สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิและเอทานอลสูง เพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ

Selection of Thermotolerance and Ethanol Tolerance *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strain for Bioethanol Production from Sweet Potato

T130013

นายสุวภัทร เจียมทวีทรัพย์
นายสุกพัฒน์ ผลิตภัณฑ์
นางสาวโสมวิสา ทองปลอด

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....130013
วัน,เดือน,ปี.....- 5 มี.ค. 2557

b.....
i.....

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2555

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

SELECTION OF THERMOTOLERANCE AND ETHANOL TOLERANCE *Saccharomyces cerevisiae* YEAST STRAIN FOR BIOETHANOL PRODUCTION FROM SWEET POTATO

SUVAPAT JEAMTAVEESUB
SOOKAPAT PALITTAPAN
SOMVISA THONGPLOD

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2012

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิและเอทานอลสูง เพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ
Selection of Thermotolerance and Ethanol Tolerance *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strain for Bioethanol Production from Sweet Potato

ชื่อนักศึกษา
นายสุวภัทร เจียมทวีทรัพย์ รหัส 52051121
นายสุกพัฒน์ ผลิตภัณฑ์ รหัส 52051125
นางสาวโสมวิสา ทองปลอด รหัส 52051135

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดวงใจ โอชัยกุล

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2555

คณะกรรมการสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล	
กรรมการ	ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิและเอทานอลสูง เพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ

ชื่อนักศึกษา
นายสุวภัทร เจียมทวีทรัพย์ รหัส 52051121
นายสุกพัฒน์ ผลิตภัณฑ์ รหัส 52051125
นางสาวโสมวิสา ทองปลอด รหัส 52051135

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดวงใจ โอชัยกุล

บทคัดย่อ

ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งใช้อุณหภูมิในการย่อยที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส ความเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ซึ่งใช้เวลาในการย่อยที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ศึกษาเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. cerevisiae* YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เปรียบเทียบกันที่สภาวะการทนต่ออุณหภูมิสูงที่อุณหภูมิ 30 37 40 42 และ 45 องศาเซลเซียส และการทนต่อความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 0 5 10 15 18 และ 20 โดยปริมาตรต่อปริมาตร พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์นี้ยังสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 15 โดยปริมาตรต่อปริมาตร จึงคัดเลือกเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป โดยศึกษากระบวนการหมักเอทานอลเปรียบเทียบกันระหว่างกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก และกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก ในขั้นตอนการหมักใช้ปริมาณเชื้อร้อยละ 10 โดยหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอลที่สูงกว่ากระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมักคือ 11.59 12.03 และ 11.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นศึกษากระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 โดยหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเอทานอล 8.28 8.80 และ 8.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และการหมักที่ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 15 โดยปริมาตรต่อปริมาตรร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาตรเอทานอลที่วิเคราะห์ได้มีลดลงแสดงว่ากระบวนการหมักไม่เกิดขึ้นที่สภาวะนี้

คำสำคัญ : *Saccaromyces cerevisiae*, เอทานอล, กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก, กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Selection of Thermotolerance and Ethanol Tolerance *Saccharomyces cerevisiae* Yeast Strain for Bioethanol Production from Sweet Potato
Student	Suvapat Jeamtaveesub
	Sookapat Palittapan
	Somvisa Thongplod
Degree	Bachelor of Science
Major program	Industrial Microbiology
Academic Year	2012
Advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul

ABSTRACT

Ethanol production from sweet potato starch hydrolyzed by alpha-amylase concentration of 0.05 % and volume of 5 ml at 90 °C for 2 h and amyloglucosidase concentration of 0.015 % and volume of 20 ml at 60 °C for 4 h was carried on to compare *Saccharomyces cerevisiae* 6 strains (YRK 017 TISTR 5202 TISTR 5196 TISTR 5339 TISTR 5088 and TISTR 5596). The experiment conditions to achieve the thermotolerance yeasts were 30 37 40 42 and 45 °C and the conditions to obtain the ethanol tolerance yeasts (ethanol concentrations of 0 5 10 15 18 and 20 % (v/v)). *S.cerevisiae* 3 strains (YRK 017 TISTR 5339 and TISTR 5088) had good growth at 40 °C and ethanol concentration 15 % (v/v) were selected to the following investigation. Followed by the fermentation process of ethanol compared with both separate hydrolysis and fermentation (SHF) and simultaneous saccharificaion and fermentation (SSF) using *S. cerevisiae* 3 strains (YRK 017 TISTR 5339 and TISTR 5508), inoculum volume were 10 % (v/v) at 150 rpm, 30 °C for 48 h. It found that ethanol concentration of SSF was higher than that of SHF were 11.59 12.03 and 11.19 g/l, respectively. Studied on thermotolerance condition at 40 °C with SSF process, ethanol concentration were 8.28 8.80 and 8.00 g/l, respectively. but no fermented at ethanol concentration 15 % (v/v) because ethanol concentration was decreasing.

Key words : *Saccaromyces cerevisiae*, Ethanol, Separate hydrolysis and fermentation, Simultaneous saccharificaion and fermentation

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งในวิชาโครงงานพิเศษจัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยศาสตรบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ซึ่งโครงงานพิเศษนี้สามารถประสบความสำเร็จได้เนื่องด้วยได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้ ที่ได้เสียสละเวลาให้ความรู้คำแนะนำตลอดการดำเนินงานให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง และ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ที่เสียสละเวลามาเป็นประธานและกรรมการสอบ รวมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับรายงานนี้

ขอขอบคุณนางสาววริศรา ลัทธิวงศกร ที่เสียสละเวลาให้ความรู้และคำแนะนำในการดำเนินโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนด้านงบประมาณและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ ซึ่งข้าพเจ้าเชื่อมั่นว่าโครงงานพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในอนาคต ข้าพเจ้าจึงขออุทิศรายงานเล่มนี้ให้เป็นแหล่งค้นคว้าอ้างอิงความรู้แก่ผู้ที่สนใจ

นายสุวภัทร เจียมทวีทรัพย์
นายสุกพัฒน์ ผลิตภัณฑ์
นางสาวโสมวิสา ทองปลอด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย		I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ		II
กิตติกรรมประกาศ		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		VII
สารบัญรูป		IX
บทที่ 1 บทนำ		**1**
1.1	ความเป็นมาและความสำคัญ	1
1.2	วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	2
1.3	ขอบเขตของงานวิจัย	3
1.4	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง		4
2.1	เอทานอล	4
2.2	กระบวนการผลิตเอทานอล	7
2.3	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล	11
2.4	จุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอล	14
2.5	วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	18
2.6	มันเทศ	20
2.7	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	24
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย		26
3.1	เชื้อจุลินทรีย์	26
3.2	วัตถุดิบ	26
3.3	สารเคมี	26
3.4	วัสดุอุปกรณ์	26
3.5	วิธีการทดลอง	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล 33

4.1 ผลการคัดเลือกสายพันธุ์ของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* ที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง 33

4.1.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆหลังการบ่ม 48 ชั่วโมง 33

4.1.2 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆหลังการบ่ม 48 ชั่วโมง 34

4.2 ผลการศึกษาการทนทานต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ 41

4.3 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก 42

4.3.1 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) 42

4.3.2 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) 46

4.3.3 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลจากกระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) 49

4.4 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) 52

4.5 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลในอาหารหมักที่มีเอทานอลเป็นองค์ประกอบโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) 56

4.6 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลในอาหารหมักที่มีเอทานอลเป็นองค์ประกอบหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ		59
5.1	สรุปผลการทดลอง	59
5.2	ข้อเสนอแนะ	60
เอกสารอ้างอิง		61
ภาคผนวก		65
ภาคผนวก ก	อาหารเลี้ยงเชื้อ	65
ภาคผนวก ข	การวิเคราะห์ทางเคมีและเครื่องมือวิเคราะห์	67
ภาคผนวก ค	การนับจำนวนโคโลนีและการคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง	73
ภาคผนวก ง	ข้อมูลดิบ	75
ภาคผนวก จ	การวิเคราะห์ทางสถิติ	88

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารที่ได้จากการหมักเอทานอลโดยยีสต์	8
2.2	แสดงคุณค่าทางอาหารของมันเทศเนื้อขาวเปรียบเทียบกับเนื้อเหลือง	23
2.3	แสดงองค์ประกอบหลักใน 100 กรัม ของส่วนที่รับประทานได้ของพืชตระกูลหัวเปรียบเทียบกับข้าว	23
4.1	แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงบนอาหารแข็ง YPD	33
4.2	แสดงน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร	35
4.3	แสดงค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ	37
4.4	แสดงค่าปริมาณเอทานอล หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ	37
4.5	แสดงการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง YPD ที่เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง บนอาหารแข็ง YPD	41
4.6	แสดงปริมาณเอทนอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือก	43
4.7	แสดงค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisae* 3 สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง	45
4.8	แสดงปริมาณเอทนอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	46
4.9	แสดงค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisae* 3 สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.10	แสดงปริมาณเอทานอลและค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาล ที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมักเปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักที่ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก โดยใช้เชื้อ *S. cerevisae* 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือก	50
4.11	แสดงปริมาณเอทนอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	53
4.12	แสดงค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisae* 3 สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่อุณหภูมิ 40 องศแซลเซียส ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง	55
4.13	แสดงปริมาณเอทนอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักที่ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	57
4.14	แสดงปริมาณเอทนอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบการย่อยพร้อมกับการหมัก (SSF) ที่ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	58
ง-1	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	75
ง-2	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	76
ง-3	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	77
ง-4	ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส	78
ง-5	ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยแยกกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	79
ง-6	ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	81
ง-7	ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	83
ง-8	ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักและมีการเติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	ขั้นตอนและความสัมพันธ์ของขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการหมักเอทานอล	9
2.2	(a) ลักษณะโคโลนีของ *Saccharomyces cerevisiae* บนอาหารแข็ง (b) ลักษณะเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์	16
2.3	แสดงลักษณะของมันเทศ	21
4.1	แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักเซลล์แห้ง จากการหมักเอทานอลในอาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C 37°C 40°C และ 42 °C	36
4.2	แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลจากการหมักเอทานอลในอาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมงของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30°C 37°C 40°C และ 42°C	38
4.3	แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	39
4.4	แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 42 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	40
4.5	แสดงการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ด้วยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	44
4.6	แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *S. cerevisae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก	44
4.7	แสดงค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisae* 3 สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง	45
4.8	แสดงการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก (SSF) โดยเชื้อ *S. cerevisae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.9	แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *S. cerevisae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก	48
4.10	แสดงค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisae* 3 สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง	49
4.11	แสดงปริมาณเอทานอล ที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมักเปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก ที่ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก โดยใช้เชื้อ *S. cerevisae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088	50
4.12	แสดงค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก เปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก ที่ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก โดยใช้เชื้อ *S. cerevisae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088	51
4.13	แสดงการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก (SSF) โดยเชื้อ *S. cerevisae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่อุณหภูมิสูง	53
	องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	40
4.14	แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *S. cerevisae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก	54
4.15	แสดงค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisae* 3 สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	55
ข-1	กราฟมาตรฐานกลูโคสวัดโดยวิธีดีเอ็นเอส ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร	68
ข-2	แผนภาพแสดงวิธีการเตรียมสารและสารละลายมาตรฐานเอทานอล	69
ข-3	กราฟมาตรฐานเอทานอลวัดโดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี	71

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

น้ำมันนับเป็นปัจจัยสำคัญทางเศรษฐกิจทั้งในระดับครัวเรือนและระดับประเทศ เพราะน้ำมันสามารถนำมาใช้ผลิตเป็นแหล่งพลังงานและเชื้อเพลิง เพื่อรองรับกับจำนวนประชากรและเศรษฐกิจภาคอุตสาหกรรมที่เพิ่มขึ้นดังนั้นจึงหลีกเลี่ยงไม่ได้ว่าน้ำมันเป็นสิ่งจำเป็นและมีความต้องการเป็นอย่างมาก ในปัจจุบันสถานการณ์น้ำมันมีปริมาณลดลง ราคาแพง หายาก และขาดแคลนเมื่อเทียบกับปริมาณความต้องการที่เพิ่มมากขึ้น ประเทศกำลังพัฒนาส่วนใหญ่ รวมถึงประเทศไทยแหล่งพลังงานจะมีการนำเข้า และมากกว่าร้อยละ 90 เป็นเชื้อเพลิงที่ไม่สามารถนำกลับมาใช้ได้ใหม่ หรือทดแทนได้ ดังนั้นพลังงานทดแทน เช่น ไบโอเอทานอล จึงเป็นพลังงานทดแทนที่สำคัญในอนาคต และกำลังเป็นที่สนใจในปัจจุบันมีประโยชน์ทั้งในด้านเศรษฐกิจและสิ่งแวดล้อม (Lee และคณะ, 2012) ไบโอเอทานอลถือได้ว่าเป็นพลังงานที่สะอาด ไม่ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก (กล้าณรงค์, 2545) เนื่องด้วยประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ย่อมมีผลผลิตสินค้าทางการเกษตรสูง ซึ่งเราสามารถนำวัตถุดิบจากภาคเกษตรกรรมมาใช้ในการผลิตพลังงานทดแทนได้ เป็นการลดการนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศและช่วยยกระดับให้สินค้าทางการเกษตรให้มีราคาสูงขึ้น

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบได้หลายชนิด แบ่งเป็นประเภทแป้ง น้ำตาลและเศษวัสดุที่เป็นเซลลูโลส ซึ่งในการศึกษานี้จะใช้แป้งจากมันเทศมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล มันเทศ (*Ipomoea batatas*) เป็นพืชตระกูลที่มีลำต้นใต้ดินชนิดหนึ่ง ที่มีองค์ประกอบของแป้งจำนวนมากสะสมไว้ภายในลำต้น ที่เรียกว่า หัว การนำมันเทศมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลนั้น จะต้องมีการอบแห้งและบดเป็นผงแป้งให้ละเอียดเสียก่อน แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลก่อนเข้าสู่กระบวนการหมัก เพื่อให้เชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลในการผลิตเอทานอล เชื้อยีสต์ที่สำคัญคือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตไบโอเอทานอล

ในขั้นตอนการหมักสิ่งที่ถือได้ว่ามีบทบาทสำคัญ คือยีสต์ *S. cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดี ทนทานต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่น โดยยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานในการผลิตเอทานอล ซึ่งในงานวิจัยนี้สนใจสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูง โดยนำสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ชนิดต่างๆมาทำการศึกษาและทำการคัดเลือกสายพันธุ์ โดยคัดเลือกสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่มีความทนต่ออุณหภูมิ และความทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงมาใช้ในการผลิตเอทานอล

Kiran และคณะ (2000) ศึกษาเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในการทนอุณหภูมิสูงทั้งหมด 4 สายพันธุ์ โดยนำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 4 สายพันธุ์เลี้ยงบนอาหารแข็ง YEPD (yeast-extract peptone glucose) จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว YEPD บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหัวเชื้อจากอาหารเหลวมาเลี้ยงในอาหารแข็ง YEPD บ่มที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ 30 35 40 42 44 46 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดโคโลนี และนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว YFM (yeast fermentation medium) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆข้างต้น 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หามวลชีวภาพ วิเคราะห์น้ำตาลและความเข้มข้นของเอทานอล ทำการทดลอง 2 ซ้ำนำมาหาค่าเฉลี่ย จากการทดลองมีเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 2 สายพันธุ์จากทั้งหมดที่ทนอุณหภูมิได้ที่ 44 องศาเซลเซียส

Kumar และคณะ (2011) ศึกษาความทนต่อเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยนำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงบนอาหารเอียง YPG (yeast extract peptone glucose agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากอาหารเอียงมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPG ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกันดังนี้ร้อยละ 0 2.5 5 7.5 10 12.5 และ 15 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่มทำการเจือจางเชื้อ และเลี้ยงในอาหารแข็ง YPG บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คำนวณโคโลนีเป็น CFU/ml จากการทดลองจำนวนเชื้อยีสต์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่มีความทนต่ออุณหภูมิสูง และความทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูง จากนั้นนำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปหมักเอทานอลเปรียบเทียบกระบวนการหมักเอทานอลแบบการย่อยแยกจากกระบวนการหมักและการย่อยเกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการหมัก โดยวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลคือแป้งมันเทศ ซึ่งเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีจำนวนมากและหาได้ง่ายของไทย สามารถนำมาใช้แทนมันสำปะหลังได้ เป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตรของประเทศได้

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง และทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลสูง นำสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาหมักเอทานอล ศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศเปรียบเทียบกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separated hydrolysis fermentation , SHF) และการย่อยเกิดขึ้นพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation , SSF) แล้วทำการเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตโครงงานพิเศษ

ศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ผ่านการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนต่ออุณหภูมิสูง และทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลสูง จากนั้นทำการหมักโดยกระบวนการย่อยให้เกิดขึ้นพร้อมกับการหมัก (SSF) โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสย่อยแป้งในสภาวะที่เหมาะสม จากนั้นนำแป้งที่ผ่านการย่อยมาเข้ากระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล และเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลพร้อมกัน โดยใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส และ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือก 3 สายพันธุ์ หมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) โดยการใช้เอนไซม์อะไมเลส และ กลูโคอะไมเลสย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลก่อนแล้วนำมาหมักกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ลดลง และ ปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง และ ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงที่มีประสิทธิภาพมาเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล
2. เป็นการนำมันเทศซึ่งเป็นวัตถุดิบทางการเกษตรที่มีจำนวนมากของไทยมาใช้ในกระบวนการหมัก และทดแทนการใช้มันสำปะหลังได้
3. ช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับผลผลิตทางการเกษตรของประเทศได้อีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล (web.job.haii.or.th/wiki84new/index.php ; สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

เอทานอล (Ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารอินทรีย์ที่มีสูตรโมเลกุล C_2H_5OH เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกแอลกอฮอล์ซึ่งเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และ ออกซิเจนเป็น ไฮดรอกซิลดิริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอนเกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) เอทานอลบริสุทธิ์ มีลักษณะเป็นของเหลวใสไม่มีสี ติดไฟง่าย ให้เปลวไฟสีน้ำเงิน ไม่มีควัน ระเหยง่าย สามารถละลายทั้งในน้ำและสารละลายอินทรีย์อื่นๆ มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 จุดเดือด 78.32 องศาเซลเซียส และมีจุดเยือกแข็ง - 243.1 องศาเซลเซียส สามารถนำมาบริโภคได้ นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงในรูปเอทานอลไร้น้ำ (anhydrous ethanol) ที่มีความบริสุทธิ์สูง (เข้มข้นร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร) หรืออาจใช้เป็นเอทานอลที่มีน้ำ (hydrous ethanol)

เอทานอลที่ใช้กันโดยทั่วไปมี 2 ประเภทคือ เอทานอลสังเคราะห์ ซึ่งได้จากกระบวนการผลิตทางเคมี และ เอทานอลชีวภาพซึ่งได้จากการใช้จุลินทรีย์จำพวกยีสต์หมักกับวัตถุดิบจากการเกษตร เช่น วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง และเส้นใยที่เป็นผลพลอยได้จากการเกษตร เช่น ชานอ้อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด ในประเทศไทยวัตถุดิบที่มีความเหมาะสมในการนำมาผลิตเป็นไบโอเอทานอลมี 3 ชนิด ตามลำดับได้แก่ มันสำปะหลัง อ้อย และ กากน้ำตาล (molasses เป็นของเสียจากอุตสาหกรรมน้ำตาล) ประเทศบราซิล เป็นผู้ผลิตเอทานอลรายใหญ่ของโลก ใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ

แหล่งพลังงานที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันเป็นที่รู้จักกันดีว่าได้มาจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียมคือ น้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล และยังมีแนวโน้มลดลงตามลำดับ ในทางกลับกันราคาของน้ำมันในยุคนี้เพิ่มขึ้น ดังนั้นหลายประเทศจึงพยายามหาพลังงานอื่นมาทดแทนในรูปแบบต่างๆ เช่น พลังงานลม น้ำ แสงอาทิตย์ และพลังงานชีวมวล

เอทานอล แหล่งพลังงานใหม่ที่กำลังได้รับความสนใจในขณะนี้พบว่าร้อยละ 90 ได้มาจากกระบวนการหมัก (fermentations) ที่เหลือได้จากการสังเคราะห์ขึ้นมา (Synthesis) ในกระบวนการผลิตเอทานอลกระบวนการหมักเป็นขั้นตอนที่สำคัญ เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่จุลินทรีย์จะเป็นตัวไปเปลี่ยนวัตถุดิบ (raw material) ให้กลายมาเป็น เอทานอล

$$C_6H_{12}O_6 \text{ --------> } 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2$$

วัตถุดิบ(น้ำตาล) เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไบโอเอทานอล (Biothanol) (สุจิตรา และคณะ, 2552)

ไบโอเอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งมีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH เกิดจากการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas Pathway หรือ Glycolysis จากจุลินทรีย์ โดยการหมักพืชเพื่อเปลี่ยนแป้งจากพืชเป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์

ในปัจจุบัน พลังงานหลักที่นำมาใช้ในชีวิตประจำวันคือ น้ำมัน ซึ่งได้มาจากกระบวนการทางปิโตรเลียม และ ปิโตรเคมี ซึ่งแหล่งพลังงานเหล่านี้กำลังมีปริมาณลดลง และอาจหมดไปได้ในอนาคต ผู้เกี่ยวข้องทางด้านพลังงานทั่วโลกจึงได้มีการพยายามที่จะหาแหล่งพลังงานต่างๆ มาทดแทน เช่น พลังงานลม พลังงานน้ำ แม้ว่าแหล่งพลังงานเหล่านี้สามารถนำมาทดแทนพลังงานไฟฟ้าได้ ก็ไม่สามารถนำมาทดแทนพลังงานจากน้ำมันได้ แต่ยังมีแหล่งพลังงานบางชนิดที่สามารถนำมาทดแทนแหล่งพลังงานน้ำมันได้ นั่นคือ พลังงานจากเอทานอล หรือพลังงานจากพืชชีวมวล ในบางประเทศ เช่น ประเทศบราซิล ได้มีการใช้เอทานอลเพื่อทดแทนปริมาณน้ำมันที่ใช้ ในขณะที่บางประเทศนำเอทานอลเพียงบางส่วนมาผสมกับน้ำมัน เพื่อได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า แก๊ซโซฮอล์ (gasohol) ซึ่งจัดเป็นพลังงานทดแทนอีกประเภทหนึ่งที่น่าจับตามอง

สำหรับประเทศไทย ปริมาณเอทานอลที่ใช้ผสมน้ำมันมีไม่เกินร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก เอทานอลที่นำมาผสมต้องมีความบริสุทธิ์อย่างน้อยร้อยละ 99.5 โดยน้ำหนัก และได้มาจากกระบวนการหมักแป้ง ซึ่งได้มาจากการนำอ้อย ข้าวโพด หรือ มันสำปะหลัง มาเข้าสู่กระบวนการหมัก ข้อเสียของกระบวนการนี้ อยู่ที่การนำเอาอ้อย ข้าวโพด และ มันสำปะหลังมาใช้ ซึ่งพืชเหล่านี้ล้วนเป็นพืชบริโภคทั้งสิ้น ดังนั้น การผลิตเอทานอลเพื่อทดแทนน้ำมันนั้น จึงทำให้เกิดการแข่งขันทางด้านราคา จึงได้ทำการศึกษาวิจัยหากระบวนการเปลี่ยนพืชให้เป็นน้ำตาล ให้ง่ายและเร็วกว่าการหมัก รวมทั้งใช้วัสดุอื่นๆ ที่มีต้นทุนต่ำ เพื่อมาทดแทนการใช้ อ้อย ข้าวโพด หรือมันสำปะหลัง โดยศึกษาจากผลงานวิจัยที่ได้รวบรวมขึ้นในประเทศสหรัฐอเมริกา ทางด้านพืชหลายๆ ชนิดที่สามารถนำมาหมักเพื่อให้ได้เอทานอล

การนำเอทานอลไปใช้ประโยชน์ (web.bsru.ac.th/~orapim/my_doc/renewable _energy ; สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

1. แอลกอฮอล์ ที่ใช้รับประทานได้โดยตรง (Portable Alcohol) ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสุรา เครื่องสำอาง และ ยา

2. แอลกอฮอล์ที่ไม่ใช้รับประทานโดยตรง (Industrial Alcohol) ตัวอย่างเช่น กรดอะซิติก หรือ กรดน้ำส้ม กรดมะนาว ที่สามารถนำไปใช้ต่อในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมทางการแพทย์ และนอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใย และ โลหะ

3. แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงบริสุทธิ์สูงร้อยละ 95 หรือ ร้อยละ 99.5 - 99.6 แอลกอฮอล์ ที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันนี้ สามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ 3 แบบดังนี้

   1.1 แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ร้อยละ 95 ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงทดแทนน้ำมันเบนซิน หรือดีเซล ใช้กับเครื่องยนต์ ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 แอลกอฮอล์ร้อยละ 99.5 - 99.6 เมื่อผสมกับน้ำมันเบนซิน จะเรียกกันว่า แก๊ซโซฮอล์ โดยที่แก๊ซโซฮอล์ 95 หมายถึง การผสมนำมันเบนซิน 95 กับเอทานอล ในสัดส่วน 9:1 โดยที่ยังรักษาค่าออกเทนไว้ได้ในระดับเดิม สัดส่วนการผสมเอทานอลกับน้ำมันนั้น มีใช้กันอยู่หลายประเทศ E85 เป็นเชื้อเพลิงที่ได้จากการผสมน้ำมันกับเอทานอล โดยมีสัดส่วนของเอทานอลสูงถึงร้อยละ 85 และ มีค่าออกเทนสูง มีใช้กันในประเทศในแถบ บราซิล อเมริกา และยุโรป อย่างไรก็ตาม น้ำมันชนิดนี้ไม่สามารถใช้กับรถยนต์รุ่นส่วนใหญ่ที่ใช้ในประเทศไทย เนื่องจากต้องเป็นรถยนต์ที่มีเครื่องยนต์ที่ทนต่อการกัดกร่อนสูงกว่าปกติ ดังนั้นในการใช้น้ำมันชนิดนี้จึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการเตรียมความพร้อมทั้งในด้านของผู้ใช้รถยนต์และรวมถึงผู้จำหน่ายน้ำมันต้องคำนึงถึงกระบวนการผลิตและขั้นตอนการจัดจำหน่าย

1.3 เป็นสารเคมีที่ช่วยเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันโดยการเปลี่ยนรูป เอทานอล เป็น ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Buty Ether) ซึ่ง MTBE เป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซินที่มีหลายประเทศประกาศห้ามใช้เนื่องจากก่อให้เกิดมลภาวะในอากาศที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่นๆ

สำหรับประเทศไทยใช้สูตร E10 หรือที่เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ 95 (เอทานอลบริสุทธิ์สูงร้อยละ 10 : น้ำมันเบนซินออกเทน 91 ร้อยละ 90) มีคุณสมบัติเทียบเท่าน้ำมันเบนซินออกเทน 95 สามารถใช้ทดแทนกันได้โดยไม่ต้องมีการปรับแต่งเครื่องยนต์ นอกจากนี้ยังมีการวิจัยและพัฒนาน้ำมันจากพืชและ แอลกอฮอล์มาใช้เป็นเชื้อเพลิงเช่น มีการทดลองผลิตน้ำมันดีโซฮอล์ ซึ่งเป็นเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ดีเซล โดยได้จากการผสมไบโอเอทานอลความบริสุทธิ์สูงในสัดส่วนร้อยละ 15 กับน้ำมันดีเซล และ สารอิมัลซิไฟเออร์คือ ทำให้เอทานอลผสมเข้ากับน้ำมันดีเซลโดยไม่แยกชั้น ซึ่งนำมาทดลองใช้กับรถยนต์เครื่องยนต์ดีเซลในโครงการส่วนพระองค์สวนจิตรลดาและได้มีการทดลองนำน้ำมันแก๊ซโซฮอล์ 91 ที่ผสมเอทานอลมากกว่าร้อยละ 20 มาใช้กับรถยนต์และรถจักรยานยนต์เบนซิน 91

ข้อดีของการใช้ไบโอเอทานอลเป็นพลังงานทดแทนมีหลายประการเช่น ช่วยลดมลพิษในสิ่งแวดล้อมจากการใช้สาร MTBE เพื่อเพิ่มค่าออกเทน เนื่องจากสาร MTBE มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมสูงทำให้เกิดมลพิษทางอากาศและปนเปื้อนในน้ำใต้ดิน หลายประเทศมีแนวโน้มจะยกเลิกการใช้สาร MTBE ผสมลงในน้ำมันเบนซิน ประเทศไทยได้กำหนดยกเลิกการนำเข้าสาร MTBE ใน พ.ศ. 2550 ช่วยให้เครื่องยนต์มีการเผาไหม้ดีขึ้นทำให้ไอเสียจากการใช้แก๊ซโซฮอล์มีปริมาณแก๊ซคาร์บอนมอนอกไซด์ลดลงร้อยละ 20 และปริมาณไฮโดรคาร์บอนลดลงร้อยละ 10 เมื่อเทียบกับการใช้น้ำมันเบนซิน ซึ่งจะส่งผลให้ลดค่าใช้จ่ายในการแก้ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมและสุขภาพของประชาชน ลดปริมาณการนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงและสาร MTBE จากต่างประเทศได้ประมาณ 3,000 ล้านบาทต่อปี มีผลทำให้ลดการขาดดุลทางการค้า ช่วยยกระดับราคาผลผลิตทางการเกษตรที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล ทำให้เกิดการลงทุนในภาคเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมต่อเนื่องหลายสาขา นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความมั่นคงและมีเสถียรภาพด้านพลังงานของประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แนวความคิดการใช้เอทานอลในประเทศไทย (ศุภวรรณ์, 2551)

เอทานอลในประเทศไทยถูกพัฒนาและค้นคว้าอย่างต่อเนื่อง เหตุผลมาจาก

1. สภาวะวิกฤตน้ำมันโลก

ในสภาวะปัจจุบันประเทศไทยต้องประสบกับความเสียเปรียบทางด้านพลังงาน เนื่องจากมีการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ เพื่อการขนส่งในปริมาณที่สูงมากและมีราคาน้ำมันดิบในตลาดโลกมีราคาสูงและมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตลอดเวลา ส่งผลให้ประเทศไทยต้องเผชิญกับความเสียเปรียบทางด้านเศรษฐกิจ ต้องพิจารณาแหล่งพลังงานใหม่เพื่อทดแทนที่มาจากวัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถผลิตได้เองภายในประเทศ ทำให้สามารถประหยัดส่วนที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศได้ร้อยละ 10 จากการนำเข้าน้ำมันปิโตรเลียมต่อปีประมาณ 4 แสนล้านบาท

2. สภาวะโลกร้อน

ปัจจุบันสภาวะโลกร้อนหรือที่เรียกว่าสภาวะเรือนกระจก ซึ่งทั่วโลกให้ความสำคัญจากผลกระทบที่เกิดขึ้นและกำลังพยายามหาแนวทางแก้ไขที่ยั่งยืน เอทานอลเป็นพลังงานที่รักษาสิ่งแวดล้อมจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยลดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์จากสภาวะโลกร้อน

พลังงานชีวมวลที่ผลิตจากเอทานอลมีศักยภาพสูงในการใช้เป็นแหล่งพลังงานทดแทนน้ำมันเชื้อเพลิงที่ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ โดยเอทานอลสามารถผลิตได้จากชีวมวลทางการเกษตรที่มีแป้งหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีพืชเศรษฐกิจที่สำคัญเป็นแหล่งสะสมน้ำตาลและแป้ง ได้แก่ อ้อย มันสำปะหลัง และ วัสดุเศษเหลือทางการเกษตรบางชนิด วัตถุดิบเหล่านี้ได้ผ่านการวิจัยและพัฒนาด้านการเพิ่มผลผลิตมาอย่างต่อเนื่องจากหลากหลายหน่วยงาน ซึ่งประสบความสำเร็จเป็นอย่างยิ่ง สำหรับเทคโนโลยีในการผลิตมีอยู่มากมาย ซึ่งเป็นทั้งเทคโนโลยีที่พัฒนาขึ้นภายในประเทศและนำเข้าจากต่างประเทศ ซึ่งสามารถแบ่งเป็น 3 ระยะของการใช้วัตถุดิบ คือ การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลจากแป้งและเซลลูโลส ประเทศไทยสามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลได้อย่างมีประสิทธิภาพตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันและได้พัฒนาการผลิตเอทานอลอย่างต่อเนื่องและมีประสิทธิภาพสูงมากในปัจจุบัน สำหรับการนำเซลลูโลสมาใช้เป็นวัตถุดิบนั้นยังอยู่ระหว่างการพัฒนาจากระดับเครื่องต้นแบบสู่การผลิตในระดับอุตสาหกรรม

2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล

การผลิตเอทานอลโดยทั่วไปมีอยู่ 2 วิธี คือวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี แล ะวิธีการหมัก สำหรับการผลิตโดยวิธีทางเคมีนั้นทำโดยไฮเดรชัน (hydration) สารเอทีลีน (ethylene) ซึ่งได้จากปิโตรเลียม และ ก๊าซธรรมชาติ สำหรับการผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมักนั้นอาศัยเอนไซม์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ช่วยทำให้เกิดปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแปลงซับสเตรต ตัวอย่างเช่นเมื่อเติมยีสต์ลงในอาหารที่มีซูโครสยีสต์ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ซึ่งเอนไซม์นี้ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนซูโครสให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว คือกลูโคส และ ฟรุกโทส จากนั้นกลูโคส และ ฟรุกโทส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเอนไซม์อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในวิถี Embden-Meyerhof-Parnas

เทคโนโลยีการหมักจัดว่าเป็นวิธีเก่าแก่ที่สุดของกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ คำว่าการหมัก มาจากคำกิริยาของภาษาลาตินที่เรียกว่า ฟีเวีย (fevere) แปลว่าการเดือด (to boiling) ที่เกิดจากการกระทำของยีสต์ โดยเกิดเป็นฟองปุดขึ้นมาบนสารสกัดของผลไม้หรือธัญพืชที่กำลังงอก ซึ่งการหมักดังกล่าวเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางเคมีโดยจุลินทรีย์หรือผลิตภัณฑ์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น

ชีวเคมีการหมักเอทานอลโดยยีสต์

สำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำตาลของยีสต์เกิดโดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway โดยวิถีไกลโคไลซิสนี้ไม่มีโมเลกุลของออกซิเจนเข้ามาเกี่ยวข้อง ไพรูเวตที่ได้ยีสต์จะเปลี่ยนเป็นแอซีทาลดีไฮด์ และ เอทานอล ตามลำดับ

Paturau (1969) รายงานว่าในการหมักเอทานอลนั้นยีสต์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลและสารอื่น ๆ ดังตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 สารที่ได้จากการหมักเอทานอลโดยยีสต์

	ร้อยละ
เอทานอล	48.4
คาร์บอนไดออกไซด์	46.5
แอซีแทลดีไฮด์	0 - 0.03
กรดอะซิติก	0.05 - 0.25
กลีเซอรอล	2.5 - 3.6
กรดแล็กทิก	0 - 0.2
กรดซัคซินิก	0.5 - 0.77
น้ำมันเชื้อเพลิง	0.25 - 0.5

ที่มา: คมสัน (2553)

กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ประกอบไปด้วย 6 ขั้นตอน (Stanbury and Whitaker, 1995) คือ

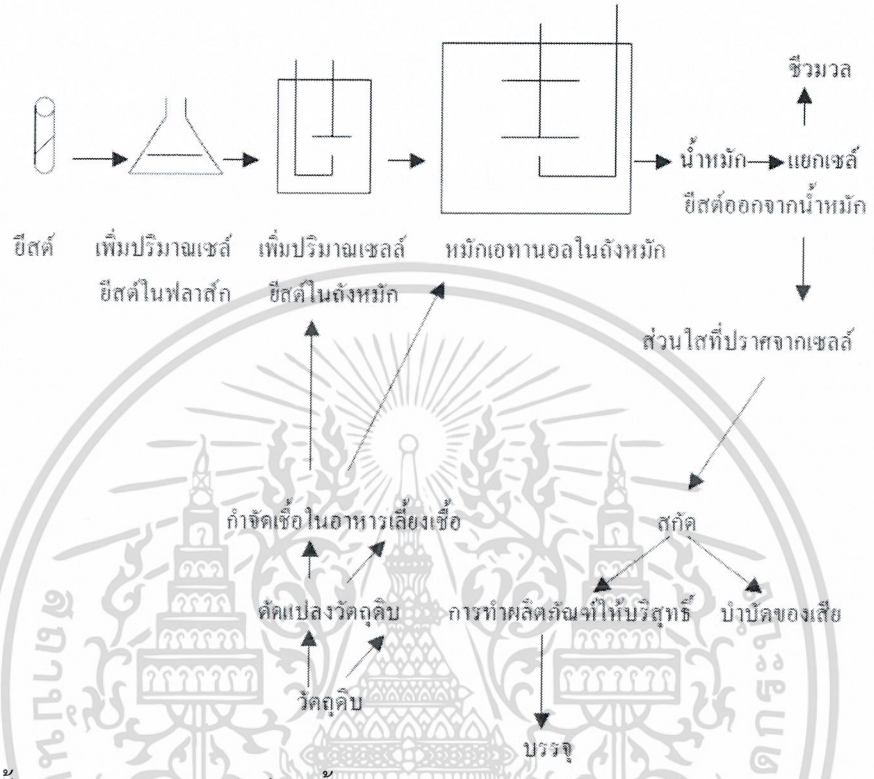
1. การเตรียมอาหารที่ใช้หมัก
2. การทำให้อาหาร ถังหมัก และ อุปกรณ์ปลอดเชื้อ
3. การเพาะเชื้อ โดยปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ใช้เพาะลงในอาหารหมักต้องเหมาะสม เชื้อต้องบริสุทธิ์ และ ว่องไว (active)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ

5. การสกัดผลิตภัณฑ์และการทำให้บริสุทธิ์

6. การกำจัดของเสียที่เกิดขึ้นจากกระบวนการทั้งหมด



รูปที่ 2.1 ขั้นตอนและความสัมพันธ์ของขั้นตอนต่างๆ ในกระบวนการหมักเอทานอล
ที่มา : Stanbury และ Whitaker (1995)

การหมักเอทานอล

โดยทั่วไปการหมักทำได้โดยการเตรียมน้ำหมักที่มีความเข้มข้นน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ได้ร้อยละ ประมาณ 14 – 18 สารอาหารที่ต้องเตรียมเพิ่มเติมคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ประมาณ 70 – 400 กรัมต่อลิตร และมีการเติมกรดฟอสฟอริกด้วย เติมกรดซัลฟูริกเพื่อปรับความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ประมาณ 4.5 – 5.0 ป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆได้ด้วย จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ประมาณร้อยละ 5 – 8 โดยปริมาตรและสามารถหมักในสภาพจำกัดอากาศที่มีอุณหภูมิประมาณ 25 – 30 องศาเซลเซียส ประมาณ 30 – 72 ชั่วโมง จะได้ความเข้มข้นเอทานอลประมาณร้อยละ 6 – 9

กระบวนการหมักที่ใช้มี 3 แบบ (สมใจ, 2537) คือ

1. การหมักแบบแบตช์ (Batch fermentation)

เป็นการหมักที่ทำในระบบปิด มีสารอาหารเริ่มต้นจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงในระบบแล้ว ไม่มีการเติมสารอาหารใด ๆ เพิ่มลงไปอีกจนเสร็จการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การหมักแบบนี้มีข้อดีคือ ค่าติดตั้งอุปกรณ์ถูกกว่า ไม่ต้องการการฆ่าเชื้อในถังหมักอย่างสมบูรณ์ ไม่ต้องใช้คนที่มีความเชี่ยวชาญมากในการควบคุมเครื่องระหว่างทำงาน ความเสี่ยงในการลงทุนต่ำ ง่ายในการเก็บรักษาวัตถุดิบ สามารถใช้กับการหมักที่ต้องการผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างกันได้ และโอกาสที่การหมักจะปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆต่ำ

ข้อเสียของการหมักแบบนี้ ความถี่ในการฆ่าเชื้อถังจะมีผลต่อการวัดค่าของเครื่องมือวัดต่างๆ ค่าใช้จ่ายในการเตรียมหัวเชื้อสูง ความเสี่ยงสูงในการกลายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้หมัก ถังหมักหนึ่งถังไม่เพียงพอต่อการผลิตผลิตภัณฑ์หลายๆอย่างและผลิตภัณฑ์จะถูกแยกออกเนื่องจากปฏิกิริยาที่ไม่ต่อเนื่อง

2. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

เป็นวิธีการที่ในระหว่างการหมักมีการเติมอาหารใหม่ และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกัน ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร

ข้อดีของการหมักแบบนี้คือ ใช้พนักงานน้อย ควบคุมผลิตภัณฑ์ได้ โอกาสติดเชื้อในระหว่างการหมักต่ำ และป้องกันการเสียหายของอุปกรณ์เครื่องมือวัดในระหว่างการฆ่าเชื้อภายในถังหมักน้อย

ข้อเสีย คือวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักต้องเป็นแบบเดียวกันตลอดการหมัก ปัญหาในการรักษาอัตราการหมักสูงๆ การใช้เครื่องควบคุมแทนคนงานมีค่าใช้จ่ายในการทำงานสูงกว่า อุปกรณ์ในการแยกของแข็งในระหว่างการหมักมีราคาแพง

3. การหมักแบบเฟด-แบตช์ (Fed-batch fermentation)

เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะ ๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าออก ซึ่งการหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้แก้ปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ หรืออาจทำให้มีปัญหาในการให้ออกซิเจนโดยการให้ในปริมาณที่เพียงพอทำได้ยาก

ข้อดีของการหมักแบบเฟด-แบตช์ อธิบายได้ดังนี้ (Roehr, 2001)

1. ให้ผลผลิตสูง ทั้งนี้เพราะไม่มีการดึงเซลล์ออกในระหว่างการหมัก
2. มีความยืดหยุ่นสูง
3. มีความเสี่ยงต่อการเกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นต่ำ
4. เงื่อนไขของสภาวะต่าง ๆ มีความเหมาะสม ต่อจุลินทรีย์ เช่น การเจริญของเชื้อ

ข้อเสีย ดังนี้

1. เสียเวลากับการเติมอาหาร การให้ความร้อน การกำจัดเชื้อ การใช้ระบบหล่อเย็น และการทำความสะอาดถังหมัก
2. ต้องการกำลังคนมาก หรือต้องการเครื่องมือที่มีราคาแพง เช่น การใช้ระบบคอมพิวเตอร์ในการควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. มีความเสี่ยงสูงต่อการเกิดการปนเปื้อน หรือการได้รับสารพิษจากคนที่เข้าไปปฏิบัติกับงาน

4. เครื่องมือได้รับความเสียหายมากจากการกำจัดเชื้อหลาย ๆ ครั้ง

2.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

Panchal (1990) ได้ชี้ให้เห็นว่ามีปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งปฏิกิริยาการผลิตเอทานอล ทำให้ผลิตเอทานอลได้น้อยลง ซึ่งปัจจัยหลัก ๆ ได้แก่

1. การยับยั้งการผลิตเอทานอลโดยผลิตภัณฑ์สุดท้าย นั่นคือ เอทานอลทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา

2. การยับยั้งการผลิตเอทานอลโดยผลผลิตพลอยได้ (by products) เช่น กรดอินทรีย์

3. การยับยั้งโดยแรงดันออสโมซีส เนื่องจากมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง

4. การยับยั้งเนื่องจากผลของอุณหภูมิที่เพิ่มมากขึ้น

5. การยับยั้งกระบวนการหมักแต่ไปส่งเสริมการเจริญของยีสต์เนื่องจากการให้อากาศ (aeration) หรือการกวน (agitation)

6. การยับยั้งกระบวนการหมักเนื่องจากการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์ชนิดอื่น (โดยเฉพาะอย่างยิ่งการหมักในระดับอุตสาหกรรม)

7. การยับยั้งกระบวนการหมักเนื่องจากสายพันธุ์ยีสต์ที่เลือกใช้ไม่คงตัว มีการกลายพันธุ์หรือมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ มีดังนี้ (วราวุฒิ และคณะ, 2529)

1. ความเข้มข้นของเอทานอล

ยีสต์หลายชนิดมีความอ่อนแอต่อการยับยั้งด้วยเอทานอล การมีเอทานอลสะสมอยู่ในถังหมักถือว่าเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่ไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ความเข้มข้นของเอทานอลเพียง 1 - 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ก็ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าลง และที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เกือบหยุดลง การเจริญของจุลินทรีย์ถูกยับยั้งด้วยเอทานอลแบบไม่แข่งขัน (non-competitive) ตามสมการ Michaelis-Menten (Aiba และคณะ, 1968)

อย่างไรก็ตาม Brown และ คณะ (1981) ได้ทำการศึกษาและชี้ให้เห็นว่าผลของการยับยั้งนั้นมีความซับซ้อนมาก ยิ่งไปกว่านั้นถ้ามีการเติมเอทานอลในช่วง log phase ทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพอย่างถาวร โดยทั่วไปพบว่าเอลยีสต์ (ale yeast) มีความทนต่อเอทานอลน้อยกว่าลาเกอร์ยีสต์ (lager yeast) และยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศหรือในสภาวะที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว พบว่ามีการตอบสนองต่อเอทานอลน้อย แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงช่วยส่งเสริมให้ความเป็นพิษของเอทานอลมีมากขึ้น การผลิตเอทานอลลดลงเมื่อยีสต์อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ และการผลิตเอทานอลมีมากขึ้นเมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะของอุณหภูมิต่ำสุดของการเจริญ เอทานอลมี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลต่อการยับยั้งแบบไม่แข่งขันในการขนส่งกลูโคส มอลโทส แอมโมเนีย และ กรดอะมิโนต่าง ๆ ยีสต์สายพันธุ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated fatty acid) ปริมาณมากสามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง ๆ มากกว่ายีสต์สายพันธุ์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่น้อย ซึ่งคล้ายกับว่าผลของเอทานอลไปส่งเสริมให้ไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ion) ไหลผ่าน (passive flux) เยื่อหุ้มเซลล์มากขึ้น ซึ่งการไหลผ่านของไฮโดรเจนไอออนนี้ไม่ได้ผ่านทาง ATPase ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง จึงทำให้เกิดความต่างระดับของโปรตอน (proton gradient) กระจายไปทั่วเยื่อหุ้มเซลล์ จึงไปมีผลต่อการยับยั้งการขนส่งสารละลายต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าไมโทคอนเดรียมีบทบาทสำคัญต่อการทนเอทานอลของยีสต์ และยีสต์ที่มีขนาดของเซลล์เล็กสามารถทนต่อเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ที่มีขนาดของเซลล์ใหญ่ (Panchal, 1990)

2. ความเข้มข้นของน้ำตาล

อาหารสำหรับหมักที่มีน้ำตาลสูงกว่าร้อยละ 15 การหมักเอทานอลของยีสต์จะหยุดลง ดังนั้นการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มาหมักในสภาวะเช่นนี้ จึงมีผลให้การหมักเป็นไปได้ช้า ๆ และเมื่อเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerant yeast) เช่น *S. rouxii* พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำ

D'Amore และคณะ (1988) ได้ศึกษาผลของแรงดันออสโมซีสต่อกระบวนการหมักของ brewing yeast (*S. cerevisiae*) ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 100, 200, 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ผลแสดงให้เห็นว่าเมื่อกลูโคสความเข้มข้นสูงขึ้นการเจริญและการหมักของ brewing yeast ลดต่ำลง จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการเจริญ อัตราการหมัก และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลซึ่งดูจากค่าผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (theoretical ethanol yield) ลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลภายในเซลล์ได้รับความเสียหาย จึงมีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในวิถี Embden-Meyerhof-Parnas

3. สารอาหาร และ โคแฟกเตอร์ (cofactor)

สารอาหารบางอย่างอาจมีไม่เพียงพอสำหรับการหมัก ซึ่งรวมถึงแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (เช่น แอมโมเนียมไอออน) วิตามิน หรือแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น สังกะสี ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แมกนีเซียม และแคลเซียม การเติมสารอาหารให้กับยีสต์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะเมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 16 (Rose และ Harrison, 1993)

3.1 <u>ไนโตรเจน</u>

โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมไอออน ได้ซึ่งอาจเติมในรูปของไดแอมโมเนียมฟอสเฟต หรือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแอมโมเนียมไอออนนั้นจัดว่าเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำซึ่งยีสต์ *Saccharomyces* spp. สามารถใช้ได้ ขณะนี้ยังไม่พบว่ามีการนำยูเรียไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตอาหารสำหรับคนอย่างเป็นการค้า แต่มีการใช้ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิง โดยยูเรีย นั้นจัดเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ยีสต์สามารถใช้ได้เช่นเดียวกันกับเกลือแอมโมเนียม

3.2 ฟอสฟอรัส

ปกติใส่ในรูปของฟอสเฟต ซึ่งเป็น ionic factor จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ แต่ไม่ควรใส่จนมีความเข้มข้นเกินร้อยละ 4 ของน้ำหนักแห้ง

3.3 ซัลเฟอร์

ปกติในอุตสาหกรรมใช้ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับฟอสฟอรัส และความเข้มข้นที่ใส่โดยทั่วไปไม่ควรเกินร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้ง

3.4 Trace element

สำหรับ brewer's yeast ความต้องการแร่ธาตุค่อนข้างหลากหลายโดยเฉพาะพวกที่เป็นประจุบวก (cation) ได้แก่ สังกะสี แมงกานีส แมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดง โพแทสเซียม และเหล็ก โดยที่สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ทองแดง และแมกนีเซียม ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแคทาไลติกเซ็นเตอร์ (catalytic centre) ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา หรืออยู่ในสภาวะที่เสถียร ส่วนโพแทสเซียมนั้นเป็นส่วนประกอบของระบบการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์ สำหรับแมกนีเซียมและแคลเซียมปริมาณการใส่อยู่ในช่วงกว้างแต่ในอาหารจะขาดธาตุทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้ เพราะถ้าขาดจะมีผลให้หมักช้า กรณีของแมกนีเซียมช่วยให้อัตราในการผลิตเอทานอลเหมาะสม ขณะที่แคลเซียมกระตุ้นการเจริญและมีบทบาทต่อการตกตะกอนของเซลล์ยีสต์

3.5 วิตามิน

ความต้องการวิตามินในการเจริญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ส่วนมากbrewer's yeast มีความต้องการไบโอติน โดยไบโอตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์คาร์บอกซีเลส (carboxylase) เพื่อใช้สำหรับสังเคราะห์ลิพิดที่จำเป็น มียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ต้องการแพนโททีเนต เป็นปัจจัยการเจริญ แม้ว่าบางครั้งจะผลิตได้มากและปลดปล่อยออกมาสู่อาหาร ซึ่งแพนโททีเนตนี้เป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ เอ และมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตและลิพิด นอกจากนั้นเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ซัลเฟอร์เพื่อเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโน สำหรับอินอซิทอล (inositol) มีความต้องการเป็นบางครั้งเพราะใช้เป็นองค์ประกอบของฟอสฟอลิพิด ขณะที่ไพริดอกซิน (pyridoxine) และไทอะมีน (thiamine) นั้นมีความจำเป็นต่อ brewer's top yeasts ซึ่งวิตามินต่างๆ เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตและเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน ซึ่งการจะเติมสารอาหารใดลงไปนั้นควรคำนึงถึงผลต่อต้นทุนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สภาวะแวดล้อม

4.1 พีเอช

การที่เซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน ค่าพีเอชของโปรโตพลาสซึมภายในเซลล์นั้นไม่เหมือนกัน ยีสต์สามารถรักษาระดับพีเอชภายในเซลล์ได้ค่อนข้างดีเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชต่างกัน และยีสต์สามารถเจริญได้ค่อนข้างดีที่พีเอชระหว่าง 3.6 - 6.0 แต่พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ระหว่าง 4.5 - 5.0 สำหรับอาหารที่มีบัฟเฟอร์ต่ำ พีเอชเริ่มต้นสำหรับการหมักที่เหมาะสมควรมีค่าประมาณ 5.5 แต่อาหารที่มีบัฟเฟอร์สูงพีเอชที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 4.5 - 4.7 (สาวิตรี, 2540)

4.2 อุณหภูมิ

สำหรับยีสต์อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักจะสูงกว่าการเจริญ5 – 10 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่สัมพันธ์กับกระบวนการทางชีวเคมีรวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ยีสต์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส โดยพบว่าเซลล์ยีสต์ในระยะที่มีการเจริญเกิดการตายได้ ถ้านำไปไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50 - 60 องศาเซลเซียส ในเวลาน้อยกว่า 30 นาที สำหรับการผลิตยีสต์ขนมปัง มักควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมักให้อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส

4.3 ออกซิเจน

ในกระบวนการหมักยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ เพื่อให้โครงสร้างที่เป็นลิพิดมีเสถียรภาพ และเพื่อรักษาสภาพของกระบวนการต่างๆ ที่มีอยู่ทั่วไปในเซลล์ อย่างไรก็ตามการให้ออกซิเจนในการหมักนั้นมีผลให้การผลิตเอทานอลลดลง และทำให้ชีวมวลของเซลล์เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นเพราะออกซิเจนส่งเสริมให้เกิด Pasteur effect ในกรณีที่ใช้แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ในการหมัก มีแบคทีเรียหลายชนิดที่ต้องอยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศเท่านั้น ถึงจะมีอัตราการผลิตเอทานอลสูง และผลิตชีวมวลของเซลล์ต่ำ

4.4 คาร์บอนไดออกไซด์

ยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนในที่ความดันสูงกว่าบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญและการหมักรุนแรงมากขึ้น เช่นเดียวกับสภาวะที่อาหารมีพีเอชต่ำ และมีความเข้มข้นของเอทานอลสูง ดูเหมือนว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันเท่านั้น แต่ก็พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมบางอย่างของเอนไซม์ เปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึมได้ (permeability) และการขนส่งตัวถูกละลาย

2.4 จุลินทรีย์ในการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอลที่สำคัญที่สุดคือ ยีสต์ ซึ่งสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นพลังงานเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอากาศ และสร้างเอทานอลเมื่ออยู่ในสภาวะที่ปราศจากอากาศ(มีอากาศจำกัด) กระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยยีสต์นั้นในระดับอุตสาหกรรมมีกระบวนการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกต่างกันไป รวมถึงยีสต์ที่ได้รับความสนใจและถูกเลือกใช้ในการหมักได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *S. uvaum* *Shizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces* species สำหรับแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ในกระบวนการหมัก ได้แก่ *Zymomonas mobilis* ซึ่งการเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดใดก็ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ สำหรับ *Z. mobilis* และ *S. cerevisiae* ต่างมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพื้นฐานของการจัดการ กรณีเลือกใช้ *Z. mobilis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงแต่มีชีวมวลต่ำ ฉะนั้นจำเป็นต้องมีความระมัดระวังในเรื่องของการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงแง่เศรษฐศาสตร์โรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจึงให้ความสนใจ *S. cerevisiae* มากกว่าอีกทั้ง *Z. mobilis* มีความทนต่อเอทานอลต่ำกว่ายีสต์ การผลิตเอทานอลในระดับโรงงานอุตสาหกรรมนั้นจุลินทรีย์ที่เลือกมาใช้ต้องมีลักษณะเหมาะสมกับกระบวนการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต และการออกแบบลักษณะของกระบวนการการผลิตนั้นก็ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ถูกเลือกมาใช้ในกระบวนการหมักด้วยเช่นกัน

ยีสต์คือจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางเป็นเวลานานมาแล้ว ถึงกับมีผู้กล่าวไว้ว่า ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดแรกที่มนุษย์รู้จักนำมาใช้ประโยชน์ โดยนำมาใช้ในการผลิตเบียร์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า Boozah เมื่อประมาณ 6,000 ก่อนคริสตศักราช ปัจจุบันได้มีการนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในหลายๆด้าน ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมเครื่องสำอางและเภสัชกรรม การแพทย์ การเกษตร และสิ่งแวดล้อม การใช้ประโยชน์ของเซลล์ยีสต์ในอุตสาหกรรมอาหารมีบทบาทสำคัญอย่างมากและสามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับเซลล์ยีสต์ได้อย่างคุ้มค่า นอกจากนี้ยีสต์ยังสามารถนำไปใช้ในกระบวนการหมักเพื่อผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ เช่น เบียร์ ไวน์ การผลิตเอทานอลสำหรับใช้เป็นสารเคมีและเชื้อเพลิง เป็นต้น

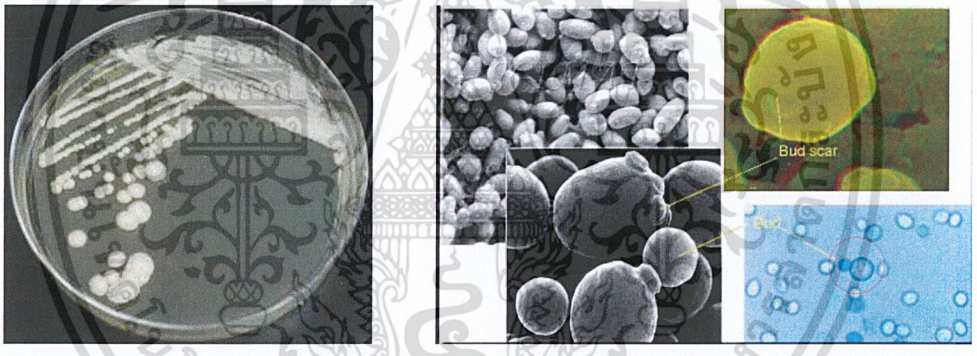
ยีสต์จัดเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มของรากลุ่มหนึ่งที่มีการดำรงชีวิตเป็นแบบเซลล์เดี่ยว มีรูปร่างหลายแบบ เช่นรูปร่างกลม ทรงรี สามเหลี่ยม รูปร่างคล้ายผลมะนาวแถบประเทศตะวันตกหรือรูปร่างยาว เป็นต้น ยีสต์จะมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบไม่อาศัยเพศโดยวิธีการแตกหน่อ (budding) หรือสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยวิธีการสร้างสปอร์ชนิดแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือแบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) ยีสต์ส่วนใหญ่จะมีการใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอน มนุษย์รู้จักนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ในแง่ของกระบวนการหมัก (fermentation) โดยเซลล์ยีสต์จะมีการเจริญเติบโตและแพร่ขยายจำนวนภายใต้สภาวะต่างๆ เช่น อาหาร อุณหภูมิ และปัจจัยแวดล้อมในกระบวนการหมักที่เหมาะสมด้วยการเปลี่ยนแปลงน้ำตาล (สารอินทรีย์ที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอน) เป็นคาร์บอนไดออกไซด์และแอลกอฮอล์ เซลล์ยีสต์สามารถพบได้มากมายตามธรรมชาติ เช่น ในน้ำ ดิน พืช หรือแม้กระทั่งในอากาศ นอกจากนี้ยังพบว่ายีสต์บางชนิดจะรวมอยู่กับแมลง หรือในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แหล่งที่มักพบยีสต์เจริญปะปนอยู่บ่อยๆ คือ แหล่งที่มีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลสูงๆ เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง และผลไม้ที่มีรสหวาน นอกจากนี้ยังสามารถพบยีสต์เจริญได้ในเมล็ดธัญพืช หญ้าฟาง หรือแม้กระทั่งอาหารสัตว์ การปนเปื้อนของเชื้อยีสต์ในอาหารเหล่านี้อาจก่อให้เกิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารอีกด้วย อย่างไรก็ตามยีสต์หลายสายพันธุ์ที่ได้ทำการพิสูจน์และศึกษาค้นคว้าว่ามีประโยชน์ต่อมนุษย์ แต่ยีสต์ที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมนั้นมีเพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้น ตัวอย่างสายพันธุ์ที่เป็นที่รู้จักและมีการนำมาใช้อย่างแพร่หลาย คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเบียร์ (Brewer's Yeast) เอทานอล และสำหรับทำขนมปัง (Baker's yeast)

Saccharomyces cerevisiae จัดอยู่ใน

Division	:	Ascomycotina
Class	:	Ascomysetes
Order	:	Saccharomycetales
Family	:	Saccharomycetaceae
Sub-family	:	Saccharomycetoidae
Genus	:	*Saccharomyces*
Species	:	*cerevisiae*



(a) (b)

รูปที่ 2.2 (a) ลักษณะโคโลนีของ *Saccharomyces cerevisiae* บนอาหารแข็ง
(b) ลักษณะเซลล์ของ *Saccharomyces cerevisiae* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน กำลังขยาย 100X

ที่มา : http://wineserver.ucdavis.edu/content.php? (สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

ในกระบวนการหมักเอทานอลจุลินทรีย์ที่สำคัญที่สุดคือ ยีสต์ โดยเฉพาะ S. cerevisiae จุดเด่นของเชื้อนี้คือ สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิกว้าง (0 ถึง 40 องศาเซลเซียส) ทนอุณหภูมิสูงได้นอกจากนี้ยังสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิดนอกเหนือจากน้ำตาลกลูโคส เช่นน้ำตาลซูโครส (น้ำตาลทราย) น้ำตาลมอลโตส กาแลกโตส เป็นต้น จึงนิยมใช้หมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยทั่วๆไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอทานอลในระดับโรงงานอุตสาหกรรมนั้นจุลินทรีย์ที่เลือกมาใช้ต้องมีลักษณะเหมาะสมกับกระบวนการและอุปกรณ์ที่ใช้ในการผลิต และการออกแบบลักษณะของกระบวนการการผลิตนั้นก็ขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่ถูกเลือกมาใช้ในกระบวนการหมักด้วยเช่นกัน จุลินทรีย์ที่ดี และมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงควรมีลักษณะดังนี้ (สาวิตรี, 2540; Panchal, 1990)

1. ให้ผลผลิตสูง
2. ทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
3. ทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerance)
4. มีความคงตัวภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของการหมัก
5. ทนต่อพีเอชต่ำ (acid tolerance)
6. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
7. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
8. เพิ่มจำนวน (propagation) ได้ง่าย
9. ให้ความร้อนในระหว่างการหมักต่ำ
10. การแสดงลักษณะตกตะกอนหรือไม่ตกตะกอนขึ้นอยู่กับลักษณะของกระบวนการหมักที่ผู้ผลิตต้องการ
11. มีกิจกรรมการเป็นผู้ฆ่า (killer activity)
12. นอกเหนือจากการใช้กลูโคส มีความสามารถในการใช้โพลีแซกคาไรด์
13. มีความทนทานต่อสารพิษต่าง ๆ

ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกเพื่อการอยู่รอดได้แตกต่างกัน อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่สุดในด้านลบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ การที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงต้องมีกลไกพิเศษช่วยให้มีชีวิตรอด ซึ่งเกี่ยวข้องกับสิ่งสำคัญอยู่ 3 ประการ คือ ความคงตัวของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาของลิพิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ การสร้างองค์ประกอบของเซลล์ขึ้นมาทดแทนองค์ประกอบเดิมที่เสียสภาพไป และการที่จุลินทรีย์นั้นทนต่ออุณหภูมิสูงอยู่ก่อนแล้วเกิดวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ประมาณ 46 - 50 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่านั้นหาได้ยาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ รวมทั้งสภาวะการเจริญ เช่น อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน น้ำ ออกซิเจน ความเข้มข้นของเอทานอล และปัจจัยการเจริญอื่น การให้สารอาหารพิเศษบางชนิดสามารถช่วยให้ยีสต์เจริญที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้ เช่น การเติมกรดไขมันอิ่มตัว และเออร์โกสเตอรอลในอาหารหมัก การที่ยีสต์มีการเจริญลดลงในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นอาจเนื่องมาจากมีการสังเคราะห์สเตอรอลได้น้อยลง (Anderson และคณะ, 1986) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพบว่าสภาพการเป็นของไหลขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มลดลง การมีชีวิตรอดของยีสต์น้อยลง ทั้งนี้เพราะโปรตีนหรือองค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ (Swan และ Watson, 1997)

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของสำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

130013

ที่อุณหภูมิสูงอัตราการเจริญของยีสต์ลดลงมีผลให้ชีวมวลโดยรวมลดลง เพราะฉะนั้นปริมาณโปรตีน กรดไรโบนิวคลีอิก กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก และกรดอะมิโนอิสระต่าง ๆ ภายในเซลล์จึงลดลง และการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นยังเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัวมากขึ้น ทำให้ความสามารถในการไหลผ่านของสารละลายต่าง ๆ รวมทั้งสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง (Panchal,1990) จึงมีผลต่อการลดอัตราการหายใจของยีสต์ แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิสูงเหนี่ยวนำให้ระบบการหายใจของยีสต์บกพร่อง นั่นคือไมโทคอนเดรียมีบทบาทโดยตรงต่อการทนสภาวะอุณหภูมิสูง (Van Uden, 1984)

ปัจจัยที่อาจเป็นไปได้ต่อการทนอุณหภูมิสูงของยีสต์คือการแสดงออกหรือไม่แสดงออกของ heat shock proteins (HSPs) ซึ่งในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิด HSPs ซึ่ง HSPs นี้เป็นตัวการในการทำให้เซลล์ยีสต์มีความทนต่ออุณหภูมิสูง ได้รายงานถึงการทำ heat shock ใน *S. cerevisiae* ว่าไม่เพียงเหนี่ยวนำให้เกิด HSPs และการทนอุณหภูมิสูงเท่านั้น แต่ยังมีส่วนช่วยให้ยีสต์ทนต่อระดับของเอทานอลที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามยีสต์ยังไม่สามารถหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง

เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานที่สามารถผลิตขึ้นมาทดแทนได้อยู่ตลอดเวลา จึงเป็นที่ยอมรับและเป็นที่สนใจต่อการวิจัย โดยพบว่าในระหว่างการหมักเอทานอลนั้นอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีผลต่อการผลิตเอทานอล ดังนั้นการใช้ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงจึงมีความสำคัญในการช่วยลดต้นทุนของระบบหล่อเย็นในระหว่างการหมัก ทำให้อัตราการหมักเร็วขึ้น และช่วยลดโอกาสการเกิดการปนเปื้อนในระหว่างการหมักได้ ซึ่งสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส และทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี (Sridhar และคณะ, 2001)

2.5 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (www.dkt.ac.th/kruya/energy/en_else/atanol : สืบค้นวันที่ 10 กันยายน 2555)

เอทานอลเกิดจากการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลกลูโคสผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas Pathway หรือ Glycolysis pathway จากจุลินทรีย์ เนื่องจากยีสต์ที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อผลิตเอทานอลนั้น สามารถใช้น้ำตาลทราย (ซูโครส) ได้ด้วย ฉะนั้นจึงสามารถใช้น้ำอ้อย หรือกากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบสำหรับการหมักได้ ส่วนวัตถุดิบที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก ถ้าย่อยแป้งก็จะได้น้ำตาลกลูโคสและหมักเป็นเอทานอลได้เช่นเดียวกัน โดยเทคโนโลยีการผลิตเอทานอลจากชีวมวลจะขึ้นอยู่กับประเภทของวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร สามารถแบ่งตามกลุ่มพืชผลทางการเกษตรที่ใช้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีทรูท ข้าวฟ่างหวาน หัวผักกาดหวาน เป็นต้น ยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการใดๆโดยวัตถุดิบเหล่านี้จะมีน้ำตาลซูโครส (Sucrose) เป็นองค์ประกอบหลัก

$$\underset{\text{Glucose}}{C_6H_{12}O_6} + \text{YEAST} \longrightarrow \underset{\text{Carbon dioxide}}{2nCO_2} + \underset{\text{Ethanol}}{2C_2H_5OH}$$

2. วัตถุดิบประเภทแป้ง

เป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสจะต้องนำมาผ่านกระบวนการย่อยให้ได้น้ำตาลกลูโคสเป็นโมเลกุลเดี่ยวยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ดังสมการ

$$\underset{\text{Starch}}{H(C_6H_{10}O_5)nOH} \xrightarrow[\text{water}]{\text{Amylotytic enzymes}} \underset{\text{Glucose}}{nC_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{yeast}} \underset{\text{Ethanol}}{2nCH_3CH_2OH} + \underset{\text{Carbon dioxide}}{2nCO_2}$$

วัตถุดิบประเภทแป้งได้แก่ผลผลิตทางการเกษตรเช่น พวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และ พืชประเภทหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น

3. วัตถุดิบประเภทเส้นใย

ซึ่งเป็นวัตถุประเภทลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ลิกนิน (lignin) และสารประกอบอื่นๆ

เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึก มีลักษณะเป็นเส้นใย เหนียวและไม่ละลายน้ำ

เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และ อะราบิโนส (Arabinose) เป็นต้น จะไม่ละลายน้ำและเสถียรน้อยกว่าเซลลูโลสมาก

ลิกนิน เป็นพอลิเมอร์ของ ฟีนิลโพรเพน (Phenylpropane) ทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก ดังนั้นในการนำมาผลิตเอทานอลต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบก่อน

วัสดุส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

วัสดุเหลือทางการเกษตรสามารถนำมาผลิตเอทานอลได้ โดยวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรที่มีมากในประเทศไทย เช่น ผลพลอยได้จากข้าว ผลพลอยได้จากข้าวโพด และ ผลพลอยได้จากปาล์มน้ำมัน ซึ่งวัสดุเหลือทิ้งแต่ละประเภท มีคุณสมบัติและปริมาณแตกต่างกันไปสำหรับการนำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัสดุเศษเหลือจากการเกษตรไปผลิตเอทานอลนั้นมีข้อจำกัดเพราะวัสดุเศษเหลือที่น้ำหนักน้อยและพองฟูทำให้ไม่คุ้มค่าขนส่ง

แม้จะมีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ แต่จะมีเพียงไม่กี่ชนิดที่มีความเหมาะสมในการผลิตเป็นเอทานอล โดยมีหลักเกณฑ์ที่ควรพิจารณาคือ

- วัตถุดิบมีปริมาณเพียงพอสำหรับป้อนสู่โรงงานได้ตลอดปี หาได้ง่าย ราคาถูก
- สามารถผลิตเอทานอลต่อหน่วยของวัตถุดิบและต่อหน่วยของพื้นที่เพาะปลูกได้ในปริมาณสูง
- พลังงานสมดุลของระบบเป็นบวก
- วัตถุดิบนั้นจะต้องไม่แย่งอาหารของมนุษย์

(www1.mod.go.th/opsd/dedweb/energy/about/meaning% ; สืบค้นวันที่ 26 ธันวาคม 2555)

2.6 มันเทศ (Sweet Potato)

http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book (สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2555)

ประวัติความเป็นมา

มันเทศมีถิ่นกำเนิดเดิมอยู่บริเวณเขตร้อนของทวีปอเมริกา แต่มันเทศที่ปลูกกันอยู่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ไม่มีหลักฐานแน่นอนว่ามีวิวัฒนาการมาจากพืชป่าชนิดใด ในสมัยโบราณมันเทศเป็นอาหารหลักของมนุษย์สองเขต คือ พวกอินเดียนในอเมริกากลางและบริเวณเทือกเขาแอนดีส ประเทศเปรู พวกอินเดียนทั้งสองแหล่งนี้ปลูกข้าวโพดเพื่อใช้เป็นอาหารหลัก และในขณะเดียวกันก็ปลูกมันเทศด้วย อีกเขตหนึ่ง คือ ชนเผ่าโพลิเนเชียนที่อาศัยอยู่บนหมู่เกาะต่างๆ ในมหาสมุทรแปซิฟิก และตอนเหนือของเกาะนิวซีแลนด์ เชื่อกันว่ามันเทศที่ชาวโพลิเนเชียนปลูกกันในสมัยก่อนนั้น นำมาจากทวีปอเมริกาในคริสต์ศตวรรษที่ 16 หลังจากชาวยุโรปค้นพบทวีปอเมริกา นักสำรวจชาวสเปนได้นำมันเทศไปสู่ประเทศสเปน จากประเทศสเปนก็แพร่ต่อไปยังประเทศอื่นๆในยุโรป

ทางด้านเอเชียมันเทศก็ถูกนำมายังอินเดีย ฟิลิปปินส์ จีน และญี่ปุ่น โดยนักสำรวจสเปนและโปรตุเกส สำหรับประเทศไทยไม่มีหลักฐานบันทึกว่าได้มีการนำมันเทศเข้ามาปลูกในสมัยใดแต่เข้าใจกันว่ามีผู้นำมันเทศมาแพร่หลายในราวสมัยกรุงศรีอยุธยาเป็นราชธานี เพราะมีเรือสำเภาไปมาค้าขายระหว่างประเทศจีน พวกคนจีนคงจะได้นำติดมือมา ตามนิสัยที่ไปอยู่ที่ไหนก็หาพันธุ์พืชไปปลูกบริโภค

ในปัจจุบันมันเทศปลูกกันทั่วไปในประเทศไทยเพราะมันเทศเป็นพืชที่เหมาะสมกับสภาพดินฟ้าอากาศของประเทศไทยอย่างยิ่ง สามารถเจริญเติบโตได้ดีและให้ผลผลิตของหัวค่อนข้างสูง แต่ส่วนใหญ่แหล่งปลูกเป็นจังหวัดในทางภาคกลาง จังหวัดที่ปลูกมาก ได้แก่ นครศรีธรรมราช เชียงใหม่ นครสวรรค์ พระนครศรีอยุธยา สงขลา นครปฐม เพชรบุรี ตรัง เลย และปทุมธานี โดยข้อมูลปี 2546 – 2547 ประเทศไทยมีการปลูกมันเทศ รวม 30,905 ไร่ มีปริมาณผลผลิต 56,432 ตัน เฉลี่ย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลผลิต 1.82 ตันต่อไร่ มันเทศจึงเป็นพืชอาหารที่มีความสำคัญเป็นอันดับที่ 5 ของโลกรองจาก ข้าวสาลี ข้าวจ้าว ข้าวโพด และ มันฝรั่ง

ลักษณะทั่วไปของมันเทศ (www.guru.sanook.com/encyclopedia ; สืบค้นวันที่ 12 พฤศจิกายน 2555)

รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของมันเทศ
ที่มา : www.hcsupply.blogspot.com/2009/02/blog-post.html (สืบค้นวันที่ 12 พฤศจิกายน 2555)

ชื่ออังกฤษ : Sweet Potato
ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Ipomoea batatus L.*
ชื่อวงศ์ : Convolvulaceae

ลักษณะทางพฤษศาสตร์

มีลำต้นเป็นเถาหรือเป็นพุ่มตั้งตรง และมีจำนวนน้อย ที่เป็นประเภทไม้ยืน ต้นพืชพวกนี้อาจเจริญในที่แห้งแล้ง ในน้ำ และอาจเป็นพวกตัวเบียน (parasite) โดยทั่วไปแล้วเมื่อใบหรือลำต้นเป็นแผลพืชในวงศ์นี้จะให้น้ำยางสีขาว

ราก มันเทศมีระบบรากแบบรากฝอย ซึ่งเกิดจากข้อของลำต้นที่ใช้ปลูก หรือเกิดจาก ลำต้นที่ทอดไปตามพื้นดิน รากมันเทศจะเป็นที่สะสมอาหารและใช้รับประทานได้

ใบ เป็นแบบใบเดี่ยว เกิดสลับกันบนข้อของลำต้น มีขนาดและรูปร่างต่างกัน ความแตกต่างของใบนั้นมิใช่เกิดจากพันธุ์เท่านั้น แม้แต่ในต้นเดียวกันก็อาจมีรูปร่างแตกต่างกันได้ บางใบมีขอบใบเรียบ บางใบมีใบเป็นแฉก และบางใบมีรูปร่างคล้ายหัวใจ เป็นต้น ใบมีขนเล็กน้อย และ มักจะมีสีม่วงอยู่ตามเส้นใบ ก้านใบอาจจะยาวหรือสั้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับพันธุ์นั้นๆ

ดอก มันเทศที่ปลูกในเขตอบอุ่นมักไม่ออกดอก ส่วนการปลูกในเขตร้อนจะออกดอกแต่มักไม่ติดเมล็ด ดอกเกิดตามมุมของใบ มีก้านช่อดอก (peduncle) แข็งแรง ซึ่งมักจะยาวกว่าก้านใบ ดอกมีกลีบเลี้ยง 5 กลีบ ซึ่งโดยปกติจะแยกเป็นอิสระ ซึ่งกันและกัน หรือ อาจเชื่อมติดกันที่โคนกลีบดอก (petal) มี 5 กลีบ กลีบดอกเหล่านั้นจะเชื่อมติดกันเป็นรูปกรวย (corolla tube) มีลักษณะคล้ายดอก ผักบุ้ง กลีบดอกมีสีชมพูปนม่วง มีเกสรตัวผู้ (stamen) 5 อันและแยกเป็นอิสระซึ่งกันและกัน ก้านชูอับเกสรตัวผู้เรียกว่า ก้านอับเกสรมีความยาวไม่เท่ากัน และเชื่อมติดอยู่กับฐานของกลีบ

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ

ดอก รังไข่ มี 2 ส่วน บางดอกอาจจะมี 4 ส่วน แต่ละส่วนจะมีไข่ 1 หรือ 2 ที่รับละอองเกสรตัวผู้ (stigma) มี 2 แฉกอยู่ที่ก้าน (style) เชื่อมติดกับรังไข่

ผล มีเปลือกแข็งหุ้ม มีลักษณะเป็นแคปซูล (capsule) ภายในเปลือกแข็งมีเมล็ดเล็กสีดำค่อนข้างแบน ด้านหนึ่งของเมล็ดเรียบ ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นเหลี่ยม ทางด้านเรียบจะเห็นรอยที่เมล็ดติดกับผนังรังไข่เรียกว่า ไฮลัม (hilum) และมีรูเล็กๆ เรียกว่า ไมโครไพล์ (micropyle) เปลือกของเมล็ดค่อนข้างหนา และน้ำซึมผ่านได้ยาก

หัว มันเทศลงหัวในระดับความลึกไม่เกิน 9 นิ้ว หัวมันเทศเกิดจากการขยายตัวของรากซึ่งเนื้อเยื่อภายในรากที่เรียกว่าพาเรนไคมา (parenchyma) เป็นส่วนที่สะสมแป้ง รากที่ขยายตัวเป็นหัวขึ้นมาอาจเกิดจากรากของลำต้นที่ใช้ปลูก หรือจากรากที่เกิดจากข้อของลำต้นที่เลื้อยไปตามดินก็ได้ ดังนั้นมันเทศต้นหนึ่งๆ อาจมีหัวมากกว่า 50 หัวลักษณะหัวส่วนมากมีรูปร่างทรงกระบอก ด้านหัวท้ายเรียวตรงกลางป่องออก สีผิวของหัวและสีของเนื้ออาจจะเป็นสีแดง เหลือง ขาว หรือสีนวลแตกต่างกันไปตามพันธุ์ ผิวอาจจะเรียบหรือขรุขระและมักจะมีรากแขนงเกิดในร่องของหัว

คุณค่าทางโภชนาการของมันเทศ

ประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรต เส้นใย โปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก วิตามินเอ วิตามินบี 1 วิตามินบี2 ไนอาซิน โฟเลท วิตามินซี สารเริ่มต้นของสารแคโรทีนและเบต้าแคโรทีน

มันเทศ เป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรตชั้นดีที่ให้พลังงานโดยไม่ก่อพิษต่อร่างกายแบบอาหารที่แปรรูปจากแป้งและน้ำตาลแบบอื่นๆ หัวมันเทศชนิดหัวสีเหลืองแสดงว่าเป็นแหล่งเบต้าแคโรทีนที่ดีกินแล้วจะได้วิตามินเอ มันเทศจึงมีส่วนช่วยบำรุงสายตา เสริมสร้างระบบคุ้มกันของร่างกายให้แข็งแกร่ง ลดความเสี่ยงต่อโรคต่างๆ

มันเทศ เป็นพืชอาหารของมนุษย์และสัตว์ โดยใช้ทั้งหัว เถา ใบ และยอดอ่อน มาประกอบอาหารทั้งคาวและหวาน เช่น มันกระป๋อง น้ำส้มสายชูหมักจากมันเทศ ในด้านอุตสาหกรรมมีการสกัดแป้งมันเทศเป็นส่วนผสมของอาหารเด็ก และกาว เป็นต้น นอกจากนี้มันเทศยังใช้เป็นอาหารสัตว์ได้หลายชนิด เช่น สุกร วัว ควาย กระต่าย เป็ด ไก่ และปลา เป็นต้น

สรรพคุณของมันเทศ

มันเทศเป็นแหล่งพลังงาน และให้วิตามินบี 2 และโฟเลทสูง รองลงมาจากผักใบเขียว มีสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีเยี่ยม มีฤทธิ์เย็น รสหวาน ส่วนที่ใช้ประโยชน์ของมันเทศ คือ หัว ต้นและใบ ซึ่งแต่ละส่วนจะให้สรรพคุณแตกต่างกัน เช่น

- หัวมันหรือส่วนยอด สามารถนำมาปรุงอาหาร ชงน้ำดื่มแก้กระหาย บำรุงม้าม ไต แก้เมาคลื่น น้ำคั้นจากหัวมันเทศใช้ทาแก้แผลไฟไหม้
- ใบมันเทศ ตำพอกฝี แก้ไขข้ออักเสบ แก้แผลไฟไหม้ แก้ผื่นคัน ตุ่มพุพอง
- ทั้งต้นและหัว มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณค่าทางอาหารของมันเทศเนื้อขาวเปรียบเทียบกับเนื้อเหลือง

ธาตุอาหาร	มันเทศเนื้อขาว (หัว, ต้ม)	มันเทศเนื้อเหลือง (หัว, ต้ม)
ความชื้น (gm)	62.3	68.1
แคโรรี่ (unit)	149	126
ไขมัน (gm)	0.4	0.6
ธาตุ C H O (gm)	35.8	29.4
เส้นใย (gm)	0.6	0.6
โปรตีน (gm)	0.6	1.0
แคลเซียม (mg)	72	66
ฟอสฟอรัส (mg)	51	58
เหล็ก (mg)	0.7	0.8
วิตามินเอ (i.u.)	10	1,025
วิตามินบี 1(mg)	0.06	0.09
วิตามินบี 2 (mg)	0.03	0.04
ไนอะซิน (mg)	0.5	0.6
วิตามินซี (mg)	47	31

ที่มา : กองโภชนาการ กรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุข (2530)

ตารางที่ 2.3 แสดงองค์ประกอบหลักใน 100 กรัม ของส่วนที่รับประทานได้ของพืชตระกูลหัว เปรียบเทียบกับข้าว

ชนิดพืช	น้ำหนักแห้ง (%)	คาร์โบไฮเดรต (%)	ส่วนของน้ำหนักแห้ง โปรตีน (%)	ไขมัน(%)	เส้นใย (%)	พลังงาน (kJ)
มัน	27	88.8	7.4	0.7	1.9	437
มันเทศ	30	85.8	5.0	1.0	3.3	479
มันฝรั่ง	20	85.0	10.0	trace	2.0	315
ข้าว	88	88.6	8.0	0.9	0.2	1,478

ที่มา : คมสัน (2553)

นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณอื่นเช่น แก้ท้องผูก ช่วยย่อยอาหาร ช่วยปรับสภาพเลือด บำรุงเลือด รวมถึงอวัยวะต่างๆ คือกระเพาะ ม้ามเป็นต้น ช่วยป้องกันโรคต่อกระจก ตาบอดกลางคืน รักษาโรคเบาหวาน แก้โรคดีซ่าน ป้องกันโรคหัวใจ และ มะเร็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Sree และคณะ (2000) ศึกษาเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในการทนอุณหภูมิสูงทั้งหมด 4 สายพันธุ์ โดยนำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 4 สายพันธุ์เลี้ยงบนอาหารแข็ง YEPD (yeast-extract peptone glucose) จากนั้นนำโคโลนีที่ได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว YEPD บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลานำหัวเชื้อจากอาหารเหลวมาเลี้ยงในอาหารแข็ง YEPD บ่มที่อุณหภูมิต่างๆดังนี้ 30 35 40 42 44 46 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อให้เกิดโคโลนี และศึกษาการเลี้ยงในอาหารเหลว YFM (yeast fermentation medium) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆข้างต้น 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร หามวลชีวภาพ วิเคราะห์น้ำตาล และความเข้มข้นของเอทานอล ทำการทดลอง 2 ซ้ำนำมาหาค่าเฉลี่ย จากการทดลองมีเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 2 สายพันธุ์จากทั้งหมดที่ทนอุณหภูมิได้ที่ 44 องศาเซลเซียส

Sree และคณะ (2000) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* VS1 *S. cerevisiae* VS2 *S. cerevisiae* VS3 และ *S. cerevisiae* VS4 ที่อุณหภูมิ 30 35 40 42 และ 44 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีปริมาณมวลเซลล์ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น คือมีมวลเซลล์ 3.0 2.5 3.2 และ 2.6 กรัมต่อลิตร เท่ากันทั้ง 2 อุณหภูมิ และ มีมวลเซลล์ต่ำสุดที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสของ *S. cerevisiae* VS1 *S. cerevisiae* VS2 *S. cerevisiae* VS3 และ *S. cerevisiae* VS4 คือ 0.8 0.4 0.9 และ 0.5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ซึ่งการผลิตเอทานอลก็เป็นไปในทางเดียวกัน คือ ผลิตได้สูงสุดที่ 30 องศาเซลเซียส คือ 66 48 75 และ 52 กรัมต่อลิตร และ ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสผลิตได้เพียง 40 20 58 และ 23 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร

Sree และคณะ (2000) ศึกษาการทนทานต่อเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* VS1 *S. cerevisiae* VS2 *S. cerevisiae* VS3 และ *S. cerevisiae* VS4 ที่ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 4 – 12 น้ำหนักโดยปริมาตร พบว่า *S.cerevisiae* VS3 มีความทนทานต่อเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 น้ำหนักโดยปริมาตรได้มวลชีวภาพ 1.9 กรัมต่อลิตร และ ผลิตเอทาอนลได้ร้อยละ 1.2 น้ำหนักโดยปริมาตร ซึ่งการเจริญและผลิตเอทานอลลดลง เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 12 น้ำหนักโดยปริมาตร คือ ได้มวลชีวภาพ 1.5 กรัมต่อลิตร และมีการผลิตเอทานอลเพียงร้อยละ 0.95 น้ำหนักโดยปริมาตร

Wen-Shiang และคณะ (2012) ศึกษาความทนต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในรูปแบบเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระ โดยเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเหลว YPD ที่เติมกลูโคสร้อยละ 10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และเติมเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆดังนี้ร้อยละ 0 2 4 6 8 และ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียสบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาที จากนั้นนำมาคำนวณจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต ผลผลิตเอทานอล อัตราการผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพในการหมักจากการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตทั้งเซลล์ตรึงและเซลล์อิสระลดลงเมื่อความเข้มข้นเอทานอลเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้ ... ไม่ว่ากรณีใดๆ ... เนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sathess และคณะ (2011) ศึกษาความทนต่อเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยนำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงบนอาหารเอียง YPG (yeast extract peptone glucose agar) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากอาหารเอียงมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPG ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกันดังนี้ร้อยละ 0 2.5 5.0 7.5 10 12.5 และ 15 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่มทำการเจือจางเชื้อ และเลี้ยงในอาหารแข็ง YPG บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คำนวณโคโลนีเป็น CFU/ml จากการทดลองจำนวนเชื้อยีสต์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น

Torija และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* จำนวน 20 สายพันธุ์ โดยเตรียมอาหารสำหรับหมักจาก white must ที่เข้มข้นแล้วทำให้เจือจางโดยให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลสุดท้ายเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตรที่ใช้สำหรับหมักเท่ากับ 450 มิลลิลิตร ที่บรรจุอยู่ในขวดขนาด 500 มิลลิลิตร กล้าเชื้อได้จากการเพาะยีสต์ *S. cerevisiae* จำนวน 20 สายพันธุ์ ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้น 1 x 10^5 CFU/มิลลิลิตร ลงในอาหารชนิดเดียวกัน เลี้ยงจนมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเท่ากับ 2 x 10^6 CFU/มิลลิลิตร นำจำนวนเซลล์ที่ได้เพาะลงในอาหารสำหรับหมักที่เตรียมไว้ การทดลองทำเป็นสองซ้ำ โดยศึกษาการหมัก 5 อุณหภูมิ คือ 15 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส ที่ไม่มีการเขย่าเพื่อให้อากาศ วัดปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ปล่อยออกมา และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทุก ๆ วัน ผลการทดลองพบว่าการหมักที่ 15 และ 20 องศาเซลเซียส การเจริญเป็นไปอย่างช้า ๆ ช่วง lag phase นาน และให้ค่าอัตราการหมักสูงสุดช้า โดยเฉพาะที่ 15 องศาเซลเซียส กว่าจะได้จำนวนเซลล์สูงสุดถึง 10^8 CFU/มิลลิลิตร ใช้เวลานานถึง 6 วัน ขณะที่อุณหภูมิ 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส ใช้เวลาเพียง 3 วัน และให้ค่าอัตราการหมักเริ่มต้นเร็วกว่า ส่วนการหมักที่ 35 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มี lag phase ดังนั้นจึงเข้าสู่ exponential phase ได้อย่างรวดเร็ว ทำให้ได้ประชากรเซลล์สูงสุดเร็วกว่าอุณหภูมิต่ำ

ชุติมา (2548) การคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีปะสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากยีสต์จำนวน 91 ไอโซเลตที่แยกใหม่ โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่มีเอทานอล บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส และ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีการรายงานว่าหมักเอทานอลได้สูงที่อุณหภูมิสูง คือ M30 AM12 TJ1 TJ3 และ Sc 90 พบว่ามีเพียง 6 สายพันธุ์ ที่สามารถหมักเอทานอลความเข้มข้นสูงที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส คือ DMKU 3-1042 DMKU 3-306 DMKU 3-118 DMKU 3-p1042 DMKU 3-p106 และ *S. cerevisiae* Sc 90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ปิเปต ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร
8. ตะแกรงร่อนเบอร์ 35
9. โถดูดความชื้น (desiccator)
10. ขวดเก็บตัวอย่าง (vial)
11. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น High-Pressure steam sterilizer ES-315 ยี่ห้อ TOMY
12. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) รุ่น RIOHAZARD CLASS II V6 ยี่ห้อ CLEAN
13. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น POLAR 1000 ยี่ห้อ ONTHERM
14. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Z 333K ยี่ห้อ HERMLE
15. กล้องจุลทรรศน์
16. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Helios Gamma ยี่ห้อ Thermoscientific
17. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น GC-17A ยี่ห้อ SHIMADZU

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมแป้งมันเทศ

การเตรียมวัตถุดิบโดยใช้มันเทศจากตลาดหัวตะเข้ เขตลาดกระบัง มาล้างน้ำทำความสะอาด ปอกเปลือก แล้วนำมาหั่นเป็นชิ้นบางๆประมาณ 1 มิลลิเมตร จากนั้นนำมาวางกระจายบนถาดสแตนเลส อบแห้งในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 - 3 วัน นำชิ้นมันเทศที่ผ่านการอบแห้ง ทำการปั่นละเอียดให้เป็นผงด้วยเครื่องปั่น แล้วนำมากรองผ่านตะแกรงร่อนขนาดเบอร์ 35 จะได้ผงแป้งมันเทศที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.188 มิลลิเมตรเก็บรักษาในตู้เย็นเพื่อเก็บไว้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลต่อไป

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้น

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหารแข็งเอียง YPD (ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 20 กรัมต่อลิตร กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และวุ้น 15 กรัมต่อลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ 1 - 2 ลูป ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (shaker) ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายเชื้อยีสต์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้หัวเชื้อเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 (Sridhar และคณะ , 2002)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

3.5.3.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตตปริมาณ 16.4 กรัม ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และเตรียมสารละลายกรดอะซิติก ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์โดยปิเปตกรดอะซิติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 11.55 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์โดยนำสารละลายโซเดียมอะซิเตตที่เตรียมได้มาปริมาตร 352 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดอะซิเตตปริมาตร 148 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับความเข้มข้นให้เป็น 0.05 โมลาร์ และนำไปปรับพีเอชเป็น 5.0 โดยใช้สารละลายกรดอะซิติก 0.05 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมอะซิเตต 0.05 โมลาร์

3.5.3.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ชั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 กรัม นำมาละลายในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วนำไปกรองด้วย Milipore filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ เก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.3.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

ชั่งเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.015 กรัม นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วนำไปกรองด้วย Milipore filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วโดยทำในสภาวะปลอดเชื้อ เก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

3.5.4.1 ศึกษาการเจริญของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ในอาหารแข็งเอียง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อยีสต์ 1 - 2 ลูป ลงในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 50 มิลลิลิตรในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเชื้อยีสต์ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้หัวเชื้อเริ่มต้นมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 นำหัวเชื้อที่ได้มาทำการลากเชื้อ (streak plate) ลงบนจานอาหาร YPD จากนั้นนำไปบ่มอุณหภูมิต่างๆ ที่ 30 37 40 42 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อยีสต์ที่อุณหภูมิต่างๆ โดยให้เครื่องหมายเป็นบวก(+) คือมีการเจริญ และเครื่องหมายลบ(-) คือไม่มีการเจริญของเชื้อ (Kiran และคณะ , 2000) เทียบกับชุดควบคุมคือที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและมีการเจริญเป็น +++

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.4.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ของ *S. cerevisiae* ที่หมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

เตรียมอาหารหมัก YFM (ประกอบด้วยยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 4 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) 2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$) 1 กรัมต่อลิตร และน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร pH 5.5) ปริมาตร 100 มิลลิลิตรใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในฟลาสก์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ที่ 30 37 40 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และหามวลชีวภาพ คัดเลือกสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่ผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง เพื่อศึกษาต่อไป (Kiran และคณะ, 2000)

3.5.5 ศึกษาการทนทานต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อยีสต์

เตรียมอาหารเหลว YPD ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นต่างๆดังนี้ร้อยละ 0 5 10 15 18 และ 20 โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลว YPD ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เขย่าให้เอทานอลผสมเป็นเนื้อเดียวกับอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นที่ได้จากข้อ 3.5.2 ร้อยละ10 โดยปริมาตร นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจนับเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต โดยนำมาทำการเจือจาง (serial dilution) ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-8} นำมาทำการ pour plate ลงบนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับโคโลนีบนจานที่มีจำนวน 25 - 250 โคโลนี คำนวณในรูป CFU ต่อมิลลิลิตร คัดเลือกสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ที่สามารถเจริญได้ดีที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง เพื่อศึกษาต่อไป (Kumar และคณะ , 2011)

3.5.6 การศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก

3.5.6.1 กระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separated hydrolysis and fermentation, SHF)

3.5.6.1.1 การเตรียมสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

เตรียมสารละลายผงมันเทศโดยชั่งผงมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้วใส่ลงบีกเกอร์ปริมาณ 48 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 600 มิลลิลิตร คนให้ผงมันเทศละลาย แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 – 100 องศาเซลเซียส คนต่อไปเรื่อยๆ จนได้สารละลายผงมันเทศที่มีลักษณะหนืดและข้นมากขึ้น จะได้สารละลายผงมันเทศที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) นำสารละลายผงมันเทศที่ได้ใส่ลงในพลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 150 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสความ

เอกสารนี้ถือเป็นลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เข้มข้นร้อยละ 0.015 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จะได้สารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

3.5.6.1.2 กระบวนการหมัก

นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์ที่ได้จากการคัดเลือกลงไปปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ หามวลชีวภาพ

3.5.6.2 กระบวนการหมักโดยกระบวนการย่อยเกิดขึ้นพร้อมกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

3.5.6.2.1 การเตรียมสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

เตรียมสารละลายผงมันเทศโดยชั่งผงมันเทศที่ผ่านการอบแห้งแล้วใส่บีกเกอร์ปริมาณ 48 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 600 มิลลิลิตร คนให้ผงมันเทศละลายแล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 – 100 องศาเซลเซียส คนต่อไปเรื่อยๆ จนได้สารละลายผงมันเทศที่มีลักษณะหนืดและข้นมากขึ้น จะได้สารละลายละลายผงมันเทศที่มีความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) นำสารละลายผงมันเทศที่ได้ใส่ลงในพลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฟลาสก์ละ 150 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้เป็นสารละลายน้ำตาลพวกโอลิโกแซ็กคาไรด์

3.5.6.2.2 กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก

นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมหัวเชื้อยีสต์ลงไปปริมาตร 15 มิลลิลิตร นำไปเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุก 12 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ หามวลชีวภาพ

3.5.7 การวิเคราะห์

3.5.7.1 การวิเคราะห์มวลชีวภาพ

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 50 มิลลิลิตรที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสเก็บไว้ในขวดเก็บตัวอย่าง (vial)เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอล แล้วนำส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ในหลอด

เอกสารนี้เป็นลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี ห้ามนำไปใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

เซนตริฟิวก์มาหามวลชีวภาพ โดยนำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำหลอดใส่ในโถดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งหาน้ำหนักหลอด นำมาคำนวณหามวลชีวภาพ

3.5.7.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method (Miller, 1959)

3.5.7.2.1 การเตรียม DNS reagent

เตรียมโดยละลาย DNS 10 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต 300 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ผสมเข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตรเก็บในขวดสีชา

3.5.7.2.2 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบแห้ง 0.1 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายกลูโคสมาตรฐาน มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นใส่หลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วจุ่มลงน้ำเย็นทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

3.5.7.2.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางที่เหมาะสม แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วจุ่มลงน้ำเย็นทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

3.5.7.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี รุ่น shimadzu 17A chromatograph โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา คอลัมน์ที่ใช้เป็น DB-WAX ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดเป็นชนิด flame ionization detector (FID)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 แสดงมวลชีวภาพของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ที่อุณหภูมิต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร

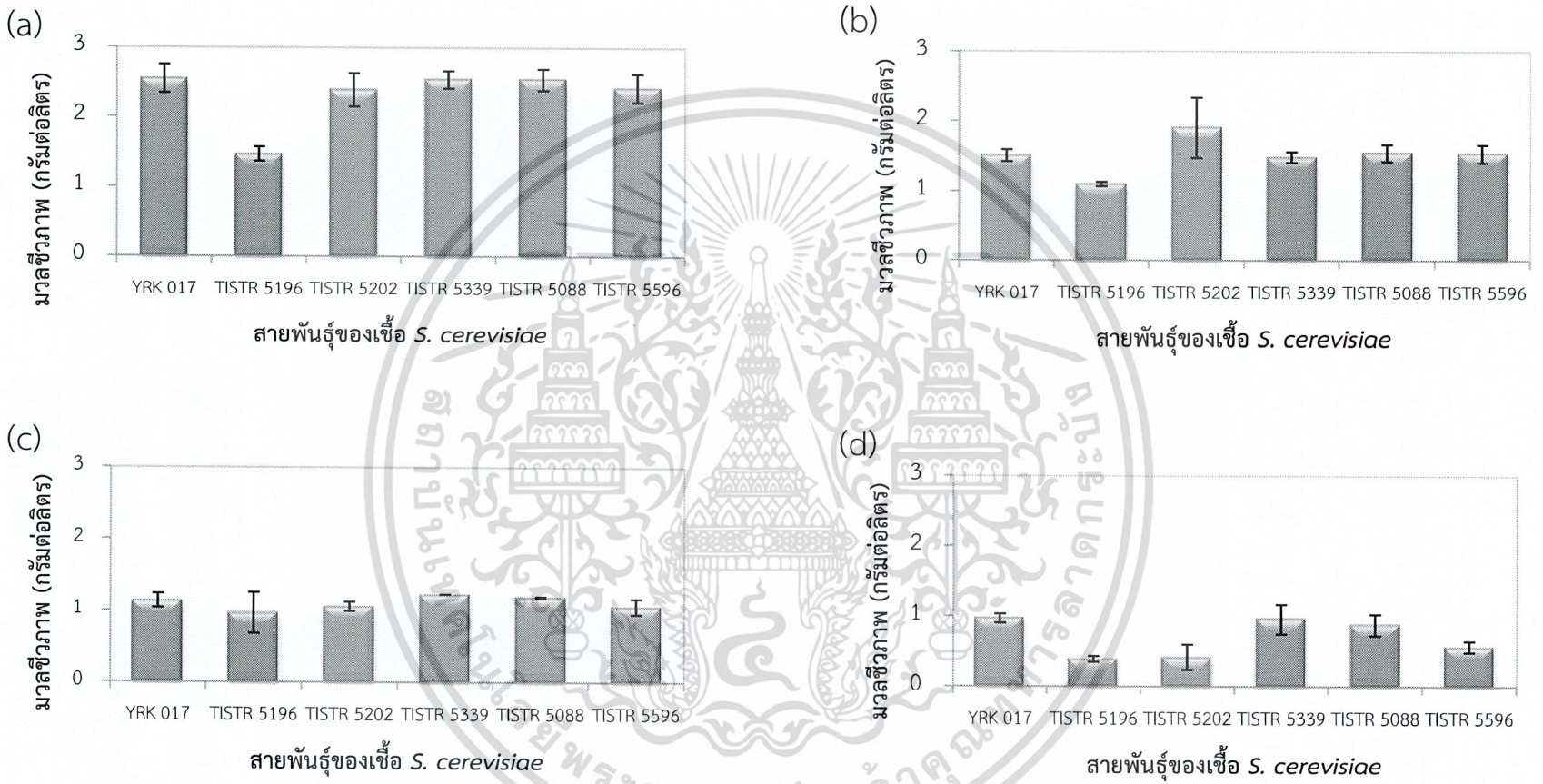
สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	มวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ			
	30 °C	37 °C	40 °C	42 °C
YRK 017	$2.55^{b} \pm 0.41$	$1.51^{ab} \pm 0.17$	$1.14^{a} \pm 0.20$	$1.06^{a} \pm 0.13$
TISTR 5196	$1.47^{c} \pm 0.20$	$1.10^{b} \pm 0.06$	$0.97^{a} \pm 0.57$	$0.42^{c} \pm 0.08$
TISTR 5202	$2.39^{b} \pm 0.48$	$2.92^{a} \pm 0.86$	$1.36^{a} \pm 0.13$	$0.39^{c} \pm 0.36$
TISTR 5339	$2.54^{b} \pm 0.25$	$1.49^{ab} \pm 0.15$	$1.23^{a} \pm 0.00$	$0.97^{ab} \pm 0.42$
TISTR **5088**	$3.54^{a} \pm 0.31$	$1.55^{ab} \pm 0.24$	$0.99^{a} \pm 0.02$	$0.87^{b} \pm 0.30$
TISTR 5596	$2.92^{ab} \pm 0.41$	$1.54^{ab} \pm 0.25$	$1.03^{a} \pm 0.22$	$0.57^{c} \pm 0.16$

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

หลังจากการปั่นเหวี่ยง นำตะกอนเซลล์วิเคราะห์หามวลชีวภาพ ส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักของอาหาร YFM นำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอานอล พบว่าภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือในอาหารหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* ทุกสายพันธุ์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะมีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 37 40 และ 42 องศาเซลเซียส โดยพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *S. cerevisiae* TISTR 5596 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมง คือ 3.32 3.82 3.50 และ 3.84 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5196 และ *S. cerevisiae* TISTR 5202 มีน้ำตาลรีดิวซ์เหลือค่อนข้างสูงคือ 23.39 และ 12.41 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2 เมื่ออุณหภูมิการหมักสูงขึ้นเป็น 37 40 และ 42 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเหลือมากขึ้น นั่นคือเชื้อ *S. cerevisiae* สามารถใช้น้ำตาลได้น้อยลงเมื่ออุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น โดยจะพบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 101.86 78.14 และ 97.71 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมง ขณะที่ *S. cerevisiae* TISTR 5196 *S. cerevisiae* TISTR 5202 และ *S. cerevisiae* TISTR 5596 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 134.86 117.36 และ 111.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเหลือในอาหารหมักค่อนข้างสูง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบมวลชีวภาพ จากการหมักเอทานอลในอาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C (a) 37 °C (b) 40 °C (c) และ 42 °C (d)

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ			
	30 °C	37 °C	40 °C	42 °C
YRK 017	$3.32^{c} \pm 0.52$	$29.79^{b} \pm 2.65$	$101.86^{bc} \pm 5.32$	$115.29^{a} \pm 8.07$
TISTR 5196	$23.39^{a} \pm 3.17$	$73.67^{a} \pm 8.10$	$134.86^{a} \pm 6.96$	$142.57^{a} \pm 9.04$
TISTR 5202	$12.41^{b} \pm 0.62$	$66.78^{a} \pm 5.28$	$117.36^{ab} \pm 21.39$	$144.79^{a} \pm 7.82$
TISTR 5339	$3.82^{c} \pm 0.72$	$29.69^{b} \pm 4.95$	$78.14^{d} \pm 4.95$	$114.29^{a} \pm 1.31$
TISTR 5088	$3.50^{c} \pm 0.79$	$31.29^{b} \pm 2.12$	$97.71^{c} \pm 3.13$	$116.21^{a} \pm 7.99$
TISTR 5596	$3.84^{c} \pm 0.55$	$37.76^{b} \pm 2.51$	$111.19^{bc} \pm 5.73$	$141.64^{a} \pm 21.77$

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

สำหรับปริมาณเอทานอล พบว่าภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อ *S. cerevisiae* ทุกสายพันธุ์ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดโดยเฉพาะเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 30.21 และ 30.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่ออุณหภูมิในการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณเอทานอลที่ได้จะลดลงทุกสายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 4.4 โดยเฉพาะที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง แสดงดังรูปที่ 4.2

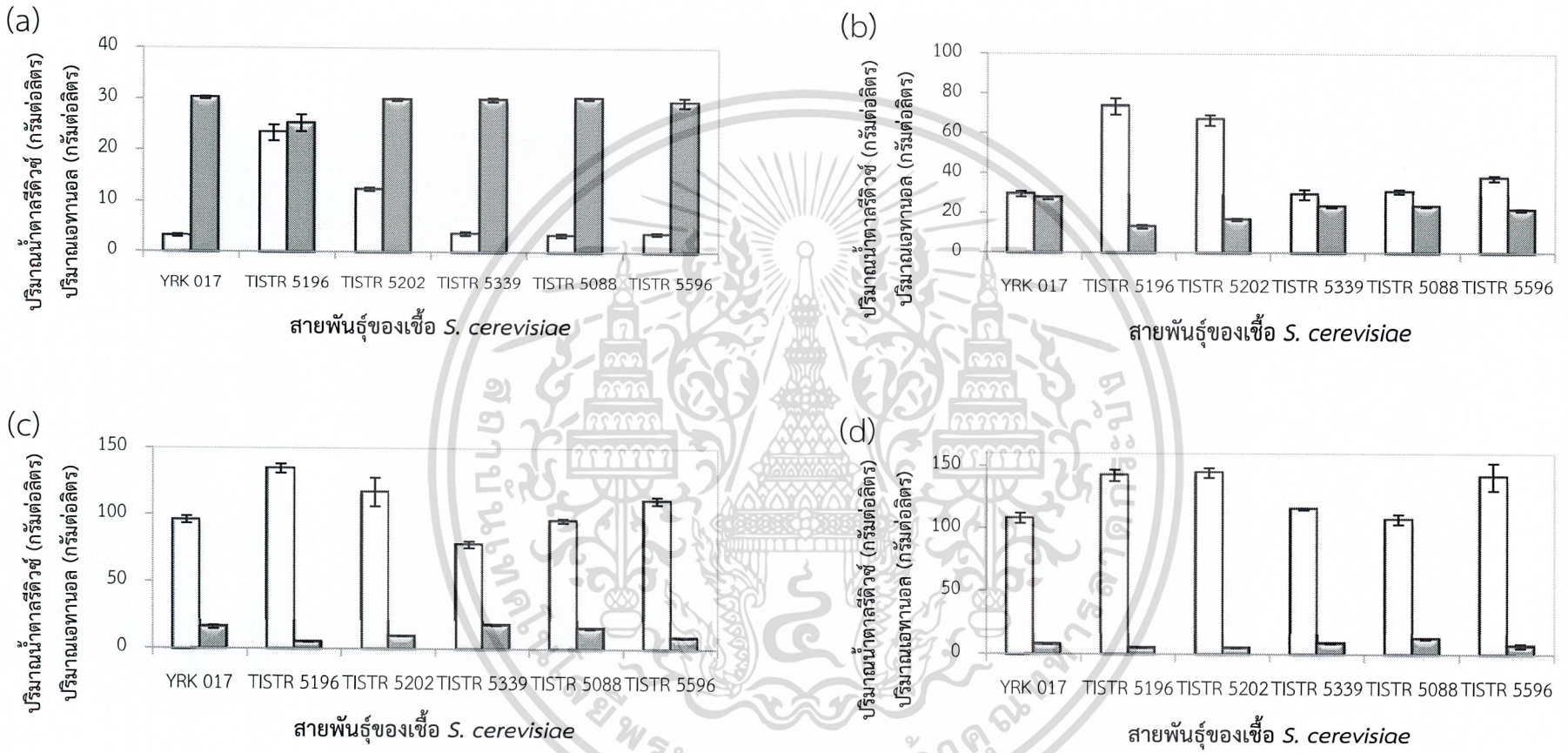
ตารางที่ 4.4 แสดงค่าปริมาณเอทานอล หลังการหมัก 48 ชั่วโมง ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิต่างๆ

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ที่อุณหภูมิต่างๆ			
	30 °C	37 °C	40 °C	42 °C
YRK 017	$30.21^{a} \pm 0.47$	$27.78^{a} \pm 1.58$	$15.92^{ab} \pm 2.69$	$8.13^{a} \pm 0.25$
TISTR 5196	$25.30^{b} \pm 3.30$	$13.43^{d} \pm 1.55$	$5.05^{d} \pm 0.12$	$4.91^{b} \pm 0.01$
TISTR 5202	$29.93^{a} \pm 0.44$	$16.86^{c} \pm 1.08$	$9.48^{c} \pm 0.25$	$4.93^{b} \pm 0.01$
TISTR 5339	$29.92^{a} \pm 0.73$	$23.37^{b} \pm 0.61$	$17.60^{a} \pm 0.26$	$8.76^{a} \pm 0.39$
TISTR 5088	$30.19^{a} \pm 0.44$	$23.50^{b} \pm 0.55$	$14.99^{b} \pm 0.22$	$8.59^{a} \pm 0.39$
TISTR 5596	$29.44^{a} \pm 1.82$	$21.84^{b} \pm 1.26$	$8.50^{c} \pm 0.10$	$6.78^{ab} \pm 3.30$

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

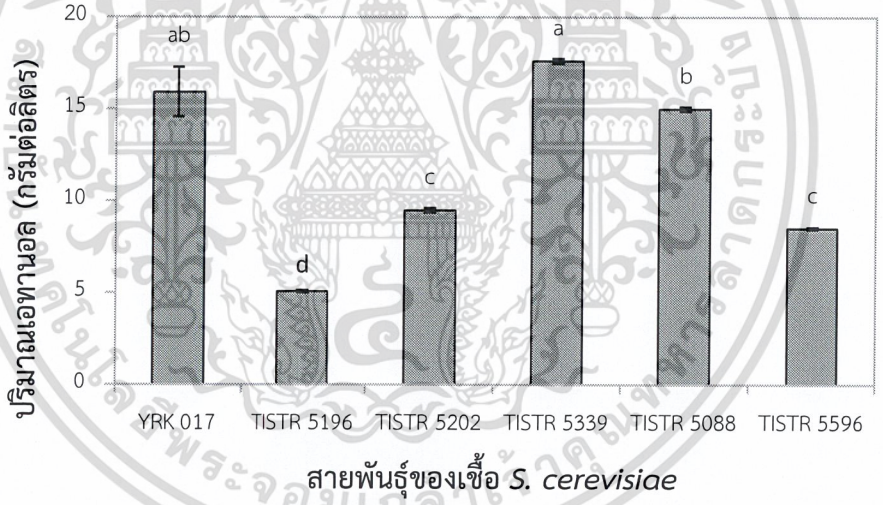
- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



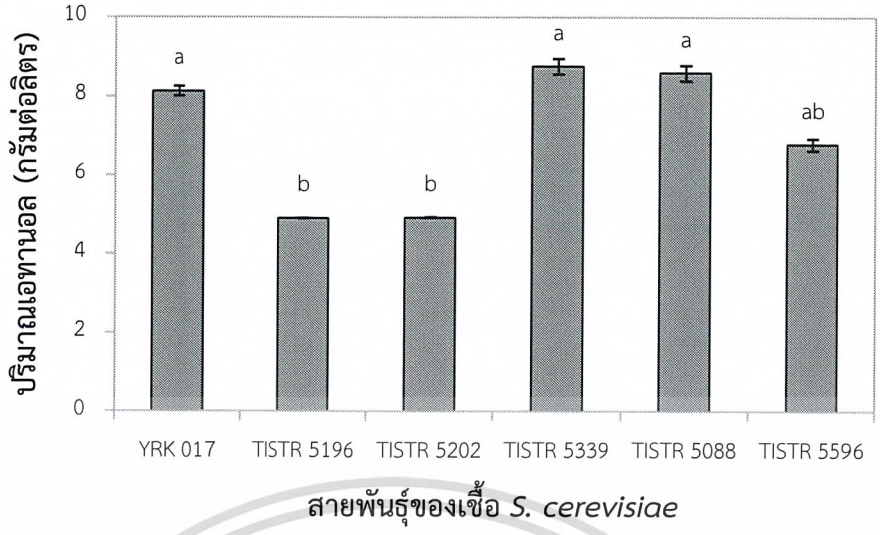
รูปที่ 4.2 แสดงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์(□) และปริมาณเอทานอล(■) (กรัมต่อลิตร) จากการหมักเอทานอลในอาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 ℃ (a) 37 ℃ (b) 40 ℃ (c) และ 42 ℃ (d)

เมื่อพิจารณาเอทานอลในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด ของเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 40 และ 42 องศาเซลเซียส นำปริมาณเอทานอลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ 17.60 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับสายพันธุ์ YRK 017 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 15.92 กรัมต่อลิตร สำหรับสายพันธุ์ TISTR 5088 ปริมาณเอทานอลที่ได้มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ TISTR 5339 แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ YRK 017 ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้คือ 14.99 กรัมต่อลิตร และสำหรับ TISTR 5202 TISTR 5596 และ TISTR 5196 ให้ปริมาณเอทานอล 9.48 8.50 และ 5.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณเอทานอลจาก 3 สายพันธุ์นี้มีความแตกต่างกันทางสถิติกับสายพันธุ์ TISTR 5339 YRK 017 และ TISTR 5088 เมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 สำหรับที่อุณหภูมิสูง 42 องศาเซลเซียส เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ปริมาณเอทานอลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติเมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสายพันธุ์ TISTR 5196 และ TISTR 5202 ดังแสดงในรูปที่ 4.4



รูปที่ 4.3 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 แสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตจากเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 42 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

ดังนั้นจากการศึกษาการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ที่อุณหภูมิสูงแสดงให้เห็นว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่สามารถเจริญและให้ผลผลิตเอทานอล ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูง 40 และ 42 องศาเซลเซียส คือ *S. cerevisiae* TISTR 5339 รองลงมาคือ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ตามลำดับ

Sree และคณะ (2000) ศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* VS1 VS2 VS3 และ VS4 ที่อุณหภูมิ 30 35 40 42 และ 44 องศาเซลเซียส ซึ่งยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์ มีปริมาณมวลชีวภาพที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียสสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น คือมีมวลชีวภาพ 3.0 2.5 3.2 และ 2.6 กรัมต่อลิตร เท่ากันทั้ง 2 อุณหภูมิ และ มีมวลเซลล์ต่ำสุดที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสของ VS1 VS2 VS3 และ VS4 คือ 0.8 0.4 0.9 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการผลิตเอทานอลก็เป็นไปในทางเดียวกัน คือ ผลิตได้สูงสุดที่ 30 องศาเซลเซียส คือ 66 48 75 และ 52 กรัมต่อลิตร และ ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสผลิตได้เพียง 40 20 58 และ 23 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร

มีการศึกษาจำนวนมากโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ยีสต์ *S. cerevisiae* ให้สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง ตัวอย่างเช่น D'Amore และคณะ(1989) ใช้สายพันธุ์ทนร้อนของเชื้อที่สามารถหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 6.2 จากกลูโคสร้อยละ 15 แต่อย่างไรก็ตามหลังจาก 24 ชั่วโมงการมีชีวิตของสายพันธุ์นี้ลดลงอย่างเห็นได้ชัดถึงร้อยละ 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาการทนทานต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 6 สายพันธุ์

จากการศึกษาการทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ โดยการเตรียมอาหารเหลว YPD ลงในหลอดทดลอง ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเอทานอลให้มีความเข้มข้นต่างๆดังนี้ร้อยละ 0 5 10 15 18 และ 20 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ลงในอาหารเหลว YPD จากนั้นเติมหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้นปริมาตรร้อยละ 10 (ปริมาตรโดยปริมาตร) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจนับเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต โดยนำมาทำการเจือจาง (serial dilution) ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-8} นำมาทำการ pour plate ลงบนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับโคโลนีและคำนวณในรูป CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ทั้ง 6 สายพันธุ์ลดลงเมื่อร้อยละความเข้มข้นเอทานอลเพิ่มมากขึ้น โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5196 สามารถทนเอทานอลได้เพียงร้อยละ 10 สำหรับ *S. cerevisiae* TISTR 5202 ทนต่อความเข้มข้นเอทานอลได้ถึงร้อยละ 18 และเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 สามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 15 จนถึงร้อยละ 20 แสดงดังตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 แสดงปริมาณของเชื้อ *S. cerevisiae* 6 สายพันธุ์ ที่รอดชีวิตบนอาหารแข็ง YPD ที่เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณจุลินทรีย์ที่รอดชีวิต(CFU/ml) ที่เอทานอลความเข้มข้นต่างๆ					
	0%	5%	10%	15%	18%	20%
YRK 017	2.40×10^{7}	1.97×10^{7}	2.35×10^{6}	3.83×10^{5}	6.40×10^{4}	7.20×10^{3}
TISTR 5196	4.90×10^{6}	4.70×10^{6}	7.13×10^{5}	-	-	-
TISTR 5202	1.09×10^{7}	5.13×10^{6}	2.08×10^{6}	1.68×10^{5}	4.20×10^{2}	-
TISTR 5339	2.69×10^{7}	2.09×10^{7}	6.90×10^{6}	1.69×10^{5}	1.26×10^{4}	3.05×10^{2}
TISTR 5088	2.49×10^{7}	2.26×10^{7}	4.13×10^{6}	4.60×10^{5}	1.73×10^{5}	3.06×10^{3}
TISTR 5596	1.95×10^{7}	1.75×10^{7}	1.07×10^{7}	1.92×10^{5}	3.90×10^{4}	5.15×10^{2}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาการทนต่ออุณหภูมิสูง และทนเอทานอลความเข้มข้นสูงของยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆพบว่า *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เป็นสายพันธุ์ที่ทนต่ออุณหภูมิในการหมักได้สูง คือสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสหรือสูงกว่า และ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์นี้ยังสามารถทนต่อเอทานอลความเข้มสูงกว่าร้อยละ 15 ได้อีกด้วย ดังนั้นจึงทำการคัดเลือก *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์นี้ไปทำการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศต่อไป

Kumar และคณะ (2011) ศึกษาความทนต่อเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* โดยนำเชื้อยีสต์มาเลี้ยงบนอาหารเอียง YPG บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อยีสต์จากอาหารเอียงมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPG ที่มีความเข้มข้นของเอทานอลแตกต่างกันดังนี้ร้อยละ 0 2.5 5 7.5 10 12.5 และ 15 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากบ่มทำการเจือจางเชื้อ และเลี้ยงในอาหารแข็ง YPG บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง คำนวณโคโลนีเป็น CFU/ml จากการทดลองจำนวนเชื้อยีสต์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น ซึ่งเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถทนความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ถึงร้อยละ 15 สอดคล้องกับการทดลองที่ได้ซึ่งจากการทดลองที่ไม่เติมเอทานอลปริมาณจุลินทรีย์ทรีย์ที่รอดชีวิตมี 4.5×10^{8} CFU/ml และที่ความเข้มข้นเอทานอล ร้อยละ 15 ปริมาณจุลินทรีย์ทรีย์ที่รอดชีวิตมี 6.0×10^{6} CFU/ml

Khaing และคณะ (2008) รายงานว่า เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ KY1 และ KY3 ทนความเข้มข้นเอทานอลได้ถึงร้อยละ 15 และเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ KY2 ทนความเข้มข้นเอทานอลได้ถึงร้อยละ 20

4.3 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก

4.3.1 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF)

จากการใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) มาศึกษาเปรียบเทียบการหมักเอทานอลระหว่างกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก(SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่ได้จากการคัดเลือกในขั้นต้น โดยการชั่งผงมันเทศแห้งปริมาณ 48 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 600 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90 – 100 องศาเซลเซียส จนได้สารละลายผงมันเทศที่ข้นหนืดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในกระบวนการหมักแบบย่อยแยกกับการหมัก ทำโดยนำสารละลายผงมันเทศมาย่อยด้วยเอนไซน์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วย่อยด้วยเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธีดีเอ็นเอส (DNS method) จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 - 10 นาที นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น จากการทดลองพบว่าการหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 48 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 9.34 10.37 และ 9.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก ที่ 48 ชั่วโมงของระยะเวลาการหมักโดย *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1.44 1.45 และ 1.50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่า *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5

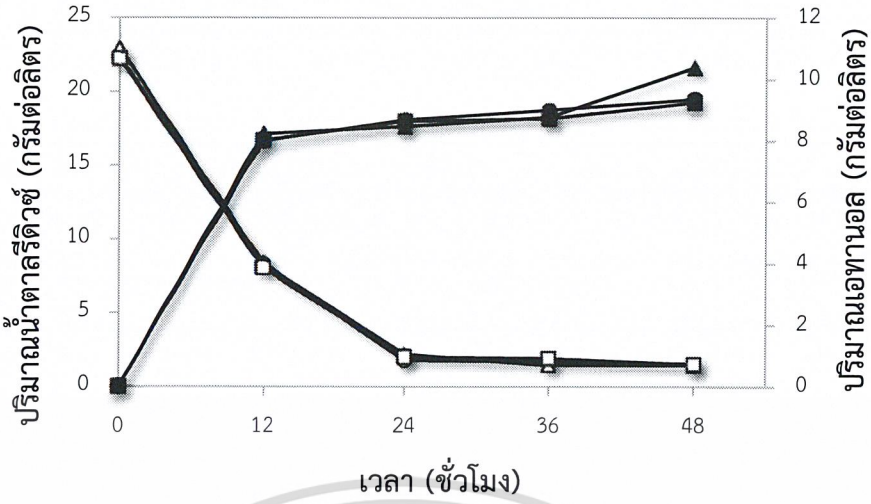
ตารางที่ 4.6 แสดงปริมาณเอทนอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่คัดเลือก

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	YRK 017	TISTR 5339	TISTR 5088	YRK 017	TISTR 5339	TISTR 5088
0	$0.00^{e} \pm 0.00$	$0.00^{c} \pm 0.00$	$0.00^{d} \pm 0.00$	$22.26^{a} \pm 1.00$	$22.91^{a} \pm 0.88$	$22.22^{a} \pm 0.55$
12	$7.98^{d} \pm 0.04$	$8.22^{b} \pm 1.41$	$8.01^{c} \pm 0.22$	$8.34^{b} \pm 0.55$	$8.37^{b} \pm 2.63$	$8.07^{b} \pm 0.19$
24	$8.68^{c} \pm 0.18$	$8.48^{b} \pm 0.34$	$8.63^{b} \pm 0.04$	$1.81^{c} \pm 0.16$	$2.17^{c} \pm 0.25$	$2.03^{c} \pm 0.28$
36	$8.99^{b} \pm 0.10$	$8.77^{b} \pm 0.42$	$8.72^{b} \pm 0.14$	$1.73^{c} \pm 0.06$	$1.50^{c} \pm 0.31$	$1.87^{c} \pm 0.13$
48	$9.34^{a} \pm 0.27$	$10.37^{a} \pm 0.41$	$9.24^{a} \pm 0.23$	$1.44^{c} \pm 0.08$	$1.45^{c} \pm 0.28$	$1.50^{c} \pm 0.08$

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

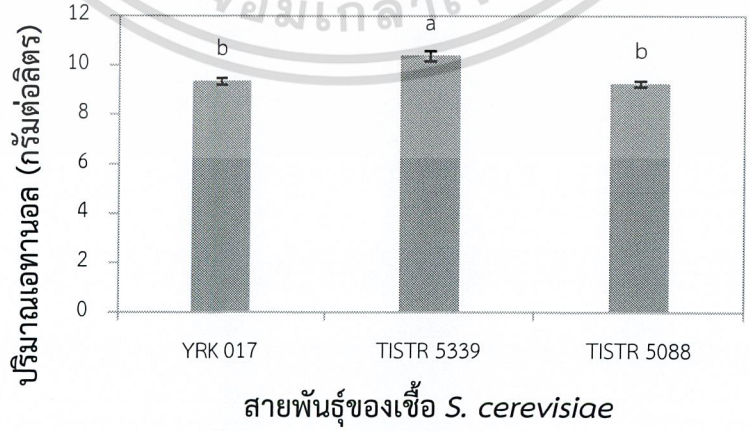
- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 แสดงการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ด้วยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017(○,●) TISTR 5339(△, ▲) และ TISTR 5088 (□, ■) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้สัญลักษณ์สีขาวแทนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และสัญลักษณ์สีดำแทนปริมาณเอทานอล

เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมักในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด นำปริมาณเอทานอลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 10.37 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติกับ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 9.34 และ 9.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสำหรับ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาณเอทานอลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อวิเคราะห์ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้เป็น 0.45 0.48 และ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.7

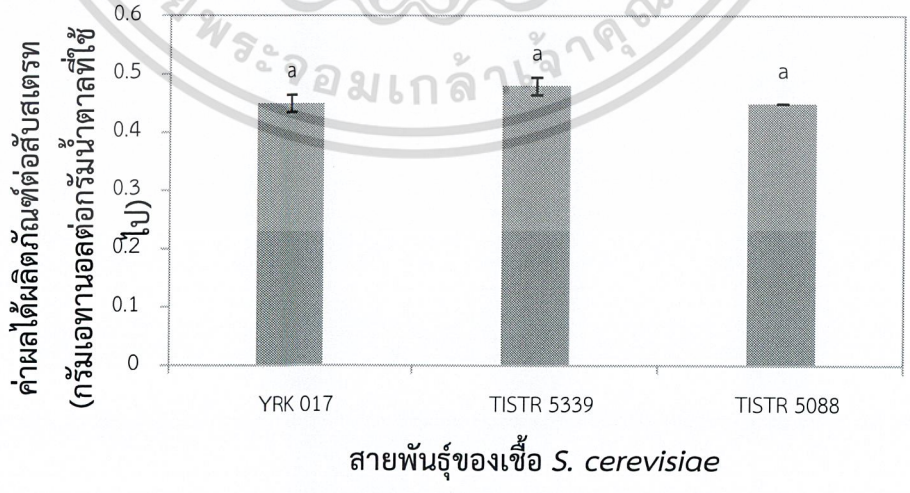
ตารางที่ 4.7 แสดงค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ ที่ได้คัดเลือกที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง		
	ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล)
YRK 017	20.82[a]	9.34[b]	0.45[a]
TISTR 5339	21.46[a]	10.37[a]	0.48[a]
TISTR 5088	20.72[a]	9.24[b]	0.45[a]

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อนำค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังรูปที่ 4.7



รูปที่ 4.7 แสดงค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ ที่ได้คัดเลือกที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก(SSF)

ในกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก ทำโดยนำสารละลายผงมันเทศมาย่อยด้วยเอนไซน์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธีดีเอ็นเอส นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น จากการทดลองพบว่าการหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 48 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 11.59 12.03 และ 11.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก ที่ 48 ชั่วโมงของระยะเวลาการหมักพบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 3.92 4.09 และ 4.68 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 และ TISTR 5088 แสดงดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.8

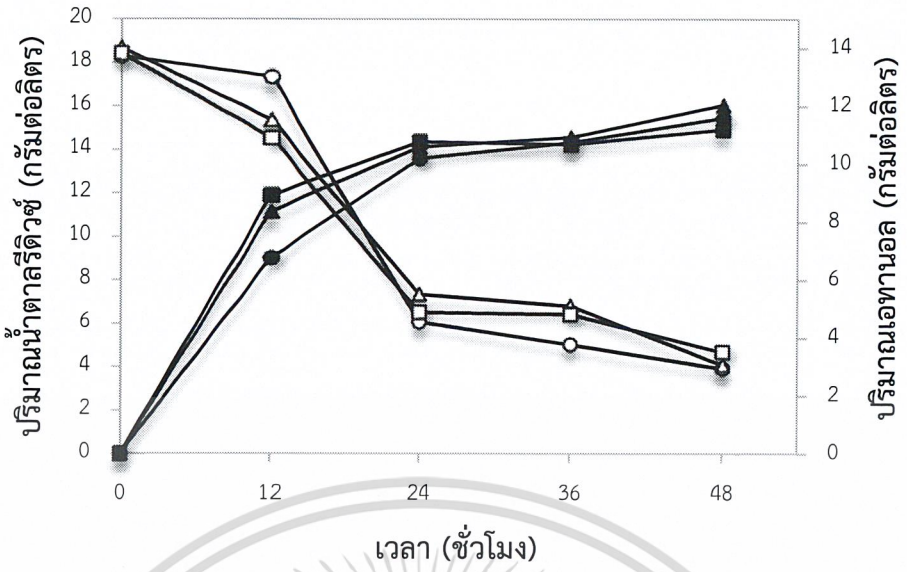
ตารางที่ 4.8 แสดงปริมาณเอทนอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	YRK 017	TISTR 5339	TISTR 5088	YRK 017	TISTR 5339	TISTR 5088
0	$0.00^{e} \pm 0.00$	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.00^{b} \pm 0.00$	$16.03^{a} \pm 0.41$	$16.54^{a} \pm 0.34$	$16.34^{a} \pm 0.98$
12	$6.76^{c} \pm 0.92$	$8.38^{c} \pm 0.70$	$8.92^{a} \pm 2.70$	$13.77^{b} \pm 1.00$	$13.37^{b} \pm 0.33$	$13.97^{b} \pm 0.28$
24	$10.20^{b} \pm 0.20$	$10.59^{b} \pm 1.01$	$10.78^{a} \pm 0.79$	$6.07^{c} \pm 0.62$	$7.35^{c} \pm 0.56$	$7.24^{c} \pm 0.92$
36	$10.75^{ab} \pm 0.18$	$10.92^{b} \pm 0.16$	$10.68^{a} \pm 0.07$	$5.04^{c} \pm 0.32$	$5.81^{d} \pm 0.44$	$6.42^{c} \pm 0.37$
48	$11.59^{a} \pm 0.44$	$12.03^{a} \pm 0.21$	$11.19^{a} \pm 0.15$	$3.92^{d} \pm 0.40$	$4.09^{e} \pm 0.19$	$4.68^{d} \pm 0.18$

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

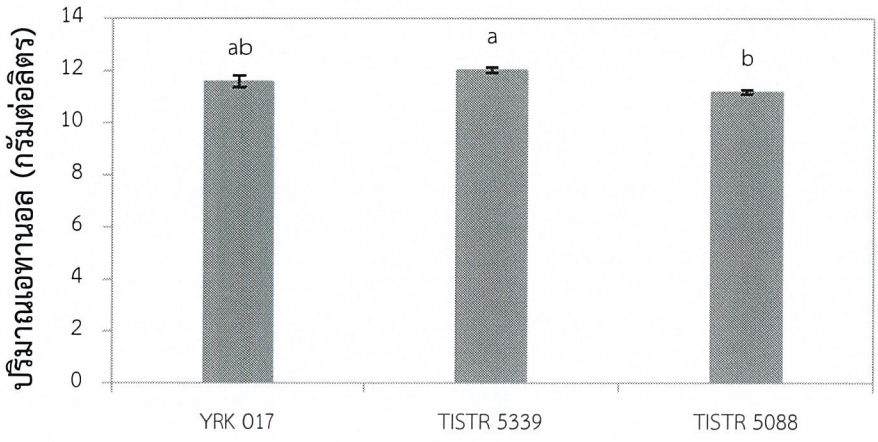
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.8 แสดงการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก (SSF) โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (○, ●) TISTR 5339(△, ▲) และ TISTR 5088 (□, ■) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้สัญลักษณ์สีขาวแทนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ สัญลักษณ์สีดำแทนปริมาณเอทานอล

เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด นำปริมาณเอทานอลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 12.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ *S. cerevisiae* YRK 017 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 11.59 กรัมต่อลิตร สำหรับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอลต่ำสุดคือ 11.19 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณเอทานอลที่ได้จาก *S. cerevisiae* TISTR 5339 แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับ *S. cerevisiae* YRK 017 เมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมัก ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก

เมื่อวิเคราะห์ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 มีค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้เป็น 0.96 0.97 และ 0.97 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ ที่ได้คัดเลือกที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง

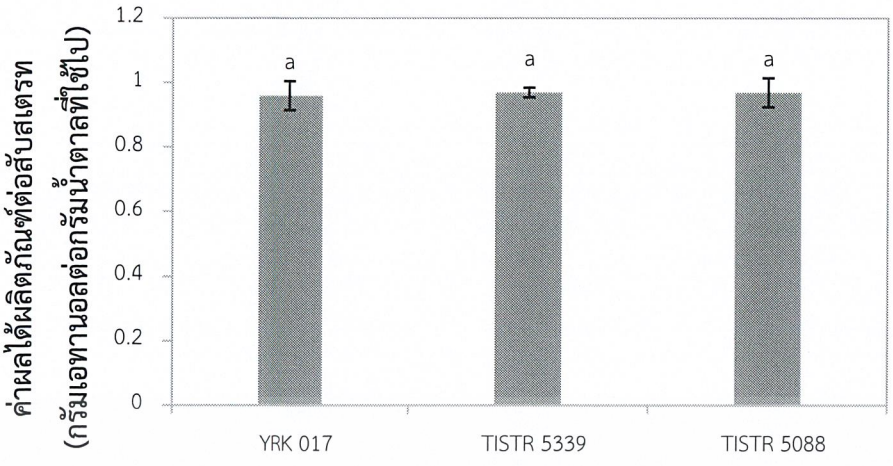
สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง		
	ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล)
YRK 017	12.10^{a}	11.59^{ab}	0.96^{a}
TISTR 5339	12.45^{a}	12.03^{a}	0.97^{a}
TISTR 5088	11.66^{a}	11.19^{b}	0.97^{a}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อนำค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังรูปที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 แสดงค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ ที่ได้คัดเลือกที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง

ดังนั้นในการทดลองกระบวนการหมักเอทานอลแบบการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก ของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ ถึงแม้ว่าค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก ที่ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเช่นกัน

4.3.3 ผลการศึกษาการเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลจากกระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

จากการนำปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดของกระบวนการหมักทั้งสองกระบวนการ คือ กระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก และกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาเปรียบเทียบแล้ววิเคราะห์ผลทางสถิติ พบว่าการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกในกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่ากระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมัก ซึ่งในกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมการหมักสายพันธุ์ที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอล 12.03 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอล 11.59 และ 11.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากการหมัก สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอล 10.37 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอล 9.34 และ 9.24 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.11

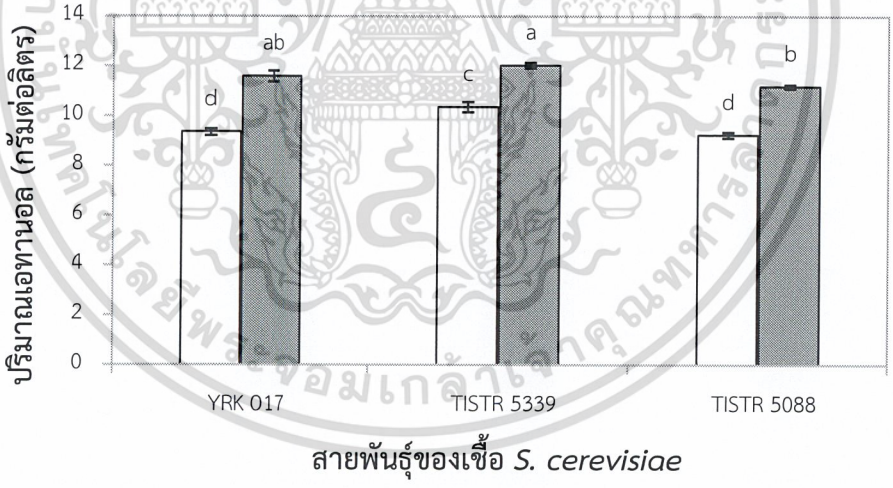
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 แสดงปริมาณเอทานอลและค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมักเปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักที่ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือก

ชนิดของกระบวนการหมัก	สายพันธุ์ ของ *S. cerevisiae*	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล)
กระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF)	YRK 017	9.34^{d}	0.45^{b}
	TISTR 5339	10.37^{c}	0.48^{b}
	TISTR 5088	9.24^{d}	0.45^{b}
กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF)	YRK 017	11.59^{ab}	0.96^{a}
	TISTR 5339	12.04^{a}	0.97^{a}
	TISTR 5088	11.19^{b}	0.97^{a}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

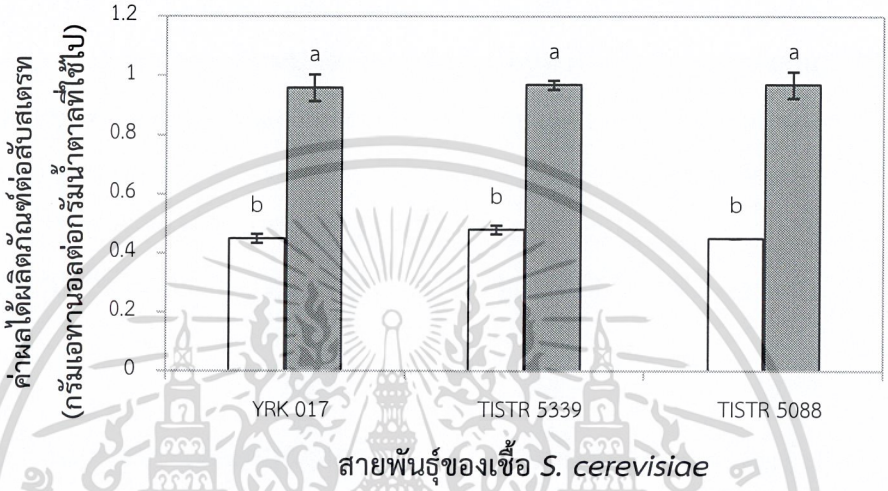
- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.11 แสดงปริมาณเอทานอล ที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (☐) เปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (■) ที่ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปจากกระบวนการหมักทั้งสองกระบวนการโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีความสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ นั่นคือ การหมักเอทานอลโดยใช้กระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักจะให้ค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงกว่าค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 แสดงค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก(☐) เปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก(▩) ที่ชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088

จากการทดลองเห็นได้ว่าการหมักเอทานอลจากสารละลายผงมันเทศ โดยใช้กระบวนการย่อยแยกกับการหมักเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบการย่อยพร้อมกับการหมักโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก คือ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์ในการหมักเอทานอลด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่ากระบวนการย่อยแยกกับการหมัก ซึ่งมีความสอดคล้องกับค่าผลได้ของเอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป และในการหมักเอทานอลด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมัก สายพันธุ์ที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดคือ *S. cerevisiae* TISTR 5339

การศึกษาของจิรศักดิ์ คงเกียรติขจร (2554) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) จากใบมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5048 *S. cerevisiae* KM 1195 *S. cerevisiae* KM 7253 และเชื้อยีสต์ผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5048 และ *Candida tropicalis* TISTR 5045 พบว่ากระบวนการ SSF ใช้ระยะเวลาในการหมักน้อยกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการ SHF และมีผลผลิตของเอทานอลสูงสุดของกระบวนการ SSF และ SHF เป็นร้อยละ 0.36 และ 0.35 กรัม ตามลำดับ

Ohgrenและ คณะ (2007) ศึกษาการเปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) และกระบวนการ Separate Hydrolysis and Fermentation (SHF) โดยใช้ซังข้าวโพดที่ผ่านการแยกด้วยไอน้ำ พบว่าการใช้ปริมาณของแข็งที่ไม่ละลายน้ำร้อยละ 8 จะทำให้การผลิตเอทานอลลดลง ในการทดลองนี้มีการใช้เอนไซม์ 10 FPU ต่อกรัมของปริมาณของแข็ง และใช้ความเข้มข้นของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* กระบวนการ SSF 1 กรัมต่อลิตร นำสารละลายทั้งหมดจากการพรีทรีตเมนต์ มาใช้ในการทดลองและทำการเจือจางให้ได้ร้อยละ 8 ของปริมาณของแข็ง โดยใช้น้ำ พบว่ากระบวนการ SSF จะให้ผลผลิตของเอทานอลสูงกว่ากระบวนการหมักแบบ SHF ร้อยละ 13 โดยกระบวนการ SSF มีผลผลิตของเอทานอลร้อยละ 72.4 ขณะที่กระบวนการหมักแบบ SHF มีผลผลิตของเอทานอลร้อยละ 59.1 ของทฤษฎี มีสารประกอบบางชนิดที่เกิดขึ้นจากกระบวนการพรีทรีตเมนต์มีผลไปยับยั้งการผลิตเอทานอลในกระบวนการ SSF และ SHF ที่แตกต่างกัน

4.4 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

การศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ ที่อุณหภูมิสูง โดยใช้กระบวนการหมักเอทานอลแบบการย่อยพร้อมกับการหมัก (SSF) จากเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกจากการทดลองคือ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ทำโดยนำสารละลายผงมันเทศมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธีดีเอ็นเอส นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น จากการทดลองพบว่าการหมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง โดยเชื้อ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาในการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 48 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 8.28 8.80 และ 8.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก ที่ 48 ชั่วโมงของระยะเวลาการหมักโดย *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 5.73 5.55 และ 4.58 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่า *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ดังแสดงตารางที่ 4.11

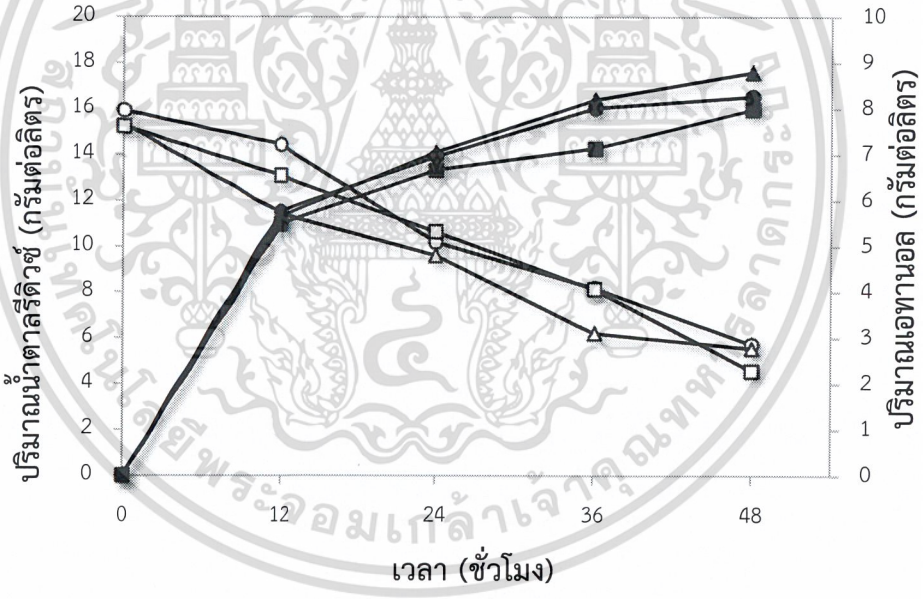
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	YRK 017	TISTR 5339	TISTR 5088	YRK 017	TISTR 5339	TISTR 5088
0	$0.00^{d} \pm 0.00$	$0.00^{e} \pm 0.00$	$0.00^{e} \pm 0.00$	$15.92^{a} \pm 0.52$	$15.36^{a} \pm 0.17$	$14.66^{a} \pm 0.17$
12	$5.77^{c} \pm 0.43$	$5.64^{d} \pm 0.17$	$5.49^{d} \pm 0.45$	$14.45^{a} \pm 1.30$	$11.47^{b} \pm 0.50$	$13.10^{b} \pm 1.46$
24	$6.97^{b} \pm 0.21$	$7.06^{c} \pm 0.15$	$6.67^{c} \pm 0.15$	$10.20^{b} \pm 2.57$	$9.63^{c} \pm 0.69$	$10.63^{c} \pm 0.75$
36	$8.02^{a} \pm 0.27$	$8.20^{b} \pm 0.26$	$7.14^{b} \pm 0.45$	$8.20^{bc} \pm 1.26$	$6.22^{d} \pm 0.51$	$8.15^{d} \pm 0.73$
48	$8.28^{a} \pm 0.12$	$8.80^{a} \pm 0.16$	$8.00^{a} \pm 0.16$	$5.73^{c} \pm 0.08$	$5.55^{d} \pm 0.16$	$4.58^{e} \pm 0.55$

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

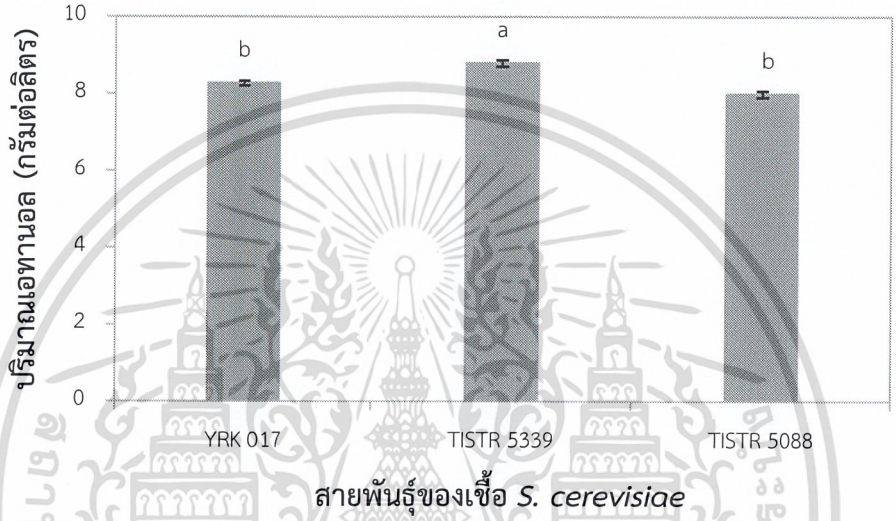
- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.13 แสดงการหมักเอทานอลโดยใช้สารละลายผงมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก (SSF) โดยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 (○ , ●) TISTR 5339 (△ ,▲) และ TISTR 5088 (□ ,■) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยให้สัญลักษณ์สีขาวแทนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และ สัญลักษณ์สีดำแทนปริมาณเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด นำปริมาณเอทานอลมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 8.80 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติกับ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 8.28 และ 8.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสำหรับ *S. cerevisiae* YRK 017 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาณเอทานอลที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อทำการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังแสดงในรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 แสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก

เมื่อวิเคราะห์ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 มีค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้เป็น 0.81 0.90 และ 0.79 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

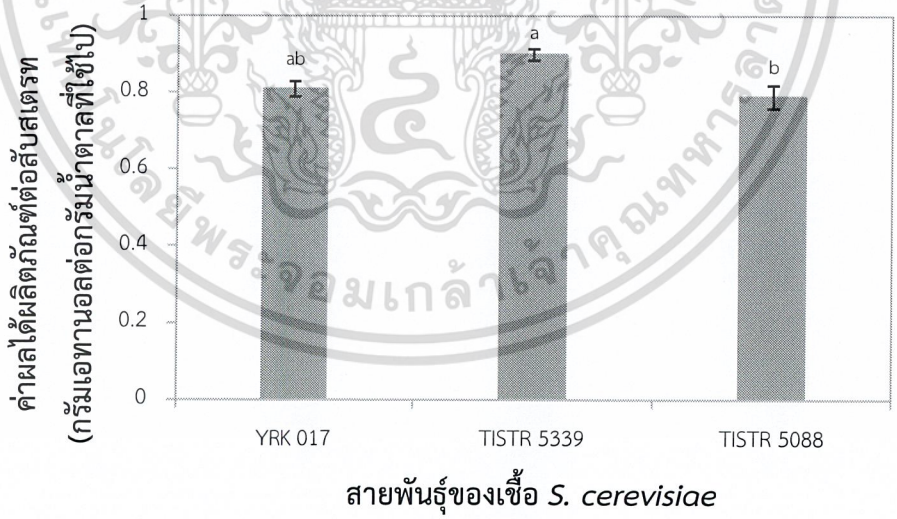
ตารางที่ 4.12 แสดงค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ ที่ได้คัดเลือกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง

สายพันธุ์ของ *S. cerevisiae*	ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง		
	ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น (กรัมต่อลิตร)	ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล)
YRK 017	10.19^{a}	8.28^{b}	0.81^{ab}
TISTR 5339	9.81^{a}	8.80^{a}	0.90^{a}
TISTR 5088	10.08^{a}	8.00^{b}	0.79^{b}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อนำค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) มาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ YRK 017 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติแต่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังรูปที่ 4.15



รูปที่ 4.15 แสดงค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ ที่ได้คัดเลือกที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นในการทดลองกระบวนการหมักเอทานอลแบบการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก ของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงสุดคือ *S. cerevisiae* TISTR 5339 ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่ได้มีปริมาณสูงสุดเช่นกัน

Chutima (2005) ศึกษาการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง โดยนำยีสต์ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเจริญทั้งอุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส มาทดสอบการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยที่เตรียมให้มีน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ แอมโมเนียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซ็นต์ และปรับพีเอชอาหารเท่ากับ 4.5 ปริมาตรของอาหารที่ใช้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร บรรจุอยู่ในฟลาส์กขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่าแบบหมุนด้วยความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามียีสต์เพียง 6 สายพันธุ์ที่หมักเอทานอลได้สูงทั้ง 2 อุณหภูมิ ได้แก่สายพันธุ์ DMKU 3-1042 DMKU 3-306 DMKU 3-118 DMKU 3-p1042 DMK 3-p106 และ *S. cerevisiae* Sc90

4.5 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลในอาหารหมักที่มีเอทานอลเป็นองค์ประกอบโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

การศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศมีการเติมเอทานอลในอาหารหมักโดยกระบวนการหมักเอทานอลวิธีการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก (SSF) จากเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกจากการทดลองคือ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ทำโดยนำสารละลายผงมันเทศมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธีดีเอ็นเอส นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆร้อยละ 10 โดยปริมาตร จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 15 (ปริมาตรโดยปริมาตร) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น จากการทดลองพบว่าการหมักเอทานอลจากสารละลายผงมันเทศที่มีเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 (ปริมาตรโดยปริมาตร) โดยกระบวนการหมักแบบการย่อยพร้อมกับการหมัก เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ทำการศึกษาให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลง ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.13 นั่นแสดงว่าเชื้อ *S. cerevisiae* ไม่สามารถใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ ในสภาวะที่มีเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 (ปริมาตรโดยปริมาตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.13 แสดงปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักที่เติมเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)		
	YRK 017	TISTR 5339	TISTR 5088	YRK 017	TISTR 5339	TISTR 5088
0	55.94^{a} ± 1.55	55.30^{a} ± 0.59	54.54^{a} ± 0.78	16.77^{c} ± 1.06	16.45^{c} ±1.31	15.95^{d} ± 0.95
12	54.74^{a} ± 1.22	50.98^{ab} ±3.25	52.26^{b} ± 0.61	26.16^{b} ±0.59	25.32^{b} ±0.81	23.30^{c} ± 0.99
24	50.19^{b} ±0.61	49.48^{ab} ±4.27	48.61^{a} ± 0.47	32.93^{a} ± 0.72	32.08^{a} ±1.84	31.19^{b} ± 1.50
36	49.73^{b} ±1.19	48.89^{ab} ±4.66	48.50^{a} ± 0.41	32.89^{a} ± 0.74	32.78^{a} ±0.58	33.16^{a} ± 0.60
48	49.12^{b} ±0.71	48.41^{b} ±2.95	48.09^{a} ± 1.91	34.04^{a} ± 0.74	33.13^{a} ±1.11	33.82^{a} ± 1.08

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาในแถวแนวตั้ง

- ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
- ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.6 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลในอาหารหมักที่มีเอทานอลเป็นองค์ประกอบหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

การศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศมีการเติมเอทานอลลงในอาหารหมักโดยใช้กระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก จากเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกคือ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ทำโดยนำสารละลายผงมันเทศมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยใช้วิธีดีเอ็นเอส นำสารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยมาเติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสเข้มข้นร้อยละ 0.015 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร แล้วนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ต่างๆร้อยละ 10 โดยปริมาตร จากนั้นเติมเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 15 (ปริมาตรโดยปริมาตร) นำไปเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากการทดลอง พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่ทำการศึกษาให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลง ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 4.14 นั่นแสดงว่าเชื้อ *S. cerevisiae* ไม่สามารถใช้น้ำตาลเพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส และมีเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 (ปริมาตรโดยปริมาตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 6 สายพันธุ์ คือ YRK 017 TISTR 5196 TISTR 5202 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง เมื่อทำการศึกษาที่อุณหภูมิต่างๆ โดยใช้อาหาร YFM ที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร พบว่าภายหลังการหมัก 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อ *S. cerevisiae* ทุกสายพันธุ์ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด เมื่ออุณหภูมิในการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณที่เอทานอลที่ได้จะลดลงทุกสายพันธุ์ ที่อุณหภูมิสูง 40 องศาเซลเซียส พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 17.60 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ *S. cerevisiae* YRK 017 และ TISTR 5088 ตามลำดับ เช่นเดียวกับที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 8.76 กรัมต่อลิตร จากนั้นได้ทำการศึกษาการทนต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* ทั้ง 6 สายพันธุ์ โดยศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อที่ความเข้มข้นเอทานอลต่างๆ พบว่า *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 TISTR 5088 และ TISTR 5596 สามารถทนเอทานอลได้ถึงร้อยละ 20 ปริมาตรโดยปริมาตร ดังนั้นจากการคัดเลือก *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ทนต่ออุณหภูมิ และเอทานอลสูง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาทำการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศคือ *S. cerevisiae* YRK 017 *S. cerevisiae* TISTR 5339 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 โดยนำมาทำการหมักเอทานอลจากสารละลายผงมันเทศที่ความเข้มข้นร้อยละ 8 น้ำหนักโดยปริมาตร เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลแบบย่อยแยกจากการหมักกับกระบวนการหมักเอทานอลแบบย่อยพร้อมการหมัก หมักเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การหมักเอทานอลด้วยกระบวนการย่อยแยกจากการหมัก *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ 10.37 กรัมต่อลิตร เช่นเดียวกับกระบวนการหมักเอทานอลแบบการย่อยพร้อมกับการหมัก *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 12.03 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่ากระบวนการหมักเอทานอลแบบการย่อยพร้อมกับการหมักให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่า และกระบวนการนี้ยังสามารถลดระยะเวลาการหมักได้ 4 ชั่วโมงอีกด้วย จากนั้นทำการศึกษาการหมักเอทานอลในสภาวะที่อุณหภูมิสูงที่ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้กระบวนการหมักเอทานอลแบบการย่อยพร้อมกับการหมัก พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5339 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 8.80 กรัมต่อลิตร

นอกจากศึกษาการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงแล้ว ยังทำการศึกษาการหมักเอทานอลในสภาวะที่มีเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 ปริมาตรโดยปริมาตร โดยใช้กระบวนการหมักเอทานอลแบบการย่อยพร้อมกับการหมัก พบว่า ไม่เกิดการหมักเอทานอลในสภาวะนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1). การใช้วัตถุดิบประเภทแป้ง เอนไซม์ไม่สามารถย่อยแป้งเปลี่ยนเป็นน้ำตาลได้หมด เมื่อนำไปปั่นเหวี่ยงพบว่ามีตะกอนแป้งเกิดขึ้น ซึ่งตะกอนแป้งดังกล่าวรวมตัวกับตะกอนเซลล์ยีสต์ จึงทำให้ไม่สามารถหามวลชีวภาพที่แน่นอนได้ ดังนั้นอนุภาคของแป้งจึงควรทำให้ละเอียดที่สุดเพื่อที่เอนไซม์ย่อยได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2). การหมักโดยเติมเอทานอลร้อยละ 15 โดยปริมาตรทำให้ เอทานอลที่ผลิตได้ลดลงเรื่อยๆ แต่น้ำตาลรีดิวซ์กลับเพิ่มขึ้นแสดงว่าไม่เกิดกระบวนการหมักเกิดขึ้น ซึ่งจากการทดลองยังไม่ทราบปัจจัยที่แน่ชัดว่าเกิดขึ้นจากปัจจัยใด ดังนั้นในการทดลองรั้งต่อไปควรควบคุมปัจจัยการทดลองให้เหลือเพียงปัจจัยเดียว เช่น ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารหมักควรเท่ากันและในการหมักระดับฟลาก์สควรใช้จุกสีดำแทนจุกสำลีเพื่อป้องกันการระเหยของเอทานอล

3). ในการศึกษาการทนต่อความเข้มข้นเอทานอลของเชื้อยีสต์ หลังจากทดสอบการเจริญแล้วควรนำไปศึกษากับอาหารหมักต่อเพื่อทดสอบว่าเชื้อยีสต์สามารถทนเอทานอลที่มันสร้างขึ้นได้มากน้อยเพียงใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กล้าณรงค์ ศรีรอต เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์ วิจารณ์ วิชชุกิจ เอ็จ สโรบล พิพัฒน์ วีระถาวร และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2544. รายงานการวิจัยฉบับสมบรูณ์ โครงการการศึกษาสถานภาพของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแก๊สโซฮอล์ (A study on suitability of various raw materials for gasohol production). สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. 114 หน้า

คมสัน หุตะแพทย์. 2553. มันพื้นบ้าน มันเทศ พืชใต้ดิน อาหารแห่งอนาคต. เกษตรกรรมธรรมชาติ , 3, 32 -38.

จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร. 2554. การศึกษาการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการย่อยสลายน้ำตาลแยกจากการหมักและการย่อยให้เป็นน้ำตาลพร้อมการหมักจากใบมันสำปะหลัง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. หน้า 314 -321.

ชุติมา ศรีงิ้ว. 2548. การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง. ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีวิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา. 202 หน้า

ชื่นจิตต์ บุญเฉิด. 2554. การหาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงยีสต์ทนร้อนเพื่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 41°C โดยยีสต์ทนร้อน ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

วราวุฒิ ครูส่ง และ กรวิกา ศรีวงษ์. 2539. เทคโนโลยีชีวภาพ. ภาควิชาอุตสาหกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิมลักษณ์ รัตนปรีดากุล. 2549. การศึกษาเชื้อราและเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าเปรียบเทียบกับยีสต์บริสุทธิ์ในการผลิตสาโท. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิต วิทยาลัยสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ศุภวรณ์. 2551. ความสำคัญของเอทานอลในประเทศไทย. ยุคทองมันสำปะหลังพืชพลังงานแห่งอนาคต. 140น. หน้า 98 -99

มลวิรินทร์ อาวัชนาวงศ์ และ ภารวี คล้ายลี. 2547. การผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน. ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สมใจ ศิริโภค. 2537. เทคโนโลยีการหมัก. ศูนย์สื่อเสริมสุขภาพ, กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aiba, S., Shoda, M., Nagatani, M., 1968. Kinetic of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnology and Bioengineering. 10 : 845-846.

Edgardo, A., Carolina, P., Manuel, R., Juanita, F. and Jaime, B. 2008. Selection of the thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. Enzyme and Microbial Technology. 43 : 120 - 123.

Banat, I.M., P. and Marchant, R. 1992. Isolation of thermotolerant, fermentative yeasts growing at 52°C and producing ethanol at 45°C and 50°C. World Journal of Microbiology & Biotechnology. 8 : 259 - 263.

Benjaphokee, S., Hasegawa, D., Yokota, D., Asvarak, T., Auesukaree, C., Sugiyama, M., Kaneko, Y., Boonchird, C. and Harashima, S. 2012. Highly efficient bioethanol production by a *Saccharomyces cerevisiae* strain with multiple stress tolerance to high temperature, acid and ethanol. New Biotechnology. 29 : 379 - 386.

Brown, S.W., Oliver, S.C., Harison, D.F.F. and Righelato, R.C. 1981. Ethanol inhibition of yeast grown and fermentation: difference in the magnitude and complexity of the effect. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology. 11 : 151 - 155.

D'Amore, T., Celotto, G., Russell, I. and Stewart, G.G., 1989. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40°C. Enzyme and Microbial Technology. 11 : 411- 416.

Jakel, M. 2005. Gas chromatography determination of ethanol in wine by head-space gas chromatography. Department of Agro-Industry. Faculty of Food and Agricultural Technology. Pibulsongkram Rajabhat University.

Khaing TW., Weine N., Mya, M.O. 2008. Isolation, characterization and screening of thermotolerant, ethanol tolerant indigenous yeasts and study on the effectiveness of immobilized cell for ethanol production. J. Sci. Technol. 1 : 12 - 14.

Kumar, R., Shankar, T and Anandapandian, K.T.K. 2011. Characterization of alcohol resistant yeast *Saccharomyces cerevisiae* isolated from Toddy. IRJM. 2 : 399 - 404.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Limtong, S., Sringiew, C. and Yongmanitchai, W. 2006. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* . Kasetsart University , Thailand.

Miller, G.L., 1959. Use of dinitrosalicylic acid as reagent for determination of reducing sugar. Analytical Chemistry. 31 : 426 - 428.

Mobini-Dehkordi, M., Nahvi, I., Zarkesh-Esfahani, H., Ghaedi, K., Tavassoli, M. and Akada, R. 2008. Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by an ethyl methane sulfonate - induced mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. Bioscience and Bioengineering. 105 : 403 - 408.

Panchal, C.J. 1990. Yeast strain selection. VetroGen Corporation, London, Ontario, Canada Marcel Dekker, INC., New York and Basel.

Paturau, J.M. 1969. By product of conc sugar industry. Elsevies Publishing Co., Amsterdums.

Roehr, M. 2001. The Biotechnology of ethanol : Classical and future applications. WILEYVCH : Weinheim - New York – Chichester–Brisbane–Singapore–Toronto.

Rose, A.H. and Harrison, J.S. 1993. Yeast Technology. The Yeast. Vol.5. Academic Press, San Diego.

Sree, N., Sridhar, S.K., Banat, I.M., Venkateswar, R.L. 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolorant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Bioresource Technology. 72 : 43 - 46.

Sridhar, M., Kiran Sree, N., Venkateswar Rao, L. 2002. Effect of UV radiation on thermotolerance, ethanol tolerance and osmotolerance of *Saccharomyces cerevisiae* VS1 and VS3 strains. Bioresource Technology. 83 : 199 - 202.

Stanbury, P.F., Whitaker, A and 3.5.Hall. 1995. Principles of fermentation technology, second edition. Elsevier Science Ltd. 357.

Swanson, K. M. J., Busta, F. F., Peterson, E. H., Johnson, M. G. 1992. Colony count methods. In:Vanderzant, C.,Splittstoesser, D. F. (Eds.). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, 3rd ed. American Public Health Association, Washington, D C, pp. 75-95.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Torija, M.J., Rozes, N., Poblet, M., Guillamon, J.M and Mas, A. 2003. Effect of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. International Journal of Food Microbiology. 80 : 47 - 53.

[Online].Available : www.dkt.ac.th/kruya/energy/en_else/atanol
(สืบค้นวันที่ 10 กันยายน 2555)

[Online].Available : www..bsru.ac.th/~orapim/my_doc/renewable _energy
(สืบค้นวันที่ 18 กันยายน 2555)

[Online].Available : http://kanchanapisek.or.th/kp6/New/sub/book
(สืบค้นวันที่ 15 กันยายน 2555)

[Online].Available : www.wineserver.ucdavis.edu/content.php?category=Resea
(สืบค้นวันที่ 18 กันยายน 2555)

[Online].Available : www.hcsupply.blogspot.com/2009/02/blog-post.html
(สืบค้นวันที่ 12 พฤศจิกายน 2555)

[Online].Available: www.guru.sanook.com/encyclopedia
(สืบค้นวันที่ 12 พฤศจิกายน 2555)

[Online].Available:www.hcsupply.blogspot.com/2009/02/blog-post.html
(สืบค้นวันที่ 12 พฤศจิกายน 2555)

[Online].Available: http://wineserver.ucdavis.edu/content.php?category=Research
(สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

[Online].Available: web.bsru.ac.th/~orapim/my_doc/renewable_energy
(สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

[Online].Available: http://www.jobpub.com/articles/showarticle.asp?id=7939
(สืบค้นวันที่ 26 ธันวาคม 2555)

[Online].Available: : http://www1.mod.go.th/opsd/dedweb/energy/about/meaning%
(สืบค้นวันที่ 26 ธันวาคม 2555)

[Online].Available: http://www.dede.go.th/dede/fileadmin/usr/bers/gasohol_doc ments/Executive_summary_value_added_to_ethanol_waste.pdf
(สืบค้นวันที่ 26 ธันวาคม 2555)

[Online].Available: http://(wwww.job.haii.or.th/wiki84new/index.php
(สืบค้นวันที่ 18 พฤศจิกายน 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ YFM Broth

ประกอบด้วย

- กลูโคส 150 กรัม
- เปปโตน 5 กรัม
- ยีสต์สกัด 6 กรัม
- KH_2PO_4 4 กรัม
- $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัม
- $MgSO_4.7H_2O$ 1 กรัม

วิธีการเตรียม

1. ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
2. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD Broth

ประกอบด้วย

- กลูโคส 20 กรัม
- เปปโตน 20 กรัม
- ยีสต์สกัด 10 กรัม

วิธีการเตรียม

1. ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
2. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD Agar

ประกอบด้วย

-	กลูโคส	20	กรัม
-	เปปโตน	20	กรัม
-	ยีสต์สกัด	10	กรัม
-	วุ้น	15	กรัม

วิธีการเตรียม

1. ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน
2. นำไปให้ความร้อนเพื่อให้วุ้นละลายจนอาหารเลี้ยงเชื้อใส
3. จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 121 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางเคมีและเครื่องมือวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (Dinitrosalicylic Method)

สารเคมี

1. สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic (DNS) ร้อยละ 1
2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

วิธีการเตรียมสารละลาย

1. สารละลาย 3,5-dinitrosalicylic (DNS) ร้อยละ 1
   - ชั่งสาร 3,5-dinitrosalicylic 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร
   - เติมสารละลายด่างทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร)
   - คนให้สารละลายเข้ากันจนหมด จนกระทั่งได้สารละลายใส
   - เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาเททลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร
2. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน
   - อบกลูโคสที่ตู้อบ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเต
   - ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
   - ทำการเจือจางสารละลายกลูโคสที่ได้โดยใช้น้ำกลั่น ดังตาราง

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาณกลูโคส (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	–	5
100	0.5	4.5
200	1	4
400	2	3
600	3	2
800	4	1
1000	5	–

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการวิเคราะห์

1. การทำกราฟมาตรฐาน

1.1 นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 10 20 40 60 80 และ100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

1.2 ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเจือจางใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

1.3 ปิเปต DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตรใส่ในหลอดลองที่มีสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเจือจาง ผสมให้เข้ากัน

1.4 นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วรอให้เย็น

1.5 ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองที่ผ่านการต้มแล้ว ผสมให้เข้ากัน

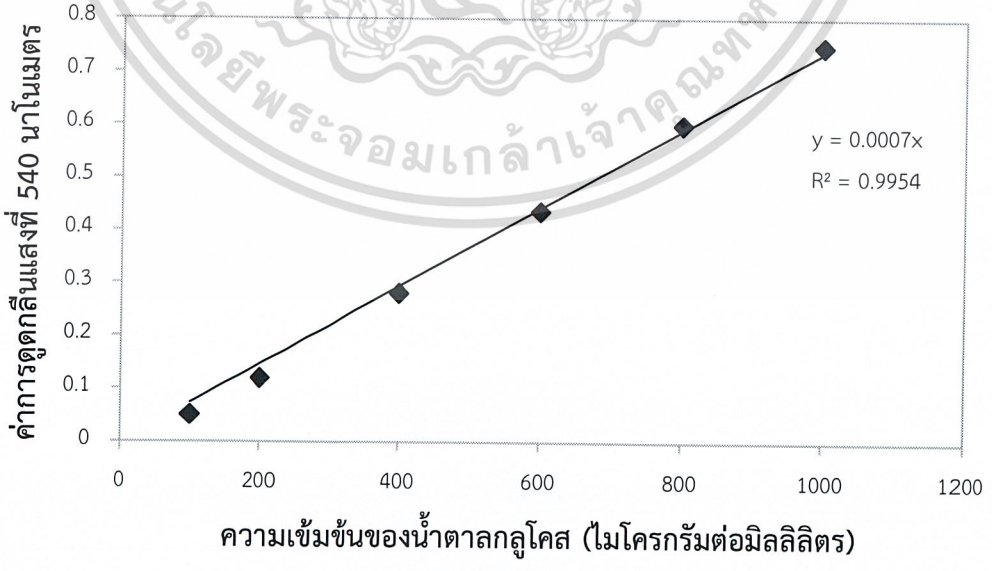
1.6 นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พร้อมนำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

2. หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

2.1 นำตัวอย่างมาทำการเจือจางให้เหมาะสม

2.2 ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น } 540 \text{ นาโนเมตร}) \times (\text{อัตราการเจือจาง})}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times 1000}$$



รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคสวัดโดยวิธีดีเอ็นเอส ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

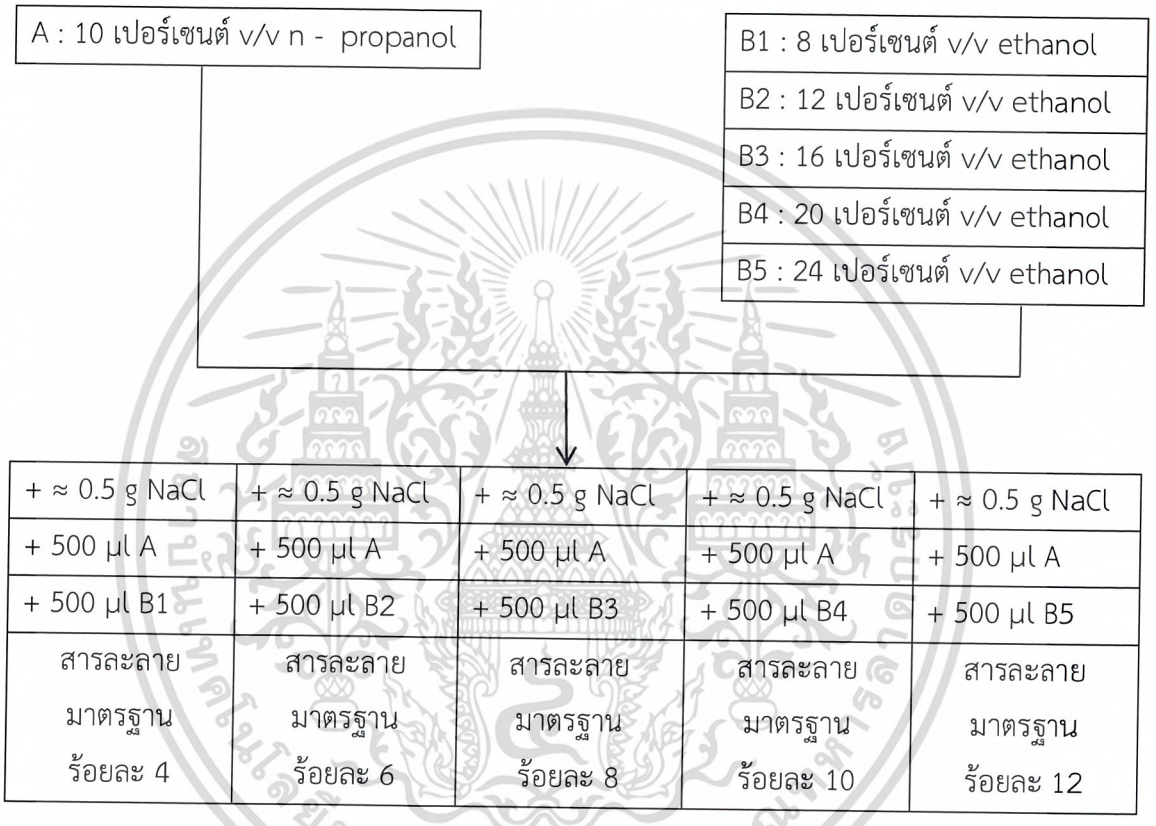
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. วิธีวิเคราะห์เอทานอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Jekel, 2005)

1. วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานเอทานอล

1.1 เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้โพรพานอล (n-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เป็นสารละลายมาตรฐานภายใน

1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 4 6 8 10 และ12 โดยปริมาตร ซึ่งมีวิธีทำดังแผนภาพ



รูปที่ ข-2 แผนภาพแสดงวิธีการเตรียมสารและสารละลายมาตรฐานเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ใส่สารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นในขวดแก้วขนาด 20 มิลลิลิตร พร้อมปิดฝาขวดด้วยเซปตัม (septum)

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลใช้เทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโตกราฟี (HS-GC) โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (GC-17A Chromatogram, Shimadzu) ต่อกับเครื่อง HSS - 4A (Shimadzu) ซึ่งเป็นส่วนที่ตัวอย่างจะถูกบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สารตัวอย่างในขวดแก้วจะระเหยกลายเป็นไอจนกระทั่งอยู่ในสมดุลไดนามิก จากนั้นเครื่องจะดูดไอปริมาตร 1 มิลลิลิตรเพื่อเข้าสู่คอลัมน์ต่อไป

1.5 ใช้คอลัมน์ DB-WAX (Agilent J&W GC Column) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 1 ไมครอน อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจวัด (Detector) ชนิด FID โดยปรับอุณหภูมิเท่ากับ 150 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (Injector) เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา โดยมีความดันคอลัมน์เท่ากับ 30 กิโลพาสคาล

1.6 สภาวะในการวิเคราะห์เริ่มจากอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มในอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาทีจนถึง 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 นาที รวมเวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 25 นาทีต่อตัวอย่าง โครมาโตแกรมจะแสดงเวลาที่เอทานอลและโพรพานอลถูกชะออกจากคอลัมน์

1.7 นำพื้นที่ใต้กราฟ (Peak Area) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อโพรพานอลในแต่ละความเข้มข้นซึ่งกำหนดให้เป็นแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอลเป็นแกน x

2. วิธีการวิเคราะห์เอทานอลในตัวอย่าง

2.1 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างโดยผสม NaCl 0.5 กรัม สารละลายโพรพานอลร้อยละ 10 โดยปริมาตรปริมาณ 500 ไมโครลิตร และตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร

2.2 วิเคราะห์ดังสภาวะข้างต้น จากนั้นนำเอาอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลในสารตัวอย่างต่อโพรพานอลมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรคำนวณปริมาณเอทานอล ได้จากกราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอล

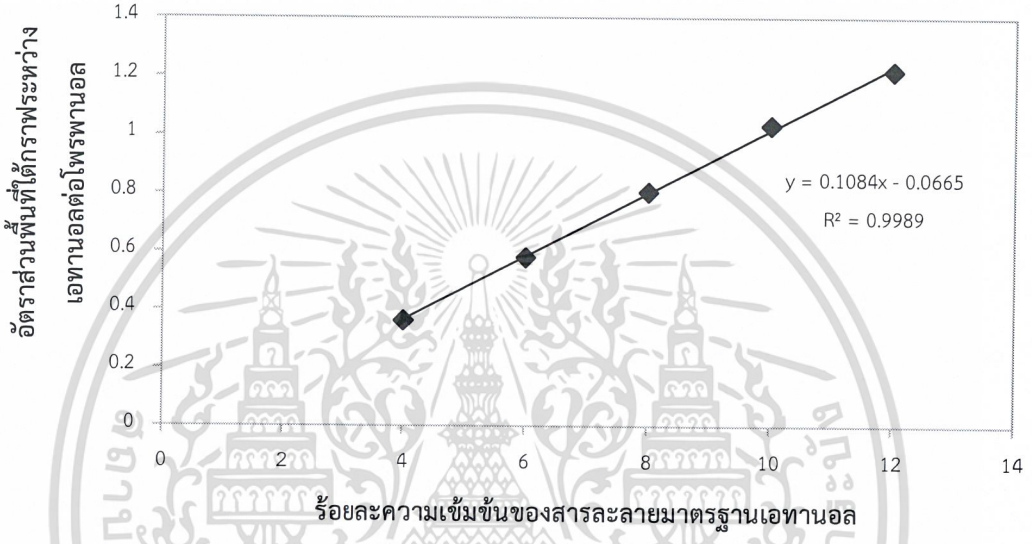
สมการ $y = 0.1084x - 0.0665$

ให้ y = อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟเอทานอลต่อโพรพานอล

X = ความเข้มข้นของเอทานอล (เปอร์เซนต์)

โดย ความหนาแน่นของเอทานอล = 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร

ดังนั้น ปริมาณเอทานอล = (x) (0.789) (10) กรัมต่อลิตร



รูปที่ ข-3 กราฟมาตรฐานของเอทานอลวัดโดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. วิธีการใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

3.1 เปิดปั๊ม และทำการคลายจุกใต้ปั๊มเพื่อไล่น้ำออกจากปั๊มประมาณ 5 แล้วจึงปิดปั๊ม

3.2 เปิด power supply และ zero air

3.3 เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ และทำการตั้งค่าต่างๆ

3.4 เปิดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี และตั้งค่าบนคอมพิวเตอร์อีกครั้ง

3.4.1 คลิกที่ CLASS-GC ซึ่งคอลัมน์ต้องเป็น GC-17A

3.4.2 คลิก Real Time Analysis → Method File → Load แล้วทำการหาชื่อไฟล์ JEHSS.MET แล้วจึงกด Load

3.4.3 คลิก Set Up เพื่อตรวจสอบอุณหภูมิ ก่อนทำการฉีดตัวอย่างทุกครั้งควรล้างคอลัมน์ก่อนโดยการตั้งค่าอุณหภูมิคอลัมน์เท่ากับ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-30 นาที จากนั้นจึงเปลี่ยนอุณหภูมิกลับไปเป็น 60 องศาเซลเซียส ตรวจ Flow เลือกให้เป็น 30 kPa และตัวตรวจวัดต้องเป็นชนิด FID

3.4.4 คลิก GC Monitor แล้วเปิดแก๊สฮีเลียม แก๊สไฮโดรเจน และแก๊สไนโตรเจน

3.4.5 คลิก System On จากนั้น คลิก Flame Ignition แล้วทำการจุดไฟบนตำแหน่งของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี แล้วทำการสังเกตที่หน้าจอรอจนกว่าเส้น base line จะตรง

3.5 คลิก Sample Schedule → Load File

3.6 วิเคราะห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การนับจำนวนโคโลนีและการคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่าง

1. การนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่วิเคราะห์โดยเทคนิค spread plate และ pour plate (Swanson และคณะ, 1992)

1. กรณีที่มีเชื้อเจริญปกติและมีจำนวนโคโลนีในช่วง 25 - 250 โคโลนี การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดบน nonselective media เช่น PCA ให้นับทุกโคโลนี รวมทั้งโคโลนีขนาดเล็ก(pinpointsize) ทั้งหมด บันทึกระดับความเจือจางและจำนวนโคโลนีที่นับได้ แต่ถ้าตรวจนับจำนวนโคโลนีของจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งบน selective media หรือ differential media ให้นับโคโลนีที่ขึ้นบนจานที่มีจำนวนโคโลนีในช่วง 15 - 150 โคโลนี
2. กรณีที่มีเชื้อเจริญหนาแน่น จำนวนมากกว่า 250 โคโลนี
   2.1 ถ้ามีจำนวนมากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ไม่ต้องนับให้บันทึก “TNTC” หมายถึง มากเกินกว่าที่จะนับได้ (Too Numerous To Count)
   2.2 ถ้ามีจำนวนโคโลนี 4-10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร ให้นับ 12 ตารางเซนติเมตร (12 ช่องสีเหลี่ยม) โดยนับติดต่อกัน 6 ช่องในแนวนอนและ 6 ช่องในแนวตั้ง จากนั้นคำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีต่อ 1 ตารางเซนติเมตรแล้วคูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ
   2.3 ถ้ามีจำนวนโคโลนีมากกว่า 10 โคโลนีต่อตารางเซนติเมตร แต่ดูไม่หนาแน่นจนเกินไปสามารถนับได้ ให้นับเพียง 4 ตารางเซนติเมตร คำนวณหาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีต่อ 1 ตารางเซนติเมตรแล้วคูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ
3. กรณีที่มีเชื้อขึ้นแต่มีลักษณะแผ่ไปทั่วผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ไม่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ให้บันทึกว่า “SPR” (Spreader) ลักษณะของโคโลนีที่ไม่แยกนี้แบ่งเป็น 3 ลักษณะ คือ
   1) ลักษณะโคโลนีที่เรียงติดกันเป็นสายไม่แยกกันอย่างเด่นชัดซึ่งเป็นลักษณะที่เกิดจากการแตกออก ของกลุ่มแบคทีเรียที่เกาะกัน
   2) ลักษณะที่เป็นฟิล์มระหว่างวุ้นและก้นจาน
   3) ลักษณะที่เป็นฟิล์มที่ขอบและที่ผิวของวุ้น

ถ้าหากมีลักษณะของการแผ่ติดกันมากกว่าร้อยละ 50 ของพื้นที่บนจานอาหารให้บันทึกว่า “SPR” สำหรับลักษณะของโคโลนีที่เรียงติดกันเป็นสาย (ลักษณะที่ 1) ถ้ามีเพียง 1 สายให้นับเป็น 1 โคโลนี แต่ถ้าโคโลนีมี 1 สายหรือมากกว่า 1 สายมีกำเนิดมาจากหลายแหล่ง ให้นับแต่ละสายจากแต่ละแหล่งเป็น 1 โคโลนี อย่านับแต่ละโคโลนีที่ติดกันนั้นเหมือนกับเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ถ้าเกิดการเจริญแผ่ของโคโลนีเพียงจานเดียวจากจำนวน 2 จานของตัวอย่างเดียวกันให้นำผลการนับจำนวนโคโลนีเฉพาะของจานที่นับได้มาคำนวณ แต่ถ้าเกิดการเจริญแผ่เพียงส่วนเดียวของผิวหน้าอาหาร เช่น เพียงครึ่งหนึ่งหรือ 1 ใน 4 ของผิวหน้าอาหาร ให้นับเฉพาะส่วนที่นับได้แล้วคูณด้วยตัวเลขสัดส่วนที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

เหมาะสมของพื้นที่บนจานเช่น คูณด้วย 2 ถ้านับจำนวนโคโลนีได้เพียงครึ่งจานและคูณด้วย 4 ถ้านับได้เพียง 1 ใน 4 ของผิวหน้าอาหาร

4. ถ้าจานอาหารนั้นปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ชนิดอื่น ให้บันทึกว่า “LA” (Laboratory Accident)

2. การคำนวณหาจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อกรัมหรือ CFU ต่อมิลลิลิตรของอาหาร)

ในการคำนวณหา CFU ต่อกรัมหรือ CFU ต่อมิลลิลิตร ให้คูณจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่นับได้หรือจำนวนโคโลนีเฉลี่ย (ถ้าทำซ้ำ 2 จาน) ในส่วนกลับของ dilution factor

Dilution Factor = ระดับความเจือจางเริ่มต้น x ระดับความเจือจางต่อมา x ปริมาณตัวอย่างที่เติมในจาน

CFU ต่อกรัมหรือ CFU ต่อมิลลิลิตร = ส่วนกลับของ Dilution Factor x จำนวนโคโลนีที่นับได้

การรายงานผล

ในการรายงานค่า CFU ต่อกรัมหรือ CFU ต่อมิลลิลิตร นิยมรายงานโดยเขียนเป็นเลขทศนิยม 1 ตำแหน่ง โดยเขียนเฉพาะตัวเลข 2 ตัวเลข ส่วนตัวเลขตัวที่ 3 ให้ปัดขึ้นหรือปัดลง ถ้าตัวเลขตัวที่ 3 เป็น 6 7 8 หรือ 9 ให้ปัดขึ้น และถ้าตัวเลขตัวที่ 3 เป็น 1 2 3 หรือ 4 ให้ปัดลง แต่ถ้าตัวเลขตัวที่ 3 เป็น เลข 5 ให้ปัดขึ้นถ้าตัวเลขตัวที่ 2 เป็นเลขคี่ แต่ถ้าตัวเลขตัวที่ 2 เป็นเลขคู่ให้ปัดลง

หมายเหตุ

1. ถ้าไม่พบโคโลนีขึ้นอยู่เลยในทุกระดับความเจือจาง รายงานผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดว่าน้อยกว่า 1 เท่าของค่าความเจือจางต่ำสุด เช่น ถ้าระดับความเจือจางต่ำสุดเป็น 1:100 ให้รายงานว่ามีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยกว่า 100 CFU ต่อมิลลิลิตรหรือต่อกรัม
2. ถ้าจานที่ทั้งสองระดับความเจือจางมีโคโลนีขึ้นน้อยกว่า 25 โคโลนีให้บันทึกผลจำนวนที่นับได้ตาม ความจริง แต่ให้รายงานว่า น้อยกว่า 25 x 1/d เมื่อ d คือ dilution factor ของจานเพาะเชื้อที่ระดับความเจือจางต่ำสุดที่มีโคโลนีขึ้น
3. ถ้าทุกจานอาหารเลี้ยงเชื้อจากทั้ง 2 ระดับความเจือจาง มีโคโลนีขึ้นมากกว่า 250 โคโลนี แต่ในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตรมีจำนวนโคโลนีน้อยกว่า 100 โคโลนี ให้ประมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดจากจานที่มีจำนวนโคโลนีขึ้นใกล้เคียง 250 มากที่สุดแล้วคูณด้วยส่วนกลับของ dilution factor ($1/10^{-3}$ = 1000) และเขียน “ESPC” (Estimate Standard Plate Count) หรือ “EAPC” (Estimate Aerobic Plate Count) กำกับไว้ด้วย
4. ถ้าทุกจานอาหารเลี้ยงเชื้อ มีโคโลนีขึ้นมากกว่า 100 โคโลนีในพื้นที่ 1 ตารางเซนติเมตร ให้ประมาณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดว่ามีมากกว่า 100 เท่าของส่วนกลับของ dilution factor ที่ระดับความเจือจางสูงสุด ($1/10^{-3}$ = 1000) คูณด้วยพื้นที่ของจานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง
ข้อมูลดิบ

ตารางที่ ง-1 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
YRK 017	1	3.0200	2.5467	2.743	3.324	30.7564	30.2125
	2	2.2900		3.729		29.9223	
	3	2.3300		3.500		29.9587	
TISTR 5196	1	1.2700	1.4679	25.964	23.393	24.1504	25.3053
	2	1.4667		24.357		22.7165	
	3	1.6667		19.857		29.0489	
TISTR 5202	1	2.1000	2.3921	11.764	12.407	30.0315	29.9272
	2	2.9433		13.007		29.4492	
	3	2.1333		12.450		30.3008	
TISTR 5339	1	2.3400	2.5456	4.100	3.821	30.6065	29.9199
	2	2.8167		3.007		30.0024	
	3	2.4800		4.357		29.1508	
TISTR 5088	1	3.5233	3.5389	3.179	3.498	30.1844	30.1965
	2	3.8533		2.921		29.4274	
	3	3.2400		4.393		30.9777	
TISTR 5596	1	3.0667	2.9156	3.271	3.843	29.3837	29.4395
	2	2.4533		3.879		27.6441	
	3	3.2267		4.379		31.2907	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-2 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอล ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
YRK 017	1	1.4767	1.5133	29.500	29.786	29.5875	83.3254
	2	1.7033		32.571		26.7197	
	3	1.3600		27.286		27.0182	
TISTR 5196	1	1.0767	1.1033	69.571	73.667	13.9312	13.4290
	2	1.0600		83.000		11.6894	
	3	1.1733		68.429		14.6663	
TISTR 5202	1	2.5067	1.9067	60.686	66.781	18.0946	16.8570
	2	1.3067		69.943		16.0857	
	3	4.9500		69.714		16.3987	
TISTR 5339	1	1.6033	1.4878	26.214	29.690	24.0703	23.3739
	2	1.3167		35.357		23.1168	
	3	1.5433		27.500		22.9347	
TISTR 5088	1	1.6500	1.5544	33.500	31.286	22.8912	23.5026
	2	1.7333		31.071		23.9684	
	3	1.2800		29.286		23.6482	
TISTR 5596	1	1.8300	1.5389	38.643	37.762	22.2216	21.8407
	2	1.4233		34.929		22.8621	
	3	1.3633		39.714		20.4383	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-3 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอล ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
YRK 017	1	0.9167	1.1433	98.714	96.286	15.3215	15.9183
	2	1.3067		98.857		13.5819	
	3	1.2067		108.000		18.8516	
TISTR 5196	1	1.6233	0.9733	141.857	134.857	5.1897	5.0538
	2	0.5433		134.786		5.0077	
	3	0.7533		127.929		4.9640	
TISTR 5202	1	1.5100	1.3655	141.857	117.357	9.2293	9.4816
	2	1.2733		107.786		9.7315	
	3	1.3133		102.429		9.4840	
TISTR 5339	1	1.2300	1.2333	72.429	78.143	17.7161	17.5996
	2	1.2367		81.000		17.3012	
	3	1.2333		81.000		17.7816	
TISTR 5088	1	1.0067	0.9945	101.143	96.000	15.1686	14.9915
	2	1.0000		95.000		14.7392	
	3	0.9767		97.000		15.0667	
TISTR 5596	1	0.8433	1.0330	112.714	111.190	8.3850	8.5039
	2	1.2700		104.857		8.5815	
	3	0.9857		116.000		8.5451	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-4 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอล ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
YRK 017	1	1.1067	1.0645	106.500	115.287	8.0210	8.1350
	2	1.1667		122.357		8.4213	
	3	0.9200		117.000		7.9628	
TISTR 5196	1	0.3567	0.4189	136.929	124.572	4.9276	4.9131
	2	0.5100		153.000		4.9131	
	3	0.3900		137.786		4.8985	
TISTR 5202	1	0.4167	0.3911	136.929	144.786	4.9422	4.9349
	2	0.4300		152.571		4.9276	
	3	0.3267		144.857		4.9349	
ISTR 5339	1	0.9333	0.9722	115.7143	114.952	8.4577	8.7659
	2	0.9167		114.000		9.1929	
	3	1.0667		113.143		8.6470	
TISTR 5088	1	0.9033	0.8693	113.786	116.214	9.0255	8.5912
	2	0.8500		109.714		8.2758	
	3	0.8547		125.143		8.4723	
TISTR 5596	1	0.4667	0.5711	166.929	141.643	4.8840	6.7764
	2	0.4933		93.429		10.5831	
	3	0.7533		164.571		4.8621	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-5 ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยแยกกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
0	YRK017	1	21.1143	22.2572	0.000	0
		2	22.7143		0.000	
		3	22.9429		0.000	
	TISTR5339	1	23.6571	22.9143	0.000	0
		2	21.9429		0.000	
		3	23.1429		0.000	
	TISTR5088	1	22.3429	22.2286	0.000	0
		2	21.6286		0.000	
		3	22.7143		0.000	
12	YRK017	1	7.9971	8.3400	7.9555	7.9770
		2	8.9743		8.0201	
		3	8.0486		7.9555	
	TISTR5339	1	10.9929	8.3705	7.1913	8.2175
		2	5.7429		7.6352	
		3	8.3756		9.8261	
	TISTR5088	1	8.1600	8.0686	7.9264	8.0137
		2	8.1943		8.2612	
		3	7.8514		7.8536	
24	YRK017	1	1.9919	1.8111	8.8653	8.6761
		2	1.7357		8.5160	
		3	1.7057		8.6470	
	TISTR5339	1	2.4557	2.1686	8.0283	8.4626
		2	2.0443		8.6688	
		3	2.0057		8.6906	
	TISTR5088	1	2.0486	2.0328	8.6033	8.6276
		2	2.3014		8.6106	
		3	1.7485		8.6688	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-5(ต่อ) ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยแยกกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
36	YRK 017	1	1.7486	1.7314	8.9090	8.9915
		2	1.7786		9.1055	
		3	1.6671		8.9600	
	TISTR 5339	1	1.8643	1.5057	8.4577	8.7707
		2	1.3029		8.6106	
		3	1.3500		9.2438	
	TISTR 5088	1	1.9286	1.8672	8.5670	8.7247
		2	1.9586		8.8290	
		3	1.7143		8.7780	
48	YRK 017	1	1.4914	1.4457	9.5204	9.3457
		2	1.3500		9.0327	
		3	1.4957		9.4840	
	TISTR 5339	1	1.6629	1.4495	10.0081	10.3720
		2	1.5571		10.2992	
		3	1.1286		10.8087	
	TISTR 5088	1	1.5800	1.5019	9.1927	9.2375
		2	1.5114		9.0327	
		3	1.4143		9.4840	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-6 ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
0	YRK 017	1	15.6571	16.0094	0.000	0
		2	16.4571		0.000	
		3	15.9140		0.000	
	TISTR 5339	1	16.5429	16.5429	0.000	0
		2	16.8857		0.000	
		3	16.2000		0.000	
	TISTR 5088	1	17.1714	16.3428	0.000	0
		2	15.2571		0.000	
		3	16.6000		0.000	
12	YRK 017	1	14.9143	13.7714	5.7137	6.7570
		2	13.3286		7.4606	
		3	13.0714		7.0966	
	TISTR 5339	1	13.1571	13.3714	8.4577	8.3849
		2	13.2000		9.0400	
		3	13.7571		7.6570	
	TISTR 5088	1	14.2286	13.9714	5.8229	8.9236
		2	14.0143		10.7359	
		3	13.6714		10.2119	
24	YRK 017	1	6.4857	6.0714	10.4230	10.2046
		2	5.3571		10.0445	
		3	6.3714		10.1464	
	TISTR 5339	1	7.3429	7.3476	11.2454	10.5904
		2	7.9143		11.0999	
		3	6.7857		9.4258	
	TISTR 5088	1	7.9714	7.2414	10.0081	10.7845
		2	6.2143		0.000	
		3	7.5386		0.000	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-6(ต่อ) ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
36	YRK 017	1	5.0857	5.0438	10.9543	10.7510
		2	4.7086		10.5991	
		3	5.3371		10.6995	
	TISTR 5339	1	5.9200	5.8095	10.9470	10.9228
		2	6.1829		11.0708	
		3	5.3257		10.7505	
	TISTR 5088	1	6.1714	6.4228	10.6777	10.6777
		2	6.2514		10.7505	
		3	6.8457		10.6049	
48	YRK 017	1	4.0214	3.9214	11.9078	11.5924
		2	3.4786		11.0853	
		3	4.2643		11.7841	
	TISTR 5339	1	4.2571	4.0976	11.8860	12.0364
		2	4.1500		11.9442	
		3	3.8857		12.2790	
	TISTR 5088	1	4.6071	4.6785	11.1363	11.1945
		2	4.8785		11.0780	
		3	4.5500		11.3692	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-7 ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในกาหมัก (ชั่วโมง)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
0	YRK017	1	16.4384	15.9193	0.000	0
		2	15.4001		0.000	
		3	15.9193		0.000	
	TISTR5339	1	15.1839	15.3569	0.000	0
		2	15.5299		0.000	
		3	15.3569		0.000	
	TISTR5088	1	14.8378	14.6647	0.000	0
		2	14.4917		0.000	
		3	14.6647		0.000	
12	YRK017	1	13.0353	14.4484	6.2596	5.7661
		2	15.5732		5.5106	
		3	14.7368		5.5281	
	TISTR5339	1	10.9589	11.4684	5.5339	5.6460
		2	11.9683		5.5638	
		3	11.4780		5.8403	
	TISTR5088	1	14.5638	13.1026	5.5229	5.4936
		2	11.6511		5.4408	
		3	13.0930		5.5172	
24	YRK017	1	7.7433	10.2019	6.7327	6.9729
		2	12.8695		7.0530	
		3	9.9928		7.1330	
	TISTR5339	1	10.3172	9.6251	7.0020	7.0554
		2	8.9329		6.9438	
		3	9.6251		7.2204	
	TISTR5088	1	11.4636	10.6345	6.7545	6.6696
		2	10.0144		6.7545	
		3	10.4254		6.4998	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-7(ต่อ) ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในกาหมัก (ชั่วโมง)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
36	YRK017	1	9.3872	8.2048	7.7115	8.0270
		2	6.8782		8.1957	
		3	8.3490		8.1739	
	TISTR5339	1	6.6474	6.2245	7.9191	8.2030
		2	5.6525		8.4213	
		3	6.3735		8.2685	
	TISTR5088	1	7.4982	8.1471	7.5916	7.1403
		2	8.9402		6.6890	
		3	8..0029		7.1403	
48	YRK017	1	5.6957	5.7390	8.2103	8.2801
		2	5.6885		8.2103	
		3	5.8327		8.4214	
	TISTR5339	1	5.4001	5.5468	8.6688	8.8047
		2	5.5230		8.7634	
		3	5.7174		8.9818	
	TISTR5088	1	7.7751	7.8943	7.8711	7.9953
		2	7.9366		8.1811	
		3	7.9712		7.9337	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-8 ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักและมีการเติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในกาหมัก (ชั่วโมง)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
0	YRK017	1	15.7030	16.7700	54.5604	55.9433
		2	16.7844		57.6174	
		3	17.8226		55.6522	
	TISTR5339	1	15.4867	16.4528	55.3101	55.3028
		2	15.9193		55.8851	
		3	17.9524		54.7132	
	TISTR5088	1	15.9193	15.9481	54.0072	54.4561
		2	15.0108		54.0000	
		3	16.9142		55.3610	
12	YRK017	1	25.4795	26.1572	53.8689	54.7375
		2	26.5177		56.1326	
		3	26.4744		54.2110	
	TISTR5339	1	24.5710	25.3208	47.4055	50.9841
		2	26.1716		53.7597	
		3	25.2199		51.7872	
	TISTR5088	1	22.7109	23.3021	51.5689	52.2652
		2	24.4412		52.5224	
		3	22.7542		52.7043	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-8(ต่อ) ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักและมีการเติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในกาหมัก (ชั่วโมง)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
24	YRK017	1	33.7419	32.9344	50.4844	50.1932
		2	32.3576		50.6081	
		3	32.7037		49.4872	
	TISTR5339	1	34.1745	32.0837	45.0982	49.4823
		2	30.7138		53.6214	
		3	31.3627		49.7274	
	TISTR5088	1	32.8335	31.1031	49.0796	48.6138
		2	30.5840		48.1334	
		3	29.8919		48.6283	
36	YRK017	1	32.5883	32.8959	50.9647	49.7347
		2	32.3576		49.6473	
		3	33.7419		48.5920	
	TISTR5339	1	33.3381	32.7806	44.4431	48.8903
		2	32.8190		53.7306	
		3	32.1846		48.4973	
	TISTR5088	1	32.8767	33.1651	48.9486	48.5046
		2	33.8573		48.1479	
		3	32.7613		48.4172	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง-8(ต่อ) ผลน้ำตาลรีดิวซ์และความเข้มข้นเอทานอลโดยการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยพร้อมกับการหมักและมีการเติมเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 15 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาในกาหมัก (ชั่วโมง)	สายพันธุ์ *S. cerevisiae*	ซ้ำที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)	เฉลี่ย
48	YRK017	1	33.2228	34.0495	49.1815	49.1208
		2	34.6647		49.8002	
		3	34.2610		48.3808	
	TISTR5339	1	32.7614	33.1267	46.4011	48.4148
		2	32.2423		51.8018	
		3	34.3764		47.0416	
	TISTR5088	1	35.0685	33.8188	48.9267	48.0897
		2	33.2228		49.4435	
		3	33.1651		45.8988	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ
การวิเคราะห์ทางสถิติ

1. ค่าความเข้มข้นเอทานอล (g/l) ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 g/l ที่อุณหภูมิต่างๆของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	949.982	3	316.661	122.430	.000
Within Groups	20.692	8	2.586		
Total	970.674	11			

Robust Tests of Equality of Means

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	626.460	3	3.598	.000
Brown-Forsythe	122.430	3	3.659	.000

Ethanol

Duncan[a]

Tem	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
42	3	8.135033		
40	3		15.918333	
37	3			27.775133
30	3			29.979367
Sig.		1.000	1.000	.132

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ค่าความเข้มข้นเอทานอล (g/l) ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 g/l ที่อุณหภูมิต่างๆของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5196

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	832.278	3	277.426	82.543	.000
Within Groups	26.888	8	3.361		
Total	859.166	11			

Robust Tests of Equality of Means

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	49.573	3	3.366	.003
Brown-Forsythe	82.543	3	2.839	.003

Ethanol

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05		
TEM	N	1	2	3
42	3	4.913067		
40	3	5.053800		
37	3		13.428967	
30	3			25.305367
Sig.		.927	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ค่าความเข้มข้นเอทานอล (g/l) ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 g/l ที่อุณหภูมิต่างๆของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5202

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1073.027	3	357.676	1006.923	.000
Within Groups	2.842	8	.355		
Total	1075.869	11			

Robust Tests of Equality of Means

Etahnol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	2674.710	3	3.336	.000
Brown-Forsythe	1006.923	3	2.874	.000

Ethanol

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05			
TEM	N	1	2	3	4
42	3	4.934900			
40	3		9.481600		
37	3			16.859667	
30	3				29.927167
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ค่าความเข้มข้นเอทานอล)g/l ในอาหารหมัก (YFM ที่มีกลูโคส 150 g/l ที่อุณหภูมิต่างๆขอ เชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	725.179	3	241.726	862.961	.000
Within Groups	2.241	8	.280		
Total	727.420	11			

Robust Tests of Equality of Means

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	674.343	3	4.163	.000
Brown-Forsythe	862.961	3	5.576	.000

Ethanol

Duncan[a]

TEM	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
42	3	8.765867			
40	3		17.599633		
37	3			23.373933	
30	3				29.919900
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ค่าความเข้มข้นเอทานอล (g/l) ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 g/l ที่อุณหภูมิต่างๆของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5088

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	808.906	3	269.635	973.053	.000
Within Groups	2.217	8	.277		
Total	811.123	11			

Robust Tests of Equality of Means

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	669.439	3	4.069	.000
Brown-Forsythe	973.053	3	5.117	.000

Ethanol

Duncan[a]

TEM	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
42	3	8.591200			
40	3		14.991500		
37	3			23.502600	
30	3				30.196500
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ค่าความเข้มข้นเอทานอล (g/l) ในอาหารหมัก YFM ที่มีกลูโคส 150 g/l ที่อุณหภูมิต่างๆของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5596

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1063.516	3	354.505	89.605	.000
Within Groups	31.650	8	3.956		
Total	1095.167	11			

Robust Tests of Equality of Means

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	173.562	3	3.358	.000
Brown-Forsythe	89.605	3	3.778	.001

Ethanol

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05		
TEM	N	1	2	3
42	3	6.769100		
40	3	8.503867		
37	3		21.840667	
30	3			29.439500
Sig.		.317	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก(SHF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	186.697	4	46.674	1999.169	.000
Within Groups	.233	10	.023		
Total	186.930	14			

Robust Tests of Equality of Means[b]

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	.	.	.	.
Brown-Forsythe	.	.	.	.

Ethanol

Duncan[a]

HR	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.000000				
12	3		7.977033			
24	3			8.676100		
36	3				8.991500	
48	3					9.345700
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก(SHF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	201.118	4	50.280	102.754	.000
Within Groups	4.893	10	.489		
Total	206.012	14			

Robust Tests of Equality of Means[b]

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	.	.	.	.
Brown-Forsythe	.	.	.	.

Ethanol

Duncan[a]

HR	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
0	3	.000000		
12	3		8.217533	
24	3		8.480800	
36	3		8.770700	
48	3			10.372000
Sig.		1.000	.377	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก(SHF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5088

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	181.864	4	45.466	1891.387	.000
Within Groups	.240	10	.024		
Total	182.104	14			

Robust Tests of Equality of Means[b]

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	.	.	.	.
Brown-Forsythe	.	.	.	.

Ethanol

		Subset for alpha = 0.05			
HR	N	1	2	3	4
0	3	.000000			
12	3		8.013733		
24	3			8.627567	
36	3			8.724667	
48	3				9.236467
Sig.		1.000	1.000	.461	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. ค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยแยกกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง

ANOVA

Yield

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	2	.001	2.304	.181
Within Groups	.003	6	.001		
Total	.006	8			

Robust Tests of Equality of Means

Yield

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	2.602	2	2.732	.233
Brown-Forsythe	2.304	2	3.881	.219

YIELD

Duncan[a]

SP	N	Subset for alpha = 0.05
		1
TISTR 5088	3	.445567
YRK 017	3	.450067
TISTR 5339	3	.483733
Sig.		.107

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

11. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก(SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	272.346	4	68.087	304.501	.000
Within Groups	2.236	10	.224		
Total	274.582	14			

Robust Tests of Equality of Means[b]

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	.	.	.	.
Brown-Forsythe	.	.	.	.

Ethanol

Duncan[a]

HR	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.000000			
12	3		6.756967		
24	3			10.204633	
36	3			10.750967	10.750967
48	3				11.592400
Sig.		1.000	1.000	.187	.054

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

12. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก(SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	284.834	4	71.209	225.962	.000
Within Groups	3.151	10	.315		
Total	287.986	14			

Robust Tests of Equality of Means[b]

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	.	.	.	.
Brown-Forsythe	.	.	.	.

Ethanol

Duncan[a]

HR	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.000000			
12	3		8.384900		
24	3			10.590367	
36	3			10.922767	
48	3				12.036400
Sig.		1.000	1.000	.485	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. ตารางแสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก)SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5088

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	268.445	4	67.111	42.334	.000
Within Groups	15.853	10	1.585		
Total	284.298	14			

Robust Tests of Equality of Means[b]

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	.	.	.	.
Brown-Forsythe	.	.	.	.

Ethanol

Duncan[a]

HR	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
0	3	.000000	
12	3		8.923567
36	3		10.677700
24	3		10.784467
48	3		11.194500
Sig.		1.000	.066

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14. ค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง

ANOVA

Yield

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	.003	.997
Within Groups	.037	6	.006		
Total	.037	8			

Robust Tests of Equality of Means

Yield

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	.004	2	3.125	.996
Brown-Forsythe	.003	2	4.390	.997

YIELD

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05
SP	N	1
YRK 017	3	.962367
TISTR 5088	3	.965733
TISTR 5339	3	.967500
Sig.		.940

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักSSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	138.389	4	34.597	545.270	.000
Within Groups	.634	10	.063		
Total	139.024	14			

Robust Tests of Equality of Means[b]

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	.	.	.	.
Brown-Forsythe	.	.	.	.

Ethanol

Duncan[a]

HR	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0	3	.000000			
12	3		5.766100		
24	3			6.972900	
36	3				8.027033
48	3				8.280667
Sig.		1.000	1.000	1.000	.246

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

16. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักSSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	149.824	4	37.456	1320.318	.000
Within Groups	.284	10	.028		
Total	150.108	14			

Robust Tests of Equality of Means[b]

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	.	.	.	.
Brown-Forsythe	.	.	.	.

Ethanol

Duncan[a]

HR	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.000000				
12	3		5.646000			
24	3			7.055400		
36	3				8.202967	
48	3					8.804667
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักSSF) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5088

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	121.581	4	30.395	597.701	.000
Within Groups	.509	10	.051		
Total	122.090	14			

Robust Tests of Equality of Means[b]

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	.	.	.	.
Brown-Forsythe	.	.	.	.

Ethanol

Duncan[a]

HR	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0	3	.000000				
12	3		5.493633			
24	3			6.669600		
36	3				7.140300	
48	3					7.995300
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18. ค่าผลได้เอทนอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* 3 สายพันธุ์ YRK 017 TISTR 5339 และ TISTR 5088 ที่ระยะการหมัก 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ANOVA

Yield

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.017	2	.009	3.967	.080
Within Groups	.013	6	.002		
Total	.030	8			

Robust Tests of Equality of Means

Yield

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	4.711	2	3.708	.096
Brown-Forsythe	3.967	2	4.697	.098

YIELD

Duncan[a]

SP	N	Subset for alpha = 0.05	
		1	2
TISTR 5008	3	.797733	
YRK017	3	.814900	.814900
TISTR 5339	3		.897833
Sig.		.667	.072

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19. ตารางแสดงปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก(SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและ มีเอาทานอล15% ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ YRK 017

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	119.145	4	29.786	24.075	.000
Within Groups	12.372	10	1.237		
Total	131.517	14			

Robust Tests of Equality of Means

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	15.227	4	4.860	.006
Brown-Forsythe	24.075	4	7.379	.000

Ethanol

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05	
HR	N	1	2
48	3	49.120833	
36	3	49.734667	
24	3	50.193233	
12	3		54.737500
0	3		55.943333
Sig.		.286	.214

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก(SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและ มีเอาทานอล15% ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5339

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	93.635	4	23.409	1.967	.176
Within Groups	119.028	10	11.903		
Total	212.664	14			

Robust Tests of Equality of Means

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	5.050	4	4.189	.068
Brown-Forsythe	1.967	4	7.160	.202

Ethanol

Duncan[a]

		Subset for alpha = 0.05	
HR	N	1	2
48	3	48.414833	
36	3	48.890333	48.890333
24	3	49.482333	49.482333
12	3	50.984133	50.984133
0	3		55.303000
Sig.		.414	.060

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21. ปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักสารละลายผงมันเทศโดยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก(SSF) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและ มีเอาทานอล15% ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมงของเชื้อ *S.cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5088

ANOVA

Ethanol

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	96.152	4	24.038	23.834	.000
Within Groups	10.086	10	1.009		
Total	106.237	14			

Robust Tests of Equality of Means

Ethanol

	Statistic[a]	df1	df2	Sig.
Welch	36.560	4	4.862	.001
Brown-Forsythe	23.834	4	3.623	.007

Ethanol

Duncan[a]

HR	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
48	3	48.089667		
36	3	48.504567		
24	3	48.613767		
12	3		52.265200	
0	3			54.456067
Sig.		.556	1.000	1.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้