

การใช้ประโยชน์จากเศษน้ำย่อยแป้งที่เหลือจากโรงงานผลิตน้ำตาล
เพื่อผลิตชีวมวลยีสต์: สภาวะที่เหมาะสม และจลนพลศาสตร์

UTILIZATION OF STARCH HYDROLYZED WASTE
FROM SUGAR FACTORY FOR PRODUCING YEAST BIOMASS:
OPTIMUM CONDITION AND KINETICS

อัษฎาวุธ อารีศิริสุข*, ชุตินา รักกิจการพูล สุจยา ฤทธิศร และ จันทิมา ทีชะ

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

จังหวัดปทุมธานี 12110 ประเทศไทย

Atsawut Areesirisuk*, Chutima Rakkitkanphun, Sujaya Ritthisorn and Jantima Teeka

Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi,

Pathum Thani, 12110, Thailand

*E-mail: atsawut_a@rmutt.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการใช้เศษน้ำย่อยแป้งจากโรงงานผลิตน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการผลิตชีวมวลยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และศึกษาอิทธิพลของอัตรา การให้อากาศในการเพาะเลี้ยงยีสต์ในระดับถังหมัก ผลการทดลองพบว่าปริมาณของแฉัง ที่ละลายได้ทั้งหมด ($^{\circ}\text{Brix}$) ความเป็นกรดต่าง (pH) และความเข้มข้นของยีสต์สกัด (Yeast extract) เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลยีสต์จากเศษน้ำย่อยแป้งอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ โดยได้สมการกำลังสองสำหรับทำนายสภาวะที่เหมาะสมคือ น้ำหนักชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร) $= 2.38 + 0.36A + 1.13C - 0.021D + 0.052AC - 0.10AD - 0.042CD - 0.18A^2 - 0.76C^2 - 0.28D^2$ โดยสภาวะที่เหมาะสมคือ ปริมาณของแฉังที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 16.73 องศาบริกซ์ ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.84 และความเข้มข้นของยีสต์สกัดเท่ากับ 8.78 กรัมต่อลิตร โดยได้ชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 2.95 กรัมต่อลิตร และการศึกษาการผลิตชีวมวล ยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร พบว่าอัตราการให้อากาศมีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลยีสต์โดยที่ อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม (vvm) มีน้ำหนักชีวมวลยีสต์สูงสุด และอัตราการผลิตชีวมวล

ยีสต์สูงสุดมากกว่าที่อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแบบหุ้ Logistic และแบบหุ้ประยุกต์ของ Gompertz สามารถใช้ในการเลียนแบบการเจริญของยีสต์ในเศษน้ำย่อยแบ่งได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: เศษน้ำย่อยแบ่ง ชีวมวลยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* อัตราการให้อากาศ แบบหุ้ทางคณิตศาสตร์

ABSTRACT

The aim of this research was to study the utilization of starch hydrolyzed waste (SHW) from glucose manufacturing as a raw material for producing yeast biomass *Saccharomyces cerevisiae*. Moreover, aeration rate of the yeast cultivation in fermenter scale was investigated. The result showed that total soluble solids, pH, and yeast extract affected to biomass production from SHW significantly. In addition, the quadratic equation for predicting the optimum condition was $Biomass (g/L) = 2.38 + 0.36A + 1.13C - 0.021D + 0.052AC - 0.10AD - 0.042CD - 0.18A^2 - 0.76C^2 - 0.28D^2$. The optimum condition was total soluble solids, pH, and yeast extract for 16.73 °Brix, 4.84, and 8.78 g/L, respectively. Under this condition, the highest biomass was obtained for 2.95 g/L of shaking flask scale. Biomass production in 5-L fermenter demonstrated that the aeration rate influenced the biomass production. The maximum biomass and maximum biomass production rate at 1.0 vvm were higher than at 0.5 vvm for 10% and 75% approximately, respectively. Furthermore, experimental result denoted that the Logistic model and modified Gompertz model could simulate the growth of yeast in SHW as well.

Keywords: Starch hydrolyzed waste, Yeast biomass, *Saccharomyces cerevisiae*, Aeration rate, Mathematical modeling

บทนำ

ยีสต์สปีชีส์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เอทานอล และโปรไบโอติก (Capozzi et al., 2015; Nuanpeng et al., 2018; Pinpimai et al., 2015) เนื่องจากมีความปลอดภัย และสามารถเพาะเลี้ยงในระดับขยายขนาดได้ง่าย (Fadel et al., 2017) นอกจากนี้ยังมีการนำชีวมวลของ *S. cerevisiae*

มาใช้เป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ โดยผลิตเป็นสารสกัดจากยีสต์ สารเพิ่มรสชาติในอาหาร และโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Najafpour, 2015) และในด้านสิ่งแวดล้อมมีการนำชีวมวลของยีสต์มาใช้ในการกำจัดโลหะหนักเนื่องจากผนังของเซลล์ยีสต์มีสารฟอสโฟแมนแนน (Phosphomannan) เป็นส่วนประกอบ และยังพบหมู่คาร์บอกซิล ไฮดรอกซิล เอมีน ฟอสเฟต ไฮโดรซัลไฟด์ ที่โปรตีนบริเวณผนังเซลล์ซึ่งสามารถจับกับโลหะชนิด Double Valence ได้ (Veglio' & Beolchini, 1997; Zou et al., 2006)

อุตสาหกรรมแป้งมันสำปะหลังถือเป็นอุตสาหกรรมที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยในการเป็นสินค้าส่งออก ปัจจุบันมีโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลังจำนวนมากที่มีการผลิตรวมหลายล้านตันต่อปี (Pilot Plant Development and Training Institute, 2003) ในปัจจุบันมีการนำแป้งมันสำปะหลังที่ผลิตได้มาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ (Starch-Based Product) โดยกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์ เช่น มอลโตเดกซ์ทริน น้ำตาลมอลโตส และน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์อาหารและเครื่องดื่ม โดยในระหว่างกระบวนการผลิตนั้นจะมีเศษน้ำย่อยแป้งที่เหลือจากกระบวนการผลิตปล่อยลงสู่ระบบบำบัดน้ำเสียเพื่อบำบัดต่อไป ทั้งนี้เศษน้ำย่อยแป้งดังกล่าวยังมีองค์ประกอบที่สามารถนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตชีวมวลได้ อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงยีสต์ในแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันยีสต์ก็จะมี การเจริญเติบโตและผลิตชีวมวลได้แตกต่างกัน (Ferreira et al., 2010; Li et al., 2009; Taccari et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยหลายชนิดที่ส่งผลต่อการเจริญของยีสต์ เช่น แหล่งไนโตรเจน ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ และการให้อากาศ เป็นต้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อให้ยีสต์สามารถเจริญเติบโตและผลิตชีวมวลได้อย่างมีประสิทธิภาพ งานวิจัยนี้จึงมุ่งศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์โดยใช้เศษน้ำย่อยแป้งจากโรงงานผลิตน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนหลัก เพื่อลดภาระของระบบบำบัดน้ำเสีย และเพิ่มมูลค่าของของเหลือจากกระบวนการผลิต และนำแบบหุ่นทางคณิตศาสตร์ (Mathematical Model) มาใช้เลียนแบบ (Simulation) การเจริญของยีสต์ (Dodic et al., 2012; Zajšek & Goršek, 2010) เพื่ออธิบายพฤติกรรมการเจริญเติบโตของยีสต์ในเศษน้ำย่อยแป้ง

วิธีการ

1. ยีสต์ที่ใช้ในการศึกษา

Saccharomyces cerevisiae var. *montache*

2. การเตรียมวัตถุดิบ

นำเศษน้ำย่อยแป้งจากกระบวนการแปรรูปแป้งมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์จากบริษัท ดับเบิลยูจีซี จำกัด (WGC Co., Ltd) อำเภอสามพราน จังหวัดนครปฐม มาปั่นเหวี่ยง

แยกกากแบ่งที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองถัดไป

3. การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตชีวมวลยีสต์ด้วยการหมักแบบเบดเสิร์ฟในเศษน้ำย่อยแบ่ง

เพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YM Broth โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายยีสต์ที่ได้ลงในเศษน้ำย่อยแบ่งที่ปลอดเชื้อ ซึ่งแปรผันปัจจัยทางเคมีและกายภาพ ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman Design (PBD) (ตารางที่ 2) (Zhou et al., 2011) ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมงและเก็บตัวอย่างมาวัดค่าความขุ่น (Optical Density; OD) ที่ 600 นาโนเมตร นำค่ามาคำนวณเป็นน้ำหนักรวมชีวมวลยีสต์ด้วยสมการ Biomass (g/L) = $OD_{600nm} / 1.736$ ซึ่งได้มาจากการสร้างความสัมพันธ์ระหว่างค่าความขุ่นและน้ำหนักรวมชีวมวลยีสต์ ($R^2 = 0.9930$) และคำนวณค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม Design Expert Version 7.0 คัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของยีสต์อย่างมีนัยสำคัญ เพื่อศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยนั้นในการทดลองถัดไป

4. การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์

เพาะเลี้ยงกล้าเชื้อยีสต์ในอาหาร YM Broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายยีสต์ลงในเศษน้ำย่อยแบ่งที่ฆ่าเชื้อแล้ว ซึ่งแปรผันปัจจัยต่าง ๆ ดังตารางที่ 3 โดยวางแผนการทดลองแบบ Box-Behnken Design (BBD) (Aslan & Cebeci, 2007) เมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณชีวมวลยีสต์ และสร้างแบบพหุนาม (Model) ด้วยสมการ Polynomial Quadratic Equation และนำสมการมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์ต่อไป

ตารางที่ 1 ปัจจัยที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลต่อการเจริญของยีสต์

Variables	Symbol	Experimental value	
		Low value (-1)	High value (+1)
Total Soluble Solids (°Brix)	A	15	28
Ammonium Sulfate (g/L)	B	0	5
pH	C	3.0	5.0
Yeast Extract (g/L)	D	0	5
Shaking Rate (rpm)	E	100	200
Inoculums Size (% , v/v)	G	5	10
Temperature (°C)	H	25	30
Dummy	F, I, J, K	-1	1

ตารางที่ 2 แผนการทดลองแบบ PBD และการผลิตชีวมวลยีสต์ที่แปรรูปปัจจัยด้วย PBD

Run	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Biomass (g/L)
1	28	5	3.0	5	200	1	5	25	-1	1	-1	1.751
2	15	5	5.0	0	200	1	10	25	-1	-1	1	1.926
3	28	0	5.0	5	100	1	10	30	-1	-1	-1	2.219
4	15	5	3.0	5	200	-1	10	30	1	-1	-1	0.668
5	15	0	5.0	0	200	1	5	30	1	1	-1	0.381
6	15	0	3.0	5	100	1	10	25	1	1	1	0.776
7	28	0	3.0	0	200	-1	10	30	-1	1	1	0.586
8	28	5	3.0	0	100	1	5	30	1	-1	1	0.763
9	28	5	5.0	0	100	-1	10	25	1	1	-1	0.583
10	15	5	5.0	5	100	-1	5	30	-1	1	1	1.613
11	28	0	5.0	5	200	-1	5	25	1	-1	1	2.644
12	15	0	3.0	0	100	-1	5	25	-1	-1	-1	0.117

F, I, J และ K คือ Dummy 1, Dummy 2, Dummy 3, และ Dummy 4 ตามลำดับ

5. การศึกษาอิทธิพลของการให้อากาศต่อการผลิตชีวมวลของยีสต์ในถังหมัก 5 ลิตร ถ่ายกล้ำเชื้อปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในเศษน้ำย่อยแบ่งที่ปรับองค์ประกอบให้เหมาะสม (พิจารณาจากการศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์) และควบคุมอัตราการให้อากาศที่ 0.5 วีวีเอ็ม หรือ 1.0 วีวีเอ็ม ด้วยอัตราการทวน 400 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างเป็นระยะมาวัดค่าความขุ่น และนำมาคำนวณเป็นน้ำหนักชีวมวลยีสต์

6. การศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของยีสต์ด้วยแบบหุ่นทางคณิตศาสตร์

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง (Experimental Data) ในถังหมักมาประมาณค่าจลนพลศาสตร์ของยีสต์ด้วยวิธีการหาเส้นโค้งที่เหมาะสม (Curve Fitting) โดยใช้แบบจำลองทางคณิตศาสตร์ในการศึกษาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (Maximum Specific Growth Rate, $\mu_{\max}$) เพื่ออธิบายการเจริญของยีสต์ด้วยแบบหุ่นโลจิสติก (Logistic Model) (สมการ (1) และ (2)) (Zajšek & Goršek, 2010) และศึกษาอัตราการผลิตชีวมวลสูงสุด (Maximum Biomass Productivity, $r_{\max}$) เพื่ออธิบายอัตราการผลิตชีวมวลด้วยแบบหุ่นประยุกต์ของ Gompertz (Modified Gompertz Model) (Dodić et al., 2012) (สมการ (3)) โดยทำการประมาณค่า $\mu_{\max}$ และ $r_{\max}$ ที่เหมาะสมด้วยฟังก์ชัน (Function) Solver ในโปรแกรม Microsoft Excel (Version 2016)

ตารางที่ 3 การวางแผนทดลองแบบ BBD และผลการผลิตชีวมวลยีสต์จากแผนการทดลองแบบ BBD

Run	°Brix (A)	pH (C)	Yeast Extract (g/L) (D)	Biomass (g/L)
1	21.5 (0)	3.0 (-1)	0 (-1)	0.257
2	21.5 (0)	3.0 (-1)	10 (+1)	0.303
3	21.5 (0)	5.0 (+1)	0 (-1)	2.470
4	21.5 (0)	5.0 (+1)	10 (+1)	2.347
5	15 (-1)	4.0 (0)	0 (-1)	1.243
6	15 (-1)	4.0 (0)	10 (+1)	1.398
7	28 (+1)	4.0 (0)	0 (-1)	2.652
8	28 (+1)	4.0 (0)	10 (+1)	2.405
9	15 (-1)	3.0 (-1)	5 (0)	0.182
10	15 (-1)	5.0 (+1)	5 (0)	2.487
11	28 (+1)	3.0 (-1)	5 (0)	0.308
12	28 (+1)	5.0 (+1)	5 (0)	2.822
13	21.5 (0)	4.0 (0)	5 (0)	2.484
14	21.5 (0)	4.0 (0)	5 (0)	2.302
15	21.5 (0)	4.0 (0)	5 (0)	2.459
16	21.5 (0)	4.0 (0)	5 (0)	2.234
17	21.5 (0)	4.0 (0)	5 (0)	2.425

(-1) คือ ระดับต่ำ (0) คือ ระดับกลาง และ (+1) คือ ระดับสูง

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) X \quad (1)$$

$$X = \frac{X_0 \exp(\mu_{\max} t)}{1 - \left[\left(\frac{X_0}{X_{\max}}\right)(1 - \exp(\mu_{\max} t))\right]} \quad (2)$$

$$X = X_0 + \left[X_{\max} \cdot \exp \left[-\exp \left(\frac{r_{\max} \cdot \exp(1)}{X_{\max}} \right) (t_L - t) + 1 \right] \right] \quad (3)$$

เมื่อ	X	คือ	น้ำหนักชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร)
	X_0	คือ	น้ำหนักชีวมวลยีสต์เริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
	$X_{\max}$	คือ	น้ำหนักชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตร)
	$\mu_{\max}$	คือ	อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (ต่อชั่วโมง)
	$r_{\max}$	คือ	อัตราการผลิตชีวมวลยีสต์สูงสุด (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
	t_L	คือ	ระยะเวลาพักตัว (ชั่วโมง)
	t	คือ	ระยะเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดเลือกปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในเศษน้ำย่อยแบ่ง
การคัดเลือกปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงในเศษน้ำย่อย
แบ่งด้วยการวางแผนการทดลองแบบ PBD โดยมีปัจจัยที่ศึกษาทั้งหมด 7 ปัจจัย ผลการทดลอง
แสดงดังตารางที่ 2 พบว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่แตกต่างกันจะส่งผลต่อการเจริญเติบโต
ของยีสต์โดยสภาวะที่สามารถผลิตชีวมวลยีสต์ได้สูงที่สุด และต่ำที่สุดคือการทดลองที่ 11 และ 12
ตามลำดับ ซึ่งสามารถผลิต ชีวมวลยีสต์ได้เท่ากับ 2.644 กรัมต่อลิตร และ 0.117 กรัมต่อลิตร
ตามลำดับ จากงานวิจัยที่ผ่านมารายงานว่า การเพาะเลี้ยงยีสต์ด้วยปัจจัยที่แตกต่างกันจะส่งผล
ต่อกระบวนการทางชีวเคมีภายในเซลล์ยีสต์ต่างกันทำให้ยีสต์มีการเจริญเติบโตแตกต่างกัน
(Trigueros et al., 2016) และผลการศึกษาอิทธิพลของปัจจัยที่มีต่อการผลิตชีวมวลของยีสต์
เมื่อเพาะเลี้ยงด้วยเศษน้ำย่อยแบ่ง โดยการวิเคราะห์การถดถอย (Regression Analysis)
(ตารางที่ 4) พบว่า ปัจจัยปัจจัยแต่ละชนิดมีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลของยีสต์แตกต่างกัน
เมื่อพิจารณาทางสถิติพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลของยีสต์สูงที่สุดคือ ความเข้มข้น
ของยีสต์สกัด (D) รองลงมาคือ ความเป็นกรดต่าง (C) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด
(A) ตามลำดับ โดยปัจจัยทั้งสามชนิดมีค่า สัมประสิทธิ์ (Coefficient) เท่ากับ 0.99 0.87 และ

0.57 ตามลำดับ และคิดเป็นสัดส่วนของอิทธิพล (Contribution) ที่มีต่อการผลิตชีวมวลยีสต์ เท่ากับ 31.95% 25.03% และ 10.62% ตามลำดับ

ตารางที่ 4 การศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยต่อการผลิตชีวมวลยีสต์ด้วยวิธีการวิเคราะห์การถดถอย

Variables	Coefficients	Computed <i>t</i> -value	<i>p</i> -value	Contribution (%)
A	0.57	1.462	0.262	10.62*
B	0.11	0.282	0.817	0.38
C	0.87	2.231	0.115	25.03*
D	0.99	2.538	0.086	31.95*
E	0.35	0.897	0.467	4.02
G	-0.095	-0.244	0.838	0.29
H	-0.29	-0.744	0.541	2.78

*Independent variables which were selected for Box-Behnken Experimental Design.

ยีสต์สกัดเป็นแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจน (Organic Nitrogen Source) ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ได้เนื่องจากมีกรดอะมิโน เปปไทด์ วิตามิน และเกลืออนินทรีย์เป็นองค์ประกอบ โดยยีสต์สามารถนำไปใช้ในกระบวนการสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของเซลล์ และเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาทางชีวเคมีภายในเซลล์ยีสต์ (Li et al., 2017) ดังนั้นเมื่อมีการเติมยีสต์สกัดลงไปในเศษน้ำย่อยแบ่งมากขึ้น ยีสต์จึงสามารถเจริญเติบโตและผลิตชีวมวลได้มากขึ้น สอดคล้องกับผลการศึกษานี้ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของยีสต์สกัดมีอิทธิพลในทางบวก (Positive Effect) ต่อการผลิตชีวมวลของยีสต์

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงยีสต์พบว่าอิทธิพลในทางบวก (Positive Effect) (ตารางที่ 4) ซึ่งชีวมวลของยีสต์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเป็นกรดต่างของอาหารเพิ่มขึ้นจาก 3.0 เป็น 5.0 โดยระดับความเป็นกรดต่างของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์มีความสัมพันธ์กับปริมาณไฮโดรเจนไอออน (H ion) หรือโปรตอน (Proton) ซึ่งควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนภายในเซลล์ และความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ของสารต่าง ๆ (Cell Permeability) โดยทั่วไปยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าแบคทีเรียในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เป็นกรด ทำให้มีโอกาสเกิดการปนเปื้อนในระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์น้อย (Limtong, 2006) ความเป็นกรดต่างของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ยังมีบทบาทสำคัญ

ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ Glucose-6-Phosphate-Dehydrogenase (G6PDH) ในวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการผลิตชีวมวลของยีสต์ *S. cerevisiae* (Trigueros et al., 2016) เศษน้ำย่อยแบ่งที่เหลือจากการผลิตน้ำตาลมีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งเศษน้ำย่อยแบ่งจากกระบวนการผลิตดังกล่าวมีปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด อยู่ในช่วงประมาณ 25 - 28 องศาบริกซ์ คิดเป็นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสประมาณ 180 - 200 กรัมต่อลิตร และมีปริมาณของแข็งชนิดอื่นอยู่ประมาณ 70 - 80 กรัมต่อลิตร จากองค์ประกอบนี้เศษน้ำย่อยแบ่งจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์ เนื่องจาก *S. cerevisiae* สามารถเมตาบอไลต์ (Metabolite) น้ำตาลกลูโคส ในการเจริญเติบโตได้ดี (Limtong, 2006) สอดคล้องกับผลการทดลองนี้ซึ่งพบว่า ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดของเศษน้ำย่อยแบ่งมีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลของยีสต์รองจากระดับความเป็นกรดต่างและยีสต์สกัด

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอิทธิพลของแอมโมเนียมซัลเฟต อัตราการเขย่า ปริมาณ กล้าเชื้อ และอุณหภูมิ ในช่วงที่ทำการทดลอง (Experimental Level) พบว่ามีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลยีสต์น้อยกว่ายีสต์สกัด ความเป็นกรดต่าง (pH) และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด โดยมีสัดส่วนของอิทธิพลเท่ากับ 0.38 4.02 0.29 และ 2.78 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ดังนั้นจึงเลือกยีสต์สกัด ความเป็นกรดต่าง และปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด มาศึกษา ระดับที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยในการทดลองถัดไป

2. การศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์

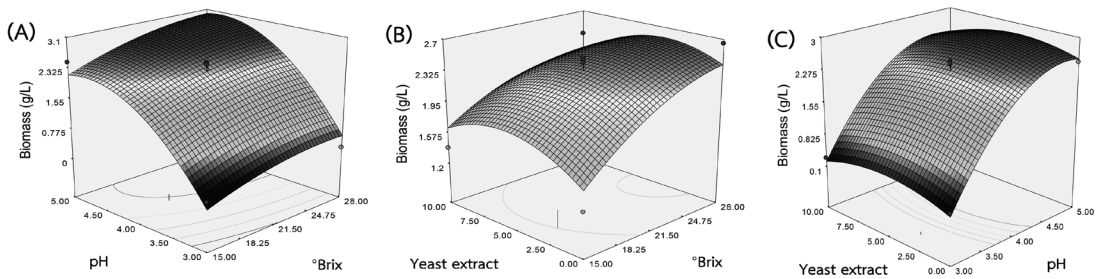
การออกแบบการทดลองแบบ BBD ใช้เพื่อศึกษาระดับที่เหมาะสมของปัจจัย ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ผลการทดลองพบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ความเป็นกรดต่าง และความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการเจริญของยีสต์ โดยสภาวะที่สามารถผลิตชีวมวลยีสต์ได้น้อยที่สุด และสูงที่สุดคือการทดลองที่ 9 และ 12 โดยมีปริมาณชีวมวลยีสต์เท่ากับ 0.182 กรัมต่อลิตร และ 2.822 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 3) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลตามแผนการทดลองของ BBD โดยใช้สมการกำลังสอง (Quadratic Equation) เป็นแบบหุนเพื่อสร้างความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตกับการสร้างชีวมวลของยีสต์จะได้ดังสมการที่ (4)

$$\begin{aligned} \text{ชีวมวลยีสต์ (กรัมต่อลิตร)} = & 2.38 + 0.36A + 1.13C - 0.021D + 0.052AC \\ & - 0.10AD - 0.042CD - 0.18A^2 - 0.76C^2 \\ & - 0.28D^2 \end{aligned} \quad (4)$$

เมื่อ A C และ D คือ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด ความเป็นกรดต่าง และความเข้มข้นของยีสต์สกัด ตามลำดับ

นอกจากนี้แบบจำลองของสมการที่ (4) (รูปที่ 1A-1C) สามารถนำไปใช้ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตชีวมวลได้ โดยพบว่าสภาวะที่เหมาะสมคือ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดเท่ากับ 16.73 องศาบริกซ์ ความเป็นกรดต่างเท่ากับ 4.84 และความเข้มข้นของยีสต์สกัดเท่ากับ 8.78 กรัมต่อลิตร ให้ค่าชีวมวลของยีสต์เท่ากับ 2.950 กรัมต่อลิตร จึงนำสภาวะดังกล่าวมาเตรียมสื่อน้ำย่อยแบ่งเพื่อศึกษาอิทธิพลของการให้อากาศต่อการผลิตชีวมวลของยีสต์ในระดับถึงหมักขนาด 5 ลิตรต่อไป

3. การศึกษาอิทธิพลของการให้อากาศต่อการผลิตชีวมวลของยีสต์ในถังหมัก 5 ลิตร การเจริญของยีสต์ในถังหมักที่มีอัตราการให้อากาศเท่ากับ 0.5 และ 1.0 วีวีเอ็ม แสดงดังรูปที่ 2(A) ผลการทดลองพบว่าการเจริญของยีสต์ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม จะมีอัตราการเจริญเติบโตในช่วง Log phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ถึง ชั่วโมงที่ 72 ของการเพาะเลี้ยงก่อนเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ในขณะที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม เซลล์มีการเจริญเข้าสู่ช่วง Log phase ในชั่วโมงที่ 4 ถึง ชั่วโมงที่ 36 และยังพบว่าที่อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม ยีสต์การเจริญเติบโตได้ช้ากว่าที่ 1.0 วีวีเอ็ม โดยมีการผลิตชีวมวลยีสต์เท่ากับ 6.11 (ที่ 72 ชั่วโมง) และ 6.13 (ที่ 36 ชั่วโมง) ตามลำดับ แสดงว่าการให้อากาศมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ โดยอัตราการให้อากาศที่ระดับต่ำมีผลทำให้เกิดการละลายของออกซิเจนในอาหารเพาะเลี้ยงต่ำทำให้ยีสต์เจริญเติบโตได้น้อยกว่าสภาวะที่มีอัตราการให้อากาศสูง ดังนั้นการเพิ่มอัตราการให้อากาศ จะสามารถเพิ่มอัตราการสร้างชีวมวลยีสต์ได้มากขึ้น (Yen & Liu, 2014) และยังมีการศึกษาอิทธิพลของปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Dissolve Oxygen, DO) ต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *Candida utilis* ที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม พบว่า เมื่อค่า DO เพิ่มขึ้นอัตราการผลิตชีวมวลของยีสต์ *C. utilis* ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย และอัตราการผลิตชีวมวลของ *C. utilis* ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อค่า DO มากกว่า 50% เนื่องจากที่อัตราการให้อากาศดังกล่าวเพียงพอต่อการผลิต Crude Protein ของเซลล์ทำให้เซลล์ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อให้ DO ในระดับที่เกินพอ (Excess Level) (Rajoka et al., 2006) สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* ด้วยไฮโดรไลเซตของเปลือกผลไม้แห้ง (Hydrolysate of Empty Fruit Bunch) โดยพบว่าในสภาวะที่มีการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม ยีสต์จะเจริญเติบโตสูงกว่าสภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ และที่อัตราการให้อากาศเท่ากับ 1.0 วีวีเอ็ม เซลล์ยีสต์จะมีการเจริญเติบโตเข้าสู่ช่วง Stationary Phase เร็วกว่าที่อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม และให้ชีวมวลสูงสุดเท่ากับ 1.04 กรัมต่อลิตร (Hermansyah et al., 2015) จากการวิจัยดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการให้อากาศในระดับที่เหมาะสมจะส่งเสริมการเจริญเติบโตของยีสต์ทำให้ยีสต์สร้างชีวมวลได้สูง และการให้อากาศมากเกินไปไม่ได้ช่วยส่งเสริมการผลิตชีวมวลของยีสต์ และยังเพิ่มต้นทุนการดำเนินการระบบการให้อากาศอีกด้วย

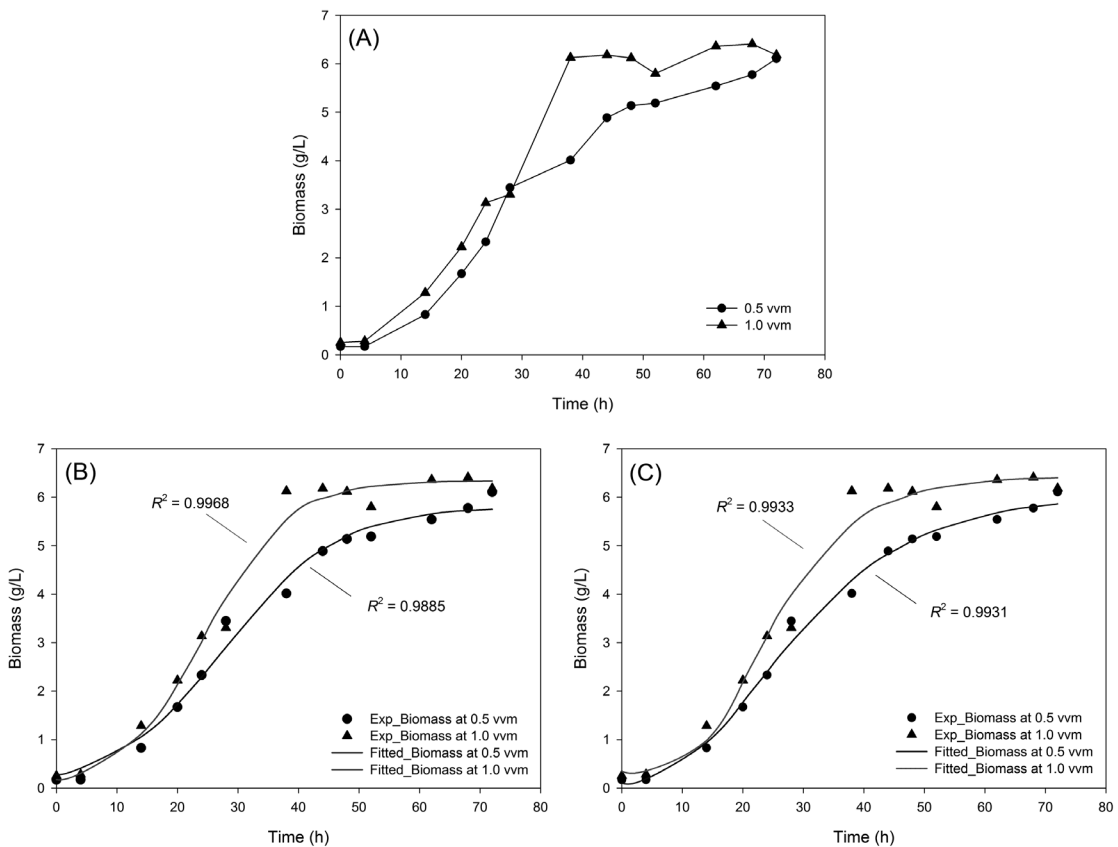


รูปที่ 1 อิทธิพลร่วมของปัจจัยต่อการผลิตชีวมวลยีสต์

(A) ความเป็นกรดต่างและปริมาณของแข็งที่ละลายได้

(B) ยีสต์สกัดและปริมาณของแข็งที่ละลายได้ และ

(C) ยีสต์สกัดและความเป็นกรดต่าง



รูปที่ 2 (A) การเจริญเติบโตของยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

(B) การเลียนแบบการเจริญของยีสต์ด้วยแบบหูน Logistic และ

(C) การเลียนแบบด้วยแบบหูนประยุกต์ของ Gompertz

4. การศึกษาจลนพลศาสตร์การเจริญของยีสต์ด้วยแบบหุ้नทางคณิตศาสตร์

ผลการเลียนแบบการเจริญของยีสต์ด้วยแบบหุ้नทางคณิตศาสตร์ได้แก่ แบบหุ้น Logistic และ แบบหุ้นประยุกต์ของ Gompertz แสดงดังรูปที่ 2(B) และ 2(C) และค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของยีสต์จากแบบหุ้นดังกล่าวแสดงดังตารางที่ 5 ผลการทดลองพบว่าแบบหุ้นทั้งสองแบบสามารถเลียนแบบการเจริญของยีสต์ได้เป็นอย่างดี โดยให้ค่าสัมประสิทธิ์การอธิบาย (Coefficient of Determination, R^2) มากกว่า 0.98 แสดงว่าแบบหุ้นทั้งสองสามารถเลียนแบบการเจริญของยีสต์ และประมาณค่าจลนพลศาสตร์ได้ใกล้เคียงกับผลการทดลองจริงมาก เมื่อพิจารณาน้ำหนักชีวมวลยีสต์สูงสุด ($x_{\max}$) และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ($\mu_{\max}$) พบว่าที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม ยีสต์มีค่า $x_{\max}$ และ $\mu_{\max}$ สูงกว่าที่อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม โดยการประมาณค่า $x_{\max}$ ที่อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม และ 1.0 วีวีเอ็ม ด้วยแบบหุ้น Logistic พบว่ามีค่าเท่ากับ 5.802 กรัมต่อลิตร และ 6.362 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และ $\mu_{\max}$ มีค่าเท่ากับ 0.108 ต่อชั่วโมง และ 0.164 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาการประมาณค่า $x_{\max}$ ด้วยแบบหุ้นประยุกต์ของ Gompertz ก็พบว่าให้ผลคล้ายคลึงกัน และจากแบบหุ้นดังกล่าวยังพบว่า ยีสต์มีอัตราการผลิตชีวมวลสูงสุด ($r_{\max}$) เพิ่มขึ้นเมื่ออัตราการให้อากาศสูงขึ้น โดยมีค่า ($r_{\max}$) เท่ากับ 0.157 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.274 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และพบว่าแบบหุ้นทางคณิตศาสตร์ทั้งสองแบบสามารถอธิบายประสิทธิภาพการผลิตชีวมวลได้สอดคล้องกัน ซึ่งสนับสนุนว่าอัตราการให้อากาศส่งผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์

อย่างไรก็ตามเพื่อพิจารณาระยะเวลาพักตัว (t_L) ของยีสต์ในช่วงแรกของการเจริญเติบโตก่อนเข้าสู่ช่วง Log phase พบว่าเมื่ออัตราการให้อากาศสูงขึ้นยีสต์จะมีระยะเวลาในการพักตัวมากขึ้น ซึ่งที่อัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม และ 1.0 วีวีเอ็ม มีค่าเท่ากับ 9.20 ชั่วโมง และ 12.84 ชั่วโมง ตามลำดับ เนื่องจากเมื่อพ่นอากาศเข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราการไหลที่สูงเกินไปในช่วงแรก จะทำให้ระยะเวลาของอากาศที่ถูกกับเก็บเอาไว้ภายในถังหมักสั้นลงเพราะอากาศเคลื่อนที่ออกจากถังหมักอย่างรวดเร็ว ส่งผลให้อัตราการแพร่ของออกซิเจนไปยังจุลินทรีย์น้อย แต่หลังจากนั้นอัตราการละลายของออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะสูงขึ้น (Doran, 2013) ทำให้อัตราการเจริญจำเพาะและอัตราการผลิตชีวมวลของยีสต์เพิ่มขึ้น ทั้งนี้หากต้องการให้ออกซิเจนละลายในอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้นควรเพิ่มอัตราการกวนผสมของถังหมักด้วย

เมื่อเปรียบเทียบการใช้เศษน้ำย่อยแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์กับของเสียชนิดอื่น (ตารางที่ 6) พบว่า ยีสต์สามารถผลิตชีวมวลในวัตถุดิบแต่ละชนิดได้แตกต่างกันโดยยีสต์สามารถผลิตชีวมวลในน้ำเสียจากการย่อยไม้ไผ่ (Bamboo Wastewater) (Li et al., 2009) ที่เหลือจากการทำกระดาศ และ Hydrolyzed Cheese Whey Permeates (Trigueros et al., 2016) ได้เท่ากับ 14.67 และ 8.20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้เศษน้ำย่อยแป้งเป็นวัตถุดิบ เนื่องจากเซลลูโลส (Cellulose) ในน้ำเสียจากการย่อยไม้ไผ่

ตารางที่ 5 ค่าจลนพลศาสตร์การเจริญของยีสต์ที่ได้จากแบบหุ่นทางคณิตศาสตร์

Parameters	Logistic model		Modified Gompertz model	
	0.5 vvm	1.0 vvm	0.5 vvm	1.0 vvm
X_0 (g/L)	0.273	0.130	0.070	0.353
$X_{\max}$ (g/L)	5.802	6.362	5.972	6.070
$\mu_{\max}$ (1/h)	0.108	0.164	NC	NC
$r_{\max}$ (g/Lh)	NC	NC	0.157	0.274
t_L (h)	NC	NC	9.20	12.84
R^2	0.9885	0.9968	0.9931	0.9933

NC = Not calculated

ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) ทำให้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส และไซโลสเพิ่มขึ้น โดยมีความเข้มข้นเท่ากับ 15.58 และ 21.64 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่สารละลาย Hydrolyzed Cheese Whey Permeates ซึ่งผ่านกระบวนการย่อยด้วยเอนไซม์เบต้า-กาแลคโตซิเดส (β -galactosidase) มีน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลกาแลคโตสรวมกันเท่ากับ 180 กรัมต่อลิตร ยีสต์จึงสามารถเจริญเติบโตในวัตถุดิบดังกล่าวได้ดีและผลิตชีวมวลได้สูง ในขณะที่เศษน้ำย่อยแป้งมีน้ำตาลกลูโคสอยู่ที่เท่ากับ 118.57 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เปลือกผลไม้แห้ง (Empty Fruit Bunch Lignocellulosic Hydrolysate) ที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์เซลลูเลส มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 14.7 กรัมต่อลิตร (Hermansyah et al., 2015) ซึ่งน้อยกว่าในวัตถุดิบชนิดอื่นจึงทำให้ยีสต์ผลิตชีวมวลได้น้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม นอกจากแหล่งคาร์บอนที่มีในวัตถุดิบแล้ว จะต้องคำนึงถึงธาตุอาหารชนิดอื่นที่ช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของยีสต์ได้อีกด้วย จากงานวิจัยนี้เห็นได้ว่าองค์ประกอบของวัตถุดิบมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตชีวมวลยีสต์ ดังนั้นควรมีการย่อยหรือปรับสภาพของวัตถุดิบด้วยกระบวนการที่เหมาะสมก่อนนำไปใช้ในการเพาะเลี้ยงยีสต์ต่อไป

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการผลิตชีวมวลยีสต์โดยใช้ของเหลือชนิดต่าง ๆ มาเป็นวัตถุดิบ

Carbon Source	Optimized Variable	Biomass (g/L)	References
1. Bamboo Wastewater	Initial pH 6.1, Fermentation Time 69 h and Yeast Extract 1.17 g/L	14.67	Li et al., 2009
2. Hydrolyzed Cheese Whey Permeates	(NH ₄) ₂ SO ₄ 1.93 g/L, MgSO ₄ 0.04 g/L, KH ₂ PO ₄ 0.06 g/L and Hydrolyzed CWP 40 g/L	8.20	Trigueros et al., 2016
3. Empty Fruit Bunch Lignocellulosic Hydrolysate	Temperature 30°C, Fermentation Time 24 h and Aeration Rate 1.0 vvm	1.04	Hermansyah et al., 2015
4. Starch Hydrolysate Waste	Total Soluble Solid 16.73°Brix, pH 4.84, Yeast Extract 8.78 g/L and Aeration Rate 1.0 vvm	6.13	This Study

สรุป

จากการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ พบว่าปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (A) ค่าความเป็นกรดต่าง (C) และสารสกัดจากยีสต์ (D) มีอิทธิพลต่อการผลิตชีวมวลยีสต์สูงสุด โดยสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตชีวมวลยีสต์คือ ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด เท่ากับ 16.73 องศา บริกซ์ ความเป็นกรดต่าง เท่ากับ 4.84 และสารสกัดจากยีสต์ เท่ากับ 8.78 กรัมต่อลิตร โดยสามารถผลิต ชีวมวลได้สูงสุดเท่ากับ 2.95 กรัมต่อลิตร และสามารถสร้างสมการกำลังสองได้ดังสมการที่ (4) ซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9624 จากการศึกษา ยังพบว่าอัตราการให้อากาศมีอิทธิพลต่ออัตราการผลิตชีวมวลยีสต์ในถังหมักขนาด 5 ลิตร โดยที่อัตราการให้อากาศ 1.0 วีวีเอ็ม มีน้ำหนักรวมชีวมวลยีสต์ และอัตราการผลิตชีวมวลยีสต์สูงสุด ซึ่งสูงกว่าอัตราการให้อากาศ 0.5 วีวีเอ็ม เท่ากับ 10 และ 75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าแบบหุ่นของ Logistic และ แบบหุ่นประยุกต์ของ Gompertz สามารถใช้ในการเลียนแบบการเจริญของยีสต์ในถังหมักได้เป็นอย่างดี และข้อมูลจากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการบริหารจัดการและเพิ่มมูลค่าของเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้แป้งเป็นวัตถุดิบได้ และยังช่วยลดภาระการกำจัดของเหลือทิ้งได้อีกทางหนึ่ง

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ บริษัท ดับเบิลยูจีซี จำกัด ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์เศษน้ำย่อยแบ่งสำหรับการวิจัยนี้ ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ที่อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Aslan, N. & Cebeci, Y. (2007). Application of Box-Behnken design and response surface methodology for modeling of some Turkish coals. **Fuel**. 86(1-2), 90–97.
- Capozzi, V., Garofalo, C., Chiriatti, M. A., Grieco, F. & Spano, G. (2015). Microbial terroir and food innovation: The case of yeast biodiversity in wine. **Microbiological Research**. 181, 75-83.
- Dodic, J. M., Vucurovic, D. G., Dodic, S. N., Grahovac, J. A., Popov, S. D. & Nedeljkovic, N. M. (2012). Kinetic modelling of batch ethanol production from sugar beet raw juice. **Applied Energy**. 99, 192-197.
- Doran, P. M. (2013). **Bioprocess engineering principles**. 2nd edition. Amsterdam: Academic Press.
- Fadel, M., Hassanein, N. M., Elshafei, M. M., Mostafa, A. H., Ahmed, M. A. & Khater, H. M. (2017). Biosorption of manganese from groundwater by biomass of *Saccharomyces cerevisiae*. **Housing and Building National Research Center Journal**. 13(1), 106-113.
- Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E. & Tavarela, J. G. (2010). Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: characteristics and potential applications. **Trends in Food Science & Technology**. 21(2), 77-84.
- Hermansyah, H., Putri Wisman, A., Firdaus, D., Arbianti, R., Utami, T. & Kurnia, A. (2015). Effect of aeration and nutrients on *Saccharomyces cerevisiae* cultivation using lignocellulosic hydrolysate from empty fruit bunch. **International Journal of Technology**. 6, 1110.
- Li, X., Ouyang, J., Xu, Y., Chen, M., Song, X., Yong, Q. & Yu, S. (2009). Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. **Bioresource Technology**. 100(14), 3613-3617.

- Li, Z., Wang, D. & Shi, Y. C. (2017). Effects of nitrogen source on ethanol production in very high gravity fermentation of corn starch. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**. 70(Supplement C), 229-235.
- Limtong, S. (2006). **Yeasts: Biodiversity and Biotechnology**. Bangkok: KU Press. (in Thai)
- Mathur, G., Mathur, A., Sharma, B. M. & Chauhan, R. S. (2013). Enhanced production of laccase from *Coriolus* sp. using Plackett–Burman design. **Journal of Pharmacy Research**. 6(1), 151-154.
- Najafpour, G. D. (2015). **Biochemical Engineering and Biotechnology**. 2nd edition. Amsterdam: Elsevier.
- Nuanpeng, S., Thanonkeo, S., Klanrit, P. & Thanonkeo, P. (2018). Ethanol production from sweet sorghum by *Saccharomyces cerevisiae* DBKKUY-53 immobilized on alginate-loofah matrices. **Brazilian Journal of Microbiology**, In Press.
- Pilot Plant Development and Training Institute. (2003). **Surveying and collecting data of water utilization and energy in tapioca starch factories**. Thonburi: King Mongkut's University of Technology Thonburi. (in Thai)
- Pinpimai, K., Rodkhum, C., Chansue, N., Katagiri, T., Maita, M. & Pirarat, N. (2015). The study on the candidate probiotic properties of encapsulated yeast, *Saccharomyces cerevisiae* JCM 7255, in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Research in Veterinary Science**. 102, 103-111.
- Rajoka, M. I., Khan, S. H., Jabbar, M. A., Awan, M. S. & Hashmi, A. S. (2006). Kinetics of batch single cell protein production from rice polishings with *Candida utilis* in continuously aerated tank reactors. **Bioresource Technology**. 97(15), 1934-1941.
- Taccari, M., Canonico, L., Comitini, F., Mannazzu, I. & Ciani, M. (2012). Screening of yeasts for growth on crude glycerol and optimization of biomass production. **Bioresource Technology**. 110(0), 488-495.
- Trigueros, D. E. G., Fiorese, M. L., Kroumov, A. D., Hinterholz, C. L., Nadai, B. L. & Assunção, G. M. (2016). Medium optimization and kinetics modeling for the fermentation of hydrolyzed cheese whey permeate as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. **Biochemical Engineering Journal**. 110, 71-83.

- Veglio', F. & Beolchini, F. (1997). Removal of metals by biosorption: a review. **Hydrometallurgy**, 44(3), 301-316.
- Yen, H. W., & Liu, Y. X. (2014). Application of airlift bioreactor for the cultivation of aerobic oleaginous yeast *Rhodotorula glutinis* with different aeration rates. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 118(2), 195-198.
- Zajšek, K. & Goršek, A. (2010). Modelling of batch kefir fermentation kinetics for ethanol production by mixed natural microflora. **Food and Bioproducts Processing**. 88(1), 55-60.
- Zhou, J., Yu, X., Ding, C., Wang, Z., Zhou, Q., Pao, H. & Cai, W. (2011). Optimization of phenol degradation by *Candida tropicalis* Z-04 using Plackett-Burman design and response surface methodology. **Journal of Environmental Sciences**. 23(1), 22-30.
- Zou, W., Han, R., Chen, Z., Shi, J. & Liu. (2006). Characterization and properties of manganese oxide coated zeolite as adsorbent for removal of Copper(II) and Lead(II) ions from solution. **Journal of Chemical & Engineering Data**. 51(2), 534-541.
-