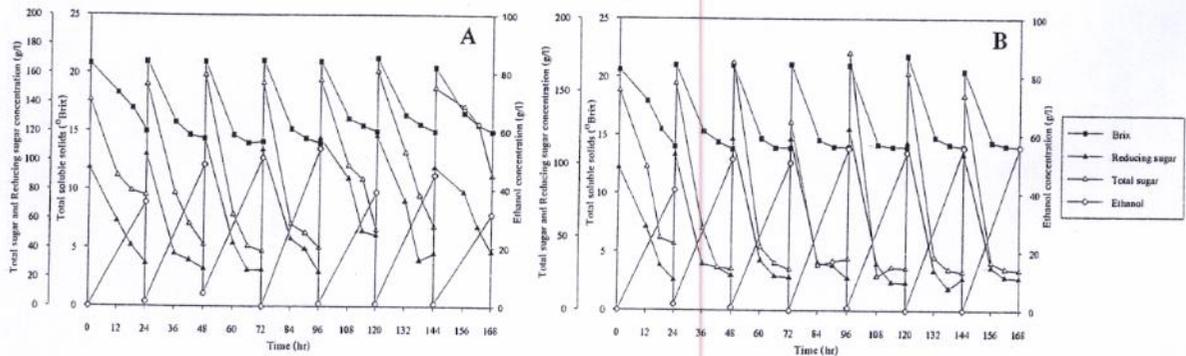


รอบที่ผ่านมามากทำให้ยีสต์ผลิต เอทานอล ได้ต่ำ ขณะที่การหมักแบบกึ่งกะ ในอัตราส่วนสูงจะให้ผลในทางตรงกันข้าม เมื่อเปรียบเทียบผลการใช้เซลล์ยีสต์อิสระและเซลล์ยีสต์ตรึง (รูปที่ 1) พบว่าการใช้เซลล์ยีสต์ตรึงให้ความเข้มข้นของเอทานอลทั้งหมด และอัตราการผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงบนขานอ้อย เพราะการตรึงเซลล์ช่วยเพิ่มความเข้มข้นชีวมวลของเซลล์ยีสต์ในระบบให้สูงขึ้นจึงสามารถผลิตเอทานอลได้มากขึ้น (Sreenath and Jeffries, 2000)



รูปที่ 1 การผลิตเอทานอลแบบกะซ้ำที่อัตราส่วน 100 % ในระดับพลาสติก ด้วยเซลล์ยีสต์อิสระ (A) และเซลล์ยีสต์ตรึง (B)

ในขณะที่การศึกษาการหมักแบบกะซ้ำในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อัตราส่วน 100 % ในสภาวะเช่นเดียวกับการหมักในระดับพลาสติก พบว่า ได้รับความเข้มข้นของเอทานอล ผล ได้ และอัตราการผลิตเอทานอล เท่ากับ 347.33 กรัมต่อลิตร 0.44 และ 2.07 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการหมักในระดับพลาสติก และเมื่อเปรียบเทียบกับกรหมักโดยใช้เซลล์ยีสต์อิสระ พบว่า การใช้เซลล์ตรึงให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงกว่าการใช้เซลล์อิสระเช่นเดียวกัน

4.สรุปผลการทดลอง

การปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลแบบกะซ้ำโดยการตรึงเซลล์บนขานอ้อย พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ยีสต์ คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ร่วมกับขานอ้อยขนาด 2 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที และยังพบว่าสามารถทำการหมักแบบกะซ้ำด้วยเซลล์ยีสต์ตรึงได้ถึง 7 รอบ โดยประสิทธิภาพของการหมักไม่ลดลง ขณะที่การผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อัตราส่วนเดียวกันนั้นมีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลใกล้เคียงกัน

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณการสนับสนุนทุนวิจัยจากกองทุนเพื่อส่งเสริมการอนุรักษ์พลังงาน สำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน

เอกสารอ้างอิง

- พันธ์ณรงค์ จันทร์แสงศรี. (2552). *เซลล์จุลินทรีย์ตรึงรูป*. แคนก้อปปี. พิษณุโลก.
- สาวิตรี ลี้มทอง. (2540). *ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี*. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Liang, L., Zhang, Y.P., Zhang, L., Zhu, M.J., Liang, S.Z. and Huang, Y.N. (2008). Study of sugarcane pieces as yeast supports for ethanol production from sugarcane juice and molasses. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(12), 1605-1613.
- Lucero, P., Penalver, E., Moreno, E. and Lagunas, R. (2000). Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(10), 4456-4461.
- Petrov, K.K., Yankov, D.S. and Beschkov, V.N. (2006). Lactic acid fermentation by cells of *Lactobacillus rhamnosus* immobilized in polyacrylamide gel. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22(4), 337-345.
- Sreenath, H.K. and Jeffries T.W. (2000). Production of ethanol from wood hydrolysate by yeasts. *Bioresource Technology*, 72, 253-260.

การประชุมวิชาการ และนำเสนอผลงานวิจัย

วิทยาศาสตร์วิจัย ครั้งที่ 3

SCIENCE RESEARCH CONFERENCE 3



The 3rd Science Research Conference

วันที่ 14 -15 มีนาคม 2554

ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ลงทะเบียนได้ที่ www.sci.nu.ac.th/src3

การประชุมวิชาการ

“วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 3 เป็นเวทีแลกเปลี่ยนความรู้ทางวิชาการด้านคณิตศาสตร์ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ระหว่างนักวิชาการ นักวิจัย คณาจารย์ นิสิต นักศึกษา กิจกรรมประกอบด้วย การนำเสนอผลงานวิจัยและมีการตีพิมพ์เผยแพร่ เป็น Proceeding ที่มี Peer Review ตามเกณฑ์มาตรฐานหลักสูตร ระดับบัณฑิตศึกษาพ.ศ.2548 ของกระทรวงศึกษาธิการ และการบรรยายพิเศษจากวิทยากรผู้ทรงคุณวุฒิรับเชิญ ได้แก่

1. ศาสตราจารย์ ดร. ชูกิจ ลิ้มปิจำนงค์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
บรรยายพิเศษเรื่อง เข้าใจวัสดุจากระดับอะตอม
2. ศาสตราจารย์ ดร.ฟิลิป พูลสวัสดิ์ มหาวิทยาลัยมหิดล
บรรยายพิเศษเรื่อง การวิจัยและการอนุรักษ์นกเงือกในประเทศไทย
3. ศาสตราจารย์ ดร.ไพโรจน์ สัตยธรรม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
บรรยายพิเศษเรื่อง การประยุกต์ใช้คณิตศาสตร์ขั้นสูงในธุรกิจการเงิน และการประกันสมัยใหม่

ปฏิทินการประชุมวิชาการ

วันที่	รายละเอียด
วันที่ 2-3	วันลงทะเบียนวิชาการและนำเสนอผลงานวิจัยพร้อม Proceeding
วันที่ 4-5	วันจัดการประชุมสัมมนาและบรรยายพิเศษ
วันที่ 6-7	วันผู้ลงทะเบียนและนำเสนอผลงานวิจัยและตีพิมพ์
วันที่ 8-9	วันประชุมวิชาการ และนำเสนอผลงาน ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

ติดต่อสอบถาม

ทนายวิจัย งานบริการวิชาการ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ราชภัฏการไฟฟ้านครหลวง อ่างทอง อ่างทอง 15120 โทร 0-3596-3171 Website: <http://www.sci.nu.ac.th/src3>



549 (13)

ที่ ศธ 0527.04/ว 137

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
อำเภอเมืองฯ พิษณุโลก 65000

22 กุมภาพันธ์ 2554

เรื่อง ตอบรับการนำเสนอผลงาน การประชุมวิชาการ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 3

เรียน นายอัมภาวุธ อารีศิริสุข

ตามที่ท่านได้ส่งผลงานวิจัยเพื่อนำเสนอในการประชุมวิชาการ “วิทยาศาสตร์วิจัย” ครั้งที่ 3 ระหว่างวันที่ 14-15 มีนาคม 2554 ณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยนครสวรรค์ และทางคณะกรรมการฯ ได้พิจารณาผลงานของท่านเรียบร้อยแล้ว นั้น ในการนี้ จึงใคร่ขอแจ้งผลการตอบรับการนำเสนอผลงานทางวิชาการฯ ดังนี้ ท่านได้รับคัดเลือกให้นำเสนอผลงาน

ชื่อผลงาน “การศึกษาการปรับปรุงการหมักเอทานอลแบบกะช้าโดยการตรึงเซลล์บนขาน้อย”

รูปแบบ Poster Presentation

ซึ่งรายละเอียดเกี่ยวกับกำหนดการนำเสนอผลงานท่านสามารถดูได้ทางเว็บไซต์
<http://www.sci.nu.ac.th/src3>

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ และขอขอบคุณท่านเป็นอย่างยิ่งที่ให้เกียรติส่งผลงานเข้าร่วมการประชุมวิชาการฯ ครั้งนี้

ขอแสดงความนับถือ

(ศาสตราจารย์ ดร.สมยศ พลับเที่ยง)

รองคณบดีฝ่ายวิชาการและวิจัย ปฏิบัติราชการแทน

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

งานบริการการศึกษา หน่วยวิจัย

โทรศัพท์ 0-5596-3171

โทรสาร 0-5596-3145

< 501-31 >

การศึกษาการปรับปรุงการหมักเอทานอลแบบกะซ้ำโดยการตรึงเซลล์บนขานอ้อย
 อัมภาวุธ อารีศิริสุข^{1*}, กนกวรรณ เมืองทอง¹, รัชณี ไชยช่วย¹, สุภรารักษ์ ปุระณะวิทย์¹,
 อัมพวัน มีทรัพย์มัน¹, ศิริพร ลุนพรม¹ และ อนันต์ บุญปาน¹

The Study of Ethanol Fermentation Improvement by Repeated – Batch Process
 with Cell Immobilization on Sugarcane Bagasse

Atsada-wut Areesirisuk^{1*}, Kanogwan Muangsong¹, Ratchanee Chaichavy¹, Suparaporn Puranawit¹,
 Ampawun Meesubmun¹, Siriporn Lunprom¹ and Anan Boonpan¹

¹ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี 12110

*Corresponding author. E-mail: areesirisuk@hotmail.com

บทคัดย่อ

การศึกษาการปรับปรุงการผลิตเอทานอลด้วยการหมักแบบกะซ้ำโดยการตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 บนขานอ้อย พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการตรึงเซลล์ยีสต์บนขานอ้อย คือ การเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ร่วมกับขานอ้อยขนาด 2 เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที ซึ่งมีเซลล์ถูกตรึงบนขานอ้อยสูงสุดเท่ากับ 6.23×10^{10} เซลล์ต่อกรัมของขานอ้อย การศึกษาอัตราส่วนการคังน้ำหมักเข้าและออกในการหมักแบบกะซ้ำ โดยใช้เซลล์ยีสต์ตรึงและเซลล์ยีสต์อิสระในระดับพลาสติก พบว่า การใช้เซลล์ตรึงมีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงกว่าเซลล์อิสระ และที่อัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ได้ความเข้มข้นของเอทานอล (P) และอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด (Q_p) เท่ากับ 360.45 กรัมต่อลิตร และ 2.15 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และพบว่า ประสิทธิภาพของการหมักไม่ลดลงตลอด 7 รอบของการหมัก ขณะที่การหมักในถังขนาด 5 ลิตร ที่มีปริมาตรน้ำหมัก 3 ลิตร ให้ผลคล้ายกับการหมักในระดับพลาสติก เขย่า โดยได้ P และ Q_p เท่ากับ 347.33 กรัมต่อลิตร และ 2.07 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และพบว่าประสิทธิภาพการหมักแบบกะซ้ำทั้ง 7 รอบ ไม่ลดลง เช่นเดียวกับการทดลองในระดับพลาสติกเขย่า

คำสำคัญ : การตรึงเซลล์, การหมักแบบกะซ้ำ, ขานอ้อย, เอทานอล

Abstract

Ethanol fermentation was studied in a repeated batch process using immobilized yeast cells on sugarcane bagasse (SB). The optimum condition for cell immobilization was operated on 2 cm length of SB, 30°C of cultivation and agitation at 200 rpm. Cells were immobilized on SB about 6.23×10^{10} cell per gram of SB. Subsequently, the ratios of repeated batch fermentation were investigated in the shaking flask with immobilized and free cell. The results showed that the efficiency of ethanol production with immobilized cells was higher than free cells. The maximum ethanol concentration (P) and ethanol productivity (Q_p) (360.45 g l^{-1} and $2.15 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively) were observed at ratio of 100%. Moreover, ethanol production efficiencies were not decreased through out of 7 cycles of cultivation. Then, the ethanol production in a 5L fermenter with 3L working volume was carried on similar repeated batch ratio (100 %) and its results were similar to the result in the shaking flask. P and Q_p of immobilized cells were 347.33 g l^{-1} and $2.07 \text{ g l}^{-1} \text{ h}^{-1}$, respectively and the performances of 7 cycles in 5L fermenter were not decreased too.

Keywords: cell immobilization, repeated batch fermentation, sugarcane bagasse, ethanol

1. คำนำ

ปัจจุบันมีงานวิจัยที่พัฒนาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเพื่อนำมาใช้เป็นพลังงานทดแทนด้วยการใช้เทคนิคต่างๆในกระบวนการหมัก เช่น การหมักแบบบริฟท์แบทช์ร่วมกับการตรึงเซลล์ การหมักแบบแบทช์ การใช้ยีสต์ดกตะกอน การใช้ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อน กระบวนการหมักแบบบริฟท์แบทช์ (repeated batch fermentation) หรือกะซ้ำ เป็นกระบวนการหมักชนิดหนึ่งที่มีความคล้ายคลึงกับการหมักแบบกะแต่เมื่อการหมักสิ้นสุดลงจะมีการถ่ายเอาน้ำหมักออกจากถังหมักบางส่วน จากนั้นจะเติมอาหารหรือวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลใหม่ลงไปในถังหมัก น้ำหมักที่เหลือในถังหมักจากการหมักครั้งแรกจะถูกใช้เป็นก้ำเชื้อในการหมักได้ทันที อย่างไรก็ตามในระหว่างที่มีการถ่ายน้ำหมักออกจากถังนั้นยีสต์จะออกมาพร้อมกับน้ำหมัก ทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลลดลง งานวิจัยนี้จึงมุ่งปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลแบบกะซ้ำโดยใช้ขานอ้อยตรึงเซลล์ยีสต์ให้อยู่ภายในถังหมักมากยิ่งขึ้น

2. วิธีการทดลอง

2.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาคือ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) ซึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.2 การเตรียมขานอ้อย

นำขานอ้อยมาลอกเปลือกและล้างด้วยน้ำสะอาด ตัดให้มีขนาดประมาณ 1.0 หรือ 2.0 เซนติเมตร นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสเพื่อไล่ความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำขานอ้อยไปกำจัดลิกนิน (delignification) โดยแช่ขานอ้อยในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (0.1 %w/v NaOH) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำไปล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัด NaOH (Liang *et al.*, 2008) และนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที เก็บเอาไว้ใช้เป็นวัสดุตรึงเซลล์ (immobilized carrier)

2.3 การตรึงเซลล์บนขานอ้อย

ถ่ายเชื้อ *S. cerevisiae* จำนวน 1 ลูป (loop) และขานอ้อยขนาดต่างๆที่ผ่านการกำจัดลิกนินและนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 4 กรัม (น้ำหนักแห้ง) ลงไปในอาหาร Yeast extract-malt extract medium (YM) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร จำนวน 300 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 หรือ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 หรือ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ ปริมาณเซลล์ยีสต์อิสระ และเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงในขานอ้อย

2.4 การหมักเอทานอลแบบกะซ้ำในระดับพลาสติกเขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร

นำกากน้ำตาลความเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ จำนวน 300 มิลลิลิตร มาเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (ammonium sulfate, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$) ลงไป 0.5 กรัมต่อลิตร บรรจุลงในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที ถ่ายสารละลายเซลล์ยีสต์ที่ถูกเพาะเลี้ยงใน YM ลงไป 30 มิลลิลิตร ส่วนการทดลองที่ใช้เซลล์ยีสต์ตรึงจะใช้ขานอ้อยที่ผ่านการเพาะเลี้ยงร่วมกับยีสต์จำนวน 60 กรัม (น้ำหนักเปียก) มาล้างด้วยอาหาร YM แล้วถ่ายลงไปนึ่งน้ำหมักทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะนิ่ง และเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด น้ำตาลรีดิวซ์ เอทานอล ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมดเป็นระยะๆตลอดการหมักเมื่อการหมักรอบที่ 1 เสร็จสิ้น จะทำการถ่ายน้ำหมักปริมาณ 25 50 75 หรือ 100 เปอร์เซ็นต์ของปริมาตรน้ำหมักเริ่มต้นออกจากพลาสติก จากนั้นเติมน้ำหมักปริมาณเท่ากันลงไปนึ่งฆ่าเชื้อในพลาสติก เริ่มทำการหมักในรอบที่ 2 เก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์เหมือนกับการหมักในรอบที่ 1 ทำเช่นนี้ไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดและเอทานอลในแต่ละรอบคงที่ โดยทำการทดลองแบบ 2 ซ้ำ

การหมักเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร จะใช้กากน้ำตาลความเข้มข้น 20 องศาบริกซ์ จำนวน 3 ลิตร มาเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ลงไป 0.5 กรัมต่อลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ถ่ายเซลล์ยีสต์อิสระหรือเซลล์ยีสต์ตรึงบนขานอ้อยที่ถูกเพาะเลี้ยงด้วยสภาวะที่เหมาะสมลงไปจำนวน 300 มิลลิลิตร หรือ 600 กรัม ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที และเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์เหมือนการทดลองในระดับพลาสติก

2.5 การวิเคราะห์

ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด และน้ำตาลรีดิวซ์วิเคราะห์ด้วยวิธี ฟีนอล-ซัลฟูริก (phenol-sulfuric method) และวิธี DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) ความเข้มข้นเอทานอลวิเคราะห์ด้วยเครื่อง ebulliometer

3. ผลการทดลอง

3.1 การตรึงเซลล์บนขานอ้อย

จากการศึกษาผลของขนาดของขานอ้อย อุณหภูมิ และอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ยีสต์ให้ถูกตรึงบนขานอ้อย โดยการแปรผันปัจจัยต่าง ๆ พบว่า ระหว่างการเพาะเลี้ยงยีสต์ร่วมกับขานอ้อย ปริมาณของแข็งที่ละลายทั้งหมด และปริมาณน้ำตาลกลูโคสมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกันทุกการทดลอง ขณะที่ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์อิสระในน้ำหมักมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง log phase จนถึงชั่วโมงที่ 14 (ไม่แสดงข้อมูล) จะเริ่มคงที่ในช่วงประมาณ $0.88 \times 10^8 - 2.15 \times 10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในระยะ stationary phase

ตารางที่ 1 ปริมาณ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ถูกตรึงบนขานอ้อยเมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะต่างๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณเซลล์ยีสต์ (เซลล์ต่อกรัมของขานอ้อย)			
	อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที		อัตราการเขย่า 200 รอบต่อนาที	
	ขานอ้อย 1 ซม.	ขานอ้อย 2 ซม.	ขานอ้อย 1 ซม.	ขานอ้อย 2 ซม.
30	4.65×10^{10}	4.88×10^{10}	4.85×10^{10}	6.23×10^{10}
35	2.79×10^{10}	2.53×10^{10}	4.30×10^{10}	3.60×10^{10}

จากการทดลอง พบว่ามีเซลล์ยีสต์ถูกตรึงอยู่บนขานอ้อยในทุกสภาวะการเพาะเลี้ยง (ตารางที่ 1) โดย Liang *et al.* (2008) รายงานว่า ขานอ้อยประกอบด้วยโครงสร้างที่เป็นเฮมิเซลลูโลส และลิกนินซึ่งเป็นสารประกอบที่มีขั้ว มีลักษณะเป็นประจุบวก และการกำจัดลิกนินจะเป็นการเพิ่มประจุลบบนขานอ้อยทำให้เซลล์ยีสต์ถูกดูดซับบนขานอ้อยมากขึ้น โดยเซลล์ยีสต์และขานอ้อยยึดเกาะกันด้วยพันธะไอออนิก บริเวณพารานไคมา (parenchyma) ท่อลำเลียงน้ำและอาหาร (xylem and phloem) และส่วนต่าง ๆ ของขานอ้อย เมื่อเปรียบเทียบการตรึงเซลล์ยีสต์บนขานอ้อยขนาด 1 และ 2 เซนติเมตร พบว่าที่อุณหภูมิและอัตราการเขย่าเดียวกันจะมีปริมาณเซลล์ที่ถูกตรึงบนขานอ้อยใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 1) แสดงว่าขนาดขานอ้อยดังกล่าวไม่มีผลต่อปริมาณเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงบนขานอ้อย ขณะที่การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการตรึงเซลล์ยีสต์บนขานอ้อย พบว่า เมื่ออุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงสูงขึ้นปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เกาะบนขานอ้อยลดลง เนื่องจากอุณหภูมิมิมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดด่าง ทำให้เกิดการแตกตัวของไอออนในสารละลาย ส่งผลต่อการยึดเกาะระหว่างเซลล์ยีสต์กับขานอ้อย โดยเมื่อไอออนในสารละลายมีการแตกตัวสูงขึ้นจะทำให้เกิดการแย่งจับระหว่างเซลล์ยีสต์กับขานอ้อย ส่งผลให้ปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เข้าจับกับขานอ้อยลดลง และอุณหภูมิที่สูงขึ้นยังส่งผลต่อพันธะไอออนิกระหว่างเซลล์ยีสต์และขานอ้อย โดยทำให้พลังงานระหว่างโมเลกุลสูงขึ้นทำให้การจับกันระหว่างประจุบวกและประจุลบหลุดออกจากกันได้ง่าย (พันธะแรงค์ จันทรแสงศรี, 2552) โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีเซลล์เกาะอยู่บนขานอ้อยเท่ากับ 6.23×10^{10} เซลล์ต่อกรัมของขานอ้อย ซึ่งมากกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ถึง 1.73 เท่า และยังพบว่า เมื่ออัตราการเขย่าสูงขึ้นทำให้มีปริมาณเซลล์ยีสต์บนขานอ้อยมากขึ้น โดยการเขย่าอาจจะมีผลต่อปริมาณออกซิเจนที่ละลายลงไปในอาหาร ทำให้ยีสต์เจริญเติบโตมากขึ้น ซึ่งสวาวิตรี (2540) รายงานว่า เมื่อเซลล์ยีสต์เจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนสูง ยีสต์จะนำน้ำตาลในอาหาร ไปสร้างองค์ประกอบของเซลล์มากทำให้จำนวนเซลล์ยีสต์เพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่ออัตราการเขย่าสูงขึ้นจึงทำให้ยีสต์เจริญเติบโตมากขึ้นปริมาณเซลล์ยีสต์ที่เกาะอยู่บนขานอ้อยจึงสูงขึ้นด้วย

3.2 การหมักเอทานอลแบบกะขี้ในระดับพลาสก์เขย่าและถังหมักขนาด 5 ลิตร

จากการศึกษาพบว่าที่อัตราส่วนการคั่งน้ำหมักเข้าและออก 25 % ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ถูกใช้ไป ความเข้มข้นเอทานอลทั้งหมด และอัตราการผลิตเอทานอลมีค่าต่ำที่สุด (ไม่แสดงข้อมูล) แต่ค่าดังกล่าวจะสูงขึ้นเมื่ออัตราส่วนการหมักเพิ่มขึ้น โดยที่อัตราส่วนการหมัก 100 % มีความเข้มข้นเอทานอลทั้งหมด และอัตราการผลิตเอทานอลสูงสุด เนื่องจากการหมักที่มีอัตราส่วนต่ำจะมีปริมาณน้ำตาลและสารอาหารต่าง ๆ ที่ถูกเติมเข้าไปน้อยไม่เพียงพอต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอล และอาจมีการสะสมสารพิษต่าง ๆ (Petrov and Okorokov, 1990; Lucero *et al.*, 2000) ที่เกิดขึ้นจากการหมักใน