงว่ายีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต และ แมกนีเซียมซัลเฟต ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนช่วยในการปรับปรุงประสิทธิภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากรายงานการศึกษาพบว่ายีสต์สกัดมีส่วนช่วยเพิ่มปริมาณไนโตรเจนอิสระที่เป็นแหล่งอาหารรองจากแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณที่เหมาะสมของอะมิโนไนโตรเจนอิสระ (free amino nitrogen: FAN) ควรมีค่าอยู่ระหว่าง 140-150 มิลลิกรัม FAN ต่อลิตร (O'Connor-Cox, et al., 1991) และมีการเติมแอมโมเนียซัลเฟตจะพบว่าระยะปรับตัว (lag phase) มีช่วงที่สั้นลงเมื่อเทียบกับที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตรดั้งเดิม สอดคล้องกับรายงานของ Arrizon & Gschaedler (2002) พบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต มีผลทำให้เซลล์เข้าสู่ระยะทวีคูณได้เร็วขึ้น และช่วยเพิ่มอัตราการหมักและสามารถทำให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นร้อยละ 3.3 ซึ่งค่าของความเข้มข้นของแอมโมเนียมที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 16.5- 66 มิลลิกรัมต่อลิตร (Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., & Leao, C., 2004) และแมกนีเซียมซัลเฟต ซึ่งมีส่วนช่วยในการแบ่งเซลล์และกระบวนการเมตาบอริซึมของเซลล์ (Udeh, H. O., & Kgatla, T. E., 2013) จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าปริมาณแมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+}) 500 ppm เป็นปริมาณที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์ในสภาวะที่มีออกซิเจนส่งผลให้ยีสต์มีจำนวนเซลล์และอัตราการหมักเพิ่มขึ้น (Rees, E., & Stewart, G., 1999) จากนั้นจึงทำการปรับสูตรอาหารอีกครั้ง เป็นอาหารสูตร 2CD โดยลดปริมาณกากน้ำตาลลงเหลือ 80 กรัมต่อลิตร เพิ่มปริมาณยีสต์สกัด แอมโมเนียมซัลเฟต และ แมกนีเซียมซัลเฟต 10 เท่าจากสูตร 2C แต่เมื่อทำการเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรากฏว่าประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ประมาณ 0.3 เท่าเมื่อเทียบกับสูตร 2C ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดด่างในอาหารสูตร BUU 2C และ BUU 2CD อยู่ในช่วง 5.4-4.7 ดังนั้นจึงปรับสูตรอาหารเป็นสูตร 2D ซึ่งประกอบด้วย กากน้ำตาล 40 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 3.6 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 1 กรัมต่อลิตร โดยไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 3.6 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตทำหน้าที่เป็นสารบัฟเฟอร์ในสูตรอาหาร ทำให้ค่าความเป็นกรดด่างมีความเสถียรยิ่งขึ้นมีค่าอยู่ระหว่าง 5.1-5.3 ทำให้ประสิทธิภาพ

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

เพิ่มขึ้นถึง 1.3 เท่าของสูตร 2C และเพิ่มขึ้นจากสูตรดั้งเดิมถึง 4.7 เท่า ดังนั้นจึงใช้อาหารสูตร 2D ในการทดลองในระดับขยายขนาด เนื่องจากการทดลองในระดับฟลาสก์มีข้อจำกัดด้านปริมาณอากาศ

5.3 การขยายขนาดในถังหมักขนาด 5 และ 75 ลิตร

จากการศึกษาการขยายขนาดในถังหมักขนาด 5 ลิตรปริมาตรการหมัก 3 ลิตร โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร BUU 2D ความเข้มข้นเซลล์ที่ 0 ชั่วโมง วัดได้เท่ากับ $22.25 \times 10^6 \pm 3.18$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการหมักเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น $330 \times 10^6 \pm 5.08$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าช่วงปรับตัว (lag phase) 3 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น $1x10^7$ คิดเป็นร้อยละ 5 สอดคล้องกับรายงานของ Zabed et al. (2014) ควรใช้หัวเชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นระหว่าง $1x10^4$ ถึง $1x10^7$เซลล์ต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับรายงานของ Breisha (2010) ระดับความเข้มข้นของหัวเชื้อเริ่มต้น มีผลช่วยลดระยะปรับตัว (lag phase) และลดเวลาการหมักจาก 72 ชั่วโมงเหลือเพียง 48 ชั่วโมง แต่ไม่มีผลต่อปริมาณผลผลิตของเอทานอล จากการทดลองในระดับขยายขนาดมีการควบคุมปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ ควบคุมอุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส จากการศึกษาของ Soisuda et al. (2014) พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *S. cerevisiae* SC90 คือ 35 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *S. cerevisiae* SC90 และให้ผลผลิตเอทานอลมากที่สุด 97.03 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดด่างให้มีค่าเฉลี่ย 5.5 ซึ่งค่าความเป็นกรดด่างนับเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อเซลล์โดยตรง เนื่องจากความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออน (H^+) มีผลต่อประจุรวม (total charge) ของผนังเซลล์ซึ่งส่งผลต่อการนำสารอาหารเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Lin et al., 2012) การเติมอากาศเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโต (growth factor) ของเซลล์ยีสต์ เนื่องจากยีสต์ต้องการออกซิเจนในกระบวนการการสังเคราะห์ชีวภาพของกรดไขมัน (เช่น กรดโอเลอิก) และสเตอรอล (sterol) (เช่น เอโกสเตอรอล) ดังนั้นปริมาณออกซิเจนจึงต้องเพียงพอต่อการเจริญเติบโต ซึ่งสามารถช่วยลดระยะเวลาการหมักได้ถึงร้อยละ 33 (Jones, H. L., A. Margaritis, & Stewart, R. J., 2007) และการกวนผสมเป็นปัจจัยสำคัญอีกอย่างหนึ่งที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก เนื่องจากการกวนผสมมีส่วนช่วยเพิ่มอัตราสัมผัสระหว่างออกซิเจน อาหารและเซลล์ยีสต์ อีกทั้งยังช่วยให้เกิดการกระจายตัวของเซลล์และสารอาหาร การกวนผสมที่ดีควรอยู่ระหว่าง 100 – 200 รอบต่อนาที จากรายงาน Liu & Shen (2008) พบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตเอทานอลสูงสุดถึงร้อยละ 85.73 ที่อัตรากวนผสม 200 รอบต่อนาที จะเห็นได้ว่าหลังจากการทดลองในถังหมักขนาด 5 ลิตร ช่วงเวลาที่เซลล์ยีสต์อยู่ในระยะทวีคูณ (log phase) อยู่ระหว่างชั่วโมงที่ 6-18 ดังนั้นจึงเลือกเวลาที่ 15 ชั่วโมง สำหรับการนำกล้าเชื้อไปขยายขนาดในระดับต่อไป เนื่องจากกล้าเชื้อที่ได้จะอยู่ในช่วงที่

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

เซลล์มีความแข็งแรง และสามารถเจริญเติบโตได้ดี มาขยายขนาดต่อในถังหมักขนาด 75 ลิตร มีปริมาตรการหมัก 50 ลิตร พบว่าที่เวลา 15 ชั่วโมง สามารถวัดความเข้มข้นเซลล์ได้ 410.00 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ของถังหมัก 5 ลิตรและ 50 ลิตรลดลงประมาณ 2 องศาบริกซ์ และคงที่จนสิ้นสุดเวลาการเลี้ยง แสดงว่าน้ำตาลที่เหลือเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ (unfermentable sugar) ดังรายงานของ Fadel, M., Zohri, A.-N., El-Dean, A., Auob, A. H., & Deiab, B. (2016) ทำการทดลองเติมเอนไซม์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกากน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักและให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 8.81 โดยเอนไซม์ที่ให้ไปจะทำหน้าที่ในการสลายพอลิเมอร์ชีวภาพ (biopolymer) จากการทดลองสูตรอาหารที่ถูกพัฒนาขึ้นสามารถนำมาใช้ได้ดีในระดับขยายขนาด จากนั้นจึงนำหัวเชื้อที่ได้ไปเป็นกล้าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ ที่มหาวิทยาลัยบูรพา

5.4 การขยายขนาดในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ

จากการศึกษาในถังหมักขนาด 750 ลิตร ของโรงงานต้นแบบ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยถ่ายหัวเชื้อปริมาตร 25 ลิตร หรือคิดเป็นร้อยละ 5 โดยปริมาตร ที่ได้จากถังหมักขนาด 75 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 750 ลิตร โดยเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาล เนื่องจากถังหมักมีประสิทธิภาพสูง และมีการเติมอากาศ 2 vvm พบว่าที่เวลา 15 ชั่วโมง สามารถวัดความเข้มข้นเซลล์ได้เท่ากับ 360.00 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากการศึกษาพบว่าการเติมอากาศมีผลต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ ช่วยให้เซลล์ยีสต์ลดระยะปรับตัวและระยะเวลาในกระบวนการหมักลดลง (Chul, Wackerbauer, & Kang, 2007) จากการศึกษาพบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ ลดลงเพียง 1 องศาบริกซ์ แสดงว่าปริมาณน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณสูงอยู่ สามารถที่จะพัฒนาสูตรอาหารโดยลดปริมาณกากน้ำตาลลง เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของถังหมักของโรงงานต้นแบบและถังหมัก Starter A พบว่าช่องว่างด้านบน (head space) ของโรงงานต้นแบบมี 250 ลิตร ในขณะที่ขององค์การสุราฯ มีเพียง 200 ลิตร ทำให้อัตราการแพร่ของออกซิเจนมีโอกาสแพร่ผ่านเซลล์ยีสต์ได้มากกว่า ดังนั้นถังหมักของโรงงานต้นแบบจึงมีประสิทธิภาพมากกว่า

5.5 การขยายขนาดในถังหมัก Starter A และ Starter B ระดับอุตสาหกรรม

กระบวนการเตรียมกล้าเชื้อในถัง starter A ขององค์การสุราแบบดั้งเดิม เป็นการเตรียมกล้าเชื้อโดยไม่มีการเติมอากาศ และการกวนผสม อีกทั้งยังใช้อาหารที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลสูง ทำให้เซลล์ยีสต์เกิดความเครียดแล้วนำไปสู่ปรากฏการณ์ที่เรียกว่า crabtree-effect ความเข้มข้นของน้ำตาลควรต่ำกว่าร้อยละ 25 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เนื่องจากความเข้มข้นของน้ำตาลจะไปมีผลต่อ

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

แรงดันออสโมซิสของเซลล์ และส่งผลเสียโดยตรงต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของเซลล์ (Patrascu, Rapeanu, & Hopulele, 2009) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง สามารถผลิตกล้าเชื้อได้เพียง 5.46 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดลดลงเพียง 0.4 องศาบริกซ์ และในถังหมัก starter B แบบดั้งเดิม เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง วัดความเข้มข้นเซลล์ได้ 105.83 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งการผลิตหัวเชื้อแบบเดิมในถังหมัก starter A และถังหมัก starter B ได้ปริมาณกล้าเชื้อน้อยมากทำให้ต้องเตรียมกล้าเชื้อหลายถัง ทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย

การทดลองระดับอุตสาหกรรมในถังหมัก starter A ขนาดถังหมัก 500 ลิตร ปริมาตรการหมัก 300 ลิตร ได้มีการปรับปรุงประสิทธิภาพของถัง โดยควบคุมสภาวะของถัง ได้แก่ มีการเติมอากาศและการกวนผสม มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้มีความใกล้เคียงกับสภาวะที่ทำการทดลองในระดับขยายขนาด (เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์, และขวัญฤทัย มาลัยเรือง, 2562) และใช้สูตรอาหาร 2D ปรับปรุงในการเพาะเลี้ยง ถังหมัก starter A เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ถึงร้อยละ 90.3 วัดความเข้มข้นเซลล์ได้ 275 x 10^6± 7.07 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงว่าอาหารสูตร 2D ปรับปรุงมีประสิทธิภาพเพียงพอในการเตรียมกล้าเชื้อในระดับอุตสาหกรรม ในสภาวะที่มีการเติมอากาศและควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง และเมื่อกล้าเชื้อจากถังหมัก starter A ขยายต่อในถัง starter B ปริมาณ 3,000 ลิตร สามารถขยายกล้าเชื้อได้ถึงร้อยละ 90.3 ดังนั้นอาหารสูตร 2D ปรับปรุงมีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับการผลิตกล้าเชื้อ

5.6 การศึกษาต้นทุนการผลิต

จากการศึกษาต้นทุนการผลิตพบว่าในส่วนของต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร 2D ต้นทุนการผลิตต่อสูงเนื่องจากยีสต์สกัดมีราคาสูง ดังนั้นเมื่อนำไปใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมจะมีต้นทุนการผลิตสูงด้วยจึง ทำการปรับปรุงสูตรเป็น 2D ดัดแปลง เมื่อนำไปเลี้ยงในถัง starter A ขนาด 500 ลิตร ปริมาตรเพาะเลี้ยง 300 ลิตร พบว่ามีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับสูตร 2D และเมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพต่อหน่วยในถังหมักขนาด starter A จะพบว่าการเตรียมกล้าเชื้อด้วยอาหาร 2D ปรับปรุงในสภาวะที่มีการปรับปรุงถังหมักมีประสิทธิภาพมากกว่าการเตรียมกล้าเชื้อแบบดั้งเดิมประมาณ 50 เท่า ดังนั้นทำให้ค่าใช้จ่ายในส่วนขององค์ประกอบของอาหาร ค่าไฟ และแรงงาน ต่อหน่วยการผลิตลดลง อีกทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตได้มากขึ้น

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

บรรณานุกรม

Abubaker, H. O., Sulieman, A. M. E., & Elamin, H. B. (2012). Utilization of *Schizosaccharomyces pombe* for Production of Ethanol from Cane Molasses. *Journal of Microbiology Research,* 2, pp. 36-40. doi:10.5923/j.microbiology.20120202.06

Arrizon, J., & Gschaedler, A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. *Canadian journal of microbiology,* 48(11), 965-970.

Azenha, M., Vasconcelos, M., & Moradas-Ferreira, P. (2000). The Influence of Cu Concentration on Ethanolic Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 90, 163-167. doi:10.1016/S1389-1723(00)80104-8

Azhar, S. H. M., Abdulla, R., Jambo, S. A., Marbawi, H., Gansau, J. A., Faik A. A. M. & Rodrigues, K. F. (2017). Yeasts in sustainable bioethanol production: A review. *Biochemistry and Biophysics Reports,* 10, pp. 52-61. doi:10.1016/j.bbrep.2017.03.003

Blackwell, K. J., Singleton, l., & Tobin, J. M. (1995). Metal cation uptake by yeast: a review. *Apply Microbiol Biotechnol,* 43, 579-584.

Breisha, G. Z. (2010). Production of 16% ethanol from 35% sucrose. *Journal of Biomass and Bioenergy,* 34(8), pp. 1243-1249. doi:https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2010.03.017

Brown, W. F., Klopfenstein, T. J., Merrill, J. K., & McDonnell, M. L. (1981). Corn or soybean hulls as energy supplements to crop residues. *Journal of Animal Science,* 53.

Cao, W., & Liu, R. (2013). Screening and optimization of trace elements supplement in sweet sorghum juice for ethanol production. *Biomass and Bioenergy,* 50, 45-51. doi:https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.10.016

Cheng, N. G., Hasan, M., Kumoro, A. C., Ling C. F. & Tham, M. (2009). Production of Ethanol by Fed-Batch Fermentation. *Pertanika Journal Science & Technology,* 17(2), pp. 399-408.

Fadel, M., Zohri, A.-N., El-Dean, A., Auob, A. H., & Deiab, B. (2016). Enhancing Ethanol Yield From Sugar Cane Molasses Fermentation by Addition of Depolymerising Enzymes. *Indian Journal of Applied Research,* 6, 291-294.

Hidzir, N. S., Som A. M., & Abdullah, Z. (2014). *Ethanol Production via Direct Hydration of*

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

Ethylene Paper presented at the International Conference on Global Sustainbility and Chemical Engineering (ICGSE).

Joginder, S. D., Ashok, K., & Sunil, K. T. (2013). Bioethanol production from starchy part of tuberous plant (potato) using *Saccharomyces cerevisiae* MTCC-170. *African Journal of Microbiology Research,* 7(46), pp. 5253-5260. doi:10.5897/ajmr2013.6122

Jones, H. L., Margaritis, A., & Stewart, R. J. (2007). The combined effects of oxygen supply strategy, inoculum size and tempuerature profile on very-high-gravity beer fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the Institute of Brewing,* 113, pp. 168-184.

Knop, M. (2011). Yeast cell morphology and sexual reproduction--a short overview and some considerations. *Journal of Comptus Rendus Biologies,* 334(8-9), pp. 599-606. doi:10.1016/j.crvi.2011.05.007

Kosaric, N., A. , Wieczorek, G. P., Cosentino, R. J., & Magee., R. J. (1983). Ethanol fermentation. In e. H.-J.Rehm and G. Reed, Dellweg, H., Verlag Chemie, Weinheim, *Biotechnology* (Vol. 3, pp. 257-385). Verlag Chemie: Weinheim.

Laopaiboon, L., Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., & Laopaiboon, P. (2009). Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource technology,* 100(18), pp. 4176-4182.

Lasztity, R. (2017). *Use of yeast biomass in food production*: Routledge.

Lavarack, B. P. (2003). Estimates of Ethanol Production from Suger Cane Feedstocks. *Australian Society of Suger Cane Technologists (ASSCT*).

Lin, Y., Zhang, W., Li, C., Sakakibara, K., Tanaka, S., & Kong, H. (2012). Factors affecting ethanol fermention using *Saccromyces cerevisiae* BY4742. *Biomass of Bioenergy,* 47, pp. 395-401.

Liu, R., & Shen, F. (2008). Impacts of Main Factors on Bioethanol Fermentation from Stalk Juice of Sweet Sorghum by Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresource technology,* 99, pp. 847-854. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2007.01.009

Liu, X. F., Supek, F., Nelson, N., & Culotta, V. C. (1997). Negative control of heavy metal uptake by the *Saccharomyces cerevisiae* BSD2 gene. *Journal of biological chemistry,* 272(18), 11763-11769. doi:10.1074/jbc.272.18.11763

Louhichi, B., Belgaib, J., benamor, H., & Hajji, N. (2013). Production of bio-ethanol from three varieties of dates. *Renewable Energy,* 51, pp. 170-174.

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

doi:https://doi.org/10.1016/j.renene.2012.07.028

Maria, C. d. A. W., Mariana, L. S., & Ester, R. G. (2014). Selection of inoculum size and *Saccharomyces cerevisiae* strain for ethanol production in simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of sugar cane bagasse. *African Journal of Biotechnology,* 13(27), pp. 2762-2765. doi:10.5897/ajb2013.13179

Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., & Leao, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology,* 97, pp. 540-545. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02331.

O'Connor-Cox, E. S. C., J. Paik., & Ingledew, W. N. (1991). Improved ethanol yields through supplementation with excess assimilable nitrogen. *Journal of industrial microbiology,* 8(1), pp. 45-52.

Osunkoya, O. A., & Okwudinka, N. J. (2011). Utilization of sugar refinery waste (molasses) for ethanol production- using *Saccharomyces cerevisiae*. *American Journal of Scientific and Industrial Research,* 2(4), pp. 694-706. doi:10.5251/ajsir.2011.2.4.694.706

Ochiai, E.-I. (1983). Copper and the biological evolution. *Journal Biosystems,* 16(2), pp. 81-86. doi:https://doi.org/10.1016/0303-2647(83)90029-1

Panchal, C. J. (1990). *Yeast Strain Selection for Fuel Etahnol Production*. Marcel Dekker, INC: Ontario Canada.

Patil N. P., & Patil, V. S. (2017). Fuel Ethanol from Cane Molasses A Review of Feedstocks, Technologies, Opportunities and Challenges. *Journal of Natural Products and Resources,* 3(1(2017)), pp. 104-110.

Patrascu, E., Rapeanu, G., & Hopulele, T. (2009). Current approaches to efficient biotechnological production of ethanol. *Innovative Romanian Food Biotechnology,* 4, 1.

Pornpukdeewattana, S., Chalearmkit P., & Iamsamang, P. (2014). Optimization of Fermentation Temperature for Very High Gravity Ethanol Production using Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae* SC90. *Thammasat International Journal of Science and Technology,* 19, pp. 21-37.

Rees, E., & Stewart, G. (1999). Effects of Magnesium, Calcium and Wort Oxygenation on the Fermentative Performance of Ale and Lager Strains Fermenting Normal and High Gravity

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

Worts. *Journal of the Institute of Brewing,* 105. doi:10.1002/j.2050-0416.1999.tb00021.x

Roehr, M., Kosaric, N., Vardar-Sukan, F., Pieper, H. J., & Senn, T. (2001). *The biotechnology of ethanol: classical and future applications*. Germany: Wiley-VCH Weinheim

Rose, A. H., & Harrison, J. S. (1993). *The Yeasts* (Vol. 5). New York: Academic Press.

Stanbury, P. F., Whitaker A., & Hall, S. J. (1999). *Principle of fermentation technology*. United Kingdom: Butterworth-Heinemann.

Stehlik-Tomas, V., Zetic, V., Stanzer, D., Grba, S., ,& Vahcic, N. (2004). Zinc, Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisae*. *Food Technology and Biotechnology,* 42, pp. 115-120.

Techaparin, A., Thanonkeo, P., & Klanrit, P. (2017). High-temperature ethanol production using thermotolerant yeast newly isolated from Greater Mekong Subregion. *Brazilian journal of microbiology : publication of the Brazilian Society for Microbiology,* 48(3), 461-475. doi:10.1016/j.bjm.2017.01.006

Udeh, H. O., & Kgatla, T. E. (2013). Role of magnesium ions on yeast performance during very high gravity fermentation. *Journal of Brewing and Distilling,* 4(2), 19-45. doi:10.5897/jbd2013.0041

Walker G. M. & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages,* 2(4). doi:10.3390/beverages2040030

Yogini P Bhavsar-Jog. Bi, E. (2017). Mechanics and regulation of cytokinesis in budding yeast. *Semin cell developmental biology,* 66, pp. 107-118.

Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J., Azirun, M., Hashim, R., & Nasrulhaq Boyce, A. (2014). Bioethanol Production from Fermentable Sugar Juice. *The Scientific World Journal,* 2014, 11 pages.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน. (2562). ฐานข้อมูล นโยบายและประกาศ (เอทานอล). วันที่สืบค้นข้อมูล 8/10/2562, เข้าถึงได้จาก http://www.dede.go.th/ewt_news.php?nid=46775&filename=index

กระทรวงพลังงาน. (2554). คู่มือการพัฒนาและการลงทุนผลิตพลังงานทดแทน ชุดที่ 7. เชื้อเพลิงเอทานอล. กรุงเทพฯ.

ณภักดิ์ษร คำอิน. (2560). ผลของปริมาณกากน้ำตาลและธาตุอาหารปริมาณน้อยต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์. ชลบุรี: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

เดชาวุฒิ วานิชสรรพ์, นิทัศน์ นิลฉวี, ทวีศักดิ์ รัตนคม และพรรณนิการ์ กงจักร. (2558). ขั้นตอนวิธีนับ

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

จำนวนเชื้อบนแผ่นฮีโมซิโตมิเตอร์ด้วยเทคนิคประมวลผลภาพและดีบีสแกน. วารสารเทคโนโลยีสารสนเทศ, 11, *No.*2, 56-61.

ธนาคารแห่งประเทศไทย. (2562). รายงานสถานการณ์ราคาเอทานอลของไทยและต่างประเทศไตรมาส 2/2562. เข้าถึงได้จาก https://www.bot.or.th/Thai/MonetaryPolicy/NorthEastern/

นพวรรณ ด่านบำรุงตระกูล, ธีราพร ตังเจริญ และประมุข ภระกูลสุขสถิตย์. (2014). ผลของยูเรียต่อการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SC90. การประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 52 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์).

รัชพล พะวงศ์รัตน์. (2558). กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้ง ทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส. *Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University*, pp. 143-157.

ลักขณา เหล่าไพบูลย์, กุลเชษฐ์ เพียรทอง, วรวุฒิ ศรีดี, ประสิทธิ์ ใจศิล, มัลลิกา บุญมี และพัฒนา เหล่าไพบูลย์. (2011). การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่างหวานในระดับขยายขนาด. *KKU Research Journal,* 16(8), หน้า 919-930.

ศูนย์ความเป็นเลิศด้านการจัดการสารและของเสียอันตราย. (2560). รายงานฉบับสมบูรณ์ โครงการศึกษาปริมาณและการใช้แอลกอฮอล์ในประเทศ. Retrieved from เข้าถึงได้จาก https://www.liquor.or.th/assets/images/PDF/

เศรษฐวัชร ฉ่ำศาสตร์, กรองจันทร์ รัตนประดิษฐ์ และขวัญฤทัย มาลัยเรือง. (2562). รายงานผลในการดำเนินงานในรอบ 12 เดือน โครงการ"ปรับปรุงการผลิตกล้าเชื้อยีสต์ (*Starter A* และ *Starter B)* ของโรงงานผลิตเอทานอล ชลบุรี.

สาวิตรี ลิ่มทอง. (2549). ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพฯ: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. (2558). ยีสต์และเทคโนโลยีของยีสต์. กรุงเทพฯ: บริษัทก้าวไทยแอดเวอร์ไทซิ่ง แอนด์ พริ้นติ้ง.

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast Malt medium (YM) (Breisha, 2010) ประกอบด้วย

Yeast extract	3	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3	กรัมต่อลิตร
Peptone	5	กรัมต่อลิตร
Glucose	10	กรัมต่อลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่ฟลาสก์ ฟลาสก์ละ 100 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. สารละลายแอมโมเนียเหลว (NH_3OH)

- ชั่งแอมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) มา 66.07 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
- ชั่ง NaOH 320 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร
- ค่อย ๆ เทผสมกัน จนเข้ากัน

3. สารละลาย HCl

- ตวงกรด HCl เข้มข้น 37 % v/v ปริมาตร 334 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

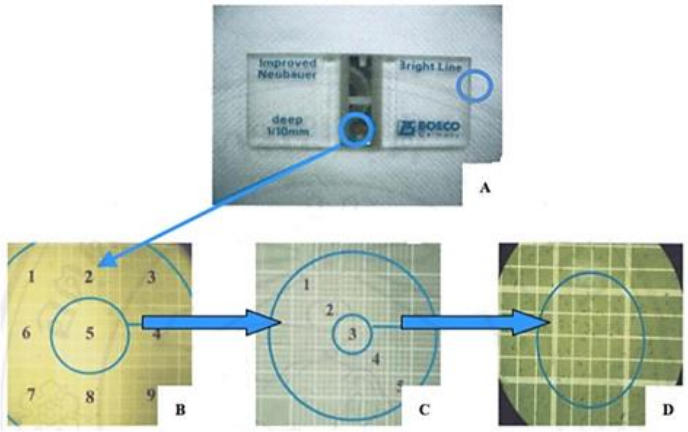
3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

ภาคผนวก ข
วิธีวิเคราะห์

1. การนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

วาง Cover Glass บนฮีมาไซโตมิเตอร์ ซึ่งแผ่น Cover Glass นี้จะอยู่เหนือผิวตาราง 0.1 มิลลิเมตร ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำตัวอย่าง (ทำการเจือจางความเข้มข้นที่หมาะสม) มา 50 ไมโครลิตร วางปลายปิเปตใกล้ขอบ Cover Glass จากนั้นค่อยๆ หยดน้ำตัวอย่างลงไป ซึ่งน้ำจะไหลเข้าใต้ Cover Glass เองจนเต็มพื้นที่ตาราง (ภาพที่ ข-1) นับปริมาณเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่ใช้สำหรับการนับจะแบ่งเป็น 9 ช่องในช่องตรงกลาง จะถูกแบ่งเป็น 25 ช่องเล็ก และแต่ละ 25 ช่องจะถูกแบ่งเป็น 16 ช่องเล็กการนับเซลล์ยีสต์จะที่อยู่ในช่องที่ 5 ของแต่ละ Chamber โดยสุ่มนับ 5 ช่องในเส้นทแยงมุมแล้วนำมาคำนวณหาปริมาณเซลล์ยีสต์ดังนี้

ปริมาณเซลล์ยีสต์ = จำนวนเซลล์ที่นับได้ x 5 x 10^4 x อัตราการเจือจาง



ภาพที่ ข- 1 การนับเซลล์ยีสต์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

A = พื้นที่สำหรับการนับมี 2 Chambers

B = บริเวณที่ใช้นับจะแบ่งออกเป็น 9 ช่อง

C = การนับในเส้นแนวทแยงมุม

D = 16 ช่องเล็กที่ใช้นับเซลล์

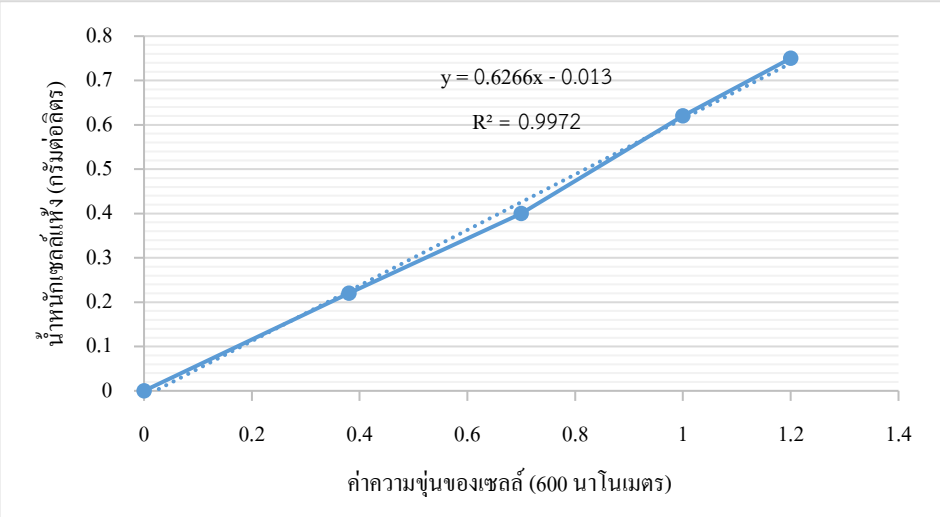
ที่มา: (เดชาวุฒิ วานิชสรรพ์, นิทัศน์ นิลฉวี, ทวีศักดิ์ รัตนคม, และพรรณนิการ์ กงจักร, 2558)

2. การวัดมวลเซลล์ โดยวิธีการวัดความขุ่นของเซลล์

นำตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์มาไปนำเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใส (Supernatant) ในส่วนของตะกอนเซลล์ (Pellet) ที่ได้ต้องทำการล้างเซลล์ให้สะอาด โดยเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (Vortex) นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งเก็บเอาเฉพาะส่วนของตะกอนเซลล์ จากนั้นทำการล้างเซลล์ซ้ำ อีก 2 ครั้ง ตะกอนเซลล์ที่ได้นำมาวิเคราะห์ต้องทำการเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ก่อนที่จะนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยใช้น้ำกลั่นเป็นแบลงค์ ทำการบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ และค่าอัตราการเจือจางเพื่อใช้ในการคำนวณค่าความขุ่น โดยค่าความขุ่นที่วัดได้สามารถคำนวณกลับเป็นน้ำหนักแห้งได้ด้วยการเปรียบเทียบค่ากับกราฟมาตรฐานการเจริญของจุลินทรีย์ สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งกับค่าความขุ่นที่วัดได้

3. กราฟมาตรฐานการเจริญของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SC90

นำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ถ่ายลงในอาหารเหลว YM เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการเก็บตัวอย่าง 30 มิลลิลิตร เพื่อนำไปวัดความขุ่นให้มีค่าอยู่ในช่วง 0.1-0.8 ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปวิเคราะห์หาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐานการเจริญของเชื้อระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักเซลล์แห้ง



ภาพที่ ข- 2 กราฟมาตรฐานการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90

3119683100 BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101

4. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (Cell Dry Weight)

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดตัวอย่างที่ผ่านการชั่งน้ำหนักไว้เรียบร้อยแล้ว จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสาร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อล้างตะกอนเซลล์ แล้วนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปชั่งด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง แล้วนำมาคำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งได้ ดังนี้

น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) = [(น้ำหนักเซลล์ (กรัม) + น้ำหนักหลอด (กรัม)] – น้ำหนักหลอด (กรัม)

5. การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้

การวิเคราะห์ปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้ด้วยเครื่องรีแฟรกโตมิเตอร์ (Refractometer) กดปุ่มเปิดเครื่องคำว่า Start เติมน้ำกลั่นลงในหลุมให้ท่วมต้องระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศและกดปุ่มคำว่า Zero รอสักครู่ หลังจากนั้นเทน้ำกลั่นออกเช็ดที่หลุมเบา ๆ แล้วเติมตัวอย่างโดยใช้ไมโครปิเปต ทำการปิเปตตัวอย่างมา 500 ไมโครลิตร จึงกดปุ่ม Start รอสักครู่จะขึ้นตัวเลขที่หน้าจอดิจิตอล ทำการจดบันทึกค่าปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด หน่วยเป็นองศาบริกซ์

ภาพที่ ข- 3 เครื่องวัดปริมาณของแข็งทั้งหมดที่ละลายได้

3119683100
BUU iThesis 60910100 thesis / recv: 12062563 20:34:16 / seq: 101