การศึกษาการหมักแบบต่อเนื่องสำหรับการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล ด้วย *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02

A Study on Continuous Fermentation for Ethanol Production from Sugar Cane Molasses with *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์[1] สิทธินันท์ ท่อแก้ว[2]
Pongsri Siwarasak[1] Sittinun Towkhew[2]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาพารามิเตอร์ต่างๆ ในการหมักแบบแบทช์ของสารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ด้วยยีสต์ที่แปรผันความเข้มข้นเท่ากับ 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล ที่ความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 และอุณหภูมิห้อง (33 องศาเซลเซียส) ใช้เวลาหมักนาน 96 ชั่วโมง พบว่า อัตราการเติบโตจำเพาะของยีสต์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรในสารละลายกากน้ำตาลในการหมักแบบแบทช์เท่ากับ 0.0485 ต่อชั่วโมง กากน้ำตาลถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลมีค่าสูงสุดเท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และใช้เวลาหมักนาน 40 ชั่วโมง อีกวัตถุประสงค์หนึ่งเพื่อหาพารามิเตอร์ต่างๆ ในการหมักสารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ด้วยยีสต์เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรในถังหมักแบบต่อเนื่อง พบว่า เอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 ของการหมักที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.10 ต่อชั่วโมง และเซลล์ยีสต์เฉลี่ยเท่ากับ 0.4335 กรัมน้ำหนักแห้ง

คำสำคัญ : *Saccharomyces. cerevisiae* เอทานอล การหมักแบบต่อเนื่อง กากน้ำตาล

Keywords : *Saccharomyces. cerevisiae*, ethanol, continuous fermentation, sugar cane molasses

---

[1]อาจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี คลองหก ธัญบุรี ปทุมธานี 12110

[2]อาจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ นครนายก 26120

[1]Instructor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineer, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Klong 6 Thanyaburi, Pathum Thani 12110

[2]Instructor, Department of Chemical Engineering, Faculty of Engineer, Srinakharinwirot University, Ongkharak, Nakhonnayok 26120

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ และสิทธินันท์ ท่อแก้ว. "ศึกษาการหมักแบบต่อเนื่องสำหรับการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล". **วารสารวิจัยและฝึกอบรม มหาวิยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล.** 10,1 (ก.ย.-ธ.ค. 2549) 1-12.

Abstract

One objective of this study was to determine different parameters in batch fermentation of 20° Brix of sugar cane molasses with various volume percentages : 5, 10, 15 and 20% of yeast in sugar cane molasses culture medium at pH of 5.0 and room temperature (33°C) for 96 hours of fermentation. It was found that the specific growth rate of 20° Brix of sugar cane molasses fermented with 20% volume of yeast was 0.0485 per hour and the molasses was converted to ethanol at the maximum weight of 6% during the 40-hour batch fermentation. The other objective was to determine various parameters in fermentation of 20° Brix of sugar cane molasses with 20% volume of yeast in continuous bioreactor. It was found that 6% by weight of average ethanol was obtained at the 15th hour of fermentation with 0.1 per hour dilution rate and the cells yeast with an average dry weight of 0.4335 g.

บทนำ

การผลิตเอทานอลทางชีวภาพได้จากการหมักสารตั้งต้นโมเลกุลเล็กที่สุดคือน้ำตาลกลูโคสหรือเฮกโซสกับยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สภาวะเหมาะสม ได้แก่ ปริมาณสารตั้งต้น ปริมาณเชื้อยีสต์ ความต้องการออกซิเจน ความชื้น เกลือแร่ที่จำเป็น ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ เป็นต้น (วิลาวัณย์, 2539 ; สาโรจน์และประวิทย์, 2538) ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มนิยมใช้ยีสต์ในการหมักเอทานอล แต่ในอุตสาหกรรมอื่นอาจจะใช้แบคทีเรียผลิตเอทานอลแทนได้ อย่างไรก็ตามยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลได้โดยผ่านกระบวนการหมักที่ไม่ต้องการอากาศ ในทางทฤษฎีจะได้เอทานอล 51.10 เปอร์เซ็นต์ และเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.90 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ได้จากการหมักมักจะไม่ได้ตามทฤษฎีเนื่องจากหลายปัจจัย สาเหตุประการหนึ่งคือยีสต์จะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตจากปริมาณเอทานอลที่เพิ่มมากขึ้นในระบบการหมักแบบแบทช์ (batch) ซึ่งเอทานอลที่ได้จะมีค่าสูงสุด อย่างไรก็ตามเซลล์ยีสต์จะมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลที่ยังคงเหลืออยู่ไปเป็นเอทานอลได้อีกต่อไป วิธีแก้ปัญหานี้คือการนำเอาเอทานอลที่ได้ออกจากระบบอย่างต่อเนื่องเพื่อให้เซลล์ยีสต์สามารถยืดระยะเวลาการเจริญในระยะล็อกเฟส (log phase) ให้นานขึ้น โดยการเติมอาหารลงไปใหม่จำนวนหนึ่งไปแทนที่อาหารเก่าในปริมาณเท่ากัน จะทำให้ยีสต์เจริญเพิ่มจำนวนต่อไปได้อีกเมื่อมีการควบคุมสภาวะให้คงที่ (steady state) นั่นคือ ปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นใหม่เท่ากับปริมาณเซลล์ในอาหารเก่าที่ปล่อยออกจากถังหมัก เรียกความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการไหลของอาหารเข้าสู่ถังหมักกับปริมาตรรวมของสับสเตรทว่า อัตราการเจือจาง ระบบการเพาะเลี้ยงยีสต์แบบต่อเนื่องดังกล่าวเป็นแบบ chemostat ซึ่งเป็นที่นิยมใช้เนื่องจากควบคุมระบบง่าย ไม่ซับซ้อน การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์โดยใช้ระบบต่อเนื่องมีข้อดีกว่าการใช้ระบบแบทช์ คือให้ผลผลิตต่อหน่วยเวลา (productivity) สูงกว่า มีความสม่ำเสมอในการดำเนินงานและควบคุม โดยใช้ระบบอัตโนมัติได้ง่าย แต่มีข้อเสียคือมีโอกาสเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายกว่าการใช้ระบบแบทช์ (สมใจ, 2544)

สารตั้งต้นที่นิยมนำมาใช้ในการหมักเอทานอลคือกากน้ำตาลซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจาก

โรงงานผลิตน้ำตาลทรายซึ่งมีราคาถูกพอสมควร และสามารถใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้โดยตรง จากการศึกษาเปรียบเทียบการหมักกากน้ำตาลแบบแบทช์ด้วยยีสต์สองสายพันธุ์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 และ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 พบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 เป็นเชื้อยีสต์ที่มีความเหมาะสมและมีศักยภาพสำหรับใช้ในการหมักกากน้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอล ซึ่งยีสต์นี้สามารถทนทานต่อสับสเตรทได้อย่างดี (ผ่องศรี, 2548) การใช้กากน้ำตาลเป็นสับสเตรทในการหมักด้วยยีสต์เพื่อผลิตเอทานอลจึงทำได้ง่ายกว่าเมื่อเทียบกับการหมักที่ใช้สับสเตรทอย่างอื่น ได้แก่ แป้งมันสำปะหลัง ข้าวเหนียว ข้าวเจ้า และของเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด เป็นต้น เนื่องจากในกระบวนการหมักสับสเตรทดังกล่าวต้องใช้วิธีการย่อยแป้งหรือเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสที่มีอยู่ในสับสเตรทนั้นๆ ให้เป็นน้ำตาลเสียก่อน จึงจะนำน้ำตาลที่ได้ไปทำการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอล วิธีการที่นิยมใช้ในการย่อยแป้งเพื่อเปลี่ยนเป็นน้ำตาลคือการหมักแป้งด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสม เช่น เชื้อรา *Aspergillus niger* (รัฐพงศ์, 2545) หรืออาจจะใช้วิธีการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ทางการค้าเพื่อเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล (Pongsri and Wattana, 2002) หรืออาจใช้กระบวนการย่อยเซลลูโลสด้วยเชื้อรา *Trichoderma reesei* เปลี่ยนเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ก่อนใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลดังกล่าวเป็นเอทานอล (Pongsri and Wattana, 2002 ; ผ่องศรี, 2546 ; Pongsri, 2004)

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาค่าคงที่ของอัตราจำเพาะของการเติบโตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 สำหรับการหมักแบบแบทช์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลซึ่งมีความเข้มข้นเริ่มต้นคงที่เท่ากับ 20 องศาบริกซ์ ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 ที่อุณหภูมิห้อง (33 องศาเซลเซียส) และใช้เวลาหมักนาน 96 ชั่วโมง โดยที่แปรผันความเข้มข้นของยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลเท่ากับ 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร จากนั้นทำการทดลองหาอัตราการเจือจางในระบบการหมักแบบต่อเนื่องที่ได้เอทานอลสูงสุดและใช้วิธีการเพาะเลี้ยงยีสต์แบบ chemostat กับปริมาตรสารละลายกากน้ำตาล 4 ลิตร ในถังหมักสแตนเลสขนาด 10 ลิตร ใช้เวลาทำการหมักต่อเนื่องนาน 120 ชั่วโมง ที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 และอุณหภูมิห้อง (33 องศาเซลเซียส) โดยที่แปรผันอัตราการเจือจาง 0.075 0.100 และ 0.125 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

วัสดุและอุปกรณ์

วัสดุ

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ กากน้ำตาลและจุลินทรีย์ในหลอดอาหารวุ้นเอียง คือ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยไวน์และสุราพื้นบ้าน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

อาหารแข็งวายเอ็มเอ (Yeast-Malt-Agar) มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ (กรัม) ยีสต์ แอ็กซ์แทรค 3.0 มอร์ต์แอ็กซ์แทรค 3.0 เบคโต-เปปโตน 5.0 กลูโคส 20.0 วุ้น 20.0 และปรับปริมาตรให้เป็น 1.0 ลิตรด้วยน้ำอาร์โอ นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

อาหารเหลววายเอ็ม (Yeast-Malt) ใช้ส่วนประกอบเหมือนวายเอ็มเอ ยกเว้นไม่ใส่วุ้นและนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะเหมือนกับข้างต้น

อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทำต้นเชื้อยีสต์ทำโดยใช้กากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 20 (โดยน้ำหนัก) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ กากน้ำตาล 150 มิลลิลิตร น้ำตาลปี๊ป 50 กรัม แมกนีเซียม ซัลเฟต 0.025 กรัม โพแทสเซียม ไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.500 กรัม ไดแอมโมเนียม ซัลเฟต 1,000 กรัม และปรับปริมาตรให้เป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำอาร์โอ นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะเหมือนกับข้างต้น

อุปกรณ์

เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (ยี่ห้อ Sartorius model BP2215) เครื่องกวนสาร (ยี่ห้อ Heidolph รุ่น MR 3001 K) ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (ผลิตในประเทศไทย) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (บริษัท Wisconsil Aluminum Foundry Co., Inc. รุ่น 1925 X) เครื่องเขย่าเชื้อ (ผลิตในประเทศไทย) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (ยี่ห้อ INDEX รุ่น ID1000) เครื่องวัดน้ำตาล (KRuss nD 1.333-1.520) ถังหมักสแตนเลส ขนาด 10 ลิตร (ผลิตในประเทศไทย) เครื่องกวนแม่เหล็ก (ผลิตในประเทศไทย) กล้องจุลทรรศน์ (บริษัท Olympus รุ่น CX31) เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (ยี่ห้อ Spectronic Instruments รุ่น 4001/4) เครื่องอังน้ำอุ่น (ผลิตในประเทศไทย) โถดูดความชื้น (ผลิตจากประเทศจีน) เครื่องเหวี่ยงแยกสาร (K. Harmonic Series) และอุปกรณ์วัดความเข้มข้นเอทานอล (Ebullometer, ยี่ห้อ Dujardin-Salleron)

วิธีการวิจัย

การทดลองหาค่าคงที่ของอัตราจำเพาะของการเติบโตของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 สำหรับการหมักสารละลายกากน้ำตาลแบบแบทช์ มีวิธีการทดลองดังนี้ คือ การเพาะยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 ด้วยการใช้ลูพปลอดเชื้อเขี่ยเชื้อยีสต์จากหลอดวุ้นเอียง จำนวน 1 ลูพ นำไปเขี่ยลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งวายเอ็มเอในจานเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ถึง 3 วัน จะได้เชื้อยีสต์กระจายบนจานเพาะเชื้ออาหารแข็งเป็นโคโลนีเดี่ยว

วิธีการเตรียมต้นเชื้อยีสต์ ทำโดยเขี่ยเชื้อยีสต์ 1 โคโลนีลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลสำหรับการทำต้นเชื้อยีสต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตรลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 5 ด้วยสารละลายกรดแอซิตริก ปิดขวดรูปชมพู่ด้วยสำลี นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าที่อุณหภูมิห้องด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมัก (สารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์) เพื่อใช้ในการหมักทั้งแบบแบทช์และแบบต่อเนื่อง โดยที่ใช้กากน้ำตาล 200 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร และไดแอมโมเนียมซัลเฟต 0.2 กรัม ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้เท่ากับ 5.0 นำไปทำให้ปลอดเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการทดลองหาความเข้มข้นของต้นเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมในกระบวนการหมักแบบแบทช์แบ่งออกเป็น 4 การทดลอง โดยที่แปรผันความเข้มข้นของต้นเชื้อยีสต์ที่ 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร การทดลองที่ 1 สำหรับความเข้มข้นของต้นเชื้อยีสต์ 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ทำการทดลองโดยนำต้นเชื้อยีสต์ปริมาตรเท่ากับ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร จำนวน 13 ขวด

แต่ละขวดจะแทนเวลาที่ใช้หมัก คือ เริ่มต้น 8 16 24 32 40 48 56 64 72 80 88 และ 96 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วจึงปรับปริมาตรแต่ละขวดให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมัก (สารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์) ปิดปากขวดด้วยสำลี และนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ทำการเก็บตัวอย่างทุก 8 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงโดยวิธีของโซโมจาย-เนลสัน (Somogyi-Nelson method) (สาโรจน์ และคณะ, 2544) ปริมาณเอทานอลโดยใช้อีบูลิโอมิเตอร์ (Ebulliometer) (ระวีวรรณ, 2538) และน้ำหนักเซลล์แห้งวิธีโดยน้ำหนัก (gravimetric method) (รัฐพงศ์, 2545) สำหรับการทดลองที่ 2 ถึง 4 ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 1 เพียงแต่เปลี่ยนความเข้มข้นของต้นเชื้อยีสต์จาก 5 มิลลิลิตร เป็น 10 15 และ 20 มิลลิลิตร ตามลำดับ

วิธีการทดลองหาอัตราการเจือจางของการหมักแบบต่อเนื่องสำหรับการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลในถังหมักชีวภาพขนาด 10 ลิตร แบ่งออกเป็น 3 การทดลอง โดยที่แปรผันอัตราการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.3 0.4 และ 0.5 ลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ การทดลองที่ 1 สำหรับอัตราการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 0.3 ลิตรต่อชั่วโมง โดยทำการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมัก (สารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์) ด้วยยีสต์ที่มีความเข้มข้นเหมาะสมจากการทดลองการหมักแบบแบทช์ปริมาตรรวมในถังหมักเท่ากับ 4 ลิตร ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 และที่อุณหภูมิห้อง โดยที่ใช้เวลาหมักเท่ากับเวลาที่เชื้อยีสต์มีอัตราการเจริญเป็นสองเท่าในช่วงเอ็กโพเนนเชียลก่อน แล้วจึงป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการหมัก (สารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์) ที่อัตราการป้อนเท่ากับ 0.3 ลิตรต่อชั่วโมงและควบคุมปริมาตรในถังหมักให้เท่ากับ 4 ลิตร โดยปล่อยออกให้เท่ากับอัตราการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งคิดเป็นอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.075 ต่อชั่วโมง สำหรับการทดลองที่ 2 และ 3 ทำการทดลองเหมือนการทดลองที่ 1 เพียงแต่เปลี่ยนอัตราการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 0.3 ลิตรต่อชั่วโมงเป็น 0.4 และ 0.5 ลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.1 และ 0.125 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ แต่ละการทดลองทำการหมักต่อเนื่องเป็นเวลานาน 5 วัน (120 ชั่วโมง) เก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง เอทานอลที่ได้และน้ำหนักเซลล์แห้งจากถังหมักเวลา 10.00 น. และ 15.00 น. ของทุกวัน

ผลการทดลอง

ผลการทดลองหาความเข้มข้นของต้นเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 ที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อ (สารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์) แบบแบทช์เมื่อใช้ต้นเชื้อยีสต์เข้มข้นเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร พบว่า เอทานอลที่ได้จากการหมักมีค่ามากที่สุดประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถูกใช้ไปมากที่สุดและเหลืออยู่เพียง 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์มีค่าประมาณ 1.5 กรัมต่อกรัมสับสเตรทที่เวลาหมักนาน 40 ชั่วโมง ดังแสดงใน Figure 1 2 และ 3 ตามลำดับ

นำข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (กรัมต่อกรัมสับสเตรท) จาก Figure 3 ทำให้เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก นำไปหาอัตราจำเพาะของการเติบโต (hr^{-1}, ต่อชั่วโมง) โดยเขียนกราฟเซมิลอกระหว่างเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักของเซลล์แห้งกับเวลา ในระยะล็อกเฟสหรือเอ็กซ์โพเนน

เชียลเฟสซึ่งอัตราการเติบโตของยีสต์เป็นปฏิกิริยาอันดับที่หนึ่ง จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งค่าความลาดเอียงเท่ากับอัตราจำเพาะของการเติบโต (μ ต่อชั่วโมง) ดังแสดงใน Figure 4

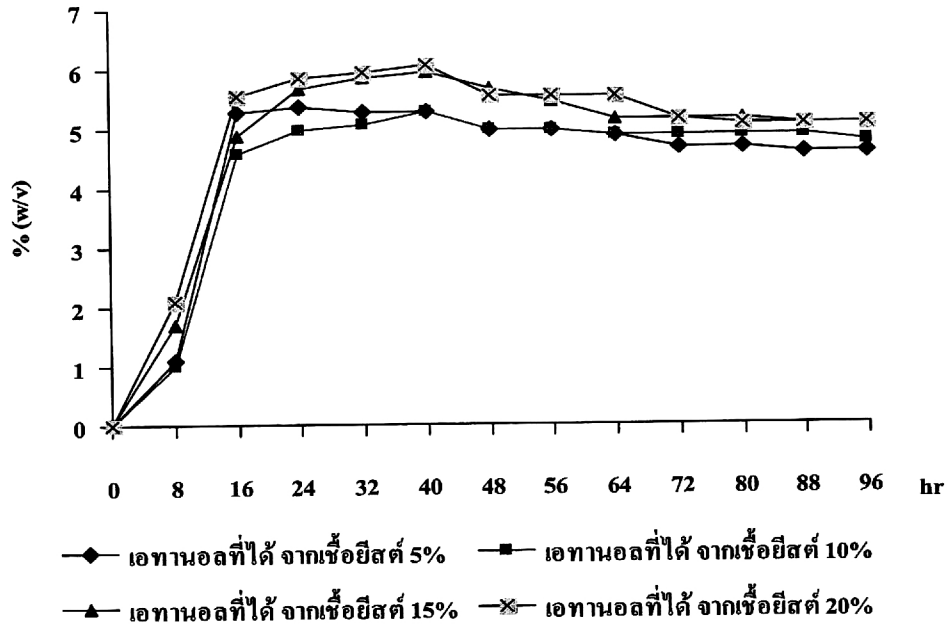

Figure 1 เอทานอลที่ได้จากการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อ (สารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์) แบบแบทช์ ด้วยต้นเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 ที่ความเข้มข้น 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

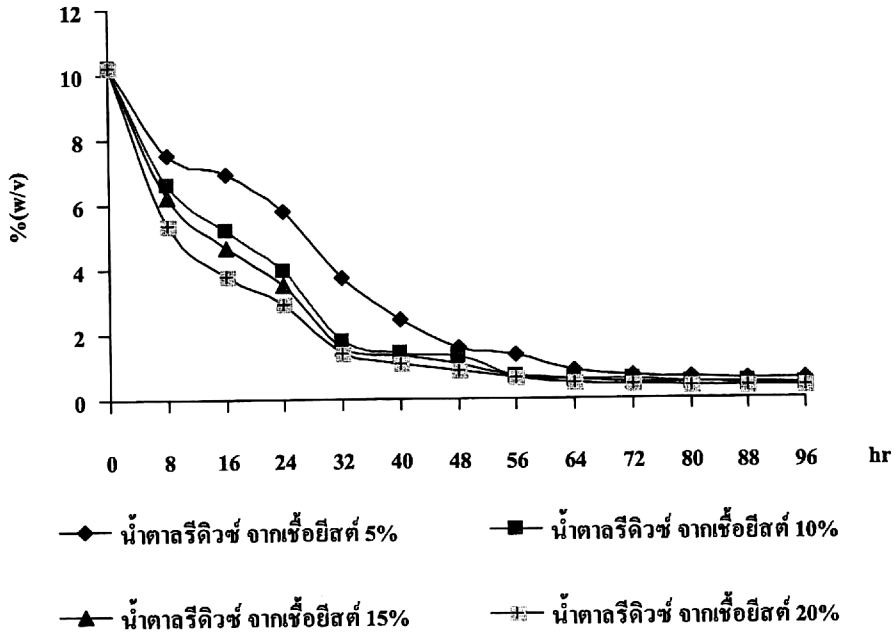

Figure 2 น้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงจากการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อ (สารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์) แบบแบทช์ ด้วยต้นเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 ที่ความเข้มข้น 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

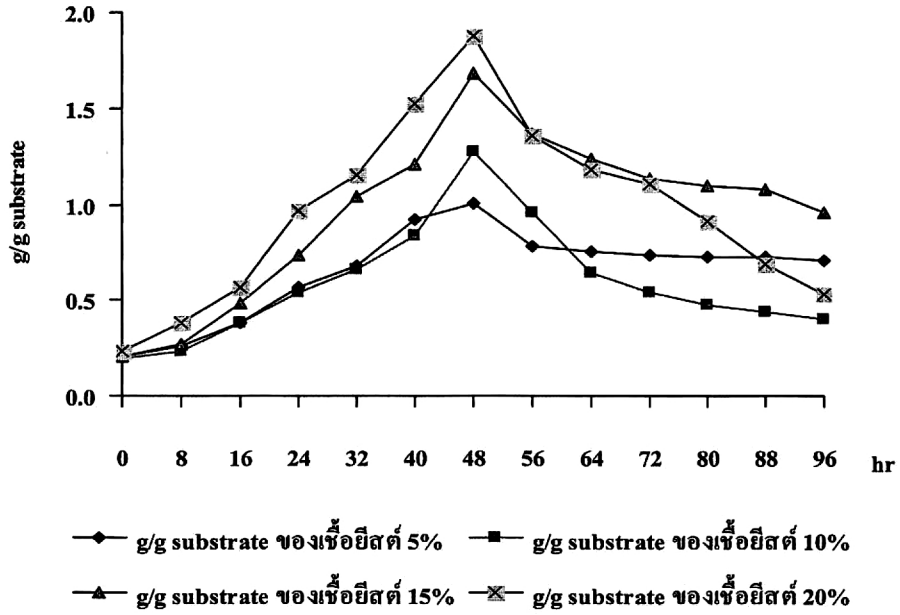

Figure 3 เซลล์ยีสต์แห้งจากการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อ (สารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์) แบบแบทช์ ด้วยต้นเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 ที่ความเข้มข้น 5 10 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

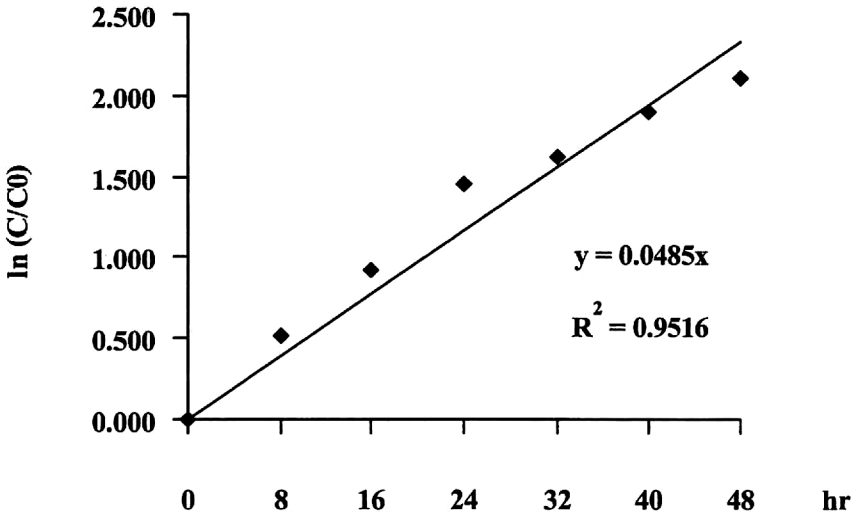

Figure 4 ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 ในสเกลล็อกกับเวลาซึ่งค่าความลาดเอียงที่ได้มีค่าเท่ากับอัตราจำเพาะของการเติบโต (μ)

จากค่าความลาดของกราฟใน Figure 4 นำค่าที่ได้นี้ไปคำนวณหาเวลาทวีคูณ (t_d) ที่ต้องการใช้ในการหมักแบบแบทช์เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 ให้เป็นสองเท่า ดังนี้

t_d = In(2)/ ชั่วโมง

μ = 0.0485

t_d = 14.3 ชั่วโมง

ทำนองเดียวกันสามารถหาค่าอัตราจำเพาะของการเติบโตของยีสต์ เวลาทวีคูณ และระยะเวลาปรับตัวก่อนการเติบโต ของต้นเชื้อยีสต์เข้มข้น 5 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 1 ซึ่งค่าของระยะเวลาปรับตัวก่อนการเติบโตหาได้จากการคำนวณบนพื้นฐานของกราฟระหว่างค่าล็อกของเซลล์แห้งกับเวลาในการเพาะเลี้ยง (growth curve) คือสมการ $InC_X = \mu(t-L)+InC_{X0}$ โดยที่ L คือ ระยะเวลาปรับตัวก่อนการเติบโต (สาโรจน์ และคณะ, 2544)

Table 1 อัตราจำเพาะของการเติบโต ระยะเวลาปรับตัวก่อนการเติบโต และเวลาทวีคูณของเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการหมักกากน้ำตาล 20 องศาบริกซ์แบบแบทช์

ต้นเชื้อยีสต์ (%โดยปริมาตร)	อัตราจำเพาะของการเติบโต μ (ต่อชั่วโมง)	ระยะเวลาปรับตัวก่อนการเติบโต (L, ชั่วโมง)	เวลาทวีคูณ t_d (ชั่วโมง)	R^2
5	0.0368	3.0	18.8	0.97
10	0.0389	3.0	17.8	0.99
15	0.0461	3.0	15.0	0.96
20	0.0485	2.0	14.3	0.95

พิจารณา Table 1 พบว่า การใช้ต้นเชื้อยีสต์ 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร สำหรับนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์แบบแบทช์ก่อนจะทำการหมักแบบต่อเนื่องเพื่อผลิตเอทานอลจึงเหมาะสมมากที่สุด เนื่องจากที่สภาวะนี้ยีสต์ใช้เวลาปรับตัวน้อยที่สุดเพียง 2 ชั่วโมง และเวลาทวีคูณสั้นที่สุดคือใช้เวลา 14.3 ชั่วโมง ซึ่งสามารถคำนวณหาพารามิเตอร์จากผลการทดลองการหมักแบบแบทช์ที่สภาวะนี้บนพื้นฐานของการเติบโตของยีสต์อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม โดยปราศจากสารยับยั้ง การเติบโตของยีสต์เป็นปฏิกิริยาอันดับที่ 1 และสามารถใช้สมการของโมโน็อด (Monod equation) $\mu = \mu_{max} \cdot \overline{C}_S / (K_S + \overline{C}_S)$ โดยที่ $\mu_{max}, \overline{C}_S$ และ K_S คือ อัตราจำเพาะของการเติบโตสูงสุด ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ที่สภาวะคงที่ และ ค่าคงที่ในการใช้สับสเตรท หรือปริมาณความเข้มข้นของสารอาหารที่ $\mu = \frac{1}{2}\mu$ ตามลำดับ (สาโรจน์ และคณะ, 2544) ดังแสดงใน Table 2

Table 2 พารามิเตอร์ของการหมักแบบแบทช์ของกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร

พารามิเตอร์	ค่าที่ได้
ผลที่ได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$)	0.16 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์
ผลได้ของเอทานอล ($Y_{P/S}$)	0.59 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรีดิวซ์
อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p)	1.51 กรัมเอทานอลต่อลิตร.ชั่วโมง
อัตราจำเพาะของการเติบโตสูงสุด (μ_{max})	0.12 ต่อชั่วโมง
ค่าคงที่ในการใช้กากน้ำตาล (K_S)	58.78 กรัมต่อลิตร

การหมักแบบต่อเนื่องด้วยการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร นำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (สารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์) ปริมาตรการหมักรวมทั้งหมด 4 ลิตร ในถังหมักชีวภาพขนาด 10 ลิตร เวลาที่ต้องการใช้สำหรับเพิ่มปริมาณเซลล์ยีสต์เป็นสองเท่าคือ 14.3 ชั่วโมง อย่างไรก็ตาม การทดลองนี้ทำการหมักแบบแบทช์ในถังหมักนานประมาณ 14 ชั่วโมงก่อนแล้วจึงป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ด้วยอัตราการป้อนเท่ากับ 0.3 0.4 และ 0.5 ลิตรต่อชั่วโมง หรือคิดเป็นอัตราการเจือจางเท่ากับ 0.075 0.1 และ 0.125 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ ใช้เวลาในการหมักแบบต่อเนื่องนาน 5 วัน (120 ชั่วโมง) พบว่า การหมักกากน้ำตาลแบบอย่างต่อเนื่องสามารถผลิตเอทานอลได้มีเฉลี่ยประมาณ 6 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ที่อัตราการเจือจางเท่ากับ 0.1 ต่อชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 15 เป็นต้นไป และมีค่ามากกว่าที่อัตราการเจือจาง 0.075 และ 0.125 ต่อชั่วโมงอยู่เท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เซลล์ยีสต์มีค่าค่อนข้างคงที่ในทุกอัตราการเจือจาง เฉลี่ยมีค่าประมาณ 0.415 เปอร์เซ็นต์ (w/v) สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลงของอัตราการเจือจาง 0.075 0.100 และ 0.125 ต่อชั่วโมง มีค่าเฉลี่ยประมาณ 2.71 2.96 และ 4.36 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ตามลำดับ ดังแสดงใน Figure 5

นำผลการทดลองของการหมักกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ แบบต่อเนื่องด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร ที่อัตราการเจือจาง 0.1 ต่อชั่วโมง จาก Figure 5 นำไปคำนวณพารามิเตอร์ต่างๆ ดังแสดงใน Table 3 บนพื้นฐานของสมการโมโนด ที่สภาวะคงที่ ปริมาณความเข้มข้นอาหารคงที่ และอัตราจำเพาะของการเติบโตมีค่าเท่ากับอัตราการเจือจาง $\mu = D$ คือ สมการ $\overline{C}_S = K_S D / (\mu_{max} - D)$ (สาโรจน์ และคณะ, 2544) และคำนวณหาอัตราจำเพาะของการผลิตเอทานอล (q_p) โดยใช้สมการ $q_p = D \cdot C_P / C_X$ โดยที่ C_P และ C_X คือ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์และเซลล์ยีสต์ เพื่อคำนวณอัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) ในปริมาตรการหมักทั้งหมด 4 ลิตร (สาโรจน์ และประวิทย์, 2538)

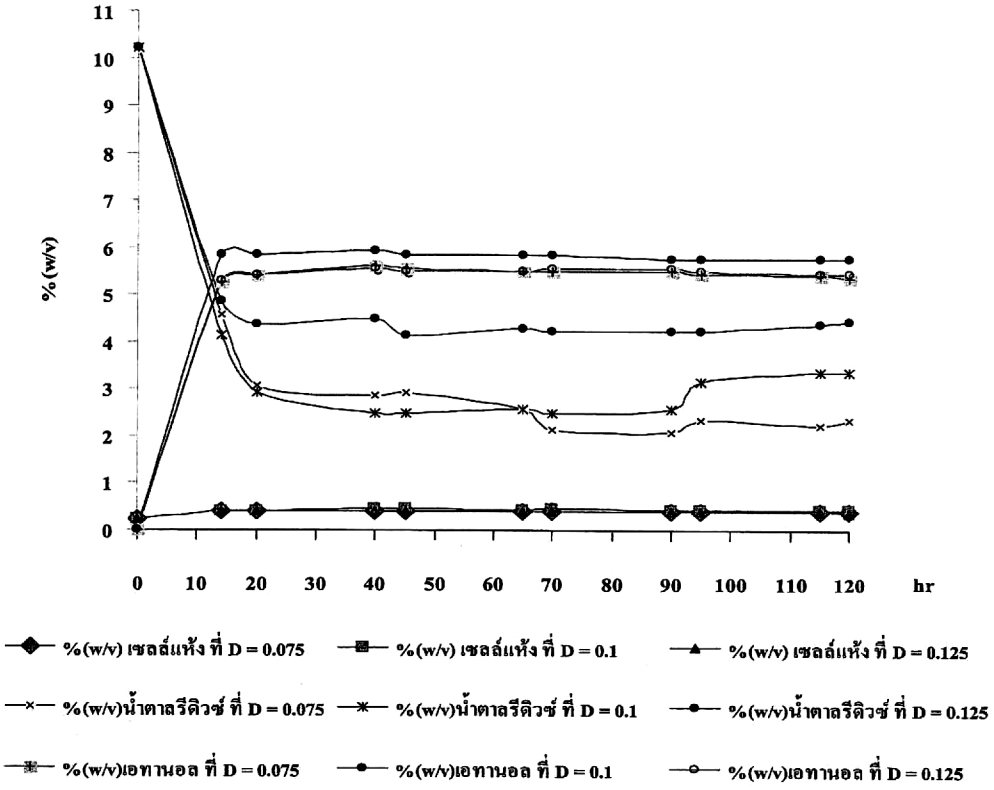

Figure 5 เอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง และน้ำหนักเซลล์แห้งของการหมักอาหารเลี้ยงเชื้อ (สารละลายกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์) กับต้นเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรในการหมักแบบต่อเนื่องใช้เวลาหมักนาน 5 วัน (120 ชั่วโมง)

Table 3 พารามิเตอร์ของการหมักแบบต่อเนื่องของกากน้ำตาลเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ ด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 เข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรที่อัตราการเจือจาง 0.1 ต่อชั่วโมง

พารามิเตอร์	ค่าที่ได้
ผลที่ได้ของเซลล์ ($Y_{X/S}$)	0.04 กรัมเซลล์ / กรัมน้ำตาลรีดิวซ์
ผลได้ของเอทานอล ($Y_{P/S}$)	0.57 กรัมเอทานอล / กรัมน้ำตาลรีดิวซ์
อัตราการเจือจางวิกฤต ($D_{critical}$)	0.10 ต่อชั่วโมง
อัตราจำเพาะของการเติบโตสูงสุด (μ_{max})	0.27 ต่อชั่วโมง
ค่าคงที่ในการใช้กากน้ำตาล (K_S)	48.75 กรัมต่อลิตร
อัตราจำเพาะของการผลิตเอทานอล (q_p)	1.34 ต่อชั่วโมง
อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p)	78.13 กรัมต่อเอทานอล / ลิตร.ชั่วโมง