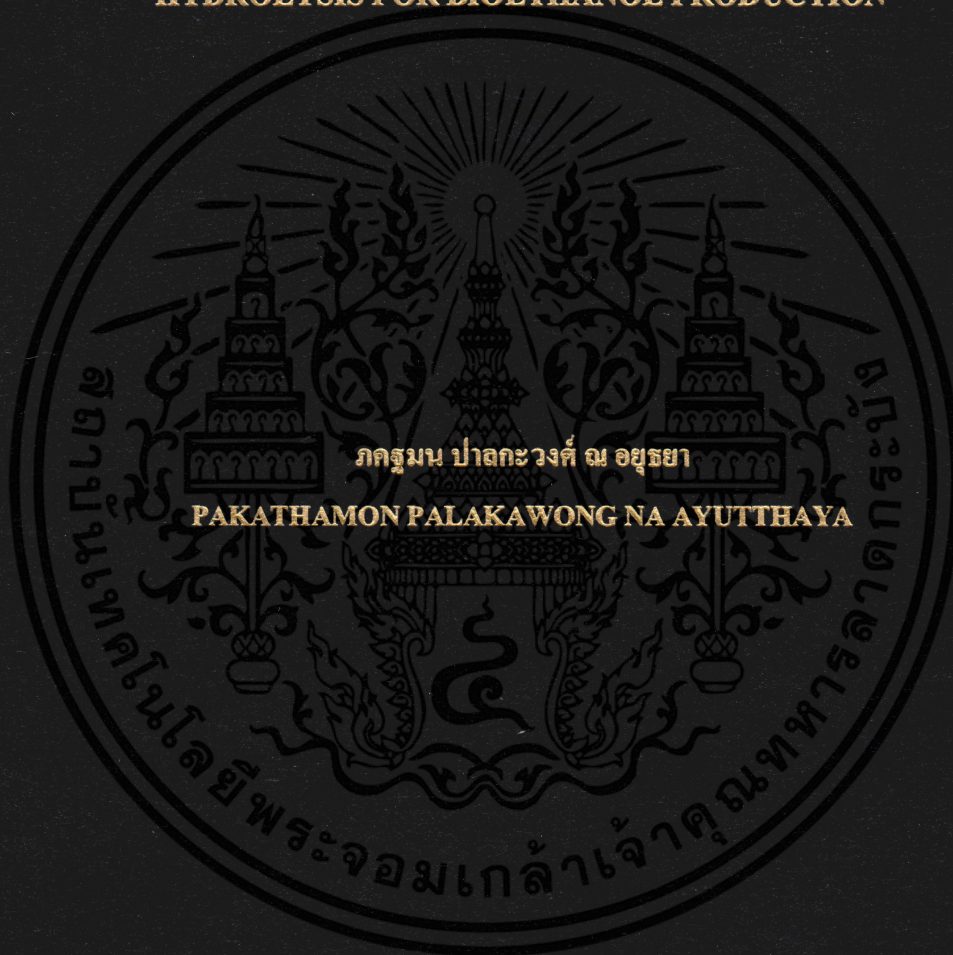


การปรับสภาพเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ให้ทนต่อสารยับยั้งที่
เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลชีวภาพ

ADAPTATION OF COMMERCIAL YEAST *Saccharomyces cerevisiae* SC90 TO
TOLERATE INHIBITORS GENERATED DURING CASSAVA PULP
HYDROLYSIS FOR BIOETHANOL PRODUCTION



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-AI-M-053-331

การปรับสภาพเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ให้ทนต่อสารยับยั้งที่
เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลชีวภาพ

**ADAPTATION OF COMMERCIAL YEAST *Saccharomyces cerevisiae* SC90 TO
TOLERATE INHIBITORS GENERATED DURING CASSAVA PULP
HYDROLYSIS FOR BIOETHANOL PRODUCTION**



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

KMITL-2019-AI-M-053-331

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ADAPTATION OF COMMERCIAL YEAST *Saccharomyces cerevisiae* SC90 TO
TOLERATE INHIBITORS GENERATED DURING CASSAVA PULP
HYDROLYSIS FOR BIOETHANOL PRODUCTION**



PAKATHAMON PALAKAWONG NA AYUTTHAYA

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE
FACULTY OF AGRO-INDUSTRY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2019

KMITL-2019-AI-M-053-331

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2019

FACULTY OF AGRO-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์

การปรับสภาพเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ให้ทนต่อสารยับยั้ง
ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลชีวภาพ
ADAPTATION OF COMMERCIAL YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*
SC90 TO TOLERATE INHIBITORS GENERATED DURING CASSAVA PULP
HYDROLYSIS FOR BIOETHANOL PRODUCTION

ชื่อนักศึกษา

นางสาวกชฎมน ปาลกะวงศ์ ณ อยุธยา

รหัสประจำตัว

57608007

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม -

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์	ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา	สร้อยสุดา
ผศ.ดร.ธงชัย พุฒทองศิริ	ธงชัย
ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ	วิรามศรี ศรีพจนารถ
รศ.ดร.เทพปัญญา เจริญรัตน์	เทพปัญญา

วัน / เดือน / ปีที่สอบ 5 กรกฎาคม 2562 เวลา 09.00-12.00 น.

สถานที่สอบ ณ ห้อง A 302 อาคารเจ้าคุณทหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตรรับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิริโรตม)

คณบดีคณะอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 30 เดือน กค พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การปรับสภาพเชื้อยีสต์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SC90 ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอลชีวภาพ Adaptation of commercial yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis for bioethanol production
ชื่อนักศึกษา	นางสาว ภคธมณ ปาลกะวงศ์ ณ อยุธยา
รหัสประจำตัว	57608007
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร. สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา

บทคัดย่อ

กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรจากการผลิตแป้งมันสำปะหลังในอุตสาหกรรมของประเทศไทย สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้โดยการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดร่วมกับกระบวนการระเบิดด้วยไอน้ำซึ่งอาจก่อให้เกิดสารยับยั้ง เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอพิวริล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวริล ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและส่งผลต่อการหมักของเชื้อยีสต์ ดังนั้น ในการศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับสภาพยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SC90 ในอาหารปรับสภาพสูตรเดิมซ้ำหลายๆรอบเพื่อให้ได้เซลล์ที่สามารถทนต่อสารยับยั้งโดยวัดจากการเจริญเติบโตของเชื้อจนกระทั่งได้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อเท่ากับหรือมากกว่า $0.22 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ (80% ของค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในสถานะควบคุม) แล้วจึงนำไปเพาะเลี้ยงในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปตั้งแต่ 20 ถึง 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ผลการทดลองพบว่า การเพิ่มปริมาณของสารละลายกากมันสำปะหลังส่งผลให้เชื้ออยู่ในช่วงปรับตัวนานขึ้นและใช้เวลาเพาะเลี้ยงนานขึ้นเพื่อให้ได้จำนวนเซลล์สูงสุดในอาหารแต่ละสูตร อย่างไรก็ตามการเลี้ยงเชื้อในอาหารปรับสภาพสูตรเดิมซ้ำๆ ช่วยลดระยะเวลาปรับตัวของเชื้อและใช้เวลาในการทำให้เซลล์มีจำนวนสูงสุดลดลงในแต่ละรอบของการหมัก เมื่อนำเซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพมาเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ที่เติมสารยับยั้งผสมซึ่งคัดเลือกจากการเจริญของยีสต์ในสารยับยั้งทั้งห้าชนิด พบว่าเซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพสามารถทนสารยับยั้งกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอพิวริล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวริลได้มากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ปรับสภาพ ที่ระดับความเข้มข้น 67.5, 85, 125, 3.25 และ 4.39 มิลลิโมลาร์

ตามลำดับ และเมื่อนำไปเพาะเลี้ยงในสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า เซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพมีการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพการหมักสูงกว่าสถานะที่ใช้เชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เท่ากับ 38% และ 27% ตามลำดับ นอกจากนี้การปรับสภาพเชื้อแล้ว การเติมปุ๋ยขาวให้มากเกินพอดีด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ก็เป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยกำจัดสารพิษในสารละลายจากวัสดุทางการเกษตรและสามารถเพิ่มความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อได้ จากการทดลองพบว่า ในกระบวนการผลิตเอทานอลจากสารละลายที่กำจัดสารพิษออกโดยใช้ยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพสามารถปรับปรุงการเจริญและประสิทธิภาพการหมักของเชื้อได้สูงกว่าสถานะที่ใช้สารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่ได้กำจัดสารพิษเพียงเล็กน้อยประมาณ 9% และ 4% ตามลำดับ



Thesis	Adaptation of commercial yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis for bioethanol production
Student	Ms. Pakathamon Palakawong Na Ayutthaya
Student ID.	57608007
Degree	Master of Science
Program	Food science
Year	2017
Thesis Advisor	Assist. Prof. Dr. Soisuda Pornpukdeewattana

ABSTRACT

Cassava pulp is an agricultural residue from cassava flour manufacturing in industry of Thailand. It can be used as a substrate for ethanol fermentation by using diluted acid hydrolysis combined with steam explosion which can generate inhibitory byproducts including acetic acid, formic acid, levulinic acid, furfural and 5-hydroxy methyl furfural (5-HMF). These compounds have negative effect on yeast growth and fermentation ability. Therefore, the objective of this study was to adapt yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to obtain the inhibitor tolerable cells. Adaptation was performed by repeated culture in the same media to a specific growth rate (μ) of 0.22 h^{-1} or higher (80% of the μ in control) and then transferring them to progressively higher concentration of cassava pulp hydrolysate ranging from 20% to 100% (v/v). The results showed that a tendency of longer lag phase as well as time to reach maximum cell number (t_{maxc}) with an increase in hydrolysate concentration. However, the repeated culture at the same hydrolysate concentration could shorten both lag period and t_{maxc} . The adapted cells were grown in YPD medium containing various inhibitors which is selected from the yeast growth in each of the five inhibitors. The adapted cells showed the tolerant on acetic acid, formic acid, levulinic acid, furfural and 5-HMF more than that of non-adapted cells at the concentration of 67.5, 85, 125, 3.25 and 4.39 mM, respectively. It also showed that the growth and fermentation efficiency of adapted cells in 100% hydrolysate were significantly higher ($p \leq 0.05$) than those of non-adapted cells by 38% and 27%, respectively. Moreover, the addition of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (overliming) is an alternative for detoxification in lignocellulose hydrolysate and it can enhance the fermentability

by yeast. The result showed that the adapted cells can improve both growth and fermentation efficiency of detoxified cassava pulp hydrolysates which is more than those of un-detoxified hydrolysate about 9% and 4%, respectively.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติที่ได้สนับสนุนทุนการวิจัย โดยวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยการให้คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนการตรวจสอบวิทยานิพนธ์จาก ผศ.ดร.สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ โดยมี รศ.ดร.เทพปัญญา เจริญรัตน์ ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ และ ผศ.ดร.ชงชัย พุฒทองศิริ ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการในการสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์ และสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนให้คำแนะนำ การแก้ไขปัญหาต่างๆ และช่วยตรวจทานวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์มากขึ้น นอกจากนี้ยังได้รับความช่วยเหลือด้านเครื่องมือจากเจ้าหน้าที่ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีวิทยาลัยเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ จนทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยจึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ให้คำปรึกษา และช่วยเหลือในการปฏิบัติงาน รวมถึงเพื่อนๆ และน้องๆ ที่ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานนเดียวกัน นอกจากนี้ยังได้รับความอนุเคราะห์วัตถุดิบจากบริษัท ไควซ์ เอ็ยะ อุตสาหกรรมแป้งมันและสาชู จำกัด อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณ บิดา มารดา ญาติๆ ที่ส่งเสริมการศึกษาและให้กำลังใจมาโดยตลอดรวมถึงงานวิจัยต่างๆ ที่ผู้วิจัยได้ศึกษาค้นคว้าและนำมาอ้างอิงในการทำวิจัยในฉบับนี้

ภกฐมน ปาลกะวงศ์ ณ อยุธยา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ	VI
สารบัญตาราง	IX
สารบัญภาพ	XI
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ยีสต์.....	4
2.2 เอทานอลชีวภาพ	7
2.3 กากมันสำปะหลัง.....	8
2.4 องค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลส.....	10
2.5 วิธีการผลิตเอทานอลชีวภาพจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส	13
2.6 กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้น	14
2.7 การย่อยสลาย.....	19
2.8 กระบวนการหมักเอทานอล	21
2.9 สารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยสลายด้วยกรดร่วมกับ การใช้ความร้อน.....	23
2.10 กลไกการยับยั้งของสารยับยั้ง.....	26
2.11 การลดความเป็นพิษของสารยับยั้งที่เกิดระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ	28
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินงาน	31
3.1 วัตถุดิบ	31
3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์.....	31
3.3 สารเคมี.....	32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์.....	33
3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย	33
3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	40
บทที่ 4 ผลการทดลอง และวิจารณ์	41
4.1 ปริมาณน้ำตาล และสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสารละลายกากมันสำปะหลัง.....	41
4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งแต่ละชนิดต่อการเจริญของเชื้อยีสต์	43
4.3 ผลการศึกษาการปรับสภาพเชื้อยีสต์ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นใน ระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง	48
4.3.1 การเจริญ และการรอดชีวิต.....	49
4.3.2 สารยับยั้ง และการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้ง.....	52
4.3.3 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล	55
4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งในรูปสารผสมต่อการ เจริญ และการผลิตเอทานอลในอาหารเหลว YPD โดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่าน การปรับสภาพ.....	58
4.4.1 การเจริญ และการรอดชีวิต.....	58
4.4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้ง	60
4.4.3 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล	62
4.5 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมัน สำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ	65
4.5.1 การเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ ไม่ผ่านการกำจัดสารพิษความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร)	65
4.5.2 การเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ผ่านการกำจัด และไม่ กำจัดสารพิษ.....	69
4.6 ผลการศึกษาปริมาณแหล่งอนินทรีย์ในโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิต เอทานอลชีวภาพ	71
4.6.1 การเจริญ และการรอดชีวิต.....	72
4.6.2 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล	73

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	76
5.1 สรุปผลการทดลอง	76
5.2 ข้อเสนอแนะ	77
บรรณานุกรม	78
ภาคผนวก	91
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	92
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	103
ประวัติผู้เขียน	114







สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง	9
2.2 สารยับยั้งทั่วไปที่เกิดขึ้นในสารละลายจากการย่อยสลายวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส.....	24
3.1 การทดสอบความสามารถของยีสต์ ในการทนต่อสารยับยั้งในรูปสารผสม.....	37
4.1 ปริมาณ fermentable sugars ที่ลดลงในระหว่างการหมักในสารละลายกากมัน สำปะหลังโดยเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90	43
4.2 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ระยะพัก การเจริญสัมพัทธ์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง ของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ระดับความเข้มข้นและสารยับยั้งแตกต่างกัน	46
4.3 การเจริญ และการรอดชีวิตของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ในระหว่างกระบวนการ ปรับสภาพ	51
4.4 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากการปรับสภาพเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตร	56
4.5 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพในอาหารเหลว YPD ที่มีการเติมสารยับยั้งผสมในระดับต่างๆ.....	60
4.6 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพในอาหาร YPD ที่มีการเติมสารยับยั้ง ผสมในระดับต่างๆ	64
4.7 พารามิเตอร์การเจริญและการผลิตเอทานอล โดยเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายกากมันสำปะหลัง ที่ไม่กำจัดสารพิษ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร)	67
4.8 พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการ ปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัด และกำจัดสารพิษ.....	71
4.9 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการ ผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลาย กากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษ	74
ก-1 สูตรอาหารปรับสภาพที่ใช้ในการปรับตัวของเชื้อยีสต์.....	97
ข-1 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและค่าลอการิทึมของจำนวนเซลล์ยีสต์ในช่วงระยะเพิ่มจำนวน	105

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข-2 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐาน และค่า OD_{480} ของกลูโคสที่ความเข้มข้น ต่างๆ	107
ข-3 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐานเอทานอล ที่ความเข้มข้นต่างๆ	109
ข-4 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐานน้ำตาลที่ ความเข้มข้นต่างๆ	110
ข-5 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐานสารยับยั้ง ประเภทกรดที่ความเข้มข้นต่างๆ	112
ข-6 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานสารยับยั้งประเภทฟูแรนที่ความเข้มข้น ต่างๆ	113

สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 รูปแบบการเจริญของยีสต์ในระบบให้อาหารแบบครั้งเดียว (batch culture).....	6
2.2 กากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง.....	8
2.3 แสดงโครงสร้างภายในผนังเซลล์ของพืช.....	10
2.4 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส.....	11
2.5 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส.....	12
2.6 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน.....	12
2.7 กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส.....	14
2.8 โครงสร้างวัตถุดิบโนเซลลูโลสหลังการปรับสภาพ.....	15
2.9 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลสภายใต้ สภาวะที่เป็นกรด.....	23
2.10 กลไกการยับยั้งที่เกิดขึ้นในเซลล์ของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> จากอนุพันธ์ฟูแรน กรดอ่อน และสารประกอบฟีนอลิก.....	28
4.1 การเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 โดยติดตามจากค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในอาหาร YPD ที่เติมกรดฟอร์มิก (ก) กรดอะซิติก (ข) กรดลิวลินิก (ค) เฟอพิวรัล (ง) และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล (จ) ในระดับความ เข้มข้นต่างๆ และสภาวะควบคุมที่ไม่เติมสารยับยั้ง.....	44
4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอะซิติก กรดลิวลินิก เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัลในระหว่างการปรับสภาพเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่เลี้ยงในอาหารที่ ผสมสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 20% (ก) 40% (ข) 60% (ค) 80% (ง) และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) (จ) ในรอบแรก และรอบสุดท้าย.....	54
4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) และการรอดชีวิต (ข) ของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ไม่ได้ปรับสภาพ และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ค) และการรอด ชีวิต (ง) ของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในอาหาร YPD ที่ เติมสารยับยั้งในระดับความเข้มข้นต่างๆ.....	59
4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้งเฟอพิวรัล (— ) และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล (— ) โดยการใส่เชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพ [(— )], (— )] ที่เลี้ยงในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งผสมระดับความเข้มข้นที่ 1 (ก) 2 (ข) 3 (ค) และ 4 (ง).....	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) การรอดชีวิต (ข) การใช้น้ำตาล กลูโคส (ค) และ (ง) การผลิตเอทานอล ของเชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ (—●—) และไม่ผ่านการปรับสภาพ (—○—) ในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร).....	66
4.6 ผลของความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการกำจัดสารพิษต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการปรับสภาพด้วย การทดลองนี้ใช้เทคนิค Spot plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง.....	69
4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) และการรอดชีวิต (ข) ของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่กำจัด (—●—) และไม่กำจัดสารพิษ (—○—).....	70
4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) และ การรอดชีวิต (ข) ของเชื้อยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังไม่กำจัดสารพิษที่ไม่มี (—●—) และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 (—○—) 3 (—▼—) 5 (—▲—) และ 7.5 กรัมต่อลิตร (—■—)	72
4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังไม่กำจัดสารพิษที่ไม่มี (—●—) และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 (—○—) 3 (—▼—) 5 (—▲—) และ 7.5 กรัมต่อลิตร (—■—).....	74
ข-1 ตัวอย่างการคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อยีสต์	106

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นสารประกอบชีวมวลที่มีปริมาณมากที่สุดในโลก พบได้ทั่วไปในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร ซึ่งมีองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสแตกต่างกันตามชนิดของพืช แต่โดยทั่วไปแล้วประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน (พิชามญช์ และคณะ, 2556) ประเทศไทยนับว่าเป็นประเทศเกษตรกรรม และมีผลผลิตทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก จึงมีข้อได้เปรียบในเรื่องการนำวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรมาใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ เช่น ใช้ในการผลิตไบโอเอทานอลซึ่งเป็นเชื้อเพลิงชีวภาพ สามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทดแทนน้ำมันจากฟอสซิลได้เป็นอย่างดี

มันสำปะหลัง จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งในประเทศไทยที่มีการเพาะปลูกในพื้นที่ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นส่วนใหญ่ โดยพบว่าแต่ละปีมีการนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อการบริโภคต่างๆ เช่น การผลิตแป้งมันสำปะหลัง โดยมีกากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือทิ้งเป็นจำนวนมาก กากมันสำปะหลังนอกจากจะนำไปใช้ทำอาหารสัตว์แล้วยังมีการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ เนื่องจากในกากมันสำปะหลังยังคงมีปริมาณแป้งหลงเหลืออยู่ค่อนข้างมาก ดังนั้น การนำกากมันสำปะหลังมาใช้ในการผลิตเอทานอลไม่เพียงแต่ช่วยลดของเสียที่เกิดจากอุตสาหกรรมการผลิตแป้งมันสำปะหลังเท่านั้น แต่ยังสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย

การผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสจำเป็นต้องมีขั้นตอนปรับสภาพวัตถุดิบ เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างของมวลชีวภาพโดยการละลายหรือแยกส่วนประกอบประเภทลิกนินและเฮมิเซลลูโลสรวมถึงการลดปริมาณคริสตัลไลน์เซลลูโลสออกจากกันเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Kumar *et al.*, 2009) โดยวิธีที่นำมาใช้ในการวิจัยคือการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน ซึ่งวิธีนี้มักจะเกิดสารเคมีอื่นๆ ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ (Walker, 2011) โดยจะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ ตลอดจนมีความรุนแรงต่อกระบวนการผลิตเอทานอล โดยจะชะลอจนพลศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลให้ช้าลง บางกรณีอาจพบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ และยับยั้งการผลิตเอทานอลอย่างสมบูรณ์ (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Mussatto and Roberto, 2004) ทั้งนี้ชนิดและปริมาณสารยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ และกระบวนการที่เลือกใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ

เนื่องจากกระบวนการเตรียมวัตถุดิบก่อให้เกิดสารยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักซึ่งส่งผลต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดขึ้น จึงมีการศึกษาถึงการลดความเป็นพิษของสารยับยั้งดังกล่าว เพื่อที่จะเพิ่มศักยภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา มีการศึกษาวิจัยในการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสนั้นหัวข้อหนึ่งที่ได้รับความสนใจ คือ การปรับสภาพของเชื้อจุลินทรีย์ให้ทนต่อสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยปรับปรุงผลได้ของผลิตภัณฑ์ (Silva and Roberto, 2001) เช่น ในการศึกษาการพัฒนาเชื้อ *Pichia stipitis* *Candida shehatae* และ *Pachysolen tanophyllus* ให้ทนต่อสารยับยั้ง ซึ่งส่งผลให้เกิดการพัฒนาความสามารถในการหมักสารละลายที่มีไซโลส (Tomás-Pejó *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2007)

งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นของเหลือจากโรงงานโดยใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลชีวภาพ โดยนำกากมันสำปะหลังซึ่งเป็นส่วนที่เหลือจากการผลิตแป้งมันสำปะหลังมาผ่านการย่อยด้วยกรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อนเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการหมักเอทานอลได้ และมีวัตถุประสงค์ในการปรับสภาพเชื้อจุลินทรีย์ให้สามารถทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสารละลายที่ได้จากกระบวนการปรับสภาพ โดยทำการเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 5 สูตร ซึ่งจะเริ่มจากการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการเจือจางของสารยับยั้งน้อยที่สุดเพื่อให้เชื้อได้มีการปรับตัว จากนั้นจึงถ่ายเชื้อไปยังสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงขึ้น ด้วยวิธีการดังกล่าวมานี้ มีผู้รายงานว่าเชื้อจุลินทรีย์สามารถทนต่อสารยับยั้งได้สูงขึ้น และพบว่ามีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลที่สูงขึ้น (Martín *et al.*, 2007; Tomás-Pejó *et al.*, 2010) ซึ่งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมที่ใช้วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นวัตถุดิบ

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ให้สามารถทนต่อสารยับยั้งต่างๆ ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากกากมันสำปะหลังด้วยสารละลายซัลฟูริกเจือจางร่วมกับการให้ความร้อนเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอล

1.2.2 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมทั้ง 5 ชนิดสูงสุดในอาหารเหลว YPD ที่ยีสต์สามารถเจริญได้

1.2.3 เพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดยการหมักด้วยยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว

1.2.4 เพื่อศึกษาความเข้มข้นของสารอาหารแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

ในงานวิจัยนี้มีเป้าหมายในการปรับสภาพเชื้อยีสต์ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบจากกากมันสำปะหลัง คือ กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดลิวลินิก เฟอพิวริล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวริล เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล โดยขั้นต้นจะทำการศึกษาความสามารถเบื้องต้นของการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในการทนต่อสารยับยั้งแต่ละชนิดในอาหารเหลว YPD หลังจากนั้นทำการปรับสภาพเชื้อยีสต์ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดจากกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดรวมกับการให้ความร้อน โดยนำสารละลายกากมันสำปะหลังที่ข่อยได้ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และสารยับยั้งต่างๆ (กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก กรดลิวลินิก เฟอพิวริล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวริล) ก่อนนำไปใช้ในการหมักจะทำการเจือจางความเข้มข้นของสารละลายส่วนใสออกเป็น 5 ระดับ คือ ระดับความเข้มข้น 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% โดยเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีความเข้มข้นน้อยที่สุดเพื่อให้เชื้อได้มีการปรับตัวในการทนต่อสารยับยั้งได้มากขึ้นก่อนจะถ่ายเชื้อไปยังสภาวะที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น และนำเชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วไปทำการศึกษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิดในรูปสารผสมอีกครั้งเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญกับเชื้อยีสต์ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ รวมทั้งทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษและกำจัดสารพิษ ตลอดจนศึกษาปริมาณแอลกอฮอล์ในโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลชีวภาพจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วสามารถทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยวิธีการใช้กรดเจือจางร่วมกับความร้อนได้

1.4.2 ทราบระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิดสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้

1.4.3 เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว มีความสามารถในการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังได้ดีขึ้น

1.4.4 ทราบระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากสารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลัง

บทที่ 2

ทฤษฎี และวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มนุษย์ให้ความสนใจศึกษาก่อนข้างมาก และรู้จักนำมาใช้ประโยชน์ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น เบียร์ ไวน์ วิสกี้ สุรา เป็นต้น นอกจากนี้ยีสต์ยังมีบทบาทสำคัญทางอุตสาหกรรมผลิตพลังงานทดแทนคือเอทานอลที่ผลิตจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร (อรุณ, 2558) ยีสต์ที่นิยมใช้มากที่สุดในระดับอุตสาหกรรม และในการวิจัยในห้องปฏิบัติการคือยีสต์ในตระกูล *Saccharomyces* sp. ซึ่งมีการพัฒนาเป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะ *S. cerevisiae* ที่มีการพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์มาตลอด จนปัจจุบันมีเชื้อยีสต์สายพันธุ์นี้มากกว่าพันสายพันธุ์ ด้วยคุณสมบัติที่ต่างจากสายพันธุ์อื่นๆ คือ สามารถเจริญเติบโตได้เร็วทั้งในสถานะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ สามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น กลูโคส ฟรักโทส และซูโครส มีความทนต่อเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อ และผลิตเอทานอลได้สูง อีกทั้งยังทนต่อสารยับยั้งที่เกิดในระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ (Linden and Hahn-Hägerdal, 1989; Olsson and Hahn-Hägerdal, 1993.; กล้าณรงค์ และคณะ, 2549)

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของยีสต์

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ชนิดยูคาริโอตจัดอยู่ในอาณาจักรฟังไจ (fungi) อยู่ในดิวิชันยูมัซโคตา (Eumycota) ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว สามารถสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยวิธีการแตกหน่อ (budding) และการแบ่งตัวแบบทวิภาค (binary fission) บางชนิดสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ (อรุณ, 2558)

2.1.2 โครงสร้างของยีสต์

โครงสร้างสำคัญของยีสต์ประกอบไปด้วย ผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์ เพอร์พลาสซึม ไซโทพลาสซึม นิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย แวกัวโอล และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (อรุณ, 2558)

2.1.3 แหล่งสารอาหารสำหรับยีสต์

2.1.3.1 แหล่งคาร์บอน ได้แก่ น้ำตาล โดยเฉพาะกลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ส่วนใหญ่สามารถนำไปใช้และเจริญได้ดี ห้องปฏิบัติการจึงนิยมใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการเพาะเลี้ยงยีสต์

2.1.3.2 แหล่งไนโตรเจน ไสโตรเจนไอออน หรือโปรตอน มีความสำคัญทางสรีรวิทยาของยีสต์ เนื่องจากมีผลต่อค่า pH ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ มีอิทธิพลมากต่อการเจริญและเมตาบอลิซึมของยีสต์

2.1.3.3 แหล่งออกซิเจน ยีสต์หลายชนิดเจริญเฉพาะในที่ที่มีออกซิเจน โดยออกซิเจนทำหน้าที่หลักเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่อิเล็กตรอน (electron transport chain) และยังทำหน้าที่เป็นต่อการเกิดปฏิกิริยาไฮดรอกซีเลชัน (hydroxylation) เพื่อใช้ในการสังเคราะห์สเตอรอล และกรดไขมันไม่อิ่มตัวซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์

2.1.3.4 แหล่งไนโตรเจน ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบภายในเซลล์ประมาณ 10 % ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สำหรับการเพาะเลี้ยงยีสต์สามารถใช้สารหลายชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยต้องมีโมเลกุลขนาดเล็ก และใช้ได้ง่าย เช่น กลีโอะแอม โมเนียม ไนเตรท ไนไตรท์ ยูเรีย กรดอะมิโนเปปไทด์ พิวรีน และเอมีน เป็นต้น

2.1.3.5 แหล่งซัลเฟอร์ ยีสต์ต้องการซัลเฟอร์เพื่อใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ แหล่งซัลเฟอร์ได้จากสารประกอบหลายชนิด เช่น ซัลเฟต ซัลไฟด์ ไทโอซัลเฟต เมไทโอนีน และกลูตาไทโอน เป็นต้น สารซัลเฟตอินทรีย์ในรูปของซัลเฟตไอออน โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต $((\text{NH}_4)_2\text{SO}_4)$ หรือโพแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) เป็นแหล่งของซัลเฟอร์ที่นิยมใช้ในอาหาร

2.1.3.6 แหล่งฟอสฟอรัส ฟอสฟอรัสพบได้ในกรดนิวคลีอิกและฟอสโฟลิปิด ประจุลบในไซโทพลาสซึมของยีสต์ส่วนหนึ่งเกิดจากสารอนินทรีย์ฟอสเฟต โดยแหล่งฟอสฟอรัสที่ใช้ คือ ออร์โทฟอสเฟต และอนินทรีย์ฟอสเฟต โดยออร์โทฟอสเฟตทำหน้าที่ช่วยการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด รวมทั้งการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างพลังงาน

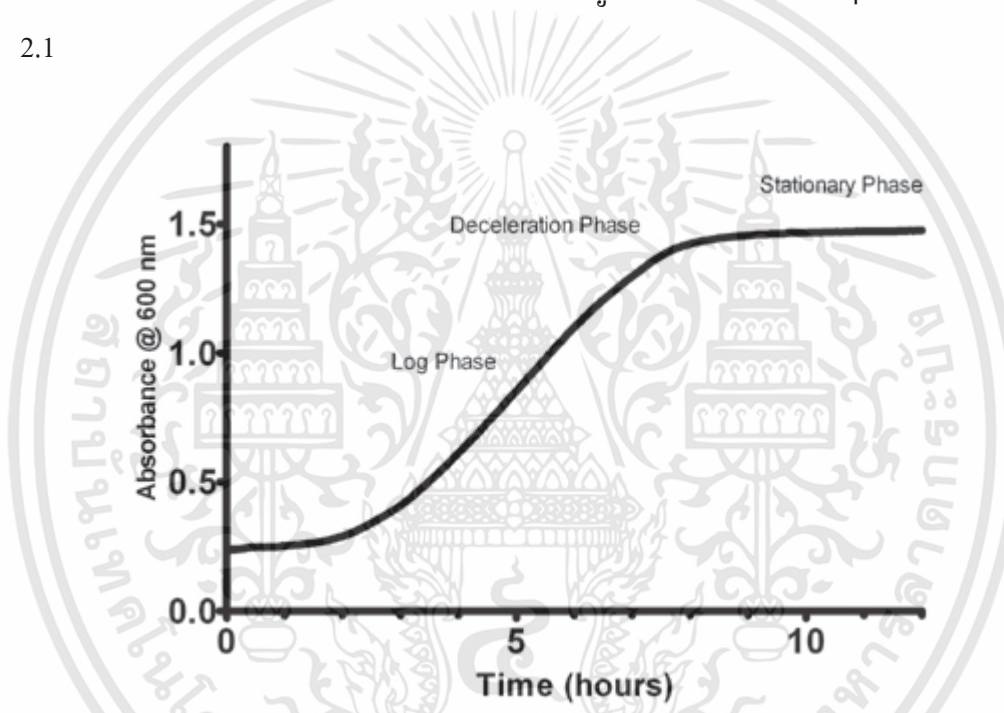
2.1.3.7 แหล่งแร่ธาตุ ยีสต์ต้องการแร่ธาตุหลายชนิดสำหรับการเจริญ โดยแมกโครอิลิเมนต์ (macro element) เป็นธาตุที่ต้องการมากกว่าธาตุอื่น คือ โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ที่ระดับมิลลิโมลาร์ (millimolar; mM) ใช้สำหรับสร้างสถานะที่มีประจุบวกภายในเซลล์ ส่วนธาตุอาหารที่ยีสต์ต้องการในปริมาณต่ำ เรียกว่า ไมโครอิลิเมนต์ (micro element) ได้แก่ แอมกานีส แคลเซียม เหล็ก สังกะสี ทองแดง นิกเกิล โคบอลต์ และ โมลิบดีนัม กลุ่มธาตุโลหะจำเป็น ได้แก่ อะลูมิเนียม อะเซนิค โบรอน ซีเซียม แคลเซียม โปรท ลิเทียม ตะกั่ว ต้องการในปริมาณน้อยมาก และจะเป็นพิษต่อการเจริญหากมีความเข้มข้นมากกว่า 100 ไมโครโมลาร์

2.1.3.8 สารสนับสนุนการเจริญ (growth factor) เป็นสารประกอบอนินทรีย์ที่ยีสต์ต้องการในปริมาณน้อยที่นำมาใช้เฉพาะในกระบวนการแคตาบอลิซึม (catabolism) บางอย่างเท่านั้น หรือมีบทบาทต่อการทำงานของโครงสร้างของเซลล์ยีสต์ เช่น วิตามิน ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ของเอนไซม์บางชนิด อีกทั้งต้องการกรดอะมิโนบางชนิด สเตอรอล พอลิเอมีน โคลีน มีโซอินซิทอล และกรดไขมันบางประเภท เนื่องจากยีสต์ไม่สามารถสังเคราะห์สารเหล่านี้เองได้ ซึ่งพบว่าเมื่อเติมสารเหล่านี้ในอาหารเพาะเลี้ยงสามารถกระตุ้นการเจริญของยีสต์ได้มากขึ้น (สาวิตรี, 2549; อรุณ, 2558)

2.1.4 การเจริญของยีสต์

การเจริญ (growth) ในทางจุลชีววิทยา หมายถึง การทวีจำนวนของจุลินทรีย์ ซึ่งถือว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงในด้านปริมาณมากกว่าการเพิ่มขนาดของเซลล์ โดยการเจริญของยีสต์เกี่ยวข้องกับการลำเลียงสารและการใช้สารอาหารที่นำเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้สร้างโครงสร้างภายในทำให้เซลล์มีการขยายขนาดและสามารถแบ่งตัวได้อย่างต่อเนื่อง กระบวนการเจริญของเซลล์ที่สำคัญประกอบด้วย การสร้างผนังเซลล์ เชื้อหุ้มเซลล์ การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น และการแบ่งเซลล์ (อรุณ, 2558)

การเจริญของยีสต์ในอาหารเหลวโดยให้สารอาหารเพียงครั้งเดียว (batch culture) และบ่มในสภาวะที่เหมาะสม สามารถแบ่งการเจริญของยีสต์ ณ เวลาต่างๆ เป็น 5 ระยะ ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 รูปแบบการเจริญของยีสต์ในระบบให้อาหารแบบครั้งเดียว (batch culture) (ดัดแปลงจาก Paul, 2010)

2.1.4.1 ระยะปรับตัว (lag phase) เป็นระยะที่ไม่มีมีการเจริญหรืออัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (specific growth rate, μ) เป็นศูนย์ เนื่องจากยีสต์พบกับการเปลี่ยนแปลงของสารอาหารหรือสภาพแวดล้อมทางกายภาพใหม่ ระยะเวลาช่วงเริ่มต้นจะนานเพียงใดขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่เจริญอยู่ ระยะเริ่มต้นนี้เซลล์ยีสต์มีการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมทางกายภาพและสารเคมี

2.1.4.2 ระยะเร่ง (acceleration phase) เป็นระยะต่อจากระยะเริ่มต้น เซลล์เริ่มปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่เจริญอยู่ได้และเริ่มแบ่งเซลล์

2.1.4.3 ระยะเพิ่มจำนวน (log phase) ในระยะนี้เซลล์มีการเจริญเติบโตอย่างเต็มที่ มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นแบบทวีคูณในอัตราคงที่ และเป็นระยะที่มีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max})

2.1.4.4 ระยะชะลอตัว (deceleration phase) เซลล์อยู่ในสภาวะเริ่มขาดแคลนอาหาร เกิดการสะสมเมตาบอไลต์ที่ยับยั้งการเจริญ และเซลล์เกิดการเกาะกลุ่มตกตะกอนจำนวนมาก ระยะนี้เซลล์ยีสต์เริ่มเจริญช้าลง

2.1.4.5 ระยะคงที่ (stationary phase) เป็นระยะที่เซลล์อยู่ในสภาพขาดสารอาหาร เซลล์ยีสต์บางส่วนแบ่งตัว บางส่วนตาย และเกิดการย่อยสลายตัวเอง (autolysis) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในระยะนี้เท่ากับศูนย์

2.2 เอทานอลชีวภาพ (bioethanol)

เอทานอล (ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) มีสูตรทางเคมี คือ C_2H_5OH เป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 จุดหลอมเหลว -114.3 องศาเซลเซียส จุดเดือด 78.32 องศาเซลเซียส เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย ระเหยง่าย สามารถละลายในน้ำและสารอินทรีย์อื่นได้ดี (สิริวรรณ, 2554) สามารถใช้ประโยชน์ได้ทั้งเป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ตัวทำละลายทางเคมีในอุตสาหกรรม ยารักษาโรคและเครื่องสำอาง และที่สำคัญยังถูกนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล ซึ่งเป็นที่รู้จักกันว่าแหล่งพลังงานนี้ได้มาจากเชื้อเพลิงฟอสซิล (fossil fuel) นั้นมีแนวโน้มลดลงตามลำดับ และราคาน้ำมันที่สูงขึ้นอย่างต่อเนื่องทำให้หลายประเทศพยายามหาพลังงานทางเลือกใหม่ (ฉพลพัทธ์ และคณะ, 2555) เช่น ก๊าซชีวภาพ (biogas) ไบโอดีเซล (biodiesel) และเอทานอลชีวภาพ (bioethanol) ซึ่งได้ถูกพัฒนาและนำไปใช้อย่างกว้างขวาง

เอทานอลชีวภาพ เป็นพลังงานชีวภาพที่ถูกผลิตขึ้นจากชีวมวลที่ได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น อ้อย น้ำตาล มันสำปะหลัง และข้าวโพด เป็นต้น ซึ่งถูกนำไปใช้ผลิตเป็นพลังงานทดแทนน้ำมันจากเชื้อเพลิงฟอสซิล มากกว่านั้นยังพบว่าการผลิตเอทานอลชีวภาพนี้สามารถผลิตจากชีวมวลที่ได้จากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรซึ่งกำลังได้รับความสนใจและถูกนำไปใช้ในหลายประเทศในหลายทศวรรษที่ผ่านมา (Ei-Naggar *et al.*, 2014) โดยวัสดุเหล่านี้มีความเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม จึงเป็นอีกวิธีการหนึ่งในการลดภาวะโลกร้อนได้ เนื่องจากพลังงานจากชีวมวลมีการปลดปล่อยมลพิษทางอากาศ และสารพิษต่างๆ ออกมาน้อยกว่าพลังงานจากเชื้อเพลิงฟอสซิล อีกทั้งยังเป็นการรักษาความมั่นคงของพลังงานทั่วโลกได้อีกด้วย ดังนั้น วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส จึงเป็นแหล่งพลังงานทางเลือก ซึ่งสามารถนำกลับมาให้ใหม่ได้ และนำไปใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงชีวภาพแทนการใช้เชื้อเพลิงจากฟอสซิล (Wyman and Goodman, 1993; Okudoh *et al.*, 2014; อรุณี, 2555) สำหรับในประเทศไทย องค์กรทั้งภาครัฐและเอกชนประกาศแผนการลงทุนระยะยาว 10 ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งคาดว่าใช้มูลค่าประมาณ 400,000 ล้านบาทในการร่วมมือสร้างเศรษฐกิจชีวภาพโดยมุ่งเน้นไปที่ อ้อยและมันสำปะหลังเป็นหลัก ในการสร้างอุตสาหกรรมชีวเคมี ชีวเภสัชภัณฑ์ และเชื้อเพลิงชีวภาพ

2.3 กากมันสำปะหลัง (Cassava pulp)

มันสำปะหลัง (*Manihot esculenta* Crantz) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย และส่วนใหญ่นำมาผลิตเป็นแป้งมันสำปะหลัง กากมันสำปะหลังเป็นวัสดุเหลือทิ้งจากการผลิตแป้งมันสำปะหลัง มีรายงานว่าปริมาณมากถึง 7.3 ล้านตันในปีพ.ศ.2558 (Trakulvichean *et al.*, 2017) ลักษณะทั่วไปของกากมันสำปะหลัง คือ เปลือกมีลักษณะเป็นขุย สีน้ำตาล กากมันมีลักษณะละเอียด สีขาว (ประเวทย์ และคณะ, 2551) ดังภาพที่ 2.2 ส่วนมากนำมาใช้เป็นอาหารสัตว์หรือนำไปตากแห้งทำเป็นมันเส้น มันอัดเม็ด หรือมันบด Balagopalan *et al.* (1994) รายงานว่า กากมันสำปะหลังที่ผ่านการสกัดแป้งแล้ว คงเหลือแป้งเป็นส่วนประกอบประมาณ 50-60 % ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งในการผลิตแป้งมันสำปะหลังแต่ละครั้งทำให้ได้กากมันสำปะหลังสูงถึง 10 % ของน้ำหนักมันสำปะหลังสด

โดยกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังจะต้องใช้หัวมันสำปะหลังนำไปล้างให้สะอาด และสับหัวมันสำปะหลังเป็นชิ้นเล็กๆ เพื่อนำเข้าเครื่องโม่บดให้ละเอียด ซึ่งจะได้ออกของเหลวที่ประกอบด้วย แป้ง น้ำ และกากมันสำปะหลังปนกันอยู่ จากนั้นนำของเหลวดังกล่าวเข้าเครื่องสกัด กากที่จะทำหน้าที่แยกกากมันสำปะหลังออกจากน้ำแป้งโดยอาศัยแรงเหวี่ยง หลังจากนั้นนำแป้งที่ได้ไปเข้าเครื่องอบแห้งแล้วบรรจุถุงต่อไป ส่วนกากมันสำปะหลังที่ได้จากเครื่องสกัดกากจะถูกนำไปเข้าเครื่องอัดกากมันสำปะหลังแล้วตากแห้งในลานตาก



ภาพที่ 2.2 กากมันสำปะหลังจากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง (ฉวีริศา, 2557)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องค์ประกอบส่วนใหญ่ของกากมันสำปะหลังนั้นประกอบด้วยแป้งประมาณ 60-75 % โดยน้ำหนักแห้ง รองลงมาคือ เส้นใย (เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน) ประมาณ 12-20 % โดยน้ำหนักแห้ง มีความชื้นสูงประมาณ 60-75 % โดยน้ำหนักเปียก (สิริวรรณ, 2554) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับคุณภาพของหัวมันสำปะหลังและกระบวนการผลิตแป้งมันสำปะหลังในแต่ละโรงงานด้วย โดยมีโปรตีน ไขมัน เถ้า ในปริมาณที่ต่ำ

ตารางที่ 2.1 องค์ประกอบของกากมันสำปะหลัง

องค์ประกอบ	% โดยน้ำหนักแห้ง
แป้ง	68.89
ความชื้น	72 (%โดยน้ำหนักเปียก)
เถ้า	1.70
โปรตีน	1.55
เส้นใย	27.75
ไขมัน	0.12

ที่มา: Sriroth *et al.* (2000)

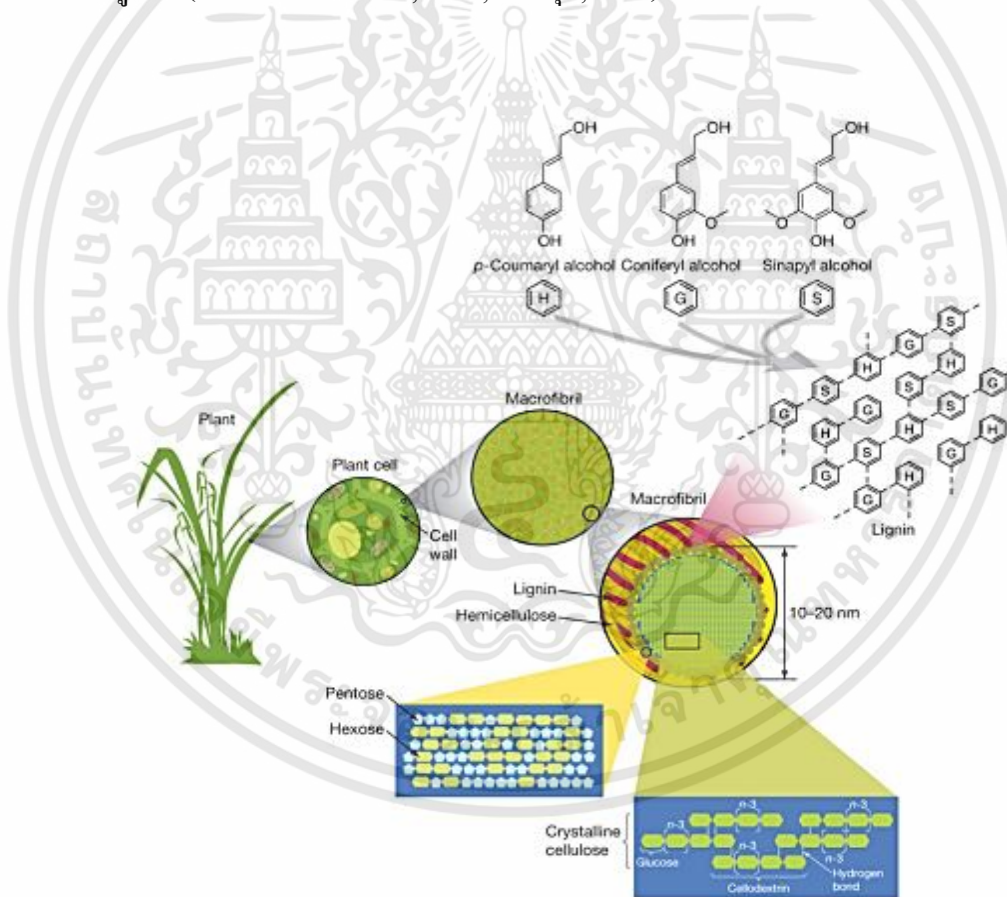
ชลดา (2546) ศึกษาองค์ประกอบของกากมันสำปะหลังจากจังหวัดนครราชสีมา พบว่า มีแป้งเป็นองค์ประกอบสูงสุด คือ 61.84-69.9 % โดยน้ำหนักแห้ง มีปริมาณเส้นใย 10.61-14.35 % โดยน้ำหนักแห้ง เถ้า 1.61-2.38 % โดยน้ำหนักแห้ง โปรตีน 1.82-2.03 % โดยน้ำหนักแห้ง และไขมัน 0.09-0.20 % โดยน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ

กากมันสำปะหลังจัดเป็นวัสดุลิกโนเซลลูโลสจากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งมีปริมาณแป้งตกค้างอยู่สูง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ต่อในรูปอาหารสัตว์ การผลิตก๊าซชีวภาพ มากกว่านั้นยังสามารถใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย (Balat, 2011) สารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลนอกเหนือไปจากวัสดุประเภทแป้งหรือน้ำตาลแล้ว วัสดุจำพวกลิกโนเซลลูโลสก็กำลังได้รับความสนใจในปัจจุบัน โดยพบว่า 90 % ของน้ำหนักแห้งของพืชส่วนใหญ่ ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และเพกติน (Yat *et al.*, 2008) ซึ่งเป็นองค์ประกอบที่ย่อยสลายได้ยากทางชีวภาพ ดังนั้นในการผลิตวัตถุดิบประเภทนี้ควรมีขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้นก่อน (สุภาวดี, 2557; รัชพล, 2558) ซึ่งมีขั้นตอนการย่อยหลายวิธี เพื่อให้ได้สารละลายที่มีปริมาณน้ำตาลสูงขึ้นซึ่งเหมาะสำหรับการใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอล

2.4 องค์ประกอบของวัสดุลิกโนเซลลูโลส

วัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นชีวมวลที่เป็นแหล่งวัตถุดิบที่มีมากที่สุดในโลก จัดเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของผนังเซลล์พืช อยู่ในรูปผลึกมีลักษณะเป็นเส้นใยเหนียว และไม่ละลายน้ำ ประกอบด้วยโครงสร้างหลัก 3 ชนิด คือ เซลลูโลส (cellulose) 35-50 % เป็นองค์ประกอบหลัก เฮมิเซลลูโลส (hemicellulose) 20-35 % และ ลิกนิน (lignin) 15-20 % (Mood *et al.*, 2013) โดยอัตราส่วนของเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนินแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดและอายุของวัสดุ

ในผนังเซลล์ของพืช เซลลูโลสแต่ละโมเลกุลจะเกิดการรวมกันเป็นมัดของเซลลูโลส (cellulose bundles) โดยมีลิกนินล้อมรอบอยู่ เฮมิเซลลูโลสทำหน้าที่เชื่อมต่อระหว่างเซลลูโลสกับลิกนินเข้าไว้ด้วยกัน การจัดเรียงตัวในลักษณะดังกล่าวทำให้เส้นใยที่อยู่ในผนังเซลล์มีความแข็งแรงสูงขึ้น (ประเวทย์ และคณะ, 2551; ประมุข, 2555) ดังภาพที่ 2.3



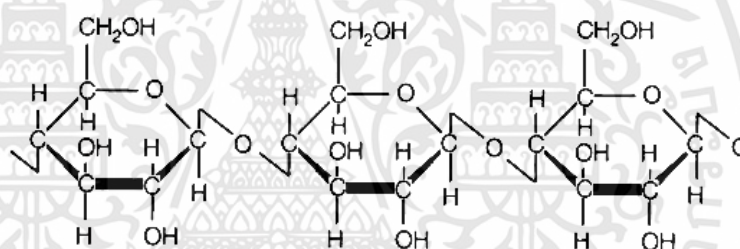
ภาพที่ 2.3 แสดงโครงสร้างภายในผนังเซลล์ของพืช (ชันันท์ และเฉลิม, 2555)

2.4.1 เซลลูโลส (cellulose)

เซลลูโลสเป็นสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดหนึ่งที่มีมากในผนังเซลล์พืช โครงสร้างของเซลลูโลสเป็นแบบไม่มีกิ่งก้านสาขาประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคส เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากกว่า 10,000 หน่วยมาต่อกันเป็นเส้นยาวด้วยพันธะแบบ β -1,4 glycosidic ดังแสดงในภาพที่ 2.4 เซลลูโลสไม่สามารถละลายด้วยน้ำ ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารละลายด่างอ่อน แต่จะละลายในกรดและด่างแก่ หากการย่อยสลายด้วยกรดหรือเอนไซม์เกิดขึ้นสมบูรณ์จะได้น้ำตาลกลูโคสเพียงอย่างเดียว แต่ถ้าการย่อยสลายตัวไม่สมบูรณ์จะได้เซลโลไบโอสซึ่งเป็นไดแซ็กคาไรด์ และได้โอลิโกแซ็กคาไรด์

สายพอลิเมอร์แต่ละสายจะเรียงขนานกันและสร้างพันธะไฮโดรเจนเชื่อมต่อกัน ซึ่งอาจจะสูงถึง 3 พันธะต่อหน่วยกลูโคส แต่เมื่อรวมกันหลายสายจะเรียกว่า ไมโครไฟบริล (microfibril) ซึ่งเป็นโครงสร้างแบบโครงผลึกสามมิติ (Crystalline) ส่วนที่ไม่ได้เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจนแต่มีการจัดเรียงตัวแบบสุ่มจะเรียกว่า เซลลูโลสแบบหลวม (Amorphous) ส่วนใหญ่มักพบเซลลูโลสธรรมชาติเป็นเซลลูโลสแบบผลึก หรือโครงสร้างแบบระเบียบ ซึ่งมีการเรียงตัวของโครงสร้างแน่น มีความแข็งแรง และไม่ละลายน้ำหรือสารอินทรีย์ (สุภาวดี, 2557; ประมุข, 2555)

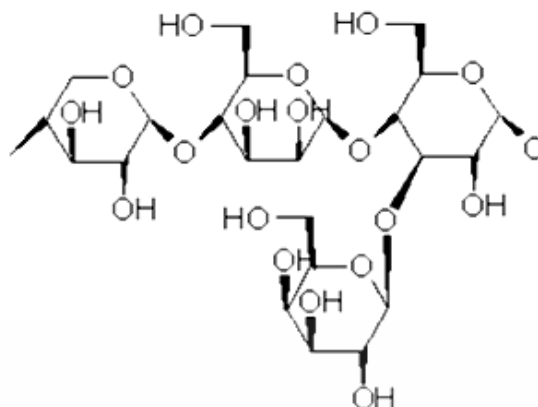


ภาพที่ 2.4 โครงสร้างทางเคมีของเซลลูโลส (สุกรินทร์, 2557)

2.4.2 เฮมิเซลลูโลส (hemicelluloses)

เฮมิเซลลูโลสเป็นองค์ประกอบส่วนหนึ่งของผนังเซลล์พืช มักจะอยู่ร่วมกับเซลลูโลส ลิกนิน และสารประกอบเพกทิน จัดเป็นสารประกอบพอลิเมอร์ไฮเดรทอสแตน (Amorphous polymeric carbohydrate) พบมากในพืชมั้ใบกว้างและพืชมั้ตระกูลหญ้า เฮมิเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลุ่มเพนโทส หรือเฮกโซสประกอบด้วยหน่วยย่อย 50-200 หน่วย และต่อกันแบบกิ่งก้านสาขามากกว่าแบบเส้นตรง ดังแสดงในภาพที่ 2.5 ซึ่งมีโมเลกุลต่ำกว่าเซลลูโลสจึงย่อยสลายได้ง่ายกว่า น้ำตาลที่ประกอบอยู่ในเฮมิเซลลูโลส ได้แก่ไซโลส อะราบิโนส กลูโคส กาแลกโตส และแมนโนส เฮมิเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นพอลิเมอร์เฮเทโรไกลแคน (Heteroglycan) คือประกอบด้วยน้ำตาลชนิดต่างๆ กันตั้งแต่ 2-4 ชนิด ส่วนเฮมิเซลลูโลสชนิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลชนิดเดียวเรียกว่า โฮโมไกลแคน (Homoglycan) แต่เฮมิเซลลูโลสชนิดนี้จะพบเป็นส่วนน้อย ซึ่งชนิดของน้ำตาลและปริมาณที่พบขึ้นอยู่กับชนิดและแหล่งของพืช มีคุณสมบัติไม่ละลายน้ำแต่ละลายในสารละลายที่เป็นด่างเจือจาง (สุกรินทร์, 2557; ขวัญชนก, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

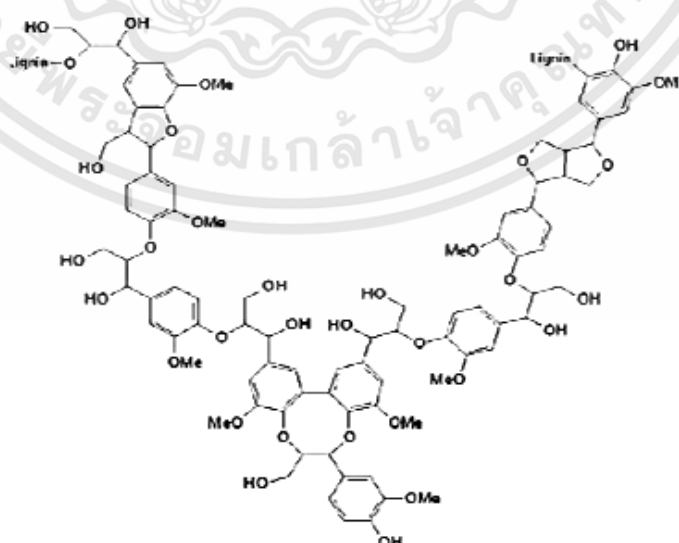


ภาพที่ 2.5 โครงสร้างทางเคมีของเฮมิเซลลูโลส (ประมุข, 2555)

นอกจากนี้ การใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูง ช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของเฮมิเซลลูโลสในน้ำได้ ซึ่งหากการย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสมีการใช้อุณหภูมิสูงร่วมด้วย จำเป็นต้องระวังการเกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่ต้องการซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งในกระบวนการหมัก ตัวอย่างเช่น เฟอพิวรัล (Furfural) และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล (Hydroxy methyl furfural) เป็นต้น (Mood *et al.*, 2013; Galbe and Zacchi, 2012)

2.4.3 ลิกนิน (lignin)

ลิกนิน เป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูง มักพบอยู่ร่วมกับเซลลูโลส เป็นสารประกอบพอลิเมอร์อะโรมาติกของฟีนิลโพรเพน (phenylpropane) มากกว่า 10,000 หน่วย ดังแสดงในภาพที่ 2.6 ซึ่งมีสารประกอบหลักเริ่มต้นที่สำคัญ 3 หน่วยหลักๆ คือ *p*-coumaryl, coniferyl และ sinapyl alcohol



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของลิกนิน (ประมุข, 2555)

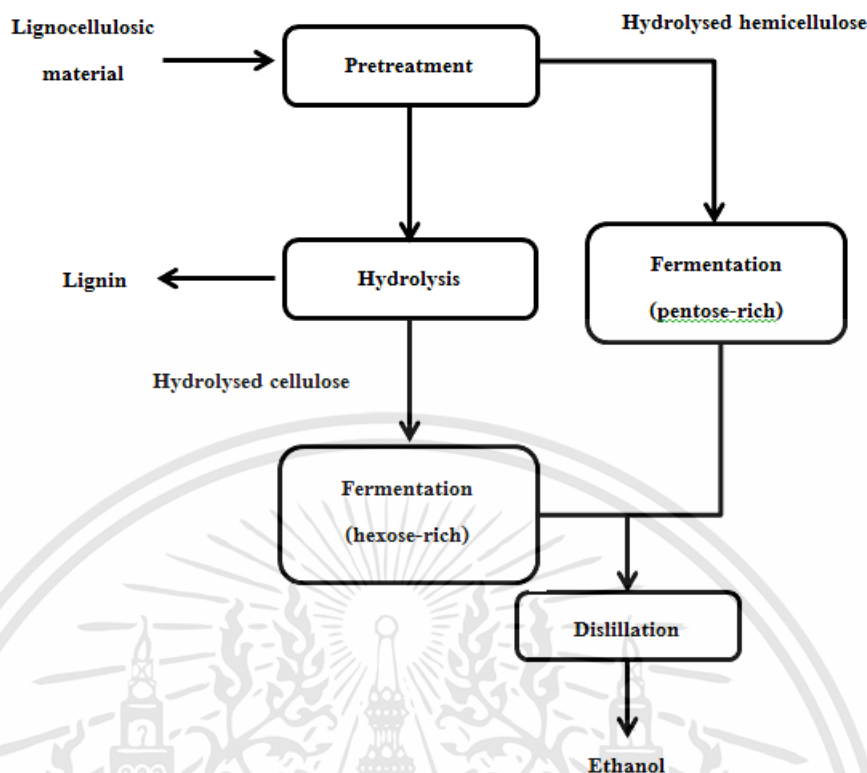
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลิกนินไม่ใช่คาร์โบไฮเดรต แต่เป็นส่วนของผนังเซลล์ พวกพืชอายุน้อยจะมี primary wall ซึ่งประกอบด้วยเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลส เมื่อพืชอายุมากขึ้นจะเกิด secondary wall โดยมีลิกนินเข้ามาประกอบอีกส่วน จึงเป็นสารที่อยู่ร่วมกับคาร์โบไฮเดรตของพืช การที่ลิกนินเคลือบอยู่บนผนังเซลล์ของพืช ทำให้เอนไซม์ต่างๆ เข้าไปย่อยพวกเซลลูโลส และเฮมิเซลลูโลสได้ยาก เป็นสาเหตุให้พืชอาหารสัตว์ชนิดนั้นๆ ไม่ถูกย่อย หรือสัตว์นำไปใช้ประโยชน์ได้น้อยลง โดยทั่วไปแล้ว ลิกนินเป็นสารที่ทนต่อสารเคมี ไม่ละลายน้ำแต่สามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น ในเอทานอลหรือเมทานอลที่ร้อน และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ไม่มีสมบัติการยืดหยุ่น เพราะฉะนั้นจึงทำให้พืชที่มีลิกนินมากมีความแข็งแรงทนทาน (ขวัญชนก, 2544; ประมุข, 2555; สุภาวดี, 2557)

2.5 วิธีการผลิตเอทานอลชีวภาพจากวัสดุลิกโนเซลลูโลส

การผลิตเอทานอลชีวภาพสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตรซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้ (1) วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ข้าวโพด ข้าว มันฝรั่ง และมันสำปะหลัง (2) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย บีทรูต ข้าวฟ่างหวาน และกากน้ำตาล และ (3) วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร ได้แก่ ไม้ ฟางข้าว ชานอ้อย แกลบ กากมันสำปะหลัง ส่วนที่เหลือของพืช ของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อและกระดาษ รวมทั้งวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตร เป็นต้น (กล้าณรงค์ และคณะ, 2548) โดยในช่วงแรกของการผลิตเอทานอลชีวภาพนั้นพบว่ามาจากวัตถุดิบประเภทแป้งและน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่เนื่องจากมีอยู่เป็นจำนวนมากในประเทศไทย แต่ในปัจจุบันเริ่มหันมาสนใจวัสดุทดแทนประเภทอื่นๆ นอกเหนือจากแป้งและน้ำตาล นั่นก็คือ วัสดุลิกโนเซลลูโลส เนื่องจากได้ตระหนักถึงความมั่นคงของอาหารเพื่อมนุษย์และสัตว์ และปัญหาสิ่งแวดล้อม งานวิจัยด้านการผลิตเอทานอลในปัจจุบันจึงมุ่งเน้นไปยังชีวมวลที่เป็นผลพลอยได้จากการเกษตร และอุตสาหกรรมเกษตร ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้หาได้ง่ายและราคาถูก อีกทั้งเป็นการรักษาสิ่งแวดล้อม โดยเป็นการกำจัดขยะอินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพวิธีหนึ่ง (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2551)

กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้นประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอน ดังนี้ (1) การปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้น (Pretreatment) (2) การย่อยสลาย (Hydrolysis) (3) การหมักเอทานอล (Fermentation) และ (4) การกลั่นเอทานอล (Distillation) (��ชนันท์ และเฉลิม, 2555) ดังแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 กระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส
(ธีรภัทร และคณะ, 2551)

เนื่องจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้นประกอบด้วยพอลิเมอร์ 3 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เป็นโครงสร้างที่มีความซับซ้อนและมีความแข็งแรงสูงมาก ทำให้การย่อยสลายอย่างสมบูรณ์เป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวทำได้ยาก จึงต้องมีกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ และย่อยสลายด้วยสารเคมี หรือเอนไซม์เพื่อที่จะเปลี่ยนโครงสร้างดังกล่าวให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เช่น กลูโคส (glucose) ไซโลส (xylose) และอะราบิโนส (arabinose) ที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ ก่อนที่จะนำสารละลายน้ำตาลดังกล่าวไปใช้ในกระบวนการผลิตเอทานอล

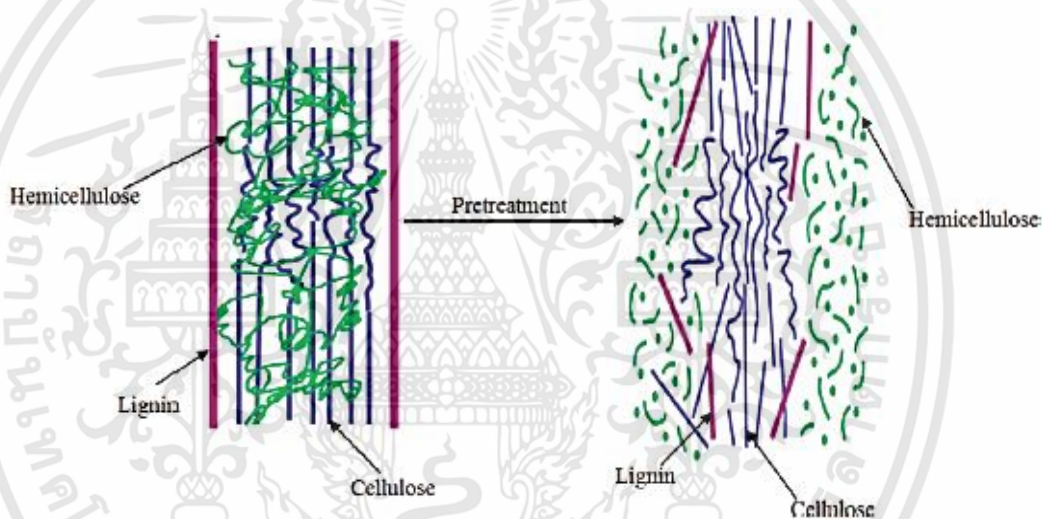
2.6 กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบเบื้องต้น

การปรับสภาพวัตถุดิบเป็นขั้นตอนแรก และเป็นขั้นตอนสำคัญในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส มีวัตถุประสงค์หลักในการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมีของมวลลิกโนเซลลูโลส โดยการละลายหรือแยกส่วนประกอบพวกเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารสกัดอื่นๆ ออกจากกันเพื่อให้มวลชีวภาพที่เหลืออยู่ง่ายต่อการนำไปย่อย ดังภาพที่ 2.8 ซึ่งหากไม่กำจัดสารประกอบจำพวกลิกนินที่ห่อหุ้มโครงสร้างเฮมิเซลลูโลส และเซลลูโลสออกจะทำให้ขั้นตอนการย่อยสลายนั้นทำได้ยาก ขั้นตอนนี้ยังช่วยเพิ่มขนาดรูพรุนของตัววัตถุดิบ เพิ่มอัตราการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข่อยน้ำตาล และลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (cellulose crystallinity) ทำให้เอนไซม์สามารถเข้าถึงวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น (Sun and Cheng, 2002; Harmsen *et al.*, 2010; สุขใจ, 2554) อีกทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายสำหรับเอนไซม์ที่ใช้ในการข่อยเซลลูโลส เนื่องจากหากใช้เอนไซม์ในการข่อยเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนจะมีค่าใช้จ่ายสำหรับเอนไซม์ถึง 25 % ของต้นทุนการผลิตเอทานอลทั้งหมด (สุภาวดี, 2557) มากกว่านั้นยังช่วยให้กระบวนการผลิตเอทานอลมีประสิทธิภาพมากขึ้น ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเพิ่มกระบวนการปรับสภาพเข้าไปในกระบวนการผลิตก่อนจะนำไปหมักเอทานอล

การศึกษาของ Sreenath *et al.* (2001) พบว่า การหมักเอทานอลจากเส้นใยอัลฟาลฟา (alfalfa fiber) โดยไม่ผ่านการปรับสภาพ ให้ปริมาณเอทานอลเพียง 6.4 กรัมต่อลิตร แต่เมื่อทำการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนนำไปหมักช่วยให้ปริมาณการผลิตเอทานอลสูงถึง 18.0 กรัมต่อลิตร



ภาพที่ 2.8 โครงสร้างวัสดุเซลลูโลสหลังการปรับสภาพ (Kumar *et al.*, 2009)

กระบวนการปรับสภาพวัตถุดิบของวัสดุพวกกลีโคเซลลูโลสเพื่อให้ได้น้ำตาลนั้นมีหลายวิธีด้วยกัน แบ่งออก เป็น 4 รูปแบบ ได้แก่ (1) การปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment) (2) การปรับสภาพทางเคมี (Chemical pretreatment) (3) การปรับสภาพทางเคมีร่วมกับกายภาพ (Physico-chemical pretreatment) และ (4) การปรับสภาพทางชีวภาพ (Biological pretreatment) การเลือกกระบวนการในการปรับสภาพขึ้นอยู่กับชนิด และลักษณะสมบัติของวัตถุดิบที่นำมาใช้ อย่างไรก็ตาม ปัญหาหลักที่เกิดขึ้นในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ คือ การเกิดสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งต้องใช้วัตถุดิบเป็นจำนวนมาก และต้องมีกระบวนการแยกน้ำตาลออกจากสารละลายอย่างมีประสิทธิภาพ จึงอาจกล่าวได้ว่า กระบวนการเตรียมวัตถุดิบกลีโคเซลลูโลสนั้นเป็นขั้นตอนหนึ่งที่ทำให้เกิดค่าใช้จ่ายสูงในกระบวนการผลิตเอทานอล (Walker, 2011; Zheng *et al.*, 2009)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.1 การปรับสภาพทางกายภาพ (Physical pretreatment)

เป็นการใช้แรงกลหรือกระบวนการทางกายภาพเพื่อปรับขนาด และทำลายโครงสร้างเซลล์ของวัตถุดิบ เพื่อให้ปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมีในขั้นต่อไปเกิดขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ การตัดหรือบดให้ชิ้นวัตถุดิบมีขนาดเล็กจะช่วยเพิ่มพื้นที่ผิว ทำให้ตัวเร่งปฏิกิริยา เอนไซม์ หรืออินน้ำจับกับวัตถุดิบได้ง่ายขึ้น (ปฐมา และคณะ, 2551)

2.6.1.1 การใช้แรงทางกล (Mechanical comminution)

คือ วิธีการทำให้วัตถุดิบมีขนาดเล็กสามารถทำได้หลายวิธี เช่น การทุบ การบด การโม่ การเขย่าวัตถุดิบ เป็นต้น (รัชพล, 2558) โดยทั่วไปขนาดของเศษวัตถุดิบหลังการหั่นแล้วมีขนาดประมาณ 1-3 เซนติเมตร และหลังจากการบดละเอียดจะมีขนาดประมาณ 0.2-2 มิลลิเมตร ซึ่งความสามารถในการลดขนาดจะขึ้นอยู่กับขนาดสุดท้ายของวัสดุและคุณสมบัติของวัสดุนั้น (Sun and Cheng, 2002)

2.6.1.2 การไพโรไลซิส (Pyrolysis)

เป็นวิธีการใช้ความร้อนในสภาวะไร้ออกซิเจนในการสลายวัตถุดิบ โดยเมื่ออุณหภูมิมากกว่า 300 องศาเซลเซียส จะทำให้วัตถุดิบกลายเป็นแก๊สและผงถ่าน กระบวนการจะทำได้ช้าและการระเหยจะต่ำถ้าใช้อุณหภูมิต่ำ (Singh *et al.*, 2014)

2.6.1.3 การระเบิดด้วยไอน้ำ (Steam explosion)

หากพิจารณาด้านค่าใช้จ่ายในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบเบื้องต้นเป็นหลัก วิธีนี้นับเป็นวิธีที่น่าสนใจ และเป็นวิธีนิยมใช้กันมากที่สุดเนื่องจากช่วยลดการใช้สารเคมี นิยมใช้กับไม้เนื้อแข็ง และวัสดุเหลือทิ้งจากการเกษตร ไม่นิยมปรับสภาพไม้เนื้ออ่อน การปรับสภาพด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพสูงเมื่อเทียบกับการปรับสภาพด้วยวิธีอื่น เนื่องจากใช้พลังงานและการลงทุนที่ต่ำกว่า มีความเป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อมน้อยกว่า (Balat, 2011) ทำได้โดยอาศัยใช้แรงดันไอน้ำอ้อมตัวสูงก่อนที่จะลดความดันลงอย่างรวดเร็วจนถึงความดันบรรยากาศ ทำให้เกิดการระเบิดของโครงสร้างวัตถุดิบ (explosive decompression of biomass) ซึ่งวิธีการปรับสภาพนี้ก่อให้เกิดการย่อยสลายอัตโนมัติ (autohydrolysis) โดยองค์ประกอบเฮมิเซลลูโลส และลิกนินสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น โอลิโกเมอร์ที่ละลายน้ำได้ (soluble oligomers) และลดการเกิดผลึกของเซลลูโลส (Banerjee *et al.*, 2010) ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการนี้ คือ ระยะเวลา อุณหภูมิ และขนาดอนุภาคของวัสดุ โดยส่วนใหญ่จะควบคุมอุณหภูมิที่ 160-260 องศาเซลเซียส ที่ความดัน 0.69-4.83 เมกะพาสคาล เป็นเวลาสั้นๆ (Kumar *et al.*, 2009) มีรายงานว่า การใช้อุณหภูมิต่ำและระยะเวลานานขึ้นเหมาะต่อกระบวนการปรับสภาพมากกว่าการใช้อุณหภูมิสูง (Zheng *et al.*, 2009)

อย่างไรก็ตาม การย่อยวัตถุดิบพวกลิกโนเซลลูโลสด้วยการระเบิดไอน้ำนี้มักเกิดสารประเภทกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก (acetic acid) และกรดลิวูลินิก (levulinic acid) ทำให้เกิดสารละลายในสถานะที่เป็นกรด และอาจเกิดการย่อยสลายน้ำตาลไปเป็นเฟอิวรัล

(Furfural) และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล ฟือฟิวรัล (Hydroxy methyl furfural) ต่อไปได้ (Mood *et al.*, 2013) ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และกระบวนการหมัก (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000)

2.6.2 การปรับสภาพทางเคมี (Chemical pretreatment)

2.6.2.1 การใช้กรด (Acid pretreatment)

กรดที่นิยมใช้สำหรับการปรับสภาพวัตถุดิบจากลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ กรดซัลฟูริก และกรดไฮโดรคลอริก นอกจากนี้ยังมีกรดฟอสฟอริก และกรดไนตริก เดิมเคยใช้กรดเข้มข้นในการย่อยลิกโนเซลลูโลสซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยเซลลูโลสมาก แต่เนื่องจากกรดเข้มข้นเหล่านี้มีฤทธิ์กัดกร่อนเครื่องมือหรืออุปกรณ์และเป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม ตลอดจนการเกิดสารที่ไม่พึงประสงค์ต่อการหมัก และการกำจัดสารพิษที่มีราคาสูง จึงหันมาใช้กรดเจือจาง ร่วมกับการใช้ความร้อนในการปรับสภาพวัสดุจากลิกโนเซลลูโลสแทนซึ่งเป็นอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจ และประสบความสำเร็จ โดยสามารถละลายหรือทำลายโครงสร้างเอมิเซลลูโลส รวมทั้งเพิ่มปริมาณกลูโคสได้มากขึ้นโดยใช้ต้นทุนในกระบวนการต่ำ (Kumar *et al.*, 2009) การปรับ สภาพด้วยกรดเจือจางมักใช้ความเข้มข้นของกรด 0.2-2.5 % โดยอุณหภูมิที่ใช้อยู่ระหว่าง 130-210 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลาสั้นๆ ไม่เกินที่ถึงนานเป็นชั่วโมง (Menon and Rao, 2012) ทั้งนี้การ เลือกใช้สภาวะขึ้นอยู่กับความจำเพาะต่อสารเคมี และองค์ประกอบทางโครงสร้างของแหล่งชีว มวลที่ใช้ด้วย

นอกจากนี้ กระบวนการปรับสภาพโดยการใช้กรดร่วมกับการใช้อุณหภูมิ สูงยังทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่พึงประสงค์ เช่น ฟือฟิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล ฟือฟิวรัล ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อกระบวนการหมัก โดยปริมาณสารดังกล่าวขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ กรด อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการเตรียมวัตถุดิบ การลดความเป็นพิษสามารถทำได้โดย การปรับสภาพไฮโดรไลเซสให้เป็นกลางด้วยด่างก่อนนำไปใช้

2.6.2.2 การใช้ด่าง (Alkaline pretreatment)

กลไกการทำงานของด่างนั้นเชื่อว่าจะไปเพิ่มการพองตัวของโมเลกุล ภายในต่อสายพันธะภายในของไซแลนในเอมิเซลลูโลส ความพรุนของวัสดุจะเพิ่มขึ้นได้เมื่อทำ การกำจัดสายโซ่ของโครงสร้างที่เชื่อมต่อกภายใน ดังที่นิยมใช้กันทั่วไป คือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ โพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ แคลเซียมไฮดรอกไซด์ และแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ การใช้ด่างเจือ จาง เช่น โซเดียมไฮดรอกไซด์เจือจางในการปรับสภาพวัสดุ นั้น มีผลทำให้เกิดการบวมภายใน ช่วย เพิ่มพื้นที่ผิวสัมผัสในการทำปฏิกิริยา ทำให้วัสดุมีความพรุนเพิ่มขึ้นได้ ลดความเป็นโครงสร้าง ผลึกของเซลลูโลส และสามารถทำลายของโครงสร้างลิกนิน ซึ่งประสิทธิภาพของด่างที่ใช้ใน กระบวนการแปลงสภาพจะขึ้นอยู่กับปริมาณของลิกนินที่มีอยู่ในวัสดุ นอกจากนั้นการปรับสภาพ

ด้วยค้างยังเป็นวิธีที่ง่าย และไม่ต้องใช้พลังงานมากเมื่อเปรียบเทียบกับ การปรับสภาพด้วยกรด (Balat, 2011; รัชพล, 2558)

2.6.2.3 การใช้โอโซน (Ozonolysis)

โอโซนเป็นตัวออกซิแดนท์ที่มีประสิทธิภาพ ช่วยลดการเกิดผลึกของ เซลลูโลส สามารถทำให้เกิดการแตกตัวของลิกนิน และเฮมิเซลลูโลสได้ วิธีนี้มีจุดเด่นคือ เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการกำจัดลิกนินออกได้ดี ไม่ก่อให้เกิดสารพิษที่จะไปยับยั้งการทำปฏิกิริยาใน ส่วนต่างๆ กระบวนการนี้สามารถทำได้ที่อุณหภูมิห้อง แต่ข้อเสียของวิธีนี้คือ ต้องใช้โอโซนใน ปริมาณมากและมีค่าใช้จ่ายสูง (Balat, 2011; Jönsson and Martín, 2016)

2.6.3 การปรับสภาพทางเคมีร่วมกับกายภาพ (Physico-chemical pretreatment)

2.6.3.1 การใช้ความร้อนชื้น (Liquid hot water)

วิธีการนี้อาศัยอุณหภูมิสูง (160-220 องศาเซลเซียส) และความดัน ประมาณ 15 นาที่ เพื่อควบคุมสถานะของน้ำในสถานะของเหลว โดยไม่ต้องใช้สารเคมีในการเร่ง ปฏิกิริยา การปรับสภาพวิธีนี้สามารถละลายโครงสร้างเฮมิเซลลูโลส และลิกนินได้น้อยกว่าการใช้ วิธีการระเบิดด้วยไอน้ำ จึงทำให้เกิดสารยับยั้งน้อยกว่า และเกิดตะกอนของลิกนินน้อยกว่า (Mood *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2009) นอกจากนี้มีรายงานว่า การใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายชีวมวลจะ เพิ่มขึ้นหลังผ่านกระบวนการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ (Weil *et al.*, 1998)

2.6.3.2 การฉายรังสีไมโครเวฟ (Microwave irradiation)

การใช้รังสีไมโครเวฟในการปรับสภาพ เป็นการถ่ายเทพลังงานของรังสี ไปสู่โครงสร้างโมเลกุลของวัสดุ ความร้อนที่เกิดขึ้นจะทำให้โครงสร้างผลึกของเซลลูโลสเกิดการ เปลี่ยนแปลง ช่วยกำจัดลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ตลอดจนช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ได้ดีขึ้น (ณัฐธิดา, 2557)

2.6.3.3 การระเบิดด้วยแอมโมเนีย (Ammonia fiber explosion, AFEX)

เป็นการใช้แอมโมเนียเหลวร่วมกับการระเบิดด้วยไอน้ำ โดยทำให้ชีวมวลสัมผัสกับแอมโมเนียเหลวที่อุณหภูมิปานกลาง (60-120 องศาเซลเซียส) ภายใต้ความดันสูง (1.72-2.06 เมกะพาสกาล) เป็นเวลา 30 นาที กลไกการปรับสภาพด้วยวิธีนี้ทำให้ของเหลวเกิด สถานะเป็นกรด ทำให้เกิดการย่อยสลายเกิดขึ้น โดยเฉพาะเฮมิเซลลูโลส (Puri and Mamers, 1983; Kumar *et al.*, 2009) อย่างไรก็ตาม วิธีนี้ไม่เหมาะกับวัสดุที่มีลิกนินสูง และยังเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่าย สูงกว่าวิธีการระเบิดด้วยไอน้ำอีกด้วย (Cheng, 2009)

2.6.3.4 การระเบิดด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide explosion)

วิธีการนี้ใช้คาร์บอนไดออกไซด์จากกรดคาร์บอนิกในการเพิ่มอัตราการย่อยสลายขั้นต่อไป (ปฐมา และคณะ, 2551) โดยโมเลกุลที่มีขนาดเล็กของแก๊สสามารถแทรกซึม ผ่านรูพรุนของโครงสร้างลิกโนเซลลูโลสได้ ข้อดีของวิธีการนี้คือไม่เกิดความเป็นพิษ และไม่ทำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้คิดไฟ ซึ่งวิธีการนี้ได้ผลผลิตต่ำกว่าการใช้ไอน้ำหรือแอมโมเนีย แต่ไม่เกิดสารยับยั้งที่เป็นพิษต่อการหมัก (Mood *et al.*, 2013)

2.6.3.5 การย่อยเปียก (Wet oxidation)

โดยใช้ออกซิเจน และอากาศเป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยา นิยมใช้ถังหมักชีวภาพในสภาวะที่อุณหภูมิต่ำกว่าได้แรงดัน และเวลาสั้น โดยทั่วไปจะใช้เวลา 10-15 นาที อุณหภูมิ 170-200 องศาเซลเซียส และความดันระหว่าง 10-12 บาร์ นิยมใช้ในการผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักแบบการย่อยให้เป็นน้ำตาลและหมักในขั้นตอนเดียวกัน (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) (รัชพล, 2558)

2.6.4 การปรับสภาพทางชีวภาพ (Biological pretreatment)

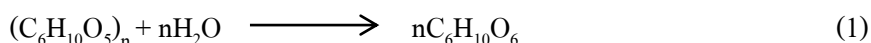
เป็นการใช้จุลินทรีย์ปรับสภาพของวัตถุดิบเพื่อทำลายเนื้อเยื่อของเซลล์ulos เช่น ราสีน้ำตาล (brown-rot fungi) จะย่อยเซลลูโลส ส่วนราสีขาว (white-rot fungi) และราผุอ่อน (soft-rot fungi) จะย่อยลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ราขาวซึ่งจัดอยู่ใน Class Basidiomycetes เป็นตัวเลือกที่ดีที่สุดในการปรับสภาพทางชีวภาพ สามารถผลิตเอนไซม์ที่ทำงานภายนอกเซลล์ (extracellular enzyme) หลายชนิด ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้สามารถย่อยสลายโครงสร้างลิกนินได้ (Singh *et al.*, 2014) ข้อดีของกระบวนการนี้คือ สามารถทำได้ในสภาวะปกติ ใช้พลังงานน้อย ไม่ใช้สารเคมีในกระบวนการ ทำให้เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อมและมีค่าใช้จ่ายต่ำ แต่กระบวนการปรับสภาพทางชีวภาพต้องอาศัยเวลานาน เนื่องจากสภาวะที่ใช้ไม่รุนแรง อัตราการย่อยสลายค่อนข้างต่ำ ใช้พื้นที่ในการผลิตมาก จึงไม่ค่อยเหมาะสมในการนำมาใช้จริง (สุภาวดี, 2557)

มีการรายงานถึงการเตรียมกากมันสำปะหลังโดยวิธีทางชีวภาพซึ่งอาศัยครูดเอนไซม์เซลลูเลส จากเชื้อรา *Trichoderma reesei* เพื่อเปลี่ยนเซลลูเลสในกากมันให้กลายเป็นน้ำตาล จากนั้นจึงใช้ยีสต์มาหมักน้ำตาลให้เป็นเอทานอล (ผ่องศรี และคณะ, 2550) วิธีการนี้มีข้อดีคือ ใช้พลังงานต่ำกว่าได้สภาวะที่ไม่รุนแรง ไม่ก่อให้เกิดสารยับยั้งต่อการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ และไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม อย่างไรก็ตามอัตราการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์นั้นใช้เวลานานมาก (สุขใจ, 2554)

2.7 การย่อยสลาย

การย่อยสลายหรือไฮโดรไลซิส คือ การย่อยสายพอลิเมอร์ทั้งเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส ให้สั้นลงกลายป็นน้ำตาลอิสระก่อนที่จะนำไปหมักเป็นเอทานอลโดยใช้กรด ต่าง หรือเอนไซม์เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ซึ่งการย่อยสลายสามารถทำให้โครงสร้างของเฮมิเซลลูโลสเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลไซโลส แมนโนส กาแลคโตส และกลูโคส ส่วนเซลลูโลสเปลี่ยนไปเป็นกลูโคส (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000) โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยอย่างสมบูรณ์คือกลูโคส ดังสมการ (1) (สิริวรรณ, 2554)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ในปัจจุบันการย่อยสลายวัสดุคูลิก โนเซลลูโลสที่นิยมใช้ในการวิจัยเพื่อผลิตเอทานอลมี 2 วิธี คือ

2.7.1 การย่อยสลายด้วยกรด (Acid hydrolysis)

เป็นวิธีที่ทำได้ง่ายและค่าใช้จ่ายไม่สูง ในการย่อยสลายวัสดุคูลิกประเภทลิกโนเซลลูโลส สามารถแบ่งได้เป็น 2 วิธีตามชนิดของกรดที่ใช้ ดังนี้

2.7.1.1 การใช้กรดเข้มข้น (Concentrated acid hydrolysis) เช่น กรดไฮโดรคลอริก หรือกรดซัลฟูริกเข้มข้น โดยปกติใช้ความเข้มข้นของกรดประมาณ 10–30 % กระบวนการนี้สามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลลูโลสไปเป็นกลูโคสได้อย่างรวดเร็ว แต่ด้วยสภาวะการย่อยที่รุนแรงของวิธีนี้ทำให้เกิดการผูกกร่อนของเครื่องมือ และจำเป็นต้องของการกำจัดกรดออกจากน้ำตาลก่อนนำไปใช้

2.7.1.2 การใช้กรดเจือจาง (Diluted acid hydrolysis) นิยมใช้กรดซัลฟูริกซึ่งเป็นกรดที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง เป็นวิธีเก่าแก่ที่นิยมใช้เพื่อปรับสภาพวัสดุคูลิกโนเซลลูโลส กรดที่ใช้แล้วจำเป็นต้องทำให้เป็นกลางด้วยปูนขาวหรือแคลเซียมคาร์บอเนตก่อนนำกลับมาใช้ใหม่ (ชัชพันธ์ และเฉลิม, 2555) โดยทั่วไปการย่อยด้วยกรดเจือจางนี้มักใช้ร่วมกับสภาวะที่มีอุณหภูมิและความดันสูง แต่มักก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ข้างเคียงคือสารอนุพันธ์ฟูแรนซึ่งจะไปขัดขวางการย่อยสลายโครงสร้างของวัสดุไปเป็นน้ำตาลได้น้อยลง มากกว่านั้นยังมีฤทธิ์ยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์และการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งส่งผลต่อการผลิตเอทานอลอีกด้วย (Balat, 2011)

2.7.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis)

เป็นการใช้เอนไซม์ในการย่อยสลายสายวัสดุคูลิกโนเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาล โดยอาศัยเอนไซม์ที่ได้มาจากเชื้อราและแบคทีเรีย ด้วยองค์ประกอบในโครงสร้างของวัสดุคูลิกโนเซลลูโลสที่มีความแตกต่างกันจำเป็นต้องใช้เอนไซม์หลายชนิดเพื่อให้เกิดความจำเพาะเจาะจงต่อสับเตรทในการทำปฏิกิริยาสูง จึงทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์สูง และยังไม่เกิดการผูกกร่อนของเครื่องมือ (ธีรภัทร, 2551) อย่างไรก็ตามโครงสร้างของวัสดุประเภทนี้ทำให้เกิดการขัดขวางการย่อยสลายโดยเอนไซม์จึงมักใช้เวลานานในการย่อย เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาย่อยสลาย คือ เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) เป็นเอนไซม์ที่ได้จากรา *Trichoderma viride* โดยแบ่งกลุ่มของเอนไซม์ได้ 3 ชนิด ที่ทำงานร่วมกัน (สิริวรรณ, 2554; ศุภรินทร์, 2553) ดังนี้

2.7.2.1 เอ็นโดกลูคาเนส (Endoglucanase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลสให้เปลี่ยนเป็นเซลโลไบโอส โดยตัดพันธะ β -1,4 glycosidic แบบสุ่มภายในสาย ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือ โอลิโกแซคคาไรด์

2.7.2.2 เอ็กโซกลูคาเนส (Exoglucanase) ทำหน้าที่ย่อยสลายเซลลูโลส โดยจะย่อยสลายจากทางด้านปลาย non-reducing ผลิตภัณฑ์ที่ได้คือเซลโลไบโอส

2.7.2.3 เบต้า-กลูโคซิเดส (β -Glucosidase) ทำหน้าที่ย่อยโอลิโกแซคคาไรด์ และเซลโลไบโอสให้เปลี่ยนเป็นกลูโคส

2.8 กระบวนการหมักเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 2 วิธี ได้แก่ (1) กระบวนการสังเคราะห์เคมี (Chemical synthesis) ซึ่งใช้เอทิลีน (C_2H_4) เป็นวัตถุดิบ และ (2) กระบวนการหมัก (Fermentation) โดยใช้จุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล (ศุภรินทร์, 2553) ด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีมีราคาต้นทุนวัตถุดิบที่สูง และมีกระบวนการผลิตค่อนข้างยุ่งยาก พร้อมทั้งในปัจจุบันมีการพัฒนาเทคโนโลยีการหมักมากขึ้นจึงหันมาใช้วิธีนี้ในการผลิตเอทานอลซึ่งอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์แทน โดยจุลินทรีย์ที่นิยมใช้มากที่สุดนั่นก็คือยีสต์

ขั้นตอนการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดจากการทำงานของเชื้อยีสต์ในการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส ภายใต้อุณหภูมิที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยให้เป็นแอลกอฮอล์ ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic) ยีสต์จะมีการใช้น้ำตาลกลูโคสในการหายใจสำหรับการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่วนในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobic) ยีสต์จะสร้างเอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานจากการนำน้ำตาลกลูโคสเข้าสู่เซลล์ผ่านวิถีเมย์เดน-ไพเยอร์ฮอฟ (embden-Meyerhof pathway) หรือวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) (จิรศักดิ์, 2551) ตามทฤษฎีแล้ว น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล สามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลได้ 2 โมเลกุล คิดเป็น 51.11 % โดยน้ำหนัก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล คิดเป็น 48.89 % โดยน้ำหนัก ดังสมการ (2) (กล้าณรงค์ และคณะ, 2548) แต่ในทางปฏิบัติปริมาณเอทานอลจะได้ต่ำกว่านี้เนื่องจากน้ำตาลส่วนหนึ่งถูกนำไปใช้ในการสร้างชีวมวลของเชื้อ และมีการสร้างผลพลอยได้อื่นๆ เช่น กลีเซอรอล และกรดอินทรีย์ (Boulton and Quain, 2006)



ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลนั้นจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ ชนิดและความเข้มข้นของสับสเตรท ธาตุอาหาร เกลือแร่ และวิตามินต่างๆ ค่า pH เริ่มต้นของอาหาร อุณหภูมิ และการปรับสภาพวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก (พงษ์ศักดิ์, 2552) เนื่องจากปัจจัยสำคัญเหล่านี้มีส่วนเกี่ยวข้องต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ และการหมักเอทานอล โดยทั่วไป กระบวนการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสมี 2 วิธีการ คือ กระบวนการหมัก

แบบ Separate hydrolysis and fermentation (SHF) หมายถึงการหมักเอทานอล โดยการย่อยสลายเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้เป็นน้ำตาลแยกจากการหมัก ซึ่งมีหลายขั้นตอน ต้องทำในถังปฏิกรณ์มากกว่า 1 ถัง ทำให้ต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้น และบางกรณีอาจให้ผลผลิตต่ำกว่า และกระบวนการหมักแบบ Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) หมายถึงการหมักเอทานอลโดยการย่อยสลายให้เป็นน้ำตาลควบคู่กับการหมักวิธีนี้จะทำให้เป็นน้ำตาล และเกิดการหมักในถังปฏิกรณ์เดียวกันสามารถแก้ไขข้อเสียจากวิธีการแรกได้

เวสาร์ช และคณะ (2557) ศึกษาการการใช้ประโยชน์จากปอควิวา (*Hibiscus cannabinus* L.) เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR5019 และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล 2 วิธี คือ กระบวนการหมักแบบ SHF และ SSF พบว่า กระบวนการหมักแบบ SSF มีความสามารถในการผลิตมากกว่า SHF โดย SSF ให้ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นสูงสุด และอัตราผลผลิตเอทานอล เท่ากับ 7.66 กรัมต่อ 100 กรัมของสารตั้งต้น และ 0.07 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนการหมักด้วยวิธีการหมักแบบ SHF ให้ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นสูงสุด และอัตราผลผลิตเอทานอล เท่ากับ 1.70 กรัมต่อ 100 กรัมของสารตั้งต้น และ 0.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

กล้าณรงค์ และคณะ (2548) ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยอาศัยกระบวนการหมักที่มีการย่อยแบ่งให้เป็นน้ำตาล และหมักแบบ SSF โดยนำน้ำเชื่อมที่ผ่านการย่อยครั้งแรกด้วยเอนไซม์อะไมเลสมาผสมกับเอนไซม์กลูโคอะไมเลสพร้อมกับเชื้อยีสต์ ซึ่งกระบวนการ SSF สามารถลดระยะเวลาการหมักได้เมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม (Conventional Fermentation)

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแล้ว เอทานอลที่ได้จะถูกนำไปกลั่นเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล เนื่องจากเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 8-12 % โดยปริมาตร และการนำเอทานอลไปใช้เป็นเชื้อเพลิงนั้นจำเป็นต้องแยกเอทานอลให้ได้ความบริสุทธิ์ถึง 99.5 % โดยปริมาตร อย่างไรก็ตามการกลั่นที่ความดันบรรยากาศจะได้เอทานอลเพียง 95 % โดยปริมาตร ดังนั้นจำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นๆ มาช่วยแยกน้ำออกจากเอทานอลให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้น เช่น กระบวนการแยกด้วยเมมเบรน หรือกระบวนการแยกโดยการให้เอทานอลไหลผ่านวัสดุที่มีรูพรุนสูง (วิธีโมเลกุลซีฟ) (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย, 2551)

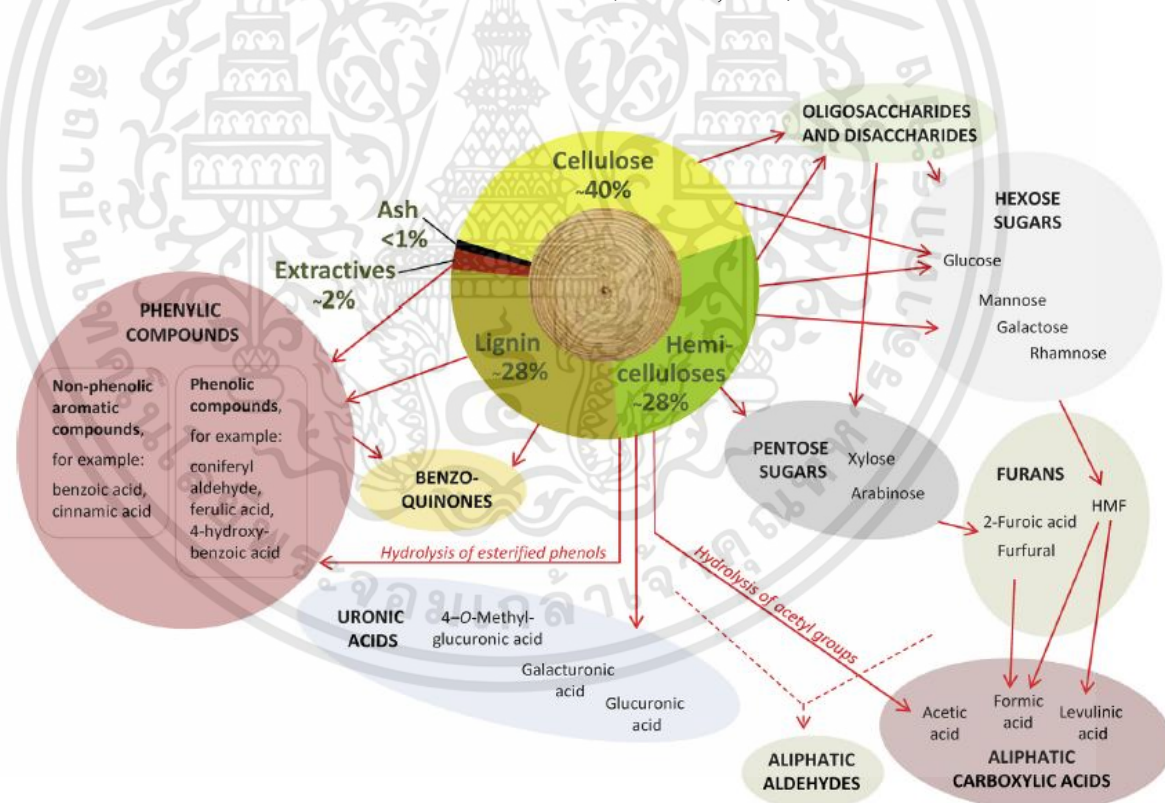
สำหรับการผลิตเอทานอลจากผลพลอยได้ทางการเกษตรนั้นจำเป็นต้องมีการเพิ่มแหล่งไนโตรเจน วิตามิน และแร่ธาตุที่จำเป็นให้แก่ยีสต์ โดยแหล่งไนโตรเจนมีความจำเป็นสำหรับการสังเคราะห์กรดอะมิโน พิวรีน ไพริมิดีน คาร์โบไฮเดรตบางชนิด ลิพิด เอนไซม์ โคแฟกเตอร์และสารชนิดอื่นๆ แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ เกลืออนินทรีย์ เช่น แอมโมเนียมซัลเฟต และแอมโมเนียมไนเตรด (NH_4NO_3) และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ เช่น เพปโตน และยีสต์สกัด (yeast extract) (สุขใจ, 2554) อย่างไรก็ตาม มีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการหาสูตรสารอาหารที่เหมาะสมสำหรับยีสต์เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลซึ่งมีหลายสูตรด้วยกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ได้เลือกใช้และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของงาน งานวิจัยของ Alfenore *et al.* (2002) รายงานว่า การเติมวิตามินรวมหลายชนิด จะส่งผลต่อการเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของยีสต์ และให้ผลได้เอทานอลเพิ่มขึ้น

2.9 สารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยสลายด้วยกรดร่วมกับการใช้ความร้อน

การปรับสภาพวัตถุดิบที่เป็นผลพลอยได้จากโรงงานผลิตแป้งมันสำปะหลัง (กากหรือเปลือก) สามารถเตรียมได้โดยการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดเจือจางร่วมกับการใช้ความร้อน (Srinorakutara *et al.*, 2006; กัลยา และคณะ, 2548; Agu *et al.*, 1997) กรดจะเข้าไปทำปฏิกิริยาสลายพันธะ β -1,4 glycosidic ของโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้แตกออก ทำให้เกิดการปลดปล่อยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวมากขึ้น เช่น กลูโคส กาแลคโตส แมนโนสไซโลส และอะราบินอส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ยิ่งไปกว่านั้นยังมีผลิตภัณฑ์พลอยได้อื่นๆ ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงหรือสลายตัวของโครงสร้างวัสดุเองหรือน้ำตาลรีดิวซ์ไปเป็นสารประกอบอื่นได้อีก ดังแสดงในภาพที่ 2.9 และยังทำให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้มีค่าน้อยลง (สิริวรรณ, 2554)

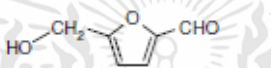
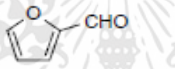

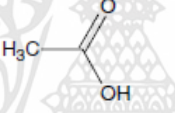
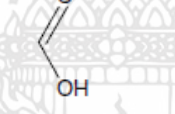
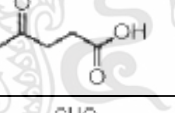
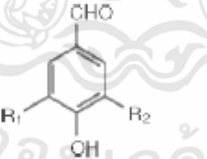
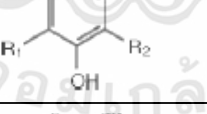
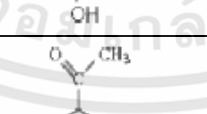
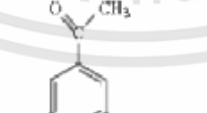
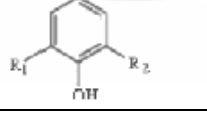
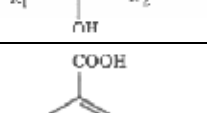
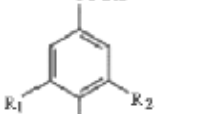
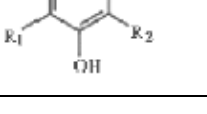



ภาพที่ 2.9 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบจำพวกกลีโคเซลลูโลสภายใต้สภาวะที่เป็นกรด (Jönsson and Martín, 2016)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

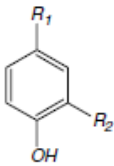
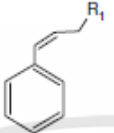
อย่างไรก็ตาม สารประกอบบางตัวที่เกิดขึ้นในระหว่างการเตรียมวัตถุดิบพวกกลีโคเซลลูโลสโดยใช้ความร้อนสูงภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดร่วมด้วยนั้นส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์เกิดขึ้น (Parajó *et al.*, 1998) ได้แก่ เฟอพิวรัล 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดลิวลินิก (Larsson *et al.*, 1999) (ตารางที่ 2.2) การเกิดสารยับยั้งเหล่านี้ในรูปของสารผสม พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยลดประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการหมักเอทานอลได้มากกว่าการเกิดสารยับยั้งเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง (Mussatto and Roberto, 2004; Palmqvist *et al.*, 1999b)

ตารางที่ 2.2 สารยับยั้งทั่วไปที่เกิดขึ้นในสารละลายจากการย่อยสลายวัตถุดิบกลีโคเซลลูโลส

กลุ่มของสารยับยั้ง	ตัวอย่างสารยับยั้ง
Furan derivatives	 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde (HMF)
	 2-Furaldehyde
	 2-Furoic acid
Aliphatic acids	 Acetic acid
	 Formic acid
	 Levulinic acid
Phenolic compounds	 $R_1 = R_2 = H$ 4-hydroxybenzaldehyde
	 $R_1 = H, R_2 = OCH_3$ Vanillin
	 $R_1 = R_2 = OCH_3$ Syringaldehyde
	 $R_1 = R_2 = H$ 4-hydroxyacetophenone
	 $R_1 = H, R_2 = OCH_3$ Acetovanillone
	 $R_1 = R_2 = OCH_3$ Acetosyringone
	 $R_1 = R_2 = H$ 4-hydroxybenzoic acid
	 $R_1 = H, R_2 = OCH_3$ Vanillic acid
	 $R_1 = R_2 = OCH_3$ Syringic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 (ต่อ)

กลุ่มของสารยับยั้ง	ตัวอย่างสารยับยั้ง	
Phenolic compounds		$R_1 = R_2 = H$ Phenol $R_1 = H, R_2 = OH$ Catechol $R_1 = OH, R_2 = H$ Hydroquinone
		$R_1 = COOH$ Cinnamic acid

ที่มา: Almeida *et al.* (2007)

ปริมาณและชนิดสารยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุคิบ และกระบวนการที่ใช้ย่อยสลายวัตถุคิบ โดยแบ่งสารพิษออกเป็น 4 ประเภทตามแหล่งกำเนิด (Mussatto and Roberto, 2004) ดังนี้

2.9.1 สารยับยั้งที่เกิดจากการสลายตัวของน้ำตา

ในระหว่างการย่อยสลาย น้ำตาลกลุ่มเพนโทสถูกสลายไปเป็นผลิตภัณฑ์อื่นโดยกระบวนการดีไฮเดรชัน (dehydration) ต่อได้เป็นเฟอพิวรัล ซึ่งสามารถยับยั้งอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ และผลได้มวลเซลล์ ส่วนการสลายตัวของน้ำตาลกลุ่มเฮกโซสสามารถเกิดเป็นสารยับยั้งได้เช่นกัน คือ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล ซึ่งมีอิทธิพลในการยับยั้งได้เช่นเดียวกับเฟอพิวรัล แต่มีความเป็นพิษน้อยกว่า อย่างไรก็ตามในสารละลายหลังการย่อยมักพบสารยับยั้งชนิดนี้ในปริมาณมากกว่าเฟอพิวรัล (Almeida *et al.*, 2007) ทั้งนี้เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัลสามารถสลายไปเป็นกรดฟอร์มิก ส่วน 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล ยังสามารถสลายไปเป็นกรดลิวลินิกอีกด้วย

2.9.2 สารยับยั้งที่เกิดจากการสลายตัวของลิกนิน

ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลาย โครงสร้างลิกนินส่วนใหญ่ คือ สารประกอบฟีนอลิก โดยสารประกอบนี้ที่มีมวลโมเลกุลต่ำจะมีความเป็นพิษต่อกระบวนการหมักมากที่สุด (Ando *et al.*, 1986) Parajó *et al.* (1998) รายงานว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการสลายตัวของลิกนินมีความรุนแรงต่อเชื้อจุลินทรีย์มากกว่าเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล แม้จะพบในปริมาณต่ำก็ตาม

2.9.3 สารยับยั้งที่มาจากองค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลส

สารยับยั้งในกลุ่มนี้ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid) ซึ่งได้จากการย่อยสลายของหมู่อะซิติกที่พบในเฮมิเซลลูโลส และสารแทรกที่อยู่องค์ประกอบภายนอกในวัสดุลิกโนเซลลูโลส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เช่น เรซิน (resin) แทนนิก (taninic) และ เทอร์ปีน (terpene) โดยสารแทรกที่เกิดขึ้นนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์น้อยกว่าอนุพันธ์จากการสลายโครงสร้างลิกนินหรือกรดอะซิติก

2.9.4 ไอออนของโลหะหนัก

ไอออนของโลหะหนัก ได้แก่ เหล็ก โคโรเมียม นิกเกิล และทองแดง ที่เกิดจากการกักร่อนของอุปกรณ์ที่ใช้ในกระบวนการย่อยด้วยกรด มีผลทำให้เกิดการยับยั้งเอนไซม์ในเมตาบอลิซึมและกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์สำหรับการหมัก (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000)

2.10 กลไกการยับยั้งของสารยับยั้ง

2.10.1 อนุพันธ์ฟูแรน (furan derivatives)

สารยับยั้งจากอนุพันธ์ฟูแรน เช่น 5-ไฮดรอกซี เมทิล ฟือฟิวรัล และฟือฟิวรัล จะไปทำให้การผลิตชีวมวล อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และการผลิตเอทานอลของเชื้อน้อยลง และยังส่งผลให้ระยะปรับตัวนานขึ้น นอกจากนี้ฟือฟิวรัลสามารถเปลี่ยนไปเป็นฟือฟิวรัลแอลกอฮอล์ (furfuryl alcohol) ซึ่งส่งผลต่อการเจริญของเชื้อเช่นกัน ระดับความเป็นพิษขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารยับยั้งและสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก Roberto *et al.* (1991a) รายงานว่า ความเข้มข้นของฟือฟิวรัลในปริมาณต่ำส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pichia stipites* ที่ใช้ในการหมักเอทานอล แต่เมื่อความเข้มข้นมากกว่า 2 กรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เกือบสมบูรณ์ นอกจากนี้ Liu *et al.* (2004) ทำการศึกษาผลของการใช้สารยับยั้งทั้ง 2 ชนิดนี้ร่วมกัน พบว่ามีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์มากกว่าการมีสารยับยั้งเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง

กลไกการยับยั้งเกิดจากสารทั้ง 2 ชนิดนี้เหมือนกัน คือ ไปยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ไพรูเวตดีไฮโดรจีเนส (pyruvate dehydrogenase) และแอลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส (aldehyde dehydrogenase) รวมทั้งเอนไซม์และโคแฟกเตอร์ในวิถีไกลโคไลซิส ฟือฟิวรัลยังสามารถทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแควิวโอล และไมโทคอนเดรียได้อีกด้วย โดยทั่วไปอธิบายกลไกการยับยั้งของสารชนิดนี้ว่า ยีสต์จำเป็นต้องลดการใช้ ATP และ NAD(P)H ภายในเซลล์ รวมทั้งยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และการใช้โคแฟกเตอร์เพื่อซ่อมแซมการทำลายที่เกิดขึ้น (Almeida *et al.*, 2007)

2.10.2 กรดอ่อน (weak acids)

กรดอ่อนที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลาย ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก ทำให้เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักโดยไปลดการผลิตชีวมวล และเอทานอล นอกจากนี้มีการรายงานว่า กรดอ่อนทำให้ลดการดูดซึมของกรดอะมิโนในอาหารทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์ (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Almeida *et al.*, 2007) กระบวนการยับยั้งของกรดอ่อนประกอบไปด้วยกลไก 2 ขั้นตอน คือ การแตกตัว และการสะสมประจุลบภายในเซลล์ มีรายงานว่า กรดอ่อนที่มีความเข้มข้นเท่ากันมีความเป็นพิษต่างกันเนื่องจาก

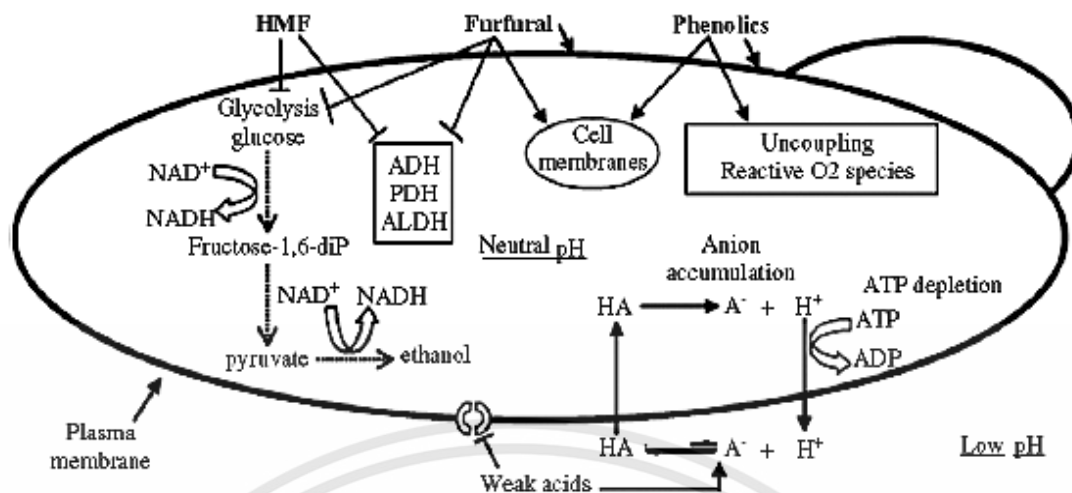
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการแพร่เข้าไปในเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และความเป็นพิษของประจุลบในกรดอ่อนแต่ละชนิดแตกต่างกัน

กรดอ่อนที่เกิดขึ้นในสารละลายจะอยู่ในรูปไม่แตกตัว เมื่อแพร่เข้าไปในไซโทพลาสซึมของเซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แล้วจะเกิดการแตกตัวของกรด ค่า pH ภายในเซลล์จึงลดลง ดังนั้นกระบวนการปรับสภาวะให้เป็นกลางภายในเซลล์จำเป็นต้องอาศัยการทำงานของ ATPase ในเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขับโปรตอนออกนอกเซลล์ เป็นผลให้เซลล์ผลิตชีวมวลได้น้อยลง อย่างไรก็ตาม กรดอ่อนที่ความเข้มข้นต่ำจะช่วยส่งเสริมการผลิตเอทานอลได้ดีขึ้น โดยเชื่อว่าที่จะไปกระตุ้นการทำงานของ ATPase และขับโปรตอนมากขึ้น ทำให้ ATP เพิ่มขึ้น จึงสามารถรักษาระดับค่า pH ภายในเซลล์ได้ แต่เมื่อความเข้มข้นของกรดมากขึ้น ทำให้เซลล์ขาดความสามารถในการขับโปรตอน ปริมาณ ATP ในไซโทพลาสซึมของเซลล์จึงหมดไป จึงเกิดความเป็นกรดขึ้น ส่งผลให้การผลิตเอทานอลน้อยลงด้วย

2.10.3 สารประกอบฟีนอลิก (phenolic compounds)

สารประกอบฟีนอลิกสามารถยับยั้งกระบวนการหมักได้ โดยพบว่าสารประกอบฟีนอลิกที่มีมวลโมเลกุลต่ำมีฤทธิ์ยับยั้งในกระบวนการหมักมากกว่าสารประกอบฟีนอลิกที่มีมวลโมเลกุลสูง เนื่องจากสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำสามารถแทรกอยู่ในโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ ทำให้เซลล์สูญเสียความแข็งแรง และยังมีผลต่อการควบคุมการเข้าออกของสารและเอนไซม์ต่างๆ มีผลทำให้การเจริญเติบโตและดูดซึมน้ำตาลโดยเชื้อจุลินทรีย์ลดลง นอกจากนี้ตำแหน่งของหมู่แทนที่พารา (para-) ออโธ (ortho-) และ เมตา (meta-) ในสารประกอบก็มีส่วนทำให้เกิดความเป็นพิษได้เช่นกัน (Mussatto and Roberto, 2004; Almeida *et al.*, 2007) กลไกการยับยั้งจากอนุพันธ์ฟูแรน กรดอ่อน และสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดขึ้นในเซลล์ของยีสต์ ดังแสดงในภาพที่ 2.10



ภาพที่ 2.10 กลไกการยับยั้งที่เกิดขึ้นในเซลล์ของยีสต์ *S. cerevisiae* จากอนุพันธ์ฟูแรน กรดอ่อน และสารประกอบฟีนอลิก (Almeida *et al.*, 2007)

2.11 การลดความเป็นพิษของสารยับยั้งที่เกิดระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ

เนื่องจากกระบวนการเตรียมวัตถุดิบก่อให้เกิดสารยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ ซึ่งส่งผลต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดขึ้น จึงจำเป็นต้องมีการปรับสภาพสัปดาห์จากที่ได้ หลังการย่อยเพื่อลดความเป็นพิษจากสารยับยั้งดังกล่าวให้เหมาะต่อระบบเมตาบอลิซึมของเชื้อ และเพื่อที่จะเพิ่มศักยภาพการผลิตเอทานอลในยุคที่สองให้ทัดเทียมกับยุคแรกได้ สิ่งที่จะต้องทราบก่อนที่จะเลือกวิธีการลดความเป็นพิษของสารยับยั้ง คือ ประเภทของสารยับยั้งที่เกิดขึ้น (Fernandes *et al.*, 2012) แนวทางที่จะลดความเข้มข้นของสารยับยั้ง มีดังนี้ (1) ป้องกันการเกิดสารยับยั้งในระหว่างกระบวนการเตรียมวัตถุดิบ (2) การลดความเป็นพิษก่อนจะเข้าสู่กระบวนการหมัก (3) การพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ให้สามารถทนต่อสารยับยั้งนั้นๆ ได้ และ (4) เปลี่ยนสารพิษให้เป็นผลิตภัณฑ์อื่นที่ไม่รบกวนระบบเมตาบอลิซึม (Taherzadeh *et al.*, 2000b)

การลดความเป็นพิษประกอบไปด้วย (1) วิธีทางชีวภาพ (2) วิธีทางกายภาพ และ (3) วิธีทางเคมี (Mussatto and Roberto, 2004)

2.11.1 วิธีทางชีวภาพ

เป็นการใช้เอนไซม์ที่มีความจำเพาะ หรือการใช้จุลินทรีย์ในการลดความเป็นพิษของสารยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ เป็นกระบวนการที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งความต้องการพลังงานที่ใช้ในระบบต่ำ อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีข้อจำกัดที่ต้องอาศัยเวลาในการเกิดปฏิกิริยา และอาจมีการสูญเสียของน้ำตาลที่เกิดขึ้น (Yang and Wyman, 2008)

2.11.1.1 การปรับสภาพเชื้อ

การปรับสภาพของเชื้อจุลินทรีย์ให้ทนต่อสภาพแวดล้อมในสารละลาย หรือสารยับยั้งที่เกิดจากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลสเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยปรับปรุงผลได้ เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของผลิตภัณฑ์ (Silva and Roberto, 2001) เช่น ในการศึกษาการพัฒนาเชื้อ *P. stipitis*, *C. shehatae* และ *P. tanophilus* ให้ทนต่อสารยับยั้ง โดยการเลี้ยงในอาหารที่มีการเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งตามลำดับ วิธีการนี้สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลภายใต้สภาวะที่มีสารยับยั้งได้ดีขึ้น (Tomás-Pejó *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2007)

Silva and Roberto (2001) ศึกษาการปรับสภาพเชื้อ *C. guilliermondii* ในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าว เพื่อใช้ในการผลิตไซลิตอล (xylitol) พบว่ากระบวนการดังกล่าวนี้ ได้ผลดี และมีค่าใช้จ่ายไม่สูง

Pornpukdeewattana *et al.* (2014) ทำการปรับสภาพเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่มีความเข้มข้นต่างๆ โดยพบว่าเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพให้ผลได้เอทานอลสูงกว่าเชื้อที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ

2.11.1.2 การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการลดความเป็นพิษ

กระบวนการนี้ทำโดยเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายลิกโนเซลลูโลส เพื่อให้จุลินทรีย์นั้นลดความเป็นพิษของสารยับยั้งโดยการเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีของสารนั้นๆ (López *et al.*, 2004) กระบวนการนี้จะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายของกระบวนการผลิตเอทานอล โดยอาศัยเชื้อจุลินทรีย์พวกยีสต์ รา แบคทีเรียที่ไม่ผ่าน หรือผ่านการตัดแปลงพันธุกรรมที่มีเอนไซม์แลกเคส (laccase) หรือเพอรอกซิเดส (peroxidase)

Nichols *et al.* (2008) พบว่าเชื้อ *Coniochaeta ligniaria* NRRL30616 สามารถเมตาโบไลต์เฟอพิวรัต ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัต สารอะโรมาติก และแอลดีไฮด์ ที่มีอยู่ในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายซังข้าวโพด

Okuda *et al.* (2008) ใช้เชื้อ *Ureibacillus thermosphaericus* ลดความเป็นพิษในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย waste house wood การศึกษาพบว่าเชื้อนี้สามารถย่อยเฟอพิวรัต และไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัตที่มีอยู่ในสารละลายที่สังเคราะห์ขึ้น อีกทั้งยังสามารถย่อยสารประกอบฟีนอลิกที่มีในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลาย waste house wood โดยเชื้อนี้เจริญได้อย่างรวดเร็ว และใช้น้ำตาลในระบบต่ำกว่า 5 %

2.11.1.3 การใช้ High cell density ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพการผลิตจำเพาะโดยมวล (cell specific productivity) และความเข้มข้นมวลชีวภาพ มีรายงานว่า การเติมหัวเชื้อจำนวนมาก (high cell mass inoculums) สามารถทนต่อสารยับยั้งในระบบได้ (Purwadi *et al.*, 2007) Brandberg *et al.* (2007) เสริมว่า การควบคุมระบบให้มีเชื้อเริ่มต้นจำนวนมากจะทำให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลสูงขึ้น อย่างไรก็ตามวิธีนี้ยังไม่ได้รับความสนใจในระดับโรงงาน (Jönsson *et al.*, 2013)

2.11.1.4 การใช้เอนไซม์ในการลดความเป็นพิษ นิยมใช้เอนไซม์ laccase และ peroxidase ที่ผลิตจากเชื้อราสีขาวในการลดปริมาณสารยับยั้งจากสารประกอบฟีนอลิกที่เกิดขึ้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยไปทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดทีฟพอลิเมอไรเซชัน (oxidative polymerization) (Chandel *et al.*, 2011)

Jönsson *et al.* (1998) รายงานผลของการลดสารพิษในสารละลายที่ได้จากการย่อยสลายไม้ด้วยเอนไซม์ laccase และ peroxidase ที่ผลิตจากเชื้อรา *Trametes versicolor* โดยพบว่าเชื้อใช้น้ำตาลได้ดีขึ้น และมีประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลที่สูงขึ้น เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ไปเปลี่ยนโครงสร้างของกรด และสารประกอบฟีนอลิก

2.11.2 วิธีทางกายภาพ

เช่น การใช้การระเหยแบบสุญญากาศ (vacuum evaporation) การสกัดของเหลวด้วยของเหลว (liquid-liquid extraction) และการสกัดของแข็งด้วยของเหลว (solid-liquid extraction) เป็นต้น (Jönsson and Martín, 2016) Converti *et al.* (2000) รายงานว่า การลดความเป็นพิษของสารยับยั้งด้วยการระเหยแบบสุญญากาศ สามารถลดปริมาณสารประกอบที่ระเหยง่ายในสารละลายที่ย่อยได้จากวัสดุลิกโนเซลลูโลส รวมทั้งกรดอะซิดิก และเฟอพิวรัล อย่างไรก็ตามวิธีนี้จะทำให้สารประกอบที่ระเหยไม่ได้เพิ่มขึ้น เช่น สารแทรก และสารยับยั้งที่เกิดจากการสลายตัวของลิกนิน นอกจากนี้การแยกโดยใช้เยื่อกรอง (membrane separation) เป็นอีกวิธีหนึ่งในการกำจัดสารยับยั้งกรดอะซิดิกได้ (Chandel *et al.*, 2011)

2.11.3 วิธีทางเคมี

เช่น การทำสารละลายให้เป็นกลาง (neutralization) โดยปรับค่า pH ให้มีค่าประมาณ 6-7 ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการหมักโดยการเติมด่าง เช่น แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) หรือ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ซึ่งสามารถลดความเป็นพิษที่เกิดขึ้นได้ ซึ่งการปรับสภาพสารละลายที่ได้หลังการย่อยด้วยกรดซัลฟิวริกเจือจางโดยการเติมปูนให้มากเกินพอ (overliming) โดยใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ ($\text{Ca}(\text{OH})_2$) หรือแคลเซียมออกไซด์ (CaO) (Yang and Wyman, 2008) เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ มีค่าใช้จ่ายไม่สูง โดยทั่วไปมักเติมปูนจนกระทั่งสารละลายมีค่า pH ประมาณ 9-11 แล้วจะทำให้เกิดการตกตะกอนของแคลเซียมซัลเฟต (Mohagheghi *et al.*, 2006) ทั้งนี้ยังช่วยในการกำจัดลิกนิน และเพิ่มปริมาณการผลิตเอทานอลได้อีกด้วย Chandel *et al.* (2011) รายงานว่า การใช้แคลเซียมไฮดรอกไซด์ช่วยกำจัดสารยับยั้งเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอพิวรัลได้

นอกจากนั้นการดูดซับสารยับยั้งยังมีอีกหลายวิธี ได้แก่ การใช้ถ่านกัมมันต์ (activated charcoal) ไดอะตอมมาเซียสเอิร์ธ (diatomaceous earth) และการใช้ระบบแลกเปลี่ยนไอออน (ion exchange resins) เป็นต้น (Mussatto and Roberto, 2004)

บทที่ 3

อุปกรณ์ และวิธีการดำเนินงาน

3.1 วัตถุดิบ

3.1.1 กากมันสำปะหลังสด ได้รับความอนุเคราะห์จาก บริษัท ไควซ์เอี๊ยะอุตสาหกรรม แป้งมันและสาชู จำกัด อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี

3.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

3.2.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	Nikon, Japan
3.2.2 เครื่องกวนผสมสาร (Overhead stirrer)	IKA รุ่น RW 20 digital, Germany
3.2.3 เครื่องเขย่าสาร	New brunswick scientific รุ่น Innova 2100 USA.
3.2.4 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ	N-Biotek รุ่น NB-205 VL, Korea
3.2.5 เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง	Shimadzu รุ่น Nexera, Japan
3.2.6 เครื่องชั่ง 2 ตำแหน่ง	Mettler toledo รุ่น Dragon3002, USA.
3.2.7 เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง	Sartorius รุ่น CPA3245, Germany
3.2.8 เครื่องบดแบบแฮมเมอร์ (Hammer mill)	
3.2.9 เครื่องบ่มเชื้อ	Memmert, Germany
3.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน	Hettich รุ่น EBA20, Norway
3.2.11 เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก	Heraeus รุ่น Pico 21, Germany
3.2.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอนควบคุมอุณหภูมิ	Eppendorf รุ่น 5804R, Germany
3.2.13 เครื่องผสมละลาย (Vortex mixer)	Scientific industries รุ่น Vortex genie2, USA.
3.2.14 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	Inolab PH level1, Germany
3.2.15 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง	Shimadzu รุ่น UV-1601 , Japan
3.2.16 โถดูดความชื้น (desiccator)	
3.2.17 ไมโครปีเปต	Sartorius รุ่น Proline, Germany
3.2.18 ไมโครเวฟ	Electrolux รุ่น EMS 3027X, PRC
3.2.19 ตะแกรงร่อน ขนาด 40 mesh	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.20 ตู้เชื่อม	Bosstech รุ่น HBV120S, Thailand
3.2.21 ตู้อบลมร้อน	Heraeus, Germany
3.2.22 ตู้อบแห้งแบบถาด	Progress electronic, Thailand
3.2.23 หม้อนิ่งฆ่าเชื้อ	Tomy รุ่น SS-325, Japan
3.2.24 ฮีมาไซโตมิเตอร์	BOECO, Germany
3.2.25 เครื่องแก้วต่างๆ	

3.3 สารเคมี

3.3.1 5-Hydroxy methyl furfural (5-HMF)	Sigma-aldrich, Singapore
3.3.2 Acetonitrile	Merk, Germany
3.3.3 Ammonium sulfate	Merk, Germany
3.3.4 Calcium chloride dihydrate	Merk, Germany
3.3.5 Calcium hydroxide	Merk, Germany
3.3.6 Ethanol 95%	Italmar, Thailand
3.3.7 Ethanol 99.5%	Merk, Germany
3.3.7 Furfural	Sigma-aldrich, Singapore
3.3.8 Glycerol	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.9 Isopropanol	Merk, Germany
3.3.10 Levulinic acid 98%	Sigma-aldrich, Singapore
3.3.11 Magnesium sulfate heptahydrate	Merk, Germany
3.3.12 Methylene violet	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.13 Phenol	RCI Labscan, Ireland
3.3.14 Phosphoric acid	RCI Labscan, Ireland
3.3.15 Potassium dihydrogen phosphate	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.16 Sodium acetate trihydrate	Merk, Germany
3.3.17 Sodium chloride	Merk, Germany
3.3.18 Sodium citrate	Merk, Germany
3.3.19 Sodium formate	Merk, Germany
3.3.20 Sodium hydroxide	Carlo Erba Reagent, Italy
3.3.21 Sulfuric acid 98%	RCI Labscan, Ireland

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ และส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

3.4.1 Agar	SP scientific, Thailand
3.4.2 Bacto peptone	Difco, USA.
3.4.3 Dextrose	Zhucheng dongxiao biotechnology, China
3.4.4 Yeast extract	Difco, USA

3.5 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.5.1 การเตรียมตัวอย่างกากมันสำปะหลัง

นำกากมันสำปะหลังสดจากบริษัท ไคว้ซังเอี๊ยะ อุตสาหกรรมแป้งมันและสาकु จำกัด ไปอบด้วยตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนกระทั่งกากมันสำปะหลังแห้ง นำมาบดด้วยเครื่องบดแบบแฮมเมอร์ แล้วร่อนผ่านตะแกรงขนาด 40 mesh เก็บรักษาในภาชนะที่แห้งและปิดให้มิดชิดที่อุณหภูมิห้องก่อนนำไปใช้

3.5.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ SC90 จากห้องปฏิบัติการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าคุณทหารลาดกระบัง โดยเลี้ยงเชื้อบนอาหารวุ้นเลี้ยง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วทำการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยมีการต่อเชื้อใหม่ทุก 1 เดือน เชื้อจุลินทรีย์อีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาในรูปสารแขวนลอยเซลล์ในสารละลายกลีเซอรอล 30 % ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.5.3 การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์

การเตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 คัดแปลงจาก Silva *et al.* (2011) และ Pornpukdeewattana *et al.* (2014) โดยทำการเชี่ยกล้าเชื้อยีสต์จากอาหารวุ้นเลี้ยง YPD 1 ลูก ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อที่ได้ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเตรียมกล้าเชื้อยีสต์เข้มข้น 50 % ก่อนนำไปใช้ โดยนำยีสต์ที่เพาะเลี้ยงไปเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนน้ำหมักเก็บไว้ แล้วเติมกลับลงไปนในเซลล์ยีสต์ด้วยอัตราส่วนเชื้อยีสต์ต่อน้ำหมัก 1:1 โดยน้ำหนัก แล้วตรวจนับปริมาณเชื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์

3.5.4 การย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจางร่วมกับการให้ความร้อน

การย่อยกากมันสำปะหลังโดยใช้กรดร่วมกับการให้ความร้อนคัดแปลงจากวิธีของ Srinorakutara *et al.* (2006) ซึ่งรายงานว่าได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง โดยซังกากมันสำปะหลัง 80 กรัม และเติมสารละลาย H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร (อัตราส่วนกากมันสำปะหลังต่อกรดเท่ากับ 1:10 (มวล/ปริมาตร)) นำไปย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส ในหม้อหม้อนึ่งมาเชื้อเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง โดยแบ่งสารละลายที่ได้ออกเป็น 2 ส่วน คือ

1) สารละลายที่ไม่กำจัดสารพิษ

นำสารละลายไปกรองกากมันออกด้วยผ้าขาวบาง ปรับค่า pH ให้เป็นกลางเท่ากับ 5.5 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 10 โมลาร์ จากนั้นนำสารละลายที่ย่อยได้ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนกากมันออกที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดตะกอนที่เกิดขึ้น

2) สารละลายที่กำจัดสารพิษ

การกำจัดสารพิษในสารละลายออก (detoxification) ซึ่งคัดแปลงจากวิธีของ Akaracharanya *et al.* (2011) โดยกรองกากมันสำปะหลังในสารละลายที่ได้จากการย่อยด้วยกรดเจือจางออกด้วยผ้าขาวบาง ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 10 ด้วยผง $Ca(OH)_2$ ทำการกวนต่อเป็นระยะเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปรับค่า pH ให้เท่ากับ 5.5 ด้วยกรด H_2SO_4 เข้มข้น แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 9000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เพื่อกำจัดตะกอนที่เกิดขึ้น

นำสารละลายไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) วิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดในสารละลาย ด้วยเทคนิคโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) คัดแปลงจากวิธีการของ Sluiter *et al.* (2012) และสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวูลินิก เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล ด้วยเทคนิค HPLC แล้วเก็บสารละลายกากมันสำปะหลังพร้อมใช้ไว้ในภาชนะที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปใช้

3.5.5 การศึกษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์ในระหว่างการเตรียมตัวอย่างโดยใช้กรดเจือจาง

เตรียมอาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการเติมสารยับยั้งแต่ละชนิดดังนี้ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวูลินิก ในรูปเกลือ ระดับความเข้มข้นละ 100, 200,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

300, 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ เฟอไฟวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอไฟวรัล ระดับความเข้มข้นละ 6.25, 12.5, 18.75 และ 25 มิลลิโมลาร์ ควบคุมค่า pH ของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลาย H_3PO_4 หรือสารละลาย NaOH และทำการฆ่าเชื้อ จากนั้นถ่ายกล้ำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ลงในอาหาร โดยควบคุมให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มีชีวิต 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72-120 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 60 และ 72 ติดตามการเจริญของเชื้อยีสต์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง (Charoenrat *et al.*, 2013) เปรียบเทียบผลกับการทดลองควบคุมที่ไม่มีการเติมสารยับยั้ง

3.5.6 การปรับสภาพเชื้อยีสต์ให้สามารถทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเตรียมสารละลายน้ำตาลจากกากมันสำปะหลังด้วยกรดเจือจาง

3.5.6.1 การเตรียมอาหารปรับสภาพเชื้อยีสต์

ทำการเติมสารอาหารต่างๆลงในสารละลายจากกากมันสำปะหลังส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ ดังนี้ yeast extract 5 กรัมต่อลิตร $(NH_4)_2SO_4$ 7.5 กรัมต่อลิตร KH_2PO_4 3.5 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.75 กรัมต่อลิตร และ $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 กรัมต่อลิตร (Kouteu Nanssou *et al.*, 2016) ปรับค่า pH ของอาหารให้เท่ากับ 5.5 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นถ่ายกล้ำเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหาร ดำเนินการหมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำ 3 ซ้ำ นำน้ำหมักชั่วโมงที่ 0 และชั่วโมงที่ 72 มาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) และปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดด้วยเทคนิค HPLC โดยปริมาณน้ำตาลที่ลดลงคือปริมาณน้ำตาลที่เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 สามารถนำไปใช้ในการหมัก (fermentable sugar) ซึ่งมีค่าเท่ากับ 46.52 ± 0.56 กรัมต่อลิตร

ทำการเตรียมอาหารปรับสภาพเชื้อยีสต์โดยนำสารละลายจากกากมันสำปะหลังส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ (100% ปริมาตร/ปริมาตร) มาเจือจางด้วยน้ำกลั่น เพื่อให้ได้อาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายจากกากมันสำปะหลังเท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) โดยอาหารในสภาวะควบคุม (0% ปริมาตร/ปริมาตร) จะไม่มีการเติมสารละลายจากกากมันสำปะหลัง ปรับปริมาณ fermentable sugar ในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตรให้เท่ากับ 46.52 กรัมต่อลิตร ด้วยน้ำตาลกลูโคส และเติมสารอาหารต่างๆ ดังที่กล่าวไว้ข้างต้น ปรับค่า pH เป็น 5.5 และนำไปฆ่าเชื้อ

3.5.6.2 การปรับสภาพยีสต์

การปรับสภาพเชื้อดัดแปลงจากงานวิจัยของ Pornpukdeewattana *et al.* (2014) โดยทำการเลี้ยงเชื้อยีสต์ในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งต่ำก่อนจากนั้นจึงเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งให้มากขึ้น โดยมีขั้นตอนดังนี้ ถ้ายกกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่มีชีวิต 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในอาหารสถานะควบคุมปริมาตร 300 มิลลิลิตร ในขวดรูปชมพู่ขนาด 1000 มิลลิลิตร ดำเนินการหมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่าง ชั่วโมงที่ 0, 1, 2, 3, 4, 8, 12, 24, 36 และ 48 เพื่อติดตามการเจริญของเชื้อยีสต์ โดยใช้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) และระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุด (t_{max}) ในสภาวะควบคุมเป็นค่าอ้างอิงในการประเมินการเจริญ หลังจากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงน้ำหมักเพื่อแยกเซลล์ยีสต์ที่ได้จากสภาวะควบคุมนี้ไปใช้เป็นกล้าเชื้อยีสต์สำหรับอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของกากมันสำปะหลังต่ำสุด (20% ปริมาตร/ปริมาตร) ต่อไป โดยควบคุมให้มีเชื้อยีสต์ที่มีชีวิตเริ่มต้นเท่ากัน และดำเนินการหมักเช่นเดียวกันกับที่กล่าวไว้ข้างต้น ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารปรับสภาพสูตรเดิมจนกระทั่งอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อมีค่าเท่ากับหรือสูงกว่า 80% ของค่าการเจริญเติบโตจำเพาะในสภาวะควบคุม ตลอดจนระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดต้องใช้เวลาน้อยกว่าในสภาวะควบคุมเช่นกัน จากนั้นจึงทำการถ่ายเซลล์ยีสต์ลงในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังมากขึ้นตามลำดับ (40%, 60%, 80%, และ 100% ปริมาตร/ปริมาตร) โดยทำการทดลองทำ 3 ซ้ำ เก็บตัวอย่าง ชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 24 และ 48 ในรอบแรก และรอบสุดท้ายของอาหารแต่ละสูตร เพื่อนำมาตรวจสอบปริมาณเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการรอดชีวิต (Smart *et al.*, 1999) ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) ความเข้มข้นของเอทานอล และสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ด้วยเทคนิค HPLC โดยกระบวนการปรับสภาพเชื้อยีสต์ดำเนินการต่อเนื่องเป็นเวลา 960 ชั่วโมง เมื่อสิ้นสุดการปรับสภาพ นำเซลล์ยีสต์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง โดยมีอาหารปรับสภาพที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) เป็นส่วนประกอบเพื่อรักษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งของเชื้อยีสต์

3.5.7 การศึกษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งในรูปสารผสมต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลในอาหารเหลว YPD โดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

ทำการคัดเลือกความเข้มข้นของสารยับยั้งแต่ละชนิด (จากการศึกษาในหัวข้อที่ 3.5.5) เพื่อใช้ในการเตรียมสารยับยั้งผสมทั้ง 5 ชนิด โดยทำการพล็อตกราฟระหว่างค่าความเข้มข้นของสารยับยั้งแต่ละตัวกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ และเลือกความเข้มข้นสูงสุด ณ จุดที่ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อมีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 80% ของค่าการเจริญเติบโตจำเพาะในสภาวะควบคุม จากนั้นแบ่งระดับความเข้มข้นออกเป็น 4 ระดับ คือ (1) 25% (2) 50% (3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

75% และ (4) 100% ของความเข้มข้นสูงสุดของสารยับยั้งแต่ละชนิดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ ดังแสดงในตารางที่ 3.1 โดยทำการเติมลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 3.1 และมีอาหารที่ไม่เติมสารยับยั้งเป็นสภาวะควบคุม ปรับค่า pH ของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ด้วยสารละลาย H_3PO_4 หรือสารละลาย NaOH แล้วทำการฆ่าเชื้อ

ตารางที่ 3.1 การทดสอบความสามารถของยีสต์ในการทนต่อสารยับยั้งในรูปสารผสม

สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)			
	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น	ความเข้มข้น
	ระดับที่ 1	ระดับที่ 2	ระดับที่ 3	ระดับที่ 4
กรดอะซิติก	33.75	67.5	101.25	135
กรดฟอร์มิก	42.5	85	127.5	170
กรดลิวลินิก	62.5	125	187.5	250
เฟอพิวรัล	1.63	3.25	4.88	6.5
5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล	2.19	4.39	6.58	8.77

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการปรับสภาพ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ) และอาหารเหลว YPD ตามลำดับ โดยมีขั้นตอนดังข้อ 3.5.3 จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ ลงในอาหารเหลว YPD ที่ผสมสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ควบคุมเชื้อให้มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้น 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 เพื่อตรวจสอบการเจริญของเชื้อยีสต์โดยวัดการเจริญ และร้อยละการรอดชีวิต (Smart *et al.*, 1999) รวมถึงประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นของเอทานอล และสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ด้วยเทคนิค HPLC และทำการทดลองแบบเดียวกันโดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ เปรียบเทียบผลในสภาวะที่ใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

3.5.8 การศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

3.5.8.1 ศึกษาการเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลัง ความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) (ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการปรับสภาพ โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% และ 0% (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ โดยมีขั้นตอนดังข้อ 3.5.3 ถ้ายกกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพลงในอาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) (ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ) ซึ่งเติมสารอาหารต่างๆ ตามการรายงานของ Kouteu Nanssou *et al.* (2016) ปรับค่า pH เป็น 5.5 ควบคุมปริมาณเชื้อที่มีชีวิตเริ่มต้น 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 60 และ 72 เพื่อตรวจสอบปริมาณเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการรอดชีวิต (Smart *et al.*, 1999) ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) และความเข้มข้นของเอทานอลด้วยเทคนิค HPLC ทำการทดลองแบบเดียวกัน โดยใช้กล้าเชื้อยีสต์ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ (สภาวะควบคุม) เปรียบเทียบผลในสภาวะที่ใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

ทำการประเมินความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งของเชื้อด้วยเทคนิค Spot plate โดยนำกล้าเชื้อยีสต์ทั้งสองที่มีความเข้มข้น 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาเจือจางให้อยู่ที่ระดับความเข้มข้นอย่างละ 10^{-4} , 10^{-5} และ 10^{-6} แล้วนำมา Spot ลงบนเพลทสารละลายกากมันสำปะหลัง (cassava hydrolysate medium agar) ความเข้มข้น 0%, 50% และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) จำนวน 10 ไมโครลิตร เป็นจำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการถ่ายรูปเพื่อเปรียบเทียบผลการเจริญของเชื้อทั้งสองชนิด

3.5.8.2 ศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่กำจัด และไม่กำจัดสารพิษ

เตรียมกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพที่เลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ) โดยมีขั้นตอนดังข้อ 3.5.3

ถ้ายกกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพลงในอาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ทั้งส่วนที่กำจัด และไม่กำจัดสารพิษ ซึ่งเติมสารอาหารต่างๆ ตามรายงานของ Kouteu Nanssou *et al.* (2016) ปรับค่า pH เป็น 5.5 และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ควบคุมปริมาณเชื้อที่มีชีวิตเริ่มต้น 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 เพื่อตรวจสอบปริมาณเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการรอดชีวิต (Smart *et al.*, 1999) ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) และความเข้มข้นของเอทานอลด้วยเทคนิค HPLC

3.5.9 การศึกษาปริมาณแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลชีวภาพ

ถ่ายกล้าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพลงในอาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ โดยมีการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในปริมาณแตกต่างกัน คือ 0, 1, 3, 5 และ 7.5 กรัมต่อลิตร และเติมสารอาหารอื่นๆ ตามการรายงานของ Kouteu Nanssou *et al.* (2016) ตลอดจนปรับค่า pH เป็น 5.5 และผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยควบคุมปริมาณเชื้อที่มีชีวิตเริ่มต้น 3×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดำเนินการหมักที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างชั่วโมงที่ 0, 4, 8, 12, 24, 48 และ 72 เพื่อตรวจสอบปริมาณเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการรอดชีวิต (Smart *et al.*, 1999) ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก (Dubois *et al.*, 1956) และความเข้มข้นของเอทานอลด้วยเทคนิค HPLC

3.5.10 วิธีการวิเคราะห์

3.5.10.1 การตรวจสอบการเจริญ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อยีสต์ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Charoenrat *et al.* (2013) โดยเจือจางตัวอย่างน้ำหมักให้มีความเข้มข้นเหมาะสมด้วยสารละลาย NaCl 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3.5.10.2 การตรวจสอบปริมาณเซลล์ทั้งหมด และร้อยละการรอดชีวิตตามวิธีการของ Smart *et al.* (1999) โดยใช้การย้อมด้วยสีเซลล์ด้วยเมทิลีนไวโอเลต และนับปริมาณเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์

3.5.10.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และระยะพักของเชื้อ (lag time, t_{lag}) ตามวิธีการของ El-Mansi and Bruce Ward (2006)

3.5.10.4 การวิเคราะห์น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง คัดแปลงจากวิธีการของ Charoenrat *et al.* (2013)

3.5.10.5 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก ตามวิธีการของ Dubois *et al.* (1956)

3.5.10.6 การวิเคราะห์องค์ประกอบและปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิด (กลูโคส ไชโลส และอะราบีโนส) ด้วยเทคนิค HPLC คัดแปลงจากวิธีการของ Sluiter *et al.* (2012)

3.5.10.7 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล และสารยับยั้งประเภทกรด (กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก) ด้วยเทคนิค HPLC

ความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อประเมินโดยใช้พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ (Keating *et al.*, 2006) ดังนี้

(1) ผลได้เอทานอล ($Y_{p,s}$; กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส) คำนวณจากความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตสูงสุด/ปริมาณน้ำตาลที่ถูกนำไปใช้

(2) อัตราการผลิตเอทานอล (Q; กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) คำนวณจากความเข้มข้นของเอทานอลที่ผลิตสูงสุด/เวลาที่ได้อเอทานอลสูงสุด

(3) ประสิทธิภาพการหมัก (%) คำนวณจาก $[\text{ผลได้เอทานอล/ผลได้ของการผลิตเอทานอลทางทฤษฎีจากกลูโคส (0.51 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส)}] \times 100$

3.5.10.8 วิธีการวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งประเภทฟูแรน (เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล) ด้วยเทคนิค HPLC ตามวิธีการของ Martín *et al.* (2017)

3.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การแสดงผลนำมาแสดงเป็นค่าเฉลี่ย และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยแสดงเป็นแถบค่าคลาดเคลื่อน ค่าทั้งสองได้มาจากการคำนวณในโปรแกรม Microsoft Excel 2010 โดยใช้ฟังก์ชัน AVERAGE และ STDEV ตามลำดับ ทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยด้วยโปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16 ด้วยวิธี Unpaired two-tailed T-test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ 0.05 ($p \leq 0.05$)

บทที่ 4

ผลการทดลอง และวิจารณ์

4.1 ปริมาณน้ำตาล และสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสารละลายกากมันสำปะหลัง

การปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสนั้นมีวัตถุประสงค์เพื่อย่อยสลายโครงสร้างผนังเซลล์ในวัสดุ และเกิดการปลดปล่อยน้ำตาลที่ยีสต์สามารถนำไปใช้หมักเอทานอลได้ (Kumar *et al.*, 2009; Yang and Wyman, 2008) ซึ่งการใช้กรดในการปรับสภาพวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลสเป็นที่นิยมในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะกรด H_2SO_4 ซึ่งใช้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากกรดชนิดนี้มีราคาถูก ไม่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม และมีประสิทธิภาพในการย่อย (Bensah and Mensah, 2013; Jönsson and Martín, 2016) อย่างไรก็ตาม ผลกระทบของการใช้กรดอ่อนในการปรับสภาพคือการเกิดสารยับยั้งต่างๆในไฮโดรไลเซส เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอร์วิรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอร์วิรัล ซึ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งในกระบวนการหมัก (Larsson *et al.*, 1999) ในการศึกษาทำการย่อยกากมันสำปะหลัง ด้วยสารละลาย H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยสัดส่วนของกากมันสำปะหลังต่อสารละลายกรดเท่ากับ 1:10 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ทำการตรวจสอบองค์ประกอบน้ำตาล ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด และปริมาณสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ผลการทดลองพบว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังมีค่าเท่ากับ 62.95 กรัมต่อลิตร โดยพบน้ำตาลกลูโคส ไซโลส และอะราบีโนส เป็นองค์ประกอบในสารละลายเท่ากับ 45.47 2.52 และ 1.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และพบสารยับยั้งเพียง 3 ชนิด คือ กรดอะซิติก กรดลิวลินิก และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอร์วิรัล เท่ากับ 14.68 0.43 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Cao *et al.* (2010) ที่ทำการย่อยซังข้าวโพดด้วยสารละลาย H_2SO_4 ความเข้มข้น 2% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 นาที ได้น้ำตาลทั้งหมดความเข้มข้น 14.17 กรัมต่อลิตร โดยพบกรดอะซิติก เฟอร์วิรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอร์วิรัล ปริมาณ 30.81 6.24 และ 1.98 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ในขณะที่ Huang *et al.* (2011) ย่อยซังข้าวโพดด้วยสารละลาย H_2SO_4 ความเข้มข้น 3 % กรัมต่อกรัม น้ำหนักแห้ง ที่อุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที พบปริมาณน้ำตาลทั้งหมด กรดอะซิติก เฟอร์วิรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอร์วิรัล เท่ากับ 57.15 85.26 7.18 และ 5.79 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้ Tian *et al.* (2011) ย่อยไม้เนื้ออ่อน killed lodgepole ด้วยโซเดียมไบซัลไฟต์ และ H_2SO_4 ในเครื่องย่อยที่อุณหภูมิ 180 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 25 นาที ได้น้ำตาล กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอร์วิรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอร์วิรัลที่มีความเข้มข้น 33.36 85.26 77.99 2.67 20.71 และ 19.90 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ในการปรับสภาพวัสดุชีวภาพดั่งที่กล่าว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาข้างต้นมีสภาวะรุนแรงกว่าการปรับสภาพในการศึกษานี้ จึงอาจทำให้เกิดสารยับยั้งปริมาณสูงกว่า Soleymanpour *et al.* (2018) รายงานว่า การใช้กรดที่มีความเข้มข้นสูงส่งผลให้เกิดการย่อยสลายน้ำตาลมากขึ้น และเกิดสารยับยั้งในปริมาณสูงด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งที่เกิดขึ้นยังขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบและความรุนแรงของสภาวะที่ใช้ในการปรับสภาพวัตถุดิบ (Görgens *et al.*, 2014)

หลังจากได้สารละลายกากมันสำปะหลัง ทำการเตรียมอาหารปรับสภาพเชื้อยีสต์โดยทำการจำลองสภาวะให้มีปริมาณ fermentable sugar เริ่มต้นให้เท่ากันในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตร อย่างไรก็ตาม ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่พบในสารละลายกากมันสำปะหลัง (62.95 กรัมต่อลิตร) ประกอบไปด้วย fermentable sugar คือน้ำตาลที่ยีสต์นำไปใช้ประโยชน์ได้ ซึ่งพบเพียงน้ำตาลกลูโคส และ non-fermentable sugar เป็นน้ำตาลที่ยีสต์นำไปใช้ประโยชน์ไม่ได้ ซึ่งพบเฉพาะน้ำตาลไซโลส และอะราบีโนสในไฮโดรไลเซส โดยทั่วไปแล้ว น้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และมอลโทส เป็นน้ำตาล fermentable sugar สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* จึงเป็นไปได้ว่า น้ำตาลดังกล่าวข้างต้นยีสต์สามารถนำไปใช้ในการหมักได้ (Luján-Rhenals and Morawicki, 2016) เมื่อทำการตรวจสอบการใช้น้ำตาลของเชื้อ โดยทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสารละลายกากมันสำปะหลังเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยปริมาณน้ำตาลที่ลดลง คือปริมาณ fermentable sugar ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดที่ยีสต์นำไปใช้ เท่ากับ 46.52 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะเห็นว่าปริมาณมากกว่าน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเล็กน้อย (45.47 กรัมต่อลิตร) ที่พบในสารละลายกากมันสำปะหลัง และปริมาณน้ำตาลกลูโคสหลังจากการหมักพบว่าลดลง 43.92 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4.1 ซึ่งความแตกต่างของทั้งสองค่าอาจมาจากในไฮโดรไลเซสอาจมีน้ำตาลตัวอื่นๆ ที่ไม่ได้วิเคราะห์ซึ่งยีสต์นำไปใช้ได้ หรืออาจมาจากความแม่นยำของวิธีการวิเคราะห์ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ ใช้ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด คือ 46.52 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณ fermentable sugar เนื่องจากครอบคลุมปริมาณน้ำตาลทั้งหมดได้ดีกว่า

การเลือกวิธีการปรับสภาพในการศึกษานี้ เนื่องจากปริมาณน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังค่อนข้างสูง (62.95 กรัมต่อลิตร) ซึ่งให้ผลการศึกษาใกล้เคียงกับ Siroth *et al.* (2000) ซึ่งทำการย่อยกากมันสำปะหลังด้วยกรดซัลฟูริก ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส สามารถผลิตน้ำตาลกลูโคสได้ 79.17 กรัมต่อลิตร ในขณะที่พบชนิดและความเข้มข้นของสารยับยั้งในสารละลาย (กรดอะซิติก 14.68 มิลลิโมลาร์ กรดลิวอลินิก 0.43 มิลลิโมลาร์ และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอพิวริล 0.01 มิลลิโมลาร์) น้อยกว่าในการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้น อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ (สารละลาย H_2SO_4 ความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ สัดส่วนของกากมันสำปะหลังต่อสารละลายกรดเท่ากับ 1:10 ปริมาตร ย่อยที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 30 นาที) มีความรุนแรงน้อยกว่า จึงทำให้การสลายโครงสร้างของกากมันสำปะหลัง ไปเป็นน้ำตาลในปริมาณสูงและเกิดสารยับยั้งในปริมาณน้อย จึงเป็นข้อได้เปรียบของการศึกษานี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ปริมาณ fermentable sugars ที่ลดลงในระหว่างการหมักในสารละลายกากมัน
สำปะหลังโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90

องค์ประกอบ	ความเข้มข้นเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) (กรัม/ลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย (ชั่วโมงที่ 72) (กรัม/ลิตร)	ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (กรัม/ลิตร)
น้ำตาลทั้งหมด ¹	59.56±1.88	13.04±0.05	46.52±0.56
กลูโคส ²	44.64±0.54	0.72±0.00	43.92±0.53
ไซโลส ²	2.18±0.04	1.97±0.07	0.21±0.00
อะราบีโนส ²	1.49±0.01	1.44±0.02	0.05±0.00

หมายเหตุ: ¹ความเข้มข้นน้ำตาลทั้งหมดวิเคราะห์โดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก โดยใช้กลูโคสเป็น
สารละลายมาตรฐาน, ²ความเข้มข้นของน้ำตาลแต่ละชนิดวิเคราะห์โดยเทคนิค HPLC

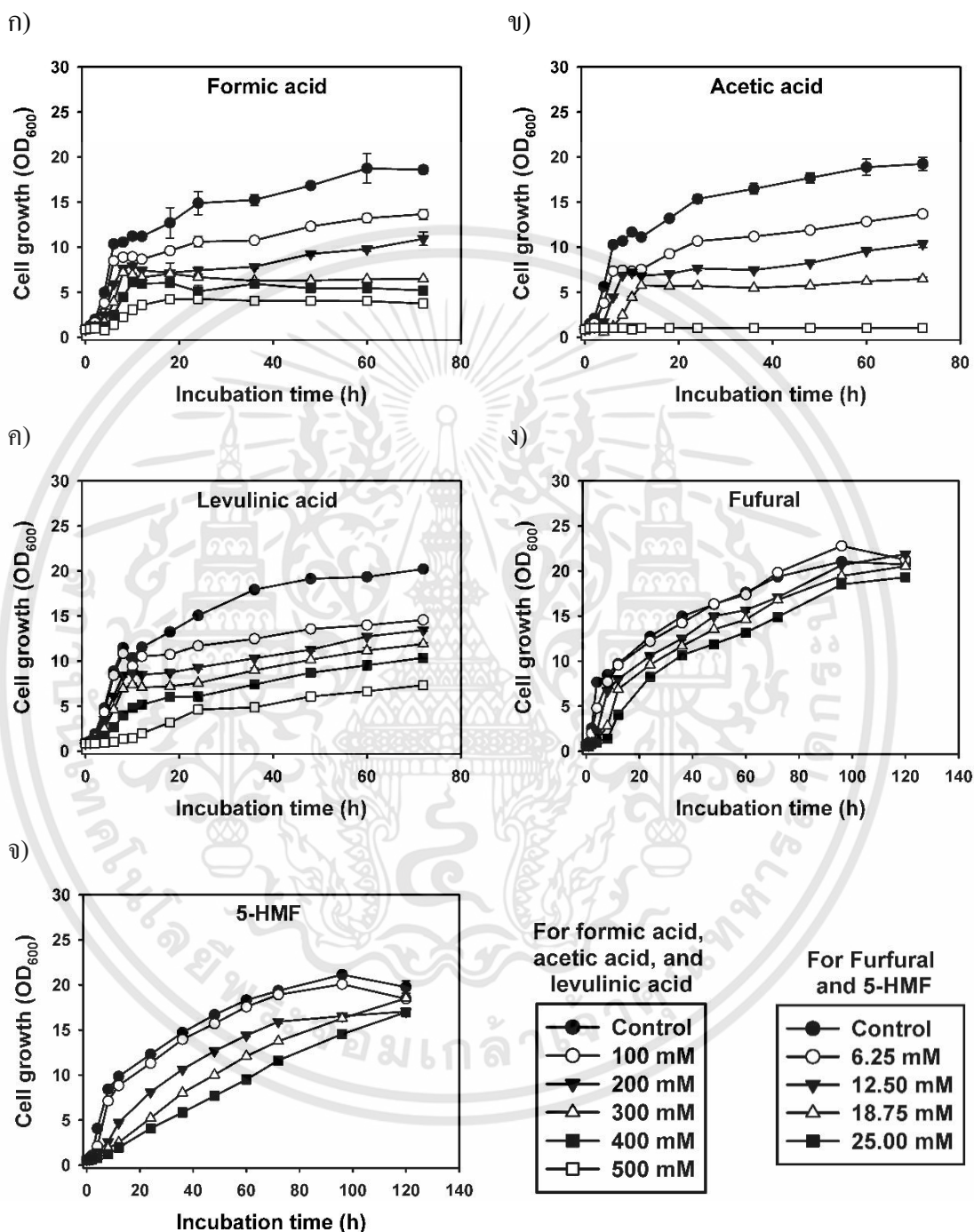
4.2 ผลการศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งแต่ละชนิดต่อการเจริญของเชื้อยีสต์

กรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดลิวลินิก เป็นสารยับยั้งจำพวกกรดอ่อนที่เกิดขึ้นระหว่างการปรับสภาพวัตถุดิบจำพวกลิกโนเซลลูโลส (Mussatto and Roberto, 2004) ซึ่งชนิดและปริมาณสารยับยั้งต่างๆ ที่เกิดขึ้นแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวัตถุดิบและกระบวนการไฮโดรไลซิส (Olsson and Hahn-Hägerdal, 1996) ดังนั้น การศึกษานี้จึงได้ทำการทดสอบความสามารถในการทนต่อพิษของสารยับยั้งของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 โดยทำการศึกษการเจริญของเชื้อยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดลิวลินิก ในระดับความเข้มข้นละ 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ เฟอิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอิวรัล ระดับความเข้มข้นละ 6.25 12.5 18.75 และ 25 มิลลิโมลาร์ เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และติดตามการเจริญของเชื้อยีสต์โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

จากการติดตามการเจริญของเชื้อในรูปแบบการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงดังแสดงในภาพที่ 4.1 พบว่า ค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อมีค่าลดลงตามระดับความเข้มข้นของกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดลิวลินิกที่มากขึ้น ในขณะที่เดียวกันติดตามน้ำหนักเซลล์แห้ง และแสดงผลของสารยับยั้งต่อการเจริญของเชื้อเป็นค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ระยะพัก และการเจริญสัมพัทธ์ของเชื้อดังตารางที่ 4.2 โดยค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ บ่งบอกถึง อัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์ต่อหน่วยเวลา หรือเป็นค่าที่บอกความเร็วของการเพิ่มจำนวนเซลล์ และระยะพักบ่งบอกถึงเวลาในการปรับตัวของเชื้อให้เข้ากับอาหารและสิ่งแวดล้อมใหม่ โดยผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เมื่อค่าความเข้มข้นของสารยับยั้งมากขึ้นส่งผลให้น้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ และการเจริญสัมพัทธ์ลดลง ในขณะที่ระยะปรับตัวของเชื่อนานขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนสารยับยั้งกรดลิวลินิก 100 มิลลิโมลาร์ ซึ่งมีการสัมพัทธ์สูงกว่าสภาวะควบคุมที่ไม่มีการเติมสารยับยั้งเล็กน้อย



ภาพที่ 4.1 การเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 โดยติดตามจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในอาหาร YPD ที่เติมกรดฟอร์มิก (ก) กรดอะซิติก (ข) กรดลิวลินิก (ค) เฟอพิวรัล (ง) และ 5-ไฮดรอกซี เมทซิล เฟอพิวรัล (จ) ในระดับความเข้มข้นต่างๆ และสภาวะควบคุมที่ไม่เติมสารยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อิทธิพลการยับยั้งของกรดฟอร์มิก กรดอะซิติก และกรดลิวลินิกเป็นไปในทางเดียวกัน คือ เมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงขึ้นส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและการผลิตชีวมวลของเชื้อลดลง นอกจากนี้ยังส่งผลให้เชื้อยีสต์อยู่ในช่วงปรับตัวนานก่อนเข้าสู่ระยะแบ่งเซลล์ และจะเห็นว่าอิทธิพลของสารยับยั้งจำพวกกรดอ่อน โดยเฉพาะกรดอะซิติก มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 มากที่สุด เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงๆ (400 และ 500 มิลลิโมลาร์) พบว่า แทบไม่พบการเจริญสัมพัทธ์ของเชื้อ หรือเกิดการยับยั้งการเจริญเกือบสมบูรณ์ นอกจากนี้ยังพบว่า อิทธิพลการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์โดยกรดฟอร์มิกดูเหมือนจะมากกว่ากรดลิวลินิก เนื่องจากการเจริญสัมพัทธ์ของเชื้อยีสต์ในสภาวะที่มีกรดลิวลินิกมีค่ามากกว่าในสภาวะที่มีกรดฟอร์มิก และยังช่วยให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีกรดลิวลินิกความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ มีการรายงานที่ กรดลิวลินิกสามารถกระตุ้นการเจริญของเชื้อยีสต์ได้ โดย Zhang *et al.* (2016) พบว่าที่ความเข้มข้นของกรดลิวลินิก 10 กรัมต่อลิตร (ประมาณ 86 มิลลิโมลาร์) ส่งผลให้รา *Rhizopus oryzae* มีการเจริญเติบโตมากที่สุดเมื่อเทียบกับการใช้กรดฟอร์มิก และกรดอะซิติกที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน Almeida *et al.* (2007) อธิบายว่ากรดลิวลินิกมีความเป็นพิษน้อยกว่ากรดฟอร์มิก แต่มากกว่ากรดอะซิติก อันเนื่องมาจากความเข้มข้นของกรดที่ไม่แตกตัวในอาหารมีความแตกต่างกัน Thomas *et al.* (2002) รายงานว่า ยีสต์สามารถเจริญในอาหารที่มีการปรับค่า pH เริ่มต้นได้ดีกว่าอาหารที่ไม่ได้ปรับค่า pH เริ่มต้น โดยพบว่า การเติมกรดอะซิติก 167 มิลลิโมลาร์ ลงในอาหาร ทำให้ค่า pH ในอาหารลดลงเป็น 2.76 ส่งผลให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้ แต่เมื่อเติมกรดอะซิติกลงในอาหารซึ่งปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 ยีสต์สามารถเจริญได้ดีขึ้น ที่เป็นเช่นนี้เนื่องจาก การเกิดกลุ่มฟิเฟอรัลจากการเติมกรดในอาหารสามารถลดความแตกต่างของค่า pH ระหว่างภายในและภายนอกเซลล์ เซลล์จึงมีความสามารถในการรักษาระดับ pH ได้ดีกว่าอาหารที่ไม่ได้ปรับค่า pH เริ่มต้น ค่า pH ในอาหารจึงลดลงไม่มาก ซึ่งเหตุผลนี้อาจเกี่ยวข้องกับความรุนแรงในการยับยั้งการเจริญของเชื้อยีสต์จากกรดทั้ง 3 ชนิดที่เติมลงในอาหารที่มีการปรับค่า pH เริ่มต้นเป็น 5.5 ที่ใช้ในการศึกษานี้ ทำให้การเติมกรดในความเข้มข้นสูงๆ อาจไม่ส่งผลต่อค่า pH ภายในและภายนอกของเชื้อมากนักจึงทำให้เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีกรดความเข้มข้นสูงๆ ได้ อย่างไรก็ตาม สาเหตุที่ฤทธิ์การยับยั้งของกรดอ่อนแต่ละชนิดต่อการเจริญของยีสต์ในการศึกษานี้แตกต่างออกไปอาจเนื่องมาจากสายพันธุ์ยีสต์และสภาวะที่ใช้เพาะเลี้ยงแตกต่างกัน

จึงสรุปได้ว่า ในการเติมสารยับยั้งประเภทกรดลงในอาหารเหลว YPD ที่มีการควบคุม pH เริ่มต้นเป็น 5.5 โดยกรดอะซิติกมีผลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์มากที่สุด รองลงมาเป็นกรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก ตามลำดับ

ตารางที่ 4.2 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ระยะพัก การเจริญสัมพัทธ์ และน้ำหนักเซลล์แห้งของ เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ระดับความเข้มข้นและสารยับยั้งแตกต่างกัน

สารยับยั้ง	ความเข้มข้น (มิลลิโมลาร์)	อัตราการเจริญเติบโต จำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ระยะพัก ^a (ชั่วโมง)	การเจริญสัมพัทธ์ ^b (%)	น้ำหนักเซลล์ แห้ง (กรัม/ลิตร)
กรดฟอร์มิก	0*	0.41 ± 0.00	0.2	100 ± 0.76	7.69 ± 0.19
	100	0.38 ± 0.01	0.6	92.15 ± 2.49	5.65 ± 0.24
	200	0.31 ± 0.00	1.7	75.33 ± 0.96	4.52 ± 0.31
	300	0.27 ± 0.00	2.5	64.13 ± 0.26	2.68 ± 0.01
	400	0.20 ± 0.00	3.6	48.96 ± 0.28	2.16 ± 0.02
	500	0.12 ± 0.00	4.45	29.54 ± 1.11	1.56 ± 0.03
กรดอะซิติก	0*	0.41 ± 0.00	0.2	100 ± 0.17	7.96 ± 0.30
	100	0.36 ± 0.00	0.8	88.05 ± 0.08	5.66 ± 0.05
	200	0.27 ± 0.00	2.7	66.10 ± 0.63	4.29 ± 0.16
	300	0.16 ± 0.00	5.35	38.97 ± 0.40	2.68 ± 0.09
	400	0.02 ± 0.00	na	4.52 ± 0.41	0.45 ± 0.00
	500	0.02 ± 0.00	na	4.57 ± 0.31	0.44 ± 0.00
กรดลิวิลินิก	0*	0.40 ± 0.00	0.33	100 ± 1.12	8.36 ± 0.06
	100	0.40 ± 0.00	1.0	101.34 ± 1.01	6.02 ± 0.09
	200	0.35 ± 0.00	1.05	86.74 ± 0.56	5.56 ± 0.05
	300	0.30 ± 0.01	1.9	75.36 ± 1.62	4.92 ± 0.05
	400	0.20 ± 0.00	2.2	50.94 ± 0.56	4.28 ± 0.12
	500	0.08 ± 0.00	3.9	20.16 ± 0.26	3.03 ± 0.04
เฟอไฟรัด	0*	0.41 ± 0.01	0.31	100 ± 0.96	7.78 ± 0.02
	6.25	0.33 ± 0.00	1.25	80.99 ± 0.38	7.70 ± 0.13
	12.5	0.20 ± 0.00	2.9	48.53 ± 0.28	6.94 ± 0.10
	18.75	0.13 ± 0.00	5.8	32.73 ± 0.02	6.52 ± 0.06
	25	0.08 ± 0.00	7	18.36 ± 0.02	6.12 ± 0.02
5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอไฟรัด	0*	0.41 ± 0.00	0.34	100 ± 0.30	7.94 ± 0.28
	6.25	0.37 ± 0.00	1.22	92.13 ± 0.40	7.60 ± 0.04
	12.5	0.23 ± 0.00	1.50	56.05 ± 0.31	6.86 ± 0.05
	18.75	0.17 ± 0.00	2.08	41.68 ± 0.53	6.85 ± 0.05
	25	0.11 ± 0.00	4.45	27.00 ± 0.28	6.83 ± 0.08

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : ^a ได้จากการลากเส้นการเจริญของเชื้อในระยะเพิ่มจำนวนมาสัมผัสกับเส้นปริมาณเชื้อเริ่มต้น

^b คำนวณจาก [อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อในแต่ละการทดลอง/อัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อในสภาวะควบคุม]*100

* สภาวะควบคุม: ไม่เติมสารยับยั้ง

na: ไม่สามารถหาระยะพักของเชื้อได้

สำหรับกลไกการยับยั้งของกรดอ่อนอธิบายไว้ว่า กรดที่ไม่แตกตัวเป็นประจุสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ และเกิดการแตกตัวส่งผลให้ค่า pH ภายในเซลล์ลดลง จึงทำให้เซลล์ต้องใช้พลังงาน (ATP) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อขับโปรตอนออกภายนอกเซลล์ (Russel, 1992; Verduyn *et al.*, 1992; Pampulha and Loureiro-Dias, 1989) พลังงานจึงไม่เพียงพอต่อการสร้างชีวมวลของเชื้อ จึงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญ และมีการอธิบายว่า การที่เชื้อต้องขับโปรตอนที่มีปริมาณมากเกินไปออกนอกเซลล์เพื่อให้ค่า pH ภายในเซลล์เหมาะสมต่อการเจริญ ตลอดจนส่งผลให้เชื้ออยู่ในระยะพักก่อนเข้าสู่ระยะแบ่งตัวมากขึ้น (Lambert and Stratford, 1999) นอกจากนี้ ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดสูงๆ พลังงานที่ใช้ในการขับโปรตอนออกนอกเซลล์อาจไม่เพียงพอจนทำให้เกิดสภาวะความเป็นกรดภายในเซลล์ และส่งผลให้การแบ่งเซลล์น้อยลง (Russel, 1992; Imai and Ohono, 1995) เช่นเดียวกับผลการเจริญที่ได้จากการศึกษานี้คือ เมื่อความเข้มข้นของกรดอ่อนเพิ่มขึ้น ค่าการดูดกลืนแสง และน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อมีค่าลดลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีการแบ่งตัวน้อยลงเนื่องจากความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้นนั่นเอง

นอกเหนือจากสารยับยั้งประเภทกรดอ่อนแล้ว สารอนุพันธ์ฟูแรนก็สามารถเกิดขึ้นในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบได้เช่นกัน สารอนุพันธ์ฟูแรน เช่น เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอพิวรัล โดยเฟอพิวรัลเกิดจากการสลายน้ำตาลเพนโตส ส่วน 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอพิวรัลเกิดจากการสลายของน้ำตาลเฮกโซส (Wright and Power 1987; Clausen and Gaddy, 1988) จัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาอิทธิพลของสารทั้งสองต่อการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีการเติมสารยับยั้งโดยทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหาร YPD ที่เติมเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล ระดับความเข้มข้นละ 6.25, 12.5, 18.75 และ 25 มิลลิโมลาร์ เเพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า การเจริญของเชื้อยีสต์ในสารยับยั้งประเภทฟูแรนทั้ง 2 ชนิดมีแนวโน้มเหมือนกับลักษณะการเจริญของเชื้อในสภาวะที่มีสารยับยั้งประเภทกรดอ่อน โดยค่าการดูดกลืนแสง น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าลดลง ในขณะที่ระยะพักของเชื้อมีค่ามากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งที่มากขึ้น จึงส่งผลต่อการลดลงของอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและการเจริญสัมพันธ์เช่นกัน ยิ่งกว่านั้นในสภาวะที่เติม 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอพิวรัล เชื้อมีการเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงกว่า และช่วงระยะพักสั้นกว่าในอาหารที่เติมเฟอพิวรัลในระดับความเข้มข้นที่เท่ากัน ดังแสดงในภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.2 สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Taherzadeh *et al.* (2000b) และ Liu *et al.* (2004) ซึ่งรายงานว่า ความเป็นพิษของเฟอพิวรัลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์มีความรุนแรงมากกว่า 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล และยังทำให้เชื้ออยู่ในระยะพักนาน เข้าสู่ระยะแบ่งตัวช้ากว่าในสภาวะที่มีสารยับยั้ง 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัลที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน โดยปกติแล้วกลไกการยับยั้งของสารทั้ง 2 ชนิดนี้จะไปยับยั้งกิจกรรมเอนไซม์ในวัฏจักรเครป (krebs cycle) ตลอดจนเมตาบอลิซึมในการสร้างเอทานอล (alcohol metabolism) เช่น เอนไซม์ Alcohol dehydrogenase เอนไซม์ Aldehyde dehydrogenase และเอนไซม์ Pyruvate dehydrogenase รวมถึงเอนไซม์และโคแฟกเตอร์ในวิถีไกลโคลิซิส (Banerjee *et al.*, 1981; Modig *et al.*, 2002) โดยเมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งประเภทฟูแรนสูงขึ้น ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญ โดยไปลดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ผลได้ของชีวมวล รวมทั้งยี่ระยะพักของเชื้อ (Boyer *et al.*, 1992; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Ask *et al.*, 2013)

จากผลการศึกษาทำให้ทราบว่า ความเป็นพิษของสารยับยั้งประเภทฟูแรนต่อการเจริญของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 มากกว่าสารยับยั้งจากกรดอ่อน เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งประเภทฟูแรนเพียง 6.25 - 25 มิลลิโมลาร์ ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ลดลงอย่างรวดเร็วเมื่อเทียบการเจริญในสารยับยั้งประเภทกรดอ่อนซึ่งเดิมในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่ามาก (100 - 500 มิลลิโมลาร์) โดยในสภาวะที่เติมความเข้มข้นของเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัลสูงสุด (25 มิลลิโมลาร์) ทำให้การเจริญสัมพัทธ์มีค่าเท่ากับ 18.36 และ 27.00 % ตามลำดับ ในขณะที่การเติมกรดอ่อนความเข้มข้นต่ำสุด (100 มิลลิโมลาร์) ยังให้ค่าการเจริญสัมพัทธ์ของเชื้อสูงกว่าในสภาวะที่มีสารยับยั้งฟูแรนอย่างเห็นได้ชัด เช่นเดียวกับการศึกษาของ Zhang *et al.* (2016) ที่รายงานว่า สารยับยั้งประเภทฟูแรนที่เกิดจากการสลายน้ำตาลมีความเป็นพิษต่อเชื้อมากกว่าสารยับยั้งจากกรดอ่อน อย่างไรก็ตามระดับความเป็นพิษขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารยับยั้งและสายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ (Almeida *et al.*, 2007)

4.3 ผลการศึกษาการปรับสภาพเชื้อยีสต์ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการย่อยกากมันสำปะหลัง

เนื่องจากเกิดสารประกอบต่างๆที่เกิดขึ้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยลดประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการหมักเอทานอล การปรับสภาพเชื้อให้ทนต่อสารยับยั้งเหล่านั้นจึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มศักยภาพในการผลิตเอทานอลของเชื้อจากวัสดุเหลือใช้ (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Silva and Roberto, 2001) ในการศึกษาครั้งนี้จึงทำการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ให้ทนต่อสารยับยั้งที่อาจเกิดขึ้นในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดเจือจางที่อุณหภูมิสูง โดยเริ่มเลี้ยงเชื้อจากสภาวะที่มีความเอกลสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของสารยับยั้งต่ำก่อน แล้วค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งให้สูงขึ้น นั่นคือเริ่มการปรับสภาพเชื้อยีสต์ในสภาวะควบคุมหลังจากนั้นจึงถ่ายเชื้อลงในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ แต่ละรอบทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที ดำเนินการหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรเคมีซ้ำจนกระทั่งค่าการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อไม่ต่ำกว่า 80% ของค่าการเจริญเติบโตจำเพาะของสภาวะควบคุม เปรียบเทียบผลการรอดชีวิตของยีสต์ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณกลูโคส เอทานอล และปริมาณสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด

4.3.1 การเจริญ และการรอดชีวิต

ผลการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตรคือ สารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 20%, 40%, 60%, 80%, และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ใช้เวลาในการเลี้ยงเชื้อยีสต์เพื่อปรับสภาพอย่างละ 2, 2, 3, 5 และ 7 รอบ ตามลำดับ โดยใช้เวลารวมทั้งหมด 19 รอบ ดังตารางที่ 4.3 ปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุดในอาหารสภาวะควบคุม (ไม่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง) คือ 1.99×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 20% และ 40% (ปริมาตร/ปริมาตร) มีปริมาณมากกว่าเล็กน้อย คือ 2.6×10^8 และ 2.4×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ Greetham (2014) รายงานว่า กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่ำประมาณ 10-25 มิลลิโมลาร์ มีผลกระทบเล็กน้อยหรือไม่มีผลกระทบต่อ การเจริญของยีสต์ นอกจากนี้ยังพบว่า ที่ความเข้มข้นกรดอะซิติก 25 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มการเจริญให้แก่เซลล์ได้เมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะที่ไม่มีกรดอะซิติก ส่วนระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุด (t_{max}) ของรอบแรกในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) คือ 12 ชั่วโมง ซึ่งเท่ากับสภาวะควบคุม และเมื่อปรับสภาพเชื้อในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 40% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในรอบแรก พบว่าระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดคือ 24 ชั่วโมง และการปรับสภาพเชื้อในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้นมากกว่า 40% (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่งผลให้มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุดมีค่าน้อยลงและใช้เวลาในการทำให้ได้ปริมาณเซลล์สูงสุดมากขึ้น อย่างไรก็ตาม ปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุดของรอบสุดท้ายในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 60%, 80%, และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) มีค่ามากกว่าปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุดของรอบแรกประมาณ 11, 13 และ 34% ตามลำดับ

ในไฮโดรไลเซสที่ระดับความเข้มข้นต่ำหรือมีสารยับยั้งน้อยเป็นสภาวะที่เซลล์ยีสต์ยังไม่ได้รับการปรับสภาพ เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรไลเซสสูงขึ้นหรือมีสารยับยั้งมากขึ้นทำให้การปรับสภาพเชื้อรอบแรกในอาหารแต่ละสูตรมีปริมาณเซลล์น้อยลง แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อหลายรอบในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 80% และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงขึ้น ระยะพักของเชื้อ และระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดมีค่า

น้อยลง แสดงให้เห็นว่าเซลล์สามารถทนต่อสารยับยั้งได้ (ตารางที่ 4.3) ซึ่งการลดลงของระยะพักเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อซ้ำในอาหารซึ่งมีสารยับยั้งหลายๆรอบ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Wallace-Salinas and Gorwa-Grauslund (2013) และ Koppram *et al.* (2012)

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อที่สภาวะควบคุมและในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายไขมันต่ำปะหลัง 20% และ 40% (ปริมาตร/ปริมาตร) อยู่ในช่วง 0.27-0.30 ชั่วโมง⁻¹ หลังจากนั้น เซลล์ถูกนำไปเลี้ยงต่อในรอบแรกของสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายไขมันต่ำปะหลัง 60% 80% และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ส่งผลให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของรอบแรกลดลงเป็น 0.24 0.21 และ 0.20 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อที่ลดลงเมื่อถ่ายเชื้อไปยังอาหารที่มีความเข้มข้นของไฮโดรไลเซตสูงขึ้น สอดคล้องกับผลการทดลองของ Wallace-Salinas and Gorwa-Grauslund (2013) งานวิจัยของ Koppram *et al.* (2012) อธิบายไว้ว่า ช่วงระยะพักที่นานขึ้นก่อนที่เชื้อจะฟื้นตัวและมีการแบ่งตัวได้นั้นบ่งบอกว่าเซลล์เกิดการปรับเปลี่ยนสรีรวิทยาภายใต้สภาวะเครียดจากสารยับยั้งในอาหาร โดยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเซลล์ที่ค่อยๆเพิ่มขึ้นนี้เกิดจากการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ปรับสภาพซึ่งมีปริมาณมากกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ปรับสภาพ นอกจากนี้ผลการทดลองยังแสดงให้เห็นว่า ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงขึ้นจำเป็นต้องมีการเลี้ยงเชื้อซ้ำในอาหารนั้นๆ จนกระทั่งเชื้อสามารถเจริญและทำให้ได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่ต่ำกว่า 80% ของสภาวะควบคุม (0.28 ชั่วโมง⁻¹) ซึ่งเท่ากับ 0.22 ชั่วโมง⁻¹ โดยยีสต์จากสภาวะควบคุมที่ถูกนำไปเลี้ยงต่อในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายไขมันต่ำปะหลัง 20%, 40% และ 60% (ปริมาตร/ปริมาตร) ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้ออยู่ในช่วงที่ยอมรับได้ (ไม่ต่ำกว่า 0.22 ชั่วโมง⁻¹) แต่เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายไขมันต่ำปะหลังสูงขึ้นเป็น 80% และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะน้อยกว่าสภาวะที่เลี้ยงในอาหารปรับสภาพช่วงแรกซึ่งมีความเข้มข้นของสารละลายไขมันต่ำปะหลังต่ำกว่า ดังนั้นเพื่อที่จะได้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะสูงขึ้น (มากกว่า 0.22 ชั่วโมง⁻¹) จึงต้องเพิ่มจำนวนรอบในการเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรเดิมซ้ำ 5 และ 7 รอบตามลำดับ ซึ่งอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่ลดลงนี้อาจเกิดจากความเข้มข้นของสารยับยั้งที่มากขึ้นในอาหารปรับสภาพที่มีความเข้มข้นของสารละลายไขมันต่ำปะหลังมากขึ้นนั่นเอง

สารยับยั้งกรดอะซิติก กรดลิวิลินิก และ 5-ไดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล เป็นที่รู้จักกันว่าเป็นสารประกอบที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยในสารละลายไขมันต่ำปะหลังในการศึกษานี้พบกรดอะซิติก กรดลิวิลินิก และ 5-ไดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลที่ความเข้มข้น 14.68 0.43 และ 0.10 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ภาพที่ 4.2) ความรุนแรงของสารยับยั้งขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆ เช่น สายพันธุ์ยีสต์ที่ใช้ ความสามารถในการปรับตัวของยีสต์ต่อสารยับยั้ง กระบวนการหมักประเภทของสารยับยั้ง ตลอดจนการเสริมฤทธิ์กันของสารยับยั้งร่วม (Mussatto and Roberto, 2004) อนุพันธ์ฟูแรน เช่น เฟอพิวรัล และ 5-ไดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล เป็นสารยับยั้งที่เกิดจากการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สลายตัวของน้ำตาลเพนโตสและเฮกโซส ตามลำดับ โดยสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในวิถีไกลโคไลซิสซึ่งส่งผลให้อัตราการเจริญของเชื้อ ผลผลิตชีวมวล ประสิทธิภาพการผลิต และผลได้เอทานอลมีค่าลดลง และทำให้ระยะพักของเชื่อนานขึ้น (Almeida *et al.*, 2007; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000) สารยับยั้งประเภทกรดอ่อนที่เกิดขึ้นระหว่างการย่อยวัตถุดิบส่วนใหญ่คือ กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก ซึ่งส่งผลต่อการการผลิตชีวมวลและผลได้เอทานอลของเชื้อได้น้อยลง (Larsson *et al.*, 1999; Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000) Bauar *et al.* (2003) รายงานว่า กรดอ่อนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยลดการดูดซึมกรดอะมิโนในอาหาร ซึ่งระดับความเป็นพิษของกรดนั้นขึ้นอยู่กับสถานะที่ใช้ในการหมัก (Mussatto and Roberto, 2004)

ระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดเป็นพารามิเตอร์ที่สามารถบ่งบอกได้ว่าเซลล์เกิดการปรับตัว ในอาหารสถานะควบคุมและอาหารปรับสภาพที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) เชื้อใช้เวลาในการทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดเท่ากัน คือ 12 ชั่วโมง แต่เมื่อการปรับสภาพเชื้ออยู่ในอาหารที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 40%-100% (ปริมาตร/ปริมาตร) เวลาในการทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุดใช้เวลานานขึ้น อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงเชื้อในอาหารเดิมหลายครั้ง ช่วยลดระยะเวลาที่ทำให้ปริมาณเซลล์มีค่าสูงสุด สิ่งนี้อาจบ่งบอกได้ว่าการปรับตัวของเซลล์ในระหว่างการเลี้ยงเชื้อหลายรอบ ช่วยให้เซลล์ทนต่อความเป็นพิษของสารยับยั้งได้ (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 การเจริญ และการรอดชีวิตของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ในระหว่างกระบวนการปรับสภาพ

การทดลอง	เซลล์ทั้งหมดสูงสุด (เซลล์/มิลลิลิตร)	การรอดชีวิต (%)	อัตราการเจริญ เติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ระยะเวลาที่ทำให้ ปริมาณเซลล์มี ค่าสูงสุด (ชั่วโมง)	ระยะพัก (ชั่วโมง)
สถานะควบคุม	$1.99 \pm 0.04 \times 10^8$	92.04 ± 2.46	0.28 ± 0.00	12	0.9
สารละลายกากมัน 20% (ปริมาตร/ปริมาตร)					
รอบที่ 1 ^a	$2.55 \pm 0.16 \times 10^8$	91.18 ± 2.40	0.27 ± 0.01	12	1.5
รอบที่ 2 ^b	$2.58 \pm 0.17 \times 10^8$	89.41 ± 0.48	0.30 ± 0.01	12	1.0
สารละลายกากมัน 40% (ปริมาตร/ปริมาตร)					
รอบที่ 3 ^a	$2.42 \pm 0.06 \times 10^8$	98.60 ± 0.23	0.28 ± 0.01	24	1.9
รอบที่ 4 ^b	$2.44 \pm 0.01 \times 10^8$	98.94 ± 0.23	0.30 ± 0.01	12	1.5
สารละลายกากมัน 60% (ปริมาตร/ปริมาตร)					
รอบที่ 5 ^a	$1.95 \pm 0.10 \times 10^8$	99.00 ± 0.05	0.24 ± 0.02	36	2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไมอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

อาหารปรับสภาพ	เซลล์ทั้งหมดสูงสุด (เซลล์/มิลลิลิตร)	การรอดชีวิต (%)	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	ระยะเวลาที่ทำ ให้ปริมาณเซลล์ มีค่าสูงสุด (ชั่วโมง)	ระยะพัก (ชั่วโมง)
รอบที่ 6	$2.03 \pm 0.13 \times 10^8$	98.99 ± 0.50	0.25 ± 0.01	24	1.9
รอบที่ 7 ^b	$2.16 \pm 0.06 \times 10^8$	98.58 ± 0.46	0.26 ± 0.01	12	1.5
สารละลายกากมัน 80% (ปริมาตร/ปริมาตร)					
รอบที่ 8 ^a	$1.74 \pm 0.06 \times 10^8$	98.16 ± 1.13	0.21 ± 0.01	48	2.0
รอบที่ 9	$1.74 \pm 0.07 \times 10^8$	99.01 ± 0.76	0.21 ± 0.01	36	1.9
รอบที่ 10	$1.74 \pm 0.15 \times 10^8$	99.63 ± 0.64	0.22 ± 0.01	36	1.6
รอบที่ 11	$1.88 \pm 0.13 \times 10^8$	98.83 ± 2.03	0.23 ± 0.01	24	1.6
รอบที่ 12 ^b	$1.96 \pm 0.12 \times 10^8$	99.06 ± 0.34	0.23 ± 0.01	12	1.6
สารละลายกากมัน 100% (ปริมาตร/ปริมาตร)					
รอบที่ 13 ^a	$1.52 \pm 0.10 \times 10^8$	98.31 ± 1.10	0.20 ± 0.01	48	1.9
รอบที่ 14	$1.48 \pm 0.14 \times 10^8$	99.24 ± 0.37	0.20 ± 0.01	48	1.7
รอบที่ 15	$1.68 \pm 0.11 \times 10^8$	99.26 ± 0.38	0.21 ± 0.02	36	1.5
รอบที่ 16	$1.55 \pm 0.02 \times 10^8$	99.40 ± 0.63	0.19 ± 0.01	24	1.5
รอบที่ 17	$1.67 \pm 0.16 \times 10^8$	98.88 ± 1.12	0.21 ± 0.01	12	1.3
รอบที่ 18	$1.97 \pm 0.06 \times 10^8$	99.11 ± 0.93	0.23 ± 0.01	12	1.3
รอบที่ 19 ^b	$2.04 \pm 0.07 \times 10^8$	99.69 ± 0.53	0.24 ± 0.00	12	1.3

หมายเหตุ: ^{a,b} คือ การปรับสภาพเชื้อรอบแรกและรอบสุดท้ายในสารละลายกากมันสำปะหลังแต่ละสูตร ตามลำดับ

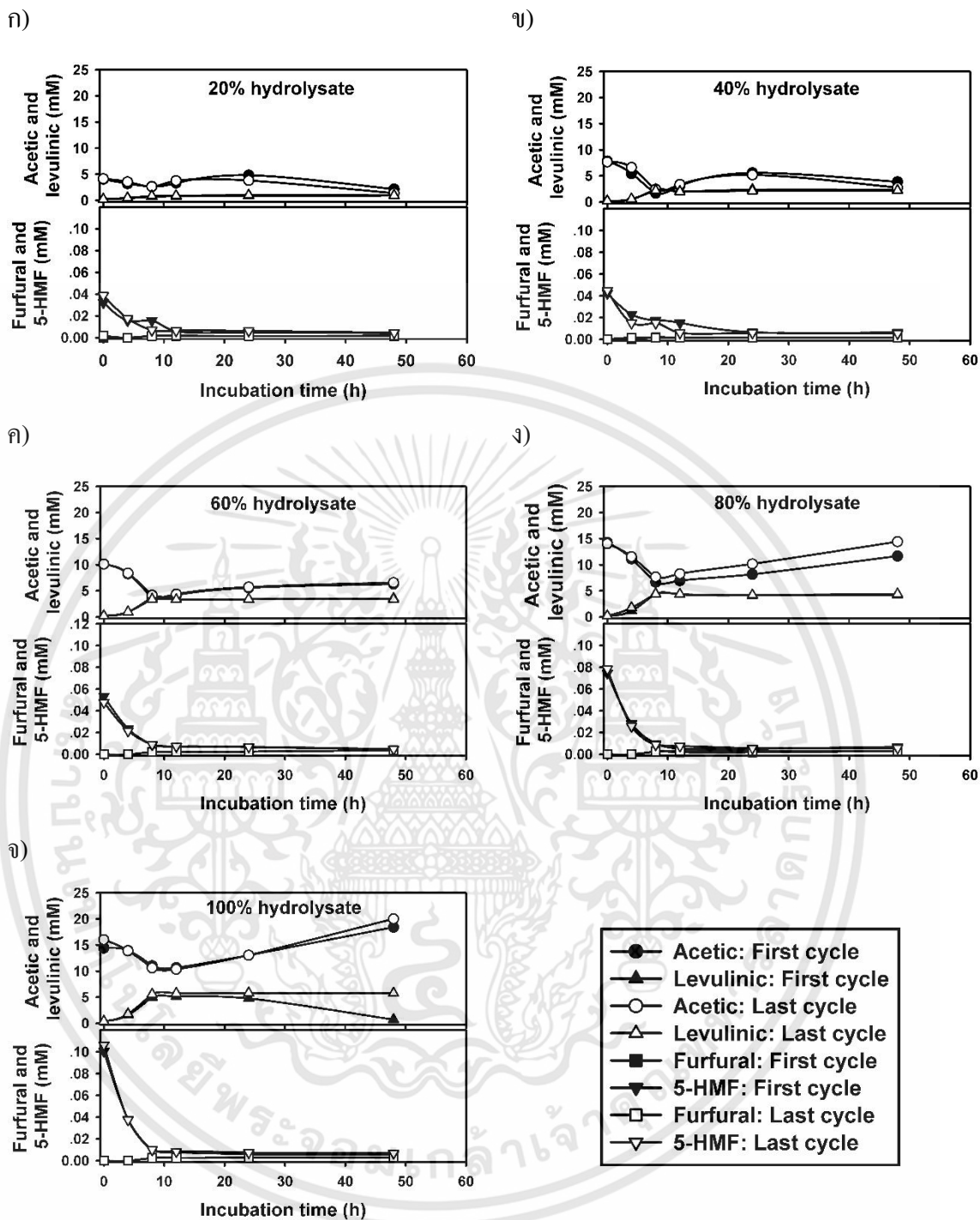
4.3.2 สารยับยั้ง และการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้ง

จากที่รายงานไปข้างต้น สารยับยั้งที่สำคัญที่พบในสารละลายกากมันสำปะหลังในการศึกษานี้ คือ กรดอะซิติก กรดลิวิลินิก และ 5-ไฮดรอกซี เมทิลเฟอพิวรีล ในการดำเนินการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่มีการใช้อาหารปรับสภาพหลายความเข้มข้น พบว่า ในอาหารที่มีไฮโดรไลเซสความเข้มข้นสูงๆ จะพบปริมาณสารยับยั้งที่มากขึ้น ดังภาพที่ 4.2 ในช่วงแรกของการหมัก พบกรดอะซิติก และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีลในปริมาณสูง และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามปริมาณสารละลายกากมันสำปะหลังที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารปรับสภาพ โดยที่ความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% (ปริมาตร/เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาตร) มีกรดอะซิติกเริ่มต้นเท่ากับ 4.08 ± 0.04 , 7.75 ± 0.08 , 10.13 ± 0.01 , 14.16 ± 0.12 และ 15.96 ± 0.09 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลเริ่มต้นเท่ากับ 0.035 ± 0.004 , 0.043 ± 0.002 , 0.051 ± 0.003 , 0.076 ± 0.002 และ 0.103 ± 0.003 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ นอกจากนี้มีรายงานว่าการอะซิติกมักพบในปริมาณสูงกว่าสารยับยั้งที่เป็นกรดฟอร์มิก และกรดลิวูลินิก เช่นเดียวผลการทดลองของ Tomás-Pejó *et al.* (2010) และ Tian *et al.* (2011) และยังพบว่าเป็นสารยับยั้งที่พบมากที่สุดคนในไฮโดรไลซิส Nilvebrant *et al.* (2003) รายงานว่า โดยทั่วไปแล้ว เฟอพิวรัลมักพบในปริมาณที่น้อยกว่า 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล ซึ่งในการศึกษานี้ไม่พบสารยับยั้งเฟอพิวรัล

จากการปรับสภาพวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสภายใต้สภาวะที่เป็นกรดร่วมกับการให้ความร้อน มักพบ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล ซึ่งเกิดจากการย่อยสลายจากน้ำตาลเฮกโซส และยังสามารถสลายตัวไปเป็นกรดฟอร์มิก และกรดลิวูลินิก ซึ่งจากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่ากรดลิวูลินิกที่เกิดขึ้นในสารละลายกากมันสำปะหลังนั้นมีความเข้มข้นต่ำในขณะที่ไม่พบกรดฟอร์มิก อันเนื่องมาจากการสลายตัวของสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลที่เกิดขึ้นได้น้อย (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Thomas *et al.*, 2002) ส่วนกรดอะซิติกเกิดจากการย่อยสลายของหมู่อะซิติกที่มีอยู่ในโครงสร้างของเฮมิเซลลูโลส (Almeida *et al.*, 2007) นอกจากนี้กรดอะซิติกยังเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces* sp. อีกด้วย (Narendranath *et al.*, 2001)

จากวิธีการปรับสภาพกากมันสำปะหลังในการศึกษานี้โดยการย่อยด้วยกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.6 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส 30 นาที พบปริมาณ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลน้อยมาก (ประมาณ 0.1 มิลลิโมลาร์) ซึ่งคล้ายกับผลการศึกษาของ Lacerda *et al.* (2013) ที่ศึกษาการย่อยเส้นใยป่าน (sisal pulp) โดยใช้สารละลายกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 5% โดยปริมาตร (ประมาณ 0.5 โมลาร์) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่าการย่อยที่เวลาต่ำกว่า 120 นาที พบปริมาณเฟอพิวรัล (น้อยกว่า 0.26 มิลลิโมลาร์) และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล (น้อยกว่า 0.04 มิลลิโมลาร์) ในไฮโดรไลซิสปริมาณต่ำ และสามารถพบกรดฟอร์มิกเมื่อใช้กรดซัลฟูริกความเข้มข้นตั้งแต่ 15-25% โดยปริมาตร (ประมาณ 1.5-2.5 โมลาร์) ดังนั้นชนิดและปริมาณสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสารละลายลิกโนเซลลูโลสมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบและกระบวนการเตรียมวัตถุดิบที่เลือกใช้



ภาพที่ 4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอะซิติก กรดลิวลินิก เฟอฟูรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอฟูรัล ในระหว่างการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่เลี้ยงในอาหารที่ผสมสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 20% (ก) 40% (ข) 60% (ค) 80% (ง) และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) (จ) ในรอบแรก และรอบสุดท้าย

สำหรับแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของสารยับยั้งในระหว่างการปรับสภาพเชื้อยีสต์รอบแรกและรอบสุดท้ายในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตรนั้น มีรูปการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารยับยั้งที่เหมือนกัน (ภาพที่ 4.2) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ปริมาณกรดอะซิติกมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องใน 8 ชั่วโมงแรก และมีปริมาณเพิ่มขึ้นอีกครั้งหลังจากการเพาะเลี้ยงผ่านไป 12 ชั่วโมง ซึ่งกรดอะซิติกสามารถถูกซึมเพื่อนำไปสร้างอะซิติลโคเอ (Acetyl CoA) และนำไปใช้ในวัฏจักรเครปต่อไป อย่างไรก็ตาม กรดอะซิติกก็เป็นผลพลอยได้จากการหมักโดยใช้ยีสต์เช่นกัน (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Thomas *et al.*, 2002) สำหรับกรดลิวูลินิกมีปริมาณมากขึ้นอย่างรวดเร็วใน 8 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นจึงมีปริมาณคงที่ตลอดการหมัก มีการวิจัยที่สอดคล้องกันกับผลการทดลองนี้ โดย Thompson *et al.* (2016) พบว่า กรดลิวูลินิกมีค่าสูงขึ้นในระหว่างการหมัก

เช่นเดียวกับ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอิวรัล ที่มีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วใน 8 ชั่วโมงแรก การศึกษาของ Palmqvist and Hahn-Hägerdal (2000) แสดงให้เห็นว่ายีสต์ *S. cerevisiae* สามารถเปลี่ยน 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอิวรัล ด้วยเอนไซม์ไปเป็นสารประกอบที่เป็นพิษน้อยลง โดย 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอิวรัลถูกรีดิวซ์ไปเป็น 2,5-bis-hydroxymethylfuran (HMF-alcohol) ภายใต้สภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (Liu *et al.*, 2004) และ Koppram *et al.* (2012) ยังค้นพบว่า ในระหว่างการปรับสภาพ เซลล์มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสารยับยั้งประเภทฟูแรนได้ ทั้งนี้ข้อมูลของสารยับยั้งกรดฟอร์มิกไม่ได้นำมาแสดงเนื่องจากความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นขั้นสุดท้ายต่ำมากจนไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ได้ ดังนั้น ในการค่อยๆปรับสภาพเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ซึ่งเกิดการนำสารยับยั้งไปใช้ ถือได้ว่าเป็นการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ โดยส่งผลให้เซลล์ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างการปรับสภาพกากมันสำปะหลังได้ดีขึ้น

4.3.3 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลในระหว่างการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารแต่ละสูตร โดยคำนวณค่าพารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลจากชั่วโมงที่ 8 ซึ่งให้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุด โดยพบว่า การปรับสภาพเชื้อยีสต์ในอาหารแต่ละสูตรมีผลต่อการปรับปรุงการใช้น้ำตาลกลูโคสในสารละลายได้ดีขึ้น แต่พบการลดลงของอัตราการผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมักในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 80% และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ดังตารางที่ 4.4 เนื่องมาจากความเป็นพิษจากความเข้มข้นของสารยับยั้งที่พบในอาหารปรับสภาพมากขึ้นนั่นเอง (ภาพที่ 4.2) จากการปรับสภาพปรับสภาพเชื้อยีสต์ในขั้นแรกๆที่เริ่มเลี้ยงในสภาวะควบคุม (ไม่เติมสารละลายกากมันสำปะหลัง) พบว่า เชื้อมีประสิทธิภาพการหมักสูงถึง 96.15% และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีส่วนผสมของสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) รอบแรก พบว่ามีประสิทธิภาพการหมักลดลงเล็กน้อยเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม โดยในสภาวะที่มีสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในการศึกษาพบสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างการปรับสภาพ โดยพบกรดอะซิติกปริมาณเริ่มต้นต่ำมากประมาณ 4 มิลลิโมลาร์ ดังที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานไว้ข้างต้น มีรายงานก่อนหน้าที่ศึกษาเกี่ยวกับการใช้กรดอะซิติกความเข้มข้นต่ำในการปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอล การศึกษาของ Thomas *et al.* (2002) พบว่า ในสภาวะการหมักที่มีกรดอะซิติก ทำให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าในสภาวะที่ไม่มีกรดอะซิติก และ Greetham (2014) ค้นพบว่า ความเข้มข้นกรดอะซิติกที่ต่ำกว่า 25 มิลลิโมลาร์ ไม่ส่งผลต่อ metabolic output ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ Larsson *et al.* (1999) รายงานเพิ่มเติมว่า กรดอะซิติกที่ความเข้มข้นต่ำช่วยเพิ่มผลได้ของเอทานอลซึ่งอาจเกิดจากการกระตุ้นการผลิต ATP

ตารางที่ 4.4 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลจากการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารปรับสภาพแต่ละสูตร

การทดลอง	อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร·ชั่วโมง)	ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)	ผลผลิตชีวมวล (เซลล์/กรัม)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร·ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการหมัก (%)
สภาวะควบคุม	6.08	0.49	4.09×10^6	3.20	96.15
สารละลายกากมัน 20% (ปริมาตร/ปริมาตร)					
รอบที่ 1 ^a	5.61	0.48	5.49×10^6	3.14	94.83
รอบที่ 2 ^b	6.02	0.49	5.55×10^6	3.19	96.12
สารละลายกากมัน 40% (ปริมาตร/ปริมาตร)					
รอบที่ 3 ^a	6.52	0.46	4.60×10^6	2.96	89.37
รอบที่ 4 ^b	6.57	0.47	4.64×10^6	3.09	93.10
สารละลายกากมัน 60% (ปริมาตร/ปริมาตร)					
รอบที่ 5 ^a	6.80	0.44	3.41×10^6	2.86	86.35
รอบที่ 7 ^b	7.49	0.41	3.78×10^6	2.91	80.09
สารละลายกากมัน 80% (ปริมาตร/ปริมาตร)					
รอบที่ 8 ^a	6.77	0.43	3.03×10^6	2.80	84.50
รอบที่ 12 ^b	7.58	0.40	3.41×10^6	2.62	78.96
สารละลายกากมัน 100% (ปริมาตร/ปริมาตร)					
รอบที่ 13 ^a	7.96	0.36	2.44×10^6	2.32	69.91
รอบที่ 19 ^b	7.62	0.32	3.27×10^6	2.06	62.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : เวลาที่ได้เอทานอลสูงสุดคือชั่วโมงที่ 8, ^{a,b} คือ การปรับสภาพเชื้อรอบแรกและรอบสุดท้ายในสารละลายกากมันสำปะหลังแต่ละสูตร ตามลำดับ

สำหรับประสิทธิภาพการหมักในรอบแรกของสภาวะที่มีความเข้มข้นของกากมันสำปะหลัง 20% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่ามีค่าเท่ากับ 94.83% และในรอบสุดท้าย มีค่าเท่ากับ 96.12% จะเห็นได้ว่าไม่มีความแตกต่างกันของผลได้เอทานอล อัตราการผลิตเอทานอล การใช้น้ำตาล และประสิทธิภาพการหมักในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อซ้ำในอาหารเดิม และเมื่อทำการปรับสภาพเชื้อยีสต์ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลัง 60% 80% และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า ผลได้เอทานอลและประสิทธิภาพในการหมักลดลงในรอบสุดท้ายเมื่อเปรียบเทียบกับผลในรอบแรก (ตารางที่ 4.4) อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง 60% 80% และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ในรอบสุดท้าย มีปริมาณเซลล์ทั้งหมดสูงสุด (ตารางที่ 4.3) และผลผลิตชีวมวล ($Y_{x/s}$) (ตารางที่ 4.4) มีค่าสูงขึ้นเมื่อเทียบกับผลในรอบแรกของการปรับสภาพในอาหารแต่ละสูตร ผลการทดลองในการศึกษานี้คล้ายกับการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *Pichia stipitis* ของ Zhu et al. (2009) โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของไฮโดรไลซิสซังข้าวโพดตั้งแต่ 10% ถึง 50% (ปริมาตร/ปริมาตร) แต่ละความเข้มข้นทำการเลี้ยงเชื้อซ้ำ 3 รอบ พบว่า ปริมาณน้ำตาลไซโลสที่เหลือค่อยๆเพิ่มขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นไฮโดรเซสมากขึ้น ในขณะที่เดียวกันเอทานอลที่ผลิตในรอบแรกของอาหารแต่ละสูตรมีปริมาณสูงขึ้น และมีค่าน้อยลงในรอบหลัง สิ่งนี้สามารถอธิบายได้จากกระจายตัวของ flux ของคาร์บอนในระหว่างการหมักเอทานอลซึ่งจะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์องค์ประกอบ (anabolism) และเมตาบอลิซึมของพลังงานภายในเซลล์ โดยในรอบแรกของอาหารปรับสภาพแต่ละสูตร เซลล์ต้องปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมใหม่ที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงขึ้น จึงจำเป็นต้องใช้พลังงานในการปรับตัวมากกว่าปกติที่ได้รับจากการหมักเอทานอลในรอบแรก ดังนั้น การที่เชื้อต้องการพลังงานมาก เอทานอลที่เกิดขึ้นจึงมีปริมาณมากเช่นกัน ดังจะเห็นได้จากผลได้เอทานอลในรอบแรกสูงกว่าในรอบสุดท้ายของอาหารปรับสภาพแต่ละสูตร (ตารางที่ 4.4) และหลังจากที่เซลล์สามารถปรับตัวให้ทนต่อสารยับยั้งในรอบสุดท้ายในอาหารแต่ละสูตรได้แล้ว ยีสต์จะนำแหล่งคาร์บอนไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตมากกว่าการนำไปผลิตเอทานอล จึงทำให้ปริมาณเซลล์ และการผลิตชีวมวลของเชื้อมีค่าเพิ่มขึ้น แต่เอทานอลที่ผลิตได้มีค่าลดลง นอกจากนี้มีการรายงานของ Liu et al. (2009) อธิบายไว้ว่า เชื้อยีสต์ที่ทนต่อสารยับยั้งประเภทฟูแรนได้จะมีกลไกทางพันธุกรรมในการกำจัดสารประกอบที่เป็นพิษ และยังสามารถกระตุ้นเมตาบอลิซึมของการผลิตเอทานอลได้ โดยมียีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมของกลูโคส (glucose metabolism), NAD(P)H metabolic, การรีเจนเนอเรชัน (regeneration) และเอนไซม์ในกลุ่มทรานสเฟอเรส (Transferases) เช่น *HXK1*, *HXK2*, *GLK1*, *TDH1*, *TDH3*, *LAT1*, *PDC6*, *ADH4*, *ALD2*, *ALD4*,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ZWF1, *SOL3*, *RBK1*, *TAL1*, *NQL1* และ *PRS2* ซึ่งจะพบในกลุ่มนี้ในเชื้อที่ทนต่อสารยับยั้งได้มากกว่าเชื้อที่ไม่ทนสารยับยั้ง

4.4 ผลการศึกษาความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งในรูปสารผสมต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลในอาหารเหลว YPD โดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

หลังทำการศึกษาอิทธิพลของสารยับยั้งแต่ละชนิด (กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอพิวริล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวริล) ในหัวข้อที่ 4.2 ต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ จึงได้ทำการศึกษาอิทธิพลของการมีสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิดร่วมกันในอาหารเหลว YPD โดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ ซึ่งความเข้มข้นของสารยับยั้งแต่ละชนิดที่เติมในอาหารได้มาจากการคัดเลือกความเข้มข้นของสารยับยั้งแต่ละชนิดที่ระดับสูงสุดที่ทำให้เชื้อยีสต์ (ยังไม่ปรับสภาพ) สามารถเติบโตไม่ต่ำกว่า 80% ของค่าการเจริญสูงสุด ดังความเข้มข้นที่แสดงในตารางที่ 3.1 โดยระดับความเข้มข้นสูงสุดของสารยับยั้งกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอพิวริล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวริลที่ยีสต์สามารถเจริญได้ คือ 135, 170, 250, 6.5 และ 8.77 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ (ความเข้มข้นสูงสุด; 100%) จัดให้เป็นความเข้มข้นระดับที่ 4 แล้วทำการเจือจางให้มีความเข้มข้นน้อยลงเหลือ 25% 50% และ 75% ของความเข้มข้นสูงสุด จัดให้เป็นความเข้มข้นระดับที่ 1 2 และ 3 ตามลำดับ ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญ อัตราการรอดชีวิต การเปลี่ยนแปลงสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลและการผลิตเอทานอล ตลอดจนเปรียบเทียบผลกับสภาวะที่หมักโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ยังไม่ได้ปรับสภาพ

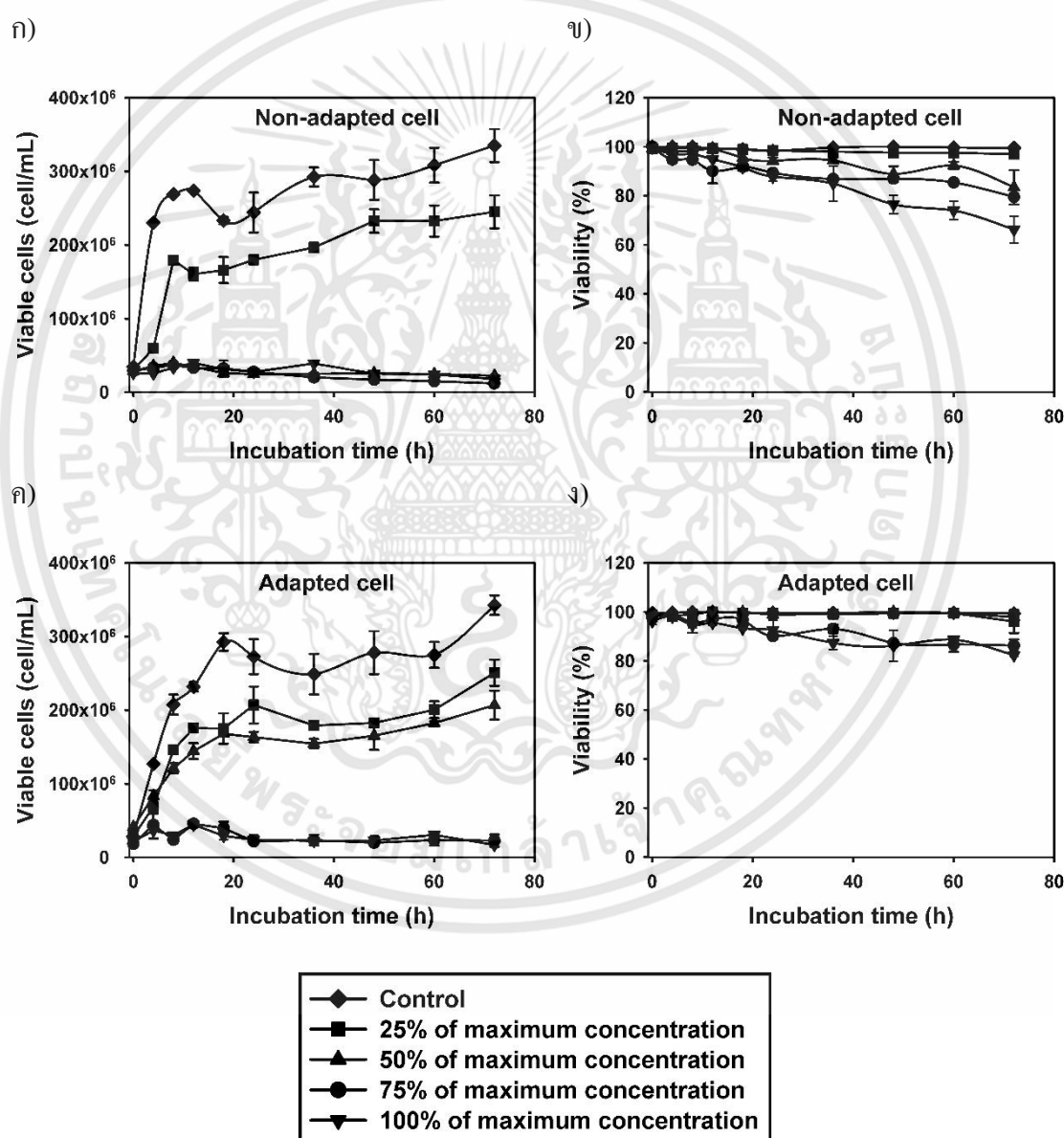
4.4.1. การเจริญ และการรอดชีวิต

ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีเซลล์ที่มีชีวิต และการรอดชีวิตในสภาวะควบคุมสูงสุด เมื่อเติมสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิดลงในอาหาร พบว่า ที่สภาวะที่มีสารยับยั้งผสมน้อยที่สุด หรือความเข้มข้นระดับที่ 1 มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อสูงกว่าความเข้มข้นระดับที่ 2, 3 และ 4 ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ก และ 4.3 ข โดยที่ความเข้มข้นระดับที่ 1 เชื้อมีการรอดชีวิตต่ำกว่าสภาวะควบคุมเล็กน้อย และเมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมมากขึ้นเป็นระดับที่ 2, 3 และ 4 การรอดชีวิตมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นระดับที่ 1 ประมาณ 13.54%, 17.45% และ 30.78% ตามลำดับ เมื่อสิ้นสุดการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อมีระยะพักประมาณ 4 ชั่วโมงในสภาวะที่มีสารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 1 ซึ่งนานกว่าสภาวะควบคุมที่ไม่เติมสารยับยั้ง

สำหรับการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพแล้ว ดังแสดงในภาพที่ 4.3 ค และ 4.3 ง พบว่า เซลล์ที่มีชีวิตมีค่าสูงสุดในสภาวะควบคุม และมีค่าน้อยลง

ในสภาวะที่เติมสารยับยั้งผสมที่ระดับความเข้มข้นที่ 1 และความเข้มข้นระดับที่ 2 ตามระดับความเอกลสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้นของสารยับยั้งผสมที่มากขึ้น เมื่อความเข้มข้นสูงถึงระดับที่ 3 และ 4 พบการเจริญของเชื้อ น้อยมาก ส่วนการรอดชีวิตของเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะที่มีสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้นที่ 1 และ 2 มีค่าใกล้เคียงกับสภาวะควบคุม ในขณะที่การรอดชีวิตน้อยลงในระดับความเข้มข้นที่ 3 และ 4 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นระดับที่ 2 ประมาณ 11.6% และ 15.58% ตามลำดับ ณ จุดสิ้นสุดการหมัก อย่างไรก็ตาม จากการทดลองสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้นที่ 2 หรือความเข้มข้น 50% ของความเข้มข้นสูงสุด พบว่า สภาวะที่ใช้เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพมีปริมาณเซลล์สูงกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพอย่างเห็นได้ชัด



ภาพที่ 4.3 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) และการรอดชีวิต (ข) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ได้ปรับสภาพ และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ค) และการรอดชีวิต (ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งในระดับความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อทั้ง 2 ตัว ดังตารางที่ 4.5 พบว่า ในสภาวะที่เติมสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้นที่ 1 ทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะต่ำกว่าสภาวะควบคุม แต่มีค่าสูงกว่าในอาหารที่มีสารยับยั้งผสมความเข้มข้นระดับที่ 2, 3 และ 4 อย่างชัดเจน โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพเจริญได้น้อยมากในระดับความเข้มข้นที่ 2 โดยให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ $0.04 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ ในขณะที่เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพให้ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะที่สูงกว่านั้นคือ $0.08 \text{ ชั่วโมง}^{-1}$ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมีการเจริญที่สูงกว่าเชื้อที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ โดยแสดงความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้น 50% ของความเข้มข้นสูงสุด

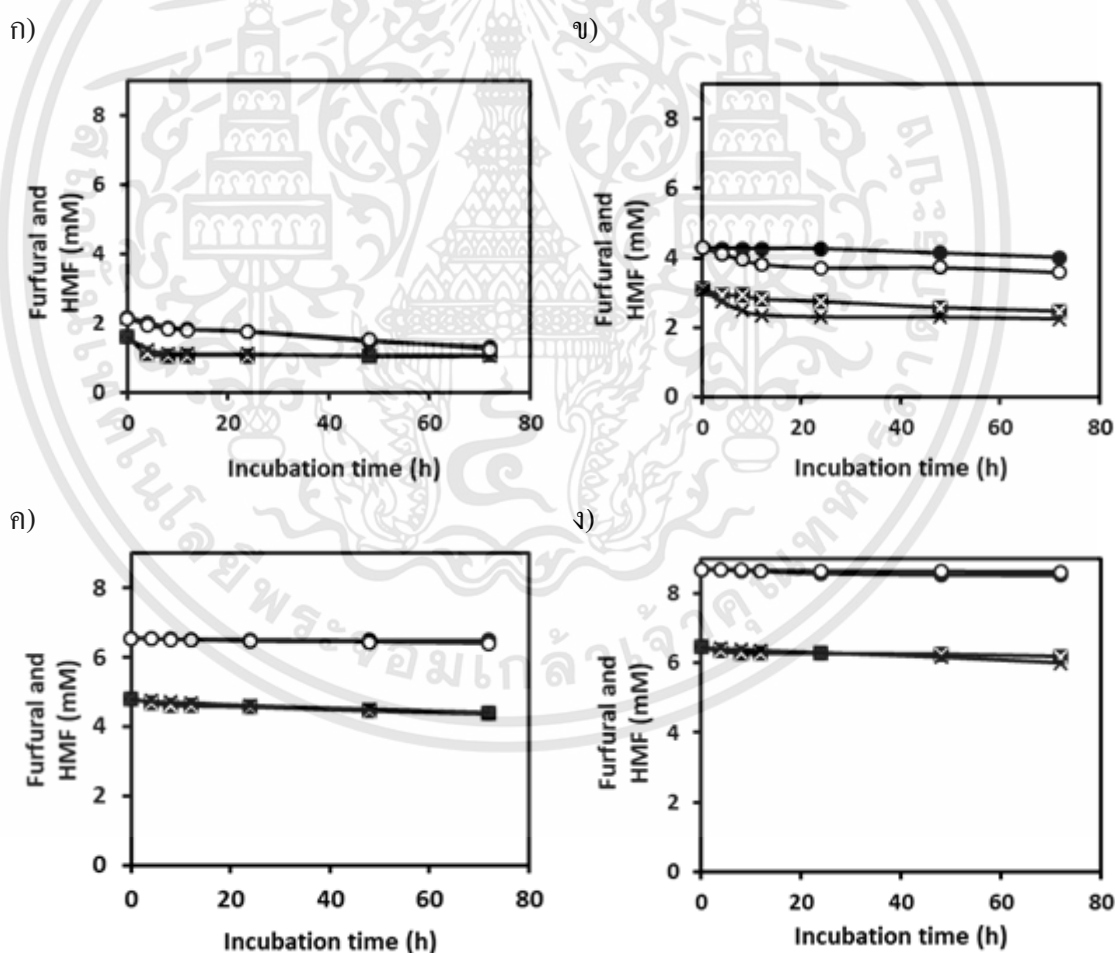
ตารางที่ 4.5 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพในอาหารเหลว YPD ที่มีสารเติมสารยับยั้งผสมในระดับต่างๆ

การทดลอง	อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง^{-1})	
	เชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ยังไม่ปรับสภาพ	เชื้อ <i>S. cerevisiae</i> SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ
ควบคุม	0.26 ± 0.00	0.25 ± 0.03
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 1	0.22 ± 0.00	0.21 ± 0.04
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 2	0.04 ± 0.00	0.08 ± 0.01
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 3	0.03 ± 0.00	0.03 ± 0.01
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 4	0.03 ± 0.00	0.04 ± 0.03

4.4.2 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้ง

จากการติดตามการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารยับยั้งในระหว่างการหมัก โดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ได้ผ่านการปรับสภาพ พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารยับยั้งประเภทฟูแรน ดังแสดงในภาพที่ 4.4 ในขณะที่สารยับยั้งประเภทกรดอ่อนไม่พบความแตกต่างระหว่างความเข้มข้นเริ่มต้นและความเข้มข้นสุดท้ายเมื่อสิ้นสุดการหมัก จึงไม่นำมาแสดงผล ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมระดับที่ 1 เชื้อทั้งสองตัวสามารถใช้สารยับยั้งทั้งเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลได้ไม่แตกต่างกัน

โดยมีการลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 4 ชั่วโมงแรก และอัตราการใช้สารยับยั้งทั้งสองไม่มีความแตกต่างโดยเชื้อทั้งสอง เมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งสูงถึงระดับที่ 2 พบว่า เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพสามารถลดปริมาณสารยับยั้งทั้งสองชนิดได้มากกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งมีการลดลงของสารยับยั้งอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรก โดยที่เฟอพิวรัลมีปริมาณลดลง 64.95% และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลลดลง 16.10% จากเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ส่วนเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพสามารถลดเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลได้ถึง 88.56% และ 39.49% ตามลำดับ จากผลการทดลอง เห็นได้ชัดว่า ที่ระดับของความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมที่มีความเข้มข้น 50% ของสารยับยั้งสูงสุด เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพมีความสามารถในการใช้สารยับยั้งทั้งสองในอาหารได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ ทำให้มีความเข้มข้นของสารยับยั้งทั้งสองตัวน้อยลงเมื่อสิ้นสุดการหมัก แต่ในสถานะที่มีความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมในอาหารสูงขึ้นไปเป็นระดับที่ 3 และ 4 พบว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้งในระหว่างการหมัก



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารยับยั้งเฟอพิวรัล (—●—) และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล (—○—) โดยการใช้เชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับ

สภาพ [(—×—), (—○—)] ที่เลี้ยงในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งผสมระดับความเข้มข้น
ที่ 1 (ก) 2 (ข) 3 (ค) และ 4 (ง)

ในการศึกษานี้จะเห็นว่า การลดลงของสาร 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีนต่ำกว่า การลดลงของเฟอพิวรีน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Larsson *et al.* (1999) อีกทั้งมีการศึกษาอื่นๆ ก่อนหน้านี้ รายงานว่า ยีสต์สามารถใช้สารยับยั้งเฟอพิวรีนได้ทั้งหมดโดยใช้เวลาเร็วกว่า 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีน โดยสามารถเปลี่ยนสารยับยั้งประเภทฟูแรนไปเป็นสารประกอบที่มีความเป็นพิษน้อยกว่า นั่นคือ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีนถูกเปลี่ยนไปเป็น 2,5-บิส-ไฮดรอกซีเมทิลฟูแรน (2,5-bis-hydroxymethylfuran) และเฟอพิวรีนสามารถเปลี่ยนไปเป็นเฟอพิวรีน แอลกอฮอล์ (furfuryl alcohol) เมื่อสารยับยั้งถูกเปลี่ยนไปเป็นสารอื่นแล้วจะปรากฏการเจริญของเชื้อยีสต์ขึ้น (Villa *et al.*, 1992; Taherzadeh *et al.*, 2000a; Liu *et al.*, 2004) Palmqvist *et al.* (1999a) รายงานว่า อัตราการลดลงของเฟอพิวรีนมีค่าลดลงเนื่องจากเซลล์ตายเมื่อมีเฟอพิวรีนความเข้มข้นสูง และเมื่อมีการใช้เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพแล้วพบว่าเชื้อมีความสามารถสูงในการใช้สารยับยั้งทั้งเฟอพิวรีน และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรีนเช่นเดียวกับการรายงานของ Tian *et al.* (2011) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Wallace-Salinas and Gorwa-Grauslund (2013) รายงานว่า ในสภาวะที่มีกรดอินทรีย์ ในไฮโดรไลเซส การเจริญ และประสิทธิภาพการหมักของเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพไม่มีความแตกต่างกับเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ และ Landaeta *et al.* (2013) ยังพบอีกว่า ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นกรดอะซิติกในระหว่างการหมักแบบเบทซ์จากเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ได้ปรับสภาพ ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้การศึกษานี้ไม่พบความแตกต่างของการใช้กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิกในอาหารจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ได้ปรับสภาพ ตลอดจนไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกรดที่เติมลงในระหว่างการหมัก ดังนั้น จะเห็นได้ว่าในสภาวะที่มีสารยับยั้งผสมในอาหาร เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพจะมีความทนต่อสารยับยั้ง โดยเซลล์สามารถนำสารยับยั้งในกลุ่มฟูแรนไปใช้ได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับรายงานของ Martín *et al.* (2007) และ Tian *et al.* (2011)

4.4.3 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล

ความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ได้ผ่านการปรับสภาพในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้นต่างๆ นำมาแสดงเป็นค่าพารามิเตอร์ดังแสดงในตารางที่ 4.6 แต่ไม่ได้แสดงข้อมูลในสภาวะความเข้มข้นระดับที่ 3 และ 4 เนื่องจากมีการเจริญ การใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอลของเชื้อมีค่าต่ำมากซึ่งไม่สามารถนำมาคำนวณได้ จากผลการทดลองพบว่า เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพในสภาวะควบคุม และในสภาวะที่ สารยับยั้งผสมระดับความเข้มข้นที่ 1 ให้อัตราการผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมักสูง โดยให้ความเข้มข้นเอทานอลสูงสุดที่เวลาการหมัก 8 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับความสามารถในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักเอทานอลโดยเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพ เมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมสูงขึ้น เป็นระดับที่ 2 พบว่า เชื้อทั้งสองชนิดสามารถผลิตเอทานอลโดยให้ความเข้มข้นสูงสุดนานขึ้นเป็น 12 ชั่วโมง ซึ่งมีอัตราการผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมักจากเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ เท่ากับ 0.52 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 63.63% ตามลำดับ และเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพ ให้อัตราการผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพการหมัก เท่ากับ 0.74 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 104.45% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพแล้วมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ Boulton (2000) อธิบายว่า การเติมกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ช่วยให้เกิดการสลายไกลโคเจนในเมตาบอลิซึมมากขึ้น ส่งผลให้เชื้อสร้างเอทานอลได้สูงกว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทางทฤษฎี เช่นเดียวกันกับการศึกษานี้ที่ใช้อาหารเหลว YPD ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร จึงทำให้มีประสิทธิภาพการหมักค่อนข้างสูง นอกจากนี้ที่ระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมที่ 1 เชื้อยังสามารถให้ประสิทธิภาพการหมักสูงใกล้เคียงกับสภาวะควบคุม อาจเนื่องมาจากการมีกรดอะซิติกในปริมาณต่ำ งานวิจัยของ Greetham *et al.* (2016) เปิดเผยว่า การเติมกรดอะซิติกในระดับ 20 มิลลิโมลาร์ สามารถป้องกันเซลล์ยีสต์อันเนื่องมาจากความเครียดจากสารยับยั้งเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซี เมทิล เฟอพิวรัล ได้ อีกทั้งช่วยปรับปรุงอัตราการใช้น้ำตาลและอัตราการผลิตเอทานอลได้ จึงเป็นไปได้ว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมที่ 1 ซึ่งเติมกรดอะซิติกลงในอาหาร YPD ความเข้มข้น 33.75 มิลลิโมลาร์ สามารถเพิ่มความสารในการหมักให้สูงขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม เมื่อความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมสูงขึ้นเป็นระดับที่ 2 ซึ่งเติมกรดอะซิติก 67.5 มิลลิโมลาร์ ส่งผลให้ประสิทธิภาพการหมักลดลง ซึ่งรายงานของ Greetham (2014) ได้อธิบายว่า การเจริญเติบโตของเชื้อและประสิทธิภาพการหมักลดลงเมื่อความเข้มข้นของกรดอะซิติกสูงถึง 50 มิลลิโมลาร์ อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมมากขึ้นกว่าระดับนี้ไม่พบการผลิตเอทานอลของเชื้อทั้งสอง โดยการศึกษาของ Larsson *et al.* (1999) ได้จำลองโมเดลผลของสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยวัสดุลิกโนเซลลูโลสต่อการหมักของเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่า สภาวะที่มีสารยับยั้งจากกรดสามชนิด และจากอนุพันธ์เฟอพิวรัล ยิ่งส่งผลให้เกิดการยับยั้งร่วมกัน จะเห็นได้ว่าการใช้สารยับยั้งร่วมกันนั้นสามารถเสริมฤทธิ์กันในการเกิดผลกระทบด้านลบต่อการเจริญ และการหมักเอทานอลของเชื้อ

ตารางที่ 4.6 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และผ่านการปรับสภาพ ในอาหาร YPD ที่มีการเติมสารยับยั้งผสมในระดับต่างๆ

การทดลอง	เวลาที่ได้เอทานอลสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร·ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร·ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการหมัก (%)
ควบคุม						
เชื้อยังไม่ปรับสภาพ	8	2.39	0.25	0.53	1.28	104.77
เชื้อผ่านการปรับสภาพ	8	2.29	0.07	0.54	1.25	106.58
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 1						
เชื้อยังไม่ปรับสภาพ	8	2.38	0.15	0.54	1.30	106.74
เชื้อผ่านการปรับสภาพ	8	2.22	0.15	0.54	1.19	105.10
สารยับยั้งความเข้มข้นระดับที่ 2						
เชื้อยังไม่ปรับสภาพ	12	1.59	0.20	0.32	0.52	63.63
เชื้อผ่านการปรับสภาพ	12	1.39	0.66	0.53	0.74	104.45

Tomás-Pejó *et al.* (2010) ศึกษาการปรับสภาพเชื้อยีสต์ด้วยการเลี้ยงเชื้อในสารละลายฟางข้าวสาลี โดยค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของสารละลาย พบว่า เชื้อที่ผ่านปรับสภาพสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการหมัก และทนต่อสารยับยั้งได้ดีกว่าการใช้เชื้อที่ยังไม่ได้ปรับสภาพ ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาอื่นๆ (Zhu *et al.*, 2009; Martín *et al.*, 2007) มีการรายงานว่าความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งของเชื้อที่ได้จากการปรับสภาพ สามารถลดความเข้มข้นของเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลได้อย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ (Landaeta *et al.*, 2013; Jang *et al.*, 2014) ดังนั้น การศึกษาปัจจัยร่วมกันของสารยับยั้งทั้ง 5 ชนิด โดยการใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพสามารถเจริญและให้ประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลสูงกว่าการใช้เชื้อที่ยังไม่ผ่านการปรับสภาพ โดยแสดงความสามารถในการทนสารยับยั้งผสมในระดับความเข้มข้น 50% ของความเข้มข้นสูงสุดได้ นั่นคือ ที่ระดับความเข้มข้นของกรดอะซิติก 67.5 มิลลิโมลาร์ กรดฟอร์มิก 85 มิลลิโมลาร์ กรดลิวลินิก 125 มิลลิโมลาร์ เฟอพิวรัล 3.25 มิลลิโมลาร์ และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล 4.39 มิลลิโมลาร์ จึงมีความเป็นไปได้ว่าการใช้ไฮโดรไลเซสที่เตรียมได้จากวัตถุดิบที่เหลือใช้ทางการเกษตรต้องมีความเข้มข้นของสารยับยั้งต่างๆ เริ่มต้นไม่เกินตามที่อธิบายไว้ข้างต้น เพื่อสามารถนำไปใช้เป็นสับสเตรทในกระบวนการหมักเอทานอลในอุตสาหกรรมโดยใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

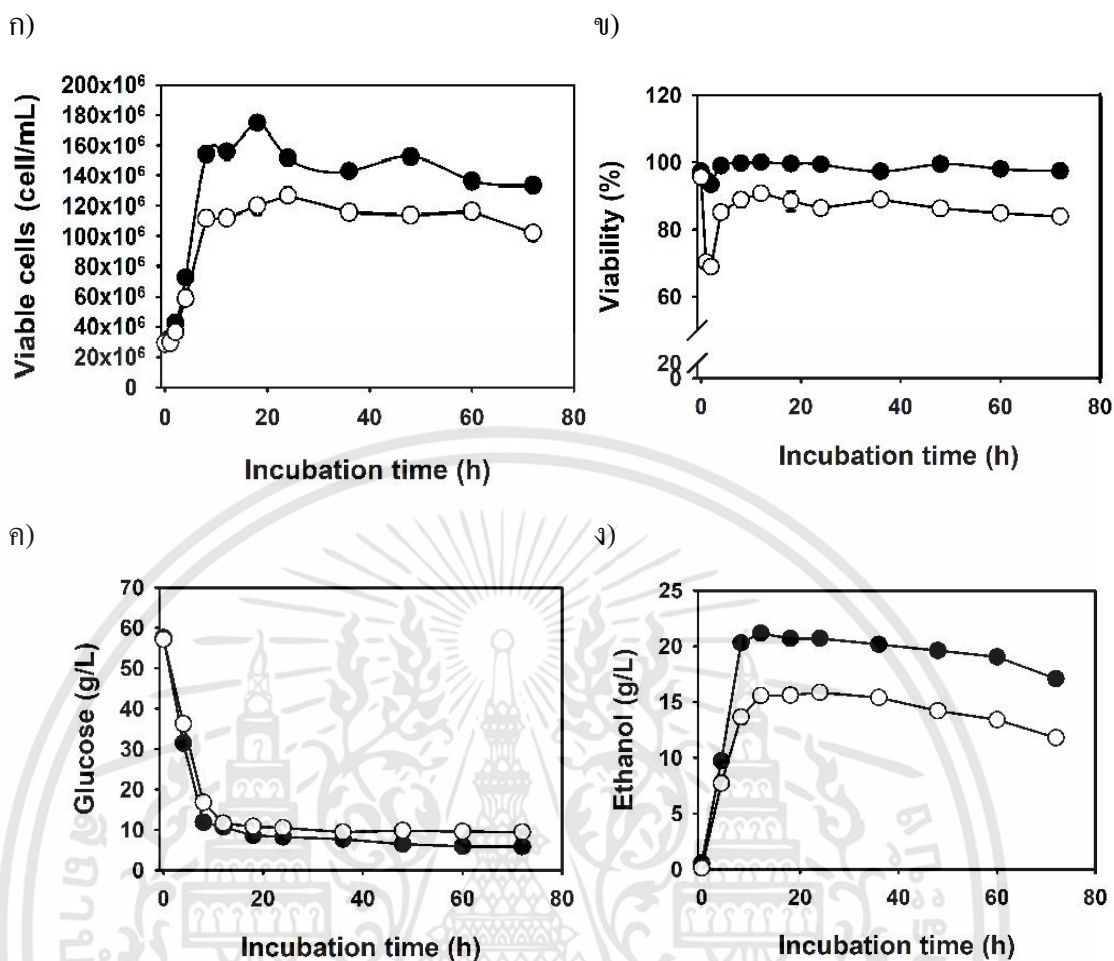
4.5 ผลการศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพ

4.5.1 การเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการกำจัดสารพิษความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร)

จากการปรับสภาพยีสต์ให้ทนต่อสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในสารละลายไฮโดรไลเซสเป็น กระบวนการทางชีวภาพอีกวิธีหนึ่งที่ได้รับความสะดวกซึ่งช่วยให้ลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการกำจัดสารพิษในสารละลายได้ (Parawira and Tekere, 2011) ในการศึกษาครั้งนี้ยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ได้จากการปรับสภาพของรอบสุดท้ายถูกนำมาเพาะเลี้ยงในสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ไม่กำจัดสารพิษ เพื่อประเมินการเจริญเติบโตและประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลเพื่อเปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ผลการทดลองพบว่า จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและร้อยละการรอดชีวิตของเซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ (ภาพที่ 4.5ก, ข; ตารางที่ 4.7) เมื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะพบว่าเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพมีอัตราการเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.22 ± 0.00 ชั่วโมง⁻¹ ในขณะที่เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพมีค่าเท่ากับ 0.19 ± 0.00 ชั่วโมง⁻¹ (ตารางที่ 4.7) ช่วงระยะพักของเชื้อที่ปรับสภาพและไม่ปรับสภาพ ซึ่งมีปริมาณเซลล์ค่อนข้างน้อย มีระยะพักเท่ากับ 0.3 และ 0.7 ชั่วโมง ตามลำดับ

ผลการเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลกลูโคสและการผลิตเอทานอล โดยเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพและยังไม่ปรับสภาพในระหว่างการหมักในสารละลายกากมันสำปะหลัง ดังแสดงในภาพที่ 4.5 ค และ ง พบว่า เชื้อยีสต์ที่ปรับสภาพและไม่ปรับสภาพสามารถใช้น้ำตาลได้ในระดับใกล้เคียงกัน โดยเชื้อที่ปรับสภาพให้ค่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ แสดงให้เห็นว่า เชื้อทั้งสองมีการนำแหล่งคาร์บอน ไปใช้ในการเจริญและผลิตเอทานอลได้ไม่เท่ากัน โดยที่เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพสามารถนำกลูโคสมาใช้เพื่อการเจริญและการบำรุงรักษาเซลล์ได้ดีกว่า ปริมาณเซลล์ที่ได้จึงมากกว่า ตลอดจนสามารถสร้างเอทานอลได้มากกว่าเชื้อที่ไม่ปรับสภาพ

ค่าพารามิเตอร์ทางจลพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลดังตารางที่ 4.7 แสดงให้เห็นว่า เชื้อที่ปรับสภาพแล้วให้ความเข้มข้นของเอทานอล ผลได้เอทานอล ประสิทธิภาพการหมัก และอัตราการผลิตเอทานอลที่สูงกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Silva and Roberto (2001) ซึ่งรายงานว่า จุลินทรีย์ที่ผ่านการปรับสภาพให้ทนต่อสารยับยั้งแล้วสามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลในสารละลายลิกโนเซลลูโลสได้



ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) อัตราการรอดชีวิต (ข) การใช้น้ำตาลกลูโคส (ค) และ (ง) การผลิตเอทานอล ของเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ (●) และไม่ผ่านการปรับสภาพ (○) ในอาหารที่มีสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร)

เมื่อเปรียบเทียบผลของการศึกษานี้กับการศึกษาของ Landaeta *et al.* (2013) ที่ทำการปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* NRRL Y-265 โดยมีการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ในอาหารสังเคราะห์ที่ค่อยๆ เพิ่มความเข้มข้นสารยับยั้งต่างกัน 5 ระดับ ซึ่งอาหารที่ใช้ปรับสภาพเป็นสภาวะจำลองปริมาณสารยับยั้งที่มีในสารละลายจากไมยคาลิปดัส (กรดอะซิดิก, เฟอพิวรัล, 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล, วานิลิน, ซิงรินกอลดีไฮด์ (Syringaldehyde) และกรดไฮดรอกซีเบนโซอิก) จากนั้นนำเซลล์ที่ปรับสภาพแล้วมาเลี้ยงในไฮโดรไลเซสที่ได้จากการย่อยไมยคาลิปดัสด้วยการระเบิดด้วยไอน้ำ จะเห็นได้ว่าเชื้อที่ปรับสภาพในสภาวะที่มีสารละลายจากยูคาลิปดัสสามารถปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตเอทานอลประมาณได้ 70% และ 10% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับผลของเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ โดยอธิบายว่าเชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพมีการนำสารยับยั้งเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลในสารละลายยูคาลิปดัสไปใช้ในวง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะพักของเชื้อในอัตราที่มากกว่าการใช้เชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ จึงทำให้เชื้อที่ปรับสภาพมีระยะพักสั้นกว่าเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ ในขณะที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงจากการนำสารยับยั้งกรดอะซิติกไปใช้ในระหว่างการหมัก ส่วนผลการศึกษานี้จะเห็นว่า เชื้อที่ปรับสภาพมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และอัตราการผลิตเอทานอลสูงกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพประมาณ 17% และ 46% ตามลำดับ อันเนื่องมาจากเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพสามารถรักษาระดับการเจริญและมีการใช้สารยับยั้งประเภทฟูแรนในสารละลายกากมันสำปะหลังไปใช้ได้ดีกว่า ทำให้ระยะพักของเชื้อที่ปรับสภาพใช้เวลาน้อยกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ อย่างไรก็ตาม ค่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะและอัตราการผลิตเอทานอลที่ได้จากผลการศึกษา Landaeta *et al.* (2013) มีค่าต่ำกว่าผลจากการศึกษานี้ ทั้งเชื้อที่ปรับสภาพและไม่ปรับสภาพ

ตารางที่ 4.7 พารามิเตอร์การเจริญและการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ และไม่ผ่านการปรับสภาพ ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร)

พารามิเตอร์	การศึกษาปัจจุบัน		การศึกษาของ Landaeta <i>et al.</i> (2013)	
	เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพ	เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ	เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพ	เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ
ระยะพัก (ชั่วโมง)	0.3	0.7	nd	nd
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)	0.22 ± 0.00	0.19 ± 0.00	0.05	0.03
ปริมาณเซลล์สูงสุด (x10 ⁸ เซลล์/มิลลิลิตร)	1.75 ± 0.05	1.27 ± 0.02	nd	nd
ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)	0.43 ± 0.01 ^a	0.34 ± 0.01 ^b	0.48	0.48
ประสิทธิภาพการหมัก (%)	83.82 ± 1.37 ^a	66.04 ± 2.94 ^b	nd	nd
อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร·ชั่วโมง)	2.47 ± 0.01 ^a	1.69 ± 0.08 ^b	0.53	0.48

หมายเหตุ : ^a, ^b ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$), การศึกษาของ Landaeta *et al.* (2013) เปรียบเทียบผลการเจริญและประสิทธิภาพการหมักของเชื้อที่ปรับและไม่ปรับสภาพในสารละลายยูคาลิปตัส nd: ไม่มีข้อมูล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Parekh *et al.* (1986) ซึ่งรายงานว่ายีสต์ *Candida shehatae* และ *Pichia stipites* ที่ปรับสภาพด้วยวิธีการนำเซลล์กลับมาเพาะเลี้ยงใน สารละลายไม้แอสเพน (aspen wood) หลากๆ รอบ ส่งผลให้การผลิตเอทานอลมีสูงขึ้นประมาณ 13% เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ การศึกษาของ Yu and Zhang (2003) รายงานว่า การเลี้ยงเชื้อยีสต์ที่ปรับสภาพในสารละลายที่ได้จากการย่อยฝ้าย สามารถเพิ่มการผลิตเอทานอลได้ สูงกว่าการใช้เชื้อที่ยังไม่ปรับสภาพ และการศึกษาของ Pompukeewattana *et al.* (2014) ทดลอง การหมักเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ผ่านการปรับสภาพด้วยกรดอ่อน พบว่า เชื้อที่ ผ่านการปรับสภาพให้ผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.42 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส และเชื้อที่ไม่ได้ ปรับสภาพให้ผลได้เอทานอลเท่ากับ 0.35 กรัมเอทานอลต่อกรัมกลูโคส

การทดลองการเพื่อทดสอบความสามารถในการทนต่อสารยับยั้งของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ปรับสภาพด้วยเทคนิค Spot plate โดยทำการ เพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองบนเพลทที่มีความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังแตกต่างกัน (0% 50% และ 100% ปริมาตร/ปริมาตร) พบว่า เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ผ่านการปรับสภาพ สามารถเจริญได้ดีในเพลทที่ไม่มีสารละลายกากมันสำปะหลัง (0% ปริมาตร/ปริมาตร) (สภาวะ ควบคุม) แต่เมื่อความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังมากขึ้นเป็น 50% (ปริมาตร/ ปริมาตร) ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพ และเมื่อความเข้มข้น ของสารละลายกากมันสำปะหลังมากขึ้นเป็น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) พบเพียงการเจริญของเชื้อ ที่ผ่านการปรับสภาพเท่านั้น ในขณะที่เชื้อที่ไม่ผ่านการปรับสภาพการเจริญถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ ดังภาพที่ 4.6 ซึ่งเห็นได้ชัดว่าเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วสามารถทนต่อ สารยับยั้งในสารละลายกากมันสำปะหลังได้มากกว่าเชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพ

Tested medium	Strain	Dilution fold of cell suspension		
		10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶
0% cassava hydrolysate medium (Control)	Non adapted cells			
	Adapted cells			
50% cassava hydrolysate medium	Non adapted cells			
	Adapted cells			
100% cassava hydrolysate medium	Non adapted cells			
	Adapted cells			

ภาพที่ 4.6 ผลของความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่ผ่านการกำจัดสารพิษ ต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพและไม่ผ่านการปรับสภาพ การทดลองนี้ใช้เทคนิค Spot plate บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

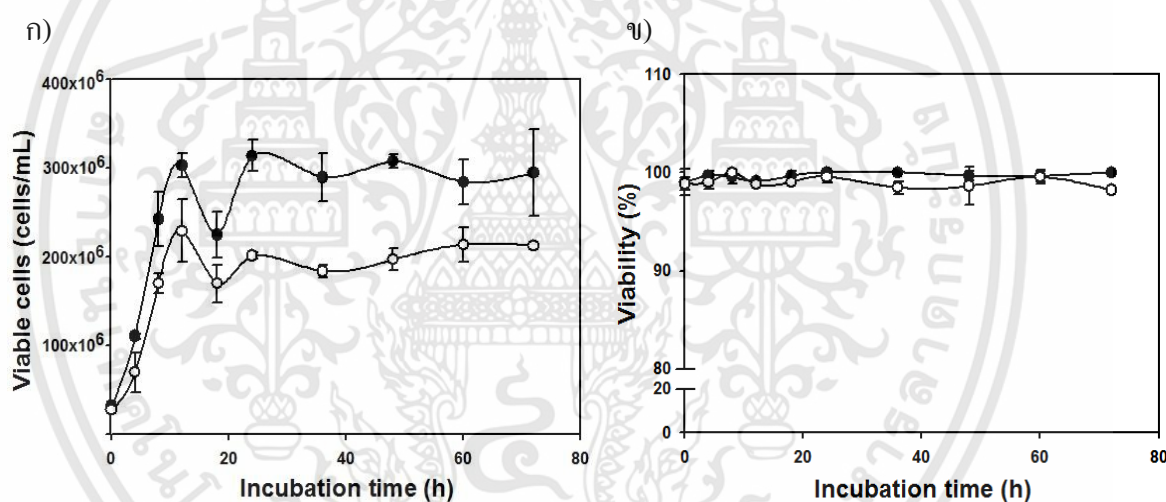
4.5.2 การเจริญ และการผลิตเอทานอลในสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ที่ผ่านการกำจัด และไม่กำจัดสารพิษ

อย่างที่ได้อธิบายในขั้นต้นว่าปัญหาหลักในกระบวนการเตรียมวัตถุดิบโดยการย่อยด้วยกรดภายใต้อุณหภูมิสูงเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้นคือการเกิดสารเคมีที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ และกระบวนการหมัก (Palmqvist and Hahn-Hägerdal, 2000; Walker, 2011) นอกจากนอกการปรับสภาพเชื้อให้สามารถทนต่อสารยับยั้งแล้ว การลดความเป็นพิษของสับสเตรทก่อนจะเข้าสู่กระบวนการหมักเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถเพิ่มศักยภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุลิกโนเซลลูโลสให้ดีขึ้น ดังนั้นการลดความเป็นพิษในการศึกษานี้ใช้วิธีการเติมปูนขาวให้มากเกินไป (Overliming) ด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ซึ่งนับว่าเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และมีค่าใช้จ่ายไม่สูง (Mohagheghi *et al.*, 2006; Yang and Wyman, 2008) การศึกษานี้ทำโดยนำเชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพมาเลี้ยงในอาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/

ปริมาณ) ในส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษ และส่วนที่กำจัดสารพิษ ตรวจสอบการเจริญ อัตราการรอดชีวิต และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

4.5.2.1 การเจริญ และการรอดชีวิต

จากผลการเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต และการรอดชีวิตของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังส่วนที่กำจัด และไม่กำจัดสารยับยั้ง ดังแสดงในภาพที่ 4.7 จะเห็นว่าเชื้อยีสต์ที่เจริญในสารละลายกากมันสำปะหลังที่กำจัดสารพิษให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและการรอดชีวิตสูงกว่าในสภาวะที่ไม่กำจัดสารพิษอย่างเห็นได้ชัด โดยมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเท่ากับ 0.25 ± 0.01 ชั่วโมง⁻¹ ซึ่งมากกว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในสภาวะที่ไม่กำจัดสารพิษออก คือ 0.23 ± 0.00 ชั่วโมง⁻¹ นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อยีสต์ใช้เวลาในการปรับตัวในสภาวะที่กำจัดสารพิษเพียง 1.7 ชั่วโมง ซึ่งน้อยกว่าในสภาวะที่ไม่มีการกำจัดสารพิษซึ่งใช้เวลาปรับตัวเท่ากับ 2.6 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) และการรอดชีวิต (ข) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่กำจัด (●—) และไม่กำจัดสารพิษ (○—)

การศึกษาของ van Zyl *et al.* (1988) อธิบายว่า การกำจัดสารพิษด้วยการปรับค่า pH ของสารละลายให้เป็นด่างสูงๆ ช่วยให้เกิดการตกตะกอนของสารพิษ โดยสามารถกำจัดสารประกอบฟีนอลิก (Roberto *et al.*, 1991b) รวมถึงกรดอะซิติก เฟอิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอิวรัล (Tian *et al.*, 2011) จึงเป็นไปได้ว่า การกำจัดสารพิษในสารละลายกากมันสำปะหลังก่อนจะนำมาใช้ในการทดลองด้วยการเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์นั้น ส่งผลให้เชื้อที่ผ่าน

การปรับสภาพมีการเจริญและการอยู่รอดสูงกว่าการเจริญของเชื้อในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่ได้กำจัดสารพิษ

4.5.2.2 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

ทำการประเมินประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล ณ ชั่วโมงที่ 8 ที่เชื้อสามารถผลิตเอทานอลโดยให้ความเข้มข้นสูงสุด พบว่า ในสารละลายกากมันสำปะหลังที่กำจัดสารพิษออก เชื้อที่ผ่านการปรับสภาพให้ผลได้เอทานอลสูงกว่าในสถานะที่ไม่กำจัดสารพิษออก โดยให้ประสิทธิภาพการหมักสูงกว่าประมาณ 3.68 % ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 พารามิเตอร์ของการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัด และกำจัดสารพิษ

พารามิเตอร์	สารละลายที่ไม่กำจัด	สารละลายที่กำจัด
	สารพิษ	สารพิษ
ผลได้เอทานอล (กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)	0.43 ± 0.01 ^a	0.45 ± 0.02 ^b
ประสิทธิภาพการหมัก (%)	85.10 ± 4.26 ^a	88.23 ± 3.31 ^b

หมายเหตุ : ^{a, b} ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอนแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$)

Martín *et al.* (2002) ทำการศึกษาการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TMB 3001 ที่ได้รับการพัฒนาให้มีความสามารถในการหมักเอทานอลในสารละลายขานอ้อย เมื่อนำเชื้อมาเลี้ยงในสารละลายขานอ้อยทั้งที่ไม่ได้กำจัดและกำจัดสารพิษโดยการเติมต่างให้มากเกินพอด้วยแคลเซียมไฮดรอกไซด์ พบว่า ประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลของเชื้อในสถานะที่กำจัดสารพิษออกมีค่าสูงกว่าในสถานะที่ไม่กำจัดสารพิษ ซึ่งสอดคล้องกับการผลของการศึกษานี้ คือ ในสถานะที่มีการกำจัดสารพิษออกจากสารละลายกากมันสำปะหลัง เชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพสามารถผลิตเอทานอลได้ดีกว่าในสถานะที่ไม่มีการกำจัดสารพิษออกจากสารละลายกากมันสำปะหลัง

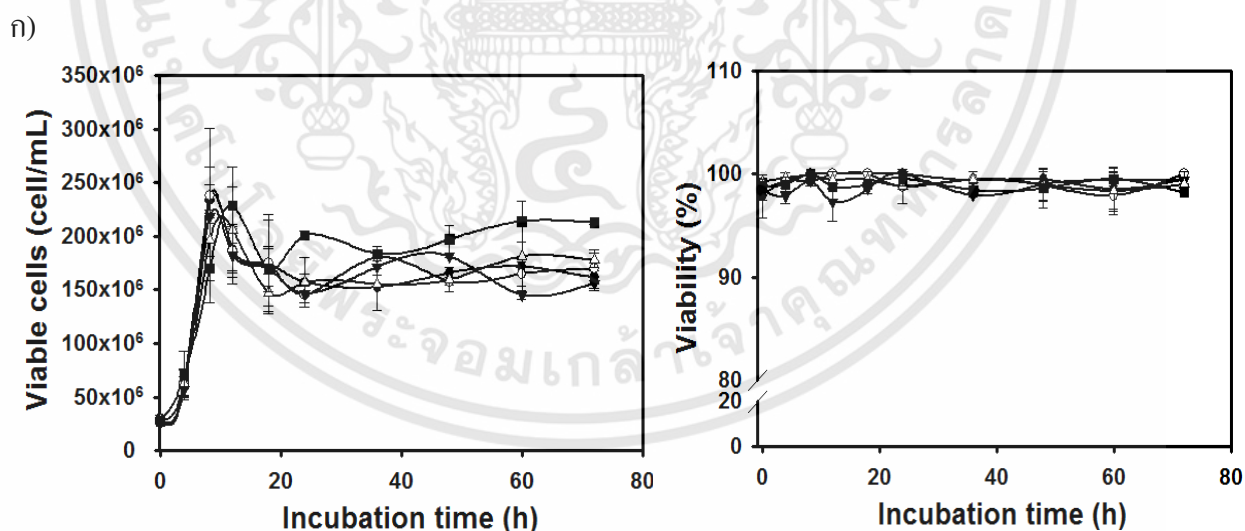
4.6 ผลการศึกษาปริมาณแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลชีวภาพ

โดยทั่วไปแล้ว การหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อเป็นแหล่งแหล่งไนโตรเจน โดยจัดเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของยีสต์ (Yu and Zhang, 2003) จึงได้ทำการศึกษแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากสารละลายกากมันสำปะหลังที่ได้จากการย่อยด้วยกรดเจือจางและความร้อน โดยทำการเลี้ยงยีสต์

S. cerevisiae SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในอาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% ส่วนที่ไม่กำจัดสารพิษซึ่งมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1, 3, 5 และ 7.5 กรัมต่อลิตร โดยมีส่วนที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นการทดลองควบคุม ดำเนินการหมักในสภาวะเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ติดตามการเจริญ อัตราการรอดชีวิต การใช้ของน้ำตาล และการผลิตเอทานอล

4.6.1 การเจริญ และการรอดชีวิต

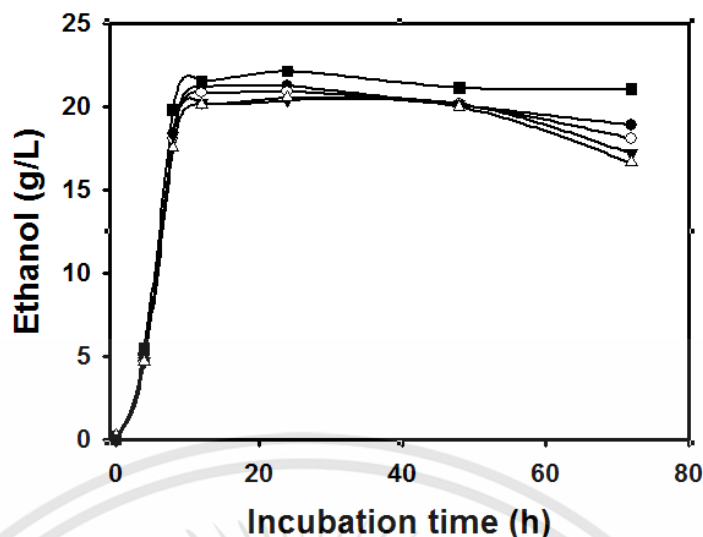
จากการศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล และการเจริญของเชื้อ พบว่า ในการทดลองควบคุม และการทดลองที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1, 3 และ 5 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการหมักปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตของเชื้อใกล้เคียงกัน ซึ่งอยู่ในช่วง 1.56×10^8 ถึง 1.78×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร แต่ในสภาวะที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตถึงระดับ 7.5 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตมีค่าสูงกว่า คือ 2.13×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังภาพที่ 4.8 ก และการรอดชีวิตของเชื้อพบว่า ใกล้เคียงกันดังภาพที่ 4.8 ข เมื่อคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อในสภาวะที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจนมีค่าเท่ากับ 0.25 ชั่วโมง⁻¹ และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมากขึ้นเป็น 1, 3, 5 และ 7.5 กรัมต่อลิตร อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อมีค่าเท่ากับ 0.26, 0.25, 0.24 และ 0.23 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นว่าการเติมหรือไม่เติมแหล่งไนโตรเจนไม่มีความแตกต่างของการเจริญของเชื้อมากนัก



ภาพที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (ก) และการรอดชีวิต (ข) ของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังไม่กำจัดสารพิษ ที่ไม่มี (—●—) และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 (—○—) 3 (—▼—) 5 (—△—) และ 7.5 กรัมต่อลิตร (—■—)

4.6.2 ประสิทธิภาพการใช้น้ำตาล และการผลิตเอทานอล

ความสามารถในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลัง ที่มีการเติม และไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต แสดงในภาพที่ 4.9 พบว่า ในสภาวะควบคุมที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นเอทานอลที่เชื้อสร้างได้เมื่อสิ้นสุดการหมักมีค่าเท่ากับ 18.92 กรัมต่อลิตร และเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1, 3 และ 5 กรัมต่อลิตร พบว่า ความเข้มข้นเอทานอลสุดท้ายลดลงเป็น 18.12, 17.22 และ 16.67 ในขณะที่การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 7.5 กรัมต่อลิตร เชื้อผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ 21.09 กรัมต่อลิตร โดยค่าพารามิเตอร์การหมักเอทานอลของเชื้อ ณ ชั่วโมงที่ 12 ดังตารางที่ 4.9 พบว่า ในสภาวะที่ไม่เติม และเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร เชื้อมีประสิทธิภาพการหมักใกล้เคียงกัน ประมาณ 74% หลังจากนั้นเมื่อความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้นเป็น 3 และ 5 กรัมต่อลิตร ประสิทธิภาพการหมักลดลงเล็กน้อย คือ 73% และ 69% ตามลำดับ แต่เมื่อความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้นถึง 7.5 กรัมต่อลิตร พบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของเชื้อสูงขึ้นเป็น 73% แต่ยังมีค่าน้อยกว่าในสภาวะที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต อย่างไรก็ตาม ผลการเจริญของเชื้อในสภาวะที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต 7.5 กรัมต่อลิตรนี้ ให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อต่ำสุดนั้น อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อยีสต์อาจมีการใช้สารอาหารไปใช้เพื่อการผลิตเอทานอลมากเกินไปจนไปลดการเจริญของเชื้อ มีการศึกษาของ Mendes-Ferreira *et al.* (2004) ซึ่งศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อรูปแบบการเจริญและการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อจากน้ำองุ่น (grape juice medium) พบว่าเมื่อปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตมากขึ้นจะไปลดอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อ *S. cerevisiae* ในขณะที่ความเข้มข้นของเอทานอลสุดท้ายมีค่ามากขึ้น



ภาพที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังไม่กำจัดสารพิษที่ไม่มี (●) และมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 1 (○) 3 (▼) 5 (▲) และ 7.5 กรัมต่อลิตร (■)

ตารางที่ 4.9 ผลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อค่าพารามิเตอร์ทางจลนพลศาสตร์ของการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ไม่กำจัดสารพิษ

แอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม/ลิตร)	เวลาที่ได้อเอทานอลสูงสุด (ชั่วโมง)	อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคส (กรัม/ลิตร · ชั่วโมง)	ความเข้มข้นกลูโคสที่เหลือ (กรัม/ลิตร)	ผลได้อเอทานอล (กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคส)	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/ลิตร · ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการหมัก (%)
0	12	4.62	1.85	0.38	1.77	74.20
1	12	4.49	1.85	0.38	1.74	74.86
3	12	4.49	1.78	0.37	1.69	72.92
5	12	4.71	0.89	0.35	1.68	69.08
7.5	12	4.82	0.49	0.37	1.80	73.05

แหล่งไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวนของยีสต์และยังช่วยเพิ่มสามารถในการทนต่อเอทานอลและการผลิตเอทานอลได้ (Bafmcová *et al.*, 1999) โดยแอมโมเนียมไอออนสามารถถูกดูดซึมเข้าสู่ผู้กรดอะมิโนได้อย่างรวดเร็ว (Nissen *et al.*, 2000; Mendes-Ferreira *et al.*, 2004) จากผลการทดลองสรุปได้ว่า ในสภาวะที่เติมแหล่งไนโตรเจนในรูป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แอมโมเนียมซัลเฟต 7.5 กรัมต่อลิตรหรือไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันของประสิทธิภาพการหมัก มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ได้ผลการทดลองคล้ายกันของ Akaracharanya *et al.* (2011) ซึ่งรายงานว่า การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 0, 0.2, 0.4 และ 0.6% (มวล/ปริมาตร) (0, 2, 4 และ 6 กรัมต่อลิตร) ลงในสารละลายกากมันสำปะหลังที่ถูกย่อยด้วยกรดซัลฟูริก ไม่พบความแตกต่างกันของเอทานอลที่สร้างขึ้นโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR5596

ดังนั้นในการเสริมแหล่งไนโตรเจนในอาหารที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังนั้นอาจไม่มีความจำเป็นเนื่องจากองค์ประกอบในกากมันสำปะหลังประกอบไปด้วยโปรตีน (Stiroth *et al.*, 2000) เมื่อนำมาย่อยก็จะมีโปรตีนละลายอยู่ในสารละลายไฮโดรไลเซสเช่นกัน และความสามารถในการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *S. cerevisiae* SC90 ที่ปรับสภาพซึ่งได้จากการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตในสารละลายไม่มีความแตกต่างกับเอทานอลที่ได้จากสารละลายที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มต้นทุนหากมีการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมอีกด้วย



บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การปรับสภาพเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ในอาหารปรับสภาพที่ค่อยๆเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายกากมันสำปะหลังอย่างต่อเนื่อง และเลี้ยงในอาหารปรับสภาพสูตรเดิมซ้ำหลายๆรอบ สามารถปรับปรุงการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อได้

5.1.2 การเพิ่มจำนวนรอบของการปรับสภาพสามารถปรับปรุงอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ และลดระยะเวลาปรับตัวของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ได้ สันนิษฐานได้ว่า เชื้อเกิดการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมนั้นๆ

5.1.3 เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพ มีความสามารถในการทนต่อสารพิษจากสารยับยั้งรวมทั้ง 5 ชนิด ในอาหารเหลว YPD ได้ดีกว่าเชื้อยีสต์ที่ยังไม่ได้ปรับสภาพ โดยสามารถทนระดับสารยับยั้งผสมของกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดลิวลินิก เฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล ได้เท่ากับ 67.5, 85, 125, 3.25 และ 4.39 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ ซึ่งเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพสามารถนำสารยับยั้งประเภทฟูแรนไปใช้ได้

5.1.3 เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพเมื่อเลี้ยงในสารละลายกากมันสำปะหลัง 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ให้ผลได้เอทานอลสูงกว่าการใช้เชื้อที่ไม่ได้ปรับสภาพประมาณ 27%

5.1.4 การเติมแคลเซียมไฮดรอกไซด์ลงในสารละลายกากมันสำปะหลังเพื่อกำจัดสารพิษออกช่วยให้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพมีการเจริญและปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลได้ดีขึ้น

5.1.5 การเจริญและการผลิตเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังที่มีการเติมและไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตไม่มีความแตกต่างกัน

ดังนั้น วิธีการปรับสภาพโดยเลี้ยงในอาหารเดิมหลายๆครั้งสามารถช่วยให้เชื้อทนต่อสารยับยั้ง (กรดอะซิติก กรดลิวลินิก และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล) ที่เกิดขึ้นในระหว่างการย่อยกากมันสำปะหลังได้ ทำให้เซลล์ที่ผ่านการปรับสภาพแล้วสามารถทนต่อสารพิษได้ดีกว่าเซลล์ที่ไม่ได้ปรับสภาพ สิ่งนี้อาจเป็นประโยชน์หากมีการใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* SC90 ที่ผ่านการปรับสภาพและใช้กากมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบสำหรับการหมักเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมต่อไปได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการศึกษาครั้งนี้ แม้ว่าจะใช้เชื้อยีสต์ที่ได้จากการปรับสภาพในสารละลายกากมันสำปะหลังซึ่งย่อยด้วยสภาวะการย่อยที่ไม่รุนแรงมาก และก่อให้เกิดสารยับยั้งในปริมาณไม่สูง แต่ยังคงพบว่าเมื่อนำเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพมาเลี้ยงในอาหาร YPD ที่เติมสารยับยั้งผสมทั้ง 5 ชนิดซึ่งเดิมในระดับความเข้มข้นสูงกว่าที่พบในไฮโดรไลเซส แล้วยังพบว่าเชื้อที่ผ่านการปรับสภาพสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดี ดังนั้นหากทำการปรับสภาพเชื้อโดยใช้ไฮโดรไลเซสที่ผ่านการย่อยด้วยสภาวะที่รุนแรงมากขึ้น ซึ่งอาจทำให้ได้สารยับยั้งปริมาณที่สูงขึ้นเช่นกัน การปรับสภาพอาจเพิ่มความสามารถในการทนต่อความเป็นพิษจากสารยับยั้งและเพิ่มประสิทธิภาพการหมักได้ดีขึ้นได้ อย่างไรก็ตามในการประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรม อาจมีปัจจัยอื่นมาเกี่ยวข้อง เช่น ความเข้มข้นของสับสเตรท หรือน้ำตาลที่ใช้ในปริมาณค่อนข้างสูงกว่าในระดับห้องปฏิบัติการ รวมถึงสภาวะการหมักที่แตกต่างกันอาจมีผลต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อต่างจากผลในงานวิจัยนี้

5.2.2 จากวิธีการเตรียมกากมันสำปะหลังแห้งก่อนนำมาย่อยด้วยกรดโดยนำกากมันสำปะหลังสดมาผ่านขั้นตอนการอบแห้งนั้นเป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานาน และต้องใช้พลังงานสูง ดังนั้นหากมีการนำไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมในอนาคต การอบแห้งกากมันสำปะหลังสดอาจจะเป็นขั้นตอนที่เพิ่มต้นทุน และใช้เวลามาก จึงควรมีการทดลองนำกากมันสำปะหลังสดมาใช้ในการปรับสภาพแทน

บรรณานุกรม

- กล้าณรงค์ ศรีรอด สิริพล โกสินทรเสณีย์ เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ปฐมา จาดกานนท์ และ สิทธิโชค วัลลภาทิพย์. 2548. การพัฒนาการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเพื่อลดต้นทุนการผลิตและปลอดจากผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- กล้าณรงค์ ศรีรอด เกื้อกุล ปิยะจอมขวัญ สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ ปฐมา จาดกานนท์ และ สิทธิโชค วัลลภาทิพย์. 2549. การพัฒนาการผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยการปรับปรุงการย่อยแป้งดิบด้วยเอนไซม์. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- กัลยา อยู่นาน จิรศักดิ์ คงเกียรติจร และ กนก รัตนะกนกชัย. 2548. การผลิตเอทานอลจากสารละลายกากมันที่ย่อยด้วยกรดโดยการหมักด้วย *Saccharomyces cerevisiae*. ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43. วันที่ 1-4 กุมภาพันธ์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. หน้า 537-543.
- ขวัญชนก จันทร์สว่าง. 2554. การย่อยสลายโมเลกุลของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรโดยกระบวนการฉายรังสีแกมมาพร้อมกับไซโตเดียมไฮดรอกไซด์/ยูเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- จิรศักดิ์ คงเกียรติจร. 2551. การพัฒนากระบวนการเพิ่มผลผลิตไบโอเอทานอลโดยการหมักจากวัสดุเหลือทิ้งจากต้นมันสำปะหลังและผักตบชวา. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- ชลดา ช่อสัตย์. 2546. การใช้ประโยชน์จากกากมันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ชัชพันธ์ นิवासวงษ์ และ เฉลิม เรืองวิริยะชัย. 2555. การผลิตเซลลูโลซิกเอทานอลในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 40: 1073-1088.
- ณพลพัทธ์ ปุญญฤทธิ์เจริญ ภัทรพงศ์ เว็นบาป และ โสภิต แซ่ตั้ง. 2555. การผลิตไบโอเอทานอลจากผักตบชวาโดยเชื้อยีสต์ *Candida shehatae* TISTR 5843. วิทยานิพนธ์. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.
- ณัฐธิดา เกิดแล้ว. 2557. การปรับสภาพเส้นใยลิกโนเซลลูโลสโดยการระเบิดด้วยไอน้ำเพื่อการผลิตเอทานอล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- ธีรภัทร ศรีนรคุตร ณัฐชนัน ลีพิพัฒน์ไพบุลย์ นันทนา บำรุงเชื้อ บัญชา เม้าทุ่ง บัณฑิต ผึ้งสินธุ์ ปิยะวรรณ เดชคง มนตรี วังพิลา ยุทธศักดิ์ สุขการี ยุทธศักดิ์ รัตนสงฆ์ และ สุทธิกมล สุทธิกุล.

2551. การผลิตน้ำตาลจากยอดและใบอ้อย. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- ปฐมา จาดกานนท์ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ สมพร อิศวิลานนท์ เอ็จ สโรบล ถาวร ปั้นตระกูล และมีชัย ลัดดี. 2551. แนวทางการพัฒนาอุตสาหกรรมเอทานอลจากวัตถุดิบทางการเกษตรของประเทศไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ประมุข กระจุกสุขสถิต. 2555. การผลิตไบโอเอทานอลจากชีวมวล. รายงานวิจัย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย. กรุงเทพฯ.
- ประเวทย์ ค้อยเต็มวงค์ ปราโมทย์ ศิริโรจน์ สรทศน์ อินทร์คคมพร นงพา คุณจักร และ วรณัฐ เกิดสินชัย. 2551. การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส. รายงานการวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. กรุงเทพฯ.
- ผ่องศรี ศิวราศักดิ์ เพ็ญจิตร ศรีนพคุณ และ สิทธิพันธ์ ท่อแก้ว. 2550. การผลิตเอทานอลจากเชื้อราไตรโคเดอร์มา รีลีส สำหรับอุตสาหกรรมเอทานอล. รายงานการวิจัย ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. กรุงเทพฯ.
- พงษ์ศักดิ์ นพรัตน์. 2552. สภาพที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำทิ้งโรงงานสกัดน้ำมันปาล์มโดยเชื้อ *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.
- พิชามณูษ์ แดงพราหม์ สุดาทิพย์ จันทร และ สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2556. อิทธิพลของชนิดและปริมาณของวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรต่อการผลิตโพลิโกแซ็กคาไรด์ด้วยสารละลายเอนไซม์สกัดหยาบจาก *Penicillium oxalicum* KUB-SN2-1. วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 36. 73-84.
- รัชพล พะวงศรีรัตน์. 2558. กระบวนการปรับสภาพเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส. วารสารสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2: 143-157.
- เวสาร์ช สุนทรชัยบุรณ์ จิราภรณ์ แก้วใสแสง และ รัชพล พะวงศรีรัตน์. 2557. ศักยภาพของปอควินา (*Hibiscus cannabinus* L.) ในการผลิตเอทานอลโดยยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5019. วารสารเกษตรพระวรุณ. 11: 167-174.
- ศุภรินทร์ ไชยกลางเมือง. 2553. การปรับสภาพฟางข้าวด้วยไอน้ำ และสารละลายต่างเจือจางเพื่อผลิตเอทานอล. รายงานการวิจัย ฐานข้อมูลโครงสร้างพื้นฐานภาครัฐด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. กรุงเทพฯ.
- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย. 2551. เราไม่จ้อน้ำมัน. ฐานข้อมูล. กรุงเทพฯ. 180 หน้า.

- สาวิตรี ลีमतอง. 2549. **ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 611 หน้า
- สิริวรรณ แก้วชิงดวง. 2554. **การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากกากมันสำปะหลังโดยการบำบัดขั้นต้น**. ปรินญาณิพนธ์. สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.
- ศุขใจ ชูจันทร์. 2554. **การผลิตกรดอินทรีย์จากวัสดุเหลือใช้มวลชีวภาพ**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 298 หน้า.
- สุภาวดี ผลประเสริฐ. 2557. **การปรับสภาพวัตถุดิบพอลิกลีโนเซลลูโลสสำหรับการผลิตเอทานอล**. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*. 22: 641-649.
- อรุณ ชาญชัยเชาว์วิวัฒน์. 2558. **ยีสต์และเทคโนโลยีของยีสต์**. ก้าวไทยแอดแอดเวอร์ไทซิง. กรุงเทพฯ.
- อรุณี สุกสินสาธิต. 2555. **พลังงานจากชีวมวลที่มีลิกโนเซลลูโลสสูง**. *วารสารสิ่งแวดล้อม*. 16: 36-43.
- Agu, R. C., Amadife, A. E., Ude, C. M., Onyia, A., Ogu, E. O., Okafor, M. and Ezejiofor, E. 1997. Combined heat treatment and acid hydrolysis of cassava grate waste (cgw) biomass for ethanol production. **Waste Management**. 17: 91-96.
- Akaracharanya, A., Kesornsit, J., Leepipatpiboon, N. Srinorakutara, T. Kitpreechavanich, V. and Tolieng, V. 2011. Evaluation of the waste from cassava starch production as a substrate for ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Annals of Microbiology**. 61: 431-436.
- Alfenore, S., Molina-Jouve, C., Guillouet S. E., Uribebarrea J. L., Goma, G., Benbadis, L. 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 60: 67-72.
- Almeida, J. R., Modig, T., Petersson, A., Hähn-Hägerdal, B., Lidén, G. and Gorwa-Grauslund, M. F. 2007. Increased tolerance and conversion of inhibitors in lignocellulosic hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**. 82: 340-349.
- Ando, S., Arai, I., Kiyoto, K., and Hanai, S. 1986. Identification of aromatic monomers in steam-exploded poplar and their influences on ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Fermentation Technology**. 64: 567-570.
- Ask, M., Bettiga, M., Duraiswamy, V. R. and Olsson, L. 2013. Pulsed addition of HMF and furfural to batch-grown xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* results in different

- physiological responses in glucose and xylose consumption phase. **Biotechnology for Biofuels**. 6: 181.
- Bafrcová, P., ŠSmogrovicová, D., Sláviková, I., Pátrová, J. and Dömény, Z. 1999. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnology**. 21: 337–441.
- Balagopalan, C., Ray, R. C., Sheriff, J. T. and Rajalekshmy, L. 1994. Biotechnology for the value addition of waste waters and residues from cassava processing industries. In **The Cassava Biotechnology Network: proceedings of the Second International Scientific Meeting**. 22-26 August. Bogor, Indonesia. pp. 609-701.
- Balat, M. 2011. Production of bioethanol from lignocellulosic materials via the biochemical pathway: A review. **Energy Conversion and Management**. 52: 858–875.
- Banerjee, N., Bhatnagar, R. and Viswanathan, L. 1981. Inhibition of glycolysis by furfural in *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 11: 226-228.
- Banerjee, S., Mudaliar, S., Sen, R., Giri, B., Satupte, D., Chakrabarti, T. and Pandey, R. A. 2010. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**. 4: 77-93.
- Bauer B. E., Rossington, D., Mollapour, M., Mammun, Y., Kuchler, K. and Piper, P. W. 2003. Weak organic acid stress inhibits aromatic amino acid uptake by yeast, causing a strong influence of amino acid auxotrophies on the phenotypes of membrane transporter mutants. **European Journal of Biochemistry**. 15: 3189–3195.
- Bensah, E. C. and Mensah, M. 2013. Chemical pretreatment methods for the production of cellulosic ethanol: technologies and innovations. **International Journal of Chemical Engineering**. 2013: 21.
- Boulton, C. 2000. Trehalose, glycogen and sterol. In: **Brewing Yeast Fermentation Performance**, (Ed. K.A. Smart). Blackwell Science Ltd, Oxford, UK. pp. 10-19
- Boulton, C. and Quain, D. 2006. The biochemistry of fermentation. In: **Brewing Yeast and Fermentation**. Blackwell Science, Oxford, UK. pp. 69-142.
- Boyer, L. J., Vega, K., Klasson, K. T., Clausen, E. C. and Gaddy, J. L. 1992. The effects of furfural on ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**. 3: 41-48.

- Brandberg, T., Karimi, K., Taherzadeh, M. J., Franzén, C. J., and Gustafsson, L. 2007. Continuous fermentation of wheat-supplemented lignocellulose hydrolysate with different types of cell retention. **Biotechnology and Bioengineering**. 98: 80–90.
- Cao G. L., Ren N. Q., Wang, A. J., Guo, W. Q., Xu, J. F. and Liu, B. F. 2010. Effect of lignocellulose-derived inhibitors on growth and hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16. **International Journal of Hydrogen Energy**. 35: 13475-13480.
- Chandel, A. K., Silva, S. S. and Singh O. V. 2011. Detoxification of Lignocellulosic Hydrolysates for Improved Bioethanol Production. In: **Biofuel Production-Recent Developments and Prospects**, Marco Aurelio Dos Santos Bernardes (Ed.). InTech, Shanghai, China. pp. 225-246.
- Charoenrat, T., Khumruaengsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S. and Roongsawang, N. 2013. Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 116: 193-198.
- Cheng, J., 2009. **Biomass to Renewable Energy Processes**. Taylor and Francis Group, New York.
- Clausen, E. C. and Gaddy, J. L. 1988. Ethanol from biomass by concentrated acid hydrolysis and fermentation. **Energy Biomass Wastes**. 12: 1319-1342.
- Converti, A., Domínguez, J. M., Perego, P., Silva, S. S. and Zilli, M. 2000. Wood hydrolysis and hydrolyzate detoxification for subsequent xylitol production. **Chemical Engineering Technology**. 23: 1013-1020.
- Dubois, M., Gilles, D. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for the determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**. 28: 350-356..
- El-Mansi, E. M. T. and Bruce Ward, F. 2006. Microbiology of industrial fermentation. In: **Fermentation microbiology and biotechnology**, El-Mansi, E. M. T., Bryce, C. F. A., Demain, A. L. and Allman, A. R. (Eds). Taylor & Francis, Boca Raton. Pp. 11–46.
- El-Naggar, N. E., Deraz, S. and Khalil, A. 2014. Bioethanol production from lignocellulosic feedstocks based on enzymatic hydrolysis: current status and recent developments. **Biotechnology**. 13: 1-21.

- Fernandes, D. L. A., Pereira, S. R., Serafim, L. S., Evtuguin, D. V. and Xavier, A. M. R. B. 2012. Second Generation Bioethanol from Lignocellulosics: Processing of Hardwood Sulphite Spent Liquor. In: **Biotechnology**, Marco Aurelio Pinheiro Lima (Ed.). InTech, Shanghai, China. pp. 123-152.
- Galbe, M. and Zacchi, G. 2012. Pretreatment: The key to efficient utilization of lignocellulosic materials. **Biomass and Bioenergy**. 46: 70-78.
- Greetham, D. 2014. Presence of low concentrations of acetic acid improves fermentations using *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Bioprocessing and Biotechniques**. 5: 192.
- Greetham, D., Hart, A. J. and Tucker, G. A. 2016. Presence of low concentrations of acetic acid improves yeast tolerance to hydroxymethylfurfural (HMF) and furfural. **Biomass and Bioenergy**. 85: 53-60.
- Görgens, J. F., Carrier, M. and García-Aparicio, M. P. 2014. Biomass Conversion to Bioenergy Products. In: **Bioenergy from Wood**, Seifert, T. (Ed.). Springer, Dordrecht, Netherlands. pp. 137-167.
- Harmsen, P. F. H., Huijgen, W. J. J., Bermúdez López, L. M., Bakker and R. R. C. 2010. Literature Review of Physical and Chemical Pretreatment Processes for Lignocellulosic Biomass. **Food and Biobased Research**. Wageningen, Netherlands.
- Huang, X., Wang, Y., Liu, W. and Bao, J. 2011. Biological removal of inhibitors leads to the improved lipid production in the lipid fermentation of corn stover hydrolysate by *Trichosporon cutaneum*. **Bioresource Technology**. 102: 9705–9709.
- Imai, T. and Ohono, T. 1995. The relationship between viability and intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied and Environmental Microbiology**. 61: 3604–3608.
- Jang, Y., Lim, Y. and Kim, K. 2014. *Saccharomyces cerevisiae* Strain Improvement Using Selection, Mutation, and Adaptation for the Resistance to Lignocellulose-Derived Fermentation Inhibitor for Ethanol Production. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. 24: 667–674.
- Jönsson, L. J., Palmqvist, E., Nilvebrant, N. O. and Hahn-Hägerdal, B. 1998. Detoxification of wood hydrolysates with laccase and peroxidase from the white-rot fungus *Trametes versicolor*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 49: 691-697.
- Jönsson, L. J., Alriksson, B. and Nilvebrant, N. 2013. Bioconversion of lignocellulose: inhibitors and detoxification. **Biotechnology for Biofuels**. 6: 16.

- Jönsson, L. J. and Martín, C. 2016. Pretreatment of lignocellulose: Formation of inhibitory by-products and strategies for minimizing their effects. **Bioresource Technology**. 199: 103–112.
- Keating, J. D., Panganiban, C. and Mansfield, S. D. 2006. Tolerance and adaptation of ethanologenic yeasts to lignocellulosic inhibitory compounds. **Biotechnology and Bioengineering**. 93: 1196–1206.
- Koppram, R., Albers, E., and Olsson, L. 2012. Evolutionary engineering strategies to enhance tolerance of xylose utilizing recombinant yeast to inhibitors derived from spruce biomass. **Biotechnology for Biofuels**. 5: 32.
- Kouteu Nanssou, P. A., Jiokap Nono, Y. and Kapseu, C. 2016. Pretreatment of cassava stems and peelings by thermohydrolysis to enhance hydrolysis yield of cellulose in bioethanol production process. **Renewable Energy**. 97: 252-265.
- Kumar, P., Barrett, D. M., Delwiche, M. J. and Stroeve, P. 2009. Methods for pretreatment of lignocellulosic biomass for efficient hydrolysis and biofuel production. **Industrial and Engineering Chemistry Research**. 48: 3713–3729.
- Lacerda, T. M., Zambon, M. D. and Frollini, E. 2013. Effect of acid concentration and pulp properties on hydrolysis reactions of mercerized sisal. **Carbohydrate Polymers**. 93: 347–356.
- Lambert, R. J. and Stratford, M. 1999. Weak-acid preservatives: modelling microbial inhibition and response. **Applied Microbiology**. 86:157-164.
- Landaeta, R., Aroca, G., Acevedo, F., Teixeira, J. A. and Mussatto, S. I. 2013. Adaptation of a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain to lignocellulosic inhibitors by cell recycle batch fermentation. **Applied Energy**. 102: 124-130.
- Larsson, S., Palmqvist, E., Hahn-Hägerdal, B., Tengborg, C., Stenberg, K., Zacchi, G. and Nilvebrant, N. O. 1999. The generation of fermentation inhibitors during dilute acid hydrolysis of softwood. **Enzyme and Microbial Technology**. 24: 151–159.
- Linden, T. and Hahn-Hägerdal, B. 1989. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates with yeasts and xylose isomerase. **Enzyme and Microbial Technology**. 11: 583-589.
- Liu, Z. L., Slininger, P. J., Dien, B. S., Berhow, M. A., Kurtzman, C. P. and Gorsich, S. W. 2004. Adaptive response of yeasts to furfural and 5-hydroxymethylfurfural and new chemical evidence for HMF conversion to 2,5-bis-hydroxymethylfuran. **Industrial Microbiology and Biotechnology**. 31: 345-352.

- Liu, Z. L., Ma, M. and Song, M. 2009. Evolutionarily engineered ethanologenic yeast detoxifies lignocellulosic biomass conversion inhibitors by reprogrammed pathways. **Molecular Genetics and Genomics**. 282: 233–244.
- López, M. J., Nichols, N. N., Dien, B. S., Moreno, J. and Bothast, R. J. 2004. Isolation of microorganisms for biological detoxification of lignocellulosic hydrolysates. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 64:125–131.
- Luján-Rhenals, D. E. and Morawicki, R. O. 2016. Production of fermentable sugars and a high protein meal by dilute acid hydrolysis of soybean meal at high temperatures. **Bioresources**. 11: 8155–8165.
- Martín, C., Galbe, M., Wahlbom, C. F., Hahn-Hägerdal, B. and Jönsson, L. J. 2002. Ethanol production from an enzymatic hydrolysate of sugarcane bagasse using recombinant xylose-utilising *Saccharomyces cerevisiae*. **Enzyme and Microbial Technology**. 31: 274-282.
- Martín, C., Marcet, M., Almazán, O. and Jönsson, L. J. 2007. Adaptation of a recombinant xylose-utilizing *Saccharomyces cerevisiae* strain to a sugarcane bagasse hydrolysate with high content of fermentation inhibitors. **Bioresource Technology**. 98: 1767–1773.
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A. and Leão, C. 2004. Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. **Applied Microbiology**. 97: 540–545.
- Menon, V. and Rao, M. 2012. Trends in bioconversion of lignocellulose: Biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. **Progress in Energy and Combustion Science**. 38: 522-550.
- Modig, T., Lidén, G. and Taherzadeh, M. J. 2002. Inhibition effects of furfural on alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase and pyruvate dehydrogenase. **Biochemical**. 363: 769–776.
- Mohagheghi, A., Ruth, M. and Schell, D. J. 2006. Conditioning hemicellulose hydrolysates for fermentation: Effect of overliming pH on sugar and ethanol yields. **Process Biochemistry**. 41: 1806-1811.
- Mood, S. H., Golfeshan, A. H., Tabatabaei, M., Jouzani, G. S., Najafi, G. H., Gholami, M. and Ardjmand, M. 2013. Lignocellulosic biomass to bioethanol, a comprehensive review with a focus on pretreatment. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 27: 77–93.

- Mussatto, S. I. and I. C. Roberto. 2004. Alternatives for detoxification of diluted-acid lignocellulosic hydrolyzates for use in fermentative processes: A review. **Bioresource Technology**. 93: 1-10.
- Narendranath, N. V., Thomas, K. C. and Ingledew W. M. 2001. Effects of acetic acid and lactic acid on the growth of *Saccharomyces cerevisiae* in a minimal medium. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 26: 171-177.
- Nichols, N. N., Sharma, L. N., Mowery, R. A., Chambliss, C. K., van Walsum, G. P., Dien, B. S. and Iten, L. B. 2008. Fungal metabolism of fermentation inhibitors present in corn stover dilute acid hydrolysate. **Enzyme and Microbial Technology**. 42: 624–630.
- Nilvebrant, N. O., Persson, P., Reimann, A., De Sousa, F., Gorton, L. and Jönsson, L. J. 2003. Limits for alkaline detoxification of dilute acid lignocellulose hydrolysates. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 105–108: 615–628.
- Nissen, T. L., Kielland-Brandt, M. C., Nielsen, J. and Villadsen, J. 2000. Optimization of ethanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by metabolic engineering of the ammonium assimilation. **Metabolic Engineering**. 2: 67–77.
- Okuda, N., Sonuera, M., Ninomiya, K., Katakura, Y. and Shioya, S. 2008. Biological detoxification of waste house wood hydrolysate using *Ureibacillus thermosphaericus* for bioethanol production. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 106: 128–133.
- Okudoh, V., Trois, C., Workneh, T. and Schmidt, S. 2014. The potential of cassava biomass and applicable technologies for sustainable biogas production in South Africa: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 39: 1035–1052.
- Olsson, L. and Hahn-Hägerdal, B. 1993. Fermentative performance of bacteria and yeasts in lignocellulose hydrolysates. **Process Biochemistry**. 28: 249-257.
- Olsson, L. and Hahn-Hägerdal, B. 1996. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates for ethanol production. **Enzyme and Microbial Technology**. 18: 312–331.
- Palmqvist, E., Almeida, J. and Hahn-Hägerdal, B. 1999a. Influence of furfural on anaerobic glycolytic kinetics of *Saccharomyces cerevisiae* in batch culture. **Biotechnology and Bioengineering**. 62: 447-454.
- Palmqvist, E., Grage, H., Meinander, N. Q. and Hahn-Hägerdal, B. 1999b. Main and interaction effects of acetic, furfural, and β -hydroxybenzoic acid on growth and ethanol productivity of yeast. **Biotechnology and Bioengineering**. 63: 46-55.

- Palmqvist, E. and Hahn-Hägerdal, B. 2000. Fermentation of lignocellulosic hydrolysates. II: inhibitors and mechanisms of inhibition. **Bioresource Technology**. 74: 25–33.
- Pampulha, M. E. and Loureiro-Dias, M. C. 1989. Combined effect of acetic acid, pH and ethanol on intracellular pH of fermenting yeast. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 20: 286–293.
- Parajó, J. C., Dominguez, H. and Dominguez, J. M. 1998. Biotechnological production of xylitol. Part 3: operation in culture media made from lignocellulose hydrolysates. **Bioresource Technology**. 66: 25–40.
- Parawira, W. and Tekere, M. 2011. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. **Critical Reviews in Biotechnology**. 31: 20–31.
- Parekh, S. R., Yu, S. and Wayman, M. 1986. Adaptation of *Candida shehatae* and *Pichia stipitis* to wood hydrolysates for increased ethanol production. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 25: 300-304.
- Paul Held. 2010. **Monitoring Growth of Beer Brewing Strains of *Saccharomyces cerevisiae***. [online]. Available: <http://www.biotek.com/resources/articles/beer-brewing-synergyh1-yeast-growth.html>.
- Pornpukdeewattana, S., Khamfun, J. and Phatyenchai, N. 2014. Adaptation of commercial yeast *Saccharomyces cerevisiae* SC90 to tolerate inhibitors generated during cassava pulp hydrolysis. **Suranaree Journal of Science and Technology**. 21: 335-345.
- Puri, V. P. and Mammers, H. 1983. Explosive pretreatment of lignocellulosic residues with high-pressure carbon dioxide for the production of fermentation substrates. **Biotechnology and Bioengineering**. 25: 3149–3161.
- Purwadi, R., Brondberg, T. and Taherzadeh, M. J. 2007. A possible industrial solution to ferment lignocellulosic hydrolyzate to ethanol: continuous cultivation with flocculating yeast. **International Journal of Molecular Sciences**. 8: 920-932.
- Roberto, I. C., Lacis, L. C., Barbosa, M. F. S. and Mancilha, I. M. 1991a. Utilization of sugarcane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Pichia stipitis*, for the production of ethanol. **Process Biochemistry**. 26: 15–21.
- Roberto, I. C., Felipe, M. G. A., Lacis, L. C., Silva, S. S. and Mancilha, I. M. 1991b. Utilization of sugar cane bagasse hemicellulosic hydrolysate by *Candida guilliermondii* for xylitol production. **Bioresource Technology**. 36: 271–275.

- Russel, J. B. 1992. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: Anion accumulation versus uncoupling. **Applied Bacteriology**. 73: 363–370.
- Silva, C. J. and Roberto, I. C. 2001. Improvement of xylitol production by *Candida guilliermondii* FTI 20037 previously adapted to rice straw hemicellulosic hydrolysate. **Letters in Applied Microbiology**. 32: 248–252.
- Silva J. P. A., Mussatto, S. I., Roberto, I. C., and Teixeira, J. A. 2011. Ethanol production from xylose by *Pichia stipitis* NRRL Y-7124 in a stirred tank bioreactor. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. 28: 151-156.
- Singh, R., Shukla, A., Tiwari, S. and Srivastava M. 2014. A review on delignification of lignocellulosic biomass for enhancement of ethanol production potential. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**. 32: 713–728.
- Smart, K. A., Chambers, K. M., Lambert, I. and Jenkins, C. 1999. Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. **Journal of the American Society of Brewing Chemists**. 57: 18-23
- Soleymanpour, Z. N. M., Talebnia, F. and Niknezhad, V. 2018. Xantha gum production from acid hydrolyzed broomcorn stem as a sole carbon source by *Xanthomonas campestris*. **3 Biotech**. 8: 296.
- Sreenath, H. K., Koegel, R. G., Moldes, A. B., Jeffries, T. W. and Straub, R. J. 2001. Ethanol production from alfalfa fiber fractions by saccharification and fermentation. **Process Biochemistry**. 36: 1199–1204.
- Srinorakutara, T., Kaewvimol, L. and Saengow, L. 2006. Approach of Cassava Waste Pretreatments for Fuel Ethanol Production in Thailand. **Journal of Scientific Research Chulalongkorn University**. 31: 77-84.
- Sriroth, K., Chollakup, R., Chotineeranatb, S., Piyachomkwan, K. and Oates, C. G. 2000. Processing of cassava waste for improved biomass utilization. **Bioresource Technology**. 71: 63-69.
- Sun, Y. and Cheng, J. 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A review. **Bioresource Technology**. 83: 1-11.
- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L., Niklasson, C., and Lidén, G. 2000a. Inhibition effects of furfural on aerobic batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* growing on ethanol and/or acetic acid. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 90: 374-80.

- Taherzadeh, M. J., Gustafsson, L. and Lidén, G. 2000b. Physiological effects of 5-hydroxymethylfurfural on *Saccharomyces cerevisiae*. **Applied Microbiology and Biotechnology**. 53: 701–708.
- Thomas, K. C., Hynes, S. H. and Ingledew W. M. 2002. Influence of Medium Buffering Capacity on Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* Growth by Acetic and Lactic Acids. **Applied and Environmental Microbiology**. 4: 1616–1623.
- Thompson, O. A., Hawkins, G. M., Gorsich, S. W. and Doran-Peterson, J. 2016. Phenotypic characterization and comparative transcriptomics of evolved *Saccharomyces cerevisiae* strains with improved tolerance to lignocellulosic derived inhibitors. **Biotechnology for biofuels**. 9: 200.
- Tian, S., Zhu, J. and Yang, X. 2011. Evaluation of an adapted inhibitor-tolerant yeast strain for ethanol production from combined hydrolysate of softwood. **Applied Energy**. 88: 1792–1796.
- Tomás-Pejó, E., Ballesteros, M., Oliva, J. M. and Olsson, L. 2010. Adaptation of the xylose fermenting yeast *Saccharomyces cerevisiae* F12 for improving ethanol production in different fed-batch SSF processes. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**. 37: 1211–1220.
- Trakulvichean, S., Chaiprasert, P., Otmakhova, J. and Songkasiri, W. 2017. Comparison of fermented animal feed and mushroom growth media as two value-added options for waste Cassava pulp management. **Waste Management and Research**. 35: 1210-1219.
- van Zyl, C., Prior, B. A. and du Preez, J. C. 1988. Production of ethanol from sugar cane bagasse hemicellulose hydrolyzate by *Pichia stipites*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 17: 357-369.
- Verduyn, C., Postma, E., Scheffers, W. A. and Van Dijken, J. P. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. **Yeast**. 8: 501–517.
- Villa, G. P., Bartroli, R., López, R., Guerra, M., Enrique, M., Peñas, M., Rodríguez, E., Redondo, D., Iglesias, I. and Díaz, M. 1992. Microbial transformation of furfural to furfuryl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Acta Biotechnologica**. 12: 509–512.
- Walker, G. M. 2011. Fuel alcohol: current production and future challenges. **Journal of the Institute of Brewing**. 117: 3-22.

- Wallace-Salinas, V. and Gorwa-Grauslund, M. F. 2013. Adaptive evolution of an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* for combined tolerance to inhibitors and temperature. **Biotechnology for Biofuels**. 6: 151.
- Weil, J. R., Sarikaya, A., Rau, S. L., Goebz, J., Lasisch, C. M., Brwer, M., Hendrickson, R. and Tadisch, M. R. 1998. Pretreatment of corn fiber by pressure cooking in water. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 73: 1–17.
- Wright, J. D. and Power, A. J. 1987. Comparative technical evaluation of acid hydrolysis processes for conversion of cellulose to alcohol. **Energy Biomass Wastes**. 10: 949–971.
- Wyman, C. E. and Goodman, B. J. 1993. Biotechnology for production of fuels, chemicals, and materials from biomass. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 39: 41-59.
- Yang, B. and Wyman, C. E. 2008. Pretreatment: the key to unlocking low-cost cellulosic ethanol. **Biofuels Bioproducts and Biorefining**. 2: 26–40.
- Yat, S. C., Berger, A. and Shonnard, D. R. 2008. Kinetic characterization of dilute surface acid hydrolysis of timber varieties and switchgrass. **Bioresource Technology**, 99. 3855–3863.
- Yu, Z. and Zhang, H. 2003. Ethanol fermentation of acid-hydrolyzed cellulosic pyrolysate with *Saccharomyces cerevisiae*. **Bioresource Technology**. 90: 95-100.
- Zhang, L., Li, X., Yong, Q., Yang, ST., Ouyang, J. and Yu, S. 2016. Impacts of lignocellulose-derived inhibitors on L-lactic acid fermentation by *Rhizopus oryzae*. **Bioresource Technology**. 203: 173–180.
- Zheng, Y., Pan, Z. and Zhang, R. 2009. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. **International Journal of Agricultural and Biological Engineering**. 2: 51-68.
- Zhu, J. J., Yong, Q., Xu, Y., Chen, S. X. and Yu, S. Y. 2009. Adaptation fermentation of *Pichia stipitis* and combination detoxification on steam exploded lignocellulosic prehydrolyzate. **Natural Science**. 1: 47-54.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

ก.1.1 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium

Yeast Extract	10	กรัม
Peptone	20	กรัม
Dextrose (Glucose)	20	กรัม
น้ำกรอง	1000	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ผสมสารอาหารต่างๆเข้าด้วยกันลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกรองปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ทำการปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง เทสารละลายที่ได้ลงในขวดคูเรนแล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.2 Yeast Peptone Dextrose (YPD) Agar

Yeast Extract	1	กรัม
Peptone	2	กรัม
Dextrose (Glucose)	2	กรัม
Agar	2	กรัม
น้ำกรอง	100	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ผสมสารอาหารต่างๆเข้าด้วยกันลงในบีกเกอร์ เติมน้ำกรองปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ทำการปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง เทสารละลายที่ได้ลงในขวดคูเรนสำหรับเทลงในจานเพาะเชื้อหรือคูดใส่หลอดทดลองเพื่อทำอาหารวุ้นเลี้ยง แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.3 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมสารยับยั้งแต่ละชนิด

ก.1.3.1 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมกรดอะซิติก

Yeast Extract	15	กรัม
Peptone	30	กรัม
Dextrose (Glucose)	30	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2 M Sodium acetate trihydrate (Stock solution)

น้ำกรอง

วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เทน้ำกรองปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรด ฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดคูลูแรนขวดละ 200 มิลลิลิตร (จำนวน 5 ขวด) แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลาย Sodium acetate trihydrate ที่ฆ่าเชื้อและปรับค่า pH เป็น 5.5 แล้วลงในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นขวดละ 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ โดยคำนวณจากสูตร $N_1 V_1 = N_2 V_2$ (N_1 คือ ความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการใช้ N_2 คือ ความเข้มข้นของสารละลาย stock solution V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการใช้ V_2 คือ ปริมาตรของสารละลาย stock solution ที่ต้องใช้ในการเตรียม) แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

ก.1.3.2 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมกรดฟอร์มิก

Yeast Extract	15	กรัม
Peptone	30	กรัม
Dextrose (Glucose)	30	กรัม
2 M Sodium formate (Stock solution)		
น้ำกรอง		

วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เทน้ำกรองปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรด ฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดคูลูแรนขวดละ 200 มิลลิลิตร (จำนวน 5 ขวด) แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลาย Sodium formate ที่ฆ่าเชื้อและปรับค่า pH เป็น 5.5 แล้วลงในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นขวดละ 100 200 300 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

ก.1.3.3 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมกรดลิวลินิก

Yeast Extract	15	กรัม
---------------	----	------

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peptone	30	กรัม
Dextrose (Glucose)	30	กรัม
98% Levulinic acid น้ำกรอง		

วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เเท่น้ำกรองปริมาตร 500 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดคูเรนขวดละ 200 มิลลิลิตร (จำนวน 5 ขวด) ผสม Levulinic acid ลงในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นขวดละ 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิโมลาร์ จากนั้นทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรอง นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.3.4 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมเฟอฟูรัล

Yeast Extract	12	กรัม
Peptone	24	กรัม
Dextrose (Glucose)	24	กรัม
1 M Furfural (Stock solution) น้ำกรอง		

วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เเท่น้ำกรองปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 800 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดคูเรนขวดละ 200 มิลลิลิตร (จำนวน 4 ขวด) แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลาย Furfural ลงในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นขวดละ 6.25, 12.5, 18.75 และ 25 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

ก.1.3.5 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสม 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรัล

Yeast Extract	12	กรัม
Peptone	24	กรัม
Dextrose (Glucose)	24	กรัม

1.06 M 5-HMF (Stock solution)

น้ำกรอง

วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เทน้ำกรองปริมาตร 400 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรด ฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 800 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดคูแรมขวดละ 200 มิลลิลิตร (จำนวน 4 ขวด) แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลาย 5-HMF ลงในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นขวดละ 6.25, 12.5, 18.75 และ 25 มิลลิโมลาร์ แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

ก.1.4 Yeast Peptone Dextrose (YPD) medium ผสมสารยับยั้งผสมทั้ง 5 ชนิด

Yeast Extract	12	กรัม
Peptone	24	กรัม
Dextrose (Glucose)	24	กรัม
4.05 M Sodium acetate trihydrate (Stock solution)		
5.1 M Sodium formate (Stock solution)		
3.75 M Levulinic acid (Stock solution)		
1 M Furfural (Stock solution)		
1.06 M 5-HMF (Stock solution)		
น้ำกรอง		

วิธีทำ

ผสมสารอาหาร Yeast Extract Peptone และ Dextrose ลงในบีกเกอร์ เทน้ำกรองปริมาตร 300 มิลลิลิตร ลงในสารอาหารให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรด ฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 600 มิลลิลิตร ด้วยกระบอกตวง แบ่งใส่ขวดคูแรมขวดละ 150 มิลลิลิตร (จำนวน 4 ขวด) แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ผสมสารละลายทั้ง 5 ชนิด คือ Sodium acetate trihydrate, Sodium formate, Levulinic acid, Furfural และ 5-HMF ลงไปในอาหาร YPD ให้มีความเข้มข้นของสารยับยั้งผสมทั้ง 4 ระดับตามที่ระบุไว้ในตารางที่ 3.1 แล้วปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 300 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกรองที่ฆ่าเชื้อแล้ว

ก.1.5 อาหารปรับสภาพเชื้อยีสต์

Yeast Extract	5	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7.5	กรัม
KH_2PO_4	3.5	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.75	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1	กรัม
Dextrose (Glucose)		
สารละลายกากมันสำปะหลัง		
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ปริมาณสารละลายกากมันสำปะหลัง น้ำกลั่น และน้ำตาลที่ใช้เป็นส่วนผสมในอาหารปรับสภาพทั้ง 5 สูตร ดังตารางที่ ก-1 ทำการผสมสารอาหารต่างๆ และน้ำตาลลงในบีกเกอร์ เทน้ำกลั่นครึ่งหนึ่งของปริมาณที่ใช้ลงในสารอาหาร ให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย เทสารละลายกากมันสำปะหลังลงไป ในอาหาร ผสมให้เข้ากัน ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง เทสารละลายที่ได้ลงในขวดคูลูเรน แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ตารางที่ ก-1 สูตรอาหารปรับสภาพที่ใช้ในการปรับตัวของเชื้อยีสต์

ความเข้มข้น (%)	สารละลายกากมันสำปะหลัง (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่น (มิลลิลิตร)	Dextrose (กรัม)
0	0	1000	46.52
20	200	800	37.22
40	400	600	27.91
60	600	400	18.61
80	800	200	9.30
100	1000	0	0

ก.1.6 เพลทสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 0% (ปริมาตร/ปริมาตร) (0% (v/v) cassava hydrolysate medium agar)

Yeast Extract	0.5	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.75	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KH_2PO_4	0.35	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.075	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Dextrose (Glucose)	4.65	กรัม
Agar	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ผสมสารอาหารต่างๆเข้าด้วยกันลงในบีกเกอร์ เทน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เทสารละลายที่ได้ลงในขวดคูแรนสำหรับทดลองในงานเพาะเชื้อหรือตู้ใส่หลอดทดลองเพื่อทำอาหารวุ้นเอียง แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.7 เพลทสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 50% (ปริมาตร/ปริมาตร) (50% (v/v) cassava hydrolysate medium agar)

Yeast Extract	0.5	กรัม
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.75	กรัม
KH_2PO_4	0.35	กรัม
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.075	กรัม
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.1	กรัม
Dextrose (Glucose)	2.33	กรัม
Agar	2	กรัม
สารละลายกากมันสำปะหลัง	50	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ผสมสารอาหารต่างๆเข้าด้วยกันลงในบีกเกอร์ เทสารละลายกากมันสำปะหลัง 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เทสารละลายที่ได้ลงในขวดคูแรนสำหรับทดลองในงานเพาะเชื้อหรือตู้ใส่หลอดทดลองเพื่อทำอาหารวุ้นเอียง แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.1.8 เพลทสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) (100% (v/v) cassava hydrolysate medium agar)

Yeast Extract	0.5	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.75	กรัม
KH ₂ PO ₄	0.35	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.075	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.1	กรัม
Agar	2	กรัม
สารละลายกากมันสำปะหลัง	100	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ผสมสารอาหารต่างๆเข้าด้วยกันลงในบีกเกอร์ เพลทสารละลายกากมันสำปะหลัง 50 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 100 มิลลิลิตร ด้วยสารละลายกากมันสำปะหลัง เพลทสารละลายที่ได้ลงในขวดคูเรนสำหรับเทลงในจานเพาะเชื้อหรือคูดใส่หลอดทดลองเพื่อทำอาหารวุ้นเอียง แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.1.7 อาหารสารละลายกากมันสำปะหลังความเข้มข้น 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) เติร์มโนโตรเจนด้วย (NH₄)₂SO₄

Yeast Extract	5	กรัม
(NH ₄) ₂ SO ₄	1, 3, 5, 7.5	กรัม
KH ₂ PO ₄	3.5	กรัม
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.75	กรัม
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1	กรัม
สารละลายกากมันสำปะหลัง	1000	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ผสมสารอาหารต่างๆ และ (NH₄)₂SO₄ ลงในบีกเกอร์ เพลทสารละลายกากมันสำปะหลัง 500 มิลลิลิตร ให้ความร้อนจนสารอาหารต่างๆละลาย ทำการปรับค่า pH ด้วยกรดฟอสฟอริกหรือโซเดียมไฮดรอกไซด์ให้ได้เท่ากับ 5.5 เพลทสารละลายกากมันสำปะหลังที่เหลือผสมไปในอาหารและปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 1000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เพลทสารละลายที่ได้ลงในขวดคูเรนแล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 การเตรียมสารเคมี

ก.2.1 การเตรียมสีย้อม Methylene violet

Sodium Citrate	2	กรัม
Methylene violet	0.01	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ละลาย Sodium Citrate ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร ละลาย Methylene violet ด้วยสารละลาย Sodium Citrate เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

ก.2.2 สารละลาย NaCl 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

Sodium chloride	0.8	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ละลาย Sodium chloride ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เทสารละลายที่ได้ลงในขวดคูแรน แล้วนำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.2.3 สารละลาย 0.6 M H₂SO₄

98% Sulfuric acid	32.64	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ค่อยๆผสม Sulfuric acid ลงในน้ำกลั่น (เตรียมในตู้ดูดควัน) แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

ก.2.4 สารละลาย 10 M NaOH

Sodium Hydroxide	399.97	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ละลาย Sodium Hydroxide ด้วยน้ำกลั่นที่ละน้อยจนครบ 399.97 กรัม (เตรียมในตู้ดูดควัน) ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดพลาสติก

ก.2.5 สารละลาย 5% Phenol

Phenol	5	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ละลาย Phenol ในน้ำกลั่น (เตรียมในตู้ดูดควัน) แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย
ขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

ก.2.6 สารละลาย 2 M Sodium acetate trihydrate

Sodium acetate trihydrate	27.22	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ละลาย Sodium acetate trihydrate ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย
ขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

ก.2.7 สารละลาย 4.05 M Sodium acetate trihydrate

Sodium acetate trihydrate	55.11	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ละลาย Sodium acetate trihydrate ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วย
ขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

ก.2.8 สารละลาย 2 M Sodium formate

Sodium formate	13.6	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ละลาย Sodium formate ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับ
ปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

ก.2.9 สารละลาย 5.1 M Sodium formate

Sodium formate	34.69	กรัม
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ละลาย Sodium formate ในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

ก.2.10 สารละลาย 3.75 M Levulinic acid

Levulinic acid	76.79	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น		

วิธีทำ

ผสม Levulinic acid ลงในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

ก.2.11 สารละลาย 1 M Furfural

Furfural	4.14	มิลลิลิตร
99.5% Ethanol	45.86	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ละลาย Furfural ใน Ethanol และผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา

ก.2.12 สารละลาย 1.06 M 5-HMF

5-HMF	4.02	มิลลิลิตร
99.5% Ethanol	35.63	มิลลิลิตร

วิธีทำ

ละลาย 5-HMF ใน Ethanol และผสมให้เข้ากัน เก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.1 วิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงของเชื้อ

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- สารละลาย NaCl 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่างน้ำหมักมาเจือจางด้วยสารละลาย NaCl ให้มีค่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสม แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร โดยค่าที่เหมาะสมควรอยู่ในช่วง 0.2-0.8

ข.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยใช้สีย้อม Methylene violet

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

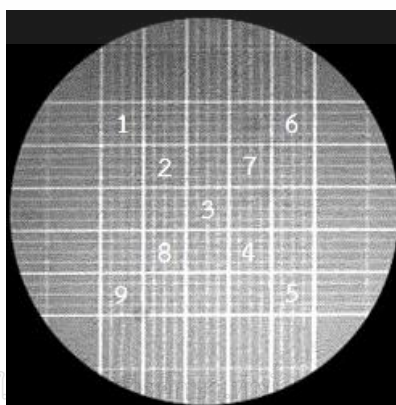
- กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
- Hemocytometer

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- สีย้อม Methylene violet
- สารละลาย NaCl 0.8% โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

วิธีวิเคราะห์

1. นำตัวอย่างสารละลายเซลล์มาเจือจางสารละลายเซลล์โดยใช้สารละลาย NaCl จนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ
2. นำสารละลายเซลล์ที่เจือจางแล้วมาย้อมสีโดยการใส่สีย้อม Methylene violet โดยใช้สารละลายเซลล์ต่อสีย้อมในอัตราส่วน 1:1
3. นำสารละลายเซลล์ที่ย้อมสีแล้วมานับเซลล์โดยใช้ Hemocytometer โดยนับปริมาณเซลล์ 9 ช่องตามแนวทแยงดังภาพที่แสดง โดยให้ในแต่ละช่องมีปริมาณเซลล์ 10-30 เซลล์ โดยเซลล์เป็นจะไม่ติดสีย้อม และเซลล์ตายจะติดสีย้อมของ Methylene violet



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ภายในเท่านั้น ไม่ควรเผยแพร่ไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. นำปริมาณเซลล์ที่ได้มาคำนวณด้วยสูตร $\frac{\text{ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่นับได้} \times \text{ค่าการเจือจาง}}{4 \times 10^{-6}}$

จะได้ปริมาณเซลล์ในหน่วย เซลล์ต่อมิลลิลิตร

วิธีคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ

ได้มาจากการประมาณจากกราฟความสัมพันธ์ของสมการเส้นตรงระหว่างค่าลอการิทึมธรรมชาติของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และเวลาในระยะเพิ่มจำนวน (log phase) ของเชื้อยีสต์ จะได้ค่าความชันเป็นอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ ดังสมการ (3)

$$\mu \text{ (ชั่วโมง}^{-1}\text{)} = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{t - t_0} \quad (3)$$

โดย μ = อัตราการเจริญจำเพาะ

X_t = มวลชีวภาพเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา t ชั่วโมง

X_0 = มวลชีวภาพเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา t_0 ชั่วโมง

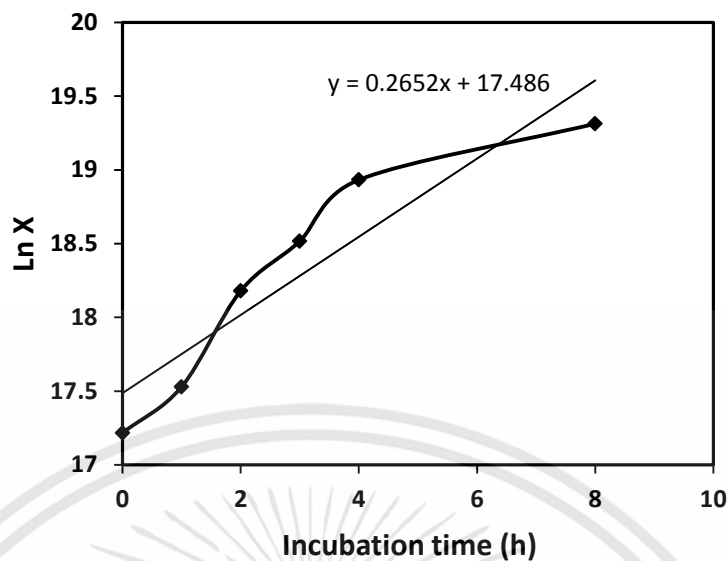
t = เวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ในช่วง X_t

t_0 = เวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ในช่วง X_0

ตารางที่ ข-1 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตและค่าลอการิทึมของจำนวนเซลล์ยีสต์ในช่วงระยะเพิ่มจำนวน

ชั่วโมงที่	เซลล์ที่มีชีวิต (เซลล์/มิลลิลิตร)	ลอการิทึมธรรมชาติของ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ($\ln X$)	อัตราการเจริญเติบโต จำเพาะ (ชั่วโมง ⁻¹)
0 (t_0)	3.01×10^7 (X_0)	17.22	
1	4.10×10^7	17.53	
2	7.86×10^7	18.18	
3	1.10×10^8	18.52	0.27
4	1.67×10^8	18.93	
8 (t)	2.44×10^8 (X_t)	19.31	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ข-1 ตัวอย่างการคำนวณอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของเชื้อยีสต์

ข.3 วิธีวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นเหวี่ยงตกตะกอน
- ตู้อบลมร้อน
- โถดูดความชื้น

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- น้ำกลั่น

วิธีวิเคราะห์

1. เตรียมหลอดทดลองที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอน 2 หลอด
2. ดูดตัวอย่างน้ำหมัก 5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง
3. นำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
4. เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปเหวี่ยงแยกอีกครั้ง
5. รินส่วนใสทิ้งนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. ทิ้งให้เย็นในเดสิคเคเตอร์ และนำไปชั่งน้ำหนัก
7. คำนวณหาน้ำหนักแห้ง ดังสมการ

$$\text{น้ำหนักแห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{น้ำหนักหลอดและเซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{น้ำหนักหลอด (กรัม)} \times 1000}{\text{ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)}}$$

ปริมาตรตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.4 วิธีวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยวิธีฟินอล-ซัลฟิวริก

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง
- คิวเวต

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- สารละลาย 5% Phenol
- กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (98% Sulfuric acid)
- น้ำกลั่น

วิธีวิเคราะห์

1. เติมสารละลาย Phenol 1 มิลลิลิตร ลงในสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ทำ blank โดยใช้ น้ำกลั่น แทนตัวอย่าง)
2. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 10 นาที
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร
4. นำค่าที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้นในช่วง 10 - 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยการละลายน้ำตาลกลูโคส 0.04 กรัมในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดปรับปริมาตร นำสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 10, 20, 40, 60 และ 80 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ ข-2 การเจือจางสารละลายกลูโคสมาตรฐาน และค่า OD₄₈₀ ของกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอด ที่	การเจือจาง		ความเข้มข้นของกลูโคส (ไมโครกรัม/มล.)	OD ₄₈₀
	สารมาตรฐาน (มล.)	น้ำกลั่น (มล.)		
1	0	10	0	0
2	0.25	9.75	10	0.103
3	0.5	9.5	20	0.200
4	1	9	40	0.412
5	1.5	8.5	60	0.612
6	2	8	80	0.825

ข.5 วิธีวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่อง โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- คอลัมน์ Supelcogel H 59346 ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร
- เครื่องตรวจวัดชนิด refractive index

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 0.1% Phosphoric acid
- 99.5% Ethanol
- Isopropanol

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางแล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร
2. ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ใช้น้ำยาละลาย Phosphoric acid ซึ่งเป็นสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.17 มิลลิลิตรต่อนาที
3. กำหนดความเข้มข้นของเอทานอลในสารละลายตัวอย่างจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานเอทานอล

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร
2. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายใน โดยใช้ Isopropanol
3. ผสมสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐาน ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะเดียวกัน นำโครมาโตแกรมที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ข-3 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐานเอทานอลที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัม/ลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ (retention time = 26.525 นาที)
1	0	0
2	5	0.144
3	10	0.293
4	15	0.450
5	20	0.592
6	25	0.733

ข.6 วิธีวิเคราะห์หองค์ประกอบ และปริมาณน้ำตาลแต่ละชนิดโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่อง โครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- คอลัมน์ Supelcogel H 59346 ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร
- เครื่องตรวจวัดชนิด refractive index

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 0.1% Phosphoric acid
- Glucose
- Xylose
- Arabinose
- Isopropanol

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางแล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร
2. ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ะด้วยสารละลาย Phosphoric acid ซึ่งเป็นสารละลายเคลื่อนที่ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.17 มิลลิลิตรต่อนาที

3. คำนวณความเข้มข้นของกรดแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่างจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานน้ำตาลแต่ละชนิด

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส ไชโลส และอะราบีโนสความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้ Isopropanol

3. ผสมสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐาน ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะเดียวกัน นำโครมาโตแกรมที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ข-4 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐานน้ำตาลแต่ละชนิดที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ความเข้มข้นของสาร ยับยั้ง (กรัม/ลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ		
		กลูโคส (retention time = 11.7 นาที)	ไชโลส (retention time = 12.6 นาที)	อะราบีโนส (retention time = 13.8 นาที)
1	0	0	0	0
2	5	0.444	0.500	0.456
3	10	0.903	1.007	0.920
4	15	1.345	1.493	1.371
5	20	1.774	1.964	1.804
6	25	2.259	2.518	2.299

ข.7 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งโดยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

ข.7.1 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งประเภทกรด

อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- คอลัมน์ Supelcogel H 59346 ขนาด 250×4.6 มิลลิเมตร
- เครื่องตรวจวัดชนิด refractive index

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 0.1% Phosphoric acid
- Acetic acid
- Formic acid
- Levulinic acid
- Isopropanol

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางแล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร

2. ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ะด้วยสารละลาย Phosphoric acid ซึ่งเป็นสารละลายเคลื่อนที่ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.17 มิลลิลิตรต่อนาที

3. คำนวณความเข้มข้นของกรดแต่ละชนิดในสารละลายตัวอย่างจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานสารยับยั้งประเภทกรด

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกรดลิวลินิก ความเข้มข้น 0, 5, 10, 15, 20 และ 25 กรัมต่อลิตร

2. เตรียมสารละลายมาตรฐานภายในโดยใช้ Isopropanol

3. ผสมสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐาน ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะเดียวกัน นำโครมาโตแกรมที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ข-5 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานภายในต่อสารละลายมาตรฐานสารยับยั้งประเภทกรดที่ความเข้มข้นต่างๆ

หลอดที่	ความเข้มข้นของสารยับยั้ง (กรัม/ลิตร)	พื้นที่ใต้กราฟ		
		กรดอะซิติก (retention time = 20.941 นาที)	กรดฟอร์มิก (retention time = 19.536 นาที)	กรดลิวลินิก (retention time = 23.858 นาที)
1	0	0	0	0
2	5	0.226	0.203	0.379
3	10	0.448	0.407	0.769
4	15	0.698	0.617	1.171
5	20	0.923	0.811	1.548
6	25	1.150	1.003	1.928

ข.7.2 วิธีวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งประเภทฟูแรน อุปกรณ์ในการวิเคราะห์

- เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง
- คอลัมน์ ZORBAX RRHT SB-C18 ขนาด 50×3 มิลลิเมตร ขนาดอนุภาค 1.8 ไมโครเมตร
- เครื่องตรวจวัดชนิด diode-array

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์

- 0.1% formic acid
- 0.1 % acetonitrile
- Furfural
- 5-HMF

วิธีวิเคราะห์

1. นำสารละลายตัวอย่างมาเจือจางแล้วนำไปกรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมโครเมตร
2. ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงปริมาณ 10 ไมโครลิตร โดยควบคุมอุณหภูมิคอลัมน์ เท่ากับ 40 องศาเซลเซียส ะด้วยสารละลาย 0.1% (ปริมาตร/ปริมาตร) Formic acid และสารละลาย 0.1 % (ปริมาตร/ปริมาตร) Acetonitrile ด้วยอัตราการไหลเท่ากับ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที และตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 282 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. กำหนดความเข้มข้นของเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัลในสารละลาย ตัวอย่างจากการเทียบกับกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานสารยับยั้งประเภทฟูแรน

1. เตรียมสารละลายมาตรฐานเฟอพิวรัล และ 5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล ให้มีความเข้มข้นอย่างละ 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1 กรัมต่อลิตร

2. ฉีดสารเข้าเครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูงโดยใช้สภาวะเดียวกัน นำโครมาโตแกรมที่ได้ไปสร้างกราฟมาตรฐาน

ตารางที่ ข-6 ค่าพื้นที่ใต้กราฟของสารละลายมาตรฐานสารยับยั้งประเภทฟูแรนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

หลอดที่	ความเข้มข้นของสาร		พื้นที่ใต้กราฟ	
	ยับยั้ง (กรัม/ลิตร)	เฟอพิวรัล (retention time = 12.189 นาที)	5-ไฮดรอกซีเมทิลเฟอพิวรัล (retention time = 8.783 นาที)	
1	0	0	0	
2	0.2	0.062	0.138	
3	0.4	0.120	0.280	
4	0.6	0.179	0.421	
5	0.8	0.244	0.556	
6	1	0.304	0.696	

ประวัติผู้เขียน

- ชื่อ-นามสกุล นางสาว ภคธมณ ปาลกะวงศ์ ณ อยุธยา
- วัน เดือน ปีเกิด 23 ธันวาคม 2534 จังหวัด กรุงเทพมหานคร
- ที่อยู่ 142/46 ซอยร่มเกล้า 21 ถนนร่มเกล้า แขวงคลองสามประเวศ เขต
ลาดกระบัง จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10250
- ประวัติการศึกษา - พ.ศ. 2556 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบัน
เทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- พ.ศ. 2557 ศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขา
วิทยาศาสตรการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระ
จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- ประวัติการทำงาน - พ.ศ. 2557 ผู้ช่วยนักวิจัย เรื่องการประเมินความเสี่ยงด้านจุลินทรีย์ตาม
สุขลักษณะที่ดีของร้านอาหาร ภายใต้โครงการ “การพัฒนาอุตสาหกรรม
อาหารของไทยให้เป็นครัวอาหารคุณภาพของโลก” ปีงบประมาณ 2557
(Thailand Food Quality to the World)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้