



รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดเจือจางและมี
การเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย
Saccharomyces cerevisiae SC90

นางสาวสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา
คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
นางสาวกมลวรรณ ชูชีพ
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
นายเทพปัญญา เจริญรัตน์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจาก เงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม ห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ชื่อโครงการ (ภาษาไทย) การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดเจือจางและมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90

(ภาษาอังกฤษ) Bioethanol production from dilute acid hydrolysates of cassava solid waste and supplement with coconut juice by *Saccharomyces cerevisiae* SC90

แหล่งเงิน เงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

ประจำปีงบประมาณ 2556 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 115,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2555 ถึง 30 กันยายน 2556

รายนามคณะผู้วิจัย

1. นางสาวสร้อยสุดา พรภักดีพัฒนา คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. (หัวหน้าโครงการ)
2. นางสาวกมลวรรณ ชูชีพ คณะวิทยาศาสตร์ สจล. วิทยาเขตชุมพร (ผู้ร่วมโครงการ)
3. นายเทพปัญญา เจริญรัตน์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ผู้ร่วมโครงการ)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางเป็นแหล่งวัตถุดิบราคาถูก ร่วมกับการใช้น้ำมะพร้าวแก่เป็นแหล่งของสารอาหารเสริมการเจริญของยีสต์และเป็นแหล่งของน้ำตาลในการผลิตเอทานอล และศึกษาถึงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในรูปแบบแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ผลการศึกษาพบว่า อาหารที่เติมน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร ส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุด โดยให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงถึง $7.47 \pm 0.26 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่อาหารควบคุมที่มีการเติมยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร แทนน้ำมะพร้าว ให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ $4.54 \pm 0.85 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอทานอลในอาหารที่ใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางที่เสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1-3 กรัมต่อลิตร ส่งเสริมการหมักเอทานอลได้ดีโดยให้ผลได้ของเอทานอล อัตราการผลิตเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการหมักประมาณ 0.38 กรัมต่อกรัม 0.32 กรัมต่อลิตร. ชั่วโมง และ 74.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการศึกษานี้ก็กล่าวได้ว่ากากมันสำปะหลังและน้ำมะพร้าวมีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบราคาถูกสำหรับการผลิตเอทานอลชีวภาพ

คำสำคัญ: เอทานอลชีวภาพ กากมันสำปะหลัง น้ำมะพร้าว *Saccharomyces cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Research Title: Bioethanol Production from Dilute Acid Hydrolysates of Cassava Pulp and Supplement with Coconut Juice by *Saccharomyces cerevisiae* SC90

Researcher: Soisuda Pornpukdeewattana Faculty: Agro-Industry, KMITL

Kamonwan Chuchep Faculty: Science, KMITL

Theppanya Charoenrat Faculty: Science and Technology, TU

ABSTRACT

The purpose of this research was to evaluate the impact of using dilute acid hydrolysates of cassava pulp as a low cost substrate for bioethanol production. The hydrolysate was supplemented with coconut juice, as nutrient and carbon sources, to enhance yeast growth and ethanol production. The effect of inorganic nitrogen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* SC90 was also investigated. Coconut juice at 200 ml/l mixed with dilute acid hydrolysates presented the best results in yeast growth with cell density at $7.47 \pm 0.26 \times 10^7$ cells/ml comparing to cell density at $4.54 \pm 0.85 \times 10^7$ cells/ml of the control prepared by the addition of 1 g/l of yeast extract instead of coconut juice. In addition, the effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on ethanol production from dilute acid hydrolysates of cassava pulp supplemented with 200 ml/l of coconut juice was examined. The results presented that 1-3 g/l of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ provided ethanol yield, volumetric productivity, and fermentation efficiency around 0.38 g/g, 0.32 g/l.h, and 74.66 %, respectively. In summarize, our results reveal that both cassava solid waste and coconut juice are potential resources to be used as low cost materials for bioethanol production.

Keywords: bioethanol, cassava pulp, coconut juice, *Saccharomyces cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) จากแหล่งทุนเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2556

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 สาขาเทคโนโลยีการหมัก และบุคลากร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ที่ช่วยสนับสนุนงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิตที่ให้ความเอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือในการวิเคราะห์

นางสาวสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

นางสาวกมลวรรณ ชูชีพ

นายเทพปัญญา เจริญรัตน์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	2
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม	5
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	13
3.1 วัตถุประสงค์และเชื้อจุลินทรีย์	13
3.2 การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง	13
3.3 การเตรียมเชื้อยีสต์เริ่มต้น	13
3.4 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ในด้านความทนต่อแรงดันออสโมติก อุณหภูมิ และเอทานอล	14
3.5 การใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรต	14
3.6 การใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งสารอาหารในการหมักเอทานอล	14
3.7 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการหมักเอทานอล	15
บทที่ 4 ผลการวิจัย	16
4.1 การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง	16
4.2 ข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ในด้านความทนต่อแรงดันออสโมติก อุณหภูมิ และเอทานอล	16
4.3 การใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรต	20
4.4 การใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งสารอาหารในการหมักเอทานอล	22
4.5 ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล	25
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	28
บทที่ 6 สรุปผลผลิตงานวิจัย	29
เอกสารอ้างอิง	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก	35
ภาคผนวก ก ผลผลิตงานวิจัย	36
ก-1 การผลิตเอทานอลชีวภาพจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจาง และมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SC90	37
ก-2 Optimization of Fermentation Temperature for Very High Gravity Ethanol Production using Industrial Strain of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SC90	47
ภาคผนวก ข สรุปค่าใช้จ่ายการดำเนินโครงการวิจัย	73
ประวัตินักวิจัย	106



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมะพร้าว	10
3.1 องค์ประกอบของอาหารสำหรับศึกษาการใช้ น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งสารอาหารเสริมในการหมักเอทานอล	15
4.1 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลของเชื้อ SC90 ที่มีการเติมน้ำมะพร้าวที่ความเข้มข้นต่างๆ	25
4.2 ค่าพารามิเตอร์ของเชื้อ SC90 ภายใต้การเสริมสาร $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	27



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงสร้างวัสดุทิกโนเซลลูโลส	5
2.2 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลและหมักในขั้นตอนเดียวกัน	6
2.3 เส้นทางมะพร้าวผล 1 ลูก	9
4.1 การเตรียมกากมันสำปะหลังเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลโดยย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางร่วมกับการใช้ความร้อน	16
4.2 ผลของแรงดันออสโมติกที่เหนี่ยวนำโดยใช้น้ำตาลซอร์บิทอลต่อการเจริญของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90	17
4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90	18
4.4 ผลของเอทานอลต่อการเจริญของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่เลี้ยงบนอาหาร YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30°C	19
4.5 ผลของเอทานอลและอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90	20
4.6 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง	21
4.7 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD สูตรมาตรฐาน	22
4.8 จำนวนเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่มีชีวิตในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยยีสต์สกัดหรือน้ำมะพร้าว	23
4.9 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยยีสต์สกัดหรือน้ำมะพร้าว	24
4.10 ผลของ (NH ₄) ₂ SO ₄ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเซลล์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่มีชีวิตในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 mL	26
4.11 ผลของ (NH ₄) ₂ SO ₄ ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 mL เมื่อการหมักผ่านไป 36 ชั่วโมง	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 1

บทนำ

ในปัจจุบันนี้มีความตื่นตัวเรื่องของพลังงานทดแทนไม่เพียงแต่ในระดับนานาชาติเท่านั้น แม้แต่ประเทศไทยก็ได้กำหนดกรอบนโยบายการพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพของประเทศไทยประจำปี 2555-2564 ในเรื่องการเพิ่มความมั่นคงด้านพลังงานด้วยการใช้เทคโนโลยีชีวภาพพัฒนาพลังงานทางเลือกที่ไม่ก่อปัญหาการแย่งชิงพืชอาหาร โดยประเทศไทยจำเป็นต้องลงทุนการวิจัยและพัฒนาพลังงานชีวภาพยุคที่ 2 “เอทานอลจากวัสดุเซลลูโลสจากของเหลือทางการเกษตร” จากรายงานของ Prasad *et al* (2007) กล่าวว่าเอทานอลสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทางเลือกในภาคการคมนาคมขนส่งเพื่อทดแทนแหล่งพลังงานเชื้อเพลิงฟอสซิล (น้ำมัน) ซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการแก้ปัญหาความไม่เสถียรภาพด้านพลังงานของประเทศช่วยในการลดการนำเข้าน้ำมัน อีกทั้งช่วยลดปัญหามลภาวะทางอากาศที่เกิดจากภาวะเรือนกระจกจากการใช้เชื้อเพลิงประเภทน้ำมันปิโตรเลียม

เอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบ 3 ประเภทใหญ่ๆ คือ (1) วัตถุดิบประเภทแป้ง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นผลผลิตทางการเกษตร เช่น ข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น (2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย ข้าวฟ่างหวาน กากน้ำตาล บีทรูท เป็นต้น (3) วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากวัสดุการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ชังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ชี้อ้อย และวัชพืช ทั้งนี้ความแตกต่างของกระบวนการผลิตเอทานอลขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่นำมาใช้ (Demirbaş, 2007; Sánchez and Cardona, 2008) กล่าวคือ การผลิตเอทานอลจากพืชน้ำตาล สามารถนำน้ำคั้นจากวัตถุดิบมาผ่านกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ ยีสต์ หรือ แบคทีเรีย โดยตรง (Demirbaş, 2007) ส่วนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบจำพวกพืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ จะต้องผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นจึงนำมาหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอทานอล (Gray *et al.*, 2006) สำหรับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบพวกเซลลูโลสนั้นจะมีขั้นตอนมากกว่าวัตถุดิบพวกแป้งหรือน้ำตาล กล่าวคือ ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ อาจต้องเพิ่มขั้นตอนการลดขนาดของวัตถุดิบให้เล็กลงโดยอาศัยกระบวนการทางกล และอาจมีการปรับสภาพวัตถุดิบเพื่อให้เหมาะต่อการนำไปย่อยเพื่อเปลี่ยนสารพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาล (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2006) ที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ เอทานอลที่ผลิตขึ้นจากวัตถุดิบชนิดต่างๆ จะถูกนำเข้าสู่กระบวนการกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่สูงขึ้น (Cardona *et al.*, 2010) วัตถุดิบที่นำมาผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมของประเทศไทยคือ กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง เนื่องจากประเทศไทยมีวัตถุดิบดังกล่าวเป็นจำนวนมาก นอกจากวัตถุดิบสองชนิดที่ได้กล่าวถึงแล้ว งานวิจัยในปัจจุบันนี้จะมุ่งเน้นไปยังการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สองโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อเสริมสร้างความมั่นคงทางอาหาร กล่าวคือ การผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นพลังงานทางเลือกจากวัสดุเซลลูโลสจากของเหลือทางการเกษตร หรืออุตสาหกรรมเกษตร (Purwadi *et al.*, 2007) การพัฒนาการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่สองเกิดขึ้นเนื่องจาก เทคโนโลยีการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพรุ่นที่หนึ่งซึ่งผลิตจากแป้ง น้ำตาลและน้ำมันพืช เป็นวัตถุดิบ ได้ส่งผลกระทบต่อความมั่นคงของอาหาร โดยทำให้อาหารมีราคาแพงขึ้น เพราะการนำไปใช้ผลิตเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพจะได้ราคาต่อหน่วยสูงกว่า (อำพน, 2552) ดังนั้นการผลิตเอทานอลจากชีวมวลซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรหรืออุตสาหกรรมเกษตรจึงไม่เป็นการทำลายหรือรบกวนทรัพยากรธรรมชาติของโลก เพราะสามารถปลูกขึ้นทดแทนได้ และแม้แต่ประเทศ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยากจนก็สามารถผลิตชีวมวลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานได้ (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย, 2551)

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปี 2552 ประเทศไทยมีกำลังการผลิตมันสำปะหลัง 30 ล้านตัน และมีการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ คือ อุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลังร้อยละ 56 และอุตสาหกรรมผลิตมันเส้นหรือมันอัดเม็ดร้อยละ 44 แป้งมันที่ผลิตขึ้นได้ถูกส่งออกจำหน่ายร้อยละ 60 ส่วนที่เหลือเป็นการใช้ในประเทศโดยใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมหลายประเภทเช่น อุตสาหกรรมอาหาร สำหรับมันเส้นที่ผลิตได้ส่งออกร้อยละ 56 ส่วนที่เหลือเป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมผลิตอาหารสัตว์ แอลกอฮอล์ และกรดอินทรีย์ เป็นต้น (ฝ่ายบริหารคลังสตอร์และโปรแกรมวิจัยสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2555)

การผลิตแป้งมันสำปะหลังจะมีวัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการผลิต คือ กากมันสำปะหลังซึ่งจัดได้ว่าเป็นผลพลอยได้ที่เป็นปริมาณของแข็งมากที่สุด โดยมีลักษณะทั่วไปที่ละเอียด สีขาว และมีความชื้นสูง ร้อยละ 75 (<http://www.thailandtapiocastarch.net>) กล้าณรงค์และคณะ (2548) รายงานว่า กากมันสำปะหลังนี้อยู่ในรูปของกากเปียกปริมาณ 3-4 ล้านตันต่อปี หรือคิดในรูปกากแห้งเป็น 1-1.5 ล้านตันต่อปี (คิดเป็นร้อยละ 10-15 ของหัวมันสดที่ใช้ในการผลิตแป้ง) โดยกากมันสำปะหลังยังคงมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรตอยู่ร้อยละ 55 คิดเป็นแป้งอยู่ร้อยละ 50-60 ของน้ำหนักแห้ง โดยแบ่งในส่วนนี้จะแทรกอยู่ใน ลิกโนเซลลูโลส และเพคติน กากมันสำปะหลังยังประกอบไปด้วยเซลลูโลสและเส้นใยร้อยละ 10-15 โปรตีนร้อยละ 1.5-5 และไขมันร้อยละ 0.1-4.0 โดยน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุ Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , และ Zn^{2+} ในปริมาณต่ำ (จิราภรณ์, 2525) จากองค์ประกอบดังกล่าวจึงสามารถนำกากมันสำปะหลังไปใช้ประโยชน์ในรูปของการผลิตอาหารสัตว์เนื่องจากยังคงประกอบด้วยโปรตีนและสารอาหารต่างๆ (นารีรัตน์ และคณะ, 2552)

อีกทางเลือกหนึ่งของการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งนี้ คือ การนำมาผลิตเอทานอล ทั้งนี้มีการรายงานว่าการผลิตเอทานอลจำเป็นต้องหาเทคโนโลยีที่ช่วยลดต้นทุนมากที่สุดเพื่อให้สามารถแข่งขันกับน้ำมันเบนซินได้ โดยทางเลือกหนึ่งคือ การพัฒนาวัตถุดิบทางเลือกใหม่ที่มีราคาต่ำให้กับอุตสาหกรรม อาทิ การใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย กากมันสำปะหลัง (กล้าณรงค์และคณะ, 2548) การใช้กากมันสำปะหลังซึ่งนับว่าเป็นของเหลือจากโรงงานผลิตแป้งมันมาผลิตเอทานอล นอกจากเป็นประโยชน์ในด้านการสร้างความมั่นคงของอาหารดังกล่าวในช่วงต้นแล้วยังจัดว่าเป็นการรักษาสิ่งแวดล้อมโดยการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรที่มีอยู่ให้เกิดความคุ้มค่ามากที่สุด และปลดปล่อยของเสียน้อยที่สุด

รายงานการวิจัยหลายแหล่งได้กล่าวถึงแนวทางการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง (กล้าณรงค์และคณะ, 2548; ธีรภัทร และคณะ, 2549; ธนภูมิ และคณะ, 2552; กิตขามาศ และคณะ, 2010; Akaracharanya *et al.*, 2011) ข้อได้เปรียบอย่างหนึ่งของการใช้กากมันสำปะหลังในการผลิตเอทานอลคือไม่ต้องผ่านกระบวนการลดขนาดของวัตถุดิบเมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดอื่น ซึ่งเป็นการช่วยลดเวลา และค่าใช้จ่าย (Akaracharanya *et al.*, 2011) การย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อให้ได้น้ำตาลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้กรด และการใช้เอนไซม์ โดยวิธีการแรกได้รับความนิยมมาก (Badger, 2002) ในปัจจุบันได้มีการรายงานถึงการใช้กระบวนการทั้งสองร่วมกันเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่สูงขึ้น กากมันสำปะหลังนั้นมีสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เหลืออยู่น้อย ดังนั้น โครงการวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการเพิ่มความสามารถของยีสต์ในการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้จากเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจาง ด้วยการศึกษาสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล

มะพร้าวเป็นพืชเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่สำคัญของประเทศ จากการรายงานของสำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร (2551) กล่าวว่า บริเวณที่มีการเพาะปลูกมะพร้าวมากได้แก่ ภาคใต้และภาคกลาง ทั้งนี้ จังหวัดชุมพรเป็นจังหวัดที่มีผลผลิตมะพร้าวมากเป็นอันดับสองของประเทศไทย เพื่อเป็นการสร้างความร่วมมือทางงานวิจัยของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังระหว่างคณะอุตสาหกรรมเกษตร และวิทยาเขตชุมพร จึงเกิดแนวคิดในการใช้น้ำมะพร้าวมาเป็นสารอาหารเสริมในการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางขึ้น นอกจากนี้ การสร้างความร่วมมือในการวิจัยระหว่างวิทยาเขตแล้ว โครงการวิจัยนี้ยังมุ่งเน้นไปที่การหาแนวทางใหม่ในการใช้ประโยชน์จากน้ำมะพร้าวซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำมะพร้าวมาเสริมทั้งน้ำตาลและสารอาหารในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง โดยมีการรายงานถึงองค์ประกอบทางเคมีของน้ำมะพร้าวว่าอุดมไปด้วยน้ำตาลหลากชนิด กรดอะมิโน และวิตามินบี ซึ่งจัดว่าเป็นแหล่งวัตถุดิบเหลือใช้ที่มีศักยภาพในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (Shivakumar and Vijayendra, 2006)

คณะผู้วิจัยมีความเชื่อมั่นเป็นอย่างยิ่งว่า งานวิจัยนี้สามารถช่วยแก้ปัญหา หรือช่วยเติมเต็มช่องว่างของการวิจัย รวมทั้งสามารถขยายผลไปสู่เชิงพาณิชย์เพื่อเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาทั้งภาคเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรของประเทศไทยในด้านการลดต้นทุนการผลิตของเอทานอล และด้านการลดปัญหาสิ่งแวดล้อม

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 ศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ในด้านความสามารถในการทนต่อแรงดันออสโมติก อุณหภูมิ และเอทานอล

1.2.2 ศึกษาปริมาณน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นแหล่งสารอาหารของยีสต์ในการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง

1.2.3 ศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลจากกากมันสำปะหลังที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาวิจัยโครงการนี้เป็นการศึกษาในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อให้ทราบถึงข้อมูลเบื้องต้นของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในด้านความทนต่อแรงดันออสโมติก อุณหภูมิ และเอทานอล โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ในการศึกษา ซึ่งทั้งสามปัจจัยดังกล่าวเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งในการผลิตเอทานอล โครงการนี้ยังศึกษาการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจางเพื่อเป็นแหล่งสับสเตรทราคาถูก รวมทั้งศึกษาถึงการใช้ประโยชน์ของน้ำมะพร้าวซึ่งเป็นผลพลอยได้จากอุตสาหกรรมผลิตกะทิ โดยนำมาใช้เป็นแหล่งของสารอาหารเสริมที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ และเป็นแหล่งของน้ำตาลในการผลิตเอทานอล จากนั้นจะศึกษาถึงปริมาณที่เหมาะสมของแหล่งไนโตรเจน ซึ่งในการศึกษานี้เลือกใช้เกลืออนินทรีย์ $[\text{NH}_4]_2\text{SO}_4$ การทดลองเบื้องต้นในการการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมนั้นจะดำเนินการในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร มีการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนเท่ากับ 120 รอบต่อนาที โดยปราศจากการให้อากาศ

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 องค์ความรู้เบื้องต้นของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในด้านความทนต่อแรงดันออสโมติก อุณหภูมิ และเอทานอล

1.4.2 สูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากกากมันสำปะหลังโดยการย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง

1.4.3 สามารถนำองค์ความรู้ที่ได้ไปประยุกต์เป็นบทปฏิบัติการสำหรับงานการเรียนการสอน เพื่อให้นักศึกษาเห็นภาพในการใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งทางการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร

1.4.4 เพื่อเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตรให้แก่กากมันสำปะหลัง และน้ำมะพร้าวซึ่งปกติเป็นของเหลือ ไม่มีราคา อีกทั้งเป็นการลดปริมาณกากมันสำปะหลัง และน้ำมะพร้าวที่จะส่งสู่ระบบบำบัดน้ำเสีย หรือช่วยแก้ปัญหามลภาวะที่เกิดจากการเททิ้งน้ำมะพร้าวลงแม่น้ำ ลำคลอง ซึ่งทำให้น้ำในแม่น้ำเป็นไขจากมะพร้าว

1.4.5 ผลงานวิจัยที่ได้คาดว่าจะนำไปเผยแพร่ในวารสารวิชาการ และ/หรือการประชุมวิชาการ ระดับชาติ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

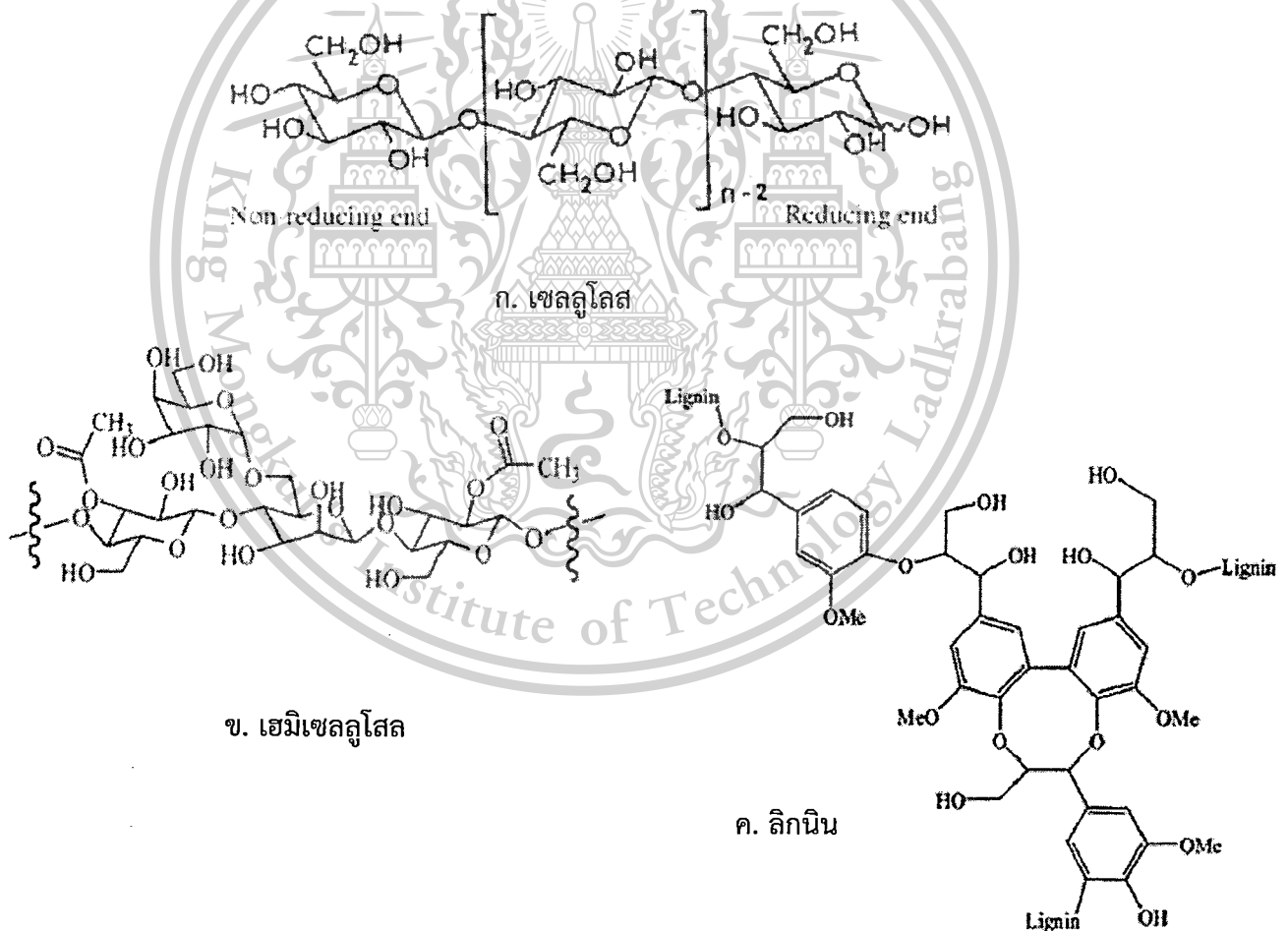
บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม

2.1 วิธีการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส

ด้วยความตระหนักถึงความมั่นคงของอาหารเพื่อมนุษย์และสัตว์ งานวิจัยด้านการผลิตเอทานอลในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นไปยังชีวมวลที่เป็นผลพลอยได้จากการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้หาได้ง่ายและมีราคาถูก และยังเป็นการรักษาสิ่งแวดล้อมโดยเป็นการกำจัดขยะอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2551) กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้น จะประกอบไปด้วยขั้นตอน (1) การเตรียมวัตถุดิบ (pre treatment) (2) การเตรียมกล้าเชื้อ (inoculum preparation) (3) การหมัก (fermentation) (4) การแยกเอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์ (separation and purification)

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้นประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses) และลิกนิน (lignin) ดังแสดงในภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างวัสดุลิกโนเซลลูโลส ก. เซลลูโลส ข. เฮมิเซลลูโลส และ ค. ลิกนิน

ที่มา : Han et al. (2011)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

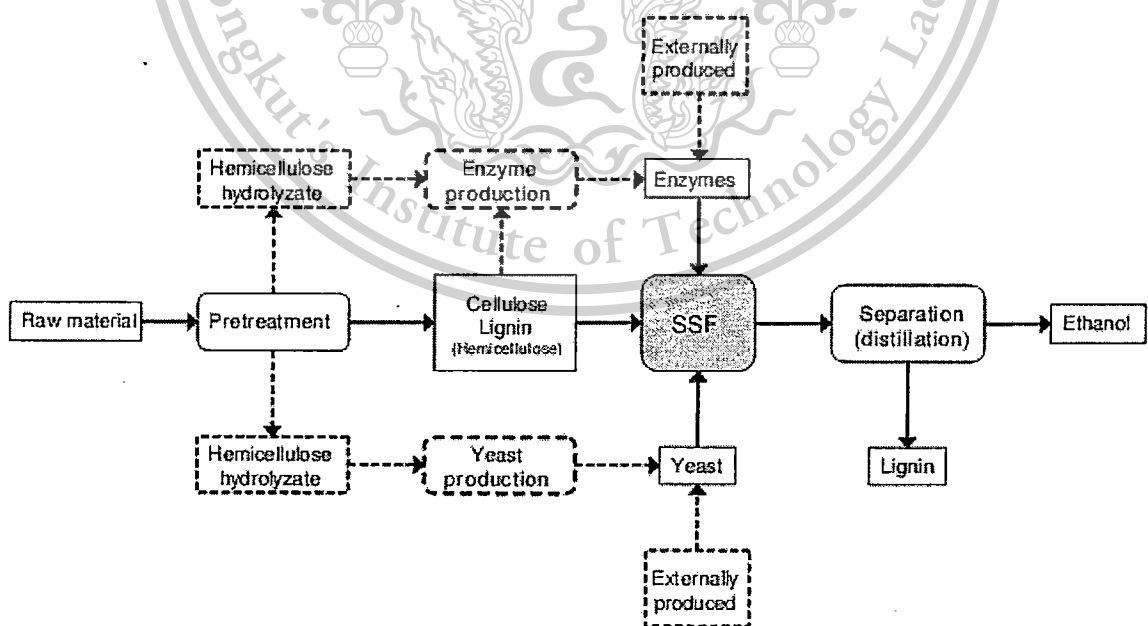
โครงสร้างทั้งสามนี้มีความแข็งแรงสูงมาก ดังนั้น จึงต้องมีกระบวนการเตรียมวัตถุดิบเพื่อที่จะเปลี่ยนโครงสร้างดังกล่าวให้เป็นน้ำตาลไซโลส (xylose) กลูโคส (glucose) และอะราบิโนส (arabinose) ที่ยีสต์สามารถใช้ได้ โดยจะกล่าวถึงในหัวข้อที่ 2.2

กล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักเอทานอลนั้นโดยทั่วไปใช้เชื้อ *S. cerevisiae* เนื่องจากมีการรายงานไว้ว่า เชื้อดังกล่าวสามารถผลิตเอทานอลได้สูง อีกทั้งยังทนต่อสารยับยั้งที่เกิดในระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ (Linden and Hahn-Hägerdal, 1989) และยังทนต่อเอทานอล และอุณหภูมิสูงได้ (Kosaric and Vardar-Sukan, 2001) อย่างไรก็ตามเชื้อนี้มีข้อจำกัดคือไม่สามารถใช้น้ำตาลในกลุ่มเพนโทส (C5) เช่น ไซโลส และ อะราบิโนส ได้ ซึ่งน้ำตาลในกลุ่มนี้จะพบมากในวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลส ดังนั้นงานวิจัยในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นการสร้างรีคอมบิแนนท์ *S. cerevisiae* เพื่อให้สามารถใช้น้ำตาลในกลุ่ม C5 ได้ (Hahn-Hägerdal *et al.*, 2006; Verstrepen *et al.*, 2006)

หลังจากที่วัตถุดิบผ่านกระบวนการปรับสภาพและย่อยให้ได้น้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้แล้ว ยีสต์จะใช้น้ำตาลโดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis) โดยผลิตผลหลักคือ เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) โดยน้ำตาลส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้างชีวมวลของเชื้อ และมีการสร้างผลพลอยได้อื่นๆ เช่น กลิเซอรอล และ กรดอินทรีย์ (Boulton and Quain, 2006)

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแล้วเอทานอลที่ได้จะถูกนำไปกลั่นเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล เนื่องจากเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักนั้น มีความเข้มข้นอยู่ในช่วงร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร และการนำเอทานอลไปใช้เป็นเชื้อเพลิงนั้นจำเป็นต้องทำให้บริสุทธิ์ถึงร้อยละ 99.5 แต่โดยปกติแล้วกลั่นจะได้เอทานอลร้อยละ 95 ดังนั้นจำเป็นต้องมีวิธีการอื่น เช่น กระบวนการแยกด้วยเมมเบรน หรือกระบวนการแยกโดยการให้เอทานอลไหลผ่านวัสดุที่มีรูพรุนสูง (วิธีโมเลกุลซีฟ) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2551)

จากรายงานวิจัยของ Olofsson และคณะ (2008) ซึ่งเสนอเป็นแผนภาพกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาลและหมักในขั้นตอนเดียวกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ที่มา: Olofsson *et al.* (2008)

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กลั่นรงค์ และคณะ (2548) ผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง ซึ่งกากมันดังกล่าวยังมีแป้ง เป็นองค์ประกอบสูงจึงสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ อย่างไรก็ตามต้องมีการปรับสภาพกากมันด้วย เอนไซม์เซลลูเลส เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการผสมและการย่อยแป้ง จากนั้นนำกากมันที่ผ่านการปรับ สภาพแล้วไปเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตเอทานอลโดยอาศัยกระบวนการหมักที่มีการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลและ หมักในขั้นตอนเดียวกัน (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) โดยนำน้ำเชื่อมที่ ผ่านการย่อยครั้งแรกด้วยเอนไซม์อมิเลส (amylase) มาผสมกับเอนไซม์กลูโคมิเลส (glucoamylase) พร้อมกับเชื้อยีสต์ ซึ่งกระบวนการ SSF สามารถลดระยะเวลาการหมักได้เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการ หมักแบบดั้งเดิม (Conventional Fermentation)

2.2 กระบวนการเตรียมวัตถุดิบ

วัตถุประสงค์ของกระบวนการเตรียมวัตถุดิบนั้นเพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของมวลชีวภาพโดย การละลายหรือแยกส่วนประกอบพวก เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารสกัดอื่นๆ เพื่อให้มวลชีวภาพ ที่เหลืออยู่ง่ายต่อการนำไปไฮโดรไลซ์ (สุขใจ, 2551) การเตรียมตัวอย่างของวัสดุพวกลิกนินเซลลูโลสเพื่อให้ ได้น้ำตาลนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน ได้แก่ (1) การเตรียมตัวอย่างทางกายภาพ (2) การเตรียมตัวอย่างทางเคมี- ฟิสิกส์ (3) การเตรียมตัวอย่างทางเคมี และ (4) การเตรียมตัวอย่างทางชีวภาพ ทั้งนี้แต่ละวิธีต่างมีข้อดี และ ข้อจำกัดแตกต่างกันไป (สุขใจ, 2551; Zheng *et al.*, 2009)

สำหรับการเตรียมวัตถุดิบจำพวกผลพลอยได้จากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง (กาก เปลือก และลำต้น) สามารถเตรียมได้โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน (Srinorakutara *et al.*, 2006; กัลยา และคณะ, 2548; Agu *et al.*, 1997) การใช้กรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน และ การใช้เอนไซม์เพื่อย่อยเซลลูโลส และแป้งที่ตกค้าง (Akarachanya *et al.*, 2011; Han *et al.*, 2011)

ได้มีการรายงานถึงการเตรียมกากมันสำปะหลังโดยวิธีทางชีวภาพซึ่งอาศัยครูดเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* เพื่อเปลี่ยนเซลลูเลสในกากมันให้กลายเป็นน้ำตาล จากนั้นจึงใช้ยีสต์มา หมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล (ผ่องศรี และคณะ, 2550) วิธีการนี้มีข้อดี คือ ใช้พลังงานต่ำภายใต้สภาวะที่ไม่ รุนแรงอีกทั้งยังไม่ก่อให้เกิดสารยับยั้งต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตาม ข้อจำกัดของวิธีการนี้อยู่ที่อัตราการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์นั้นใช้เวลานานมาก (สุขใจ, 2551)

งานวิจัยของ Jakobsson (2003) พบว่าการปรับสภาพของวัตถุดิบโดยการให้ความร้อนก่อน การย่อยด้วยเอนไซม์นั้น สามารถเพิ่มปริมาณน้ำตาลกลูโคสได้ อีกทั้งมีงานวิจัยที่สนับสนุนว่ากระบวนการ ใช้กรดเจือจาง เช่น ซัลฟิวริกเจือจาง ร่วมกับการให้ความร้อนเพื่อแยกเฮมิเซลลูโลส สามารถเพิ่ม ประสิทธิภาพของเอนไซม์เซลลูเลสในการย่อยเซลลูโลส อย่างไรก็ตาม วิธีการนี้มีข้อจำกัดและผลเสียคือ เครื่องมือถูกกัดกร่อน และมีสารพิษเกิดขึ้น (สุขใจ, 2551)

2.3 การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง

ในการผลิตเอทานอลจากผลพลอยได้ทางการเกษตร หรืออุตสาหกรรมเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย เปลือกและกากมันสำปะหลัง จำเป็นต้องมีการเพิ่มแหล่งไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุที่จำเป็น ให้แก่ยีสต์ โดยไนโตรเจนจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์กรดอะมิโน พิวรีน ไพริมิดีน คาร์โบไฮเดรตบางชนิด ลิปิด เอนไซม์ โคแฟกเตอร์และสารชนิดอื่นๆ แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียม ซัลเฟต ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) และ แอมโมเนียมไนเตรต (NH_4NO_3) และสารประกอบอินทรีย์ เช่น เพปโตน ยีสต์ สกัด และน้ำแช่ข้าวโพด (สุขใจ, 2554) อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสูตรสารอาหารที่

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เหมาะสมสำหรับยีสต์เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร หรืออุตสาหกรรมเกษตร ปรากฏว่ามีหลายสูตรด้วยกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ได้เลือกใช้ และวัตถุประสงค์ของงาน เช่น งานวิจัยของ Yu และ Zhang (2004) ซึ่งศึกษาการผลิตเอทานอลจากของเหลือจากอุตสาหกรรมฝ้าย มีการเตรียมวัตถุดิบโดยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกเจือจาง สารอาหารที่นักวิจัยกลุ่มนี้เติมให้แก่ยีสต์ คือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 2.0 กรัมต่อลิตร, แมกเนเซียมซัลเฟต ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 1.0 กรัมต่อลิตร, ยีสต์สกัด 10.0 กรัมต่อลิตร และยูเรีย (urea) 6.4 กรัมต่อลิตร จากงานวิจัยเรื่องการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดย Agu และคณะ (1997) ได้เสริมสารอาหาร คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ KH_2PO_4 ในปริมาณที่เท่ากัน คือ 3 กรัมต่อลิตร ซลดาและคณะ (2547) ใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นสารตั้งต้นเพื่อผลิตเอทานอล โดยสารอาหารที่เสริมให้แก่ยีสต์ คือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ กัลยาและคณะ (2548) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากสารละลายกากมันที่ย่อยด้วยกรดโดยการหมักด้วย *S. cerevisiae* และได้มีการเติมอาหารเสริมให้แก่ยีสต์ คือ ยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 กรัมต่อลิตร, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 กรัมต่อลิตร และ KH_2PO_4 0.5 กรัมต่อลิตร สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับสภาพของเชื้อยีสต์ให้สามารถทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบนั้นจะมีการเติมแหล่งแร่ธาตุและวิตามินเพิ่มขึ้น (Tomas-Pejo *et al.*, 2010; Martín *et al.*, 2007) จากผลการทดลองของ Alfenore และคณะ (2002) พบว่าการเติมวิตามินรวมหลายชนิดจะส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของยีสต์ อีกทั้งได้เอทานอลเพิ่มขึ้น และจากรายงานการวิจัยที่กล่าวว่าน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหารที่ดีสำหรับเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหารเสริมให้แก่ยีสต์ในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังซึ่งวัตถุดิบดังกล่าวมีข้อจำกัดในด้านสารอาหาร

2.4 มะพร้าวและการใช้ประโยชน์

ประเทศไทยมีพืช ผลไม้หลายชนิดที่มีความสัมพันธ์กับเศรษฐกิจและสังคมไทย มะพร้าวจัดเป็นหนึ่งในนั้น ซึ่งนอกจากจะสร้างรายได้ให้แก่เกษตรกรผู้ปลูกแล้ว ยังก่อให้เกิดอุตสาหกรรมแปรรูปต่อเนื่องเป็นสินค้าส่งออกสร้างรายได้ให้แก่ประเทศได้ อีกทั้งยังเป็นส่วนหนึ่งในวิถีชีวิตคนไทย (กลุ่มวิจัยเศรษฐกิจการค้าการลงทุน, 2553) ในปี 2551 ประเทศไทยมีพื้นที่ปลูกมะพร้าว 1.54 ล้านไร่ มีผลผลิตรวม 1.48 ล้านตัน มูลค่าผลผลิตรวม 7,111 ล้านบาท ผลิตมาก ในภาคใต้และภาคกลาง ตามลำดับ โดยจังหวัดที่มีผลผลิตมากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร ชลบุรี สุราษฎร์ธานี และนครศรีธรรมราช คิดเป็น 73% ของปริมาณผลผลิตทั้งประเทศ (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2551)

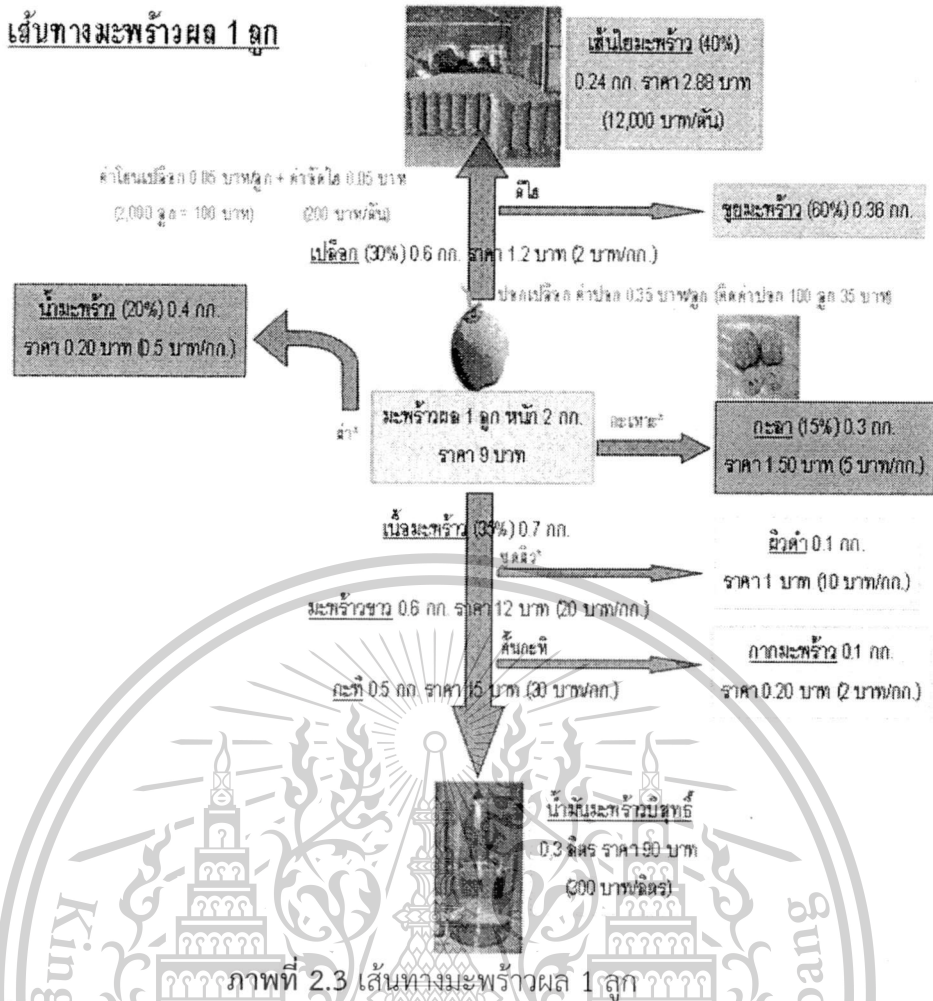
ผลมะพร้าว เป็นสินค้าเกษตรที่ประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิต เนื้อมะพร้าวที่ได้จากผลมะพร้าวแก่สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์หลายชนิด ตัวอย่างเช่น เนื้อมะพร้าวแห้ง (copra) น้ำมันมะพร้าว (coconut oil) เนื้อมะพร้าวฝอยอบแห้ง (dessicated coconut) และกะทิ (coconut milk) (สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ, 2554) นอกจากนี้ยังมีวัสดุเหลือทิ้งที่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ คือ กะลามะพร้าว นำไปผลิตของใช้และเครื่องประดับ น้ำมันมะพร้าว สามารถเพิ่มมูลค่าโดยการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์วันสวรรค์ ไยมะพร้าว นำไปใช้เป็นเส้นในโซฟา เบาะ ทำแท่งเพาะชำ และกากมะพร้าว สามารถนำไปผลิตอาหารสัตว์ เป็นต้น จากที่กล่าวมานี้แสดงให้เห็นว่ามะพร้าวมีห่วงโซ่อุปสงค์และอุปทานที่ซับซ้อนสามารถแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ได้หลากหลายชนิดและเกิดมูลค่าเพิ่มขึ้นในทุกขั้นตอน ดังภาพที่ 2.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เส้นทางมะพร้าวผล 1 ลูก



ภาพที่ 2.3 เส้นทางมะพร้าวผล 1 ลูก

ที่มา: <http://www.kmutt.ac.th/titec/gtz/coconut-detail-upload5.html>

ประเทศไทยมีการแปรรูปผลิตภัณฑ์จากมะพร้าวเป็นจำนวนมาก ดังนั้นจึงมีน้ำมะพร้าวซึ่งจัดว่าเป็นผลพลอยได้จำนวนมากเช่นกัน จากรายงานทางวิชาการที่ผ่านมาจะพบว่าประเทศไทยมีการเพิ่มมูลค่าของน้ำมะพร้าวโดยด้วยการหมักโดยกิจกรรมของแบคทีเรียกรดน้ำส้ม (Acetic acid bacteria) ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ วุ้นมะพร้าว หรือที่รู้จักกันในชื่อ nata de coco (ปราโมทย์และคณะ, 2538) สำหรับในต่างประเทศจะมีการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์และน้ำส้มสายชูจากน้ำมะพร้าว (Law et al., 2011) การใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งสารอาหารในการเพาะเลี้ยงเซลล์จุลินทรีย์ (Kurniasari et al., 2011; Kuswardani et al., 2011) อีกทั้งมีการใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งคาร์บอนราคาถูกเพื่อใช้ในการผลิตสารให้ความหนืดพวกโพลีแซคคาไรด์ (Shivakumar et al., 2006; Kuntiya et al., 2010; Seesuriyachan et al., 2011) ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร

กากมันสำปะหลังประกอบไปด้วยสารอาหารในปริมาณต่ำ และจากรายงานการวิจัยที่กล่าวว่า น้ำมะพร้าวประกอบไปด้วยน้ำตาลหลายชนิด รวมถึงสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (Shivakumar and Vijayendra, 2006) (ตารางที่ 2.1) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำมะพร้าวมาใช้เป็นแหล่งสารอาหารเสริมจำพวกวิตามินและแร่ธาตุให้แก่ยีสต์ในการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มแนวทางในการใช้ประโยชน์น้ำมะพร้าวซึ่งจัดว่าเป็นการเพิ่มมูลค่าให้แก่ตัวน้ำมะพร้าวเอง นอกจากนี้ยังเป็นการลดค่าใช้จ่ายในการบำบัดน้ำทิ้งที่เกิดจากน้ำมะพร้าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมะพร้าว

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมะพร้าว	ปริมาณ
Proximates	(g/100g)
Water	94.45
Dry	5.55
Energy value	
Protein	0.52
Total lipid (fat)	0.15
Ash	0.47
Carbohydrate	4.41
Fiber, total dietary	ND*
Sugars	(g/100g)
Total	3.42
Sucrose	0.51
Glucose	1.48
Fructose	1.43
Inorganic ions	(mg/100g)
Calcium, Ca	31.64
Iron, Fe	0.02
Magnesium, Mg	9.44
Phosphorus, P	12.77
Potassium, K	257.52
Sodium, Na	16.10
Zinc, Zn	0.02
Copper, Cu	0.03
Manganese, Mn	0.08
Selenium, Se	
Chlorine, Cl	
Sulfur, S	
Aluminium, Al	0.06
Boron, B	0.08
Vitamins	(mg /100 dm³)
Vitamin C, total ascorbic acid	7.08
Thiamin (B1)	0.01
Riboflavin (B2)	0.01
Niacin (B3)	ND*
Pantothenic acid (B5)	
Pyridoxine (B6)	ND*
Folate, total	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมันพรว้าว	ปริมาณ
Vitamins (ต่อ)	
Folic acid	
Folate, food	
Folate, Dietary Folate Equivalent (DFE)	
Biotin	
Nicotinic acid (Niacin)	
Lipid	(g/100g)
Total	0.1482
Fatty acids, total saturated	0.1
6:00	
8:00	ND*
10:00	0.0028
12:00	0.0274
14:00	0.019
16:00	0.032
17:00	0.0016
18:00	0.0108
20:00	0.0033
Fatty acids, total monounsaturated	0.02
16:1 undifferentiated	0.0007
18:1 undifferentiated	0.015
20:1 undifferentiated	0.0019
22:1 undifferentiated	0.0023
Fatty acids, total polyunsaturated	0.0054
18:2 n-6undifferentiated	0.0032
20:4 n-6	0.0022
Amino acids	(mg/g defatted sample)
Alanine	3.88
β -Alanine	
γ -Aminobutyric acid	
Arginine	0.81
Asparagine and glutamine	
Aspartic acid	0.76
Asparagine	
Cystine	0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

องค์ประกอบทางเคมีของน้ำมะพร้าว	ปริมาณ
Amino acids (ต่อ)	(mg/g defatted sample)
Glutamic acid	3.75
Glutamine	
Glycine	0.11
Homoserine	
Histidine	0.67
Isoleucine	0.27
Leucine	0.58
Lysine	3.41
Methionine	0.21
Ornithine	
Phenylalanine	0.00
Pipecolic acid	
Proline	0.95
Serine	1.06
Tyrosine	0.00
Tryptophan	0.00
Threonine	0.33
Valine	0.82
Dihydroxyphenylalanine	
Hydroxyproline	
Pipecolic acid	
Organic acid	(mg /100 DM)
Tartaric	2.4
Malic	307
Citric	24.8
Acetic	1.3
Pyridoline	
Succinic	
Shikimic and quinic acids, etc.	
Chemical properties	
pH	5.2±0.1

ที่มา: Santoso *et al.* (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัตถุดิบและเชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 กากมันสำปะหลัง

กากมันสำปะหลังสดจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง แบ่งใส่ถุง ถุงละ 500 กรัม ปริมาณรวม 30 กิโลกรัม นำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ความชื้น ตามวิธีของ Agu และคณะ (1997)

3.1.2 น้ำมะพร้าวและการเก็บรักษา

น้ำมะพร้าวที่ได้จากมะพร้าวแก่ที่ใช้คั้นกะทิ ซึ่งถือเป็นผลพลอยได้จากการผลิตกะทิ กรองผ่านผ้าขาวบาง ปรับพีเอชเป็น 4.0 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) แบ่งใส่ขวดพลาสติกขวดละ 500 มิลลิลิตร ปริมาณรวม 30 ลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.1.3 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 เก็บรักษาบนอาหารยูนเอยิง YPD (1% bacto yeast extract, 2% bacto peptone, 2% glucose, 2% agar) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และมีการต่อเชื้อใหม่ทุก 1 เดือน เชื้อจุลินทรีย์อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในรูปสารแขวนลอยเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอล 30% ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.2 การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง

การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางตามวิธีของ กิตทามาต และคณะ (2010) และ Khosravi-Darani และ Zoghi (2008) โดยชั่งกากมันสำปะหลังอบแห้ง 80 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1000 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N ปริมาตร 800 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 132 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง ปรับค่าพีเอชให้เป็นกลางด้วย $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (Akaracharanya *et al.*, 2011) จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกเพื่อกำจัดของแข็ง เก็บส่วนใสที่ได้ไว้วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959) และน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol sulfuric acid (Dubois *et al.*, 1956)

3.3 การเตรียมเชื้อยีสต์เริ่มต้น

เชื้อเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 1 ลูก ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อทั้งหมดลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร YPD ปริมาณ 90 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมงแล้วไปเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5000 รอบต่อ นาที เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสเก็บไว้ ทำการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์เข้มข้นโดยเติมส่วนใสกลับลงไปให้แก่เชื้อยีสต์ด้วยอัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อส่วนใส 1:1 โดยน้ำหนัก ตรวจสอบปริมาณเชื้อและเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต (Smart *et al.*, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3.4 การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในด้านความทนต่อแรงดันออสโมติก อุณหภูมิ และเอทานอล

3.4.1 ความสามารถในการทนต่อแรงดันออสโมติก

นำกล้าเชื้อยีสต์ตามข้อ 3.3 มาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค spot plate บนอาหารยูน YPD ที่มีการผันแปรความเข้มข้นน้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol) ที่ 0, 5, 10, 15, 20, 25, และ 30 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามผลการทดลองโดยการบันทึกภาพทุก 24 ชั่วโมง จนกระทั่งไม่มีการเพิ่มจำนวนของโคโลนี ประเมินผลการทดลองจากจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นในระดับความเข้มข้นของน้ำตาลซอร์บิทอลที่ระดับต่างๆ

3.4.2 ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ

เตรียมเชื้อยีสต์ตามข้อ 3.3 นำมาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค spot plate บนอาหารยูน YPD อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม คือ 30, 35, 40, และ 45 องศาเซลเซียส ติดตามผลการทดลองด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 3.4.1

3.4.3 ความสามารถในการทนต่อเอทานอล

เตรียมเชื้อยีสต์ตามข้อ 3.3 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค spot plate บนอาหารยูน YPD ที่มีการผันแปรความเข้มข้นของเอทานอลที่ระดับ 0, 5, 10, 15, 20, และ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามผลการทดลองด้วยวิธีการเดียวกับข้อ 3.4.1

3.5 การใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นสับสเทรต

ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางทดแทนกลูโคสโดยใช้อาหารเหลว YPD เปรียบเทียบการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอลในอาหารเหลว โดยเตรียมอาหารเหลว YPD และอาหารเหลว YPD ที่มีการใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง โดยอาหารทั้ง 2 สูตร มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์ 20 กรัม/ลิตร พีเอช 5.5 แบ่งอาหารที่เตรียมได้ 100 มิลลิลิตร ใส่พลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น เติมกล้าเชื้อที่เตรียมตามข้อ 3.3 ให้ได้ความเข้มข้นเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารทั้ง 2 สูตร ดำเนินการหมักโดยเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง จนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก โดยตัวอย่างที่เก็บได้ไปวัดการเจริญโดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และอัตราการรอดชีวิต (Smart *et al.*, 1999) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และการใช้น้ำตาลกลูโคสโดยวิธี DNS (Miller, 1959) จากผลการทดลองในขั้นนี้จะสามารถทราบถึงความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังในการผลิตเอทานอล

3.6 การใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งสารอาหารในการหมักเอทานอล

การทดลองในหัวข้อนี้ใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งอาหารเสริม ดังตารางที่ 3.1 เปรียบเทียบกับสูตรอาหารควบคุมซึ่งรายงานไว้โดย กัลยา และคณะ (2548) เตรียมอาหารทั้ง 6 สูตรตามตารางที่ 3.1 ปรับค่าพีเอชเป็น 5.5 ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวิซ์ในอาหารทุกสูตรให้เท่ากันโดยใช้กลูโคส เตรียมอาหาร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นถ่ายเชื้อยีสต์ที่เตรียมตามข้อ 3.3 ลงในอาหารที่เตรียมไว้โดยให้ได้ความเข้มข้นเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักตามสภาวะโดยเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง จนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก โดยตัวอย่างที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่วางไว้เพื่อใช้ในการศึกษาวิจัยและการศึกษาวิจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เก็บได้นำไปนับจำนวนเซลล์ อัตราการรอดชีวิต ความเข้มข้นของกลูโคส ค่าพีเอช และความเข้มข้นของเอทานอล จากผลการทดลองในขั้นนี้จะสามารถทราบความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งสารอาหารเสริมในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

ตารางที่ 3.1 องค์ประกอบของอาหารสำหรับศึกษาการใช้ น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งสารอาหารเสริมในการหมักเอทานอล

Composition	Control	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l
Yeast extract	1 g/l	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	0.5 g/l	0.5 g/l	0.5 g/l	0.5 g/l	0.5 g/l	0.5 g/l
MgSO ₄ .7H ₂ O	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Coconut juice	-	-	50 ml/l	100 ml/l	150 ml/l	200 ml/l
References	กัลยา และ คณะ (2548)	This research	This research	This research	This research	This research

3.7 การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการหมักเอทานอล

เตรียมอาหารที่มีการเติมน้ำมะพร้าวที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากการทดลองในหัวข้อที่ 3.6 โดยแปรผันค่าความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในรูป (NH₄)₂SO₄ โดยกำหนดความเข้มข้นที่จะศึกษาเป็น 4 ระดับ คือ 0, 1, 3, และ 5 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชของอาหารเป็น 5.5 เตรียมอาหาร 100 มิลลิลิตร ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น ถ่ายเชื้อยีสต์ที่เตรียมตามข้อ 3.3 ลงในอาหารที่เตรียมไว้โดยให้ได้ความเข้มข้นเชื้อสุดท้ายเท่ากับ 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักตามสภาวะโดยเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง จนกว่าจะสิ้นสุดการหมัก โดยตัวอย่างที่เก็บได้นำไปนับจำนวนเซลล์ อัตราการรอดชีวิต ความเข้มข้นของกลูโคส และความเข้มข้นของเอทานอล จากผลการทดลองในขั้นนี้จะสามารถทราบความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในรูป (NH₄)₂SO₄ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

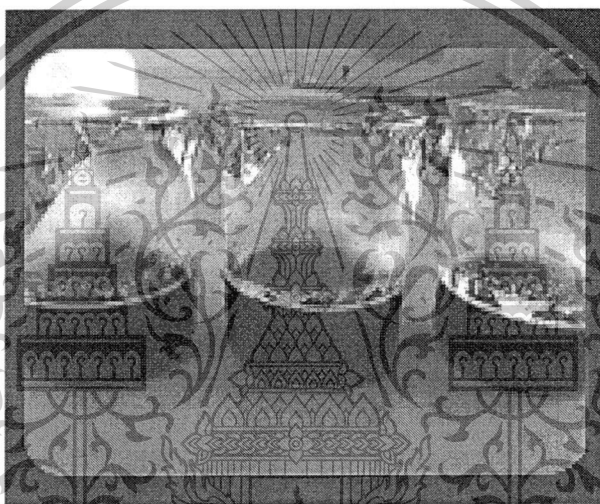
This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง

การเตรียมวัตถุดิบจำพวกผลพลอยได้จากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง (กาก เปลือก และลำ ตัน) สามารถเตรียมได้โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน ในการทดลองนี้ ดำเนินการโดยย่อยกากมันสำปะหลังแห้ง 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ในหม้อนิ่งความดันไอที่อุณหภูมิ 132 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.1) จากผลการทดลองพบว่าได้ความเข้มข้นของน้ำตาลในรูปน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 4.89 เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนักต่อปริมาตร และเมื่อวิเคราะห์ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐานให้ค่าความเข้มข้นใน รูปน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 4.08 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร



ภาพที่ 4.1 การเตรียมกากมันสำปะหลังเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลโดยย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง ร่วมกับการใช้ความร้อน

4.2 ผลข้อมูลเบื้องต้นของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในด้านความทนต่อแรงดันออสโมติก อุณหภูมิ และเอทานอล

4.2.1 ความสามารถในการทนต่อแรงดันออสโมติก

ความเครียดที่เกิดจากแรงดันออสโมติกจัดเป็นความเครียดที่ยืดได้เผชิญเป็นอันดับแรก ในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอล อันเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหาร เลี้ยงเชื้อที่มีระดับต่ำในการเตรียมกล้าเชื้อ สู่อาหารที่ใช้ในการหมักซึ่งมีความเข้มข้นน้ำตาลสูง อย่างไรก็ตาม การผลิตเอทานอลจากแหล่งที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงมาก (very high gravity) มีข้อดีคือ ได้ ผลผลิตเอทานอลในปริมาณสูง เป็นการประหยัดน้ำในระบบ และพลังงานในการกลั่นเอทานอล ดังนั้น การศึกษาในหัวข้อนี้จึงศึกษาถึงความเข้มข้นของน้ำตาลสูงที่สุดในรูปซอร์บิทอลที่เชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ยังคงสามารถเจริญได้ โดยนำเชื้อยีสต์มาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค spot plate บนอาหารยูน YPD ที่มีการผัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ อนุญาตให้นำไปใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้เชิงพาณิชย์หรือการค้า

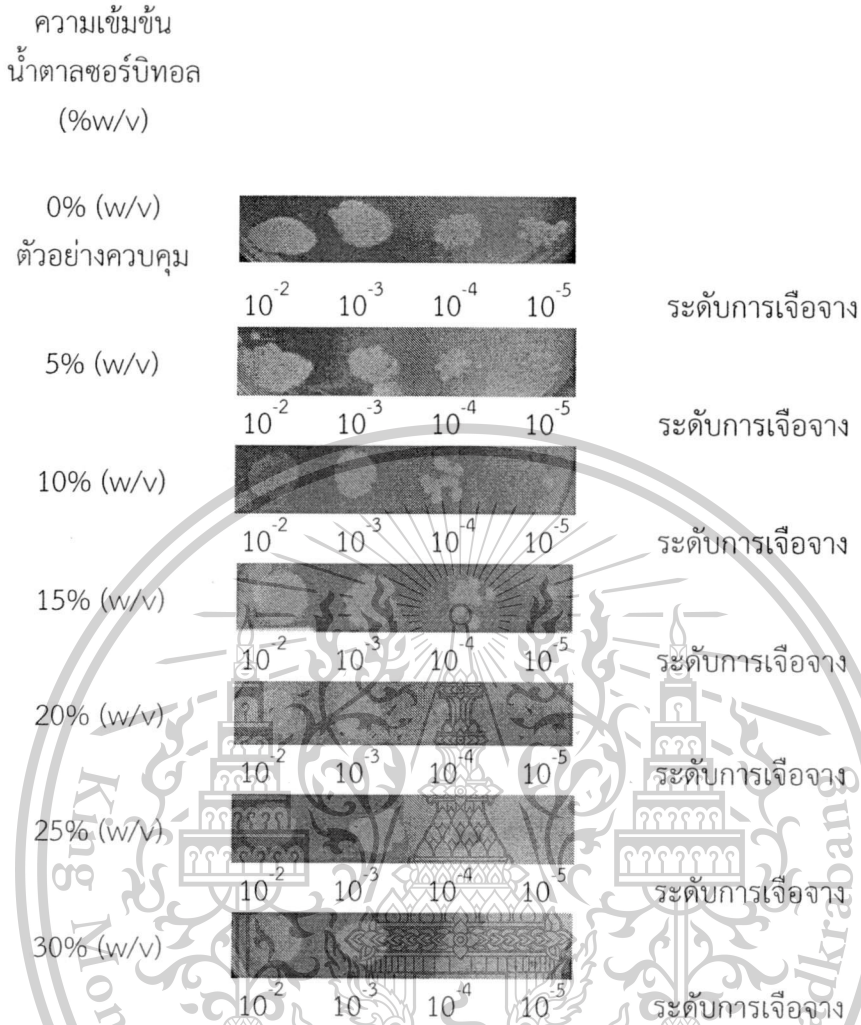
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

โดยนำหนักต่อปริมาตรนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามผลการทดลองโดยการบันทึกภาพ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 ผลของแรงดันออสโมติกที่เหนี่ยวนำโดยใช้น้ำตาลซอร์บิทอลต่อการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่เลี้ยงบนอาหาร YPD และบ่มที่อุณหภูมิ 30°C ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ เป็นเวลา 2 วัน

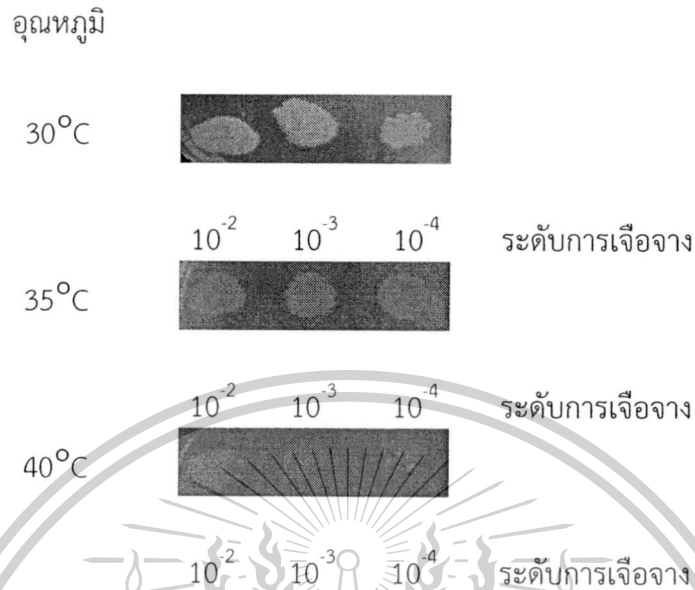
จากการทดลองพบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซอร์บิทอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่งผลให้เชื้อมีการเจริญน้อยลงอันเนื่องมาจากมีแรงดันออสโมติกภายนอกซึ่งที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม *S. cerevisiae* SC90 สามารถเจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีการเติมซอร์บิทอลที่ระดับความเข้มข้นสูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

4.2.2 ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ

ในระหว่างกระบวนการผลิตเอทานอลนั้น เชื้อจะมีการคายความร้อนออกสู่ระบบ ส่งผลให้ความร้อนในระบบสูงขึ้น ซึ่งความร้อนนี้จะส่งผลต่อการเจริญ และการสร้างผลผลิตเอทานอลของเชื้อ อีกทั้งประเทศไทยเป็นประเทศภูมิอากาศแบบร้อนชื้น ดังนั้น ในการผลิตเอทานอลจึงต้องอาศัยระบบหล่อเย็น การทดลองในหัวข้อนี้จึงศึกษาถึงความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิของยีสต์ โดยนำเชื้อยีสต์มา

ไม่ว่าการณ์ใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค spot plate บนอาหารวุ้น YPD (สูตรมาตรฐาน) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, และ 40 องศาเซลเซียส ติดตามผลการทดลองโดยการบันทึกภาพ ดังแสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่เลี้ยงบนอาหาร YPD ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ เป็นเวลา 2 วัน

จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อยีสต์ยังคงมีการเจริญที่ดีในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม เมื่อเพิ่มอุณหภูมิสูงถึง 40 องศาเซลเซียส เชื้อจะมีการเจริญลดลงเล็กน้อย ซึ่งอาจจะกล่าวได้ว่าการใช้เชื้อนี้ในการผลิตเอทานอลจะช่วยลดค่าใช้จ่ายของระบบหล่อเย็นลงได้ ซึ่งเป็นการลดต้นทุนโดยรวมในกระบวนการผลิตเอทานอล

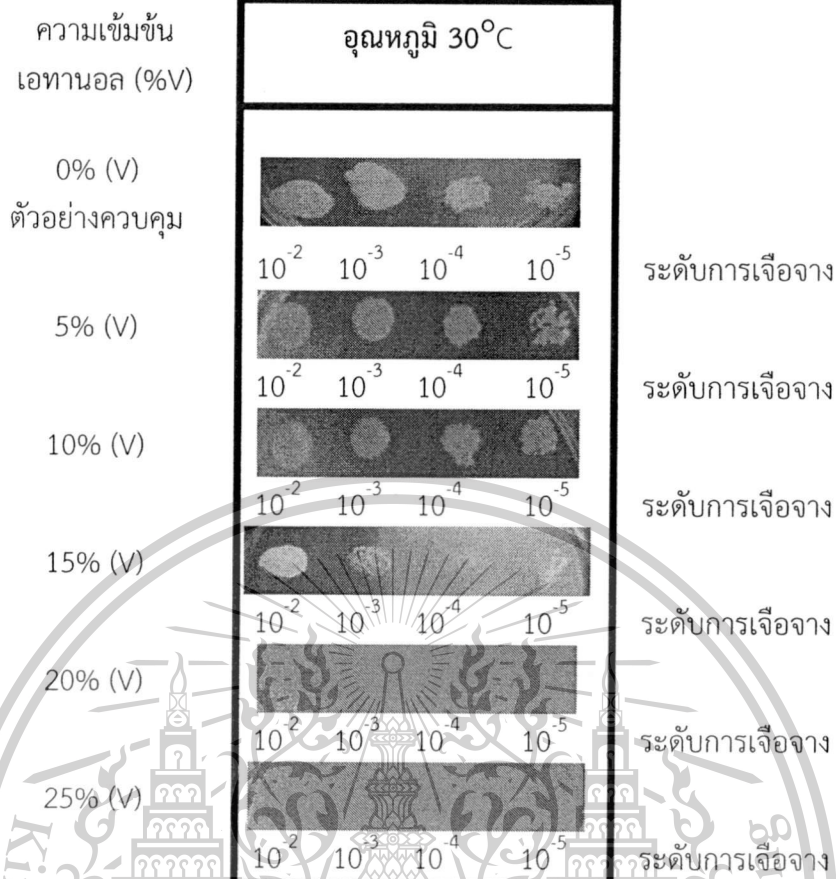
4.2.3 ความสามารถในการทนต่อเอทานอล

คุณสมบัติของเชื้อยีสต์ประการหนึ่งที่สำคัญในการผลิตเอทานอล คือ ความสามารถในการทนต่อเอทานอล เนื่องจากเอทานอลมีความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษาในหัวข้อนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อให้ทราบถึงความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 สามารถทนได้ ทำการทดลองโดยนำเชื้อยีสต์มาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค spot plate บนอาหารวุ้น YPD ที่มีการผันแปรความเข้มข้นของเอทานอลที่ระดับ 0, 5, 10, 15, 20, และ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ติดตามผลการทดลองโดยการบันทึกภาพ ดังแสดงในภาพที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาพที่ 4.4 ผลของเอทานอลต่อการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่เลี้ยงบนอาหาร YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30°C ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเป็นเวลา 2 วัน

จากการทดลองพบว่า ปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้การเจริญของเชื้อต่ำลง โดยความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ยีสต์นี้สามารถทนได้ คือ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร อย่างไรก็ตาม ที่ระดับ 20 และ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เชื้ออาจต้องใช้ระยะเวลาในการฟื้นตัวมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นเอทานอลต่ำกว่า จากการทดลองในหัวข้อนี้ มีความสอดคล้องกับผลการทดลองในหัวข้อ 4.2.1 ซึ่งพบว่ายีสต์สามารถทนต่อน้ำตาลที่ความเข้มข้น 30 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งเมื่อคำนวณจากผลได้ตามทฤษฎีของเอทานอลจากกลูโคสแล้ว จะได้เอทานอลประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

4.2.4 อิทธิพลของปัจจัยร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อยีสต์

ในระหว่างกระบวนการผลิตเอทานอล นอกจากความเครียดจากแรงดันออสโมติกแล้วยังพบว่ายีสต์จะต้องเผชิญความเครียดอื่นเนื่องจากอุณหภูมิ และเอทานอลที่เพิ่มสูงขึ้น และมีการรายงานทั้งสองปัจจัยนี้จะส่งผลร่วมกันได้ต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ ดังนั้น การทดลองในหัวข้อนี้จึงศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยร่วมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ โดยนำเชื้อยีสต์มาเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค spot plate บนอาหารแข็ง YPD ที่มีการผันแปรความเอทานอล 0, 5, 10, 15, 20, เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

และ 25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, และ 40 องศาเซลเซียส ติดตามผลการทดลองโดยการบันทึกภาพ ดังแสดงในภาพที่ 4.5

ความเข้มข้นเอทานอล (%V)	อุณหภูมิ 30°C	อุณหภูมิ 35°C	อุณหภูมิ 40°C	
0% (V)				
ตัวอย่างควบคุม	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	ระดับการเจริญ
5% (V)				
	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	ระดับการเจริญ
10% (V)				
	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	ระดับการเจริญ
15% (V)				
	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	ระดับการเจริญ
20% (V)				
	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	ระดับการเจริญ
25% (V)				
	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	10 ⁻² 10 ⁻³ 10 ⁻⁴ 10 ⁻⁵	ระดับการเจริญ

ภาพที่ 4.5 ผลของเอทานอลและอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่เลี้ยงบนอาหาร YPD ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ เป็นเวลา 2 วัน

จากการทดลองพบว่า ปัจจัยรวมระหว่างความเข้มข้นของเอทานอลและอุณหภูมิมีผลอย่างยิ่งต่อการเจริญของยีสต์ โดยที่ความเข้มข้นของเอทานอลในระดับเดียวกัน การเพิ่มอุณหภูมิในการบ่มจะไปชะลอการเจริญของเชื้ออย่างเห็นได้ชัด (เอทานอล 15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ที่ 30, 35, และ 40 องศาเซลเซียส) จากการทดลองนี้ อาจกล่าวได้ว่าระหว่างการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงควรที่จะควบคุมอุณหภูมิระหว่างการผลิตไม่ให้สูงกว่า 40 องศาเซลเซียส โดยจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า ระดับอุณหภูมิดังกล่าว อาจทำให้การเจริญของเชื้อหยุดชะงัก และส่งผลต่อผลได้ของเอทานอลที่เกิดขึ้น

4.3 การใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเป็นสับสเตรต

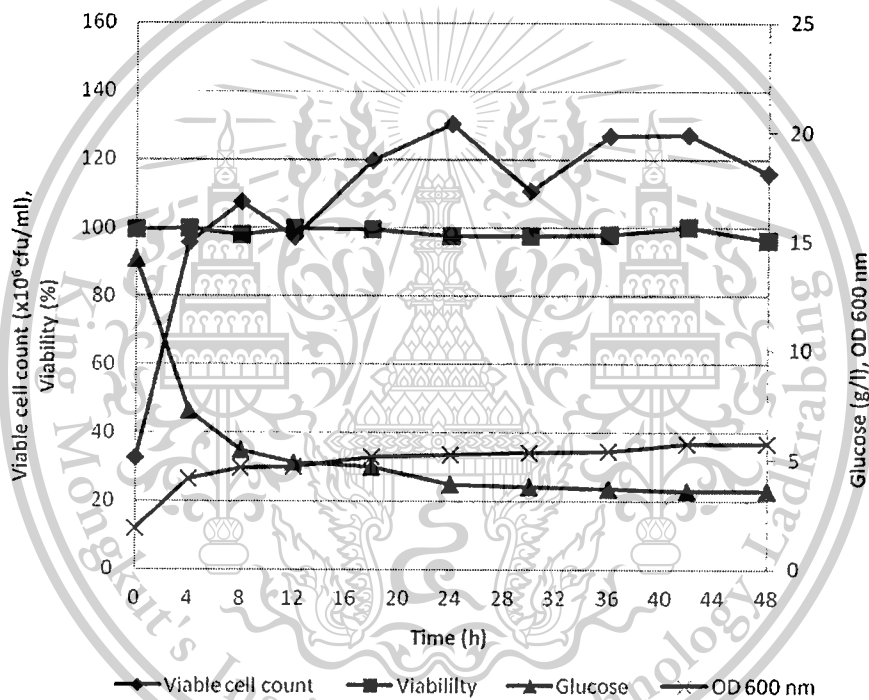
การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางทดแทนกลูโคส โดยเตรียมอาหารเหลว YPD สูตรมาตรฐาน ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 2% (w/v) และเอ็กสารอาหารเหลว YPD ที่มีกัวร์ไซน์น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางโดยอาหารทั้ง 2 ด้านการค้ำไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

สูตร มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีตีวซีในรูปน้ำตาลกลูโคส 2% (w/v) พีเอช 5.5 เปรียบเทียบการเจริญเติบโต และการนำน้ำตาลไปใช้ ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 4.6 และ 4.7

จากผลการทดลองที่ได้แสดงในภาพที่ 4.6 และ 4.7 กล่าวได้ว่า *S. cerevisiae* SC90 สามารถใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อการเจริญเติบโตได้ อย่างไรก็ตาม อัตราการนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังไปใช้ และอัตราการเจริญของเซลล์ (ภาพที่ 6) นั้นมีค่าต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร YPD สูตรมาตรฐาน (ภาพที่ 7) เนื่องจากระหว่างการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางร่วมกับการใช้ความร้อนนั้น มีรายงานว่า จะเกิดสารยับยั้งซึ่งส่งผลกระทบต่อสมรรถภาพการนำน้ำตาลไปใช้ รวมถึงการเจริญของเชื้อยีสต์ ดังจะเห็นว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร YPD สูตรมาตรฐานนั้นจะได้รับความเข้มข้นเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดที่ 1.37×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขณะที่การเลี้ยงเซลล์ในอาหาร YPD ที่มีการเติมน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังนั้น ให้ความเข้มข้นเซลล์ต่ำกว่า คือ 1.16×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

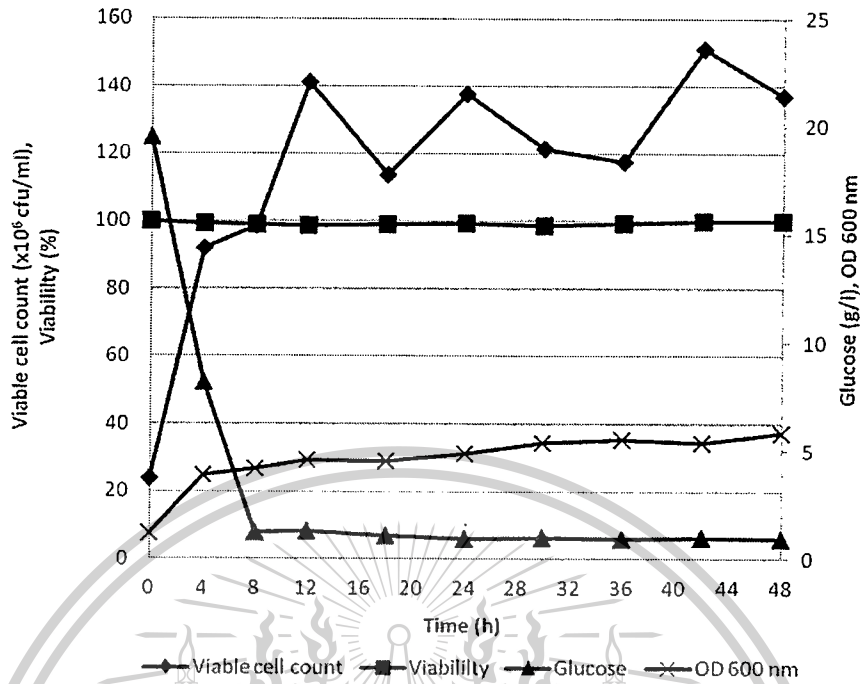


ภาพที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่เติมน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD สูตรมาตรฐาน

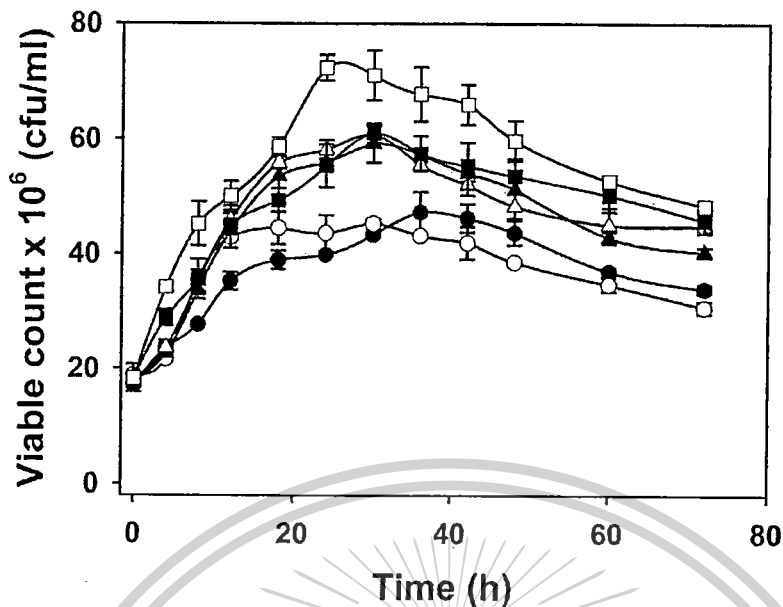
4.4 การใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งสารอาหารในการหมักเอทานอล

การทดลองในหัวข้อนี้ได้ศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวต่อการเจริญของเซลล์ โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังและมีการเติมน้ำมะพร้าวในปริมาณ 0-200 มิลลิลิตรต่อลิตร ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.8 พบว่าการเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารสูตรควบคุมที่มีการเติมยีสต์สกัด และในอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งไม่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว ต่ำกว่าอาหารสูตรอื่นที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว ทั้งนี้พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญได้เร็วที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณความเข้มข้นอื่น โดยมีค่าเท่ากับ $7.47 \pm 0.26 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 4.8) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากน้ำมะพร้าวที่ความเข้มข้นดังกล่าว ช่วยเพิ่มปริมาณสารอาหาร และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มากขึ้น (Santoso *et al.*, 1996) โดยการทดลองนี้ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ อโนทัย (2519) ซึ่งศึกษาการเจริญของยีสต์อาหารสัตว์ 3 สายพันธุ์ ในอาหารที่ใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ ผู้วิจัยพบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญในน้ำมะพร้าวซึ่งไม่ได้เติมสารใด ๆ ได้ดีเท่ากับอาหารเหลว Malt-Yeast extract (YM) ซึ่งอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย มอลท์สกัด (malt extract) 3.0 กรัม ยีสต์สกัด 0.1 กรัม เปปโทน 5.0 กรัม และกลูโคส 10.0 กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



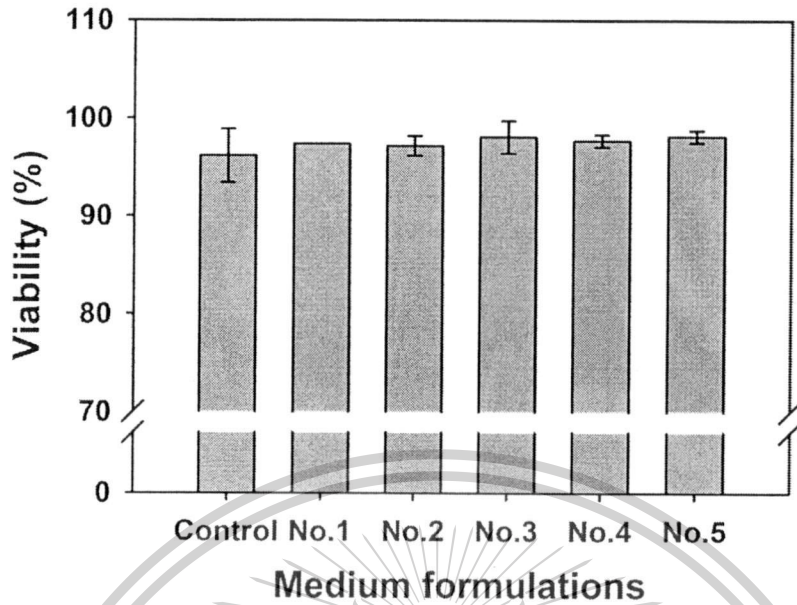
ภาพที่ 4.8 จำนวนเซลล์ *S. cerevisiae* SC90 ที่มีชีวิตในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยยีสต์สกัด 1 g/L (ตัวอย่างควบคุม; ●), น้ำมะพร้าว 0 mL (○), 50 mL (▲), 100 mL (△), 150 mL (■), และ 200 mL (□)

เมื่อพิจารณาถึงผลของการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวต่อการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ (ภาพที่ 4.9) พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมน้ำมะพร้าวให้ผลไม่แตกต่างจากอาหารควบคุมโดยมีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในช่วง 96.11 ± 2.77 ถึง 98.13 ± 0.64 อย่างไรก็ตาม จากโครงการวิจัยอื่นของกลุ่มวิจัยนี้ ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YPD ที่ไม่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง พบว่าที่ 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงให้ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตสูงถึง 99.79 ± 0.30 ซึ่งการที่ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางต่ำกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง ทั้งนี้อาจอธิบายได้โดยอาศัยงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดรวมทั้งการระเบิดเยื่อด้วยไอน้ำจะก่อให้เกิดสารยับยั้ง เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural) และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอร์ฟูรัล (5-hydroxyl methyl furfural; HMF) โดยสารยับยั้งที่เกิดขึ้นดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีสต์ (Chandel *et al*, 2011) นอกจากนี้เอทานอลที่ยีสต์ผลิตขึ้นยังเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีผลต่อการแบ่งเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ โปรตีน ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ ยับยั้งการหมักโดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป เหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวของไขมัน ยับยั้งการขนถ่ายเอนไซม์อาหารเข้าสู่เซลล์ เพิ่มความเป็นพิษของออกซิเจน และอาจมีผลต่อเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) และเฮกโซไคเนส (hexokinase) (สาวิตรี, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาพที่ 4.9 เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของ *S. cerevisiae* SC90 ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยยีสต์สกัด 1g/L (ตัวอย่างควบคุม), น้ำมะพร้าว 0 ml/L (No.1), 50 ml/L (No.2), 100 ml/L (No.3), 150 ml/L (No.4), และ 200 ml/L (No.5)

จากผลการศึกษาสรุปได้ว่า น้ำมะพร้าวความเข้มข้น 200 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถทดแทนยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร (ตัวอย่างควบคุม) เพื่อเป็นแหล่งสารอาหารเสริมในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล โดยพิจารณาจากการให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่สูงกว่าสภาวะอื่น ทั้งนี้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงคาดว่าจะส่งเสริมการผลิตเอทานอลได้มากขึ้น

ตารางที่ 4.1 แสดงประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลของเชื้อ SC90 ซึ่งพบว่าการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวช่วยส่งเสริมให้เชื้อยีสต์มีประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลได้ดีขึ้น โดยพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่และอัตราการใช้น้ำตาลในรูปของน้ำตาลกลูโคส โดยจะเห็นว่าการเสริมสารอาหารด้วยการเติมน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร จะมีน้ำตาลเหลือน้อยที่สุด และมีอัตราการใช้น้ำตาลสูงที่สุด โดยเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารอื่น ๆ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (เมื่อ $p < 0.05$) พบว่าอาหารที่ทำให้เชื้อยีสต์มีประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลสูงที่สุด คือ อาหารที่มีการเติมน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.1 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลของเชื้อ SC90 ที่มีการเติมน้ำมะพร้าวที่ความเข้มข้นต่างๆ

Mediums	Attenuation Time (h)	Residue sugar (g/l)	Rate of sugar utilization (g/L.h)
Control	48	17.36±1.60 ^c	0.54±0.03 ^a
No. 1	48	13.19±1.03 ^b	0.74±0.03 ^b
No. 2	42	12.87±0.11 ^b	0.90±0.04 ^c
No. 3	30	12.52±0.25 ^b	0.88±0.03 ^c
No. 4	30	13.29±1.35 ^b	0.90±0.04 ^c
No. 5	30	10.49±1.29 ^a	1.28±0.05 ^d

Mean values in the each column with different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$). All values are expressed as means±standard deviation ($n=3$).

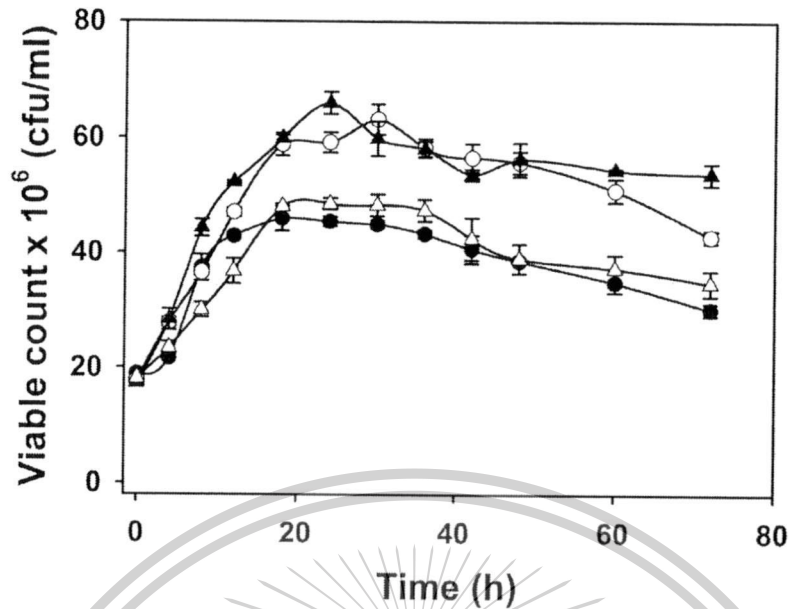
4.5 ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

ในหัวข้อนี้ศึกษาความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล จากผลการศึกษาในหัวข้อที่ 4.4 พบว่าความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ คือ 200 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งเชื้อที่มีการเจริญได้ดี ควรจะผลิตเอทานอลได้สูง ดังนั้น จึงนำความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวดังกล่าวมาศึกษาต่อเพื่อหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตเอทานอล โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่เสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณ 1, 3, และ 5 กรัมต่อลิตร การเจริญของเซลล์ในรูปเซลล์ที่มีชีวิตแสดงดังภาพที่ 4.10 พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต 1-3 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญได้รวดเร็วและให้ความหนาแน่นสูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมงของการหมัก โดยมีค่าประมาณ $6.26 \pm 1.84 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 5 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ความหนาแน่นของเซลล์ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองจากการใช้อาหารควบคุม อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาร้อยละของการรอดชีวิต (ภาพที่ 4.11) ที่ 36 ชั่วโมงของการหมัก พบว่าที่ทุกระดับของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำการทดสอบให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากอาหารควบคุมโดยมีค่าร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ในช่วง 96.96 ± 0.92 ถึง 98.03 ± 1.62

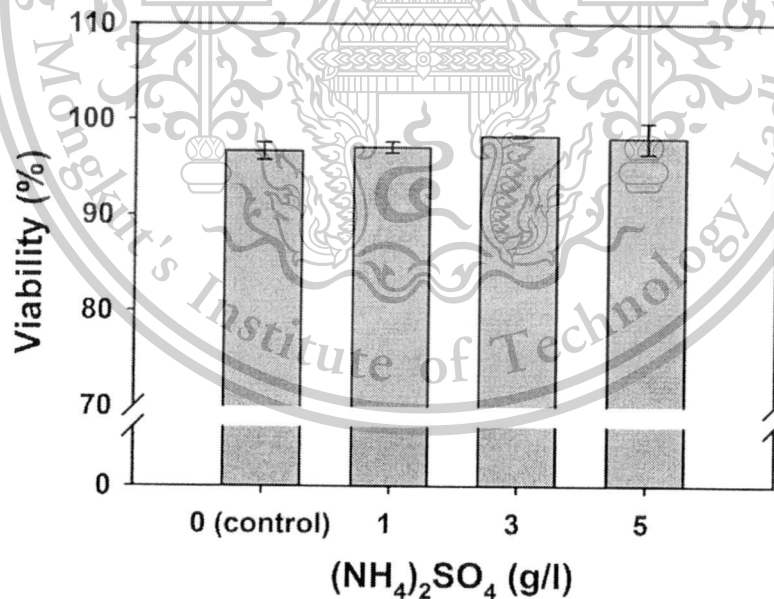
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาพที่ 4.10 ผลของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 0 g/L (●), 1 g/L (○), 3 g/L (▲), and 5 g/L (△) ต่อจำนวนเซลล์ *S. cerevisiae* SC90 ที่มีชีวิต ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 mL



ภาพที่ 4.11 ผลของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้น 0 g/L (●), 1 g/L (○), 3 g/L (▲), and 5 g/L (△) ต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของ *S. cerevisiae* SC90 ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการ

ย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 mL เมื่อการหมักผ่านไป 36 ชั่วโมง

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ตารางที่ 4.2 แสดงผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อค่าพารามิเตอร์ในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้ของเอทานอลจากสับสเทรต อัตราการผลิตเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการหมัก ที่ได้จากอาหารที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทุกระดับความเข้มข้น มีค่าสูงกว่าอาหารควบคุม โดยที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 3 กรัมต่อลิตร ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 11.59 ± 0.49 กรัมต่อลิตร 0.38 ± 0.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมสับสเทรต 0.32 ± 0.01 กรัมต่อลิตร. ชั่วโมง และ ร้อยละ 74.66 ± 1.38 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 ค่าพารามิเตอร์ของเชื้อ SC90 ภายใต้การเสริมสาร $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (g/l)	Attenuation time (h)	Ethanol concentration (g/l)	Ethanol yield ($Y_{P/S}$, g/g)	Volumetric productivity (g/L.h)	Fermentation efficiency (%)
0 (control)	36	10.27 ± 0.14^a	0.32 ± 0.01^a	0.29 ± 0.01^a	62.43 ± 2.05^a
1	36	11.64 ± 0.59^b	0.35 ± 0.02^b	0.32 ± 0.02^b	69.04 ± 3.74^b
3	36	11.59 ± 0.49^b	0.38 ± 0.01^b	0.32 ± 0.01^b	74.66 ± 1.38^b
5	36	10.93 ± 0.59^b	0.37 ± 0.02^b	0.30 ± 0.02^b	72.76 ± 4.52^b

Mean values in the each column with different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$). All values are expressed as means \pm standard deviation ($n=3$).

การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 1 เป็น 3 กรัมต่อลิตร มีผลให้ค่าผลได้ผลผลิตเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการหมักสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตจนถึง 5 กรัมต่อลิตร มีผลให้ค่าพารามิเตอร์ทั้งสามต่ำลง ดังนั้น จากการทดลองนี้จึงกล่าวได้ว่า ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร อยู่ในช่วง 1-3 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่ากากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอล ในขณะที่น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมที่ช่วยในการเจริญของยีสต์ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางร่วมกับการระเบิดเยื่อด้วยไอน้ำยังคงมีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น จึงควรหาแนวทางในการปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบเริ่มต้นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ได้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูงขึ้น อีกทั้งในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางร่วมกับการระเบิดเยื่อด้วยไอน้ำมีการรายงานว่าก่อให้เกิดสารยับยั้ง ได้แก่ เพอร์ฟูรัล และไฮดรอกซี เมทิล เพอร์ฟูรัล ซึ่งสารยับยั้งดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อ การเจริญของยีสต์ และการผลิตเอทานอล ดังนั้น จึงควรหาวิธีการที่เหมาะสมในการลดปริมาณสารยับยั้งก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอล



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทที่ 6

สรุปผลผลิตที่ได้จากงานวิจัย

โครงการวิจัย การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดเจือจางและมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ซึ่งได้รับงบประมาณสนับสนุนจากแหล่งเงินรายได้ คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. สามารถผลิตบทความวิจัยได้จำนวน 2 ชิ้นงาน (ภาคผนวก ก) ประกอบด้วย

- (1) สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา ประพัฒน์ พัวพันวัฒน์ และ ไอรยา สิทธิอำพรพรรณ (2556) การผลิตเอทานอลชีวภาพจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางและมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90. งานประชุมวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ครั้งที่ 2, 30 สิงหาคม 2556, โรงแรมวินเซอร์ สวีท สุขุมวิท, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย.
- (2) Pornpukdeewattana, S., Chalearmkit, P., and 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 (3): 21-37.
- (3) Adaptation of commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis (อยู่ในระหว่างการตีพิมพ์ของวารสาร Suranaree Journal of Science and Technology)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

เอกสารอ้างอิง

- กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2548. การพัฒนาเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อลดต้นทุนการผลิตและปลอดภัยจากผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ทำเนียบผลการวิจัย 13(13): 33-35
- กลุ่มวิจัยเศรษฐกิจการค้าการลงทุน สำนักงานยุทธศาสตร์การพาณิชย์. 2553. มะพร้าว. กลุ่มวิจัยเศรษฐกิจการค้าการลงทุน สำนักงานยุทธศาสตร์การพาณิชย์
- กิตทามาศ ศิริไชย นันทนา สีสุข และสาวิตรี ลิ้มทอง. 2010. การกระทำก่อนการทำตามกระบวนการกับวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสเพื่อผลิตเอทานอล Proceeding in The 36th Congress on Science and Technology of Thailand. October 26-28. Bangkok, Thailand.
- กัลยา อยู่นาน จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร กนก รัตนะกนกชัย. 2548. การผลิตเอทานอลจากสารละลายกากมันที่ย่อยด้วยกรดโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae*. ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 43 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2548. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- จิราภรณ์ โล่ห์วงศ์วัฒนา. 2525. การผลิตกรดซิตริกจากกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- ชลดา ชื่อสัตย์ บงกชรัตน์ ปิตยนต์ ธีรภัทร ศรีนรคุตร และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2547. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 42 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ธนภูมิ มณีบุญ อัญชริดา อัครจรัสญา ธีรภัทร ศรีนรคุตร และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2552. การย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลและการหมักเอทานอลในขั้นตอนเดียวโดยเชื้อผสมระหว่าง *Rhizopus oryzae* และ *Saccharomyces cerevisiae* ในการเพาะเลี้ยงแบบ solid state. ในการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 47 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 17-20 มีนาคม 2552. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- นารีรัตน์ เจริญวัฒนสกุล ยุวเรศ เรืองพานิช สุกัญญา รัตนทับทิมทอง และเสกสม อาตมางกูร. 2552. ผลของการใช้กากมันสำปะหลังในอาหารสุกรเล็ก รุน และขุน ต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพซาก ในการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 47 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 17-20 มีนาคม 2552. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ปราโมทย์ ธรรมรัตน์. 2538. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการพัฒนาผลิตภัณฑ์จากมะพร้าว มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และสิทธิพันธ์ ท่อแก้ว. 2551. การผลิตเอ็นไซม์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีสีอี สำหรับอุตสาหกรรมเอทานอล. รายงานการวิจัย. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี กรุงเทพฯ.
- วริยา โกสุม นารีรัตน์ เจริญวัฒนสกุล ยุวเรศ เรืองพานิช สุกัญญา รัตนทับทิมทอง และเสกสม อาตมางกูร คุณสมบัติทางกายภาพ เคมี และชีวภาพของกากมันสำปะหลัง. ในการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 47 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 17-20 มีนาคม 2552. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2551. เราไม่จ้องน้ำมัน. ฐานบุ๊คส์, กรุงเทพ. 180 หน้า

สาวิตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักพิมพ์ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นจำเป็นต้องใช้ประโยชน์ทางการค้า มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ. 2554. มาตรฐานสินค้าเกษตร มะพร้าว. สำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2551. สถิติการเกษตรของประเทศไทย. สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์
- อโณทัย คมเสวต. 2519. การศึกษาการเจริญของยีสต์โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- อำพัน กันธิยะ. 2552. การใช้ประโยชน์จากของเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร: น้ำมะพร้าวแก่. วารสารปริทรรศน์อุตสาหกรรมเกษตร ปีที่ 1, ฉบับที่ 1, หน้า 3
- Agu, R.C., Amadife, A.E., Ude, C.M., Onyia, A., Ogu, E.O., Okafor, M. and Ezejiofor, E. 1997. Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (cgw) biomass for ethanol production. *Waste Management*, 17, 1: 91-96.
- Akaracharanya, A., Kesornsit, J., Leepipatpiboon, N. Srinorakutara, T. Kitpreechavanich, V. and Tolieng, V. 2011. Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 61:431-436.
- Alfenore, S. Molina-Jouve, C., Guillouet S. E., Uribe Larrea J.L., Goma, G. Benbadis, L. 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 60: 67-72.
- Badger, P. C. 2002. "Ethanol from cellulose: A general review. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.), Trends in new crops and new uses" ASHS Press, Alexandria, VA. 17-21.
- Boulton, C. and Quain, D. 2006. The biochemistry of fermentation. In: *Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Science, Oxford.
- Cardona, C.A., Sánchez, O.J., Gutiérrez, L.F. 2010. Analysis of ethanol recovery and dehydration. In: *Process synthesis for fuel ethanol production*, pp. 199-219. CRC Press Taylor & Francis Group, New York.
- Chandel, A.K., da Silva, S.S and Singh, O.V. 2011. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. In: *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*, Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), Croatia: InTech; 2011
- Claassen, P.A., Sijtsma, L., Stams, A.J.M., de Vries, S.S., Weusthuis, R.A. 1999. Utilisation of biomass for the supply of energy carriers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 52: 741-745.
- Demirbaş, A. 2007. Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and Combustion Science*, 33: 1-18.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Dubois, M., Gilles, D.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*, 28: 350-356.
- Galbe, M., Zacchi, G. 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied microbial biotechnology*, 59: 618-628.
- Gray, K.A., Zhao, L. and Emptage, M. 2006. Bioethanol. *Current Opinion in Chemical Biology*, 10: 141-146
- Hahn-Hägerdal, B., Galbe, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Lidén, G. and Zacchi, G. 2006. Bioethanol – the fuel of tomorrow from the residues of today. *Trends in Biotechnology*, 24(12): 549-556
- Han, M., Kim, Y. Kim, Y. Chung, B. and Choi, G.W. 2011. Bioethanol production from optimized pretreatment of cassava stem. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 28(1): 119-125.
- <http://www.kmutt.ac.th/titec/gtz/coconut-detail-upload5.html>
- <http://www.thailandtapiocastarch.net>
- Jakobsson, E. 2003. Optimization of the pretreatment of wheat straw for production of bioethanol. Department of Chemical Engineering Lund University.
- Khosravi-Darani, K. and Zoghi, A. 2008. Comparison of pretreatment strategies of sugarcane baggase: Experimental design for citric acid production. *Bioresource Technology*, 99: 6986-6993.
- Kosaric, N. and Vardar-Sukan, F. 2001. Microbiology and Biochemistry of Ethanol Formation. In: *The Biotechnology of Ethanol Classic and Future Application*, pp. 90-106 (Ed. M. Roehr) WILEY-VCH, NewYork.
- Kumar, L., Dhavala, P., Goswami, A., and Maithel, S. 2006. Liquid biofuels in south asia: resources and technologies. *Asian Biotechnology and Development Review*, 8: 31-49.
- Kuntiya, A., Hanmoungjai, P., Techapun, C., Sasaki, K. and Seesuriyachan, P. 2010. Influence of pH, sucrose concentration and agitation speed on exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as a raw material substitute. *Maejo International Journal of Science and Technology*, 4(02): 318-330.
- Kurniasari, N., Sidar, A.E., Rahayu, S. and Utami, T. 2011. The growth of *Pediococcus acidilactici* f-11 in tofu whey. The 3rd International Conference of Indonesian Society for Lactic Acid Bacteria (3rd IC-ISLAB): Better Life with Lactic Acid Bacteria: Exploring Novel Functions of Lactic Acid Bacteria.
- Kuswardani, I., Kusumawati, N., Srianta, Ign. and Sabrina, M. I. 2011. Survival of *Lactobacillus bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* in coconut water based medium during frozen storage. The 3rd International Conference of Indonesian

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Society for Lactic Acid Bacteria (3rd IC-ISLAB): Better Life with Lactic Acid Bacteria: Exploring Novel Functions of Lactic Acid Bacteria.
- Law, S.V., Abu Bakar, F., Mat Hashim, D. and Abdul Hamid, A. 2011. Minireview: Popular fermented foods and beverages in Southeast Asia. *International Food Research Journal* 18: 475-484.
- Linden, T. and Hahn-Hagerdal, B. 1989. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates with yeasts and xylose isomerase. *Enzyme and Microbial Technology*, 11, 583-589.
- Martin, C. Marcet, M. Almazan, O. Jonsson, L.J. 2007. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technology*, 98: 1767-1773.
- Miller, G.L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31(3): 426-428.
- Olofsson, K., Bertilsson M. and Lidén, G. 2008. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnology for Biofuels*, 1(7): 1-14.
- Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H.C. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conservation and Recycling*, 50: 1-39.
- Purwadi, R., Brondberg, T. and Taherzadeh, M.J. 2007. A possible industrial solution to ferment lignocellulosic hydrolyzate to ethanol: continuous cultivation with flocculating yeast. *International Journal of Molecular Sciences*, 8: 920-932.
- Sánchez. O.J. and Cardona, C.A. 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99: 5270-5295.
- Santoso, U., Kubo, K., Ota, T., Tadokoro, T. and Maekawa, A. 1996. Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). *Food Chemistry*, 57: 299-304.
- Seesuriyachan, P., Kuntiya, A., Hanmoungjai, P. and Techapun, C. 2011. Exopolysaccharide production by *Lactobacillus confusus* TISTR 1498 using coconut water as an alternative carbon source: the effect of peptone, yeast extract and beef extract. *Songklanakarinn Journal of Science and Technology*, 33 (4): 379-387.
- Shivakumar, S. and Vijayendra, S.V.N. 2006. Production of exopolysaccharide by *Agrobacterium sp.* CFR-24 using coconut water – a byproduct of food industry. *Letters in Applied Microbiology*. 42: 477-482.
- Smart, K.A., Chambers, K.M., Lambert, I. and Jenkins, C. 1999. Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57: 18-23.
- Srinorakutara, T., Kaewwimol, L. and Saengow, L. 2006. Approach of Cassava Waste Pretreatments for Fuel Ethanol Production in Thailand. *Journal of Scientific Research Chulalongkorn University*, 31(1): 77-84.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Tomaş-Pejo, E., Ballesteros, M. Oliva, J.M. and Olsson, L. 2010. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 37:1211–1220.
- Verstrepen, K.I., Chambers, J. and Pretorius, J.S. 2006. The Development of superior yeast strains for the food and beverage industries: challenges, opportunities and potential Benefits. In: *Yeast in Food and Beverage*, pp. 399-444 (Eds. A. Querol and G.H. Fleet) Springer, Verlag Berlin Heidelberg.
- Yu, Z. and Zhang, H. 2004. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technology*, 93: 199–204.
- Zheng, Y., Pan, Z. and Zhang, R. 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*, 2, 3: 51-68.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาคผนวก ก

เอกสารหลักฐานอ้างอิงของผลผลิต จากบทที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.



ภาคผนวก ก-1
การผลิตเอทานอลชีวภาพจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจาง
และมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

การผลิตเอทานอลชีวภาพจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจาง
และมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90
Bioethanol Production from Dilute Acid Hydrolysates of Cassava Pulp and
Supplement with Coconut Juice by *Saccharomyces cerevisiae* SC90

สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา¹ ประพัฒน์ พัวพันวัฒนะ¹ และ ไอรยา สิทธิอำพรพรรณ¹
Soisuda Pornpukdeewattana¹ Prapat Puapanwattana¹ and Iraya Sittipomphun¹

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการใช้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางเป็นแหล่ง
วัตถุดิบราคาถูก ร่วมกับการใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งของสารอาหารเสริมการเจริญของยีสต์ และเป็นแหล่งของน้ำตาล
ในการผลิตเอทานอล และศึกษาถึงความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทาน
อลด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ผลการศึกษาพบว่า อาหารที่เติมน้ำมะพร้าว 200 มิลลิตรต่อลิตร
ส่งเสริมการเจริญได้ดีที่สุด โดยให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์สูงถึง $7.47 \pm 0.26 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ขณะที่อาหาร
ควบคุมที่มีการเติมยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร เติมน้ำมะพร้าว ให้ค่าความหนาแน่นของเซลล์เท่ากับ $4.54 \pm 0.85 \times 10^7$ เซลล์
ต่อมิลลิลิตร ผลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอทานอลในอาหารที่ใช้น้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง
ด้วยกรดเจือจางที่เสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 มิลลิตรต่อลิตร พบว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 1-3 กรัม
ต่อลิตร ส่งเสริมการหมักเอทานอลได้ดีโดยให้ผลได้ของเอทานอล อัตราการผลิตเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการหมัก
ประมาณ 0.38 กรัมต่อกรัม 0.32 กรัมต่อลิตร. ชั่วโมง และ 74.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการศึกษานี้กล่าวได้ว่ากากมัน
สำปะหลังและน้ำมะพร้าวมีศักยภาพในการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบราคาถูกสำหรับการผลิตเอทานอลชีวภาพ
คำสำคัญ: เอทานอลชีวภาพ กากมันสำปะหลัง น้ำมะพร้าว *Saccharomyces cerevisiae*

Abstract

The purpose of this research was to evaluate the impact of using dilute acid hydrolysates of cassava pulp as
a low cost substrate for bioethanol production. The hydrolysate was supplemented with coconut juice, as
nutrient and carbon sources, to enhance yeast growth and ethanol production. The effect of inorganic
nitrogen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ on ethanol production using *Saccharomyces cerevisiae* SC90 was also investigated.
Coconut juice at 200 ml/l mixed with dilute acid hydrolysates presented the best results in yeast growth with
cell density at $7.47 \pm 0.26 \times 10^7$ cells/ml comparing to cell density at $4.54 \pm 0.85 \times 10^7$ cells/ml of the control
prepared by the addition of 1 g/l of yeast extract instead of coconut juice. In addition, the effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
on ethanol production from dilute acid hydrolysates of cassava pulp supplemented with 200 ml/l of coconut
juice was examined. The results presented that 1-3 g/l of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ provided ethanol yield, volumetric
productivity, and fermentation efficiency around 0.38 g/g, 0.32 g/l.h, and 74.66 %, respectively. In summarize,
our results reveal that both cassava solid waste and coconut juice are potential resources to be used as low
cost materials for bioethanol production.

Keywords: bioethanol, cassava pulp, coconut juice, *Saccharomyces cerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานานาชาติ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ขอสงวนสิทธิ์ในฉบับนี้ไว้สำหรับงานวิชาการเท่านั้น สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ 10520

*ติดต่องานวิจัย Email address: kpsoisud@kmitl.ac.th

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

บทนำ

กากมันสำปะหลังเป็นของเหลือจากกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีปริมาณของแข็งเป็นองค์ประกอบมากที่สุด โดยมีลักษณะทั่วไปที่ละเอียด สีขาว และมีความชื้นสูงถึงร้อยละ 75 โดยกล้านรงค์ และคณะ (2548) รายงานว่าในแต่ละปีประเทศไทยมีของเหลือที่อยู่ในรูปกากมันสำปะหลังประมาณ 3-4 ล้านตัน (น้ำหนักเปียก) หรือมีปริมาณประมาณ 1-1.5 ล้านตัน (น้ำหนักแห้ง) ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 10-15 ของหัวมันสดที่ใช้ในการผลิตแป้ง โดยกากมันสำปะหลังยังคงมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นคาร์โบไฮเดรต ซึ่งคิดเป็นแป้งสูงถึงร้อยละ 50-60 ของน้ำหนักแห้ง แป้งในกากมันจะแทรกอยู่ในลิกโนเซลลูโลส และเพคติน นอกจากนี้ กากมันสำปะหลังยังประกอบไปด้วยเซลลูโลสและเส้นใยร้อยละ 10-15 โปรตีนร้อยละ 1.5-5 และไขมันร้อยละ 0.1-4 โดยน้ำหนัก รวมถึงยังมีแร่ธาตุ Fe^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , และ Zn^{2+} ในปริมาณต่ำ (จิราภรณ์, 2552)

ทางเลือกหนึ่งของการใช้ประโยชน์จากของเหลือนี้ คือ การนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล รายงานการวิจัยหลายแห่งได้กล่าวถึงแนวทางการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง (กัลยา และคณะ, 2548; ธนภูมิ และคณะ, 2552; กิตติมาศ และคณะ, 2553; Akaracharanya *et al.*, 2011) ซึ่งข้อได้เปรียบอย่างหนึ่งของการใช้กากมันสำปะหลังในการผลิตเอทานอล คือ ไม่ต้องผ่านกระบวนการลดขนาดของวัตถุดิบเมื่อเปรียบเทียบกับวัตถุดิบทางการเกษตรชนิดอื่น ซึ่งเป็นการช่วยลดเวลาและค่าใช้จ่าย (Akaracharanya และคณะ, 2011) การย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อให้ได้น้ำตาลสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การใช้กรด และการใช้เอนไซม์ โดยการใช้กรดเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมมาก (Badger, 2002) ซึ่งจากรายงานก่อนหน้าพบว่ากากมันสำปะหลังมีสารอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์อยู่น้อย (จิราภรณ์, 2552) ดังนั้น การวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาการเพิ่มความสามารถของยีสต์ในการหมักเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่เตรียมได้จากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจาง อย่างไรก็ตาม ในหลายการทดลองพบว่าสารอาหารที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาหารเลี้ยงเชื้ออาจไม่เพียงพอต่อการหมักเอทานอลโดยยีสต์ ดังนั้น ชลดา และคณะ (2547) จึงเติมยีสต์สกัด และ Agu *et al.* (1997) จึงเติมแหล่งไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต เพื่อเพิ่มสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์ลงในอาหารที่ใช้ในการหมักเพื่อเพิ่มผลผลิตของเอทานอล ทั้งนี้ เนื่องจากน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งวัตถุดิบเหลือใช้ที่มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นแหล่งสารอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งน้ำมะพร้าวอุดมไปด้วยน้ำตาลหลากชนิด กรดอะมิโน และวิตามินบี (Shivakumar and Vijayendra, 2006) ดังนั้น งานวิจัยนี้เลือกใช้น้ำมะพร้าวมาเสริมทั้งน้ำตาลและสารอาหารในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสารละลายน้ำตาลจากกากมันสำปะหลัง

ซึ่งกากมันสำปะหลังแห้ง 10 กรัม ใส่บีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มัล 100 มิลลิลิตร นำไปเข้าหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 132 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองแยกเก็บส่วนใสจะได้สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2. การใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งสารอาหารเสริมในการหมักเอทานอล

การทดลองในหัวข้อนี้ใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งสารอาหารเสริม โดยปริมาตรน้ำมะพร้าวที่เติมลงในอาหารแต่ละสูตรแสดงดัง Table 1 เปรียบเทียบกับอาหารสูตรควบคุมซึ่งรายงานไว้โดย กัลยา และคณะ (2548) เตรียมอาหารทั้ง 6 สูตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ตามองค์ประกอบที่แสดงใน Table 1 ปรับค่าพีเอชเป็น 5.5 ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารทุกสูตรให้เท่ากันโดยใช้กลูโคส ถ่ายเชื้อยีสต์ลงในอาหารที่เตรียมไว้ โดยให้ได้ความเข้มข้นเชื้อสุดท้ายประมาณ 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์จำนวนเซลล์ อัตราการรอดชีวิต (Smart et al., 1999) ความเข้มข้นของกลูโคสโดยวิธี DNS (Miller, 1959) ค่าพีเอช และความเข้มข้นของเอทานอลโดยแก๊สโครมาโทกราฟี ผลการทดลองที่ได้ในการทดลองนี้จะทำให้ทราบความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งสารอาหารเสริมในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง

Table 1 Medium formulations

Composition	Control	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l	2 g/l
Yeast extract	1 g/l	-	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	0.5 g/l	0.5 g/l	0.5 g/l	0.5 g/l	0.5 g/l	0.5 g/l
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l	1 g/l
Coconut juice	-	-	50 ml/l	100 ml/l	150 ml/l	200 ml/l
References	กัลยา และคณะ(2548)	This research	This research	This research	This research	This research

Note: All medium formulations used 750 ml/l of cassava pulp hydrolysate as carbon source and the final concentration of carbon source was adjusted to 20 g/l of reducing sugar using glucose

3. การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการหมักเอทานอล

เตรียมอาหารโดยแปรผันค่าความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 4 ระดับ คือ 0, 1, 3, และ 5 กรัมต่อลิตร โดยเติมน้ำมะพร้าวที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล (ข้อมูลจากการศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวเป็นแหล่งสารอาหารเสริมในการหมักเอทานอล) ปรับค่าพีเอชของอาหารเป็น 5.5 ถ่ายเชื้อยีสต์ลงในอาหารที่เตรียมไว้โดยให้ได้ความเข้มข้นเชื้อสุดท้ายประมาณ 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักและเก็บตัวอย่างตามวิธีการที่ได้กล่าวไปแล้ว ในหัวข้อที่ 2 ผลการทดลองที่ได้ในการทดลองนี้จะทำให้ทราบความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์

การทดลองในหัวข้อนี้ได้ศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวต่อการเจริญของเซลล์ โดยการเลี้ยงเชื้อในเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าอาหารที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังและมีการเติมน้ำมะพร้าวในปริมาณ 0-200 มิลลิลิตรต่อลิตร ผลการทดลองไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แสดงดัง Figure 1 พบว่าการเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารสูตรควบคุมที่มีการเติมยีสต์สกัด และในอาหารสูตรที่ 1 ซึ่งไม่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว ต่ำกว่าอาหารสูตรอื่นที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว ทั้งนี้พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญได้เร็วที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณความเข้มข้นอื่น โดยมีค่าเท่ากับ $7.47 \pm 0.26 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง (Figure 1A) ซึ่งอาจเป็นผลมาจากน้ำมะพร้าวที่ความเข้มข้นดังกล่าว ช่วยเพิ่มปริมาณสารอาหาร และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มากขึ้น (Santoso *et al.*, 1996) โดยการทดลองนี้ให้ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ อินทัย (2519) ซึ่งศึกษาการเจริญของยีสต์อาหารสัตว์ 3 สายพันธุ์ ในอาหารที่ใช้ น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ ผู้วิจัยพบว่ายีสต์ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญในน้ำมะพร้าวซึ่งไม่ได้เติมสารใด ๆ ได้ดีเท่ากับอาหารเหลว Malt-Yeast extract (YM) ซึ่งอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย มอลท์สกัด (malt extract) 3.0 กรัม ยีสต์สกัด 0.1 กรัม เปปไทน์ 5.0 กรัม และกลูโคส 10.0 กรัม

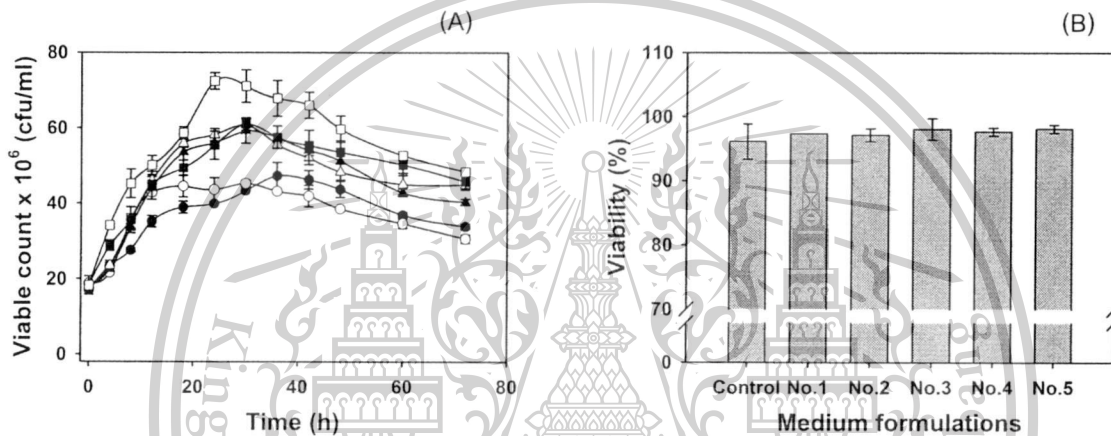


Figure 1 Viable cell density (A) and percentage viability at 48 h of cultivation, (B) of *S. cerevisiae* SC90 in dilute acid hydrolysates of cassava pulp supplemented with yeast extract 1g/l (control; ●), coconut juice 0 ml/l (No.1; ○), 50 ml/l (No.2; ▲), 100 ml/l (No.3; △), 150 ml/l (No.4; ■), and 200 ml/l (No.5; □). Fermentations were initiated with a viable cell density of 3×10^7 cells/ml. Batch fermentations were conducted in 100 ml conical flasks and incubated in orbital shaker at 120 rpm and 30°C.

เมื่อพิจารณาถึงผลของการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวต่อการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ (Figure 2B) พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง ร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของเซลล์ยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมน้ำมะพร้าวให้ผลไม่แตกต่างจากอาหารควบคุม โดยมีค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ในช่วง 96.11 ± 2.77 ถึง 98.13 ± 0.64 อย่างไรก็ตาม จากโครงการวิจัยอื่นของกลุ่มวิจัยนี้ ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหาร YPD ที่ไม่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง พบว่าที่ 48 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงให้ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตสูงถึง 99.79 ± 0.30 ซึ่งการที่ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางต่ำกว่าในอาหารที่ไม่มีการเติมน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง ทั้งนี้อาจอธิบายได้โดยอาศัยงานวิจัยก่อนหน้าที่พบว่าการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดรวมกับการระเบิดเยื่อด้วยไอน้ำจะก่อให้เกิดสารยับยั้ง เช่น เฟอร์ฟูรัล (furfural) และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอร์ฟูรัล (5-hydroxyl methyl furfural; HMF) โดยสารยับยั้งที่เกิดขึ้น

ดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อ การเจริญของยีสต์ (Chandel *et al.*, 2011) นอกจากนี้ เอทานอลที่ยีสต์ผลิตขึ้นยังเป็นพิษต่อเซลล์ โดยมีผลต่อการแบ่งเซลล์ ยับยั้งการสังเคราะห์เอ็นเอ โปรตีน ทำให้โปรตีนเสื่อมสภาพ ยับยั้งการหมักโดยทำให้ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป เหนียวนำไปเกิดการรวมตัวของไขมัน ยับยั้งการขนถ่ายเศษอาหารเข้าสู่เซลล์ เพิ่มความเป็นพิษของออกซิเจน และอาจมีผลต่อเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนส (dehydrogenase) และเฮกโซไคเนส (hexokinase) (สาวิตรี, 2540)

จากผลการศึกษานี้สรุปได้ว่า น้ำมะพร้าวความเข้มข้น 200 มิลลิลิตรต่อลิตร สามารถทดแทนยีสต์สกัด 1 กรัมต่อลิตร (ตัวอย่างควบคุม) เพื่อเป็นแหล่งสารอาหารเสริมในสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจ็จจางเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล โดยพิจารณาจากการให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตที่สูงกว่าสภาวะอื่น ทั้งนี้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตสูงคาดว่าจะส่งเสริมการผลิตเอทานอลได้มากขึ้น

Table 2 แสดงประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลของเชื้อ SC90 ซึ่งพบว่าการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวช่วยส่งเสริมให้เชื้อยีสต์มีประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลได้ดีขึ้น โดยพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่และอัตราการใช้น้ำตาลในรูปของน้ำตาลกลูโคส โดยจะเห็นว่าการเสริมสารอาหารด้วยการเติมน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร จะมีน้ำตาลเหลือน้อยที่สุด และมีอัตราการใช้น้ำตาลสูงที่สุด โดยเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารอื่น ๆ จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (เมื่อ $p < 0.05$) พบว่าอาหารที่ทำให้เชื้อยีสต์มีประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาลสูงที่สุด คือ อาหารที่มีการเติมน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร

Table 2 Attenuation time, residue sugar, and rate of sugar utilization of SC90 under different concentrations of coconut juice

Mediums	Attenuation Time (h)	Residue sugar (g/l)	Rate of sugar utilization (g/l.h)
Control	48	17.36±1.60 ^c	0.54±0.03 ^a
No. 1	48	13.19±1.03 ^b	0.74±0.03 ^b
No. 2	42	12.87±0.11 ^b	0.90±0.04 ^c
No. 3	30	12.52±0.25 ^b	0.88±0.03 ^c
No. 4	30	13.29±1.35 ^b	0.90±0.04 ^c
No. 5	30	10.49±1.29 ^a	1.28±0.05 ^d

Mean values in the each column with different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$). All values are expressed as means±standard deviation ($n=3$).

2. ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

ในหัวข้อนี้ศึกษาความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล จากผลการศึกษาในหัวข้อที่ 1 พบว่าความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ คือ 200 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งเชื้อที่มีการเจริญได้ดี ควรจะผลิตเอทานอลได้สูง ดังนั้น จึงนำความเข้มข้นของน้ำมะพร้าวดังกล่าวมาศึกษาต่อเพื่อหาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อและการผลิตเอทานอล โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่เสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในปริมาณ 1, 3, และ 5 กรัมต่อลิตร การเจริญของเซลล์ในรูปเซลล์ที่มีชีวิตแสดงดัง Figure 2A พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นเอกสารถูกส่งไปสำหรับกรทำงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อนำเอาไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ซัลเฟต 1-3 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถเจริญได้รวดเร็วและให้ความหนาแน่นสูงที่สุดที่ 24 ชั่วโมงของการหมัก โดยมีไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่าประมาณ $6.26 \pm 1.84 \times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็น 5 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ความหนาแน่นของเซลล์ลดลงจนมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองจากการใช้อาหารควบคุม อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาร้อยละของการรอดชีวิต (Figure 2B) ที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก พบว่าที่ทุกระดับของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทำการทดสอบให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างจากอาหารควบคุมโดยมีค่าร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ในช่วง 96.96 ± 0.92 ถึง 98.03 ± 1.62

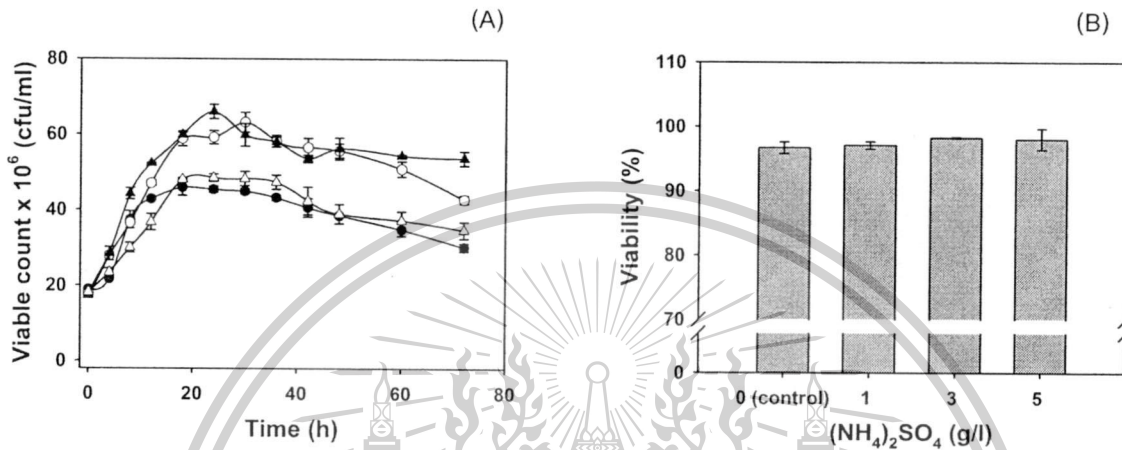


Figure 2 Cell viability (A) and percentage viability at 36 h of attenuation (B) of *S. cerevisiae* SC90 in dilute acid hydrolysates of cassava solid waste supplemented with coconut juice 200 ml/l. The impact of (NH₄)₂SO₄ on cell growth was studied at 0 g/l (●), 1 g/l (○), 3 g/l (▲), and 5 g/l (△). Fermentations were initiated with a viable cell density of 3×10^7 cells/ml. Batch fermentations were conducted in 100 ml conical flasks and incubated in orbital shaker at 120 rpm and 30 °C.

Table 3 Production kinetics of SC90 under different concentration of (NH₄)₂SO₄

(NH ₄) ₂ SO ₄ (g/l)	Attenuation time (h)	Ethanol concentration (g/l)	Ethanol yield (Y _{P/S} , g/g)	Volumetric productivity (g _p /l.h)	Fermentation efficiency (%)
0 (control)	36	10.27±0.14 ^a	0.32±0.01 ^a	0.29±0.01 ^a	62.43±2.05 ^a
1	36	11.64±0.59 ^b	0.35±0.02 ^b	0.32±0.02 ^b	69.04±3.74 ^b
3	36	11.59±0.49 ^b	0.38±0.01 ^b	0.32±0.01 ^b	74.66±1.38 ^b
5	36	10.93±0.59 ^b	0.37±0.02 ^b	0.30±0.02 ^b	72.76±4.52 ^b

Mean values in the each column with different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$). All values are expressed as means±standard deviation ($n=3$).

Table 3 แสดงผลของความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อค่าพารามิเตอร์ในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้ของเอทานอลจากสับสเตรต อัตราการผลิตเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการหมัก ที่ได้จากอาหารที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ทุกระดับความเข้มข้นมีค่าสูงกว่าอาหารควบคุม โดยที่ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต 3 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

กรัมต่อลิตร ให้ค่าสูงที่สุดเท่ากับ 11.59 ± 0.49 กรัมต่อลิตร 0.38 ± 0.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมสับสเตรต 0.32 ± 0.01 กรัมต่อลิตร. ชั่วโมง และ ร้อยละ 74.66 ± 1.38 ตามลำดับ

ทั้งนี้ การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตจาก 1 เป็น 3 กรัมต่อลิตร มีผลให้ค่าผลได้ ผลผลิตเชิงปริมาตร และประสิทธิภาพการหมักสูงขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตจนถึง 5 กรัมต่อลิตร มีผลให้ค่าพารามิเตอร์ทั้งสามต่ำลง ดังนั้น จากการทดลองนี้จึงกล่าวได้ว่าปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเชื้อจางที่มีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าว 200 มิลลิลิตรต่อลิตร อยู่ในช่วง 1-3 กรัมต่อลิตร

สรุปผลการทดลอง

จากงานวิจัยนี้ สามารถสรุปได้ว่ากากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบที่มีศักยภาพสำหรับเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอล ในขณะที่น้ำมะพร้าวเป็นสารอาหารเสริมที่ช่วยในการเจริญของยีสต์ อย่างไรก็ตาม จากการทดลองพบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเชื้อจางร่วมกับการระเบิดเชื้อด้วยไอน้ำยังคงมีความเข้มข้นต่ำ ดังนั้น จึงควรหาแนวทางในการปรับปรุงขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบเริ่มต้นเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้ได้ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูงขึ้น อีกทั้งในการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเชื้อจางร่วมกับการระเบิดเชื้อด้วยไอน้ำมีการรายงานว่าก่อให้เกิดสารยับยั้ง ได้แก่ เพอร์ฟูล และไฮดรอกซี เมทิลเพอร์ฟูล ซึ่งสารยับยั้งดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของยีสต์ และการผลิตเอทานอล ดังนั้น จึงควรหาวิธีการที่เหมาะสมในการลดปริมาณสารยับยั้งก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอล

เอกสารอ้างอิง

- กิตทามาต ศิริไชย , นันทนา สีสุข และ สาวิตรี ลิ้มทอง. 2553. การกระทำก อนการทำตามกระบวนการกับวัสดุเหลือทิ้งประเภทลิกโนเซลลูโลสเพื่อผลิตเอทานอล Proceeding in The 36th Congress on Science and Technology of Thailand. October 26-28. Bangkok, Thailand.
- กัลยา อยู่นาน จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร กนก รัตนะกนกชัย. 2548. การผลิตเอทานอลจากสารละลายกากมันที่ย่อยด้วยกรดโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae*. ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 43 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 1-4 กุมภาพันธ์ 2548. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- จิราภรณ์ โฉหวงศ์วัฒนา. 2525. การผลิตกรดซิตริกจากกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger*. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ชลดา ซื่อสัตย์ บงกชรัตน์ ปิตียนต์ วีรภัทร ศรีนครบุตร และวิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2547. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. ในการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 42 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 3-6 กุมภาพันธ์ 2547. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.
- ธนภูมิ มณีบุญ อัญชรีดา อัครจรัลญา วีรภัทร ศรีนครบุตร และ วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2552. การย่อยกากมันสำปะหลังให้เป็นน้ำตาลและการหมักเอทานอลในขั้นตอนเดียวโดยเชื้อผสมระหว่าง *Rhizopus oryzae* และ *Saccharomyces*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

cerevisiae ในการเพาะเลี้ยงแบบ solid state. ในการประชุมทางวิชาการครั้งที่ 47 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 17-20 มีนาคม 2552. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สาวตรี ลิ้มทอง. 2549. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อโณทัย คมเสวต. 2519. การศึกษาการเจริญของยีสต์โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นวัตถุดิบ. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Akaracharanya, A., Kesornsit, J., Leepipatpiboon, N. Srinorakutara, T. Kitpreechavanich, V. and Tolieng, V. 2011. Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology*, 61:431–436.

Agu, R.C., Amadife, A.E., Ude, C.M., Onyia, A., Ogu, E.O., Okafor, M. and Ezejiofor, E. 1997. Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (cgw) biomass for ethanol production. *Waste Management*, 17, 1: 91-96.

Chandel, A. K., S. S. da Silva and O. V. Singh. 2011. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. In: *Biofuel Production-Recent Developments and Prospects*, Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.), Croatia: InTech; 2011

Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, 31 (3): 426–428.

Santoso, U., Kubo, K., Ota, T., Tadokoro, T. and Maekawa, A. 1996. Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera* L.). *Food Chemistry*, 57: 299–304.

Shivakumar, S. and Vijayendra, S. V. N. 2006. Production of exopolysaccharide by *Agrobacterium* sp. CFR-24 using coconut water – a byproduct of food industry. *Letters in Applied Microbiology*, 42: 477-482.

Smart, K. A., Chambers, K. M., Lambert, I. and Jenkins, C. 1999. Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57: 18-23.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ภาคผนวก ก-2

Optimization of Fermentation Temperature for Very High Gravity Ethanol Production
using Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae* SC90



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Optimization of Fermentation Temperature for Very High Gravity Ethanol Production using Industrial Strain of *Saccharomyces cerevisiae* SC90

Soisuda Pornpukdeewattana*, Panida Chalearmkit,
and Panpaphon Iamsamang

Faculty of Agro-Industry,
King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok 10520, Thailand

Abstract

Very high gravity (VHG) ethanol fermentation has been remarkably developed in order to significantly enhance productivity through higher ethanol concentration in fermentation broth. This technique is helpful for saving water and energy consumption, reducing bacterial contamination, and decreasing distillate discharge treatment from the distillation system. However, this technology causes of yeast cell suffers according to several stresses including osmotic stress, anaerobic shift, accumulation of ethanol concentration, and nutrient limitation under VHG conditions. *Saccharomyces cerevisiae* produces heat during the process of ethanol production. Consequently, a cooling system is recommended during fermentation to disperse heat. There are many advantages including the increased capacity during the fermentation process at high temperatures, the reduction in the cooling cost, and the economic benefits from the increased productivity during fermentation and distillation. Even though VHG ethanol fermentation has several advantages, it causes the fermentation process to become stuck or sluggish, resulting in a prolonged attenuation period and an increase in the amount of unfermentable sugar. Consequently, the efficiency of ethanol production decreases. The basic background of yeast strain on stress tolerance including osmotic pressure, temperature, and ethanol is therefore very important to overcome this challenge. The current research aimed to identify the temperature range (30, 35 and 40°C) within which industrial ethanologenic strain of *Saccharomyces cerevisiae* SC90 would ferment effectively under VHG conditions. It also investigated the effect of fermentation temperature on cell growth and kinetic parameters of ethanol production from VHG medium (YPD containing 34% (w/v) glucose). The results showed that optimum fermentation temperature for ethanol production using SC90 was 35°C with the maximum amount of ethanol content at 97.03 g/l and volumetric productivity at 2.70 g/l.h. It could be summarized that the remaining percentage viability after complete fermentation indicates the ability of yeast in ethanol and temperature tolerance.

Keywords: Very high gravity fermentation; *Saccharomyces cerevisiae*; osmotic pressure; ethanol; temperature.

*Correspondence: kpsoisud@kmitl.ac.th; focus0107@yahoo.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาด้านนี้ มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

1. Introduction

Bioethanol, a clean and renewable biofuel, is reckoned as one of the best alternatives [1]. Several reasons have made it become a highly attractive fuel energy resource, including reduction in air pollution, CO₂ [2], and CO generation reduction in the emission of CO [3]. In addition, it can be blended with gasoline, currently 10% and 22% in the US and Brazil, respectively [2]. Bioethanol is produced from several kinds of substrates such as fermentable sugar and starch [4]. More recently, lignocelluloses have also been well known as a feedstock for bioethanol production [5]. The difference in ethanol production process depends on kinds of raw materials [3, 6]. Fermentable sugars in molasses or sugar cane are able to ferment to ethanol directly using yeast or bacteria [6]. Ethanol production from starch has to be started with digestion of starch using enzyme to fermentable sugars. Then, yeast can utilize sugars to produce ethanol [7]. It has been reported that to achieve the optimum conversion of sugar to ethanol this process requires a yeast strain capable of high ethanol tolerance because ethanol inhibits growth and fermentation [8]. *Saccharomyces cerevisiae* is one of several species of interest for bioethanol production in regards to a variety of substrate utilization, high growth and fermentation rates under severe conditions of ethanol production including low pH, high temperature as well as high ethanol concentration [8].

Very high gravity (VHG) fermentation is able to significantly improve ethanol productivity by enhancing ethanol concentration in media. A number of advantages of this technique have been reported including reduced energy, labor, cleaning, effluent costs, and an increase in the amount of ethanol per unit of fermentable broth because the reduction of yeast growth increase the glucose flux to ethanol production [9-11]. Normal gravity

fermentation containing an initial sugar concentration of 150 to 200 g/l is fermented to produce ethanol concentration of only 7.5 to 10% (v/v) [12]. To enhance ethanol level, initial sugar concentrations higher than 200 g/l are required. However, this technology has been considered impractical because some problems adversely affect yeast fermentation performance [13, 14]. Initial high sugar content in the fermentation medium induces an increase in osmotic pressure which can have a deleterious effect on yeast cells [15]. In addition, elevated ethanol levels can cause an increase in the stress to yeast cells leading to stuck fermentation [16].

Temperature has been considered one of the most important environmental factors positively and negatively affecting yeast growth and ethanol production efficiency [17-19]. Increasing temperature induces a rate of yeast growth and fermentation. However, it also impairs ethanol tolerance due to the synergistic inhibition of ethanol and the high temperature results in stuck fermentation [12, 20, 21]. The optimum temperature for yeast cell growth and ethanol formation have been reported at range 30-32°C but it is strain dependent to be more tolerate above 35°C [22]. The rapid reduction of yeast growth rate has been observed after optimum point of temperature due to alteration of the cellular composition of yeasts under O₂ limited conditions [23], enzyme denaturation, and cellular membranes damage [24]. Even though high temperature has a deleterious effect on yeast fermentation performance, it offers the benefits of a minimized bacterial contamination, a reduction of cooling costs and therefore lower costs of energy consumption [19, 25]. Yeast strains for ethanol production should therefore be able to tolerate high temperature because ethanol fermentation cannot be operated under low temperature in summer for most tropical and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

subtropical regions without a cooling system [21].

There is no report delineating stress tolerance and optimum temperature for VHG ethanol fermentation using industrial strain *S. cerevisiae* SC90. In the current research we aimed to investigate the effect of osmotic pressure induced by sorbitol, temperature, ethanol, and the synergistic effects between temperature and ethanol. According to several advantages of VHG fermentation and high temperature, this research identified the temperature range and investigated impact of temperature on very high gravity ethanol production using industrial yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae* SC90. The results would be useful for tropical climates where a day time maximum temperature is 32°C. The data set might provide more understanding on stress occurrence during ethanol production and might be applied to improve stress tolerance in yeast under VHG fermentation.

2. Materials and Methods

2.1 Microorganism and Inoculum Preparation

S. cerevisiae SC90 was obtained from Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok. The strain was pre-grown into a 250 ml Erlenmeyer flask containing 100 ml of YPD (20 g/l neutralised bacteriological peptone, 10 g/l yeast extract, 20 g/l glucose) media. The flask was incubated on an orbital shaker at 30°C and 120 rpm for 48 h. In order to increase cell concentration, we transfer the yeast into a 1000 ml Erlenmeyer flask containing 500 ml of YPD. The flasks were further incubated under the same conditions. After 48 h, this was used as an inoculum for ethanol production.

2.2 Spot Plate for Stresses Assessment

The culture was diluted to a concentration of 3×10^7 cells/ml with sterile

distilled water in sterile microcentrifuge tubes. Four subsequent 1:10 dilutions of cell suspensions were performed. A volume of 10 μ l from each dilution was spotted onto the surface of the plate. Cells were spotted in duplicates on each plate. Serial dilutions of the yeast strain were spotted onto YPD agar supplemented with different concentrations of sorbitol (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30% (w/v)). Plate cultures were incubated in an inverted position at 30°C under aerobic conditions for 2 days. For assessment of ethanol and temperature tolerance, serial dilutions of the yeast strain were spotted onto YPD agar supplemented with different concentrations of ethanol (0, 5, 10, 15, 20 and 25% (v/v)) and plates were incubated in an inverted position at various temperatures (30, 35 and 40°C). Growth was recorded using a camera.

2.3 Effects of Fermentation Temperature on Mini Laboratory Batch Ethanol Fermentation

The fermentation profile of yeast was studied by using mini laboratory scale fermentations. *S. cerevisiae* SC90 was inoculated into a 250 ml Erlenmeyer flask comprising 50 ml of YPD medium (340 g/l glucose concentration, 20 g/l neutralised bacteriological peptone and 10 g/l yeast extract) and adjusted to a pH optimized for yeast growth. The media were sterilized at 121°C for 15 min. The medium was inoculated with *S. cerevisiae* SC90 to achieve an initial cell concentration of 3×10^7 cells/ml. Parafilm was used to cover the top of a flask. A bunsen valve was inserted through the parafilm to prevent pressure build up. The bunsen valve was constructed using a sterile needle and a Durham tube (10 mm diameter) connected via a section of silicone tubing (10 mm diameter) with a narrow slit cut into it to allow release of CO₂ but no ingress of air. Bag ties were used to fasten the tubing to the needle and Durham tube. The fermentation was conducted in batch mode

in an orbital shaker at 120 rpm without pH control. The fermentation temperatures were conducted at 30, 35 and 40°C. Cells grown under YPD containing 20 g/l of glucose and incubated at 30°C were set as a control. Samples were collected to investigate growth, sugar utilization and ethanol contents. The data set was analyzed and presented with respect to the corresponding kinetic parameters.

2.4 Fermentation Analysis

Weight Loss: The progression of the fermentation was monitored by measuring sugar utilization in terms of weight loss over time [26, 27].

Viable Cell Count: Cell suspensions were diluted to an appropriate concentration, and density was measured using a counting chamber and a standard light microscope. Viability was determined by mixing a volume of cell suspension with an equal volume of methylene blue solution (methylene blue dissolved in sodium citrate solution (2% w/v) to a final concentration of 0.01% (w/v)). Unstained cells are assumed to be viable. The viability of the sample was expressed as a percentage [28].

Glucose Utilization: The reduction in sugar concentration was analyzed using 3,5-dinitrosalicylic acid reagent as described by Miller [29]. The fermentation data set was analyzed and presented with respect to the glucose utilization rate with units grams of glucose consumed per hour.

Ethanol: Ethanol concentration was determined via gas chromatography (SHIMADZU, GCMS-QP2010 Ultra, Japan). Isopropanol was used as the internal standard. Data was presented with respect to a set of kinetic parameters (rate of glucose utilization, ethanol yield, volumetric productivity and fermentation efficiency).

Data Analysis: The mean and standard deviation of a data set were calculated using the AVERAGE and STDEV functions of Microsoft® Excel 2003. The presented results were expressed

as mean \pm STDEV obtained from three independent experiments and error bars corresponding to STDEV. The statistical analysis of the data was conducted using analysis of variance (ANOVA): single factor at 95% confidence limits.

3. Results and Discussion

3.1 Stress Tolerance of

S. cerevisiae SC90

3.1.1 Osmotic Stress

At the beginning of fermentation, yeast is faced with osmotic stress which is one of the first environmental stresses. Under this condition, yeast cells have to resist this stress in order to start growing and to carry out the alcoholic fermentation [30]. High initial sugar concentration causes a loss in sugar transport activity, consequently resulting in less ethanol [31]. In this study, we investigated the range of osmotic tolerance induced by sorbitol in *S. cerevisiae* SC90. Spot plate technique was applied on YPD containing various concentrations of sorbitol (0, 5, 10, 15, 20, 25 and 30% (w/v)). Then the plates were incubated at 30°C. The results were presented in Fig. 1.

According to Fig. 1, increased concentrations of sorbitol induced higher osmotic pressure and resulted in a reduction of cell growth and therefore a decrease in form a colony. However, *S. cerevisiae* SC90 was able to recover and grow well on YPD even under the sorbitol concentration of up to 30% (w/v).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

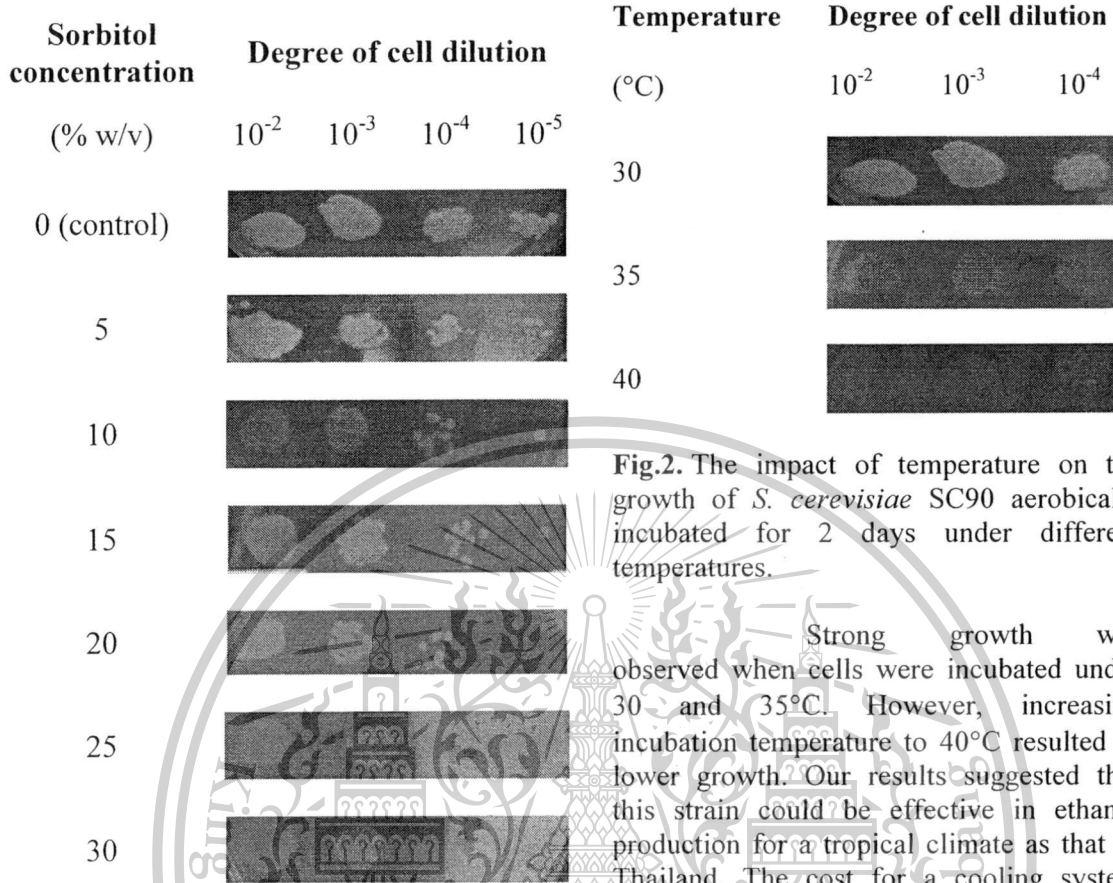


Fig.1. Effect of osmotic stress induced by sorbitol on yeast cell growth. Serial dilutions of *S. cerevisiae* SC90 were spotted onto YPD and then incubated at 30°C under aerobic conditions for 2 days.

3.1.2 Temperature Stress

Exothermic process occurs during ethanol production carried out by the yeasts during their growth. High temperature might be harmful to growth and fermentation potential of cells. Therefore, a cooling system has to be included in the process for temperature control. This current study aimed to identify the temperature range that yeast could grow. Yeast cell cultures were diluted as required and spotted on to YPD agar plates. The plates were aerobically incubated under various temperatures (30°C, 35°C and 40°C). The results were shown in Fig. 2.

Fig.2. The impact of temperature on the growth of *S. cerevisiae* SC90 aerobically incubated for 2 days under different temperatures.

Strong growth was observed when cells were incubated under 30 and 35°C. However, increasing incubation temperature to 40°C resulted in lower growth. Our results suggested that this strain could be effective in ethanol production for a tropical climate as that of Thailand. The cost for a cooling system would be saved. Consequently, ethanol production would become cheaper.

3.1.3 Synergistic Effect of Ethanol and Temperature on Cell Growth

Apart from common stress as osmotic and temperature stress, ethanol stress is also considered a chemical stress that occurs during ethanol production. Ethanologenic yeast should therefore be tolerant to ethanol. It has been reported that both ethanol and temperature stresses result in deleterious synergistic effect on yeast cell growth. The purpose of this study was to assess the ability of SC90 on a combination of ethanol and high temperatures stress. Yeast cell cultures were diluted as required and spotted onto YPD agar plates containing various concentrations of ethanol (0, 5, 10, 15, 20 and 25% (v/v)). These plates were

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

incubated aerobically at various temperatures (30, 35 and 40°C).

As presented in Fig. 3, increasing ethanol concentration resulted in a reduction of cell growth. Cells incubated in 30°C were able to grow at 15% (v/v) ethanol concentration. When ethanol concentration was increased to 20 and 25% (v/v), it became necessary to prolong the incubation period for cell repair and recovery (data not shown). The result in this study corresponded to a study on the topic of osmotic stress that showed that the ability of osmotic tolerance of SC90 was 30% (w/v). At 30% (w/v) sugar concentration, yeast could theoretically produce 15% (v/v) of ethanol.

In an experiment with an incubation at 35°C for 2 days, cells exposed to ethanol concentrations between 0 and 10% (v/v) were observed. A small growth was observed at ethanol concentration of 15% (v/v). Cells demonstrated no growth in the presence of 20 and 25% (v/v) ethanol. The impact on growth at the temperature of 40°C and various level of ethanol stress was shown in Fig. 3. Colony formation of cells incubated between 0 and 5% (v/v) ethanol was apparent within 2 days. No growth was observed when cells were incubated in ethanol concentration above 5% (v/v).

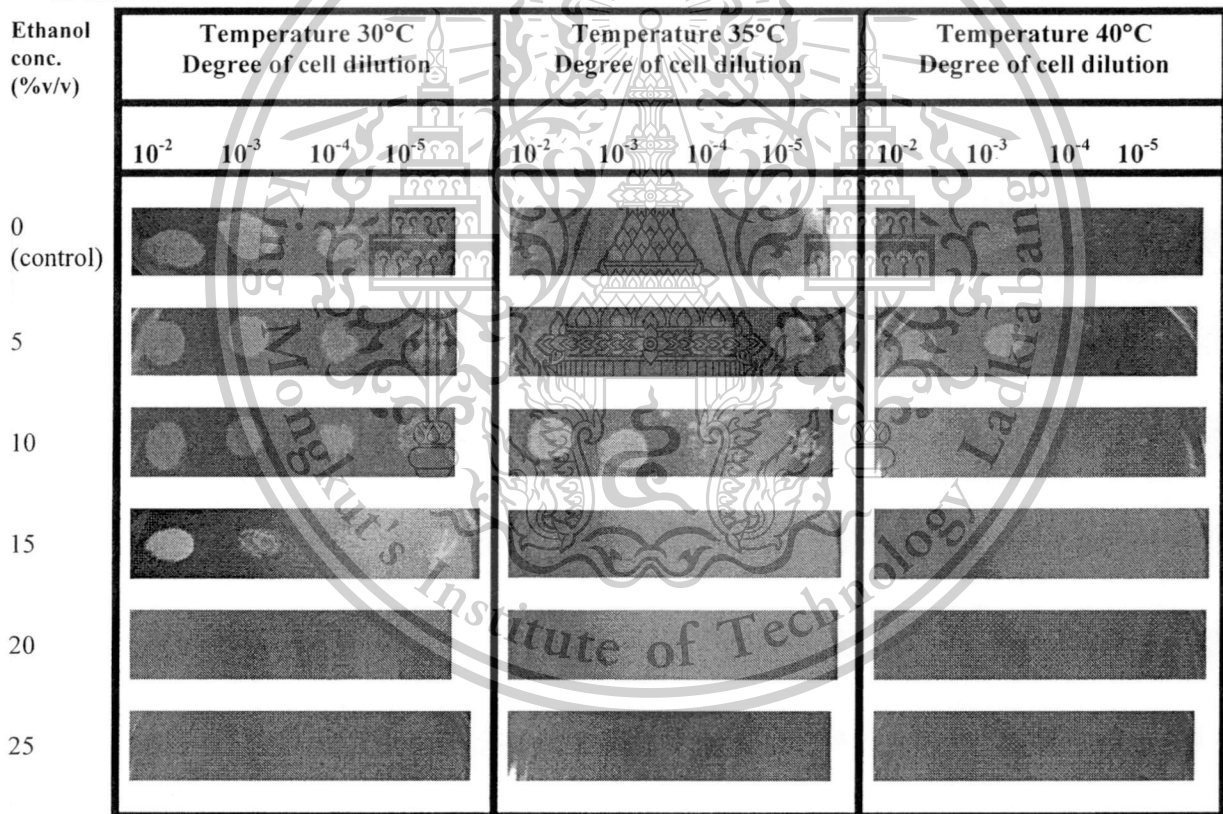


Fig.3. Impact of ethanol and temperature on growth of *S. cerevisiae* SC90 on YPD aerobically incubated for 2 days.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Fig. 3 suggested that the synergistic effect of ethanol and temperature played an important role on yeast cell growth. At a similar concentration of ethanol, increasing temperature could retard cell repair and recovery. According to our results, it appears that a high gravity ethanol production should maintain temperature no higher than 35°C. Several studies reported that a fermentation temperature above 35°C causes stuck fermentation and consequently low ethanol yield [23, 32].

3.2 Impact of Fermentation Temperature on Very High Gravity Ethanol Production

To assess the combined effects of fermentation temperature and initial substrate concentration on ethanol fermentation, YPD containing glucose concentration approximately 340 g/l conducts with yeast industrial strain SC90 at temperatures between 30 and 40°C. The results were reported as follows.

3.2.1 Progression in Weight Loss

CO₂ is one of the major fermentation products of sugar utilization by *S. cerevisiae*. Evolution of CO₂ leads to a progressive weight loss during fermentation which is a rapid and convenient method as well as represents an accurate assessment of fermentation rate instead of ethanol production [33]. A study on the impact of temperature on utilization of a very high glucose concentration (340 g/l) was therefore assessed by observing the progression of weight loss for *S. cerevisiae* SC90. The result was demonstrated in Fig. 4.

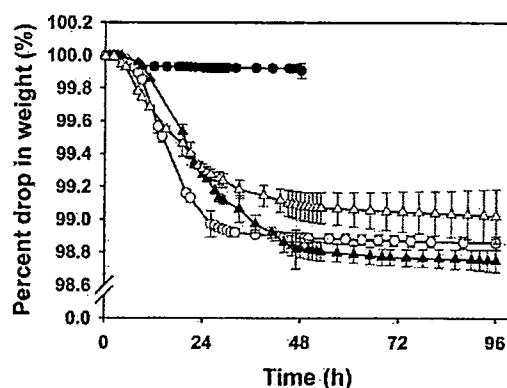


Fig.4. Impact of temperature on residual weight of *S. cerevisiae* SC90 in YPD containing approximately 340 g/l of glucose. Flasks were incubated in an orbital shaker at 120 rpm and different temperatures (30°C (○), 35°C (▲) and 40°C (△). Yeast grown in normal YPD and incubated at 30°C (●) was carried out as a control. Values represent the means of three independent measurements. Error bars indicate the standard deviations of the means.

A sample with the glucose concentration of 20 g/l incubated at 30°C was set as a control to compare with samples with a higher concentration of glucose (340 g/l) under various fermentation temperatures (30, 35 and 40°C). The lower concentration of glucose presented a shorter attenuation time at 8 h. Under VHG, fermentation at 30°C reached attenuation point at 36 h. Increasing temperature to 35 and 40°C permitted attenuation to be achieved at more than 48 h. Even though the initial rate of weight loss at 40°C appeared to be quite rapid during the first 10 h, a small amount of glucose content after 48 h was observed. The results suggested that the rate of weight loss was dependent on the concentration of glucose and the fermentation temperature. Using attenuation time and rate of progression in weight loss as comparative markers of fermentation, we can assume that VHG ethanol production at

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

30°C incubation temperature reach the maximum ethanol content in the shortest amount of time compared to the incubation temperatures of 35 and 40°C. We hypothesized that 35°C of fermentation temperature may present in the highest amount of ethanol according to the lowest residual weight. To prove this hypothesis, we present the reduction of glucose content and ethanol produced in Fig. 5 and Fig. 6, respectively.

3.2.2 Glucose Utilization

To investigate the effect of fermentation temperature on glucose uptake rate, we conducted four batch experiments. Glucose utilization was monitored using the DNS method, and the fermentation data was illustrated in Fig. 5. As the initial sugar content was increased, the time required to complete sugar utilization increased. However, increasing content of glucose from 20 to 340 g/l appeared to enhance the rate of glucose utilization.

At a high initial concentration of glucose, the fermentation temperature at 30°C demonstrated the most rapid rate of reduction in glucose during the first 4 h. Increasing fermentation temperature to 35 and 40°C slowed down the glucose utilization rate. During the first 24 h, cells incubated at 40°C appeared to utilize glucose faster than those incubated at 35°C. However, after 30 h fermentation at 35°C demonstrated a more rapid rate of glucose utilization. It has been reported by Gibson *et al.* [34] that, due to the rapid growth of yeast cells, initial rapid reduction of glucose and the rapid conversion of sugar to ethanol using glycolysis pathway were observed. At the end of fermentation (96 h), the glucose content remaining at 30, 35 and 40°C were 1.87, 5.15 and 5.10 g/l, respectively.

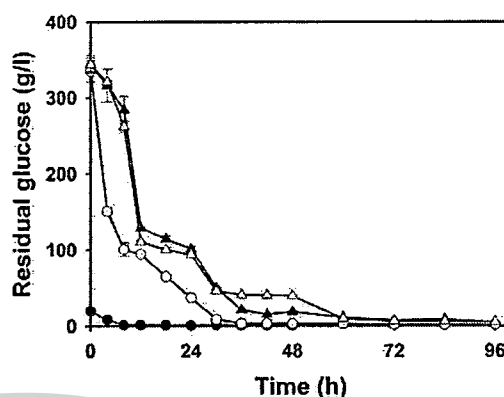


Fig.5. Impact of temperature on glucose utilization of *S. cerevisiae* SC90 in YPD containing approximately 340 g/l of glucose. Flasks were incubated in an orbital shaker at 120 rpm and different temperatures (30°C (○), 35°C (▲); and 40°C (△). Yeast grown in normal YPD and incubated at 30°C (●) was carried out as a control. Values represent the means of three independent measurements. Error bars indicate the standard deviations of the means.

3.2.3 Ethanol Production

The major fermentation products of sugar utilization by *S. cerevisiae* are ethanol and CO₂. To determine the optimum temperature for ethanol production, we assessed ethanol content by GC as presented in Fig. 6.

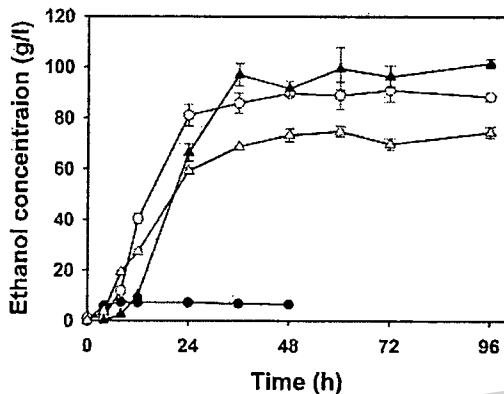


Fig.6. Ethanol production of *S. cerevisiae* SC 90. Cells were grown in 340 g/l of glucose and incubated under different temperatures; 30°C (○), 35°C (▲) and 40°C (△) with 120 rpm in orbital shaker. Yeast grown in normal YPD and incubated at 30°C (●) was carried out as control. Values represent the means of three independent measurements. Error bars indicate the standard deviations of the means.

Ethanol, a primary metabolite, is produced in close association with the growth of yeast cells during fermentation. The decline in glucose was inversely related to an increase in ethanol content. The rate of ethanol production during the first 8 h of fermentation was dependent on the fermentation temperature, the highest being 40°C the ethanol production rate was the highest. However, after this point, a reduction in the rate of ethanol formation was observed. The reason for this is likely to be a result of a more efficient metabolic pathway, which can be induced by high temperature [23]. After the incubation period of 8 h the temperatures in decreasing order of ethanol production rates were 30, 35 and 40°C. The highest amount of ethanol formation from approximately 340 g/l of glucose by SC90 was observed at 35°C with 99.50 ± 8.40 g/l of ethanol in 60 h, followed by 30°C with 89.64 g/l in 48 h, and then at

40°C with 74.72 ± 1.99 g/l in 60 h. Our data suggested that fermentation temperature above 35°C might lead to an adverse effect on ethanol fermentation. This was supported by the work of Damore *et al.* [35], which reported that maximum ethanol fermentation by yeast required temperatures between 30 and 35°C. However, the results from this study were in disagreement with Jones and Ingledew [36], which reported that a peak of sugar utilization is observed at 20 and 25°C. In addition, an optimal temperature for VHG wheat mashes ethanol production supplemented with urea has been suggested at 27-30°C to obtain above 20% (v/v) ethanol within 55 h. The different results might be due to yeast strain dependence and the differences in fermentation media.

3.2.4 Cell Growth and Viability

Viable cell density of SC90 was shown in Fig. 7A. All fermentations were conducted with viable cell density of 3×10^7 cells/ml. The initial viability of SC90 was high at approximately 99%. A rapid increase in viable cell density during the first 8 h was observed for all conditions. However, cells grown at 35°C with the initial glucose concentration of 340 g/l appeared to have a longer lag period. Interestingly, the fermentation temperature of 40°C resulted in the highest growth rate after 4 h of incubation. The only exception was the sample with 20 g/l of glucose (control) incubated at 30°C for which the viable cell density remained static whereas the rate of VHG ethanol production at 30, 35, and 40°C incubation temperatures rapidly declined after 42, 16, and 4 h, respectively. It is worth noting that the cell viability for the four batch differencing fermentation temperatures was significantly different. The maximal viability was obtained at the initial glucose concentration of 20 g/l at 30°C with $98.88 \pm 1.16\%$ when the maximum of ethanol level was reached

(Fig. 7B). The viability of VHG fermentation remaining at 30, 35, and 40°C were 80.18 ± 4.43 , 40.49 ± 3.19 , and 25.81 ± 1.14 cells/ml, respectively (Fig. 7B). A shorter period of fermentation presented higher viability (data not shown) because less ethanol toxicity was exerted on yeast cell. The results indicated that high temperature had a negative impact on yeast cell viability. The impact was probably due to the damage to hydrogen bonding and hydrophobic interaction [37]. Furthermore temperature higher than 20°C induced a rapid reduction of cell viability at the end of fermentation, enzyme activity and membrane function might be disrupted under high temperature [38].

Our results suggested that a low initial concentration of glucose provided the highest viability (Fig. 7B), but lowest ethanol content was observed (Fig. 6). Under VHG at 30°C, high viability of yeast cells ($80.18 \pm 4.43\%$) was found and was accompanied by a high amount of ethanol content (85.79 ± 4.04 g/l), indicating the possibility that the yeast cells were reused for a consecutive batch fermentation process. The VHG ethanol fermentation in this current study indicated that the reduction in viability seemed to depend on fermentation temperature and ethanol concentration (Fig. 6). It was therefore indicated that two or more stress factors can occur simultaneously or in succession during fermentation. However, some stresses occur during fermentation in sequence rather than combination [16]. As in this study, the occurrence of high osmotic pressure from the substrate sugar at the beginning of fermentation steadily declines after a consequence of ethanol accumulation. D'Amore [39] reported that using high gravity substrate increased external osmotic pressure leading to cell dehydration and damage to plasma membrane ion gradients which result in a deterioration of viability, growth and fermentation performance. However, there

was no substrate inhibition in our study because the fermentation started with high viability of yeast cells, and they utilized glucose rapidly (Fig. 5).

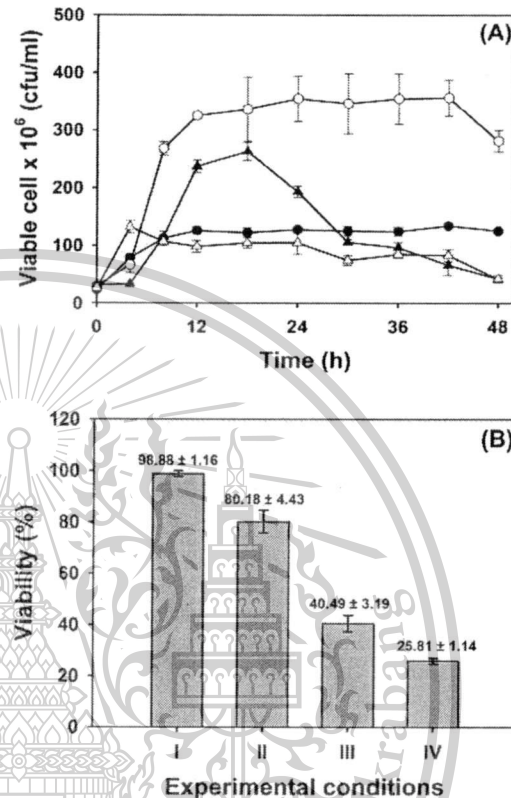


Fig.7. Viable cell count (A) and viability (B) of SC90 in YPD containing 340 g/l of glucose. Fermentations were initiated with a viable cell density of 3×10^7 cells/ml. Batch fermentations were conducted in 100 ml conical flasks and incubated in orbital shaker at 120 rpm and different fermentation temperatures (30°C (○), 35°C (▲) and 40°C (△)). The control (●) was YPD containing 20 g/l of glucose and incubated at 30°C in orbital shaker. Viability was calculated at time taken to reach maximum ethanol (Table 1). Values represent the means of three independent measurements. Error bars indicate the standard deviations of the means. Experimental condition I: 20 g/l glucose at 30°C; II: 340 g/l glucose at 30°C; III: 340 g/l glucose at 35°C; IV: 340 g/l glucose at 40°C.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Ethanol is normally generated and accumulated in the broth after osmotic stress decreases. The data demonstrated that the accumulation of ethanol content of up to 85.79 g/l at 30°C had no significant effect on cell viability during 48 h. It might be implied that the industrial yeast strain SC90 is able to tolerate an ethanol level of up to 85.79 g/l at 30°C. Our result is in agreement with Deesuth *et al.* [40] who reported that *S. cerevisiae* NP01 can withstand up to 93 g/l of ethanol at 30°C. However, a reduction in cell viability of this study occurred during fermentations conducted at high temperature (35 and 40°C) with ethanol content exceeding 70 g/l (Fig. 6 and 7B).

Ethanol, a toxic metabolite, exerts in cells at cellular levels by modifying the fluidity of plasma membrane, destroying various membrane structures of yeast cells [41] as well as denaturing proteins [42]. This results in a strong inhibition on yeast cell growth and no more than 13% (v/v) ethanol production [43]. Several authors stated that the reduction in yeast viability is due to a massive leakage of intracellular metabolites when ethanol levels in the broth reach 10% (v/v) or more [44, 45]. This level of ethanol not only impairs plasma membrane integrity but also induces the formation of heat shock proteins (hsps) [46, 47].

Apart from osmotic stress and ethanol toxicity, temperature, a physical stress, is considered to be another crucial stress that can affect cell growth and fermentation performance in terms of viability, the length of lag period, enzyme activity, membrane function, and the rate of ethanol production [38, 48]. During ethanol production, yeast also generates heat [49]. Therefore, it confronts dual stresses of ethanol and temperature as shown in Fig. 7B. Our results of spot plate and fermentation test indicated that both ethanol and temperature induced a reduction in

yeast cell viability. It can be said that ethanol and temperature have a synergistic effect [50] resulting in similar effects on yeast cells, such as an inhibition of the glycolysis pathway, an increase in membrane permeability, a reduction of proton motive force and intracellular pH, consequently leading to a reduction in fermentation rates [51]. In addition, Jones and Ingledew [36] concluded that increasing temperature exacerbates the toxicity of ethanol on cell lysis.

3.2.5 Kinetic Parameters of Ethanol Fermentation

Fermentation temperature is one of several factors that have been proposed to influence the efficiency of ethanol production. The effect of temperature on kinetic parameters associated with ethanol production was assessed. The maximum rate of glucose utilization, the ethanol yield, the volumetric productivity, and the fermentation efficiency were calculated and were presented in Table 1.

Increasing concentrations of glucose resulted in a higher rate of glucose utilization, ethanol concentrations, and volumetric productivity. However, ethanol yield and fermentation efficiency decreased inversely with increasing glucose concentration in the media. Our result has demonstrated that ethanol content was enhanced with increasing fermentation temperature providing this did not exceed 35°C. Furthermore, at temperature higher than 35°C, ethanol levels decreased thus showing negative effects on fermentation efficiency with the reduction of almost all kinetic parameters.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Table1. Kinetic parameters for SC90 under different fermentation temperatures.

Experimental conditions	Time taken to reach maximum ethanol (h)	Rate of glucose utilization (g/l.h)	Residual glucose (g/l)	Ethanol concentration (g/l)	Ethanol yield ($Y_{P/S}$ g/g)	Volumetric productivity ($g_p/l.h$)	Fermentation efficiency (%)
I	8	2.29±0.04 ^a	1.24±0.05	7.42±0.36	0.41±0.02 ^c	0.93±0.05 ^a	79.49±4.75 ^c
II	36	9.22±0.39 ^c	3.30±0.09	85.79±4.04	0.26±0.01 ^a	2.38±0.11 ^c	50.61±1.18 ^a
III	36	8.99±0.30 ^c	21.13±1.18	97.03±4.45	0.30±0.02 ^b	2.70±0.12 ^c	58.77±4.25 ^b
IV	48	6.35±0.19 ^b	39.35±0.39	73.26±2.45	0.24±0.01 ^a	1.53±0.05 ^b	47.07±1.51 ^a

Mean values in each column with different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$).

All values are expressed as means \pm standard deviation ($n=3$). Residue glucose was calculated at the end of fermentation. Experimental condition I: 20 g/l of glucose concentration at 30°C; II: 340 g/l of glucose concentration at 30°C; III: 340 g/l of glucose concentration at 35°C; IV: 340 g/l of glucose concentration at 40°C.

Under VHG, attenuation time which is time taken to reach a peak level of ethanol might depend on fermentation temperature and ethanol concentration. Fermentation temperature at 40°C presented more residual glucose compared to lower temperatures. Ethanol yield depended on the sugar feed in the fermentation system. The value of 0.24-0.41 g/g for four batch fermentations were achieved which is equivalent to 47.07-79.49% of the theoretical concentration of ethanol in stoichiometric yields of 0.511 [52]. The impact of fermentation temperature under VHG conditions in this study implied that the maximal concentration of ethanol was seen at 35°C at 97.03 ± 4.45 g/l and volumetric productivity of 2.70 g/l.h while the corresponding low viability was $40.49 \pm 3.19\%$ (Fig. 9B). Other optimum temperatures for bioethanol production were reported. Slaa *et al.* [53] produced ethanol from 18% of D-glucose by baker's yeast with the optimum temperature at 35°C. Liu and Shen [33] reported that the optimum temperature for ethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum using immobilized *S. cerevisiae* CICC1308 was 37°C with an ethanol yield of 89.89%. Deesuth *et al.* [40] concluded that ethanol formation was dependent on temperature, strain, and medium for fermentation. Normally, industrial

bioethanol product applies reused yeast cells for a consecutive batch fermentation process. Therefore, high viability of yeast cells with high ethanol content has been considered. According to this current research, it was suggested that fermentation temperature should be at 30°C in order to prevent drops in viability due to the ethanol induced lethality of increasing amounts of ethanol produced by the yeast cells. Laluec *et al.* [54] stated that the lowering of the process temperature is therefore recommended in order to minimize cell mortality and maintain high levels of ethanol production when the temperature is increasing in an industrial reactor. However, a low fermentation temperature may result in a longer fermentation period and an increase in cooling cost.

Apart from ethanol and CO₂, main products, yeast cells assimilate sugar to produce cell biomass, organic acids, glycerol, higher alcohols, esters, acetaldehyde and volatile sulphur compounds [55, 56]. Therefore percentage fermentation efficiency of ethanol production in Table 1 is less than 100%. In addition, some of the glucose might be taken to produce storage carbohydrates such as glycogen and trehalose. The former provides carbon and energy for cellular maintenance functions [57, 58] whereas the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

later serves as a cell protectant [59-61]. However, in this study the amount of glycogen and trehalose has been not examined. Further study will therefore consider both of these storage carbohydrates.

4. Conclusion

Increasing fermentation temperature is one of the promising methods to improve yeast fermentation performance under very high gravity fermentation. However, our results revealed that the temperature should not be above 35°C. Keeping temperature at this level appeared to enhance fermentation rate but also reduced the capacity of the cells to tolerate ethanol. Loss of cell viability was due to the negative effect of osmotic stress at the beginning of fermentation and was a consequence of ethanol accumulation, which together with temperature had a synergistic effect. In terms of kinetic parameters (we used ethanol yield, volumetric productivity, and fermentation efficiency as selective markers), the optimum temperature for VHG ethanol production using SC90 was 35°C. After maximum ethanol content was obtained, fermentations conducted at above 30°C presented a lower remaining percentage viability. Therefore, the remaining percentage viability after complete fermentation was indicated the ability of yeast to ethanol and high temperature tolerance. Further study on VHG ethanol production process need to be explored to improve the fermentation efficiency similar to that in normal gravity ethanol production including the fed-batch fermentation process [62], nutrient supplementations [40, 45, 63-65], the use of high cell densities [54, 64, 66], and yeast adaptation for stress tolerance [67].

5. Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge funding of this research by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Research Fund, Thailand. We also acknowledge Central Scientific Instrument Center (CSIC), Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Thailand for kindly supporting the use of their GC.

6. References

- [1] Zaldivar, J., Nielsen, J. and Olsson, L., Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration, *Appl. Microbiol. Biot.*, Vol. 56, pp. 17-34, 2001.
- [2] Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H.C., Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour. Conserv. Recy.*, Vol. 50, pp. 1-39, 2007.
- [3] Sánchez, O.J. and Cardona, C.A., Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresour. Technol.*, Vol. 99, pp. 5270-5295, 2008.
- [4] Leiper, K.A., Schlee, C., Tebble, I. and Stewart, G.G., The fermentation of beet sugar syrup to produce bioethanol. *J. I. Brewing*, Vol. 112, No. 2, pp. 122-133, 2006.
- [5] Purwadi, R., Brondberg, T. and Taherzadeh, M.J., A possible industrial solution to ferment lignocellulosic hydrolyzate to ethanol: continuous cultivation with flocculating yeast. *Int. J. Mol. Sci.*, Vol. 8, pp. 920-932, 2007.
- [6] Demirbaş, A. Progress and recent trends in biofuels. *Prog. Energ. Combust.*, Vol. 33, pp. 1-18, 2007.
- [7] Gray, K.A., Zhao, L. and Emptage, M., *Bioethanol. Curr. Opin. Chem. Biol.*, Vol. 10, pp. 141-146, 2006.
- [8] Kosaric, N. and Vardar-Sukan, F., Microbiology and biochemistry of ethanol formation. In: *The Biotechnology of Ethanol Classic and Future Application*, (Ed. M. Roehr)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Wiley-Vch, NewYork, pp. 90-106, 2001.
- [9] Erten, H., Tanguler, H. and Cariroz, H., The effect of pitching rate on fermentation and flavour compounds in high gravity brewing. *J. Inst. Brew.*, Vol. 113, pp. 75-79, 2007.
- [10] Puligundla, P., Smogrovicova, D., Sarathi, V., Obulam, R. and Ko, S., Very high gravity (VHG) ethanolic brewing and fermentation: a research update. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 38, pp. 1133-1144, 2011.
- [11] Li, C.G., Wang, N., Lin, Y.H. and Bai, F.W., Very high gravity ethanol fermentation by flocculating yeast under redox potential-controlled conditions. *Biotechnol. Biofuels*, Vol. 5, No. 61, pp. 1-7, 2012.
- [12] Laluece, C., Current aspects of fuel ethanol production in Brazil. *Crit. Rev. Biotechnol.*, Vol. 11, pp. 149-161, 1991.
- [13] Tyagi, R. D., Participation of oxygen in ethanol fermentations. *Process Biochem.*, Vol. 19, pp. 136-141, 1984.
- [14] Stewart, G., Fermentation of high gravity worts – its influence on yeast metabolism and morphology. *Proceedings of the 28th Congress of the European Brewery Convention*, Budapest, Hungary, pp. 336-341, 2001.
- [15] Bafrncová, P., Šmogrovič ová, D., Sláviková, I., Pátková, J. and Dömény, Z., Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, Vol. 21, pp. 337-341, 1999.
- [16] Panchal, C.J. and Stewart, G.G., The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. *J. Inst. Brew.*, Vol. 86, pp. 207-210, 1980.
- [17] Kosaric, N., Duvnjak, Z. and Stewart, G.C. Fuel ethanol from biomass: production, economics, and energy. *Adv. Biochem. Eng.* Vol. 20, pp. 126-128, 1981.
- [18] Lee, K.J., Skotnicki, M.L., Tribe, D.E. and Rogers, P.L., The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by strains of *Zymomonas mobilis*. *Biotechnol. Lett.*, Vol. 3, pp. 291-296, 1981.
- [19] Banat, I.M., Nigam, P., Singh, D., Marchantand, R. and Mchale, A.P., Review: ethanol production at elevated temperatures and alcohol concentrations: Part I – yeasts in general. *World J. Microb. Biot.*, Vol. 14, pp. 809-821, 1998.
- [20] Thomas, K.C., Hynes, S.H., Jones, A.M. and Ingledew, W.M., Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology: effect of sugar concentration and fermentation temperature. *Appl. Biochem. Biotech.*, Vol. 43, pp. 211-226, 1993.
- [21] Bai, F.W. and Zhao, X.O., Mechanisms of yeast stress tolerance and its manipulation for efficient fuel ethanol production. *J. Biotechnol.*, Vol. 144, pp. 23-30, 2009.
- [22] Bai, F.W. and Zhao, X.O. Zinc and yeast stress tolerance: micronutrient plays a big role. *J. Biotechnol*, Vol. 158, pp. 176-183, 2012.
- [23] Rao, L.V. and Pasha, C., Evaluation of thermotolerant mechanism in thermotolerant yeast for ethanol production. In: *Microbial Diversity Current Perspectives and Potential Application*, (Eds. T. Satyanarayana and B. N. Johri) I.K. International Publishing House Pvt. Ltd, New Delhi, pp. 881-898, 2005.
- [24] Serra, A., Strehaiano, P. and Taillandier, P., Influence of temperature and pH on *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* growth; impact of a wine yeast.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- interspecific hybridization on these parameters. *Int. J. Food. Microbiol.*, Vol. 104, pp. 257–265, 2005.
- [25] Fonseca, G.G., Heinzle, E., Wittmann, C. and Gombert, A.K., The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 79, pp. 339–354, 2008.
- [26] Jakobsen, T. and Lie, S., Chelators in beer. *J. Inst. Brew.*, Vol. 88, pp. 387–389, 1982.
- [27] Äyräpää, T., Monitoring of Fermentation by Weighing of the Vessel. *J. Inst. Brew.*, Vol. 79, pp. 274, 1973.
- [28] Smart, K.A., Chambers K.M., Lambert, I. and Jenkins, C., Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, Vol. 57, pp. 18-23, 1999.
- [29] Miller, G.L., Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.*, Vol. 31, pp. 426-428, 1959.
- [30] Carrasco, P., Querol, A. and del Olmo, M., Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch. Microbiol.*, Vol. 175, pp. 450–457, 2001.
- [31] Salmon, J.M. and Maurico, J.C., Relationship between sugar uptake kinetics and total sugar consumption in different industrial *Saccharomyces cerevisiae* strains during alcohol fermentation. *Biotechnol. Lett.*, Vol. 16, pp. 89–94, 1994.
- [32] Krouwel, P.G. and Braber, L., Ethanol production by yeast at supra optimal temperatures. *Biotechnol. Lett.*, Vol. 1, pp. 403-408, 1979.
- [33] Liu, R. and Shen, F., Impact of main factors on bioethanol fermentation from stalk juice of sweet sorghum by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* (CICC 1308). *Bioresour. Technol.*, Vol. 99, pp. 847–854, 2008.
- [34] Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Boulton, C.A., Box, W.G., Graham, N.S., Linforth, R.S.T. and Smart, K.A., The oxidative stress response of a lager brewing yeast strain during industrial propagation and fermentation. *FEMS Yeast Res.*, Vol. 8, pp. 574-585, 2008.
- [35] D'Amore, T., Celotto, G., Russell, I. and Stewart, G.G., Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. *Enzyme. Microb. Technol.*, Vol. 11, pp. 411–416, 1989.
- [36] Jones, A.M. and Ingledew, W.M., Fuel alcohol production: optimization of temperature for efficient very-high-gravity fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 60, pp. 1048–1051, 1994.
- [37] Walker, G.M., *Yeast: physiology and biotechnology*, Wiley, New York, 1998.
- [38] Şener, A., Canbaş, A. and Ünal, Ü.M., The effect of fermentation temperature on the growth kinetics of wine yeast species. *Turk. J. Agric. Forest*, Vol. 31, pp. 349–354, 2007.
- [39] D'Amore, T., Improving yeast fermentation performance. *J. Inst. Brew.*, Vol. 98, pp. 375-382, 1992.
- [40] Deesuth, O., Laopaiboon, P., Jaisil, P. and Laopaiboon, L., Optimization of nitrogen and metal ions supplementation for very high gravity bioethanol fermentation from sweet sorghum juice using an orthogonal array design. *Energies*, Vol. 5, pp. 3178-3197, 2012.
- [41] Casey, G.P. and Ingledew, W.M., Ethanol tolerance in yeasts. *Crit. Rev. Microbiol.*, Vol. 13, pp. 219–280, 1986.
- [42] Ding, J., Huang, X., Zhang, L., Zhao, N., Yang, D. and Zhang, K., Tolerance and stress response to ethanol in the yeast. *Appl. Microbiol.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Biotechnol., Vol. 85, No. 2, pp. 253-263, 2009.
- [43] Bai, F.W., Chen, L.J., Zhang, Z., Anderson, W.A. and Moo-Young, M., Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J. Biotechnol.*, Vol. 110, pp. 287-293, 2004.
- [44] Petrov, V.V. and Okorokov, L.A., Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its de-energization. *Yeast*, Vol. 6, pp. 311-318, 1990.
- [45] Cot, M., Loret, M., François J. and Benbadis, L., Physiological behavior of *Saccharomyces cerevisiae* in aerated fed-batch fermentation for high level production of bioethanol. *FEMS Yeast Rev.*, Vol. 7, pp. 22-32, 2007.
- [46] Piper, P.W., Talreja, K., Panaretou, B., Moradas-ferreira, P., Byrne, K., Praekelt, U.M., Meacock, P., Récnacq, M. and Boucherie, H., Induction of major heat-shock proteins of *Saccharomyces cerevisiae*, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold. *Microbiology*, Vol. 140, pp. 3031-3038, 1994.
- [47] Hallsworth, J.E., Ethanol induced water stress in Yeast. *J. Ferment. Bioeng.*, Vol. 85, pp. 125-137, 1998.
- [48] Pratt-Marshall, P. L., Brey, S. E., de Costa, S. D., Bryce, J. H. and Stewart, G. G., High gravity brewing – an inducer of yeast stress. *Brewers' Guardian*, Vol. 131, pp. 22-26, 2002.
- [49] Briggs, D.E., Boulton, C.A., Brookes, P.A. and Stevens, R., *Brewing Science and Practice*. Woodhead, Cambridge, 2004.
- [50] Casey, G.P., Magnus, C.A. and Ingledew, W.M., High-gravity brewing: effects of nutrition on yeast composition, fermentative ability and alcohol production. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 48, pp. 639-646, 1984.
- [51] Piper, P.W., The heat shock and ethanol stress responses of yeast exhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS Microbiol. Lett.*, Vol. 134, pp. 121-127, 1995.
- [52] Borzani, W., Batch ethanol fermentation: the correlation between the fermentation efficiency and the biomass initial concentration depends on what is considered as produced ethanol. *Braz. J. Microbiol.*, Vol. 37, pp. 87-89, 2006.
- [53] Slaa, J., Gnode, M., and Else, H., Yeast and fermentation: the optimum temperature. *J. Org. Chem.*, 134, pp. a-c, 2009.
- [54] Lalue, C., Tognolli, J.O., de Oliveira, K.F., Souza, C.S. and Morais, M.R., Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability. *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 83, pp. 627-637, 2009.
- [55] Ingledew, W.M., Yeasts for production of fuel ethanol. In: *The Yeasts*, vol. 5, (Eds. A.H. Rose and J.S. Harrison), Academic Press, London, pp. 245-291, 1993.
- [56] Boulton, C. and Quain, D., The biochemistry of fermentation. In: *Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Science, Oxford, pp. 69-142, 2006.
- [57] Quain, D.E. and Tubb, R.S., The importance of glycogen in brewing yeasts. *MBAA. TQ.*, Vol. 19, pp. 29-33, 1982.
- [58] Novo, M.T., Beltran, G., Torija, M.J, Poblet, M., Rozès, N., Guillamón, J.M. and Mas, A., Changes in wine yeast storage carbohydrate levels

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- during pre adaptation, rehydration and low temperature fermentations. *Int. J. Food. Microbiol.*, Vol. 86, pp. 153–161, 2003.
- [59] Crowe, J.H., Crowe, L.M. and Chapman, D., Preservation of membranes in a hydrobiotic organism: the role of trehalose. *Science*, Vol. 223, pp. 701-703, 1984.
- [60] Iwahashi, H., Obuchi, K., Fujii, S. and Komatsu, Y., The correlative evidence suggesting that trehalose stabilized membrane structure in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell. Mol. Biol.*, Vol. 41, pp. 763-769, 1995.
- [61] Crowe, J.H., Crowe, L.M., Oliver, A.E., Tsvetkova, N., Wolkers, W. and Tablin, F., The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry State. *Cryobiology*, Vol. 43, pp. 89–105, 2001.
- [62] Lin, Y.H., Chien, W.S., Duan, K.J. and Chang, P.R., Effect of aeration timing and interval during very-high-gravity ethanol fermentation. *Process Biochem.*, Vol. 46, No. 4, 1025-1028, 2011.
- [63] Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet, S.E., Uribelarrea, J.L., Goma, G. and Benbadis, L., Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 60, pp. 67–72, 2002.
- [64] Mukhtar, K., Asgher, M., Afghan, S., Hussain, K. and Zia-Ul-Hussnain, S., Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on Industrial Scale. *J. Biomed. Biotechnol.*, Vol. 2010, pp. 1-5, 2010.
- [65] Chunkeng, H., Qing, Q. and Peipei, G., Medium optimization for improved ethanol production in very high gravity fermentation. *Biotechnol. Bioeng. Chin. J. Chem. Eng.*, Vol. 19, No. 6, pp. 1017-1022, 2011.
- [66] Nguyen, T.H. and Viet Man, L.V., 2009. Using high pitching rate for improvement of yeast fermentation performance in high gravity brewing. *International Food Research Journal*, Vol. 16, pp. 547-554, 2009.
- [67] Logothetis, S., Nerantzis, E.T., Gioulioti, A., Kanelis, T., Panagiotis, T. and Walker, G., Influence of sodium chloride on wine yeast fermentation performance. *International Journal of Wine Research*, Vol. 2, pp. 35–42, 2010.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

The logo of King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang is a circular emblem. It features a central sunburst with rays emanating from a central point. Below the sunburst are two traditional Thai stupas (chedis) flanking a central, more ornate structure. The entire emblem is surrounded by a decorative border. The text 'King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang' is written around the perimeter of the circle.

ภาคผนวก ก-3

Adaptation of commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

Author's Accepted Manuscript

Adaptation of Commercial Yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to Tolerate Inhibitors Generated During Cassava Pulp Hydrolysis

Soisuda Pornpukdeewattana, Jinnicha Khamfun, and
Narinthorn Phatyenchai

Reference: **SCI1403697**
www: <http://ird.sut.ac.th/e-journal/Journal/pdf/1403697.pdf>
To appear in: Suranaree Journal of Science and Technology
ISSN: 0858-849X
Received date: February 15, 2014
Revised date: May 17, 2014
Accepted date: May 27, 2014

Cite this article as:

Chankaew, S. and Charoenlarnopparat, C. (2014). Two-Dimensional Finite Impulse Response Zero-Phase Design Based on a Non-Uniform Frequency Sampling Method. Suranaree J. Sci. Technol. Available from: <http://ird.sut.ac.th/e-journal/Journal/pdf/1403697.pdf>.

This is an early version of an unedited manuscript that has been accepted for publication. The manuscript will undergo copyediting and review of the resulting galley proof before it is published in its final form.

It should be noted that, during the production process, errors may be found which may affect the content. All disclaimers relating to the opinions and statements contained in the journal remain in force.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ADAPTATION OF COMMERCIAL YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SC90 TO TOLERATE INHIBITORS GENERATED DURING CASSAVA PULP HYDROLYSIS

Running head: Adaptation of yeast *S. cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors

Soisuda Pornpukdeewattana*, Jinnicha Khamfun, and
Narinthorn Phatyenchai

Faculty of Agro-Industry, KingMongkut's Institute of Technology Ladkrabang,
Ladkrabang, Bangkok, 10520, Thailand. Tel. 0-2329-8526 ext 7251; Fax.0-2329-
8527; E-mail: kpsoisud@kmitl.ac.th

* Corresponding author

Abstract

The pretreatment step of cellulosic ethanol production generates inhibitory compounds that affect the performance of fermenting microorganisms, and subsequently causes reductions in ethanol yield and productivity. Several researches in ethanol production from second generation feedstock have therefore focused on the detoxification of inhibitors to increase the efficiency of the ethanol production. The adaptation of the microorganisms to inhibitors presented in raw material hydrolysate is one of the biotechnology routes to improve ethanol yield without any detoxification treatments. The purpose of this work was to adapt *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to improve its ability to ferment toxic cassava pulp hydrolysate pretreated with diluted acid (1 N HCl). The initial total sugar of cassava pulp hydrolysate was 49.79 ± 0.76 g/l. The 20, 40, 60, 80, 100% (v/v) of hydrolysate were prepared from the initial cassava pulp hydrolysate for the adaptation procedure. The total sugar concentration in all the diluted hydrolysate was adjusted to 50 g/l using glucose and supplemented with 1 g/l yeast extract, 2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5 g/l KH_2PO_4 , and 1 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ and the pH was adjusted to 5.5. The yeast cells were subcultured twice in the same hydrolysate dilution before similar numbers of initial cells were transferred to a more concentrated hydrolysate. Adapted yeast cells from 100% (v/v) of hydrolysate supplemented with nutrient sources and non-adapted cells (the control) were investigated. The growth and fermentation potentials were compared. The adapted cells showed an improvement in sugar utilization and cell viability compared with those of the non-adapted cells. Consequently, the ethanol yield of the adapted cells was improved. These results indicated that the adaptation of the yeast

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

cells to overcome the inhibitory effects of the lignocellulosic hydrolysate could improve the productivity and ethanol yield.

Keywords: adaptation, cassava pulp hydrolysis, inhibitors, *Saccharomyces cerevisiae*, tolerate

Introduction

The rapid increase in energy demand, excessive consumption of fossil fuels, and the limitation of global crude oil reserves need to be confronted. The utilization of fossil fuels has resulted in a negative impact on the environment (Sánchez and Cardona, 2008). Alternative energetic resources have therefore been considered. Bioethanol, a clean and renewable biofuel, is thought to be one of the best alternatives (Zaldivar *et al.*, 2001). With regard to food security and sustainability, current research on bioethanol production has been remarkably focused on non-food lignocellulosic waste products as an environmentally-friendly, potentially inexpensive, and more abundant alternative feedstock to fossil fuels (Wyman and Goodman, 1993). Lignocellulosic biomass consists of 3 major constituents: cellulose, hemicelluloses, and lignin. Hemicelluloses are comprised of long chains of pentose sugars. Cellulose is composed of long chain glucose molecules and it is encapsulated by lignin. Therefore, these cellulosic materials are more difficult to hydrolyse than starch (Demirbaş, 2005). Cassava pulp represents one of the major lignocellulosic materials to be considered in most tropical countries on account of the high amount of starch on a dry weight basis (approximately 50-70%) but low cellulose fiber (approximately 20-30%) (Pandey *et al.*, 2000). It is readily available at the cassava starch site as a fibrous by-product (Kosugi *et al.*, 2009). This underused biomass has been evaluated for producing other value added bioproducts as well as biofuels.

Due to the structural characteristics of the lignocellulosic materials, a pretreatment step is crucial for obtaining potentially fermentable sugars in the hydrolysis step. It aims to break down complex structures to be a simple molecule of pentoses (xylose and arabinose) and hexoses (glucose, galactose, and mannose) and then ethanologenic microorganisms, usually yeast, can convert these sugars into ethanol (Leiper *et al.*, 2006). The widely used pretreatment methods are steam explosion and acid hydrolysis. However, these methods result in the generation of toxic compounds that have deleterious effects on yeast cell growth and fermentation efficiency (Martín *et al.*, 2006; Tomás-Pejo *et al.*, 2010). Recent works have shown that the removal or detoxification of the inhibitors' toxicity including phenols, 5-hydroxy methylfurfural (5-HMF), furfural, and organic acids (Kahr *et al.*, 2011) prior to its use as a fermentation medium improved ethanol productivity and yield (Martín *et al.*, 2006). Nevertheless, the process is considered to limit the requirements for detoxification to a minimum for economic reasons (von Sivers *et al.*, 1994) and the sugar losses may be significant according to the detoxification method used (Mussatto and Roberto, 2004). Microbial adaptation to inhibitor tolerance is therefore an alternative choice to overcome this problem (Chandel *et al.*, 2011). Landaeta *et al.* (2013) minimized

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

the negative effects of chemical inhibitors found in lignocellulosic hydrolysates such as acetic acid, furfural, hydroxyl methyl furfural, vanillin, syringaldehyde, and hydroxyl benzoic acid by acclimatization of a flocculent strain of *Saccharomyces cerevisiae* (NRRL Y-265) to a sequentially increased concentration of inhibitory compounds. By this strategy a yeast strain with an increased ethanol volumetric productivity and growth rate over the parental strain was obtained. The adaptation of *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 to wheat straw hydrolysates showed an improved ethanol yield (Nigam, 2001). In addition, *P. stipitis* employed on a steam-stripped hardwood hydrolysate improved ethanol production with more than 90% xylose utilization compared with steam-unstripped hardwood hydrolysate (Parekh *et al.*, 1987). Furthermore, adaptation of *Candida guilliermondii* employed on rice straw hemicellulose hydrolysate for xylitol production showed an effective and inexpensive method to alleviate the inhibitory effect of toxic compounds on the xylose to xylitol bioconversion (Silva and Roberto, 2001).

In this current study, the adaptation of the commercial yeast strain *S. cerevisiae* SC90 to inhibitory compounds generated during the pretreatment process was performed using sequential adaptation in order to improve the laboratory scale of ethanol production from cassava pulp hydrolysis. Experiments were conducted to compare the adapted cells from 100% (v/v) of hydrolysate supplemented with nutrients and the non-adapted cells (the control) in growth and fermentation potentials.

Materials and Methods

Strain, medium, and culture conditions

The commercial yeast strain, *S. cerevisiae* SC90, obtained from the Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Kasetsart University, Bangkok has already been used for ethanol production on an industrial scale by several alcoholic beverage factories in Thailand. The strain was maintained and grown on yeast extract peptone dextrose (YPD) containing 20 g/l neutralised bacteriological peptone, 10 g/l yeast extract, and 20 g/l glucose. Agar 20g/l was added when solid media were required. A starter culture was obtained by inoculating the yeast from the YPD slope into 10 ml of the YPD medium. This was incubated in an orbital shaker at 120 rpm and 30°C for 48 h. An aliquot of 10 ml was then transferred to a 250 ml baffle flask containing 100 ml of fresh YPD and incubated as stated above.

Pretreatment of cassava pulp

Cassava pulp was obtained from S.C. Industry Co. Ltd., Chachengsao, Thailand. It was dried and milled before use. The cassava pulp for adaptation was prepared by pretreating 100 g of cassava pulp with 900 ml of diluted acid (1 N HCl) and a steam explosion at 132°C for 1 h. The 100% (v/v) of hydrolysate supplemented with 1 g/l yeast extract, 2 g/l (NH₄)₂SO₄, 0.5 g/l KH₂PO₄, and 1 g/l MgSO₄·7H₂O was the initial. The pH was adjusted to 5.5. The hydrolysates were

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

diluted to 20, 40, 60, 80% (v/v) with distilled water and glucose was added to all diluted hydrolysates to adjust the total sugar concentration similar to that in 100% (v/v) of hydrolysate. The other nutrients were supplemented similar to the 100% hydrolysate (Tomás-Pejo *et al.*, 2010). The media were sterilized at 121°C for 15 min.

Adaptation procedure

The strain was pre-grown in YPD medium. Cells were incubated in an orbital shaker at 30°C and 120 rpm for 48 h. A direct adaptation method was modified from Tomás-Pejo *et al.* (2010). Five sequentially different media with an increasing inhibitor concentration were prepared (Figure 1). The medium was inoculated with *S. cerevisiae* SC90 to achieve an initial cell concentration of 3×10^7 cfu/ml. Yeast cells were subcultured twice after 48 h in the same hydrolysate concentration before a similar number of initial cells were transferred to a more concentrated hydrolysate (gradually increasing the concentration to 40%, 60%, 80%, and 100%). The adaptation procedure was carried out in a laboratory scale fermentation using a conical flask with an air lock on an orbital shaker at 30°C and 120 rpm. All sequential adaptations were performed in triplicate. Cell growth and viability were examined. The obtained strain (SC90-5) was cultivated on YPD agar plates supplemented with 1 g/l furfural and 4 g/l acetic acid for maintenance and further evaluation, as recommended by Landaeta *et al.* (2013).

The adapted cells and the non-adapted cells (the control) fermentations were carried out in 100% (v/v) of hydrolysate with the same conditions as the adaptation procedure. Samples were collected to investigate growth, total sugar utilization, and ethanol contents. The data set was calculated for presentation in terms of the kinetic parameters.

Analysis of fermentation substrates and products

Viable cell counts: Cell suspensions were diluted to an appropriate concentration and density was measured using a counting chamber and a standard light microscope. Viability was determined by mixing a volume of cell suspension with an equal volume of methylene blue solution (methylene blue dissolved in 2% (w/v) sodium citrate solution to a final concentration of 0.01% (w/v)). Unstained cells are assumed to be viable. The viability of the sample was expressed as a percentage. At least 500 cells were enumerated and calculated for the viability (Smart *et al.*, 1999).

Glucose utilization: Total sugar content was assessed using the phenol sulphuric method (Dubois *et al.*, 1956). The fermentation data set was calculated to the glucose utilization rate with the unit of glucose consumed in grams per hour.

Ethanol production: Ethanol concentration was determined by gas chromatography with a gas chromatographer mass spectrometer (SShimadzu GCMS-QP2010 Ultra, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan). Iso-propanal was used as the internal standard. Ethanol yields and percent theoretical yields were calculated using the following equations (Keating *et al.*, 2006):

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$$Y_{P/S} = \frac{[\text{EtOH}]_{\max}}{[\text{Sugar}]_{\text{ini}}} \quad (1)$$

$$Q = \frac{[\text{EtOH}]_{\max}}{\text{Attenuation time}} \quad (2)$$

$$Y_{\%T} = (Y_{P/S} \div 0.51) \times 100 \quad (3)$$

where $Y_{P/S}$ = ethanol yield (g/g), $[\text{EtOH}]_{\max}$ = maximum ethanol concentration achieved during fermentation (g/l), $[\text{Sugar}]_{\text{ini}}$ = total initial sugar concentration at onset of fermentation (g/l), Q = volumetric productivity (g/l/h), Attenuation time = time taken to reach maximum ethanol, $Y_{\%T}$ = percent theoretical yield (%), and 0.51 = theoretical maximum ethanol yield per unit of hexose sugar from glycolytic fermentation (g/g).

Statistical method

The mean and standard deviation of a data set was calculated using the AVERAGE and STDEV functions of Microsoft® Excel 2003. The presented results were expressed as the mean \pm STDEV obtained from 3 independent experiments and error bars correspond to the STDEV. Statistical analysis of data was conducted by analysis of variance: single factor at 95% confidence limits.

Results and Discussion

Pretreatment hydrolysis of cassava pulp using diluted acid and steam explosion

Cassava pulp, a solid by-product from the starch industry, is a promising and underused biomass that can be converted into valuable biofuels. Its dried basis is composed of 50-70% starch, 15.63% cellulose, 4.58% hemicellulose, and 2.83% lignin (Pandey *et al.*, 2000; Rattanachomsri *et al.*, 2009). Starch, cellulose, and hemicellulose can be converted to fermentable monomeric sugars in the pretreatment step. Pretreatment hydrolysate with 1N HCl at 132°C for 1 h contained 49.79 \pm 0.76 g/l total sugars. It was used to prepare the adaptation media. The concentration of total sugars in each hydrolysate dilution was adjusted to be around 50 g/l before hydrolysate sterilization. Sugars are found in biofuel production including hexose (sucrose, glucose, fructose, maltose, and galactose) and pentose (arabinose and xylose) (Prasad *et al.*, 2007). It was reported that hexose is the major sugar in the solid fraction of softwood, which was favorable for bioconversion to ethanol (Prasad *et al.*, 2007).

Cell growth in a series of concentration of inhibitors

Successful adaptation of yeasts to rice straw hemicellulose and softwood prehydrolysates has been reported and also that adapted strains performed with higher resistance to inhibitors compared with the parental strain (Keller *et al.*, 1998; Silva and Roberto, 2001). Nevertheless, adaptation of the commercial strain of *S. cerevisiae* SC90 to cassava pulp hydrolysate has not been reported previously.

Cell growth and viability under the sequential adaptation of each hydrolysate dilution was examined using methylene blue staining (Figure 2A and

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B). The data collected from the first run of each adaptation demonstrated that the maximum viable cell number was observed at 20% hydrolysate with $1.36 \pm 0.09 \times 10^8$ cfu/ml within 48 h compared with cell growth in normal YPD at $1.37 \pm 0.18 \times 10^8$ cfu/ml (data not shown). When a higher concentration of hydrolysate (80 and 100% hydrolysate) was used, yeast cells responded with an extended lag period of 4 h prior to cell growth. The growth rate of yeast cells confronted with higher inhibitor contents (40 and 60% hydrolysate) appeared to be lower with the final cell number of $5.31 \pm 0.2 \times 10^7$ to $5.33 \pm 0.24 \times 10^7$ cfu/ml. Moving to a higher concentration of inhibitors at 80 and 100% hydrolysate, cells have a longer lag period and the maximum cell number was $2.69 \pm 0.05 \times 10^7$ to $4.11 \pm 0.26 \times 10^7$ cfu/ml.

Thermochemical degradation of hemicellulose provides the majority of sugar monomers including xylose, mannose, galactose, and glucose which coincides with a number of inhibitory compounds that are toxic to the fermenting microorganism (Parawira and Tekere, 2011). Our results suggested that a concentration of hydrolysate exceeding 20% might contain a minimum amount of inhibitors that can cause injury to cells. The hydrolysate obtained in our research might be composed of furfural, 5-hydroxymethylfurfural (5-HMF), acetic acid, and formic acid which are generally found during dilute acid pretreatment. These toxic compounds affect overall cell physiology and often result in decreased viability, ethanol yield, and productivity (Chandel *et al.*, 2011; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000a), and the breakdown of DNA (Endo *et al.*, 2008). It was experimentally confirmed by Tian *et al.* (2009) that furfural and 5-HMF mainly affected the length of the lag phase during the initial part of the incubation process.

According to the current study, it was hard to improve cell growth in hydrolysate containing a high concentration of inhibitors. This yeast strain was not properly adapted to deal with the high number of inhibitors, which was also apparent from the relatively poor rate of cell growth in these hydrolysates. This is therefore a big challenge for further studies to enhance both cell density and viability.

Figure 2B presents the percentage viability of SC90 during sequential adaptation. The data collected from the first run of each adaptation showed that at 20% hydrolysate, viability declined from 100% to $97.80 \pm 1.08\%$. After the end of the second run, the cells were then transferred to 40% hydrolysate. At this condition, the cell viability seemed to be maintained at 84-86% throughout the fermentation period. Moving the cells from 40% hydrolysate to 60% hydrolysate surprisingly did not cause more cell death but higher cell viability was seen, even though a small amount of cell growth was found, as presented in Figure 2A. This was probably because the cell adaptation process of *S. cerevisiae* SC90 could occur during the extended lag phase when cells were confronted with a higher concentration of inhibitors presented in the cassava pulp hydrolysate. Once a culture is able to tolerate the inhibitors, active cell growth and metabolism will recover (Tian *et al.*, 2011). Acclimatization of the fermentative microorganisms to inhibitory compounds generated during the pretreatment process prior to

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

fermentation of lignocellulose hydrolysates is able to enhance product yields (Parawira and Tekere, 2011).

Hydrolysate fermentation performance of adapted cells and non-adapted cells

The adaptation procedure of the commercial yeast *S. cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during thermochemical hydrolysis of the cassava pulp was developed by sequential adaptation strategy. To evaluate this procedure, adapted cells from 5 series of adaptation and non-adapted cells were inoculated into 100% hydrolysate supplemented with a variety of nutrients and incubated at 120 rpm and 30°C for 72 h. Then growth and fermentation performance were compared.

Monitoring of cell growth

Viable cell counts and the viability of adapted cells and non-adapted cells (control) were examined (Figure 3). During the first 8 h of fermentation, there were small differences in the viable cell counts between the non-adapted and adapted cells. However, after 48 h, the cells grown in the 5 sequential adaptations demonstrated higher viable cell density than the non-adapted cells. The viable cell count of fermentation conducted with the adapted cells showed a maximum viable cell number at $4.35 \pm 0.11 \times 10^7$ cfu/ml at 42 h and then seemed to be stable until 72 h. However, the maximum viable cell count of the non-adapted cells appeared to be lower with a final cell number around $4.03 \pm 0.14 \times 10^7$ cfu/ml at 42 h and then it gradually declined to $3.57 \pm 0.12 \times 10^7$ cfu/ml at 72 h. A reduction in viability was observed according to the high content of fermentation inhibitors (Martín *et al.*, 2006), ethanol and CO₂ accumulation, and nutrient limitation (Gibson *et al.*, 2007). Our results suggested that adaptation led to an improvement of the evolved strain to be more tolerant to the toxic compounds present in the medium, as proved by better growth in the adapted cells. Liu (2009) has also shown that the adapted strain is able to withstand the inhibitor stress and that rapid cell growth after 42 h was observed, whereas the parental strain is unable to recover. The adapted strain displays an enriched genetic background with a significantly higher number of gene transcripts than the non-tolerant parental strain. In addition, the adapted strain might be able to reduce the toxic compounds by altering the chemical nature of the inhibitors in the hydrolysates (Martín *et al.*, 2006; Chandel *et al.*, 2011). For example, *S. cerevisiae* grown in anaerobic conditions is able to detoxify furans by reducing to its corresponding alcohol moieties (Mussatto and Roberto, 2004; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000b). *S. cerevisiae* partially metabolizes some of the phenolic compounds to its less toxic vinyl derivatives probably *via* phenylacrylic acid decarboxylase conversion of cinnamic, *p*-coumaric, and ferulic acids (Larsson *et al.*, 2000; Clausen *et al.*, 1994). Some *Saccharomyces* strains have the capability to transform 5-HMF to the less toxic 2,5-bis-hydroxymethyl-furan (Liu *et al.*, 2004) and cells metabolize 5-HMF by increasing the expression of the ADH6 (alcohol dehydrogenase 6) gene (Pettersson *et al.*, 2006). In addition, yeast expresses furan reductase to enhance the fermentation rate (Larsson *et al.*, 2001; Nilsson *et al.*, 2005). However, in this

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

current study the types and amounts of the inhibitors in the cassava pulp hydrolysate were not determined.

Sugar utilization and ethanol production

According to the rate of total sugar utilization in terms of glucose (Figure 4A), the adapted cells show a faster rate of sugar utilization compared with the non-adapted cells. Even though there are many kinds of toxic inhibitors generated during pretreatment of hemicelluloses hydrolysate, Keating *et al.* (2006) reported that furfural and acetic acid had little independent effect upon sugar consumption rates. After 36 h, the residual glucose was 11.04 ± 0.18 g/l in the fermentation with the adapted cells, whereas at 48 h of the fermentation period, a higher amount of glucose at 15.73 ± 0.62 g/l had still not been consumed by the non-adapted cells. Apart from the effect of toxicification of the inhibitors on the sugar consumption rate, there still seemed to be residual sugars in the process regarding unfermentable sugars, including xylose and arabinose (Dwivedi *et al.*, 2009) in which *S. cerevisiae* cannot metabolize. Figure 4B shows the ethanol content of the adapted and non-adapted cells determined by gas chromatography. Ethanol production by the adapted cells reached the highest content of 16.98 ± 1.13 g/l at 36 h. For the non-adapted cells, the maximum concentration of the ethanol produced was lower at 12.79 ± 1.04 g/l. It also took a longer time to reach the maximum ethanol concentration (48 h).

Kinetic parameters of adapted cells and non-adapted cells on ethanol production

Hydrolysate from pretreatment of diluted acid and steam exploded cassava pulp was used in the fermentation of the parental and adapted cells to compare the kinetic parameters of the attenuation time, rate of sugar utilization, residual sugar, ethanol concentration, ethanol yield, volumetric productivity, as well as fermentation efficiency (Table 1).

The non-adapted cells presented a poor fermentation performance compared with the adapted cells. It probably was due to the presence of biomass degradation by-products mainly furfural, acetic acid, and compounds from lignin and extractives (Clark and Mackie, 1984). The adapted cells significantly performed all kinetic parameters better than the non-adapted cells. This proved the success of the directed evolution with regard to improved sugar consumption rates. The higher amount of consumed glucose was reflected in higher fermentation efficiency. It was found that an improvement of 32.76, 20.00, 76.00, and 20.00% in ethanol content, ethanol yield, volumetric productivity, and fermentation efficiency, respectively, was achieved using the adapted cells. In addition, faster sugar utilization by the adapted cells suggested that the ability to tolerate and/or metabolize toxic inhibitors was enhanced (Keating *et al.*, 2006; Martín *et al.*, 2006; Tomás-Pejo *et al.*, 2010). Our results can be supported by the findings of other researches on adaptation of fermenting yeast to lignocellulosic hydrolysate for improving ethanol production, as presented in Table 1. Using sequential adaptation, yeast presents higher inhibitor tolerance which results in a higher rate of sugar utilization and finally improvement in ethanol fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

efficiency compared with the parental strain (non-adapted cells) (Martín *et al.*, 2006; Tomás-Pejo *et al.*, 2010; Landaeta *et al.*, 2013). Interestingly, the adapted cells in this current research which passed 5 runs of a series of adaptation and were then inoculated in 100% hydrolysate demonstrated an improvement in sugar utilization with a lower residual glucose compared with the non-adapted cells grown in 100% hydrolysate. This indicated that more runs of adaptation gave more improvements, as presented in the work of Keating *et al.* (2006) that showed only a mild improvement in the ethanologenic capacity *via* cell recycling.

Conclusions

Adaptation of the commercial ethanologenic strain of *S. cerevisiae* SC90 to cassava pulp hydrolysate with increasing concentrations of inhibitors provided further improvement in the fermentative competence with respect to higher glucose utilization rates, higher ethanol contents, and higher productivities than the non-adapted cells, which should be beneficial to economization. The results clearly indicate the great potential in using adaptation as an effective strategy for improving yeast tolerance to the toxic compounds in cassava pulp hydrolysate.

Acknowledgements

This work was funded by King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang Research Fund, Thailand. The authors are thankful to S.C. Industry Co. Ltd., Chachengsao, Thailand who kindly donated cassava pulp. We also acknowledge Central Scientific Instrument Center (CSIC), Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Thailand for kindly supporting the use of their gas chromatography.

References

- Chandel, A.K., da Silva, S.S., and Singh, O.V. (2011). Detoxification of lignocellulosic hydrolysates for improved bioethanol production. In: Biofuel Production - Recent Developments and Prospects. Bernardes, M.A. S. (ed). InTech, Rijeka, Croatia, p. 225-246.
- Clark, T.A. and Mackie, K.L. (1984). Fermentation inhibitors in wood hydrolysate derived from soft wood *Pinus radiata*. J. Chem. Technol. Biot., 34B:101-110.
- Clausen, M., Lamb, C.J., Megnet, R., and Doerner, P.W. (1994). PAD1 encodes phenylacrylic acid decarboxylase which confers resistance to cinnamic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 142:107-112.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Demirbaş, A. (2005). Bioethanol from cellulosic materials: a renewable motor fuel from biomass. *Energ. Source.*, 27:327-337.
- Dubois, M., Gilles, D.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. (1956). Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.*, 28:350-356.
- Dwivedi, P., Alavalapati, J.R.R., and Lal, P. (2009). Cellulosic ethanol production in the United States: Conversion technologies, current production status, economics, and emerging developments. *Energy Sustain. Dev.*, 13:174-182.
- Endo, A., Nakamura, T., Ando, A., Tokuyasu, K., and Shima, J. (2008). Genome-wide screening of the genes required for tolerance to vanillin, which is a potential inhibitor of bioethanol fermentation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels*, 1(1):3
- Gibson, B.R., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P., Powell, C.D., and Smart, K.A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.*, 31:535-569.
- Kahr, H., Helmberger, S., and Jäger, A.G. (2011). Yeast adaptation on the substrate straw. *Proceedings of the World Renewable Energy Congress; May 8-13, 2011; Linköping, Sweden*, p. 492-499.
- Keating, J.D., Panganiban C., and Mansfield, S.D. (2006). Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. *Biotechnol. Bioeng.*, 93(6):1,196-1,206.
- Keller, F.A., Bates, D., Ruiz, R., and Nguyen, Q. (1998). Yeast adaptation on softwood prehydrolysate. *Appl. Biochem. Biotech.*, 70-72: 137-148.
- Kosugi, A., Kondo, A., Ueda, M., Murata, Y., Vaithanomsat, P., Thanapase, W., Arai, T., and Mori, Y. (2009). Production of ethanol from cassava pulp via fermentation with a surface engineered yeast strain displaying glucoamylase. *Renew. Energ.*, 34(5):1,354-1,358.
- Landaeta, R., Aroca, G., Acevedo, F., Teixeira, J.A., and Mussatto, S.I. (2013). Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. *Appl. Energ.*, 102:124-130.
- Larsson, S., Nilvebrant, N.O., and Jonsson, L.J. (2001). Effect of overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* Pad1p on the resistance to phenylacrylic acids and lignocellulose hydrolysates under aerobic and oxygen-limited conditions. *Appl. Microbiol. Biot.*, 57(1-2):167-174.
- Larsson, S., Quintana-Sainz, A., Reimann, A., Nilvebrant, N.O., and Jonsson, L.J. (2000). Influence of lignocellulose-derived aromatic compounds on oxygen-limited growth and ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Biochem. Biotech.*, 84-86: 617-632.
- Leiper, K.A., Schlee, C., Tebble, I., and Stewart, G.G. (2006). The fermentation of beet sugar syrup to produce bioethanol. *J. I. Brewing.*, 112(2):122-133.
- Liu, Z.L. (2009). Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. *Mol. Genet. Genomics*, 282(3): 233-244.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Liu, Z.L., Slininger, P.J., Dien, B.S., Berhow, M.A., Kurtzman, C.P., and Gorsich, S.W. (2004). Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 31(8):345-352.
- Martín, C., Marcet, M., Almazán, O., and Jönsson, L.J. (2006). Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. *Bioresource Technol.*, 98:1767-1773.
- Mussatto, S.I. and Roberto, I.C. (2004). Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosichydrolyzates for use in fermentative processes: A review. *Bioresource Technol.*, 93(1):1-10.
- Nigam, J.N. (2001). Ethanol production from wheat straw hemicelluloses hydrolysate by *Pichiastipitis*. *J. Biotechnol.*, 87:17-27.
- Nilsson, A., Gorwa-Grauslund, M.F., Hahn-Hägerdal, B., and Lidén, G. (2005). Cofactor dependence in furan reduction by *Saccharomyces cerevisiae* in fermentation of acid-hydrolyzed lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.*, 71(12):7,866-7,871.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. (2000a). Fermentation of lignocellulosichydrolysates. I: inhibition and detoxification. *Bioresource Technol.*, 74:17-24.
- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. (2000b). Fermentation of lignocellulosichydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. *Bioresource Technol.*, 74:25-33.
- Pandey, A., Soccol, C.R., Nigam, P., Soccol, V.T., Vanderberghe, L.P.S., and Mohan, R. (2000). Biotechnological potential of agro-industrial residues. II: cassava bagasse. *Bioresource Technol.*, 74(1): 81-87.
- Parawira, W. and Tekere, M. (2011). Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 31:20-31.
- Parekh, S.R., Parekh, R.S., and Wayman, M. (1987). Fermentation of wood derived acid hydrolysates in a batch bioreactor and in a continuous dynamic immobilized cell bioreactor by *Pichia stipites*. *Proc. Biochem.*, 22:85-91.
- Petersson, A., Almeida, J.R., Modig, T., Karhumaa, K., Hahn-Hägerdal, B., Gorwa-Grauslund, M.F., and Lidén, G. (2006). A 5-hydroxymethyl furfural reducing enzyme encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* ADH6 gene conveys HMF tolerance. *Yeast*, 23(6):455-464.
- Prasad, S., Singh, A., and Joshi, H.C. (2007). Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resour. Conserv. Recy.*, 50:1-39.
- Rattanachomsri, U., Tanapongpipat, S., Eurwilaichitr, L., and Champreda, V. (2009). Simultaneous non-thermal saccharification of cassava pulp by multi-enzyme activity and ethanol fermentation by *Candida tropicalis*. *J. Biosci. Bioeng.*, 107:488-493.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sánchez, O. J. and Cardona, C. A. (2008). Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technol.*, 99(13):5,270-5,295.
- Silva, C.J.S.M. and Roberto, I.C. (2001). Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosichydrolysate. *Lett. Appl. Microbiol.*, 32:248-252.
- von Sivers, M., Zacchi, G., Olsson, L., and Hahn-Hägerdal, B. (1994). Cost analysis of ethanol production from willow using recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Progr.*, 10:556-560.
- Smart, K.A., Chambers K.M., Lambert, I., and Jenkins, C. (1999). Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 57:18-23.
- Tian, S., Zhou, G.X., Yan, F., Yu, Y., and Yang, X.S. (2009). Yeast strains for ethanol production from lignocellulosichydrolysates during in situ detoxification. *Biotechnol. Adv.*, 27:656-660.
- Tian, S., Zhu, J., and Yang, X. (2011). Evaluation of an adapted inhibitor-tolerant yeast strain for ethanol production from combined hydrolysate of softwood. *Appl. Energ.*, 88:1,792-1,796.
- Tomás-Pejo, E., Ballesteros, M., Oliva, J.M., and Olsson, L. (2010). Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 37:1,211-1,220.
- Wyman, C.E. and Goodman, B.J. (1993). Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass. *Appl. Biochem. Biotech.*, 39-40:41-59.
- Zaldivar, J., Nielsen, J., and Olsson, L. (2001). Fuel ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration, *Appl. Microbiol. Biot.*, 56:17-34.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Table 1. Summary of kinetic parameters for *S. cerevisiae* SC90

Conditions	Attenuation time (h)	Rate of sugar utilization (g/l/h)	Residual sugar (g/l)	Ethanol concentration (g/l)	Ethanol yield ($Y_{P/S}$ g/g)	Volumetric productivity ($Q_{p/l/h}$)	Fermentation efficiency ($Y_{\%T}$)
Non-adapted cells (the control)*	48	0.71 ± 0.02 ^a	15.73 ± 0.62 ^a	12.79 ± 1.04 ^a	0.35 ± 0.02 ^a	0.25 ± 0.01 ^a	68.49 ± 4.68 ^a
Adapted cells* (Present work)	36	1.07 ± 0.02 ^b	11.04 ± 0.18 ^b	16.98 ± 1.13 ^b	0.42 ± 0.03 ^b	0.44 ± 0.02 ^b	82.19 ± 5.14 ^b
Non-adapted cells	98	-	-	-	0.48	0.48	93.93
Adapted cells (andaeta <i>et al.</i> , 2013)	75	-	-	-	0.48	0.53	93.93
Non-adapted cells	140	-	-	21.80	0.23	0.16	44.00
Adapted cells (Tomás-Pejo <i>et al.</i> , 2010)	140	-	-	27.40	0.31	0.20	61.00
Non-adapted cells	36	-	-	-	0.38	0.23	74.36
Adapted cells (Martín <i>et al.</i> , 2006)	24	-	-	-	0.38	0.51	74.36

Mean values in each column with different letters indicate significant differences ($p \leq 0.05$). All values are expressed as means ± standard deviation ($n=3$). Attenuation time is time taken to reach maximum ethanol. Residue sugar is calculated at the attenuation time. * refers to this current research.

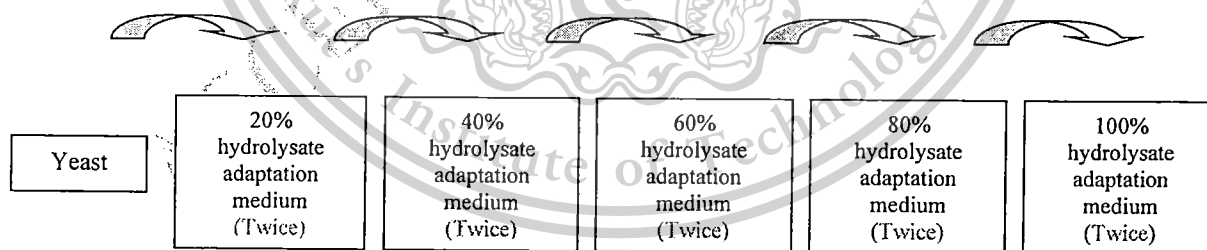


Figure1. Adaptation procedure of *S. cerevisiae* SC90 on cassava pulp hydrolysate pretreated by diluted acid and steam explosion. Adaptation was carried out in a laboratory scale fermentation on an orbital shaker at 30°C and 120 rpm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

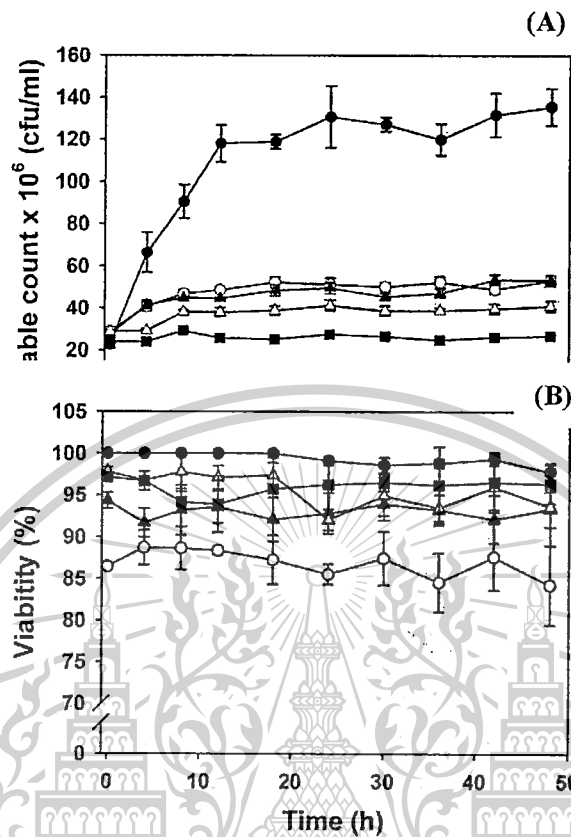


Figure 2. Viable cell count (A) and viability (B) of *S. cerevisiae* SC90 during 5 series of adaptation. The data collected from the first run of each adaptation is demonstrated. Yeast cells were subcultured twice at the same hydrolysate before transferring to a higher concentration of hydrolysate (20% hydrolysate, ●; 40% hydrolysate, ○; 60% hydrolysate, ▲; 80% hydrolysate, △; 100% hydrolysate, ■)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

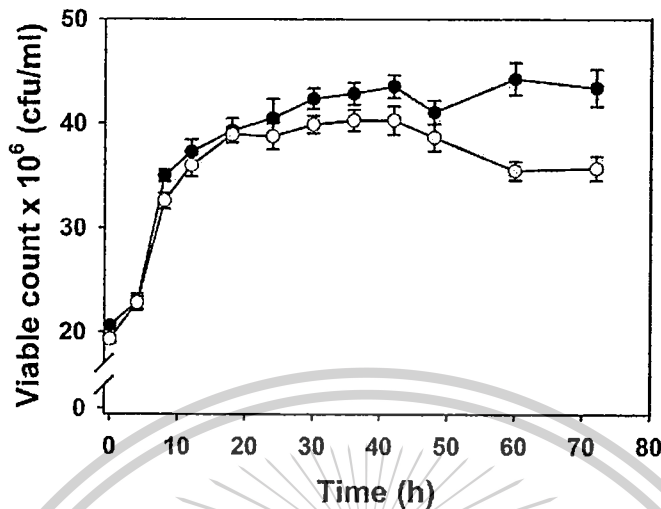
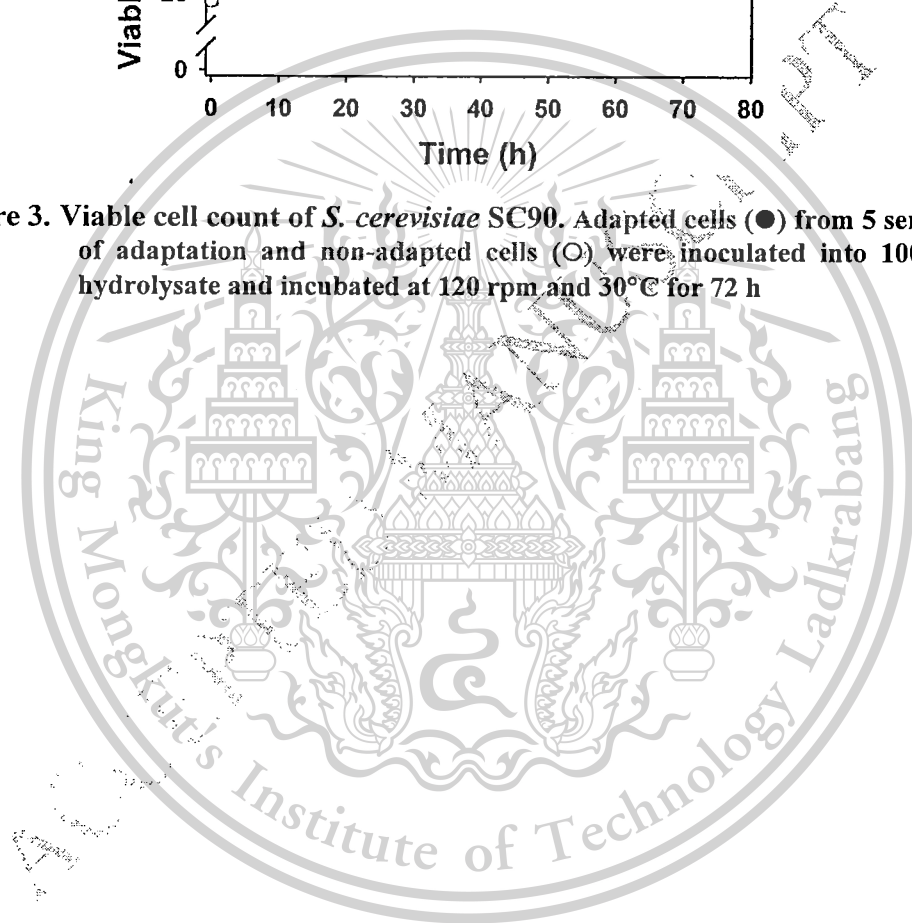


Figure 3. Viable cell count of *S. cerevisiae* SC90. Adapted cells (●) from 5 series of adaptation and non-adapted cells (○) were inoculated into 100% hydrolysate and incubated at 120 rpm and 30°C for 72 h



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

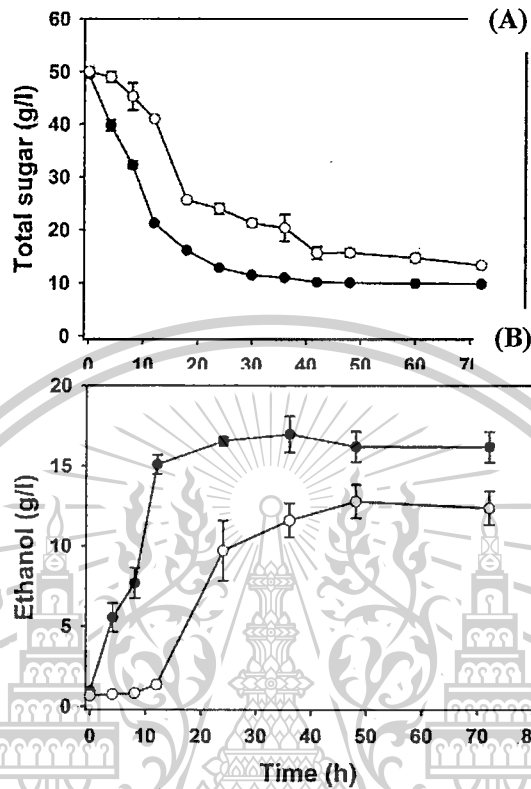


Figure 4. Changes in total sugars (A) and ethanol content (B) of *S. cerevisiae* SC90. Adapted cells (●) from five series of adaptation and non-adapted cells (○) were inoculated into 100% hydrolysate and incubated at 120 rpm and 30°C for 72 h

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปการใช้จ่ายเงิน

1. การเบิกจ่ายงบประมาณ

งวดที่ 1 ...115,000... บาท ...100% วันที่ได้รับอนุมัติให้เบิกจ่ายเงิน (ว/ด/ป)...10/01/2556

2. สรุปงบประมาณค่าใช้จ่ายที่ใช้นับตั้งแต่เริ่มทำการวิจัยถึงปัจจุบัน (จำแนกตามหมวดค่าใช้จ่าย)

หมวดค่าใช้จ่าย	งบประมาณทั้งหมด	ค่าใช้จ่าย (บาท)	คงเหลือ (บาท)
งบดำเนินงาน			
ค่าใช้สอย	25,000.00	24,960.00	40.00
ค่าวัสดุ	90,000.00	83,522.53	6,477.47
รวม	115,000.00	108,482.53	6,517.47



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

ประวัตินักวิจัย

1. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาว สร้อยสุตา พรภักดีวัฒนา (หัวหน้าโครงการ)

ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Soisuda Pornpukdeewattana

1.1. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำ สาขาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

1.2 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา/ประกาศนียบัตร	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2555	ป.เอก	Ph.D. (Food Science)	Food Science	University of Nottingham	อังกฤษ
2546	ป.โท	วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2542	ป.ตรี	วท.บ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย

1.3 สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

1.3.1 เทคโนโลยีการหมัก

1.3.2 เทคโนโลยีชีวภาพของยีสต์

1.4 หัวหน้าโครงการวิจัย

1.4.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินในไวน์ผลไม้ ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล.ปี พ.ศ.2548

1.4.2 การผลิตโยเกิร์ตน้ำนมข้าวโพด ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี พ.ศ. 2549

1.4.3 การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดเจือจางและมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี พ.ศ. 2556

1.5. งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1.5.1 การศึกษาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและแอนโทไซยานินในไวน์ผลไม้ รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี 2548-49.

1.5.2 การผลิตโยเกิร์ตน้ำนมข้าวโพด รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี 2549-50.

1.5.3 การพัฒนาหัวเชื้อน้ำส้มสายชูหมักเพื่อรองรับเทคโนโลยีผลิตน้ำส้มสายชูจากต่างชาติ. รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนวิจัย โครงการสนับสนุนการพัฒนาเทคโนโลยีของอุตสาหกรรมไทย ศูนย์บริหารจัดการเทคโนโลยี สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช) ปี พ.ศ. 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

- 50.

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

1.6 งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัยคล่องแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

1.6.1 การผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการเตรียมด้วยกรดเจือจางและมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี พ.ศ.2556 หัวหน้าโครงการ ได้ทำการวิจัยคล่องแล้ว 90%

1.6.2 โครงการการพัฒนากระบวนการผลิตน้ำส้มสายชูหมักจากข้าวไร้และการใช้ประโยชน์ ได้รับทุนจากกองทุนวิจัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปี 2557 เป็นระยะเวลา 3 ปี โดยมีสัดส่วนที่รับผิดชอบ 20% ได้ทำการวิจัยคล่องแล้ว 15%

1.6.3 การเพิ่มประสิทธิภาพการทนความร้อนของหัวเชื้อน้ำส้มสายชู *Acetobacter aceti* WK ด้วยประจุแคลเซียม ทุนสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปี พ.ศ. 2557 ผู้ร่วมโครงการ ได้ทำการวิจัยคล่องแล้ว 60%

1.6.4 การเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 โดยการเหนี่ยวนำด้วยโซเดียมคลอไรด์ ทุนวิจัย เงินรายได้คณะอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ปี พ.ศ.2557 หัวหน้าโครงการ ได้ทำการวิจัยคล่องแล้ว 40%

1.6.5 ผลของประจุสังกะสีต่อการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลความเข้มข้นสูงด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 (อยู่ในระหว่างการยื่นตีพิมพ์วารสารวิทยาศาสตร์ ปี 2557)

1.7. การนำเสนอผลงานวิชาการ

1.7.1 บทความวิจัย

(1) Pornpukdeewattana, S., Chalearmkit, P., and 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 (3): 21-37.

(2) Pornpukdeewattana, S., Khamfun, J. and Phatyenchai, N. Adaptation of commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis. The 25th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference (TSB 2013), 16th-19th October 2013, The Emerald Hotel, Bangkok, Thailand.

(3) สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา ประพัฒน์ พัวพันวัฒนะ และ ไอรยา สิทธิอำพรพรหม (2556) การผลิตเอทานอลชีวภาพจากกากมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางและมีการเสริมสารอาหารด้วยน้ำมะพร้าวโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SC90. งานประชุมวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร สจล. ครั้งที่ 2, 30 สิงหาคม 2556, โรงแรมวินเซอร์ สวีท สุขุมวิท, กรุงเทพฯ, ประเทศไทย.

(4) Sukwanno, P. Pornpukdeewattana, S., Krusong, W. and Puttongsiri, T. (2013) Impact of chitosan concentrations on the reduction of initial microorganisms in dried Sepat-Siam (*Trichogaster pectoralis*). The 15th

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ใช้ในเชิงพาณิชย์ การค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- Food Innovation Asia Conference 2013, 13th-14th June 2013, Bitec Bangna, Bangkok, Thailand.
- (5) Pornpukdeewattana, S., Boulton, C.A. and Smart, K.A. (2011) Optimization of Temperature for Bioethanol Production using *Saccharomyces cerevisiae*. BBSRC Workshop 30th-31st March 2011, Downing College, University of Cambridge, Cambridge, UK.
 - (6) Pornpukdeewattana, S., Boulton, C.A. and Smart, K.A. (2010) Optimization of Bioethanol Fermentation using *Saccharomyces cerevisiae*. Lace Conference 9th-10th September 2010, U. of Nottingham, Nottingham, UK.
 - (7) Pornpukdeewattana, S., Boulton, C.A. and Smart, K.A. (2010) Understanding the Stresses Encountered during Bioethanol Fermentations. Second International Symposium for Young Scientists and Technologists in Malting, Brewing and Distilling 19th-21st May 2010, Freising – Weihenstephan, Germany.
 - (8) Krusong, W., Sawetwivat, A., Pornpukdeewattana, S., Vijitraka, A. and Tuntratian, S. (2006) Prolonged Shelf-life of Fresh Chicken Meat by Using Vinegar. The 8th Agro-Industrial Conference 15th-16th June 2006, Bitec Bangna, Bangkok, Thailand.
 - (9) Pornpukdeewattana, S. and Jiatrakul, P. (2006) Production of Corn Milk Based Yoghurt. The 8th Agro-Industrial Conference 15th-16th June 2006, Bitec Bangna, Bangkok, Thailand.
 - (10) Pornpukdeewattana, S. and Jiatrakul, P. (2005) Change In Total Polyphenol and Color of Fruit Wine During Aaging. The 7th Agro-Industrial Conference 22nd-24th June 2005, Bitec Bangna, Bangkok, Thailand. (Poster presentation)

1.7.2 บทความวิชาการ

- (1) สร้อยสุตา พรภักดีวัฒนา และ เทพปัญญา เจริญรัตน์ (2554). The stresses occurrence and response during bioethanol fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*. วารสารอุตสาหกรรมเกษตรพระจอมเกล้า, 3(2): 28-36.
- (2) สร้อยสุตา พรภักดีวัฒนา และเทพปัญญา เจริญรัตน์. 2556. เทคโนโลยีการหมักและการประยุกต์ ใน เทคนิคพื้นฐานทางเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: ยูโอเพ่น จำกัด หน้า 125-173.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

2. ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย) นางสาว กมลวรรณ ชูชีพ

ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ) MISS Kamonwan Chucheep

2.1 ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะ วิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)

2.2 ประวัติการศึกษา

ปีที่จบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา/ ประกาศนียบัตร	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2548	ป.เอก	Ph.D. (Bioresource Production)	Bioresource Production	Kagoshima University	ญี่ปุ่น
2543	ป.โท	วท.ม. (เทคโนโลยีหลัง การเก็บเกี่ยว)	เทคโนโลยีหลังการ เก็บเกี่ยว	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระ จอมเกล้าธนบุรี	ไทย
2540	ป.ตรี	วท.บ. (จุลชีววิทยา)	จุลชีววิทยา	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระ จอมเกล้าธนบุรี	ไทย

2.3 ประสบการณ์งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง และ/หรือที่ผ่านมา ทั้งภายในและภายนอกประเทศ โดยระบุสถานภาพในการทำวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอการวิจัย

2.3.1 การใช้สูตรอาหารดัดแปลงชนิดใหม่สำหรับแยกเชื้อ *Escherichia coli*, *Samonella* และ *Shigella* จากตัวอย่างอาหารและเครื่องดื่ม ทุนวิจัย เงินรายได้ คณะวิทยาศาสตร์ สจล. ปี 2553 (หัวหน้าโครงการ)

2.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร phenolic acids ในผลไม้เขตร้อนบางชนิดโดยวิธีไฮเพอร์ฟอร์มมานซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี ทุนวิจัย สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย ปี 2554 (หัวหน้าโครงการ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายเทพปัญญา เจริญรัตน์

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) MR.Theppanya Charoenrat

3.1 ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ประจำภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

3.2 ประวัติการศึกษา

ปีจบ	ระดับการศึกษา	วุฒิการศึกษา/ประกาศนียบัตร	สาขาเอก	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
2549	ป. เอก	Ph.D. (Biotechnology)	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี	ไทย
2548	Licentiate	Lic. Eng. (Biotechnology)	เทคโนโลยีชีวภาพ	Royal Institute of Technology (KTH) Stockholm	Sweden
2545	ป. โท	วทม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์	ไทย
2542	ป. ตรี	วทบ. (เทคโนโลยีชีวภาพ)	เทคโนโลยีชีวภาพ	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง	ไทย

3.3. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญเป็นพิเศษ

3.3.1 วิศวกรรมกระบวนการชีวภาพ

3.3.2 เทคโนโลยีการหมัก

3.3.3 เทคโนโลยีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

3.3.4 การเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ

3.4. หัวหน้าโครงการวิจัย : ชื่อโครงการวิจัย

3.4.1 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง การควบคุมการเกิด overflow metabolism ระหว่างการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาโดย *Pichia pastoris* จำนวนงบประมาณ 480,000 บาท ชื่อแหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ช่วงปีที่รับทุน กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2552 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2552)

3.4.2 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง กระบวนการผลิตไลโซไซม์จากไซขาวโดยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 80,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน เมษายน 2550 ถึง กันยายน 2551 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2552)

3.4.3 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง การศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกตัวด้วยกระบวนการหมักแบบแบทช์ซ้ำเพื่อเก็บเกี่ยวไฟโคไซยานินจากสาหร่ายที่ได้ด้วยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน มิถุนายน 2552 ถึง พฤษภาคม 2553 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2553)

3.4.4 หัวหน้าโครงการวิจัย เรื่อง การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนเทอโรโคเนสสายสั้นโดย *Pichia pastoris* และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท

ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน มิถุนายน 2553 ถึง พฤษภาคม 2554 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2555)

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

3.5 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

3.5.1 การควบคุมการเกิด overflow metabolism ระหว่างการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาโดย *Pichia pastoris* จำนวนงบประมาณ 480,000 บาท ชื่อแหล่งทุน สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ช่วงปีที่รับทุน กรกฎาคม พ.ศ. 2550 ถึง พฤษภาคม พ.ศ. 2552 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2552)

3.5.2 กระบวนการผลิตไลโซไซม์จากไข่ขาวโดยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 80,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน เมษายน 2550 ถึง กันยายน 2551 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2552)

3.5.3 การศึกษาการเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Anabaena siamensis* TISTR 8012 ในถังปฏิกรณ์แบบอากาศยกตัวด้วยกระบวนการหมักแบบแช่ขี้ข้าเพื่อเก็บเกี่ยวไฟโคไซยานินจากสาหร่ายที่ได้ด้วยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน มิถุนายน 2552 ถึง พฤษภาคม 2553 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2553)

3.5.4 การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนเทอโรโคเนสสายสั้นโดย *Pichia pastoris* และการทำให้บริสุทธิ์ด้วยโครมาโตกราฟีแบบดูดซับชนิดฐานขยาย จำนวนงบประมาณ 100,000 บาท ชื่อแหล่งทุน กองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ช่วงปีที่รับทุน มิถุนายน 2553 ถึง พฤษภาคม 2554 (แล้วเสร็จ พ.ศ. 2555)

3.6. งานวิจัยที่กำลังทำ : ชื่อข้อเสนอการวิจัย แหล่งทุน และสถานภาพในการทำวิจัยว่าได้ทำการวิจัย ลุล่วงแล้วประมาณร้อยละเท่าใด

3.6.1 ผู้ร่วมโครงการวิจัย เรื่อง การพัฒนากระบวนการผลิตเอนไซม์ในกลุ่มย่อยสลายเซลลูโลสจากยีสต์ *Pichia pastoris* KM71 จำนวนงบประมาณ 1,112,400 บาท ชื่อแหล่งทุน สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ช่วงปีที่รับทุน ตุลาคม 2554 ถึง เมษายน 2556

3.7 ผลงานวิจัยที่ได้รับการตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารทางวิชาการ หรือการยื่นจดสิทธิบัตร/อนุสิทธิบัตร หรือการนำไปใช้ประโยชน์ต่อชุมชน/สังคม (กรณีงานวิจัยเพื่อตอบปัญหาและพัฒนาชุมชน/สังคม)

3.7.1 ผลงานตีพิมพ์

(1) Charoenrat, T., Khumruangsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S., and Roongsawang, N. (2013) Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculums and pH control of proteolysis. J. Biosci. Bioeng. (Accepted manuscript)

(2) Rattananikom, K., Choengpanya, K., Tongtubtim, N., Charoenrat, T., Withers, S.G., and Kongsaree, P.T. (2013) Mutational analysis in the glycone binding pocket of *Dalbergia cochinchinensis* β -glucosidase to increase catalytic efficiency towards mannosides. Carbohydrate Research. (In Press, Accepted manuscript, doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2012.10018>)

(3) ศจิกัญจน์ พึ่งบัว, ชนิดา กุประดิษฐ์, มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ และเทพปัญญา เจริญรัตน์ (2555) การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอนเทอโรโคเนสสายสั้นโดย *Pichia pastoris*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 20(1): 83-97.
- (4) กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ แพรรพธณ เกตุเรืองรอง สุเปัญญา จิตตพันธ์ วัชร กัลยาลัง และ เทพปัญญา เจริญรัตน์ (2554) การคัดเลือกสายสำหรับเชื้อยีสต์ *Oscillatoria* ssp. สำหรับนำมาใช้ในการผลิตซี-ไฟโคไซยานิน. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 19(3): 1-12.
- (5) เทพปัญญา เจริญรัตน์ กรวิชญ์ จิวสวัสดิ์ นิตี พานิชเกษม และพรณทิพย์ วรเดชวิทยา (2553) เทคนิคอย่างรวดเร็วและประหยัดในการหาสภาวะดูดซับโปรตีนของตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุ. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 18(3): 1-11.
- (6) อภินันท์ เอี่ยมสุวรรณสุข เทพปัญญา เจริญรัตน์ นิตี พานิชเกษม และสุเปัญญา จิตตพันธ์ (2553) ความหลากหลายของโรติเฟอร์ไรแหล่งน้ำรอบอาคาร SME ของมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต. วารสารวิชาการด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (ภาษาไทย) มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 18(2): 1-8.
- (7) Kupradid, C., Charoenrat, T. and Ketudat-Cairns, M. (2008) Bovine enterokinase light chain production by *Pichia pastoris*: Effect of induction temperature. Thai Journal of Biotechnology 8(1): 99-105.
- (8) Jahic, M., Veide, A., Charoenrat, T., Teeri, T.T. and Enfors, S.-O. (2006) Process technology for production and recovery of heterologous proteins with *Pichia pastoris*. Biotechnology Progress. 22: 1465-1473.
- (9) Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Jahic, M., Veide, A. and Enfors, S.-O. (2006) Increased total air pressure versus oxygen limitation for enhanced oxygen transfer and product formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process. Biochemical Engineering Journal. 30: 205-211.
- (10) Jahic, M., Knoblichner, J., Charoenrat, T., Enfors, S.-O. and Veide, A. (2006) Modified *Pichia pastoris* culture technique for improved interfacing with expanded bed adsorption. Biotechnology and Bioengineering. 93(6): 1040-1049.
- (11) Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Jahic, M., Enfors, S.-O. and Veide, A. (2006) Recovery of recombinant β -glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high-cell-density culture broth. J. Biotechnology. 122: 86-98.
- (12) Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Stendahl-Andersen, H., Jahic, M. and Enfors, S.-O. (2005) Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. Bioprocess and Biosystem Engineering. 27(6): 399-406. **Received Best paper of the year award.**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.

- (13) Andersen, H.S., Charoenrat, T., Eriksen, N.T., Enfors, S.-O. (2004) Ilt- og methanolbegrænsede fed-batch-kulturer af gæren *Pichia pastoris* (Oxygen and methanol limited fed-batch cultures of the yeast *Pichia pastoris*). Dansk Kemi 85: 22-24.
- (14) Charoenrat, T., Vanichsrirattana, W. and Ketudat-Cairns, M. (2004) Recombinant β -glucosidase Production by *Pichia pastoris*: The influence of pH. Thai Journal of Biotechnology 5(1): 51-55.

3.7.2 สิทธิบัตร :

การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง (เลขที่คำขอ : 071698)

3.7.3 อนุสิทธิบัตร :

กระบวนการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Pichia pastoris* กลุ่มที่มีความสามารถในการใช้เมทานอล ซ้ำลง (Mut^s) เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพกล้าเชื้อในกระบวนการหมัก (เลขที่คำขอ : 1203000856)

3.7.4 การได้รับรางวัลทางด้านวิชาการ

- (1) Best paper of the year 2005: Award from Bioprocess and Biosystems Engineering Journal
- (2) The 2006 Taguchi Price for Outstanding Doctoral Degree Thesis in the Field of Biotechnology: Award from Thai Society for Biotechnology



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

This material is reserved for educational use only, not allowed for commercial use.

Forbidden to modify the content, and cite the document when use.