การผลิตไบโอเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM CASSAVA USING CO-CULTURE OF *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 AND *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 WITH *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

นวพร รุ่งโรจน์มงคล

วัชราพรรณ ชนานาฎ

สุณัฏฐา ศิลป์วัฒนจินดา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

PRODUCTION OF BIOETHANOL FROM CASSAVA USING CO-CULTURE OF *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 AND *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 WITH *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

NAWAPHORN ROONGROJMONGKHON

WATCHARAPAN CHANANAT

SUNUTTHA SINWATTHANAJINDA

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE
INDUSTRIAL MICROBIOLOGY
DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
ACADEMIC YEAR 2016

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ การผลิตไบโอเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

Production of Bioethanol from Cassava Using Co-culture of *Amylomyces rouxii TISTR 3182* and *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 with *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

ชื่อนักศึกษา นางสาวนวพร รุ่งโรจน์มงคล รหัสนักศึกษา 56051057
นางสาววัชราพรรณ ชนานาฎ รหัสนักศึกษา 56051067
นางสาวสุณัฏฐา ศิลป์วัฒนจินดา รหัสนักศึกษา 56051089

ปริญญา วิทยาศาสตรบัณฑิต จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ภาควิชา ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

ปีการศึกษา 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ. ดวงใจ โอชัยกุล

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.) อนุมัติให้โครงงานพิเศษ นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2559

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ ประธานกรรมการสอบ	
ดร. สมพิศ สอนโยธา กรรมการ	
รศ. ดวงใจ โอชัยกุล กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ	การผลิตไบโอเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 และ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088
ชื่อนักศึกษา	นางสาวนวพร รุ่งโรจน์มงคล รหัสนักศึกษา 56051057 นางสาววัชราพรรณ ชนานาฎ รหัสนักศึกษา 56051067 นางสาวสุณัฏฐา ศิลป์วัฒนจินดา รหัสนักศึกษา 56051089
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ภาควิชา	ชีววิทยา
คณะ	วิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัย	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง (สจล.)
ปีการศึกษา	2559
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ. ดวงใจ โอชัยกุล

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาผลของการผลิตไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) เปรียบเทียบกับกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยใช้เชื้อราที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยสลายแป้งทำงานร่วมกับยีสต์ในการหมักเอทานอล โดยศึกษาสภาวะการทดลอง 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ (1) เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (2) *A. oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (3) *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (4) *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 พบว่ากระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) โดยการใช้เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 25.37 ± 0.69 กรัมต่อลิตร ใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์ทางการค้ากับเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงการหมักที่ 24 เท่ากับ 24.99 ± 0.42 กรัมต่อลิตร ในขณะที่กระบวนการหมักแบบ SSF พบว่าชุดการทดลองที่ 3 การใช้เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 25.37 ± 0.95 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางนัยสำคัญกับการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

26.32 ± 0.86 กรัมต่อลิตร โดยระยะเวลาของกระบวนการหมักแบบ SSF ที่ใช้เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 กับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดและใช้ระยะเวลาสั้นกว่ากระบวนการหมักแบบ SHF งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการใช้เชื้อราผลิตเอนไซม์สำหรับย่อยแป้งแทนการใช้เอนไซม์ทางการค้า ซึ่งจะสามารถลดต้นทุนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง

คำสำคัญ : *Amylomyces rouxii* , *Aspergillus oryzae* , *Saccharomyces cerevisiae* , กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก และ กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Production of Bioethanol from Cassava Using Co- culture of *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 and *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 with *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088
Students	Miss. Nawaphorn Roongrojmongkhon Student ID 56051057
	Miss. Watcharapan Chananat Student ID 56051067
	Miss. Sunuttha Sinwatthanajinda Student ID 56051089
Degree	Bachelor of Science
Major Program	Industrial Microbiology
Department	Biology
Faculty	Science
University	King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang (KMITL)
Academic Year	2016
Advisor	Assoc. Prof. Duangjai Ochaikul

Abstract

This research focused on the production of Bioethanol from cassava by separate hydrolysis and fermentation (SHF) compared with simultaneous saccharification and fermentation (SSF). Using fungi producing enzymes for starch degradation functioning with yeast to ethanol fermentation . These four experiment include (1) commercial enzymes with *S. cerevisiae* TISTR 5088 (2) *A. oryzae* TISTR 3086 with *S. cerevisiae* TISTR 5088 (3) *A. rouxii* TISTR 3182 with *S. cerevisiae* TISTR 5088 (4) *A. oryzae* TISTR 3086 and *A. rouxii* TISTR 3182 with *S. cerevisiae* TISTR 5088. The results revealed that SHF using *A. rouxii* TISTR 3182 with *S. cerevisiae* TISTR 5088 produced the maximum content of ethanol (25.37 ± 0.69 g/l) at 96 hours. Similarly, using commercial enzymes with *S. cerevisiae* TISTR 5088 produced ethanol (24.99 ± 0.42 g /l) at 24 hours. From SSF , the results from cultivation of *A. rouxii* TISTR 3182 and *S. cerevisiae* TISTR 5088 revealed that the maximum concentration of ethanol (25.37 ± 0.95 g/l) at 48 hours. The result was not significantly different from using

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

commercial enzymes with *S. cerevisiae* TISTR 5088 (26.32 ± 0.86 g/l). The period of SSF using *A. rouxii* TISTR 3182 with *S. cerevisiae* TISTR 5088 achieved the maximum content of ethanol was shorter than SHF. This research shows the possibility of fungi utilization to produce enzyme for starch hydrolysis , instead of commercial enzymes. This may be the process to reduce the cost of ethanol production from cassava.

Keywords : *Amylomyces rouxii* , *Aspergillus oryzae* , *Saccharomyces cerevisiae* , Separate hydrolysis and fermentation (SHF), Simultaneous saccharification and fermentation (SSF)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษจัดขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โครงงานพิเศษนี้ประสบความสำเร็จได้เนื่องด้วยได้รับความอนุเคราะห์จากรองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้ที่ได้เสียสละเวลาให้ความรู้ คำแนะนำตลอดการดำเนินงานให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ และ ดร.สมพิศ สอนโยธา ที่เสียสละมาเป็นประธานกรรมการและกรรมการสอบรวมทั้งให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์เกี่ยวกับโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์อัษฎาวุธ แสงนภาเพ็ญ และบริษัทก้าวหน้าโลจิสติคล์ คอนซัลแทนท์ จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์มันสำปะหลังสำหรับเป็นวัตถุดิบในโครงงานพิเศษนี้

ขอขอบคุณนางสาววรัญญา บินอานัต และนางสาวอิสรียา จันเกิด ที่เสียสละเวลาให้ความรู้เกี่ยวกับการใช้เครื่องมือวิเคราะห์เอทานอลและคำแนะนำในการดำเนินงาน ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ และขอขอบคุณครอบครัวที่ให้การสนับสนุนอีกทั้งเป็นกำลังใจสำคัญในการจัดทำโครงงานพิเศษฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่สนับสนุนด้านงบประมาณและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ ซึ่งข้าพเจ้าเชื่อมั่นว่าโครงงานพิเศษเล่มนี้จะเป็นประโยชน์อย่างมากในอนาคต ข้าพเจ้าจึงขออุทิศรายงานเล่มนี้ให้เป็นแหล่งอ้างอิงความรู้เกี่ยวกับการผลิตไบโอเอทานอล

นางสาวนวพร รุ่งโรจน์มงคล
นางสาววัชราพรรณ ชนานาฎ
นางสาวสุณัฏฐา ศิลป์วัฒนจินดา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ง
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฐ
สารบัญรูป ..... ด
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ 2
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ 3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4
2.1 เอทานอล 4
2.1.1 ความหมายของเอทานอล 4
2.1.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล 4
2.1.3 กระบวนการผลิตเอทานอล 5
2.1.4 รูปแบบการใช้เอทานอล 5
2.1.5 จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล 5
2.1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์และการผลิตเอทานอล 6
2.2 ยีสต์ 8
2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* 10
2.2.1.1 การจำแนก 10
2.2.1.2 ลักษณะโดยทั่วไป 10
2.3 เชื้อรา 12
2.3.1 ลักษณะสำคัญของเชื้อรา 13
2.3.2 การจัดจำแนกหมวดหมู่ของเชื้อรา 14
2.3.3 *Aspergillus oryzae* 15
2.3.3.1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 16
2.3.3.2. ประโยชน์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* 16
2.3.4 *Amylomyces rouxii* 16
2.3.4.1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา 17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4 มันสำปะหลัง 18
2.4.1 ความเป็นมาของมันสำปะหลัง 18
2.4.2 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์ 18
2.4.3 องค์ประกอบของมันสำปะหลัง 19
2.5 เอนไซม์ 20
2.5.1 เอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส 20
2.5.1.1 ความสำคัญของเอนไซม์อะไมเลส 20
2.5.1.2 อะไมเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ 20
2.5.1.3 ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส 21
2.5.2 เอนไซม์แอคเซลเลอเรส 1500 21
2.6 กระบวนการหมักเอทานอล 22
2.6.1 กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF) 23
2.6.2 กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF) 23
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 25
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย 28
3.1 เชื้อจุลินทรีย์ 28
3.2 วัตถุดิบ 28
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 28
3.4 วัสดุอุปกรณ์ 29
3.5 วิธีการทดลอง 30
3.5.1 การเตรียมวัตถุดิบ 30
3.5.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์ 30
3.5.2.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ 30
3.5.2.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 31
3.5.2.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 31
3.5.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบแป้งมันสำปะหลัง 31
3.5.4 ศึกษาสภาวะการย่อยผงมันสำปะหลัง โดยไม่เติมเอนไซม์ ACCELLEASE 1500 31

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.5 ศึกษาสภาวะการย่อยผงมันสำปะหลัง โดยการเติมเอนไซม์ ACCELLEASE 1500 31
3.5.6 ศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลโดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) 32
3.5.6.1 การเตรียมสารละลายผงมันสำปะหลัง 32
3.5.6.2 การเตรียมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 32
3.5.6.3 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 32
3.5.6.4 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 32
3.5.6.5 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยการใช้เชื้อเดี่ยวของ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเอนไซม์ทางการค้า โดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) 33
3.5.6.6 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISIR 5088 โดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) 33
3.5.6.7 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยการใช้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) 34
3.5.6.8 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) 34
3.5.7 ศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5.7.1 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยการใช้เชื้อเดี่ยวของ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)..... 35

3.5.7.2 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISIR 5088 โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)..... 35

3.5.7.3 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยการใช้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)..... 35

3.5.7.4 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)..... 36

3.6 การวิเคราะห์..... 36

3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS..... 36

3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล..... 36

3.6.3 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)..... 37

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ..... 37

บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล..... 38

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของผงมันสำปะหลัง..... 38

4.2 ผลการศึกษาผลการศึกษาการย่อยสลายผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเอนไซม์ ACCELLEASE 1500..... 39

4.3 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลส..... 40

4.4 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)..... 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.1 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้า ย่อยและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF 41
4.3.2 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF 43
4.3.3 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF 44
4.3.4 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF 46
4.5 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) 49
4.5.1 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้า ย่อยและหมักเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF 49
4.5.2 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF 51
4.5.3 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF 53

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5.4 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสม *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF 54
4.6 ผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลจากกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) 58
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 59
5.1 สรุปผลการวิจัย 59
5.2 ข้อเสนอแนะ 60
เอกสารอ้างอิง 61
ภาคผนวก ก 67
ภาคผนวก ข 69
ภาคผนวก ค 76
ภาคผนวก ง 97

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	การเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ	7
2.2	องค์ประกอบในหัวมันสำปะหลัง	19
2.3	องค์ประกอบในเนื้อมันสำปะหลัง	20
2.4	เอนไซม์ย่อยสลายแป้งจากจุลินทรีย์	22
4.1	ส่วนประกอบของผงมันสำปะหลัง	38
4.2	ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELLERASE 1500 และไม่ใช้ เอนไซม์ ACCELLERASE 1500	39
4.3	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182	40
4.4	ปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ย่อยและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF	42
4.5	ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF	43
4.6	ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF	45
4.7	ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF	46
4.8	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักของเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF)	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.9	ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้ากับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF	50
4.10	ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF	52
4.11	ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF	53
4.12	ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมัก SSF	55
4.13	ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกกระบวนการหมักของเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการหมักแบบ SSF	56
4.14	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SHF) ของชุดการทดลอง 4 ชุดการทดลอง	58
ค-1	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) จากการย่อยสลายผงมันสำปะหลัง	76
ค-2	ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF	77
ค-3	ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF	78

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ค-4 ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF..... 79

ค-5 ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF..... 80

ค-6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF..... 81

ค-6 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่าง กระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF..... 82

ค-7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF..... 84

ค-7 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSFกับกระบวนการ SHF..... 85

ค-8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF..... 87

ค-8 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF..... 88

ค-9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF..... 90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

ค-9 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF..... 91

ค-10 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF 93

ค-11 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่าง กระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF..... 94

ค-12 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่าง กระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF..... 95

ค-13 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF 96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของเอทานอล	4
2.2	รูปร่างของ *Saccharomyces cerevisiae*	10
2.3	การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศของยีสต์	11
2.4	วัฏจักรการสังเคราะห์เอทานอลจากสารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาลกลูโคส	12
2.5	รูปร่างของ *Aspergillus oryzae*	16
2.6	รูปร่างของ *Amylomyces rouxii*	17
2.7	ลักษณะมันสำปะหลัง	18
2.8	กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นด้วยกระบวนการผลิต (a) แบบ Separate hydrolysis and fermentation และ (b) แบบSimultaneousSaccharification and Fermentation (SSF)	23
2.9	การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง	25
4.1	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้และไม่ใช้เอนไซม์ ACCELLERASE ในการย่อยสลายผงมันสำปะหลัง	39
4.2	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าย่อยและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)	42
4.3	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)	44
4.4	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)	45
4.5	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
4.6	ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่เกิดจากกระบวนการหมักของเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086, *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF).....	48
4.7	ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง) ในชุดการทดลองต่างๆ ด้วยกระบวนการหมักแบบย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)	49
4.8	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชของการหมักผงมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF).....	51
4.9	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชของการหมักผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)	52
4.10	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชของการหมักผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีตส์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)	54
4.11	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชของการหมักผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)	55
4.12	ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่เกิดจากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลของเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)	57
4.13	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง) ในชุดการทดลองต่าง ๆ ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)	57
ข-1	กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวัดโดยวิธีดีเอ็นเอสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร.....	70
ข-2	กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตสวัดโดยวิธีดีเอ็นเอสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร	71
ข-3	กราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอลวัดโดยเครื่องโครมาโตกราฟี	74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
ค-1	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF	77
ค-2	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับเวลา(ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF	78
ค-3	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับเวลา(ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF	79
ค-4	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF	80
ค-5	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF	83
ค-6	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF	83
ค-7	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF	86
ค-8	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 2 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF	86
ค-9	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF	89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
ค-10	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF	89
ค-11	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF	92
ค-12	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF	92
ค-13	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างกับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088	93
ค-14	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างกับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088	94
ค-15	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างกับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 3 เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088	95
ค-16	ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างกับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088	96

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันไบโอเอทานอลได้กลายเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกที่สำคัญ เนื่องจากการลดลงอย่างต่อเนื่องของเชื้อเพลิงจำพวกฟอสซิลที่มีอยู่อย่างจำกัด โดยเรียกเอทานอลที่ผลิตด้วยกระบวนการหมักว่าไบโอเอทานอลหรือเอทานอลชีวภาพ ซึ่งถือว่าเป็นวิธีการแก้ปัญหาบางส่วนสำหรับวิกฤตพลังงานทั่วโลก ซึ่งไบโอเอทานอลเป็นพลังงานทางเลือกหนึ่งที่มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ประเทศไทยถือว่าเป็นผู้ผลิตมันสำปะหลังที่ใหญ่ที่สุดเป็นอันดับสามของโลก โดยมันสำปะหลังเป็นพืชที่มีคาร์โบไฮเดรตสูงและเป็นวัตถุดิบตั้งต้นที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลและช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายลงได้ กระบวนการหมักเอทานอลในอุตสาหกรรมโดยทั่วไปประกอบด้วยสองขั้นตอนหลักคือ การย่อยสลายแป้งและการหมัก (Ruttikan และคณะ, 2012) ซึ่งในการผลิตแอลกอฮอล์เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงาน มี 3 ขั้นตอน ได้แก่ 1) การย่อยสลายสารละลายแป้งที่เป็นของเหลวโดยใช้เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส 2) การใช้เอนไซม์ย่อยผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวให้เปลี่ยนเป็นน้ำตาลกลูโคส และ 3) การหมักน้ำตาลกลูโคสให้เปลี่ยนเป็นเอทานอล (Sree และคณะ, 2004) อย่างไรก็ตามการผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวลนี้ถูกจำกัดด้วยราคาต้นทุนของวัตถุดิบและกระบวนการทางชีวภาพที่ค่อนข้างสูง โดยต้นทุนที่สำคัญของวิธีการทางชีวภาพนี้คือ ค่าใช้จ่ายของการใช้พลังงานความร้อนในการปรับสภาพวัตถุดิบและการใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยสลาย (Anselm และคณะ, 2015)

การผลิตไบโอเอทานอลด้วยวิธีโดยตรง โดยใช้เชื้อร่วมกันของจุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยสลายแป้ง เช่น เชื้อรากลุ่มที่มีความสามารถในการย่อยแป้งและจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล เช่น *Saccharomyces cerevisiae* การย่อยสลายแป้งของจุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยสลายแป้งได้เกิดขึ้นพร้อมกับการหมักของจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถในการหมัก เป็นเทคนิคที่ได้รับความสนใจในการใช้วิธีทางชีวภาพในการเปลี่ยนแป้งไปเป็นไบโอเอทานอล ซึ่งข้อดีของการย่อยสลายพร้อมกับกระบวนการหมักคือ เป็นการเกิดกระบวนการหลายขั้นตอนสำหรับการเปลี่ยนแป้งไปเป็นเอทานอลภายในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพียงใบเดียว โดยกลูโคสที่ผลิตขึ้นในกระบวนการเปลี่ยนแป้งไปเป็นน้ำตาลจะเกิดขึ้นพร้อมกับการดูดซึมสารอาหารของยีสต์ เป็นการหลีกเลี่ยงการเกิดแรงดันออสโมติกที่จะยับยั้งกระบวนการหมัก (Anselm และคณะ, 2015)

ในทางการค้านิยมใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลสในการทำให้เกิดกระบวนการ Saccharification (Neves และคณะ, 2006) ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้มีราคาแพง การหมักเอทานอลแบบดั้งเดิมนิยมใช้ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตไบโอเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง ในกระบวนการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น และไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา รวมทั้งต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Liquefaction ต้องใช้อุณหภูมิสูง 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำให้แป้งเกิดการหนืดและพองตัว ซึ่งขั้นตอนนี้ใช้พลังงานค่อนข้างสูง ประมาณร้อยละ 30-40 ของพลังงานทั้งหมดที่ใช้ผลิตเอทานอลจากแป้ง ดังนั้นจึงมีการพัฒนากระบวนการหมักไบโอเอทานอล โดยใช้กระบวนการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลพร้อมกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) ซึ่งกระบวนการนี้สามารถลดการใช้พลังงานลงได้ และเพิ่มประสิทธิภาพของการใช้ซับสเตรท (koutinas และคณะ, 2007) มีงานวิจัยมากมายที่ใช้กระบวนการ SSF ในการหมักไบโอเอทานอล (kurosawa และคณะ, 1988 ; Hwang และคณะ, 2007)

การใช้จุลินทรีย์ร่วมกันในการหมักไบโอเอทานอลเป็นอีกวิธีหนึ่งที่นำมาใช้ปรับปรุงกระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น เช่น Swain และคณะ (2013) ใช้เชื้อราที่สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ เช่น *Trichoderma* sp. เลี้ยงร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่สามารถหมักเอทานอลได้สูง นอกจากนี้ Lee และคณะ (2012) ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้การตรึงเซลล์ร่วมกันของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* , *Monascus purpureus* และ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น

โครงงานพิเศษนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ในกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมักและกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักโดยใช้วัตถุดิบเป็นมันสำปะหลังเส้นที่มีในประเทศไทยในการผลิตไบโอเอทานอล เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไบโอเอทานอลและลดต้นทุนของการใช้เอนไซม์ทางการค้า

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. ศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยใช้กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation , SHF)

2. ศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 โดยใช้กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation , SSF)

3. การเปรียบเทียบกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยเชื้อราร่วมกับยีสต์ระหว่างกระบวนย่อยแยกจากกระบวนหมัก (SHF) กับกระบวนย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

ศึกษาความสามารถของในการย่อยสลายแป้งให้เป็นน้ำตาลของเชื้อ *Aspergillus oryzae* และเชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 จากนั้นนำมาหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยใช้กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นการนำมันสำปะหลังเส้นมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอลเพื่อนำมาใช้เป็นแหล่งพลังงาน โดยใช้เชื้อราผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลและยีสต์หมักน้ำตาลเป็นเอทานอล ซึ่งจะลดต้นทุนในการนำเอนไซม์ทางการค้ามาใช้ และได้พลังงานที่สะอาดและลดมลภาวะทางสิ่งแวดล้อม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

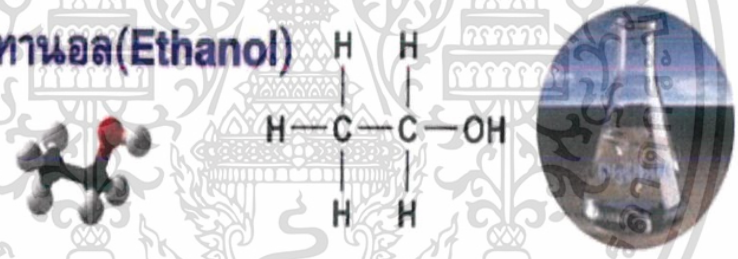
บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล (วิโรจน์, 2553)

2.1.1 ความหมายของเอทานอล

เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ คือ แอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีสูตรเคมี C_2H_5OH มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย มีความไวไฟและค่าออกเทนสูง (เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.8 มีค่าออกเทนสูงถึง 113) ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจนและออกซิเจน เป็นไฮดรอกซิลดิริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) มีน้ำหนักโมเลกุล 46.07 ความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว -114.1 องศาเซลเซียส จุดเดือด 78.5 องศาเซลเซียส สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ใช้ผลิตอาหาร และเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิง เป็นต้น



รูปที่ 2.1 โครงสร้างของเอทานอล
ที่มา : http://thaicafe.blogspot.com/2012/06/blog-post_21.html
สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2559

2.1.2 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (ภูวดี, 2551)

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้ คือ

1. วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ธัญพืช ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น

2. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีตรูต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น

3. วัตถุดิบประเภทเส้นใย ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 กระบวนการผลิตเอทานอล (ภูวดี, 2551)

กระบวนการผลิตเอทานอล แบ่งได้เป็น 2 วิธี ดังนี้

วิธีที่ 1 การใช้กระบวนการทางเคมีเป็นการสังเคราะห์เอทานอล เอทานอลที่ได้เรียกว่า "เอทานอลสังเคราะห์ (synthetic ethanol)"

วิธีที่ 2 การใช้วิธีการทางชีวเคมีเพื่อผลิตเอทานอล เอทานอลที่ได้เรียกว่า "ไบโอเอทานอล (bio-ethanol)" โดยการใช้วัสดุการเกษตรที่มีองค์ประกอบประเภท แป้ง น้ำตาล หรือเซลลูโลส เป็นวัตถุดิบ

2.1.4 รูปแบบการใช้เอทานอล (ภูวดี, 2551)

เอทานอลนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ 3 รูปแบบ

1. ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง ทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล โดยเครื่องยนต์ของรถยนต์ต้องได้รับการออกแบบเป็นพิเศษ ให้สามารถต้านทานการกัดกร่อนได้ เนื่องจากเอทานอลสามารถกัดกร่อนโลหะ ยาง และพลาสติกบางชนิดที่ใช้เป็นชิ้นส่วนของเครื่องยนต์และอุปกรณ์

2. นำไปผสมกับน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซลในสัดส่วนต่าง ๆ ตามการเลือกใช้ของแต่ละประเทศ ซึ่งหากผสมกับน้ำมันเบนซินในสัดส่วนร้อยละ 10 โดยปริมาตร เรียกว่าน้ำมันแก๊สโซฮอล์ (Gasohol) แต่ถ้าผสมในสัดส่วนที่แตกต่างไปจากร้อยละ 10 โดยปริมาตร เช่น ผสมในสัดส่วนร้อยละ 85 เรียกว่าน้ำมัน E85

3.ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซิน เนื่องจากเอทานอลมีค่าออกเทนสูง โดยค่าออกเทนจะเพิ่มขึ้นตามสัดส่วนของเอทานอลที่ใช้ผสมในน้ำมันเบนซิน

2.1.5 จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล (ปฏิพล, 2555)

กระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยยีสต์ในระดับอุตสาหกรรมมีกระบวนการผลิตแตกต่างกันไป รวมถึงยีสต์ที่ได้รับความสนใจและถูกเลือกใช้ในการหมัก ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvaum (carlsbergensis)*, *Shizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces* species สำหรับแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ในกระบวนการหมักได้แก่ *Zymomonas mobilis* ซึ่งการเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดใดก็จะขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ สำหรับ *Zymomonas mobilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* ต่างมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม กรณีเลือกใช้ *Z. mobilis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงแต่มีชีวมวลต่ำ และมีความทนต่อเอทานอลต่ำกว่ายีสต์ จึงจำเป็นต้องมีความระมัดระวังในเรื่องของการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงแง่เศรษฐศาสตร์ โรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจึงให้ความสนใจ *S. cerevisiae* มากกว่า (ชุติมา, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณสมบัติของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลควรมีลักษณะดังนี้ (นฤมล, 2549)

1. สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด

2. ให้ผลผลิตสูงและมีอัตราการหมักเอทานอลเร็ว ทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง

3. มีความทนต่อเอทานอล เนื่องจากระหว่างกระบวนการหมักจะมีเอทานอลบางส่วนสะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์ยีตส์แตกได้ ยีตส์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอลได้สูง จึงส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

4. มีความทนต่ออุณหภูมิสูง (Thermotolerance) เพราะในกระบวนการผลิตเอทานอลจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้อุณหภูมิในการหมักสูงขึ้นมีผลต่อการอยู่รอดและกิจกรรมการทำงาน ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงจึงช่วยให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

5. ทนพีเอช (pH) ต่ำ หรือทนกรด (Acid tolerance) ในกระบวนการผลิตจะเกิดกรดทำให้พีเอชของอาหารลดลง ยีสต์ที่สามารถทนพีเอชต่ำได้จะช่วยให้มีการผลิตเอทานอลสูงขึ้นด้วย

6. มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงในสภาวะต่าง ๆ ของการหมัก และมีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย ส่งผลให้ประสิทธิภาพและคุณภาพในการผลิตเอทานอลสม่ำเสมอ

7. มีความสามารถในการตกตะกอน (Flocculation) ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวและนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ใหม่ได้

8. มีความทนต่อแรงดันออสโมซิส (Osmotolerance) ทำให้สามารถใช้อาหารที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูงๆ และช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ทนต่อแรงดันออสโมซิส จึงมีผลทำให้ผลิตเอทานอลมากขึ้น

2.1.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์และการผลิตเอทานอล (จิตตวีร์,2557)

1. ความเข้มข้นของน้ำตาล

แหล่งคาร์บอนที่ใช้ได้ดีได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและฟรักโตส ยีสต์บางชนิดสามารถใช้ไดแซกคาไรด์มอลโตส ซูโครสหรือแลกโตสได้ ส่วนพอลีแซคคาไรด์ที่ยีสต์บางชนิดใช้ได้ คือ แป้ง ยีสต์ที่สามารถใช้แป้งได้ เช่น *Saccharomyces cerevisiae, S. chevalieri, Endomycopsis fibuligera* ยีสต์บางชนิดเท่านั้นที่สามารถใช้น้ำตาลเพนโตสได้ดีกว่าน้ำตาลเฮกโซส เช่น *Cryptococcus* ยีสต์บางพวก เช่น ฟิล์มยีสต์สามารถใช้กรดอินทรีย์ได้ อาหารสำหรับหมักที่มีน้ำตาลสูงกว่า 11-15 เปอร์เซ็นต์ การหมักเอทานอลของยีสต์จะหยุด ดังนั้นการใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* มาหมักในสภาวะเช่นนี้ จึงมีผลให้การหมักเป็นไปได้ช้าๆ และเมื่อเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerant yeast) เช่น *S. rouxii* พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำ (Panchal และ Stewart, 1980) D. Amore และคณะ (1988) ได้ศึกษาผลของแรงดันออสโมซิสต่อกระบวนการหมักของ brewing yeast (*S. cerevisiae*) ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลต่างๆ โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 100, 200,

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

300, และ 400 กรัมต่อลิตร ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2.1 คือเมื่อกลูโคสความเข้มข้นสูงขึ้นการเจริญและการหมักของ brewing yeast ลดต่ำลง

ตารางที่ 2.1 การเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารที่มีกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

กลูโคส (กรัม/ลิตร)	อัตราการเจริญ (มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง/มิลลิลิตร.ชั่วโมง)	การหมัก (โมลของเอทานอล/มิลลิลิตร. ชั่วโมง)	ผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (เปอร์เซ็นต์)
100	0.33	54.0	93.5
200	0.24	52.7	66.4
300	0.11	42.5	59.0
400	0.03	14.2	23.6

ที่มา : Panchal, 1990

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าอัตราการเจริญ อัตราการหมักและประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล ซึ่งดูจากค่าผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (theoretical ethanol yield) ลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลภายในเซลล์ได้รับความเสียหาย จึงมีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในวิถี Embden-Meyerhof-Parnas อย่างไรก็ตาม เมื่อมีการเพิ่มลิพิดไม่อิ่มตัว (unsaturated lipid) เช่น กรดลิโนลีนิก (linolenic acid) และสารอาหารบางอย่าง เช่น เปปโตนยีสต์เอกเทรกซ์ (Peptone-yeast extract) ลงไปในอาหารสำหรับหมัก มีผลให้การยับยั้งเนื่องจากแรงดันออสโมซิสลดน้อยลง แรงดันออสโมซิสมีผลให้เซลล์ยีสต์ขาดสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการรักษาสภาพของเซลล์ ทั้งนี้เพราะแรงดันออสโมซิสไปมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะแข็ง (rigid) จึงมีผลกระทบต่อการนำสารอาหารเข้าไปในเซลล์ การเติมลิพิดไม่อิ่มตัว เช่น กรดลิโนลีอิกจึงไปช่วยเพิ่มสภาพการเป็นของไหล (fluidity) ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สารอาหารต่าง ๆ สามารถไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีขึ้นและเอทานอลภายในเซลล์สามารถแพร่ออกนอกเซลล์ได้เร็วขึ้น

2. อุณหภูมิ

ยีสต์แต่ละชนิดเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกมีโซไฟล์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์ยังสามารถเจริญเติบโตได้ประมาณ 35-47 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้อยู่ระหว่าง 0 - 5 องศาเซลเซียส แต่ยีสต์บางชนิดที่เป็นพวกไซโครไฟล์สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส *Saccharomyces cerevisiae* อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 25-30 องศเซลเซียส สูงสุดประมาณ 35 องศาเซลเซียส ต่ำสุด 11 - 12 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ออกซิเจน

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นพวกแฟคคัลเททีพ แอนแอโรป แต่ยีสต์เติบโตในสภาพมีออกซิเจนได้ดี ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจนเติบโตได้ช้า ในสภาพมีออกซิเจนยีสต์ใช้น้ำตาลโดยการออกซิเดชันอย่างสมบูรณ์ได้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ส่วนในสภาพไม่มีออกซิเจน ยีสต์ใช้น้ำตาลโดยการหมักส่วนใหญ่เป็นการให้เอทานอล ในการหมักโดยยีสต์ให้ได้เอทานอลนั้น หากมีออกซิเจนยีสต์จะใช้น้ำตาลให้คาร์บอนไดออกไซด์และน้ำ แทนการหมักเอทานอล หรือการหมักถูกยับยั้งโดยการหายใจเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า Pasteur effect

4. ค่าความเป็นกรด-เบส

ยีสต์เติบโตได้ใน pH ต่ำสุดที่ยีสต์สามารถเติบโตได้คือ 1.5 ส่วน pH สูงสุด 8.0-8.5 สำหรับ pH ที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของยีสต์แตกต่างกัน ส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 4.0-4.5 ยีสต์ส่วนใหญ่จะเติบโตไม่ดีในสภาพที่เป็นด่าง

5. ความเข้มข้นของเอทานอล

ยีสต์หลายสกุลมีความอ่อนแอต่อการยับยั้งโดยเอทานอล การมีเอทานอลอยู่ในถังหมักถือว่าเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่สามารถไปยับยั้งการเจริญของยีสต์ ความเข้มข้นของเอทานอลเพียง 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ก็ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าลง การเจริญของจุลินทรีย์ถูกยับยั้งด้วยเอทานอลแบบไม่แข่งขัน อย่างไรก็ตามได้ทำการศึกษาและชี้ให้เห็นว่าถ้ามีการเติมเอทานอลในช่วง log phase ทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลง ยีสต์หลายสกุลมีความอ่อนแอต่อการยับยั้งด้วยเอทานอล อย่างไรก็ตาม Brown และคณะ (1981) ได้ทำการศึกษาและชี้ให้เห็นว่าผลของการยับยั้งนั้นมีความซับซ้อนมาก ยิ่งไปกว่านั้นถ้ามีการเติมเอทานอลในช่วง log phase ทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว (อาจเป็นผลเนื่องมาจากการสังเคราะห์โปรตีน) ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพอย่างถาวร โดยทั่วไปพบว่าเอลยีสต์ (ale yeast) มีความทนต่อเอทานอลน้อยกว่าลาเกอร์ยีสต์ (larger yeast) และยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศหรือในสภาวะที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว พบว่ามีการตอบสนองต่อเอทานอลน้อย แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงช่วยส่งเสริมให้ความเป็นพิษของเอทานอลมีมากขึ้น การผลิตเอทานอลลดลงเมื่อยีสต์อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ และการผลิตเอทานอลมีมากขึ้นเมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะของอุณหภูมิต่ำสุดของการเจริญ

2.2 ยีสต์ (วันเชิญ, 2550)

ยีสต์เป็นสิ่งมีชีวิตในอาณาจักรเห็ดรา (kingdom Fungi) เช่นเดียวกับรา แต่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว (Unicellular) มีขนาด5-10 ไมโครอน เมื่อแตกหน่อเซลล์จะต่อกันเป็นสายรียกว่าซูโดมัยสิเลียม (Psudomycelium) บางชนิดสร้างเส้นใยที่แท้จริง (True mycelium) เช่นเดียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับเชื้อรา ยีสต์มีรูปร่างหลายแบบทั้งแบบกลม รูปไข่ รูปไข่ปลายแหลม รูปคนโท รูปสามเหลี่ยม รูปทรงกระบอก และรูปเลมอน ซึ่งส่วนใหญ่จะสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (Budding)

ยีสต์พบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในดิน น้ำ หรือในส่วนต่าง ๆของพืช ยีสต์บางชนิดอาจพบอยู่กับแมลง หรือแม้แต่ในกระเพาะของสัตว์บางชนิด แต่แหล่งที่พบยีสต์ได้บ่อยคือ แหล่งที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง เช่น น้ำผลไม้ที่มีรสหวานและมีสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของยีสต์แต่ละชนิด เช่น ยีสต์พวก *Saccharomyces* สามารถเจริญได้ดีในที่มีน้ำตาล เช่น น้ำหวานของดอกไม้ ตามผิวของผลไม้ที่สุกงอมหรือมีตำหนิ ในน้ำผลไม้ที่เกิดการหมัก เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถพบยีสต์ได้ในผักดอง ผลไม้ดองและอาหารหมัก ในบางระยะยีสต์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติมักจะปนเปื้อนลงในอาหารเป็นเหตุให้อาหารเน่าเสียได้

เซลล์ยีสต์ประกอบด้วยกรดอะมิโน โปรตีน เกลือแร่ วิตามิน และธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์และสัตว์ ยีสต์จึงถูกนำมาเป็นอาหารคนและอาหารสัตว์ที่มากด้วยคุณค่าของวิตามิน เช่น การดื่มไวน์ในปริมาณเล็กน้อยจะช่วยให้ร่างกายแข็งแรงต้านทานโรค ทำให้มีอายุยืน เพราะมีสารอาหารและแร่ธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญและการต้านโรค

แอลกอฮอล์เป็นผลผลิตสำคัญที่ได้จากการทำงานของยีสต์ โดยการหมักธัญพืชต่างๆ ให้กลายเป็นเมรัย หรือเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ถือเป็นกระบวนการที่มนุษย์สามารถคิดค้นได้เมื่อประมาณ 8,000 ปีมาแล้ว ตั้งแต่ชนชาติบาลิโลเนียน อียิปต์ และเมโสโปเตเมีย โดยเบียร์ถือเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดแรกของโลก นอกจากนี้ในประเทศต่าง ๆยังมีภูมิปัญญาการหมักเมรัยจากวัตถุดิบที่แตกต่างกันทั่วโลก เช่น ไวน์จากการหมักองุ่น สาเก และสาโทจากการหมักข้าว เป็นต้น นอกจากการหมักแอลกอฮอล์เพื่อเป็นเครื่องดื่มแล้ว ปัจจุบันการหมักแอลกอฮอล์ถูกนำไปผสมกับน้ำมัน ทำให้เกิดเชื้อเพลิงทางเลือกที่เรียกว่า แก๊สโซฮอล์และดีโซฮอล์ โดยแอลกอฮอล์ที่นำมาผสม เรียกว่า เอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) เกิดจากการหมักวัตถุดิบที่มีน้ำตาล ได้แก่ อ้อย ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น นำวัตถุดิบดังกล่าวมาบีบหรือรีดเพื่อให้ได้ของเหลวที่มีน้ำตาลออกมา รวมทั้งวัตถุดิบที่มีแป้งหรือเซลลูโลส ได้แก่ มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และผักตบชวา เป็นต้น โดยต้องใช้เอนไซม์ย่อยแป้งหรือเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลออกมาก่อน เมื่อได้น้ำตาลแล้วหลังจากนั้นจึงเติมยีสต์เพื่อให้ยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นอาหาร หลังจากหมักได้ประมาณ 3 วัน ก็จะได้แอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 9 - 10 ซึ่งเมื่อนำไปผ่านกระบวนการกลั่นจะทำให้ได้แอลกอฮอล์ร้อยละ 95 และนำไปผสมกับน้ำมันเบนซินหรือน้ำมันดีเซลในสัดส่วนตามแต่ละประเภทของน้ำมัน มียีสต์หลายสายพันธุ์ได้ถูกนำมาศึกษาพิสูจน์แล้วว่ามีประโยชน์ต่อมนุษย์ แต่มียีสต์เพียงไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่ถูกนำมาใช้ในระดับอุตสาหกรรม โดยตัวอย่างสายพันธุ์ที่นิยมนำมาใช้คือ *Saccharomyces cerevisiae*

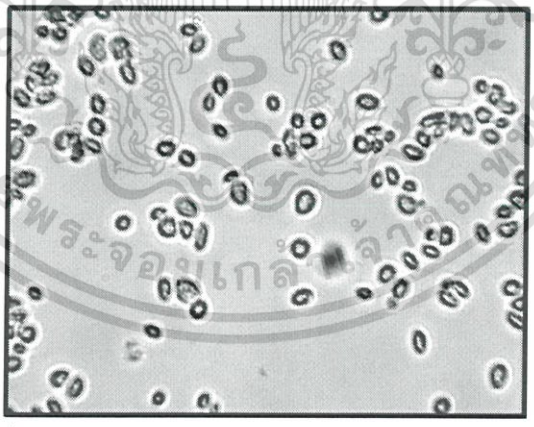
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 *Saccharomyces cerevisiae* (นุกูล, 2551)

ปัจจุบันพบว่าในจีนัส *Saccharomyces* มีอยู่ด้วยกัน 10 – 16 สปีชีส์ แต่ที่รู้จักกันดีที่สุด คือ *S. cerevisiae* เนื่องจากเป็นยีสต์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับมนุษย์อย่างมาก ถือว่าเป็นยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์สำหรับเป็นเครื่องดื่ม (brewer's yeast) และยีสต์ผลิตขนมปัง (baker's yeast) อย่างไรก็ตามยีสต์สำหรับผลิตแอลกอฮอล์ที่เป็นเครื่องดื่มดีที่สุดมาจาก *S. pastorianus* หรือเรียกชื่อหนึ่งว่า *S. carlsbergensis* นอกจากนี้ *S. cerevisiae* ได้ใช้ในการศึกษาหลายด้านทั้งด้านเซลล์วิทยาซึ่งถือว่าเป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิตพวกยูคาริโอต ทางชีวเคมีได้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับวิถีสังเคราะห์ของสารต่างๆ โดยเฉพาะคาร์โบไฮเดรต และทางพันธุศาสตร์ประยุกต์ซึ่งใช้ยีสต์ชนิดนี้เป็นโฮสต์ในการตัดต่อยีนจากภายนอกเข้าไปเพื่อการผลิตสารเคมีใหม่ๆ เป็นจำนวนมาก เป็นต้น

2.2.1.1 การจำแนก

Kingdom	:	Fungi
Phylum	:	Ascomycota
Subphylum	:	Saccharomycotina
Class	:	Saccharomycetes
Order	:	Sccharomycetaceae
Genus	:	*Saccharomyces*
Species	:	*cerevisiae*



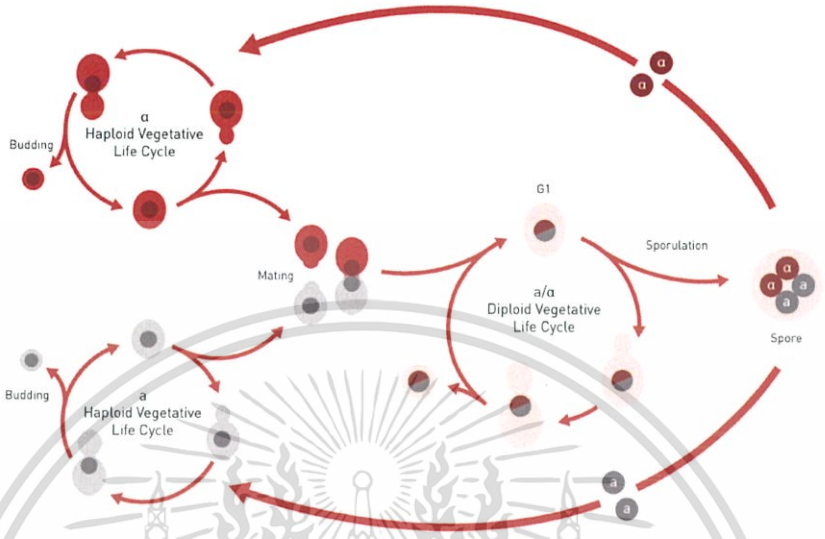
รูปที่ 2.2 รูปร่างของ *Saccharomyces cerevisiae*
ที่มา : Konig และคณะ (2009) สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2559

2.2.1.2 ลักษณะโดยทั่วไป (สาวิตรี, 2549)

Saccharomyces cerevisiae จัดเป็นยีสต์แท้ มีวงจรชีวิตได้ทั้งแบบ Haploid (n) และ Diploid (2n) แสดงดังรูปที่ 2.3 แต่ส่วนมากพบในรูปของ Diploid ซึ่งมีลักษณะเป็นทรงรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5-6 ไมโครเมตร สำหรับ Haploid จะมีรูปร่างค่อนข้างกลมมีขนาดเส้นผ่าน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศูนย์กลาง 4 ไมโครเมตร แต่ในระยะ Exponential phase นั้นมักจะพบวงจรชีวิตแบบ Haploid มากกว่า Diploid ซึ่งทั้งสองแบบนี้สามารถแตกหน่อ (Budding) โดยเซลล์นั้นจะยื่นหน่อออกมาจากเซลล์แม่

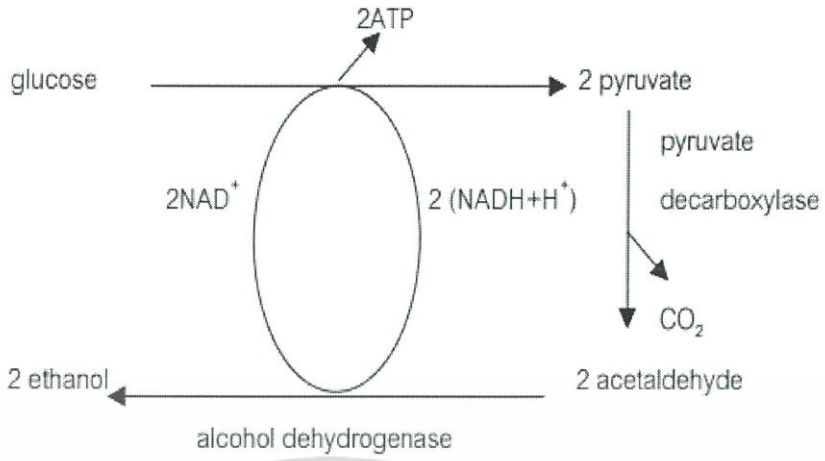


รูปที่ 2.3 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศของยีสต์
ที่มา : http://www.singerinstruments.com/resource/what-is-yeast/
สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2559

Saccharomyces cerevisiae มี Generation time สั้น (Doubling time 1.25-2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) เจริญได้ง่าย การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศจะสร้างแอสโคสปอร์ ซึ่งเกิดขึ้นภายหลังการคอนจูเกชั่น (conjugation) หรือจะพัฒนาจากเซลล์ดิพลอยที่อยู่ในระยะเวเจตเททีฟแอสโคสปอร์มักมีรูปกลมหรือไข่ มีจำนวน 1-4 แอสโคสปอร์ต่อแอสคัส สปอร์มีลักษณะกลมรี ผิวสปอร์เรียบ สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้แต่ใช้เกลือไนเตรทไม่ได้ ยีสต์ชนิดนี้เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารต่างๆ เช่น ผลไม้ น้ำผลไม้ น้ำเชื่อม และน้ำผึ้งเกิดการเน่าเสียในขณะเดียวกันก็เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตแอลกอฮอล์ได้สูงจึงมีการนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเอทานอล

การหมักเอทานอลของยีสต์นั้นเกิดจากการที่น้ำตาลกลูโคสถูกเปลี่ยนไปตามวิถีไกลโคไลซิส จนได้ไพรูเวต จากน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล จะได้ไพรูเวต 2 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวตเกิด decarboxylation โดยเอนไซม์ pyruvate decarboxylase เป็นตัวเร่งการสร้าง acetaldehyde ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นเอทานอล โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ดังสมการรูปที่ 2.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ประสิทธิภาพทางการผลิตเอทานอลของยีสต์

$C_6H_{12}O_6$ → $C_2H_5OH + 2CO_2$ + energy

Glucose	ยีสต์เอนไซม์	Ethanol		ATP
180 g		92 g	88 g	56 Kcal

รูปที่ 2.4 วัฏจักรการสังเคราะห์เอทานอลจากสารตั้งต้นที่เป็นน้ำตาลกลูโคส
ที่มา : Panchal และ Tavares (1990)
สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2559

จากสมการให้ผลสรุปทางทฤษฎีได้ว่า การผลิตเอทานอลจากกลูโคส 1 กรัม ให้เอทานอล 0.511 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.498 กรัม นั้นคือมีผลผลิตทางทฤษฎี (theoretical yield) สำหรับการผลิตเอทานอล โดยมีผลผลิตทางทฤษฎีร้อยละ 51.1 เนื่องจากน้ำตาลร้อยละประมาณ 6-12 จะถูกยีสต์ใช้เพื่อการเจริญและบางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นผลผลิตพลอยได้บางชนิด เช่น กลีเซอรอล ซัคซิเนท และ higher alcohol หรือ fusel oil ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ต่ำกว่าผลผลิตทางทฤษฎี

2.3 เชื้อรา (อนุวัฒน์, 2549)

รามีความสำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่ อุตสาหกรรมอาหารหมักและเครื่องดื่ม เช่น การผลิตสาเก เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว เทมเป้ อุตสาหกรรมการผลิตสารเมตาบอไลท์ปฐมภูมิ เช่น กรดอินทรีย์และวิตามินต่าง ๆ อุตสาหกรรมการผลิตสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ เช่น ยาปฏิชีวนะและสารอัลคาลอยด์ นอกจากนี้รายังเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ที่มีความสำคัญหลายชนิด เช่น อะไมเลส โปรติเอสและฟอสฟาเทส เป็นต้น และในปัจจุบันรายังถูกนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับผลิต heterologous

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

protein หลายชนิด เนื่องจากรามีข้อดีหลายประการเมื่อเปรียบเทียบกับสิ่งมีชีวิตในระบบอื่น เช่น 1) รามีกลไกในการผลิตและส่งโปรตีนออกมานอกเซลล์ได้ในปริมาณสูง 2) รามีกลไก post-transcription และ post-translation 3) ราบางชนิดยังได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา (FDA) ว่ามีความปลอดภัยต่อการนำไปใช้งานในอุตสาหกรรมอาหาร และ 4) รายังมีความเสถียรทางพันธุกรรมสูง ราที่มีบทบาทในการผลิต heterologous protein ในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ กลุ่ม *Aspergillus* spp. (*A. awamori A. niger A. oryzae* และ *A. nidulans*) กลุ่ม *Mucor* spp. (*M. miehie* และ *M. circinelloides*) กลุ่ม *Mortierella* spp. (*M. isabellina*) และกลุ่ม *Trichoderma* spp. (*T. reesei*)

2.3.1 ลักษณะสำคัญของเชื้อรา

1. Mode of nutrition ลักษณะการรับอาหารของราเรียกว่า heterotrophic (ลักษณะต่างไปจากพืชชั้นสูง ซึ่งมี mode of nutrition เป็นแบบ autotrophic) โดยราไม่มี chlorophyll ดังนั้นจึงไม่สามารถสังเคราะห์แสงหรือสร้างอาหารพวก carbon compound หรือน้ำตาลได้เอง จึงต้องอาศัยสิ่งเหล่านี้จากแหล่งภายนอก ซึ่งหาได้ 2 ลักษณะ ดังนี้

1.1 การเป็น parasite แหล่งอาหารที่ได้รับจากการเป็น parasite คือเซลล์ของสิ่งมีชีวิตซึ่งอาจเป็นคน สัตว์ หรือพืช

1.2 การเป็น saprobe ตรงข้ามกับการเป็น parasite คือ ได้รับอาหารจากอินทรียวัตถุต่างๆที่ตายแล้ว (dead organic matter)

ดังนั้นแบ่งราโดยใช้ลักษณะของการได้รับอาหารเป็นหลัก แบ่งออกเป็น 2 พวกใหญ่ๆ คือ พวกที่เป็น parasite และพวกที่เป็น saprobe และใน 2 พวกนี้สามารถแบ่งย่อยต่อได้อีก คือ obligate parasite หมายถึง พวก parasite ตลอดชีพของมันเป็น parasite ได้เพียงอย่างเดียว พวก saprobe สามารถแบ่งเป็น obligate saprobe คือเป็นได้แต่เพียง saprobe อย่างเดียวตลอดชีพจักร นอกจากนี้มีราอีกเป็นจำนวนมากที่ในชีพจักรสามารถเป็นได้ทั้ง parasite และ saprobe

2. Nucleus นิวเคลียสของราสามารถมองเห็นได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อย้อมด้วยสีบางชนิด เช่น Giemsa หรือ Feulgen stain ซึ่งย้อม nucleus acid แต่ละนิวเคลียสมี nucleolus เพียง 1 อัน มีตำแหน่งอยู่ติดกับ nuclear membrane การแบ่งนิวเคลียสแบบ mitosis (somatic nuclear division) ของรา แตกต่างไปจากพืชและสัตว์อื่น ๆ คือ ตลอดระยะเวลาการแบ่งนิวเคลียส nuclear membrane จะคงอยู่ตลอดเวลา โดยนิวเคลียสมีการยืดยาวออกเป็นรูป dumd-bell-shaped และในที่สุดจะขาดออกเป็น 2 nuclear membrane ซึ่งทำหน้าที่ในการแบ่งส่วนโครโมโซมให้เข้าไปอยู่ใน daughter nucleus เท่าๆกัน

3. Somatic phase (vegetative phase) หมายถึง ระยะที่มีการเจริญเติบโต มีความหมายตรงข้ามกับ reproductive phase เส้นใยของรามีผนังห่อหุ้ม ยกเว้นในราบางชนิดที่จัดอยู่ในพวกชั้นต่ำ พบว่ามี somatic phase ประกอบด้วยเซลล์เดียวและไม่มี cell wall ห่อหุ้ม thallus ราส่วนใหญ่ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เอง (non-motile) ประกอบด้วย filament มีลักษณะยาวเรียกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เส้นใย (hypha) อาจมีผนังกั้นตามแนวขวาง ระยะผนังกั้นเรียกว่า septum ซึ่งแบ่งเส้นใยออกเป็นช่องๆ แต่ละช่องเรียกว่า hyphal segment

4. Hyphal wall ผนังของเส้นใยในราส่วนใหญ่ประกอบด้วย microfibril ของสาร chitin มีราบางพวกเท่านั้นที่พบว่าผนังของเส้นใยประกอยด้วยสาร cellulose โครงสร้างของ chitin คือ N-acetyl-D-glucosamine จับต่อกันเป็น polymer ส่วนของ cellulose เป็น polymer ของ D-glucose

5. Storage nutrient อาหารสะสมของราพบได้ในรูปของ glycogen และ lipid เท่านั้น glycogen เป็นอาหารสะสมที่พบใน cytoplasm ของราและสัตว์ แต่จะไม่พบในเซลล์ของพืช

6. Reproductive system หน่วยที่ใช้ในการแพร่พันธุ์ของรา ได้แก่ สปอร์ สปอร์ที่ราสร้างเป็นผลมาจากระบบการสืบพันธุ์ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 2 แบบ คือระบบการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศและระบบการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ

6.1 ระบบการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้เพศ (asexual or imperfect reproductive system) สปอร์ที่ได้จากการสืบพันธุ์แบบนี้ไม่ผ่านขั้นตอนการรวมตัวกันของนิวเคลียสและนิวเคลียสมีการแบ่งตัวแบบ mitosis ได้แต่เพียงอย่างเดียว

6.2 ระบบการสืบพันธุ์แบบใช้เพศ (sexual or pefect reproductive system) มีการผสมระหว่าง sex cell และนิวเคลียส 2N มีการแบ่ง meiosis ลดจำนวน chromosome จาก 2N เป็น N ทำให้ได้สปอร์ที่มีลักษณะเป็น haploid และ sexual spore ที่สร้างโดยเชื้อรา ได้แก่ oospore, zygospore, ascospore และ basidiospore

2.3.2 การจัดจำแนกหมวดหมู่ของเชื้อรา

เนื่องจากเชื้อรามีอยู่มากมาย บางชนิดมีลักษณะรูปร่างคล้ายคลึงกันมาก บางชนิดแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดเจน ทำให้นักจุลชีววิทยาพยายามที่จะจัดแบ่งเชื้อราเป็นหมวดหมู่ ในสมัยแรกๆ การจัดประเภทของเชื้อรายังไม่ถูกต้องตามธรรมชาติที่แท้จริง เพราะขาดความรู้ด้านวิวัฒนาการ แต่ในปัจจุบันความรู้ทางด้านวิวัฒนาการก้าวหน้าไปไกล การจัดประเภทของเชื้อราจึงถูกต้องมากขึ้น เชื้อราทั้งหมดอยู่ใน Division Eumycophyta ซึ่งแบ่งเป็น 4 class ได้แก่ (Ainsworth และคณะ, 1983)

1. Class Phycomycetes เชื้อราใน Class นี้มีลักษณะที่สำคัญคือ

1.1 เส้นใยไม่มีผนังกั้น มีนิวเคลียสกระจัดกระจายทั่วเส้นใยที่เรียกว่า coenocytic hypha

1.2 สร้างสปอร์ภายในอับสปอร์ไม่จำกัดจำนวน

1.3 Resting spore เกิดจากการสืบพันธุ์แบบมีเพศ มีผนังหนาทำให้มันต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ดี

1.4 ต้องการความชื้นสูงในการเจริญ ส่วนมากเป็นพวกที่อาศัยอยู่ในน้ำ

1.5 ดำรงชีวิตแบบ saprophyte และ parasite

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.6 สมาชิกในกลุ่มนี้ได้แก่ *Rhizopus* sp., *Mucor* sp. , *Allomyces* sp. , *Aprolegnia* sp. และ *Aibugo* sp.

2. Class Ascomycetes เชื้อราใน Class นี้มีลักษณะที่สำคัญ คือ

2.1 เส้นใยมีผนังกั้น

2.2 สปอร์แบบมีเพศสร้างภายใน ascus มี 8 ascospore

2.3 สปอร์แบบไม่มีเพศ ไม่สร้างใน ascus และสปอร์ไม่เคลื่อนที่

2.4 ไม่ต้องการความชื้นมากในการเจริญ

2.5 สมาชิกที่สำคัญได้แก่ ยีสต์ , *Aspergillus* sp. และ *Penicillium* sp.

3. Class Basidiomycetes เชื้อราใน Class นี้มีลักษณะที่สำคัญคือ

3.1 เส้นใยมีผนังกั้น

3.2 สปอร์ไม่เคลื่อนที่

3.4 สปอร์แบบมีเพศสร้างบน basidium โดยแต่ละ basidium มี 4 basidiospore

3.4 เส้นใยเป็นชนิด binucleate mycelium คือมีสองนิวเคลียสในแต่ละเซลล์

3.5 สมาชิกที่สำคัญได้แก่ เห็ดชนิดต่างๆ

4. Class Deuteromycetes เชื้อราใน class นี้มีลักษณะที่สำคัญ คือ

4.1 เส้นใยมีผนังกั้น

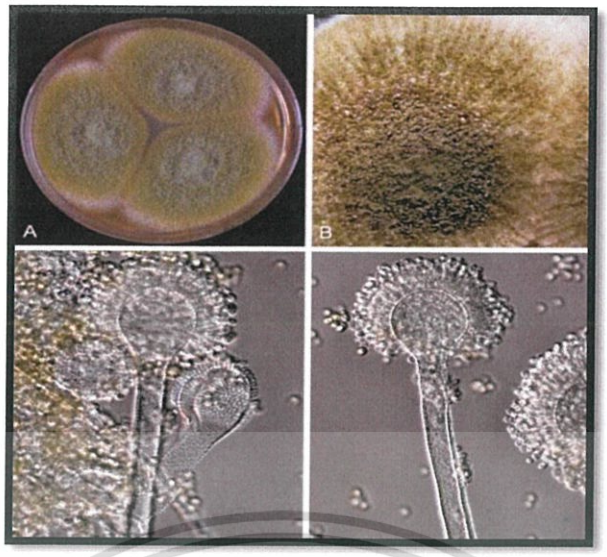
4.2 สมาชิกที่สำคัญได้แก่พวกที่เป็นสาเหตุของโรคกลาก เกลื้อน Hong Kong foot

4.3 การสืบพันธุ์แบบไม่มีเพศจะสร้างสปอร์แบบ conidia

2.3.3 *Aspergillus oryzae*

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 รูปร่างของ *Aspergillus oryzae*

ที่มา : Varga และคณะ (2011) สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2559

2.3.3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Aspergillus sp. โคโลนีจะมีลักษณะเป็นเส้นใยสีขาว สปอร์สีเขียวและเมื่อนำมาส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า มีก้านชูสปอร์ (conidiophore) และส่วนปลายของก้านชูสปอร์จะโป่งออกเป็นเวสสิเคิล มีสปอร์เกาะติดและเป็นเส้นใยแบบมีผนังกั้น (Anselm และคณะ, 2015)

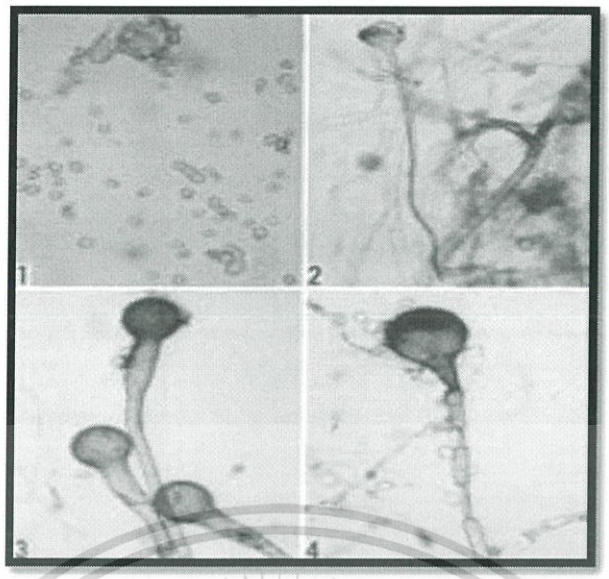
2.3.3.2 ประโยชน์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae*

จากการศึกษาพบว่า *Aspergillus oryzae* เป็นสายพันธุ์ของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในปริมาณสูง (Aunstrup, 1979) และยังเป็นสายพันธุ์ที่ผลิต อะไมโลกลูโคซิเดสได้ (Pandey และคณะ, 2005) ทั้งนี้ยังเป็นเชื้อราที่มีความสำคัญในการผลิตอาหารหมักและเครื่องดื่ม (Machida และคณะ, 2005)

2.3.4 *Amylomyces rouxii*

Domain	:	Eukaryote
Kingdom	:	Fungi
Division	:	Zygomycota
Class	:	Zygomycetes
Order	:	Mucorales
Family	:	Mucoraceae
Genus	:	*Amylomyces*
Species	:	*rouxii*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.6 รูปร่างของ *Amylomyces rouxii*
ที่มา : Ellis และคณะ (1976) สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2559

2.3.4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

Amylomyces rouxii หรือ *Mucor rouxii* เป็นเชื้อราอยู่ใน Family *Mucoraceae* *Amylomyces rouxii* มีลักษณะโคโลนีแบบแพร่กระจาย สีเหลือง สืบพันธุ์ได้แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยการสร้าง sporangiospore อาศัยเพศสร้าง zygospore โดยทั่วไปการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีบทบาทต่อการสืบพันธุ์มากกว่า สร้าง sporangiophores ยาวประมาณ 10 มิลลิเมตร กว้าง 14 ไมโครเมตร sporangia มีขนาดยาว 85 ไมโครเมตร สูง 40-50 ไมโครเมตร zygospore มีรูปร่างกลมหรือเรียบแบน ขนาดประมาณ 100 ไมโครเมตร นอกจากนี้ *A. rouxii* มีคุณสมบัติที่สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างในระหว่างการเจริญเติบโตได้ทั้งแบบเส้นใย (mycelium) และแบบเซลล์ยีสต์ (yeast-like) ตามสภาวะแวดล้อมของการเจริญ คุณสมบัติต่างๆเป็นข้อได้เปรียบอย่างมากในการเพาะเลี้ยงราชนิดนี้ในถังหมัก เพราะช่วยลดปัญหาในเรื่องการถ่ายเทออกซิเจนและการส่งผ่านสารอาหาร และลดการถูกทำลายของเซลล์เนื่องมาจากแรงเฉือนได้ ซึ่งจะช่วยลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเมื่อเทียบกับราชนิดอื่น ๆ นอกจากนั้น *A.rouxii* ยังใช้ในการย่อยสลายแป้งเป็นน้ำตาลก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ เพื่อลดการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายแป้งก่อนการหมัก (Webster, 1979) *Amylomyces rouxii* มีความใกล้เคียงกับ *Rhizopus oryzae* (Montiel และคณะ, 2004; Kito และคณะ, 2009) แต่การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศจะใช้คลาไมโดสปอร์ (chlamydospores) ซึ่งเป็นสปอร์ที่เกิดจากเส้นใยในการแพร่กระจายมากกว่าสปอร์แรงจิโอสปอร์ (sporangiospore) ที่เกิดภายในถุงสปอร์แรงเจียม (sporangium) (Kozaki และคณะ, 1977)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 มันสำปะหลัง

2.4.1 ความเป็นมาของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลัง (Cassava หรือ Tapioca) ประเทศแถบแอฟริกา เรียกชื่อ ภาษาฝรั่งเศส ว่า แมนิออค (Manioc) มันสำปะหลังมีถิ่นกำเนิดในอเมริกาใต้ เช่น ประเทศเปรู เม็กซิโก กัวเตมาลา ฮอนดูรัส และบราซิล ซึ่งมีการปลูกมันสำปะหลังมา 3,000 ถึง 7,000 ปีแล้ว ต่อมาได้ขยายไปสู่แหล่งอื่นๆ ของโลก โดยชาวโปรตุเกส และสเปน นำมันสำปะหลังจากเม็กซิโก มายังฟิลิปปินส์ ประมาณ ค.ศ.17 และชาวฮอลแลนด์ นำไปยังอินโดนิเซีย ประมาณ ค.ศ.18

2.4.2 การจำแนกชั้นทางวิทยาศาสตร์

นักวิทยาศาสตร์ได้จัดมันสำปะหลังไว้เป็นหมวดหมู่ ดังนี้

Order	:	Geramnialrs or Euphorbiales
Class	:	Dicotyledonea
Subclass	:	Archichlamydeae
Family	:	Euphorbiaceae
Tribe	:	Manihoteae
Genus	:	Manihot
Species	:	Esculenta

มันสำปะหลังเป็นไม้พุ่มยืนต้นมีอายุอยู่ได้หลายปี การปลูกมันสำปะหลังจะใช้ส่วนของลำต้น ตัดเป็นท่อนปักลงในดิน ตรงบริเวณรอยตัดที่ปักอยู่ในดินจะแตกเป็นรากฝอย หลังจากปลูกได้ประมาณ 2 เดือนรากจะค่อยๆสะสมแป้งและมีขนาดโตขึ้น เรียกว่าหัวมันสำปะหลัง และจะสามารถเก็บเกี่ยวหัวมันสำปะหลังหลังจาก 6 เดือนผ่านไปแล้ว โดยจะยืดอายุเก็บเกี่ยวไปได้ถึง 16 เดือน โดยส่วนตาที่อยู่ด้านข้างท่อนจะเจริญเติบโตออกมาเป็นลำต้นต่อไป

รูปที่ 2.7 ลักษณะมันสำปะหลัง

ที่มา : http://www.sarakadee.com/feature/2002 สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประเทศไทยนั้นไม่มีหลักฐานที่แน่ชัดว่า มีการนำมันสำปะหลังเข้ามาปลูกเมื่อใด แต่คาดว่ามีการนำมันสำปะหลังมาจากประเทศมาเลเซียเมื่อ พ.ศ. 2329 โดยมีชื่อเรียกในระยะต่อมาว่ามันไม้และมันสำโรง คำว่าสำปะหลังนั้นภาษามาเลเซียและอินโดนีเซียเรียกว่า Ubikayu แปลว่า พืชที่มีรากขยายใหญ่ และคล้ายกับภาษาชวาตะวันตกว่า “สัมเปอ (Sampeu)”

มันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทย แบ่งเป็น 2 ชนิดคือ

1.ชนิดหวาน (Sweet Type) เป็นมันสำปะหลังที่มีปริมาณกรดไฮโดรไซยานิคต่ำ ไม่มีรสขม ใช้เพื่อการบริโภคของมนุษย์ มีทั้งชนิดเนื้อร่วนนุ่ม และชนิดเนื้อแน่น เหนียว แต่มีจำนวนน้อย

2.ชนิดขม (Bitter Type) เป็นมันสำปะหลังที่มีกรดไฮโดรไซยานิคสูง เป็นพิษ และมีรสขม ไม่เหมาะสำหรับการบริโภคของมนุษย์ หรือใช้หัวมันสำปะหลังสดเลี้ยงสัตว์โดยตรง แต่จะใช้สำหรับอุตสาหกรรมแปรรูปต่างๆ เช่น แป้งมัน มันอัดเม็ด และแอลกอฮอล์ เป็นต้น เนื่องจากมีปริมาณแป้งสูง มันสำปะหลังที่ปลูกในประเทศไทยส่วนใหญ่เป็นชนิดขมสำหรับใช้ในอุตสาหกรรม

2.4.3 องค์ประกอบของมันสำปะหลัง

มันสำปะหลังเป็นพืชที่เก็บสะสมอาหารไว้ในราก เมื่อพืชมีการสร้างอาหารจากใบและส่วนที่เป็นสีเขียวแล้ว จะสะสมในรูปของคาร์โบไฮเดรต คือ แป้งไว้ในราก ความสามารถในการสร้างและสะสมแป้งในรากมีความแตกต่างกันขึ้นกับพันธุ์ของมันสำปะหลัง อายุเก็บเกี่ยว ปริมาณน้ำฝนในช่วงแรกก่อนการเก็บเกี่ยว และปัจจัยอื่นๆ จึงทำให้ส่วนประกอบของหัวมันอาจจะแตกต่างกันไป โดยทั่วไปหัวมันสำปะหลังที่มีอายุ 12 เดือน ที่ได้รับปริมาณน้ำฝนเพียงพอ และไม่มีฝนตกชุกขณะเก็บเกี่ยว จะมีส่วนประกอบดังนี้

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบในหัวมันสำปะหลัง

องค์ประกอบในหัวมันสำปะหลัง	ปริมาณ(ต่อ 100 กรัมน้ำหนักหัวมัน)
น้ำ (กรัม)	60.21 – 75.32
เปลือก (กรัม)	4.08 – 14.08
เนื้อ (กรัม)	25.87 – 41.88
ไซยาไนต์ (ppm)	2.85 – 39.27

ที่มา : มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย (2542)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบในเนื้อมันสำปะหลัง

องค์ประกอบในเนื้อมัน	ปริมาณ (ต่อ100 กรัมน้ำหนักแห้งเนื้อมัน)
แป้ง (กรัม)	71.9 - 85.0
โปรตีน (กรัม)	1.57 - 5.78
เยื่อใย (กรัม)	1.77 - 3.98
เถ้า (กรัม)	1.20 - 2.80
ไขมัน (กรัม)	0.06 - 0.43
คาร์โบไฮเดรตที่ไม่ใช่แป้ง	3.59-8.66

ที่มา : มูลนิธิสถาบันพัฒนามันสำปะหลังแห่งประเทศไทย (2542)

องค์ประกอบส่วนใหญ่ในรากนั้น นอกจากน้ำแล้วคือแป้ง ซึ่งมีถึงร้อยละ 70-80 จึงถือว่ามันสำปะหลังเป็นพืชที่เป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่ให้พลังงานกับคนและสัตว์ได้ดีที่สุด โดยปกติหัวมันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้งสูง ปริมาณน้ำจะน้อยและความหนาแน่นของหัวจะมีสูง

2.5 เอนไซม์

2.5.1 เอนไซม์อะไมเลสและกลูโคอะไมเลส

2.5.1.1 ความสำคัญของเอนไซม์อะไมเลส

อะไมเลสเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกที่พบในแป้ง โดยเอนไซม์อะไมเลสได้มาจากแหล่งที่มาที่แตกต่างกัน มีกิจกรรมของเอนไซม์ ความจำเพาะเจาะจงและความต้องการที่แตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ แม้ว่าจะมาจากเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิตที่เหมือนกัน ซึ่งเอนไซม์อะไมเลสจะย่อยสลายแป้งดิบ และเป็นเอนไซม์ที่ผลิตได้จากสิ่งมีชีวิต ตั้งแต่สิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก ได้แก่ เชื้อรา ยีสต์ และแบคทีเรีย รวมถึงพืชและมนุษย์ (Amira และคณะ, 2012)

2.5.1.2 อะไมเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์

จากการศึกษาได้มีการคัดแยกแบคทีเรีย เชื้อรา และจุลินทรีย์ขนาดเล็กอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในหลายศตวรรษที่ผ่านมา โดยแบคทีเรียและเชื้อราจะหลั่งเอนไซม์อะไมเลสออกมานอกเซลล์และทำการย่อยสลายภายนอกเซลล์ จากการศึกษาพบว่า *Aspergillus niger* และ *Aspergillus oryzae* เป็นสายพันธุ์ของเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์อะไมเลสได้ในปริมาณสูง (Aunstrup, 1979)

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.3 ชนิดของเอนไซม์อะไมเลส

เอนไซม์อะไมเลสมีสองประเภทได้แก่ เอกโซอะไมเลสและเอนโดอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการย่อยสลายแป้ง โดยอะไมเลสจัดเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถทำลายพันธะไกลโคซิดิก เอนไซม์ในการย่อยสลายแป้งพบมากในกลุ่ม glycoside hydrolase (GH) 13,14 และ 15 โดยพบมากที่สุดในกลุ่ม GH 13 (Coutinho และ Henrissat, 1999)

เอนโดอะไมเลสมีความสามารถในการตัดพันธะ α,1-4 glycosidic ของอะไมโลสหรืออะไมโลแพคติน. แอลฟา-อะไมเลสเป็นเอนโดอะไมเลสพบได้ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตที่หลากหลายซึ่งอยู่ในอาณาจักรอาเคียตลอดจนอาณาจักรแบคทีเรีย (Pandey และคณะ, 2000) ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลังจากการทำงานของแอลฟา-อะไมเลส คือ โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีความยาวแตกต่างกัน α-configuration และ α-limit dextrins ซึ่งประกอบด้วยโอลิโกแซคคาไรด์แบบกิ่ง เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสสามารถจำแนกได้เป็นสองประเภทตามระดับของการย่อยสลายสารตั้งต้น (Fukumoto และ Okada, 1963) แอลฟา-อะไมเลสมีความสามารถในการย่อยสลายแป้งไปเป็นน้ำตาลได้ร้อยละ 50-60 และแอลฟา-อะไมเลสช่วยลดความหนืดของแป้งโดยตัดพันธะไกลโคไซด์ของแป้งได้ประมาณร้อยละ 30-40 (Angelo และคณะ, 2013) อะไมเลสกลุ่มที่สองคือ เอกโซอะไมเลส โดยสามารถตัดพันธะ α,1-4 glycosidic ได้ชนิดเดียวเช่น เบต้า-อะไมเลส หรือสามารถตัดได้ทั้งพันธะ α,1-4 glycosidic และ α,1-6 glycosidic ได้แก่ อะไมโลกลูโคซิเดส หรือกลูโคอะไมเลส และ แอลฟา-กลูโคซิเดส โดยการทำงานของเอนไซม์เอกโซอะไมเลสจากการย่อยสลายอะไมโลแพคตินหรืออะไมโลสจะได้ส่วนที่เหลืออยู่คือน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นจะผลิตน้ำตาลกลูโคสเพียงชนิดเดียวหรือมีน้ำตาลมอลโตสและเบต้า-ลิมิต เดกซ์ตริน (Pandey และคณะ, 2000) โดยกลูโคอะไมเลสจัดเป็นเอกโซเอนไซด์ มีกลไกแบบสลับโดยตัดพันธะ α-glycoside ที่ปลาย non-reducing ของอะไมโลสและอะไมโลแพคตินทำให้ได้คาร์โบไฮเดรตมวลโมเลกุลต่ำในรูปแบบ β-anomeric (Angelo และคณะ, 2013) เอนไซม์ที่ย่อยสลายแป้งจากจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แสดงดังตารางที่ 2.4

2.5.2 เอนไซม์แอคเซลเลอเรส 1500

ในปี 2010 มีการผลิตเอนไซม์ตัวใหม่โดยบริษัทชั้นนำได้แก่ Novozyme และ Genencor การสนับสนุนของฝ่ายพลังงาน สหรัฐอเมริกา(DOE) คือเอนไซม์ Accellerase 1500 ซึ่งเป็นเอนไซม์เซลลูเลสเชิงซ้อน (exoglucanase, endoglucanase, hemi-cellulase และ β-glucosidase) เอนไซม์ชนิดนี้สามารถผลิตได้จากการดัดแปลงพันธุกรรมของเชื้อ *Trichoderma reesei* (Alessandra และคณะ, 2012) Accellerase 1500 เป็นเอนไซม์ที่สามารถทำลายโครงสร้างของเซลลูโลสโดยการย่อยสลายให้ได้น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ออกมาในช่วงการปรับสภาพวัตถุดิบได้แก่ เศษวัสดุเหลือทิ้ง ซังข้าวโพด ชานอ้อย เยื่อกระดาษและฟางข้าวสาลี โดยเป็นเอนไซม์ผสมที่ถูกผลิตขึ้นสำหรับการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายโดยปราศจากการยับยั้งสิ่งมีชีวิตในกระบวนการหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.4 เอนไซม์ย่อยสลายแป้งจากจุลินทรีย์

α-Amylase	β-Amylase	Glucoamylase	Pullulanase
Aeromonas caviae	*Aspergillus terreus*	*Acremonium zonatum*	*Aerobacter aerogenes*
Acinetobacter	*Bacillus cereus*	*Amylomyces rouxii*	*Anaerobranca gottschalkii*
Alicyclobacillus acidocaldarius	*B. circulans*	*Arxula adeninivorans*	*Bacillus acidopullulyticus*
Alteromonas haloplanetis	*B. megatarium*	*Aspergillus* sp.	*Bacillus stearothermophilus*
Archaeobacterium pyrococcus woesei	*B. polymyxa*	*A. awamori*	*Bacillus cereus*
Aspergillus sp.	*Brettanomyces naardensis*	*A. candidus*	*Bacillus circulans*
A. awamori	*C. thermocellum*	*A. foetidus*	*Bacillus flavocaldarius*

ที่มา : Doman-Pytka และ Bardowshi (2004) สืบค้นวันที่ 15 ธันวาคม 2559

2.6 กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักที่ใช้มี 3 แบบ (สมใจ, 2537) คือ

1. การหมักแบบแบตช์ (Batch fermentation) เป็นการหมักที่ทำในระบบปิด มีสารอาหารเริ่มต้นจำกัด เมื่อใส่จุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยงลงในระบบแล้ว ไม่มีการเติมสารอาหารลงไปอีกจนการหมักเสร็จสิ้นลง

2. การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นวิธีการที่ในระหว่างการหมักมีการเติมอาหารใหม่และถ่ายอาหารเก่าออกจากระบบในอัตราเดียวกัน ทำให้จุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องโดยไม่มีข้อจำกัดในเรื่องอาหาร

3. การหมักแบบเฟด-แบตช์ (Fed-batch fermentation) เป็นการหมักที่มีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เป็นระยะๆ เพื่อให้จุลินทรีย์เจริญและใช้สารอาหารได้อย่างเต็มที่ โดยไม่มีการถ่ายเทอาหารเก่าออก ซึ่งการหมักแบบนี้ส่วนใหญ่ใช้แก้ไขปัญหาเกี่ยวกับข้อจำกัดเรื่องความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น ซึ่งถ้าใช้มากไปอาจมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หรืออาจทำให้มีปัญหาในการให้ออกซิเจน โดยการให้ในปริมาณที่เพียงพอทำได้ยาก

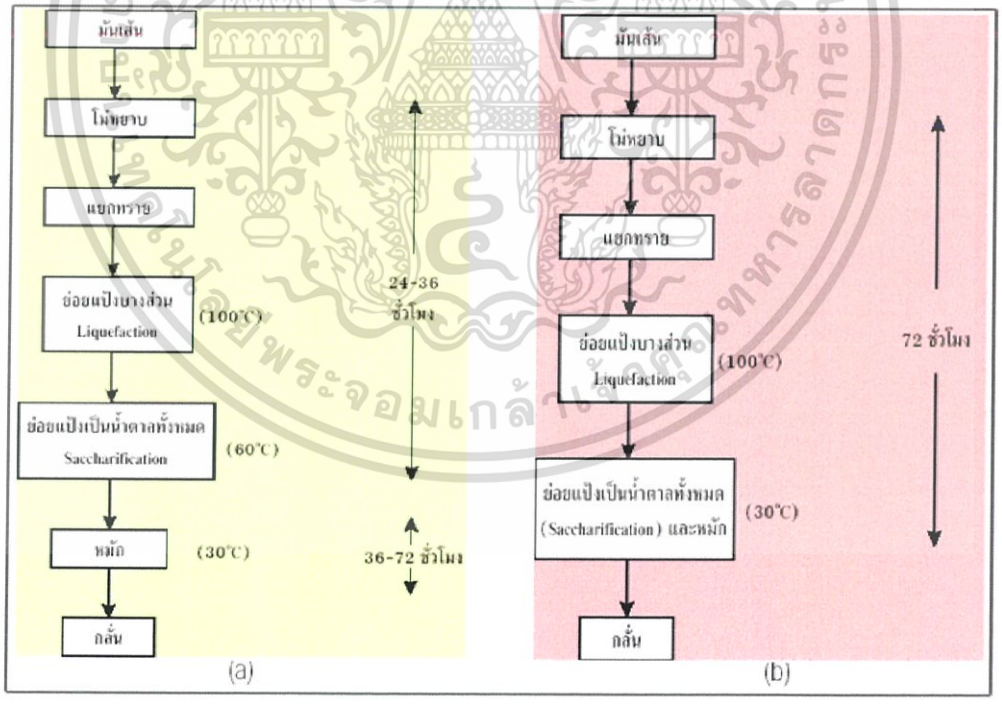
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (Separate hydrolysis and fermentation ; SHF)

วิธีการพื้นฐานของ SHF เป็นกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก กระบวนการผลิตเอทานอล โดยปกติจะเริ่มจากกการย่อยสลายวัตถุดิบเป็นน้ำตาลโมโนเมอร์ก่อนโดยการใช้เอนไซม์ จากนั้นก็จะทำการหมักโดยใช้น้ำตาลที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการย่อยสลาย (Alfani และคณะ, 2000)

2.6.2 กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (Simultaneous saccharification and fermentation ; SSF)

เป็นการรวมการย่อยและการหมักไว้ในขั้นตอนเดียว สำหรับข้อได้เปรียบของการหมักแบบ SSF คือ สามารถเพิ่มอัตราการย่อยได้เนื่องจากกลูโคสที่ได้จากการย่อยเป็นตัวกลางที่จุลินทรีย์ผลิตเอทานอลนำไปใช้ต่อไป เมื่อระดับของเซลโลไบโอสและกลูโคสต่ำมากการยับยั้งของเซลลูเลสจะลดลง ซึ่งทำให้อัตราการผลิตน้ำตาลรวมทั้งผลได้เพิ่มขึ้นและเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการลดลง ใช้อุปกรณ์หรือถังปฏิกรณ์ในการผลิตเอทานอลน้อยลง เนื่องจากรวมถังในขั้นตอนการย่อย และการหมักไว้ในถังเดียวกัน ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง (Sun และ Cheng, 2002) กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก แสดงดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 กระบวนการผลิตเอทานอลจากมันเส้นด้วยกระบวนการผลิต
(a) แบบ Separate hydrolysis and fermentation และ
(b) แบบSimultaneousSaccharification and Fermentation (SSF)
ที่มา : http://www2.rdi.ku.ac.th/kasetfair49 สืบค้นวันที่ 19 เมษายน 2560

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง (Conventional Process) สรุปได้ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเตรียมวัตถุดิบ นำมันสำปะหลังมาไปอบให้แห้ง จากนั้นบดให้ละเอียดและร่อนผ่านตะแกรงจะได้เป็นผงแป้งมันสำปะหลัง

ขั้นตอนที่ 2 การย่อยแป้ง เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล (กลูโคส) เพื่อให้มีสภาพเหมาะกับการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ในขั้นตอนต่อไป โดยวิธีการย่อยแป้งอาจใช้กรดย่อยแป้ง (Acid Hydrolysis) หรือใช้เอนไซม์ (Enzymatic Hydrolysis) ซึ่งวิธีการที่ใช้เอนไซม์เพื่อย่อยแป้งนั้นจะได้รับความนิยมมากกว่า เนื่องจากสะดวกและประหยัดต้นทุน ขั้นตอนนี้จะทำการย่อย 2 ครั้งด้วยกัน

ครั้งที่ 1 ย่อยแป้งเพื่อทำให้แป้งมีโมเลกุลเล็กหรือทำให้เหลว (Liquefaction) เป็นการเตรียมแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้วิธีการต้มเคี่ยวน้ำแป้งสำปะหลังด้วยเอนไซม์ตัวที่ 1 คือ เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase) โดยใช้อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส ใช้เวลา 2 ชั่วโมง

ครั้งที่ 2 ย่อยแป้งทำให้ได้กลูโคสหรือย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาล (Saccharification) โดยทำให้น้ำแป้งสุก ก่อนผสมเอนไซม์ตัวที่ 2 คือ กลูโค-อะไมเลส (Glucoamylase หรือ เบต้า-อะไมเลส (β-amylase) เพื่อย่อยแป้งสุกให้เป็นน้ำตาลก่อนเข้าสู่กระบวนการการหมัก

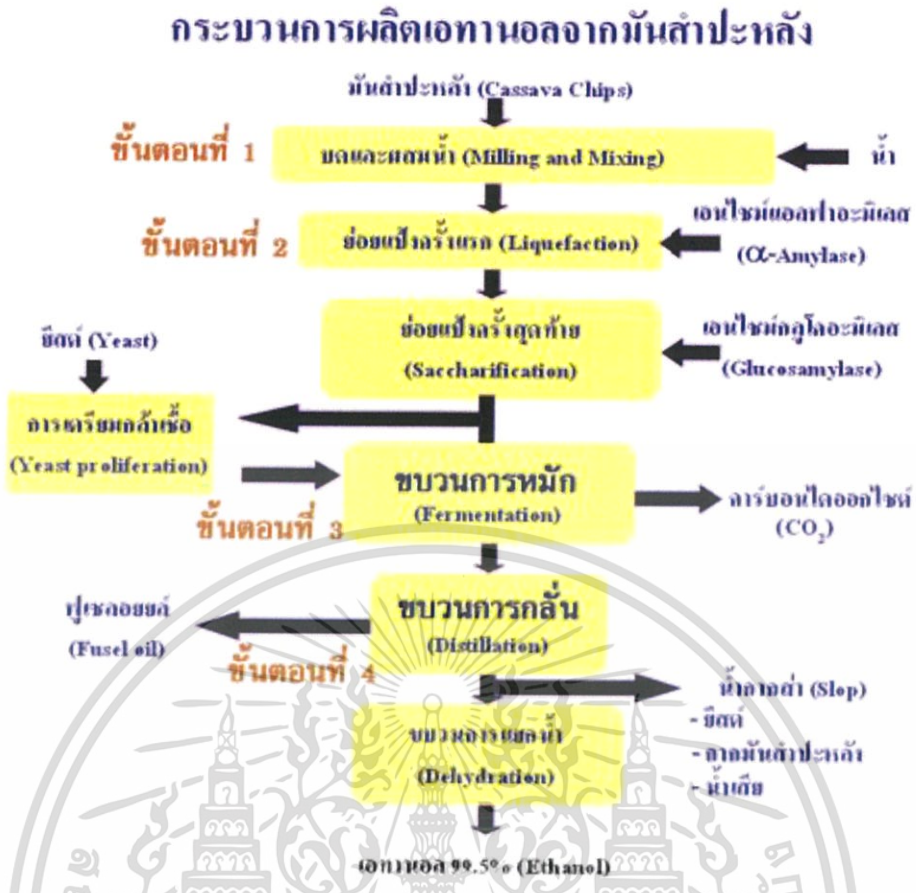
ขั้นตอนที่ 3 กระบวนเตรียมหัวเชื้อและการหมัก (fermentation) การเตรียมหัวเชื้อ (inoculum) เพื่อให้ได้เชื้อจุลินทรีย์ที่แข็งแรงและมีปริมาณมากเพียงพอสำหรับใช้ในการหมัก เมื่อเตรียมหัวเชื้อพร้อมแล้ว ก็เข้าสู่ขั้นตอนการหมักโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* จากนั้นทำการปรับและควบคุมสภาวะของการหมักเช่น อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน ค่าพีเอช และอุณหภูมิ

ขั้นตอนที่ 4 การกลั่นเอทานอล (Ethanol) ขั้นตอนนี้เป็นการกลั่นเพื่อผลิตเอทานอลและทำให้บริสุทธิ์เป็นการแยกเอทานอลที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตร ออกจากน้ำหมักและน้ำส่า โดยการกลั่นลำดับส่วนซึ่งสามารถแยกเอทานอลให้บริสุทธิ์ร้อยละ 95.6 โดยปริมาตร แต่การนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิง (แก๊สโซฮอล์) นั้นจะต้องทำให้เอทานอลมีความบริสุทธิ์ไม่ต่ำกว่าร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร ซึ่งจำเป็นต้องใช้เทคนิค หรือ เทคโนโลยีในการกลั่นเพื่อแยกน้ำให้ได้เอทานอลที่บริสุทธิ์ ที่นิยมใช้กันอยู่มี 3 วิธี คือ

1. การดูดซับด้วย Molecular sieve
2. การกลั่นอะซีโอโทรป (Azeotropic distillation)
3. เทคโนโลยีแผ่นเยื่อบาง (Membrane technology)

การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังแสดงดังรูปที่ 2.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลัง

ที่มา : http://www.vcharkarn.com/varticle/38199 สืบค้นวันที่ 19 เมษายน 2560

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Nanssou และคณะ (2014) ศึกษาศักยภาพของวัสดุเหลือทิ้งเซลลูโลสของมันสำปะหลังในการผลิตเอทานอลโดยทำการปรับสภาพวัตถุดิบโดยการย่อยด้วยเอนไซม์ และหมักโดยเชื้อ *Rhizopus* spp. และ *Saccharomyces cerevisiae* ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 5.27 กรัมต่อ 100 กรัม สำหรับต้นมันสำปะหลัง และได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 2.6 กรัมต่อ 100 กรัม สำหรับเปลือกมันสำปะหลัง

Mohammed และคณะ (2014) ศึกษาความสามารถของการหมักน้ำตาลโดยกระบวนการปรับสภาพและการย่อยด้วยกรดของเปลือกมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อ *Aspergillus niger* และ เอนไซม์ (amylase,cellulase และ pectinase) เป็นเวลา 5 วัน และ 15 วัน โดยย่อยด้วยเชื้อ *Aspergillus niger* ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 95.44 ± 0.11 มิลลิกรัมต่อกรัม และย่อยด้วยเอนไซม์ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 72.38 ± 0.06 มิลลิกรัมต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ajibola และคณะ (2012) ศึกษาแป้งมันสำปะหลังจากสายพันธุ์ TMS30572 และสายพันธุ์ Idileru ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α-amylase และ Amylo-glucosidase และหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์จากปาล์มไวน์ และสายพันธุ์จากเบอเกอร์ยีสต์ จากการศึกษาพบว่าแป้งมันสำปะหลังสายพันธุ์จาก TMS30572 สามารถหมักน้ำตาลได้สูงสุดร้อยละ 25 โดย *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์จากปาล์มไวน์จะมีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลให้กลายเป็นเอทานอลได้สูงสุด

Elemike และคณะ (2015) ศึกษาวัสดุเหลือทิ้งจากมันสำปะหลังในส่วนที่เป็นเซลลูโลสนำมาทำการย่อยเอนไซม์ α-amylase , Hydrochloric acid และ Amyloglucosidase และหมักด้วยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าการใช้เอนไซม์ร่วมกับการใช้กรดในการย่อยทำให้ได้ปริมาณแป้งและเซลลูโลสมากกว่าการใช้กรดอย่างเดียว และได้ปริมาณแอลกอฮอล์ร้อยละ 32.4

Anselm และคณะ (2015) ศึกษาการใช้มันสำปะหลังป่าที่กินไม่ได้มาผลิตเป็นไบโอเอทานอลโดยวิธีการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพของการใช้แป้งดิบจากมันสำปะหลังป่าในการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิต่ำโดยการใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *Aspergillus* sp. MZA-3 กับ *Saccharomyces cerevisiae* และการใช้เชื้อเดี่ยวเพียงเชื้อเดียวคือ *Saccharomyces cerevisiae* ทำงานร่วมกับเอนไซม์ที่สกัดได้จากเชื้อ *Aspergillus* sp. MZA-3. ซึ่ง *Aspergillus* sp. MZA-3 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้ใหม่และมีความสามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งดิบโดยมีกิจกรรมของเอนไซม์สูงที่สุดคือ 3.3 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และค่าพีเอช เท่ากับ 5.5 ในรูปแบบที่หนึ่งคือการใช้เชื้อร่วมกันระหว่าง *Aspergillus* sp . MZA-3 กับ *Saccharomyces cerevisiae* และรูปแบบที่สองคือการใช้เชื้อเดี่ยวเพียงเชื้อเดียวคือ *Saccharomyces cerevisiae* ทำงานร่วมกับ เอนไซม์ MZA-3 (โดยทั้งสองรูปแบบได้มีการเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส) ซึ่งผลลัพธ์ที่ได้ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นไบโอเอทานอลซึ่งเป็นพลังงานเชื้อเพลิงชีวภาพ (เปอร์เซ็นต์ผลผลิตทางทฤษฎี) 91 และ 95 เปอร์เซ็นต์ โดยมีประสิทธิภาพเท่ากับ 84 และ 96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ การใช้วิธีการทางชีวภาพโดยตรงในการเปลี่ยนแป้งดิบเป็นไบโอเอทานอลนี้ทำได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้การทำงานร่วมกันของเชื้อสองสายพันธุ์ ซึ่งการทดลองนี้เป็นที่น่าสนใจอย่างมากเนื่องจากสามารถลดต้นทุนของพลังงานได้

Mingjun และคณะ (2014) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยปราศจากการปรับสภาพก่อนกระบวนการหมัก ซึ่งในกระบวนการหมักมีการใช้เอนไซม์อะไมเลส, เซลลูเลส, เซลโลไบเอส และ กลูโคอะไมเลส สำหรับการผลิตเอทานอลทั้งวิธีแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) โดยสภาวะที่เหมาะสมสำหรับกระบวนการหมักคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พีเอชเท่ากับ 5.0 และปริมาณหัวเชื้อร้อยละ 6 โดยใช้กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง (Batch fermentation) และมีความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของกากมันสำปะหลังร้อยละ 20 ทั้งกระบวน SHF และ SSF สามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด 23.51 และ 34.67 กรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จิตตวีร์ และคณะ (2014) ศึกษาการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อตัวเดียวคือ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ในการหมักร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที พบว่าเวลา 48 ชั่วโมงให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ 23±0.37 กรัมต่อลิตร และมีความสามารถในการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.51 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากนั้นศึกษาการหมักเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่างเชื้อรากับเชื้อยีสต์คือ *Amylomyses rouxii* TISTR 3182 กับเชื้อ *S.cerevisiae* TISTR 5088 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล ปริมาณหัวเชื้อที่ใช้ในการหมักร้อยละ 10 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ทำการแปรผันอัตราส่วนเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ ความเร็วรอบของการเขย่าและการเติมแหล่งไนโตรเจน โดยใช้อุณหภูมิคงที่ ที่ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการหมักเอทานอลของเชื้อผสมระหว่างเชื้อรากับเชื้อยีสต์คืออัตราส่วน 1:1 ความเร็วรอบการเขย่า 200 รอบต่อนาที และแหล่งไนโตรเจนคือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยชั่วโมงที่ 48 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดคือ 24.78±0.48 กรัมต่อลิตร และมีค่าความสามารถในการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Millati และคณะ (2005) ศึกษาการผลิตเอทานอลจากจุลินทรีย์ในคลาส Zygomycetes ได้แก่ *Rhizopus oryzae, Mucor corticolous, M. hiemalis, M. indicus, Rhizomucor pusillus* และ *R. miehei* โดยใช้น้ำตาลกลูโคส,ไซโลส และ ไดรูท-แอซิด ไฮโดรไลเซท (DAH) เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *Mucor 2* สายพันธุ์ได้แก่ *M. hiemalis* และ *M. indicus* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ โดยเชื้อรา *M. indicus* (*M.rouxii* หรือ *Amylomyces rouxii*) สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส , ไซโลส และ DAH ได้เท่ากับ 0.39 , 0.22 และ 0.44 กรัมของเอทานอลต่อกรัมของแหล่งคาร์บอน

Carlsen และคณะ (1995) พบว่าเชื้อรา *Aspergillus oryzae* สามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 1 กรัมต่อลิตร ภายใต้กระบวนการหมักแบบไม่ต่อเนื่อง และเอทานอลจะถูกผลิตก็ต่อเมื่ออยู่ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนอย่างจำกัด

ปรามสยบ และคณะ (2543) การศึกษาสภาวะการผลิตเอนไซม์ของเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3068 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ คือ พีเอช เท่ากับ 5.0 อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส สภาวะที่เอนไซม์มีความคงตัวจะอยู่ในช่วง พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส และมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากเชื้อราสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5088

Amylomyces rouxii TISTR 3182

Aspergillus oryzae TISTR 3086

จุลินทรีย์เหล่านี้ได้รับความอนุเคราะห์จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

3.2 วัตถุดิบ

มันสำปะหลัง จากบริษัทก้าวหน้าโลจิสติคส์ คอนซัลแทนท์ จำกัด อำเภอคลองขลุง จังหวัดกำแพงเพชร

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

3.3.1 อาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) broth

3.3.2 อาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) agar

3.3.3 อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA)

3.3.4 สารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ พีเอช 5.0

3.3.5 สารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส จาก *Aspergillus oryzae* กิจกรรมของเอนไซม์ 31.2 หน่วยต่อมิลลิกรัม

3.3.6 สารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส จาก *Aspergillus niger* กิจกรรมของเอนไซม์ 67.4หน่วยต่อมิลลิกรัม

3.3.7 สารละลายเอนไซม์ ACCELLEASE 1500

3.3.8 สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3.9 Dinitrosalicylic acid (DNS) reagent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 วัสดุอุปกรณ์

3.4.1 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)

3.4.2 หลอดทดลอง (Test tube)

3.4.3 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.4.4 ขวดรูปชมพู่ (Flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร

3.4.5 ขวดปรับปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร

3.4.6 กระบอกตวง (Graduated cylinder) ขนาด 100 และ 1,000 มิลลิลิตร

3.4.7 ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 5 และ 10 มิลลิลิตร

3.4.8 ตะแกรงร่อนแป้ง

3.4.9 โถดูดความชื้น (Desiccator)

3.4.10 จุกยางดูดสาร (Rubber bulb)

3.4.11 ขวดเก็บตัวอย่าง (Vial)

3.4.12 แท่งแก้วคนสาร (Stirring Rod)

3.4.13 เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)

3.4.14 ลวดเขี่ยเชื้อ (Loop)

3.4.15 คิวเวต (Cuvette)

3.4.16 หลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifuge tube) ขนาด 50 มิลลิลิตร

3.4.17 Milipore filter เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน

3.4.18 ไมโครปิเปต (Micropipette) ช่วงการปิเปต 100 - 1000 ไมโครลิตร

3.4.19 ไมโครปิเปตทิป (Micropipette Tips) ขนาดการดูดจ่ายของเหลว 1000 ไมโครลิตร

3.4.20 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave) รุ่น ES-315 ยี่ห้อ TOMY

3.4.21 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) รุ่น ABS1200 ยี่ห้อ Sciencetech

3.4.22 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น 10196 ยี่ห้อ Contherm

3.4.23 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ยี่ห้อ menmert

3.4.24 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator Shaker) รุ่น 10196 ยี่ห้อ Contherm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.25 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น Z326K ยี่ห้อ HERMLE Labortechnik GmbH

3.4.26 ไมโครเวฟ (Microwave) รุ่น R-242 ยี่ห้อ SHARP

3.4.27 เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น GC-2014RTF ยี่ห้อ SHIMADZU

3.4.28 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Spectrophotometer) รุ่น UV-1800 ยี่ห้อ SHIMADZU

3.4.29 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven) รุ่น IN 110 ยี่ห้อ menmert

3.4.30 ตู้แช่เย็น ยี่ห้อ SANYO

3.4.31 เครื่องบด รุ่น Sk100/C Gusseisen ยี่ห้อ Retsh

3.4.32 เครื่องวัดพีเอช (pH Meter) รุ่น PH200&PH500 ยี่ห้อ Clean

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การเตรียมวัตถุดิบ

นำมันสำปะหลังเส้นจากบริษัทก้าวหน้าโลจิสติคส์ คอนซัลแทนท์ จำกัด อำเภอคลองขลุง จังหวัดกำแพงเพชร นำมาอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมันสำปะหลังเส้นที่ผ่านการอบแห้งปั่นให้ละเอียดเป็นผง กรองผ่านตะแกรงร่อนขนาด 50 mesh ขนาดของแป้งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 300 ไมโครเมตร จากนั้นเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลต่อไป

3.5.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์

3.5.2.1 การเตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์

เตรียมสารละลายโซเดียมอะซิเตต (CH_3COONa) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยชั่งโซเดียมอะซิเตต ปริมาณ 16.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ และเตรียมสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ โดยปิเปตกรดอะซิติกความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 11.55 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางให้มีความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ เตรียมสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์โดยนำสารละลายโซเดียมอะซิเตตปริมาตร 352 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกรดอะซิติกปริมาตร 148 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร และปรับความเข้มข้นให้เป็น 0.05 โมลาร์ และนำไปปรับพีเอช 5.0 โดยใช้สารละลายกรดอะซิติก 0.05 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมอะซิเตต 0.05 โมลาร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.2 การเตรียมสารละลายเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส

ชั่งเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส 0.05 กรัม นำมาละลายในสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตรแล้วนำไปกรองด้วย Milipore filter เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน และเก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.2.3 การเตรียมสารละลายเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส

ชั่งเอนไซม์อะไมโลกลูโคซิเดส 0.015 กรัม นำมาละลายด้วยสารละลายอะซิเตตบัฟเฟอร์แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร นำไปกรองด้วย Milipore filter เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นเก็บสารละลายเอนไซม์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบแป้งมันสำปะหลัง

นำผงแป้งมันสำปะหลังมาทำการวิเคราะห์องค์ประกอบปริมาณโปรตีน ไขมัน เยื่อใยหยาบ เถ้า และ คาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ AOAC (1990)

3.5.4 ศึกษาสภาวะการย่อยผงมันสำปะหลัง โดยไม่เติมเอนไซม์ ACCELLEASE 1500

เตรียมสารละลายผงมันสำปะหลังโดยชั่งผงมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้งแล้วปริมาณ 6 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เตรียมน้ำกลั่น 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส คนเป็นเวลา 30 นาที จนได้สารละลายผงมันสำปะหลังที่มีลักษณะหนืดและข้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเหลือประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

3.5.5 ศึกษาสภาวะการย่อยผงมันสำปะหลัง โดยการเติมเอนไซม์ ACCELLEASE 1500

เตรียมสารละลายผงมันสำปะหลังโดยชั่งผงมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้งแล้วปริมาณ 6 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เตรียมน้ำกลั่น 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส คนเป็นเวลา 30 นาที จนได้สารละลายผงมันสำปะหลังที่มีลักษณะหนืดและข้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเหลือประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตรและเติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (1 ml/g substrate) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

3.5.6 ศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลโดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)

3.5.6.1 การเตรียมสารละลายผงมันสำปะหลัง

เตรียมสารละลายผงมันสำปะหลังโดยชั่งผงมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้งแล้ว ปริมาณ 6 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เตรียมน้ำกลั่น 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส คนเป็นเวลา 30 นาที จนได้สารละลายผงมันสำปะหลังที่มีลักษณะหนืดและข้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเหลือประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.5.6.2 การเตรียมเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

เขี่ยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 จากอาหารแข็งเอียง YPD 1 ลูป ใส่ลงในอาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ได้การค่าการดูดกลืนคลื่นแสง 0.5 (Petrea และคณะ, 2008)

3.5.6.3 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 บนอาหารแข็งเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำสารละลายสปอร์เชื้อราโดยการเติมน้ำกลั่นที่มี Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 บรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อหลอด และนำสารละลายสปอร์มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ให้มีจำนวนสปอร์ $1X10^7$ - $1X10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ปรามสยบ และคณะ, 2543)

3.5.6.4 การเตรียมสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182

เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 บนอาหารแข็งเอียง Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ทำสารละลายสปอร์เชื้อราโดยใช้น้ำกลั่นมี Tween 80 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5 มิลลิลิตรต่อหลอด และนำสารละลายสปอร์มานับจำนวนสปอร์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ ให้มีจำนวนสปอร์ $1X10^7$ - $1X10^8$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร

3.5.6.5 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อเดี่ยวของ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเอนไซม์ทางการค้า โดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)

นำสารละลายผงมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมาย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (1 ml/g substrate) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และทิ้งให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 30 องศาเซลเซียสแล้วเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH)

3.5.6.6 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISIR 5088 โดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)

ชั่งผงมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้ง 6 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปฆ่าเชื้ออุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (1 ml/g substrate) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (อัตราเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ 1:1) นำไปบ่มต่อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนครบระยะเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.6.7 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)

ชั่งผงมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้ง 6 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (1ml/g substrate) ปริมาณ 6 มิลลิลิตร และสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (อัตราเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ 1:1) นำไปบ่มต่อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ที่องศาเซลเซียส จนครบระยะเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

3.5.6.8 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)

ชั่งผงมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้ง 6 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (1 ml/g substrate) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (อัตราเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ 1:1) นำไปบ่มต่อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนครบระยะเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.7 ศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

3.5.7.1 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อเดี่ยวของ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร่วมกับเอนไซม์ทางการค้าโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

นำสารละลายผงมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลสมาเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (1 ml/g substrate) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร พร้อมกับเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

3.5.7.2 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISIR 5088 โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

ชั่งผงมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้ง 6 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (1ml/g substrate) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร พร้อมกับเตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (อัตราเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ 1:1) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 ที่องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

3.5.7.3 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

ชั่งผงมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้ง 6 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (1ml/g substrate) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร พร้อมกับเตรียมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (อัตราเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ 1:1) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

3.5.7.4 ศึกษาการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

ชั่งผงมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้ง 6 กรัม ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 (1 ml/g substrate) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร และสารละลายสปอร์ของเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร้อยละ 5 โดยปริมาตรและ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร้อยละ 5 โดยปริมาตร พร้อมกับเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร (อัตราเชื้อราต่อเชื้อยีสต์ 1:1) นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

3.6 การวิเคราะห์

3.6.1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Miller, 1959)

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ทำการเจือจางที่เหมาะสม วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS นำผลที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

3.6.2 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่อง

แก๊สโครมาโตรกราฟี โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดเป็นชนิด Flame Ionization Detector (FID)

3.6.3 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้มาทำการวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ pH meter

3.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธีของ Duncan โดยใช้โปรแกรมทางสถิติในการวิเคราะห์ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p \leq 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบของผงมันสำปะหลัง

จากการนำมันสำปะหลังมาอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และนำมาปั่นให้เป็นผงละเอียด กรองผ่านตะแกรงร่อนขนาด 50 mesh จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด ปริมาณเถ้า ปริมาณความชื้น ปริมาณพลังงาน และวิเคราะห์หาพลังงานทั้งหมดจากไขมัน พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 90.35 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 1.58 ไขมันร้อยละ 0.48 เถ้าร้อยละ 1.99 และความชื้นร้อยละ 5.60 แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบของผงมันสำปะหลัง

ส่วนประกอบของผงมันสำปะหลัง	ปริมาณ
โปรตีน (ร้อยละโดยปริมาตร)	1.58
ไขมัน (ร้อยละโดยปริมาตร)	0.48
เถ้า (ร้อยละโดยปริมาตร)	1.99
ความชื้น (ร้อยละโดยปริมาตร)	5.60
คาร์โบไฮเดรตทั้งหมด (ร้อยละโดยปริมาตร)	90.35
พลังงาน (กิโลแคลอรีต่อ 100 กรัม)	372.04
พลังงานทั้งหมดจากไขมัน (กิโลแคลอรีต่อ 100 กรัม)	4.32

Audu และคณะ (2012) ศึกษาการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและโลหะบางชนิดในแป้งมันสำปะหลัง จากการวิเคราะห์องค์ประกอบของแป้งมันสำปะหลัง พบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตร้อยละ 87.44 ปริมาณไขมันร้อยละ 1.26 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 0.96 และปริมาณเยื่อใยหยาบร้อยละ 0.60

Olufunmilola และคณะ (2013) ศึกษาแป้งมันสำปะหลังที่มีไซยาไนส์ในระดับปริมาณต่ำจากการดัดแปลงมันสำปะหลังสายพันธุ์ TMS 30572 ทำการผสมกับข้าวสาลีดูรัม วิเคราะห์องค์ประกอบเคมี พบว่ามีปริมาณโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และเถ้า ดังนี้ ร้อยละ 0.75-12.31 ร้อยละ70.87-87.80 ร้อยละ0.95-4.41 และ ร้อยละ0.12-0.83 ตามลำดับ และระดับไซยาไนส์ในตัวอย่างแป้งทั้งหมดมีค่าน้อยกว่า 0.1 ppm

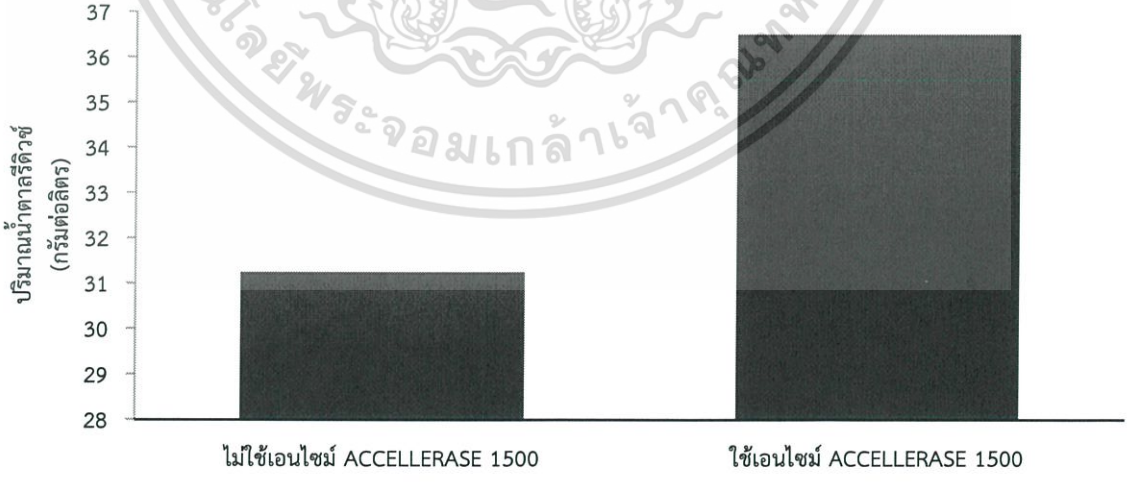
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 ผลการศึกษาการย่อยสลายผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเอนไซม์ ACCELLEASE 1500

จากการนำผงมันสำปะหลังมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตไบโอเอทานอลในงานวิจัยนี้ เนื่องจากมันสำปะหลังมีส่วนของเปลือก จึงทำการศึกษาการย่อยสลายผงมันสำปะหลังด้วยเอนไซม์ทางการค้า โดยเปรียบเทียบระหว่างชุดการทดลองที่ 1 ไม่เติมเอนไซม์ ACCELLEASE 1500 และชุดการทดลองที่ 2 เติมเอนไซม์ ACCELLEASE 1500 พบว่าชุดการทดลองที่ 2 ที่มีการเติมเอนไซม์ ACCELLEASE 1500 มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 36.50 ± 4.20 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าชุดการทดลองที่ 1 ซึ่งไม่ได้เติมเอนไซม์ ACCELLEASE 1500 ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 31.25 ± 1.08 กรัมต่อลิตร แสดงให้เห็นว่าการเติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 สำหรับย่อยสลายเซลลูโลสบางส่วนให้ได้น้ำตาลดิวซ์สูงกว่าชุดการทดลองที่ไม่มีการเติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.2 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ที่ได้จากการใช้เอนไซม์ ACCELLERASE 1500 และไม่ใช้เอนไซม์ ACCELLERASE 1500

ชุดการทดลอง	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
1 (ไม่ใช้ เอนไซม์ ACCELLERASE 1500)	31.25 ± 1.08
2 (ใช้เอนไซม์ ACCELLERASE 1500)	36.50 ± 4.20



รูปที่ 4.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการใช้และไม่ใช้เอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ในการย่อยสลายผงมันสำปะหลัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์อะไมเลส

จากการเลี้ยงเชื้อเพื่อทำการผลิตเอนไซม์อะไมเลสในอาหารเหลว สูตร Ghosh และคณะ (1991) ที่พีเอช 5.0 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์จากเชื้อรา 2 ชนิดระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 กับ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 พบว่าเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 65.4 ± 1.10 หน่วยต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสเท่ากับ 142.2 ± 1.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182

จุลินทรีย์	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)
A. oryzae TISTR 3086	65.4 ± 1.10
A. rouxii TISTR 3182	142.2 ± 1.05

จากการศึกษากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่เชื้อราทั้งสองชนิดสามารถผลิตได้ พบว่าเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงกว่าเชื้อรา *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 Aunstrup (1979) รายงานว่าเชื้อรา *Aspergillus oyzae* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสและเชื้อรา *Amylomyces rouxii* มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส Doman และคณะ (2004) รายงานว่าคุณสมบัติของเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส คือ เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยไฮโดรไลซ์พันธะ 1,4-glycosidic bond ในโมเลกุลของแป้ง (starch) ให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลงได้น้ำตาลไดแซ็กคาไรด์ เช่น มอลโทส และมอนอแซ็กคาไรด์ เช่น กลูโคส ในขณะที่เอนไซม์กลูโคอะไมเลสมีคุณสมบัติไฮโดรไลซ์สายพอลิเมอร์ของแป้งได้ทั้งที่พันธะไกลโคไซด์ที่ตำแหน่งแอลฟา 1,4 และ 1,6-glycosidic bond ได้น้ำตาลกลูโคส (ผกามาส , 2552)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)

4.4.1 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าย่อยและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

จากการนำมันสำปะหลังอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้งมาทำการปั่นให้ละเอียดเป็นผง กรองผ่านตะแกรงร่อนขนาด 50 mesh ขนาดของแป้งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 300 ไมโครเมตร ทำการชั่งผงมันสำปะหลังใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 6 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จนได้สารละลายผงมันสำปะหลังมีลักษณะหนืดและข้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้อุณหภูมิเหลือประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ($ml/g_{substrate}$) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร บ่มที่ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นลดอุณหภูมิลงเหลือประมาณ 30 องศาเซลเซียส เติมหัวเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช จากการทดลองพบว่าปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 24.99 ± 0.42 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลง อาจเนื่องจากมีปริมาณน้ำตาลเหลือน้อย ซึ่งเชื้อ *S. cerevisiae* จะใช้น้ำตาลรีดิวซ์เป็นสับสเตรทในการหมักเอทานอล จึงมีผลให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ลดลง สำหรับปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาในการหมัก ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชจะลดลง เนื่องจากในกระบวนการหมักของเชื้อยีสต์ นอกจากจะผลิตเอทานอลแล้วยังผลิตกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆมากมาย เช่น กรดแอซิติก กรดแลคติก และกรดซัคซินิก (Martha และคณะ, 2016) ในระยะสุดท้ายของการหมักพีเอชจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งพิมเพ็ญ (2560) พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สามารถย่อยสลายกรดอินทรีย์ทำให้ความเป็นกรดลดลง มีผลให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น โดยมีพีเอชเท่ากับ 4.85 ± 0.03 แสดงดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.2

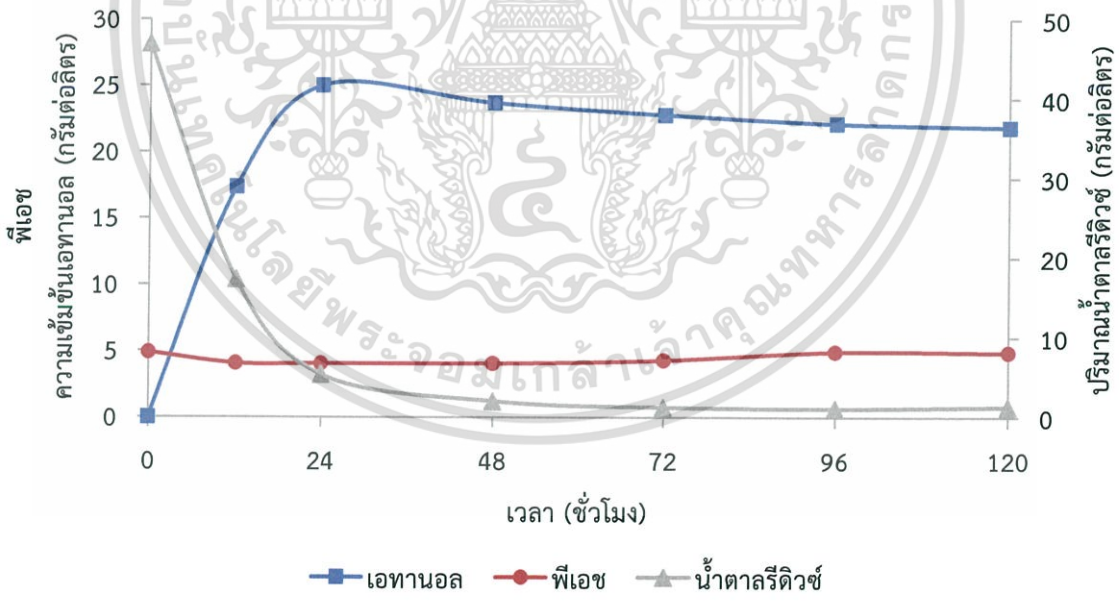
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ย่อยและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$0.00^{f} \pm 0.00$	$46.92^{a} \pm 2.15$	$4.88^{ab} \pm 0.01$
12	$17.35^{e} \pm 0.14$	$17.31^{b} \pm 2.92$	$4.06^{d} \pm 0.03$
24	$24.99^{a} \pm 0.42$	$5.35^{c} \pm 0.40$	$4.03^{d} \pm 0.01$
48	$23.69^{b} \pm 0.52$	$1.99^{d} \pm 0.04$	$4.04^{d} \pm 0.03$
72	$22.79^{c} \pm 0.43$	$1.23^{d} \pm 0.03$	$4.29^{c} \pm 0.01$
96	$22.13^{d} \pm 0.10$	$1.08^{d} \pm 0.01$	$4.91^{a} \pm 0.06$
120	$21.84^{d} \pm 0.20$	$1.30^{d} \pm 0.08$	$4.85^{b} \pm 0.03$

เมื่อพิจารณาแนวตั้ง ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าย่อยและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.2 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

จากการทดลองพบว่าช่วง 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้น เนื่องจากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ผลิตเอนไซม์ออกมาย่อยแป้งเป็นน้ำตาล หลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลจะลดลงอาจเนื่องจากเชื้อราเองใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตเพื่อผลิตชีวมวลของรา ในชั่วโมงที่ 48 มีการเติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาณน้ำตาลจะลดลงเรื่อยๆ เนื่องจากเชื้อยีสต์ใช้น้ำตาลเป็นสับสเตรทในการผลิตเอทานอล เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลจะพบว่าช่วง 12-24 ชั่วโมงของการหมัก มีปริมาณเอทานอลเกิดขึ้นเล็กน้อย เนื่องจากเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 สามารถผลิตเอทานอลได้เล็กน้อย คือ 0.62 ± 0.22 – 6.43 ± 0.22 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าในชั่วโมงที่ 96 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดและมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 กับปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48 และ 120 แต่ไม่แตกต่างกับชั่วโมงที่ 72 ภายหลังการเติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและมีปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ 22.90 ± 1.08 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Carlsen และคณะ (1995) พบว่าเชื้อ *Aspergillus oryzae* สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 1 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด สำหรับค่าพีเอช ช่วงแรกของการหมัก (12-24 ชั่วโมง) พีเอชจะเพิ่มขึ้น หลังจากเติมเชื้อยีสต์พีเอชจะลดลงเรื่อยๆ และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) แสดงดังตารางที่ 4.5 และ รูปที่ 4.3

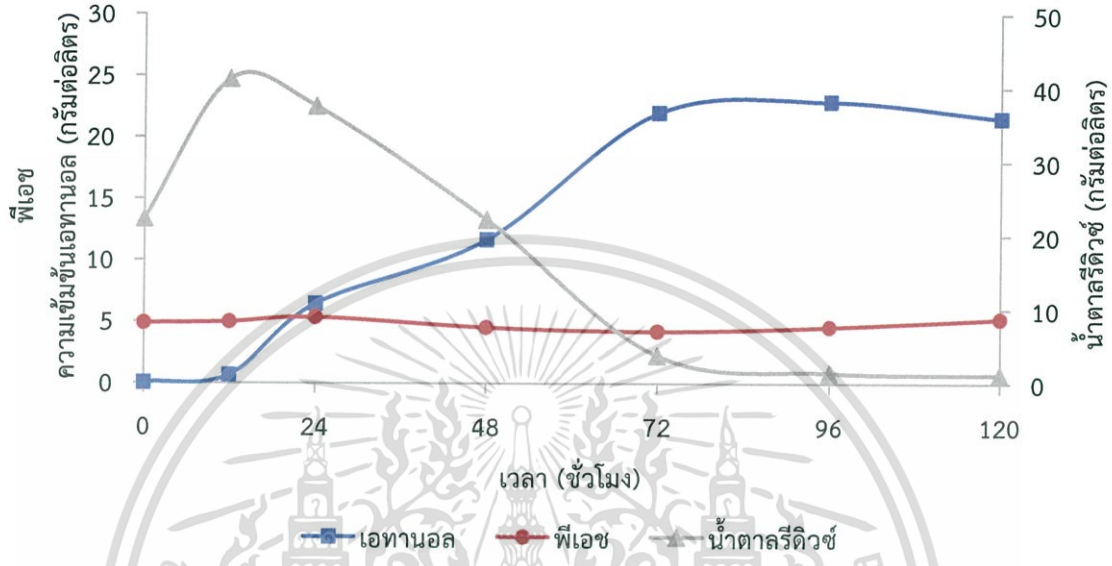
ตารางที่ 4.5 ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$0.00^{e} \pm 0.00$	$22.23^{b} \pm 2.20$	$4.87^{a} \pm 0.04$
12	$0.62^{e} \pm 0.22$	$41.21^{a} \pm 2.26$	$4.97^{b} \pm 0.06$
24	$6.43^{d} \pm 0.22$	$37.51^{a} \pm 2.98$	$5.35^{b} \pm 0.01$
48	$11.64^{c} \pm 0.40$	$22.17^{b} \pm 4.18$	$4.52^{c} \pm 0.12$
72	$21.98^{ab} \pm 1.50$	$3.75^{c} \pm 0.71$	$4.22^{c} \pm 0.03$
96	$22.90^{a} \pm 1.08$	$1.40^{c} \pm 0.10$	$4.57^{a} \pm 0.09$
120	$21.56^{b} \pm 0.30$	$1.16^{c} \pm 0.13$	$5.23^{a} \pm 0.26$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาแนวตั้ง ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

4.4.3 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นช่วง 12-24 ชั่วโมงของการหมัก เนื่องจากเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 สามารถผลิตเอนไซม์ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้เช่นเดียวกันกับเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 และสามารถผลิตน้ำตาลได้สูงกว่า *A. oryzae* TISTR 3086 ภายหลังจากการเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 จะพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว วันสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1.22 ± 0.03 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณเอทานอลในช่วง 12-24 ชั่วโมงแรกของการหมักมีปริมาณเล็กน้อย เนื่องจากเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 สามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณเล็กน้อย ภายหลังการเติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่ชั่วโมงที่ 48 ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 25.37 ± 0.69 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลง สำหรับค่าพีเอชในช่วงแรกของการหมัก (12-24 ชั่วโมง) พีเอชจะเพิ่มขึ้น ภายหลังการเติมเชื้อยีสต์พีเอชจะลดลงเรื่อยๆ และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) เท่ากับ 5.60 ± 0.12 แสดงดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.4

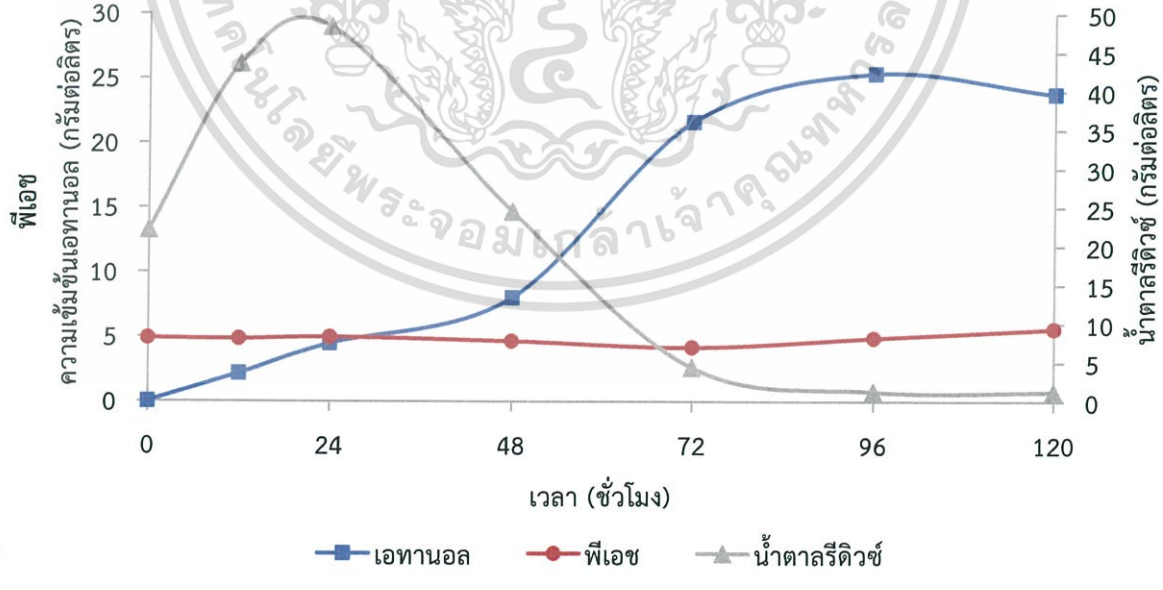
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$0.00^{g} \pm 0.00$	$22.10^{c} \pm 1.17$	$4.90^{a} \pm 0.10$
12	$2.17^{f} \pm 1.07$	$43.58^{b} \pm 0.79$	$4.85^{b} \pm 0.00$
24	$4.49^{e} \pm 1.00$	$48.36^{a} \pm 5.10$	$4.98^{b} \pm 0.01$
48	$8.03^{d} \pm 0.23$	$24.49^{c} \pm 0.23$	$4.66^{c} \pm 0.28$
72	$21.63^{c} \pm 1.08$	$4.42^{d} \pm 0.33$	$4.19^{c} \pm 0.02$
96	$25.37^{a} \pm 0.69$	$1.26^{d} \pm 0.02$	$4.89^{a} \pm 0.60$
120	$23.80^{b} \pm 0.20$	$1.22^{d} \pm 0.03$	$5.60^{a} \pm 0.12$

เมื่อพิจารณาแนวตั้ง ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.4 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะเพิ่มขึ้นในช่วง 12-24 ชั่วโมงของการหมัก ซึ่งเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 สามารถผลิตเอนไซม์อะไมเลสออกมาย่อยแป้งเป็นน้ำตาลได้ ภายหลังที่เติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากยีสต์ใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอล ซึ่งวันสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เหลือ 1.12 ± 0.07 กรัมต่อลิตร ขณะที่ปริมาณเอทานอลในช่วง 12-24 ชั่วโมงแรกของการหมักมีปริมาณเล็กน้อยอยู่ในช่วง 0.66 ± 0.26 -5.66 ± 0.21 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเชื้อราทั้งสองสายพันธุ์ที่ใช้ในการทดลองสามารถผลิตเอทานอลได้เล็กน้อย ภายหลังการเติมเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 96 ชั่วโมงเท่ากับ 23.83 ± 0.56 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลง จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 96 มีปริมาณสูงสุดและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับปริมาณเอทานอลที่ชั่วโมงต่างๆ ของการหมัก สำหรับค่าพีเอชในช่วงแรกของการหมัก (12-24 ชั่วโมง) พีเอชจะเพิ่มขึ้น ภายหลังการเติมเชื้อยีสต์พีเอชจะลดลงเรื่อยๆ และจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) เท่ากับ 5.60 ± 0.44 แสดงดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.5

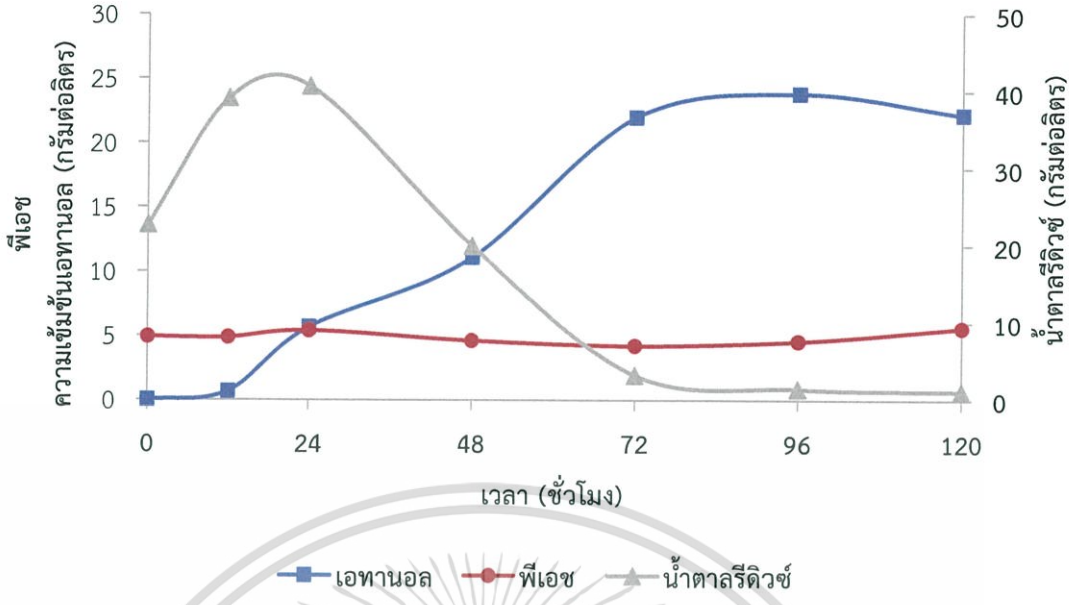
ตารางที่ 4.7 ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$0.00^{f} \pm 0.00$	$22.73^{b} \pm 1.32$	$4.93^{b} \pm 0.06$
12	$0.66^{e} \pm 0.26$	$39.17^{a} \pm 0.97$	$4.88^{bc} \pm 0.02$
24	$5.66^{d} \pm 0.21$	$40.69^{a} \pm 4.11$	$5.40^{a} \pm 0.06$
48	$11.10^{c} \pm 0.61$	$19.98^{c} \pm 1.80$	$4.62^{bc} \pm 0.01$
72	$22.00^{b} \pm 0.37$	$3.23^{d} \pm 0.28$	$4.23^{d} \pm 0.03$
96	$23.83^{a} \pm 0.56$	$1.44^{d} \pm 0.09$	$4.58^{c} \pm 0.03$
120	$22.18^{b} \pm 0.17$	$1.12^{d} \pm 0.07$	$5.60^{a} \pm 0.44$

เมื่อพิจารณาแนวตั้ง ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยใช้เชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SHF

ดังนั้นการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยกระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมัก (SHF) โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าย่อยและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (ชุดการทดลองที่ 1) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 24.99 ± 0.42 กรัมต่อลิตร ขณะที่การหมักด้วยเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ตามด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (ชุดการทดลองที่ 2) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 96 ชั่วโมงเท่ากับ 22.90 ± 1.08 กรัมต่อลิตร การหมักด้วยเชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ตามด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (ชุดการทดลองที่ 3) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 25.37 ± 0.69 กรัมต่อลิตร และการหมักด้วยเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 ตามด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (ชุดการทดลองที่ 4) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 96 ชั่วโมงเท่ากับ 23.83 ± 0.56 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.6 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้เชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการใช้เอนไซม์ทางการค้าย่อยแป้งเป็นน้ำตาลและการหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการหมักในชุดการทดลองที่ 3 ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับปริมาณเอทานอลในชุดการทดลองที่ 1 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.8 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)

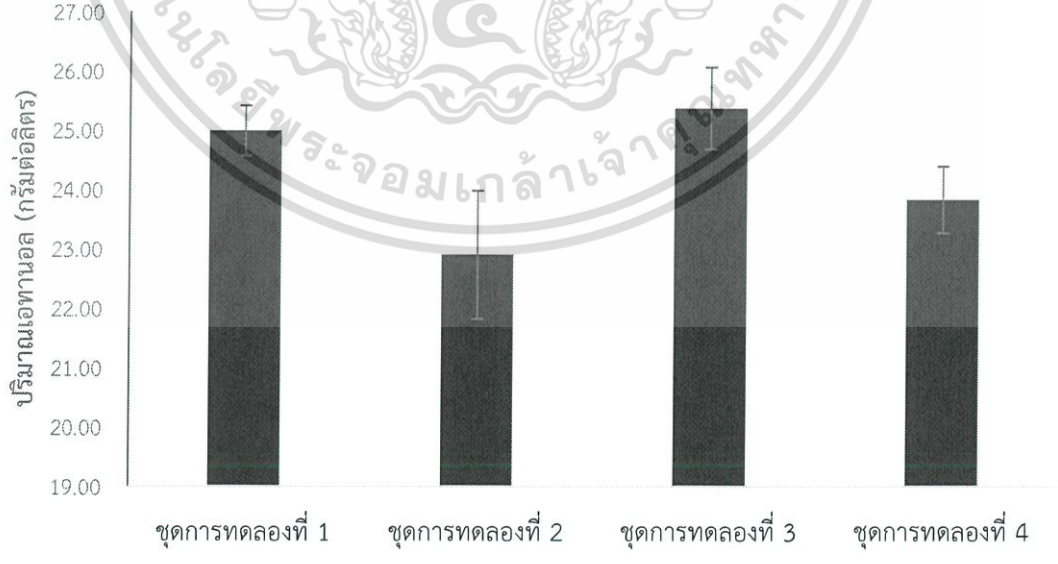
ชุดการทดลอง	ชั่วโมงการหมัก	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)
ชุดการทดลองที่ 1	24	$24.99^{ab} \pm 0.42$
ชุดการทดลองที่ 2	96	$22.90^{c} \pm 1.08$
ชุดการทดลองที่ 3	96	$25.37^{a} \pm 0.69$
ชุดการทดลองที่ 4	96	$23.83^{bc} \pm 0.56$

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 : เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 2 : *A. oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 508

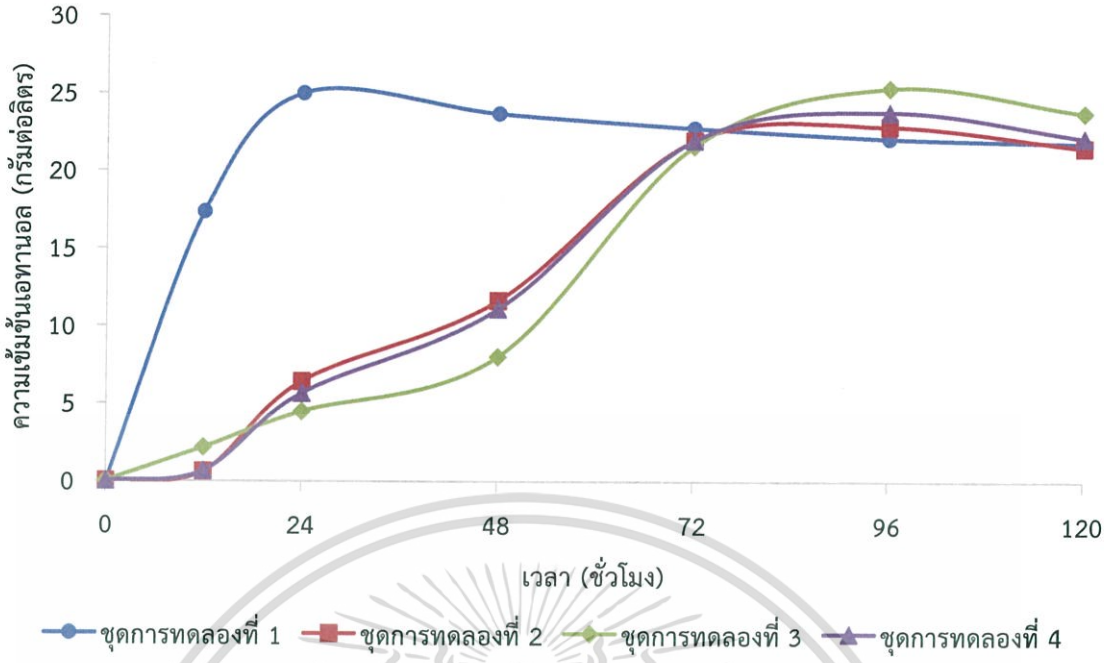
ชุดการทดลองที่ 3 : *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 4 : *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088



รูปที่ 4.6 ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ได้จากกระบวนการหมักของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับระยะเวลาหมัก (ชั่วโมง) ในชุดการทดลองต่างๆ ด้วยกระบวนการหมักแบบกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 : เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 2 : *A. oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 3 : *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 4 : *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

4.5 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

4.5.1 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้า ย่อยและหมักเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับการหมัก (SSF)

จากการนำมันสำปะหลังอบแห้งในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมันสำปะหลังที่ผ่านการอบแห้งมาทำการปั่นให้ละเอียดเป็นผง กรองผ่านตะแกรงร่อนขนาด 50 mesh ขนาดของแป้งมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 300 ไมโครเมตร ทำการชั่งผงมันสำปะหลังใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปริมาณ 6 กรัม เติมน้ำกลั่นปริมาตร 74 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30 นาที จนได้สารละลายผงมันสำปะหลังมีลักษณะหนืดและข้น นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ลดอุณหภูมิเหลือประมาณ 80-90 องศาเซลเซียส แล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์แอลฟาอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ลดอุณหภูมิลงประมาณ 30 องศาเซลเซียส ย่อยต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะไมเลส ความเข้มข้นร้อยละ 0.06 (น้ำหนักโดยปริมาตร) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ ACCELLERASE 1500 ($ml/g_{substrate}$) ปริมาตร 6 มิลลิลิตร พร้อมเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 7 มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 0, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้น ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอช จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาในการหมัก จะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12-48 ชั่วโมง และในชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) จะเหลือน้ำตาลรีดิวซ์ 1.36 ± 0.14 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 26.32 ± 0.38 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ใช้น้ำตาลในการผลิตเอทานอล สำหรับค่าพีเอชจะลดลงเรื่อยๆ และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงท้ายของการหมัก เนื่องจากในกระบวนการหมัก นอกจากผลิตเอทานอลแล้วยังผลิตกรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดแลคติก และกรดซัคซินิก (Martha และคณะ, 2016) ในระยะสุดท้ายของการหมักพีเอชจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย พิมเพ็ญ (2560) พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* สามารถย่อยกรดอินทรีย์ได้ทำให้ความเป็นกรดลดลง มีผลให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้น โดยชั่วโมงที่ 120 มีพีเอชเท่ากับ 4.84 ± 0.05 แสดงดังตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.10

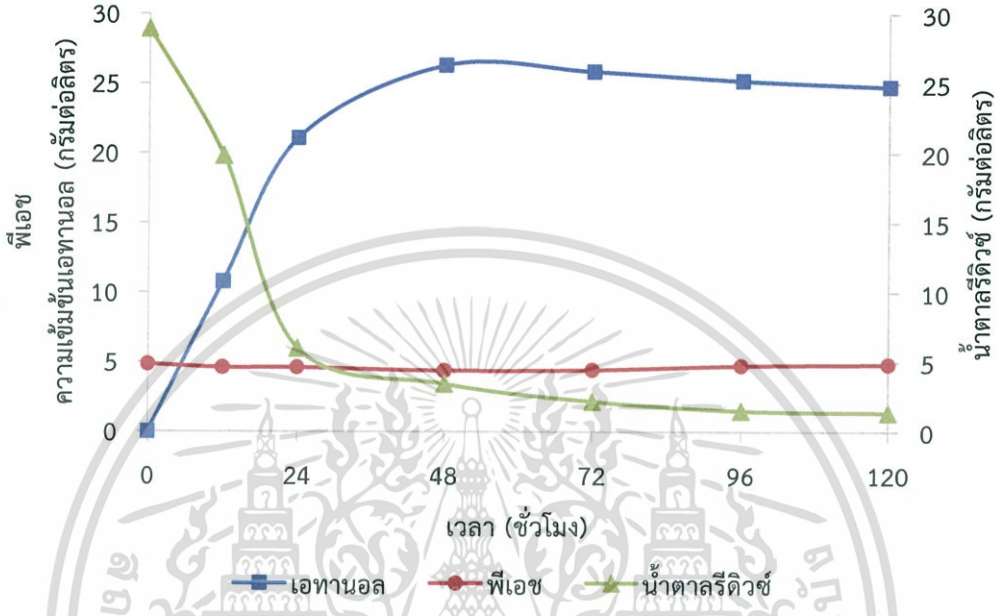
ตารางที่ 4.9 ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$0.00^{f} \pm 0.00$	$28.96^{a} \pm 2.90$	$4.87^{a} \pm 0.00$
12	$10.78^{e} \pm 0.98$	$19.83^{b} \pm 2.04$	$4.63^{b} \pm 0.03$
24	$21.10^{d} \pm 0.26$	$6.09^{c} \pm 0.53$	$4.62^{b} \pm 0.03$
48	$26.32^{a} \pm 0.38$	$3.44^{d} \pm 0.15$	$4.40^{c} \pm 0.01$
72	$25.85^{ab} \pm 0.18$	$2.17^{d} \pm 0.13$	$4.45^{c} \pm 0.08$
96	$25.22^{bc} \pm 0.25$	$1.50^{d} \pm 0.04$	$4.75^{a} \pm 0.15$
120	$24.77^{c} \pm 0.18$	$1.36^{d} \pm 0.14$	$4.84^{a} \pm 0.05$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อพิจารณาแนวตั้ง ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชของการหมักผงมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

4.5.2 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12-24 ชั่วโมง ในชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) จะเหลือน้ำตาลรีดิวซ์ 1.21 ± 0.04 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 24.65 ± 0.86 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงเล็กน้อย สำหรับค่าพีเอชจะลดลงเรื่อยๆ และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงท้ายของการหมัก โดยชั่วโมงที่ 120 มีพีเอช 4.92 ± 0.16 แสดงดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.9

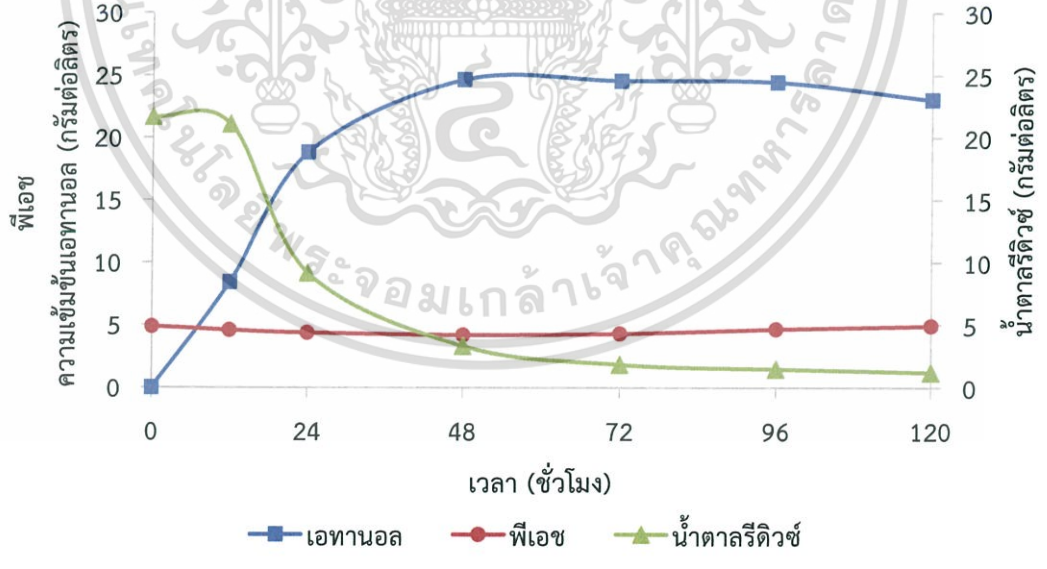
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$0.00^{e} \pm 0.00$	$21.67^{a} \pm 0.69$	$4.89^{a} \pm 0.02$
12	$8.43^{d} \pm 0.61$	$21.08^{a} \pm 0.76$	$4.61^{b} \pm 0.02$
24	$18.81^{c} \pm 1.40$	$9.18^{b} \pm 0.05$	$4.39^{c} \pm 0.02$
48	$24.65^{a} \pm 0.86$	$3.33^{c} \pm 0.11$	$4.22^{d} \pm 0.02$
72	$24.57^{ab} \pm 0.42$	$1.85^{d} \pm 0.05$	$4.32^{cd} \pm 0.04$
96	$24.44^{ab} \pm 0.57$	$1.48^{d} \pm 0.15$	$4.68^{b} \pm 0.13$
120	$23.04^{b} \pm 1.19$	$1.21^{d} \pm 0.04$	$4.92^{a} \pm 0.16$

เมื่อพิจารณาแนวตั้ง ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชของการหมักผงมันสำปะหลังโดยใช้ *A. oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5.3 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก และลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12-48 ชั่วโมง ในชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) จะเหลือน้ำตาลรีดิวซ์ 1.22 ± 0.05 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 25.37 ± 0.34 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงเล็กน้อย สำหรับค่าพีเอชจะลดลงเรื่อยๆ และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงท้ายของการหมัก โดยชั่วโมงที่ 120 มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.95 ± 0.03 แสดงดังตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.10

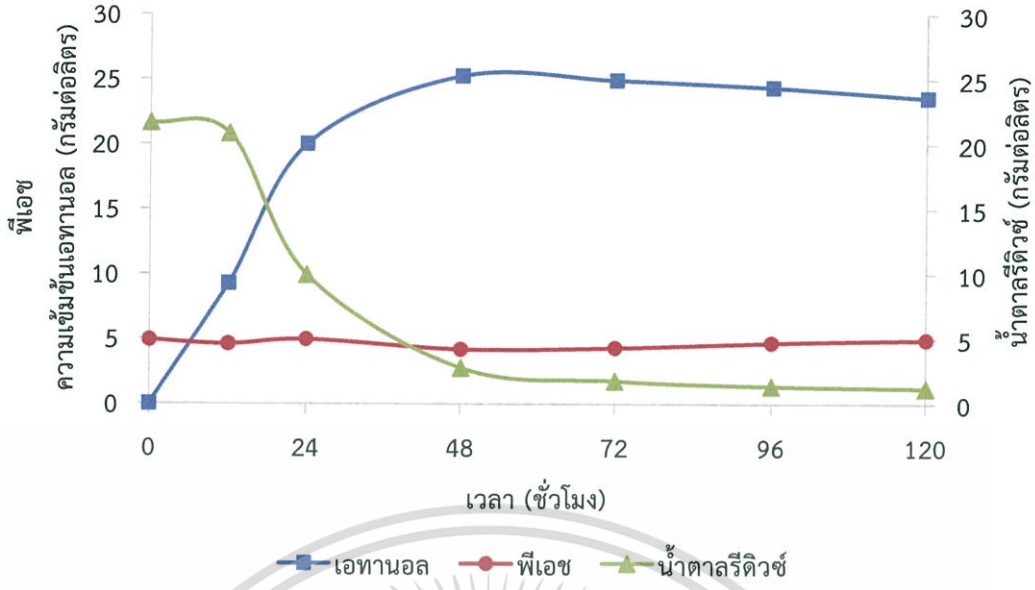
ตารางที่ 4.11 แสดงปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$0.00^{e} \pm 0.00$	$21.67^{a} \pm 0.1.35$	$4.92^{b} \pm 0.06$
12	$9.29^{d} \pm 0.34$	$20.85^{a} \pm 0.43$	$4.62^{d} \pm 0.03$
24	$20.04^{c} \pm 1.17$	$9.97^{b} \pm 0.40$	$4.98^{a} \pm 0.01$
48	$25.37^{a} \pm 0.34$	$2.78^{c} \pm 0.21$	$4.21^{f} \pm 0.02$
72	$24.92^{a} \pm 0.61$	$1.75^{d} \pm 0.14$	$4.32^{e} \pm 0.03$
96	$24.39^{ab} \pm 0.16$	$1.37^{d} \pm 0.05$	$4.72^{c} \pm 0.01$
120	$23.59^{b} \pm 0.19$	$1.22^{d} \pm 0.05$	$4.95^{ab} \pm 0.03$

เมื่อพิจารณาแนวตั้ง ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชของการหมักผงมันสำปะหลัง โดยใช้ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

4.5.4 ผลการศึกษากระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสม *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

จากการทดลองพบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาการหมัก โดยจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12-48 ชั่วโมง ในชั่วโมงสุดท้ายของการหมัก (120 ชั่วโมง) จะเหลือปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ 1.32 ± 0.04 กรัมต่อลิตร สำหรับปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นและมีปริมาณสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 เท่ากับ 24.88 ± 0.95 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลง สำหรับค่าพีเอชจะลดลงเรื่อยๆและเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในช่วงท้ายของการหมัก ชั่วโมงที่ 120 มีค่าพีเอชเท่ากับ 4.91 ± 0.03 แสดงดังตารางที่ 4.12 และรูปที่ 4.11

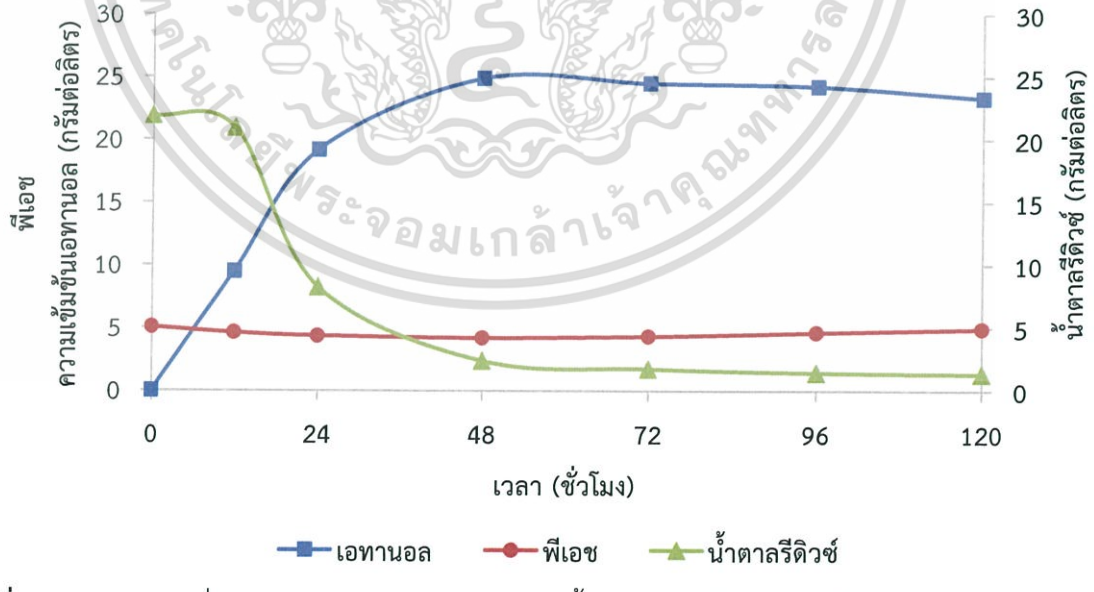
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชที่ได้จากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

เวลา (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)	ค่าพีเอช
0	$0.00^{d} \pm 0.00$	$21.90^{a} \pm 0.31$	$5.06^{a} \pm 0.08$
12	$9.50^{c} \pm 1.17$	$20.93^{a} \pm 1.98$	$4.62^{b} \pm 0.04$
24	$19.18^{b} \pm 1.30$	$8.23^{b} \pm 0.62$	$4.36^{c} \pm 0.01$
48	$24.88^{a} \pm 0.95$	$2.37^{c} \pm 0.42$	$4.20^{c} \pm 0.01$
72	$24.49^{a} \pm 0.49$	$1.74^{c} \pm 0.05$	$4.33^{c} \pm 0.05$
96	$24.24^{a} \pm 0.52$	$1.43^{c} \pm 0.03$	$4.62^{b} \pm 0.25$
120	$23.30^{a} \pm 0.68$	$1.32^{c} \pm 0.04$	$4.91^{a} \pm 0.03$

เมื่อพิจารณาแนวตั้ง ตัวอักษรต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ และค่าพีเอชของการหมักผงมันสำปะหลัง โดยใช้ *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยกระบวนการหมักแบบ SSF

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้นการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยกระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมัก (SSF) โดยใช้เอนไซม์ทางการค้าย่อยและหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (ชุดการทดลองที่ 1) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงเท่ากับ 26.32 ± 0.86 กรัมต่อลิตร ขณะที่มีการหมักด้วยเชื้อผสมของ *A. oryzae* TISTR 3086 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (ชุดการทดลองที่ 2) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 24.65 ± 0.66 กรัมต่อลิตร การหมักด้วยเชื้อผสมของ *A. rouxii* TISTR 3182 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (ชุดการทดลองที่ 3) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 25.37 ± 0.34 กรัมต่อลิตร และการหมักด้วย *A. oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *A. rouxii* TISTR 3182 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 (ชุดการทดลองที่ 4) ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ 48 ชั่วโมง เท่ากับ 24.88 ± 0.38 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.13 และรูปที่ 4.12 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการหมักในสภาวะที่ 1 3 และ 4 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดไม่แตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 แต่ชุดการทดลองที่ 1 ให้ปริมาณเอทานอลสูงและแตกต่างกับปริมาณเอทานอลในชุดการทดลองที่ 2

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการใช้เชื้อ *A. rouxii* TISTR 3182 ย่อยแป้งเป็นน้ำตาลและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยเกิดพร้อมกับกระบวนการหมัก จะให้ปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกับการใช้เอนไซม์ทางการค้าย่อยแป้งเป็นน้ำตาลและหมักด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 4.13 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากกกระบวนการหมักของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการหมักแบบ SSF

ชุดการทดลอง	ชั่วโมงการหมัก	ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร)
ชุดการทดลองที่ 1	48	$26.32^{a} \pm 0.86$
ชุดการทดลองที่ 2	48	$24.65^{b} \pm 0.66$
ชุดการทดลองที่ 3	48	$25.37^{ab} \pm 0.34$
ชุดการทดลองที่ 4	48	$24.88^{ab} \pm 0.38$

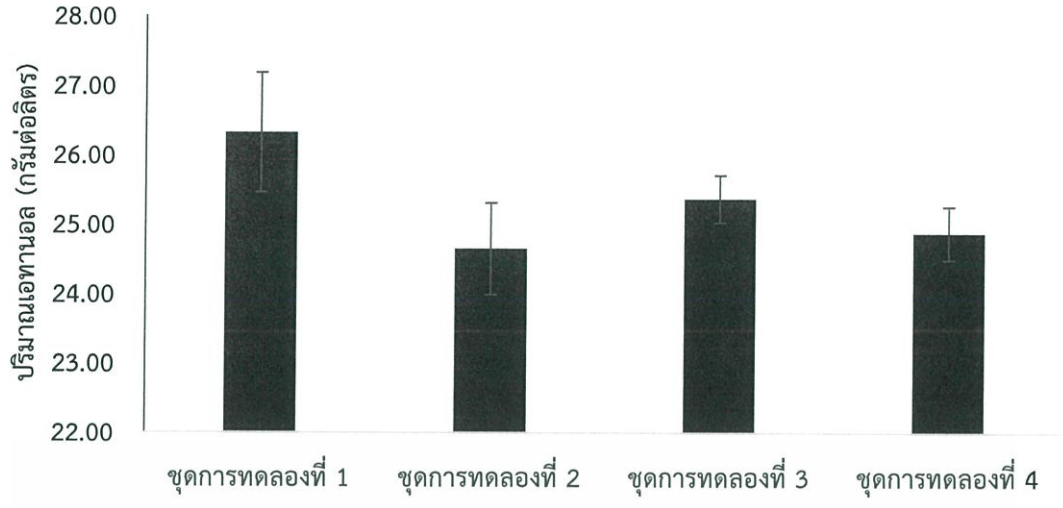
หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 : เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 2 : *A. oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

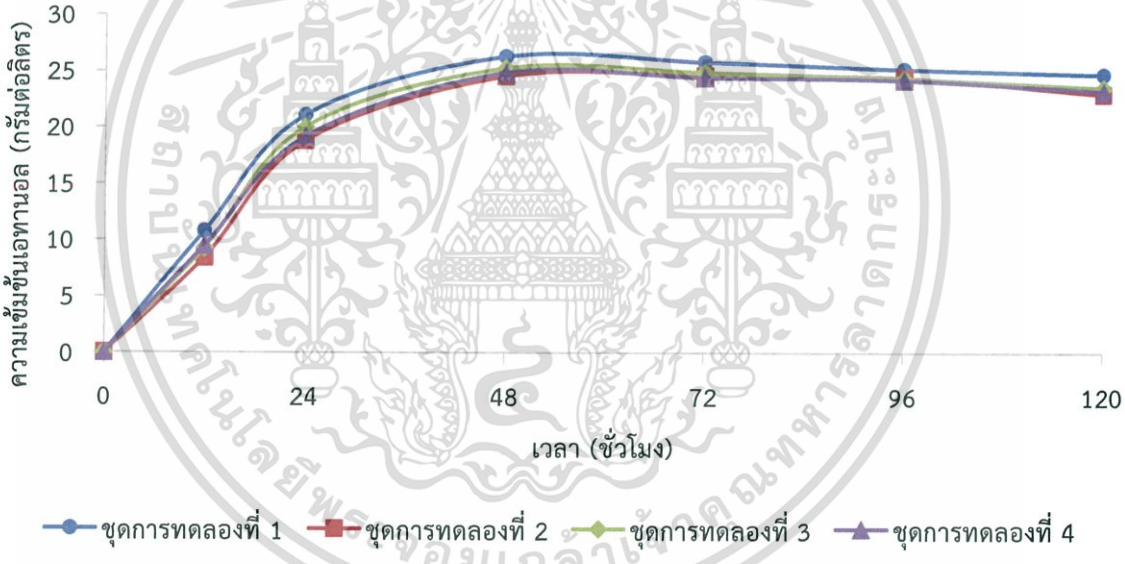
ชุดการทดลองที่ 3 : *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 4 : *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่เกิดจากกระบวนการหมักไบโอเอทานอลของเชื้อ *A. oryzae* TISTR 3086 , *A. rouxii* TISTR 3182 และ *S. cerevisiae* TISTR 5088 โดยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)



รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง) ในชุดการทดลองต่างๆ ด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 : เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 2 : *A. oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 3 : *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 4 : *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.6 ผลการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

เมื่อเปรียบเทียบกระบวนการหมักแบบการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) ของเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการหมักผงมันสำปะหลัง พบว่ากระบวนการย่อยพร้อมกระบวนการหมักของชุดการทดลองทั้ง 4 ชุดการทดลองให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่ากระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก แสดงดังตารางที่ 4.14 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mingium และคณะ (2014) พบว่ากระบวนการหมักเอทานอลจากกากมันสำปะหลัง สภาวะที่เหมาะสมในการหมักคือ ใช้ความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังร้อยละ 20 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 หมักด้วยกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักให้ปริมาณเอทานอล 34.67 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณสูงกว่าการหมักด้วยกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมักซึ่งให้ปริมาณเอทานอล 23.51 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.14 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลที่ได้จากกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) ของชุดการทดลอง 4 ชุดการทดลอง

ชุดการทดลอง	กระบวนการหมัก	ระยะเวลาที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร/ชั่วโมง)
1	SHF	24	$24.99^{ab} \pm 0.42$	1.04
	SSF	48	$26.32^{a} \pm 0.86$	0.55
2	SHF	72	$21.98^{c} \pm 1.50$	0.31
	SSF	48	$24.65^{b} \pm 0.66$	0.51
3	SHF	96	$25.37^{ab} \pm 0.69$	0.26
	SSF	48	$25.37^{ab} \pm 0.95$	0.53
4	SHF	96	$23.83^{b} \pm 0.56$	0.25
	SSF	48	$24.88^{ab} \pm 0.38$	0.52

หมายเหตุ ชุดการทดลองที่ 1 : เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 2 : *A. oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 3 : *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 4 : *A. oryzae* TISTR 3086 และ *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษากระบวนการผลิตไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลัง โดยแบ่งการทดลอง 4 ชุดการทดลอง ได้แก่ ชุดการทดลองที่ 1 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอมไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ชุดการทดลองที่ 2 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ชุดการทดลองที่ 3 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 และชุดการทดลองที่ 4 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสม *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักในสภาวะเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 120 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF) และกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF) จากการทดลองพบว่ากระบวนการย่อยแยกกับกระบวนการหมักของชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งเป็นกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 25.37 ± 0.69 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 96 ประสิทธิภาพการผลิตเท่ากับ 0.26 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และกระบวนย่อยพร้อมกับกระบวนการหมักของชุดการทดลองที่ 3 ซึ่งเป็นกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *A. rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 25.37 ± 0.95 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมง 48 ประสิทธิภาพการผลิต 0.53 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง โดยเชื้อรา *A. rouxii* TISTR 3182 มีค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส 144.2 ± 1.05 หน่วยต่อมิลลิลิตร สูงกว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสของเชื้อรา *A. oryzae* TISTR 3086 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 65.4 ± 1.10 หน่วยต่อมิลลิลิตร

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรพัฒนาสภาวะในกระบวนการหมัก โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากนั้นทำการสกัดเพื่อให้ได้เอนไซม์บริสุทธิ์แล้วนำมาใช้ในกระบวนการผลิตไบโอเอทานอล เพื่อหลีกเลี่ยงสภาวะการเจริญเติบโตที่ไม่เหมาะสมของเชื้อที่ใช้ในกระบวนการหมัก

2. ควรศึกษาปัจจัยที่ทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น เช่น การใช้แหล่งไนโตรเจนสำหรับเป็นสารอาหารที่เหมาะสมของเชื้อราและเชื้อยีสต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จิตตวีร์ สมผล, ปิติพร น้อยสกุล และ วรรณนา เชฏฐ์เรืองชัย. 2557. “การผลิตไบโอเอทานอลจากผงมันเทศโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 กับเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะเขย่า”. โครงงานพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ชุติมา ศรีงิ้ว. 2548. “การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง”. ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา, มหาวิทยาเกษตรศาสตร์.

นฤมล โตอ่อน. 2549. “ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล”.วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า102.

นุกูล อินทระสังขา. 2551. “**วิทยาเชื้อรา**”, โครงการส่งเสริมการผลิตเอกสารวิชาการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยทักษิณ. ครั้งที่ 1, หน้า 116 – 117.

ปฏิพล ชัยเทพ, ไพรัช สาใจ และ รัชฎาภรณ์ ปวงก่องตั้น. 2555. “การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ทนร้อน”. สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร วิทยาลัยเทคโนโลยีและสหวิทยาการ, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา.

พิมเพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. 2560. “ยีสต์ (yeast)”. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.food networksolution.com/wiki/word/0555/yeast

ภูวดี. 2551. “เอทานอล”. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://www.vcharkarn.com/varticle/

รัตติกาล กองบุญ. 2550. “การประเมินศักยภาพการผลิตเซลล์เชื้อเพลิงเพื่อการพาณิชย์ในประเทศไทย”. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมอุตสาหการ บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

วันเชิญ โพธาเจริญ. 2550. **“เอกสารประกอบสื่อการเรียนรู้ความหลากหลายทางชีวภาพ “7,000 ปีก่อนคริสตกาล””.** สำนักงานปลัดกระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ.

วิโรจน์ พุทธวิถี. 2553. “เอทานอล”. [Online]. เข้าถึงได้จาก : http://thaicafe.blogspot.com

สมใจ ศิริโภค. 2337. **“เทคโนโลยีการหมัก”.** ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ, กรุงเทพฯ.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุวภัทร เจียมทวีทรัพย์, สุกพัฒน์ ลิตภัณฑ์ และโสมวิสา ทองปลอด. 2555. "การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ทนอุณหภูมิและเอทานอลสูง เพื่อใช้ผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันเทศ". โครงงานพิเศษสาขาวิชาชีววิทยาอุตสาหกรรม ภาควิชาชีววิทยา, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549. "ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพของยีสต์". มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ 376 น. หน้า 109 – 121.

อนุวัฒน์ เตชะฤทธิ์. 2549. "การเพิ่มผลผลิตการสังเคราะห์โปรตีนในรา *Aspergillus oryzae* โดยการควบคุมกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส". สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

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

Alessandra, V., Isabella, D., Emanuele, R. and Vincenza, C. 2012. "Hydrolysis of lignocellulosic biomass : current status of processes and technologies and future perspectives". *Bioethanol.* : 953 – 978.

Alfani, F. , Gallifuoco, A. , Saporosi, A. , Spera, A. and Cantarella, M. 2000. "Comparison of SHF and SSF processes for the bioconversion of steam-exploded wheat straw". *J Ind Biotechnol.* 100 : 1122-1131.

Amira, E., Mohammed, A., Ahmed, E. and Noha, O. 2012. "Starch and microbial α-amylases: from concepts to biotechnological applications". *Genetics and Molecular Biology.* : 864.

Angelo, S., Tathiana, S., Erika, V., Bianca, W. and Gisela, M. 2013. "Enzymes in bakery: current and future trends". *Food Industry.* : 911.

Anselm, P.M., Ken, M.M., Hosea, E.E., Gashaw, M., Linda, O., and Achu, N. 2016. "Production of raw starch-degrading enzyme by *Aspergillus* sp. and its use in conversion of inedible wild cassava flour to bioethanol". *Bioscience and Bioengineering.* 121(4) : 457 – 463.

Audu, A., Waziri, M. and Olasinde, T. 2012. "Proximate analysis and levels of some heavy metals in cassava flour processed by roadside drying along Abuja-lokoja highway,Nigeria". *Fundamental and Applied Life Sciences.* 2(3) : 55 – 58.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Aunstrup, K. 1979. " Production isolatiom and economics of extracellular enzymes". *App Biochem Bioeng.* 2(1) : 27 – 69.

Carlsen, M., Spohr, A., Nielsen, J. and Villadsen, J. 1995. "Morphology and physiology of an α- amylase producing strain of *Aspergillus oryzae* during batch cultivations". *Biothechnology and Bioengineering.* 49(3) : 266–276.

Chang, C., Tang, M. and Lin, C. 1995. " Purification and properties of alpha-amylase from *Aspergillus oryzae* ATCC 76080". *Biochem Mol Biol.* 36(1) : 185-93.

Coutinho,P.M. and Henrissat, B. 1999 Recent advances in carbohydrate bioengineering. edited by H. J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat and B. Svensson, 3–12. Cambridge : *The Royal Society of Chemistry.* 76(1) : 106 – 107

D' Amore, T., Panchal, C.J., Russell, I. and Stewart, G.G. 1988. "Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation". *Industry Microbiology.* 2 : 365 - 372.

Doman-Pytka, M. and Bardowski, J. 2004. " Pullulan degrading enzyme of bacterial origin". *Critical Reviews in Microbiology.* 30(1) : 107 – 121.

Ghosh, S. K., Kusari, J., Bandyopadhyay, S. K., Samanta, H., Kumar, R., and Sen, G. C. 1991. " Enzymatic activity of 2'-5'-oligoadenylate synthetase is impaired by specific mutations that affect oligomerization of the protein". *J. Biol. Chem.* 266(1) : 15293 – 15299.

Hwang, W.S., Luen, G.G., Chen, W.H., Men, L.C., Wang, J.B and Kuo, MC. 2007. "The current status of the technology development for the cellulosic ethanol at INER". In: Yang, S.S., Sayigh, A.A.M, Lai, C.M., Chen, S.editors. Development and applications of renewable energy. Taiwan : National Taiwan University. P.35

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Koutinas, A., Xu. Y., Wang, R., Webb, C. 2007. "Polyhydroxybutyrate production from a novel feedstock derived from a wheat- based biorefinery". *Enzyme and Microbial Technology.* 40(5) : 1035 – 1044.

Kozaki, M. and Uchimura, T. 1990. "Microorganisms in chinese starter 'bubod' and rice wine 'tapuy' in the philippinces". *Journal of Brewing Society of Japan.* 85(11) : 818-824.

Kurosawa, H., Nomura, N., Tanaka, H. 1988. "Ethanol production from starch by a coimmobilized mixed culture system of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae*". *Biotechnol.* 33(1) : 716 – 723

Lee, W.-S., Chen, I.-C., Chang, C.-H., and Yang, S. 2012. "Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae*". *Renew. Energ.* 39(1) : 216 – 222.

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T. and Kumagai, T. 2005. "Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*". *Nature.* : 22;438(7071) : 1157 – 1161.

Manas Ranjan Swain, Jyoti Mishra, Hrudayanath Thatoi. 2013. "Bioethanol production from sweet potato (*Ipomoea batatas L.*) flour using co-culture of *Trichoderma* sp. and *Saccharomyces cerevisiae* in solid -state fermentation Agribusiness ang". *Biotechnology.* 56(2) : 1678 – 1683.

Marcos Antonio das Neves, Toshinori Kimura, Naoto Shimizu, Kiwamu Shiiba. 2006. "Production of alcohol by simultaneous saccharification and fermentation of low-grade wheat flour". *Brazilian archives of biology and technology.* 49(3) : 481 – 490.

Martha, E., Jesus, B., Olga. M., Silvia, M. and Nicolas, O. 2016. "Performance of mixtures of *Saccharomyces* and non -*Saccharomyces* native yeasts during alcoholic fermentation of Agave duranguensis juice". *Food Microbiology.* 54(1) : 91 – 97.

Millati, R., Edebo, L. and Mohammad, J. 2005. "Performance of *Rhizopus*, *Rhizomucor*, and *Mucor* in ethanol production from glucose, xylose, and wood hydrolyzates". *Enzyme and Microbial Technology.* 36(2) : 294 – 300.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Miller, T. R. 1959. " Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*". *FEMS Microbiology Letters.* 24(2) : 375 – 379.

Mingjun, Z., Ping, L., Xinfang, G. and Jufang, W. 2014. "A comparison of the production of ethanol between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using unpretreated cassava pulp and enzyme cocktail". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* 76(4) : 671 – 678.

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

Olufunmilola, O. , Ogugua, C. , Bussie, M. , Erukainure, L. and Gloria, N. 2013. " Chemical and functional properties of cassava starch,durum wheat semolina flour, and their blends".*Food and Nutrition.* 2(2) : 132 – 138.

Panchal, C.J. 1990. **"Yeast Strain Selection".** VetroGen Corporation, London, Ontario, Canada Marcel Dekker, INC., New York and Basel.

Panchal, C.J., and Tevares, F.C. 1990. "Yeast strain selection for fuel ethanol production yeast strain selection". 8 : 225 – 236

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C., Soccol, V., Singh, D. and Mohan, R. 2000. "Advances in microbial amylases". *Biotechnol. Appl Biochem.* 31 : 135 – 152.

Petrea, L. 2008. "Characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* strain obtained by UV mutagenesis". *Innovative Romanian Food Biotechnology.* 42(1) : 42 – 47.

Philippidis, G. S. 1996. **" Handbook on bioethanol: Production and Utilization".** Wyman, C.E., ed., Taylor & Francis: Washington, DC, pp.

Sree, N.K., Sridhar, M., Suresh, K., Bannat, IM., Rao, LV. 2004. "High alcohol production by repeated batch fermentation using an immobilized osmotolerant *Saccharomyces cerevisiae*". *J. Ind. Microbiol.* 24(1) : 222 – 226.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar (PDA)

ประกอบด้วย

- มันฝรั่ง	200	กรัม
- น้ำตาลเดกซ์โตรส	20	กรัม
- วุ้น	20	กรัม
- น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีการเตรียม

หั่นมันฝรั่งเป็นชิ้นเล็กๆ ชั่งน้ำหนักมันฝรั่ง 200 กรัม ใส่ในภาชนะ เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปต้ม 30 นาที กรองผ่านผ้าขาวบาง น้ำมันฝรั่งที่กรองได้คือ potato infusion เติมวุ้นและน้ำตาลเดกซ์โตรสลงไป ต้มจนวุ้นละลาย บรรจุขวดหรือหลอดทดลอง นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °c เป็นเวลา 15 นาที ปรับ pH สุดท้าย 5.6 ± 0.2

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone Dextrose Agar (YPD agar)

ประกอบด้วย

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

วิธีการเตรียม

ละลายสารละลายทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract Peptone Dextrose broth (YPD broth)

ประกอบด้วย

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการเตรียม

ละลายสารละลายทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ (Ghosh และคณะ,1991)

ประกอบด้วย

- แป้ง (soluble strach)	5	กรัม
- แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	3	กรัม
- โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	1	กรัม
- แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0.5	กรัม
- โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.5	กรัม
- เฟอริกคลอไรด์ ($FeCl_3$)	0.1	กรัม
-น้ำกลั่น	1	ลิตร

วิธีการเตรียม

ละลายสารละลายทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1000 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมี

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีดีเอ็นเอส (Dinitrosalicylic Method)

สารเคมี

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

2.สารละลายกลูโคสมาตรฐาน

วิธีการเตรียมสารละลาย

1. **สารละลาย 3,5 – dinitrosalicylic (DNS) ร้อยละ 1**

1.1.ชั่งสาร 3,5 – dinitrosalicylic 10 กรัม ในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร

1.2.เติมสารละลายด่างทีละน้อย (โซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ เตรียมโดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 16 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร)

1.3.คนสารละลายให้เข้ากันจนหมด จนกระทั่งได้สารละลายใส

1.4.เติมโพแทสเซียมโซเดียมทาเทลงไปทีละน้อยจนครบ 300 กรัม สุดท้ายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร

2. **สารละลายกลูโคสมาตรฐาน**

2.1.อบกลูโคสที่ตู้อบ 70 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในเดซิเคเตอร์

2.2.ชั่งกลูโคสที่ผ่านการอบ 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

2.3.เจือจางสารละลายกลูโคสที่ได้โดยใช้น้ำกลั่นตามตาราง

ความเข้มข้นกลูโคส (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	ปริมาตรกลูโคส (มิลลิลิตร)	ปริมาตรน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	-	5
100	0.5	4.5
200	1	4
400	2	3
600	3	2
800	4	1
1000	5	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีวิเคราะห์

1. การทำกราฟมาตรฐาน

1.1.นำสารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 0 100 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อลิตร

1.2.ปิเปตสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเจือจางใส่ในหลอดทดลองปริมาตร 1 มิลลิลิตร ความเข้มข้นละ 2 ซ้ำ

1.3.ปิเปต DNS reagent ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่มีสารละลายกลูโคสมาตรฐานแต่ละความเจือจาง ผสมให้เข้ากัน

1.4.นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที แล้วรอให้เย็น

1.5.ปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 6 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการต้มแล้ว ผสมให้เข้ากัน

1.6.นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร พร้อมนำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

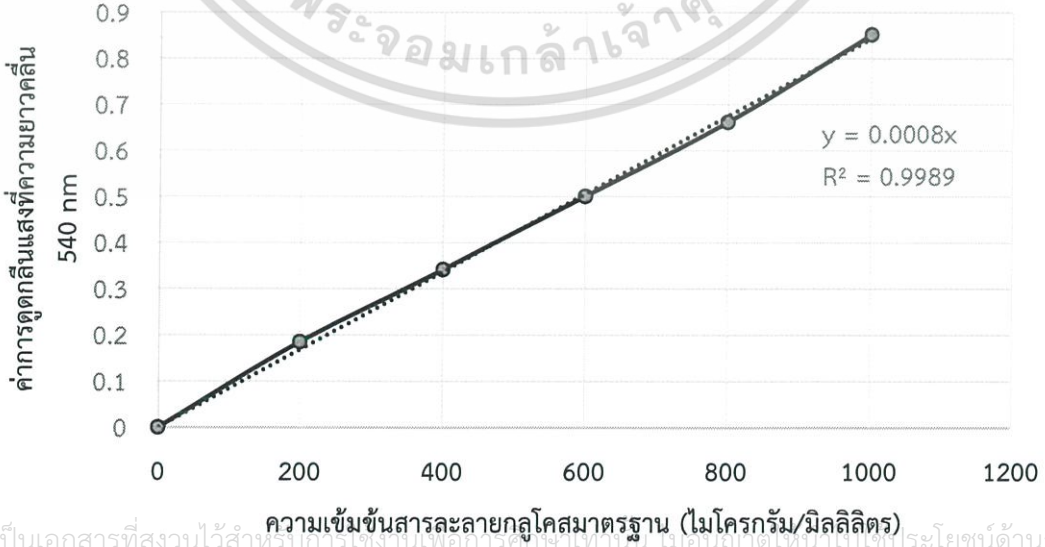
2. หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

2.1.นำตัวอย่างมาทำการเจือจางให้เหมาะสม

2.2.ทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เช่นเดียวกับการทำกราฟมาตรฐาน

สูตรคำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

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



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ข-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสวัดโดยวิธีดีเอ็นเอสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

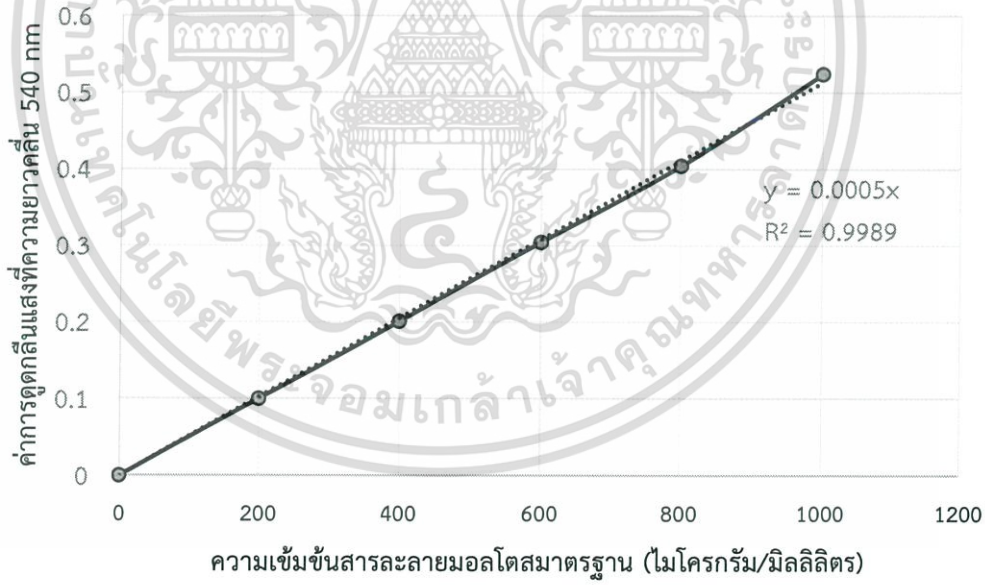
2.วิธีวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสโดยวิธี 3,5-Dinitrosalicylic acid (Bernfeld,1955)

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายแป้ง 1 เปอร์เซ็นต์ (1% soluble starch) ละลายแป้ง 1.0 กรัม ในน้ำกลั่นด้วยไฟอ่อนจนแป้งละลาย ปรับปริมาตรเป็น 100.0 มิลลิลิตร
2. อะซิเตรต บัฟเฟอร์ 0.1 พีเอชเท่ากับ 5.0
3. สารละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNS)

   ละลาย 3,5-Dinitrosalicylic acid 1.0 กรัม และโพแทสเซียมโซเดียมตาเทรต ($COOK(CHOH)_2$ $COONa•4H_2O$) 300.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 2.0 โมลาร์ ปริมาตร 200.0 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน ปรับปริมาตรเป็น 1.0 ลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บสารละลายในขวดสีชาหรือขวดทึบแสง
4. สารละลายมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส

   ละลายน้ำตาลมอลโตส 0.1 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100มิลลิลิตร ด้วยฟลาสก์ปรับปริมาตร สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ ข-2 กราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตสวัดโดยวิธีดีเอ็นเอสที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. เอนไซม์อะไมเลส

วิธีการเตรียมเอนไซม์อะไมเลส

5.1 ใส่สารละลายอะไมเส (ที่มีความเจือจางเหมาะสม) 1.0 มิลลิลิตร และอะซิเตรดบัฟเฟอร์ พีเอช 5.0 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองทุกหลอด บ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที

5.2 เติมน้ำแป้งที่อุ่นอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายเอนไซม์ หลอดละ 1.0 มิลลิลิตร ผสมสารละลายให้เข้ากันทันที นำไปบ่มในอ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.3 หยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ โดยนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที

5.4 นำสารละลายเอนไซม์ 0.5 มิลลิตร ใส่ลงในหลอดทดสอบที่มีสารละลาย DNS 5.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทอสอบที่มีสารละลาย DNS 5.0 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำทุกหลอดไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้เย็นทันที

5.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ จากกราฟมาตรฐาน

5.6 ทำหลอดควบคุม (control) ทำเช่นเดียวกันแต่นำสารละลายเอนไซม์ต้ม 5 นาที ก่อนใส่น้ำแป้งและบัฟเฟอร์ ทำแบลงค์(blank) โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายเอนไซม์

5.7 ทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลมอลโตส นำสารละลายน้ำตาลมอลโตสความเข้มข้น 0, 100, 200, 400, 600, 800, และ 1000 ไมโครโมลต่อมิลลิลิตร ทำการวิเคราะห์ตามวิธีในข้อ 5.4-5.5 เขียนกราฟระหว่างค่าการดูดกลืนแสงและความเข้มข้นของน้ำตาลมอลโตส

5.8 คำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส

$$\text{กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง} \times \text{ปริมาตรทั้งหมด} \times \text{ความเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน} \times \text{เวลา}}$$

หมายเหตุ : 1 หน่วยของเอนไซม์อะไมเลส หมายถึง ปริมาณของเอนไซม์ที่สามารถย่อยสลายสับสเทรตและได้น้ำตาลมอลโตส 1 ไมโครโมล ภายในเวลา 1 นาที ภายใต้สภาวะที่กำหนด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีการใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (สุวภัทร และคณะ, 2555)

1. วิธีเตรียมกราฟมาตรฐานเอทานอล

1.1 เตรียมสารละลายาตรฐานโพรพานอล (N-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร เป็นสารละลายมาตรฐาน

1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 8 10 12 16 และ 24 โดยปริมาตร

1.3 ใส่สารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นในขวดแก้วขนาด 2 มิลลิลิตร พร้อมปิดฝาขวด

1.4 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลใช้เทคนิค แก๊สโครมาโตกราฟี (GC) โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (GC-2014, Shimadzu) ต่อกับ Auto Injector (AOC-20i)

1.5 ใช้คอลัมน์ DB-1 (Agilent J&W GC Column) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิลิตร ความหนาของฟิล์ม 5 ไมครอน อุณหภูมิคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ใช้ตัวตรวจดู (Detector) ชนิด FID โดยปรับอุณหภูมิเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส Sampling rate เท่ากับ 40 มิลลิวินาที อุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (Injector) เท่ากับ 150 องศาเซลเซียส ใช้แก๊สฮีเลียมเป็นแก๊สตัวพา เลือกโหมด Linear Velocity

1.6 สภาวะในการวิเคราะห์เริ่มจากอุณหภูมิ 690 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นอุณหภูมิจะเพิ่มในอัตรา 20 องศาเซลเซียส จนถึง 150 องศาเซลเซียส รวมเวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 5.5 นาทีต่อตัวอย่าง โครมาโตรกราฟีจะแสดงเวลาที่เอทานอลและโพรพานอลถูกชะออกจากคอลัมน์

1.7 นำพื้นที่ใต้กราฟ (Peal Area) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยคำนวณอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อโพรพานอลในแต่ละความเข้มข้นซึ่งกำหนดให้เป็นแกน y และความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอลเป็นแกน x

2. วิธีวิเคราะห์เอทานอลในตัวอย่าง

2.1 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างโดยผสม สารละลายโพรพานอลร้อยละ 10 โดยปริมาตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร

2.2 วิเคราะห์ดังสภาวะข้างต้น จากนั้นนำเอาอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลในสารตัวอย่างต่อโพรพานอลมาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรคำนวณปริมาณเอทานอล ได้จากกราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอล

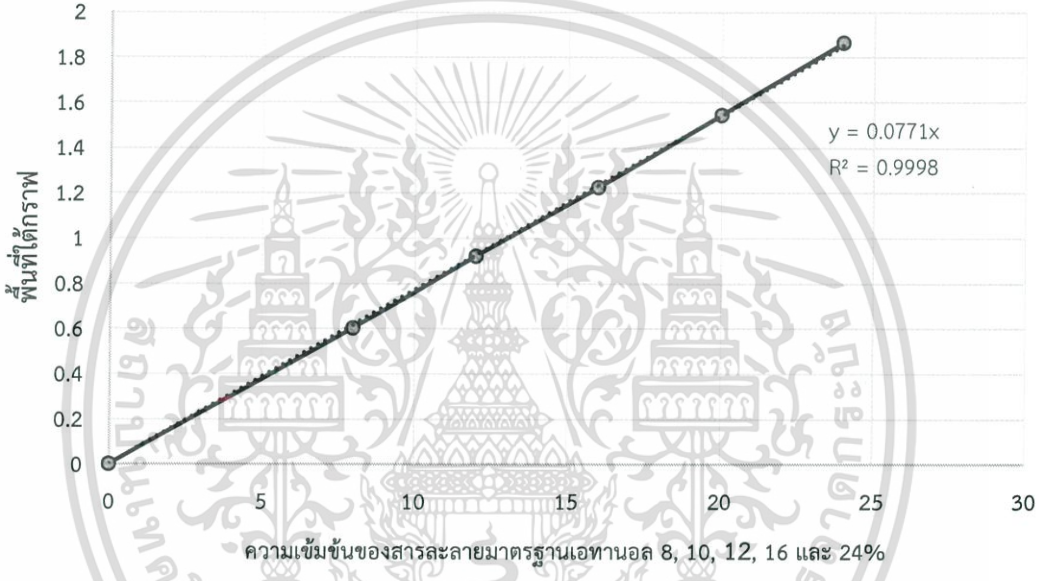
สมการ $y = 0.0007x$

ให้ y = อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟเอทานอลต่อโพรพานอล

x = ความเข้มข้นของเอทานอล (ร้อยละ)

โดย ความหนาแน่นของเอทานอล = 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร

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



รูปที่ ข-3 กราฟสารละลายมาตรฐานเอทานอลวัดโดยเครื่องโครมาโตกราฟี

3. วิธีการวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่อง Gas Chromatography

3.1 เปิด air-pump และคลายเกลียวใต้ปั๊มเพื่อไล่น้ำออกจากปั๊มให้หมด แล้วจึงบิดเกลียวให้แน่นดังเดิม

3.2 เปิดเครื่อง Zero air

3.3 จากนั้นเปิดวาวส์ที่ถังแก๊สฮีเลียม ไฮโดรเจน และไนโตรเจน

3.4 เปิดเครื่องคอมพิวเตอร์และทำการตั้งค่าการใช้งาน

3.5 เปิดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี และตั้งค่าบนคอมพิวเตอร์อีกครั้ง

3.5.1 เปิดโปรแกรม Lab solution กด instrument แล้วเลือกเครื่อง GC

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 กดแถบ Data acquisition แล้วกดเปิด method ที่ทำการตั้งค่าไว้ตามที่กำหนดแล้วสร้าง method ใหม่ ด้วยการเลือก New method file จากนั้นกด Download

3.5.3 ตั้งค่า Set up ที่เครื่อง GC ให้อุณหภูมิที่คอลัมน์อยู่ที่ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อทำการไล่สารที่ไม่ต้องการออก จากนั้นปรับกลับไปที่ 60 องศาเซลเซียส

3.5.4 คลิก System on รอให้แถบสถานะขึ้น Ready และตรวจสอบสถานะของ Carrier Gas, Purge Flow, DFID 1 Detector และ DFID 1 Flame เป็น on ทั้งหมด

3.6 สร้างตารางวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.6.1 คลิกแถบ Realtime batch กด file แล้วเลือก new batch table (Auto Create Name) กด ok

3.6.2 ใส่ตัวเลขขวดตัวอย่าง ชื่อของตัวอย่าง Sample ID แล้วเลือก Method File ที่ใช้ในการวิเคราะห์

3.6.3 Save Batch File As ไว้ใน folder ที่ต้องการ

3.6.4 กดปุ่ม Star Realtime Batch เพื่อเริ่มทำการวิเคราะห์ตัวอย่าง

3.6.5 วิเคราะห์

4. วิธีปิดเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

4.1 คลิก System Off

4.2 ปิดวาวส์ ก๊าซไฮโดรเจน air pump และ zero air

4.3 รอให้อุณหภูมิของ column ต่ำกว่า 40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของ Auto Injector และ Detector ต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส

4.4 ปิดวาวส์ก๊าซฮีเลียม และไนโตรเจน

4.5 ปิดโปรแกรม ปิดคอมพิวเตอร์ และปิดเครื่อง Gas Chromatography

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ข้อมูลดิบ

1.ผลการทดลองการปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จากการศึกษาการย่อยสลายผงมันสำปะหลัง เปรียบเทียบการใช้เอนไซม์ ACCELLEASRE 1500

ชุดการทดลองที่ 1 : ไม่เติมเอนไซม์ ACCELLERASE

ชุดการทดลองที่ 2 : เติมเอนไซม์ ACCELLERASE

ตารางที่ ค-1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) จากการย่อยสลายผงมันสำปะหลัง

ชุดการทดลอง	ครั้งที่	ค่าการดูดกลืนแสง 540 นาโนเมตร			ระดับความเจือจาง	ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย		
1	1	0.256	0.224	0.240	100x	30.00
	2	0.254	0.254	0.254	100x	31.75
	3	0.254	0.257	0.256	100x	32.00
2	1	0.328	0.325	0.327	100x	40.88
	2	0.267	0.311	0.289	100x	36.13
	3	0.270	0.250	0.260	100x	32.50

2. ผลการทดลองแสดงความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ของการผลิตไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังทั้ง 4 สภาวะ เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF และ SHF

สภาวะการทดลอง ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 1 : เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 2 : *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

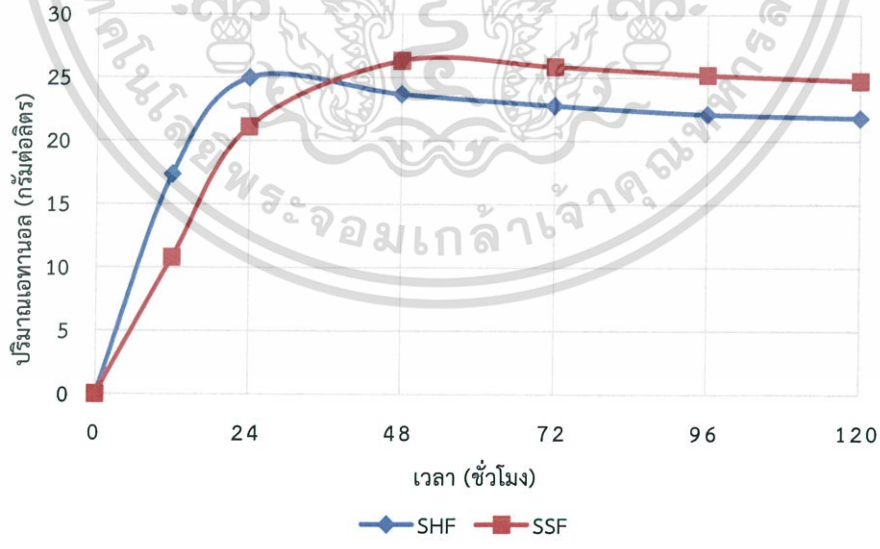
ชุดการทดลองที่ 3 : *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

ชุดการทดลองที่ 4 : *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-2 ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการทดลอง	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	SHF	0	0	0	0
	SSF	0	0	0	0
12	SHF	17.5199	17.2690	17.2704	17.3531
	SSF	10.1424	11.9105	10.3010	10.7846
24	SHF	24.5287	25.3355	25.1070	24.9904
	SSF	20.9076	21.3939	21.0014	21.1010
48	SHF	24.2824	23.3076	23.4876	23.6925
	SSF	26.0265	26.7470	26.1716	26.3150
72	SHF	22.3232	22.8633	23.1716	22.7860
	SSF	25.8522	25.6719	26.0324	25.8525
96	SHF	22.0101	22.1619	22.2099	22.1273
	SSF	25.1202	25.4998	25.0377	25.2192
120	SHF	22.0741	21.6977	21.7500	21.8406
	SSF	24.5736	24.9383	24.8027	24.7715

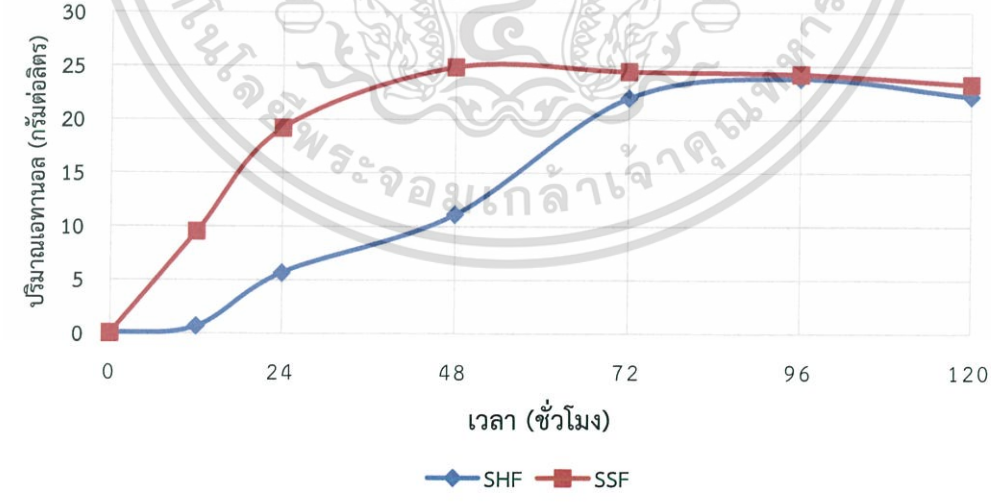


รูปที่ ค-1 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-3 ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการทดลอง	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	SHF	0	0	0	0
	SSF	0	0	0	0
12	SHF	0.5213	0.4625	0.8626	0.6155
	SSF	7.8984	8.2959	9.0975	8.4306
24	SHF	6.5819	6.5303	6.1695	6.4272
	SSF	17.2744	20.0107	19.1590	18.8147
48	SHF	11.9359	11.8130	11.1842	11.6444
	SSF	24.3852	25.0479	24.2751	24.6484
72	SHF	22.4573	23.1857	20.3106	21.9845
	SSF	23.7268	24.7941	25.4244	24.5694
96	SHF	24.1448	22.4295	22.1361	22.9035
	SSF	23.9931	24.2554	25.0800	24.4428
120	SHF	21.8113	21.6349	21.2192	21.5551
	SSF	23.5885	21.6770	23.8475	23.0376

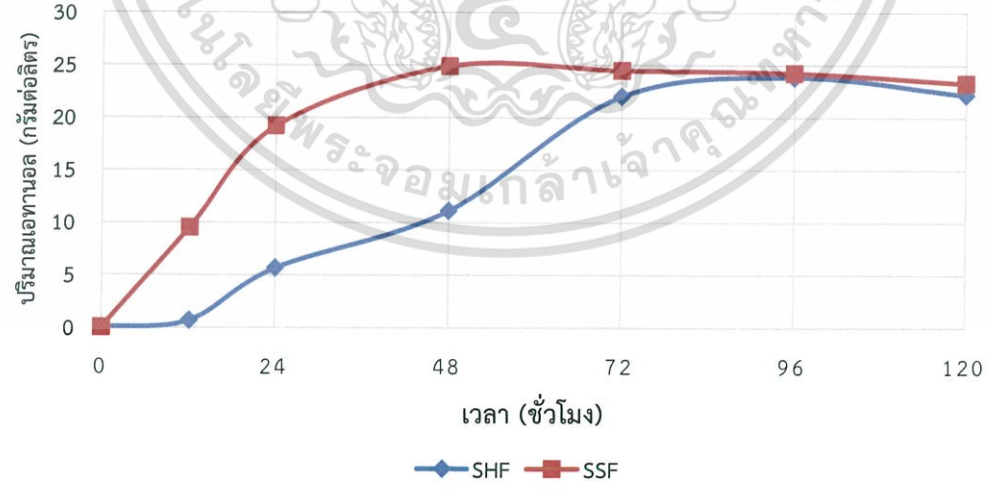


รูปที่ ค-2 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-4 ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการทดลอง	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	SHF	0	0	0	0
	SSF	0	0	0	0
12	SHF	2.8732	0.9447	2.7015	2.1731
	SSF	8.9464	9.2825	9.6313	9.2867
24	SHF	3.5236	4.4213	5.5117	4.4855
	SSF	21.0758	20.2618	18.7811	20.0396
48	SHF	7.9891	8.2775	7.8156	8.0274
	SSF	25.2664	23.7897	25.5693	25.2742
72	SHF	22.1547	20.3873	22.3444	21.6288
	SSF	25.5074	24.2892	24.9756	24.9240
96	SHF	24.6120	25.5609	25.9480	25.3736
	SSF	24.2052	24.4529	24.5019	24.3867
120	SHF	23.5623	23.8798	23.9450	23.7957
	SSF	23.5258	23.4349	23.7974	23.5861

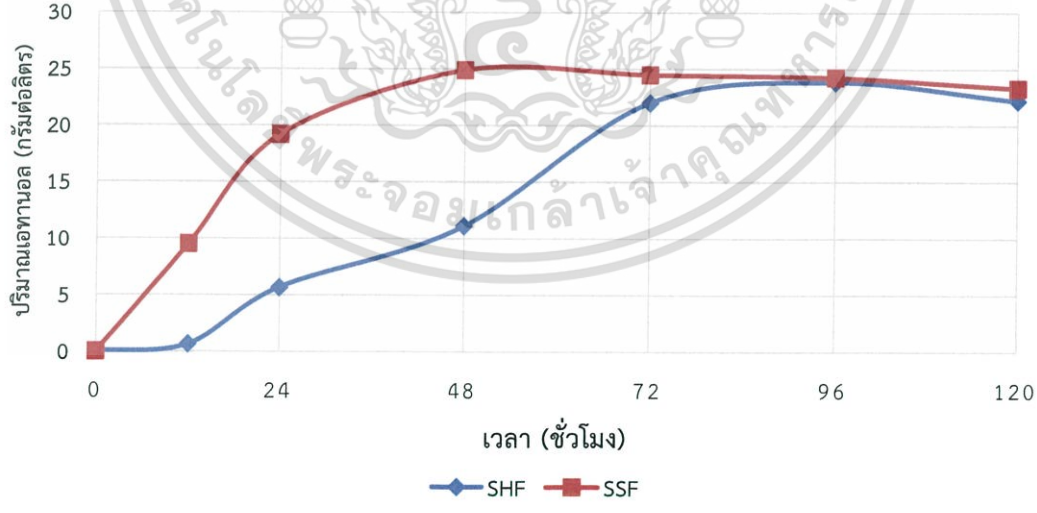


รูปที่ ค-3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-5 ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการทดลอง	ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	SHF	0	0	0	0
	SSF	0	0	0	0
12	SHF	0.4544	0.5706	0.9479	0.6576
	SSF	10.8000	8.5194	9.1820	9.5005
24	SHF	5.4255	5.7643	5.7991	5.6630
	SSF	18.9272	18.0229	20.5796	19.1766
48	SHF	11.2583	10.4361	11.6202	11.1049
	SSF	25.2672	24.9354	25.6200	24.8751
72	SHF	21.7367	21.8431	22.4305	22.0034
	SSF	23.9786	24.9553	24.5283	24.4874
96	SHF	24.3188	23.9464	23.2205	23.8286
	SSF	23.6759	24.6944	24.3462	24.2388
120	SHF	22.3104	22.2453	21.9921	22.1826
	SSF	22.5864	23.3698	23.9366	23.2976



รูปที่ ค-4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร) กับเวลา(ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของการผลิตไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังทั้ง 4 ชุดการทดลอง เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF และ SHF

ตารางที่ ค-6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

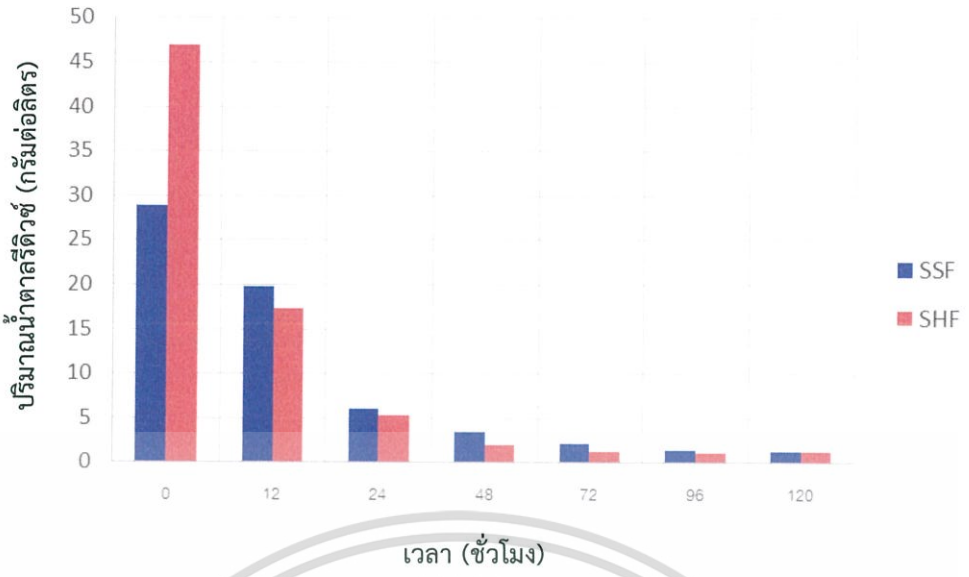
เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการหมัก	ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm			ระดับความเจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (g/l)	ความเข้มข้นน้ำตาลเฉลี่ย (g/l)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย			
0	SSF1	0.273	0.220	0.247	100x	30.8750	28.9583
	SSF2	0.207	0.203	0.205	100x	25.6250	
	SSF3	0.239	0.246	0.243	100x	30.3750	
	SHF1	0.362	0.350	0356	100x	44.5000	46.9167
	SHF2	0.392	0.370	0.381	100x	47.6250	
	SHF3	0.382	0.396	0.389	100x	48.6250	
12	SSF1	0.372	0.337	0.355	50x	22.1875	19.8333
	SSF2	0.287	0.305	0.296	50x	18.5000	
	SSF3	0.307	0.295	0.301	50x	18.8125	
	SHF1	0.307	0.355	0.331	50x	20.6875	17.3125
	SHF2	0.244	0.259	0.252	50x	15.7500	
	SHF3	0.333	0.330	0.332	50x	20.7500	
24	SSF1	0.492	0.517	0.505	10x	6.3125	6.0083
	SSF2	0.437	0.427	0.432	10x	5.4000	
	SSF3	0.494	0.516	0.505	10x	6.3125	
	SHF1	0.418	0.419	0.419	10x	5.2375	5.3542
	SHF2	0.439	0.388	0.464	10x	5.8000	
	SHF3	0.408	0.395	0.402	10x	5.0250	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

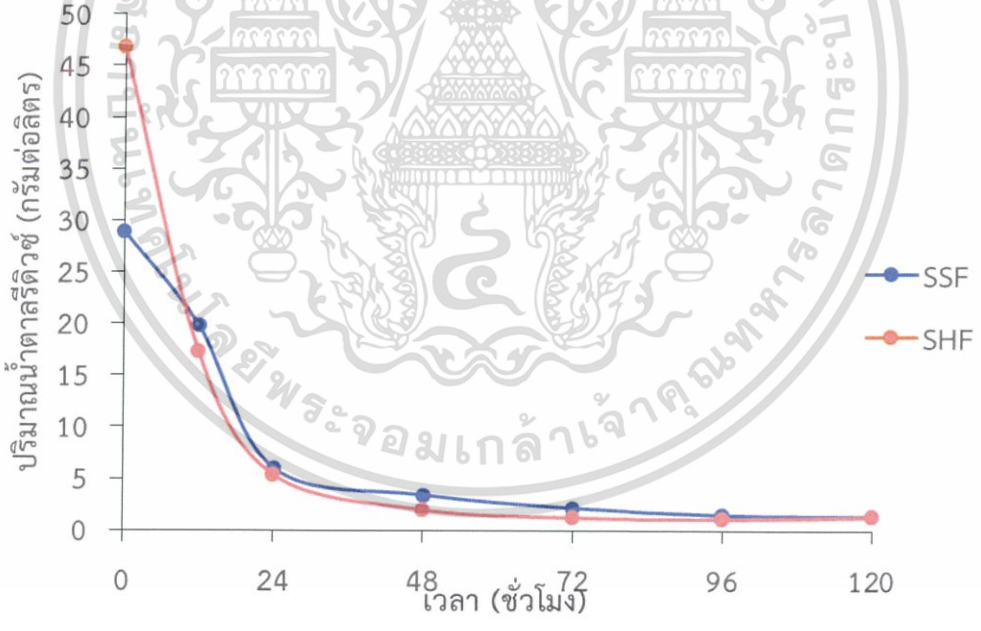
ตารางที่ ค-6 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการหมัก	ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm			ระดับความเจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (g/l)	ความเข้มข้นน้ำตาลเฉลี่ย (g/l)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย			
48	SSF1	0.550	0.579	0.565	5x	3.5313	3.4375
	SSF2	0.494	0.549	0.522	5x	3.2625	
	SSF3	0.535	0.591	0.563	5x	3.5188	
	SHF1	0.287	0.336	0.312	5x	1.9500	1.9938
	SHF2	0.313	0.334	0.323	5x	2.0188	
	SHF3	0.316	0.307	0.322	5x	2.0125	
72	SSF1	0.630	0.602	0.616	3x	2.3100	2.1738
	SSF2	0.548	0.545	0.547	3x	2.0513	
	SSF3	0.584	0.567	0.576	3x	2.1600	
	SHF1	0.493	0.477	0.485	2x	1.2125	1.2317
	SHF2	0.512	0.499	0.506	2x	1.2650	
	SHF3	0.482	0.492	0.487	2x	1.2175	
96	SSF1	0.656	0.575	0.616	2x	1.5400	1.4975
	SSF2	0. 549	0. 614	0.582	2x	1.4550	
	SSF3	0. 594	0. 604	0.599	2x	1.4975	
	SHF1	0. 427	0. 442	0.435	2x	1.0875	1.0825
	SHF2	0. 440	0. 427	0.434	2x	1.0850	
	SHF3	0. 426	0. 434	0.430	2x	1.0750	
120	SSF1	0.605	0. 613	0.609	2x	1.5225	1.3600
	SSF2	0. 546	0. 490	0.518	2x	1.2950	
	SSF3	0. 515	0. 495	0.505	2x	1.2625	
	SHF1	0. 539	0. 558	0.549	2x	1.3725	1.2950
	SHF2	0. 509	0. 523	0.516	2x	1.2900	
	SHF3	0. 477	0. 500	0.489	2x	1.2225	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-5 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF



รูปที่ ค-6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้า ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

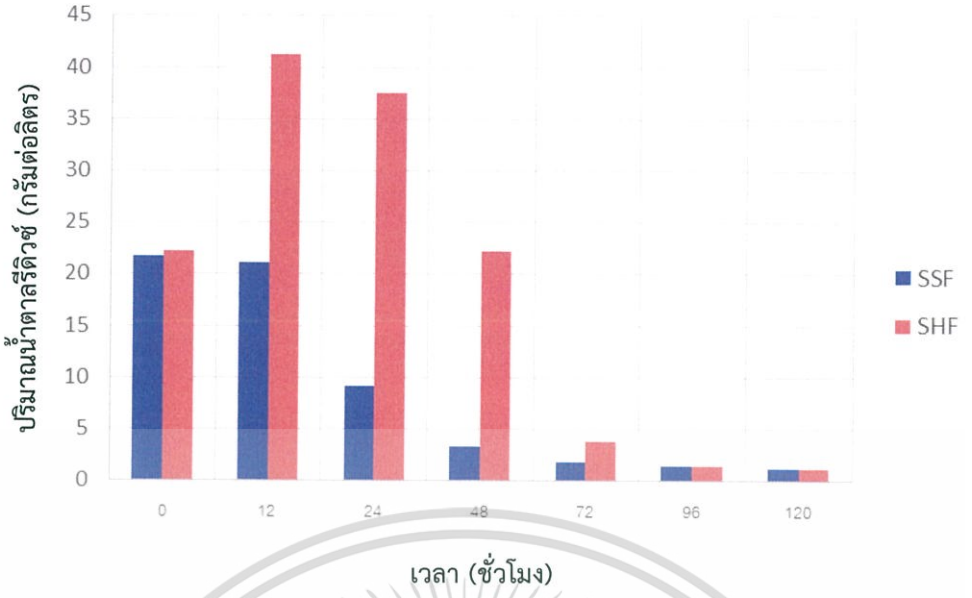
เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการหมัก	ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm			ระดับความเจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (g/l)	ความเข้มข้นน้ำตาลเฉลี่ย (g/l)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย			
0	SSF1	0.333	0.375	0.354	50x	22.1250	21.6667
	SSF2	0.365	0.339	0.352	50x	22.0000	
	SSF3	0.340	0.327	0.334	50x	20.8750	
	SHF1	0.301	0.491	0.396	50x	24.7500	22.2292
	SHF2	0.343	0.336	0.340	50x	21.2500	
	SHF3	0.337	0.324	0.331	50x	20.6875	
12	SSF1	0.542	0.536	0.539	30x	20.2125	21.0750
	SSF2	0.601	0.539	0.570	30x	21.3750	
	SSF3	0.586	0.567	0.577	30x	21.6375	
	SHF1	0.668	0.725	0.697	50x	43.5625	41.2083
	SHF2	0.654	0.658	0.656	50x	41.0000	
	SHF3	0.622	0.627	0.625	50x	39.0625	
24	SSF1	0.372	0.365	0.369	20x	9.2250	9.1833
	SSF2	0.370	0.366	0.368	20x	9.2000	
	SSF3	0.359	0.371	0.365	20x	9.1250	
	SHF1	0.424	0.509	0.467	70x	40.8625	37.5083
	SHF2	0.411	0.423	0.417	70x	36.4875	
	SHF3	0.396	0.408	0.402	70x	35.1750	
48	SSF1	0.217	0.336	0.277	10x	3.4625	3.3333
	SSF2	0.253	0.272	0.263	10x	3.2875	
	SSF3	0.251	0.268	0.260	10x	3.2500	
	SHF1	0.281	0.335	0.308	70x	26.9500	22.1667
	SHF2	0.244	0.220	0.232	70x	20.3000	
	SHF3	0.207	0.223	0.220	70x	19.2500	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

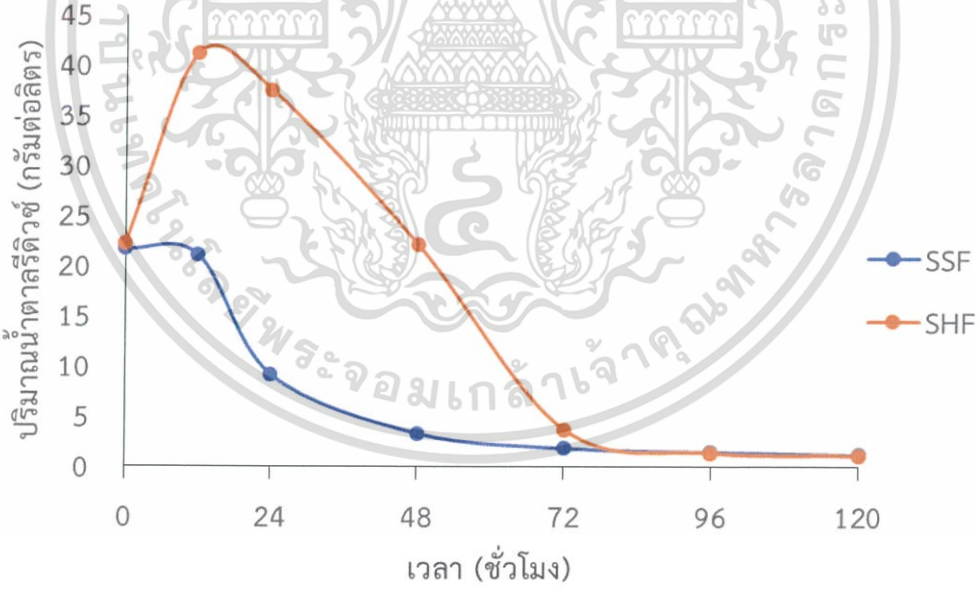
ตารางที่ ค-7 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการหมัก	ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm			ระดับความเจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (g/l)	ความเข้มข้นน้ำตาลเฉลี่ย (g/l)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย			
72	SSF1	0.288	0.320	0.304	5x	1.9000	1.8521
	SSF2	0.298	0.295	0.297	5x	1.8563	
	SSF3	0.288	0.287	0.288	5x	1.8000	
	SHF1	0.260	0.253	0.257	10x	3.2125	3.7458
	SHF2	0.273	0.282	0.278	10x	3.4750	
	SHF3	0.372	0.355	0.364	10x	4.5500	
96	SSF1	0.349	0.389	0.369	3x	1.3838	1.4838
	SSF2	0.369	0.381	0.375	3x	1.4063	
	SSF3	0.356	0.529	0.443	3x	1.6613	
	SHF1	0.266	0.219	0.243	5x	1.5188	1.4021
	SHF2	0.211	0.221	0.216	5x	1.3500	
	SHF3	0.213	0.215	0.214	5x	1.3375	
120	SSF1	0.481	0.518	0.500	2x	1.2500	1.2067
	SSF2	0. 466	0. 472	0.469	2x	1.1725	
	SSF3	0. 484	0. 473	0.479	2x	1.1975	
	SHF1	0. 426	0. 393	0. 410	2x	1.0250	1.1592
	SHF2	0. 502	0. 532	0.517	2x	1.2925	
	SHF3	0. 472	0. 456	0.464	2x	1.1600	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF



รูปที่ ค-8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-8 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

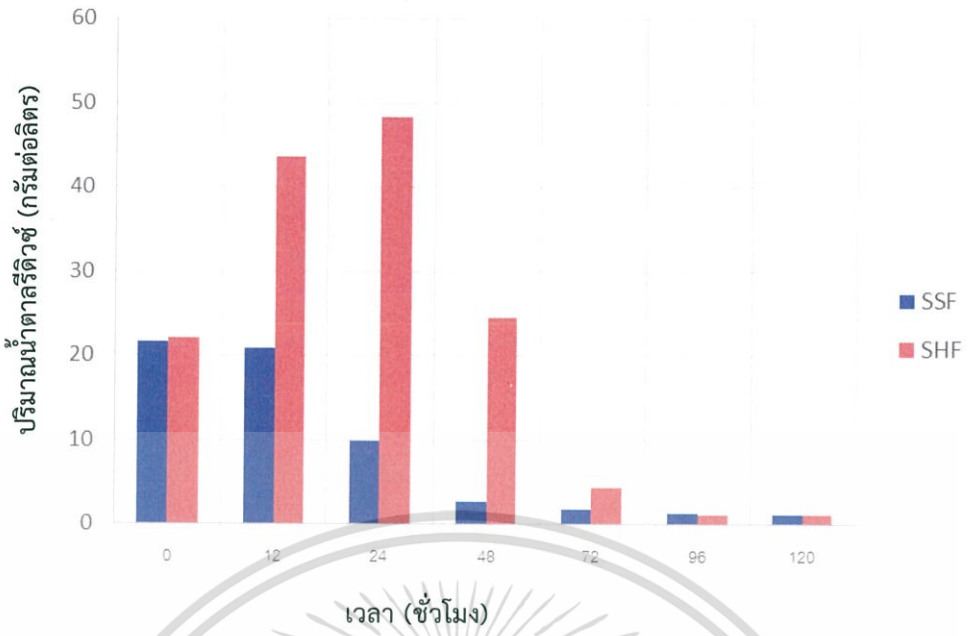
เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการหมัก	ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm			ระดับความเจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (g/l)	ความเข้มข้นน้ำตาลเฉลี่ย (g/l)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย			
0	SSF1	0.331	0.367	0.349	50x	21.8125	21.6667
	SSF2	0.342	0.306	0.324	50x	20.2500	
	SSF3	0.363	0.371	0.367	50x	22.9375	
	SHF1	0.372	0.355	0.364	50x	22.7500	22.1042
	SHF2	0.362	0.368	0.365	50x	22.8125	
	SHF3	0.333	0.330	0.332	50x	20.7500	
12	SSF1	0.555	0.564	0.560	30x	21.0000	20.8500
	SSF2	0.538	0.591	0.565	30x	21.1875	
	SSF3	0.543	0.542	0.543	30x	20.3625	
	SHF1	0.651	0.766	0.709	50x	44.3125	43.5833
	SHF2	0.707	0.690	0.699	50x	43.6875	
	SHF3	0.682	0.686	0.684	50x	42.7500	
24	SSF1	0.435	0.396	0.416	20x	10.4000	9.9667
	SSF2	0.370	0.397	0.384	20x	9.6000	
	SSF3	0.392	0.400	0.396	20x	9.9000	
	SHF1	0.580	0.660	0.620	70x	54.2500	48.3583
	SHF2	0.520	0.520	0.520	70x	45.5000	
	SHF3	0.510	0.525	0.518	70x	45.3250	
48	SSF1	0.203	0.209	0.206	10x	2.5750	2.7833
	SSF2	0.204	0.275	0.240	10x	3.0000	
	SSF3	0.209	0.234	0.222	10x	2.7750	
	SHF1	0.218	0.222	0.220	90x	24.7500	24.4875
	SHF2	0.218	0.216	0.217	90x	24.4125	
	SHF3	0.207	0.225	0.216	90x	24.3000	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

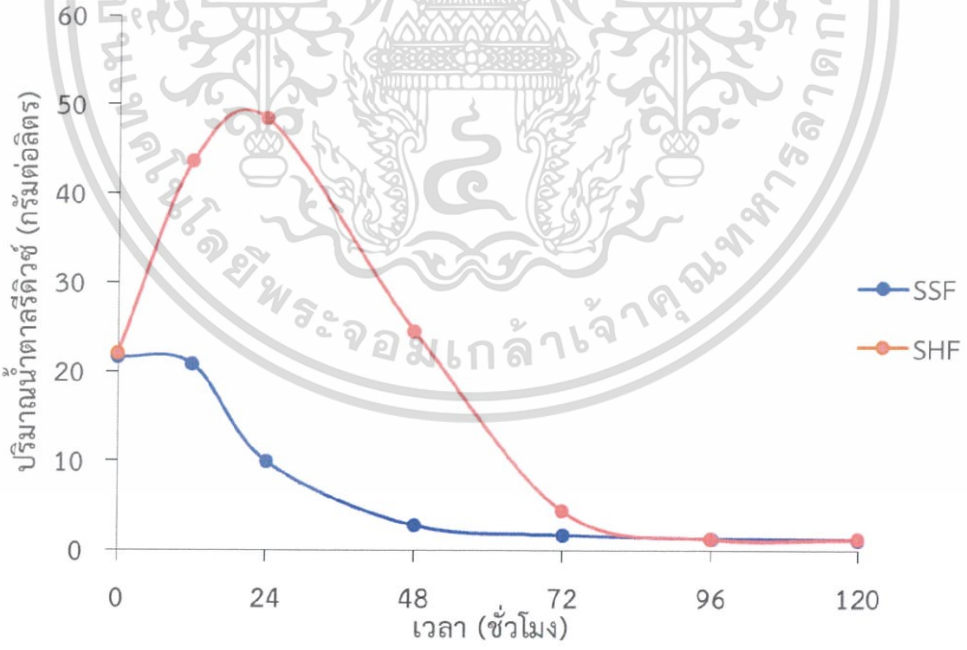
ตารางที่ ค-8 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการหมัก	ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm			ระดับความเจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (g/l)	ความเข้มข้นน้ำตาลเฉลี่ย (g/l)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย			
72	SSF1	0.284	0.325	0.305	5x	1.9063	1.2611
	SSF2	0.258	0.289	0.274	5x	1.7125	
	SSF3	0.265	0.260	0. 263	5x	1.6438	
	SHF1	0.314	0.335	0. 325	10x	4.0625	4.4167
	SHF2	0.331	0.383	0. 357	10x	4. 4625	
	SHF3	0.370	0.386	0. 378	10x	4.7250	
96	SSF1	0.394	0.334	0.364	3x	1.3650	1.3663
	SSF2	0.401	0. 357	0.379	3x	1.4213	
	SSF3	0.340	0. 360	0.350	3x	1.3125	
	SHF1	0.317	0. 343	0.330	3x	1.2375	1.2550
	SHF2	0. 336	0. 334	0.335	3x	1.2563	
	SHF3	0. 367	0. 310	0.339	3x	1.2713	
120	SSF1	0.482	0.542	0.512	2x	1.2800	1.2225
	SSF2	0. 445	0. 494	0.470	2x	1.1750	
	SSF3	0. 498	0. 472	0.485	2x	1.2125	
	SHF1	0. 484	0. 485	0. 485	2x	1.2125	1.2217
	SHF2	0. 502	0. 506	0.504	2x	1.2600	
	SHF3	0. 476	0. 478	0. 477	2x	1.1925	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF



รูปที่ ค-10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-9 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

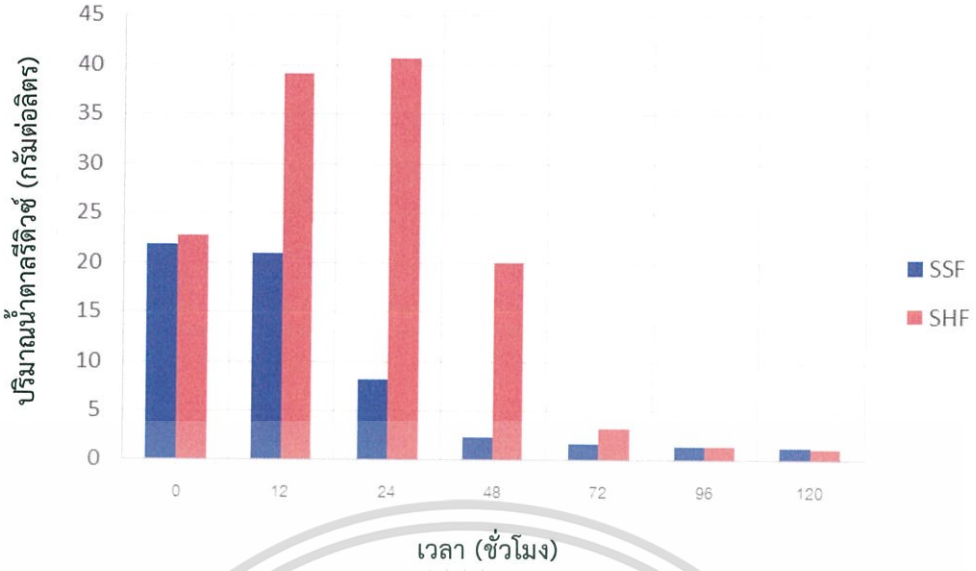
เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการหมัก	ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm			ระดับความเจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (g/l)	ความเข้มข้นน้ำตาลเฉลี่ย (g/l)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย			
0	SSF1	0.341	0.355	0.348	50x	21.7500	21.8958
	SSF2	0.359	0.353	0.356	50x	22.2500	
	SSF3	0.342	0.351	0.347	50x	21.6875	
	SHF1	0.362	0.330	0.346	50x	21.6250	22.7292
	SHF2	0.450	0.324	0.387	50x	24.1875	
	SHF3	0.368	0.347	0.358	50x	22.3750	
12	SSF1	0.609	0.629	0.619	30x	23.2125	20.9250
	SSF2	0.519	0.537	0.528	30x	19.8000	
	SSF3	0.523	0.530	0.527	30x	19.7625	
	SHF1	0.624	0.651	0.638	50x	39.8750	39.1667
	SHF2	0.628	0.637	0.633	50x	39.5625	
	SHF3	0.575	0.643	0.609	50x	38.0625	
24	SSF1	0.341	0.361	0.351	20x	8.7750	8.2333
	SSF2	0.305	0.299	0.302	20x	7.5500	
	SSF3	0.394	0.275	0.335	20x	8.3750	
	SHF1	0.538	0.499	0.519	70x	45.4125	40.6875
	SHF2	0.440	0.446	0.443	70x	38.7625	
	SHF3	0.453	0.433	0.433	70x	37.8875	
48	SSF1	0.289	0.364	0.327	7x	2.8613	2.3742
	SSF2	0.240	0.237	0.239	7x	2.0913	
	SSF3	0.251	0.244	0.248	7x	2.1700	
	SHF1	0.214	0.282	0.248	70x	21.7000	19.9792
	SHF2	0.220	0.239	0.230	70x	20.1250	
	SHF3	0.204	0.210	0.207	70x	18.1125	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

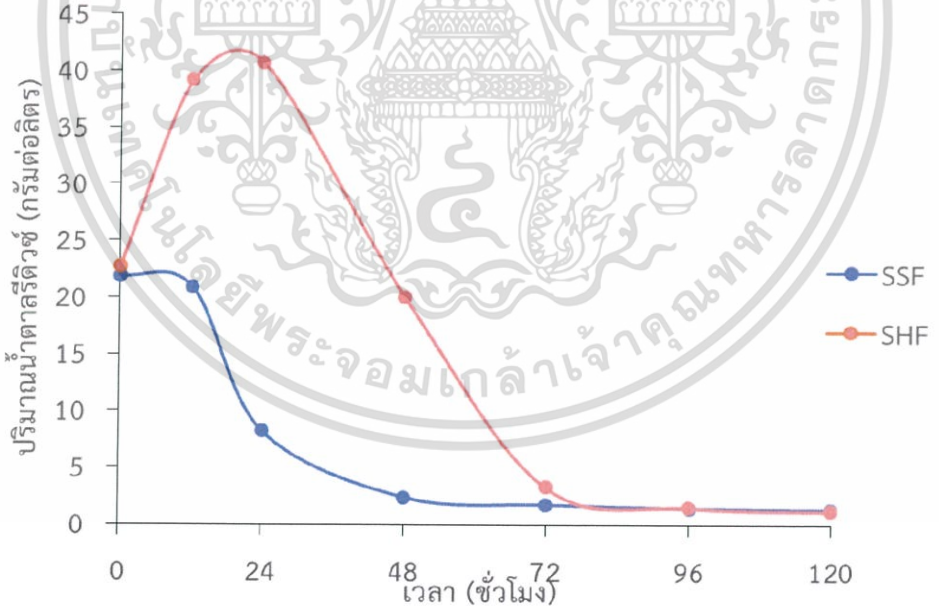
ตารางที่ ค-9 (ต่อ) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการหมัก	ค่าการดูดกลืนแสง 540 nm			ระดับความเจือจาง	ความเข้มข้นน้ำตาล (g/l)	ความเข้มข้นน้ำตาลเฉลี่ย (g/l)
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ค่าเฉลี่ย			
72	SSF1	0.441	0.484	0.463	3x	1.7363	1.7400
	SSF2	0.482	0.472	0.477	3x	1.7888	
	SSF3	0.453	0.451	0.452	3x	1.6950	
	SHF1	0.253	0.257	0.255	10x	3.1875	3.2292
	SHF2	0.297	0.267	0.282	10x	3.5250	
	SHF3	0.233	0.243	0.238	10x	2.9750	
96	SSF1	0.553	0. 580	0.567	2x	1.4175	1.4325
	SSF2	0. 584	0. 586	0.585	2x	1.4625	
	SSF3	0. 574	0. 559	0.567	2x	1.4175	
	SHF1	0. 226	0. 254	0.240	5x	1.5000	1.4396
	SHF2	0. 218	0. 209	0.214	5x	1.3375	
	SHF3	0. 219	0. 254	0.237	5x	1.4813	
120	SSF1	0.493	0.546	0.520	2x	1.3000	1.3192
	SSF2	0. 527	0. 560	0.545	2x	1.3625	
	SSF3	0. 536	0. 499	0.518	2x	1.2950	
	SHF1	0. 448	0. 502	0.475	2x	1.1875	1.1183
	SHF2	0. 416	0. 415	0.416	2x	1.0400	
	SHF3	0. 443	0. 458	0.451	2x	1.1275	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ค-11 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF



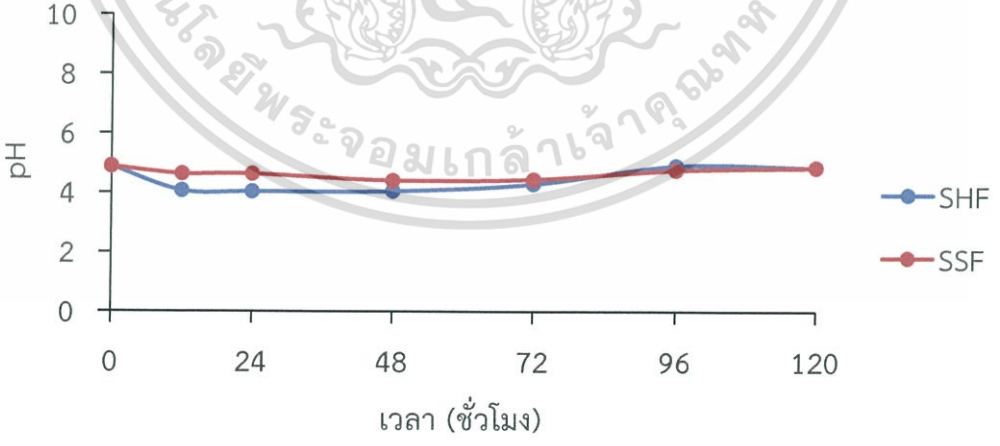
รูปที่ ค-12 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ผลการทดลองแสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของการผลิตไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังทั้ง 4 สภาวะ เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF และ SHF

ตารางที่ ค-10 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดการทดลองที่ 1 เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการทดลอง	พีเอช (pH)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	SHF	4.89	4.88	4.88	4.88
	SSF	4.87	4.87	4.87	4.87
12	SHF	4.09	4.03	4.07	4.06
	SSF	4.65	4.63	4.60	4.63
24	SHF	4.04	4.03	4.02	4.04
	SSF	4.65	4.63	4.60	4.63
48	SHF	4.07	4.05	4.01	4.03
	SSF	4.39	4.41	4.41	4.40
72	SHF	4.30	4.28	4.28	4.29
	SSF	4.46	4.52	4.36	4.45
96	SHF	4.98	4.89	4.86	4.85
	SSF	4.86	4.82	4.58	4.75
120	SHF	4.88	4.83	4.85	4.91
	SSF	4.81	4.82	4.90	4.84

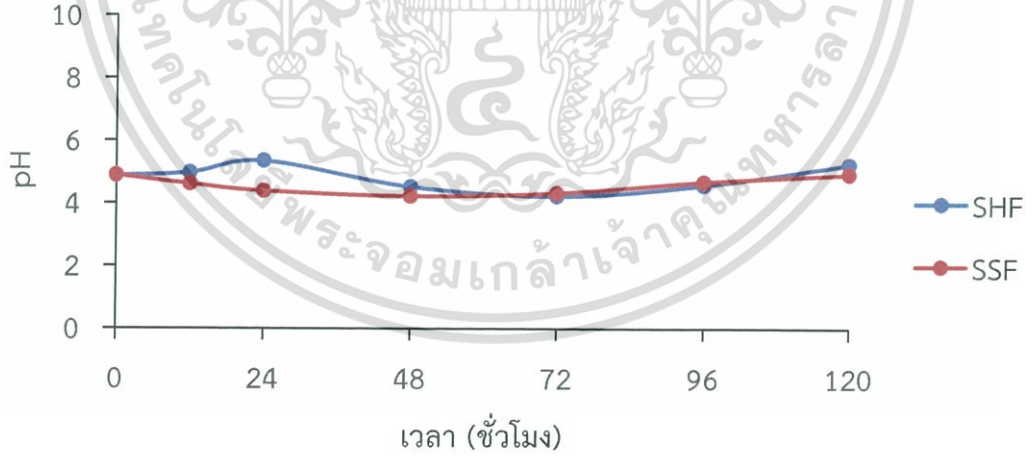


รูปที่ ค-13 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างกับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 1 เอ้นไซม์ทางการค้าร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-11 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการทดลอง	พีเอช (pH)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	SHF	4.92	4.84	4.86	4.97
	SSF	4.87	4.90	4.90	4.89
12	SHF	5.00	5.01	4.90	4.87
	SSF	4.62	4.59	4.62	4.61
24	SHF	5.35	5.34	5.35	4.52
	SSF	4.39	4.37	4.40	4.39
48	SHF	4.61	4.56	4.39	4.35
	SSF	4.24	4.20	4.22	4.22
72	SHF	4.35	4.21	4.20	4.22
	SSF	4.34	4.28	4.35	4.32
96	SHF	4.67	4.52	4.52	4.57
	SSF	4.73	4.53	4.77	4.68
120	SHF	5.48	4.96	5.26	5.23
	SSF	4.82	5.11	4.84	4.92

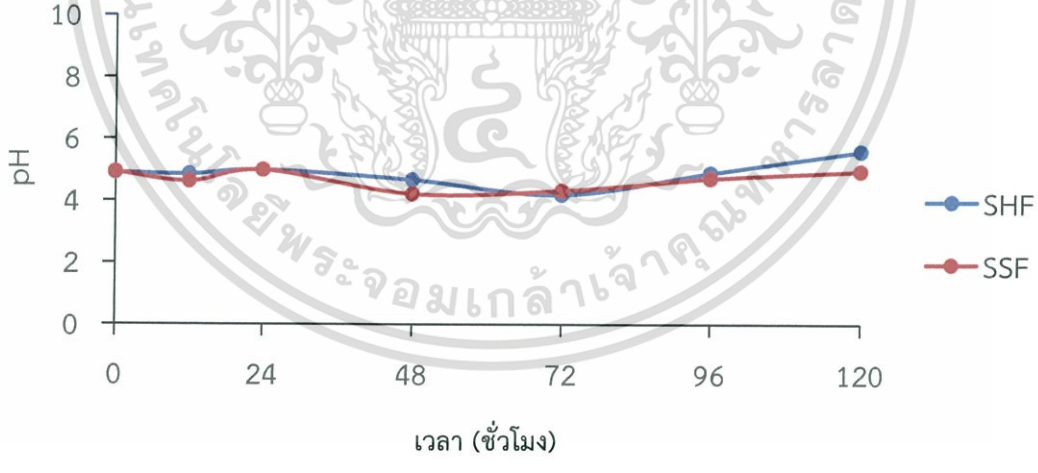


รูปที่ ค-14 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างกับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 2 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-12 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับกระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการทดลอง	พีเอช (pH)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	SHF	4.99	4.91	4.80	4.93
	SSF	4.91	4.99	4.87	5.06
12	SHF	4.85	4.85	4.85	4.88
	SSF	4.64	4.65	4.59	4.62
24	SHF	4.98	4.98	4.99	4.62
	SSF	4.98	4.98	4.99	4.36
48	SHF	4.94	4.39	4.66	4.40
	SSF	4.23	4.21	4.20	4.20
72	SHF	4.18	4.17	4.21	4.23
	SSF	4.35	4.31	4.30	4.33
96	SHF	4.57	4.53	5.59	4.58
	SSF	4.71	4.71	4.73	4.62
120	SHF	5.58	5.49	5.73	5.60
	SSF	4.92	4.97	4.97	4.91

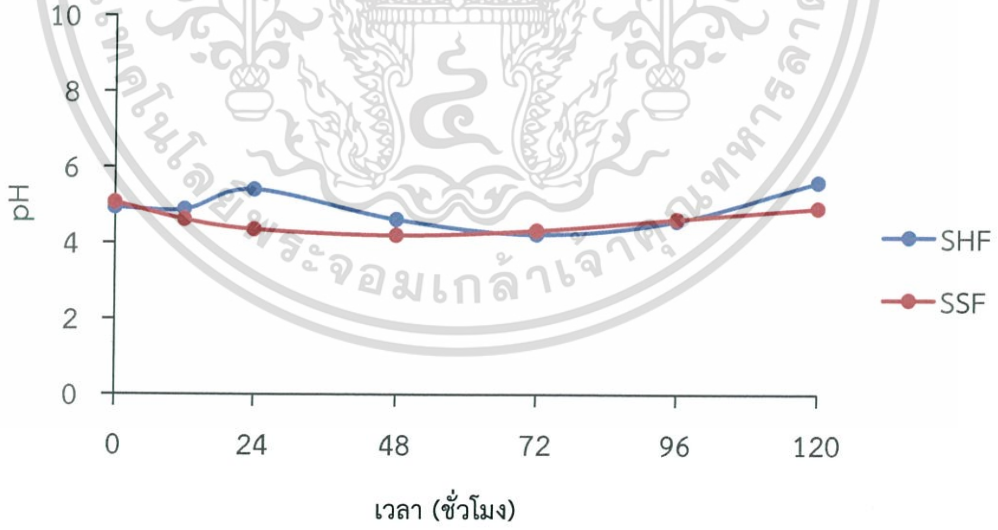


รูปที่ ค-15 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างกับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 3 *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-13 ผลแสดงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 เปรียบเทียบระหว่างกระบวนการ SSF กับ กระบวนการ SHF

เวลา (ชั่วโมง)	กระบวนการทดลอง	พีเอช (pH)			
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ค่าเฉลี่ย
0	SHF	4.99	4.87	4.93	4.98
	SSF	5.10	4.97	5.12	4.98
12	SHF	4.88	4.86	4.90	4.90
	SSF	4.66	4.59	4.60	4.92
24	SHF	5.41	5.41	5.39	4.83
	SSF	4.36	4.35	4.36	4.63
48	SHF	4.60	4.57	4.69	4.66
	SSF	4.20	4.19	4.21	4.21
72	SHF	4.22	4.22	4.24	4.19
	SSF	4.32	4.28	4.38	4.32
96	SHF	4.58	4.60	4.55	4.90
	SSF	4.81	4.34	4.72	4.72
120	SHF	5.46	6.09	5.25	5.60
	SSF	4.89	4.94	4.91	4.95



รูปที่ ค-16 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่างกับเวลา (ชั่วโมง) ของชุดการทดลองที่ 4 *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ทางสถิติ

1.กระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก (SHF)

1.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณเอทานอล

1.1.1 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่ 1 กระบวนการหมักผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ ต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	0.000000	0.0000000	0.0000000	0.000000	0.000000	0.0000	0.0000
12hr	3	17.353100	.1444547	.0834010	16.994255	17.711945	17.2690	17.5199
24hr	3	24.990400	.4158464	.2400890	23.957380	26.023420	24.5287	25.3355
48hr	3	23.692533	.5187071	.2994757	22.403994	24.981073	23.3076	24.2824
72hr	3	22.786033	.4294453	.2479403	21.719232	23.852835	22.3232	23.1716
96hr	3	22.127300	.1042971	.0602159	21.868212	22.386388	22.0101	22.2099
120hr	3	21.840600	.2039007	.1177221	21.334082	22.347118	21.6977	22.0741
Total	21	18.969995	8.2546377	1.8013096	15.212529	22.727461	0.0000	25.3355

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1361.381	6	226.897	2269.848	.000
Within Groups	1.399	14	.100		
Total	1362.781	20			

Ethanol

	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0hr	3	0.000000					
12hr	3		17.353100				
120hr	3			21.840600			
96hr	3			22.127300			
72hr	3				22.786033		
48hr	3					23.692533	
24hr	3						24.990400
Sig.		1.000	1.000	.285	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.2 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่ 2 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	0.000000	0.0000000	0.0000000	0.000000	0.000000	0.0000	0.0000
12hr	3	.615467	.2160336	.1247271	.078809	1.152124	.4625	.8626
24hr	3	6.427233	.2246898	.1297247	5.869073	6.985394	6.1695	6.5819
48hr	3	11.644367	.4032259	.2328026	10.642698	12.646035	11.1842	11.9359
72hr	3	21.984533	1.4947178	.8629757	18.271449	25.697618	20.3106	23.1857
96hr	3	22.903467	1.0849895	.6264190	20.208203	25.598730	22.1361	24.1448
120hr	3	21.555133	.3040027	.1755160	20.799949	22.310318	21.2192	21.8113
Total	21	12.161457	9.6202398	2.0993084	7.782377	16.540538	0.0000	24.1448

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1843.453	6	307.242	571.454	.000
Within Groups	7.527	14	.538		
Total	1850.980	20			

Ethanol

	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0hr	3	0.000000				
12hr	3	.615467				
24hr	3		6.427233			
48hr	3			11.644367		
120hr	3				21.555133	
72hr	3				21.984533	21.984533
96hr	3					22.903467
Sig.		.321	1.000	1.000	.485	.147

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.3 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่ 3 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	0.000000	0.0000000	0.0000000	0.000000	0.000000	0.0000	0.0000
12hr	3	2.173133	1.0673128	.6162133	-.478219	4.824485	.9447	2.8732
24hr	3	4.485533	.9956053	.5748130	2.012313	6.958754	3.5236	5.5117
48hr	3	8.027400	.2333197	.1347072	7.447802	8.606998	7.8156	8.2775
72hr	3	21.628800	1.0793462	.6231608	18.947555	24.310045	20.3873	22.3444
96hr	3	25.373633	.6974050	.3968734	23.666025	27.081242	24.6120	25.9480
120hr	3	23.795700	.2047424	.1182081	23.287092	24.304308	23.5623	23.9450
Total	21	12.212029	10.4339634	2.2768775	7.462545	16.961512	0.0000	25.9480

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2169.623	6	361.604	655.036	.000
Within Groups	7.729	14	.552		
Total	2177.352	20			

Ethanol

	N	Subset for alpha = 0.05						
		1	2	3	4	5	6	7
0hr	3	0.000000						
12hr	3		2.173133					
24hr	3			4.485533				
48hr	3				8.027400			
72hr	3					21.628800		
120hr	3						23.795700	
96hr	3							25.373633
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.1.4 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่ 4 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	0.000000	0.0000000	0.0000000	0.000000	0.000000	0.0000	0.0000
12hr	3	.657633	.2580052	.1489593	.016713	1.298554	.4544	.9479
24hr	3	5.662967	.2063870	.1191576	5.150273	6.175660	5.4255	5.7991
48hr	3	11.104867	.6067780	.3503234	9.597547	12.612187	10.4361	11.6202
72hr	3	22.003433	.3736572	.2157311	21.075217	22.931649	21.7367	22.4305
96hr	3	23.828567	.5585510	.3224796	22.441049	25.216084	23.2205	24.3188
120hr	3	22.182600	.1681582	.0970862	21.764872	22.600328	21.9921	22.3104
Total	21	12.205724	9.9319140	2.1673213	7.684771	16.726677	0.0000	24.3188

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1970.944	6	328.491	2402.206	.000
Within Groups	1.914	14	.137		
Total	1972.858	20			

Ethanol

	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0hr	3	0.000000					
12hr	3		.657633				
24hr	3			5.662967			
48hr	3				11.104867		
72hr	3					22.003433	
120hr	3					22.182600	
96hr	3						23.828567
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.562	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

1.2.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชุดการทดลองที่ 1 กระบวนการหมักผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ ต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	46.916667	2.1517919	1.2423376	41.571319	52.262014	44.5000	48.6250
12hr	3	17.312500	2.9255074	1.6890425	10.045137	24.579863	15.5000	20.6875
24hr	3	5.354167	.4004555	.2312031	4.359380	6.348953	5.0250	5.8000
48hr	3	1.993767	.0380337	.0219588	1.899286	2.088248	1.9500	2.0188
72hr	3	1.231667	.0289756	.0167290	1.159687	1.303646	1.2125	1.2650
96hr	3	1.082500	.0066144	.0038188	1.066069	1.098931	1.0750	1.0875
120hr	3	1.295000	.0751249	.0433734	1.108379	1.481621	1.2225	1.3725
Total	21	10.740895	16.1519716	3.5246492	3.388606	18.093185	1.0750	48.6250

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5191.009	6	865.168	453.404	.000
Within Groups	26.714	14	1.908		
Total	5217.724	20			

Reducing Sugar

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
96hr	3	1.082500			
72hr	3	1.231667			
120hr	3	1.295000			
48hr	3	1.993767			
24hr	3		5.354167		
12hr	3			17.312500	
0hr	3				46.916667
Sig.		.468	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชุดการทดลองที่ 2 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	22.229167	2.2011479	1.2708333	16.761212	27.697121	20.6875	24.7500
12hr	3	41.208333	2.2572222	1.3032078	35.601083	46.815584	39.0625	43.5625
24hr	3	37.508333	2.9780009	1.7193496	30.110569	44.906098	35.1750	40.8625
48hr	3	22.166667	4.1756237	2.4107975	11.793842	32.539491	19.2500	26.9500
72hr	3	3.745833	.7086886	.4091616	1.985353	5.506314	3.2125	4.5500
96hr	3	1.402100	.1012582	.0584615	1.150561	1.653639	1.3375	1.5188
120hr	3	1.159167	.1337519	.0772217	.826908	1.491425	1.0250	1.2925
Total	21	18.488514	16.1535445	3.5249924	11.135509	25.841520	1.0250	43.5625

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5145.190	6	857.532	163.229	.000
Within Groups	73.550	14	5.254		
Total	5218.740	20			

Reducing Sugar

	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
120hr	3	1.159167		
96hr	3	1.402100		
72hr	3	3.745833		
48hr	3		22.166667	
0hr	3		22.229167	
24hr	3			37.508333
12hr	3			41.208333
Sig.		.210	.974	.068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชุดการทดลองที่ 3 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	26.270833	3.1575389	1.8230060	18.427072	34.114595	22.8125	29.0000
12hr	3	43.583333	.7864411	.4540520	41.629705	45.536961	42.7500	44.3125
24hr	3	48.358333	5.1030832	2.9462665	35.681572	61.035095	45.3250	54.2500
48hr	3	26.925000	1.8633387	1.0757991	22.296210	31.553790	24.9750	28.6875
72hr	3	5.875000	1.5118800	.8728843	2.119282	9.630718	4.7250	7.5875
96hr	3	1.255033	.0169356	.0097778	1.212963	1.297104	1.2375	1.2713
120hr	3	1.221667	.0346711	.0200174	1.135539	1.307794	1.1925	1.2600
Total	21	21.927029	18.7886734	4.1000247	13.374527	30.479530	1.1925	54.2500

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6975.506	6	1162.584	191.985	.000
Within Groups	84.779	14	6.056		
Total	7060.285	20			

Reducing Sugar

	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
120hr	3	1.221667				
96hr	3	1.255033				
72hr	3		5.875000			
0hr	3			26.270833		
48hr	3			26.925000		
12hr	3				43.583333	
24hr	3					48.358333
Sig.		.987	1.000	.750	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชุดการทดลองที่ 4 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	30.020833	3.6143882	2.0867680	21.042195	38.999471	27.3125	34.1250
12hr	3	39.166667	.9689180	.5594051	36.759741	41.573592	38.0625	39.8750
24hr	3	40.687500	4.1152916	2.3759647	30.464549	50.910451	37.8875	45.4125
48hr	3	19.979167	1.7981906	1.0381859	15.512213	24.446120	18.1125	21.7000
72hr	3	3.229167	.2773573	.1601323	2.540173	3.918160	2.9750	3.5250
96hr	3	1.439600	.0889142	.0513346	1.218725	1.660475	1.3375	1.5000
120hr	3	1.118333	.0741760	.0428256	.934070	1.302597	1.0400	1.1875
Total	21	19.377324	16.8737010	3.6821434	11.696507	27.058140	1.0400	45.4125

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5625.912	6	937.652	191.569	.000
Within Groups	68.524	14	4.895		
Total	5694.436	20			

Reducing Sugar

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
120hr	3	1.118333			
96hr	3	1.439600			
72hr	3	3.229167			
48hr	3		19.979167		
0hr	3			30.020833	
12hr	3				39.166667
24hr	3				40.687500
Sig.		.286	1.000	1.000	.414

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติค่าพีเอช

1.3.1 ค่าพีเอชที่ได้จากชุดการทดลองที่ 1 กระบวนการหมักผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ ต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	4.8833	.00577	.00333	4.8690	4.8977	4.88	4.89
12hr	3	4.0633	.03055	.01764	3.9874	4.1392	4.03	4.09
24hr	3	4.0300	.01000	.00577	4.0052	4.0548	4.02	4.04
48hr	3	4.0433	.03055	.01764	3.9674	4.1192	4.01	4.07
72hr	3	4.2867	.01155	.00667	4.2580	4.3154	4.28	4.30
96hr	3	4.9100	.06245	.03606	4.7549	5.0651	4.86	4.98
120hr	3	4.8533	.02517	.01453	4.7908	4.9158	4.83	4.88
Total	21	4.4386	.40315	.08798	4.2551	4.6221	4.01	4.98

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.237	6	.540	566.532	.000
Within Groups	.013	14	.001		
Total	3.251	20			

pH

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
24hr	3	4.0300			
48hr	3	4.0433			
12hr	3	4.0633			
72hr	3		4.2867		
120hr	3			4.8533	
0hr	3			4.8833	4.8833
96hr	3				4.9100
Sig.		.229	1.000	.254	.308

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.2 ค่าพีเอชที่ได้จากชุดการทดลองที่ 2 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	4.8733	.04163	.02404	4.7699	4.9768	4.84	4.92
12hr	3	4.9700	.06083	.03512	4.8189	5.1211	4.90	5.01
24hr	3	5.3467	.00577	.00333	5.3323	5.3610	5.34	5.35
48hr	3	4.5200	.11533	.06658	4.2335	4.8065	4.39	4.61
72hr	3	4.2533	.08386	.04842	4.0450	4.4617	4.20	4.35
96hr	3	4.5700	.08660	.05000	4.3549	4.7851	4.52	4.67
120hr	3	5.2333	.26102	.15070	4.5849	5.8818	4.96	5.48
Total	21	4.8238	.39013	.08513	4.6462	5.0014	4.20	5.48

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2.841	6	.474	32.679	.000
Within Groups	.203	14	.014		
Total	3.044	20			

pH

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
72hr	3	4.2533			
48hr	3		4.5200		
96hr	3		4.5700		
0hr	3			4.8733	
12hr	3			4.9700	
120hr	3				5.2333
24hr	3				5.3467
Sig.		1.000	.619	.342	.268

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.3 ค่าพีเอชที่ได้จากชุดการทดลองที่ 3 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	4.9000	.09539	.05508	4.6630	5.1370	4.80	4.99
12hr	3	4.8500	0.00000	0.00000	4.8500	4.8500	4.85	4.85
24hr	3	4.9833	.00577	.00333	4.9690	4.9977	4.98	4.99
48hr	3	4.6633	.27502	.15878	3.9802	5.3465	4.39	4.94
72hr	3	4.1867	.02082	.01202	4.1350	4.2384	4.17	4.21
96hr	3	4.8967	.60078	.34686	3.4043	6.3891	4.53	5.59
120hr	3	5.6000	.12124	.07000	5.2988	5.9012	5.49	5.73
Total	21	4.8686	.45243	.09873	4.6626	5.0745	4.17	5.73

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.172	6	.529	8.031	.001
Within Groups	.922	14	.066		
Total	4.094	20			

pH

	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
72hr	3	4.1867		
48hr	3		4.6633	
12hr	3		4.8500	
96hr	3		4.8967	
0hr	3		4.9000	
24hr	3		4.9833	
120hr	3			5.6000
Sig.		1.000	.187	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3.4 ค่าพีเอชที่ได้จากชุดการทดลองที่ 4 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	4.9300	.06000	.03464	4.7810	5.0790	4.87	4.99
12hr	3	4.8800	.02000	.01155	4.8303	4.9297	4.86	4.90
24hr	3	5.4033	.01155	.00667	5.3746	5.4320	5.39	5.41
48hr	3	4.6200	.06245	.03606	4.4649	4.7751	4.57	4.69
72hr	3	4.2267	.01155	.00667	4.1980	4.2554	4.22	4.24
96hr	3	4.5767	.02517	.01453	4.5142	4.6392	4.55	4.60
120hr	3	5.6000	.43715	.25239	4.5141	6.6859	5.25	6.09
Total	21	4.8910	.47650	.10398	4.6741	5.1079	4.22	6.09

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.141	6	.690	24.169	.000
Within Groups	.400	14	.029		
Total	4.541	20			

pH

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
72hr	3	4.2267			
96hr	3		4.5767		
48hr	3		4.6200	4.6200	
12hr	3		4.8800	4.8800	
0hr	3			4.9300	
24hr	3				5.4033
120hr	3				5.6000
Sig.		1.000	.055	.050	.176

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.กระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

2.1 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณเอทานอล

2.1.1 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่ 1 กระบวนการหมักผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบ ต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	0.000000	0.0000000	0.0000000	0.000000	0.000000	0.0000	0.0000
12hr	3	10.784633	.9782486	.5647921	8.354529	13.214738	10.1424	11.9105
24hr	3	21.100967	.2579866	.1489486	20.460093	21.741841	20.9076	21.3939
48hr	3	26.315033	.3810642	.2200075	25.368417	27.261649	26.0265	26.7470
72hr	3	25.852167	.1802500	.1040674	25.404401	26.299932	25.6719	26.0324
96hr	3	25.219233	.2464545	.1422906	24.607007	25.831460	25.0377	25.4998
120hr	3	24.771533	.1843368	.1064269	24.313615	25.229451	24.5736	24.9383
Total	21	19.149081	9.5346688	2.0806353	14.808952	23.489210	0.0000	26.7470

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1815.606	6	302.601	1634.486	.000
Within Groups	2.592	14	.185		
Total	1818.198	20			

Ethanol

	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
0hr	3	0.000000					
12hr	3		10.784633				
24hr	3			21.100967			
120hr	3				24.771533		
96hr	3				25.219233	25.219233	
72hr	3					25.852167	25.852167
48hr	3						26.315033
Sig.		1.000	1.000	1.000	.223	.093	.209

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่ 2 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae TISTR 3086* ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	0.000000	0.0000000	0.0000000	0.000000	0.000000	0.0000	0.0000
12hr	3	8.430600	.6107931	.3526416	6.913306	9.947894	7.8984	9.0975
24hr	3	18.814700	1.4002647	.8084432	15.336250	22.293150	17.2744	20.0107
48hr	3	24.648433	.8581233	.4954377	22.516737	26.780130	23.7268	25.4244
72hr	3	24.569400	.4180337	.2413519	23.530947	25.607853	24.2751	25.0479
96hr	3	24.442833	.5671740	.3274581	23.033895	25.851772	23.9931	25.0800
120hr	3	23.037667	1.1854664	.6844293	20.092805	25.982528	21.6770	23.8475
Total	21	17.706233	9.2724961	2.0234245	13.485444	21.927023	0.0000	25.4244

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1709.640	6	284.940	401.166	.000
Within Groups	9.944	14	.710		
Total	1719.584	20			

Ethanol

	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0hr	3	0.000000				
12hr	3		8.430600			
24hr	3			18.814700		
120hr	3				23.037667	
96hr	3				24.442833	24.442833
72hr	3				24.569400	24.569400
48hr	3					24.648433
Sig.		1.000	1.000	1.000	.052	.781

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่ 3 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	0.000000	0.0000000	0.0000000	0.000000	0.000000	0.0000	0.0000
12hr	3	9.286733	.3424696	.1977249	8.435992	10.137475	8.9464	9.6313
24hr	3	20.039567	1.1633799	.6716777	17.149571	22.929563	18.7811	21.0758
48hr	3	25.374200	.3423537	.1976580	24.423746	26.124654	24.9354	25.6200
72hr	3	24.924067	.6107328	.3526068	23.406922	26.441211	24.2892	25.5074
96hr	3	24.386667	.1590530	.0918293	23.991557	24.781776	24.2052	24.5019
120hr	3	23.586033	.1886070	.1088923	23.117508	24.054559	23.4349	23.7974
Total	21	18.213895	9.3109486	2.0318156	13.975602	22.452188	0.0000	25.6200

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1729.832	6	288.305	998.184	.000
Within Groups	4.044	14	.289		
Total	1733.875	20			

Ethanol

	N	Subset for alpha = 0.05				
		1	2	3	4	5
0hr	3	0.000000				
12hr	3		9.286733			
24hr	3			20.039567		
120hr	3				23.586033	
96hr	3				24.386667	24.386667
72hr	3					24.924067
48hr	3					25.374200
Sig.		1.000	1.000	1.000	.089	.074

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.4 ปริมาณเอทานอลที่ได้จากชุดการทดลองที่ 4 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	0.000000	0.0000000	0.0000000	0.000000	0.000000	0.0000	0.0000
12hr	3	9.500467	1.1731794	.6773354	6.586128	12.414806	8.5194	10.8000
24hr	3	19.176567	1.2964631	.7485133	15.955974	22.397160	18.0229	20.5796
48hr	3	24.875133	.9521351	.5497155	22.509899	27.240368	23.7897	25.5693
72hr	3	24.487400	.4896329	.2826897	23.271085	25.703715	23.9786	24.9553
96hr	3	24.238833	.5176691	.2988764	22.952872	25.524795	23.6759	24.6944
120hr	3	23.297600	.6779894	.3914374	21.613381	24.981819	22.5864	23.9366
Total	21	17.939429	9.1424521	1.9950466	13.777834	22.101023	0.0000	25.5693

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1661.826	6	276.971	393.176	.000
Within Groups	9.862	14	.704		
Total	1671.689	20			

Ethanol

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
0hr	3	0.000000			
12hr	3		9.500467		
24hr	3			19.176567	
120hr	3				23.297600
96hr	3				24.238833
72hr	3				24.487400
48hr	3				24.875133
Sig.		1.000	1.000	1.000	.051

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

2.2.1 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชุดการทดลองที่ 1 กระบวนการหมักผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	28.958333	2.8975564	1.6729050	21.760404	36.156263	25.6250	30.8750
12hr	3	19.833333	2.0447468	1.1805351	14.753901	24.912766	18.5000	22.1875
24hr	3	6.008333	.5268321	.3041667	4.699610	7.317057	5.4000	6.3125
48hr	3	3.437533	.1517121	.0875910	3.060660	3.814407	3.2625	3.5313
72hr	3	2.173767	.1298983	.0749968	1.851081	2.496452	2.0513	2.3100
96hr	3	1.497500	.0425000	.0245374	1.391924	1.603076	1.4550	1.5400
120hr	3	1.360000	.1416642	.0817899	1.008087	1.711913	1.2625	1.5225
Total	21	9.038400	10.4315073	2.2763415	4.290035	13.786765	1.2625	30.8750

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2150.495	6	358.416	194.246	.000
Within Groups	25.832	14	1.845		
Total	2176.327	20			

Reducing Sugar

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
120hr	3	1.360000			
96hr	3	1.497500			
72hr	3	2.173767			
48hr	3	3.437533			
24hr	3		6.008333		
12hr	3			19.833333	
0hr	3				28.958333
Sig.		.105	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชุดการทดลองที่ 2 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	25.520833	5.7914044	3.3436689	11.134187	39.907479	19.9375	31.5000
12hr	3	21.075000	.7583906	.4378570	19.191053	22.958947	20.2125	21.6375
24hr	3	9.183333	.0520416	.0300463	9.054055	9.312612	9.1250	9.2250
48hr	3	3.333333	.1134221	.0654843	3.051577	3.615090	3.2500	3.4625
72hr	3	1.852100	.0501321	.0289438	1.727565	1.976635	1.8000	1.9000
96hr	3	1.483800	.1541306	.0889874	1.100918	1.866682	1.3838	1.6613
120hr	3	1.206667	.0395548	.0228370	1.108407	1.304926	1.1725	1.2500
Total	21	9.093581	9.8126554	2.1412970	4.626914	13.560248	1.1725	31.5000

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1857.446	6	309.574	63.439	.000
Within Groups	68.318	14	4.880		
Total	1925.764	20			

Reducing Sugar

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
120hr	3	1.206667			
96hr	3	1.483800			
72hr	3	1.852100			
48hr	3	3.333333			
24hr	3		9.183333		
12hr	3			21.075000	
0hr	3				25.520833
Sig.		.295	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชุดการทดลองที่ 3 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	21.666667	1.3496720	.7792335	18.313895	25.019438	20.2500	22.9375
12hr	3	20.850000	.4324711	.2496873	19.775682	21.924318	20.3625	21.1875
24hr	3	9.966667	.4041452	.2333333	8.962714	10.970619	9.6000	10.4000
48hr	3	2.783333	.2126225	.1227577	2.255150	3.311517	2.5750	3.0000
72hr	3	1.754200	.1361276	.0785933	1.416040	2.092360	1.6438	1.9063
96hr	3	1.366267	.0544111	.0314142	1.231102	1.501431	1.3125	1.4213
120hr	3	1.222500	.0532095	.0307205	1.090320	1.354680	1.1750	1.2800
Total	21	8.515662	8.7598424	1.9115543	4.528229	12.503094	1.1750	22.9375

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1530.214	6	255.036	796.449	.000
Within Groups	4.483	14	.320		
Total	1534.697	20			

Reducing Sugar

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
120hr	3	1.222500			
96hr	3	1.366267			
72hr	3	1.754200			
48hr	3		2.783333		
24hr	3			9.966667	
12hr	3				20.850000
0hr	3				21.666667
Sig.		.293	1.000	1.000	.099

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากชุดการทดลองที่ 4 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	21.895833	.3083052	.1780001	21.129961	22.661706	21.6875	22.2500
12hr	3	20.925000	1.9811218	1.1438012	16.003621	25.846379	19.7625	23.2125
24hr	3	8.233333	.6246666	.3606514	6.681576	9.785091	7.5500	8.7750
48hr	3	2.374200	.4236723	.2446073	1.321740	3.426660	2.0913	2.8613
72hr	3	1.740033	.0470113	.0271420	1.623251	1.856816	1.6950	1.7888
96hr	3	1.432500	.0259808	.0150000	1.367960	1.497040	1.4175	1.4625
120hr	3	1.319167	.0376109	.0217147	1.225736	1.412597	1.2950	1.3625
Total	21	8.274295	8.8431549	1.9297346	4.248939	12.299651	1.2950	23.2125

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1554.840	6	259.140	394.867	.000
Within Groups	9.188	14	.656		
Total	1564.028	20			

Reducing Sugar

	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
120hr	3	1.319167		
96hr	3	1.432500		
72hr	3	1.740033		
48hr	3	2.374200		
24hr	3		8.233333	
12hr	3			20.925000
0hr	3			21.895833
Sig.		.162	1.000	.164

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติค่าพีเอช

2.3.1 ค่าพีเอชที่ได้จากชุดการทดลองที่ 1 กระบวนการหมักผงมันสำปะหลังโดยการใช้เอนไซม์ทางการค้าร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	4.8700	0.00000	0.00000	4.8700	4.8700	4.87	4.87
12hr	3	4.6267	.02517	.01453	4.5642	4.6892	4.60	4.65
24hr	3	4.6267	.02517	.01453	4.5642	4.6892	4.60	4.65
48hr	3	4.4033	.01155	.00667	4.3746	4.4320	4.39	4.41
72hr	3	4.4467	.08083	.04667	4.2459	4.6475	4.36	4.52
96hr	3	4.7533	.15144	.08743	4.3771	5.1295	4.58	4.86
120hr	3	4.8433	.04933	.02848	4.7208	4.9659	4.81	4.90
Total	21	4.6529	.18243	.03981	4.5698	4.7359	4.36	4.90

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.599	6	.100	20.987	.000
Within Groups	.067	14	.005		
Total	.666	20			

pH

	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
48hr	3	4.4033		
72hr	3	4.4467		
12hr	3		4.6267	
24hr	3		4.6267	
96hr	3			4.7533
120hr	3			4.8433
0hr	3			4.8700
Sig.		.454	1.000	.068

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ค่าพีเอชที่ได้จากชุดการทดลองที่ 2 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	4.8900	.01732	.01000	4.8470	4.9330	4.87	4.90
12hr	3	4.6100	.01732	.01000	4.5670	4.6530	4.59	4.62
24hr	3	4.3867	.01528	.00882	4.3487	4.4246	4.37	4.40
48hr	3	4.2200	.02000	.01155	4.1703	4.2697	4.20	4.24
72hr	3	4.3233	.03786	.02186	4.2293	4.4174	4.28	4.35
96hr	3	4.6767	.12858	.07424	4.3573	4.9961	4.53	4.77
120hr	3	4.9233	.16197	.09351	4.5210	5.3257	4.82	5.11
Total	21	4.5757	.27034	.05899	4.4527	4.6988	4.20	5.11

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.371	6	.228	35.202	.000
Within Groups	.091	14	.006		
Total	1.462	20			

pH

	N	Subset for alpha = 0.05			
		1	2	3	4
48hr	3	4.2200			
72hr	3	4.3233	4.3233		
24hr	3		4.3867		
12hr	3			4.6100	
96hr	3			4.6767	
0hr	3				4.8900
120hr	3				4.9233
Sig.		.139	.352	.328	.620

Means for groups in homogeneous subsets are displayed
a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 ค่าพีเอชที่ได้จากชุดการทดลองที่ 3 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	4.9233	.06110	.03528	4.7716	5.0751	4.87	4.99
12hr	3	4.6267	.03215	.01856	4.5468	4.7065	4.59	4.65
24hr	3	4.9833	.00577	.00333	4.9690	4.9977	4.98	4.99
48hr	3	4.2133	.01528	.00882	4.1754	4.2513	4.20	4.23
72hr	3	4.3200	.02646	.01528	4.2543	4.3857	4.30	4.35
96hr	3	4.7167	.01155	.00667	4.6880	4.7454	4.71	4.73
120hr	3	4.9533	.02887	.01667	4.8816	5.0250	4.92	4.97
Total	21	4.6767	.29544	.06447	4.5422	4.8111	4.20	4.99

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.732	6	.289	301.638	.000
Within Groups	.013	14	.001		
Total	1.746	20			

pH

	N	Subset for alpha = 0.05					
		1	2	3	4	5	6
48hr	3	4.2133					
72hr	3		4.3200				
12hr	3			4.6267			
96hr	3				4.7167		
0hr	3					4.9233	
120hr	3					4.9533	4.9533
24hr	3						4.9833
Sig.		1.000	1.000	1.000	1.000	.255	.255

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 ค่าพีเอชที่ได้จากชุดการทดลองที่ 4 กระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากผงมันสำปะหลังโดยการใช้เชื้อ *Aspergillus oryzae* TISTR 3086 และ *Amylomyces rouxii* TISTR 3182 ร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 120 ชั่วโมง

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
0hr	3	5.0633	.08145	.04702	4.8610	5.2657	4.97	5.12
12hr	3	4.6167	.03786	.02186	4.5226	4.7107	4.59	4.66
24hr	3	4.3567	.00577	.00333	4.3423	4.3710	4.35	4.36
48hr	3	4.2000	.01000	.00577	4.1752	4.2248	4.19	4.21
72hr	3	4.3267	.05033	.02906	4.2016	4.4517	4.28	4.38
96hr	3	4.6233	.24947	.14403	4.0036	5.2430	4.34	4.81
120hr	3	4.9133	.02517	.01453	4.8508	4.9758	4.89	4.94
Total	21	4.5857	.31351	.06841	4.4430	4.7284	4.19	5.12

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1.819	6	.303	28.826	.000
Within Groups	.147	14	.011		
Total	1.966	20			

pH

	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
48hr	3	4.2000		
72hr	3	4.3267		
24hr	3	4.3567		
12hr	3		4.6167	
96hr	3		4.6233	
120hr	3			4.9133
0hr	3			5.0633
Sig.		.096	.938	.095

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลจากกระบวนการย่อยแยกจากกระบวนการหมัก(SHF) กับกระบวนการย่อยพร้อมกับกระบวนการหมัก (SSF)

Descriptives

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean		Minimum	Maximum
					Lower Bound	Upper Bound		
SSF:State1 : 48 hr.	3	26.315033	.3810642	.2200075	25.368417	27.261649	26.0265	26.7470
SSF:State2 : 48 hr.	3	24.648433	.8581233	.4954377	22.516737	26.780130	23.7268	25.4244
SSF:State3 : 48 hr.	3	25.373633	.6874050	.3968734	23.666025	27.081242	24.6120	25.9480
SSF:State4 : 48 hr.	3	24.875133	.9521351	.5497155	22.509899	27.240368	23.7897	25.5693
SHF:State1 : 24 hr.	3	24.990400	.4158464	.2400890	23.957380	26.023420	24.5287	25.3355
SHF:State2 : 72 hr.	3	21.984533	1.4947178	.8629757	18.271449	25.697618	20.3106	23.1857
SHF:State3 : 96 hr.	3	25.373633	.6874050	.3968734	23.666025	27.081242	24.6120	25.9480
SHF:State4 : 96 hr.	3	23.828567	.5585510	.3224796	22.441049	25.216084	23.2205	24.3188
Total	24	24.673671	1.4171018	.2892647	24.075281	25.272060	20.3106	26.7470

ANOVA

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	35.284	7	5.041	7.396	.000
Within Groups	10.905	16	.682		
Total	46.188	23			

pH

ปริมาณเอทานอล (กรัม/ลิตร) โดยกระบวนการหมักแบบ SSF	N	Subset for alpha = 0.05		
		1	2	3
SHF:State2 : 72 hr.	3	21.984533		
SHF:State4 : 96 hr.	3		23.828567	
SSF:State2 : 48 hr.	3		24.648433	
SSF:State4 : 48 hr.	3		24.875133	24.875133
SHF:State1 : 24 hr.	3		24.990400	24.990400
SSF:State3 : 48 hr.	3		25.373633	25.373633
SHF:State3 : 96 hr.	3		25.373633	25.373633
SSF:State1 : 48 hr.	3			26.315033
Sig.		1.000	.057	.070

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้