รายงานการวิจัย

การผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5058 ร่วมกับ *Amylomyces rouxii* และ *Aspergillus oryzae*

Bioethanol production from sweet potato using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5058 and *Amylomyces rouxii* and *Aspergillus oryzae*

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัย

การผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5058 ร่วมกับ *Amylomyces rouxii* และ *Aspergillus oryzae*

Bioethanol production from sweet potato using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5058 and *Amylomyces rouxii* and *Aspergillus oryzae*

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2560

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงการวิจัย การผลิตไบโอเอทานอลจากมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อราที่ย่อยแป้ง

แหล่งเงิน (ระบุแหล่งทุน) เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์

ประจำปีงบประมาณ 2560

จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 150,000บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2559 ถึง กันยายน 2560

ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย พร้อมระบุ หน่วยงานต้นสังกัด

รศ.ดวงใจ โอชัยกุล คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

ไบโอเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพทดแทนที่น่าสนใจ เนื่องจากมีประสิทธิภาพการเผาไหม้สูงและสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบที่หลากหลาย งานวิจัยนี้เลือกใช้แป้งมันเทศเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้เชื้อรายย่อยแป้งทดแทนการใช้เอนไซม์ทางการค้าในการผลิตเอทานอล วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษากระบวนการหมักที่เหมาะสมในผลิตเอทานอล ด้วยเชื้อผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และรายย่อยแป้ง พบว่า กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF) ของเชื้อผสม *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ในอัตราส่วน 1:1 ปั่นที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.35 ±0.18 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 ซึ่งกระบวนการ SSF มีขั้นตอนไม่ยุ่งยากและใช้ระยะเวลาสั้นกว่ากระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separated Hydrolysis and Fermentation, SHF) และเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล โดยศึกษา 4 ปัจจัย ได้แก่ อัตราส่วนของหัวเชื้อยีสต์และรา ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ชนิดของแหล่งไนโตรเจนและค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก พบว่า การใช้เชื้อผสม *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 อัตราส่วน 1 ต่อ 4 โดยปริมาตร หมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นแหล่งคาร์บอนร้อยละ 8 โดยปริมาตร ปรับพีเอชเริ่มต้น 6 และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 17.91±0.37 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 และมีค่าประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้มีความแตกต่างทางสถิติกับการหมักที่ใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยแป้งอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ในการหมักเอทานอลจากผงมันเทศจึงสามารถทดแทนการใช้เอนไซม์ทางการค้าได้

คำสำคัญ : เชื้อผสม เชื้อราที่ย่อยแป้ง ไบโอเอทานอล มันเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Research Title BIOETHANOL PRODUCTION FROM SWEET POTATO BY CO - CULTURE OF *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 AND SACCHAROLYTIC MOLDS

Researcher Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul

Department of Biology, Faculty of Science,

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Abstract

Bioethanol is an interesting renewable biofuel due to its high combustion efficiency and can be produced from various raw materials. In this research, sweet potato has been used as a carbon source with saccharolytic molds instead of a commercial enzyme for bioethanol production. The objective of this research was to investigate on the optimization of the fermentation process for bioethanol production by co-culture of *S. cerevisiae* TISTR 5088 and saccharolytic molds. The results showed that the optimized process was simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process with co-culture of *S. cerevisiae* TISTR 5088 and *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 (1:1 ratio) and the cultivation conditions were at 150 rpm, 30 °C. The maximum ethanol concentration was 14.35 ±0.18 g/L obtained after 60 hour, which was higher than separated hydrolysis and fermentation (SHF) process. The SSF process was simpler and required less time than SHF process. The optimization of ethanol production were studied on inoculum ratio, carbon source concentration, type of nitrogen sources. and initial pH of medium. The result showed the ratio of *S. cerevisiae* TISTR 5088 and *A. rouxii* TISTR 3182 was 1:4, inoculated in 8% (w/v) sweet potato as carbon source, initial pH of 6and no additional nitrogen source obtained the maximum ethanol concentration at 17.91± 0.37 g/L and ethanol productivity at 0.30 g/L/h. The maximum ethanol concentration of co-culture of *S. cerevisiae* TISTR 5088 *and A. rouxii* TISTR 3182was significantly more than the maximum ethanol concentration of *S. cerevisiae* TISTR 5088 with commercial enzyme. Thus, the co-culture of *S. cerevisiae* TISTR 5088 and *A. rouxii* TISTR 3182 could produce bioethanol instead of using commercial enzymes.

Keywords : Co-culture fermentation, Saccharolytic molds, Bioethanol, Sweet potato.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของนักศึกษาระดับปริญญาโท สาขาเทคโนโลยีชีวาภาพ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบรายได้คณะฯ ประจำปีงบประมาณ 2560

รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

หัวหน้าโครงการวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข
กิตติกรรมประกาศ ..... ค
สารบัญ ..... ง
สารบัญตาราง ..... ช
สารบัญรูป ..... ฌ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย 1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 เอทานอล 4
2.1.1 การผลิตไบโอเอทานอล 4
2.1.2 วัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอล 6
2.1 มันเทศ 7
2.2.1 องค์ประกอบของมันเทศ 8
2.2.2 ลักษณะทั่วไปของมันเทศ 9
2.3 เอนไซม์อะไมเลส 10
2.3.1 แอลฟาอะไมเลส 12
2.3.2 กลูโคอะไมเลส 13
2.4 ยีสต์ 13
2.4.1 สัณฐานวิทยาของยีสต์ 13
2.4.2 สรีรวิทยาของยีสต์ 13
2.4.3 การขยายพันธุ์ของยีสต์ 14
2.4.4 นิเวศวิทยาของยีสต์ 14
2.4.5 การใช้ยีสต์ในทางอุตสาหกรรม 15
2.4.6 *Saccharomyces cerevisiae* 15
2.5 เชื้อรา 17
2.5.1 ลักษณะสำคัญของเชื้อรา 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

2.5.2 การจำแนกหมวดหมู่ของเชื้อรา 17
2.5.3 *Amylomyces rouxii* 18
2.5.4 *Aspergillus oryzae* 19
2.6 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์และเชื้อรา 20
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 21
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 24
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 24
3.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง 24
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 24
3.3 วัสดุอุปกรณ์ 25
3.5 ขั้นตอนการดำเนินการ 26
3.5.1 การเตรียมวัตถุดิบ 26
3.5.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ 26
3.5.3 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น 26
3.5.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 27
3.5.5 การหมักเอทานอลจากจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 กับเชื้อราจากผงมันเทศ 27
3.5.6 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อรากับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 29
3.5.7 ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอล 29
3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ 30
บทที่ 4 ผลการวิจัยและการอภิปรายผล 31
4.1 การวิเคราะห์องค์ประกอบของผงมันเทศ 31
4.2 การศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) 31
4.2.1 การศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการ SSF 31
4.2.2 การศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อราย่อยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF 33
4.3 การศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

4.3.1 การศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการ SHF 36
4.3.2 การศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อราย่อยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF 38
4.4 เปรียบเทียบผลการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรายย่อยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF และ SHF 41
4.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยกระบวนการ SSF 44
4.5.1 ศึกษาอัตราส่วนของหัวเชื้อยีสต์และราที่เหมาะสม 44
4.5.2 ศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม 47
4.5.3 ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม 49
4.5.4 ศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงที่เหมาะสม 50
4.6 เปรียบเทียบผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 52
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 55
5.1 สรุปผลการวิจัย 55
5.2 ข้อเสนอแนะ 56
เอกสารอ้างอิง 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2.1 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของมันเทศดิบ 100 กรัม 8
2.2 จุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของเอนไซม์อะไมเลสแต่ละชนิด 12
4.1 ส่วนประกอบของผงมันเทศ 31
4.2 ปริมาณเอทานอลสูงสุดและอัตราการผลิตที่ได้ในกระบวนการหมักเอทานอล จากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรา ย่อยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF และ SHF 50
4.3 ปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในกระบวนการหมักแบบ SSF ในอัตราส่วนของหัวเชื้อที่แตกต่างกัน 52
4.4 ปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการหมักแบบ SSF 55
4.5 ปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันในการหมักแบบ SSF 58
4.6 ปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน 61
4.7 ปริมาณเอทานอลสูงสุดและประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในชุดการทดลองที่แตกต่างกัน 64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 มันเทศ 7
2.2 ลักษณะทั่วไปของมันเทศ 9
2.3 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์ 10
2.4 การทำงานของเอนไซม์อะไมเลสแต่ละชนิด 11
2.5 รูปร่างยีสต์และโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์ 13
2.6 การแตกหน่อของยีสต์ 14
2.7 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศของยีสต์ 15
2.8 วัฏจักรการสังเคราะห์เอทานอลจากสารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาลกลูโคส 16
2.9 ลักษณะการเจริญและเส้นใยของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* 19
2.10 ลักษณะการเจริญและเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* 20
4.1 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF 32
4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF 33
4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF 35
4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF 36
4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF 37
4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยเชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF 38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ **หน้า**

4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยเชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF 39
4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยเชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อราผสม *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SF 40
4.9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอลจากการหมักผงมันเทศโดยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อรายอยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF 41
4.10 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอลจากการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อรายอยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF 42
4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักเอทานอลด้วยเชื้อผสมที่มีอัตราส่วน *S. cerevisiae* TISTR 5088 ต่อ *A. rouxii* TISTR 3182 ที่แตกต่างกัน 45
4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักเอทานอลด้วยเชื้อผสม *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกัน 48
4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักเอทานอลด้วยเชื้อผสม *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 50
4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักเอทานอลด้วยเชื้อผสม *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน 52
4.15 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะที่แตกต่างกัน 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การผลิตไบโอเอทานอลได้รับความสนใจทั่วโลก ซึ่งเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการลดภาวะโลกร้อนและเป็นการรักษาความมั่นคงของพลังงานไว้ ขณะที่ปริมาณและราคาของน้ำมันและก๊าซธรรมชาติเพิ่มสูงขึ้น การใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ในการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมัก และใช้วัตถุดิบประเภทคาร์โบไฮเดรตในการผลิตพลังงานทางเลือกกำลังได้รับความสนใจ (Ward and Singh, 2002) และได้พยายามหาวัตถุดิบทางเลือกใหม่มาใช้ผลิตเอทานอลแทนการใช้อ้อย กากน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ในการผลิตเอทานอล

มันเทศ (*Ipomoea batatas* L.) เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน เนื่องจากมีองค์ประกอบทางเคมี และมีปริมาณแป้งที่สูงเมื่อเทียบกับชีวมวลชนิดอื่น สามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบทางเลือกใหม่ในการผลิตเอทานอลโดยผ่านกระบวนการหมัก (Hang et al, 1981, 1986., Roukas, 1994) มันเทศเป็นพืชในเขตร้อนและเขตอบอุ่น มีราคาถูก สามารถหาได้ง่ายตลอดทั้งปี ประกอบด้วยแป้ง 178 กรัมต่อกิโลกรัม น้ำตาลทั้งหมด 26 กรัมต่อกิโลกรัม และโปรตีน 3.2 กรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักสด (Tian et al, 1991) ซึ่งถูกย่อยไปเป็นมอนอเมอร์ของคาร์โบไฮเดรต และถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์

กระบวนการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน (fuel ethanol) จากวัตถุดิบประเภทแป้ง ประกอบด้วยกระบวนการ 3 ขั้นตอน ดังนี้ (Sree et al, 2004)

1. Liquefaction ของแป้งโดยใช้เอมไซม์ α-amylase
2. Saccharification โดยใช้เอมไซม์เพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคส
3. Fermentation หมักกลูโคสไปเป็นเอทานอล

ในทางการค้านิยมใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการทำให้เกิดกระบวนการ Saccharification (Neves et al, 2006) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีราคาแพง การหมักเอทานอลแบบดั้งเดิมนิยมใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตไบโอเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง ในกระบวนการ Liquefaction ต้องใช้อุณหภูมิสูง 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้แป้งเกิดการหนืดและพองตัว ซึ่งขั้นตอนนี้ใช้พลังงานค่อนข้างสูง ประมาณร้อยละ 30-40 ของพลังงานทั้งหมดที่ใช้ผลิตเอทานอลจากแป้ง มีการพัฒนากระบวนการหมักไบโอเอทานอล โดยใช้กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลพร้อมกระบวนการหมัก (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) ซึ่งกระบวนการนี้สามารถลดการใช้พลังงานลงได้ และเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้ซับสเตรท (koutinas et sl, 1007) มีงานวิจัยมากมายมาใช้กระบวนการ SSF ในการหมักไบโอเอทานอล (kurosawa et al,1988., Hwang et al, 2007)

การใช้จุลินทรีย์ร่วมกันในการหมักไบโอเอทานอลเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ปรับปรุงกระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น Swain และคณะ (2013) ใช้เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ เช่น *Trichoderma* sp. เลี้ยงร่วมกับเชื้อยีสต์ *Sacchoromyces cerevisiae* ที่สามารถหมักเอทานอลได้สูง นอกจากนี้ Lee และคณะ (2012) ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แป้งมันเทศโดยใช้การตรึงเซลล์ร่วมกันของเชื้อรา *Aspergillus oryzae, Monascus purpureus* และ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น

งานวิจัยก่อนหน้านี้ผู้วิจัยได้ศึกษาศักยภาพในการนำมันเทศมาเป็นวัตถุดิบในการการผลิตไบโอเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์*Saccharomyces cerevisiae* (Duangiai และAmornrat, 2014) และมีการพัฒนาปรับปรุง กระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงขึ้น เช่น ทำการกลายพันธุ์เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* โดยการใช้รังสียูวี (UV radiations) และใช้เอทธิลมีเทนซัลโฟเนต (ethylmethanesolfonate, EMS) (Pitiporn และคณะ 2014) รวมทั้งการตรึงเซลล์ *Soccharomyces cerevisae*

งานวิจัยนี้เป็นการพัฒนาปรับปรุงกระบวนการผลิตไบโอเอทานอลให้สูงขึ้น โดยใช้วัตถุดิบเป็นแป้งมันเทศ และลดขั้นตอนการใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification) ซึ่งเอนไซน์มีราคาสูง โดยใช้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* และ *Aspergillus oryzae* ซึ่งเชื้อราเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลส และกลูโคอะไมเลสย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้ และนำมาหมักร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งเป็นเชื้อยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้สูง

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อร่วมกันระหว่างเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 กับ *A. oryzae* และ *A. rouxii*. ใช้กระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยน้ำตาลเกิดขึ้นพร้อมการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation)
2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมจากการใช้เชื้อรวมกันของเชื้อยีสต์กับเชื้อราที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักไบโอเอทานอล เช่น การใช้อัตราส่วนของเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ และแหล่งไนโตรเจน
3. เพื่อศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อรากับเชื้อยีสต์ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้น และศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก เช่น ค่าความสามารถในการผลิตเอทานอล (productivity)

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาความสามารถในการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยเชื้อเดียวของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 กับ *A.rouxii* และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอลจากการใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อยีสต์และเชื้อรา เช่น อัตราส่วนระหว่างเชื้อยีสต์ต่อเชื้อราและแหล่งไนโตรเจน จากนั้นศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อรากับเชื้อยีสต์ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้น รวมทั้งศึกษาค่าทางจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมัก

1.4 วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ใช้กระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1 โดยเตรียมหัวเชื้อยีสต์เริ่มต้น (starter) ในอาหารYPD (Yeast Extract peptone Dextrose) ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ได้ 0.5 (มีเซลล์ยีสต์ประมาณ $1x10^6$-10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) (Petrea, 2008)

1.2 การเตรียมวัตถุดิบ นำมันเทศปอกเปลือก หั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ อบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จนแห้ง นำมาปั่นให้ละเอียด กรองผ่านตะแกรงจะได้แป้งมันเทศที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 300 ไมโครเมตรจากนั้นชั่งแป้งมันเทศ 40 กรัม เติมน้ำกลั่น 500 มิลลิตร (ร้อยละ 8 น้ำหนักโดยบริมาตร) นำไปให้ความร้อน 90-100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แบ่งสารละลายแป้มันเทศใส่ขวดรูปชมพู่ นำฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็น เวลา 20 นาที

1.3 การเตรียมสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

นำสารละลายแป้งมันเทศที่ได้จากข้อ 1.2 ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05
(น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

1.4 การหมักเอทานอลจากสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ หมักด้วยเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการ SSF

นำสารละลายแป้งมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน
10 นาที เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.015 (น้ำหนักโดยบริมาตร) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมหัวเชื้อยีสต์ร้อยละ 10 โดยปริมาตร ใช้แอมโมเนียมคลอไรด์(NH_4CL) เป็นแหล่งไนโตรเจน ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหนักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือด้วยวิธี DNS วัดพีเอชของน้ำหมัก ปริมาณเอทานอลโดยเครื่อง Gas Chromatogaphy (GC) และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์โดยวิธี spread plate

ขั้นตอนที่ 2 การหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรา *Amylomyces rouxii* ใช้กระบวนการหมักแบบ SSF

2.1 เตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A.rouxii*

นำ *A.rouxii* TISTR 3182 เลี้ยงบนอาหารแข็ง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน เ
ผสมทวีน 80 ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 (Ohta และ Hayashida, 1983) ปริมาณ 3-5 มิลลิลิตรต่อหลอด นำสารละลายสปอร์มาวัดโดยใช้ฮีมาไซมิเตอร์ให้มีจำนวนสปอร์ $1x10^7$-10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

2.2 กระบวนการหมักเอทานอล

นำสารละลายแป้งมันที่ได้จากข้อ 1.2 เติมสารละลายสปอร์ของ *A.rouxii* และสารละลายยีสต์ *S.cerevisiae* TISTR 5088 โดยใช้ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เติมแอมโมเนียมคอลไรด์ได้เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.2(น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้อัตราส่วนเชื้อราต่อยีสต์ 1:1 (Swain และคณะ, 2013) บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30. องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทุกๆ 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ดังหัวข้อ 1.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนที่ 3 การหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus oryzae* ใช้กระบวนการหมักแบบ SSF

3.1 เตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *A.oryzae* เตรียมเช่นเดียวกับสารละลายสปอร์เชื้อ *A.rouxii*

3.2 กระบวนการหมัก

นำสารละลายแป้งมันเทศที่ได้จากข้อ 1.2 เติมสารละลายสปอร์ของ *A.oryzae* สารละลายยีสต์ *S.cerevisiae* TISTR 5088 โดยใช้ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เติมแอมโมเนียมคอลไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ใช้อัตราส่วนเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ 1:1 บ่มสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหนัก วิเคราะห์ต่างๆ เหมือนหัวข้อ 1.4

ขั้นตอนที่ 4 การหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรา *A.rouxii* และ *A.oryzae* ใช้กระบวนการหมักแบบ SSF โดยนำสารละลายแป้งมันเทศที่ได้จากข้อ 1.2 tเติมสารละลายสปอร์ของA. *A.rouxii* และ *A.oryzae* และ สารละลายยีสต์ *S.cerevisiae* TISTR 5088 โดยใช้รอยละ 10 โดยปริมาตร เติมแอมโมเนียมคอลไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจนความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร)ใช้อัตราส่วนเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ 1:1 บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักวิเคราะห์ผลเหมือนหัวข้อ 1.4

ขั้นตอนที่ 5 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรา *A.rouxii* และ *A.oryzae* จากนั้นคัดเลือกการหมักโดยใช้เชื้อราที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไบโอเอทานอลต่อไป

ขั้นตอนที่ 6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักไบโอเอทานอลจากเชื้อที่คัดเลือกได้ในขั้นตอนที่ 5 โดยมีการศึกษาปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

6.1 อัตราส่วนของเชื้อราต่อเชื้อยีสต์

ทำการหมักเหมือนขั้นตอนที่ 2 ในหัวข้อ 2.2 โดยแปรผันอัตราส่วนของเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ ดังนี้ 1:1 1:2 1:4 2:1 และ 4 : 1 ทำอัตราส่วนละ 3 ซ้ำบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที หมักนาน 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS วัด pH ของน้ำหมัก และปริมาณเอทานอลโดยใช้ GC คัดเลือกการใช้อัตราส่วนของเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงมาใช้ในการศึกษาในหัวข้อต่อไป

6.2แหล่งไนโตรเจน

ทำการทดลองเหมือนขั้นตอนที่ 2 ในหัวข้อ 2.2 โดยแปรผันแหล่งไนโตรเจน ดังนี้ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์และยีสต์สกัด ใช้ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แลไม่เติมแหล่งไนโตรเจนเป็นชุดควบคุม ใช้อัตราส่วนเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้น และเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักนาน 72 ชั่วโมง ทำการทดลองและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับข้างต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทดลองแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) วิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่ระดับเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($P< 0.05$) โดยDuncan's New Multiple Range Test (DMRT) ใช้โปรแกรมสถิติในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการหมัก โดยใช้เชื้อราที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ แทนการนำเอนไซม์ทางการค้ามาใช้ รวมทั้งลดเวลาในกระบวนการหมักเอทานอลลง
2. เพิ่มประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลโดยการนำเชื้อรามาใช้ร่วมกับเชื้อยีสต์ในการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกแอลกอฮอล์ มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี จุดติดไฟและระเหยง่าย สามารถละลายได้ในน้ำและสารละลายอื่นๆ สูตรทางเคมี คือ C_2H_5OH สามารถนำมาบริโภคและใช้เป็นเชื้อเพลิงในรูปเอทานอลไร้น้ำ(Anhydrous ethanol) ที่มีความบริสุทธิ์สูง (เข้มข้นร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร) หรืออาจใช้เป็นเอทานอลที่มีน้ำ (hydrous ethanol) ซึ่งสามารถนำเอทานอลมาใช้ประโยชน์ได้หลายทาง ดังนี้

1. แอลกอฮอล์ที่ใช้รับประทานได้โดยตรง (Portable Alcohol) ได้แก่ ผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ในอุตสาหกรรมสุราหรืออุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น

2. แอลกอฮอล์ที่ไม่ใช้รับประทานโดยตรง (Industrial Alcohol) ส่วนใหญ่นำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการหมักสารอื่นๆ เช่น กรดอะซิติกและกรดมะนาว ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม หรือสารอินทรีย์อื่นๆ เช่น เอทิลอีเทอร์ เอทิลเอสเทอร์ เอทิลีน อะซีทัลดีไฮด์ ใช้เป็นสารละลายหรือสารสกัดในการผลิตแลกเกอร์ และเครื่องสำอาง ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อโรคในทางการแพทย์ อุตสาหกรรมทางการแพทย์ นอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใยและโลหะอีกด้วย

3. แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิง มีความบริสุทธิ์สูงร้อยละ 95 หรือร้อยละ 99.5-99.6 แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันนี้ สามารถนำมาใช้ผลิตเป็นเชื้อเพลิงได้ 3 แบบ ดังนี้

3.1 เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงทดแทนน้ำมันเบนซินหรือดีเซล ใช้กับเครื่องยนต์ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง โดยแอลกอฮอล์มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 95

3.2 ใช้ผสมกับน้ำมันชนิดอื่นๆ โดยสัดส่วนการผสมเอทานอลกับน้ำมันนั้นมีใช้กันอยู่หลายประเภท เช่น แก๊สโซฮอล์ 95 เป็นการผสมน้ำมันเบนซิน 95 กับเอทานอล ในสัดส่วน 9 : 1 เพื่อที่ยังรักษาค่าออกเทนไว้ได้ในระดับเดิม E85 เป็นเชื้อเพลิงที่ได้จากการผสมน้ำมันกับเอทานอล โดยมีสัดส่วนของเอทานอลสูงถึงร้อยละ 85 และมีค่าออกเทนสูง มีใช้กันในประเทศในแถบบราซิล อเมริกาและยุโรป ซึ่งน้ำมันชนิดนี้ต้องใช้กับรถยนต์ที่มีเครื่องยนต์ทนต่อการกัดกร่อนสูงกว่าปกติ ดังนั้นในการใช้น้ำมันชนิดนี้จึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการเตรียมความพร้อมทั้งในด้านของผู้ใช้รถยนต์และรวมถึงผู้จำหน่ายน้ำมันที่ต้องคำนึงถึงกระบวนการผลิตและขั้นตอนการจัดจำหน่ายด้วย

3.3 เป็นสารเคมีที่ช่วยเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมัน โดยการเปลี่ยนรูปเอทานอลเป็น ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ซึ่งเป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซินที่หลายประเทศประกาศห้ามใช้ เนื่องจากก่อให้เกิดมลภาวะในอากาศสูงกว่าสารเติมแต่งอื่นๆ (Cardona และคณะ, 2010)

2.1.1 การผลิตไบโอเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีโดยมีเอทิลีนเป็นวัตถุดิบ และกระบวนการทางชีวเคมี โดยใช้พืชผลหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ ซึ่งกระบวนการนี้ได้รับความนิยม เพราะมีวัตถุดิบที่สามารถเลือกใช้ได้หลากหลายตามความเหมาะสม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของสภาพแวดล้อมในแต่ละประเทศ โดยกระบวนการผลิตเอทานอล ประกอบไปด้วยขั้นตอนการผลิตหลักๆ 3 ขั้นตอน ได้แก่

1. การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก

การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมักจะขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ ถ้าเป็นวัตถุดิบที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้ย่อยได้ง่าย การจัดเตรียมก็ทำได้ง่าย เช่น กากน้ำตาลหรือน้ำอ้อย เพียงเจือจางความเข้มข้นของวัตถุดิบให้เหมาะสมด้วยน้ำก็สามารถนำไปหมักได้ สำหรับวัตถุดิบที่ใช้ย่อยได้ยาก เช่น หัวมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทแป้ง หรือชานอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบประเภทเส้นใยเซลลูโลส จะต้องนำวัตถุดิบไปผ่านกระบวนการลดขนาดเชิงกลด้วยการหั่น ตัดหรือบด และอาจมีการใช้ความร้อนร่วมด้วยเพื่อเปลี่ยนสภาพวัตถุดิบให้เหมาะต่อการนำไปย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์ วัตถุดิบต้องผ่านหรือไม่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของการหมักและวัตถุดิบที่ใช้แล้วเข้าสู่กระบวนการการหมักต่อไป

2. การเตรียมหัวเชื้อ (Inoculum)

เตรียมหัวเชื้อเพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่แข็งแรง และมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ในการหมัก รวมทั้งต้องปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการ โดยทั่วไปหัวเชื้อที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอล คือ เชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เชื้อยีสต์ที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอล จะต้องเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว กล่าวคือเมื่อใช้วัตถุดิบต่างประเภทกัน อาจต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่แตกต่างกันด้วย เมื่อเตรียมหัวเชื้อแล้วจึงถ่ายลงในถังหมักผสมกับวัตถุดิบ จากนั้นทำการปรับและควบคุมสภาวะของการหมัก เช่น อัตราการให้อากาศ (Aeration rate) อัตราการกวน (Agitation rate) ค่าความเป็นกรดเบส (pH) และอุณหภูมิในระหว่างการหมัก ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของการหมัก ชนิดของผลิตภัณฑ์และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้

3. การหมัก (Fermentation)

ขั้นตอนการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย โดยทั่วไปการหมักแอลกอฮอล์แบ่งออกเป็น 3 ชนิด ได้แก่

1. การหมักแบบครั้งคราว (Batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์โดยอาศัยการเติมวัตถุดิบ สารอาหารและหัวเชื้อลงไปในถังหมักเพียงครั้งเดียวตลอดการหมัก

2. การหมักแบบกึ่งครั้งคราว (Fed batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปในถังหมักมากกว่า 1 ครั้งขึ้นไป เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบและสารอาหารได้ในปริมาณสูงขึ้น

3. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารเข้าไปในถังหมักตลอดเวลา ขณะเดียวกันก็มีการแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกมาตลอดเวลาเช่นกัน ทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูงสุดในระยะเวลาเท่ากันเมื่อเทียบกับการหมักทั้งสองชนิดที่กล่าวมา

4. การแยกผลิตภัณฑ์เอทานอล และทำให้บริสุทธิ์

น้ำหมักที่ได้จากกระบวนการหมักจะนำมาแยกเอทานอลออก โดยใช้กระบวนการกลั่นลำดับส่วน ซึ่งสามารถแยกเอทานอลให้ได้ความบริสุทธิ์ประมาณร้อยละ 95 โดยปริมาตร จากนั้นจึงเข้าสู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรรมวิธีในการแยกน้ำโดยการใช้โมเลคูลาซีพ (Molecular sieve separation) ทำให้เอทานอลมีความบริสุทธิ์ขึ้น โดยมีความเข้มข้นถึงร้อยละ 99.5 (Cardona และคณะ, 2010)

2.1.2 วัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอล

วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตรสามารถแบ่งตามกลุ่มพืชผลการเกษตรที่ใช้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล (Sugar) ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาลและหัวผักกาดหวาน โดยวัตถุดิบเหล่านี้จะมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก ยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการใดๆก่อนการหมัก

2. วัตถุดิบประเภทแป้ง (Starch) ได้แก่ มันสำปะหลัง ธัญพืชและมันฝรั่ง เป็นต้น แป้งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำมาผ่านกระบวนการย่อยจะได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถเข้าสู่กระบวนการหมักได้ ดังนั้นแป้งจะต้องผ่านการย่อยให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ ซึ่งการย่อยแป้งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

การย่อยครั้งแรกหรือการทำให้เหลว (Liquefaction) ขั้นตอนนี้จะใช้กรดหรือเอนไซม์กลุ่มแอลฟาอะไมเลส (Alpha-amylase) ย่อยแป้งที่อุณหภูมิประมาณ 100-105 องศาเซลเซียสให้ได้โมเลกุลขนาดเล็กลงและมีความหนืดลดลง ของเหลวที่ได้จะมีค่าสมมูลเด็กโทรส (Dextrose equivalent ; DE) อยู่ในช่วงร้อยละ 10 -15 เรียกว่า มอลโตเด็กซ์ทริน (Maltodextrin)

การย่อยครั้งสุดท้ายหรือการทำให้หวาน (Saccharification) สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งควรมีสมมูลเด็กซ์โทรสสูง ยีสต์จึงจะทำงานได้ดี ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) เข้าไปย่อยให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยจะใช้เวลาในการย่อยระหว่าง 60-72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการย่อยจะให้ความร้อนเพื่อหยุดกิจกรรมของเอนไซม์และฆ่าเชื้อที่อาจปนเปื้อนก่อนที่จะเข้ากระบวนการหมัก ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลเมื่ออยู่ในสภาพปราศจากอากาศหรือมีอากาศจำกัด

3. วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส (Lignocellulose) ส่วนมากจะเป็นผลพลอยได้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร ได้แก่ ฟางข้าว กากอ้อย ซังข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบกลุ่มนี้มีส่วนประกอบสำคัญ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนินและสารประกอบอื่นๆ เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึกมีลักษณะเป็นเส้นใย เหนียวและไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (Pentose) หลายชนิด เช่น ไซโลส แมนโนส และอะราบิโนส เป็นต้น ไม่ละลายน้ำและเสถียรน้อยกว่าเซลลูโลสมาก ลิกนินเป็นพอลิเมอร์ของฟีนิลโพรเพน ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก ดังนั้นการผลิตเอทานอลจากลิกโนเซลลูโลสจึงประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลัก ดังนี้ (Hamelinck และคณะ, 2005)

ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ (Pretreatment) เป็นการแตกพันธะที่เซลลูโลสจับกับสารประกอบอื่นๆออก เพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) สามารถเข้าถึงและย่อยเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น ซึ่งสามารถทำได้มีหลายวิธี ได้แก่ การย่อยด้วยกรดเจือจาง ย่อยด้วยกรดเข้มข้นและย่อยด้วยด่าง เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบเป็นสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการย่อย (Hydrolysis) มี 2 วิธี คือ การย่อยด้วยกรดและการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งการย่อยมี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกจะเป็นการย่อยเฮมิเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลเพนโตส ขั้นตอนที่สองจะเป็นการย่อยเซลลูโลสได้น้ำตาลกลูโคส

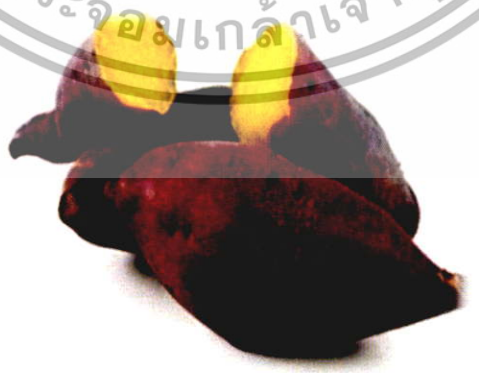
ขั้นตอนการหมักน้ำตาลที่ได้ให้เป็นเอทานอล โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลชนิดนั้นๆได้ เช่น ใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* หมักน้ำตาลกลูโคส หรือใช้เชื้อ *Pichia sitipitis* หมักน้ำตาลเพนโตส เป็นต้น (Cardona และคณะ, 2010)

2.2 มันเทศ

มันเทศ (Sweet potato) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Ipomoea batatas* L. เป็นพืชเถาเลื้อยราบไปบนพื้นดิน ปลูกเป็นพืชไร่ มีอายุยืน มีรากที่ขยายใหญ่เพื่อสะสมอาหาร มีรูปร่าง ขนาด จำนวนและสีของหัวต่างกันตามสายพันธุ์ มันเทศมีการจัดลำดับชั้นอนุกรมวิธาน ดังนี้

Kingdom : Plantae
Phylum : Magnoliophyta
Class : Magnoliopsida
Order : Solanales
Family : Convolvulaceae
Genus : *Ipomoea batatas*

มันเทศเป็นพืชหัวที่มีคุณค่าอาหารสูง มีประโยชน์ในด้านการบริโภคใช้เป็นอาหารของมนุษย์และอาหารสัตว์ได้ทั้งหัว เถา ใบ และยอดอ่อน ในประเทศไทยมันเทศใช้ประกอบอาหารได้หลายชนิด ทั้งคาวหวาน สามารถทำเป็นแป้งมันเทศ เป็นส่วนผสมของอาหารเด็ก อาหารว่างชนิดต่าง ๆ เส้นก๋วยเตี๋ยวมันเทศ แอลกอฮอล์ สุรามันเทศ และทำเป็นกาว เป็นต้น นอกจากนี้มันเทศยังสามารถใช้เป็นอาหารสัตว์ได้หลายชนิด เช่น วัว ควาย แพะ สุกร กระต่าย เป็ด ไก่ และปลา เป็นต้น แป้งมันเทศมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับแป้งมันฝรั่ง สามารถใช้แป้งมันเทศแทนมันฝรั่งได้ (มาลินี และคณะ, 2542)



รูปที่ 2.1 มันเทศ
ที่มา : http://www.agriculturesource.com/p-yam-sweet-potato-887988.html (สืบค้นวันที่ 8 ตุลาคม 2559)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 องค์ประกอบของมันเทศ

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของมันเทศ (Salunkhe and Kadam, 1998) พบว่ามีส่วนประกอบที่สำคัญดังนี้

1. แป้ง (Starch) หัวของมันเทศมีแป้งสูง

2. น้ำตาล (Sugars) ได้แก่ น้ำตาลฟรุคโตส กาแลคโตส ซูโครส กลูโคส มอลโทส และอิโนซิทอล

3. เอนไซม์ (Enzymes) มีเอนไซม์แอลฟาและเบต้าอะไมเลส ซึ่งสามารถทนความร้อนได้และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเก็บรักษาไว้ในโรงเก็บ

4. กรดอินทรีย์ (Organic acid) เป็นกลุ่มสารที่ไม่ระเหย มีผลต่อรสชาติของมันเทศเพียงเล็กน้อย เช่น กรดซัคซินิก มาลิค ซิตริก เป็นต้น ซึ่งมีปริมาณแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์

5. โปรตีน (Proteins) หัวมันเทศมีโปรตีนประมาณร้อยละ 1.0 – 5.0 ของน้ำหนักแห้ง โดยเฉพาะที่บริเวณผิวหรือเปลือก และมีกรดอะมิโนที่สำคัญ

6. วิตามินและแร่ธาตุ (Vitamins and minerals) มันเทศมีวิตามินเอและบีสูง (Yoshimoto, 1998) มันเทศที่มีเนื้อสีเหลืองหรือส้ม จะมีปริมาณของเบต้าแคโรทีนสูง ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตวิตามินเอ และยังมีแร่ธาตุพวกโพแตสเซียมและฟอสฟอรัสในปริมาณมากอีกด้วย

7. สารระเหย (Volatile compounds) สกัดได้จากผิวเปลือกของมันเทศ มีโครงสร้างเป็นวงแหวนกลุ่มอะโรมาติก ได้แก่ สารพวกแอลดีไฮด์ แอลกอฮอล์ คีโตน กรดปาล์มิติก เป็นต้น

8. รงควัตถุ (Pigments) ในมันเทศมีเบต้าแคโรทีนสูงโดยเฉพาะมันเทศที่มีเนื้อสีส้ม หรือเหลืองมากกว่าในมันเทศที่มีเนื้อสีขาว สำหรับมันเทศที่มีเนื้อสีแดงและสีม่วงจะมีแอนโทไซยานินในปริมาณสูง

ตารางที่ 2.1 แสดงคุณค่าทางโภชนาการของมันเทศดิบ 100 กรัม

คุณค่าทางโภชนาการต่อ 100 กรัม (3.5 ออนซ์)					
สารอาหาร		วิตามิน		แร่ธาตุ	
พลังงาน	359 kJ (86 kcal)	วิตามินเอ	0.71 mg	แคลเซียม	30 mg
		บีตา-แคโรทีน	0.85 mg	เหล็ก	0.61 mg
คาร์โบไฮเดรต	20.1 g	ไทอามีน(บี1)	0.078 mg	แมกนีเซียม	25 mg
แป้ง	12.7 g	ไรโบเฟลวิน(บี2)	0.061 mg	แมงกานีส	0.258 mg
น้ำตาล	4.2 g	ไนอาซิน(บี3)	0.557 mg	ฟอสฟอรัส	47 mg
ใยอาหาร	3 g	กรดแพนโทเทนิก(บี5)	0.8 mg	โพแทสเซียม	337 mg
ไขมัน	0.1 g	วิตามินบี6	0.209 mg	โซเดียม	55 mg
โปรตีน	1.6 g	โฟเลต (บี9)	0.01 mg	สังกะสี	0.3 mg
		วิตามินซี	2.4 mg		
		วิตามินอี	0.26 mg		

ที่มา : USDA National Nutrient Database for Standard Reference

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ลักษณะทั่วไปของมันเทศ

มันเทศมีถิ่นกำเนิดในบริเวณเขตร้อนของทวีปอเมริกา โดยจัดเป็นไม้ล้มลุก เลื้อยพันมีความยาวได้ถึง 5 เมตร มีน้ำยางสีขาว ลำต้นทอดเลื้อย รากมันเทศมีระบบรากเป็นแบบรากฝอย ซึ่งจะเกิดจากข้อของลำต้นที่ปลูก หรือเกิดจากลำต้นที่ทอดเลื้อยไปตามพื้นดิน รากมันเทศมีการขยายตัวเพื่อสะสมอาหาร เรียกว่า หัวมันเทศ โดยลักษณะของหัวส่วนมากจะมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก หัวเรียว ท้ายเรียว ส่วนตรงกลางป่องออก และสีผิวของหัวและสีของเนื้อในหัวจะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ โดยอาจจะเป็นสีแดง สีเหลือง สีขาว หรือสีนวล และมักจะมีรากแขนงเกิดในร่องของหัว ผิวของหัวอาจจะเรียบหรือขรุขระ หัวมันเทศนอกจากจะให้อาหารจำพวกแป้งแล้ว ยังอุดมไปด้วยวิตามินเอ (โดยเฉพาะในหัวสีเหลือง) วิตามินบี และวิตามินซีซึ่งมีประโยชน์ และสามารถใช้รับประทานได้ ใบมันเทศจะมีขนาดและรูปร่างต่างกันแม้จะอยู่ในต้นเดียวกันก็ตาม โดยปกติแล้วขอบใบจะเว้าลึกเป็นแฉก 3-7 แฉก ผิวใบเรียบหรือมีขนเล็กน้อย และมักจะมีสีม่วงตามเส้นใบ ก้านใบอาจยาวหรือสั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ ต้นที่ปลูกในเขตอบอุ่นมักจะไม่มีดอก ส่วนต้นที่ปลูกในเขตร้อนจะออกดอก แต่มักจะไม่ติดเมล็ด ออกดอกเป็นช่อ

มันเทศเป็นพืชที่เจริญเติบโตได้ดีในดินร่วนซุยระบายน้ำดี และชอบแสงแดดจัด โดยพืชที่อยู่ในวงศ์นี้จะพบได้มากในแถบเส้นศูนย์สูตรและภายใต้แถบศูนย์สูตร ส่วนในประเทศไทยมีปลูกกันทั่วไป แต่ส่วนใหญ่แหล่งปลูกจะเป็นจังหวัดในภาคกลาง โดยจังหวัดที่ปลูกมันเทศมากได้แก่ เชียงใหม่ เลย นครสวรรค์ พระนครศรีอยุธยา ปทุมธานี นครปฐม เพชรบุรี นครศรีธรรมราช สงขลา และตรัง (มาลินี และคณะ, 2542)

รูปที่ 2.2 ลักษณะทั่วไปของมันเทศ
ที่มา : มาลินี และคณะ (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 เอนไซม์อะไมเลส (Amylase)

เอนไซม์ คือ กลุ่มโปรตีน (Protein) ที่ผลิตโดยเซลล์สิ่งมีชีวิตพบได้ทั้งในพืช สัตว์และจุลินทรีย์ มีหน้าที่เร่งปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ เช่น การสังเคราะห์องค์ประกอบภายในเซลล์ ระบบการย่อยอาหาร โดยย่อยสลายโมเลกุลของอาหารที่มีขนาดใหญ่ให้เล็กลง เป็นต้น

เอนไซม์จะมีความจำเพาะต่อซับสเตรตและทำปฏิกิริยากับซับสเตรตในตำแหน่งเฉพาะเรียกว่า บริเวณเร่ง (Active site) การรวมตัวของเอนไซม์และซับสเตรต (Enzyme and substate complex) จะไม่เกิดหากรูปร่างหรือตำแหน่งของเอนไซม์หรือซับสเตรตที่บริเวณเร่งเปลี่ยนไป เปรียบได้กับแม่กุญแจกับลูกกุญแจ (Lock and key model) เมื่อรวมตัวแล้วเอนไซม์จะทำให้พันธะเคมีในโมเลกุลของซับสเตรตสลายตัวและแตกตัวเป็นโมเลกุลใหม่ที่มีขนาดเล็กลง แสดงดังรูปที่ 2.3

เอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยา ทำให้มีการเคลื่อนย้ายพลังงานจากสถานะหนึ่งไปอีกสถานะหนึ่งซึ่งเอนไซม์จะไปลดค่าพลังงานกระตุ้น (Activation energy) ของปฏิกิริยานั้นๆ ทำให้ปฏิกิริยาเกิดได้เร็วขึ้น โดยไม่มีผลต่อค่าคงที่สมดุลของปฏิกิริยา (จิตติมา, 2553)

รูปที่ 2.3 การเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนสารตั้งต้นเป็นผลิตภัณฑ์
ที่มา : http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0680/enzyme (วันที่ 10 ตุลาคม 2559)

อะไมเลส (Amylase) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่สามารถไฮโดรไลซ์พันธะในโมเลกุลของแป้งให้มีขนาดของโมเลกุลเล็กลง ทำให้ได้เป็นเดกซ์ทรินและน้ำตาล เช่น มอลโทส และ กลูโคส เอนไซม์อะไมเลสถูกค้นพบขึ้นเป็นครั้งแรกในปีค.ศ.1831 โดยศูนย์ฟรีดริช ซึ่งได้อธิบายการย่อยสลายแป้งด้วยน้ำลาย โดยอาศัยเอนไซม์ที่มีชื่อว่า ไทยาลิน (Ptyalin) หรือ อะไมเลส (Amylase) ต่อมาในปีค.ศ. 1833 Anselme Payen และ Jean-Francois Persoz นักเคมีชาวฝรั่งเศสสามารถแยกเอนไซม์อะไมเลสออกจากข้าวบาร์เลย์งอก และตั้งชื่อเอนไซม์อะไมเลสที่พบในข้าวบาร์เลย์งอกว่า diastase หลังจากนั้นในปี ค.ศ.1862 Alexander Jakulowitsch Danilewsky สามารถแยกเอนไซม์อะไมเลสออกจากเอนไซม์เทปซินในตับอ่อนได้ อะไมเลสส่วนใหญ่จึงพบได้ในน้ำลาย ตับอ่อน โดยอะไมเลสที่พบในน้ำลายเรียกว่า ไทยาลิน ซึ่งสามารถพบได้ในคนและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Colon Institute, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส สามารถแบ่งได้ 3 ชนิดคือ

1. แอลฟา-อะไมเลส (Alpha-amylase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลแป้งที่ตำแหน่งแอลฟา 1,4 แบบสุ่ม ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทสและกลูโคสอย่างรวดเร็ว

2. เบตา-อะไมเลส (Beta-amylase) เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ของโมเลกุลแป้งที่ตำแหน่งแอลฟา 1,4 ที่เฉพาะส่วนปลายสายด้านที่เป็นนอนรีดิวส์ (Non reducing end) เข้ามาทีละ 2 หน่วย ทำให้ได้น้ำตาลมอลโทส

3. แกมมา-อะไมเลส (Gamma-amylase) หรือ กลูโคอะไมเลส หรือ อะมิโลกลูโคซิเดส เป็นเอนไซม์ที่ไฮโดรไลซ์พันธะไกลโคไซด์ของโมเลกุลแป้งได้ทั้งตำแหน่งแอลฟา 1,4 และ1,6 จึงสามารถไฮโดรไลซ์โมเลกุลของอะไมโลเพกทิน ซึ่งเป็นโมเลกุลมีสายแขนง โดยจะไฮโดรไลซ์จากส่วนปลายด้านนอนรีดิวส์ (Non reducing end) เข้ามาทีละ 1 หน่วยได้น้ำตาลกลูโคส โดยสามารถผลิตได้ในราและแบคทีเรีย

รูปที่ 4 การทำงานของเอนไซม์อะไมเลสแต่ละชนิด
ที่มา : https://craftdistilleredu.wordpress.com/tag/beta-amylase (10 ตุลาคม 2559)

ในปัจจุบันเอนไซม์ได้เข้ามามีบทบาทในวงการอุตสาหกรรมเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากสามารถควบคุมกระบวนผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น และช่วยลดต้นทุนในการผลิตจากสารเคมีสังเคราะห์ ซึ่งนอกจากจะมีราคาสูงแล้ว ยังอาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมในทางอ้อมอีกด้วย ในอุตสาหกรรมอาหารเอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมที่ใช้วัตถุดิบเป็นแป้ง โดยใช้เอนไซม์อะไมเลสร่วมกับเอนไซม์อื่นเพื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลกลูโคส ในประเทศไทยอุตสาหกรรมอาหารที่มีการใช้เอนไซม์ ได้แก่ อุตสาหกรรมการแปรรูปแป้ง ผลิตไซรัป เบเกอรี่ สารปรุงแต่งรสชาติอาหาร เครื่องดื่มและนม ซึ่งอุตสาหกรรมการแปรรูปแป้งและผลิตไซรัปนั้นเป็นอุตสาหกรรมแรกที่ได้นำเอนไซม์มาใช้ โดยเฉพาะสถิติในช่วง 3 ปี พ.ศ. 2546-2548 พบว่าประเทศไทยนำเข้าเอนไซม์จากต่างประเทศจำนวนมาก เนื่องจากประเทศไทยยังไม่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ต้องการใช้ได้ (พักตร์ประไพ และ วิเชียร, 2546)

ตารางที่ 2.2 จุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งของเอนไซม์อะไมเลสแต่ละชนิด

เชื้อจุลินทรีย์	มวลโมเลกุล	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)
α-amylase		
Bacillus subtillis	41,000	
B. amyloliquefaciens	49,000	70
B. licheniformis	62,000	90
β-amylase		
B. cereus	35,000	50
B. circulans	53-63,000	60
Pseudomonas sp. BQ 6	37,000	45-55
Glucoamylase		
Aspergillus awamori	83,700-88,000	60
A. niger I	99,000	
A. oryzae I	76,000	60
A. oryzae II	38,000	40
Penicillium oxalicum I	84,000	55-66
Rhizopus delemar	100,000	40

ที่มา: http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/0680/enzyme (วันที่ 8 ตุลาคม 2559)

2.3.1 แอลฟาอะไมเลส

เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะไกลโคไซด์ภายในสายพอลิเมอร์ของโมเลกุลแป้งและไกลโคเจนที่ตำแหน่งแอลฟา 1,4 แบบสุ่มทำให้โมเลกุลของแป้งและไกลโคเจนถูกย่อยได้น้ำตาล เช่น น้ำตาลมอลโทส (Maltose) และกลูโคสอย่างรวดเร็ว เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสพบทั่วไปในระบบการย่อยอาหาร (Digestive system) ของมนุษย์และสัตว์ เช่น ในน้ำลายและน้ำย่อยจากตับอ่อน

ในอุตสาหกรรมอาหารใช้เอนไซม์นี้ในการย่อยแป้ง (Starch hydrolysis) ในขั้นตอนการทำ Liquefaction เพื่อลดความหนืดของสารละลายแป้งภายหลังการเกิดเจลาติไนซ์ (Gelatinization) เพื่อผลิตน้ำเชื่อมกลูโคส มีจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์นี้ได้ แสดงดังตารางที่ 2.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase)

มีอีกชื่อ เรียกว่า อะไมโลกลูโคซิเดส (Amyloglucosidase) เป็นเอนไซม์ที่ย่อยพันธะไกลโคไซด์ที่แอลฟา 1,4 และ1,6 จึงสามารถไฮโดรไลซ์โมเลกุลของอะไมโลเพกทิน ซึ่งเป็นโมเลกุลมีสายแขนง โดยจะไฮโดรไลซ์จากส่วนปลายด้านนอนรีดิวส์ (Non reducing end) เข้ามาทีละ 1 หน่วยได้น้ำตาลกลูโคส สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Aspergillus awamori* และ *Rhizopus oryzae* เป็นต้น ซึ่งมีความสำคัญในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Coutinho และ Reilly, 1997)

2.4 ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งอยู่ในอาณาจักรฟังไจ (Fungi) เช่นเดียวกับรา ยีสต์เป็นเซลล์ชนิดยูคาริโอต (Eukaryote) (สาวิตรี, 2540)

2.4.1 สัณฐานวิทยาของยีสต์

โดยทั่วไปขนาดเซลล์ยีสต์ใหญ่กว่าแบคทีเรีย ขนาดของยีสต์แตกต่างกันตั้งแต่ความกว้าง 1-5 ไมโครเมตร และความยาว 5-30 ไมโครเมตรหรือมากกว่า มักมีรูปไข่ แต่บางชนิดมีรูปร่างยาวและบางชนิดเป็นทรงกลม ยีสต์แต่ละชนิดจะมีรูปร่างเฉพาะ แม้จะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ก็ยังมีความแตกต่างที่ขนาดรูปร่างของแต่ละเซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุและสภาพแวดล้อม ยีสต์ไม่มีอวัยวะในการเคลื่อนที่ โดยมีรูปร่างลักษณะดังรูปที่ 2.5 (สาวิตรี, 2540)

รูปที่ 2.5 รูปร่างยีสต์และโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์

ที่มา : เมทินี (2554)

2.4.2 สรีรวิทยาของยีสต์

กระบวนการที่นิยมมากที่สุดของยีสต์ คือการย่อยสลายสารแบบไม่ใช้ออกซิเจน หรือกระบวนการหมักซึ่งผลผลิตสุดท้ายจะได้เอทิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ยีสต์จะได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ไนโตรเจน เพื่อนำไปสร้างโปรตีนและยีสต์ส่วนใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถใช้แอมโมเนียมไอออนได้ ความสามารถในการใช้ไนเตรตและไนไตรต์ และสามารถดึงหมู่อะมิโนออกจากกรดอะมิโน ช่วยแยกความแตกต่างของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ได้

ยีสต์พวกที่ชอบออสโมซิสสูงสามารถเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูงได้ โดยมีความชื้นจำกัด และยีสต์สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0-27 องศาเซลเซียส บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียส ในขณะที่บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ที่ 20-30 องศาเซลเซียส

ยีสต์ที่ก่อโรคเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียส โดยทั่วไปยีสต์เจริญได้ดีในอาหารที่มีความเป็นกรดระหว่างพีเอช 3.5-3.8ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ (ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

2.4.3 การขยายพันธุ์ของยีสต์

ยีสต์ส่วนมากขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อ (Budding) แต่ยีสต์บางชนิดอาจขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยการสร้างสปอร์ที่เรียกว่า แอสโคสปอร์ (Ascospore) หรือเบสิดิโอสปอร์ (Basidiospore) (สาวิตรี, 2540) การขยายพันธุ์ของยีสต์แสดงดังรูปที่ 2.6

รูปที่ 2.6 การแตกหน่อของยีสต์
ที่มา : เมทินี (2554)

2.4.4 นิเวศวิทยาของยีสต์

ยีสต์พบทั่วไปในธรรมชาติและแพร่กระจายไปโดยอาศัยแมลงและกระแสลม ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์ (Saprophyte) อาศัยอยู่บนสารอินทรีย์ที่ตายแล้ว บางชนิดเป็นปรสิตอาศัยโฮสต์ (Host) ที่มีชีวิตและทำให้เกิดโรคแก่คนและพืชได้ จากการสำรวจพบว่ายีสต์สามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมทุกชนิดทั้งน้ำจืด น้ำเค็ม ปากอ่าว และพบมากที่สุดที่ชายฝั่ง เนื่องจากมีสารอาหารสะสมมาก (ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.5 การใช้ยีสต์ในทางอุตสาหกรรม

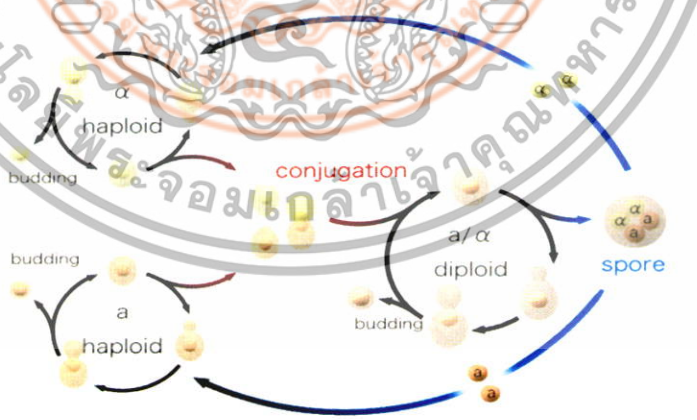
ยีสต์นิยมนำมาใช้ในอุตสาหกรรมมากมาย ได้แก่ อุตสาหกรรมการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เช่น การผลิตขนมปังและซีอิ๊ว เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และอุตสาหกรรมอาหารเสริมของสัตว์จากน้ำเสียของโรงงานกระดาษ เป็นต้น

2.4.6 *Saccharomyces cerevisiae*

การจัดลำดับชั้นอนุกรมวิธานของ *Saccharomyces* sp. (ธีระพงษ์ และคณะ, 2549) เป็นการจำแนกยีสต์ออกเป็นหมวดหมู่ตามสายวิวัฒนาการดังนี้

Kingdom : Fungi
Phylum : Ascomycota
Subphylum : Saccharomycotina (true yeasts)
Class : Ascomycetes
Order : Saccharomycetales
Family : Saccharomycetaceae
Genus : *Saccharomyces*

Saccharomyces cerevisiae จัดเป็นยีสต์แท้ มีวงจรชีวิตได้ทั้งแบบ Haploid (n) และ Diploid (2n) แสดงดังรูปที่ 2.7 แต่ส่วนมากจะพบในรูปของ Diploid ซึ่งมีลักษณะเป็นทรงรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 ไมโครเมตร สำหรับ Haploid จะมีรูปร่างค่อนข้างกลมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 ไมโครเมตร แต่ในระยะ Exponential phase นั้นมักจะพบวงจรชีวิตแบบ Haploid มากกว่า Diploid ซึ่งทั้งสองแบบนี้สามารถแตกหน่อ (Budding) ได้โดยเซลล์ลูกนั้นจะยื่นหน่อออกมาจากเซลล์แม่



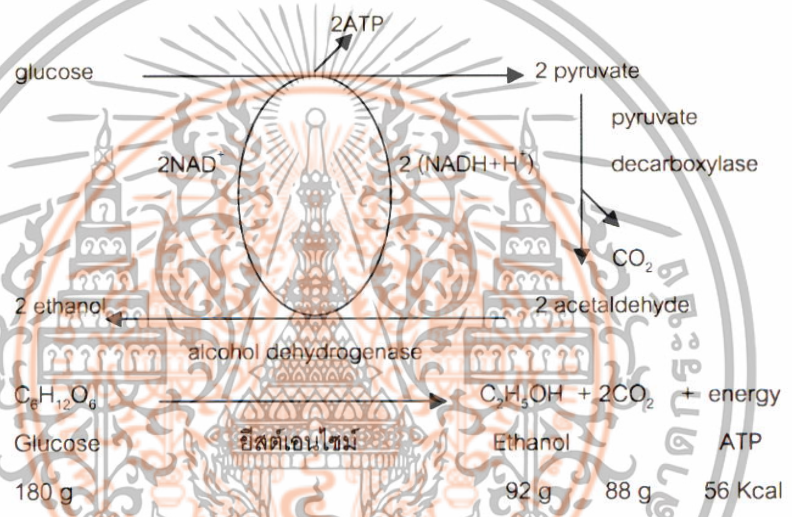
รูปที่ 2.7 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศของยีสต์
ที่มา : http://wiki.yeastgenome.org/index.php/File:Yeast_life_cycle.png (8 ตุลาคม 2559)

Saccharomyces cerevisiae มี Generation time สั้น เจริญได้ง่าย การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างแอสโคสปอร์ ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังการคอนจูเกชัน (Conjugation) หรืออาจพัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากเซลล์ดิพลอยที่อยู่ในระยะเวเจตเททีทีฟ (Vegetative) แอสโคสปอร์มักมีรูปกลมหรือไข่ มีจำนวน 1-4 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัส สปอร์มีลักษณะกลมถึงรี ผิวสปอร์เรียบ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้แต่ใช้เกลือไนเตรตไม่ได้ ยีสต์ชนิดนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารต่างๆ เช่น ผลไม้ น้ำผลไม้ น้ำเชื่อม และน้ำผึ้งเกิดการเน่าเสีย ในขณะเดียวกันยีสต์นี้มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงจึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอล (สาวิตรี, 2549)

การหมักเอทานอลของยีสต์นั้นเกิดจากการที่น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคไลซิสจนได้ไพรูเวต จากน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะให้ไพรูเวต 2 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวตเกิด Decarboxylation โดยเอนไซม์ Pyruvate decarboxylase เป็นตัวเร่งการสร้างอะซิตัลดีไฮด์ ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นเอทานอล โดยมีเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการ รูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 วัฏจักรการสังเคราะห์เอทานอลจากสารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาลกลูโคส
ที่มา : สาวิตรี, (2540) ; Panchal และTavares (1990)

จากสมการให้ผลสรุปทางทฤษฎีได้ว่า การผลิตเอทานอลจากกลูโคส 1 กรัม ให้เอทานอล 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.498 กรัม นั้นคือมีผลผลิตทางทฤษฎี (Theoretical yield) สำหรับการผลิตเอทานอลมีผลผลิตทางทฤษฎีร้อยละ 51.1 เนื่องจากน้ำตาลร้อยละประมาณ 6-12 จะถูกยีสต์ใช้เพื่อการเจริญและบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้บางชนิด เช่น กลีเซอรอล ซัคซิเนท และ Higher alcohol หรือ Fusel oil ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎีเสมอ ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ได้อยู่ในช่วงไม่เกินร้อยละ 90-95 ของผลผลิตทางทฤษฎี โดยผลผลิตพลอยได้ที่เกิดขึ้น เกิดจากการใช้สารตั้งต้นร้อยละ 4-5 และถ้าสามารถป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างผลผลิตพลอยได้เหล่านั้นจะได้เอทานอลเพิ่มขึ้นร้อยละ 2.7 ปัจจุบันการผลิตระดับอุตสาหกรรมเอทานอลที่ได้จะมีค่าเพียงร้อยละ 80-90 ของผลผลิตทางทฤษฎี ซึ่งกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์นอกจากจะให้ผลผลิตที่ต้องการแล้วยังมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนในรูปของ ATP ด้วย (สาวิตรี, 2540 ; Panchal และTavares, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 เชื้อรา

2.5.1 ลักษณะสำคัญของเชื้อรา

เส้นใยของรามีผนังห่อหุ้ม ส่วนใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เอง (Non-motile) ประกอบด้วย Filament มีลักษณะยาว เรียกว่า เส้นใย (Hypha) อาจมีผนังกั้นตามแนวขวาง ระยะผนังกั้นเรียกว่า Septum ซึ่งแบ่งเส้นใยออกเป็นช่องๆ แต่ละช่องเรียกว่า Hyphal segment ผนังของเส้นใยในราส่วนใหญ่ประกอบด้วย Microfibrill ของสารไคติน ราไม่มีคลอโรฟิลล์ จึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงหรือสร้างอาหารได้เอง ดังนั้นราจะได้รับอาหารจากแหล่งภายนอก เรียกว่า Heterotrophic โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 จำพวกตามลักษณะการได้รับอาหาร ได้แก่ Obligate parasite คือ ได้รับอาหารจากเซลล์ของสิ่งมีชีวิตอื่น และดำรงชีวิตเป็นปรสิตเพียงอย่างเดียวตลอดชีวิต Obligate saprobe คือ ได้รับอาหารจากอินทรียวัตถุต่างๆที่ตายแล้ว และดำรงชีวิตเป็นตัวย่อยสลายเพียงอย่างเดียวตลอดชีวิต และอีกพวกสามารถเป็นได้ทั้งปรสิตและตัวย่อยสลายในช่วงชีวิต อาหารสะสมของราพบได้ในรูปของไกลโคเจนและลิปิดเท่านั้น

นิวเคลียสของราสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ การแบ่งนิวเคลียสแบบไมโทซิส (Mitosis) ของรา แตกต่างไปจากพืชและสัตว์อื่นๆ คือ ตลอดระยะการแบ่งนิวเคลียส เยื่อหุ้มนิวเคลียสจะคงอยู่ตลอดเวลา ราส่วนใหญ่มีโครโมโซมรูปร่างเป็นเส้นยาว (Thread-like)

การสืบพันธุ์ของรา สามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือ

ระบบการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (Asexual reproductive system) สปอร์ที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบนี้ไม่ผ่านขั้นตอนการรวมตัวกันของนิวเคลียส และนิวเคลียสมีการแบ่งตัวแบบ Mitosis ได้แต่เพียงอย่างเดียว

ระบบการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (Sexual or perfect reproductive system) มีการผสมระหว่าง Sex cell และนิวเคลียส จึงมีระยะที่นิวเคลียสมีลักษณะเป็น Diploid (2N) และในขั้นสุดท้ายนิวเคลียส 2N มีการแบ่ง meiosis ลดจำนวนโครโมโซม จาก 2N เป็น N ทำให้ได้สปอร์ที่มีลักษณะเป็น Haploid, Sexual spore ที่สร้างโดยรา ได้แก่ Oospore, Zygospore, Ascospore และ Basidiospore (วิจัย, 2551)

2.5.2 การจำแนกหมวดหมู่ของเชื้อรา

เชื้อราอยู่ใน Division Eumycophyta ซึ่งแบ่งเป็น 4 คลาส ได้แก่ (Ainsworth และคณะ, 1983)

1. Class Phycomycetes

เชื้อราในคลาสนี้มีลักษณะที่สำคัญคือ เส้นใยไม่มีผนังกั้น มีนิวเคลียสกระจัดกระจายทั่วเส้นใย เรียกว่า Coenocytic hypha สร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ไม่จำกัดจำนวน Resting spore เกิดจากการสืบพันธุ์แบบมีเพศ มีผนังหนาทำให้ทนต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี ต้องการความชื้นสูงในการเจริญ ส่วนมากเป็นพวกที่อาศัยอยู่ในน้ำ การดำรงชีวิตเป็นแบบ Saprophyte และ Parasite ได้แก่ *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. *Allomyces* sp., *Aprolegnia* sp. และ *Aibugo* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Class Ascomycetes เชื้อราในคลาสนี้มีลักษณะที่สำคัญ คือ เส้นใยมีผนังกั้น สปอร์แบบมีเพศสร้างภายในแอสคัส ในแอสคัสมี 8 แอสโคสปอร์ สปอร์แบบไม่มีเพศจะไม่สร้างในแอสคัส และไม่เคลื่อนที่ ไม่ต้องการความชื้นมากในการเจริญ ได้แก่ ยีสต์ *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp.

3. Class Basidiomycetes เชื้อราในคลาสนี้มีลักษณะที่สำคัญ คือ เส้นใยมีผนังกั้น สปอร์ไม่เคลื่อนที่ สปอร์แบบมีเพศสร้างบนแบซิเดียม โดยแต่ละแบซิเดียมมี 4 Basidiospore เส้นใยเป็นชนิด Binucleate mycelium คือ มีสองนิวเคลียสในแต่ละเซลล์ ได้แก่ เห็ดชนิดต่างๆ

4. Class Deuteromycetes เชื้อราในคลาสนี้มีลักษณะที่สำคัญ คือ เส้นใยมีผนังกั้น การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศจะสร้างสปอร์แบบโคนิเดีย ส่วนการสืบพันธุ์แบบมีเพศยังไม่พบ ถ้ามีการศึกษาพบว่าเชื้อราเหล่านี้มีการสืบพันธุ์แบบมีเพศก็จัดไว้ในคลาสอื่นๆ ได้แก่ พวกที่เป็นสาเหตุของโรคกลากเกลื้อน Hongkong foot

2.5.3 *Amylomyces rouxii* (Hong และ Guarro, 2001)

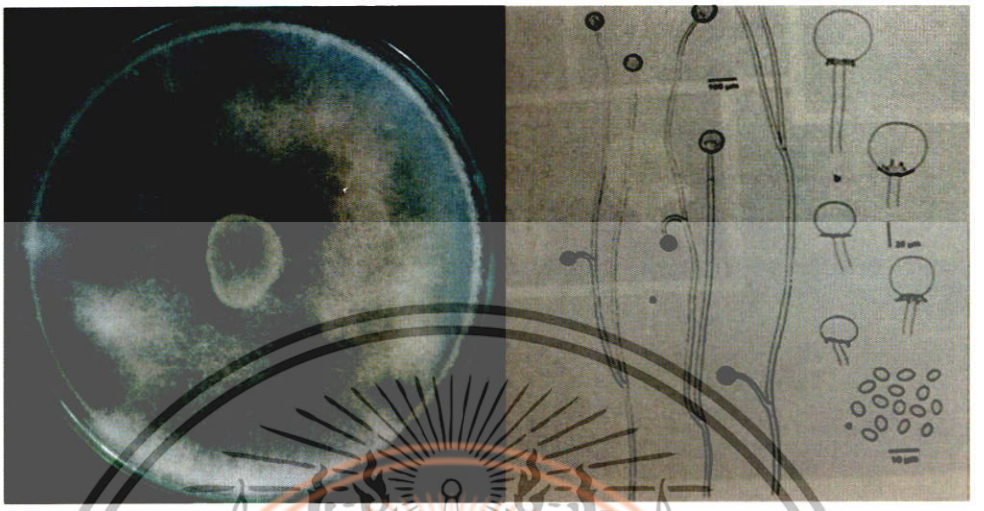
Kingdom : Fungi
Division : Zygomycota
Class : Mucormycotina
Order : Mucorales
Family : Mucoraceae
Genus : Amylomyces
Species : *Amylomyces rouxii*

Amylomyces rouxii หรือ *Mucor rouxii* เป็นราใน Class Zygomycetes ที่เจริญเติบโตได้เร็ว สามารถสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบไม่อาศัยเพศโดยการสร้าง Sporangiospore และแบบอาศัยเพศโดยการสร้าง Zygospore แต่โดยทั่วไปพบว่าการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะมีบทบาทสำคัญต่อการสืบพันธุ์มากกว่าแบบอาศัยเพศ สร้าง sporangiophores ยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร กว้าง 14 ไมโครเมตร sporangia มีขนาดยาว 85 ไมโครเมตร สูง 40-50 ไมโครเมตร zygospore มีรูปร่างกลมหรือเรียบแบน ขนาดประมาณ 100 ไมโครเมตร บริเวณผนังชั้นนอกของสปอร์จะมีโปรตีนและไขมันสะสมอยู่ในปริมาณสูง

นอกจากนี้ *A. rouxii* มีคุณสมบัติที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระหว่างการเจริญเติบโตได้ทั้งแบบเส้นใย (Mycelium) และแบบเซลล์ยีสต์ (Yeast-like) ตามสภาวะแวดล้อมของการเจริญ (Orlowski และ Sypherd, 1978) คุณสมบัติต่างๆเป็นข้อได้เปรียบอย่างมากในการเพาะเลี้ยงราชนิดนี้ในถังหมัก เพราะช่วยลดปัญหาในเรื่องการถ่ายเทออกซิเจนและการส่งผ่านสารอาหาร และลดการถูกทำลายของเซลล์เนื่องมาจากแรงเฉือนได้ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเมื่อเทียบกับราชนิดอื่นๆ นอกจากนั้น *A. rouxii* ยังใช้ในการย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลก่อนเข้าสู่การหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ เพื่อลดการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายแป้งก่อนการหมัก (Webster, 1979) *Amylomyces rouxii* มีความใกล้เคียงกับ *Rhizopus oryzae* (Montiel และคณะ, 2004; Kito และคณะ, 2009) แต่การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะใช้ คลาไมโดสปอร์ (chlamydospores) ซึ่งเป็นสปอร์ที่เกิดจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นใยในการแพร่กระจายมากกว่า สปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospore) ที่เกิดภายในถุงสปอร์แรงเจียม (sporangium) (Tanimura และคณะ, 1977)



รูปที่ 2.9 ลักษณะการเจริญและเส้นใยของเชื้อรา *Amylomyces rouxii*
ที่มา : Hong และ Guarro, (2001)

2.5.4 *Aspergillus oryzae*

Kingdom : Fungi
Division : Ascomycota
Class : Eurotiomycetes
Order : Eurotiales
Family : Trichocomaceae
Genus : *Aspergillus*
Species : *Aspergillus oryzae*

Aspergillus oryzae เป็นเชื้อราใน Family Trichocomaceae จัดเป็นราในกลุ่ม Ascomycetes โคโลนีของเชื้อรา *Aspergillus* มีสีเขียว มีเส้นใยที่แตกแขนง มีผนังกั้น และไม่มีสีเซลล์ของเส้นใยมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นรูปตัวแอลหรือตัวที มีเซลล์สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่า โคนิเดีย (Conidia) มีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 – 4.5 ไมโครเมตร ส่วนปลายของก้านชูโคนิเดียก้านชูมีผนังหนา เรียบ จะเจริญโป่งออกเป็นเวสซิเคิล (Vesicle) ซึ่งมีรูปร่างค่อนข้างกลมและมีขนาดใหญ่ โคนิเดียที่สร้างขึ้นภายหลังจะดันโคนิเดียอันแรกๆออกมา และยังติดต่อกันอยู่จึงเกิดเป็นสายของโคนิเดีย (Klich,2002) ดังแสดงในรูปที่ 2.10 เชื้อราชนิดนี้ที่มีความสำคัญในการเป็นผู้ย่อยสลายสารต่างๆในระบบนิเวศ โดยมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ พบทั่วไปใน ดิน พืช เมล็ดพืช และอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aspergillus oryzae เป็นเชื้อราประเภทที่มีเส้นใย อยู่ในสกุล Aspergillus ซึ่งนิยมนำมาใช้ประโยชน์ในการหมักอาหาร โดยราชนิดนี้จะนิยมใช้ในอาหารจีนและอาหารญี่ปุ่น สำหรับการหมักซีอิ๊วจากถั่วเหลือง โดยเตรียมหัวเชื้อที่ใช้เพื่อการหมักอยู่ในรูปของโคจิ (Koji) นอกจากนั้นยังใช้กับกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลในข้าว ธัญพืช และมันฝรั่งในการทำเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น สาเก และมักก็อลลี ซึ่งการนำ *A. oryzae* มาใช้นั้นมีมาตั้งแต่ 2,000 ปีที่ผ่านมา ซึ่งใช้ในการทำน้ำส้มสายชูที่หมักจากข้าว

ลักษณะทางชีวเคมีของราสายพันธุ์นี้ คือ สามารถสร้างเอนไซม์ที่มีแอคติวิตี้สูงพร้อมกับสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดฟูมาลิก กรดซิตริก และกรดแลคติก ทำให้เกิดรสเปรี้ยวในสาโท สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้กำจัดกลูโคสออกจากอาหาร จึงใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารนอกจากยังใช้ผลิตเอนไซม์เซลลูโลสใช้ในการย่อยเซลลูโลสจากวัสดุเหลือใช้ทางเกษตร สามารถเจริญได้ถ้าเติมเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและไนเตรทเป็นแหล่งของไนโตรเจน นอกจากนี้ยังสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยแป้งได้ ได้แก่ สามารถผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส ได้อีกด้วย (Coutinho และ Reilly, 1997)

รูปที่ 2.10 ลักษณะการเจริญและเส้นใยของเชื้อรา *Aspergillus oryzae*
ที่มา : foodnetworksolution.com/wiki/word/1438/aspergillus (10 ตุลาคม 2559)

2.6 กระบวนการหมักแอลกอฮอล์โดยเชื้อยีสต์และเชื้อรา

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมัก ประกอบด้วยจุลินทรีย์ในกลุ่มของฟังไจ 2 ประเภทคือ รา และยีสต์ ซึ่งเป็นการใช้แป้งมันเทศทำปฏิกิริยาในการหมักแอลกอฮอลล์จัดเป็น Multiparallel fermentation หมายถึง กระบวนการหมักที่มีหลายปฏิกิริยาและเกิดขึ้นพร้อมๆกัน ซึ่งแบ่งเป็น 2 ขั้นตอนหลักตามสภาวะของการหมักและประเภทของจุลินทรีย์ โดยขั้นตอนแรก เป็นกระบวนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification) โดยราจะสร้างเอนไซม์กลุ่มอะไมเลส ประกอบด้วยแอลฟาอะไมเลสและกลูโคอะไมเลส ย่อยโครงสร้างแอลฟาฟอร์มในโมเลกุลของเม็ดแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ น้ำตาลโมเลกุลคู่และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว ตามลำดับ สำหรับราแล้วสภาวะการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการอากาศ กลุ่มที่มีความสำคัญและมีบทบาทในการสร้างเอนไซม์ปริมาณมาก ได้แก่ จีนัส *Rhizopus* sp. เช่น *R. oligosporus R. oryzae R. japonicas R. arrhizus* จีนัส *Mucor* sp. เช่น *M. rouxii* (*Amylomyces rouxii*) *M. fragilis* เป็นต้น สำหรับยีสต์ในระยะแรกจะยังไม่เกิดกระบวนการหมัก แต่จะมีการแตกหน่อเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วจนมีปริมาณที่มากพอ ประกอบกับสภาวะความเป็นกรดที่ราสร้างให้ ราซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ (Strictly Aerobe) ในการเจริญจะหยุดกิจกรรม ส่วนยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ทั้งสองสภาวะ (Facultative Anaerobe) ก็จะเปลี่ยนรูปแบบการสร้างพลังงานจากการหายใจที่ใช้ออกซิเจน (Aerobic Respiration) มาเป็นกระบวนการหมักหรือการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน (Alcoholic Fermentation หรือ Anaerobic Respiration) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่สอง ที่เป็นกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลรีดิวซ์ให้เป็นแอลกอฮอล์ ยีสต์ที่สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลเฟอร์เมนต์ซึ่งผลิตแอลกอฮอลล์ได้ คือ ยีสต์ในกลุ่ม Ascomycetes ได้แก่ *Saccharomyces* sp. เช่น *S. cerevisiae* และ *S. diastaticus* ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในถังหมักจึงเรียงลำดับจาก Saccharification ของแป้งเป็นน้ำตาลเฟอร์เมนต์ชนิดต่างๆและกลูโคส โดยเอนไซม์อะไมเลสจากรา ตามด้วยยีสต์ที่จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และความร้อนพร้อมๆกับการผลิตกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดซัคซินิก กรดมาลิก กรดแลคติก และกรดแอซิติก (มณชัย, 2546)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิมลักษณ์ (2549) ศึกษาเชื้อราและยีสต์ที่คัดแยกได้จากลูกแป้งเหล้า 20 ตัวอย่างในอาหารเหลว คัดแยกเชื้อราได้ 87 ไอโซเลทและเชื้อยีสต์ได้ 30 ไอโซเลท เชื้อรา 3 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยแป้งได้สูงคือ MNT 037 MNT 029 และ MNT 006 โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสอยู่ในช่วง 0.69-8.97 ยูนิตต่อมิลลิเมตร จากการจัดจำแนกพบว่าเชื้อรา MNT 037 คือ *Amylomyces rouxii* เชื้อรา MNT 029 คือ *Aspergillus oryzae* และเชื้อรา MNT 006 คือ เชื้อรา *Rhizopus oryzae* ยีสต์ 2 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการหมักเอทานอลสูง คือ YRK 017 และ YRK 025 จากการจัดจำแนกพบว่าเป็นเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida pelliculosa* จากนั้นนำเชื้อราและยีสต์มาศึกษาความสามารถในการหมักสาโทโดยใช้เชื้อผสมในอัตราส่วนต่างๆพบว่าจากการหมักโดยใช้เชื้อรา *Amylomyces* sp. ร่วมกับ *S. cerevisiae* ในอัตราส่วน 1:1 จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์สูงสุดคือร้อยละ 14.23 จากการหมักที่อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน

Tian และคณะ (1991) ได้ศึกษาส่วนประกอบของแป้งมันเทศเนื่องด้วยมันเทศเป็นผลผลิตทางการเกษตรชนิดหนึ่งที่มีความสำคัญเป็นอย่างมากในแถบประเทศที่มีภูมิอากาศร้อน มันเทศสามารถนำมาทำเป็นอาหารให้ทั้งคนและสัตว์ แป้งมันเทศเป็นส่วนผสมสำคัญที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม ในการศึกษานี้ศึกษาองค์ประกอบของแป้งมันเทศและนำไปเปรียบเทียบกับองค์ประกอบทางเคมีกับแป้งอื่นๆโดยหัวมันเทศสดจะประกอบด้วยแป้ง 178 กรัมต่อกิโลกรัม ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 26 กรัมต่อกิโลกรัม และโปรตีน 3.2 กรัมต่อกิโลกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jeon และคณะ (2008) ศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันฝรั่ง โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อรา *Aspergillus niger* ในถังหมัก พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *A. niger* ในสภาวะที่มีอากาศ เชื้อชนิดนี้จะสามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ภายนอก (extracellular enzyme) เอนไซม์ชนิดนี้จะเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคส เมื่อเลี้ยงในสภาวะไร้อากาศเชื้อชนิดนี้ไม่สามารถเจริญและผลิตเอนไซม์ได้ ดังนั้นการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* และเชื้อรา *A. niger* ปริมาณออกซิเจนจะมีผลทางลบต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ แต่ทำให้การเจริญของเชื้อราสูงขึ้น ดังนั้นจะเห็นได้ว่าปริมาณออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญในการผลิตเอทานอลจากการใช้เชื้อผสม การใช้กระแสไฟฟ้าเพิ่มเข้ามาในถังหมัก ทำให้การผลิตเอทานอลสูง การใช้แป้งมันฝรั่ง 50 กรัมต่อลิตรหมักโดยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* และเชื้อรา *A. niger* ให้ปริมาณเอทานอล 5 กรัมต่อลิตร เมื่อให้กระแสไฟฟ้าเข้าไปในถังหมัก 4 และ 5 โวลท์ ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้สูงขึ้นเป็น 19 และ 9 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อหมักเป็นเวลา 5 วัน

Manikandan และ Viruthagiri (2009) ศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากรำข้าวสาลีในการหมักเอทานอล โดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อรายอยแป้ง *Aspergillus niger* และยีสต์ทนความร้อน *Kluyveromyces marxianus* วางแผนการทดลองแบบ central composite design (CCD) ศึกษาปัจจัยต่างๆ เช่น ความเข้มข้นซับสเตรท พีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเอนไซม์ ในการทำให้ได้น้ำตาลสูงสุด พบว่าความเข้มข้นซับสเตรทที่เหมาะสมในการหมัก คือ 200 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.5 หมักที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และใช้เอนไซม์ความเข้มข้น 7.5 IU และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเอทานอล พบว่า อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสพีเอช 5.5 และใช้รำข้าวสาลีความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 23.1 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว

Lee และคณะ (2012) ศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากมันเทศ โดยใช้เชื้อราตรึงรูปที่สามารถย่อยแป้งได้ คือ *Aspergillus oryzae* และ *Monascus purpureus* ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* โดยยีสต์ที่เจริญในอาหาร YPD (yeast extract peptone dextrose) ซึ่งมีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 10 จะมีอัตราการหมักสูงสุดร้อยละ 6.0 การตรึงรูปของเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* และ *A. oryzae* หรือ *M. purpureus* เม็ดเจลใช้เวลาในการแข็งตัว 15-60 นาที จากการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* กับเชื้อผสมของ *A. oryzae* และ *M. purpureus* ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ที่พีเอช 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 11 วัน ความสามารถในการผลิตเอทานอลร้อยละ 3.84 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และค่าผลได้ของเอทานอลต่อปริมาณแป้งที่ใช้ไป ($Y_{E/S}$) มีค่าเท่ากับ 0.39 เมื่อใช้ *S. cerevisiae* กับเชื้อผสมระหว่าง *A. oryzae* และ *M. purpureus* ในอัตราส่วน 1:2 จะมีค่าความสามารถในการผลิตเอทานอลร้อยละ 4.08 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และค่าผลได้ของเอทานอลต่อปริมาณแป้งที่ใช้ไปเท่ากับ 0.41 หลังจากการหมัก 9 วัน

Swain และคณะ (2013) ศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมของ *Trichoderma* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 172 กรัมต่อซับสเตรท 1 กิโลกรัม ในอาหารที่มีความชื้นร้อยละ 80 ใช้แหล่งไนโตรเจนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.2 พีเอช 5.0 ปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 10 หมักที่ 30 องศาเซลเซียส เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลา 72 ชั่วโมง ความสามารถในการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อร่วมกันจะสูงกว่าการใช้ *S. cerevisiae* เพียงชนิดเดียวร้อยละ 65

Wu และคณะ (2016) ศึกษาการผลิตไบโอเอทานอลจากเผือกที่เหลือทิ้ง ซึ่งส่วนใหญ่เป็นเปลือกของเผือกที่หลงเหลือจากกระบวนการทางอุตสาหกรรมอาหาร พบว่า สามารถใช้เผือก 170 กรัมต่อลิตร แทนการให้น้ำตาลกลูโคส และสามารถใช้ Corn gluten meal เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ในการศึกษาครั้งนี้ใช้วิธีการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก หรือ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) ด้วยหัวเชื้อ *Kluyveromyces marxianus* K21 ซึ่งเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ทนความร้อนได้สูง เติมหัวเชื้อร้อยละ 5 บ่มที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อผ่านไป 22 ชั่วโมง ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่ 48.98 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการผลิตเอทานอล 2.23 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และสภาวะที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีความเสถียรเมื่อนำมาหมักในถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้น

Izmirlioglu และ Demirci (2016) ได้ศึกษาการปรับปรุงกระบวนการย่อยพร้อมหมัก (SSF) เพื่อผลิตเอทานอลจากมันฝรั่งเหลือทิ้ง ด้วยเชื้อผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* และเชื้อราย่อยแป้ง *Aspergillus niger* พบว่า ใช้วัตถุดิบเป็นมันฝรั่งเหลือทิ้ง 92.37 กรัมต่อลิตร มอลต์สกัด 59.42 กรัมต่อลิตร และเติมไอออนซัลเฟต 0.159 กรัมต่อลิตร หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 35.19 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

3.1.2 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182

3.1.3 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086

จุลินทรีย์เหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการทดลอง

มันเทศ (*Ipomoea batatas* (L.) Poir.) สายพันธุ์เกษตร ซึ่งมีเนื้อสีเหลืองจากตลาดหัวตะเข้ กรุงเทพมหานคร

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.3.1 อาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) broth แสดงในภาคผนวก ก

3.3.2 อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) แสดงในภาคผนวก ก

3.3.3 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 มวลต่อปริมาตร

3.3.4 สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.5 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0 แสดงในข้อ 3.5.2

3.3.6 สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจาก *Aspergillus oryzae* 31.2 U/mg (Sigma, Aldrich CO. Ltd) แสดงในข้อ 3.5.2

3.3.7 สารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสจาก *Aspergillus niger* 31.2 U/mg (Sigma, Aldrich CO. Ltd) แสดงในข้อ 3.5.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วัสดุอุปกรณ์

3.4.1 อุปกรณ์เครื่องแก้ว เช่น จานอาหารเลี้ยงเชื้อ หลอดทดลอง บีกเกอร์ ขวดรูปชมพู่ เป็นต้น

3.4.2 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope) ยี่ห้อ OLYMPUS

3.4.3 Milipore filter เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน

3.4.4 ไมโครปิเปต (Micropipette) ยี่ห้อ GILSON

3.4.5 ตะแกรงร่อนแป้งขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 300 ไมครอน

3.4.6 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น High-Pressure steam sterilizer ES-315 ยี่ห้อ TOMY

3.4.7 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น Bio II Advance ยี่ห้อ Telstar

3.4.8 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น INB 500 ยี่ห้อ Memmert

3.4.9 เครื่องบด รุ่น SK100/C Gusseisen ยี่ห้อ Retsh

3.4.10 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง รุ่น TE 2145 ยี่ห้อ Sartorius

3.4.11 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น CG 842 ยี่ห้อ Schott

3.4.12 เครื่องควบคุมอุณหภูมิแบบแขย่า (Incubator shaker)

3.4.13 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Z 383K ยี่ห้อ HERMLE

3.4.14 ไมโครเวฟ (Microwave) รุ่น T.D.S. Triple Distribution System ยี่ห้อ SAMSUNG

3.4.15 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1601 ยี่ห้อ SHIMADZU

3.4.16 เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) รุ่น GC-2014 ยี่ห้อ SHIMADZU

3.4.18 เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High pressure liquid chromatography) รุ่นLC-20A ยี่ห้อ SHIMADZU

3.4.17 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ยี่ห้อ Memmert

3.4.18 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น UN 110 ยี่ห้อ Memmert

3.4.19 ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5. ขั้นตอนการดำเนินการ

3.5.1 การเตรียมวัตถุดิบ

มันเทศซื้อจากตลาดหัวตะเข้ โดยคัดเลือกมันเทศที่มีเปลือกสีแดง เนื้อสีเหลือง ซื้อในช่วงเดือนสิงหาคม-กันยายน 2558 นำมาล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัดสิ่งปนเปื้อนออก นำมาปอกเปลือกและหั่นเป็นชิ้นบางๆ นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน จนแห้ง จากนั้นนำมาบดให้ละเอียดโดยใช้โถปั่นไฟฟ้า นำผงมันเทศมากรองผ่านตะแกรงจะได้ผงมันเทศที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 300 ไมโครเมตร เก็บผงมันเทศที่ได้ใส่ถุงพลาสติก เก็บเข้าตู้เย็น 8 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

3.5.2.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตต 27.22 กรัม ละลายน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และเตรียมสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยปิเปตกรดอะซิติกเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 11.55 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์โดยนำสารละลายโซเดียมอะซิเตตปริมาตร 352 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดอะซิติกปริมาตร 148 มิลลิลิตร และนำไปปรับพีเอชเป็น 5.0 โดยใช้สารละลายกรดอะซิติก 0.05 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมอะซิเตต 0.05 โมลาร์ (สุวภัทร และคณะ, 2555)

3.5.2.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ชั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 กรัม นำมาละลายในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร แล้วนำไปกรองด้วย Milipore filter เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สุวภัทร และคณะ, 2555)

3.5.2.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

ชั่งเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.06 กรัม นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำไปกรองด้วย Milipore filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอนที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นเก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (สุวภัทร และคณะ, 2555)

3.5.3 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

3.5.3.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

นำ *S. cerevisiae* TISTR 5088 จากอาหารแข็งเอียง PDA 1 ลูป เลี้ยงในอาหารเหลว Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) (ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร เปปโตน 20 กรัมต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิตร และกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายยีสต์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ให้ได้ 0.5 (จะมีเชื้อยีสต์ 1×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จะได้หัวเชื้อยีสต์ (starter) ในการทดลองต่อไป (Petrea, 2008)

3.5.3.2 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้นของเชื้อรา

นำเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 เลี้ยงในอาหารแข็งเอียง PDA บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นใส่สารละลายโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ผ่านการเชื้อแล้ว ปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหลอด ใช้ลูปขูดเพื่อให้สปอร์หลุดจากเส้นใยและกรองด้วยสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำสารแขวนลอยสปอร์มาวัดโดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ให้มีจำนวนสปอร์ 1×10^{7} สปอร์ต่อมิลลิลิตร นำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการทดลองต่อไป โดยวิธีการเตรียมหัวเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 นั้นเตรียมด้วยวิธีการดังกล่าวเช่นเดียวกัน

3.5.4 การเตรียมอาหารหมัก

3.5.4.1 การเตรียมอาหารหมัก

ชั่งผงมันเทศจากข้อ 3.5.1 มาเตรียมสารละลายผงมันเทศที่มีความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักโดยปริมาตร)ในน้ำกลั่น จากนั้นคนให้ผงมันเทศละลายแล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยในระหว่างการให้ความร้อนต้องคนสารละลายผงมันเทศตลอดเวลาเพื่อไม่ให้เกิดการไหม้ นำสารละลายผงมันเทศใส่ลงในพลาสก์ๆละ 80 มิลลิลิตร จำนวน 3 ฟลาสก์ ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.5.4.2 การเตรียมอาหารหมักที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์

นำสารละลายผงมันเทศจากข้อ 3.5.4.1 มาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่เตรียมจากข้อ 3.5.2.2 บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะได้สารละลายผงมันเทศที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

3.5.5 การหมักเอทานอลจากผงมันเทศ ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)

3.5.5.1 การหมักเอทานอลจากมันเทศ ด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเอนไซม์ทางการค้า โดยใช้กระบวนการ SSF

นำสารละลายผงมันเทศจากข้อ 3.5.4.1 ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (เอนไซม์ทางการค้าผลิตจากเชื้อรา *A. oryzae* มีกิจกรรมของเอนไซม์ 37.2 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่ออุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 40 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส(เอนไซม์ทางการค้าผลิตจากเชื้อรา *Aspergillus niger* มีกิจกรรมของเอนไซม์ 72 ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมหัวเชื้อยีสต์ร้อยละ 10 โดยปริมาตร บ่มใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Ochaikul และ Suwannaposri (2014) เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสด้วยเครื่อง High pressure liquid chromatography การทดลองในหัวข้อนี้ใช้เป็นชุดควบคุม (Control)

3.5.5.2 การหมักเอทานอลจากมันเทศด้วยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อรายย่อยแป้ง โดยใช้กระบวนการหมักแบบ SSF

นำสารละลายผงมันเทศจากข้อ 3.5.4.1 เติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราและสารละลายยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ใช้แต่ละสายพันธุ์ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (เชื้อรา 1×10^7 สปอร์ต่อมิลลิลิตรและเชื้อยีสต์ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยใช้อัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อเชื้อรา 1:1 โดยปริมาตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลเหมือน 3.5.5.1

โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดที่ 1 หมักด้วยเชื้อผสมยีสต์และ *A. rouxii* TISTR 3182

ชุดที่ 2 หมักด้วยเชื้อผสมยีสต์และ *A. oryzae* TISTR 3086

ชุดที่ 3 หมักด้วยเชื้อผสมยีสต์และราทั้ง 2 สายพันธุ์

3.5.6 การหมักเอทานอลจากผงมันเทศด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separated Hydrolysis and Fermentation, SHF)

3.5.6.1 การหมักเอทานอลจากมันเทศด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าโดยใช้กระบวนการ SSF

นำสารละลายผงมันเทศจากข้อ 3.5.4.1 ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่ออุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 40 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดสความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เติมสารละลายหัวเชื้อยีสต์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มต่อจนครบ 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลเหมือน 3.5.5.1

3.5.6.2 การหมักเอทานอลจากมันเทศด้วยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรายย่อยแป้ง โดยใช้กระบวนการ SHF

นำสารละลายผงมันเทศจากข้อ 3.5.4.1 เติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมสารละลายหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และบ่มต่อจนครบเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลเหมือน 3.5.5.1

โดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุดที่ 1 หมักด้วย *A. rouxii* TISTR 3182 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์

ชุดที่ 2 หมักด้วย *A. oryzae* TISTR 3086 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์

ชุดที่ 3 หมักด้วยราทั้ง 2 สายพันธุ์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.7 เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรายย่อยแป้งในแต่ละชุดการทดลอง และคัดเลือกมาใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.8 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อรากับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

3.5.8.1 อัตราส่วนของเชื้อราต่อเชื้อยีสต์

ทำการหมักเหมือนหัวข้อ 3.5.5.2 โดยแปรผันอัตราส่วนของเชื้อราต่อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (เชื้อราต่อเชื้อยีสต์) ดังนี้ 1:1 1:2 1:3 1:4 2:1 3:1 และ 4:1 ทำอัตราส่วนละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที หมักนาน 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสด้วยเครื่อง High pressure liquid chromatography คัดเลือกการใช้อัตราส่วนของเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ที่เหมาะสมซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงใช้ในการศึกษาในหัวข้อต่อไป

3.5.8.2 ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน

ทำการหมักเหมือนหัวข้อ 3.5.5.2 โดยใช้อัตราส่วนของเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 3.5.8.1 แปรผันความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ดังนี้ ร้อยละ 4 6 8 และ 10 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักนาน 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง ทำการทดลองและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.8.1

3.5.8.3 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

ทำการหมักเหมือนหัวข้อ 3.5.5.2 โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ได้จากหัวข้อ 3.5.8.2 จากนั้นแปรผันชนิดแหล่งไนโตรเจน ดังนี้ แอมโมเนียมซัลเฟต แอมโมเนียมคลอไรด์ และยีสต์สกัด ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และไม่เติมแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อัตราส่วนเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ที่ได้จากหัวข้อ 3.5.8.1 ทำการทดลองและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.8.1

3.5.8.4 ค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ทำการหมักเหมือนหัวข้อ 3.5.5.2 โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนและชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากหัวข้อ 3.5.8.2 และ 3.5.8.3 จากนั้นแปรผันค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนี้ พีเอช 4, 5, 6 และ 7 โดยใช้อัตราส่วนเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ที่ได้จากหัวข้อ 3.5.8.1 ทำการทดลองและวิเคราะห์ผลเช่นเดียวกับหัวข้อ 3.5.8.1

3.5.9 ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อผสมระว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรายย่อยแป้งในสภาวะที่เหมาะสม

เปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักโดยแบ่งเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่

ชุด A หมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเอนไซม์ทางการค้า

นำสารละลายผงมันเทศจากข้อ 3.5.4.1 ย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่ออุณหภูมิลดลงถึงประมาณ 40 องศาเซลเซียส เติมเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส ความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมหัวเชื้อยีสต์ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลเหมือน 3.5.5.1

ชุด B หมักด้วยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรายย่อยแป้ง

นำสารละลายผงมันเทศจากข้อ 3.5.4.1 เติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราและสารละลายยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ใช้แต่ละสายพันธุ์ร้อยละ 10 โดยปริมาตร โดยใช้อัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อเชื้อรา 1:1 โดยปริมาตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลเหมือน 3.5.5.1

ชุด C หมักด้วยเชื้อผสมระหว่าง S. cerevisiae TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรายย่อยแป้งในสภาวะที่เหมาะสม

นำสารละลายผงมันเทศที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม (ร้อยละโดยปริมาตร) จากการทดลองข้อ 3.5.8.2 นำมาเติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากการทดลองข้อ 3.5.8.3 ทำการปรับพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมจากการทดลองข้อ 3.5.8.4 จากนั้นเติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราและสารละลายยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาตรรวม 20 มิลลิลิตร โดยใช้อัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อเชื้อราที่เหมาะสม (โดยปริมาตร) จากการทดลองข้อ 3.5.8.1 บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลเหมือน 3.5.5.1

3.5.7 ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอล

ศึกษาค่าจลนพลศาสตร์ของกระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อผสมของเชื้อรากับ *S.cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะที่เหมาะสมโดยวิเคราะห์ค่าความสามารถในการผลิตเอทานอล (Productivity of ethanol) เปรียบเทียบกับการใช้เชื้อเดี่ยวของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 คำนวณตามสูตรดังนี้

$$\text{ค่าความสามารถในการผลิตเอทานอล} = \frac{\text{ปริมาณของเอทานอลสูงสุด} - \text{ปริมาณของเอทานอลเริ่มต้น}}{\text{ระยะเวลาในการหมัก}}$$

(กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)

3.5.8 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ในการทดลองวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design , CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$) โดยวิธี Duncan's new multiple range test (DMRT) ใช้โปรแกรมทางสถิติในการวิเคราะห์ข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของผงมันเทศ

จากการนำมันเทศมาอบแห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำมาบดละเอียด กรองผ่านตะแกรงให้ผงมันเทศมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 300 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณเถ้า ปริมาณความชื้น ปริมาณพลังงาน และวิเคราะห์หาพลังงานทั้งหมดจากไขมัน ตามวิธีการในภาคผนวก ข พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 85.73 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 3.37 ไขมันร้อยละ 0.37 เถ้าร้อยละ 2.90 และความชื้นร้อยละ 7.63 แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบของผงมันเทศ

ส่วนประกอบของผงมันเทศ	ปริมาณ
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ร้อยละโดยมวล)	85.73
ความชื้น (ร้อยละโดยมวล)	7.63
โปรตีน (ร้อยละโดยมวล)	3.37
เถ้า (ร้อยละโดยมวล)	2.90
ไขมัน (ร้อยละโดยมวล)	0.37
พลังงานจากไขมัน (กิโลแคลอรีต่อ 100 กรัม)	359.73
พลังงานทั้งหมด (กิโลแคลอรีต่อ 100 กรัม)	3.33

4.2 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultanous Saccharification and Fermentation หรือ SSF)

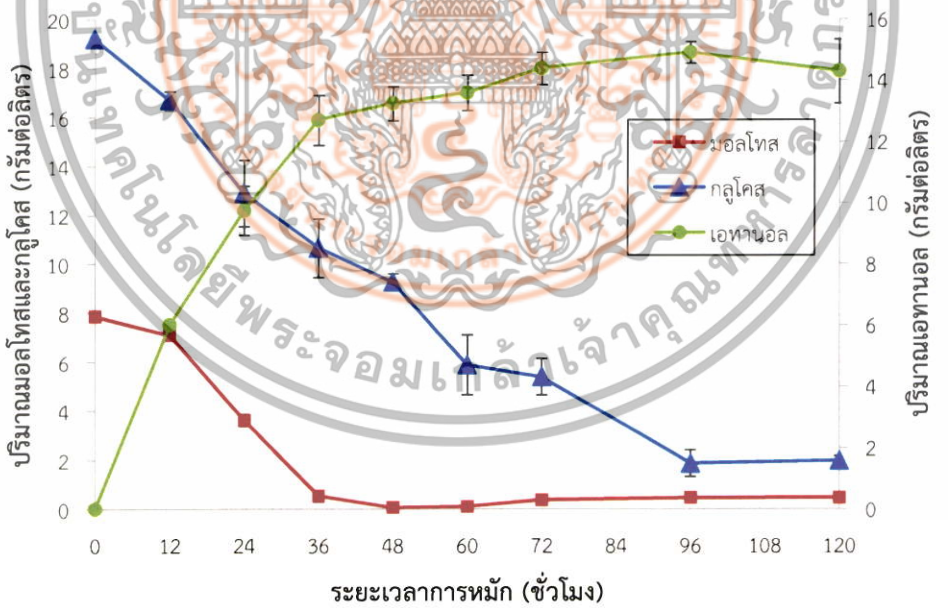
4.2.1 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF (ชุดควบคุม)

จากการนำมันเทศอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นให้เป็นผงละเอียด กรองผ่านตะแกรงให้ขนาดของแป้งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 300 ไมโครเมตร นำมาเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นสารละลายผงมันเทศที่มีความเข้มข้นร้อยละ 6 (น้ำหนักโดยปริมาตร)ในน้ำกลั่น นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จนได้สารละลายผงมันเทศมีลักษณะหนืดและข้น นำสารละลายผงมันเทศแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่ ขวดละ 80 มิลลิลิตร จำนวน 3 ขวด ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิลงประมาณ 40 องศาเซลเซียส นำมาทำการย่อยพร้อมหมัก (SSF)ด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร พร้อมเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง น้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทส จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสในอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงตลอดระยะเวลาในการหมัก โดยน้ำตาลมอลโทสจะลดลงจนหมดในช่วง 36 ชั่วโมงแรก เพราะถูกเอนไซม์ย่อยจนเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหรือน้ำตาลกลูโคส สำหรับน้ำตาลกลูโคสจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 72 ชั่วโมงแรก และในชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) จะเหลือน้ำตาลกลูโคส 1.97±0.34 กรัมต่อลิตร

สำหรับปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้น และมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 14.90±0.61 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลค่อนข้างคงที่ ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล (Van der Maarel และคณะ, 2002) มีผลทำให้น้ำตาลกลูโคสลดลงและแปรผกผันกับปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น แสดงดังรูปที่ 4.1



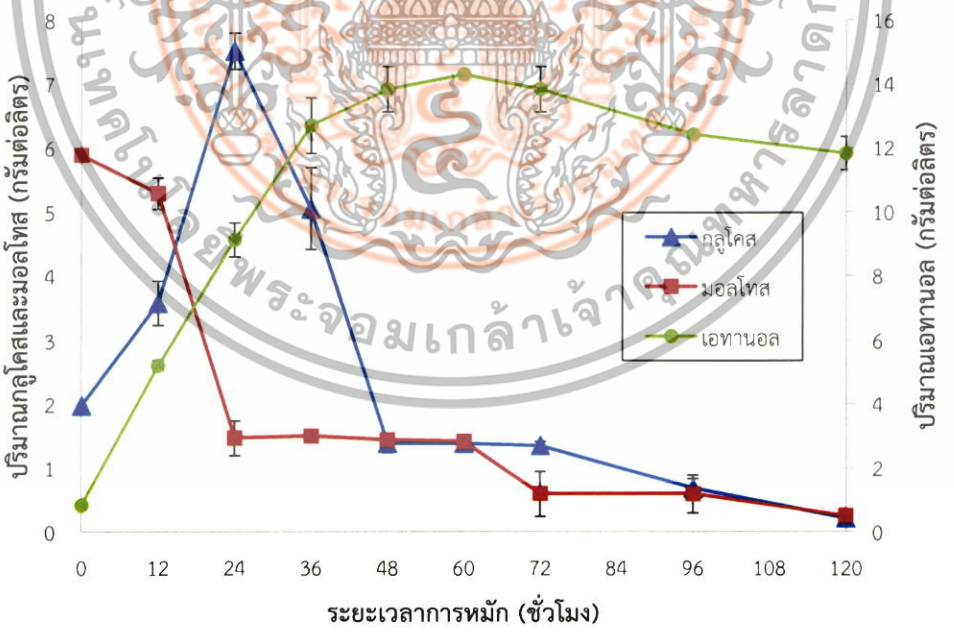
รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรายย่อยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

4.2.2.1 ผลการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF (ชุดการทดลองที่ 1)

จากการนำอาหารหมักเติมสารละลายยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และสารแขวนลอยสปอร์ของ *A. rouxii* TISTR 3182 โดยใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในแต่ละสายพันธุ์ อัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อเชื้อรา 1:1 โดยปริมาตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ผล จากการทดลองพบว่า ในระยะแรกของการหมัก ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งให้ผลผลิตสูงสุด 14.35±0.18 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 แสดงดังรูปที่ 4.2 จากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก พบว่า ปริมาณน้ำตาลมอลโทสจะลดลงอย่างรวดเร็วจนเกือบหมดในช่วง 48 ชั่วโมงแรก ส่วนน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรก เนื่องจากในสภาวะที่มีอากาศเพียงพอ เชื้อรามีการเจริญและสร้างเอนไซม์กลุ่มอะไมเลสเพื่อทำปฏิกิริยาย่อยแป้งหรือน้ำตาลโมเลกุลคู่ (น้ำตาลมอลโทส) ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (น้ำตาลกลูโคส)



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

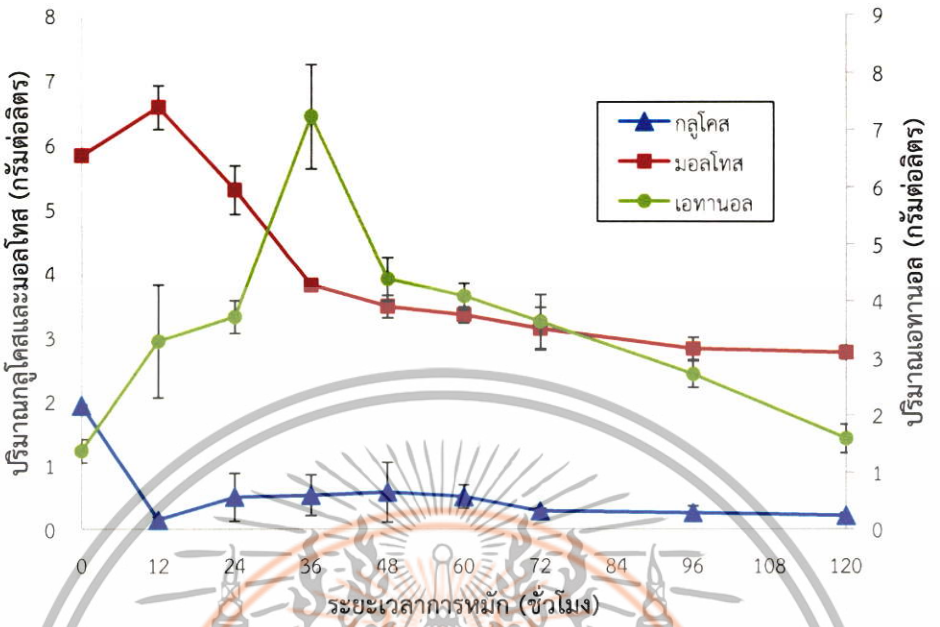
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับยีสต์นั้นจะเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างรวดเร็วในระยะแรกของการหมัก เมื่อปริมาณออกซิเจนเหลือน้อยในกระบวนการหมัก เชื้อราจะมีการเจริญและผลิตเอนไซม์ลดลงมีผลทำให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 24 ยีสต์จะเปลี่ยนรูปแบบมาเป็นการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนหรือกระบวนการหมัก ซึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล จึงทำให้ปริมาณกลูโคสจะลดลงอย่างรวดเร็ว (มณชัย, 2546) จนกระทั่งชั่วโมงที่ 48 ปริมาณกลูโคสและมอลโทสจึงค่อยๆลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการหมัก ดังรูปที่ 4.2 เมื่อน้ำตาลในกระบวนการหมักหมดไป ยีสต์จึงไม่มีสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ดังนั้นปริมาณเอทานอลจึงไม่เพิ่มขึ้นในช่วงท้ายของการหมัก ขณะที่การทดลองของ Swain และคณะ (2013) ศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* และ *Trichoderma* sp. บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็วด้วยอัตราคงที่ในช่วง 72 ชั่วโมงแรกของการหมัก จากนั้นจะลดลงอย่างช้าๆ เช่นเดียวกัน โดยปริมาณน้ำตาลจะแปรผกผันกับน้ำหนักเซลล์แห้งและเอทานอลที่เพิ่มขึ้น โดยให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 72

4.2.2.2 ผลการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. oryzae* TISTR 3182 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF (ชุดการทดลองที่ 2)

จากการนำอาหารหมักเติมสารละลายยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และสารแขวนลอยสปอร์ของ *A. oryzae* TISTR 3086 โดยใช้ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในแต่ละสายพันธุ์ บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะลดลงใน 12 ชั่วโมงแรก อาจเนื่องจากยังไม่มีการผลิตน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้น จึงทำให้ยีสต์ใช้กลูโคสเริ่มต้นที่มีเพียงเล็กน้อยจนหมดไป สำหรับปริมาณน้ำตาลมอลโทสนั้นจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยใน 12 ชั่วโมงแรก เมื่อน้ำตาลกลูโคสหมดไป น้ำตาลมอลโทสจะลดลงอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากเชื้อราผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำตาลมอลโทสเป็นกลูโคส มีผลให้ปริมาณกลูโคสค่อยๆเพิ่มขึ้นแต่เพิ่มในปริมาณเล็กน้อย เพราะในระหว่างที่มอลโทสถูกเปลี่ยนเป็นกลูโคส กลูโคสก็ถูกยีสต์ใช้ไปด้วยเช่นกัน สำหรับปริมาณเอทานอลนั้นจะค่อยๆเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนให้ผลผลิตสูงสุด 7.23±1.57 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 36 ดังแสดงในรูปที่ 4.3 หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะค่อยๆลดลง เนื่องจากเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3086 เป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสได้มากกว่าเอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Carlsen และคณะ, 1996) จึงอาจผลิตกลูโคสได้ไม่เพียงพอต่อความต้องการของเชื้อยีสต์ ยีสต์จึงเริ่มหันมาใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งเป็นลักษณะ diauxic growth กล่าวคือเมื่อน้ำตาลกลูโคสเหลือน้อยหรือหมดลง เชื้อจึงเริ่มใช้แหล่งคาร์บอนชนิดอื่นทดแทนเพื่อการเจริญเติบโต ดังรูปที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

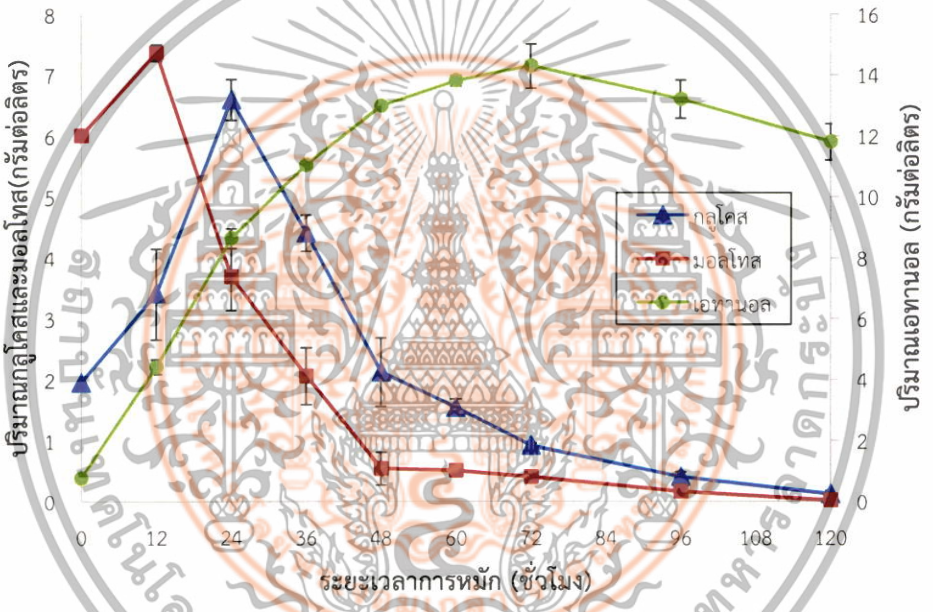
4.2.2.3 ผลการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อราผสม *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF (ชุดการทดลองที่ 3)

จากการนำอาหารหมักเติมสารละลายยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราทั้ง *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 โดยใช้ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในแต่ละสายพันธุ์ หมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง พบว่า การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล และน้ำตาลกลูโคสและมอลโทส มีแนวโน้มเช่นเดียวกันกับการหมักในชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 โดยในระยะแรกของการหมักปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12-36 ชั่วโมง และมีปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.29±1.25 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก พบว่าปริมาณน้ำตาลมอลโทสจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 48 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นจะลดลงเล็กน้อย วันสุดท้ายของการหมักมีน้ำตาลมอลโทส 0.01±0.01 กรัมต่อลิตร สำหรับน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก เนื่องจากเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 มีการเจริญและสร้างเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งเป็นน้ำตาล หลังจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นั้นปริมาณกลูโคสและมอลโทสลดลง อาจเนื่องจากเชื้อยีสต์และราที่นำมาใช้ในการทดลองใช้น้ำตาลทั้งสองชนิดในการเจริญและผลิตเอทานอล (Saito และคณะ, 2014) และใช้น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสเกือบหมดในชั่วโมงที่ 120 แสดงดังรูปที่ 4.4

Izmirlioglu และ Demirci (2016) ศึกษาผลิตเอทานอลจากเศษมันฝรั่งเหลือทิ้ง ด้วยกระบวนการ SSF โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง S. cerevisiae และเชื้อรายอยแป้ง Aspergillus niger หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 35.19 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้แตกต่างกัน อาจเกิดจากสายพันธ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ องค์ประกอบทางเคมีของวัตถุดิบ กระบวนการหมักรวมทั้งสภาวะที่ใช้ในการหมักที่แตกต่างกัน (Chen และคณะ, 2007)



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อราผสม *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

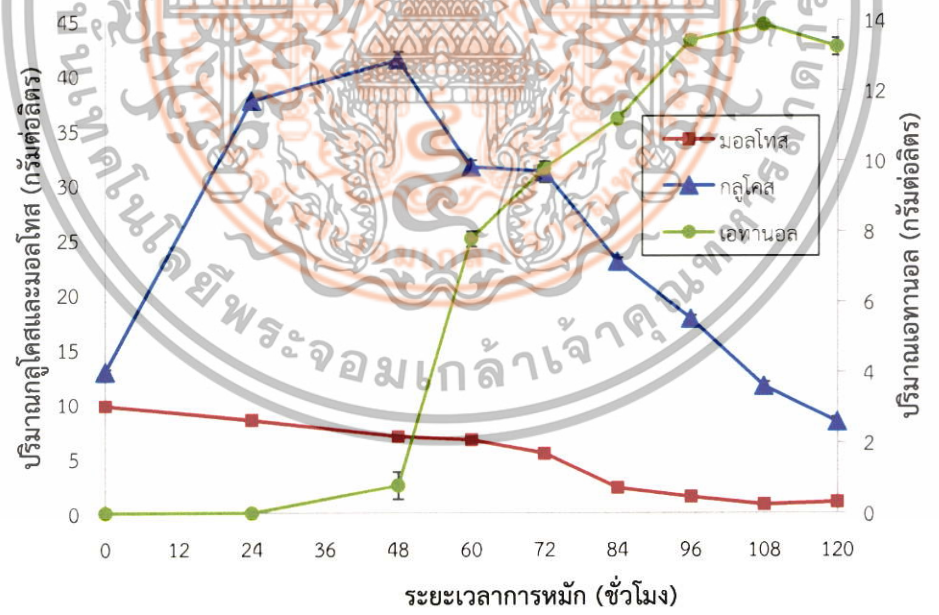
4.3 ผลการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separate Hydrolysis and Fermentation หรือ SHF)

4.3.1 ผลการศึกษาการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF (ชุดควบคุม)

จากการนำอาหารหมักมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นลดอุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลงประมาณ 40 องศาเซลเซียส นำมาเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มในเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และบ่มต่อจนครบเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทส จากการทดลอง พบว่า ปริมาณน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลมอลโทสที่ลดลงเรื่อยๆ ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะไมเลสที่เติมลงไป ได้ไปทำการเปลี่ยนน้ำตาลมอลโทสเป็นน้ำตาลกลูโคส จนทำให้มีปริมาณกลูโคสสูงสุดถึง 41.33±0.28 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีปริมาณมากกว่ากลูโคสสูงสุดในกระบวนการหมักแบบ SSF หลายเท่า เนื่องจากกระบวนการ SSF นั้นเป็นการย่อยพร้อมๆกับการหมัก ทำให้เมื่อมีน้ำตาลกลูโคสเกิดขึ้นจะถูกเชื้อยีสต์ใช้ไปทันที แต่สำหรับกระบวนการ SHF นั้นเป็นการย่อยแยกจากการหมัก ดังนั้นในระหว่างขั้นตอนการย่อย จะไม่มีเชื้อยีสต์เจริญอยู่ ดังนั้นน้ำตาลจึงไม่ถูกใช้ไปส่งผลให้มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นสูงสะสมอยู่ในกระบวนการ ภายหลังจากเติมหัวเชื้อยีสต์ในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีปริมาณเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 108 เท่ากับ 13.87±0.16 กรัมต่อลิตร สำหรับน้ำตาลกลูโคสจะลดลงอย่างต่อเนื่องจากการใช้ของเชื้อยีสต์ และปริมาณน้ำตาลมอลโทสจะลดลงเรื่อยๆและใช้เกือบหมดในที่สุด ดังรูปที่ 4.5



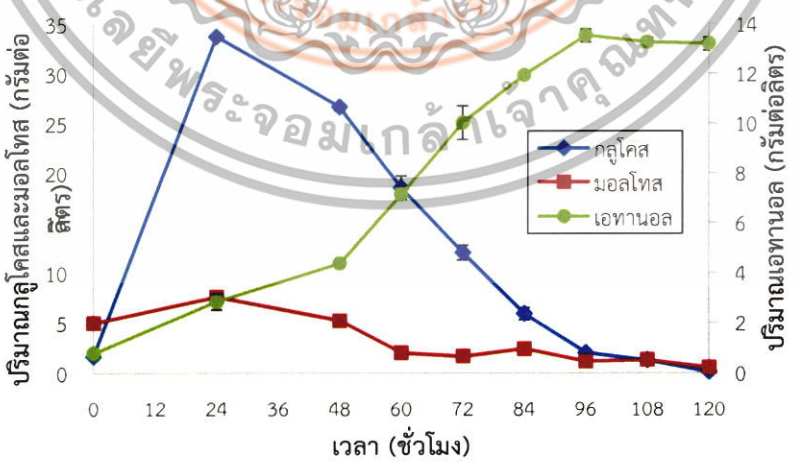
รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2 การศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรายย่อยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

4.3.2.1 ผลการหมักเอทานอลจากมันเทศโดยการใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF (ชุดการทดลองที่ 1)

จากการนำอาหารหมักมาเติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และบ่มต่อจนครบเวลา 120 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ระหว่างการหมักด้วยเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 เพียงเชื้อเดียวใน 48 ชั่วโมงแรก ปริมาณกลูโคสที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วใน 24 ชั่วโมงแรกเช่นเดียวกับการหมักแบบ SSF แต่ให้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสสูงถึง 33.69±0.22 กรัมต่อลิตร เนื่องจากในกระบวนการนี้มีเชื้อราเพียงชนิดเดียวที่เจริญเติบโต จึงทำให้มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสสะสมมาก เพราะไม่มีเชื้ออื่นนำไปใช้ เมื่อปริมาณออกซิเจนลดลง การเจริญและผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งของเชื้อราจะลดลง มีผลทำให้ปริมาณกลูโคสลดลงไปด้วย ในช่วง 48 ชั่วโมงแรกก่อนเติมเชื้อยีสต์ ตรวจพบมีปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ อาจเนื่องจากเชื้อรา *A. rouxii* เป็นเชื้อราสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ โดยให้ผลผลิตไม่มากนัก (Saito และคณะ, 2004) มีผลให้มีปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในกระบวนการหมัก เมื่อเติมหัวเชื้อยีสต์ในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณกลูโคสจะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 108 เนื่องจากยีสต์ที่เติมลงไปใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอล สอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 13.53±0.46 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงเล็กน้อยจนสิ้นสุดการหมัก ดังรูปที่ 4.6

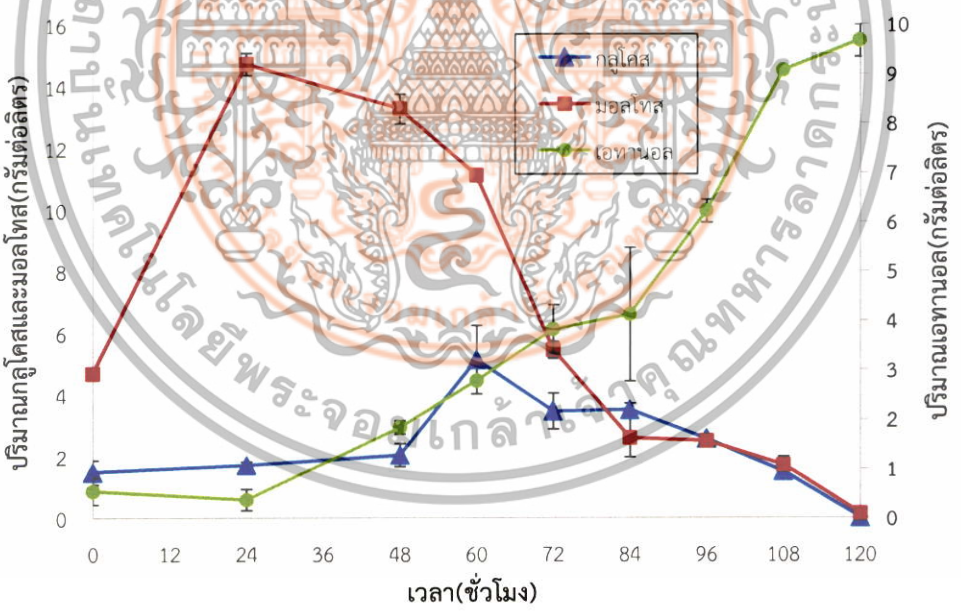


รูปที่ 4.6 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.2 ผลการหมักเอทานอลจากมันเทศโดยการใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF (ชุดการทดลองที่ 2)

จากการหมักเอทานอลโดยเติมสารละลายแขวนลอยของเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมหัวเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และบ่มต่อจนครบเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ในระยะแรกของการหมักมีปริมาณน้ำตาลมอลโทสสูง เนื่องจากในชุดการทดลองนี้มีเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3086 เจริญอยู่เพียงชนิดเดียว ซึ่งเชื้อราสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสสูง มีผลให้เกิดปริมาณน้ำตาลมอลโทสสูง ในระยะนี้มีปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ เนื่องจากเชื้อราสายพันธุ์นี้มีความสามารถผลิตเอทานอลได้เล็กน้อยในระหว่างเกิดกระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาล (Carlsen และคณะ,1996) หลังจากเติมเชื้อยีสต์ในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณน้ำตาลมอลโทสจะลดลงอย่างรวดเร็วและมีปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ แต่ปริมาณกลูโคสสะสมไม่มากนักเนื่องจากถูกยีสต์ใช้เพื่อผลิตเอทานอล จนกระทั่งสิ้นสุดการหมักให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 9.67±0.56 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 120 ดังรูปที่ 4.7

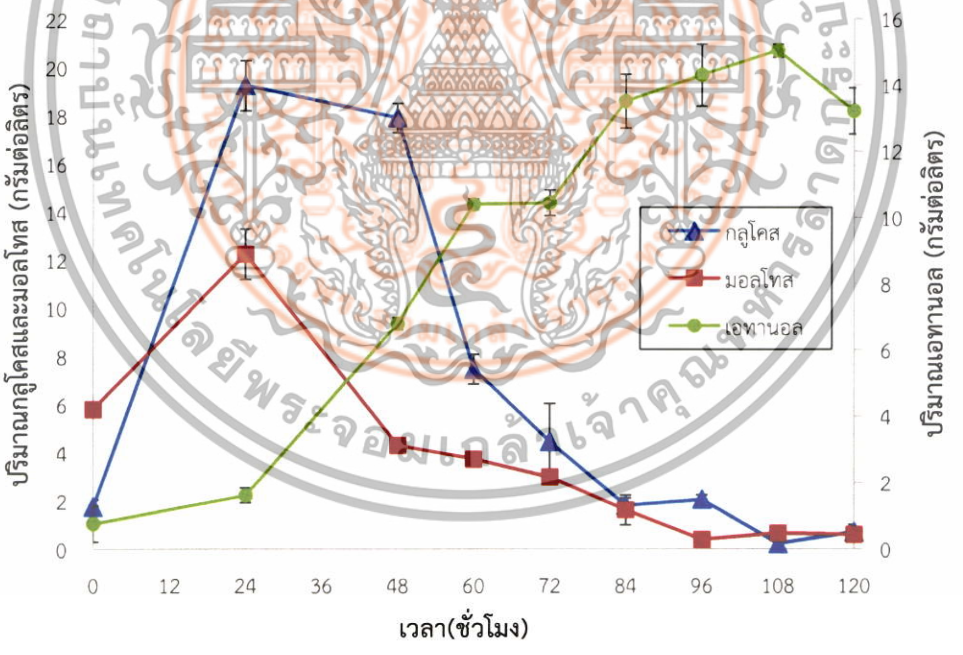


รูปที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากมันเทศ โดยใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.2.3 ผลการหมักเอทานอลจากมันเทศโดยการใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อราผสม *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ด้วยกระบวน การหมักแบบ SHF (ชุดการทดลองที่ 3)

จากการหมักเอทานอลโดยเติมสารแขวนลอยสปอร์ของเชื้อราผสม *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ปริมาตร 5 มิลลิลิตรในแต่ละสายพันธุ์ บ่มในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และบ่มต่อจนครบเวลา 120 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่า ชุดการทดลองนี้มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับชุดการทดลองที่ 1 คือ ปริมาณกลูโคสจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนให้ปริมาณกลูโคสสูงสุด 19.24±1.80 กรัมต่อลิตรใน 24 ชั่วโมงแรก ปริมาณมอลโทสที่เกิดขึ้นจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เช่นเดียวกัน โดยมีค่า 12.23±1.82 กรัมต่อลิตร ภายหลังจากเติมยีสต์ปริมานน้ำตาลทั้งสองจะลดลงอย่างรวดเร็วจนเกือบหมด สอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 15.04±0.35 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 108 จากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงเล็กน้อย ดังรูปที่ 4.8

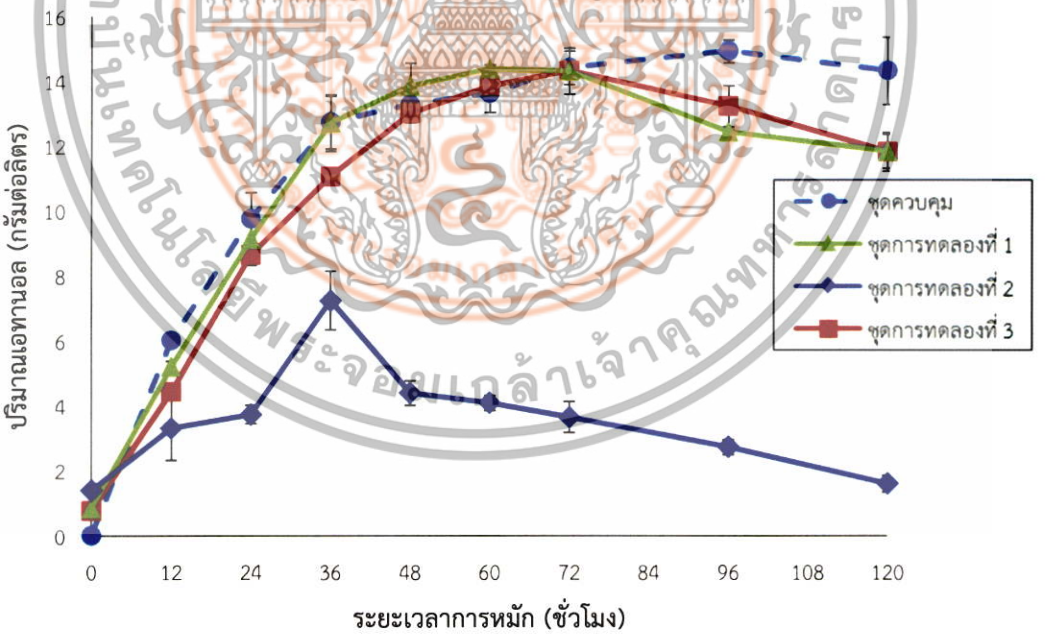


รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลกลูโคสและมอลโทสได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากมันเทศ โดยใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อราผสมทั้งสองสายพันธุ์ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

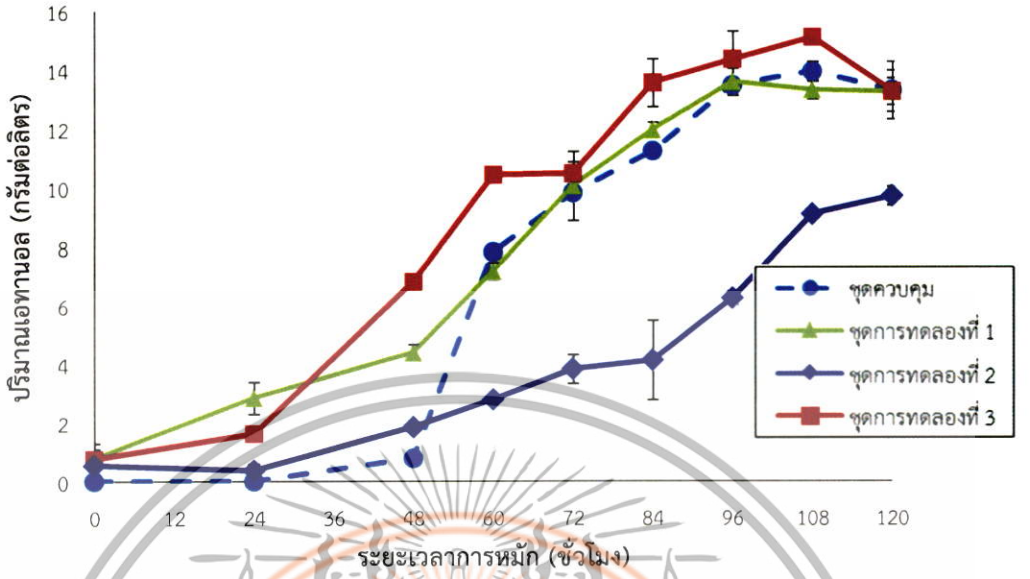
4.4 เปรียบเทียบผลการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรายอยแป้งด้วยกระบวนการหมัก แบบ SSF และ SHF

เมื่อเปรียบเทียบผลการทดลองการหมักแบบ SSF กับชุดควบคุม (ชุดการทดลองที่หมักโดยใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์) พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งหมักด้วยเชื้อผสมยีสต์และ *A. rouxii* TISTR 3182 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.35±0.18 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 กับชุดการทดลองที่ 3 หมักด้วยเชื้อผสมยีสต์และเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *A. oryzae* TISTR 3086 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.29 ± 1.25 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 โดยปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ได้จาก 2 ชุดการทดลองนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับปริมาณเอทานอลที่ได้ในชุดควบคุม และเมื่อเปรียบเทียบการหมักแบบ SHF พบว่า ชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งหมักด้วย *A. rouxii* TISTR 3182 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนเติมหัวเชื้อยีสต์ ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 13.53±0.46 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 และชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งหมักด้วย *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงก่อนเติมหัวเชื้อยีสต์ ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 15.04±0.35 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 108 โดยทั้งสองชุดการทดลองนั้นให้ปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุมเช่นเดียวกัน



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอลจากการหมักผงมันเทศ โดยเชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อรายอยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อราย่อยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

แต่อย่างไรก็ตามกระบวนการหมักแบบ SSF นั้นใช้ระยะเวลาในการหมักเอทานอลที่สั้นกว่ากระบวนการหมักแบบ SHF นอกจากนั้นการหมักแบบ SSF ยังมีข้อดีหลายประการ ได้แก่ ค่าใช้จ่ายในการเตรียมการต่ำกว่า มีความเสี่ยงในการปนเปื้อนน้อยกว่า (Keng และคณะ,2012) สามารถเกิดกระบวนการหลายๆกระบวนการไปพร้อมกันในเวลาเดียว กล่าวคือน้ำตาลกลูโคสจะเกิดขึ้นจากกระบวนการ saccharification ไปพร้อมกับการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยยีสต์ ทำให้ไม่เกิดปัญหาของความดันออสโมติกซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ยับยั้งกระบวนการหมักเอทานอลอีกด้วย (D'Amore และคณะ , 1988) ดังนั้นจึงเลือกใช้กระบวนการหมักแบบ SSF มาใช้ในการศึกษาในหัวข้อถัดไป สำหรับชุดการทดลองที่จะถูกคัดเลือกไปใช้ในการศึกษาในหัวข้อถัดไป จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 และชุดการทดลองที่ 3 เป็นการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 ของกระบวนการหมักทั้งแบบ SSF และ SHF นั้นให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับชุดควบคุม ดังแสดงในตารางที่ 4.12 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Swain และคณะ (2013) ได้ทำการศึกษาการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศด้วยเชื้อผสม *S. cerevisiae* และ *Trichoderma* sp. พบว่าผลผลิตเอทานอลใกล้เคียงกับการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* สายพันธุ์เดียวจากแป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทางการค้า ดังนั้นจากการศึกษานี้ พบว่า การใช้เชื้อราสามารถทดแทนเอนไซม์ทางการค้าในการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้งได้ สำหรับชุดการทดลองที่ 2 ซึ่งเป็นการหมักโดยใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. oryzae* TISTR 3086 นั้นให้ปริมาณเอทานอลน้อยกว่าอีกสองชุดการทดลองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทั้งกระบวนหมักแบบ SSF และ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เนื่องจากเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3086 มีค่ากิจกรรมของเอมไซม์อะไมเลสต่ำกว่าเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 มีผลทำให้ความสามารถในการผลิตน้ำตาลกลูโคสต่ำกว่าและส่งผลให้เกิดการผลิตเอทานอลได้น้อยกว่าเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 (นวพรและคณะ, 2559) ดังนั้นจากผลการทดลองดังกล่าว จึงเลือกกระบวนการหมักแบบ SSF ด้วยเชื้อผสม *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ซึ่งเป็นวิธีที่เตรียมการได้ง่าย ไม่ซับซ้อนและใช้ระยะเวลาสั้นกว่าไปใช้ในการศึกษาอัตราส่วนของหัวเชื้อต่อไป

ตารางที่ 4.2 ปริมาณเอทานอลสูงสุดและอัตราการผลิตที่ได้ในกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรา ย่อยแป้งด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF และ SHF

กระบวนการหมัก	ชุดการทดลอง	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอลสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
กระบวนการย่อยแป้งพร้อมกระบวนการหมัก (SSF)	ชุดควบคุม	96	14.90±0.61[a]
	ชุดการทดลองที่ 1	60	14.36±0.19[a]
	ชุดการทดลองที่ 2	36	7.23±1.57[c]
	ชุดการทดลองที่ 3	72	14.29±1.25[a]
กระบวนการย่อยแป้งแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)	ชุดควบคุม	108	13.87±0.16[a]
	ชุดการทดลองที่ 1	96	13.53±0.46[a]
	ชุดการทดลองที่ 2	120	9.67±0.56[b]
	ชุดการทดลองที่ 3	108	15.04±0.35[a]

หมายเหตุ : ชุดควบคุม : เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088
ชุดการทดลองที่ 1 : *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182
ชุดการทดลองที่ 2 : *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. oryzae* TISTR 3086
ชุดการทดลองที่ 3 : *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086

เมื่อพิจารณาในคอลัมน์เดียวกัน .

ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($p<0.05$)

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่า ไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p<0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

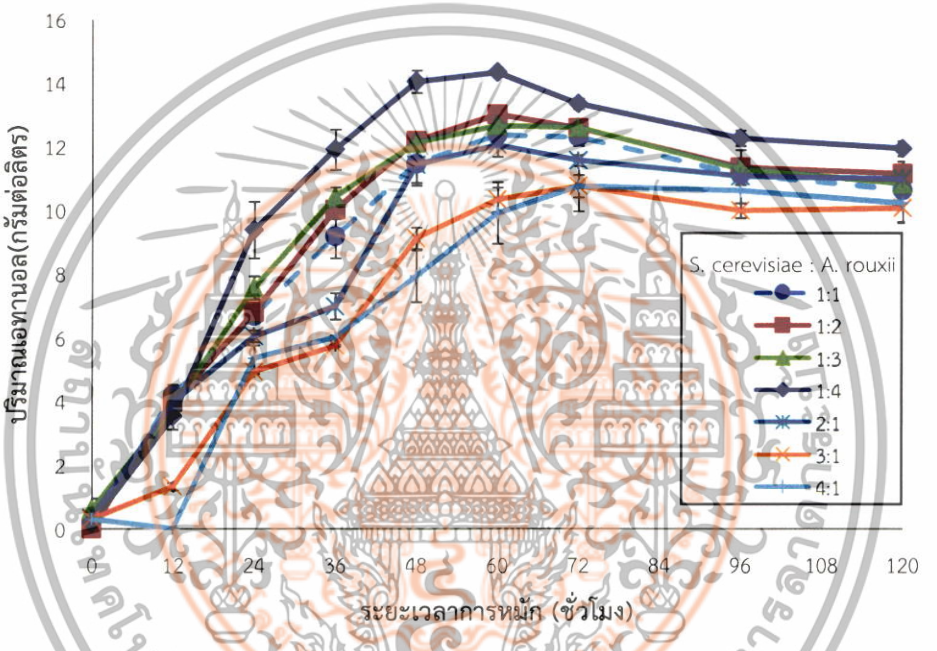
4.5 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยกระบวนการ SSF

4.5.1 ผลการศึกษาอัตราส่วนของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ต่อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ

จากการศึกษาการหมักเอทานอลจากมันเทศด้วยกระบวนการ SSF โดยใช้เชื้อผสม *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 โดยเติมหัวเชื้อทั้งหมดร้อยละ 20 ในอัตราส่วนยีสต์และราที่แตกต่างกัน ได้แก่ อัตราส่วน 1:1 1:2 1:3 1:4 2:1 3:1 และ 4:1 โดยปริมาตร พบว่า ทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ในระยะแรกของการหมักปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จนกระทั่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 60-72 หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงเล็กน้อยและคงที่จนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก โดยอัตราส่วนหัวเชื้อยีสต์ต่อรา 1:4 โดยปริมาตร ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.32±0.64 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 ซึ่งให้ผลผลิตแตกต่างจากอัตราส่วนอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญ โดยปริมาณเอทานอลสูงสุดรองลงมาคือ การใช้อัตราส่วน 1:2 1:3 1:1 2:1 3:1 และ 4:1 โดยปริมาตร ซึ่งให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 13.00±0.21 12.65±0.53 12.35±0.65 12.03±0.53 10.73±0.60 และ 10.73±1.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสที่เกิดขึ้นในการหมัก พบว่า การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลในกระบวนการหมักในทุกชุดการทดลองมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ปริมาณน้ำตาลมอลโทสจะลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งใช้จนหมดไปในที่สุด ปริมาณน้ำตาลจะลดลงเล็กน้อยในช่วง 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 12-36 หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลกลูโคสลดลงอย่างรวดเร็วและใช้จนหมดในที่สุดเช่นเดียวกัน แต่ถึงแม้ว่าทุกชุดการทดลองจะมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลไปในแนวทางเดียวกัน แต่ยังสามารถสังเกตเห็นได้ว่าในแต่ละชุดการทดลองมีระยะเวลาในการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันเล็กน้อย กล่าวคือ อัตราส่วนที่หัวเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณหัวเชื้อราที่มากกว่ายีสต์นั้น จะใช้น้ำตาลได้รวดเร็วกว่าอัตราส่วนที่หัวเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณหัวเชื้อราที่น้อยกว่ายีสต์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่หัวเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณหัวเชื้อราที่มากกว่ายีสต์ ส่งผลให้เกิดการย่อยแป้งสูง จึงเกิดน้ำตาลซึ่งเป็นซับสเตรทของเอทานอลในปริมาณมาก ยีสต์มีน้ำตาลมากพอสำหรับผลิตเอทานอล ขณะเดียวกันการที่หัวเชื้อเริ่มต้นมีปริมาณเชื้อยีสต์ที่มากกว่ารา ปริมาณเชื้อราที่น้อยไม่สามารถย่อยแป้งได้รวดเร็วในระยะแรกของการหมัก อาหารจึงยังมีความหนืดสูง และเซลล์ยีสต์ที่เติมลงไปยังคงมีความหนาแน่นของเซลล์สูง ซึ่งส่งผลไม่ดีนักต่อการเจริญและการย่อยสลายสาร เนื่องจากข้อจำกัดด้านการเข้าถึงของสารอาหาร ปริมาณอากาศ และปฏิกิริยาระหว่างเซลล์ (Laluce และคณะ, 2009) เป็นผลทำให้เกิดการผลิตเอทานอลช้ากว่าหัวเชื้อที่มีอัตราส่วนเชื้อรามากกว่ายีสต์ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Lee และคณะ (2012) ซึ่งได้ศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้กระบวนการหมักใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อราตรึงรูปที่สามารถย่อยสลายแป้งได้ คือ *Aspergillus oryzae* และ *Monascus purpureus* ร่วมกับยีสต์ที่ผลิตเอทานอล คือ *S. cerevisiae* ผลที่ได้จากกระบวนการหมักที่ใช้เชื้อร่วมของ *S. cerevisiae* กับเชื้อผสม *A. oryzae*และ *M. purpureus* ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ให้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 3.84 (โดยปริมาตร) และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้ *S. cerevisiae* กับเชื้อผสมระหว่าง *A. oryzae* และ *M. purpureus* ในอัตราส่วน 1 ต่อ 2 จะให้ปริมาณเอทานอลร้อยละ 4.08 (โดยปริมาตร) ขณะที่วิมลักษณ์ (2549) ทำการศึกษาการหมักสาโทโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อรา *Amylomyces rouxii Aspergillus oryzae* และ *Rhizopus oryzae* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้อัตราส่วนระหว่างเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ เท่ากับ 1ต่อ1 1ต่อ2 และ 2ต่อ1 ใส่ในข้าวเหนียวที่นึ่งสุกแล้ว หมักที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 14 วัน พบว่าที่อัตราส่วนราต่อยีสต์เท่ากับ 1ต่อ1 ให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดคือร้อยละ 12.65 (มวลต่อปริมาตร)



รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักเอทานอลด้วยเชื้อผสมที่มีอัตราส่วน *S. cerevisiae* TISTR 5088 ต่อ *A. rouxii* TISTR 3182 ที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในกระบวนการหมักแบบ SSF ในอัตราส่วนของหัวเชื้อที่แตกต่างกัน

ระยะเวลาการหมัก (ชม.)	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากอัตราส่วน *S. cerevisiae* TISTR 5088 ต่อ *A. rouxii* TISTR 3182 (กรัมต่อลิตร)						
	1:1	1:2	1:3	1:4	2:1	3:1	4:1
0	0.00±0.00^{a}	0.00±0.00^{a}	0.60±0.61^{a}	0.18±0.29^{a}	0.33±0.24^{a}	0.30±0.26^{a}	0.29±0.25^{a}
12	4.18±0.59^{a}	3.97±0.30^{a}	3.78±0.31^{a}	3.51±0.29^{a}	3.96±0.24^{a}	1.32±0.20^{b}	0.00±0.00^{c}
24	6.67±0.40^{bc}	6.79±0.49^{bc}	7.55±0.63^{b}	9.37±0.33^{a}	6.04±0.27^{cde}	4.92±0.1^{e}	5.34±0.71^{de}
36	9.16±1.20^{b}	10.00±0.50^{b}	10.40±0.53^{b}	11.89±0.71^{a}	6.96±0.58^{c}	5.74±0.06^{c}	6.01±0.09^{c}
48	11.43±1.18^{b}	12.17±0.17^{b}	12.10±0.49^{b}	14.03±0.98^{a}	11.40±0.80^{b}	9.10±0.58^{c}	7.91±1.41^{c}
60	12.35±0.65^{b}	13.00±0.21^{ab}	12.65±0.53^{b}	14.32±0.64^{a}	12.03±0.53^{b}	10.32±0.65^{c}	9.90±1.67^{c}
72	12.28±0.48^{ab}	12.57±0.33^{ab}	12.59±0.44^{ab}	13.33±0.29^{a}	11.54±0.24^{bc}	10.73±0.60^{c}	10.73±1.36^{c}
96	11.10±0.29^{bc}	11.33±0.96^{ab}	11.27±0.54^{ab}	12.25±0.14^{a}	11.04±0.11^{bc}	9.97±0.41^{c}	10.59±0.98^{bc}
120	10.61±0.65^{ab}	11.13±0.67^{ab}	10.81±0.77^{ab}	11.92±0.44^{a}	10.95±0.36^{ab}	10.05±0.76^{b}	10.21±1.09^{b}

หมายเหตุ : **เมื่อพิจารณาแนวนอน**

ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

4.5.2 ผลการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนในการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182

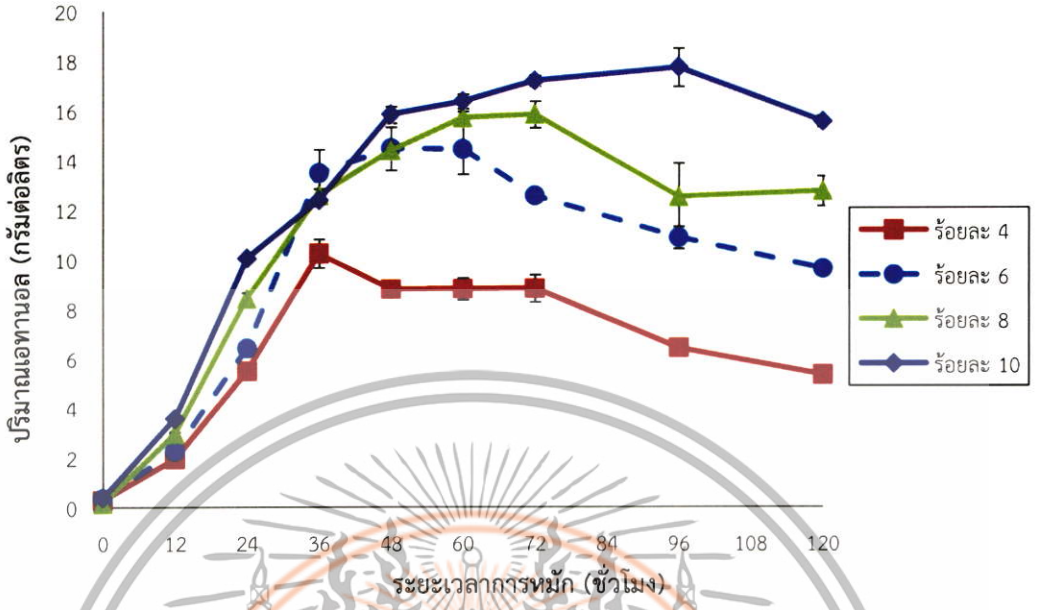
จากการศึกษาการหมักเอทานอลจากมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมยีสต์และ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยอัตราส่วน 1:4 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน(แป้งมันเทศ)แตกต่างกัน ได้แก่ ความเข้มข้นร้อยละ 4 6 8 และ 10 พบว่า การใช้สารละลายมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 10 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 17.66±1.34 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 รองลงมาเป็นการใช้สารละลายแป้งมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 8 6 และ 4 ซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 15.78±0.92 14.42±1.49 และ 10.21±0.99 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 72 60 และ 36 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.4 หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลง เมื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสและมอลโทสที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก พบว่า สารละลายแป้งมันเทศความเข้มข้นร้อยละ 10 มีปริมาณกลูโคสและมอลโทสสูงกว่าการใช้สารละลายแป้งมันเทศที่ความเข้มข้นอื่น ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่จุลินทรีย์ผลิตได้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการหมักแบบ SSF

ระยะเวลาการหมัก(ชม.)	ปริมาณเอทานอลที่ได้ (กรัมต่อลิตร)			
	ร้อยละ 4	ร้อยละ 6	ร้อยละ 8	ร้อยละ 10
0	0.26±0.22^{e}	0.33±0.56^{a}	0.14±0.24^{a}	0.36±0.31^{a}
12	1.93±0.15^{d}	2.24±0.13^{c}	2.94±0.13^{b}	3.55±0.21^{a}
24	5.47±0.43^{d}	6.39±0.27^{c}	8.37±0.45^{b}	10.02±0.12^{a}
36	10.21±0.99^{b}	13.44±1.66^{a}	12.53±0.48^{a}	12.34±0.15^{a}
48	8.78±0.21^{b}	14.39±1.76^{a}	14.34±0.14^{a}	15.78±0.58^{a}
60	8.79±0.78^{b}	14.42±1.49^{a}	15.65±0.46^{a}	16.31±0.49^{a}
72	8.80±0.97^{c}	12.51±0.39^{b}	15.78±0.92^{a}	17.13±0.38^{a}
96	6.40±0.59^{d}	10.83±0.77^{c}	12.47±2.32^{b}	17.66±1.34^{a}
120	5.32±0.10^{d}	9.60±0.23^{c}	12.70±1.03^{b}	15.49±0.38^{a}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาแนวนอน
ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95
ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักไบโอเอทานอลด้วยเชื้อผสม *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่แตกต่างกันในการหมักแบบ SSF

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wu และคณะ (2016) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเศษเผือกที่เหลือทิ้งด้วยเชื้อยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* K21 โดยศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเตรียมอาหาร ได้แก่ 40 50 75 และ 100 กรัมต่อลิตร พบว่า มีปริมาณเอทานอลสูงที่สุด ดังนี้ 19.96 21.45 31.52 และ 40.68 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยปริมาณเอทานอลที่ได้จะเพิ่มสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมากขึ้น Ji และคณะ (2015) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเศษมันฝรั่งและเฟอฟูรอลเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่แตกต่างกัน ดังนี้ ร้อยละ 6 8 12 และ 20 พบว่า ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6-12 ปริมาณเอทานอลที่ได้เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน แต่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาณเอทานอลกลับลดลง เนื่องจากอาหารมีความหนืดสูงและปริมาณน้ำตาลที่มากเกินไปส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ

ดังนั้นจากผลการทดลอง จะพบว่าการใช้สารละลายแป้งมันเทศที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 จะให้ปริมาณเอทานอลสูง แต่ลักษณะอาหารจะมีความหนืดสูง ซึ่งส่งผลต่อการถ่ายเทออกซิเจนในการหมัก ทำให้จุลินทรีย์มีการเจริญลดลง ซึ่งจากการทดลองจะเห็นได้ว่ามีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือในอาหารหมักค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารละลายแป้งมันเทศร้อยละ 8 ในการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนในการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ในการหมักแบบ SSF

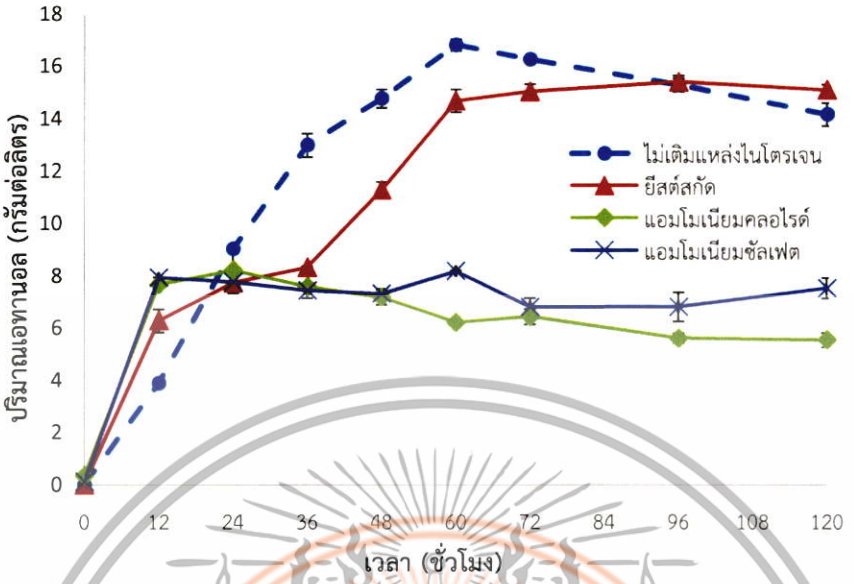
จากการหมักเอทานอลจากมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 4 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน ร้อยละ 8 และเติมแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน ได้แก่ ยีสต์สกัด แอมโมเนียมคลอไรด์ แอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 0.2 ลงในอาหารหมัก พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมยีสต์สกัดให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 15.38±0.42 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 96 โดยให้ปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกับอาหารที่ไม่เติมไนโตรเจนที่ให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุด 16.79±0.40 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 อาหารหมักที่เติมแอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟตให้ปริมาณเอทานอล 8.22±1.54 และ 8.18±0.05 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และ 60 ของการหมัก ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.5 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Izmirlioglu และ Demirci (2016) ศึกษาและปรับปรุงสูตรอาหารที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเศษมันฝรั่งเหลือทิ้งด้วยเชื้อผสม *Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่า การเติมยีสต์สกัดในอาหารเลี้ยงเชื้อมีส่วนช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล โดยการใช้เชื้อเดี่ยวของ *S. cerevisiae* เมื่อหมักด้วยเชื้อผสม ยีสต์สกัดไม่ได้ช่วยส่งเสริมการผลิตเอทานอล

ตารางที่ 4.5 ปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันในการหมักแบบ SSF

ระยะเวลาการหมัก(ชม.)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			
	ไม่เติมไนโตรเจน	ยีสต์สกัด	แอมโมเนียมคลอไรด์	แอมโมเนียมซัลเฟต
0	0.00±0.00^{b}	0.00±0.00^{b}	0.34±0.02^{a}	0.11±0.19^{b}
12	3.89±0.29^{c}	6.27±0.76^{b}	7.66±0.06^{a}	7.94±0.00^{a}
24	9.03±0.17^{a}	7.74±0.36^{a}	8.22±1.54^{a}	7.76±0.63^{a}
36	12.98±0.78^{a}	8.33±0.09^{b}	7.58±0.23^{b}	7.44±0.50^{b}
48	14.75±0.60^{a}	11.27±0.53^{c}	7.17±0.50^{c}	7.31±0.35^{c}
60	16.79±0.40^{a}	14.66±0.76^{b}	6.19±0.23^{d}	8.18±0.05^{c}
72	16.24±0.19^{a}	15.01±0.49^{b}	6.42±0.52^{c}	6.79±0.62^{c}
96	15.26±0.44^{a}	15.38±0.42^{a}	5.60±0.33^{c}	6.80±0.98^{b}
120	14.13±0.76^{a}	15.08±0.37^{a}	5.53±0.49^{c}	7.53±0.67^{b}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาแนวนอน
ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95
ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน

ขณะที่ Swift และคณะ (2000) ได้ศึกษาผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่มีต่อการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *A. oryzae* พบว่า แหล่งไนโตรเจนบางชนิดมีผลให้การปลดปล่อยเอนไซม์กลูโคอะไมเลสของเชื้อรา *A. oryzae* ลดลง ได้แก่ แอล-อะลานีน แอล-เมทไทโอนีน กรดคาซามิโน เป็นต้น Yue และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาผลกระทบของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการผลิตเอทานอลโดยนำน้ำจากต้นข้าวฟ่างหวานหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* โดยหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 ชั่วโมง แหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการหมัก คือ ยูเรียและแอมโมเนียมซัลเฟต ชุดการทดลองที่ใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน ให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่าชุดการทดลองที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โดยให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 135 กรัมต่อลิตร

4.5.4 ผลการศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นในการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182

จากการหมักเอทานอลจากมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยอัตราส่วน 1 ต่อ 4 โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 8 ปรับพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน ได้แก่ พีเอช 4 5 6 และ 7 จากผลการศึกษาพบว่า ในแต่ละชุดการทดลองให้ปริมาณเอทานอลแตกต่างกัน โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอช 6 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 17.91±0.38 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 60 รองลงมาคือ พีเอช 7 5 และ 4 ที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 15.82±1.19 14.85±1.36 และ 10.43±0.72 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 72 72 และ 96 ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

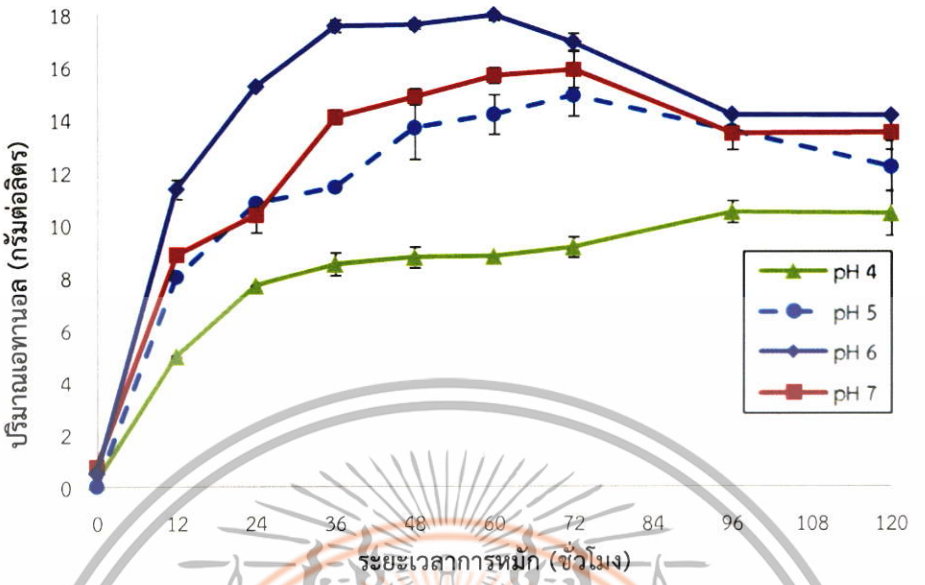
ดังแสดงในตารางที่ 4.6 ได้มีการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่า ค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของแอลฟาอะไมเลส คือ ช่วงพีเอช 5.0-8.0 (Carlsen และคณะ, 1996) และค่าพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของกลูโคอะไมเลส คือ ช่วงพีเอช 4.0-5.0 (Okazaki และ Sugama, 1979) สำหรับในการทดลองนี้เป็นการศึกษาการใช้เชื้อร่วมกันระหว่างยีสต์และรา จึงจำเป็นต้องคำนึงถึงพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ด้วย จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่ายิ่งอาหารที่ปรับพีเอชเริ่มต้นด้วยพีเอชต่ำ ยิ่งให้ปริมาณเอทานอลต่ำลงไปด้วย ทั้งนี้อาจเนื่องมาความเป็นกรด มีผลทำให้เชื้อราเจริญได้น้อยลง เมื่อเชื้อราเจริญได้น้อยจึงส่งผลให้ผลิตเอนไซม์ได้น้อยและเกิดน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลได้น้อยด้วย ดังนั้นจึงไม่ควรปรับค่าพีเอชเริ่มต้นให้สูงหรือต่ำจนเกินไป เพราะค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์และการผลิตเอทานอลอย่างมีนัยสำคัญ (Clarence และ Emmanuel, 2010) Lee และคณะ (2012) ทำการศึกษากระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้กระบวนการหมักใช้เชื้อผสมตรึงรูประหว่าง *S. cerevisiae* ร่วมกับ *A. oryzae* และ *M. purpureus* พบว่า ชุดการทดลองที่มีการผลิตเอทานอลสูงที่สุด คือชุดการทดลองปรับค่าพีเอชเริ่มต้น 4 รองลงมาคือ พีเอช 5 6 และ 3 โดยให้ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 3.05 2.65 2.37 และ 1.59 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.6 ปริมาณเอทานอลในกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน

ระยะเวลาการหมัก(ชม.)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			
	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7
0	0.20±0.34^{b}	0.00±0.00^{b}	0.48±0.10^{ab}	0.74±0.37^{a}
12	4.95±0.08^{d}	7.99±0.25^{c}	11.32±0.64^{a}	8.84±0.23^{b}
24	7.66±0.01^{c}	10.77±0.15^{b}	15.21±0.19^{a}	10.33±1.11^{b}
36	8.48±0.77^{d}	11.40±0.18^{c}	17.50±0.40^{a}	14.04±0.46^{b}
48	8.74±0.68^{d}	13.64±2.08^{b}	17.54±0.58^{a}	14.81±0.53^{b}
60	8.77±0.02^{d}	14.13±1.30^{c}	17.91±0.38^{a}	15.60±0.52^{b}
72	9.11±0.66^{c}	14.85±1.36^{b}	16.87±0.57^{a}	15.82±1.19^{ab}
96	10.43±0.72^{b}	13.52±0.27^{a}	14.11±0.12^{a}	13.41±1.08^{a}
120	10.37±1.47^{b}	12.15±1.64^{ab}	14.08±0.13^{a}	13.43±1.11^{a}

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาแนวนอน
ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95
ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกัน

ขณะที่ Dash และคณะ (2017) ศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นที่แตกต่างกันต่อการผลิตเอทานอลในการหมักจากแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *S. cerevisiae* และ *Pichia* sp. โดยศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นตั้งแต่พีเอช 3-5.5 พบว่า อาหารที่มีพีเอช 5 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 129.4±5 กรัมต่อลิตร Manikandan และ Viruthagiri (2009) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากแป้งข้าวสาลีด้วยเชื้อผสม *Aspergillus niger* และ *Kluyveromyces marxianus* พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม คือพีเอช 5.5 Carlsen และคณะ (1996) ได้ศึกษาสัณฐานและสรีระวิทยาของเชื้อรา *A. oryzae* ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส พบว่า ช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญคือ พีเอช 3-7 สำหรับพีเอชที่เหมาะที่สุดในการผลิตเอนไซม์ คือ พีเอช 6 และอัตราการผลิตเอนไซม์จะลดลงอย่างมาก ที่พีเอช 4 หรือสูงกว่า 7

4.6 เปรียบเทียบผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 และ *A. rouxii* TISTR 3182

เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศ 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ การหมักเอทานอลจากมันเทศ โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (ชุด A) การหมักเอทานอลจากมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 (ชุด B) และการหมักเอทานอลจากมันเทศ โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะที่เหมาะสม โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นของแป้งมันเทศ(แหล่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอน) ร้อยละ 8 ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมหัวเชื้อยีสต์ต่อเชื้อรา ด้วยอัตราส่วน 1:4 โดยปริมาตร (ชุด C) บ่มที่สภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส หมักเป็นเวลา 120 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเอทานอลที่ได้จะมีค่าเท่ากับ 13.63±0.31 11.99±0.84 และ 17.91±0.37 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีค่าประสิทธิภาพหรือค่าความสามารถในการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.14 0.20 และ0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.7 จากการศึกษากระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้กระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะที่เหมาะสม (ชุด C) ให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด คือ 17.91±0.37 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้มีความแตกต่างกับการหมักด้วยชุดการทดลองอื่น (ชุด A และ B) อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ค่าประสิทธิภาพหรือความสามารถในการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ตารางที่ 4.7 ปริมาณเอทานอลสูงสุดและประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ในชุดการทดลองที่แตกต่างกัน

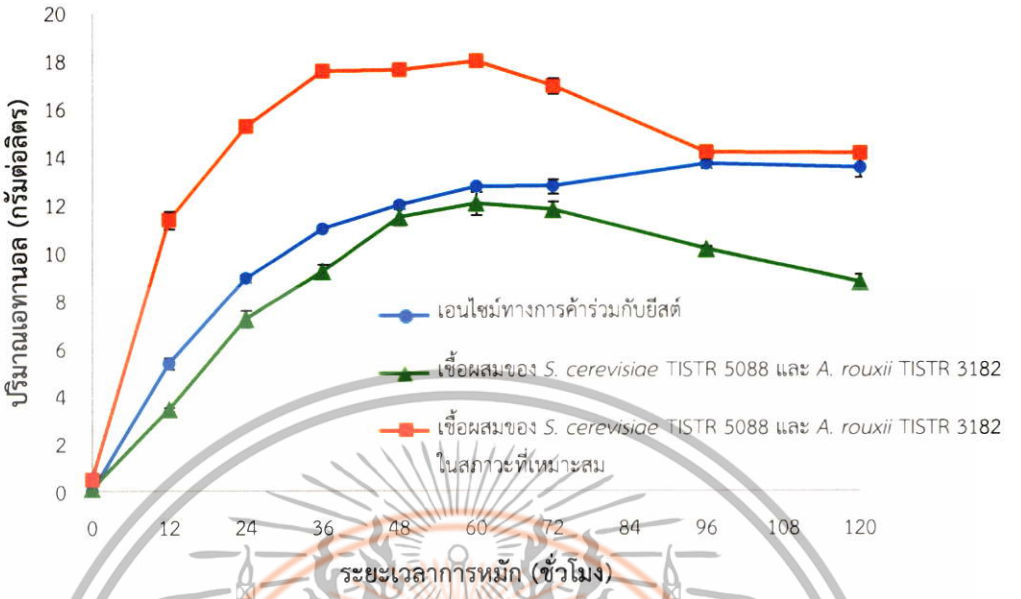
ชุดการทดลอง	เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอลสูงสุด (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)
ชุด A : เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088	96	13.63±0.31[b]	0.14
ชุด B : *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182	60	11.99±0.84[c]	0.20
ชุด C : *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะที่เหมาะสม	60	17.91±0.37[a]	0.30

หมายเหตุ : เมื่อพิจารณาแนวตั้ง

ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่า มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.15 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอทานอลในระหว่างการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ในสภาวะที่แตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษากระบวนการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ ด้วยเชื้อผสมระหว่างยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และเชื้อราที่ย่อยแป้งได้ โดยแบ่งการทดลองเป็น 3 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 การหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ชุดการทดลองที่ 2 การหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และชุดการทดลองที่ 3 การหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 และ *A. oryzae* TISTR 3086 เปรียบเทียบกับการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งเป็นชุดควบคุม หมักในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง โดยศึกษาด้วยกระบวนการหมัก 2 แบบคือ กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) จากการทดลองพบว่ากระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักของชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งเป็นกระบวนการหมักเอทานอลจากแป้งมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ให้ผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 14.36±0.19 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 60 ประสิทธิภาพการผลิตเท่ากับ 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

จากการเปรียบเทียบกระบวนการหมักสองรูปแบบของกระบวนย่อยแยกจากกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก พบว่ากระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักมีประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเอทานอลได้ดี สามารถประหยัดเวลาในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอล รวมทั้งสามารถใช้เชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ในการผลิตเอนไซม์แทนการใช้เอนไซม์ทางการค้า ซึ่งเป็นการลดต้นทุนในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอล

จากการศึกษาการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 โดยใช้กระบวนการหมักแบบ SSF ใช้เชื้อรา ย่อยแป้งแทนการใช้เอนไซม์ ศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล พบว่า การใช้อัตราส่วนเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ต่อ *A. rouxii* TISTR 3182 เท่ากับ 1ต่อ4 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 14.32 ±0.64 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 จากนั้นศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 อัตราส่วน 1:4 พบว่าการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนร้อยละ 10 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 17.66±1.34 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 96 แต่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 มีความหนืดสูงยากต่อการหมักและเก็บผลการทดลอง จึงเลือกความเข้มข้นร้อยละ 8 มาใช้ในการศึกษาต่อไป ต่อมาศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล พบว่า ชุดการทดลองที่ไม่เติมแหล่งไนโตรเจนให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 16.79±0.40 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 60 เมื่อศึกษาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม พบว่า พีเอช 6 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 17.91±0.38 กรัมต่อลิตร เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 โดยใช้กระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก พบว่าการใช้อัตราส่วนเชื้อผสม *S. cerevisiae* TISTR 5088 ต่อ *A. rouxii* TISTR 3182 เท่ากับ 1:4 ใช้ความเข้มข้นของแป้งมันเทศร้อยละ 8 ปรับพีเอชเริ่มต้นอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6 หมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 60 โดยมีปริมาณเอทานอล 17.91±0.38 กรัมต่อลิตร

เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเอนไซม์ทางการค้า และกระบวนการหมักที่ใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ต่อ *A. rouxii* TISTR 3182 หมักในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้น โดยใช้กระบวนการหมักแบบ SSF พบว่าการใช้เชื้อผสมระหว่าง ระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ต่อ *A. rouxii* TISTR 3182 ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เพียงชนิดเดียว โดยพบว่าการใช้เชื้อผสมระหว่าง *A. rouxii* TISTR 3182 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอล 17.91±0.37 กรัมต่อลิตร และมีค่าความสามารถในการผลิตเอทานอล (Productivity) 0.30 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ขณะที่การหมักโดยใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด 13.63±0.31 กรัมต่อลิตร และมีค่าความสามารถในการผลิตเอทานอล 0.16 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ดังนั้นการใช้เชื้อผสมระหว่าง *S. cerevisiae* TISTR 5088 ต่อ *A. rouxii* TISTR 3182 ในการหมักเอทานอลจากผงมันเทศจึงสามารถทดแทนการใช้เอนไซม์ทางการค้าในการนำมาย่อยแป้งเพื่อผลิตเอทานอลด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

ควรพัฒนาสภาวะในกระบวนการหมัก โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากนั้นทำการสกัดเพื่อให้ได้เอนไซม์บริสุทธิ์แล้วนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอล เพื่อหลีกเลี่ยงสภาวะการเจริญเติบโตที่ไม่เหมาะสมของเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิตติมา เจริญพานิช. 2553. **เอนไซม์วิทยา**. กรุงเทพมหานคร : โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

ธีระพงษ์ สิงหาปัด กรรณิการ์ แสงศรีเรือง และสุรัสวดี ปันรัตน์. 2549. "การผลิตแอลกอฮอล์โดยการหมักจากน้ำอ้อย." ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นวพร รุ่งโรจน์มงคล, วัชราพรรณ ชนานาฎ และสุณัฏฐา ศิลป์วัฒนจินดา. 2559. "การผลิตไบโอเอทานอลจากมันสาปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088" โครงงานพิเศษสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พักตร์ประไพ ประจำเมือง และ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2546. "เอนไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยแป้ง." *วารสารศูนย์บริการวิชาการ*. 11(4).

มณชัย เดชสังกรานนท์. 2546. "คุณสมบัติของยีสต์และราที่มีบทบาทในการหมักข้าวหมากและสาโท." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เมทินี มาเวียง. 2554. **ชีววิทยาของยีสต์**. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://sites.google.com/site/biotech rmutisurin/yeast-technology.

มาลินี พิทักษ์, สมศรี บุญเรือง และรังสิมันต์ สัมฤทธิ์. 2542. **การปลูกมันเทศ**. อุดรธานี : ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

สุวภัทร เจียมทวีทรัพย์, สุกพัฒน์ ผลิตภัณฑ์ และโสมวิสา ทองปลอด. 2555. "การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิและเอทานอลสูง เพื่อใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ." โครงงานพิเศษสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. **ยีสต์ และยีสต์เทคโนโลยี**. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิจัย รักวิทยาศาสตร์. 2551. **ราวิทยาเบื้องต้น**. นครปฐม : ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.

วิมลักษณ์ รัตนปรีดากุล. 2549. "การศึกษาเชื้อราและเชื้อยีสต์ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าเปรียบเทียบกับยีสต์บริสุทธิ์ในการผลิตสาโท." วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

Aditiya, H.B. Chong, W.T. Mahlia, T.M.I. Sebayang, A.H. Berawi, M.A. and Nur, H. 2015. "Second generation bioethanol potential from selected Malaysia's biodiversity biomasses: a review." *Waste Manage*. 47 : 46–61.

Ainsworth, G.C. Sutton, B.C. and Hawksworth, D.L. 1983. **Ainsworth and Bisby's Dictionary of the fungi.** 7th Ed. Surrey : Commonwealth Mycological Institute.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Balat, M. Balat, H. and Oz, C. 2008. "Progress in bioethanol processing." *Progress in Energy and Combustion Science*. 34 : 551–573.

Cardona, C.A. Sanchez, O.A. and Gutierrez, L.F. 2010. **Process synthesis for fuel ethanol production**. United State of America : CRC Press

Carlsen, M. Spohr, A.B. Nielsen, J. and Villadsen, J. 1996. "Morphology and physiology of an a-amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations." *Biotechnology and Bioengineering*. 49 : 266-276.

Chen, H.Z. Xu, J. and Li, Z.H. 2007. "Temperature cycling to improve the ethanol production with solid-state simultaneous saccharification and fermentation." *Applied Biochemistry and Microbiology*. 43 : 57–60.

Clarence, S.Y. Sunny, E.I. and Emmanuel, I.U. 2010. "Temperature optimization for bioethanol production from corn cobs using mixed yeast strains." *Journal of Biological Sciences*. 10 : 103-108.

Colon Institute. 2016. **Amylase.** [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มา http://coloninstitute.org/supplements/amylase.

Coutinho, P.M. and Reilly, P.J. 1997. "Automated docking of glucosyl disaccharides in the glucoamylase active site." *Proteins: Structure, Function, and Bioinfor matics*. 28(2) : 162-173.

Dash, P.K. Mohaptra, S. Swain, R.M. and Thatoi, H. 2017. "Optimization of bioethanol production from saccharified sweet potato root flour by co-fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Pichia sp.* using OVAT and response surface methodologies." *Acta Biologica Szegediensis*. 61(1) : 13-23.

Diaz, M. Garcia, AI. and Garcia, LA. 1996. "Mixing power, external convention, and effectiveness in bioreactors." *Biotechnology Bioengineer*. 51 : 131–40

D'Amore, T. Panchal, C. J. Russeil, I. and Stewart, G.G. 1988. "Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation." *Journal of Industrial Microbiology*. 2(6) : 365–372.

Hamelinck, C.N. Suurs, R.A.A. and Faaij, A.P.C. 2005. "International bioenergy transport costs and energy balance." *Biomass and Bioenergy*. 29(2) : 114-134.

Hong, G.S. and Guarro, J. 2001. "Atlas of clinical fungi." *International Microbiology*. 4 : 260-261.

Izmirlioglu, G. and Demirci, A. 2016. "Improved simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from industrial potato waste with co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by medium optimization." *Fuel*, 185 : 684-691.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jeon, B.Y. Kim, D.H. Na, B.K. Ahn, D.H. and Park, D.H. 2008. "Production of ethanol directly from potato starch by mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus niger* using electrochemical bioreactor." *Journal of Microbiology and Biotechnolo gy.* 18(3) : 545-51.

Ji, L. Yu, H. Liu, Z. Jiang, J. and Sun, D. 2015. "Enhanced ethanol production with mixed lignocellulosic substrates from commercial furfural and cassava residues." *Bioresources.* 10(1) : 1162-1173.

Kito, H. Abe, A. Sujaya, I.N. Oda, Y. Asano, K. and Sone, T. 2009. "Molecular characterization of the relationship among *Amylomyces rouxii*, *Rhizopus oryzae*, and *Rhizopus delemar*." *Bioscience Biotechnology and Biochemistry* 73 : 861–864.

Klich, M. A. 2002. **Identification of Common Aspergillus Species.** Utrecht : Centraal bureau voor Schimmelcultures.

Laluce, C. Tognolli, J.O. Oliveira, K.F. Souza, C.S. and Morais, M.R. 2009. "Optimization of temperature, sugar concentration, and inoculum size to maximize ethanol production without significant decrease in yeast cell viability." *Applied Microbiology and Biotechnology.* 83 : 627–637.

Lee, W.C. Chen, I.C. Chang, C.H. and Yang, S. 2012. "Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*." *Renewable Energy.* 39 : 216-222.

Manikandan, K. and Viruthagiri, T. 2009. "Simultaneous saccharification and fermentation of wheat bran flour into ethanol using coculture of amylotic *Aspergillus niger* and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus*." *Frontiers of Chemical Engineering in China.* 3(3) : 240–249.

Montiel, A.M. Fernández ,F.J. Marcial, J. Soriano, J. Barrios-González, J. and Tomasini, A. 2004. "A fungal phenoloxidase (tyrosinase) involved in pentachlorophenol degradation." *Biotechnology Letters.* 26 : 1353–1357.

Narendranath, N.V. and Power R. 2005. "Relationship between pH and medium dissolved solids in term of growth and metabolism of lactobacilli and *Saccharomyces cerevisiae* during ethanol production." *Applied and Environmental Microbiology.* 71 : 2239–2243.

Ochaikul, D. and Suwannaposri, A. 2014. "Ethanol production from sweet potato by enzymatic hydrolysis and *Saccharomyces cerevisiae* YRK 017 fermentation." *KMTTL science and technology journal.* 14(2) : 92-98.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ohta, K., and Hayashida, S. 1983. "Role of tween 80 and monoolin in a lipid-sterol-protein complex which enhances ethanol tolerance of sake yeast." *Appl. Environ. Microb.* 46 : 821-825

Okazaki N. and Sugama S. 1979. "A new apparatus for automatic growth estimation of mold cultured on solid media." *Journal of fermentation technology.* 57 : 413-417.

Orlowski, M. and Sypherd, P.S. 1978. "Regulation of translation rate during morphogenesis in the fungus *Mucor.*" *Biochemistry.* 17 : 569-575.

Panchal, C.J. and Tevares, F.C. 1990. "Yeast strain selection for fuel ethanol production." *Yeast Strain Selection.* 8 : 225-236.

Petrea, L. 2008. "Characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by UV mutagenesis." *Innovative Romanian Food Biotechnology.* 2 : 40-47.

Saito, K. Abe, A. Sujaya, I.N. Sone, T. and Oda, Y. 2004. "Comparison of *Amylomyces rouxii* and *Rhizopus oryzae* in lactic acid fermentation of potato pulp." *Food Science and Technology Research.* 10(2) : 224-226.

Salunkhe, D.K., and Kadam, S.S. 1998. **Handbook of vegetable science and technology: production, composition, storage, and processing.** New York : Marcel Dekker.

Somogyi, N. 1952. "Notes on sugar determination." *Journal of Biological Chemistry.* 195 : 19-23.

Swain, M.R. Mishra, J. and Thatoi, H. 2013. "Bioethanol production from sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) flour using co-culture of *Trichoderma* sp. and *Saccharomyces cerevisiae* in solid-state fermentation." *The Brazilian Archives of Biology and Technology.* 56 : 171-179.

Swanson, K.M.J. Busta, F.F. Peterson, E.H. and Johnson, M.G. 1992. **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.** Washington D.C. : American Public Health Association.

Swift, R.J. Karandikar, A. Griffen, A.M. Punt, P.J. van den Hondel, C.A.M.J.J. Robson, G.D. Trinci, A.P.J. and Wiebe, M.G. 2000. "The effect of organic nitrogen sources on recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* in chemostat culture." *Fungal Genetics and Biology.* 31 : 125-133

Tanimura, W. Sanchez, P. C. and Kozaki, M. 1977. "The fermented food in the Philippines Tapuy {rice wine)." *J. agric. Sci. Jap.* 2 : 118-34.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tian, S.J. Rickard, J.E. and Blanshard, J.M.V. 1991. "Physicochemical properties of sweet potato starch." *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 57 : 459-491.

Uma Maheswari, N. and Kalaikodi, M. 2011. "Ethanol production from cassava by co-cultures of *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oryzae*." *Biomedical and Pharmacology Journal*. 4(1) : 135-140.

Van der Maarel, MJEC. Van der Veen, B and Uitdehaag, JCM. 2002. "Properties and applications of starch-converting enzymes of the α-amylase family." *Journal Biotechnology*. 94 : 137-155.

Webster, J. 1979. **Introduction to Fungi**. Biological Science, Cambridge University Press.

Wu, W.H. Hung, W.C. Lo, Y.K. Chen, Y.K. Wan, H.P. and Cheng, K.C. 2016. "Bioethanol production from taro waste using thermo-tolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* K21." *Bioresource Technology*. 201 : 27–32.

Yoshimoto, M. 1998. "Sweet potato as a multifunctional food." 273-283. In **Proceedings of International workshop on sweet potato production system towards the 21st century.** Miyazaki : Kyushu National Experimental Experiment Station.

Yue, G. Yu, J. Zhang, X. and Tan, T. 2012. "The influence of nitrogen sources on ethanol production by yeast from concentrated sweet sorghum juice." *Biomass and Bioenergy*. 39 : 48-52.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้