

<http://journal.rmutp.ac.th/>

การห่อหุ้มเซลล์ยีสต์ที่ถูกตรึงบนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ และการประยุกต์ใช้เพื่อการผลิตเอทานอล

ตะวัน มาดวง อรวรรณ ชุณหชาติ และ รัชพล พะวงศ์รัตน์*

คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

1 หมู่ 6 อำเภอกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม 73140

รับบทความ 19 เมษายน 2561 แก้ไขบทความ 9 สิงหาคม 2561 ตอบรับบทความ 18 กันยายน 2561

บทคัดย่อ

การผลิตเอทานอลส่วนใหญ่มีข้อจำกัดของผลผลิตที่ต่ำและการนำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำ การศึกษาวิจัยนี้จึงได้นำเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ที่ถูกตรึงบนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพและห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล โดยศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการตรึงรูปเซลล์ ได้แก่ ปริมาณขานอ้อยและความเข้มข้นของอัลจิเนตต่อผลผลิตเอทานอลพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอัลจิเนตและเพิ่มปริมาณขานอ้อยมีผลทำให้เมดอัลจิเนตมีความแข็งแรงมากขึ้น และเสื่อมสภาพช้าลง โดยสภาวะที่เหมาะสม คือ ขานอ้อยร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) และร้อยละประสิทธิภาพของการหมัก (E_y) เท่ากับ 3.39 ± 0.72 กรัม/ลิตร 0.14 ± 0.03 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และ 70.98 ± 14.08 ตามลำดับ เมื่อทำการวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า เซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 สามารถเกาะกับวัสดุตรึงได้อย่างดี นอกจากนี้ศึกษาการนำเซลล์ยีสต์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำในการหมักเอทานอล สามารถนำกลับมาใช้ได้ 5 ครั้ง โดยที่ประสิทธิภาพในการหมักสูงกว่าร้อยละ 50 ของการหมักรอบที่ 1 ดังนั้นการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพพร้อมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจและมีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลต่อไปในอนาคต

คำสำคัญ : การห่อหุ้ม; ขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ; การตรึงรูป; การผลิตเอทานอล

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน โทร.: +6634 281 105-6, ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์: faasrpp@ku.ac.th

<http://journal.rmutp.ac.th/>

Encapsulation of Immobilized Yeast Cells on Pretreated-Bagasses and Application Use for Ethanol Production

Tawan Maduang Orawan Chunnachart and Ratchapol Pawongrat*

Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University

1 Moo 6 Kamphaeng Saen, Nakhon Pathom, 73140

Received 19 April 2018; Revised 9 August 2018; Accepted 18 September 2018

Abstract

Most of ethanol production processes are limited by low ethanol production rate and recyclable problem of ethanologenic organisms. In the present study, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 entrapped in an aqueous mixture of alginate and pretreated-bagasse was used for ethanol production of immobilization parameter of yeast cells consisting of amount of bagasse and alginate concentration on ethanol production were investigated. The results showed that increase in alginate concentration and the amount of bagasse can increase structural strength and reduce deterioration of bead. The optimal condition of immobilization was 1.0% (w/v) bagasse and 2.5% alginate. Ethanol yield (Y_p/s) ethanol production rate (Q_p) and efficiency of fermentation (E_y) obtained from the bagasse-alginate immobilized yeast cell was 3.39 ± 0.72 g/l 0.14 ± 0.03 g/l/h and $70.98 \pm 14.08\%$ respectively. The ultrastructure obtained from SEM illustrated that *S. cerevisiae* TISTR 5339 was well incorporated within the bagasse-alginate matrix. Moreover, the bagasse-alginate immobilized yeast cells were reusable at least 5 times with E_y higher than 50% of 1st round of fermentation. Therefore, the pretreated bagasse-alginate immobilized yeast cells is an alternatively interesting techniques with efficiency for ethanol production in the future.

Keywords : Encapsulation; Pretreated-bagasses; Imobilization; Ethanol Production

* Corresponding Author. Tel: +663 4281 105-6, E-mail Address: faasrpp@ku.ac.th

1. บทนำ

ปัจจุบันปัญหาการขาดแคลนพลังงาน และสถานการณ์ความต้องการพลังงานของโลกมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งส่วนใหญ่เป็นพลังงานที่ใช้แล้วหมดไปไม่สามารถสร้างทดแทนขึ้นมาใหม่ได้ จึงส่งผลให้มีการศึกษาและวิจัยเพื่อหาแหล่งพลังงานทดแทนใหม่ๆ เพิ่มมากขึ้น เอทานอล (Ethanol) จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เนื่องจากสามารถผลิตได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย กากมันสำปะหลัง ชังข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งการผลิตเอทานอลมี 2 แบบ คือ การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical Process) และชีวเคมี (Biochemical Process) โดยการผลิตเอทานอลทางชีวเคมีจะมีการใช้เซลล์จุลินทรีย์ในขั้นตอนการหมักซึ่งอยู่ในรูปของเซลล์อิสระ (Free Cells) แต่เนื่องด้วยข้อจำกัดบางอย่างของการใช้เซลล์อิสระ เช่น ความไม่เสถียร การใช้งานไม่ต่อเนื่อง จึงนิยมใช้ในรูปแบบของเซลล์ตรึงรูป (Immobilized Cells) โดยวิธีการดังกล่าวเป็นอีกวิธีหนึ่งที่น่าไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลในปัจจุบัน [1]

การตรึงเซลล์ (Immobilization of Cells) เป็นเทคนิคที่ใช้ตรึงเซลล์ทั้งการตรึงทางกายภาพหรือทางเคมีไว้บนวัสดุช่วยพยุงที่เป็นของแข็งหรือการตรึงภายในเนื้อสารที่เป็นของแข็งหรือถูกกักไว้ในแผ่นเยื่อเพื่อเพิ่มความคงตัว การตรึงเซลล์แบ่งเป็น 3 วิธีใหญ่ๆ คือ การเชื่อมกับตัวพยุง (Carrier Binding Method) การเชื่อมขวาง (Cross-linking Method) และการห่อหุ้ม (Entrapping Method) ข้อดีของการตรึงเซลล์เพื่อเพิ่มความคงตัวทำให้เซลล์สามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมมากขึ้น อีกทั้งเซลล์ตรึงรูปยังสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างต่อเนื่อง โดยที่ยังคงมีประสิทธิภาพสูง และยังช่วยลดต้นทุนในขั้นตอนการผลิตได้ [2] วัสดุตรึงรูป (Supporting Materials) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีความสำคัญสำหรับการตรึงรูปเซลล์ เนื่องจากจะช่วยให้เซลล์สามารถยึดเกาะ และเกิดกิจกรรมของเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์

ได้อีกด้วย โดยวัสดุตรึงรูปที่ดีต้องมีพื้นที่ผิวต่อปริมาตรที่สูง ซึ่งจากงานวิจัยของ W. Soontornchaiboon and R. Pawongrat [3] พบว่าชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพ (Pretreated Bagasse) เป็นวัสดุที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการนำมาประยุกต์ใช้เป็นวัสดุตรึงรูป เนื่องจากมีรูพรุนจำนวนมาก จึงเพิ่มพื้นที่ผิวในการดูดซับเซลล์ นอกจากนี้ต้นทุนของวัสดุยังมีราคาไม่แพง แต่การตรึงรูปดังกล่าวยังมีปัญหาในเรื่องการกักเก็บตัวเซลล์ยังไม่มีประสิทธิภาพ เนื่องจากมีเซลล์บางส่วนหลุดออกไปในระหว่างนำกลับมาใช้ซ้ำ ส่งผลให้การนำกลับมาใช้ใหม่ยังมีการใช้งานได้ไม่เต็มประสิทธิภาพ จึงได้มีการศึกษาโดยการประยุกต์ใช้วิธีการห่อหุ้มร่วมกับการตรึงรูปเซลล์บนวัสดุตรึงที่มีรูพรุน เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต และการนำกลับมาใช้ใหม่ให้มากขึ้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อทำการศึกษาการใช้ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพเพื่อเป็นวัสดุตรึงรูปเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 ร่วมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต โดยศึกษาศักยภาพในการผลิตเอทานอล และศึกษาประสิทธิภาพการนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ และพัฒนาขั้นตอนการผลิตเอทานอลด้วยเทคนิคเซลล์ตรึงรูปที่มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต

2. วิธีการศึกษา

2.1 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ดัดแปลงจากวิธีการของ W. Soontornchaiboon and R. Pawongrat [3] โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ Yeast Extract-malt Extract (YM Broth) ซึ่งประกอบด้วย Yeast extract 3 กรัม/ลิตร Malt Extract 3 กรัม/ลิตร น้ำตาลกลูโคส 10 กรัม/ลิตร และเปปโตน 5 กรัม/ลิตร ปริมาตร 100

มิลลิลิตร เพราะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า ที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการวัดจำนวนเซลล์ยีสต์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ให้ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร เพื่อใช้ในการตรึงรูปกับวัสดุตรึงรูปต่อไป

2.2 การเตรียมขานอ้อยและการปรับสภาพขานอ้อย

นำขานอ้อยมาล้างทำความสะอาด ตากแดดให้แห้ง ลดขนาดด้วยการบดให้มีขนาดประมาณ 1-2 เซนติเมตร และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการปรับสภาพขานอ้อยโดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ K. Roekarun et al. [2] โดยนำขานอ้อยแช่ในสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร (อัตราส่วน 1:20 กรัมต่อมิลลิลิตร) ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง กรองเก็บส่วนที่เป็นของแข็ง ล้างด้วยน้ำกลั่นจนค่าพีเอชเป็นกลาง (pH 7) นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนน้ำหนักคงที่ จากนั้นนำไปแช่ในสารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร (อัตราส่วน 1:20 กรัมต่อมิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองเก็บส่วนที่เป็นของแข็ง ล้างด้วยน้ำกลั่นจนค่าพีเอชเป็นกลาง (pH 7) นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ก่อนการเก็บรักษาทำการฉายแสง UV (ช่วงความยาวคลื่น 100-280 นาโนเมตร) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อยืดอายุในการเก็บรักษา แล้วเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิห้องในถุงพลาสติกที่ปิดมิดชิด

2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร่วมกับการห่อหุ้มโดยอัลจิเนต

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพกับการห่อหุ้มโดยใช้อัลจิเนตดัดแปลงมาจากวิธีการของ P. Jeamjoankhao et al. [4] และ S. Shahruzaman and I. I. Muhamada [5] โดยนำเซลล์ยีสต์ (ความเข้มข้นของเซลล์เริ่มต้น 1×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมกับขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร้อยละ 0, 0.5, 1, 1.5 และ 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) บ่มไว้ 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมอัลจิเนตความเข้มข้นร้อยละ 1.5, 2.0 และ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ละลายในซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ผสมให้เข้ากัน แล้วหยดลงในสารละลายแคลเซียมคลอไรด์ (CaCl_2) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปริมาตร 150 มิลลิลิตร กวนผสมตลอดเวลา แล้วพักไว้ 20 นาที แยกเซลล์ตรึงรูปด้วยกระดาษกรอง ล้างด้วยซิเตรตบัฟเฟอร์ pH 5.5 จำนวน 2 ครั้ง เก็บสารละลาย CaCl_2 และน้ำกลั่นที่ใช้ล้างวิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่ไม่ถูกตรึงเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (เซลล์อิสระ) แล้วคำนวณหาค่าร้อยละการยึดเกาะ (Immobilization Yield, IM) และศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุตรึงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด จากนั้นนำเซลล์ตรึงรูปไปทดสอบการผลิตเอทานอลโดยใช้อาหารเหลว YM Broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 250 มิลลิลิตร ก่อนการปิดจุกให้อากาศในพลาสติกด้วยก๊าซไนโตรเจน (N_2) แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณที่น้ำตาลที่เหลือในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น

2.4 การศึกษาประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ซ้ำของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป

การศึกษาศักยภาพการนำกลับมาใช้ซ้ำของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ถูกตรึงบน

ชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพพร้อมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต โดยเก็บเซลล์ที่รีรูปร่างทำการล้างด้วยซีเตรตบัฟเฟอร์ pH 5.5 และทำการหมักต่อด้วยอาหารเหลว YM Broth ที่เตรียมขึ้นใหม่ เก็บตัวอย่างทุกเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น จนกระทั่งพบว่า ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นมีค่าลดลงต่ำกว่าร้อยละ 50 เมื่อเทียบกับเริ่มต้น และศึกษาลักษณะพื้นผิวของวัสดุที่รีรูปร่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

2.5 การวิเคราะห์

การวัดการเจริญและจำนวนเซลล์โดยของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 โดยใช้ไมโครมิเตอร์ (Haemocytometer) การวัดค่าความหนาแน่นของเซลล์ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) การวิเคราะห์ค่าร้อยละการยึดเกาะ (Immobilization Yield, IM) ค่าร้อยละการยึดเกาะ = $100 \times [\text{จำนวนเซลล์ในชุดควบคุม (ไม่ผ่านการตรึงรูป)} - \text{จำนวนเซลล์ที่ตกค้างในสารละลาย}] / \text{จำนวนเซลล์ในชุดควบคุม (ไม่ผ่านการตรึงรูป)}$

การวิเคราะห์ลักษณะพื้นผิวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลที่เหลือในรูปแบบของน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้วิธี Dinitrosalicylic Colorimetric Method (DNS) ตามวิธีการของ J.C. Lee [6] และวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นด้วยวิธีการโครเมโทกราฟีตามวิธีการของ B. Seo et al. [7] คำนวณค่าพารามิเตอร์ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) เป็นค่าผลผลิตเอทานอลที่ผลิตแสดงเป็นกรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัม/กรัม) อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) เป็นค่าของเอทานอลที่ผลิตที่เกิดขึ้นจริงช่วงเวลาหนึ่ง (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) และค่าร้อยละของประสิทธิภาพการหมัก (E_f) เป็นค่าร้อยละของผลผลิตเอทานอลเทียบกับค่าที่ได้ทางทฤษฎี

$$Q_p = p/t, \text{ และ } E_f = 100 \times Y_{p/s} / 0.51$$

โดยที่ S คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ถูกใช้ (กรัม/ลิตร) มีค่าเท่ากับค่าความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น (กรัม/ลิตร) ลบด้วยค่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหลืออยู่ ณ เวลานั้น (กรัม/ลิตร), P คือ ความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตจริง (กรัม/ลิตร), t คือ เวลาของการผลิตเอทานอลที่ทำให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด และค่า 0.51 เป็นค่าคงที่ของผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎีโดยเทียบกับน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม

2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขั้นตอนในการวิจัยและผลการทดลองทั้งหมดมาจากการวิจัยทั้งหมด 3 ซ้ำ ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของสองชุดข้อมูลโดยวิธี t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Turkey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0 ($p < 0.05$)

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

3.1 ผลการศึกษาสภาพที่เหมาะสมของเซลล์ยีสต์ที่รีรูปร่าง *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพพร้อมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต

จากตารางที่ 1 ซึ่งแสดงผลการศึกษาสภาพที่เหมาะสมของเซลล์ยีสต์ที่รีรูปร่าง *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนชานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพพร้อมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตพบว่าค่า IM มีค่ามากกว่าร้อยละ 96 นอกจากนี้ยังพบว่าค่า IM ของเซลล์ที่รีรูปร่างบนชานอ้อยร่วมกับด้วยการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต และเซลล์ที่รีรูปร่างด้วยอัลจิเนตโดยไม่ชานอ้อย ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตสามารถรีรูปร่างเซลล์ยีสต์ไว้ในวัสดุที่รีรูปร่าง

ได้เป็นอย่างดี และเมื่อพิจารณาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ตรีงรูปบนขานอ้อยที่ปรับสภาพและห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต จากตารางที่ 1 พบว่า ความเข้มข้นของอัลจิเนตและปริมาณขานอ้อยมีผลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ เมื่อความเข้มข้นของอัลจิเนตเพิ่มมากขึ้นส่งผลให้ผลผลิตเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยพิจารณาจากสภาวะการตรึงเซลล์อัลจิเนตที่ไม่มีขานอ้อย ซึ่งให้ผลประสิทธิภาพการหมัก ดังนี้ อัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5, 2 และ 2.5 ได้ร้อยละของ Ey เท่ากับ 34.44 ± 0.86 , 55.36 ± 1.11 และ 51.69 ± 4.41 ตามลำดับ เพราะความเข้มข้นอัลจิเนตส่งผลต่อความหนาแน่นและการเข้าออกของอาหารซึ่งจากทดลองพบว่าความเข้มข้นร้อยละ 1.5 ไม่เหมาะสมความหนาแน่นน้อยทำให้เม็ดอัลจิเนตประบางและเสียรูปทรงได้ ความเข้มข้นอัลจิเนตร้อยละ 2 และ 2.5 มีความเหมาะสมเพราะให้ผลผลิตเอทานอลได้สูง เม็ดรูปทรงสมบูรณ์ ซึ่งเป็นทำนองเดียวกันกับงานวิจัย A. Mishra et al. [8] กล่าวว่าความเข้มข้นของโซเดียมอัลจิเนตที่ร้อยละ 2-3 มีความเหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอล และงานวิจัยของ F. Davarci et al. [9] ความเข้มข้นของอัลจิเนตที่ร้อยละ 2-3 ให้รูปทรงที่สมบูรณ์ที่สุดไม่หนาแน่นจนเกินไป ปริมาณขานอ้อยที่ใส่มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยพิจารณาจากสภาวะการทดลองทุกความเข้มข้นของอัลจิเนต ที่ปริมาณขานอ้อยร้อยละ 0.5 และ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ส่งผลให้มีผลผลิตเอทานอลเพิ่มมากขึ้นแต่ที่ขานอ้อยร้อยละ 1.5 และ 2 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ผลผลิตเอทานอลที่ได้มีค่าลดต่ำลงอาจเป็นเพราะการใส่ขานอ้อยปริมาณมากเกินไปเพิ่มความหนาแน่นให้แก่เม็ดอัลจิเนต จึงทำให้อาหารผ่านได้น้อยลง สอดคล้องกับงานวิจัยของ K. Roekarun et al. [2] ในการใช้ประโยชน์จากลำต้นแกล่นตะวันเพื่อเป็นวัสดุตรึงเซลล์ยีสต์พบว่าปริมาณลำต้นแกล่นตะวันร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ผลผลิตเอทานอลดีที่สุด จากตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการตรึงขานอ้อยร่วมกับการห่อหุ้ม

ด้วยอัลจิเนต คือ ความเข้มข้นอัลจิเนตที่ร้อยละ 2.5 ปริมาณขานอ้อยร้อยละ 1 เพราะว่าให้ผลผลิตเอทานอลที่ดีที่สุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระ เซลล์ที่ห่อหุ้มโดยไม่ใส่ขานอ้อย เซลล์ที่ตรึงโดยใส่ขานอ้อยอย่างเดียวยพบว่าการตรึงเซลล์บนวัสดุร่วมกับการห่อหุ้มส่งผลให้มีปริมาณเอทานอลที่ดีกว่าเซลล์อิสระ เซลล์ที่ห่อหุ้มโดยไม่ใส่ขานอ้อย และเซลล์ที่ตรึงโดยใส่ขานอ้อยอย่างเดียว เพราะการตรึงเซลล์บนวัสดุร่วมกับการห่อหุ้มทำให้เซลล์ยีสต์สามารถทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้มากกว่าจึงสามารถผลิตเอทานอลได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ R. Razmovski and V. Vucurovi. [10] โดยพบว่าการหมักเอทานอลด้วยการตรึงเซลล์ยีสต์บนลำต้นของข้าวโพดห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตให้ผลผลิตเอทานอลได้มากกว่าการหมักแบบเซลล์อิสระ

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงรูปเซลล์ร่วมกับอัลจิเนต คือ ความเข้มข้นของอัลจิเนตร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 3.39 ± 0.72 กรัม/ลิตร, $Y_{p/s}$ 0.36 ± 0.07 กรัม/กรัม, Q_p 0.14 ± 0.03 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และ E $70.98 \pm 1.08\%$ (ตารางที่ 1) จึงทำการเลือกสภาวะนี้ไปศึกษาในเรื่องของการนำเซลล์ตรึงรูปกลับมาใช้ซ้ำ

เมื่อพิจารณาผลการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 1 ก-ง) พบว่า ลักษณะภายนอกเม็ดอัลจิเนตที่ไม่ใส่ขานอ้อยจะเห็นการเพิ่มขึ้นของเซลล์ยีสต์อย่างชัดเจน เมื่อใช้เวลานานทำให้เม็ดอัลจิเนตเสื่อมสภาพได้เร็ว เนื่องจากเซลล์ยีสต์เจริญเติบโต ส่งผลให้เม็ดอัลจิเนตแตกออกเป็นรูปฟรอน [11] แต่เมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกและภายในเม็ดอัลจิเนตที่ใส่ขานอ้อยพบว่าเซลล์ยีสต์เจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้น แต่จะเจริญและเกาะอยู่ภายในขานอ้อย ดังนั้นจึงส่งผลให้เม็ดอัลจิเนตเสื่อมสภาพช้าลง นอกจากนี้ขานอ้อยยังเพิ่มความแข็งแรงให้แก่เม็ดอัลจิเนตอีกด้วย

ตารางที่ 1 ค่าร้อยละการยืดเกาะ (IM) ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ (S) ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (P) ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) และประสิทธิภาพของการหมัก (E_y) โดยเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ถูกตรึงบนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร่วมกับอัลจินตที่มีความเข้มข้นต่างๆ กันในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

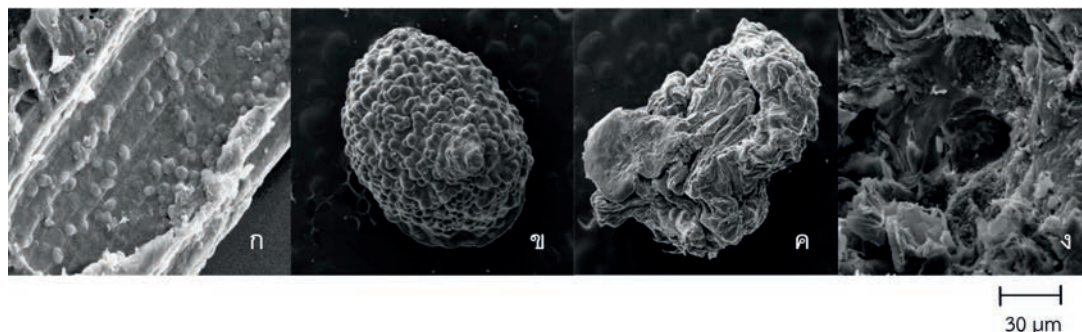
วิธีการ	อัลจินต	ขานอ้อย	IM	S	P	$Y_{p/s}$	Q_p	E_y
		กรัม/100 มล.	(%)	(กรัม/ลิตร)	(กรัม/ลิตร)	(กรัม/กรัม)	(กรัม/ลิตร/ชม.)	(%)
เซลล์อิสระ				9.31±0.35 ^{bc}	2.67±0.65 ^{ab}	0.29±0.02 ^b	0.11±0.00 ^{ab}	56.87±0.42 ^b
เซลล์ตรึงรูป		1.0	90.93±0.06 ^c	10.07±0.67 ^{ab}	2.02±0.09 ^{ef}	0.20±0.00 ^{cd}	0.08±0.00 ^{ef}	39.61±1.31 ^{ef}
เซลล์ตรึงรูป ห่อหุ้มด้วย อัลจินต	1.5	0.0	97.73±0.00 ^{ab}	9.21±0.20 ^{bc}	1.60±0.00 ^{ef}	0.17±0.00 ^e	0.06±0.00 ^{ef}	34.44±0.86 ^{de}
		0.5	98.00±0.27 ^{ab}	9.29±0.12 ^{bc}	1.60±0.18 ^{ef}	0.17±0.02 ^e	0.06±0.00 ^{def}	35.23±4.24 ^{de}
		1.0	97.93±0.06 ^{ab}	10.07±0.67 ^{ab}	2.02±0.09 ^{cd}	0.20±0.00 ^{cd}	0.08±0.00 ^{ef}	39.38±1.31 ^d
		1.5	96.86±0.86 ^{cb}	9.95±0.26 ^{ab}	1.73±0.25 ^{de}	0.17±0.02 ^e	0.05±0.01 ^f	34.13±5.79 ^{de}
		2.0	97.20±0.13 ^{ab}	8.93±0.37 ^c	1.50±0.16 ^f	0.17±0.02 ^e	0.07±0.00 ^{cd}	32.94±5.40 ^f
	2.0	0.0	98.40±0.53 ^{ab}	9.56±0.28 ^{ab}	2.69±0.59 ^b	0.28±0.06 ^b	0.11±0.02 ^{ab}	55.36±1.11 ^b
		0.5	98.40±0.00 ^{ab}	9.40±0.28 ^{bc}	2.30±0.08 ^{cd}	0.24±0.01 ^{bc}	0.09±0.00 ^{bc}	48.80±1.94 ^c
		1.0	98.33±0.20 ^{ab}	10.42±0.47 ^{ab}	2.80±0.20 ^{ab}	0.27±0.02 ^{bc}	0.11±0.00 ^{ab}	53.93±5.67 ^{bc}
		1.5	97.66±0.46 ^{ab}	10.84±0.25 ^a	2.18±0.40 ^{bc}	0.20±0.03 ^{cd}	0.09±0.01 ^{ef}	39.48±6.82 ^d
		2.0	97.46±1.40 ^{ab}	9.85±0.46 ^{ab}	1.71±0.38 ^{cd}	0.17±0.02 ^e	0.07±0.01 ^{bc}	34.02±5.62 ^{de}
	2.5	0.0	98.46±0.66 ^{ab}	10.41±1.10 ^{ab}	2.74±0.25 ^{bc}	0.26±0.02 ^b	0.11±0.01 ^{bc}	51.69±4.41 ^{bc}
		0.5	98.80±0.40 ^a	9.08±0.24 ^{bc}	2.55±0.10 ^{cd}	0.28±0.01 ^b	0.11±0.00 ^{cd}	55.12±3.51 ^b
		1.0	98.26±1.20 ^{ab}	9.50±0.24 ^{ab}	3.39±0.72 ^a	0.36±0.07 ^a	0.14±0.03 ^a	70.98±1.08 ^a
		1.5	97.66±0.60 ^{ab}	9.61±0.47 ^{ab}	1.93±0.65 ^{cd}	0.20±0.08 ^{cd}	0.09±0.02 ^{cd}	40.74±1.19 ^{cd}
		2.0	97.46±0.00 ^{ab}	8.78±0.31 ^c	1.73±0.12 ^{ef}	0.20±0.01 ^{cd}	0.07±0.00 ^{ab}	38.71±2.89 ^d

หมายเหตุ a, b, c, d, e และ f เป็นค่าทางสถิติที่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.2 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของเซลล์ยีสต์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร่วมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจินต

จากการศึกษาประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของยีสต์ของเชื้อยีสต์ตรึงรูปบนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร่วมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจินตที่สภาวะเหมาะสม

คือ ความเข้มข้นอัลจินตร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และขานอ้อย 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ภายใต้สภาวะอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง จากตารางที่ 2 พบว่า เวลาในการหมักที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลลดลงและปริมาณเอทานอลเพิ่มมากขึ้นเพราะเชื้อยีสต์มีการใช้น้ำตาลแล้วผลิตเอทานอล โดยพบว่าปริมาณของเอทานอลสูงสุดที่เกิดขึ้น เท่ากับ



รูปที่ 1 ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด;

ก) ภายนอกของเซลล์ยีสต์ที่รูปร่างแบนอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพที่กำลังขยาย 750 เท่า;

ข) ภายนอกของเซลล์ยีสต์ที่ห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตที่กำลังขยาย 750 เท่า;

ค) ภายนอก และ ง) ภายในของเซลล์ยีสต์ที่รูปร่างแบนอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่กำลังขยาย 750 และ 1000 เท่า ตามลำดับ

3.51 ± 0.42 กรัม/ลิตร, $Y_{p/s}$ 0.36 ± 0.37 กรัม/กรัม, Q_p 0.15 ± 0.02 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และ E_y 69.79 ± 4.12 %

3.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ซ้ำของเชื้อยีสต์ตรึงรูป

การศึกษาศักยภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของเชื้อยีสต์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพพร้อมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนตที่สภาวะเหมาะสมคือ ความเข้มข้นอัลจิเนต ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และขานอ้อย 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบในการเขย่า 120 รอบต่อนาที ระยะเวลาการหมัก 24 ชั่วโมง จากตารางที่ 3 พบว่า ปริมาณของเอทานอลที่เกิดขึ้นในรอบที่ 1-5 เท่ากับ 3.22 ± 0.54 , 3.04 ± 0.89 , 3.11 ± 0.22 , 3.19 ± 0.08 และ 3.23 ± 0.48 กรัม/ลิตร ตามลำดับ มีค่า E_y ในรอบที่ 1-5 เท่ากับ 100, 85.78, 90.05, 91.45 และ 94.85 ตามลำดับ และร้อยละผลผลิตในรอบที่ 1-5 มีค่ามากกว่าร้อยละ 50 ของผลผลิตเอทานอลในรอบที่ 1

เมื่อพิจารณาผลการศึกษามากจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 2) พบว่า ลักษณะ

โครงสร้างของเม็ดเจลในรอบที่ 5 เริ่มมีการเสื่อมสภาพ ทั้งนี้เพราะโครงสร้างของเม็ดเจลอัลจิเนตมีการบวม น้ำและมีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ยีสต์ภายในเม็ดเจลอัลจิเนตส่งผลให้เม็ดเจลอัลจิเนตแตก [12] ดังนั้นจากผลการศึกษาประสิทธิภาพการนำกลับมาใช้ใหม่ของเชื้อยีสต์ตรึงรูปบนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพพร้อมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต จึงสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้อย่างน้อย 5 รอบ โดยที่ค่า E_y มีค่ามากกว่าร้อยละ 50

4. สรุป

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ตรึงบนขานอ้อยปรับสภาพพร้อมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจิเนต โดยศึกษาปริมาณวัสดุที่ใช้ในการตรึงรูปและความเข้มข้นของอัลจิเนตร้อยละต่าง ๆ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการให้ผลผลิตเอทานอล คือ อัลจิเนตที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) และปริมาณขานอ้อยร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ให้ปริมาณเอทานอล 3.39 ± 0.72 กรัม/ลิตร, $Y_{p/s}$ 0.36 ± 0.07 กรัม/กรัม, Q_p 0.14 ± 0.03 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และ E_y 70.98 ± 14.08 % ผลการศึกษาประสิทธิภาพการนำเม็ดอัลจิเนตมาใช้ใหม่ของ

ตารางที่ 2 ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ (S) ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (P) ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) และประสิทธิภาพของการหมัก (E_y) โดยเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ถูกตรึงบนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกับอัลจินตความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เวลา (ชม.)	S (กรัม/ลิตร)	P (กรัม/ลิตร)	$Y_{p/s}$ (กรัม/กรัม)	Q_p (กรัม/ลิตร/ชม.)	E_y (%)
0	0.01±0.21 ^a	0.00±0.00 ^e	0.00±0.00 ^b	0.00±0.00 ^c	0.00±0.00 ^c
1	1.65±0.26 ^{ab}	0.05±0.06 ^e	0.03±0.09 ^b	0.00±0.06 ^{ab}	5.74±16.45 ^{ab}
2	1.51±0.48 ^{bc}	0.08±0.14 ^e	0.05±0.12 ^b	0.00±0.01 ^b	10.47±13.83 ^{bc}
3	4.62±0.73 ^{bc}	0.52±0.42 ^d	0.11±0.35 ^{ab}	0.02±0.14 ^a	22.03±22.58 ^a
6	6.84±0.44 ^{cd}	1.03±0.34 ^{cd}	0.11±0.68 ^{ab}	0.04±0.06 ^b	29.60±13.93 ^{ab}
12	8.96±1.83 ^d	1.99±0.14 ^{bc}	0.22±1.96 ^{ab}	0.08±0.01 ^b	43.59±16.17 ^a
18	9.75±2.43 ^e	3.28±0.55 ^{ab}	0.34±0.02 ^b	0.14±0.03 ^{bc}	65.92±4.08 ^{bc}
24	9.87±0.63 ^e	3.51±0.42 ^a	0.36±4.37 ^a	0.15±0.02 ^{bc}	69.79±4.12 ^{bc}

หมายเหตุ a, b, c, d, e และ f เป็นค่าทางสถิติที่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

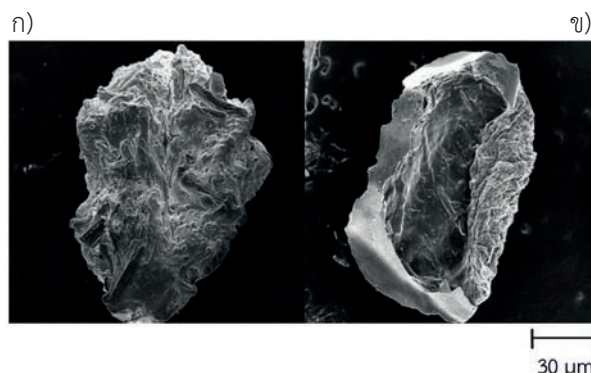
ตารางที่ 3 การนำกลับมาใช้ซ้ำของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ถูกตรึงบนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร้อยละ 1 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ร่วมกับอัลจินตความเข้มข้นร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM Broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแสดงปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ (S) ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (P) ผลผลิตเอทานอล ($Y_{p/s}$) อัตราการผลิตเอทานอล (Q_p) และประสิทธิภาพของการหมัก (E_y)

รอบที่	S (กรัม/ลิตร)	P (กรัม/ลิตร)	$Y_{p/s}$ (กรัม/กรัม)	Q_p (กรัม/ลิตร/ชม.)	E_y (%)
1	7.85±1.05 ^a	3.22±0.54 ^a	0.40±0.05 ^a	0.13±0.02 ^a	80.32±11.56 ^a
2	8.66±0.22 ^a	3.04±0.89 ^a	0.35±0.09 ^a	0.12±0.03 ^a	78.90±18.84 ^a
3	8.43±1.41 ^a	3.11±0.22 ^a	0.36±0.03 ^a	0.13±0.00 ^a	72.33±6.95 ^a
4	8.52±0.30 ^a	3.19±0.08 ^a	0.37±0.00 ^a	0.13±0.00 ^a	73.46±1.59 ^a
5	8.33±0.38 ^a	3.23±0.48 ^a	0.38±0.05 ^a	0.13±0.02 ^a	76.19±10.92 ^a

หมายเหตุ a, b, c, d, e และ f เป็นค่าทางสถิติที่แสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

เซลล์ยีสต์ตรึงรูป *S. cerevisiae* TISTR 5339 บนขานอ้อยปรับสภาพร่วมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจินตพบว่า เมื่อดำเนินการสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้ทั้งหมด 5 รอบ ซึ่งให้ผลการผลิตเอทานอลสูงกว่าร้อยละ 50

ของรอบที่ 1 ของการหมักซ้ำ ดังนั้นการตรึงรูปเซลล์ยีสต์บนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร่วมกับการห่อหุ้มด้วยอัลจินตจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจในการผลิตเอทานอลต่อไปในอนาคต



รูปที่ 2 ลักษณะพื้นผิวและโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดของเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ที่ถูกตรึงบนขานอ้อยที่ผ่านการปรับสภาพร้อยละ 1 กรัม/ปริมาตร ร่วมกับอัลจิเนต ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 กรัม/ปริมาตร ที่กำลังขยาย 750 เท่า โดย ก) ภาพภายนอกในรูปที่ 1 และ ข) ภาพภายนอกในรูปที่ 5

5. กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากหน่วยวิจัย จุลินทรีย์เพื่อการเกษตร คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน

6. เอกสารอ้างอิง

- [1] J. Jeerdonpi and R. pawongrat, "Optimization of pretreated-bagasse immobilized yeast cells and Its application for ethanol production," *Rajabhat Agriculture Journal*, vol. 13, no. 1, pp. 35-46, 2014.
- [2] K. Roekarun, S. Arthan, O. Chunhachart and R. pawongrat, "The potential and utilization of *Jerusalem Artichoke* as supporting material for immobilization of yeast cell," *Prawarun Agricultural Journal*, vol. 12, no. 2, pp. 106-113, 2015.
- [3] W. Soontornchaiboon and R. pawongrat, "The utilization of agricultural waste as supporting material for immobilization of yeast cell and its application for ethanol production," *Veridian E-Journal*, vol. 6, no. 1, pp. 795-807, 2013.
- [4] P. Jeamjoankhao, A. Hanpongkittikun and B. Cheirsilp, "Production of monoacylglycerol from palm olein by immobilized lipase with alginate," *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, vol. 29, no. 2, pp. 261-267, 2007.
- [5] S. Shahrulzaman and I. I. Muhamada, "Microencapsulation of alginate immobilized bagasse with *Lactobacillus rhamnosus* NRRL 442: Enhancement of survivability and thermo-tolerance," *Carbohydrate Polymers*, vol. 119, pp. 173-181, Mar. 2010.
- [6] C. S. James, *Analytical chemistry of foods*, London : Blackie Academic and Professional, 1995.
- [7] H. B. Seo, H. J. kim, O.K. Lee, J. H. Ha, H. Y.

- Lee and K. H. Jung, "Measurement of ethanol concentration using solvent extraction and dichromate oxidation and its application to bioethanol production process," *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol. 36, no. 2, pp. 285-292, Feb. 2009.
- [8] A. Mishra, A. K. Sharma, S. Sharm, R. Bagai, A. S. Mathur, R. P. Gupta and D. K. Tuli, "Lignocellulosic ethanol production employing immobilized *Saccharomyces cerevisiae* in packed bed reactor," *Renewable Energy*, vol. 98, pp. 57-63. Dec. 2016.
- [9] F. Davarci, D. Turan, B. Ozcelik and D. Poncelet, "The influence of solution viscosities and surface tension on calcium alginate micro bead formation using dripping technique," *Food Hydrocolloids*, vol. 62, pp. 119-127, Jan. 2017.
- [10] R. Razmovski and V. Vucurovi, "Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 48, pp. 378-385, 2010.
- [11] I. Pajic-Lijakovic, S. Levic, M. Hadnadjev, Z. Stevanovic-Dajicb, R. Radosevic, V. Nedovic and B. Bugarskia, "Structural changes of Ca-alginate beads caused by immobilized yeast cell growth," *Biochemical Engineering Journal*, vol. 103, pp. 32-38, 2015.
- [12] K. H. Lee, I. S. Choi, Y.-G. kim, D.-J. yang and H.-J. Bae, "Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads," *Bioresource Technology*, vol. 102, no. 17, pp. 8191-8198, Sep. 2011.