

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SC90  
สำหรับกระบวนการหมักที่ใช้กากน้ำตาลอ้อย

PREPARATION OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* SC90  
INOCULUMS FOR FERMENTATION PROCESS  
USING SUGARCANE MOLASSES

ลัดดาวัลย์ ป้องศรี<sup>1</sup> สมพจน์ อันติมานนท์<sup>2</sup> สร้อยสุตา พรภักดีวัฒนา<sup>3</sup> และ เทพปัญญา เจริญรัตน์<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ปทุมธานี 12120

<sup>2</sup>ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี 12120

<sup>3</sup>คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

Laddawan Pongsri<sup>1</sup>, Sompot Antimanon<sup>2</sup>, Soisuda Pornpukdeewattana<sup>3</sup>  
and Theppanya Charoenrat<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Pathum Thani, 12120,

<sup>2</sup>National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology  
Development Agency (NSTDA), Pathum Thani, 12120,

<sup>3</sup>Faculty of Agro-Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, 10520

\*E-mail: theppanya\_c@sci.tu.ac.th

Received: 2019-06-06

Revised: 2019-07-30

Accepted: 2019-07-30

### บทคัดย่อ

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรม ประกอบกับประเทศไทยเป็นแหล่งสำคัญในการผลิตน้ำตาลและมีกากน้ำตาลเป็นผลพลอยได้หลัก ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สำคัญในสร้างผลิตภัณฑ์ผ่านการหมักโดยยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้งนี้ การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ถือเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จของกระบวนการหมัก ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการทดสอบวิธีการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 เพื่อหาวิธีเตรียมกล้าเชื้อที่เหมาะสมซึ่งให้กล้าเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักกากน้ำตาลอ้อย โดยศึกษาการเตรียมกล้าเชื้อ 3 วิธีที่แตกต่างกัน ประกอบด้วยวิธีที่ 1) เตรียมกล้าเชื้อสองขั้นตอนโดยขั้นที่หนึ่งและขั้นที่สองเตรียมในอาหารวายฟีดี้ วิธีที่ 2) เตรียมกล้าเชื้อสองขั้นตอนโดยขั้นที่หนึ่งเตรียมในอาหารวายฟีดี้ และ

ขั้นที่สองเตรียมในอาหารกากน้ำตาล และวิธีที่ 3) เตรียมกล้าเชื้อแบบหนึ่งขั้นตอนในอาหารกากน้ำตาล ซึ่งการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 ใช้เวลานานที่สุด (32 ชั่วโมง) รองลงมา คือ วิธีที่ 2 (30 ชั่วโมง) และวิธีที่ 3 (24 ชั่วโมง) ตามลำดับ ในขณะที่ค่าความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าสูงสุดเมื่อเตรียมกล้าเชื้อด้วยวิธีที่ 2 ( $(26.86 \pm 1.66) \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) รองลงมา คือ วิธีที่ 3 ( $(22.89 \pm 1.40) \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) และวิธีที่ 1 ( $(19.44 \pm 1.50) \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ตามลำดับ โดยเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากแต่ละวิธีโดยการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอาหารกากน้ำตาล พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ในทันทีโดยไม่พบระยะปรับตัวเมื่อใช้กล้าเชื้อที่เตรียมจากวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 และให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตสูงกว่าการใช้กล้าเชื้อที่เตรียมจากวิธีที่ 1 ประมาณ 2 เท่า รวมทั้งยังใช้ระยะเวลาของกระบวนการน้อยกว่าการใช้กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีที่ 1 โดยการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 ที่พัฒนาขึ้นสามารถลดระยะเวลาและขั้นตอนในการเตรียมแต่ยังคงได้กล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูง จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมในการประยุกต์ในอุตสาหกรรมหมักที่ใช้กากน้ำตาลต่อไป

**คำสำคัญ:** กากน้ำตาลอ้อย กล้าเชื้อยีสต์ ระยะปรับตัว *Saccharomyces cerevisiae* SC90

## ABSTRACT

Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) is an important microorganism used in the industries. Thailand is a major source of refined sugar whose major byproduct is molasses, which is fermented into several products using *S. cerevisiae*. The preparation of the yeast inoculum can affect successful fermentation, therefore the aim was to test preparation methods of *S. cerevisiae* SC90 inoculum in order to optimize its effectiveness in fermentation of molasses. Three different inoculum preparation methods were studied as follows: Method 1) preparation of step 1 and step 2 in YPD medium, Method 2) preparation of step 1 in YPD medium and step 2 in molasses medium and Method 3) preparation one step in the molasses medium. Inoculum preparation using the Method 1 spent the longest period (32 h) followed by the Method 2 (30 h) and the Method 3 (24), respectively. While the highest viable cells was shown in the inoculum prepared using the Method 2 ( $(26.86 \pm 1.66) \times 10^7$  cell/mL) followed by the Method 3 ( $(22.89 \pm 1.40) \times 10^7$  cell/mL) and the Method 1 ( $(19.44 \pm 1.50) \times 10^7$  cell/mL), respectively. The efficiency of inoculum prepared using different methods was evaluated by fermentation in the bioreactor containing molasses medium. The results showed that cells can grow immediately without lag period when the process inoculated with inoculum from the Method 2 and the Method 3. Furthermore, about two

times higher cell viability and shorter total process time were achieved comparing to the process inoculated with inoculum from the Method 1. The developed method, the Method 3, could reduce the time and step for inoculum preparation with high efficiency of inoculum. Therefore, the Method 3 may an appropriate method for application in the fermentation industry using molasses.

**Keywords:** Sugarcane molasses, Inoculums, Lag period, *Saccharomyces cerevisiae* SC90

## บทนำ

ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมหมักที่หลากหลาย เช่น อุตสาหกรรมการผลิตยีสต์ขนมปัง อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเชิงพลังงาน เป็นต้น สำหรับประเทศไทย อุตสาหกรรมการหมักโดยยีสต์ *S. cerevisiae* นิยมใช้วัตถุดิบทางการเกษตรหรือใช้ผลพลอยได้จากการผลิตและแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร เช่น มันสำปะหลัง กากมันสำปะหลัง และกากน้ำตาลอ้อย (sugarcane molasses) เป็นต้น ทั้งนี้ กากน้ำตาลอ้อยถือเป็นวัตถุดิบที่มีข้อได้เปรียบเชิงกระบวนการสำหรับอุตสาหกรรมการหมักเนื่องจากสามารถนำมาใช้ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมที่ยุ่งยากง่ายต่อการเก็บรักษาเมื่อเทียบกับวัตถุดิบอื่น (Demirbas, 2007) ส่วนการหมักโดยใช้วัตถุดิบจำพวกพืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ โดยทั่วไปต้องผ่านกระบวนการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลโดยการทำงานของเอนไซม์ก่อนจึงจะนำมาใช้ในการหมัก (Gray et al., 2006) ดังนั้น เพื่อเป็นการลดขั้นตอนในการเตรียมวัตถุดิบ กากน้ำตาลจากอ้อยจึงเป็นวัตถุดิบที่เหมาะสมในอุตสาหกรรมการหมัก นอกจากนี้ไทยยังเป็นที่ที่มีการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อยเป็นปริมาณมาก ทำให้มีผลพลอยได้ในรูปกากน้ำตาลปริมาณมากซึ่งช่วยลดความเสี่ยงต่อการขาดแคลนวัตถุดิบ ทั้งนี้ สำนักบริหารอ้อยและน้ำตาล ได้รายงานข้อมูล ณ วันที่ 8 มีนาคม 2562 ว่าในปี พ.ศ. 2561/2562 มีปริมาณกากน้ำตาลที่ผลิตในประเทศสูงถึง 4.4 ล้านตัน (Office of the Cane and Sugar Board, Ministry of Industry, 2019)

ในการผลิตยีสต์ขนมปังและเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อย ปัญหาที่พบได้บ่อยของกระบวนการหมัก คือ หลังจากถ่ายกล้ำเชื้อยีสต์ลงถึงปฏิกรณ์ชีวภาพ ยีสต์ต้องใช้เวลาในการปรับตัวนานหรือในบางครั้งที่เชื้อไม่สามารถปรับตัวได้จะทำให้การหมักครั้งนั้นเสียหายทั้งหมด แสดงให้เห็นว่าคุณภาพของกล้ำเชื้อเป็นสิ่งที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหมักเป็นอย่างมาก (Pham et al., 1998 ; Ginovart et al., 2011) ซึ่งวิธีมาตรฐานในการเตรียมกล้ำเชื่อนิยมใช้อาหารมาตรฐานสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดในการเตรียม เช่น การเตรียมกล้ำเชื้อสำหรับแบคทีเรียนิยมใช้อาหารนิวเตรียนต์ (Nutrient medium) การเตรียมกล้ำเชื้อสำหรับยีสต์นิยมใช้อาหารยีสต์

สกัดเปปโตเนเด็กโทรส หรือ อาหารวายพีดี (Yeast extract Peptone Dextrose medium หรือ YPD medium) เป็นต้น ทั้งนี้ การเตรียมกล้าเชื้อในอาหารคนละชนิดกับอาหารที่ใช้ในการหมักจริง โดยมากจะส่งผลให้ระยะเวลาในช่วงปรับตัวของจุลินทรีย์ในการหมักจริงนานขึ้น ซึ่งก่อนหน้านี้ Charoenrat et al. (2013) ได้รายงานว่า การเตรียมกล้าเชื้อในอาหารที่มีองค์ประกอบคล้ายกับอาหารที่ใช้ในการหมักจริงเป็นแนวทางที่มีประสิทธิภาพในการลดระยะเวลาในช่วงระยะปรับตัวและเซลล์พร้อมที่จะเจริญเติบโตได้ทันทีหลังจากการเติมกล้าเชื้อลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ อย่างไรก็ตามวิธีการของ Charoenrat et al. (2013) ต้องอาศัยการเตรียมกล้าเชื้อถึง 2 ขั้นตอน ซึ่งขั้นตอนที่ 1 ใช้เวลา 24 ชั่วโมง และขั้นตอนที่ 2 ใช้เวลานานถึง 52 ชั่วโมง ซึ่งถึงแม้ว่ากล้าเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีการดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพสูงสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แต่ต้องใช้เวลาในการเตรียมกล้าเชื้อรวมกัน 2 ขั้นตอนนานถึง 76 ชั่วโมง ดังนั้น ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยจึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อพัฒนาการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ให้ใช้เวลาสั้นลง และได้กล้าเชื้อที่มีความพร้อมและมีประสิทธิภาพในการหมักกากน้ำตาลอ้อย โดยเมื่อถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอาหารซึ่งเตรียมจากกากน้ำตาลอ้อย ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้เร็ว มีระยะเวลาในการปรับตัวและระยะเวลาที่ใช้ในการหมักที่สั้น อันจะส่งผลให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพสูงขึ้น

## วิธีการ

### 1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ซึ่งผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยยีสต์สายพันธุ์นี้เริ่มต้นคัดแยกได้จากน้ำกากส่าโรงเหล้าซีแกรม (Seagram) ประเทศอินโดนีเซีย ซึ่งเชื้อยีสต์นี้สามารถหมักกากน้ำตาลและให้แอลกอฮอล์สูงในช่วง 10 - 12 ดีกรี สามารถทนต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์สูง และทนอุณหภูมิได้สูงถึง 40 องศาเซลเซียส (Department of Alternative Energy Development and Efficiency, 2016)

### 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 อาหารยีสต์สกัดเปปโตเนเด็กโทรส หรือ อาหารวายพีดี (Yeast extract Peptone Dextrose medium หรือ YPD medium) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10.00 กรัม เปปโตเน 20.00 กรัม และกลูโคส 20.00 กรัม ปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับพีเอชเป็น 4.5

2.2 อาหารกากน้ำตาล ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย กากน้ำตาลอ้อย 46.81 กรัม (มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 47.00 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) และแอมโมเนียมซัลเฟต 7.72 กรัม ปริมาตรเป็น 1 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น และปรับพีเอชเป็น 4.5 โดยอาหารที่ได้จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้นประมาณ 20-22 กรัมต่อลิตร ซึ่งอาหารกากน้ำตาลที่ใช้พัฒนาขึ้นโดยอาศัยข้อมูลจากเอกสารอ้างอิง (Pradeep & Reddy, 2010; Danbamrongtrakool

et al., 2014 ; Ngow et al., 2017) โดยในการศึกษาวิจัยนี้ได้เลือกใช้กากน้ำตาล เอ็ม โมลาส (M Molasses) ของบริษัท รวมเกษตรกรอุตสาหกรรม จำกัด (มิตรภูเวียง)

### 3. วิธีที่ใช้เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ในพลาสติกเขย่า

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ในพลาสติกเขย่าซึ่งเลือกมาศึกษาในการทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 วิธี ที่แตกต่างกันโดยมุ่งเน้นการศึกษาอิทธิพลของชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและจำนวนชั้นของการเตรียมกล้าเชื้อ ซึ่งทั้งสองปัจจัยส่งผลต่อความหนาแน่นของเซลล์และระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อ ทั้งนี้ เป้าหมายหลักของการศึกษาในส่วนนี้เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่อไป

#### 3.1 การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 (วิธีอ้างอิง)

การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 เป็นการเตรียมกล้าเชื้อแบบ 2 ขั้นตอน โดยทั้ง 2 ขั้นตอนใช้อาหารวายเป็นฟีด ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

1. กล้าเชื้อขั้นที่หนึ่ง เตรียมโดยถ่ายเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 จากคลังเซลล์ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารวายเป็นฟีดปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่ (stationary phase) โดยเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการใช้เป็นกล้าเชื้อในขั้นถัดไป คือ เซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตลด (deceleration phase)

2. กล้าเชื้อขั้นที่สอง เตรียมโดยนำกล้าเชื้อที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตลดมาปรับความเข้มข้นให้เท่ากับ  $3 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นถ่ายสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารวายเป็นฟีด ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร (ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่หนึ่งเป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

#### 3.2 การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 2

การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 2 เป็นการเตรียมกล้าเชื้อแบบ 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่หนึ่งใช้อาหารวายเป็นฟีด และขั้นตอนที่สอง ใช้อาหารกากน้ำตาล ซึ่งมีรายละเอียด ดังนี้

1. กล้าเชื้อขั้นที่หนึ่งเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่หนึ่งของการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 (หัวข้อ 3.1 ข้อที่ 1)

2. กล้าเชื้อขั้นที่สองเตรียมเช่นเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สองของการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 (หัวข้อ 3.1 ข้อที่ 2) ยกเว้นอาหารที่ใช้ศึกษาเปลี่ยนจากอาหารวายเป็นฟีดเป็นอาหารกากน้ำตาล

### 3.3 การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3

การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 เป็นการเตรียมกล้าเชื้อแบบขั้นตอนเดียว ทำโดยถ่ายเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 จากคลังเซลล์ที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอล 30 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารกากน้ำตาล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16-20 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

## 4. การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากทั้ง 3 วิธี ดำเนินการในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (Biostat B plus Twin., Sartorius Stedim Biotech Germany) ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์โดยถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมด้วยวิธีที่ 1 2 และ 3 ที่ผ่านการปรับความเข้มข้นของกล้าเชื้อเป็น  $3 \times 10^9$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอาหารกากน้ำตาลปริมาตร 2 ลิตร ซึ่งจะทำให้ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้นในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเท่ากับ  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ควบคุมสภาวะที่ใช้ในกระบวนการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 500 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตร.นาที่ พีเอช 4.5 (ปรับด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และกรดฟอสฟอริก ( $H_3PO_4$ ) ความเข้มข้น 2 โมลาร์) ทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตคงที่

## 5. วิธีการวิเคราะห์

### 5.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งทำโดยชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ได้จากการนำตัวอย่างน้ำหมักมาหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ ล้างตะกอนเซลล์ด้วยดื่มน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าน้ำหนักจะคงที่ ปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น แล้วจึงชั่งหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

### 5.2 การวิเคราะห์จำนวนเซลล์ทั้งหมด จำนวนเซลล์มีชีวิต และร้อยละเซลล์มีชีวิต

การวิเคราะห์ทำโดยนำตัวอย่างน้ำหมักมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 9 กรัมต่อลิตร ในอัตราส่วนที่เหมาะสม จากนั้นผสมสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้กับสารละลายซีเตรตเมทิลีนไวโอเลต ในอัตราส่วน 1:1 บ่มเป็นเวลา 5 นาที ดูดสารละลายตัวอย่างลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemocytometer) และนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่ติดสีม่วงคือเซลล์ที่ตายและเซลล์ที่ไม่ติดสีคือเซลล์ที่มีชีวิต (Smart et al., 1999)

### 5.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (total sugar)

เนื่องจากการศึกษานี้มีส่วนที่ใช้กากน้ำตาลอ้อยในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งในกากน้ำตาลมีทั้งน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลที่ไม่ใช่สารลดรีดิวซ์ ซึ่งวิธีการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

ทั้งหมดโดยทั่วไปนิยมใช้วิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวเป็นวิธีที่ใช้สารเคมีที่เป็นอันตราย ดังนั้น การศึกษานี้จึงพัฒนาวิธีการหาน้ำตาลทั้งหมดโดยการย่อน้ำตาลที่มีทั้งหมดในกากน้ำตาลอ้อยให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งมีสมบัติเป็นน้ำตาลรีดิวซ์ จากนั้นจึงวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี Dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) และใช้กลูโคสเป็นสารมาตรฐาน โดยมีขั้นตอนโดยสรุป คือ นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจึงวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธี DNS ซึ่งค่าที่จากวิธีการนี้มีค่าใกล้เคียงกับความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดที่วิเคราะห์ด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก

#### 5.4 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล

ความเข้มข้นของเอทานอลวิเคราะห์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ที่ต่อกับคอลัมน์ Supelcogel H (250 x 4.6 มิลลิเมตร) และดีเทคเตอร์แบบรีเฟลคทีฟอินเดกซ์ หรือแบบอาร์ไอ (reflective index detector หรือ RID) สารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ กรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิของคอลัมน์ควบคุมเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ปริมาตรของสารตัวอย่างในการฉีด คือ 10 ไมโครลิตร และอัตราการไหล 0.17 มิลลิลิตรต่อนาที

#### 5.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การแสดงผลเป็นค่าตัวเลขจะแสดงในรูปค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ในขณะที่การแสดงผลในรูปกราฟจะแสดงเป็นค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานจะแสดงเป็นแถบค่าคลาดเคลื่อน ค่าทั้งสองได้มาจากการคำนวณในโปรแกรม Microsoft Excel 2010 โดยใช้ฟังก์ชัน AVERAGE และ STDEV ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16 ด้วยวิธี Unpaired two-tailed t-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ .05 ( $p \leq .05$ )

### ผลการทดลอง

#### 1. การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ในพลาสติกเขย่า

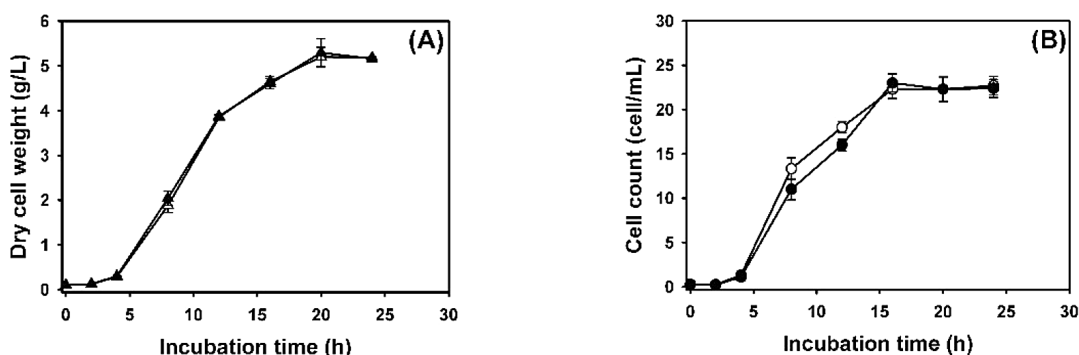
งานวิจัยนี้เลือกศึกษาวิธีการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ทั้งหมด 3 วิธี ดังรายละเอียดที่ได้กล่าวไปแล้วในส่วนของการวิจัย โดยผลการเจริญเติบโตของเชื้อระหว่างการเตรียมกล้าเชื้อทั้ง 3 วิธี มีรายละเอียดดังนี้

##### 1.1 การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 (วิธีอ้างอิง)

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์โดยทั่วไปจะทำการเตรียมแบบ 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนที่หนึ่งโดยมากมีวัตถุประสงค์เพื่อกระตุ้นการเจริญเติบโตของเชื้อ (refresh cell) และขั้นตอนที่สองมีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ให้มากขึ้น ทั้งนี้ อาหารเลี้ยงเชื้อมาตรฐานที่นิยมใช้ใน

การเลี้ยงยีสต์ คือ อาหารวายเป็นดี โดยการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 เป็นวิธีการที่มีการใช้กันโดยทั่วไปในการศึกษาวิจัยนี้จึงใช้การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 เป็นวิธีอ้างอิงเพื่อใช้เปรียบเทียบกับวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 ที่มีการพัฒนาขึ้น

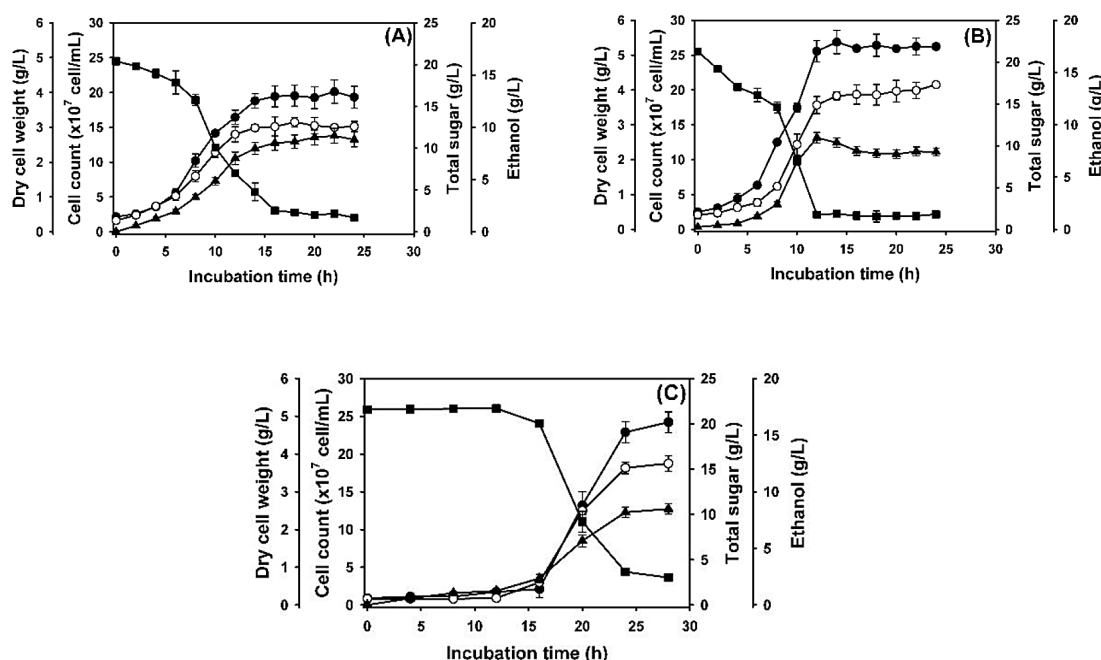
เนื่องจากการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่หนึ่งของวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ใช้วิธีการเดียวกัน คือ การเตรียมกล้าเชื้อในอาหารวายเป็นดี ดังนั้น จึงจะกล่าวถึงผลการทดลองของทั้งสองวิธีไปด้วยกัน โดยผลการทดลองที่ได้แสดงดังรูปที่ 1 ซึ่งผลที่ได้จากการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่หนึ่งของวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ให้ผลใกล้เคียงกันมาก แสดงให้เห็นถึงความเที่ยงตรงของกระบวนการในแง่มุมของการทำซ้ำ (reproducible) ซึ่งหลังจากมีการถ่ายเชื้อเริ่มต้นที่เก็บในกลีเซอรอลลงในอาหารวายเป็นดี เชื้อใช้เวลาในระยะปรับตัว (lag phase) ประมาณ 1.47 – 1.97 ชั่วโมง จากนั้นจึงสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (exponential growth phase) โดยให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะประมาณ  $0.23 \pm 0.01$  ต่อชั่วโมง และเซลล์เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตลด (decelerating growth phase) หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ 4.60 – 4.65 กรัมต่อลิตร และมีค่าความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตประมาณ  $(22.30-23.00) \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ที่ระยะเวลา 16 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สองต่อไป เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตลดถือว่ามีความหนาแน่นของเซลล์สูงใกล้เคียงกับเซลล์ในระยะการเจริญเติบโตคงที่ แต่ยังคงมีการเจริญเติบโตอยู่ ดังนั้น จึงเป็นเซลล์ที่มีความพร้อมในการเจริญเติบโตต่อไปได้ในทันทีเมื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักในขั้นถัดไป



**รูปที่ 1** รูปแบบการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหาร YPD ระหว่างการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่หนึ่งในรูปของ (A) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (สัญลักษณ์สามเหลี่ยม) และ (B) ค่าความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิต (สัญลักษณ์วงกลม) ของการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 (สัญลักษณ์โปร่ง) และวิธีที่ 2 (สัญลักษณ์ทึบ)

สำหรับการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อชั้นที่สองของวิธีที่ 1 (รูปที่ 2 A) ซึ่งทำการเตรียมในอาหารวุ้นที่ดี พบว่า ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ในทันทีหลังจากเติมกล้าเชื้อโดยไม่พบระยะการปรับตัว ทั้งนี้ เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อชั้นที่หนึ่งและกล้าเชื้อชั้นที่สองเป็นอาหารชนิดเดียวกัน โดยค่าอัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าประมาณ  $0.18 \pm 0.02$  ต่อชั่วโมง และเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 ชั่วโมง โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งประมาณ  $3.02 \pm 0.28$  กรัมต่อลิตร และมีค่าความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตมีค่าประมาณ  $(19.44 \pm 1.50) \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าวัตถุประสงค์หลักของการเตรียมกล้าเชื้อ คือ การผลิตเซลล์ที่มีชีวิต แต่ในการเตรียมกล้าเชื้อชั้นที่สองสามารถตรวจพบการผลิตเอทานอลซึ่งไม่ใช่ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการให้เกิดขึ้นในระหว่างการเตรียมกล้าเชื้อโดยมีความเข้มข้นสูงถึง  $8.51 \pm 0.71$  กรัมต่อลิตร แม้ว่าจะมีการให้อากาศโดยการเขย่าฟลาสก์ก็ตาม ผลที่ได้นี้สามารถอธิบายได้ใน 2 ประเด็น คือ ประเด็นที่ 1. การถ่ายเทมวลของออกซิเจนโดยการเขย่าฟลาสก์มีค่าน้อยกว่าความต้องการออกซิเจนของระบบทำให้เกิดสภาวะจำกัดออกซิเจน และประเด็นที่ 2. ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 จัดเป็น crabtree positive yeast ซึ่งถึงแม้ว่าออกซิเจนจะไม่จำกัด ยีสต์กลุ่มนี้ก็สามารถเกิดวิถีการหมักได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกลูโคสสูง (Papini et al., 2012)

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า ที่ระยะเวลา 16 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง เซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโต ซึ่งเซลล์ยังมีการเจริญเติบโตอยู่และมีค่าความเข้มข้นของเซลล์สูง ประกอบกับเมื่อพิจารณาค่าร้อยละของเซลล์มีชีวิต พบว่าที่ 16 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง มีค่าเท่ากับ 100 (ตารางที่ 1) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกเซลล์ที่ระยะเวลา 16 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง สำหรับใช้เป็นตัวแทนกล้าเชื้อที่ได้จากการเตรียมกล้าเชื้อด้วยวิธีที่ 1 เพื่อใช้ในการศึกษาการเจริญเติบโตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพต่อไป โดยระยะเวลารวมในการเตรียมกล้าเชื้อด้วยวิธีที่ 1 มีค่าเท่ากับ 32 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อชั้นที่หนึ่ง 16 ชั่วโมง และเป็นระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อชั้นที่สองอีก 16 ชั่วโมง



## รูปที่ 2 รูปแบบการเจริญเติบโต การใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล

ของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ระหว่างการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สอง

(A) การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สองด้วยวิธีที่ 1 (B) การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สองด้วยวิธีที่ 2

และ (C) การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 โดยมีค่าที่แสดง คือ ค่าความเข้มข้น

ของเซลล์มีชีวิต (วงกลมทึบ) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (วงกลมโปร่ง) ค่าความเข้มข้น

ของน้ำตาลทั้งหมด (สี่เหลี่ยมทึบ) และค่าความเข้มข้นของเอทานอล (สามเหลี่ยมทึบ)

### 1.2 การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 2

เมื่อนำกล้าเชื้อขั้นที่หนึ่งผ่านการเพาะเลี้ยงในอาหารวายที่ดี เป็นเวลา 16 ชั่วโมง (รูปที่ 1) เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อขั้นที่สองในอาหารกากน้ำตาล พบว่า เซลล์มีระยะเวลาในการปรับตัวนานถึง  $3.99 \pm 0.40$  ชั่วโมง ทั้งนี้ อาจเป็นผลมาจากอาหารที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่หนึ่งเป็นอาหารต่างชนิดกับอาหารที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สอง ซึ่งอาหารทั้งสองชนิดมีองค์ประกอบที่แตกต่างกันอย่างมาก โดยผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับรายงานของ (Charoenrat et al., 2013 & Lincoln., 1960) ซึ่งหลังจากเซลล์ผ่านระยะการปรับตัวเข้าสู่ระยะการเติบโตแบบทวีคูณ เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องและความหนาแน่นของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นโดยสัมพันธ์กับการลดลงของความเข้มข้นของน้ำตาล (รูปที่ 2 B) ซึ่งให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.26 \pm 0.03$  ต่อชั่วโมง (ตารางที่ 1) และหลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 14 ชั่วโมง เซลล์ได้เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตลด ซึ่งมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง

เท่ากับ  $3.83 \pm 0.12$  กรัมต่อลิตร ค่าความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตเท่ากับ  $(26.86 \pm 1.66) \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยไม่พบเซลล์ตาย และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตมีค่าเท่ากับ  $0.20 \pm 0.00$  กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัดความเข้มข้นของเอทานอลในระหว่างการเพาะเลี้ยง เช่นเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 โดยมีค่าความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ  $8.29 \pm 0.45$  กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1) จากผลการทดลองผู้วิจัยจึงเลือกใช้เซลล์ที่ระยะเวลา 14 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเป็นตัวแทนกล้าเชื้อที่ได้จากการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 2 สำหรับการศึกษาการเจริญเติบโตในถังปฏิกรณ์ชีวภาพในขั้นตอนต่อไป โดยระยะเวลารวมในการเตรียมกล้าเชื้อด้วยวิธีที่ 2 มีค่าเท่ากับ 30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่หนึ่ง 16 ชั่วโมง และเป็นระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สองอีก 14 ชั่วโมง

### 1.3 การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3

สำหรับการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 (รูปที่ 2 C) เป็นการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์แบบขั้นตอนเดียวในอาหารกากน้ำตาล จากผลการทดลองพบว่าเซลล์ใช้ระยะเวลาในการปรับตัวนานมากถึง  $11.82 \pm 1.55$  ชั่วโมง ซึ่งหลังจากเซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตแบบทวีคูณ เซลล์มีการเจริญเติบโตโดยให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.33 \pm 0.04$  ต่อชั่วโมง และเข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตลดที่ 24 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ  $3.63 \pm 0.15$  กรัมต่อลิตร ค่าความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตเท่ากับ  $(22.89 \pm 1.40) \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยไม่พบเซลล์ตาย (รูปที่ 2 C) มีค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตเท่ากับ  $0.19 \pm 0.00$  กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต และความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าเท่ากับ  $8.19 \pm 0.45$  กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 1)

เมื่อเปรียบเทียบผลจากการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 กับการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สองของวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 พบว่า การเตรียมกล้าเชื้อด้วยวิธีที่ 3 (การเตรียมกล้าเชื้อแบบขั้นตอนเดียว) เซลล์ใช้ระยะเวลาในการปรับตัวนานที่สุด คือ  $11.82 \pm 1.55$  ชั่วโมง รองลงมา คือ การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สองของวิธีที่ 2 ซึ่งใช้เวลา  $3.99 \pm 0.40$  ชั่วโมง และการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สองของวิธีที่ 1 ไม่พบระยะการปรับตัว อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาระยะเวลารวมในการเตรียมกล้าเชื้อ พบว่าการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 ใช้ระยะเวลาน้อยที่สุดเพียง 24 ชั่วโมง รองลงมา คือ การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 2 และวิธีที่ 1 ซึ่งใช้เวลาเท่ากับ 30 และ 32 ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาถึงพารามิเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่แสดงในตารางที่ 1 ซึ่งประกอบด้วยค่าความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิต ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิต และค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต พบว่าการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 2 ให้ผลการเจริญเติบโตดีที่สุด รองลงมา คือ การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 และวิธีที่ 1

จากข้อมูลที่ได้จากการเตรียมกล้าเชื้อทั้ง 3 วิธี พบว่าการเตรียมกล้าเชื้อแต่ละวิธีต่างมีข้อดีและข้อเสียที่ยากต่อการสรุปว่าการเตรียมกล้าเชื้อวิธีใดที่มีความเหมาะสมที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากวัตถุประสงค์หลักของการเตรียมกล้าเชื้อ คือ การเตรียมเซลล์ที่มีความหนาแน่นสูงซึ่งพร้อม

จะเจริญเติบโตเมื่อถ่ายลงในอาหารใหม่ในชั้นถัดไป ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่ได้จากการเตรียมทั้ง 3 วิธี โดยการติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อหลังจากถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากการเตรียมแต่ละวิธีลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอาหารกากน้ำตาล ซึ่งกล่าวในหัวข้อถัดไป

**ตารางที่ 1** ข้อมูลและค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 จากการเตรียมกล้าเชื้อทั้ง 3 วิธี<sup>1</sup>

| ข้อมูลจากการเพาะเลี้ยง <sup>2</sup>                               | วิธีที่ 1        | วิธีที่ 2        | วิธีที่ 3        |
|-------------------------------------------------------------------|------------------|------------------|------------------|
| ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตร<br>( $\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | 19.44 $\pm$ 1.50 | 26.86 $\pm$ 1.66 | 22.89 $\pm$ 1.40 |
| น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)                                    | 3.02 $\pm$ 0.28  | 3.83 $\pm$ 0.12  | 3.63 $\pm$ 0.15  |
| ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)                               | 8.51 $\pm$ 0.71  | 8.29 $\pm$ 0.45  | 8.19 $\pm$ 0.45  |
| ระยะเวลาปรับตัว (ชั่วโมง)                                         | 0.00 $\pm$ 0.00  | 3.99 $\pm$ 0.40  | 11.82 $\pm$ 1.55 |
| ร้อยละของเซลล์มีชีวิตร <sup>3</sup>                               | 100.00           | 100.00           | 100.00           |
| อัตราการเจริญเติบโตเชิงปริมาตร<br>(กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง)           | 0.19 $\pm$ 0.02  | 0.27 $\pm$ 0.01  | 0.15 $\pm$ 0.01  |
| ผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต<br>(กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรต)            | 0.17 $\pm$ 0.01  | 0.20 $\pm$ 0.00  | 0.19 $\pm$ 0.00  |
| ระยะเวลารวมในการเตรียมกล้าเชื้อ (ชั่วโมง)                         | 32.00            | 30.00            | 24.00            |

**หมายเหตุ :** <sup>1</sup> ข้อมูลของการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ที่แสดงในตารางเป็นข้อมูลจากการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่สอง

<sup>2</sup> ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่คำนวณได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ยกเว้นค่าร้อยละของเซลล์มีชีวิตร และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

<sup>3</sup> ค่าร้อยละของเซลล์มีชีวิตรแสดงค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ตัวอย่าง ณ เวลาที่เซลล์เข้าสู่ระยะการเจริญเติบโตลดลง

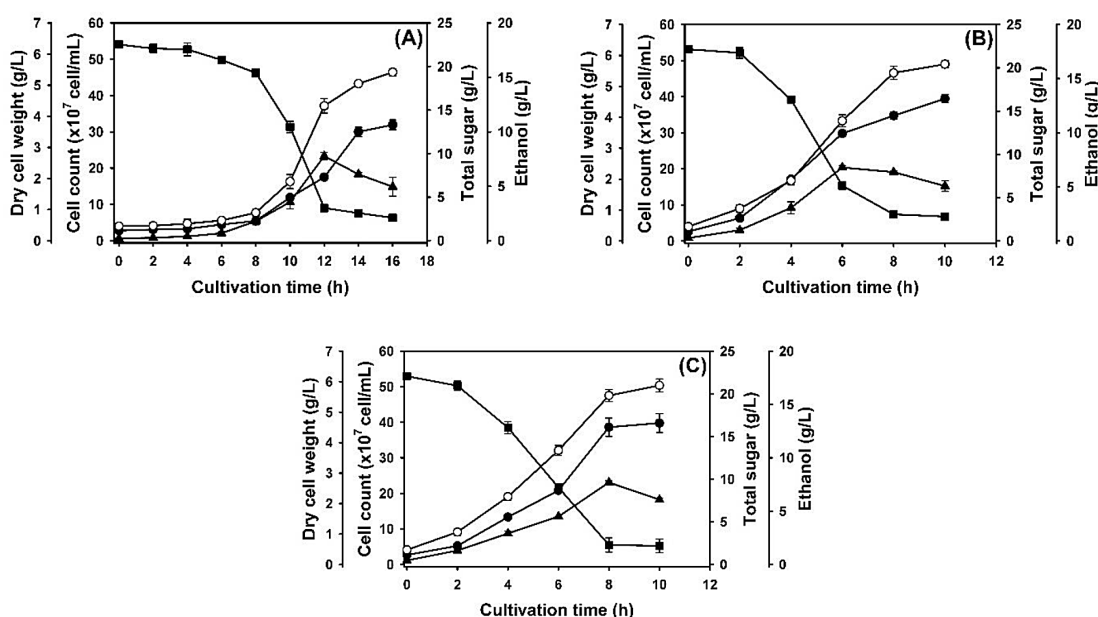
## 2. การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

จากที่ได้กล่าวเบื้องต้นในบทนำว่าอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลและอุตสาหกรรมการผลิตยีสต์ขนมปังในประเทศไทยส่วนใหญ่ใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นวัตถุดิบ ดังนั้น ในส่วนของการทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่เตรียมได้จึงเลือกทดสอบในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กากน้ำตาล และเพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อนของผลการทดสอบที่อาจเกิดขึ้นจากความแตกต่างของเชื้อเริ่มต้น ในการทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากทั้ง 3 วิธี จะมีการควบคุมความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ  $3 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร รายละเอียดดังที่ได้กล่าวไว้แล้วในวิธีดำเนินการวิจัยข้อที่ 4

ผลการทดลองพบว่า เมื่อนำกล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมได้จากวิธีที่ 1 ถ่ายลงสู่อาหารกากน้ำตาล เซลล์ยีสต์ต้องใช้เวลาในการปรับตัวเท่ากับ  $6.39 \pm 0.53$  ชั่วโมง จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณซึ่งเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องสอดคล้องกับความเข้มข้นของน้ำตาลที่ลดลง โดยมีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ  $0.40 \pm 0.03$  ต่อชั่วโมง ในขณะเดียวกันเซลล์มีการผลิตเอทานอลควบคู่กับการเจริญเติบโตแม้ว่าได้ทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีการให้อากาศและตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงค่าออกซิเจนละลาย (dissolved oxygen tension; DOT) ไม่จำกัด ซึ่งเป็นการยืนยันการเป็น crabtree positive yeast ของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ตามที่ได้กล่าวไปก่อนหน้านี้ (Papini et al., 2012) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 ชั่วโมง เซลล์มีอัตราการใช้น้ำตาลที่ลดลง โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ  $4.33 \pm 0.23$  กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตมีค่าเท่ากับ  $(17.80 \pm 0.74) \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร และความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าเท่ากับ  $7.77 \pm 0.35$  กรัมต่อลิตร (รูปที่ 3 A) และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตมีค่าเท่ากับ  $0.24 \pm 0.01$  กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต (ตารางที่ 2)

สำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 แสดงดังรูปที่ 3 (B) และ รูปที่ 3 (C) ตามลำดับ โดยพบว่าให้ผลการเจริญเติบโตที่ใกล้เคียงกัน กล่าวคือ เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ทันทีหลังจากถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยไม่พบระยะปรับตัว และเมื่อพิจารณาถึงความเข้มข้นของเซลล์ พบว่าเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างต่อเนื่องและให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะประมาณ 0.34 ต่อชั่วโมง ซึ่งกระบวนการดังกล่าวใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง 8 ชั่วโมง โดยมีค่าน้ำหนักเซลล์แห้งอยู่ในช่วง 5.40-5.60 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตมีค่าเท่ากับ  $(34-39) \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดอยู่ในช่วง 6-8 กรัมต่อลิตร และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตมีค่าเท่ากับ 0.25 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต (ตารางที่ 2) ซึ่งจากข้อมูลที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่าค่าจลนพลศาสตร์ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตซึ่งได้จากการทดสอบโดยใช้กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 มีค่าใกล้เคียงกันมาก

เมื่อทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากทั้ง 3 วิธี โดยอาศัยค่าจลนพลศาสตร์ที่แสดงดังตารางที่ 2 พบว่า การใช้กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีการที่ 1 เซลล์จะมีระยะปรับตัว ในขณะที่การใช้กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ทันทีโดยไม่มีระยะปรับตัว ทั้งนี้ เนื่องจากอาหารที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นสุดท้ายของการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 เป็นอาหารชนิดเดียวกันกับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำให้เซลล์ไม่ต้องการระยะเวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ ซึ่งการใช้อาหารในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นสุดท้ายเป็นอาหารชนิดเดียวกันหรือมีองค์ประกอบคล้ายกันกับอาหารที่ใช้ในการหมักจริงเป็นแนวทางหนึ่งที่สามารถลดระยะเวลาในการปรับตัวของเชื้อในการหมักจริง ซึ่งมีการรายงานก่อนโดย Charoenrat et al. (2013) และ Lincoln (1960)



**รูปที่ 3** การทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่เตรียมได้จาก (A) วิธีที่ 1 (B) วิธีที่ 2 และ (C) วิธีที่ 3 โดยติดตามการเจริญเติบโต การใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 เมื่อเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่เตรียมได้จากแต่ละวิธี โดยมีค่าที่แสดง คือ ค่าความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิต (วงกลมทึบ) ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (วงกลมโปร่ง) ค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด (สี่เหลี่ยมทึบ) และค่าความเข้มข้นของเอทานอล (สามเหลี่ยมทึบ)

เมื่อพิจารณาถึงค่าความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิต น้ำหนักเซลล์แห้ง และอัตราการใช้สับสเตรตเชิงปริมาตร ที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อที่เตรียมด้วยวิธีที่ 1 พบว่ามีค่าต่ำกว่าค่าที่ได้จากกล้าเชื้อที่เตรียมได้จากอีก 2 วิธี ประมาณ 1.95 1.25 และ 1.53 เท่าตามลำดับ ซึ่งผลได้จากกล้าเชื้อที่เตรียมด้วยวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 ให้ค่าต่าง ๆ ที่ใกล้เคียงกัน และเมื่อพิจารณาระยะเวลาทั้งหมดของกระบวนการตั้งแต่การเตรียมกล้าเชื้อจนสิ้นสุดการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่า กระบวนการที่ใช้กล้าเชื้อที่เตรียมจากวิธีที่ 1 ใช้ระยะเวลานานที่สุดคือ 44 ชั่วโมง รองลงมา คือ กระบวนการที่ใช้กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีที่ 2 ซึ่งใช้ระยะเวลาทั้งหมด 38 ชั่วโมง ส่วนกระบวนการที่ใช้กล้าเชื้อที่เตรียมได้จากวิธีที่ 3 ใช้ระยะเวลาน้อยที่สุด คือ 32 ชั่วโมง โดยยังคงให้ค่าจลนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของยีสต์ที่สูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิต ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตถือเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่สำคัญในกระบวนการหมักเอทานอลและการผลิตยีสต์ขนมปัง ดังนั้น การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 โดยใช้อาหารกากน้ำตาลแบบขั้นตอนเดียว หรือการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 จึงเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุดสำหรับกระบวนการหมักที่ใช้กากน้ำตาลอ้อย

**ตารางที่ 2** ข้อมูลและค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่เตรียมด้วยวิธีที่ 1 วิธีที่ 2 และวิธีที่ 3<sup>1</sup>

| ข้อมูลจากการเพาะเลี้ยง                                            | ประสิทธิภาพของกล้าเชื้อเมื่อใช้ในการหมัก |                  |                  |
|-------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|------------------|------------------|
|                                                                   | วิธีที่ 1                                | วิธีที่ 2        | วิธีที่ 3        |
| ความเข้มข้นของเซลล์มีชีวิตร<br>( $\times 10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร) | 17.80 $\pm$ 0.74                         | 34.72 $\pm$ 0.98 | 38.63 $\pm$ 2.59 |
| ความเข้มข้นของน้ำหนักรเซลล์แห้ง<br>(กรัมต่อลิตร)                  | 4.33 $\pm$ 0.23                          | 5.43 $\pm$ 0.22  | 5.54 $\pm$ 0.20  |
| ความเข้มข้นของเอทานอล<br>(กรัมต่อลิตร)                            | 7.77 $\pm$ 0.35                          | 6.36 $\pm$ 0.11  | 7.69 $\pm$ 0.17  |
| ระยะเวลาปรับตัว (ชั่วโมง)                                         | 6.39 $\pm$ 0.53                          | 0.00 $\pm$ 0.00  | 0.00 $\pm$ 0.00  |
| ร้อยละเซลล์มีชีวิตร <sup>2</sup>                                  | 100.00                                   | 100.00           | 100.00           |
| อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)                            | 0.40 $\pm$ 0.03                          | 0.35 $\pm$ 0.04  | 0.34 $\pm$ 0.04  |
| อัตราการเจริญเติบโตเชิงปริมาตร<br>(กรัมเซลล์ต่อลิตร.ชั่วโมง)      | 0.36 $\pm$ 0.02                          | 0.68 $\pm$ 0.00  | 0.69 $\pm$ 0.02  |
| อัตราการใช้สับสเตรตเชิงปริมาตร<br>(กรัมสับสเตรตต่อลิตร.ชั่วโมง)   | 1.56 $\pm$ 0.13                          | 2.38 $\pm$ 26    | 2.47 $\pm$ 0.25  |
| ผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต<br>(กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเตรต)            | 0.24 $\pm$ 0.01                          | 0.25 $\pm$ 0.01  | 0.25 $\pm$ 0.00  |
| ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงช่วงแบทช์ (ชั่วโมง)                        | 12.00                                    | 8.00             | 8.00             |
| ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงทั้งหมด (ชั่วโมง)                          | 44.00                                    | 38.00            | 32.00            |

**หมายเหตุ :** <sup>1</sup> ค่าที่แสดงในตารางเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ที่คำนวณได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ยกเว้นค่าร้อยละเซลล์มีชีวิตร และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง

<sup>2</sup> ค่าร้อยละเซลล์มีชีวิตรแสดงเป็นช่วงจากค่าต่ำสุดถึงค่าสูงสุดตลอดระยะเวลาของการเพาะเลี้ยง

## สรุปและวิจารณ์ผล

การพัฒนาการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 สำหรับใช้ในการหมักกากน้ำตาลอ้อยในงานวิจัยนี้ การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 ซึ่งเป็นการเตรียมโดยใช้อาหารชนิดเดียวกันกับอาหารที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยนำเซลล์ยีสต์จากคลังเซลล์ที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส มาเพาะเลี้ยงในอาหารกากน้ำตาลโดยตรงโดยไม่ผ่านการกระตุ้นเซลล์ ดังเช่นการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่หนึ่งของวิธีที่ 2 ทำให้เชื้อต้องใช้เวลาช่วงต้นในการปรับตัว อย่างไรก็ตาม ระยะเวลารวมทั้งหมดในการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 ยังคงมีค่าน้อยกว่าวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 เป็นเวลา 8 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ

เมื่อทำการทดสอบประสิทธิภาพของกล้าเชื้อในถังปฏิกรณ์ชีวภาพโดยใช้อาหารกากน้ำตาลพบว่า การใช้กล้าเชื้อที่เตรียมจากวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 ให้ค่าจลนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตที่สูงโดยไม่มีระยะปรับตัว ทั้งนี้ เนื่องมาจากการเตรียมกล้าเชื้อด้วยวิธีที่ 2 และวิธีที่ 3 เซลล์ได้ผ่านการปรับตัวต่อการเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกันกับอาหารที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ ทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ทันที สอดคล้องกับการรายงานของ Lincoln (1960) ที่กล่าวว่า เมื่ออาหารที่ใช้ในการเตรียมกล้าเชื้อขั้นสุดท้ายเป็นอาหารชนิดเดียวกันกับอาหารที่ใช้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะสามารถลดระยะเวลาในช่วงปรับตัวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพได้ โดยเมื่อพิจารณาถึงระยะเวลาทั้งหมดที่ใช้ในกระบวนการตั้งแต่การเตรียมกล้าเชื้อและการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ พบว่ากระบวนการที่ใช้การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 ใช้ระยะเวลารวมน้อยกว่ากระบวนการที่ใช้การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 2 ประมาณ 6 ชั่วโมง นอกจากนี้ การเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 3 ยังใช้เวลาและขั้นตอนน้อยกว่าการเตรียมกล้าเชื้อวิธีที่ 1 และวิธีที่ 2 ดังนั้น การพัฒนากล้าเชื้อที่รายงานในบทความวิจัยนี้จึงน่าจะสามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการพัฒนากล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักอื่นๆ ต่อไป

## กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน ปีงบประมาณ 2560 สัญญาเลขที่ สนอ. 07-02-60-004 และ AE-KU-60-02 ขอขอบคุณสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อเครื่องมือและสถานที่สำหรับการทำงานวิจัย

## เอกสารอ้างอิง

Charoenrat, T., Kkumruaengsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S. & Roongsawang, N. (2013). Improvement of recombinant

- endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 116, 193-198.
- Danbamrongtrakool, N., Tungcharoen, T. & Parakulsuksatid, P. (2014). Effect of Urea on Ethanol Production by *Saccharomyces Cerevisiae* Sc90. **Proceedings of 52nd Kasetsart University Annual Conference: Agro-Industry**. 1, 263-270. (In Thai)
- Department of Alternative Energy Development and Efficiency. (2016). **Ethanol production from molasses and biogas from the ethanol production process**. Retrieved August 28, 2017, from <http://e-lib.dede.go.th/mm-data/BibA11106%E0%B8%84%E0%B8%B9%E0%B9%88%E0%B8%A1%E0%B8%B7%E0%B8%AD%E0%B9%80%E0%B8%AD%E0%B8%97%E0%B8%B2%E0%B8%99%E0%B8%AD%E0%B8%A5.pdf> (In Thai)
- Ginovart, M., Prats, C., Portell, X. & Silbert, M. (2011). Exploring the lag phase and growth initiation of a yeast culture by means of an individual-based model. **Food Microbiology**. 28, 810-817.
- Lincoln, R.E. (1960). Control of stock culture preservation and inoculum build-up in bacterial fermentations. **Principle of Fermentation Technology**. 2, 481-500.
- Miller, G.L. (1959). Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Anal. Chem.** 31, 426-428.
- Ngow, Y., Wanwilai, S., Chatsungnern, T. & Sirisannanyakun, S. (2017). **Ethanol production from molasses**. 1<sup>st</sup> Edition. Bangkok: Kasetsart University Press. (In Thai)
- Office of the Cane and Sugar Board, Ministry of Industry. (2019). **Sugar production report of sugar factories throughout the country production year 2018/2019**. Retrieved May 8, 2019, from <http://www.ocsb.go.th/th/cms/detail.php?ID=10418&SystemModuleKey=production>. (In Thai)
- Papini, M., Nookaew, I., Uhlén, M. & Nielsen, J. (2012). *Scheffersomyces stipitis*: a comparative systems biology study with the Crabtree positive yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**. 11(1), 1-16.
- Pham, T.B.H., Larson G. & Enfors, S.O. (1998). Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: Simulation and model verification. **Biotechnology and Bioengineering**. 6, 527-533.

- Pradeep, P. & Reddy, O.V.S. (2010). High gravity fermentation of sugarcane molasses to produce ethanol: effect of nutrients. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**. 50(1), 582-587.
- Smart, K. A., Chambers, K. M., Lambert, I. & 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.
- .....