การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายตรึงบนซังข้าวโพด

Ethanol production from molasses using mutant *Saccharomyces cerevisiae* 62 immobilized on corn cobs

นายศุภกิตติ์ มากระดี
นายศุภฤกษ์ ภิญโญภาวศุทธิ
นายสรณ์สิริ ศรีโมรา

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายตรึงบนซังข้าวโพด

Ethanol production from molasses using mutant *Saccharomyces cerevisiae* 62 immobilized on corn cobs

T149247

นายศุภกิตติ์ มากระดี
นายศุภฤกษ์ ภิญโญภาวศุทธิ
นายสรณ์สิริ ศรีโมรา

วค.
ศ 677 ก
2558
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 149247
วัน,เดือน,ปี 30 ส.ค. 2561
b 12882616
i.....

โครงงานพิเศษนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2558

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ethanol production from molasses using mutant *Saccharomyces cerevisiae* 62 immobilized on corn cobs

Suphakit Magradee

Suparerk Phinyopawasutthi

Sornsiri Srimora

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF BACHERLOR OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY DEPARTMENT OF BIOLOGY FACULTY OF SCIENCE KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG ACEDEMIC YEAR 2015

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายตรึงบนซังข้าวโพด

Ethanol production from molasses using mutant *Saccharomy cescerevisiae* 62 immobilized on corn cobs

ชื่อนักศึกษา นายศุภกิตติ์ มากระดี นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051179

นายศุภฤกษ์ ภิญโญภาวศุทธิ นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051181

นายสรณ์สิริ ศรีโมรา นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051185

ปริญญา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ภาควิชา ชีววิทยา

ปีการศึกษา 2558

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ประจำปีการศึกษา 2558

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
รศ.ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการ	
ดร.วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการ	
รศ. อารี ฤทธิบูรณ์ กรรมการและอาจารย์ที่ปรึกษา	

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายตรึงบนซังข้าวโพด		
ชื่อนักศึกษา	นายศุภกิตติ์	มากระดี	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051179
	นายศุภฤกษ์	ภิญโญภาวศุทธิ	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051181
	นายสรณ์สิริ	ศรีโมรา	นักศึกษาชั้นปีที่ 4 รหัส 55051185
ปริญญา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)		
ภาควิชา	ชีววิทยา		
ปีการศึกษา	2558		
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์		

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลด้วยวิธีการตรึงเซลล์ เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยเลี้ยงยีสต์ (*Saccharomyces cerevisiae* 62) ในอาหารเหลวที่ประกอบไปด้วยกากน้ำตาลและซังข้าวโพดซึ่งเป็นวัสดุตรึงเซลล์ และหมักในสภาวะตั้งนิ่ง โดยวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี่ ซึ่งจะทำการศึกษาสองปัจจัยคือ แหล่งคาร์บอน (กากน้ำตาลที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ) และแหล่งไนโตรเจน (ยีสต์สกัด 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ) ซึ่งในตัวอย่างที่มีการตรึงเซลล์ ทำการศึกษาความแตกต่างระหว่างทำการล้างเซลล์และไม่ทำการล้างเซลล์หลังจากการตรึงเซลล์ จากการทดลองพบว่า การแปรผันปัจจัยแหล่งคาร์บอนสภาวะที่เหมาะสมคือความเข้มข้นของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร เวลาการเพาะเลี้ยงที่ 48 ชั่วโมง ที่ทำการล้างเซลล์ ให้ปริมาณเอทานอล 31.75±1.92 กรัมต่อลิตร ในส่วนของแหล่งไนโตรเจนสภาวะที่ให้ปริมาณเอทานอลได้สูงที่สุด คือหมักด้วยกากน้ำตาลที่ผสมยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ในที่ชั่วโมง 12 ที่ไม่ทำการล้างเซลล์ ซึ่งมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 30.72±1.73 ซึ่งให้ผลที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

คำสำคัญ : กากน้ำตาล การตรึงเซลล์ ซังข้าวโพด เอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Ethanol production from molasses using mutant *Saccharomyces cerevisiae* 62 immobilized on corn cobs		
Student	Suphakit	Magradee	55051179
	Suparerk	Phinyopawasutthi	55051181
	Sornsiri	Srimora	55051185
Degree	Bachelor of Science (Biotechnology)		
Department	Biology		
Academic Year	2015		
Advisor	Assoc. Prof. Aree Rittiboon		

Abstract

This project was a study of ethanol production from molasses using immobilized cells to find the optimal conditions for producing ethanol by cultivating yeast (*Saccharomyces cerevisiae 62*) in a medium broth which contained molasses. Corn cob was a material immobilized and fermented in static condition. The amount of ethanol was analyzed by Gas Chromatography, which will be studied in two factors. One parameter was carbon source (molasses at the concentration of 50, 100 and 150 grams per liter at 12, 24, 36, 48 and 60 hours). Another parameter was a nitrogen source (yeast extract at the concentration of 3, 4 and 5 grams per liter at 12 hours). In the immobilized cell examples, cell was studied. The difference between washing cell and non-washing cell after immobilized. Was found in the experiment that the conditions of the carbon source for the highest amount of ethanol was concentration of molasses of 150 grams per liter and 48 hours of culture time with washing cell gave the amount of ethanol of 31.75±1.92 grams per liter. The conditions of the nitrogen source for the highest amount of ethanol was fermented with molasses that were mixed with yeast extracted of 5 grams per liter at 12 hours of non-washing cell that yielded the amount of ethanol of 30.72±1.73 grams per liter and gave the results that were not significantly different in statistics at the confidence level of 95 percent.

Keywords : Corn cob , Ethanol, Immobilization, Molasess

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ อารี ฤทธิบูรณ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในการทำโครงงานพิเศษ จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ที่สละเวลาอันมีค่ามาคอยให้คำปรึกษา ให้ความสนับสนุน ความช่วยเหลือ คำแนะนำที่ดีในการดำเนินงาน รวมทั้งกรุณาตรวจทานและแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์และครบถ้วนยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. มาริสา จาตุพรพิพัฒน์ ประธานกรรมการ และ ดร. วรภัทร์ สงวนไชยไผ่วงศ์ กรรมการ ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจทานแก้ไขโครงงานพิเศษเล่มนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาทุกๆ ท่าน ที่คอยให้ความช่วยเหลือมาโดยและสนับสนุนมาโดยตลอดและขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยาที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆ ในการทำโครงงานพิเศษ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และญาติพี่น้อง ขอบคุณพี่ปริญญาโท พี่แมน รวมถึงเพื่อนๆ ทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือ สนับสนุน ดูแล และมีส่วนช่วยให้โครงงานพิเศษชิ้นนี้เสร็จสมบูรณ์ ตลอดจนผู้ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้

หากโครงงานพิเศษฉบับนี้มีสิ่งใดขาดตกบกพร่อง ทางคณะผู้จัดทำขอน้อมรับไว้ทั้งหมด ส่วนคุณความดีและประโยชน์ที่ปรากฏในโครงงานพิเศษฉบับนี้ ขอยกให้เป็นคุณความดีของผู้มีพระคุณทุกท่านที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ศุภกิตติ์ มากระดี

ศุภฤกษ์ ภิญโญภาวศุทธิ

สรณ์สิริ ศรีโมรา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
สารบัญตารางภาคผนวก	ฌ
สารบัญรูปภาคผนวก	ญ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาและความสำคัญ	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	1
1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 เอทานอล	3
2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป	3
2.1.2 ประโยชน์ของเอทานอล	3
2.1.3 ประเภทของเอทานอล	3
2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล	4
2.2.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี	4
2.2.2 กระบวนการทางชีวเคมี	4
2.3 กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวเคมี	4
2.3.1 การเตรียมและการปรับสภาพวัตถุดิบ	4
2.3.2 กระบวนการย่อย	5
2.3.3 การหมัก	7
2.3.3.1 การหมักแอลกอฮอล์	8
2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	8
2.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	8
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล	9
2.7 ยีสต์	12
2.7.1 การจัดลำดับชั้นอนุกรมวิธานของยีสต์	12
2.7.2 สัณฐานวิทยาของยีสต์	12
2.7.3 สรีรวิทยาของยีสต์	12
2.7.4 การขยายพันธุ์ของยีสต์	13
2.7.5 ชนิดของยีสต์	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
2.7.6 นิเวศวิทยาของยีสต์	14
2.8 กากน้ำตาล	14
2.8.1 การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล	15
2.8.2 การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาล	16
2.9 การตรึงเซลล์	16
2.9.1 ความหมายของการตรึงเซลล์	16
2.9.2 กระบวนการตรึงเซลล์	16
2.10 ข้าวโพดหวาน	17
2.10.1 ลักษณะทั่วๆไปและลักษณะทางพฤกษศาสตร์	18
2.11 ก๊าซโครมาโตรกราฟี	19
2.12 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS	20
2.13 ประเภทของแผนการทดลองที่มีการจัดทรีทเมนต์โดยสุ่ม	21
2.14 การทดลองแบบแฟคทอเรียล	22
2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	22
บทที่ 3 วัสดุและวิธีการ	26
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ	26
3.2 สารเคมี	26
3.3 เชื้อยีสต์ที่ใช้	27
3.4 วิธีการดำเนินงาน	27
3.4.1 การเตรียมเชื้อ	27
3.4.2 การเตรียมวัสดุตรึงรูป	27
3.4.3 การตรึงเซลล์	27
3.4.4 การเตรียมกากน้ำตาล	28
3.4.5 การทดสอบปัจจัยแหล่งคาร์บอน	28
3.4.6 แผนการทดลอง	28
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผล	29
4.1 การตรึงเซลล์	29
4.2 การทดสอบปัจจัยแหล่งคาร์บอน โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นต่างกันในการผลิตเอทานอลของเชื้อสายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae*	29
4.3 การทดสอบปัจจัยแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างกันในการผลิตเอทานอลของเชื้อสายพันธุ์กลาย *S. cerevisiae*	32
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	35
เอกสารอ้างอิง	36
ภาคผนวก	39
ภาคผนวก ก	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

	หน้า
ภาคผนวก ข	42
ภาคผนวก ค	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ปริมาณเอทานอลของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ระหว่างการหมักโดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง 32

4.2 ปริมาณเอทานอลของตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ระหว่างการหมักโดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง 32

4.3 ปริมาณเอทานอลของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ในชั่วโมงที่ 12 ทำการหมักโดยใช้ความเข้มของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร และปริมาณยีสต์สกัดต่างกันคือ 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร 35

4.4 ปริมาณเอทานอลของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ในชั่วโมงที่ 12 ทำการหมักโดยใช้ความเข้มของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร และปริมาณยีสต์สกัดต่างกันคือ 3,4 และ 5 กรัมต่อลิ 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 โครงสร้างอะไมโลสและอะไมโลแพกติน	6
2.2 รูปร่างยีสต์และโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์	12
2.3 การแตกหน่อของยีสต์	13
2.4 กากน้ำตาล	14
2.5 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล	15
2.6 สถิติการส่งออกข้าวโพดหวานกระป๋อง	18
2.7 ลักษณะทั่วไปของข้าวโพด	19
2.8 เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี	20
4.1 ปริมาณเซลล์ของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ระหว่างการหมักโดยใช้ความเข้มของกากน้ำตาล 50,100และ150กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาทั้งหมด 60ชั่วโมง	30
4.2 ปริมาณเซลล์ของตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ระหว่างการหมักโดยใช้ความเข้มของกากน้ำตาล 50,100และ150กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาทั้งหมด 60ชั่วโมง	30
4.3 ค่าพีเอชระหว่างการหมักในสภาวะตั้งนิ่งที่เวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมงตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่แตกต่างกันคือ 50 , 100 และ 150 กรัมต่อลิตร	31
4.4 ปริมาณเซลล์ของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ในชั่วโมงที่ 0 และ 12 ทำการหมักโดยใช้ความเข้มของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร และปริมาณยีสต์สกัดต่างกันคือ 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร	34
4.5 ปริมาณเซลล์ของตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ในชั่วโมงที่ 0 และ 12 ทำการหมักโดยใช้ความเข้มของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร และปริมาณยีสต์สกัดต่างกันคือ 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร	34
4.6 ค่าพีเอชระหว่างการหมักในสภาวะตั้งนิ่งที่เวลา 12 ชั่วโมง และใช้ความเข้มของยีสต์สกัดที่แตกต่างคือ 3,4และ5กรัมต่อลิตร	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ หน้า

1 ข การเจือจางสารละลายกลูโคสด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร 45
2 ข การเจือจางสารละลายกลูโคสด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร 45
1 ค การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอน ที่มีการล้างเซลล์โดยออกแบบการทดลองแบบ 4x5 แฟคทอเรียล 49
2 ค การจัดกลุ่มข้อมูลของปริมาณเอทานอลในการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอน ที่มีการล้างเซลล์โดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0 49
3 ค การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอนที่ ไม่มีการล้างเซลล์โดยออกแบบการทดลองแบบ 4x5 แฟคทอเรียล 50
4 ค การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลในการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอน ที่ไม่มีการล้างเซลล์โดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0 50
5 ค การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่ง ไนโตรเจนที่มีการล้างเซลล์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CRD 51
6 ค การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแสดงของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจน ที่มีการล้างเซลล์โดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0 51
7 ค การวิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัย แหล่งไนโตรเจนที่ไม่มีการล้างเซลล์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CRD 51
8 ค การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจน ที่ไม่มีการล้างเซลล์โดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0 52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาคผนวก

รูปที่	หน้า
1ข กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก	45
2ข กราฟมาตรฐานสารละลายเอทานอล	48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เอทานอล (Ethanol) หรือที่เรียกอีกชื่อว่าเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารอินทรีย์มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH เป็นของเหลวใสไม่มีสี ระเหยง่ายจุดติดไฟ ละลายในน้ำและในสารอินทรีย์อื่นๆได้ดีประโยชน์ของเอทานอลอาทิ ใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้ในการผลิตยา ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อขับเคลื่อนเครื่องยนต์และใช้เป็นสารเพิ่มออกเทนให้แก่น้ำมันเบนซินสำหรับรถยนต์ เป็นต้น (กนกวรรณ, 2547) เนื่องจากวิกฤตการณ์โลกด้านพลังงานทำให้กระบวนการผลิตเอทานอลโดยการหมักได้รับความสนใจเป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นแหล่งพลังงานหมุนเวียนที่ผลิตใหม่ได้เรื่อยๆ

ปัจจุบันความต้องการน้ำมันเชื้อเพลิงในประเทศไทยเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานมีปริมาณสูงโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เป็นพลังงานในการขับเคลื่อนรถยนต์ การที่น้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมมีราคาแพงและมีแนวโน้มที่จะแพงยิ่งขึ้นในอนาคตจึงมีความจำเป็นเป็นอย่างยิ่งที่จะหาพลังงานอย่างอื่นมาทดแทน เอทานอลซึ่งเป็นพลังงานสะอาดที่ไม่ทำให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อมเป็นแหล่งพลังงานหนึ่งที่น่าสนใจโดยเฉพาะสำหรับประเทศไทยที่มีวัตถุดิบที่ได้จากการเกษตรที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ดีจำนวนมาก เช่น น้ำ อ้อย กากน้ำตาล มันสำปะหลัง ข้าวฟ่าง ข้าว เป็นต้นซึ่งจากรายงานของ Laopaiboon และ Laopaiboon (2011) กระบวนการผลิตเอทานอลโดยใช้เทคนิคการตรึงเซลล์เป็นทางเลือกที่เหมาะสมสำหรับการเพิ่มความสามารถในกระบวนการผลิตและลดต้นทุนการผลิตได้ ข้อดีหลักๆของการใช้เซลล์ที่ถูกตรึงรูปเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อิสระคือ ระบบจะมีความเข้มข้นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้น เซลล์ได้รับการปกป้องจากสารพิษตลอดจนช่วยลดค่าใช้จ่ายในส่วนกระบวนการแยกเซลล์ และการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาการนำซังข้าวโพดมาใช้เป็นวัสดุสำหรับการตรึงเซลล์ *Saccharomyces cerevisiae* และศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้วัสดุพยุงในการผลิตเอทานอลซึ่งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการลดต้นทุนในกระบวนการผลิตและยังเป็นการใช้ประโยชน์จากสิ่งเหลือใช้ธรรมชาติ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอน โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายตรึงบนซังข้าวโพด
2. เพื่อศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายตรึงบนซังข้าวโพด
3. เพื่อศึกษาผลของการล้างเซลล์ด้วยกากน้ำตาลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายตรึงบนซังข้าวโพด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เพื่อศึกษาระยะเวลาในการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายตรึงบนซังข้าวโพด

1.3 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

1. ทำการทดสอบปัจจัยแหล่งคาร์บอนโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นที่ต่างกันในการผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลาย
2. ทำการทดสอบปัจจัยแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นที่ต่างกันในการผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลาย
3. ทำการเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ได้ระหว่างการล้างเซลล์กับการไม่ล้างเซลล์ในการผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลาย

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลาย ได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นและความเข้มข้นของยีสต์สกัด
2. ทราบผลความแตกต่างระหว่างการล้างเซลล์กับการไม่ล้างเซลล์ในการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล (Ethanol)

2.1.1 คุณสมบัติทั่วไป

เอทานอล (Ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่ประกอบด้วยคาร์บอนไฮโดรเจนและออกซิเจน เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ที่สามารถใช้ประโยชน์เพื่อการบริโภคซึ่งหมายถึงรูปแบบใดๆของเอทานอลที่ผ่านการกลั่นและมีความเหมาะสมสำหรับการบริโภคของมนุษย์ตามกฎหมายโดยมักจะมีข้อจำกัดว่าต้องเป็นแอลกอฮอล์ที่ได้จากการหมักด้วยกระบวนการทางธรรมชาติไม่ใช่กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีและเพื่อใช้เป็นเชื้อเพลิงซึ่งเป็นเอทานอลที่มีการกำจัดน้ำออกจนเกือบหมดหรือเอทานอลไร้น้ำที่มีความบริสุทธิ์สูงร้อยละ 99.5 (ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

2.1.2 ประโยชน์ของเอทานอล

เอทานอลสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย เช่น ใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้ในอุตสาหกรรมยา ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม เช่นสีแล็กเกอร์ ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารเคมีและชีวเคมี ใช้ผลิตเป็นอาหาร เช่นน้ำส้มสายชูเจลาติน ใช้ทางด้านการแพทย์ เช่น ใช้เช็ดแผลใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้เป็นตัวรีเอเจนต์ในห้องปฏิบัติการ ใช้เป็นสารเติมแต่งเพิ่มค่าออกเทนและสารป้องกันการน็อกให้แก่น้ำมันเบนซินเป็นต้น

2.1.2.1 ใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ สาเก ไซเดอร์เชอรรี่

2.1.2.2 ใช้เป็นตัวทำละลายในห้องปฏิบัติการเคมีต่างๆ และใช้ในทางเภสัชกรรม เช่น การเตรียมโทนิคในการผลิตยา และเครื่องสำอางค์

2.1.2.3 ใช้เป็นตัวทำละลายในการผลิตผลิตภัณฑ์ทางอุตสหากรรมหลายชนิด

2.1.2.4 ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารเคมีและสารชีวเคมี

2.1.2.5 ใช้เป็นสารลดแรงตึงผิว (co – surfactant)

2.1.2.6 ใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อ (antiseptic)

2.1.2.7 ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อขับเคลื่อนเครื่องยนต์โดยทำการผสมกับก๊าซโซลีน พลังงานจากเอทานอลขณะนี้นักวิทยาศาสตร์ได้มีความสนใจมุ่งเน้นที่จะนำไปผสมกับน้ำมันเบนซิน(gasoline) เพื่อใช้กับเครื่องยนต์และเครื่องยนต์เผาไหม้ภายใน (internal combustionengines) แบบอื่นๆ ประเทศที่ได้มีการนำเอทานอลไปใช้ในรถยนต์แล้ว ได้แก่ บราซิล สหรัฐอเมริกา ในบางรัฐของเม็กซิโกและอินเดีย เป็นต้น ประเทศบราซิลนับเป็นประเทศแรกที่ให้ความสนใจในการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงแทนน้ำมันหรือเป็นส่วนผสมในน้ำมันเพราะนอกจากจะมีคุณภาพทัดเทียมหรือเหนือกว่าน้ำมันเบนซินแล้วยังให้ผลดีในการช่วยลดมลภาวะในอากาศอีกด้วย สิ่งที่สำคัญคือไม่ต้องทำการปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์เพราะมีการทดสอบจนมั่นใจได้ว่าไม่ก่อให้เกิดผลเสียต่อเครื่องยนต์เมื่อนำเอทานอลมาผสมในน้ำมันเบนซินในอัตราส่วนร้อยละ 10 : 90

2.1.1.8 ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนให้แก่น้ำมันเบนซินสำหรับรถยนต์เอทานอลสามารถทดแทนสารเอ็มทีบีอี (methyl – tert – butyl ether; MTBE) ซึ่งเป็นสารเพิ่มออกซิเจนและค่าออก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทนในน้ำมันเบนซินได้ นอกจากนี้ยังเป็นการช่วยให้ประหยัดเงินตราต่างประเทศได้ซึ่งจะลดการนำเข้าสารเอ็มทีบีอีได้เป็นมูลค่าสามพันล้านบาทต่อปี

2.1.3ประเภทของเอทานอล (วัชราและสุภัตรา, 2546)

ประเภทของเอทานอลมี 4 ประเภทดังนี้

2.1.3.1 Denatured alcohol (88.0 OGL) เป็นเอทานอลที่ใช้สำหรับให้ความร้อนและแสง

2.1.1.2 Fine alcohol (96.0 – 96.5 OGL) เป็นเอทานอลที่ใช้ได้ในทางการแพทย์เภสัชกรรมการผลิตเครื่องสำอางค์และเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม

2.1.3.3 Industrial alcohol (96.5 OGL) เป็นเอทานอลที่ใช้สำหรับทางอุตสาหกรรมหรือเป็นรีเอเจนต์ในห้องปฏิบัติการ

2.1.3.4 Absolute alcohol หรือ Anhydrous alcohol (99.7 – 99.8 OGL) เป็นเอทานอลที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงในการเผาไหม้ในเครื่องยนต์

หมายเหตุ OGL หมายถึง The degree Gay – Lussac ซึ่งสามารถวัดค่านี้ได้โดยการใช้เครื่องไฮโดรมิเตอร์ซึ่งจะอ่านเป็นร้อยละโดยปริมาตรของเอทิลแอลกอฮอล์ในส่วนผสมของเอทิลแอลกอฮอล์ต่อน้ำ

2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีดังนี้

2.2.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี ได้จากกระบวนการแคทตาไลติกไฮเดรชัน (catalytic hydraion) โดยใช้สารเอทิลลีน (ethylene) เป็นวัตถุดิบซึ่งเป็นอนุพันธ์สารปิโตรเลียมเอทานอลที่ได้จะเรียกว่าเอทานอลสังเคราะห์ (synthetic Ethanol)

2.2.2 กระบวนการทางชีวเคมี ได้จากกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ซึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เอทานอลที่ได้จะเรียกว่าไบโอเอทานอล (bioethanol) วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆดังนี้

(1) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำอ้อย กากน้ำตาล บีตรูท ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น ซึ่งยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการใดๆ

(2) วัตถุดิบประเภทแป้งได้แก่ผลผลิตทางการเกษตรจำพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่างและพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้นซึ่งแป้งเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำแป้งมาผ่านกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) จะได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จากนั้นจุลินทรีย์จึงสามารถเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นเอทานอล

(3) วัตถุดิบประเภทเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตรเช่นฟางข้าว ชาน อ้อยซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ขี้เลื่อยวัชพืชรวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษเป็นต้น วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยส่วนประกอบสำคัญ 3 ชนิดคือเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน ส่วนใหญ่วัตถุดิบในกลุ่มนี้จะทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอลทางชีวเคมี

การผลิตเอทานอลประกอบด้วยขั้นตอนหลักๆ 3 ขั้นตอน ได้แก่ การเตรียมและการปรับสภาพวัตถุดิบ การย่อย และการหมัก โดยมีรายละเอียดแต่ละขั้นตอนดังนี้

2.3.1 การเตรียมและการปรับสภาพวัตถุดิบ (Pretreatment)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมักเป็นขั้นตอนแรกในการผลิตเอทานอลมีอยู่หลายรูปแบบขึ้นกับชนิดของวัตถุดิบที่นำมาใช้ได้แก่

(1) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล วัตถุดิบที่เป็นกากน้ำตาลเพียงเจือจางด้วยน้ำเพื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมสามารถนำไปหมักได้เลย

(2) วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น หัวมันสำปะหลังจะมีวิธีการจัดเตรียมค่อนข้างซับซ้อน จะต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์เพื่อทำให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมก่อนจะทำการหมักต่อไป

(3) วัตถุดิบประเภทเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตรเนื่องจากในกระบวนการหมักใช้เฉพาะเซลลูโลสจึงต้องแยกลิกนิน (lignin) และเฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) ออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อนเพราะองค์ประกอบทั้งสองทำให้กระบวนการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ลดลงและเป็นอุปสรรคต่อการหมักอีกด้วย นอกจากนี้การปรับสภาพยังช่วยให้เซลลูโลสมีลักษณะอ่อนนุ่มและเป็นการปรับโครงสร้างเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพที่เหมาะสมคือลดความเป็นผลึกของเซลลูโลสและเพิ่มความเป็นรูพรุนของวัตถุดิบส่งผลให้เอนไซม์เข้าถึงและทำปฏิกิริยาได้ดีเพื่อเพิ่มปริมาณการผลิตน้ำตาล ลดการสูญเสียคาร์โบไฮเดรต หลีกเลี่ยงการเกิดตัวยับยั้งในขั้นตอนการไฮโดรไลซิสและการหมัก วิธีการปรับสภาพแบ่งได้เป็น 4 วิธีคือ

3.1) การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (physical Pretreatment) เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบโดยวิธีการตัดการบดเพื่อลดความเป็นผลึกของเซลลูโลส ทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้นการบดสามารถทำลายความเป็นผลึกของเซลลูโลสและเพิ่มการย่อยสลายให้ง่ายขึ้น

3.2) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (chemical Pretreatment) จะใช้สารละลายกรดเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลสเพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลสหรือใช้สารละลายเบสเพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของเฮมิเซลลูโลสและลิกนิน เช่น การใช้สารประกอบอัลคาไลน์ (alkali pretreatment) การใช้แอมโมเนีย (ammonia Pretreatment) การใช้กรด (acid pretreatment) เป็นต้น

3.3) การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีฟิสิกส์ (physico-chemical pretreatment) เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การปรับสภาพฟางข้าวด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) ในสภาวะความดันสูง พบว่าประสิทธิภาพในการปรับสภาพฟางข้าวจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโซเดียมไฮดรอกไซด์และความร้อนที่เพิ่มขึ้น

3.4) การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (biological pretreatment) เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรง นอกจากนี้ยังช่วยลดความเป็นผลึกอีกด้วย

2.3.2 กระบวนการย่อย

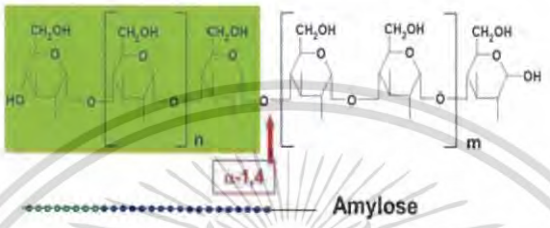
(1) วัตถุดิบประเภทแป้ง การผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้งจะต้องนำไปผ่านกระบวนการย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อนด้วยวิธีการทางเคมีฟิสิกส์หรือวิธีทางชีวภาพเพื่อเปลี่ยนแป้งให้มีโครงสร้างโมเลกุลอยู่ในรูปน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (น้ำตาลกลูโคส) กระบวนการที่นิยมใช้มี 2 วิธีคือ

1.1) การใช้กรด (acid hydrolysis) การใช้กรดย่อยแป้งให้กลายเป็นกลูโคสนิยมใช้กรดเกลือ (HCl) กรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) กรดไนตริก (HNO_3) กรดกำมะถัน (H_2SO_4) และกรดไนตริก ปัจจุบันการใช้กรดในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลไม่เป็นที่นิยมเนื่องจากการย่อยแป้งด้วยกรดต้องทำปฏิกิริยา

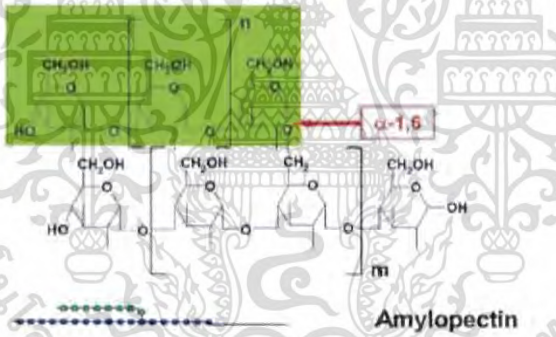
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิสูงซึ่งประสิทธิภาพในการย่อยจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกรดชนิดของกรด เวลาและอุณหภูมิในการย่อยอีกทั้งยังก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการเช่นสารเฟอร์ฟูรอล

1.2) การใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) เป็นวิธีการใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้ง การใช้เอนไซม์ย่อยแป้งจะเป็นที่นิยมมากกว่าเนื่องจากเป็นวิธีการที่สะดวกและประหยัดต้นทุนการผลิตให้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงรวมทั้งไม่ทำลายสิ่งแวดล้อมการย่อยสลายแป้งอาศัยการทำงานของเอนไซม์ 2 กลุ่มคือเอนไซม์ที่ใช้ในการตัดพันธะα-1,4 ที่เชื่อมระหว่างกลูโคสแต่ละหน่วยและเอนไซม์ที่ตัดพันธะα-1,6 ที่เป็นสาขาเชื่อมอะไมโลแพกตินซึ่งโครงสร้างของอะไมโลสและอะไมโลเพกตินแสดงได้ดังรูปประกอบที่ 2.1



(ก) อะไมโลส



(ข) อะไมโลเพกติน

รูปที่ 2.1 แสดง (ก) อะไมโลสเกิดจากกลูโคสแต่ละหน่วยเชื่อมต่อกันด้วยพันธะα-1,4
(ข) อะไมโลแพกตินเกิดจากกลูโคสที่ต่อเป็นแขนงด้วยพันธะα-1,6
ที่มา : http://5e.plantphys.net/article.php?ch=t&id=422 (วันที่12 พฤศจิกายน 2558)

การย่อยสลายแป้งโดยใช้เอนไซม์ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนใหญ่ๆ คือ Liquefaction และ Saccharification (กล้าณรงค์, 2549)

1. Liquefaction เมื่อใส่น้ำเย็นลงไปผสมกับน้ำแป้งเม็ดแป้งจะดูดน้ำได้ปริมาณหนึ่งทำให้เม็ดแป้งมีความชื้นเพิ่มมากขึ้นแต่ไม่สามารถพองตัวได้เนื่องจากแป้งประกอบด้วยพันธะ 1,4 และ 1,6 แอลฟาไกลโคซิดิกที่ยึดจับกันอย่างหนาแน่น เมื่อให้ความร้อนจนถึงอุณหภูมิประมาณ 60-70 องศาเซลเซียส ทำให้การจับตัวระหว่างโมเลกุลของแป้งคลายตัวลงเกิดปฏิกิริยารับน้ำและเกิดการพองตัวของเม็ดแป้งทำให้สารละลายแป้งมีความหนืดและใสเรียกว่าGelatinization เมื่อให้ความร้อนต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จนอุณหภูมิสูงขึ้นประมาณ 100-105 องศาเซลเซียส เอนไซม์แอลฟาอะไมเลสจะทำการย่อยแป้งที่ตำแหน่ง 1,4 แอลฟาไกลโคซิดิกแบบสุ่มทำให้ความหนืดลดลงได้ผลผลิตเป็นมอลโตสเดกซ์ตรินและโอลิโกแซคคาไรด์ขั้นตอนนี้เรียกว่า Liquefaction

2. Saccharification หลังจากทำขั้นตอน Liquefaction จนได้มอลโตสเดกซ์ตรินและโอลิโกแซคคาไรด์แล้วเติมเอนไซม์กลูโคอะไมเลสเพื่อย่อยสลายพันธะ 1,4 และ 1,6 แอลฟาไกลโคซิดิกของโมเลกุลมอลโตสเดกซ์ตรินและโอลิโกแซคคาไรด์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้นที่อุณหภูมิ60 องศาเซลเซียสจนได้กลูโคสออกมาขั้นตอนนี้เรียกว่า Saccharification

(2) วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส

เนื่องจากวัสดุชนิดลิกโนเซลลูโลสมีองค์ประกอบของเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ดังนั้นเมื่อทำการย่อยเซลลูโลสจะได้น้ำตาลออกมาถ้าการย่อยเกิดอย่างสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสอย่างเดียวแต่ถ้าไม่สมบูรณ์จะเกิดทั้งกลูโคสและโอลิโกแซคคาไรด์ ส่วนเฮมิเซลลูโลสจะได้น้ำตาลหลายชนิดซึ่งจะขึ้นกับโครงสร้างของน้ำตาลในเฮมิเซลลูโลส สำหรับการย่อยมี 2 วิธีด้วยกันคือ

2.1) การย่อยทางเคมีเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสให้ได้กลูโคสเป็นผลิตภัณฑ์โดยตรงสามารถใช้กรดเข้มข้นหรือกรดเจือจางได้แก่กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 70 ขึ้นไปกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 40 ขึ้นไปกรดซัลฟิวริกเจือจางร้อยละ 1 เป็นต้นวิธีนี้ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อยเพราะมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้นเนื่องจากน้ำตาลที่เกิดขึ้นจะทำปฏิกิริยาต่อทำให้ได้ผลพลอยได้อื่นๆ เช่น สารเฟอร์ฟูรอลและกรดอาจทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสทำให้ได้ผลผลิตที่ไม่ต้องการและต้องย่อยที่อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160 องศาเซลเซียสซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรงและไม่เฉพาะเจาะจง

2.2) การย่อยโดยใช้เอนไซม์เอนไซม์จะทำปฏิกิริยาย่อยสลายเซลลูโลสได้ผลผลิตเป็นน้ำตาลเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการยอยสลายเซลลูโลสคือเอนไซม์เซลลูเลส (Cellulase) การเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์เป็นปฏิกิริยาที่จำเพาะเจาะจงและไม่รุนแรงทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์สูงแต่ใช้เวลานานเมื่อเทียบกับวิธีทางเคมีซึ่งส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิดทั้งราและแบคทีเรีย ที่นิยมนำมาใช้คือเซลลูเลสที่ได้จาก *Trichoderma viride* หรือภายหลังจัดอยู่ใน *T. reessi*

2.3.3 การหมัก (fermentation) มีรากศัพท์มาจากคำกิริยาภาษาลาตินที่เรียกว่าฟีเวอร์ (fervere) แปลว่าการเดือด (to boiling) โดยเกิดเป็นฟองปุดขึ้นมาในน้ำสกัดผลไม้หรือเมล็ดข้าวมอลท์ซึ่งเป็นการเปลี่ยนแปลงทางเคมีเนื่องจากยีสต์ย่อยสลายน้ำตาลภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนเกิดเป็นฟองแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ผุดขึ้นมาเหมือนน้ำเดือด ในทางชีวเคมีการหมักหมายถึงกระบวนทางชีวเคมีภายในเซลล์เพื่อสร้างพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์หรือการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของสารประกอบอินทรีย์ด้วยเอนไซม์โดยมีสารอินทรีย์เป็นทั้งตัวให้และตัวรับอิเล็กตรอน การหมักทำหลังจากเตรียมวัตถุดิบเรียบร้อยแล้วนำมาเทลงในถังหมัก (fermentor) ซึ่งอาจนำมาผ่านหรือไม่ผ่านขั้นตอนการฆ่าเชื้อก็ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของการหมักและวัตถุดิบที่ใช้โดยทั่วไปจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ได้ประมาณร้อยละ 14-18 สารอาหารที่ต้องเตรียมเพิ่มเติมคือแอมโมเนียมซัลเฟสประมาณ 700-400 กรัมต่อลิตร ซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ทำการเติมกรดซัลฟิวริกเพื่อปรับความเป็นกรดด่างให้เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ประมาณ 4.5-5.0 จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ประมาณร้อยละ 5-8 โดยมวลการหมักจะใช้เวลาประมาณ 2-3 วันในสภาวะไร้อากาศที่อุณหภูมิประมาณ 25-30 องศาเซลเซียส จะได้เอทานอลที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยปริมาตรตามทฤษฎีการหมักเอทา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอลโดยใช้น้ำตาลกลูโคสถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นร้อยละ 100 ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้ร้อยละ 51.11 โดยมวลและก๊าซคาร์บอนได้ออกไซด์ร้อยละ 48.89 โดยมวล

2.3.3.1 การหมักแอลกอฮอล์สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดได้แก่

(1) การหมักแบบกะ (batch fermentation) เป็นกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์โดยอาศัยการเติมวัตถุดิบสารอาหารและหัวเชื้อลงไปในถังหมักเพียงครั้งเดียวตลอดกระบวนการ

(2) การหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (fed batch fermentation) เป็นกระบวนการที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารลงไปในถังหมักมากกว่า 1 ครั้งขึ้นไปเพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบและสารอาหารได้ในปริมาณสูงขึ้น

(3) การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation) เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมวัตถุดิบและสารอาหารเข้าไปในถังหมักและแยกเอาผลิตภัณฑ์ออกมาตลอดเวลาทำให้สามารถผลิตผลิตภัณฑ์ได้สูงสุดในระยะเวลาเท่ากันเมื่อเทียบกับการหมักทั้งสองชนิดที่กล่าวมา

2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (คณะกรรมการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร, 2545) วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอลแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ๆดังนี้คือ

(1) วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ธัญพืช ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่างและพวกพืชหัวเช่นมันสำปะหลังมันฝรั่งมันเทศเป็นต้น

(2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กาก น้ำตาล ข้าวฟ่างหวาน บีทรูทเป็นต้น

(3) วัตถุดิบประเภทเส้นใยส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืชรวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษเป็นต้น

2.5 จุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยยีสต์นั้นในระดับอุตสาหกรรมมีกระบวนการผลิตแตกต่างกันไปรวมถึงยีสต์ที่ได้รับความสนใจและเลือกใช้ในการหมักได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvaum* (*carlsbergensis*), *Shizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces* species สำหรับแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจและมีการนำมาใช้ในกระบวนการหมักได้แก่ *Zymomonas mobilis* ซึ่งการเลือกใช้จุลินทรีย์ชนิดใดก็ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่นำมาใช้ สำหรับ *Zymomonas mobilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* ต่างมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรม กรณีเลือกใช้ *Z. mobilis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงแต่มีชีวมวลต่ำและมีความทนต่อเอทานอลต่ำกว่ายีสต์จึงจำเป็นต้องมีความระมัดระวังในเรื่องของการกำจัดเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเมื่อคำนึงถึงแง่เศรษฐศาสตร์โรงงานอุตสาหกรรมทั่วไปจึงให้ความสนใจ *S. cerevisiae* มากกว่าอีกทั้ง *Z. mobilis* (ชุติมา, 2548) คุณสมบัติของยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลที่นำมาใช้ในการผลิตเอทานอลควรมีลักษณะดังนี้ (นฤมล, 2549)

(1) สามารถใช้สารตั้งต้นได้หลากหลายชนิด

(2) ให้ผลผลิตสูงและมีอัตราการหมักเอทานอลเร็วทำให้ต้นทุนการผลิตลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(3) มีความทนต่อเอทานอลเนื่องจากระหว่างการหมักจะมีเอทานอลบางส่วนสะสมอยู่ในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์ยีสต์แตกได้ยีสต์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงจึงส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

(4) มีความทนต่ออุณหภูมิสูง (thermotolerance) เพราะในกระบวนการผลิตเอทานอลจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้อุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น มีผลต่อการอยู่รอดและกิจกรรมการทำงานของยีสต์ ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงจึงช่วยให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

(5) ทนพีเอช (pH) ต่ำหรือทนกรด (acid tolerance) ในกระบวนการผลิตจะเกิดกรดทำให้พีเอชของอาหารลดลง ยีสต์ที่สามารถทนพีเอชต่ำได้จะช่วยให้มีผลการผลิตเอทานอลสูงขึ้นด้วย

(6) มีความทนต่อการเปลี่ยนแปลงในสภาวะต่างๆของการหมักและมีพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายส่งผลให้ประสิทธิภาพและคุณภาพในการผลิตเอทานอลสม่ำเสมอ

(7) มีความสามารถในการตกตะกอน (flocculation) ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวและนำเซลล์ยีสต์กับมาใช้ใหม่ได้

(8) มีความทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance) ทำให้สามารถใช้อาหารที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูงๆและช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ทนต่อแรงดันออสโมซิสจึงมีผลการผลิตเอทานอลมากขึ้น

2.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอล (ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

ปัจจัยหลายอย่างที่มีบทบาทสำคัญในการยับยั้งปฏิกิริยาการผลิตเอทานอลทำให้ผลิตเอทานอลได้น้อยลงซึ่งปัจจัยหลักๆได้แก่

(1) การยับยั้งการผลิตเอทานอลโดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือเอทานอลทำหน้าที่เป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยา

(2) การยับยั้งการผลิตเอทานอลโดยกรดอินทรีย์ซึ่งเป็นผลผลิตพลอยได้จากการหมัก

(3) การยับยั้งโดยแรงดันออสโมซิสเนื่องจากมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง

(4) การยับยั้งเนื่องจากผลของอุณหภูมิที่เพิ่มมากขึ้น

(5) การยับยั้งกระบวนการหมักแต่ไปส่งเสริมการเจริญของยีสต์เนื่องจากการให้อากาศหรือการกวน

(6) การยับยั้งกระบวนการหมักเนื่องจากการปนเปื้อนจากแบคทีเรียหรือยีสต์ชนิดอื่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งการหมักในระดับอุตสาหกรรม

(7) การยับยั้งกระบวนการหมักเนื่องจากสายพันธุ์ยีสต์ที่เลือกใช้ไม่คงตัว มีการกลายพันธุ์หรือมีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

นอกจากนี้ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์มีดังนี้

1. ความเข้มข้นของเอทานอล

เอทานอลมีผลต่อการเติบโตของยีสต์ การมีเอทานอลสะสมอยู่ในถังหมักถือว่าเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่ไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Roehr, 2001) ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 1-2 โดยน้ำหนักทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าลงและที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เกือบหยุดลง (Brown และคณะ, 1981) ได้ทำการศึกษาและชี้ให้เห็นว่าผลของการยับยั้งนั้นมีความซับซ้อนมาก ยิ่งไปกว่านั้นถ้ามีการเติมเอทานอลในช่วง log phase ทำให้อัตราการเจริญของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็ว (อาจเป็นผลเนื่องมาจากการสังเคราะห์โปรตีน) ทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพอย่างถาวร

โดยทั่วไปพบว่าเอลยีสต์ (Ale Yeast) หรือยีสต์ที่ลอยอยู่บนผิวหน้าเมื่อเกิดการหมักมีความทนต่อเอทานอลน้อยกว่าลาเกอร์ยีสต์ (Lager Yeast) หรือยีสต์ที่นอนก้นจมอยู่ด้านล่าง เมื่อเกิดการหมักโดยยีสต์ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศหรือในสภาวะที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัว พบว่ามีการตอบสนองต่อเอทานอลน้อย (Smart, 2000) แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงช่วยส่งเสริมให้ความเป็นพิษของเอทานอลมีมากขึ้น การผลิตเอทานอลลดลงเมื่อยีสต์อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้และการผลิตเอทานอลมีมากขึ้นเมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะของอุณหภูมิต่ำสุดของการเจริญ (Casey and Ingledew, 1985)

เอทานอลมีผลต่อการยับยั้งแบบไม่แข่งขันในการขนส่งกลูโคสมอลโทสแอมโมเนียและกรดอะมิโนต่างๆยีสต์สายพันธุ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวปริมาณมากสามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูงๆมากกว่ายีสต์สายพันธุ์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่น้อยซึ่งมีลักษณะเหมือนว่าผลของเอทานอลไปส่งเสริมให้ไฮโดรเจนไอออน (Hydrogen ion) ไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์มากขึ้นซึ่งการไหลผ่านของไฮโดรเจนไอออนนี้ไม่ได้ผ่านทาง ATPase ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรงจึงทำให้เกิดความต่างระดับของโปรตอนกระจายไปทั่วเยื่อหุ้มเซลล์จึงไปมีผลต่อการยับยั้งการขนส่งสารละลายต่างๆนอกจากนี้ยังพบว่าไมโทคอนเดรียมีบทบาทสำคัญต่อการทนเอทานอลของยีสต์ (Smart, 2000) และยีสต์ที่มีขนาดของเซลล์เล็กสามารถทนต่อเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ที่มีขนาดของเซลล์ใหญ่ (Panchal, 1990)

2. ความเข้มข้นของน้ำตาล

อาหารสำหรับหมักที่มีน้ำตาลสูงกว่าร้อยละ 15 ทำให้การหมักเอทานอลของยีสต์จะหยุดลง (Nagodawithana และคณะ, 1976; Panchal และ Stewart, 1980) ดังนั้นการใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* มาหมักในสภาวะเช่นนี้จึงมีผลให้การหมักเป็นไปได้ช้าๆและเมื่อเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิส เช่น *Saccharomyces rouxii* พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงแต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำ (Panchal and Stewart,1980; D'Amore และคณะ 1988)

3. สารอาหารและโคแฟกเตอร์

สารอาหารบางอย่างอาจมีไม่เพียงพอสำหรับการหมักซึ่งรวมถึงแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำเช่นแอมโมเนียมไอออน (Ammonium ion) วิตามินหรือแร่ธาตุต่างๆเช่นสังกะสี ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์ แมกนีเซียมและแคลเซียมการเติมสารอาหารให้กับยีสต์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะเมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 16 (Rose และ Harrison, 1993) ซึ่งสารอาหารที่มีความจำเป็นมีดังนี้

3.1 ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์และเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นนับว่าเป็นส่วนสำคัญที่กระตุ้นการหมักหรือการผลิตเอทานอล โดยในตัวของยีสต์จะมีปริมาณไนโตรเจนประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้ง โดยส่วนใหญ่ยีสต์จะสามารถใช้ไนโตรเจนในรูปแอมโมเนียมไอออนได้ซึ่งอาจเติมในรูปของไดแอมโมเนียมฟอสเฟตหรือแอมโมเนียมซัลเฟต ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลนิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่เป็นแหล่งให้ธาตุไนโตรเจนและให้ซัลเฟอร์ไปพร้อมกัน(สำหรับยีสต์บางชนิดอาจใช้ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโน) (Rose และ Harrison, 1993)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ฟอสฟอรัสปกติใส่ในรูปของฟอสเฟตซึ่งเป็นไอออนิกแฟคเตอร์ (สาวิตรี, 2540) จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์แต่ความเข้มข้นไม่ควรเกินร้อยละ 4 ของน้ำหนักแห้ง (Rose and Harrison, 1993)

3.3 ซัลเฟอร์ปกติในอุตสาหกรรมใช้ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟตจัดเป็นธาตุอาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับฟอสฟอรัสและความเข้มข้นโดยทั่วไปไม่ควรเกินร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้ง (Rose และ Harrison, 1993)

3.4 ธาตุที่มีความเข้มข้นเฉลี่ยน้อยกว่า 100 ส่วนในล้านส่วนของส่วนผสมทั้งหมดสำหรับบริวเวอร์ยีสต์ความต้องการแร่ธาตุค่อนข้างหลากหลายโดยเฉพาะพวกที่เป็นประจุบวก ได้แก่ สังกะสี แมงกานีส แมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดง โพแทสเซียมและเหล็ก

3.5 วิตามิน ความต้องการวิตามินในการเจริญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ส่วนมากบริวเวอร์ยีสต์มีความต้องการไบโอติน โดยไบโอตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์คาร์บอกซีเลส (carboxylase) เพื่อใช้สำหรับสังเคราะห์ไขมันที่จำเป็นมียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ต้องการแพนโททีเนตเป็นปัจจัยการเจริญ ซึ่งแพนโททีเนตนี้เป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์เอ (coenzyme A) และมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและไขมัน นอกจากนั้นเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ซัลเฟอร์เพื่อเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนสำหรับอินอซิทอล (inositol) มีความต้องการเป็นบางครั้งเพราะใช้เป็นองค์ประกอบของฟอสฟอลิพิดขณะที่ไพริดอกซิน (pyridoxine) และไทอะมีน (thiamine) นั้นมีความจำเป็นต่อ brewer's topyeasts หรือเอลยีสต์ ซึ่งวิตามินต่างๆเหล่านี้เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตและเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน (Smart, 2000)

4. สภาวะแวดล้อม

4.1 พีเอช เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน ค่าพีเอชของโปรโตพลาสซึมภายในเซลล์นั้นไม่เหมือนกัน ยีสต์สามารถรักษาระดับพีเอชภายในเซลล์ได้ค่อนข้างดีเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอชต่างกันและยีสต์สามารถเจริญได้ค่อนข้างดีที่พีเอชระหว่าง 3.6-6.0 แต่พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ระหว่าง 4.5-5.0 (Reed และ Nagodawithana, 1991) สำหรับอาหารที่มีบัฟเฟอร์ต่ำ พีเอชเริ่มต้นสำหรับการหมักที่เหมาะสมควรมีค่าประมาณ 5.5 แต่อาหารที่มีบัฟเฟอร์สูง พีเอชที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 4.5-4.7 (สาวิตรี, 2540)

4.2 อุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ในการหมักจะสูงกว่าการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส (สาวิตรี, 2540) ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่สัมพันธ์กับกระบวนการทางชีวเคมีรวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ยีสต์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส โดยพบว่าเซลล์ยีสต์ในระยะที่มีการเจริญเกิดการตายได้เมื่อนำไปไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50-60 องศาเซลเซียสในเวลาน้อยกว่า 30 นาที (Rose และ Harrison, 1971)

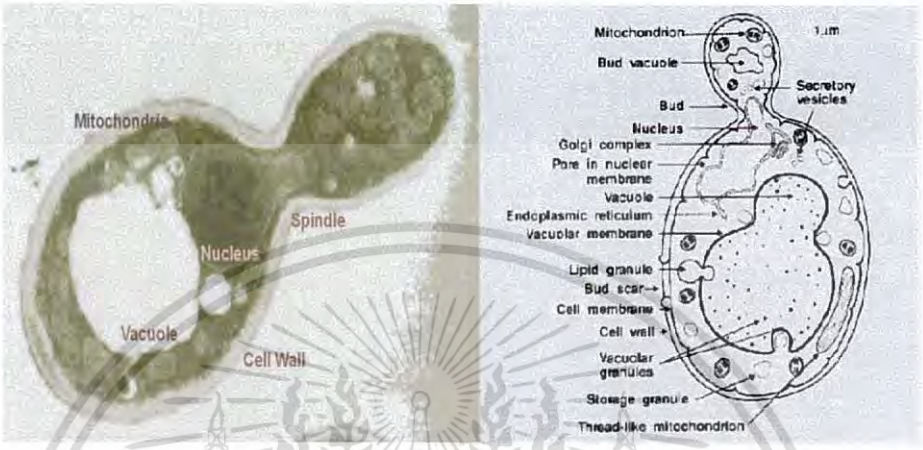
4.3 ออกซิเจน ในกระบวนการหมักยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์เพื่อให้โครงสร้างที่เป็นไขมันมีเสถียรภาพและเพื่อรักษาสภาพของกระบวนการต่างๆที่มีอยู่ทั่วไปในเซลล์ อย่างไรก็ตามการให้ออกซิเจนในการหมักนั้นมีผลให้การผลิตเอทานอลลดลง ในกรณีที่ใช้แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์สำหรับการหมักมีแบคทีเรียหลายชนิดที่ต้องอยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศจึงจะมีการผลิตเอทานอลในปริมาณที่สูงและมีการผลิตชีวมวลของเซลล์ต่ำ

4.4 คาร์บอนไดออกไซด์จะยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนเช่นเดียวกับสภาวะที่อาหารมีพีเอชต่ำและมีความเข้มข้นของเอทานอลสูง (สาวิตรี, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7 ยีสต์ (Yeast)

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งอยู่ในอาณาจักรฟังไจ (Fungi) ซึ่งเป็นอาณาจักรเดียวกับรายีสต์มีเซลล์ชนิดยูคาริโอต (Eukaryote) เป็นเซลล์เดี่ยว รูปร่างกลม รูปไข่หรือเหมือนผลเลมอนมีขนาดใหญ่กว่าแบคทีเรียมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 5 ไมครอน (สาวิตรี, 2540) โดยมีรูปร่างลักษณะดังรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 รูปร่างยีสต์และโครงสร้างภายในเซลล์ของยีสต์
ที่มา: (สาวิตรี, 2540)

2.7.1 การจัดลำดับชั้นอนุกรมวิธานของยีสต์ (ธีระพงษ์และคณะ, 2549)

เป็นการจำแนกยีสต์ออกเป็นหมวดหมู่ตามสายวิวัฒนาการโดยจะเริ่มจาก Kingdom ไป Phylum ไป Class ไป Order ไป Family ไป Genus ไป Species ดังต่อไปนี้

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

2.7.2 สัณฐานวิทยาของยีสต์

โดยทั่วไปขนาดเซลล์ยีสต์ใหญ่กว่าแบคทีเรียแต่ยีสต์ที่ขนาดเล็กที่สุดยังไม่ใหญ่เท่าแบคทีเรียที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ขนาดของยีสต์แตกต่างกันตั้งแต่ความกว้าง 1-5 ไมโครเมตรและความยาว 5-30 ไมโครเมตรหรือมากกว่า มักมีรูปไข่แต่บางชนิดมีรูปร่างยาวและบางชนิดเป็นทรงกลม ยีสต์แต่ละชนิดจะมีรูปร่างโดยเฉพาะแม้จะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ก็ยังมีความแตกต่างที่ขนาดรูปร่างของแต่ละเซลล์ซึ่งขึ้นอยู่กับอายุและสภาพแวดล้อม ยีสต์ไม่มีแฟลกเจลลาหรืออวัยวะอื่นในการเคลื่อนที่

2.7.3 สรีรวิทยาของยีสต์

ในยีสต์พบว่ามีปฏิกิริยาทางสรีรวิทยาแตกต่างกันเช่นเดียวกับสัณฐานวิทยาและกลไกการสืบพันธุ์ การย่อยสลายน้ำตาล เช่น กลูโคสอาจเกิดในลักษณะไม่ใช้ออกซิเจน (กระบวนการหมัก) หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใช้ออกซิเจน (การหายใจ) กระบวนที่นิยมมากที่สุดคือการย่อยสลายแบบไม่ใช้ออกซิเจนหรือกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ซึ่งผลสุดท้ายจะได้เอทิลแอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์ ยีสต์ได้รับไนโตรเจนจากสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ไนโตรเจนเพื่อนำไปสร้างโปรตีนและยีสต์ส่วนใหญ่สามารถใช้แอมโมเนียไอออน ได้ความสามารถในการใช้ไนเตรตและไนไตรต์และสามารถดึงหมู่อะมิโนออกจากกรดอะมิโนช่วยแยกความแตกต่างของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ได้ ยีสต์พวกที่ชอบออสโมซิสสูงสามารถเจริญในที่ที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือน้ำตาลสูงๆได้โดยมีความชื้นจำกัดและยีสต์สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิตั้งแต่ 0-27 องศาเซลเซียสบางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 15 องศาเซลเซียสในขณะที่บางชนิดจะไม่เจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่านี้ อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับยีสต์ส่วนใหญ่อยู่ที่ 20-30 องศาเซลเซียสยีสต์ที่ก่อโรคเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 30-37 องศาเซลเซียสโดยทั่วไปยีสต์เจริญได้ดีในอาหารที่มีความเป็นกรดระหว่างพีเอช 3.5-3.8 ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียส่วนใหญ่ (ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

2.7.4 การขยายพันธุ์ของยีสต์

ยีสต์ส่วนมากขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อ (budding) แต่ยีสต์บางชนิดอาจขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศด้วยการสร้างสปอร์ซึ่งมีชื่อเรียกว่าแอสโคสปอร์ (ascospore) หรือเบสิดิโอสปอร์ (basidiospore) (สาวิตรี, 2540) การขยายพันธุ์ของยีสต์แสดงดังรูปที่ 2.3

รูปที่ 2.3การแตกหน่อของยีสต์
ที่มา: สาวิตรี (2554)

2.7.5 ชนิดของยีสต์

ยีสต์ที่ขยายพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเรียกว่าดิวเทอโรมัยซิท (deuteromycetes) หรือยีสต์เทียม ยีสต์ที่ขยายพันธุ์ได้ทั้งแบบไม่อาศัยเพศและอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์เป็นยีสต์แท้ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มแอสโคมัยซีส (ascomycete) ได้แก่ *Saccharomyces* ยีสต์เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ยีสต์ที่เจริญได้ในภาวะที่มีออกซิเจนเรียกว่ายีสต์ออกซิเดทีฟ(oxidative yeast) โดยเกิดเป็นฟิล์มที่ผิวหน้าของอาหารเหลว ส่วนยีสต์ที่เจริญได้ทั้งภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนเจริญได้ทุกส่วนของอาหารจัดเป็นพวกเฟอร์เมนเตทีฟยีสต์ (fermentative yeast) (สาวิตรี, 2540)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.7.6 นิเวศวิทยาของยีสต์

ยีสต์พบทั่วไปในธรรมชาติและแพร่กระจายไปโดยอาศัยแมลงและกระแสลม ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นแซโพรไฟต์ (saprophytism) อาศัยอยู่บนสารอินทรีย์ที่ตายแล้วบางชนิดเป็นปรสิตอาศัยโฮสต์ที่มีชีวิตและทำให้เกิดโรคแก่คนและพืชได้จากการสำรวจพบว่ายีสต์สามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมทุกชนิดทั้งน้ำจืด น้ำเค็ม ปากอ่าวและพบมากที่สุดที่ชายฝั่งเนื่องจากมีสารอาหารสะสมมากอย่างไรก็ตามก็ยังพบยีสต์ในกลางมหาสมุทรที่มีความลึก 4000 เมตรในทะเลดำ จำนวนยีสต์ที่มีมากที่ระดับ 1000 เมตรแรกของระดับน้ำแต่ยิ่งลึกลงไปก็จะพบยีสต์เพียงร้อยละ25 อาจเนื่องจากความเข้มข้นของออกซิเจนลดลงและมีความเข้มข้นของไฮโดรเจนซัลไฟด์มากในทะเลสาบออนตาริโอพบยีสต์ได้ทั้งในน้ำและในตะกอนดินแต่ยีสต์จะแตกต่างกันตามความลึก(ธีระพงษ์ และคณะ, 2549)

2.2.7 การใช้ยีสต์ในทางอุตสาหกรรม (มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมธิราช, 2526)

(1) การใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิตเหล้า เบียร์ ไวน์

(2) การใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์

(3) การใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิตซีอิ้ว

(4) การใช้ยีสต์ในอุตสาหกรรมการผลิตการทำขนมปัง

(5) การใช้ยีสต์ในการผลิตอาหารเสริมของสัตว์จากน้ำเสียของโรงงานกระดาษ

2.8 กากน้ำตาล

กากน้ำตาล (Molasses) เป็นของเหลวสีดำที่เหนียวข้น (รูปที่ 2.3) ซึ่งไม่สามารถจะตกผลึกน้ำตาลได้อีกเป็นเนื้อของสิ่งที่ไม่ใช่น้ำตาลที่ละลายปนอยู่ในน้ำอ้อยซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ทและสารเคมี เช่นปูนขาว ซึ่งใช้ในการตกตะกอนให้น้ำอ้อยใส ส่วนประกอบของกากน้ำตาลจะไม่แน่นอนขึ้นอยู่กับพันธุ์อ้อยและกรรมวิธีการผลิต แต่ส่วนมากพบว่าส่วนประกอบส่วนใหญ่คือน้ำตาลซูโครส น้ำตาลอินเวอร์ทและน้ำ ปัจจุบันนี้โรงงานน้ำตาลที่ทันสมัยมีความสามารถในการสกัดน้ำตาลออกจากกากน้ำตาลได้มากขึ้นแต่ก็ยังมีหลงเหลืออยู่เพราะการสกัดออกทั้งหมดจะสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายสูง ดังนั้นจึงมีน้ำตาลซูโครสบางส่วนที่สูญเสียไปกับกากน้ำตาลซึ่งเป็นการสูญเสียค่อนข้างมากเมื่อเปรียบเทียบกับการสูญเสียแบบอื่น (นฤมล, 2549)

รูปที่ 2.4 กากน้ำตาล(Molasses)
ที่มา: นฤมล (2549)

กากน้ำตาลมี 3 ชนิดได้แก่ (ปริษฎางค์, 2547)

1. Blackstrap molasses หรือ final molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวมีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 50-60 การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมจะใช้น้ำตาลประเภทนี้เป็นวัตถุดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Refinery molasses คือกากน้ำตาลที่ได้จากการผลิตน้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์มีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 48

3. Highest molasses หรือ Invert molasses คือกากน้ำตาลที่ไม่ใช่ได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาลแต่ได้จากการนำบางส่วนของน้ำอ้อยไปแปรสภาพให้เข้มข้นโดยการระเหยซึ่งมีปริมาณน้ำตาลร้อยละ 77

2.8.1 การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล (สิริวุทธิ์, 2545)

กระบวนการผลิตเอทานอลประกอบด้วยกระบวนการเตรียมวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล กระบวนการหมักและการแยกผลิตภัณฑ์เอทานอลและการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบนั้นเมื่อปรับความเข้มข้นให้เหมาะสมแล้วสามารถนำไปหมักได้ในกระบวนการหมักจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ซึ่งส่วนใหญ่จะใช้ยีสต์การเลือกใช้ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับวัตถุดิบที่นำมาหมักจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักคือเอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอลโดยกระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลแสดงดังรูปที่ 2.5

รูปที่ 2.5 กระบวนการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล
ที่มา: สิริวุทธิ์ (2545)

การใช้กากน้ำตาลในการผลิตเอทานอลมีข้อดีคือเป็นวัตถุดิบประเภทน้ำตาลจึงไม่ต้องผ่านขั้นตอนในการเตรียมก่อนการหมัก เช่นเดียวกับมันสำปะหลังเพียงแต่ทำการเจือจางกากน้ำตาลด้วยน้ำให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมก็สามารถนำไปใช้ในการหมักด้วยยีสต์ได้ทำให้มีต้นทุนในการผลิตต่ำ แต่ข้อเสียคือการเกิดตะกรันในหอกลั่นทำให้โรงงานต้องหยุดเดินเครื่องเพื่อความสะอาดบ่อยครั้ง นอกจากนี้น้ำกากส่าจากการกลั่นเอทานอลยังมีสีเข้มซึ่งยากแก่การกำจัดสีให้หมดไปทำให้เกิดปัญหาในการระบายน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ (สิริวุทธิ์, 2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2 การใช้ประโยชน์จากกากน้ำตาล

(1) การใช้กากน้ำตาลเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อหรือส่วนผสมของอาหารเลี้ยงเชื้อในการเลี้ยงแบคทีเรีย (Keller, 1967)

(2) การใช้กากน้ำตาลมาเป็นวัตถุดิบในโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งใช้ในการผลิตเอทิลแอลกอฮอล์ บิวธิลแอลกอฮอล์ อาซีโตน กรดซิตริก เป็นต้น (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2510)

(3) การใช้กากน้ำตาลในอุตสาหรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมทำสุรา อุตสาหกรรมการทำผงชูรส อุตสาหกรรมการทำยีสต์ อุตสาหกรรมการผลิตยารักษาโรคบางอย่าง อุตสาหกรรมการทำน้ำปลาและซีอิ้ว (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2510)

(4) การใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งวิตามินบีจำนวนมากมาใช้หรือผลิตเป็นอาหารสัตว์ (กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม, 2510)

(5) การเพาะเลี้ยงสาหร่ายสไปรูลินาพลาเทนซิสซีเอมยู 2 ด้วยน้ำกากส่าเหล้า (กากน้ำตาล) ในระบบบ่อเพาะเลี้ยงน้ำวน (ปาวลี, 2550)

2.9 การตรึงเซลล์ ชยพร (2544)

2.9.1 ความหมายของการตรึงเซลล์

การตรึงเซลล์ได้ดัดแปลงมาจากการตรึงเอนไซม์โดยเป็นการจำกัดขอบเขตหรือสถานที่ทางกายภาพของเซลล์ให้อยู่ในบริเวณที่กำหนด แต่เซลล์ยังคงรักษาสมบัติในการเป็นแหล่งผลิตเอนไซม์ให้มีความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและสามารถใช้เซลล์ตรึงนี้ซ้ำและใช้อย่างต่อเนื่องได้ โดยเซลล์ที่ตรึงนี้อาจอยู่ในสถานะเซลล์ที่กำลังเจริญเซลล์ ระยะพักตัวหรือเซลล์ที่ตายแล้ว นอกจากนี้การตรึงเซลล์ยังเป็นการลดขั้นตอนการสกัดเอนไซม์ การทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยไม่ทำให้เสียความสามารถในการเร่งปฏิกิริยา

ข้อดีของเซลล์ตรึงที่ได้เปรียบกว่าเซลล์อิสระ

1) เซลล์มีเสถียรภาพมากขึ้นกว่าเดิมถ้าวิธีการตรึงนั้นเหมาะสม

2) ใช้สภาวะการทำปฏิกิริยาที่แตกต่างออกไปจากเซลล์อิสระได้

3) แยกสารผลิตภัณฑ์ออกได้ง่าย

4) นำเซลล์กลับมาใช้ซ้ำและต่อเนื่องกันได้หลายครั้งและลดต้นทุนการผลิต

2.9.2 กระบวนการตรึงเซลล์ (cell immobilization process) เทคนิคในการตรึงเซลล์มี3 วิธีคือ การยึดด้วยตัวนำ (carrier-binding method) การเชื่อมขวาง (cross linking method) และการดักติด (entrapment Method)

1) การยึดด้วยพาหะ (carrier-binding method) หมายถึงการเชื่อมเซลล์จุลินทรีย์กับสารพาหะโดยแบ่งได้ 2 วิธี

1. การใช้พันธะโคเวเลนต์ (covalent binding method) เป็นวิธีการเชื่อมเซลล์โดยตรงกับสารพาหะ โดยสารที่เชื่อมนั้นสามารถต่อกับส่วนประกอบที่ยึดเซลล์ได้แก่ กรดอะมิโน กลุ่มคาร์บอกซิล กลุ่มซัลฟีดริล กลุ่มไฮดรอกซิล กลุ่มอิมิดาโซล หรือกลุ่มฟีนอลของโปรตีน วิธีนี้มีข้อดี คือเซลล์เชื่อมอยู่กับผิวหน้าของตัวนำอย่างสม่ำเสมอ มีความคงตัวดี และการรั่วของเซลล์น้อย แต่มีข้อเสียเนื่องจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้ค่อนข้างรุนแรง และความเป็นพิษของสารที่ใช้อาจทำ ให้เซลล์สูญเสียความสามารถได้ วัสดุตรึงรูปที่นิยมใช้คือพอลิเมอร์จำพวกพอลิแซคคาไรด์ (polysaccharide polymers) เช่น เซลลูโลส เด็กซ์ทราน (dextran) แป้ง กลูโคส ซิลิกาที่มี รูพรุน (porous silica) และแก้วที่มีรูพรุน (porous glass) เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2. การเกาะหรือการดูดซับ (adsorption method) เป็นวิธีการตรึงเซลล์โดยให้เซลล์ดูดซับกับสารที่เป็นตัวนำด้วยพันธะไอออนิกหรือพันธะไฮโดรเจน โดยอาศัยหลักทางธรรมชาติเคมี เนื่องจากผนังของเซลล์ประกอบไปด้วยกรดอะมิโนและสารจำพวกเอมีน ซึ่งสามารถเกิดพันธะไอออนิกกับตัวนำได้ การตรึงเซลล์วิธีนี้เป็นวิธีที่ง่าย แต่แรงดูดซับค่อนข้างอ่อนและมีการสูญเสียเซลล์ได้ง่าย เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การไหลของน้ำ การเกิดฟองอากาศและเมื่อมีการแบ่งเซลล์

2) การเชื่อมขวาง (cross-linking method) หมายถึงการเชื่อมเซลล์เข้าด้วยกันโดยใช้สารพวก ไบ (bi-) หรือมัลติฟังก์ชันนอลรีเอเจนต์ (Multi - functional Reagent) เช่น กลูทาอัลดีไฮด์ (glutaraldehyde) และโทลูอีน ไดไอโซไซยาเนต (toluene diisocyanate) เป็นต้น วิธีนี้จะใช้สารเคมีภายใต้สภาวะที่ค่อนข้างรุนแรงทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการดำรงชีวิตได้

3) การดักติด (Entrapment Method) การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้จะต่างจากการตรึงเซลล์ด้วยวิธีทางเคมีโดยที่ไม่ได้มีการเชื่อมติดหรือไม่มีพันธะเกิดขึ้นระหว่างเซลล์กับสารพาหะ ดังนั้นจึงสามารถใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด การตรึงเซลล์ด้วยวิธีนี้แบ่งได้เป็น 2 วิธี คือ

1. การตรึงเซลล์แบบไมโครแคปซูล (microencapsulation) หมายถึงการกักขังเซลล์ไว้ในเยื่อกึ่งผ่านได้ (semipermeable membrane) เช่น คอลลอยเดียน (collodian) หรือ ซิลิโคน (silicone) ซึ่งป้องกันการซึมผ่านของเซลล์ได้ แต่ยอมให้สารอาหารและผลผลิตซึมผ่านได้อย่างอิสระ การตรึงด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ง่ายแต่ไม่แข็งแรงพอที่จะใช้ในอุตสาหกรรม และอาจมีปัญหาการตกตะกอนของเซลล์เกิดขึ้นด้วย

2. การตรึงแบบแลตทิช (Lattice type) หมายถึง การตรึงเซลล์โดยการดักติดไว้ภายในช่องว่าง 3 มิติ ในเจลของสารพอลิเมอร์ การตรึงเซลล์โดยวิธีดักติดทั่วไปจะหมายถึงแบบแลตทิช ซึ่งเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมและประสบความสำเร็จมากที่สุด เนื่องจากใช้ได้กับเซลล์ทุกชนิด ในขณะที่วิธีการอื่นมีข้อจำเพาะและข้อเสียเปรียบมากกว่า การตรึงเซลล์ด้วยวิธีการดักติดนี้นิยมใช้สารพวกไฮโดรเจนเฉื่อย (inert hydrogel) เป็นพาหะดักติด โดยใช้หลักการเกิดเจลซึ่งทำให้เกิดโครงสร้าง 3 มิติที่มีลักษณะเป็นรูพรุน โดยกลไกการเกิดเจลขึ้นกับสารพาหะที่ใช้

2.10 วัสดุที่ใช้ในการตรึงรูป

2.10.1 ข้าวโพดหวาน

ข้าวโพดหวาน (sweet corn) เป็นพืชตระกูลหญ้าวงศ์ (Family) Gramineae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Zea mays saccharata* นิยมปลูกกันอย่างแพร่หลายเพื่อรับประทานฝักสดเพราะฝักมีน้ำตาลมากทำให้มีรสหวานข้าวโพดหวานยังมีคุณประโยชน์มากมายนอกจากจะใช้รับประทานเป็นผักสดแล้วยังสามารถนำไปแปรรูปได้หลายรูปแบบ เช่น ข้าวโพดหวานบรรจุกระป๋องทั้งฝักหรือบรรจุกระป๋องเฉพาะ เมล็ดทำครีมข้าวโพดหวานข้าว โพดแช่แข็งซึ่งผลิตภัณฑ์ต่างๆเหล่านี้สามารถส่งไปจำหน่ายยังตลาดต่างประเทศ เช่น ญี่ปุ่น เกาหลี จีนและกลุ่มประเทศในแถบยุโรป

ข้าวโพดสามารถปลูกได้อย่างกว้างขวางทั่วโลกข้าวโพดสามารถเจริญเติบโตได้ดีบนพื้นที่ซึ่งมีระดับเดียวกับน้ำทะเลไปจนถึงพื้นที่ระดับสูงกว่าน้ำทะเล 3,000-3,900 เมตรแหล่งผลิตข้าวโพดสำคัญๆเรียงตามปริมาณการผลิตมากไปหาน้อยคือ สหรัฐอเมริกา สหภาพโซเวียส รัสเซีย เม็กซิโกสหภาพแอฟริกาใต้ อาร์เจนตินา รูมาเนีย ยูโกสลาเวีย อินเดีย อิตาลี ฝรั่งเศสและอินโดนิเซีย สำหรับในประเทศไทยอาจกล่าวได้ว่าข้าวโพดหวานเป็นพืชที่ปลูกได้ตลอดทั้งปีและปลูกกันทั่วทุกภาคของประเทศแหล่งเพาะปลูกข้าวโพดหวานที่สำคัญได้แก่ภาคเหนือมีแหล่งเพาะปลูกส่วนใหญ่ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
149247

จังหวัดเชียงใหม่ เชียงราย ลำพูน ลำปาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือปลูกกันที่จังหวัดหนองคาย นครพนม ภาคกลางจังหวัดกาญจนบุรี ราชบุรี นครปฐม สุพรรณบุรีส่วนภาคใต้ปลูกกันมากในจังหวัดสงขลา สุราษฎร์ธานี นครศรีธรรมราช ผลผลิตข้าวโพดหวานร้อยละ 75 ของผลผลิตทั้งหมดนำมาแปรรูปเป็นข้าวโพดหวานกระป๋องส่งออกไปยังต่างประเทศซึ่งข้อมูลจากสมาคมผู้ผลิตอาหารสำเร็จรูประบุปริมาณและมูลค่าการส่งออกข้าวโพดหวานกระป๋องแสดงดังรูปที่ 2.6 พบว่าปีพ.ศ. 2550 มีปริมาณส่งออก 151,276 ตันมูลค่า 4,611.80 ล้านบาทปีพ.ศ. 2551 ปริมาณส่งออก 153,384 ตันมูลค่า 4,843.43 ล้านบาทปีพ.ศ. 2552 ปริมาณส่งออก160,816 ตันมูลค่า 5,105.16 ล้านบาทปีพ.ศ. 2553 ปริมาณส่งออก 173,169 ตันมูลค่า 5,108.49ล้านบาทปีพ.ศ. 2554 (มกราคม-มีนาคม) ปริมาณส่งออก 40,614 ตันมูลค่า 1,220 ล้านบาท จึงเป็นโอกาสของประเทศไทยที่จะขยายการผลิตและการส่งออกข้าวโพดหวานต่อไปในอนาคตข้างหน้าได้ (สมาคมผู้ผลิตอาหารสำเร็จรูป, 2554)

รูปที่ 2.6 สถิติการส่งออกข้าวโพดหวานกระป๋อง
ที่มา : http://www.thaifood.org/index.php/home (12 พฤศจิกายน 2558)

2.10.2 ลักษณะทั่วๆไปและลักษณะทางพฤกษศาสตร์

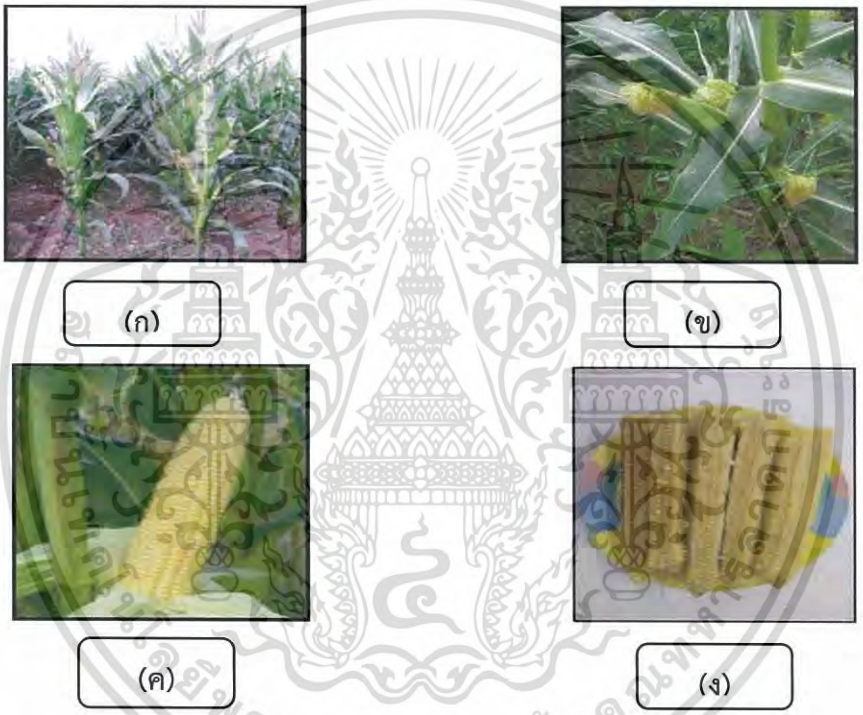
(1) รากรากแรกที่ออกมาจากคัพภะ (Embryo) เป็นรากชั่วคราวเรียกว่าไพรมารี (Primary) หรือเซมินัล (Seminal) หลังจากข้าวโพดเจริญเติบโตได้ประมาณ 7-10 วันรากถาวรจะงอกขึ้นรอบๆ ข้อปลายเมื่อเจริญเติบโตเต็มที่จะแผ่ออกไปโดยรอบประมาณ 100 เซนติเมตรและแทงลึกลงไปในดินแนวดิ่งยาวมากซึ่งอาจยาวถึง 300 เซนติเมตรรากของข้าวโพดเป็นระบบรากฝอย (Fibrous root system)

(2) ลำต้นข้าวโพดมีลำต้นแข็งไส้แน่นไม่กลวงมีความยาวตั้งแต่ 30 เซนติเมตรจนถึง 8 เมตร แล้วแต่ชนิดของพันธุ์ตามลำต้นมีข้อ (Node) และปล้อง (Internode) ปล้องที่อยู่ในดินและใกล้ผิวดินสั้นและจะค่อยๆยาวขึ้นไปทางด้านปลายปล้องเหนือพื้นดินจะมีจำนวนประมาณ 8-20 ปล้องข้าวโพดส่วนมากมีลำต้นสดสีเขียวแต่บางพันธุ์มีสีม่วง

(3) ใบข้าวโพดมีใบลักษณะยาวรีคล้ายพืชตระกูลหญ้าทั่วไปประกอบด้วยตัวใบกาบใบและเขี้ยวใบลักษณะของใบรวมทั้งสีของใบแตกต่างกันไปแล้วแต่ชนิดของพันธุ์บางพันธุ์ใบสีเขียวบางพันธุ์ใบสีม่วงและบางพันธุ์ใบลายจำนวนใบก็เช่นเดียวกันอาจมีตั้งแต่ 8-48 ใบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(4) ดอกข้าวโพดจัดเป็นพวกโมโนอิเซียส (Monoecious) คือมีดอกตัวผู้และดอกตัวเมียแยกอยู่ในต้นเดียวกันช่อดอกตัวผู้ (Tassel) อยู่ตอนบนสุดของลำต้นดอกตัวผู้ดอกหนึ่งจะมีอับเกสร (Anther) 3 อับ แต่ละอับจะมีเรณูเกสร (Pollen grain) ประมาณ 2,500 เม็ดดังนั้นข้าวโพดต้นหนึ่งจึงมีเรณูเกสรอยู่เป็นจำนวนหลายล้านและสามารถปลิวไปได้ไกลกว่า 2,000 เมตรส่วนดอกตัวเมียอยู่รวมกันเป็นช่อเกิดขึ้นตอนข้อกลางๆลำต้นต้นหนึ่งอาจมีหลายช่อแล้วแต่ชนิดพันธุ์ดอกตัวเมียแต่ละดอกประกอบด้วยรังไข่ (Ovary) และเส้นไหม (Silk หรือ Style) ซึ่งมีความยาวประมาณ 5-15 เซนติเมตรและยื่นปลายโผล่ออกไปรวมกันเป็นกระจุกอยู่ตรงปลายช่อดอกซึ่งมีเปลือกหุ้มอยู่ดอกพวกนี้พร้อมที่จะผสมพันธุ์หรือรับละอองเกสรได้เมื่อเส้นไหมโผล่ออกมาหลังจากได้รับการผสมเส้นไหมจะแห้งเหี่ยวและรังไข่เจริญเติบโตเป็นเมล็ดช่อดอกตัวเมียที่รับการผสมแล้วเรียกว่าฝัก (Ear) แต่ละฝักอาจมีเมล็ดมากถึง 1,000 เมล็ดแกนกลางของฝักเรียกว่าซัง (Cob)



รูปที่ 2.7 (ก) ต้นข้าวโพด (ข) ใบข้าวโพด (ค) ฝักข้าวโพด (ง) แกนข้าวโพด
ที่มา : http://frynn.com/ข้าวโพด/ (12 พฤศจิกายน 2558)

2.11 ก๊าซโครมาโตกราฟี (Gas Chromatography) (แม้น, 2555)

ก๊าซโครมาโตกราฟี (GC) เป็นเทคนิคหนึ่งของการวิเคราะห์ด้วยวิธีโครมาโตกราฟีซึ่งนิยมใช้กันอย่างกว้างขวางเพราะมีความสามารถแยกและวิเคราะห์ตัวอย่างที่มีองค์ประกอบซับซ้อนได้และยังให้ผลเที่ยงตรงรวดเร็วกว่าลิควิดโครมาโตกราฟีก๊าซโครมาโตกราฟี มีเทคนิคในการวิเคราะห์ 2 วิธี คือการใช้เฟสอยู่กับที่เป็นของแข็งเรียกว่า “gas-solid chromatography” (GSC) และการใช้เฟสอยู่กับที่เป็นของเหลวเรียกว่า “gas-liquid chromatography” (GLC) ซึ่งทั้งสองวิธีนี้มีเฟสเคลื่อนที่ได้เป็นก๊าซ เทคนิคทั้งสองได้มีการนำมาใช้ในการวิเคราะห์ โดยที่เทคนิคของ GLC เป็นที่นิยมกันมากกว่าก๊าซโครมาโตกราฟีใช้ได้กับสารที่สามารถระเหยกลายเป็นไอ ได้อุณหภูมิของคอลัมน์เท่านั้นดังนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการของก๊าซโครมาโตกราฟีจึงเป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกสารประกอบอินทรีย์เท่านั้นเพราะสารประกอบอินทรีย์สามารถกลายเป็นไอได้ง่ายจะไม่ใช้วิธีก๊าซโครมาโตกราฟีสำหรับการวิเคราะห์สารประกอบอนินทรีย์เพราะสารประกอบอนินทรีย์ไม่สามารถกลายเป็นไอได้ในอุณหภูมิปกติ (ที่ทำการทดลอง) ของคอลัมน์วิธีก๊าซโครมาโตกราฟีสามารถใช้ในการวิเคราะห์ได้ทั้งทางคุณภาพและทางปริมาณ

รูปที่ 2.8 ภาพ เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี
ที่มา : http://www.env.eng.chula.ac.th/?q=content/gas-chromatography-gc\
(12 พฤศจิกายน 2558)

2.12 การวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS อารี (2555)

น้ำตาลรีดิวซ์เป็นน้ำตาลที่มีหมู่อัลดีไฮด์ (aldehyde : CHO) อิสระและสามารถแสดงคุณสมบัติเป็นตัวรีดิวซ์ได้ น้ำตาลรีดิวซ์สามารถรีดิวซ์กรดไดไนโตรซาลิไซลิกให้กลายเป็นกรด 3 – อะมิโน – 5 – ไนโตรซาลิกไซลิก (3 –amino – 5 – nitrosalicylic acid) ซึ่งมีสีน้ำตาลแดงได้ ขณะเดียวกันหมู่อัลดีไฮด์ในน้ำตาลจะถูกออกซิไดซ์ให้กลายเป็นหมู่คาร์บอกซิล (Carboxyl) ดังสมการ

$$\text{Aldehyde group} \xrightarrow{\text{oxidation}} \text{carboxyl group}$$

$$\text{3,5 – dinitrosalicylic acid} \xrightarrow{\text{reduction}} \text{3 – amino ,5 – nitrosalicylic acid}$$

การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธีนี้ทำได้โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของผลิตภัณฑ์สุดท้ายแล้วเทียบค่าการดูดกลืนแสงกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสที่วัดที่ค่าการดูดกลืนแสง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เดียวกัน ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากวิธี DNS นี้อาจลดลงเนื่องจากออกซิเจนที่ละลาย (dissolved oxygen) รบกวนการออกซิไดซ์ของน้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีการปรับปรุงสาร DNS โดยการเพิ่มซัลเฟต และจะช่วยลดปริมาณออกซิเจนที่ละลาย โดยไม่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสง

2.13 ประเภทของแผนการทดลองที่มีการจัดทรีทเมนต์โดยสุ่มแบ่งได้ดังนี้ (สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ)

1. ทรีทเมนต์มาจากปัจจัยเดียว

1. ไม่มีการจัดกลุ่มหน่วยทดลอง completely randomized design (CRD)

2. มีการจัดกลุ่มสามารถใส่ได้ครบทุกทรีทเมนต์

2.1 แต่ละกลุ่มสามารถใส่ได้ครบทุกทรีทเมนต์

(1) การจัดกลุ่มในทิศทางเดียว Randomized complete block design (RBD)

(2) การจัดกลุ่มในสองทิศทาง Latin square design

(3) การจัดกลุ่มในสามทิศทาง Graeco Latin square design

2.2 แต่ละกลุ่มไม่สามารถใส่ได้ครบทุกทรีทเมนต์

(1) การจัดกลุ่มในทิศทางเดียวIncomplete block designs

(2) การจัดกลุ่มในสองทิศทาง Youden square design, Lattice square design

2 ทรีทเมนต์มาจากหลายปัจจัย

1. ทรีทเมนต์ถูกใช้ผสมกัน

1.1 ไม่มีการจัดกลุ่มโดยแต่ละกลุ่มใส่ได้ครบทุกทรีทเมนต์ Factorial experiment

1.2 มีการจัดกลุ่มโดยแต่ละกลุ่มใส่ได้ไม่ครบทุกทรีทเมนต์ Confounded design

2. ปัจจัยหนึ่งซ้อนอยู่ใต้ปัจจัยอื่น Nested design

3. หน่วยทดลองมีขนาดต่างกัน Split plot และ Split block design

3 แผนการทดลองประเภทอื่นๆ

1. หน่วยทดลองแต่ละหน่วยได้รับหลายทรีทเมนต์ Change-over และ Switchback design

2. การทดลองเฉพาะบางส่วนของซ้ำ Fractional factorial design

2.13.1 แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด

แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design ใช้ค้ายย่อว่า CRD) เป็นแผนการทดลองที่มีลักษณะง่ายสะดวกในการปฏิบัติและวิเคราะห์ข้อมูลเหมาะสำหรับหน่วยทดลองที่มีความสม่ำเสมอมากไม่มีความแตกต่างเนื่องจากปัจจัยอื่นๆตัวอย่างเช่นการศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารเลี้ยงไก่ 3 สูตรเป็นทรีทเมนต์มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของไก่หน่วยทดลองที่ใช้คือไก่แต่ละตัวมาจากพันธุ์เดียวกันเพศเดียวกันอายุและน้ำหนักเมื่อเริ่มทดลองเท่ากันก็จะได้ว่าหน่วยทดลองมีความสม่ำเสมอกันหน่วยทดลองมีโอกาสได้รับทรีทเมนต์ใดทรีทเมนต์หนึ่งเท่ากันโดยวิธีการสุ่มให้หน่วยทดลองแต่ละหน่วยมีโอกาสได้รับทรีทเมนต์ใดทรีทเมนต์หนึ่งด้วยความน่าจะเป็นที่เท่ากันแผนการทดลองแบบ CRD นิยมทำการทดลองในห้องปฏิบัติการหรือเรือนทดลองเพราะสามารถควบคุมความคลาดเคลื่อนระหว่างการดำเนินการทดลองได้

2.13.2 ลักษณะของรูปแบบการทดลอง

1.มีตัวแปรอิสระหรือตัวแปรทดลองเพียง 1 ตัว ที่แบ่งออกเป็นหลายระดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. หน่วยทดลองแต่ละหน่วยที่นำมาเป็นกลุ่มตัวอย่างจะต้องมาจากการสุ่ม
3. กลุ่มทดลองแต่ละกลุ่มจะได้รับตัวแปลทดลองเพียงตัวเดียวโดยการสุ่ม

2.14 การทดลองแบบแฟคทอเรียล (Factorial Experiment)

การทดลองแบบแฟคทอเรียลเป็นการทดลองที่ทรีทเมนต์ประกอบด้วยแฟคเตอร์ตั้งแต่ 2 แฟคเตอร์ขึ้น ไปมาร่วมกันในรูปของทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น (treatment combination) ส่วนการจัดการสุ่มทรีทเมนต์เข้าใน สิ่งทดลองจะใช้แบบเดียวกับการสุ่มของการทดลองพื้นฐาน (basic design) ทุกประการการทดลองแบบ แฟคทอเรียลมีข้อดีในการขยายขอบเขตการสรุปผล ของผลร่วม (interaction) ระหว่างแฟคเตอร์ได้ในการ วิเคราะห์วาเรียนซ์ของการทดลองจะมีการแยกผล จากแต่ละแฟคเตอร์ผลร่วม และ สามารถนำการ เปรียบเทียบแบบออโทโกนอล (orthogonal comparison) มาใช้ประโยชน์ได้ ในการทดลองแบบแฟคทอเรียลจะมีความแตกต่างจากทรีทเมนต์ของการ ทดลองพื้นฐาน กล่าวคือจะจัดทรีทเมนต์ในรูปแบบของ ทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น คือ ประกอบด้วยแฟคเตอร์ตั้งแต่ 2 แฟคเตอร์ขึ้นไปมาร่วมกัน และแต่ละแฟคเตอร์ก็มีตั้งแต่ 2 ระดับขึ้นไป

2.15 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปฏิพล และคณะ (2555) ทำการศึกษายีสต์ทนร้อน สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด นอกจากนี้ในอุตสาหกรรมการหมักยีสต์ทนร้อนช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายทั้งพลังงานและน้ำในการหล่อเย็นอันจะนำไปสู่การพัฒนาเชิงพาณิชย์ได้ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ทนร้อนไอโซเลต FE-SP1 และ เพื่อศึกษาการใช้พลังงานไฟฟ้าในกระบวนการหล่อเย็นในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ทนร้อน เพื่อเป็นแนวทางในการลดค่าใช้จ่ายด้านการหล่อเย็นในระดับอุตสาหกรรม จากผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ทนร้อนไอโซเลต FE-SP1 ได้แก่ ความเข้มข้นของน้ำตาลรวมทั้งหมด ร้อยละ 9 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาณเชื้อยีสต์เริ่มต้น เท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ ร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่เลือกใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 30 (13.41 กรัมต่อลิตร) สำหรับพลังงานไฟฟ้าที่ใช้ในกระบวนการหล่อเย็นถังหมักก่อนการเติมยีสต์ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า การลดอุณหภูมิของถังหมักจาก 98 องศาเซลเซียส เหลือเพียง 40 องศาเซลเซียส ใช้ระยะเวลา 1.48 ชั่วโมงใช้พลังงานไฟฟ้าคิดเป็นจำนวนเงิน 0.61 บาทต่อครั้ง และคิดเป็นจำนวนเงิน 179.52 บาทต่อปีดังนั้นการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ทนร้อนไอโซเลต FE-SP1 ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการการสามารถช่วยลดค่าใช้จ่ายในการหล่อเย็นได้ไม่มากนัก แต่หากนำไปประยุกต์ใช้กับถังหมักในระดับอุตสาหกรรมที่มีขนาดใหญ่ขึ้น ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการหล่อเย็นเพิ่มมากขึ้น

ชุติมา (2548) ได้ศึกษาการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากยีสต์จำนวน 91 ไอโซเลตที่แยกใหม่ โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่มีเอทานอล บ่มที่ 35 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส และ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีการรายงานว่าหมักเอทานอลได้สูงที่อุณหภูมิ คือ M30, AM12, TJ1, TJ3 และ Sc90 พบว่ามีเพียง 6 สายพันธุ์ ที่สามารถหมักเอทานอลความเข้มข้นสูงที่ 37 และ 40 องศาเซลเซียส คือ DMKU 3-1042, DMKU 3-306, DMKU 3-118, DMKU 3-p1042, DMKU 3-p106 และ *S. cerevisiae* Sc90 และเมื่อศึกษาสภาวะการหมักเอทานอลที่ 30-45 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยที่เตรียมให้มีน้ำตาลร้อยละ 18 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.05 และพีเอชเริ่มต้น 4.5 พบว่าที่ 40 และ 45 องศาเซลเซียส ยีสต์สายพันธุ์ DMKU 3-1042 ซึ่งภายหลังจัดจำแนกเป็น *Kluyveromyces marxianus* หมักเอทานอลได้สูงสุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์อื่น และหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิอื่นด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงได้คัดเลือก DMKU 3-1042 เพื่อใช้ในการศึกษาการหมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยต่อไปจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของ DMKU 3-1042 ในอาหารน้ำอ้อยในฟลาสก์บ่มแบบเขย่า พบว่าเมื่อหมักที่ 37 องศาเซลเซียส อาหารน้ำอ้อยที่เตรียมให้มีน้ำตาลร้อยละ 22 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.05 ให้เอทานอลสูงสุดร้อยละ 11.51 โดยปริมาตร ที่เวลา 60 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.42 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับร้อยละ 84 ของค่าทางทฤษฎี และ เมื่อหมักที่ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่มีองค์ประกอบและพีเอชดังกล่าว DMKU 3-1042 ให้เอทานอลสูงสุดร้อยละ 8.25 โดยปริมาตร ที่เวลา 42 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.49 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับร้อบละ 62.1 ของค่าทางทฤษฎี จากสภาวะเหมาะสมที่ได้นำมาศึกษาการหมักเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ใช้อาหารน้ำอ้อย 3 ลิตร ที่ 37 องศาเซลเซียส พบว่าการหมักแบบแบตช์ที่ใช้การกวน 300 รอบต่อนาที และให้อากาศ 0.2 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาทีตั้งแต่ 0 ถึง 12 ชั่วโมง หลังจาก 12 ชั่วโมง ปิดการให้อากาศ และลดอัตราในการกวนลงเหลือ 150 รอบต่อนาที ให้เอทานอลร้อยละ 7.64 โดยปริมาตรที่ 54 ชั่วโมง อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.11 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับร้อยละ 53.5 ของค่าทางทฤษฎี ค่าที่ได้ใกล้เคียงกับการหมักแบบแบตช์อื่นๆ แต่ใช้พลังงานต่ำกว่า ส่วนการหมักแบบเฟด-แบตช์แบบเติมน้ำอ้อยสองครั้งได้ค่าสูงกว่าการหมักแบบเฟด-แบตช์ที่เติมน้ำอ้อยครั้งเดียวและสามครั้ง ที่เวลา54 ชั่วโมง ให้เอทานอลร้อยละ 7.92 โดยปริมาตร อัตราผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และมีค่าผลผลิตการหมักเท่ากับร้อยละ 55.8 ของค่าทางทฤษฎี ซึ่งค่าที่ได้สูงกว่าการหมักแบบแบตช์เล็กน้อย

ปริษฎางค์ (2547) ได้ศึกษาการปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อย โดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ใช้กล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP1 อายุ 12 ชั่วโมง เลี้ยงในอาหาร BSM medium ที่มีกากน้ำตาลคิดเป็นปริมาณน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร พบว่าในการเลี้ยงเชื้อแบบ แบตช์ ปริมาณเอทานอลที่ผลิตคือ 53.02-72.70 กรัมต่อลิตร ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร คือ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 อัตราการกวน 100 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร *S. cerevisiae* SKP1 ผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 72.7 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 9.20 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่เวลา 72 ชั่วโมง ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.47 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลรวมเหลือเท่ากับ 12.11 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{[subscript\ p/s]}$ เท่ากับ 0.465 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลรวมเริ่มต้นมากกว่า 220 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้ปริมาณเอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทานอลที่ผลิตได้ลดลง การศึกษาการผลิตเอทานอลแบบ รีพีท-แบตช์ โดยการป้อนกากน้ำตาล 2 ระยะที่ชั่วโมงที่ 24 และ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลรวมใกล้เคียงกับความเข้มข้นเริ่มต้น (165 กรัมต่อลิตร) พบว่าการป้อนกากน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 24 ส่งผลให้ผลิตเอทานอลได้ในเวลาเร็วขึ้นโดยได้เท่ากับ 72.98 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ การเติมกากน้ำตาลไม่มีผลชัดเจนต่อการเพิ่มการผลิตเอทานอลโดยได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 80.96 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 10.25 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่เวลา 120 ชั่วโมง การปรับปรุงการผลิตเอทานอลแบบ เฟด-แบตช์ โดยการป้อนการน้ำตาลที่ชั่วโมงที่ 24 เพื่อให้ได้น้ำตาลรวมในถังหมักใกล้เคียงกับเริ่มต้น พบว่าได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 91.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 11.53 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่เวลา 84 ชั่วโมง น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.64 กรัมต่อลิตร ค่า $Y_{[subscript\ p/s]}$ เท่ากับ 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.08 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นวิธีที่ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการป้อนกลูโคสบริสุทธิ์ และการป้อนกากน้ำตาลร่วมกับไบโอติน โดยพบว่าการป้อนกลูโคสบริสุทธิ์ผลิตเอทานอลได้เร็วขึ้นตั้งแต่เวลาที่ 36 ชั่วโมง แต่ปริมาณเอทานอลสูงสุดใกล้เคียงกันโดยได้เท่ากับ 89.42 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 96 ชั่วโมง ส่วนการป้อนไบโอตินส่งผลให้การเจริญของเซลล์ดีขึ้นที่ช่วงต้นของการเจริญ (12-36 ชั่วโมง) ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ผลิตได้เท่ากับ 89.08 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 11.28 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ซึ่งใกล้เคียงกับเมื่อไม่ป้อนไบโอติน บทสรุปของการปรับปรุงการผลิตเอมานอลจากการน้ำตาลอ้อยโดยวิธีการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์พบว่า สามารถเพิ่มปริมาณเอมานอลจาก 53.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 6.71 ปริมาณต่อปริมาตร ได้สูงขึ้นถึง 91.12 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 11.53ปริมาตรต่อปริมาตร

กนกวรรณ (2547) ทำการศึกษาแนวทางในการที่จะลดความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดในส่าส่งกลั่นที่ได้จากการกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (2 ขั้นตอน) ให้มีความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดลดลงต่ำกว่าร้อยละ 3.5และศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดรวมไปถึงวิธีการป้อนกากน้ำตาลที่มีต่อประสิทธิภาพในการหมักแอลกอฮอล์ในโรงงานบริษัทแสงโสมจำกัด จ.กาญจนบุรี เมื่อนำส่าส่งกลั่นมาเติมกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* จำนวน 2×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการหมักต่อเป็นเวลา 2 วันพบว่าปริมาณยีสต์เซลล์และความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่ไม่มีความแตกต่างกับส่าส่งกลั่นก่อนเติมกล้าเชื้อยีสต์และเมื่อนำส่าส่งกลั่นไปวิเคราะห์โดยวิธี modified Lane-Eynon ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดที่เหลืออยู่มีค่าร้อยละ 3.44 แต่เมื่อทำการวิเคราะห์โดยวิธี HPLC พบว่าน้ำตาลที่ยีสต์ใช้หมักเอทานอลได้อย่างกลูโคสและซูโครสไม่มีเหลืออยู่ในส่าส่งกลั่นมีเพียงปริมาณน้ำตาลฟรุคโตสที่เหลืออยู่เพียงร้อยละ 0.33นั่นแสดงว่าน้ำตาลทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้โดยวิธี modified Lane-Eynon ในส่าส่งกลั่นนั้นอาจเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ไม่สามารถนำไปใช้ได้และหรืออาจเป็นสารรีดิวซ์อื่นๆที่สามารถทำปฏิกิริยากับ copper sulfate ในวิธีวิเคราะห์นี้ในการทดลองเพื่อหาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลได้ทำการทดลองแปรค่าความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ใช้ในขั้นตอนการหมักขั้นที่ 2 เป็นร้อยละ 17.5, 18.5และ 19.5 ตามลำดับพบว่าการหมักส่าโมลาสที่ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 18.5 จะให้ประสิทธิภาพในการผลิตสูงกว่าที่ร้อยละ 17.5 และร้อยละ 19.5 และเมื่อทำการทดลองให้ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดสุดท้ายในขั้นตอนการหมักเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ร้อยละ 18.5 โดยปรับลดความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดในขั้นตอนที่ 1 ที่เดิมของโรงงานใช้ที่ร้อยละ 14 มาเป็นร้อยละ 10 พบว่าประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์มีค่าใกล้เคียงกัน

เวสารัช และคณะ (2556) การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้น้ำตาลที่ได้จากการปรับสภาพใบตองด้วยวิธีการต่างๆที่เหมาะสมเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อ *Candida shehatae*TISTR 5843 ซึ่งสามารถใช้น้ำตาลไซโลสได้ดีและตรึงเซลล์ยีสต์ด้วยวัสดุธรรมชาติซึ่งมีต้นทุนต่ำมีความคงตัวและสามารถหาได้ง่ายคือซังข้าวโพดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยใบตองคือกรดซัลฟิวริกร้อยละ 8 ปริมาตรต่อปริมาตรได้น้ำตาลไซโลสและน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 2.25 ± 0.33 และ 1.17 ± 0.18 กรัมต่อลิตรตามลำดับสำหรับการตรึงรูปเชื้อยีสต์พบว่าซังข้าวโพดที่ผ่านการปรับสภาพจำนวนร้อยละ 3 กรัมต่อมิลลิลิตรมีความเหมาะสมในการตรึงเซลล์ยีสต์สูงสุดเท่ากับ 7.29×10^4 เซลล์ต่อมิลลิกรัมสำหรับการหมักเอทานอลในถังหมักแบบแพคเบดพบว่าอัตราการผลิตเอทานอลสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 1 คือ 0.95 ± 0.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงดังนั้นใบตองจึงเป็นอีกทางเลือกที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอลโดยประยุกต์ใช้ร่วมกับถังหมักแบบแพคเบด

นฤมล (2548) ได้กล่าวว่าจากการแยกยีสต์ทนร้อนจากผลไม้ดอกไม้ใบไม้ดินและผลปาล์มจำนวน 145ตัวอย่างที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสสามารถแยกยีสต์ทนร้อนได้ 70 ไอโซเลตในจำนวนนี้ 6 ไอโซเลตเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสในเวลา 18 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบการหมักน้ำตาลกลูโคสและซูโครสพบ 3 ไอโซเลต (MIY1 MIY48 และ MIY57) หมักน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดเป็นเอทานอลได้รวดเร็วภายใน 24 ชั่วโมงเจริญได้ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสแต่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเมื่อคัดเลือกจากความสามารถในการผลิตเอทานอลจากอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15 ไอโซเลต MIY1 และ MIY57 ผลิตเอทานอลได้สูงกว่าร้อยละ 4.0 ปริมาตรต่อปริมาตรนำยีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตมาเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสร้อยละ 15 เพื่อศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญและผลิตเอทานอลพบว่า MIY1 และ MIY57 เจริญสูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมงได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 5.9 และ 6.6 กรัมต่อลิตรตามลำดับซึ่งสูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR5048 ที่ใช้เปรียบเทียบ (5.2 กรัมต่อลิตร) และได้เอทานอลสูงกว่าร้อยละ 4.0 ปริมาตรต่อปริมาตรเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลพบว่ายีสต์ทั้ง 2 ไอโซเลตผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดเมื่อใช้เชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 15 ยีสต์สกัดร้อยละ 1พีเอชเริ่มต้น 4.5 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส MIY1 และ MIY57 เจริญได้สูงสุดที่เวลา 18 ชั่วโมงได้เซลล์แห้ง 6.3 และ 7.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับสูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 (4.1 กรัมต่อลิตร) ในเวลา 48 ชั่วโมง MIY1 และ MIY57 ผลิตเอทานอลได้ 4.7 และร้อยละ 5.0 ปริมาตรต่อปริมาตรสูงกว่า *S. cerevisiae* TISTR 5048 ซึ่งผลิตได้ร้อยละ 3.7 ปริมาตรต่อปริมาตรยีสต์ MIY1 และ MIY57 เมื่อเทียบเคียงโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสรีรวิทยาและลักษณะทางอณูชีววิทยาบ่งชี้ว่าเป็น *S. cescerevisiae*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการทำโครงงานพิเศษ

1. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี
2. เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ
3. เครื่องชั่งสาร
4. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง
5. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง
7. เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์
8. ตู้ปลอดเชื้อ
9. ตู้บ่มเชื้อ
10. ตู้ดูดควัน
11. ตู้อบลมร้อน
12. ไมโครเวฟ
13. โถดูดความชื้น
14. จานเพาะเลี้ยงเชื้อ
15. ขวดรูปชมพู่
16. ขวดรูปชมพู่ฝาเกลียว
17. ขวดปรับปริมาตร
18. แท่งแก้ว
19. ช้อนตักสาร
20. บีกเกอร์
21. ตะแกรงใส่หลอดทดลอง
22. หลอดทดลอง
23. หลอดเซนติฟิวส์
24. ปิเปต
25. ลูปเขี่ยเชื้อ
26. ตะเกียงแอลกอฮอล์
27. กล้องจุลทรรศน์
28. ฮีมาไซโตมิเตอร์

3.2 สารเคมี

1. กลูโคส
2. แอมโมเนียมซัลเฟต
3. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต
4. แมกนีเซียมซัลเฟต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ยีสต์สกัด
6. โพรพานอล (n-propanol)
7. เอทานอล
8. กากน้ำตาล
9. วุ้น
10. น้ำกลั่น
11. เมทิลีนบลู
12. คริสตัลไวโอเลต
13. แอลกอฮอล์ร้อยละ 95
14. ไอโอดีน
15. สารละลายฟีนอล-ซัลฟูริก
16. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์
17. สายละลายไฮโดรคลอริก

3.3 เชื้อยีสต์ที่ใช้

1.เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลาย

3.4 วิธีการดำเนินงาน

3.4.1 การเตรียมเชื้อ

ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ นำเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลาย (กานต์พิชชา และคณะ, 2557) มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารวุ้นเอียง Yeast Malt Agar (YMA)(ภาคผนวก ก) 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เพื่อให้มีการเจริญและเพิ่มจำนวนเซลล์ เพื่อใช้ในการตรึงรูปต่อไป

3.4.2 การเตรียมวัสดุตรึงรูป

การปรับสภาพวัสดุตรึงรูปเพื่อใช้ในการตรึงเซลล์ยีสต์โดยการนำซังข้าวโพด ตัดเป็น4ส่วน และหนา 0.5 เซนติเมตร (Radojka และคณะ, 2012) และนำไปอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จนได้ความชื้นต่ำกว่าร้อยละ 10 จากนั้นนำไปเก็บไว้ในถุงพลาสติกปิดให้มิดชิดและนำไปแช่เย็น (ภาคผนวก ก)

3.4.3 การตรึงเซลล์

เชื้อยีสต์ที่เตรียมไว้นำมาตรึงเซลล์ในวัสดุตรึงรูปที่เตรียมไว้ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร Yeast Malt Broth (YMB) พีเอช 5.5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณวัสดุตรึงเซลล์ 3 กรัม ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Radojka และคณะ, 2012) โดยใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (เวสารัช และคณะ, 2556) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยใช้เซลล์อิสระ แล้วทำการนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (เทียบกับปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ของเหลวหลังจากการตรึง แล้วคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุตรึงเซลล์

จำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุ = จำนวนเซลล์อิสระ (ชุดควบคุม) – จำนวนเซลล์ที่เหลือในของเหลว (เวสารัช และคณะ, 2556) (ภาคผนวก ข)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.4 การเตรียมกากน้ำตาล

ทำการเตรียมกากน้ำตาลโดยทำการวัดปริมาณน้ำตาลด้วยวิธีฟีนอลซัลฟิวริก (ภาคผนวก ข) และนำไปเจือจางกับน้ำกลั่น ให้ได้ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดที่ต้องการศึกษา 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร (Radojka และคณะ, 2012) และนำมาเตรียมเป็นอาหารที่ใช้ในการหมักโดยนำมาเติมสารต่างๆหน่วยเป็นกรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1, แมกนีเซียมซัลเฟต 5 และยีสต์สกัด 4 (ดัดแปลงมาจาก Radojka และคณะ, 2012) เตรียมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลีที่ปากขวดรูปชมพู่ ปิดด้วยกระดาษอีกครั้ง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ปฏิพล และคณะ, 2555) (ภาคผนวก ก)

3.4.5 การทดสอบปัจจัยแหล่งคาร์บอน

ในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยถ่ายยีสต์ตรึงเซลล์ลงในขวดรูปชมพู่ที่เตรียมกากน้ำตาลไว้ โดยทำการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลดังนี้

3.4.5.1 แหล่งคาร์บอน ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร (Radojka และคณะ, 2012)

3.4.5.2 แหล่งไนโตรเจน ปริมาณยีสต์สกัด 3, 4, 5 และ 6 กรัมต่อลิตร

3.4.5.3 ทดสอบความแตกต่างระหว่างทำการล้างเซลล์และไม่ทำการล้างเซลล์ก่อนนำไปหมัก

3.4.5.4 ระยะเวลาในการหมัก 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง

โดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเก็บตัวอย่างครั้งละ 6 มิลลิลิตร ทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการนับเซลล์ด้วยด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์และวัดปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟีและนำมาเทียบกับชุดควบคุม (ความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร, และปริมาณยีสต์สกัด 4 กรัมต่อลิตร (Radojka และคณะ, 2012))

3.4.6 แผนการทดลอง

3.4.6.1 ทำการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอน (ความเข้มข้นของน้ำตาล) โดยทำการแปรผัน 2 ปัจจัยคือความเข้มข้นของกากน้ำตาลและระยะเวลาในการหมัก

3.4.6.2 ทำการศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจน (ปริมาณยีสต์สกัด) โดยทำการแปรผัน 1 ปัจจัย คือความเข้มข้นของปริมาณยีสต์สกัด

3.4.7 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติ โดยหัวข้อ 3.4.6.1 ทำการวางแผนการทดลองแบบ Factorial Experiment in Completely Randomized Design (Factorial in CRD) และหัวข้อที่ 3.4.6.2 ทำการวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) และนำผลมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป Minitab รุ่น 16 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยตัวแปรที่ศึกษาโดยวิธี Turkey multiple comparison test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและอภิปรายผล

4.1 การตรึงเซลล์

จากการทดลองนำเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้น $1x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาทำการตรึงเซลล์บนซังข้าวโพดในอาหารเหลว YMB ในสภาวะเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการนับเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ แล้วคำนวณหาค่าเซลล์ที่ถูกตรึงในซังข้าวโพด ในรอบทดสอบปัจจัยแหล่งคาร์บอนของชุดควบคุมและตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ได้จำนวนเซลล์เท่ากันประมาณ $1.39x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์มีจำนวนเซลล์ประมาณ $0.78x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนในรอบทดสอบปัจจัยแหล่งไนโตรเจนของชุดควบคุมและตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ได้จำนวนเซลล์เท่ากันประมาณ $1.09x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์มีจำนวนเซลล์ประมาณ $0.57x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

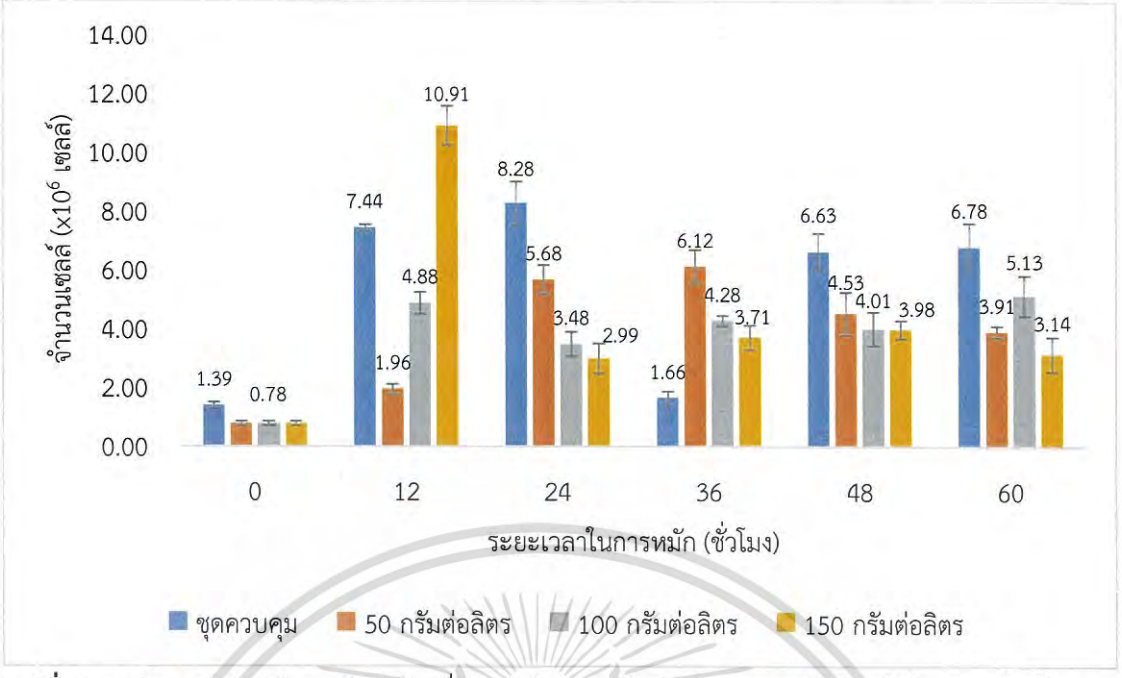
4.2 การทดสอบปัจจัยแหล่งคาร์บอน โดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ในการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลาย

เมื่อได้เซลล์ที่ถูกตรึงจากการตรึงเซลล์บนซังข้าวโพดแล้ว นำเซลล์ที่ถูกตรึงบนซังข้าวโพดมาทำการหมักในกากน้ำตาลที่ความเข้มข้นต่างกันคือ 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เพื่อศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอนจากกากน้ำตาล โดยมีเซลล์เริ่มต้นประมาณ $1.39x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ฝาเกลียวตั้งนิ่ง ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ซึ่งปริมาณเซลล์อิสระในอาหารเลี้ยงเชื้อนับได้โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ พบว่าในตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์นั้นปริมาณเซลล์จะสูงที่สุดที่ความเข้มของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีปริมาณเซลล์ในอาหารประมาณ $1.09x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.1

ในส่วนของตัวอย่างที่ไม่มีการตรึงเซลล์นั้นปริมาณเซลล์จะสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีปริมาณเซลล์ในอาหารประมาณ $8.23x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.2

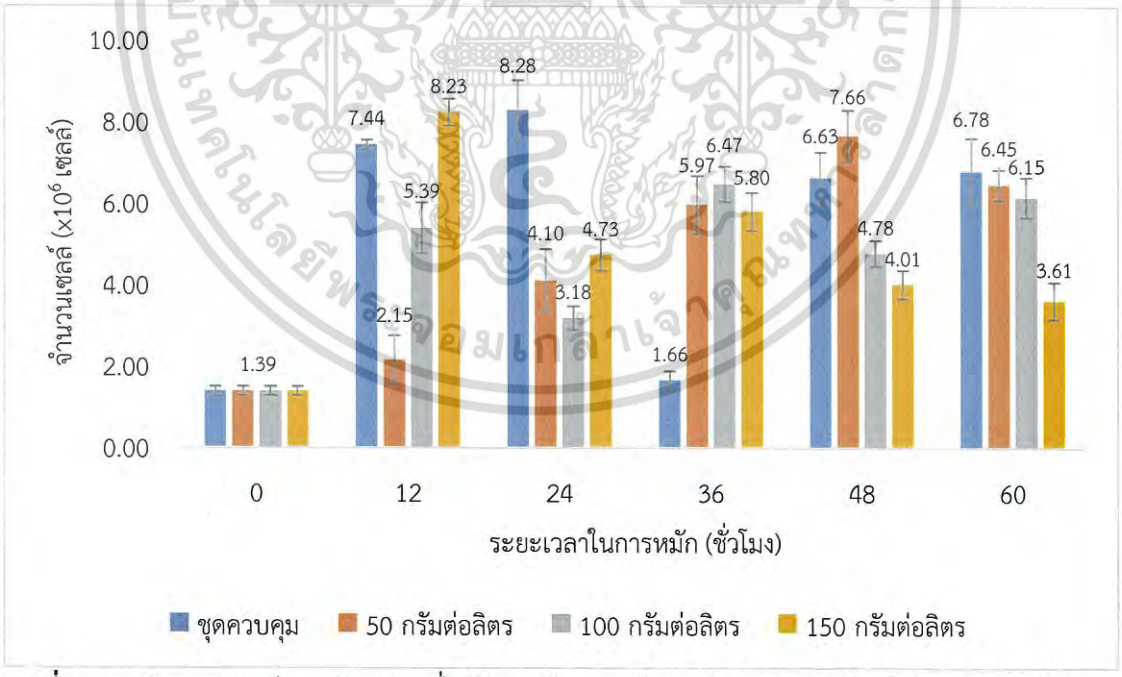
จากการทดลองพบว่าจำนวนเซลล์จะสูงที่สุดในความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ 150 กรัมต่อลิตร ที่มีการล้างเซลล์ ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าประมาณ $1.09x10^7$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสังเกตได้ว่าตัวอย่างที่มีการตรึงเซลล์ก็มีจำนวนเซลล์ที่นับได้ใกล้เคียงกับชุดควบคุมอาจมาจาก 2 สาเหตุ คือ 1. การตรึงเซลล์มีประสิทธิภาพต่ำเนื่องจากการไม่ได้ทำการปรับสภาพวัสดุตรึงเซลล์ตามวิธีของเวสารัช (2556) 2. เซลล์ยึดติดกับซังข้าวโพดโดยใช้การดูดซับกายภาพไม่ทำให้เซลล์สูญเสียกิจกรรม เซลล์อาจหลุดได้เพราะอาศัยเพียงพันธะไฮโดรเจน (Laopaiboon และคณะ, 2011) จากทั้งสองสาเหตุดังนั้นจะเห็นว่าการตรึงเซลล์ยังพบเซลล์นอกวัสดุตรึงรูปหรือซังข้าวโพดได้หลังจากการตรึงเซลล์ และสังเกตได้ว่าที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลต่างกัน เซลล์ที่นับได้ก็จะต่างกัน ซึ่งในชั่วโมงที่ 12 ตัวอย่างที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากจะมีจำนวนเซลล์ยีสต์มากกว่าที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาลน้อย แต่ถึงจำนวนเซลล์ยีสต์จะมีการลดลงบ้างแต่ปริมาณเอทานอลจะสูงขึ้นตามความเข้มข้นของกากน้ำตาลและค่อนข้างคงตัวในแต่ละชั่วโมง แสดงว่าในความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากนั้นยังมีเซลล์ยีสต์ที่ผลิตเอทานอลได้อยู่ ซึ่งอาจมาจากเซลล์ยีสต์ที่อยู่ภายในซังข้าวโพด จึงสามารถกล่าวได้ว่าซังข้าวโพดสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ปริมาณเซลล์ของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ระหว่างการหมักโดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง (x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

หมายเหตุ ที่เวลา 0 ชั่วโมง คือปริมาณเซลล์เริ่มต้น 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง คือปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.2 ปริมาณเซลล์ของตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ระหว่างการหมักโดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง (x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

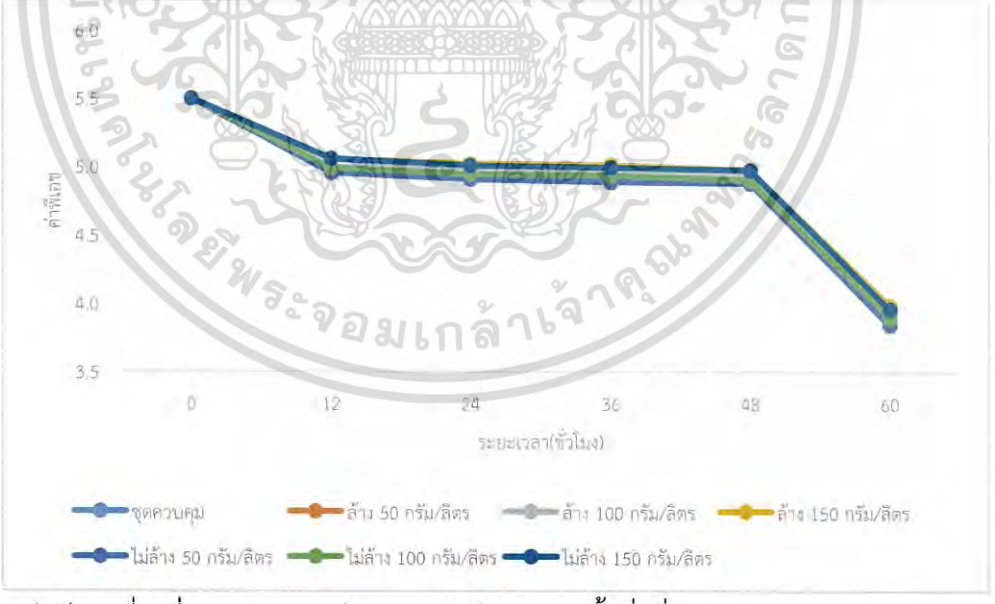
หมายเหตุ ที่เวลา 0 ชั่วโมง คือปริมาณเซลล์เริ่มต้น 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง คือปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รักษาเซลล์ยีสต์ไว้ภายในได้ ในส่วนการล้างและไม่ล้างเซลล์ในชั่วโมงที่ 12 ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50 และ 100 กรัมต่อลิตร จำนวนเซลล์ยีสต์ของการล้างเซลล์จะน้อยกว่าที่ไม่มีการล้างเซลล์ ส่วนที่ความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร การล้างเซลล์มากกว่าที่ไม่มีการล้างเซลล์อาจเป็นผลมาจากที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลมากเซลล์ยีสต์สามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้มากและเพียงพอ และการล้างเซลล์อาจช่วยให้เซลล์ที่แก่ถูกชะล้างออกไปทำให้เหลือแต่เซลล์ที่พร้อมจะเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50, 100 และ ชุดควบคุม ซึ่งในแต่ละชั่วโมงปริมาณเอทานอลไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นควรพิจารณาใช้สภาวะที่มีความเข้มข้นของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากจะเป็นการลดระยะเวลาในการผลิตเอทานอล ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้นั้นน้อยกว่าปริมาณเอทานอลในการทดลองของ Radojka (2012) เป็นผลมาจากในสูตรอาหารของ Radojka (2012) นั้นได้เพิ่มปริมาณกลูโคสลงไป 120 กรัมต่อลิตร ซึ่งในการทดลองของเราไม่ได้ใส่กลูโคสเพิ่มลงไปในสูตรอาหาร แสดงดังตารางที่ 4.1 และ 4.2

ค่าพีเอชเริ่มต้นในการหมัก คือ 5.5 และเริ่มลดลงเรื่อยๆ ในทุก 12 ชั่วโมง เนื่องจากในกระบวนการผลิตเอทานอล ยีสต์มีการสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งละลายในน้ำหมักกลายเป็นกรดคาร์บอนิก จึงทำให้ค่าพีเอชลดลงในระหว่างการหมัก (ลักขณา และคณะ, 2554) แสดงดังรูปที่ 4.3



รูปที่ 4.3 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักในสภาวะตั้งนิ่งที่เวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมงตามลำดับ และใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่แตกต่างกันคือ 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์และไม่มีการล้างเซล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณเอทานอลของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ระหว่างการหมักโดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของกากน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
ชุดควบคุม	12	22.90 ± 1.22^{b}
	24	19.53 ± 0.96^{bc}
	36	19.56 ± 1.18^{bc}
	48	19.33 ± 0.79^{c}
	60	19.86 ± 2.35^{bc}
50	12	11.24 ± 0.27^{d}
	24	10.93 ± 0.37^{d}
	36	10.92 ± 0.17^{d}
	48	10.97 ± 0.18^{d}
	60	10.84 ± 0.17^{d}
100	12	22.27 ± 1.48^{bc}
	24	20.35 ± 0.43^{bc}
	36	19.39 ± 0.85^{c}
	48	22.03 ± 0.64^{bc}
	60	21.13 ± 0.37^{bc}
150	12	30.66 ± 1.77^{a}
	24	28.73 ± 0.85^{a}
	36	31.68 ± 1.92^{a}
	48	31.75 ± 0.25^{a}
	60	29.58 ± 1.59^{a}

4.3 การทดสอบปัจจัยแหล่งไนโตรเจน โดยใช้ยีสต์สกัดเป็นแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นต่างกันในการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลาย

หลังจากที่ทดสอบปัจจัยแหล่งคาร์บอนพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายนั้นคือความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่ 150 กรัมต่อลิตร และที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ดังนั้นจะทำการทดสอบปัจจัยแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 12 ชั่วโมง โดยมีเซลล์เริ่มต้นในชุดควบคุมและตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเท่ากันประมาณ 1.09×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร และตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นประมาณ 0.57×10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตรโดยทำการทดลองมีการล้างเซลล์เทียบกับการไม่ล้างเซลล์ ซึ่งความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ใส่จะแตกต่างกันคือ 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร ที่สภาวะตั้งนิ่ง

ผลการทดลองปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่นับได้โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์จะมีจำนวนเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากที่สุดที่ชุดควบคุม ซึ่งมีจำนวนเซลล์ประมาณ $6.58x10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงดังรูปที่ 4.5 และ 4.6

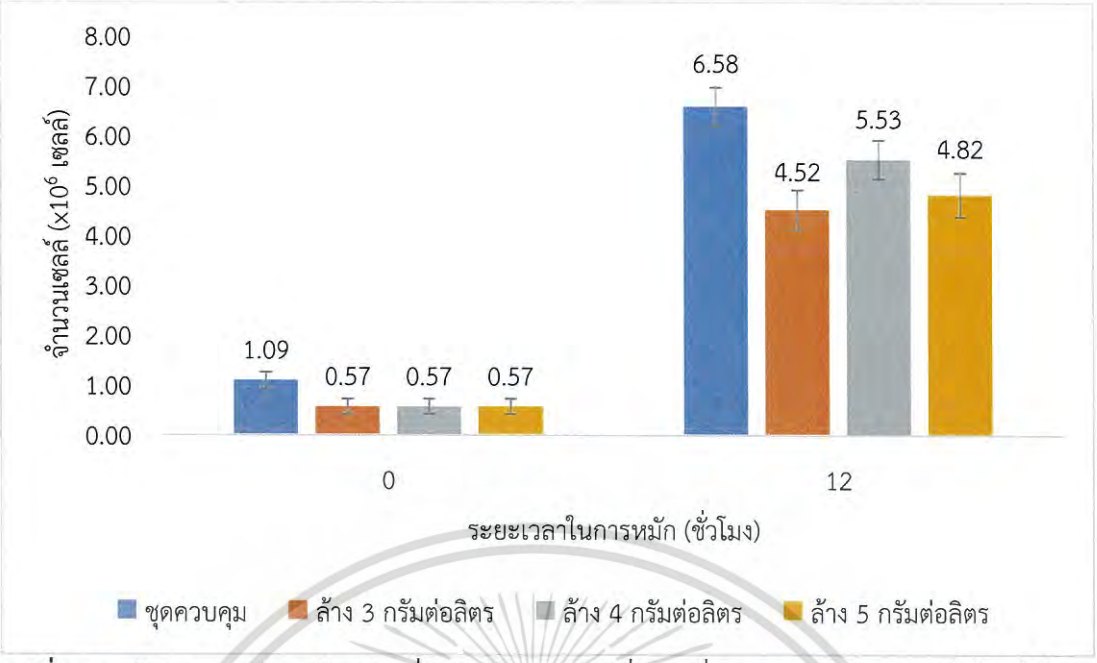
ตารางที่ 4.2 ปริมาณเอทานอลของตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ระหว่างการหมักโดยใช้ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 12, 24, 36, 48 และ 60 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของกากน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	ระยะเวลาในการหมัก (ชั่วโมง)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
ชุดควบคุม	12	22.90 ± 1.22^b
	24	19.53 ± 0.96^b
	36	19.56 ± 1.18^b
	48	19.33 ± 0.79^b
	60	19.86 ± 2.35^b
50	12	11.68 ± 0.25^c
	24	10.08 ± 0.29^c
	36	10.18 ± 0.12^c
	48	10.11 ± 0.16^c
	60	10.62 ± 0.28^c
100	12	22.73 ± 0.42^b
	24	19.05 ± 0.70^b
	36	20.35 ± 0.56^b
	48	20.69 ± 1.04^b
	60	20.87 ± 0.68^b
150	12	27.85 ± 1.45^a
	24	29.88 ± 3.60^a
	36	30.15 ± 1.60^a
	48	28.83 ± 1.47^a
	60	29.37 ± 1.20^a

ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ความเข้มข้นของปริมาณยีสต์สกัดเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่ 29.14±2.42 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.3

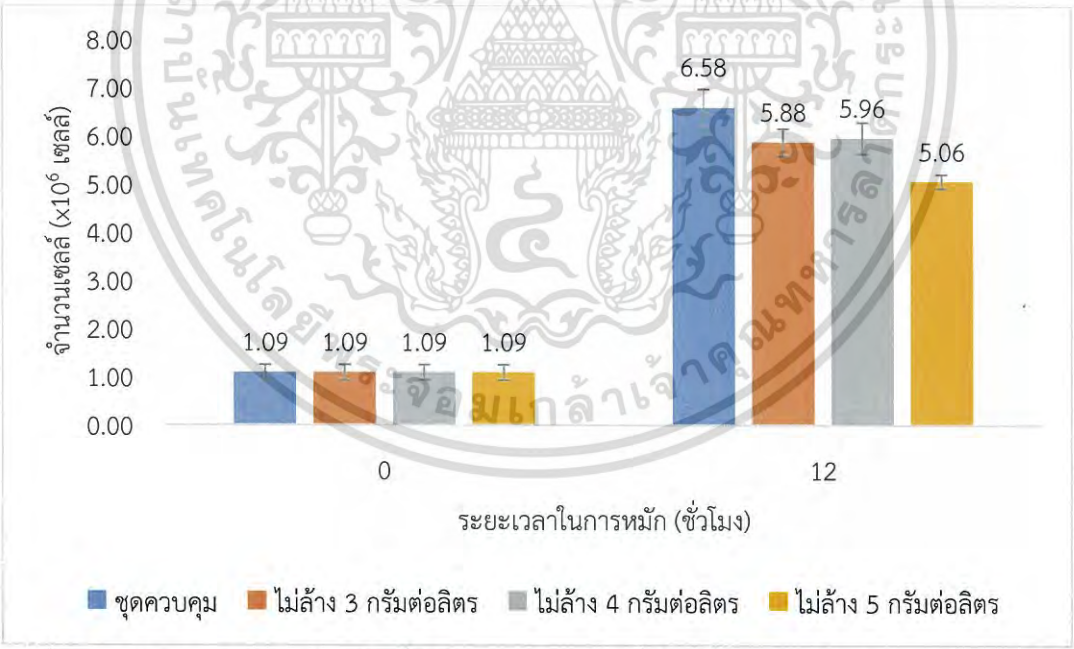
ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ความเข้มข้นของปริมาณยีสต์สกัดเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่ 30.72±1.73 กรัมต่อลิตร แสดงดังตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.4 ปริมาณเซลล์ของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ในชั่วโมงที่ 0 และ 12 ทำการหมักโดยใช้ความเข้มของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร และปริมาณยีสต์สกัดต่างกันคือ 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร (x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

หมายเหตุ ที่เวลา 0 ชั่วโมง คือปริมาณเซลล์เริ่มต้น 12 ชั่วโมง คือปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ



รูปที่ 4.5 ปริมาณเซลล์ของตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ในชั่วโมงที่ 0 และ 12 ทำการหมักโดยใช้ความเข้มของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร และปริมาณยีสต์สกัดต่างกันคือ 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร (x10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

หมายเหตุ ที่เวลา 0 ชั่วโมง คือปริมาณเซลล์เริ่มต้น 12 ชั่วโมง คือปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเอทานอลของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ในชั่วโมงที่ 12 ทำการหมักโดยใช้ความเข้มของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร และปริมาณยีสต์สกัดต่างกันคือ 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของปริมาณยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
ชุดควบคุม	27.53±4.47[a]
3	29.14±2.42[a]
4	25.71±3.21[a]
5	22.93±1.12[a]

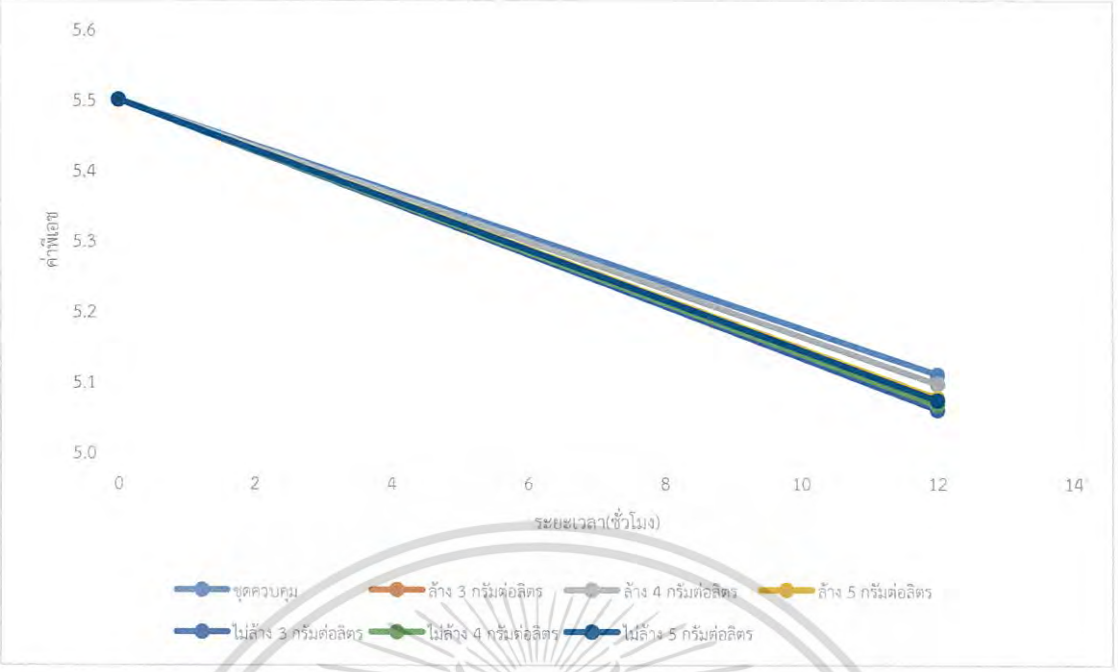
ตารางที่ 4.4 ปริมาณเอทานอลของตัวอย่างที่ไม่มีการล้างเซลล์ในชั่วโมงที่ 12 ทำการหมักโดยใช้ความเข้มของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร และปริมาณยีสต์สกัดต่างกันคือ 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร

ความเข้มข้นของปริมาณยีสต์สกัด (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
ชุดควบคุม	27.53±4.47[a]
3	27.06±1.22[a]
4	26.71±1.96[a]
5	30.72±1.73[a]

จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าการทดสอบปัจจัยแหล่งไนโตรเจนมีค่าความเชื่อมั่นทางสถิติต่ำกว่าร้อยละ 75 ทำให้การทดลองขาดความน่าเชื่อถือ ซึ่งเป็นผลมาจากในระหว่างทำการวิเคราะห์ตัวอย่างนั้นเกิดปัญหาขึ้นในขั้นตอนการกรองตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์ เนื่องจากตัวอย่างไม่สามารถผ่านตัวกรองได้และต้องทำการเก็บตัวอย่างไว้นานหลายวัน จึงทำให้ปริมาณเอทานอลเกิดการรั่วไหลในระหว่างการนำไปวิเคราะห์และเก็บรักษาตัวอย่าง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jones (2007) ซึ่งกล่าวไว้ว่าเอทานอลสามารถเกิดการรั่วไหลได้ในระหว่างการวิเคราะห์ตัวอย่าง และการทดลองของ Kerrigan (2013) ซึ่งกล่าวไว้ว่าปริมาณเอทานอลสามารถลดลงได้ในระหว่างการเก็บรักษาตัวอย่าง แต่อย่างไรก็ตามปริมาณเอทานอลที่ได้นั้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงควรเลือกใช้ความเข้มข้นของปริมาณยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร เพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเอทานอล

ค่าพีเอชเริ่มต้นในการหมัก คือ 5.5 และเริ่มลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งชั่วโมงที่ 12 จะมีค่าพีเอชประมาณ 5.1 เนื่องจากในกระบวนการผลิตเอทานอล ยีสต์มีการสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งละลายในน้ำหมักกลายเป็นกรดคาร์บอนิก จึงทำให้ค่าพีเอชลดลงในระหว่างการหมัก (ลักขณา และคณะ, 2554) แสดงดังรูปที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 ค่าพีเอชที่เปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักในสภาวะตั้งนิ่งที่เวลา 12 ชั่วโมง และใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่แตกต่างกันคือ 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตร ของตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์และไม่มีการล้างเซล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

จากผลการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอนในการหมักเอทานอลจากเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายตรึงบนซังข้าวโพด พบว่าในการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอนโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอน ปริมาณเอทานอลที่เซลล์ยีสต์ผลิตได้นั้นเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกากน้ำตาล ซึ่งปริมาณเอทานอลที่สูงที่สุดที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาลเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ทั้งในตัวอย่างที่มีการตรึงเซลล์และไม่มีการตรึงเซลล์ ซึ่งในแต่ละชั่วโมงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งปริมาณเอทานอลสูงที่สุดในตัวอย่างที่มีการล้างเซลล์ที่ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 48 ซึ่งมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 31.75±0.25 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อเทียบชุดคุมควบคุม(เซลล์อิสระ) กับชุดตัวอย่างที่มีการตรึงเซลล์ในระดับความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เท่ากันคือ 100 กรัมต่อลิตร พบว่าระหว่างชุดควบคุมและชุดตัวอย่างที่มีการตรึงเซลล์นั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจนพบว่าปริมาณเอทานอลในแต่ละตัวอย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่สูงที่สุดคือที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร ที่ไม่มีการล้างเซลล์ ซึ่งมีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 30.72±1.73 กรัมต่อลิตร แต่จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติในการศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจนพบว่ามีค่าความคาดเคลื่อนสูง อาจเป็นผลมาจากปัญหาที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการกรองตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์ เนื่องจากตัวอย่างไม่สามารถผ่านตัวกรองได้และต้องทำการเก็บตัวอย่างไว้นานหลายวัน จึงทำให้ปริมาณเอทานอลเกิดการรั่วไหลในระหว่างการนำไปวิเคราะห์และเก็บรักษาตัวอย่าง ซึ่งผลการศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจนสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของยีสต์สกัดไม่ได้ส่งผลต่อปริมาณเอทานอลที่ได้มากนัก จึงควรใช้ที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ 3 กรัมต่อลิตร เพื่อลดต้นทุนในการผลิต ในส่วนของการตรึงเซลล์และการไม่ตรึงเซลล์นั้นให้ผลเอทานอลที่ไม่แตกต่างกันมากนัก เนื่องจากในระยะเวลาเพียง 12 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* 62 สายพันธุ์กลายสามารถผลิตเอทานอลได้ในปริมาณที่มากแล้ว และในเวลา 12 ชั่วโมง เซลล์ยีสต์ยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้ในกากน้ำตาลที่ใช้เป็นอาหาร

5.2 ข้อเสนอแนะ

เราคิดว่าหากจะใช้การตรึงเซลล์ในการผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิผลที่ดีและคุ้มค่ามากขึ้นจะต้องเพิ่มความเข้มข้นของกากน้ำตาลให้สูงขึ้น เพื่อที่จะใช้ข้อดีของการตรึงเซลล์คือสามารถรักษาเซลล์ให้อยู่ในความเข้มข้นของอาหารที่สูงได้ แต่ทั้งนี้ทั้งนั้นเราจะต้องปรับปรุงประสิทธิภาพในการตรึงเซลล์ให้มีประสิทธิภาพในการตรึงที่สูงขึ้น เพราะในการตรึงเซลล์ที่เราทำนั้นไม่ได้มีการปรับสภาพของวัสดุตรึงเซลล์ ซึ่งการปรับสภาพของวัสดุตรึงเซลล์จะช่วยให้เซลล์สามารถเกาะอยู่บนวัสดุตรึงเซลล์ได้ดีขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กนกวรรณ แก้วแกมเสือ. 2547. การศึกษาแนวทางในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักกากน้ำตาลในโรงงาน บริษัท แสงโสม จำกัด จ. กาญจนบุรี. สารนิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์ มหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยศิลปากร. 73 หน้า.

กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. กากน้ำตาล. **วารสารน้ำตาล.** 3(6):

กล้าณรงค์ ศรีรอต, สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, ปฐมา จาตกานนท์ และสิทธิโชค วัลลภาทิพย์. 2549. การพัฒนาการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยการปรับปรุงการย่อยแป้งดิบด้วยเอนไซม์. รายงานการวิจัย, สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ

กานต์พิชชา สมาน, เมริน เนื่องเถื่อน และ ลูกตาล วัฒนวิภา. 2557. การกลายพันธุ์เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* 62 โดยเอทิลมีเทนซัลโฟเนต เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลจากกลีเซอรอลและกากน้ำตาล. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 89 หน้า.

คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอล และไบโอดีเซล. หนังสือเฉลิมพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว เนื่องในวโรกาสเฉลิมพระชนมพรรษา

ชยพร สงวนทรัพยากร. 2544. การลดสีของน้ำเสียจากโรงงานเยื่อกระดาษด้วยวิธีการตรึงเซลล์ *Phanerochaete chrysosporium* ในเครื่องปฏิกรณ์ชีวภาพฟลูอิไดซ์เบด 2 เครื่องที่ต่อแบบอนุกรม.

ชุติมา ศรีงิ้ว. 2548. การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 202 หน้า.

ธีระพงษ์ สิงหาปัด, กรรณิการ์ แสงศรีเรือง และสุรัสวดี ปันรัตน์. 2549. การผลิตแอลกอฮอล์โดยการหมักจากน้ำอ้อย. ภาควิชาวิศวกรรมเคมีคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 56 หน้า.

นฤมล โตอ่อน. 2549. ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 102 หน้า.

ปฏิพล ชัยเทพ, ไพรัช สาใจ และรัชฎาภรณ์ ปวงก๋องตั๋น. 2555. การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ทนร้อน. ปริญญานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมอาหาร วิทยาลัยเทคโนโลยีและสหวิทยาการ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา. 28 หน้า.

ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์. 2547. การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งกะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 156 หน้า.

เมทินี มาเวียง. 2554. ชีววิทยาของยีสต์. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จากhttp://sites.google.com/site/biotechrmutisurin/yeast-technology. (31 มีนาคม 2556).

แม้น อมรสิทธิ์. 2555. หลักการและเทคนิคการวิเคราะห์เชิงเครื่องมือ II. พิมพ์ครั้งที่ 2 ฉบับปรับปรุงใหม่. กรุงเทพฯ : ชวนพิมพ์ 50 จำกัด.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รัฐพงศ์ ปกแกว้. 2545. การเปรียบเทียบกระบวนการหมักแบบ SHF กับ SSF เพื่อการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากแป้งมันสำปะหลังโดยเชื้อ *Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae*. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร.

ลักขณา เหล่าไพบูลย์, กุลเชษฐ์ เพียรทอง, วรวุฒิ ศรีดี, ประสิทธิ์ ใจศิล, มัลลิกา บุญมี และพัฒนา เหล่าไพบูลย์. (2554). การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์และการหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นลำต้นข้าวฟ่ างหวานในระดับขยายขนาด. **KKU Research Journal.** 16 (8), 919-930.

วัชรา หงส์เวียง และสุภัตรา สิงห์ชนะ. 2546. การผลิตเอทานอลจากชานอ้อยและผักตบชวา. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม. 31 หน้า.

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ. ประเภทของแผนการทดลอง. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก www.fisheries.go.th/genetic/images/mainmenu/spss_train/trainpap1.pdf. (12 พฤศจิกายน 2558)

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 304 หน้า.

สิริวุทธิ์ เสียมภักดี. การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล. [ออนไลน์]. เข้าถึงได้จาก http://www.vcharkarn.com/varticle/38199. (12 พฤศจิกายน 2558).

สุโขทัยธรรมมาธิราช, มหาวิทยาลัย. 2526. เอกสารการสอนชุดวิชา 70205 วิทยาศาสตร์คหกรรมศาสตร์หน่วยที่ 6-10.กรุงเทพมหานคร: มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.

อารี ฤทธิบูรณ์. 2555. ปฏิบัติการเทคโนโลยีของเอนไซม์. พิมพ์ครั้งที่ 5. โครงการตำราคณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

Brown S.W., Oliver S.G., Harrison D.E.F. and Righelato R.C. 1981. Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: Differences in the magnitude and complexity of the effect. Applied Microbiology Biotechnology, 11: 151.

Casey G.P. and Ingledew W.M. 1985. Re-evaluation of alcohol synthesis and tolerance inbrewers yeast. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 43: 75-83.

Jones A.W., 2007. Are changes in blood-ethanol concentration during storage analytically significant? Importance of method imprecision, Clin. Chem. Lab. Med. 45 1299-1304.

Kerrigan S. 2013. Sampling, storage and stability. In: Negrusz A, Cooper G editors. Clarke's Analytical Forensic Toxicology. London: The Pharmaceutical Press; second edition, pp 346–54.

Keller G.A. 1967. Molasses. Encyclopedia of Chemical Technology. 2nd ed. Inter science, New York, Volume 13.

Laopaiboon L. and Laopaiboon P. 2012. Ethanol Production from Sweet Sorghum Juice in Repeated-batch Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on Corncob. World J Microbiol Biotechnol. 28: 559–566.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nagodawithana T.W., Castellano C. and Steinkraus K.H. 1976. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentation. Applied Environmental Microbiology, 31: 158-162.

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

Panchal C.J. and G.G. Stewart. (1980). The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. **Industrial Brewing,** 86: 207.

Razmovski Radojka, Vesna Vuc˘urovic´. 2012. Bioethanol production from sugar beet molasses and thick juice using *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on maize stem ground tissue. Fuel 92: 1–8

Reed G. and Nagoda withana T.W. (1991). Yeast Technology. Published by Van Nostrand Reinhold, New York.

Roehr M. 2001. The Biotechnology of Ethanol: Classical and Future Applications. WILEYVCH: Weinheim.

Rose A.H. and Harrison, J.S. 1971. Physiology and Biochemistry of Yeast. **The Yeast.** (2).London: Acedemic Press.

Rose A.H. and Harrison, J.S. 1993. Yeast Technology. **The Yeast.** (5). London: Acedemic Press.

Smart K. (2000). Brewing Yeast Fermentation Performance. 2nd ed. Oxford: Oxford Bookes University.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ YMA (Yeast Malt Agar)

สารเคมีที่ใช้ (อาหาร YMA แบบสำเร็จรูป)

1. ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร
2. มอลต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร
3. เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร
4. กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร
5. ผงวุ้น 20 กรัมต่อลิตร
6. น้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร YMA (Yeast Malt Agar)

1. นำอาหารYMA สำเร็จรูป (แบบผง)
2. ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วคนให้เข้ากัน
3. นำไปทำการเมลท์ที่เตาไมโครเวฟเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้วุ้นละลายเข้ากับน้ำกลั่นเป็นเนื้อเดียวกัน
4. นำปิเปตมาปิเปตใส่หลอดทดลอง หลอดละ 5 มิลลิลิตร ปิดจุกสำลีและคลุมด้วยกระดาษ
5. นำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่สภาวะ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 15 นาที
6. นำออกมาทำวุ้นเอียง รอจนวุ้นแข็งเพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *S.cerevisiae*

2. การเตรียมวัสดุตรึงเซลล์

วัสดุที่ใช้ตรึงเซลล์ : ซังข้าวโพด

ขั้นตอนการเตรียม

1. นำซังข้าวโพดที่ได้มาทำความสะอาดโดยการล้างน้ำ
2. นำซังข้าวโพดที่ได้มาทำการตัดให้ได้เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.5 เซนติเมตร – 2 เซนติเมตร และมีความหนาประมาณ 0.5 เซนติเมตร
3. นำซังข้าวโพดที่ได้ไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่สภาวะดังนี้ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 20 นาที
4. นำซังข้าวโพดที่ได้มาอบในตู้อบความร้อนแบบลมไหลผ่านที่สภาวะ 40 องศา เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. นำซังข้าวโพดมาหาปริมาณความชื้นให้มีค่าน้อยกว่าร้อยละ 10 (ป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้ออื่น หลังจากนั้นนำใส่ถุงปิดให้สนิทแล้วเก็บแช่ตู้เย็นไว้

3. การเตรียมอาหาร YMB (Yeast Malt Broth)

สารเคมีที่ใช้ (อาหาร YMB แบบสำเร็จรูป)

1. ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร
2. มอลต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร
3. เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร
4. กลูโคส 10 กรัมต่อลิตร
5. น้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการเตรียมอาหาร YMB (Yeast Malt Broth)

1. นำอาหาร YMB สำเร็จรูป(แบบผง)
2. ผสมน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วคนให้เข้ากัน
3. นำไปใส่ฟราสก์ที่เตรียมซังข้าวโพดไว้ ฟราสก์ละ 100 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีกับผ้าก๊อซ แล้วห่อด้วยกระดาษ
4. นำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่สภาวะ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เวลา 20 นาที รอให้เย็นแล้วนำไปใช้ในการตรึงเซลล์

4. การเตรียมหัวเชื้อสำหรับการตรึงเซลล์

เชื้อที่ใช้ : เชื้อ *S. cerevisiae*

ขั้นตอนการทำเซลล์แขวนลอย

1. เตรียมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอแล้วมา 1 หลอด
2. นำเชื้อ *S. cerevisiae* ที่เลี้ยงบนวุ้นเอียงมา
3. ใช้ลูปเผาไฟให้ร้อนแดง แล้วทำการเขี่ยเชื้อลงไปผสมกับน้ำกลั่นที่เตรียมไว้
4. นำไปวอร์เทกให้เข้ากัน
5. ทำการนับจำนวนเซลล์ให้ได้ปริมาตร 10^6 เพื่อจะนำไปใช้ในการตรึงเซลล์ต่อไป

5. การเตรียมกากน้ำตาลความเข้มข้นต่างๆเพื่อใช้ในการกระบวนการหมัก

1. ทำการเจือจางกากน้ำตาลให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับ 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตร
2. เติมสารอาหารต่างๆ ดังนี้ หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟต 1, โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1, แมกนีเซียมซัลเฟต 5 และยีสต์สกัด 4 (ดัดแปลงมาจาก Radojka และคณะ, 2012) เตรียมในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร
3. ปิดจุกสำลีที่ปากขวดรูปชมพู่ ปิดด้วยกระดาษอีกครั้ง
4. นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที (ปฏิพล และคณะ, 2555)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการวิเคราะห์

1.การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ด้วยวิธี Phenol-sulfuric acid method (Dubois, 1956)

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

1.1.2 เครื่องผสมสารละลาย (vortex)

1.1.3 คิวเวต

1.1.4 ปิเปต

1.1.5 ลูกยาง

1.1.6 หลอดทดลอง

1.2 สารเคมี

1.2.1 กรดซัลฟิวริก (reagent grade 95.5%, specific gravity 1.84)

1.2.2 ฟีนอลร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอล 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นอีก 95 กรัม เพื่อปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

1.2.3 สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.1 กรัม ละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 มิลลิลิตร ได้สารละลายกลูโคสเริ่มต้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจากนั้นนำมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังตาราง 1 ข

1.3 วิธีการวิเคราะห์

1.3.1 ปิเปตสารละลายตัวอย่างหรือสารละลายกลูโคสมาตรฐานปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลร้อยละ 5 ลงไป 1.0 มิลลิลิตร

1.3.2 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตรลงไปอย่างรวดเร็ว โดยปล่อยกรดลงไปที่ผิวหน้าของของเหลวในหลอดทดลองโดยตรง จะทำให้การผสมกันเกิดขึ้นได้ดีกว่าการปล่อยลงที่ข้างหลอด

1.3.3 ตั้งหลอดทดลองของสารผสมนี้ไว้เป็นเวลา 10 นาที แล้วผสมให้เข้ากัน

1.3.4 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

1.3.5 นำค่าการดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐานกลูโคส (รูปที่ 1 ข) เพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายตัวอย่าง หรือคำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นของกลูโคส (กรัมต่อลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงที่ } 490 \text{ นาโนเมตร} \times \text{อัตราการเจือจาง}}{\text{ความชันของกราฟมาตรฐาน}}$$

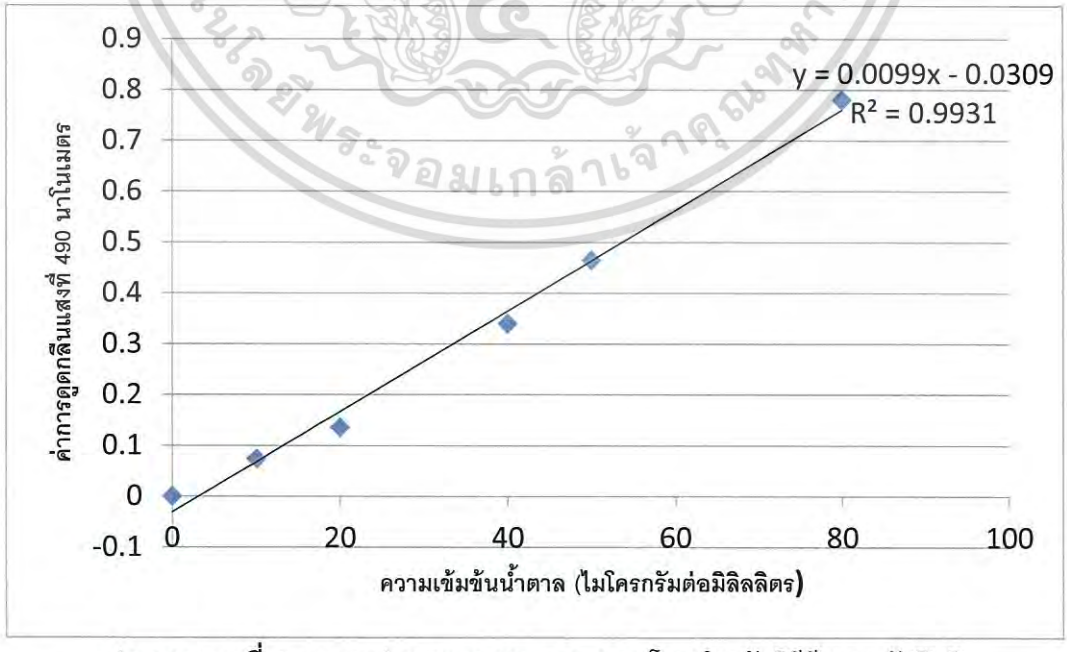
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 ข การเจือจางสารละลายกลูโคสด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

หลอดที่	สารละลายกลูโคส (0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	สารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	0	10	0
2	2	8	20
3	4	6	40
4	6	4	60
5	8	2	80
6	10	0	100

ตารางภาคผนวกที่ 2 ข แสดงค่าความเข้มข้นน้ำตาล (ug/ml) ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร

ความเข้มข้นน้ำตาล (ug/ml)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร
0	0
20	0.104
40	0.232
60	0.363
80	0.501
100	0.622



รูปภาคผนวกที่ 1 ข กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสสำหรับวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การนับจำนวนจุลินทรีย์โดยใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์ (Haemacytometer)

2.1 วิธีการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์

2.1.1 เตรียมตัวอย่างที่จะทำการตรวจนับ ถ้าเป็นของเหลวสามารถนำมานับได้ทันที แต่ถ้าเป็นของแข็งให้ละลายในน้ำกลั่นในปริมตรที่ต้องการก่อน เช่น ชั่งตัวอย่าง 1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจำนวน 10 มิลลิลิตร (จะได้ความเจือจางเป็น 1 : 10) หรืออาจต้องทำการเจือจางมากขึ้นในกรณีที่มีเซลล์จำนวนมาก เช่น เจือจางเป็น 1 : 100 หรือ 1 : 1000เท่า เป็นต้น

2.1.2 ปิเปตสารละลายตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในฮีมาไซโตมิเตอร์ (ที่ปิดด้วย cover slip) โดยใช้ปิเปตที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วดูดตัวอย่างมา 1-2 หยด และหยดลงด้านข้างของแผ่น cover slip

2.1.3 ตรวจนับโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (เลนส์ใกล้วัตถุ 40เท่า)

2.1.4นับจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละช่องเล็กแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ยดยหารด้วยจำนวนช่องทั้งหมดที่ทำการนับแล้วนำไปคูณด้วย 2.5×10^5 จะได้เป็นปริมาณเซลล์ต่อกรัมหรือมิลลิลิตร

2.2 วิธีการคำนวณหาจำนวนจุลินทรีย์

พื้นที่ 1 ช่องกลางในตารางใหญ่มีค่า = 0.2×0.2

= 0.04 ตารางมิลลิเมตร

ความลึกระหว่าง cover slip = 0.1 มิลิลิเมตร

ปริมาตร 1 ช่องกลาง = 0.04×0.1

= 0.004 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ปริมาตร 0.004 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจุลินทรีย์ = Z เซลล์

ปริมาตร 1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร มีจุลินทรีย์ = $Z \times 250 \times 10^3$

= $Z \times 2.5 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร

2.3 วิธีการคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่ถูกตรึง : จำนวนเซลล์ที่ถูกตรึงในวัสดุ = จำนวนเซลล์อิสระ (ชุดควบคุม) – จำนวนเซลล์ที่เหลือในของเหลว

3.การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อ (น้ำหนักเซลล์แห้ง (CDW))

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 หลอดเซนตริฟิวส์

3.1.2 ตู้อบ

3.1.3 โถดูดความชื้น

3.1.4 เครื่องชั่งน้ำหนักชนิดละเอียด 4 ตำแหน่ง

3.1.5 เครื่องปั่นเหวี่ยง

3.2 วิธีการวิเคราะห์

3.2.1 นำหลอดเซนตริฟิวส์อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 12 ชั่วโมง แล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น เมื่อเย็นเท่าอุณหภูมิห้องนำมาชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียดทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่

3.2.2 นำตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ปริมาณ 100 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.2.3 นำหลอดเซนตริฟิวส์ไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 นำหลอดเซนตริฟิวส์ที่อบครบ 12 ชั่วโมง นำมาใส่ในโถดูดความชื้นแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด ทำซ้ำจนน้ำหนักคงที่

3.2.5 บันทึกค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

4. วิธีการวิเคราะห์เอทานอลโดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (กานต์พิชชา, 2557)

4.1กราฟมาตรฐานของเอทานอล

4.1.1ตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้โพรพานอล (n-propanol) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตรเป็นสารละลายมาตรฐานภายใน (internal standard)

4.1.2 เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลให้มีความเข้มข้นร้อยละ 8, 12, 16, 20 และ 24 โดยปริมาตร

4.1.3 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้เทคนิคเฮดสเปซ-แก๊สโครมาโตกราฟี (HS-GC) โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี (GC-2014 Chromatograph, Shimadzu) สารตัวอย่างในขวดแก้วจะระเหยกลายเป็นไอจนกระทั่งอยู่ในสมดุลไดนามิก จากนั้นเครื่องจะดูดไอปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อเข้าสู่คอลัมน์ต่อไป

4.1.4 ใช้คอลัมน์ DB-1 (Agilent J&W GC Column) ความยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.32 มิลลิเมตร ความหนาของฟิล์ม 5 ไมครอน อุณหภูมิของคอลัมน์อยู่ที่ 60 องศาเซลเซียส และใช้ตัวตรวจวัด (detecter) เป็นชนิด Flame Ionization Detector (FID) โดยปรับอุณหภูมิเท่ากับ 180 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิของตำแหน่งฉีดสาร (injector) อยู่ที่ 150 องศาเซลเซียส และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นพาหะโดยมีความดันคอลัมน์เท่ากับ 30 kPa

4.1.5 สภาวะในการวิเคราะห์เริ่มจากอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิในอัตรา 20 องศาเซลเซียสต่อนาที จนถึง 150 องศาเซลเซียส และคงที่ไว้ รวมเวลาในการวิเคราะห์ทั้งหมด 10 นาทีต่อตัวอย่าง โครมาโตแกรมจะแสดงเวลาที่เอทานอลและโพรพานอลถูกชะออกจากคอลัมน์

4.1.6 นำพื้นที่ใต้กราฟ (peak area) ของสารมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นมาสร้างกราฟมาตรฐาน โดยกำหนดให้แกน y คือ อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลต่อโพรพานอลในแต่ละความเข้มข้นส่วนแกน x คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานเอทานอล

4.2 วิธีการวิเคราะห์เอทานอลในตัวอย่าง

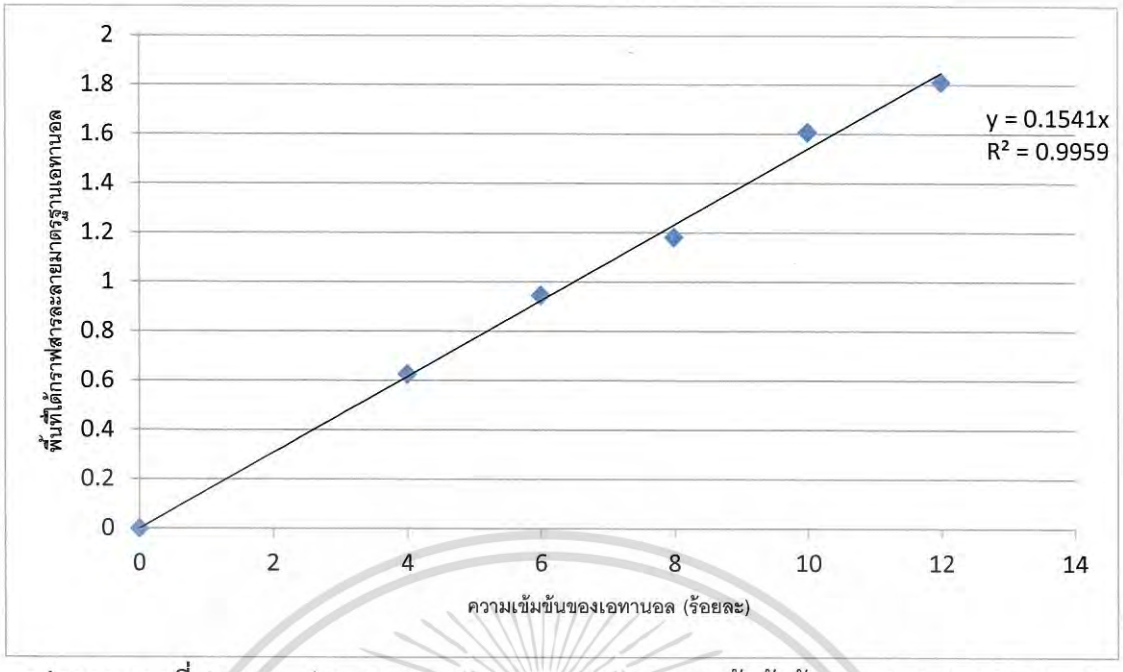
4.2.1 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่าง โดยผสมสารละลายโพรพานอลร้อยละ 10ปริมาตร 500 ไมโครลิตร และตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร

4.2.2 วิเคราะห์ดังสภาวะข้างต้น จากนั้นนำค่าอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลในสารตัวอย่างต่อโพรพานอล มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล

สูตรคำนวณปริมาณเอทานอล

สมการ	y	=	y = 0.1541x
ให้	y	=	ค่าอัตราส่วนระหว่างเอทานอลต่อโพรพานอล
ความหนาแน่นของเอทานอล		=	0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร
ดังนั้น ปริมาณเอทานอล		=	(x) (0.789) (10) กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปภาคผนวกที่ 2 ข กราฟมาตรฐานสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 4, 6, 8, 10 และ 12

5. การหาปริมาณความชื้น (A.O.A.C., 1984)

5.1 วิธีการวิเคราะห์

5.1.1 ทำการชั่งตัวอย่าง 2 กรัม ใส่ลงในภาชนะที่ผ่านการอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที

5.1.2 ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ โดยผ่านการชั่งน้ำหนักแล้ว นำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วทิ้งไว้ให้เย็นในเดซิเคเตอร์ นำมาชั่งน้ำหนักแล้วคำนวณหาปริมาณความชื้นจากสูตร

$$\text{ร้อยละปริมาณความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ(กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวอย่างหลังอบ(กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างก่อนอบ(กรัม)}} \times 100$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การคำนวณและตารางการวิเคราะห์ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอนที่มีการล้างเซลล์ โดยออกแบบการทดลองแบบ 4x5 แฟคทอเรียล

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A	3	2856.84	2856.84	952.28	792.79	0.000
B	4	25.33	25.33	6.33	5.27	0.002
A*B	12	39.79	39.79	3.32	2.76	0.008
Error	40	48.05	48.05	1.20		
Total	59	2970.01				

S = 1.09598 R-Sq = 98.38% R-Sq (adj) = 97.61%

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลในการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอนที่มีการล้างเซลล์โดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

A	B	N	Mean	Grouping
4	4	3	31.75	A
4	3	3	31.68	A
4	1	3	30.66	A
4	5	3	29.58	A
4	2	3	28.79	A
1	1	3	22.90	B
3	1	3	22.27	B C
3	4	3	22.03	B C
3	5	3	21.13	B C
3	2	3	20.35	B C
1	5	3	19.86	B C
1	3	3	19.56	B C
1	2	3	19.53	B C
3	3	3	19.39	C
1	4	3	19.33	C
2	1	3	11.24	D
2	4	3	10.97	D
2	2	3	10.93	D
2	3	3	10.92	D
2	5	3	10.84	D

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ ในช่อง A ตัวแปรมีความหมายดังนี้ 1=ชุดควบคุม 2, 3 และ 4=ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนในช่อง B คือระยะเวลาในการหมักโดย 1, 2, 3, 4 และ 5 เท่ากับ 12, 24, 36, 48 และ 60 ตามลำดับ

ตารางภาคผนวกที่ 3 ค การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอนที่ไม่มีการล้างเซลล์ โดยออกแบบการทดลองแบบ 4x5 แฟคทอเรียล

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A	3	2625.00	2625.00	875.00	516.15	0.000
B	4	20.84	20.84	5.21	3.07	0.027
A*B	12	42.66	42.66	3.56	2.10	0.040
Error	40	67.81	67.81	1.70		
Total	59	2756.32				

S =1.30202 R-Sq = 97.54% R-Sq (adj) = 96.37%

ตารางภาคผนวกที่ 4 ค การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลในการศึกษาปัจจัยแหล่งคาร์บอนที่ไม่มีการล้างเซลล์โดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

A	B	N	Mean	Grouping
4	3	3	30.15	A
4	2	3	29.88	A
4	5	3	29.37	A
4	4	3	28.83	A
4	1	3	27.85	A
1	1	3	22.90	B
3	1	3	22.73	B
3	5	3	20.87	B
3	4	3	20.69	B
3	3	3	20.35	B
1	5	3	19.86	B
1	3	3	19.56	B
1	2	3	19.53	B
1	4	3	19.33	B
3	2	3	19.05	B
2	1	3	11.68	C
2	5	3	10.62	C
2	3	3	10.18	C
2	4	3	10.11	C
2	2	3	10.08	C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ ในช่อง A ตัวแปรมีความหมายดังนี้ 1=ชุดควบคุม 2, 3 และ 4=ความเข้มข้นของกากน้ำตาล 50, 100 และ 150 กรัมต่อลิตรตามลำดับ ส่วนในช่อง B คือระยะเวลาในการหมักโดย 1, 2, 3, 4 และ 5 เท่ากับ 12, 24, 36, 48 และ 60 ตามลำดับ

ตารางภาคผนวกที่ 5 ค การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจนที่มีการล้างเซลล์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CRD

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A	3	63.852	63.852	21.284	2.27	0.157
Error	8	74.896	74.896	9.362		
Total	11	138.747				

S = 3.05973 R-Sq = 46.02% R-Sq (adj) = 25.78%

ตารางภาคผนวกที่ 6 ค การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยแสดงปริมาณของเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจนที่มีการล้างเซลล์โดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

A	N	Mean	Grouping
2	3	29.14	A
1	3	27.53	A
3	3	25.71	A
4	3	22.93	A

หมายเหตุ ในคอลัมน์ A ตัวแปรมีความหมายดังนี้ 1=ชุดควบคุม 2, 3 และ 4= ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

ตารางภาคผนวกที่ 7 ค การวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจนที่ไม่มีการล้างเซลล์ โดยออกแบบการทดลองแบบ CRD

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
A	3	30.482	30.482	10.161	1.43	0.303
Error	8	56.681	56.681	7.085		
Total	11	87.163				

S = 2.66179 R-Sq = 37.97% R-Sq (adj) = 10.59%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 8 ค การวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของปริมาณเอทานอลที่ได้ในการศึกษาปัจจัยแหล่งไนโตรเจนที่ไม่มีการล้างเซลล์โดยวิธี Tukey ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95.0

A	N	Mean	Grouping
4	3	30.72	A
1	3	27.53	A
2	3	27.06	A
3	3	26.71	A

หมายเหตุ ในคอลัมน์ A ตัวแปรมีความหมายดังนี้ 1=ชุดควบคุม 2, 3 และ 4= ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 3, 4 และ 5 กรัมต่อลิตรตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้