การศึกษาการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339

The Study on Ethanol Fermentation from Cane Sugar Molasses with *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์[1]
Pongsri Siwarasak[1]

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 และ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ กากน้ำตาลที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 5.0 และวายเอ็ม (สารละลายกลูโคสในยีสต์และมอลต์สกัด) ซึ่งความเข้มข้นเริ่มต้นของกากน้ำตาลและวายเอ็มเท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ และ 2.4 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักตามลำดับ *S. cerevisiae* RIT 02 และ *S. cerevisiae* TISRT 5339 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดถูกนำไปใช้ในการหมักเอทานอล ใช้เวลาหมักนาน 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากการทดลองพบว่า *S. cerevisiae* RIT 02 เจริญในอาหารเหลวทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่า *S. cerevisiae* TISRT 5339 และที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดเท่ากัน เอทานอลที่ได้จากการหมักด้วย *S. cerevisiae* RIT 02 ที่ความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5 มีค่ามากกว่าเอทานอลที่ได้จากการหมักด้วย *S. cerevisiae* TISTR 5339 และจากการศึกษาเปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลซึ่งมีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 10 ลิตร ด้วย *S. cerevisiae* RIT 02 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล และวายเอ็มในถังหมักแบบแบทช์ขนาด 20 ลิตร พบว่าเอทานอลที่ได้จากหัวเชื้อ *S. cerevisiae* RIT 02 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลและวายเอ็มมีค่าประมาณร้อยละ 7.1 (โดยปริมาตร) ใช้เวลาหมักนาน 24 ชั่วโมง ที่ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส)

คำสำคัญ : *S. cerevisiae*, การหมักเอทานอลและกากน้ำตาล

Keywords : *S. cerevisiae*, ethanol fermentation and cane sugar molasses

---

[1]ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ธัญบุรี ปทุมธานี 12110 โทรศัพท์ 02-549-3093 Email : pongsri@rit.ac.th, ajpongsri@hotmail.com

[1]Assistant Professor, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Prathumthani 12110, Tel. 02-549-3093 Email : pongsri@rit.ac.th, ajpongsri@hotmail.com

ผ่องศรี ศิวราศักดิ์. "การศึกษาการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลด้วย". วารสารวิจัยและฝึกอบรมมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล. 8, 3 (พ.ค.-ส.ค. 2548) 63-70.

Abstract

The objective of this study is to compare the growth of *Saccharomyces cerevisiae* RIT 02 and *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 in two types of culture liquid mediums, which were cane sugar molasses at pH 4.5 and 5.0 and YM (glucose in yeast and malt extract), initial cane sugar molasses and YM concentration of 20% and 2.4% by weight respectively. *S. cerevisiae* RIT 02 and *S. cerevisiae* TISTR 5339 in both of culture mediums were utillized for ehtanol fermentation for 96 hours at room temperature (30°C). The experimental results showed that the growth of *S. cerevisiae* RIT 02 was better than *S. cerevisiae* TISTR 5339 in both mediums and at equivalent initial glucose concentration of both modium, obtained ethanol from fermentation with *S. cerevisiae* RIT 02 and initial pH of 5.0 was much more than obtained ethanol from fermentation with *S. cerevisiae* TISTR 5339. The ethanol fermentation comparative studied volume of 10 liters cane sugar molasses initial concentration of 20% by weight with *S. cerevisiae* RIT 02 by using cane sugar molasses at initial pH of 5.0 and YM as culture mediums. The ethanol fermentations were carried in 20 liters batch fermenter. It was found that obtained ethanol by using cane sugar molasses and YM as culture mediums was 7.1% by volume for 24 hours fermentation time at pH of 5.0 and room temperature (30°C).

บทนำ

กากน้ำตาลถูกนำมาเพิ่มมูลค่าและใช้ประโยชน์ได้มากมายจากอดีตถึงปัจจุบัน ได้แก่ กากนำมาผลิตเครื่องดื่มในรูปของเหล้า และการนำกากน้ำตาลไปแปรรูปเป็นอาหารอื่นๆ เป็นต้น ขณะที่ทั่วโลกกำลังเผชิญหน้ากับวิกฤติพลังงานจากปิโตรเลียมซึ่งกำลังจะถูกใช้จนหมดไป การนำพลังงานทางเลือกมาใช้และพัฒนาให้มีความยั่งยืนจึงได้รับความสนใจเป็นอย่างยิ่ง พลังงานจากเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์จากกระบวนการหมักด้วยจุลินทรีย์ภายใต้สภาวะที่ไม่ใช้อากาศโดยใช้สับสเตรทหรืออาหารเป็นสารตั้งต้นคือน้ำตาลกลูโคส กากน้ำตาลซึ่งเป็นของเหลือทิ้งจากโรงงานผลิตน้ำตาลจากอ้อยเป็นส่วนที่ไม่ตกผลึก มีน้ำตาลต่างๆ เช่น กลูโคส ฟรุคโตส และซูโคส ซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงมาก ประมาณร้อยละ 50 - 58 (โดยน้ำหนัก) นอกจากนั้นยังมีสารอาหารบางอย่างอีกเล็กน้อย จึงนิยมนำกากน้ำตาลมาใช้ในกระบวนการหมักเพื่อใช้เป็นอาหารของจุลินทรีย์ที่สภาวะเหมาะสมภายใต้ปฏิกิริยาชีวเคมีในการผลิตเอทานอล จุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นสารตั้งต้น ได้แก่ ยีสต์สกุล *Saccharomyces* sp. ยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ตามทฤษฎีได้ประมาณร้อยละ 51.1 และ 48.9 โดยน้ำหนัก ตามลำดับ ในทางปฏิบัติน้ำตาลประมาณร้อยละ 95 เท่านั้นที่ถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล นอกนั้นยีสต์นำไปใช้สำหรับการเจริญเติบโตและเปลี่ยนเป็นผลพลอยได้อื่นๆ ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ คือ เกลือแร่ และวิตามิน การใช้กากน้ำตาลในการหมักมักจะต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.05 ถึง 0.1 จะช่วยให้การหมักดีขึ้น ส่วนวิตามินที่ยีสต์ต้องการ คือ ไบโอติน และกรดแพนโทเทนิค มีอยู่ในกากน้ำตาลเพียงพอแล้ว อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโต

ของ *S. cerevisiae* อยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส และ 3.8-5.5 ตามลำดับ นอกจากนี้แล้วความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้นที่นิยมใช้สำหรับการหมักขึ้นกับความเข้มข้นของเอทานอลที่ต้องการ โดยปกติเอทานอลที่ได้จากการหมักประมาณค่าได้จากร้อยละของความเข้มข้นน้ำตาลที่ใช้คูณกับ 0.55 ทั้งนี้เอทานอลที่ได้จากการหมักมีค่าไม่เกินร้อยละ 15 ซึ่งต้องหมักที่อุณหภูมิต่ำกว่า 15 องศาเซลเซียส ในกากน้ำตาลยังมีสารเฟอริฟีวรอลซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ ดังนั้น ตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอล ได้แก่ สายพันธุ์ยีสต์ น้ำตาลเริ่มต้น และสภาวะของการหมัก เช่น ความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ เป็นต้น

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *S. cerevisiae* RIT 02 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นกากน้ำตาลพีเอชเท่ากับ 4.5 และ 5.0 และอาหารเหลววายเอ็ม ใช้เวลาหมักนาน 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส โดยวัดการเจริญของเซลล์ยีสต์ทุกๆ 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell count) จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ และมีอุปกรณ์ช่วยนับที่เรียกว่า เฮมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer) และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่ได้กับน้ำตาลกลูโคสที่ลดลง จากนั้นนำความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์ (ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร) กับเวลาที่ใช้ในการหมัก คำนวณหาเวลาที่ต้องการให้เซลล์ยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าของเชื้อยีสต์เริ่มต้น เพื่อใช้เตรียมหัวเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับนำไปใช้ในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลปริมาตร 10 ลิตร ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ในถังหมักแบบแบทช์ขนาด 20 ลิตร ใช้เวลาหมักนาน 96 ชั่วโมงที่ความเป็นกรดด่างคงที่ และอุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส

วิธีการวิจัย

วัสดุ

วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ กากน้ำตาล และจุลินทรีย์ในหลอดอาหารวุ้นเอียง คือ *S. cerevisiae* RIT 02 และ *S. scervisiae* TISTR 5339 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยไวน์และสุราพื้นบ้าน มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี และสถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ตามลำดับ

อาหารเลี้ยงเชื้อยีสต์

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

อาหารเหลววายเอ็ม (Yeast-Malt) ใช้ส่วนประกอบเหมือนวาย เอ็ม เอ ยกเว้นไม่ใส่วุ้นและนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะเหมือนกับข้างต้น

อาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 20 (โดยน้ำหนัก) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ กากน้ำตาล 150 มิลลิลิตร น้ำตาลปี๊ป 50 กรัม แมกนีเซียมซัลเฟต 0.025 กรัม โพแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.500 กรัม ไดแอมโมเนียมซัลเฟต 1,000 กรัม และปรับปริมาตรให้เป็น 1.0 ลิตรด้วยน้ำอาร์โอ นำสารละลายไปนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะเหมือนกับข้างต้น

อุปกรณ์

เครื่องชั่งสาร (บริษัท Sartorius) เครื่องกวนสาร (บริษัท Heidolph รุ่น MR 3001 K) ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ (ผลิตในประเทศไทย) หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (บริษัท Wisconsil Aluminum Foundry Co., Inc. รุ่น 1925 X) เครื่องเขย่าเชื้อ (ผลิตในประเทศไทย) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (บริษัท Utech Instruments รุ่น Cyber scan PC 510) เครื่องวัดน้ำตาล (KRuss nD 1.333-1.520) ถังหมักพลาสติก ขนาด 20 ลิตร กล้องจุลทรรศน์ (บริษัท Olympus รุ่น CX 31) สไลด์สำหรับนับเชื้อยีสต์ (Haemacytometer ยี่ห้อ BOECO) และอุปกรณ์วัดความเข้มข้นเอทานอล (Ebullometer ยี่ห้อ Dujardin-Salleron)

วิธีการทดลอง

นำ *S. cerevisiae* RIT 02 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จากหลอดวุ้นเอียงมาเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็งวายเอ็มเอ นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อนาน 2 ถึง 3 วัน จากนั้นทำการทดลองโดยแบ่งออกเป็น

การทดลองที่ 1 การเจริญเติบโตของยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล ทำการทดลองด้วยการนำอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลปริมาตร 800 มิลลิลิตรใส่ขวดรูปชมพู่ และปรับความเป็นกรด-ด่างให้เป็น 4.5 และ 5.0 อย่างละ 2 ขวด แล้วจึงเขี่ย *S. cerevisiae* RIT 02 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จากวายเอ็มเอ อย่างละ 8 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล เลี้ยงเชื้อในสภาพเขย่าเพียง 6 ชั่วโมงของทุกวัน โดยไม่ใช้อากาศ ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาปริมาณของเอทานอล น้ำตาล จำนวนเซลล์ยีสต์ต่อมิลลิลิตร และความเป็นกรด-ด่าง ทุกๆ 24 ชั่วโมง

การทดลองที่ 2 การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ในอาหารเหลววายเอ็ม ทำการทดลองด้วยการนำอาหารเหลววายเอ็มปริมาตร 800 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ จำนวน 2 ขวด เขี่ย *S. cerevisiae* RIT 02 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จากวายเอ็มเอ อย่างละ 8 โคโลนี ตามลำดับ เลี้ยงเชื้อในสภาพเขย่าเพียง 6 ชั่วโมงของทุกวันโดยไม่ใช้อากาศ ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส วิเคราะห์หาปริมาณของเอทานอล น้ำตาล จำนวนเซลล์ยีสต์ต่อมิลลิลิตร และความเป็นกรด-ด่าง ทุกๆ 24 ชั่วโมง

จากการทดลองที่ 1 และ 2 นำผลของความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์กับเวลาที่ได้จากการทดลองไปคำนวณหาเวลาที่เชื้อยีสต์เจริญเป็น 2 เท่าของเชื้อยีสต์เริ่มต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อและความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม เวลาที่ได้จากการคำนวณคือเวลาที่จะนำไปใช้ในการต่อเชื้อยีสต์ เพื่อเตรียมหัวเชื้อที่ต้องการสำหรับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลในถังหมักขนาด 20 ลิตร ในการทดลองที่ 3 ต่อไป

การทดลองที่ 3 การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลปริมาตร 10 ลิตร ในถังหมักแบบแบทช์ขนาด 20 ลิตร ใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเริ่มต้น 20 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก เวลาหมักนาน 96 ชั่วโมง ที่พีเอชคงที่เท่ากับ 5.0 และอุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส ด้วย *S. cerevisiae* RIT 02 โดยใช้วิธีการเตรียมหัวเชื้อ 2 ขั้นตอน ได้แก่ ขั้นตอนที่ 1 วิธีเตรียมหัวเชื้อ A โดยเขี่ยเชื้อยีสต์ 1 โคโลนี ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลและอาหารเหลววายเอ็มปลอดเชื้อปริมาตรอย่างละ 100 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงในสภาพเขย่าเท่ากับที่คำนวณได้เป็นเวลา 6 ชั่วโมงใน 1 วัน โดยไม่ใช้อากาศที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลาเลี้ยงเชื้อเท่ากับที่คำนวณได้ แล้วจึงนำหัวเชื้อ A ไปต่อเชื้อในขั้นตอนที่ 2 เรียกว่า วิธีเตรียมหัวเชื้อ B โดยนำหัวเชื้อ A ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลที่ความเป็นกรด-ด่าง คงที่ และอาหารเหลววายเอ็มเอปลอดเชื้อ ปริมาตร อย่างละ 1,000 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อในสภาพเขย่าเป็นเวลา 6 ชั่วโมงโดยไม่ใช้อากาศ ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จึงนำหัวเชื้อ B ใส่ลงในถังหมักที่มีกากน้ำตาลปริมาตร 10 ลิตร และมีความเข้มข้น

เริ่มต้นเท่ากับร้อยละ 20 โดยน้ำหนักเติมเกลือแร่ต่างๆ เหมือนกับอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลและปรับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5 วิเคราะห์ ปริมาณเอทานอลที่ได้ และน้ำตาลที่ลดลงในถังหมักทุกๆ 24 ชั่วโมง

ผลการทดลอง

การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล พีเอชเท่ากับ 4.5 และ 5.0 พิจารณาจากค่าเฉลี่ยจากการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง ด้วยการนับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่ใช้เริ่มต้นเท่ากับ 8 โคโลนีในปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล 800 มิลลิลิตร ไม่สามารถตรวจเซลล์ยีสต์จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์เมื่อเริ่มต้นชั่วโมงแรกของการหมัก จึงทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อมิลลิลิตรในตัวอย่างทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* RIT 02 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลที่พีเอชเท่ากับ 4.5 และ 5.0 ได้ดีกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5339 เมื่อพิจารณาจากปริมาณเซลล์ยีสต์ต่อมิลลิลิตรของ *S. cerevisiae* RIT 02 ในกากน้ำตาลที่พีเอชเท่ากับ 4.5 และ 5.0 จะมีค่าใกล้เคียงกัน และมีค่ามากที่สุดเมื่อใช้เวลาหมักนาน 72 ชั่วโมง ขณะที่ *S. cerevisiae* TISTR 5339 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลหลังจากการหมัก 24 ชั่วโมง มีปริมาณลดลงเมื่อเวลาผ่านไป ดังแสดงใน Table 1

Table 1 ปริมาณเซลล์ *S. cerevisiae* RIT 02 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 และ 5.0 ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	*S. cerevisiae* RIT 02 (ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร)		*S. cerevisiae* TISTR 5339 (ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร)	
	ความเป็นกรด-ด่าง 4.5	ความเป็นกรด-ด่าง 5.0	ความเป็นกรด-ด่าง 4.5	ความเป็นกรด-ด่าง 5.0
24	75	75	63	65
48	138	133	25	25
72	168	215	5	8
96	165	155	ไม่พบ	ไม่พบ

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่า *S. cerevisiae* RIT 02 ผลิตเอทานอลจากอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส พีเอช 4.5 และ 5.0 ได้มากกว่าเอทานอลที่ผลิตได้จาก *S. cerevisiae* TISTR5339 ดังแสดงใน Table 2

Table 2 เอทานอลที่ได้จากการหมักด้วย *S. cerevisiae* RIT 02 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล ความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และ 5.0 ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	ความเป็นกรด-ด่าง 4.5				ความเป็นกรด-ด่าง 5.0			
	S. cerevisiae RIT 02		*S. cerevisiae* TISTR 5339		*S. cerevisiae* RIT 02		*S. cerevisiae* TISTR 5339	
	น้ำตาล (% w/w)	เอทานอล (% v/v)	น้ำตาล (% w/w)	เอทานอล (% v/v)	น้ำตาล (% w/w)	เอทานอล (% v/v)	น้ำตาล (% w/w)	เอทานอล (% v/v)
24	20.0	0.0	20.0	0.4	20.0	0.0	20.0	0.7
48	17.2	6.2	17.3	2.6	17.3	6.3	17.2	2.7
72	15.0	8.8	15.1	5.2	15.1	8.9	15.0	5.2
96	13.1	8.7	13.0	6.4	13.0	8.9	13.1	6.5

ผลการทดลองที่ 2 พบว่า การเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ S. *cerevisiae* RIT 02 ในอาหารเหลววายเอ็มมีลักษณะใกล้เคียงกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาล เมื่อพิจารณาที่เวลา 24 ชั่วโมง *S. cerevisiae* TISTR 5339 มีปริมาณเซลล์ต่อมิลลิลิตรมากกว่าของ *S. cerevisiae* RIT 02 หลังจากนั้น ปริมาณของ *S. cerevisiae* TISTR 5339 จะเริ่มลดลง จนกระทั่งไม่พบเซลล์อีกต่อไป ขณะที่ *S. cerevisiae* RIT 02 มีการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์อย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาของการหมัก เมื่อเปรียบเทียบการเจริญของ *S. cerevisiae* RIT 02 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลกับวายเอ็ม พบว่าปริมาณเซลล์ยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลมีน้อยกว่าในวายเอ็ม สำหรับปริมาณเอทานอลที่ได้และน้ำตาลที่ลดลงจากการเลี้ยง *S. cerevisiae* RIT 02 ในอาหารเหลววายเอ็มจะมีค่ามากกว่าที่ได้จาก *S. cerevisiae* TISTR 5339 ดังแสดงใน Table 3

Table 3 ปริมาณเซลล์ *S. cerevisiae* RIT 02 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ในอาหารเหลววายเอ็ม เอทานอลที่ได้และน้ำตาลที่ลดลงจากการหมักที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส

เวลา (ชั่วโมง)	*S. cerevisiae* RIT 02			*S. cerevisiae* TISTR 5339		
	ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร	น้ำตาล (% w/w)	เอทานอล (% v/v)	ล้านเซลล์ต่อมิลลิลิตร	น้ำตาล (% w/w)	เอทานอล (% v/v)
24	80	2.4	0.8	143	2.5	0.7
48	125	1.4	1.4	83	1.8	1.3
72	163	1.3	1.4	53	1.8	1.3
96	215	1.2	1.4	ไม่พบ	1.8	1.3

จากการทดลองที่ 1 และ 2 พบว่า *S. cerevisiae* RIT 02 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลที่พีเอช 5.0 และวายเอ็มได้ดีกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5339 ทั้งในด้านของปริมาณเซลล์ยีสต์ที่วัดได้และเอทานอลที่ได้จากการหมัก ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส และจากการคำนวณอัตราการเจริญของ *S. cerevisiae* RIT 02 ในอาหารเหลวกากน้ำตาลที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 พบว่า เวลาที่ยีสต์ต้องการใช้ในการเจริญเพิ่มขึ้น 2 เท่าของเชื้อยีสต์เริ่มต้นคือประมาณ 36 ชั่วโมง ซึ่งจากการคำนวณของข้อมูลที่ได้จากการทดลองที่ 1 จึงเลือกใช้ *S. cerevisiae* RIT 02 ทำหัวเชื้อโดยใช้กากน้ำตาลและวายเอ็มเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยวิธีการเตรียมหัวเชื้อ A ใช้เวลา 36 ชั่วโมงต่อเชื้อเป็นหัวเชื้อ B ซึ่งใช้เวลาอีก 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำหัวเชื้อ B ในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดไปใช้สำหรับทำการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลปริมาตร 10 ลิตร ในการทดลองที่ 3 ต่อไป

ผลการทดลองที่ 3 การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลปริมาตร 10 ลิตร ด้วย *S. cerevisiae* RIT 02 พบว่า ในชั่วโมงที่ 9 นับจากเริ่มต้นเติมหัวเชื้อ B ลงในถังหมักเอทานอลที่ได้และน้ำตาลที่ลดลงจากการหมักด้วยเชื้อยีสต์ที่เลี้ยงในกากน้ำตาลมีค่ามากกว่าที่เอทานอลมาจากอาหารเหลววายเอ็ม และมีค่าใกล้เคียงกันในชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป เวลาที่ต้องการใช้สำหรับกระบวนการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลปริมาตร 10 ลิตร ประมาณ 24 ชั่วโมง เอทานอลที่ได้ประมาณร้อยละ 7.1 โดยปริมาตร ดังแสดงใน Table 4

Table 4 เอทานอลจากการหมักกากน้ำตาลปริมาตร 10 ลิตร ด้วย *S. cerevisiae* RIT 02 ที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลและอาหารเหลววายเอ็ม ที่อุณหภูมิห้อง 30 องศาเซลเซียส

เวลา	น้ำตาลที่ลดลง % w/w		เอทานอลที่ได้ % v/v	
ชั่วโมง	กากน้ำตาล	วายเอ็ม	กากน้ำตาล	วายเอ็ม
1	20.0	20.0	0.0	0.0
9	17.1	19.0	2.3	1.0
24	13.0	13.2	7.1	7.0
48	12.8	12.8	7.2	7.1
72	12.7	12.8	7.2	7.1
96	12.6	12.8	7.2	7.1

สรุปและอภิปรายผล

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* RIT 02 และ *S. cerevisiae* TISTR 5339 เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อกากน้ำตาลที่พีเอช 4.5 และ 5.0 พบว่า การเจริญเติบโตสูงสุดของ *S. cerevisiae* RIT 02 ในกากน้ำตาลที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และ 5.0 ใช้เวลาหมักนาน 72 ชั่วโมง จากนั้นปริมาณลดลงเมื่อหมักนาน 96 ชั่วโมง เนื่องจากปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ได้ไปยับยั้งเชื้อยีสต์นี้ตรงกันข้ามกับ *S. cerevisiae* TISTR 5339 เจริญเติบโตในกากน้ำตาลได้สูงสุดที่เวลาหมัก 24 ชั่วโมง และเชื้อยีสต์จะตายไปเมื่อหมักนานเกิน 24 ชั่วโมง ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลน้อยกว่าที่ได้ จากการใช้ *S. cerevisiae* RIT 02 ทำนองเดียวกันกับการหมักในอาหารเหลววายเอ็ม นั่นคือ S. *cerevisiae* RIT 02 จึงเป็นเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมและมีศักยภาพสำหรับใช้ในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลซึ่งสามารถทนทานต่อสับเสตรทได้อย่างดี เพราะจากการทดลองพบว่ายังคงมีเซลล์ยีสต์เจริญอยู่จึงสามารถนำมาหมุนเวียนกลับไปใช้ได้อีก ในระบบที่มีการออกแบบให้เป็นกระบวนการหมักเอทานอลอย่างต่อเนื่อง และมีระบบหมุนเวียนเซลล์กลับไปใช้ใหม่

การนำหัวเชื้อของ S. *cerevisiae* RIT 02 ในอาหารที่เป็นกากน้ำตาลไปใช้หมักกากน้ำตาลที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.0 ในถังหมักปริมาตร 10 ลิตร ภายใน 24 ชั่วโมง ได้เอทานอลประมาณ 7.1 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตรซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับหัวเชื้อของ S. *cerevisiae* RIT 02 ในอาหารเหลววายเอ็มกากน้ำตาล จึงเป็นทางเลือกหนึ่งของอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อซึ่งมีราคาถูกกว่าวายเอ็ม การเพิ่มประสิทธิภาพของยีสต์เพื่อให้ปริมาณของเอทานอลที่ได้จากการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นควรมีระบบควบคุมอุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่าง ภายในถังหมักตลอดระยะเวลาของการหมัก

บรรณานุกรม

คุณวุฒิ สุวพานิช. 2546 ก. “สุรากลั่นจากกากน้ำตาล”. **วารสารเกษตรแปรรูป**. 1(10):45-49;2(14):56-58.

ดวงพร คุนธโชติ. 2530. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์**. กรุงเทพฯ : โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์. 191 หน้า.

ยุพกนิษฐ์ พ่วงวีระกุล. “ตอบปัญหาคาใจสุรากลั่น”. **วารสารเกษตรแปรรูป**. 2(14):61-62.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. **เทคโนโลยีชีวภาพ**. กรุงเทพฯ : คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. โอ. เอส. พริ้นติ้งเฮ้าส์. 163 หน้า.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. **จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร**. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.

สมใจ ศิริโภค. 2537. **เทคโนโลยีการหมัก**. กรุงเทพฯ : สหมิตรออฟเซต. 250 หน้า.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และประวิทย์ วงคงคาเทพ. 2538. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 1**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 251. หน้า.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, วรสิทธิ์ โทจำปา และประวิทย์ วงคงคาเทพ. 2544. **วิศวกรรมเคมีชีวภาพพื้นฐาน 2**. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 284 หน้า.

สิรินดา ยุ่นฉลาด. 2540. **ปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ 1**. ขอนแก่น : มหาวิทยาลัยขอนแก่น.