การตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยชานอ้อย เพื่อการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง

Immobilization of *Saccharomyces cerevisiae* to Sugarcane Bagasse for Fuel Ethanol Production

ชุติมา แก้วกระจาย* และ พัชรี สินธุนาวา

Chutima Kaewkrajay* and Patcharee Sinthunawa

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนครศรีอยุธยา

Science Department, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Si Ayutthaya Rajabhat University

วันที่รับบทความ 12 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2558

วันที่ตอบรับตีพิมพ์ 10 สิงหาคม พ.ศ. 2558

บทคัดย่อ

การผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ST-541 ด้วยวิธีตรึงเซลล์และวิธีเซลล์อิสระในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 160 กรัมต่อลิตร ที่ประกอบด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ยีสต์เอ็กแทรกซ์ 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 พบว่าการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยชานอ้อยให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 72 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 88.04 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ส่วนการหมักเอทานอลด้วยเซลล์อิสระให้ค่าเอทานอลใกล้เคียงกับวิธีตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อย ให้ค่าเอทานอลเท่ากับ 71 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 86.82 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ในขณะที่วิธีตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนทให้ค่าเอทานอลน้อยกว่าสองวิธีข้างต้น คือให้เอทานอลเท่ากับ 67 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ให้ค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 81.93 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อนำวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยชานอ้อยไปศึกษาการหมักแบบรีพิท-แบตช์ พบว่าการหมักรอบแรกให้เอทานอลสูงสุดโดยให้เอทานอลเท่ากับ 73 กรัมต่อลิตร การหมักรอบที่สองให้เอทานอล 67 กรัมต่อลิตร และการหมักในรอบที่สามให้ปริมาณเอทานอล 63 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เห็นได้ว่าการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยชานอ้อย นอกจากยีสต์หมักเอทานอลได้สูงแล้วยังสามารถนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้หมักได้ใหม่อันเป็นการลดระยะเวลาการเตรียมเซลล์ยีสต์มีผลให้ต้นทุนการผลิตเอทานอลลดลง

คำสำคัญ : การตรึงเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* ชานอ้อย เอทานอลเชื้อเพลิง การหมักแบบรีพิท-แบตช์

*Corresponding author. E-mail : kchutima@aru.ac.th, pretty_yeast@yahoo.com

Abstract

Fuel ethanol production from *Saccharomyces cerevisiae* ST-541 in diluted sugarcane blackstrap molasses containing 160 gL^{-1} reducing sugar, 0.5 gL^{-1} $(NH_4)_2SO_4$, 0.5 gL^{-1} KH_2PO_4, 1.5 gL^{-1}yeast extract and adjusted an initial pH to 5.0 by using immobilized and free cell methods. The results revealed that the yeast cells absorbed in sugarcane bagasse as immobilized support could produce higher ethanol concentration than other methods. It produced 72 gL^{-1} of ethanol after 72 h, with a productivity of 1.00 $gL^{-1}h^{-1}$ and fermentation yield of 88.04% of the theoretical yield. In similar way, the ethanol fermentation by yeast free cells, it produced ethanol as sugarcane bagasse immobilized support, 71 gL^{-1} of ethanol after 72 h, a productivity of 0.99 $gL^{-1}h^{-1}$ and a fermentation yield of 86.82% of the theoretical yield. In contrast, the ethanol fermentation by calcium alginate-immobilized *S. cerevisiae*, produced less ethanol than the methods mentioned above. It produced 67 gL^{-1} of ethanol after 72 h, with a productivity of 0.93 $gL^{-1}h^{-1}$ and a fermentation yield of 81.93% of the theoretical yield. The yeast cells absorbed in sugarcane bagasse support were performed in repeat batches of fermentation. The results implied that the first fermentation cycle produced the highest amount at 73 gL^{-1}, followed by second and third fermentation cycles at 67 and 63 gL^{-1}, respectively. These results implied that sugarcane bagasse-supported yeast cells not only produced high concentrations of ethanol, the yeast cells can also be reused for the next cycle of fermentation. Therefore, this method could save time and cost for fuel ethanol fermentation.

Keywords : Immobilization, *Saccharomyces cerevisiae*, sugarcane bagasse, fuel ethanol production, repeat-batch fermentation

บทนำ

เอทานอลเข้ามามีบทบาทสำคัญในการใช้เป็นพลังงานทดแทน นับตั้งแต่เกิดวิกฤตการณ์ราคาน้ำมันปิโตรเลียมแพงขึ้นทั่วโลก ทำให้หลาย ๆ ประเทศให้ความสนใจในการนำเอทานอลมาผสมกับแก๊สโซลีนเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงในการขับเคลื่อนรถยนต์ โดยมีอัตราส่วนการผสมแตกต่างกันไป เช่น บราซิลใช้เอทานอลผสมในแก๊สโซลีน 24 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แคนาดา ใช้เอทานอลผสม 7.5-10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อเมริกา โคลัมเบียและไทย ใช้เอทานอลผสม 10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ส่วนสวีเดนและอินเดีย ใช้เอทานอลผสม 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เป็นต้น (Sanchez & Cardona, 2008) สำหรับประเทศไทยความต้องการเอทานอลมีมากขึ้น จากการรายงานการใช้เอทานอลในเดือนเมษายน 2014 พบว่ามีการใช้เอทานอลเฉลี่ย 3.18 ล้านลิตรต่อวัน และคาดว่าในปี ค.ศ. 2021 จะมีการใช้เอทานอลภายในประเทศมากถึง 9 ล้านลิตรต่อวัน เอทานอลส่วนใหญ่ถูกนำมาใช้กับรถยนต์ เห็นได้จากรถยนต์ที่ออกจำหน่ายในตลาดของไทยสามารถเติม E20 และ E85 ที่มีปริมาณการสั่งซื้อมากขึ้นถึง 3 เท่า จาก 100,000 คันในปี ค.ศ. 2013 เป็น 300,000 คันในปี ค.ศ. 2014 (Bloyd & Foster, 2014)

สำหรับการวิจัยด้านพลังงานทดแทนอย่างเอทานอลนอกจากจะให้ความสำคัญกับจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล ไม่ว่าจะเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอล อย่าง *Pichia kudriavzevii* (Sankh, Thiru, Saran & Rangaswamy, 2013; Kaewkrajay, Dethoup & Limtong, 2014) *Kluyveromyces marxianus* (Limtong, Sringiew & Yongmanitchai, 2007; Farfan, Lappe, Saavedra, Mendez & Perez, 2008) *Saccharomyces cerevisiae* (Hernandez-Salas *et al*., 2009, Saravanakumar, Senthilraja & Kathiresan, 2013) หรือแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักเอทานอลอย่าง *Zymomonas mobilis* แล้ว (Golias, Dumsday, Stanley & Pamment, 2002) วัตถุดิบที่นำมาใช้ในการหมักเอทานอลก็มีความสำคัญเช่นกันในการลดต้นทุนการผลิต ไม่ว่าจะเป็น อ้อย มันสำปะหลัง กากน้ำตาล วัสดุที่ให้เส้นใยพวกเซลลูโลส หรือวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (ศิรินุช จินดารักษ์, 2551; เสรี มหาวิชัด และ เฉลิม เรื่องวิริยะชัย, 2555) นอกจากนี้สิ่งที่มีความสำคัญไม่แพ้กันคือกระบวนการผลิตที่นำวิธีการต่าง ๆ มาใช้เพื่อลดต้นทุนการผลิต หนึ่งในหลายวิธีคือการตรึงเซลล์ เพื่อให้จุลินทรีย์คงประสิทธิภาพในการหมักเอทานอล และสามารถนำเซลล์จุลินทรีย์ที่หมักเอทานอลในคราวแรกกลับมาใช้ได้ใหม่ด้วยเทคนิคการหมักแบบรีพิท-แบตช์ ซึ่งจะเป็นการลดระยะ lag ของการหมักลง ทำให้ระยะเวลาหมักสั้นลง ปัจจุบันได้มีการวิจัยและพยายามที่จะหาวัสดุตรึงเซลล์ที่เป็นของเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้มากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นใยบวบ ชานข้าวฟ่าง ดอกของ Mahula (*Madhuca latifolia* L.) ซึ่งเป็นพืชป่าของอินเดีย รังไหม เป็นต้น (Roble, Ogbonna & Tanaka, 2002; Yu, Zhang & Tan, 2007; Swain, Kar, Sahoo & Ray, 2007, Eiadpum, Limtong & Phisalaphong, 2012) สำหรับชานอ้อยเป็นของเหลือทิ้งเป็นลิกโนเซลลูโลสที่ประกอบด้วยเซลลูโลส 40 เปอร์เซ็นต์ เฮมิเซลลูโลส 24 เปอร์เซ็นต์ และลิกนิน 25 เปอร์เซ็นต์ (Lee, Chung & Day, 2009) ผนังเซลล์ทุติยภูมิมีสามชั้น คือ S1, S2 และ S3 ที่ล้อมรอบด้วยผนังเซลล์ปฐมภูมิ โดยชั้น S2 และ S3 มีเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบ ขณะที่ชั้น S1 มีลักษณะเป็นผลึกเซลลูโลส ด้วยลักษณะดังกล่าวทำให้ชานอ้อยมีคุณสมบัติในการดูดซับหรือยึดเกาะของเซลล์จุลินทรีย์ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวได้ดี (Karnitz *et al*., 2007; Homagai, Ghimire & Inoue, 2010)

S. cerevisiae จัดเป็นยีสต์ที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลอย่างกว้างขวาง เพราะนอกจากจะเป็นยีสต์ที่มีความปลอดภัยต่อการบริโภคแล้วยังเป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลสูงจากการหมักเอทานอลโดยใช้ดอก Mahula เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ระหว่างยีสต์ *S. cerevisiae* CTCRI กับแบคทีเรีย *Z. mobilis* MTCC 92 พบว่าเมื่อการหมักสิ้นสุดลงที่ 96 ชั่วโมง *S. cereivisiae* CTCRI หมักเอทานอลได้มากกว่า *Z. mobilis* MTCC 92 ถึง 21.2 เปอร์เซ็นต์ คือให้เอทานอล 149 กรัมต่อกิโลกรัม ขณะที่ *Z. mobilis* MTCC 92 หมักได้ 122.9 กรัมต่อกิโลกรัม (Behera, Mohantly & Ray, 2010) นอกจากนี้ยังมีการรายงานถึงความต้านทานต่อการมีชีวิตรอดของยีสต์ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงจากการทดลองหมักเอทานอลเป็นเวลา 8 วัน พบว่า *Kluyveromyces lactis* มีการตายอย่างสมบูรณ์ ขณะที่ *S. cerevisiae* K-701 สามารถทนต่อเอทานอลได้ และพบว่าการทำ co-culture ของยีสต์ทั้งสองมีผลต่อการอยู่รอดมากกว่าการใช้เชื้อเพียงชนิดเดียว (Yamaoka, Kurita & Kubo, 2014)

ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วยชานอ้อยเพราะมีคุณสมบัติในการดูดซับหรือยึดเกาะได้ดีพร้อมศึกษาการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ด้วยเทคนิคการหมักแบบรีพิท-แบตช์ เพื่อลดต้นทุนการผลิตในส่วนของการเตรียมเซลล์และลดระยะ lag ของการหมักลง ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการพัฒนาการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงของไทยในอนาคต

วิธีการวิจัย

1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

Saccharomyces cerevisiae สายพันธุ์ ST-541 ที่แยกจากซากแมลง บริเวณ อ. ทองผาภูมิ จ. กาญจนบุรี โดย ดร.ศศิธร จินดามรกฎ และจัดเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ที่ห้องปฏิบัติการเก็บรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

นำจุลินทรีย์สายพันธุ์ดังกล่าวมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งเอียง Yeast extract malt extract peptone dextrose (YM) agar บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 36-48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไว้ใช้สำหรับการศึกษาต่อไป

2. การเตรียมกล้าเชื้อ

นำเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหารแข็งเอียง YM บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเหลวที่ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อ ประกอบด้วย น้ำตาลรีดิวซ์จากกากน้ำตาล เข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มแบบเขย่าบนเครื่องเขย่าแบบหมุน ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์จะอยู่ในระยะ late log-phase เก็บเซลล์ซัสเพนชันนี้ไว้สำหรับการหมักต่อไป

3. การเตรียมอาหารหมัก

นำกากน้ำตาลที่วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้นได้ 41.6 เปอร์เซ็นต์ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 160 กรัมต่อลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ยีสต์เอ็กแทรกซ์เข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ซึ่งสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมของยีสต์ *S. cerevisiae* ST-541 ซึ่งได้ศึกษาไว้ในห้องปฏิบัติการเดียวกันก่อนหน้านี้ นำอาหารหมักดังกล่าวใส่ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. การเตรียมวัสดุและตรึงเซลล์ยีสต์

4.1 การเตรียมวัสดุและตรึงเซลล์ยีสต์แบบยึดเกาะ (adsorption method)

ตัดชานอ้อย (sugarcane bagasse) ที่อบไว้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน เป็นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 10 x 10 มิลลิเมตร (Yu *et al*., 2007) แล้วนำไปเก็บไว้ในโถดูดความชื้นเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อรา จากนั้นนำวัสดุตรึงปริมาณ 2.0 กรัม ใส่ในอาหารสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร (สำหรับอาหารหมักปริมาตร 200 มิลลิลิตร) นำไปทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นถ่ายยีสต์ที่เพาะเลี้ยงไว้บนอาหาร YM เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูป ลงในอาหารที่มีวัสดุตรึงเซลล์ดังกล่าว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็ว 160 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24

ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ยึดเกาะวัสดุตรึงก่อนนำไปใช้ (สุวิชา กัลยาณมิตร, 2548; Rattanapan, Limtong & Phisalaphong, 2011; Eiadpum *et al*., 2012)

4.2 การเตรียมวัสดุและตรึงเซลล์ยีสต์แบบดักจับ (entrapment method)

นำสารละลายเซลล์ยีสต์ (เซลล์ยีสต์ 1 ลูป ในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร) ผสมกับสารละลายโซเดียมอัลจิเนท (sodium alginate) ที่มีความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ใช้หลอดฉีดยาที่ผ่านการฆ่าเชื้อดูดสารละลายผสม แล้วหยดลงในบิกเกอร์ที่มีสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) เข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ที่มีการกวนเบา ๆ อย่างสม่ำเสมอในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์นาน 15 นาที แล้วล้างเม็ดเจลด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) เข้มข้น 9 กรัมต่อลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อจำนวน 3 รอบ ก่อนนำไปใช้ (Hang, 1989; Bangrak, Limtong & Phisalaphong, 2011; Eiadpum *et al*., 2012)

5. ศึกษาการหมักเอทานอลโดยวิธีตรึงเซลล์ (immobilized cells) และเซลล์อิสระ (free cells)

5.1 วิธีตรึงเซลล์

นำเซลล์ตรึงที่ได้จากข้อ 4.1 และ 4.2 จำนวน 2.0 กรัม ใส่ลงในอาหารหมักกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 160 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ยีสต์เอ็กแทรกซ์เข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุก ๆ 24 ชั่วโมง สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอล ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งวิเคราะห์ที่ 0 และ 72 ชั่วโมง

5.2 วิธีเซลล์อิสระ

ใช้ปิเปตดูดสารละลายเซลล์ยีสต์ที่เจริญในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ใช้เป็นกล้าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร (5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรของอาหารหมัก) ใส่ลงในอาหารหมักกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 160 กรัมต่อลิตร เติมแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ยีสต์เอ็กแทรกซ์เข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาส์กขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมงเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุก ๆ 24 ชั่วโมง สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และเอทานอล

6 การหมักแบบรีพิท-แบตช์ (Repeat-batch fermentation)

การหมักแบบรีพิท-แบตช์ เป็นการนำเซลล์ที่หมักในรอบแรกกลับมาใช้หมักในรอบการหมักถัดไป เลือกทำเฉพาะวิธีตรึงเซลล์ที่ให้เอทานอลสูงสุด จากข้อ 5.1 โดยทำการหมักแบบแบตช์ติดต่อกัน 3 ครั้ง ในการหมักแต่ละครั้งหากพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารหมักเริ่มหมดจึงหยุดหมัก แล้วถ่ายน้ำหมักส่วนบนออก 90 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นเติมอาหารใหม่ที่มีปริมาตรเท่ากับน้ำหมักที่ถ่ายออกเข้าไปแทนที่ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง มาวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล และความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งวิเคราะห์ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการหมักแต่ละรอบ (ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546; Gomes, Guimaraes, Pereira, Teixeira & Domingues, 2012)

7. การวิเคราะห์ผล

วิเคราะห์การเจริญทำ 2 วิธี คือ 1) วัดค่าความขุ่นของเซลล์ (optical density) ด้วยเครื่อง spectrophotometer (SP-830 Plus Metertech) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร โดยการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ยีสต์ออกจากน้ำหมัก ด้วยความเร็ว 1383 x g นาน 5 นาที แล้วนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้ออย่างน้อย 3 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์กระจายและเจือจางด้วย 0.1M EDTA พีเอช 7 แล้วจึงนำมาวัดหาค่าความขุ่นของเซลล์ (Kaewkrajay *et al*., 2014) และ 2) การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งทำ 2 วิธี คือ 2.1) การหาน้ำหนักเซลล์แห้งในรูปเซลล์อิสระทำโดยนำหลอดทดลองขนาด 16 x 100 มิลลิเมตร ไปอบที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง รอจนอุณหภูมิลดลงถึงอุณหภูมิห้อง จึงนำหลอดทดลองไปชั่งน้ำหนักจากนั้นใส่น้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1383 x g นาน 5 นาที เก็บส่วนใสไว้ ส่วนตะกอนล้างด้วยน้ำกลั่น 3 รอบ ก่อนนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาน้ำหนักเซลล์ 2.2) การหาน้ำหนักเซลล์แห้งในรูปเซลล์ตรึง ทำโดยล้างเซลล์ตรึงในชานอ้อยด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 รอบ นำน้ำล้างที่ได้ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1383 x g นาน 5 นาที แล้วนำตะกอนพร้อมวัสดุตรึงที่ผ่านการล้างแล้วไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส จนกระทั่งน้ำหนักคงที่ แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาน้ำหนักเซลล์ (ดัดแปลงวิธีจาก อุทัยพร อัครานุภาพพงศ์, 2547; สุวิชา กัลยาณมิตร, 2548; Yu *et al*., 2007; Eiadpum *et al*., 2012)

วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959) แล้วนำค่าที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas Chromatography (Varian star 3600 GC พร้อมชุด autosampler 8200) ใช้ n-propanol เป็น internal standard ตามวิธีของ Komagata and Ohmomo (1984) คอลัมน์ที่ใช้เป็น capillary column (DB-wax) เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ยาว 60 เมตร ความหนาของฟิล์ม 0.5 ไมโครเมตร อุณหภูมิคอลัมน์ 70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิ injector 200 องศาเซลเซียส ใช้ FID (flame-ionized detector) และไนโตรเจนเป็น carrier gas ค่าความเข้มข้นของเอทานอลในสารละลายตัวอย่างจะถูกนำไปเปรียบเทียบกับสารละลายเอทานอลมาตรฐานเข้มข้น 2 และ 8 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่สร้างเป็นกราฟมาตรฐานตามวิธี two-point calibration curve (internal standard method) ปริมาตรที่ใช้ในการฉีดเท่ากับ 1 ไมโครลิตร วิเคราะห์ค่าอัตราการผลิตเอทานอล และผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี ตามวิธีของ Morimura, Ling and Kida (1997)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

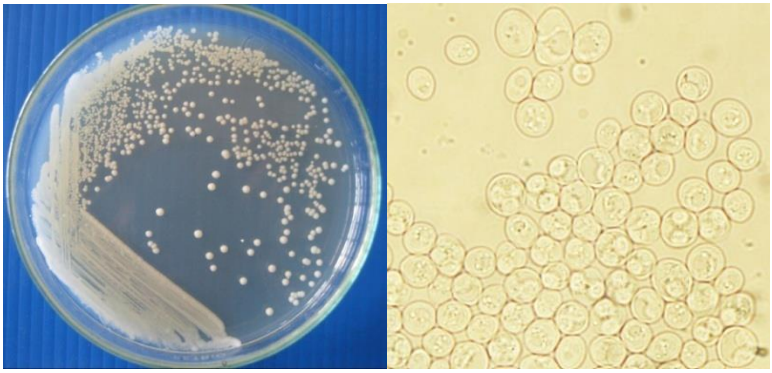
1. วัสดุตรึงเซลล์ และยีสต์ *S. cerevisiae* ST-541

วัสดุตรึงเซลล์แบบยึดเกาะได้จากของเหลือทิ้งทางการเกษตรคือชานอ้อย โดยนำชานอ้อยมาตัดเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 10 x 10 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1A) จากการรายงานของ Yu *et al*. (2007) พบว่าขนาดของวัสดุตรึงซังข้าวโพด (sorghum bagasse) ที่ใหญ่ จะส่งผลให้การเกาะติดของเซลล์ดีกว่าวัสดุตรึงที่มีขนาดเล็ก แต่ถ้าเพิ่มขนาดให้ใหญ่มากเกินไปจะส่งผลต่อการเคลื่อนย้ายและสุดท้ายจะไปมีผลต่อค่าอัตราการผลิต ดังนั้นขนาดของวัสดุตรึงที่เหมาะสมของซังข้าวฟ่างจำเป็นต้องมีการศึกษาต่อไปแต่ในที่นี้เลือกใช้ 10 x 10 x 10 มิลลิเมตรไปพรางก่อน จากการวิจารณ์ของ Yu *et al*. (2007) ทำให้การทดลองนี้เลือกใช้ชานอ้อยขนาด 10 x 10 มิลลิเมตร ส่วนความสูงไม่ได้กำหนดเนื่องจากชานอ้อยที่นำมาใช้ได้ผ่านการหีบมาจึงมีลักษณะแบน (เฉลี่ย 0.2-0.3 มิลลิเมตร)

วัสดุตรึงเซลล์แบบดักจับคือแคลเซียมอัลจิเนท ที่ภายในมีเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ST-541 (ภาพที่ 2) โดยขนาดของวัสดุตรึงมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับ 0.2 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1B)

(A) (B)

ภาพที่ 1 วัสดุตรึง (A) ชานอ้อย (B) แคลเซียมอัลจิเนท



(A) (B)

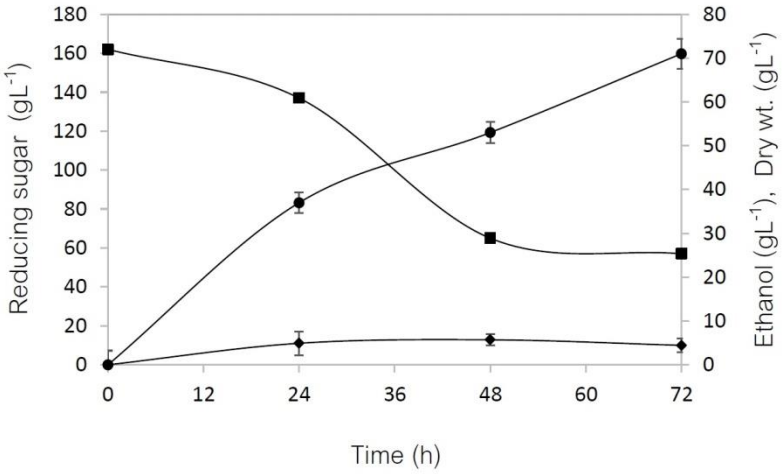
ภาพที่ 2 *S. cerevisiae* ST-541 (A) โคโลนีของยีสต์บนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ (B) ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่เลี้ยงไว้บนอาหารแข็ง YM บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่กำลังขยายภาพ 1000 เท่า

2. การหมักเอทานอลโดยวิธีตรึงเซลล์ (immobilized cells) และเซลล์อิสระ (free cells)

การหมักเอทานอลโดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 160 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต เข้มข้น 0.5 กรัมต่อลิตร ยีสต์เอ็กแทรกซ์ เข้มข้น 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 นำไปบ่มแบบเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าวิธีการตรึงเซลล์แบบยึดเกาะโดยใช้ชานอ้อยเป็นวัสดุตรึง ให้ผลการหมักเอทานอลได้ดีใกล้เคียงกับแบบเซลล์อิสระ ในขณะที่การตรึงเซลล์ด้วยวิธีแบบดักจับโดยใช้แคลเซียมอัลจิเนท ให้ผลการหมักเอทานอลน้อยกว่า 2 วิธีข้างต้น ดังนี้

2.1 วิธีเซลล์อิสระ

จากกากหมักเอทานอลโดยวิธีเซลล์อิสระ พบว่ายีสต์หมักเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 71 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 86.82 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ส่วนการใช้น้ำตาลพบว่าในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง มีน้ำตาลคงเหลือ 57 กรัมต่อลิตร เมื่อพิจารณาการเจริญพบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรกยีสต์มีการเจริญอย่างรวดเร็ว วิเคราะห์ได้ 4.9 กรัมต่อลิตร และวิเคราะห์ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งได้สูงสุดที่ 48 ชั่วโมง คือ 5.7 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งลดลง คือเท่ากับ 4.4 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยีสต์ต้องอยู่ในสภาพที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงจึงอาจมีการตายและหยุดการเจริญลงได้ (ภาพที่ 3)

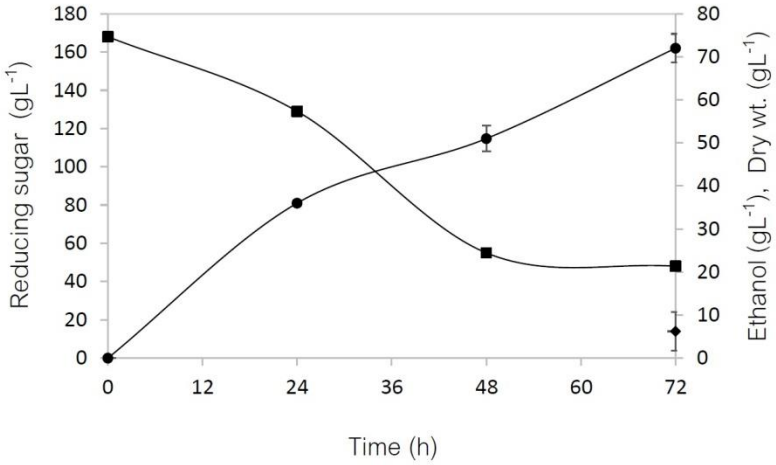


ภาพที่ 3 การหมักเอทานอลโดยวิธีเซลล์อิสระ (■) น้ำตาลรีดิวซ์, (●) เอทานอล และ (♦) น้ำหนักเซลล์แห้ง

2.2 วิธีตรึงเซลล์แบบยึดเกาะด้วยชานอ้อย

การตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อย พบว่ายีสต์หมักเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 72 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง ให้ค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 88.04 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ส่วนการใช้น้ำตาลพบว่าในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการหมักน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็ว และเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง มีน้ำตาลคงเหลือ 48 กรัมต่อลิตร สำหรับการเจริญที่วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งที่ 72 ชั่วโมง ในรูปเซลล์อิสระวิเคราะห์ได้ 0.8 กรัมต่อลิตร และที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึงวิเคราะห์ได้ 5.4 กรัมต่อลิตร (คำนวณจากน้ำหนักแห้งของเซลล์ตรึงในชานอ้อยที่เวลาหมัก 72 ชั่วโมงลบออกจากน้ำหนักแห้งของชานอ้อยเริ่มต้น) เท่ากับว่ามีปริมาณเซลล์แห้งที่อยู่ในน้ำหมักทั้งหมดเท่ากับ 6.2 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 4)

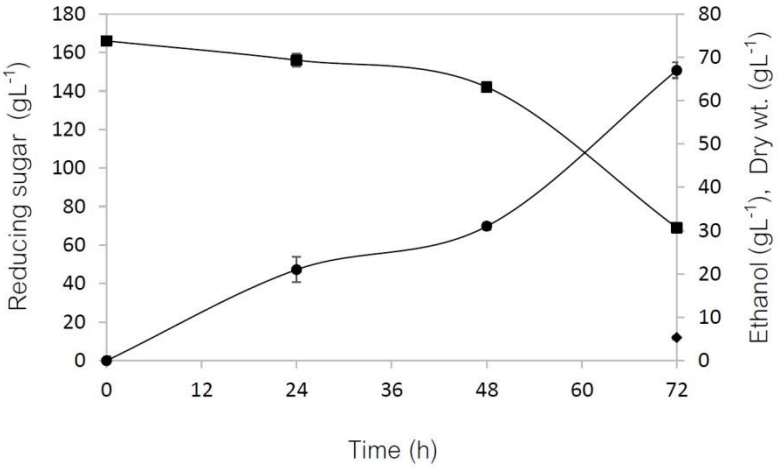
การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งของวิธีตรึงเซลล์ทำเฉพาะที่ 72 ชั่วโมง เท่านั้น ทั้งนี้เพราะเป็นชั่วโมงที่การหมักสิ้นสุดลง ซึ่งวัสดุตรึงเซลล์จะถูกเก็บมาวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งด้วย ส่วนตัวอย่างน้ำหมักที่เก็บทุก ๆ 24 ชั่วโมง จะถูกนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล และน้ำตาลรีดิวซ์เท่านั้น การรายงานน้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดที่มีอยู่ในน้ำหมักจึงมีเฉพาะที่ 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4 การหมักเอทานอลโดยวิธีตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อย (■) น้ำตาลรีดิวซ์, (●) เอทานอล และ (♦) น้ำหนักเซลล์แห้ง

2.3 วิธีตรึงเซลล์แบบดักจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนท

การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้พบว่าให้ค่าเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 67 กรัมต่อลิตรที่เวลาหมัก 72 ชั่วโมง ให้ค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 81.93 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ซึ่งให้เอทานอล อัตราการผลิตเอทานอล และผลผลิตการหมักต่ำกว่า 2 วิธีข้างต้น ส่วนการใช้น้ำตาลพบว่าน้ำตาลค่อย ๆ ลดลงในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก และเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 72 ชั่วโมง มีน้ำตาลคงเหลือ 69 กรัมต่อลิตร สำหรับการเจริญที่วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งทั้งหมดที่ 72 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 5.3 กรัมต่อลิตร โดยอยู่ในรูปเซลล์อิสระ 0.3 กรัมต่อลิตร และที่อยู่ในรูปเซลล์ตรึงวิเคราะห์ได้ 5.0 กรัมต่อลิตร ซึ่งคำนวณได้จากน้ำหนักแห้งของเซลล์ในเม็ดเจลที่เวลาหมัก 72 ชั่วโมง ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 2 ครั้ง ก่อนนำไปอบแห้งจนน้ำหนักคงที่ แล้วลบด้วยน้ำหนักแห้งของเม็ดเจลเริ่มต้น (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การหมักเอทานอลโดยวิธีตรึงเซลล์แบบดักจับด้วยแคลเซียมอัลจิเนท (■) น้ำตาลรีดิวซ์, (●) เอทานอล

และ (◆) น้ำหนักเซลล์แห้ง

จากผลการหมักเอทานอลทั้ง 3 วิธี พบว่าการหมักเอทานอลโดยวิธีตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อย และวิธีเซลล์อิสระให้เอทานอลใกล้เคียงกัน คือ 72 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 88.04 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และ 71 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมง มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 86.82 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ จากการรายงานการหมักเอทานอลของ Eiadpum *et al*. (2012) ในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 220 กรัมต่อลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042 และ coculture ระหว่างยีสต์ *K. marxianus* DMKU 3-1042 กับ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ด้วยวิธีตรึงเซลล์ด้วย alginate-loofa matrix (ALM) และ thin-shell silk cocoons (TSC) เปรียบเทียบกับวิธีเซลล์อิสระ พบว่าวิธีตรึงเซลล์ด้วย ALM ยีสต์ *K. marxianus* ให้เอทานอล 66.1 กรัมต่อลิตร coculture ให้เอทานอล 80.4 กรัมต่อลิตร วิธีตรึงเซลล์ด้วย TSC ยีสต์ *K. marxianus* ให้เอทานอล 65.0 กรัมต่อลิตร coculture ให้เอทานอล 81.4 กรัมต่อลิตร ขณะที่วิธีเซลล์อิสระ *K. marxianus* ให้เอทานอล 54.5 กรัมต่อลิตร coculture ให้เอทานอล 76.9 กรัมต่อลิตร เห็นได้ว่าการตรึงเซลล์ให้ผลการหมักเอทานอลดีกว่าวิธีเซลล์อิสระ ซึ่งก่อนหน้านี้ Yu *et al*.(2007) ได้ศึกษาการหมักเอทานอลโดยวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* ด้วยซังข้าวฟ่าง พบว่าการหมักเอทานอลโดยวิธีการตรึงเซลล์ให้เอทานอลสูงกว่าวิธีเซลล์อิสระ 2.24 เท่า ในปี ค.ศ. 2003 Alegrel, Rigol and Joekesll ได้ศึกษาการหมักเอทานอลโดยวิธีการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* บน chrysotile และใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ พบว่าการหมักเอทานอลโดยใช้ chrysotile เป็นวัสดุตรึงเซลล์ ให้เอทานอลสูงกว่าที่ไม่ได้ใช้ chrysotile

ส่วนวิธีตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนทให้เอทานอลน้อยกว่าสองวิธีข้างต้น คือให้เอทานอลเท่ากับ 67 กรัมต่อลิตร ที่เวลาหมัก 72 ชั่วโมง ให้ค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 81.93 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการมีชีวิตรอดของเซลล์ภายในเม็ดเจลตรึงหรือกิจกรรมภายในเซลล์ยีสต์ที่ลดลงเพราะในการเตรียมกล้าเชื้อของการหมักแต่ละครั้งจะเริ่มต้นด้วยเชื้อที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ในอาหาร YM จำนวน 1 ลูปเท่ากัน (เซลล์เฉลี่ย 2.89±0.35 x 10^8เซลล์) เห็นได้จากปริมาณการใช้น้ำตาลที่เริ่มลดลงอย่างรวดเร็วที่ 48 ชั่วโมง และความเข้มข้นของเอทานอลก็เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังการหมักที่ 48 ชั่วโมงนี้ ซึ่งต่างจาก 2 วิธีแรกที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มลดลงตั้งแต่เริ่มหมักและลดลงต่ำที่ 48 ชั่วโมง จึงทำให้วิธีตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนทให้เอทานอลน้อยกว่า ซึ่งจากการรายงานการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* MTCC 174 โดยใช้ชานอ้อยที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์เป็นวัตถุดิบของการหมัก โดยวิธีการตรึงเซลล์แบบต่าง ๆ พบว่าการหมักโดยการตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อยให้ผลผลิตเอทานอล 0.44 g_p/g_s ขณะที่การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนท และการตรึงด้วยวุ้น ให้ผลผลิตเอทานอล 0.38 g_p/g_sและ 0.33 g_p/g_s ตามลำดับ (Singh, Sharma, Saran, Singh & Bishnoi, 2013) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้คือการตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนทให้เอทานอลต่ำกว่าการตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อยแสดงได้ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 เอทานอล อัตราการผลิตเอทานอล และค่าผลผลิตทางทฤษฎี ของการหมักแบบแบตช์ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยยีสต์ *S. cerevisiae* ST-541 แบบเซลล์อิสระ ตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อย และแคลเซียมอัลจิเนท

Cell type	Ethanol (gL^{-1})	Cell Dry wt. (gL^{-1})			Sugar conc. remained	Productivity ($gL^{-1}h^{-1}$)	Fermentation yield (%of theoretical yield)
		Xf	Xi	Xt			
Free cell	71	5.7	-	5.7	57	0.99	86.82
Sugarcane bagasse	72	0.8	5.4	6.2	48	1.00	88.04
Calcium alginate	67	0.3	5.0	5.3	69	0.93	81.93

Xf, Xi and Xt are the free cell, immobilized cell and total cell concentration, respectively.

Productivity ($gL^{-1}h^{-1}$) = (Pf – Pi)/t

Fermentation yield = {Pf/(Si x 92/180)} x 100

Pf, Pi, Si and t are final product, initial product, initial substrate and time, respectively.

จากผลการทดลองที่ได้การหมักเอทานอลโดยวิธีการตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อยจึงถูกคัดเลือกไว้เพื่อศึกษาการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ คือการหมักแบบรีพิท-แบตช์

3. การหมักแบบรีพิท-แบตช์ (Repeat-batch fermentation)

การหมักแบบรีพิท-แบตช์ที่มีการดึงอาหารเก่าออก 90 เปอร์เซ็นต์ โดยพิจารณาจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่คงเหลือในถังหมัก และความเข้มข้นของเอทานอลที่ยีสต์ผลิตขึ้น พบว่าที่ 72 ชั่วโมงของการหมักแต่ละรอบ มีความเหมาะสมที่จะมีการดึงเอาอาหารเก่าออกและเติมอาหารใหม่พบว่ารอบแรกของการหมักให้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 73 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 89.26 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ในรอบ 2 พบว่าให้ค่าเอทานอลลดลงเล็กน้อย คือให้ค่าเอทานอลเท่ากับ 67 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 81.93 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และเมื่อนำเซลล์ตรึงกลับมาใช้ใหม่ในรอบ 3 พบว่าให้ค่าเอทานอลลดลง โดยให้เอทานอลเท่ากับ 63 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.88 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 77.04 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี จากการทดลองเห็นได้ว่าการหมักเอทานอลโดยวิธีการตรึงเซลล์แม้สามารถนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ได้ใหม่อันเป็นการช่วยลดต้นทุนและระยะเวลาในการเตรียมเซลล์ตั้งต้นเพื่อการหมักเอทานอล แต่อย่างไรก็ตามการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้ทุกรอบของการหมัก คงนำกลับมาใช้ได้เพียงรอบต้น ๆ เพราะมีผลต่อความเข้มข้นของเอทานอล ทั้งนี้อาจเป็น

เพราะเซลล์ต้องเผชิญกับสภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง และเอทานอลสูงมานาน ซึ่งโดยสภาพทั่วไปในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงจะมีผลต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ (Birch & Walker, 2000)

ตารางที่ 3 การหมักแบบรีพิท-แบตช์ของยีสต์ *S. cerevisiae* ST-541 โดยวิธีตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อย บ่มในฟลาส์กแบบเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จำนวน 3 รอบ

cycle	Fermentation time (h)	Final ethanol (gL^{-1})	Productivity ($gL^{-1}h^{-1}$)	Fermentation yield (%of theoretical yield)	Sugar conc. Remained (gL^{-1})
1	72	73	1.01	89.26	49
2	48	43	0.90	52.58	59
2	72	67	0.93	81.93	57
3	48	51	1.06	62.36	62
3	72	63	0.88	77.04	57

ในปี ค.ศ. 2012 Gomes *et al.* ได้รายงานการหมักเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ตกตะกอน FL20 ด้วยการหมักแบบรีพิท-แบตช์ โดยการบ่มในฟลาส์กแล้วทำการหมัก 5 รอบ พบว่ารอบแรก ระยะเวลาการหมักที่ 42 ชั่วโมง หมักเอทานอลได้ 135.9±1.4 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 3.24±0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 80±1 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี รอบสอง ระยะเวลาการหมักที่ 47.3 ชั่วโมง หมักเอทานอลได้ 130.4±0.2 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 2.76±0.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 81±0 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี รอบสาม ระยะเวลาการหมักที่ 47.6 ชั่วโมง หมักเอทานอลได้ 128.8±3.0 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 2.71±0.06 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 77±2 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี รอบสี่ ระยะเวลาการหมักที่ 48 ชั่วโมง หมักเอทานอลได้ 107.8±2.2 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 2.25±0.05 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 67±1 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และรอบที่ห้า ระยะเวลาการหมักที่ 47.6 ชั่วโมง หมักเอทานอลได้ 135.3±1.6 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 2.84±0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 73±1 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ซึ่งเห็นได้ว่ารอบแรกของการหมักยีสต์ยังคงให้เอทานอลสูงสุด หลังจากนั้นรอบการหมักที่สอง สาม สี่ การหมักเอทานอลของยีสต์จะค่อย ๆ ลดลง นอกจากนี้ ปนิดา กิตติรัตน์หมาย (2546) ยังได้รายงานการหมักเอทานอลแบบรีพิท-แบตช์ร่วมกับระบบ double stage โดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* M30 พบว่าสามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดติดต่อกัน 3 รอบ โดยแต่ละรอบได้เอทานอล 9 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรขึ้นไป หลังจากนั้นเอทานอลจะเริ่มลดลง จากข้อมูลดังกล่าวเห็นได้ว่าเซลล์ยีสต์สามารถนำกลับมาใช้หมักเอทานอลได้ใหม่และยังคงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลได้ดี แต่การนำมาใช้ติดต่อกันหลายรอบอาจส่งผลต่อความเข้มข้นของเอทานอล ดังนั้นจำนวนรอบของการนำเซลล์ยีสต์มาใช้อาจแตกต่างกันตามสายพันธุ์ยีสต์ จึงจำเป็นต้องศึกษาความเหมาะสมของแต่ละสายพันธุ์ ซึ่งในการทดลองนี้ *S. cerevisiae* ST-541 ที่ยึดเกาะกับชานอ้อย มีความเหมาะสมต่อการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ 3 รอบ ถ้านำกลับมาใช้มากกว่านี้ก็ได้ แต่ความเข้มข้นของเอทานอลที่ได้จะลดลงซึ่งอาจมีผลต่อความคุ้มค่าในการลงทุน

สรุปผลการวิจัย

จากการหมักเอทานอลโดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ST-541 ด้วยวิธีการตรึงเซลล์และวิธีเซลล์อิสระ พบว่าการหมักเอทานอลในอาหารกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เริ่มต้น 160 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ยีสต์เอ็กแทรกซ์ 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ที่เวลาหมัก 72 ชั่วโมง การตรึงเซลล์เซลล์ยีสต์ด้วยชานอ้อย ยีสต์หมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 72 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.00 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 88.04 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ส่วนวิธีเซลล์อิสระยีสต์หมักเอทานอลได้ใกล้เคียงกับวิธีตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อย โดยยีสต์หมักเอทานอลได้ 71 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 86.82 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ขณะที่การตรึงเซลล์ด้วยแคลเซียมอัลจิเนท ยีสต์หมักเอทานอลได้ 67 กรัมต่อลิตร ให้ค่าอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.93 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 81.93 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ซึ่งน้อยกว่าสองวิธีข้างต้น

เมื่อศึกษาการหมักแบบรีพิท-แบตช์ โดยวิธีตรึงเซลล์ด้วยชานอ้อย พบว่าการหมักรอบแรกยีสต์หมักเอทานอลได้สูงกว่าการหมักรอบที่สองและสาม โดยหมักเอทานอลได้เท่ากับ 73, 67 และ 63 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.01, 0.93 และ 0.88 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและค่าผลผลิตการหมักเท่ากับ 89.26, 81.93 และ 77.04 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี ตามลำดับ

อย่างไรก็ตามแม้ว่าการตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยชานอ้อยจะหมักเอทานอลได้พอ ๆ กับวิธีเซลล์อิสระแต่การตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยชานอ้อยสามารถนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ อันเป็นการช่วยลดระยะเวลาและต้นทุนการผลิตเอทานอลได้จึงเป็นทางเลือกที่ดีในการที่จะนำไปพัฒนาการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ปนิดา กิตติรัตน์หมาย. (2546). *การปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ตกตะกอนและเทคนิครีพีทเฟดแบทช์.* วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุวิชา กัลยาณมิตร. (2548). *การหมักกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังของเซลล์ตรึงเชื้อรา Rhizopus oryzae KPS 106 ในถังหมักแบบลอยตัว*.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสรี มหาวิชัด และ เฉลิม เรื่องวิริยะชัย. (2555). การผลิตลิกโนเซลลูโลสิกเอทานอลจากสารละลายที่ได้จากการย่อย ลำต้นมันสำปะหลังด้วยวิธีการหมักแบบกะด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048.*Veridian E-Journal SU*,*5*(3), September-December.

ศิรินุชจินดารักษ์.(2551).ข้าวฟ่างหวาน พืชพลังงานทางเลือกสำหรับการผลิตเอทานอล.*วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ*, *11*(1), มกราคม-มิถุนายน.

อุทัยพร อัครานุภาพพงศ์. (2547). *การปรับปรุงพันธุกรรมยีสต์สำหรับการผลิตไขมันสควอลีน และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Alegrel, R.M., Rigol, M., & JoekesII, I. (2003). Ethanol fermentation of a diluted molasses medium by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chrysotile. *Brazilian Archives of Biology and Technology*,*46*(4), Curitiba dez.

Bangrak, P., Limtong, S., & Phisalaphong, M. (2011). Continuous ethanol production using immobilized yeast cells entrapped in loofa-reinforced alginate carriers.*Brazilian Journal Microbiology*,*42*, 676-684.

Behera, S., Mohanty, R.C.,& Ray, R.C. (2010). Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. *Applied Energy*, *87*, 2352-2355.

Birch, R.M.,& Walker, G.M. (2000). Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol responses of Saccharomyces cerevisiae. *Enzyme Microbial Technology*, *26*, 678-687.

Bloyd, C., & Foster, N. (2014). An update on ethanol production and utilization in Thailand. U.S. Department of Energy, Pacific Northwest National Laboratory.

Eiadpum, A., Limtong, S., & Phisalaphong, M. (2012). High-temperature ethanol fermentation by immobilized coculture of *Kluyvermyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience and Bioengineering*,*114*(3), 325-329.

Farfan, M.C., Lappe, P., Saavedra, A.L., Mendez, A.M., & Perez, L.B. (2008). Ethanol production from henequen (*Agave fourcroydes* Lem.) juice and molasses by a mixture of two yeasts. *Bioresource Technology*, *99*, 9036-9039.

Golias, H., Dumsday, G.J., Stanley, G.A., & Pamment, N.B. (2002). Evaluation of a recombinant *Klebsiella oxytoca* strain for ethanol production from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation: comparison with native cellobiose-utilising yeast strains and performance in co-culture with thermotolerant yeast and *Zymomonas mobilis*. *Journal of Biotechnology*, *96*, 155-168.

Gomes, D.G., Guimaraes, P.M.R., Pereira, F.B. Teixeira, J.A., & Domingues, L. (2012). Plasmid-mediate transfer of FLO1 into industrial *Saccharomyces cerevisiae* PE-2 strain creates a strain useful for repeat-batch fermentations involving flocculation-sedimentation. *Bioresource Technology*,*108*, 162-168.

Hang, Y.D. (1989). Direct fermentation of corn to L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae*. *Biotechnology Letters*, *11*, 299-300.

Hernandes-Salas, J.M., Villa-Ramirez, M.S., Veloz-Rendon, J.S., Rivera-Hernandez, K.N., Gonzalez-Cesar, R.A., Plascencia-Espinosa, M.A., &Trejo-Estrada, S.R. (2009). Comparative hydrolysis and fermentation of sugarcane and agave bagasse. *Bioresource Technology*,*100*, 1238-1245.

Homagai, P.L., Ghimire, K.N., & Inoue, K. (2010). Adsorption behavior of heavy metals onto chemically modified sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, *101*, 2067-2069.

Kaewkrajay, C., Dethoup, T., & Limtong, S.(2014). Ethanol production from cassava using a newly isolated thermotolerant yeast strain. *Science Asia*, *40*, 268-277.

Karnitz, O., Gurgel, L.V.A., De Melo, J.C.P., Botaro, V.R., Melo, T.M.S., de Freitas Gil, R.P., &Gil, L.F. (2007). Adsorption of heavy metal ion from aqueous single metal solution by chemically modified sugarcane bagasse. *Bioresource Technology*, *98*, 1291-1297.

Komagata, K., & Ohmomo, S. (1984). Quatitative and Qualitative Analysis of Volatile Fatty Acid Alcohol by Gas Chromatography Hitachi.p. 163. *Annual Report. Central Labolatory and Greenhouse Complex*, Kasetsart University, Nakon Pathom.

Lee, Y.J., Chung, C.H., & Day, D.F. (2009). Sugarcane bagasse oxidation using a combination of hypochlorite and peroxide. *Bioresource Technology*, *100*, 935-941.

Limtong, S., Sringiew, C., & Yongmanitchai, W. (2007). Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. *Bioresource Technology*, *98*, 3367-3374.

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar.*Analytical Chemistry*, *31*, 426.

Morimura, S., Ling, Z.Y., & Kida, K. (1997). Ethanol production by repeated-batch fermentation at high temperature in a molasses medium containing a high concentration of total sugar by a thermotolerant flocculating yeast with improved salt-tolerance. *Fermentation and Bioengineering*, *3*, 271-274.

Rattanapan, A., Limtong, S., & Phisalaphong, M. (2011). Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations of blackstrap molasses using immobilized yeast cells on thin-shell silk cocoons. *Applied Energy*, *88*, 4400-4404.

Roble, N.D., Ogbonna, J.C., & Tanaka, H. (2002). A novel circulating loop bioreactor with cells immobilized in loofa (Luffa cylindrical) sponge for the bioconversion of raw cassava starch to ethanol. *Springer-Verlag*.

Sanchez, O.J., & Cardona, C.A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*,*99*, 5270-5295.

Sankh, S., Thiru, M., Saran, S., & Rangaswamy, V. (2013). Biodiesel production from a newly isolated *Pichia kudriavzevii* strain. *Fuel*,*106*, 690-696.

Saravanakumar, K., Senthilraja, P., & Kathiresan, K. (2013). Bioethanol production by mangrove-derived marine yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of King Saud University-Science*,*25*, 121-127.

Singh, A., Sharma, P., Saran, A.K., Singh, N. & Bishnoi, N.R. (2013). Comparative study on ethanol production from pretreated sugarcane bagasse using immobilized *Saccharomyces cerevisiae* on various matrices. *Renewable Energy*, *50*, 488-493.

Swain, M.R., Kar, S., Sahoo, A.K., & Ray, R.C. (2007). Ethanol fermentation of Mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers using free and immobilized yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Research*,*162*, 93-98.

Yamaoka, C., Kurita, O., & Kubo, T. (2014). Improved ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in mixed cultures with *Kluyveromyces lactis* on high-sugar fermentation. *Microbiological Research*, *169*, 907-914.

Yu, J., Zhang, X., & Tan, T. (2007). An novel immobilization method of *Saccharomyces cerevisiae* to sorghum bagasse for ethanol production. *Journal of Biotechnology*,*129*, 415-420.