รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักไบโอเอทานอลโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

Factors Affecting Bioethanol Fermentation By *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

นางสาวปรียานุช ศรีไพบูลย์
นางสาวเบญจมาศ เขตรดง
รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2559 คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักไบโอเอทานอลโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

Factors Affecting Bioethanol Fermentation By *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

นางสาวปรียานุช ศรีไพบูลย์
นางสาวเบญจมาศ เขตรดง
รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์
ประจำปีงบประมาณ 2559 คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

หัวข้อโครงการวิจัย ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักไบโอเอทานอลโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

แหล่งเงินทุน(ระบุแหล่งทุน) เงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2559
จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 50,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี เริ่มตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2558 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2559
ชื่อ-สกุล หัวหน้าโครงการวิจัย
นางสาวปรียานุช ศรีไพบูลย์
นางสาวเบญจมาศ เขตรดง
รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ในอาหารหมัก YFM เลี้ยงในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักพบว่า การหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส โดยที่ 48 ชั่วโมงของการหมักให้ปริมาณ 29.61 ± 0.17 กรัมต่อลิตร เมื่ออุณหภูมิในการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณเอทานอลที่ได้จะลดลง จากการใช้พีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักที่พีเอช 4.5 5.0 5.5 และ6.0 พบว่า อาหาร YFM ที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.0 ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการใช้อาหารที่พีเอชอื่น โดยที่ 48 ชั่วโมงของการหมักให้ปริมาณเอทานอล 33.05 ± 0.42 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจนคือยีสต์สกัดในความเข้มข้น 6 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด โดยที่ 48 ชั่วโมงของการหมักให้ปริมาณเอทานอล 33.62 ± 0.48 กรัมต่อลิตร จากการศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสซึ่งเป็นสับเตรทในการผลิตเอทานอล พบว่าการใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 250 กรัมต่อลิตรให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด โดยที่ 48 ชั่วโมงของการหมักให้ปริมาณเอทานอล 36.87 ± 0.38 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นกลูโคสที่สูงขึ้น ปริมาณเอทานอลจะลดลง

คำสำคัญ : เอทานอล, สภาวะที่เหมาะสม, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

Research Title : Factors Affecting Bioethanol Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

Researcher : Miss.Priyanush Sripriboon

Miss.Benjamas Kaddong

Assoc.Prof.Duangjai Ochaikul

Faculty : Science, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Department : Biology

ABSTRACT

This research focused on optimization of bioethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088. They were cultured in YFM broth with limited shaker conditions at 150 rpm for 96 hours fermentation period. The results have indicated that optimum temperature of bioethanol fermentation was 30°C. This temperature obtained the maximum ethanol production, compared to those of temperature at 35°C and 40°C. At 48 hr. incubation, *S. cerevisiae* TISTR 5088 gave the highest ethanol concentration of 29.61 ± 0.17 g/l . When the temperature of fermentation increased, The ethanol production also decreased. The initial pH of 5.0 in YFM broth resulted in the highest ethanol production (33.05 ± 0.42 g/L) at 48 hr. Yeast extract was nitrogen source. Yeast extract concentrations of 6 g/l gave the highest ethanol production (33.62 ± 0.48 g/L). Glucose was a substrate of ethanol fermentation. Glucose concentrations of 250 g/l. gave the highest ethanol was 36.87 ± 0.38 g/l at 48 hr. Increasing of glucose concentration resulted in a decline of ethanol production.

Keywords : Ethanol, *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088, Optimization

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยความร่วมมือของทีมวิจัยชุดนี้ และขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยาทุกท่านที่ได้เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และสารเคมีบางส่วนในการทำวิจัย งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ประจำปีงบประมาณ 2559

นางสาวปรียานุช ศรีไพบูลย์
นางสาวเบญจมาศ เขตรดง
รองศาสตราจารย์ดวงใจ โอชัยกุล
คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย	2
1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย	3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 เอทานอล	4
2.1.1 เอทานอล	4
2.1.2 การนำเอทานอลไปใช้ในรูปเชื้อเพลิง	5
2.1.3 สถานการณ์การใช้เอทานอล เป็นพลังงานทดแทนในประเทศไทย	5
2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล	6
2.2.1 การผลิตเอทานอลจากการสังเคราะห์ทางเคมี	6
2.2.2 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมัก	7
2.2.3 การกลั่นเอทานอล	8
2.3 เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	8
2.3.1 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	8
2.3.2 วงจรชีวิตของยีสต์	9
2.3.3 ยีสต์ที่ผลิตเอทานอล	9
2.4 วัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล	10
2.5 ชีวเคมีของกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์	11

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักเอทานอล	13
2.6.1 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์	13
2.6.2 ความเข้มข้นของน้ำตาล	13
2.6.3 อุณหภูมิ	13
2.6.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH)	14
2.6.5 ความเข้มข้นของเอทานอล	14
2.6.6 ปริมาณออกซิเจน	14
2.6.7 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์	14
2.6.8 แหล่งไนโตรเจน	14
2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	15
บทที่ 3 วิธีการดำเนินงาน	
3.1 เชื้อจุลินทรีย์	17
3.2 สารเคมี	17
3.3 วัสดุอุปกรณ์	17
3.4 วิธีการทดลอง	18
3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น	18
3.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088	18
3.4.2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิ	18
3.4.2.2 การศึกษาผลของพีเอช	18
3.4.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัด	18
3.4.2.4 การศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส	18
3.4.3 การวิเคราะห์	19
3.4.3.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง	19
3.4.3.2 การวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method	19
3.4.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล	20
3.4.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	
4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088	21
4.1.1 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088	21

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.1.2 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก YFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088	24
4.1.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหาร YFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088	27
4.1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ในอาหารหมัก YFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088	31
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	
5.1 สรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	38

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของเอทานอล	4
2.2 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตเอทานอลของจีนัส *Saccharomyces*	9

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 การเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลโดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส	7
2.2 วงจรการแตกหน่อของยีสต์	9
2.3 การผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร	11
2.4 วิถีไกลโคไลซิส(Glycolysis) ประกอบด้วยปฏิกิริยา 10 ขั้นตอน	14
2.5 ปฏิกิริยาเปลี่ยนไพรูเวตเป็นเอทานอล	15
4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 หมักในอาหารYFM ที่อุณหภูมิต่างๆ ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	21
4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารYFM หมักโดย *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่อุณหภูมิต่างๆ ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	22
4.3 ปริมาณเอทานอลในอาหารYFM หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่อุณหภูมิต่างๆ ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	23
4.4 ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป($Y_{p/s}$) ในอาหารYFMหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่อุณหภูมิต่างๆ ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	23
4.5 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 หมักในอาหารYFM ที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน ที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	25
4.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารYFM ที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆ หมักโดย *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	25
4.7 ปริมาณเอทานอลในอาหารYFM ที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆ หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	26
4.8 ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป($Y_{p/s}$) ในอาหารYFM ที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	27
4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 หมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ระดับต่างๆ ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	28
4.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	29
4.11 ปริมาณเอทานอลในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นแตกกัน ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	30
4.12 ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) ในอาหาร YFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด ที่แตกต่างกัน หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	30
4.13 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 หมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง	32
4.14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	33

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.15 ปริมาณเอทานอลในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง	34
4.16 ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) ในอาหาร YFM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ระยะเวลาในการ 48 ชั่วโมง	34
4.17 การเจริญและการผลิตเอทานอลจากอาหารหมัก YFM ในสภาวะที่เหมาะสมโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง	36

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ คือ แอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง ที่มีสูตรทางเคมี C_2H_5OH มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟง่าย และค่าออกเทนสูง สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย เช่น ใช้ผลิตอาหารและเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้เป็นตัวทำละลายในอุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิง เป็นต้น

เอทานอลผลิตได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยมีเอทิลีนเป็นวัตถุดิบ และกระบวนการทางชีวเคมีโดยการใช้พืชหรือวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่มีแป้ง และน้ำตาลสูงเป็นวัตถุดิบ ซึ่งกระบวนการทางชีวเคมีเป็นกระบวนการที่ได้รับความนิยม และมีวัตถุดิบหลายชนิดที่เหมาะสมของแต่ละประเทศ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง มันสำปะหลัง อ้อย กากน้ำตาล สาหร่าย เป็นต้น นอกจากนี้มีวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส เช่น ฟางข้าว ขี้เลื่อย หญ้า มาใช้เป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล

การใช้เอทานอลเป็นพลังงานเชื้อเพลิงจะช่วยอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม เนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่ปราศจากสารมลพิษ เช่น ซัลเฟอร์ และมีโมเลกุลของออกซิเจนเป็นส่วนประกอบร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก เมื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์จึงเกิดการเผาไหม้ที่สมบรูณ์มากกว่าเชื้อเพลิงทั่วไป ระบบเครื่องยนต์ที่ใช้เอทานอลจึงสะอาดกว่าเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันเบนซิน หรือดีเซล

ไบโอเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักมีขั้นตอนสำคัญคือ กระบวนการหมัก เนื่องจากเป็นขั้นตอนที่จุลินทรีย์เป็นตัวเปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายเป็นเอทานอล โดยเลือกใช้จุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับวัตถุดิบที่นำมาหมัก ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก โดยจะได้เอทิลแอลกอฮอล์หรือเอทานอลที่มีความเข้มข้นประมาณร้อยละ 8-12 โดยประมาณ การเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการหมัก เช่นเอทานอลที่หมักจากแป้งและน้ำตาลนิยมใช้ *Saccharomyces cerevisiae*วัตถุดิบประเภทหางนมนิยมใช้ *Candida pseudotropicalis* หรือ *Kluyveromyces marxianus* ถ้าใช้น้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมกระดาษจะใช้ candida utilis ในการหมัก (พรพิมล และคณะ, 2527)

มีรายงานการวิจัยมากมายเกี่ยวกับการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักไบโอเอทานอลโดยจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เช่น Lin และคณะ (2012) ได้ศึกษาผลของพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและการผลิตเอทานอล พบว่า ปกติเชื้อยีสต์จะเจริญได้ดีในอาหารที่เป็นกรดเล็กน้อย ในการหมักเอทานอลควรปรับพีเอชอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็นกรด เนื่องจากจะช่วยชะลอหรือยับยั้งแบคทีเรียที่จะมาปนเปื้อนได้ เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้ดีในอาหารที่เป็นกลาง ดังนั้นอาหารที่เป็นกรด (pH ต่ำ) จะยับยั้งแบคทีเรียได้ดี Walker (1998) ได้ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *Saccharomy cescerevisiae* พบว่าเอนนี้สามารถเจริญดีที่อุณหภูมิปานกลางในช่วง 25-30 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีอาหารสมบูรณ์ยีสต์จะทนอุณหภูมิสูงได้ดี และจะหยุดการเจริญเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียสและมากกว่า 40 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการควบคุมอุณหภูมิในการหมักเป็นสิ่งสำคัญ เพื่อทำให้การหมักเอทานอลมีประสิทธิภาพดีขึ้น

Hacking และคณะ (1998) ศึกษาการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida pseudotropicalis* และ *Kluyveromyces marxianus* โดยใช้น้ำตาลกูลโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ 140 กรัมต่อลิตร พบว่ายีสต์ทั้งสามชนิดสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดร้อยละ 8 (ปริมาตรโดยปริมาตร) เมื่อบ่มที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 72 ชั่วโมง

D' Amore และคณะ (1989) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อยีสต์ Saccharomyces diastaticus No.62 สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ผลผลิตสูง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YFM ที่มียีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร เทียบกับอาหาร YFM ที่เพิ่มยีสต์สกัดเป็น 2 เท่า (6 กรัมต่อลิตร) พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดเพิ่มขึ้นจะทำให้ *S. diastaticus* No.62 ผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น และยีสต์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างสมบรูณ์ สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นจากร้อยละ 7 เป็นร้อยละ 9.1 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักไบโอเอทานอลโดยเชื้อ *Saccharomy cescerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าเชื้อนี้ผลิตเอทานอลได้สูงกว่าเชื้อสายพันธุ์อื่นที่นำมาศึกษา ในงานวิจัยจึงศึกษาผลกระทบต่อกระบวนการหมักไบโอเอทานอลจากเชื้อนี้ เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน พีเอช และอุณหภูมิในการหมัก เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานและนำไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาศักยภาพในการผลิตไบโอเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088

2. ศึกษาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อกระบวนการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เช่น อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก พีเอชเริ่มต้น แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น

3. ศึกษาทางจลนพลศาสตร์ในการหมักไบโอเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เช่น ประสิทธิภาพในการผลิต (Productivity) ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield)

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักไบโอเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 โดยศึกษาปัจจัยต่างๆ ดังนี้ อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก พีเอชเริ่มต้น แหล่งไนโตรเจน และความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น โดยมีการแปรผันอุณหภูมิที่แตกต่างกัน คือ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส คัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูง มาใช้ศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก โดยแปรผันพีเอช 4.5 5.0 5.5 และ6.0 คัดเลือกพีเอชเริ่มต้นที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงมาใช้ในการศึกษาการเติมแหล่งไนโตรเจน โดยแปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัด ดังนี้ 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร คัดเลือกความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงมาใช้ในการศึกษาความเข้มข้นของสับสเตรท โดยแปรผันความเข้มข้นของกลูโคส 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร เมื่อได้

สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลจากเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 นำมาศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลในสภาวะเหมาะสมที่ได้ศึกษาข้างต้น เพื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อนี้

1.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย แบ่งเป็นขั้นตอนดังนี้

ขั้นที่ 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 โดยการศึกษาปัจจัยดังต่อไปนี้

1. แหล่งคาร์บอน : ใช้น้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1 กรัมต่อลิตร ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อยีสต์ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่อง Gas chromatography ปริมารน้ำตาลรีดิวซ์โดยใช้ DNS method หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอชของน้ำหมัก

2. แหล่งไนโตรเจน : ใช้ yeast extract $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4Cl ความเข้มข้นร้อยละ 2 (น้ำหนักต่อปริมาณ)

ขั้นที่ 2 ศึกษาการเจริญและการผลิตไบโอเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษา ในขั้นต้นเลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในอาหาร YFM ในสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาในขั้นต้น หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณเอทานอล น้ำตาลรีดิวซ์ พีเอชของน้ำหมัก และจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิต เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างการผลิตไบโอเอทานอลกับจำนวนเซลล์ของยีสต์ รวมทั้งมีการศึกษาค่าจลนศาสตร์ของกระบวนการหมักในสภาวะที่เหมาะสมด้วย เช่น ค่าประสิทธิภาพในการผลิตไบโอเอทานอล(Productivity) ค่า Ypls เป็นต้น

ขั้นที่ 3 สรุปผลการทดลองและจัดทำรายงาน

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้รู้ถึงปัจจัยที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S.cerevisiae*TISTR 5088 เพื่อนำมาใช้ปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลให้สูงขึ้น

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอทานอล (ไกรพัฒน์, 2550)

2.1.1 เอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือ เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl Alcohol) คือ สารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่มีธาตุคาร์บอน (C) ไฮโดรเจน (H) และออกซิเจน (O) เป็นองค์ประกอบ สูตรโมเลกุลของ เอทานอลคือ C_2H_5OH เอทานอลจัดเป็นเชื้อเพลิงที่มีออกซิเจน (Oxygenated Fuel) ชนิดหนึ่ง และเป็นไฮดรอกซิลดิริเวทีฟของไฮโดรคาร์บอน เกิดจากการแทนที่ไฮโดรเจนอะตอมด้วย hydroxyl group (OH) มีน้ำหนักมวลโมเลกุล 46.07 ความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จุดหลอมเหลว -114.1 องศาเซลเซียส จุดเดือด 78.5 องศาเซลเซียส เอทานอลมีคุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีดังนี้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและคุณสมบัติทางเคมีของเอทานอล

สถานะ	ของเหลว
สี	ใส ไม่มีสี
กลิ่น	เฉพาะตัว
น้ำหนักโมเลกุล	46.07
จุดเดือด (องศาเซลเซียส)	78
จุดหลอมเหลว / จุดเยือกแข็ง (องศาเซลเซียส)	-114
ความถ่วงจำเพาะ	0.789
ความหนาแน่น	1.6
ความหนืด (MPa.s)	1.41
ความดันไอ (มม.ปรอท)	43 ที่ 20 (°C)
ความสามารถในการละลายน้ำ (กรัม/100 มิลลิลิตร)	100

ที่มา: ไกรพัฒน์ (2550)

เอทานอลสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในหลายๆด้าน เช่น ใช้ในการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ผลิตยา ใช้เป็นตัวทำละลาย เนื่องจากเอทานอลมีคุณสมบัติที่เป็นตัวทำละลายที่ดี และในปัจจุบันที่เห็นได้ชัดเจนคือได้มีการนำเอทานอลมาใช้เป็นพลังงานทดแทนพลังงานน้ำมันที่มีราคาแพงและมีปริมาณจำกัด ถือเป็นพลังงานสิ้นเปลืองที่ใช้แล้วหมดไป โดยการนำเอทานอลมาใช้เป็นพลังงานทดแทนสามารถใช้ได้สามรูปแบบ ได้แก่

1. ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรง ทดแทนน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซล

2. ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซินในอัตราส่วนต่างๆ เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ หรือผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์

3. ใช้เพิ่มค่าออกเทนของน้ำมันให้กับเครื่องยนต์

2.1.2 การนำเอทานอลไปใช้ในรูปเชื้อเพลิง (ไกรพัฒน์, 2550)

เอทานอลมีคุณสมบัติที่สามารถจุดไฟติดได้ และให้ค่าความร้อนเมื่อถูกเผาไหม้ จึงสามารถนำเอทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงเหมือนกับน้ำมันเบนซินและน้ำมันดีเซลได้ แต่เอทานอลจะให้ค่าความร้อนที่ต่ำกว่า ซึ่งหากใช้เอทานอลในเครื่องยนต์ จำเป็นต้องปรับแต่งเครื่องยนต์ให้มีความเหมาะสมกับประเภทของพลังงานที่เลือกใช้ นอกจากเอทานอลจะใช้เป็นเชื้อเพลิงได้แล้ว ยังสามารถใช้เป็นสารในการเติมออกซิเจนและเพิ่มค่าออกเทนให้น้ำมันเชื้อเพลิงได้อีกด้วย เมื่อเกิดการเผาไหม้จะมีออกซิเจนถูกปล่อยออกสู่บรรยายกาศในปริมาณมาก เนื่องจากเอทานอลมีส่วนผสมของออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เอทานอลสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้หลายรูปแบบดังนี้

1. การนำเอทานอลร้อยละ 95 มาใช้ทดแทนเชื้อเพลิงน้ำมันเบนซินและดีเซลได้โดยตรง

2. การนำเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 มาผสมในน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ โดยผสมน้ำมันเบนซินในอัตราส่วนร้อยละ 10 ในลักษณะของสารเติมแต่งเพื่อปรับปรุงค่าออกเทนของน้ำมันเบนซินสามารถใช้งานได้กับเครื่องยนต์ทั่วไปโดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์

3. การใช้เอทานอลเป็นสารเพิ่มค่าออกเทนแก่เครื่องยนต์ โดยการเปลี่ยนรูปเอทานอลมาเป็นสาร ETBE (Ethyl Tertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether)ที่ใช้เป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซิน เนื่องจาก MTBE เป็นสารที่ก่อให้เกิดมลภาวะในอากาศที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่นๆ ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม การผสมสาร MTBE ในน้ำมันเบนซินเกินร้อยละ 10 – 15 จะเกิดผลกระทบต่อเครื่องยนต์ แต่ในการผสมเอทานอลในปริมาณที่มากไม่มีอันตรายต่อเครื่องยนต์

2.1.3 สถานการณ์การใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนในประเทศไทย (พรรณี, 2557)

เอทานอลเป็นหนึ่งในอุตสาหกรรมเชื้อเพลิงชีวภาพ (Biofuel) ที่มีโอกาสเติบโตสูง โดยได้รับปัจจัยหนุนจากนโยบายภาครัฐที่ทยอยยกเลิกจำหน่ายน้ำมันเบนซิน และการพัฒนารถยนต์รุ่นใหม่ที่สามารถรองรับการใช้น้ำมันที่มีเอทานอลผสมในสัดส่วนสูงขึ้น ซึ่งช่วยลดปัญหากำลังการผลิตส่วนเกินที่เป็นปัญหาต่อเนื่องในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล ซึ่งหากพิจารณาความต้องการใช้เอทานอลในปี 2556 จะพบว่า มีการปรับตัวดีขึ้นอยู่ที่ 2.6 ล้านลิตร/วัน จากที่ใช้เพียง 1.4 ล้านลิตร/วัน ในปี 2555 เกิดจากความต้องการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์เพิ่มขึ้น ซึ่งมีเอทานอลเป็นส่วนผสมทดแทน

การขยายตัวของรถยนต์ที่จดทะเบียนใหม่จากโครงการรถยนต์คันแรก ในปี 2556 ซึ่ง 50 เปอร์เซ็นต์เป็นรถยนต์ใหม่ที่สามารถรองรับการใช้แก๊สโซฮอล์ E20 มีเอทานอลเป็นส่วนผสม 20 เปอร์เซ็นต์

และ E85 มีเอทานอลเป็นส่วนผสม 85 เปอร์เซ็นต์ ทำให้สัดส่วนการจำหน่ายน้ำมันแก๊สโซฮอล์ E20 และ E85 เพิ่มขึ้นเป็น 15 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการใช้แก๊สโซฮอล์ทั้งหมด ซึ่งในจำนวนดังกล่าวนี้จะต้องใช้เอทานอลเป็นส่วนผสมในปริมาณถึง 1 ใน 3 ของปริมาณการใช้เอทานอลทั้งหมด ความต้องการใช้เอทานอลมีแนวโน้มเติบโตต่อเนื่องและคาดว่าจะเพิ่มขึ้นเกือบเท่าตัวในปี 2559 หรือเกือบ 5 ล้านลิตร/วัน ภายใต้สมมติฐานว่าสัดส่วนการจำหน่ายแก๊สโซฮอล์ E20 และ E85 ในช่วง 1-2 ปีข้างหน้า จะเพิ่มเป็น 20-25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการใช้แก๊สโซฮอล์ทั้งหมด โดยมีปัจจัยสนับสนุนจากการขยายตัวของการใช้น้ำมันเชื้อเพลิงใน 1-2 ปี เฉลี่ย 4-5 เปอร์เซ็นต์/ปี ตามภาวะเศรษฐกิจที่ฟื้นตัวและการเปิดประเทศสู่ AEC ในปี 2558 ปัจจัยสนับสนุนอัน ได้แก่ กิจกรรมการขนส่งและการท่องเที่ยวในประเทศการยกเลิกการจำหน่ายน้ำมันเบนซินทั้งหมดตามแผนของภาครัฐจะทำให้ปริมาณการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์อยู่ที่ประมาณ 25 ล้านลิตร/วัน การเพิ่มขึ้นของรถยนต์ใหม่ที่รองรับการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ E85 ที่มีจำนวนเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ ผู้ผลิตเอทานอลไทยแต่ละกลุ่มพบว่า ผู้ผลิตที่ใช้วัตถุดิบจากกากน้ำตาลมีแนวโน้มรายได้สม่ำเสมอและทำกำไรได้ดีกว่า ซึ่งโรงงานผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลเป็นการต่อยอดธุรกิจจากโรงงานน้ำตาลจึงมีความมั่นคงด้านวัตถุดิบ อีกทั้งราคากากน้ำตาลมีแนวโน้มไม่สูงนัก เป็นไปตามทิศทางราคาน้ำมันดิบโลก แต่โรงงานผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังยังมีความเสี่ยงจากการแย่งชิงวัตถุดิบกับอุตสาหกรรมอื่น ทำให้ความต้องการใช้มันสำปะหลังเพิ่มขึ้นเกือบ 3 ล้านตัน จากปัจจุบันที่ใช้อยู่เพียง 1.5 ล้านตัน ขณะที่ปริมาณผลผลิตมันสำปะหลังของไทย ยังมีปริมาณไม่แน่นอน เกิดจากปัญหาภัยแล้งและปัญหาการระบาดของเพลี้ยแป้งเป็นระยะ

แม้กำลังการผลิตเอทานอลมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจากแรงจูงใจด้านตลาดแต่อาจสร้างแรงกดดันด้านการแข่งขันกันในธุรกิจ ซึ่งหากภาครัฐมีการสนับสนุนอย่างจริงจังด้วยนโยบายการส่งเสริมการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ การส่งเสริมค่ายรถยนต์พัฒนารถยนต์รุ่นใหม่ที่ใช้ E85 การส่งเสริมให้มีการขยายสถานีบริการน้ำมันเชื้อเพลิงให้ครอบคลุมและสนับสนุนให้เกิดความคล่องตัวในการส่งออกด้านพลังงานแล้ว ก็จะช่วยให้ธุรกิจเกี่ยวกับพลังงานทดแทนได้เติบโตอย่างมั่นคงในระยะยาว

2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล (นคร, 2552)

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ กระบวนการผลิตโดยวิธีทางเคมี (chemical synthesis) เอทานอลที่ได้เรียกว่า“เอทานอลสังเคราะห์” และกระบวนการผลิตโดยวิธีการหมัก (fermentation) เอทานอลที่ได้เรียกว่า“ไบโอเอทานอล”

2.2.1 การผลิตเอทานอลจากการสังเคราะห์ทางเคมี

การสังเคราะห์เอทานอลเป็นการผลิตจากอนุพันธุ์ของสารปิโตรเลียม เช่น เอธิลีน (C_2H_4) ด้วยปฏิกิริยาเอธิลีนไฮเดรชั่น(Ethylene hydration) หรือการเกิดเอทานอลจากปฏิกิริยาที่ย้อนกลับได้ของเอสเทอริฟิเคชัน (esterification) เป็นต้น

ในการเกิดปฏิกิริยา Ethylene hydration นี้ จะใช้กรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทิลซัลเฟต ($CH_3CH_2SO_4H$) ดังสมการที่ 2.1 ขั้นตอนต่อมานำเอทิลซัลเฟตไปทำปฏิกิริยากับน้ำจะได้เอทานอลกับกรดซัลฟิวริก ดังสมการที่ 2.2 จากนั้นทำการสกัดให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ออกมา

$$C_2H_4 + H_2SO_4 \longrightarrow CH_3CH_2SO_4H \quad (2.1)$$

$$CH_3CH_2SO_4H + H_2O \longrightarrow CH_3CH_2OH + H_2SO_4 \quad (2.2)$$

อีกตัวอย่างหนึ่งคือ ปฏิกิริยาย้อนกลับของเอสเทอริฟิเคชั่นสามารถทำให้เกิดเอทานอลได้ ซึ่งการที่จะได้ผลิตภัณฑ์ย้อนกลับเป็นเอทานอลจะต้องใช้ความร้อนสูงและตัวเร่งปฏิกิริยาเข้าช่วย ในการทำปฏิกิริยากับน้ำ ปฏิกิริยานี้เป็นการสลายตัวแยกออกเป็นกรดคาร์บอกซิลิกและแอลกอฮอล์โดยมีกรดซัลฟิวริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาที่อุณหภูมิสูงดังสมการที่ 2.3

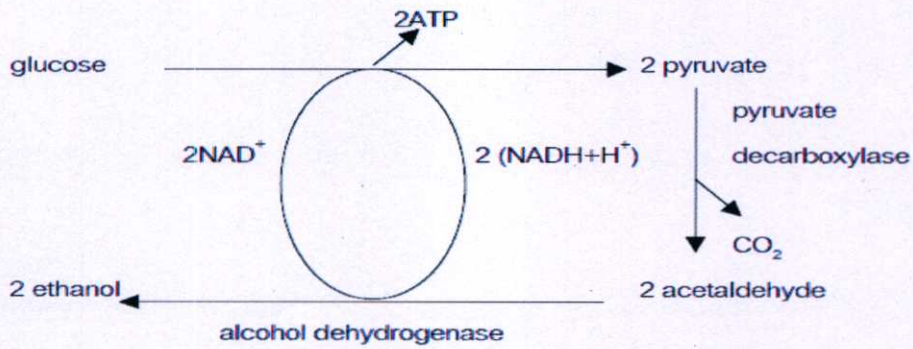
$$CH_3COOCH_2CH_3 + H_2O \xrightarrow{H_2SO_4} CH_3COOH + CH_3CH_2OH \quad (2.3)$$

2.2.2 การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมัก

การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลและนำมาหมักด้วยเชื้อยีสต์ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ ขั้นตอนแรกยีสต์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เป็นอาหาร และเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยกระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ดังสมการที่ 2.4

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ CH_3CH_2OH + 2\ CO_2 \quad (2.4)$$

การหมักเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบัน ใช้สับสเตรทเป็นสารประกอบจำพวกแป้งหรือน้ำตาล โดยที่กลูโคส 1 โมเลกุล จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุลและเอทานอล 2 โมเลกุลในสภาวะที่ไม่มีอากาศ การหมักเอทานอลของยีสต์เกิดจากการที่น้ำตาลกลูโคส ถูกเปลี่ยนโดยวิถีไกลโคไลซิสจนได้เป็น ไพรูเวท 2 โมเลกุล จากนั้นเกิดปฏิกิริยาดึงเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออก (decarboxylation) โดยใช้เอนไซม์ Pyruvate decarboxylase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็น Acetaldehyde แล้วเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase (Panchalและ Tavares, 1990)



ภาพที่ 2.1 การเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลโดยผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส

ที่มา : www.estrellamountain.edu/facultyBIOBK/biobookglyc.html (สืบค้น 26 ธันวาคม 2557)

ตามทฤษฎีการหาผลผลิตสูงสุดของเอทานอล จากน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 100 สามารถคำนวณได้จากการใช้ความสัมพันธ์ทางทฤษฎี คือ น้ำตาลกลูโคส 100 กรัม สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 51.1 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัมโดยน้ำหนัก แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสีย ได้เป็นสารประกอบอื่นๆ หรือใช้ในการสร้างเซลล์ของยีสต์ ทำให้ได้เอทานอลเพียงร้อยละ 50-90 ของน้ำหนักทางทฤษฎี เมื่อได้เอทานอลแล้ว ขั้นตอนที่ 2 จึงเป็นการทำให้เอทานอลมีความเข้มข้นและมีความบริสุทธิ์สูงขึ้นได้เป็นเอทานอลร้อยละ 99.5 การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมทั่วโลกมากกว่าร้อยละ 90 นิยมใช้วิธีการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักด้วยยีสต์มากกว่ากระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากขั้นตอนการผลิตของกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมีนั้นมีความซับซ้อนมากกว่า และมีต้นทุนในการผลิตที่สูงกว่า

2.2.3 การกลั่นเอทานอล (จิรศักดิ์, 2554)

เอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักอยู่ในรูปสารผสมที่มีความเข้มข้นของเอทานอลอยู่ในช่วง 5-10 โดยปริมาตร ในการผลิตเอทานอลจึงต้องนำเทคนิคการกลั่นเข้ามาใช้สำหรับแยกเอทานอลออกจากสารผสมและทำให้บริสุทธิ์สูง การกลั่นเป็นวิธีที่ใช้แยกของเหลวที่ผสมกันเป็นสารละลายเนื้อเดียวออกจากกัน โดยอาศัยความแตกต่างของจุดเดือด ทำให้ของเหลวได้รับความร้อนจนกลายเป็นไอ แล้วทำให้ควบแน่นกลับมาเป็นของเหลวอีก ในขณะที่กลั่นของผสม ของเหลวที่มีจุดเดือดต่ำจะกลายเป็นไอแยกออกมาก่อนส่วนของเหลวที่มีจุดเดือดสูงกว่าจะแยกออกมาภายหลัง

2.3 เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล (อนุสิษฐ์, 2554)

2.3.1 ลักษณะทั่วไปของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

1. ให้ผลผลิตเอทานอลสูง
2. ทนต่อความเข้มขนของเอทานอลได้ดี เนื่องจากถ้าจุลินทรีย์มีความไวต่อเอทานอลจะทำให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายปริมาณต่ำ
3. มีความทนต่อสภาวะที่เป็นกรดหรือพีเอชต่ำได้ดี
4. ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ เนื่องจากจะเกิดความร้อนขึ้นในระหว่างการหมัก
5. มีความสามารถในการตกตะกอนเพื่อที่จะแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักได้ง่าย
6. มีความบริสุทธิ์ ไม่ปนเปื้อน
7. มีความคงตัวทางพันธุกรรม ไม่เกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย
8. ทนต่อแรงดันออสโมซิสที่เปลี่ยนแปลงได้

2.3.2 วงจรชีวิตของยีสต์(นวลจิตต์, 2543)

ยีสต์จีนัส *Saccharomyces* มีรูปร่างเป็นเซลล์เดียว (unicellular) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง ขนาด 6-8 ไมครอน เจริญได้ดีในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) แสดงดังรูปที่ 2.2

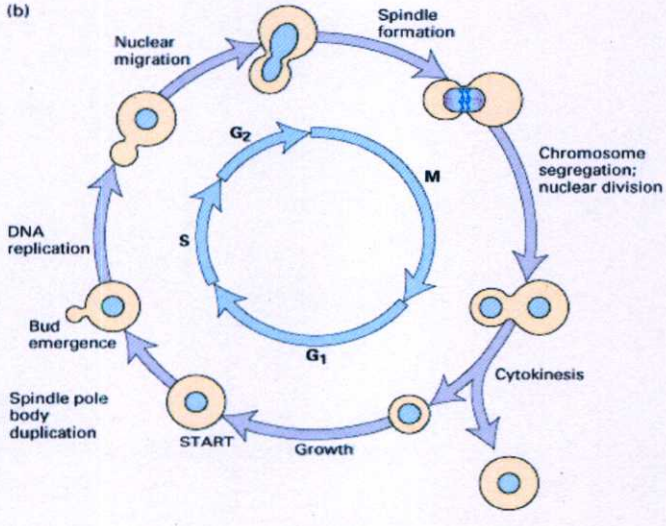
2.3.3 ยีสต์ที่ผลิตเอทานอล

1.จีนัส*Saccharomyces* ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae, Saccharomyces uvarum, Saccharomyces bataiae, Saccharomyces carlsbergensis, Saccharomyces globosus* โดยเชื้อยีสต์เหล่านี้สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกัน แสดงดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แหล่งคาร์บอนที่ใช้ผลิตเอทานอลของจีนัส *Saccharomyces*

แหล่งคาร์บอน	**สายพันธุ์ของยีสต์**
กลูโคส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
กาแล็คโตส	ผลิตได้บางสายพันธุ์
ซูโครส	ผลิตได้บางสายพันธุ์
มอลโตส	ผลิตได้บางสายพันธุ์
แลคโตส	ไม่มีสายพันธุ์ที่ผลิตได้

ที่มา: กมลและสุเปรมปรีดิ์ (2540)



ภาพที่ 2.2 วงจรการแตกหน่อของยีสต์

ที่มา : www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/picrender.fcgi , 2557

2.4 วัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล (สมใจ, 2555)

วัตถุดิบในการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

1. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ กากน้ำตาล น้ำอ้อย และหัวบีทน้ำตาล (Sugar Beet) ซึ่งยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้สังเคราะห์เอทานอลได้โดยตรง โดยยีสต์จะทำการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการใดๆก่อน

2. วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ธัญพืช มันสำปะหลัง ข้าวโพด มันฝรั่ง เป็นต้น ในการผลิตเอทานอลนั้น แป้งซึ่งเป็นวัตถุดิบจะถูกย่อยโดยกระบวนการไฮโดรไลซิสของแป้ง (Starch Hydrolysis) แป้งจะเปลี่ยนเป็นน้ำกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน จากนั้นยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวไปเป็น เอทานอล ซึ่งกระบวนการย่อยแป้งจะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

2.1 การย่อยครั้งแรก หรือการทำให้เหลว (Liquefaction) ขั้นตอนนี้สามารถเลือกใช้กรด หรือเอนไซม์กลุ่มแอลฟาอะไมเลส (α-amylase) ในการย่อยแป้งที่อุณหภูมิสูงประมาณ 80-95 องศาเซลเซียสให้ได้โมเลกุลขนาดเล็กลง ซึ่งจะทำให้ความหนืดของของเหลวที่ย่อยได้ลดลง ของเหลวที่ได้นี้ เรียกว่า เดกซ์ทริน

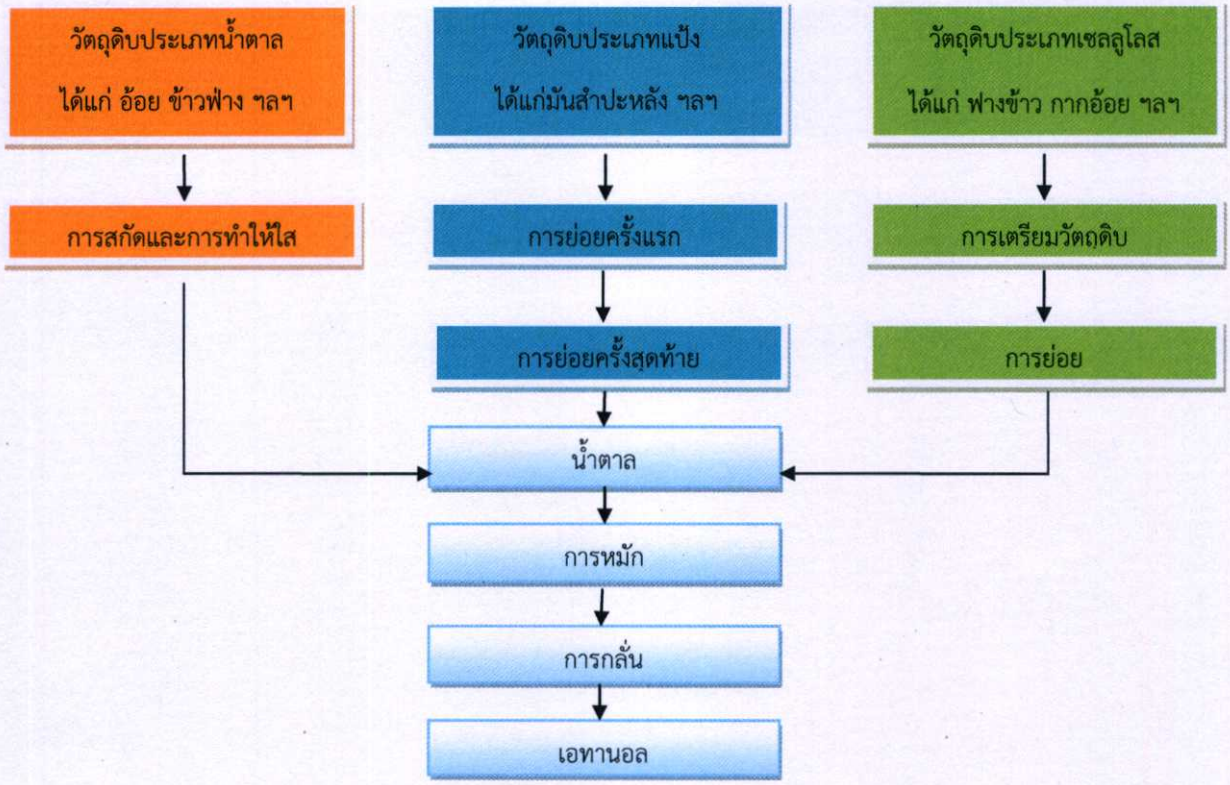
2.2 การย่อยครั้งสุดท้าย (Saccharification) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์ในกลุ่มกลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ย่อยของเหลวเด็กซ์ทรินให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว หรือโมเลกุลที่มีขนาดเล็กลงจนยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะทำงานได้ดีที่อุณหภูมิประมาณ 55-65 องศาเซลเซียส

3. วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ส่วนมากวัตถุดิบในกลุ่มนี้เป็นผลผลิตพลอยได้ (By products) ที่ได้จากการเกษตรและอุตสาหกรรมการเกษตร เช่น กากอ้อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด ของเสียจากอุตสาหกรรมเยื่อกระดาษ เป็นต้น ซึ่งวัตถุดิบประเภทนี้มีส่วนประกอบสำคัญ 4 ชนิด คือ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส ลิกนิน และสารประกอบอื่นๆ ซึ่งส่วนใหญ่มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลักประมาณร้อยละ 40-60 ขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบกลุ่มนี้ จึงมีกระบวนการเพิ่มเติมเพื่อย่อยสารประเภทดังกล่าว โดยประกอบด้วย 3 ขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

3.1 การเตรียมวัตถุดิบ (Pretreatment) เป็นการทำลายโครงสร้างที่แข็งแรงของเซลลูโลส เพื่อให้เอนไซม์เซลลูเลส (cellulase) สามารถเข้าไปย่อยเซลลูโลสได้ง่ายขึ้น ซึ่งสามารถทำได้ทั้งวิธีทางเคมี ได้แก่ การย่อยด้วยกรดเจือจาง การย่อยด้วยกรดเข้มข้น และการย่อยด้วยด่าง เป็นต้น และวิธีทางกายภาพ ได้แก่ การระเบิดด้วยการใช้ไอน้ำ เป็นต้น หรืออาจใช้ทั้ง 2 วิธีร่วมกันก็ได้ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของชนิดวัตถุดิบ

3.2 การย่อย (Hydrolysis) มี 2 วิธี คือ การย่อยด้วยกรด และการย่อยด้วยเอนไซม์ ซึ่งการย่อยด้วยกรดจะมี 2 ขั้นตอน ขั้นแรกจะเป็นการย่อยเฮมิเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลเพนโตส จากนั้นขั้นที่สองจะเป็นการย่อยเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลกลูโคส ส่วนการย่อยด้วยเอนไซม์จะใช้เอนไซม์เซลลูเลส เพื่อเปลี่ยนเซลลูโลสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส

3.3 การหมักน้ำตาลที่ได้ให้เป็นเอทานอลโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้ การผลิตเอทานอลโดยใช้กรรมวิธีการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร แสดงดังรูปที่ 2.3

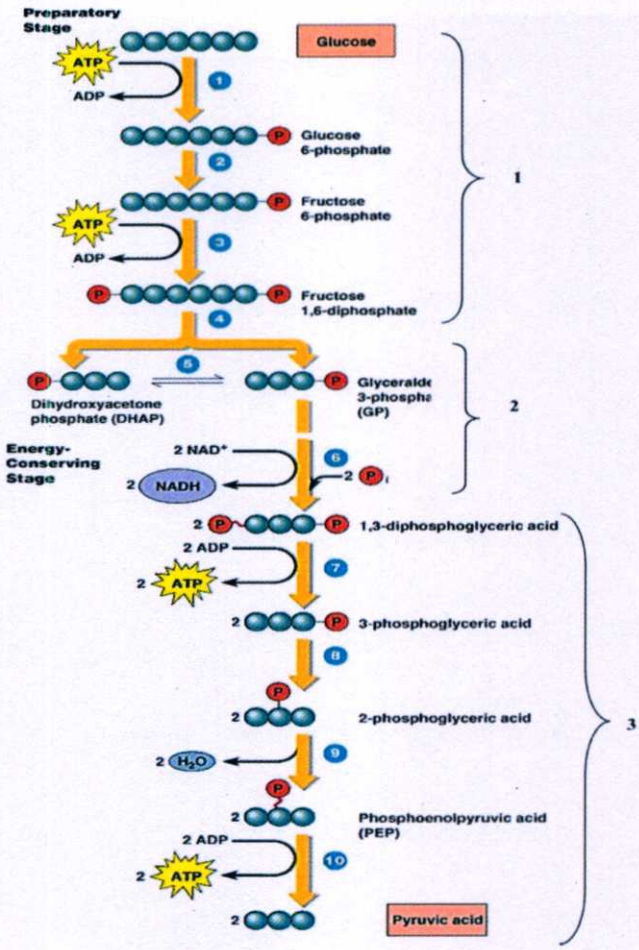


ภาพที่ 2.3 การผลิตเอทานอลโดยใช้กระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร

ที่มา : สมใจ, 2555

2.5 ชีวเคมีของกระบวนการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ (ดาวัลย์, 2553)

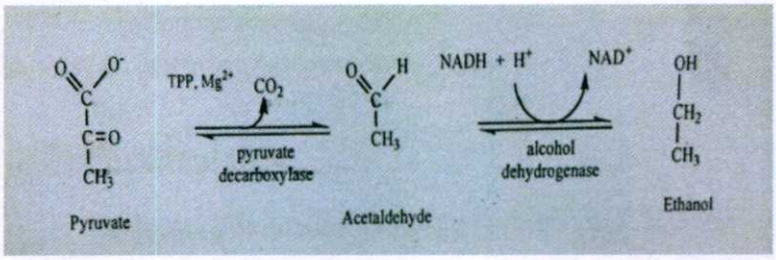
ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสในกระบวนการเมแทบอลิซึม เป็นสารเชื้อเพลิงที่ถูกเผาผลาญให้ได้พลังงานในรูป ATP ซึ่งสามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมอื่นได้ กระบวนการเผาผลาญกลูโคสในขั้นแรกคือ วิถีไกลโคลิซิส (Glycolysis) หรือเรียกว่า EmbdenMayerh of pathway เป็นการสลายกลูโคสซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ไปเป็นไพรูเวต (pyruvate) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม 2 โมเลกุล ผ่านปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นต่อเนื่องกัน 10 ขั้นตอน แสดงดังรูปที่ 2.4 ระหว่างการเกิดปฏิกิริยาระยะแรกจะต้องมีการใช้พลังงานในรูปของ ATP และมีการสร้าง reducing equivalent ในรูปของ NADH แล้วจึงมีการสร้าง ATP ออกมาตามลำดับ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในวิถีไกลโคลิซิสมีทั้งหมด 10 ชนิด พบได้ในเซลล์ทุกเซลล์ของเนื้อเยื่อร่างกาย วิถีไกลโคลิซิสจัดเป็นวิถีที่เป็นศูนย์กลาง (central pathway) ของการสลายกลูโคส รวมทั้งมอโนแซ็กคาไรด์อื่นๆ ด้วย



ภาพที่ 2.4 วิถีไกลโคลิซิส (Glycolysis) ประกอบด้วยปฏิกิริยา 10 ขั้นตอน

ที่มา : http://www.sigmaaldrich.com/metabolic-pathways/glycolytic-pathway.html, 2558

การเปลี่ยนไพรูเวตเป็นเอทานอลเกิดขึ้นในยีสต์และจุลินทรีย์บางชนิด เป็นปฏิกิริยาที่ไม่ใช้ออกซิเจน อาจเรียกกระบวนการนี้ว่า การหมักแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation) โดยไพรูเวตที่ได้จากการสลายน้ำตาลกลูโคสหรือมอโนแซ็กคาไรด์อื่นๆ ในวิถีไกลโคลิซิส จะถูกสลายโดยเอาคาร์บอนไดออกไซด์ออกไป เหลือเป็น อะเซทาลดีไฮด์ (acetaldehyde) ปฏิกิริยานี้เร่งโดยเอนไซม์ pyruvate decarboxylase ซึ่งต้องการ Mg^{++} และ TPP เป็นโคเอนไซม์ จากนั้น acetaldehyde จะถูกรีดิวซ์โดยมี NADH เป็นโคเอนไซม์ได้เอทานอลและ NAD^{+} ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นแสดงดังรูปที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนไพรูเวทเป็นเอทานอล

ที่มา :ดาวัลย์, 2553

2.6 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักเอทานอล (ถกลวรรณและเยาวลักษณ์, 2550)

การผลิตเอทานอลให้มีประสิทธิภาพและได้ผลผลิตสูงสุดนั้น จำเป็นต้องอาศัยการจัดการควบคุมสภาวะแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงและสารอาหารอย่างเหมาะสม ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล ได้แก่ ธาตุอาหาร ความเข้มข้นของน้ำตาล ปริมาณของเชื้อยีสต์ อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรดด่าง(pH) ทั้งนี้ต้องมีความสอดคล้องกับลักษณะของสายพันธุ์เชื้อยีสต์ที่ใช้ในการหมักด้วย

2.6.1 ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ (สาวิตรี, 2549)

จุลินทรีย์ที่นำมาผลิตเอทานอลมีมากมายหลายชนิด แต่ยีสต์ถูกนำมาใช้ผลิตอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีปริมาณมาก ยีสต์โดยทั่วไปที่นิยมใช้กัน คือ *Saccharomyces cerevisiae* โดยยีสต์จะมีความไวต่อตัวแปรอย่างอื่นที่ใช้ในการหมัก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง ค่าความเป็นกรดด่างและอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ค้นพบว่า มีแบคทีเรียสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* ที่สามารถหมักเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ เช่น ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่าถึง 3-4 เท่า (เมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้นเท่ากัน) แต่มีข้อเสีย คือ สามารถใช้น้ำตาลได้ในปริมาณที่จำกัดและการนำแบคทีเรียไปใช้ในโรงงานอุตสาหกรรมมีความเป็นไปได้น้อย เนื่องจากผู้ประกอบการโรงงานคุ้นเคยกับการใช้ยีสต์และการเปลี่ยนระบบการเพาะเลี้ยงใหม่จะทำให้เกิดความยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงานสูง

2.6.2 ความเข้มข้นของน้ำตาล (Anuradhaและคณะ, 1999)

สภาวะการหมักที่มีน้ำตาลสูงจะช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ดี แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะยับยั้งการเจริญของเซลล์ยีสต์และการหมักเอทานอลของเซลล์ยีสต์ได้ และเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของเอทานอลในการยับยั้งการหมัก พบว่า ความเข้มข้นของเอทานอลสูงจะมีผลในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ยีสต์มากกว่าเข้มข้นของน้ำตาลสูง ทั้งนี้ หากมีทั้งความเข้มข้นของน้ำตาลสูงประกอบกับความเข้มข้นของเอทานอลสูงในการหมัก จะส่งผลให้ลักษณะการยับยั้งส่งผลรุนแรงมากยิ่งขึ้น

2.6.3 อุณหภูมิ(Nagarjunและคณะ, 2005)

การหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ ควรควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นช่วงอุณหภูมิที่ยีสต์สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สุดและให้ผลผลิตเอทานอลสูง พบว่า เมื่อการหมักมี

อุณหภูมิเพิ่มสูงถึง 40 องศาเซลเซียสจะส่งผลให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลงอย่างมาก และมีจำนวนเซลล์ยีสต์ลดลงด้วยเช่นกัน ทั้งนี้ ช่วงของการหมักใน 10 ชั่วโมงแรก หากมีอุณหภูมิเกิน 37 องศาเซลเซียสแล้วอาจส่งผลให้แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตร่วมได้ จึงเกิดปัญหาการปนเปื้อนตามมา

2.6.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) (Amraneและคณะ, 1999)

การปรับค่าพีเอชในอาหารหมักมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เนื่องจากยีสต์โดยทั่วไปจะเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชประมาณ 4.5-6.5 แต่จะเจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกรดหรือด่างมากกว่านั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ด้วย (Walker, 1998) สำหรับยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae*การปรับพีเอชของอาหารให้อยู่ในช่วง 4.5 นอกจากจะเป็นค่าพีเอชที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลแล้วยังช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆที่อาจปะปนมาในอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียโดยทั่วไปสามารถเจริญได้ดีในช่วงพีเอชที่เป็นกลาง

2.6.5 ความเข้มข้นของเอทานอล

ในสภาวะการหมักที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง การเจริญและการหมักของยีสต์จะถูกยับยั้ง เนื่องจากเอทานอลมีผลต่อเซลล์และเอนไซม์ต่างๆภายในเซลล์ยีสต์ เมื่อเอทานอลมากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักจะมีผลทำให้อัตราการเจริญของเซลล์ลดลงและจะหยุดลงเมื่อมีเอทานอลร้อยละ 4.7-7.8 โดยน้ำหนัก จากนั้นจะเป็นการหมักเอทานอลและเมื่อได้เอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 14 โดยน้ำหนัก อัตราการผลิตเอทานอลก็จะลดลงเช่นกัน พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลมากที่สุด

2.6.6 ปริมาณออกซิเจน (Kaido และคณะ, 1999)

ในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อ ออกซิเจนมีความสำคัญเป็นอย่างมาก เพราะยีสต์มีอัตราการเจริญเติบโตสูงที่สุดในสภาวะที่มีออกซิเจนมาก แต่จะมีผลให้การหมักเอทานอลลดลง เนื่องจากออกซิเจนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวที่มีความสำคัญช่วยให้ยีสต์สามารถทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้ดีขึ้น ในกระบวนการหมักที่ไม่ใช้ออกซิเจนจึงต้องมีการเติมกรดไขมันไม่อิ่มตัวลงไปเพื่อช่วยให้เซลล์ยีสต์มีชีวิตรอด ดังนั้นในกระบวนการหมักอย่างต่อเนื่องจึงควรมีการให้อากาศบ้างเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ยีสต์ทดแทนจำนวนเซลล์ที่ตายไป พบว่า การให้อากาศเพียงเล็กน้อยจะช่วยให้ยีสต์ใช้น้ำตาลได้ดีขึ้นและทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้ดีขึ้นด้วย

2.6.7 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์

ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่สูงเกินไปมีผลต่อการเจริญของยีสต์และการหมักเอทานอลเป็นอย่างมาก เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) และคาร์บอนไดออกไซด์ยังมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้การขนถ่ายสารเข้าออกเซลล์เปลี่ยนไป

2.6.8 แหล่งไนโตรเจน(Berry และคณะ, 1999)

การผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมนั้น การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนจะต้องคำนึงถึงคุณลักษณะประจำสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักว่าสามารถใช้สารประกอบไนโตรเจนชนิดใดได้ดี โดย

พิจารณาควบคู่ไปกับราคาของแหล่งไนโตรเจนและประสิทธิภาพในการสร้างผลผลิต พบว่า เซลล์ยีสต์สามารถใช้แหล่งไนโตรเจนในรูปของเกลืออนินทรีย์ มักจะอยู่ในรูปของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) และยังสามารถใช้สารอื่นเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ เช่น Mono และ Triammonium Sulfate แหล่งไนโตรเจนที่เติมเข้าไปนี้จะช่วยให้การเจริญของยีสต์ดีขึ้น จากเดิมที่ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งไนโตรเจนในเซลล์ยีสต์สามารถพบได้ที่ส่วนของ พิวรีน(Purine) ไพริมิดีน(Pyrimidines) และกรดอะมิโน ดังนั้น ไนโตรเจนจึงนับว่าเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Lee และคณะ (2012) ได้ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากมันเทศโดยใช้เซลล์ตรึงร่วมกันของเชื้อดังนี้ *Aspergillus oryzae*และ *Monascus purpureus*และยีสต์ คือ *Saccharomyces cerevisiae* ในการตรึงเซลล์ยีสต์แสดงให้เห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่มีกลูโคสร้อยละ 10 ทำให้ได้อัตราการหมักสูงถึงร้อยละ 80.23 เซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตมีร้อยละ 95.70 ที่ความเข้มข้นของเอทานอลร้อยละ 6 การตรึงเซลล์ทำให้ยีสต์ทน เอทานอลเพิ่มขึ้น เมื่อใช้เซลล์ตรึงร่วมกันของ *Saccharomyces cerevisiae* กับ *Aspergillus oryzae* หรือ *Saccharomyces cerevisiae*กับ *Monascus purpureus* โดยเวลาที่ดีที่สุดของการทำให้เม็ดเจลแข็งตัวอยู่ในช่วง 15-60 นาที การผลิตเอทานอลอยู่ในช่วงร้อยละ 3.05 – 3.17 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และค่า $Y_{E/s}$(ผลผลิตของเอทานอลต่อแป้งที่ใช้ไป) มีค่า 0.31 – 0.37 ที่ pH 4.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที หมักเป็นเวลา 13 วัน การใช้เซลล์ตรึงร่วมกันของ *S. cerevisiae* กับเชื้อผสมของ *A. Oryzae* และ *M. purpureus* ในอัตราส่วน 2:1 สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 3.84 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และค่า $Y_{E/s}$ มีค่า 0.39 เมื่อหมัก 11 วัน อย่างไรก็ตามการใช้อัตราส่วนของ *A. oryzae* และ *M. purpureus*ที่ 1:2 มีผลทำให้อัตราการผลิตเอทานอลมีค่าร้อยละ 4.08 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และค่า $Y_{E/s}$ มีค่า 0.41 เมื่อหมัก 9 วัน

Lin และคณะ (2012) การหมักน้ำตาลโดยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* BY 4742 สำหรับการผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบกะ เพื่อปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการหมักความสามารถในการทนอุณหภูมิของ *Saccharomyces crrevisiae* ต่อการเจริญและการหมักน้ำตาลกลูโคสได้ที่อุณหภูมิสูงได้ศึกษาเช่นเดียวกันกับสภาวะในการย่อยน้ำตาลอิทธิพลของอุณหภูมิ ความเข้มข้นของสารตั้งต้น และพีเอช ในกระบวนการหมักเอทานอลได้รับการศึกษา ผลได้จากการผลิตเอทานอลและการเปลี่ยนแปลงในวิถีของกระบวนการหมักถูกเปรียบเทียบภายใต้สภาวะที่แตกต่างกัน เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นถึง 45 องศาเซลเซียส ระบบการหมักยังคงแสดงการเจริญของเซลล์ที่สูงและอัตราการผลิตเอทานอลที่สูง ในขณะที่กระบวนการหมักถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เมื่ออัตราการเจริญมีความจำเพาะสูงสุด และอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะสูงสุดอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 30 – 45 องศาเซลเซียส เมื่อมีความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่แตกต่างกัน การเปลี่ยนรูปของน้ำตาลสูงสุดที่ 30 องศาเซลเซียส หลังจากการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีค่าร้อยละ 48.0, 59.9, 28.3, 13.7 และ 3.7 เมื่อใช้ความเข้มข้นน้ำตาล 20, 40, 80, 160 และ 300 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร (กรัมต่อลิตร)ตามลำดับ สับสเตรทที่เพิ่มขึ้นไม่ได้มีผลทำให้อัตราการผลิตเอทานอลจำเฉพาะเพิ่มขึ้นถ้าไม่ได้ควบคุมพีเอช โดย pH 4.0 – 5.0 เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล อัตราการผลิตเอทานอล

จำเพาะสูงสุดจากการหมักแบบกะจะเกิดขึ้นที่ pH 5.0 ซึ่งมีค่า 410 กรัมต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมง ซึ่งให้ประสิทธิภาพการเปลี่ยนรูปเอทานอลเท่ากับร้อยละ 61.93 อัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะสูงสุดอยู่ที่ pH 4.0 มีค่า 310 กรัมต่อกิโลกรัมต่อชั่วโมงของสารแขวนลอย การเปลี่ยนแปลงในวิถีการหมักหลัก ได้รับการศึกษาเมื่อค่า pH ที่แตกต่างกัน ซึ่งกรดอะซิติกเพิ่มมากขึ้น เมื่อค่า pH ต่ำกว่า 4.0 ในขณะที่กรดบิวทาริกถูกผลิตขึ้นเมื่อค่า pH สูงกว่า 5.0 และในกรณีที่มีออกซิเจน เอทานอลอาจจะถูกนำมาใช้โดยยีสต์เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอน หลังจากที่สารอื่นถูกใช้หมดโดยสภาวะเหล่านี้จะไม่เกิดภายใต้สภาวะไร้อากาศ

Sree และคณะ (2000) ทำการศึกษาการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* VS1 *S. cerevisiae* VS2 *S. cerevisiae* VS3 และ *S. cerevisiae* VS4 ที่อุณหภูมิ 30 35 40 42 และ44 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 และ35 องศาเซลเซียส ยีสต์ทั้ง 4 สายพันธุ์มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าที่อุณหภูมิอื่น คือ 3.0 2.5 3.2 และ2.6 กรัมต่อลิตร เท่ากันทั้งสองอุณหภูมิ และน้ำหนักเซลล์แห้งน้อยสุดที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส คือ 0.8 0.4 0.9 และ 0.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่ 30 องศาเซลเซียส คือ 66 48 75 และ52 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส สามารถผลิตได้ 40 20 58 และ 23 กรัมต่อลิตร จากน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร

Hacking และคณะ (1984) ศึกษาการผลิตเอทานอลของ *C. pseudotropicalis* *S. cerevisiae* และ K. uvarumโดยใช้กลูโคส 140 กรัมต่อลิตร พบว่าทั้ง 3 สายพันธุ์ ผลิตเอทานอลได้สูงกว่า21 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในเวลา 72 ชั่วโมง

D'Amoreและคณะ (1989) ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces diastaticus* No.62 สามารถเจริญและผลิตเอทานอลให้ได้ผลผลิตที่สูง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YFM ที่มียีสต์สกัด 3 กรัมเทียบกับอาหาร YFM ที่เพิ่มสูตรอาหารเป็นสองเท่า (ยีสต์สกัด 6 กรัม) พบว่าเมื่อใช้ยีสต์สกัดที่สูงขึ้น (6 กรัม) จะทำให้ *Saccharomyces diastaticus* No.62 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงขึ้นและยีสต์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้อย่างสมบูรณ์ สามารถผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 22 กรัมต่อลิตรเป็น27 กรัมต่อลิตรเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

ชุติมา (2548)ศึกษาการหมักเอทานอลของยีสต์ที่อุณหภูมิสูง โดยนำยีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 และ45 องศาเซลเซียส ทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 และ40 องศาเซลเซียส ในอาหารน้ำอ้อยที่มีน้ำตาลร้อยละ 18 แอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.05 ปรับพีเอชในอาหารให้เท่ากับ 4.5 นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามียีสต์ 6 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้สูงทั้งสองอุณหภูมิ คือ *Saccharomyces cerevisiae*DMKU 3-1042 DMKU 3-306 DMKU 3-118 DMKU 3-p1042 DMK 3-p1042 และ *S. cerevisiae* Sc90

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงาน

3.1 เชื้อจุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae TISTR 5088 เก็บรักษาเชื้อบนอาหารวุ้นเอียง Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2 สารเคมี

1. เอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 95
2. สารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน ความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร
3. DNS reagent

3.3 วัสดุอุปกรณ์

1. จานอาหารเพาะเชื้อ
2. หลอดทดลอง
3. บีกเกอร์ปริมาตร 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร
4. ขวดรูปชมพู่ปริมาตร 250 มิลลิลิตร
5. ขวดปรับปริมาตร ขนาด 100 และ 500 มิลลิลิตร
6. กระบอกตวงปริมาตร 100 มิลลิลิตร
7. ปิเปตขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร
8. ขวดเก็บตัวอย่าง (vial)
9. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) รุ่น High-Pressure stream sterilizer ES-315 ยี่ห้อ TOMY
10. ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) รุ่น BIOHAZARD CLASS II V6 ยี่ห้อ CLEAN
11. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น POLAR 1000 ยี่ห้อ ONTHERM
12. เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) รุ่น Z333K ยี่ห้อ HERMLE
13. กล้องจุลทรรศน์
14. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น Helio Gamma ยี่ห้อ Thermoscientific
15. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (Gas chromatography) รุ่น GC-2014 ยี่ห้อ SHIMADZU

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมหัวเชื้อเริ่มต้น

เขี่ยเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088 ซึ่งเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูป ลงในอาหาร Yeast Extract Peptone Dextrose (YPD) broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายยีสต์มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ให้ค่าการดูดกลืนแสง 0.5 (โดยใช้อาหารเหลว YPD เป็น Blank)

3.4.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

3.4.2.1 การศึกษาผลของอุณหภูมิ

เตรียมอาหาร Yeast fermentation medium(YFM) (ประกอบด้วยกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร, เปปโตน 5 กรัมต่อลิตร, ยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร, KH_2PO_4 4 กรัมต่อลิตร, $(NH_4)_2SO_4$ 2 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 1 กรัมต่อลิตร) ที่มีปริมาตร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากหัวข้อ 3.4.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 35 และ40 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และพีเอชของน้ำหมัก คัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมโดยให้ปริมาณเอทานอลสูง ใช้ในการทดลองในหัวข้อต่อไป

3.4.2.2 การศึกษาผลของพีเอช

เตรียมอาหารYFM ปรับพีเอชของอาหาร ดังนี้ 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากหัวข้อ 3.4.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมตามที่ได้ทดลองในหัวข้อ 3.4.2.1 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเหมือนหัวข้อ 3.4.2.1

3.4.2.3 การศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัด

เตรียมอาหารYFM แปรผันความเข้มข้นของยีสต์สกัด ดังนี้ 0 3 6 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากหัวข้อ 3.4.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมตามที่ได้ทดลองในหัวข้อ 3.4.2.1 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเหมือนหัวข้อ 3.4.2.1

3.4.2.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคส

เตรียมอาหารYFM เติมแหล่งไนโตรเจน(ยีสต์สกัด)ในความเข้มข้นที่เหมาะสมตามที่ได้ทดลองในหัวข้อ 3.4.2.3 ปรับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสดังนี้ 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร ปริมาตรอาหาร 100 มิลลิลิตร บรรจุในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมหัวเชื้อเริ่มต้นที่ได้จากหัวข้อ 3.4.1 ร้อยละ 10 โดยปริมาตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิเหมาะสมตามที่ได้ทดลองในหัวข้อ 3.4.2.1 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ผลเหมือนหัวข้อ 3.4.2.1

3.4.3 การวิเคราะห์

3.4.3.1 การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำตัวอย่างน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตรใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการอบแห้งและชั่งน้ำหนักหลอดนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวก์ที่ความเร็วรอบ 3500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสเก็บไว้ในขวดเก็บตัวอย่าง(vial) เพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และเอทานอล นำส่วนที่เป็นตะกอนเซลล์ในหลอดเซนตริฟิวก์วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง โดยนำหลอดไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดใส่โถดูดความชื้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาชั่งน้ำหนัก คำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

3.4.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS method (Miller, 1959)

3.4.3.2.1 การเตรียม DNS reagent

เตรียมสารละลาย DNS 10 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จากนั้นละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต300 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ผสมเข้าด้วยกัน แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร เก็บในขวดสีชา

3.4.3.2.2 การเตรียมสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

ชั่งกลูโคส ที่ผ่านการอบแห้ง 0.1 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสมาตรฐานความเข้มข้น 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารละลายกลูโคสมาตรฐาน มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้น 100 200 400 600 800 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปิเปตสารละลายมาตรฐานแต่ละความเข้มข้นใส่ในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วจุ่มลงในน้ำเย็นทันที จากนั้นเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำข้อมูลที่ได้มาทำกราฟมาตรฐาน ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส

3.4.3.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่าง

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาทำการเจือจางให้เหมาะสม แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยทำการปิเปตสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร เติม DNS reagent 3 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที แล้วจุ่มลงน้ำเย็นทันทีจากนั้นเติมน้ำกลั่น 6 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร นำผลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในตัวอย่างดังนี้

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

3.4.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

นำตัวอย่างน้ำหมักไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี รุ่น Shimadzu2014 chromatograph โดยใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพา คอลัมน์ที่ใช้เป็น DB-WAX ยาว 30 เมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.53 มิลลิเมตร อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 60 องศาเซลเซียส ตัวตรวจวัดเป็นชนิด flame ionization detector (FID)

3.4.3.4 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design ; CRD) มีจำนวน 3 ซ้ำวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละตัวอย่างด้วยวิธีของ Duncan ใช้โปรแกรมสำเร็จรูปในการวิเคราะห์

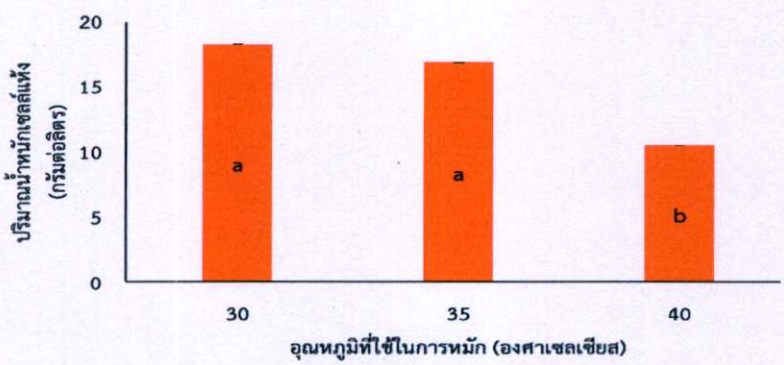
บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

4.1.1 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5088

4.1.1.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

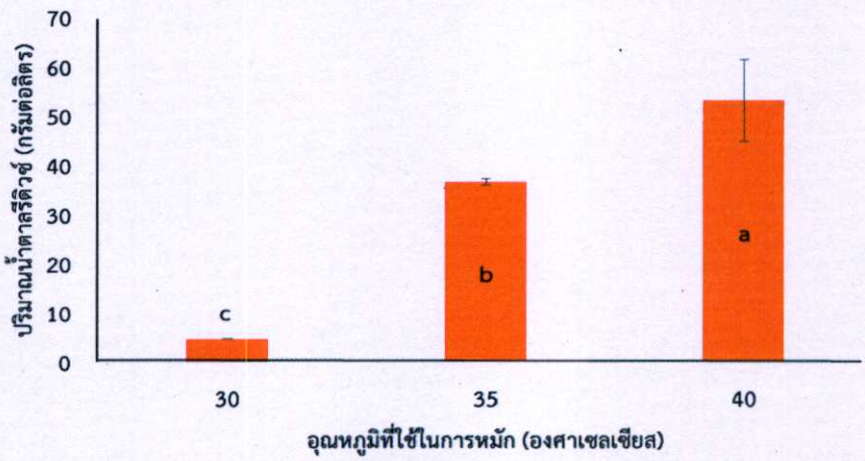
พบว่า เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น น้ำหนักเซลล์แห้งจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 48 ทุกอุณหภูมิของการหมัก *S. cerevisiae* TISTR 5088 จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด โดยพบว่า การหมักที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง จุลินทรีย์มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 18.23 ± 0.01 16.84 ± 0.01 และ 10.51 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.1 หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก ที่เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง การหมักที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส มีน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำสุด 7.80 ± 0.01 6.21 ± 0.01 และ 3.71 ± 0.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.1 เมื่อเปรียบเทียบการหมักที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิในการหมักสูงขึ้นน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงทุกระยะเวลาของการหมัก จากการวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่า การหมักที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด การหมักที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่จะมีความแตกต่างทางสถิติกับการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แสดงดังภาพที่ 4.1



ภาพที่ 4.1 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 หมักในอาหารYFM ที่อุณหภูมิต่างๆที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

4.1.1.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

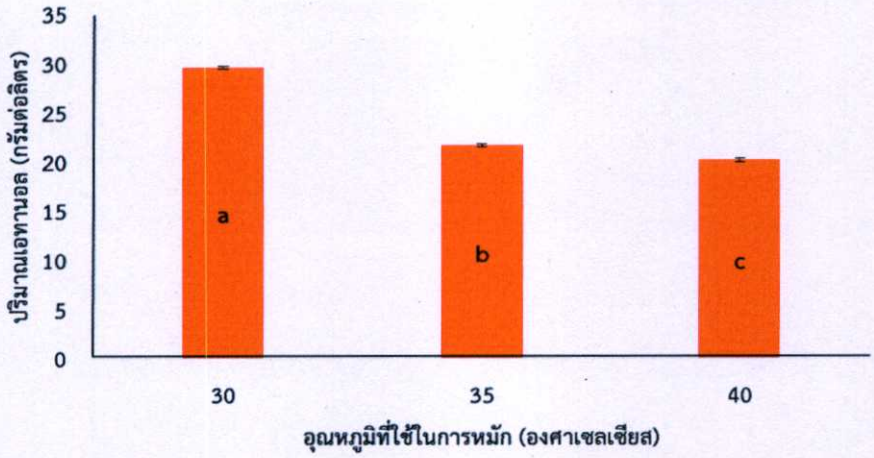
จากการทดลองพบว่า การหมักที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในลักษณะเดียวกัน เมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตามระยะเวลาการหมัก วันสุดท้ายของการหมัก (96 ชั่วโมง) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าต่ำสุด 0.85 ± 0.02 6.63 ± 0.78 และ 9.78 ± 0.14 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารYFM หมักโดย *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่อุณหภูมิต่างๆที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

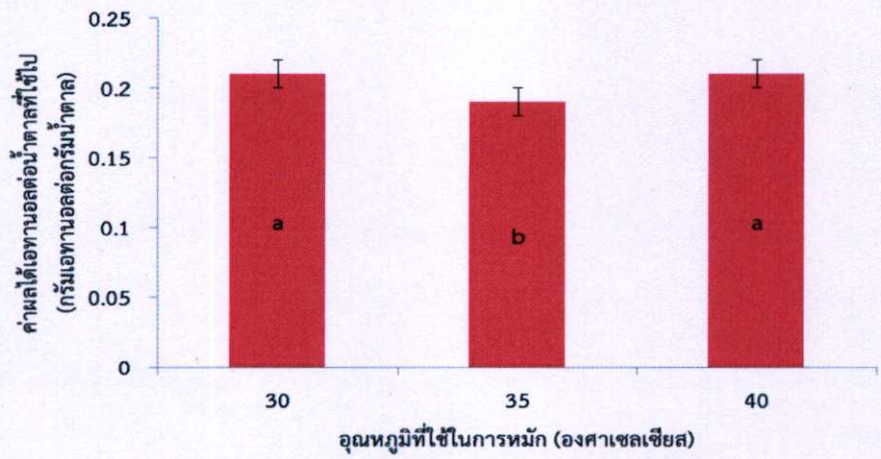
4.1.1.3 ปริมาณเอทานอล

จากการหมักในอาหาร YFM ของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าทุกอุณหภูมิของการหมักปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก และสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 โดยพบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียสให้ปริมาณ เอทานอล 29.61 ± 0.17 21.64 ± 0.14 และ 20.16 ± 0.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.3 หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลง จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก(96 ชั่วโมง) พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเอทานอล 20.02 ± 0.21 16.60 ± 0.55 และ 15.57 ± 0.19 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ทุกระยะเวลาของการหมัก และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 ปริมาณเอทานอลในอาหารYFM หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่อุณหภูมิต่างๆที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

เมื่อวิเคราะห์ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส มีค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้เป็น 0.21 0.19 และ 0.21 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ และเมื่อนำค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการหมักที่อุณหภูมิ 30 และ 40 องศาเซลเซียสให้ผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปไม่แตกต่างทางสถิติ แต่จะมีความแตกต่างทางสถิติกับการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.4



ภาพที่ 4.4 ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) ในอาหารYFMหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่อุณหภูมิต่างๆ ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

4.1.1.4 พีเอชของอาหารหมัก

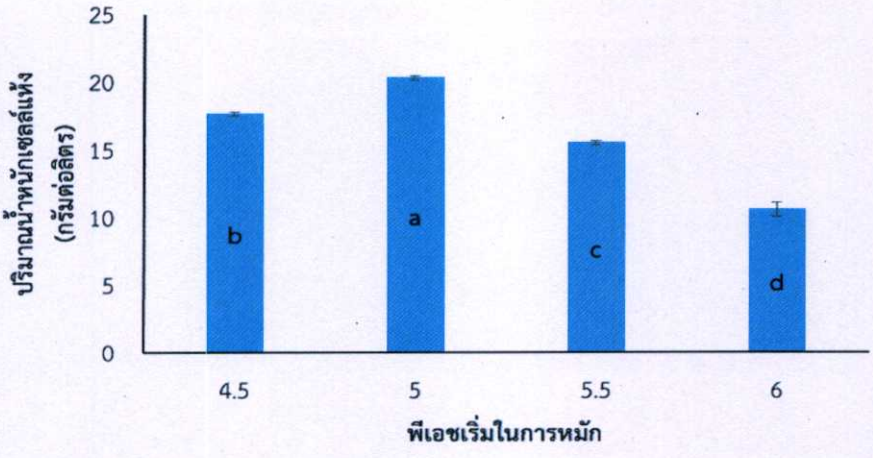
จากการทดลองพบว่าพีเอชของอาหารหมักลดลงต่ำสุดใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นพีเอชของอาหารหมักจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทุกอุณหภูมิของการหมัก ซึ่งการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อาหารหมักจะมีพีเอชลดลงมากที่สุด เมื่อเทียบกับการหมักที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียสทุกระยะเวลาของการหมัก ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 พบว่าเชื้อยีสต์สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงสุดโดยหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสที่เวลา 48 ชั่วโมง รองลงมาคือ อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังนั้นจึงคัดเลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในปัจจัยอื่นต่อไป

4.1.2 ผลการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก YFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088

4.1.2.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

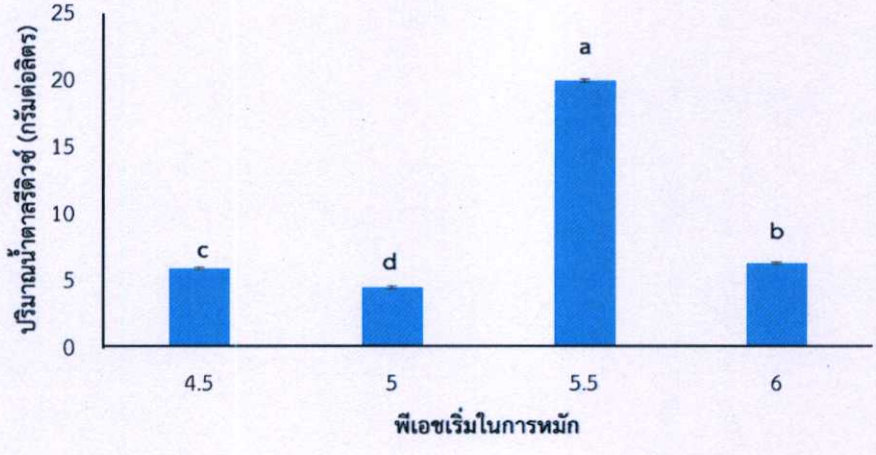
จากการทดลองวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 48 ทุกระดับพีเอชเริ่มต้นที่ใช้ในการหมัก *S. cerevisiae* TISTR 5088 จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด โดยพบว่าการหมักที่พีเอชเริ่มต้นของอาหารYFM เท่ากับ 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง จุลินทรีย์มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 17.61 ± 0.15 20.24 ± 0.14 15.45 ± 0.14 และ 10.52 ± 0.49 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.5 หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก ที่เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง การหมักในอาหารYFM ที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 มีน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำสุด 4.79 ± 0.34 5.60 ± 0.33 4.46 ± 0.05 และ 3.25 ± 0.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.6 เมื่อเปรียบเทียบการหมักที่พีเอชเริ่มต้นในอาหารYFM 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อพีเอชเริ่มต้นในอาหารหมักYFM เท่ากับ 5.0 เมื่อพีเอชเริ่มต้นในอาหารสูงหรือต่ำกว่าพีเอช 5.0 น้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงทุกระยะเวลาของการหมัก จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการหมักที่พีเอชเริ่มต้นในอาหารหมักเท่ากับ 5.0 ให้น้ำหนักเซลล์แห้งที่แตกต่างทางสถิติกับการหมักที่พีเอชเริ่มต้นในอาหารหมัก 4.5 5.5 และ 6.0 แสดงดังภาพที่ 4.5



ภาพที่ 4.5 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 หมักในอาหาร YFM ที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกันที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

4.1.2.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

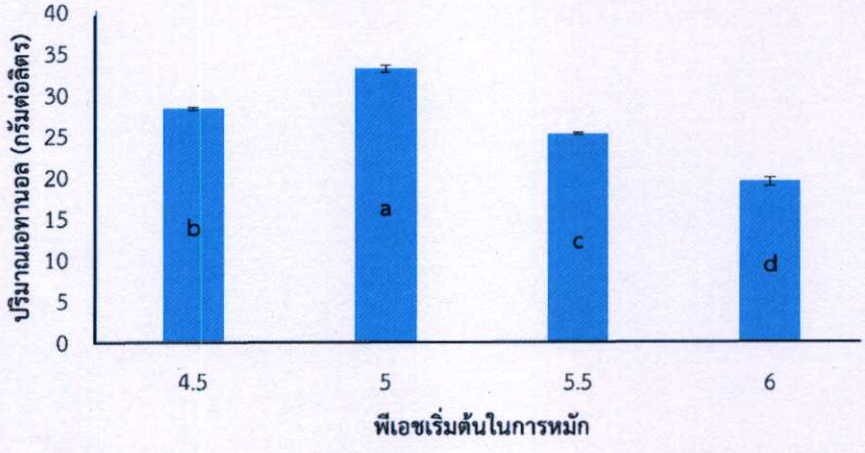
จากการทดลองพบว่า การหมักที่พีเอชเริ่มต้นในอาหารYFM 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในลักษณะเดียวกัน คือเมื่อใช้ระยะเวลาในการหมักนานขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตามระยะเวลาในการหมัก จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก(96 ชั่วโมง) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าต่ำสุด 0.68 ± 0.03 0.69 ± 0.01 0.85 ± 0.02 และ 0.85 ± 0.01 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักในอาหารYFM ที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารYFM ที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆ หมักโดย *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

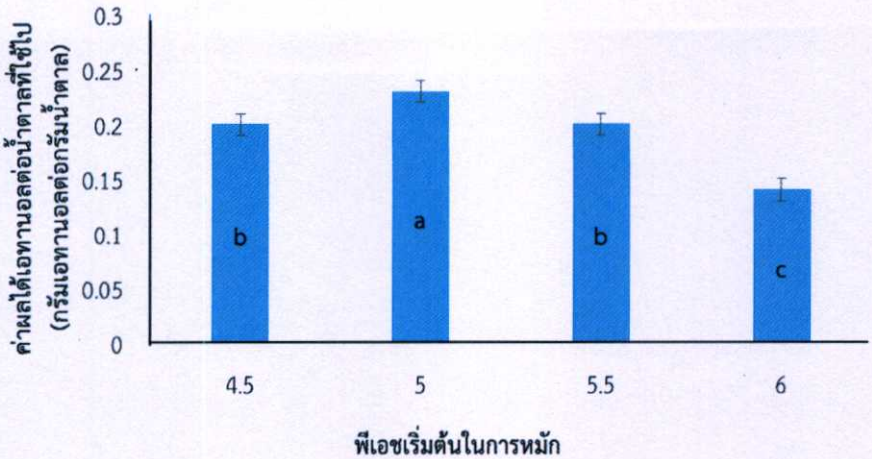
4.1.2.3 ปริมาณเอทานอล

จากการหมักในอาหารYFM ของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่พีเอชเริ่มต้นในอาหาร 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า อาหารหมักที่มีพีเอชเริ่มต้นแตกต่างกันปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักและสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 โดยพบว่า การหมักที่พีเอชเริ่มต้น 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ให้ปริมาณเอทานอล 28.25 ± 0.22 33.05 ± 0.42 25.18 ± 0.13 และ 19.42 ± 0.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.7 หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก(96 ชั่วโมง) การหมักที่พีเอชเริ่มต้น 4.5 5.0 5.5 และ6.0 ให้ปริมาณเอทานอล 18.93 ± 0.08 21.73 ± 0.19 15.62 ± 0.32 และ 13.61 ± 0.25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าการหมักโดยปรับพีเอชของอาหารYFM 5.0 ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการหมักในอาหารYFM ที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5 5.5 และ 6.0 ทุกระยะเวลาของการหมัก แสดงดังภาพที่ 4.7



ภาพที่ 4.7 ปริมาณเอทานอลในอาหารYFM ที่พีเอชเริ่มต้นต่างๆ หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

เมื่อวิเคราะห์ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักYFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่าการหมักในอาหาร YFM ที่ปรับพีเอชเริ่มต้น 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 มีค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้เป็น 0.20 0.23 0.20 และ 0.14 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เมื่อนำค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการหมักในอาหารYFM ที่มี พีเอชเริ่มต้น 5.0 ให้ผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปแตกต่างทางสถิติกับการหมักในอาหารYFM ที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.8



ภาพที่ 4.8 ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) ในอาหารYFM ที่พีเอชเริ่มต้นแตกต่างกัน หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

4.1.2.4 พีเอชของอาหารหมัก

จากการทดลองพบว่า พีเอชของอาหารหมักลดลงต่ำสุดใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้น พีเอชของอาหารหมักจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทุกชุดการทดลอง

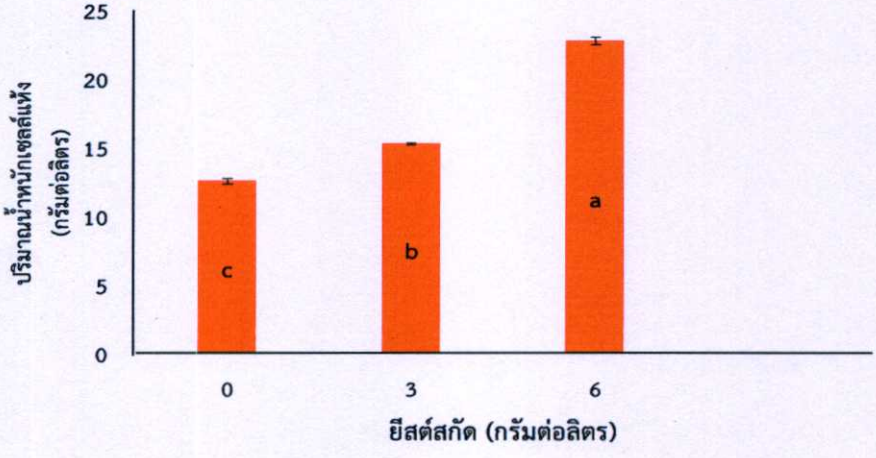
จากการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักYFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 พบว่าเชื้อยีสต์สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่พีเอชเริ่มต้นในอาหารหมัก 5.0 รองลงมาพีเอช 4.5 และ 5.5 ตามลำดับ สำหรับที่พีเอชเริ่มต้น 6.0 ยีสต์สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ต่ำสุด ดังนั้น จึงคัดเลือกพีเอช 5.0 มาใช้เป็นพีเอชเริ่มต้นในอาหารหมักYFM เพื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในปัจจัยอื่นต่อไป

4.1.3 ผลการศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหารหมัก YFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088

4.1.3.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

จากการหมักเอทานอลโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยอาหารหมัก YFM ที่มีการเติมยีสต์สกัดซึ่งใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ในปริมาณ 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมัก 5.0 และทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งพีเอชและอุณหภูมิในการหมักดังกล่าวให้ผลผลิตเอทานอลสูง ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลตามที่ได้จากการศึกษาในหัวข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากการทดลองวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า

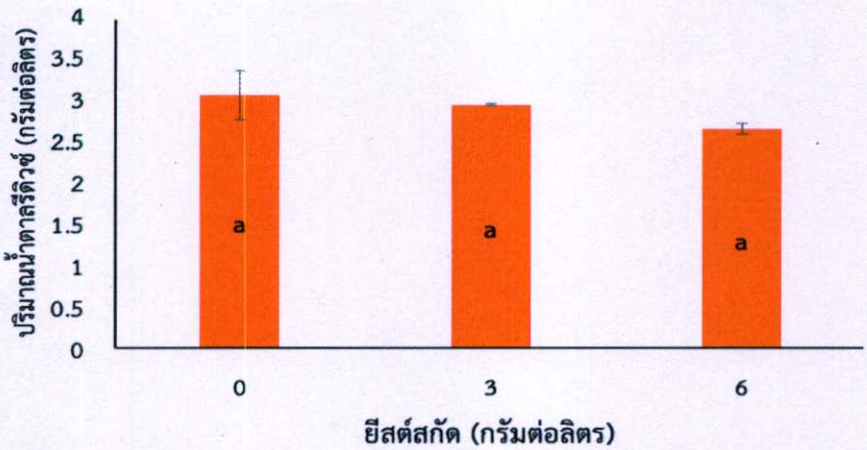
น้ำหนักเซลล์แห้งมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 48 การใช้ยีสต์สกัดทุกความเข้มข้นทำให้ *S. cerevisiae* TISTR 5088 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด โดยพบว่าการหมักที่ใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหารYFM เท่ากับ 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร ที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง จุลินทรีย์มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 12.61 ± 0.18 15.32 ± 0.06 และ 22.79 ± 0.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.9 หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก ที่เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง การหมักในอาหาร YFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำสุด 3.14 ± 0.06 5.72 ± 0.10 และ 8.48 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.11 จากการใช้ยีสต์สกัดความเข้มข้นแตกต่างกันพบว่าเมื่อใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหารYFM เท่ากับ 6 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อความเข้มข้นของยีสต์สกัดลดลง จะมีผลให้น้ำหนักเซลล์แห้งลดลงทุกระยะเวลาของการหมัก จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการหมักที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหาร 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เป็นเวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.9



ภาพที่ 4.9 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 หมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่แตกต่างกัน ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

4.1.3.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

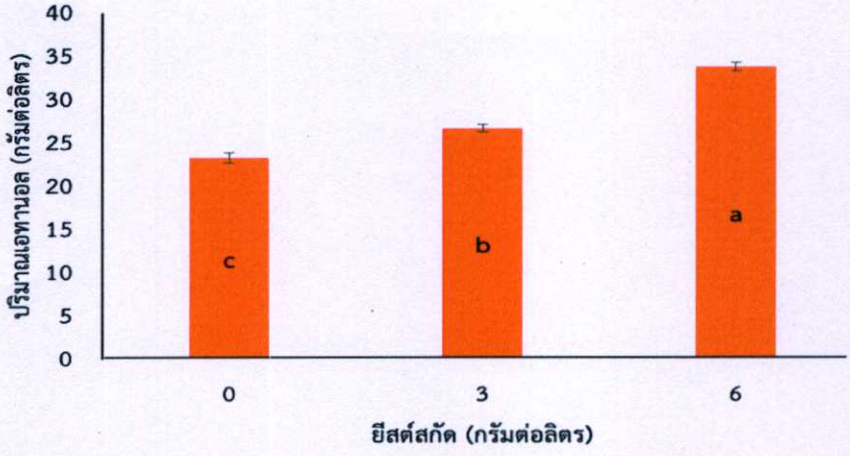
จากการทดลองพบว่า การหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในลักษณะเดียวกัน เมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้น ปริมาณน้ำตาล รีดิวซ์จะลดลงตามระยะเวลาการหมัก จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก (96 ชั่วโมง) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าต่ำสุด 0.80 ± 0.05 0.76 ± 0.04 และ 0.72 ± 0.02 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.10



ภาพที่ 4.10 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

4.1.3.3 ปริมาณเอทานอล

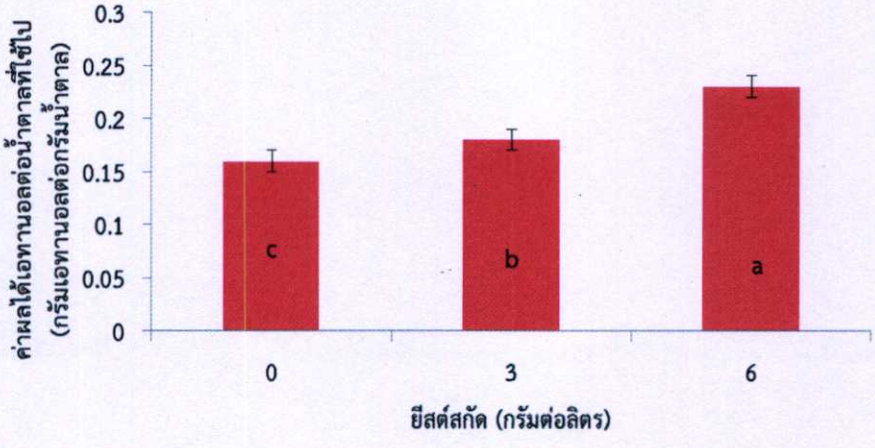
จากการหมักในอาหาร YFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมัก และสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 โดยพบว่าการหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอล 23.06 ± 0.59 26.45 ± 0.45 และ 33.62 ± 0.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตาราง 4.13 และรูปที่ 4.11 หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก(96 ชั่วโมง) โดยการหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอล 15.68 ± 0.37 16.60 ± 0.55 และ 22.57 ± 0.18 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่า การหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าอาหารหมักที่มียีสต์สกัด 0 และ 3 กรัมต่อลิตร ทุกระยะเวลาของการหมัก แสดงดังภาพที่ 4.11



ภาพที่ 4.11 ปริมาณเอทานอลในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด ที่ความเข้มข้นแตกต่างกันที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

เมื่อวิเคราะห์ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) จากการศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัดในอาหารหมัก YFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่าการหมักในอาหาร YFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 3 และ 6 กรัมต่อลิตร มีผลได้ เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้เป็น 0.16 0.18 และ 0.23 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ ตัวอักษรเหมือนกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

เมื่อนำค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการหมักในอาหาร YFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 3 และ6 กรัมต่อลิตร มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.12



ภาพที่ 4.12 ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) ในอาหาร YFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัดที่แตกต่างกัน หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

4.1.3.4 พีเอชของอาหารหมัก

จากการทดลองพบว่าพีเอชของอาหารหมักลดลงต่ำสุดใน 72 ชั่วโมงของการหมัก หลังจากนั้นพีเอชของอาหารหมักจะเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ซึ่งการหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร จะมีค่าพีเอชลดลงมากที่สุดเมื่อเทียบกับอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 และ 3 กรัมต่อลิตร ทุกระยะเวลาของการหมัก

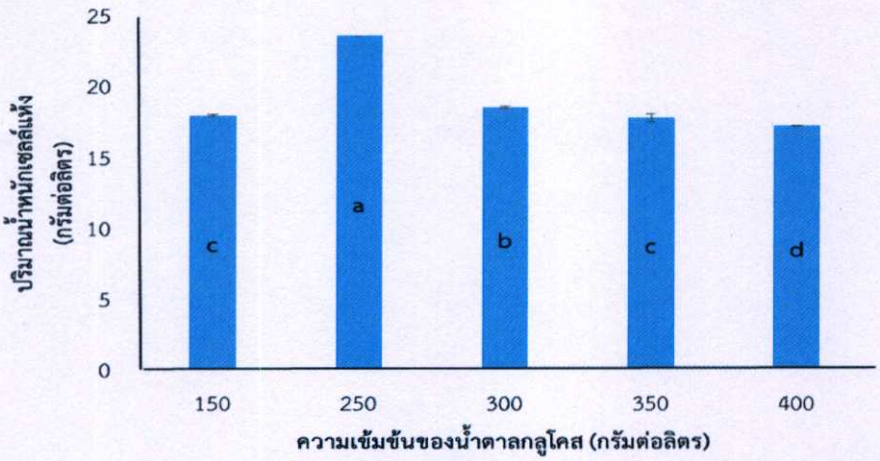
จากการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในการทดลองนี้ใช้ยีสต์สกัด ในอาหารหมัก YFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล พบว่าเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงเลือกยีสต์สกัดที่ความเข้มข้นดังกล่าวไปทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในปัจจัยอื่นต่อไป

4.1.4 ผลการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารหมัก YFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088

4.1.4.1 น้ำหนักเซลล์แห้ง

จากการหมักเอทานอลโดยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ด้วยอาหารหมักYFM ใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักให้เท่ากับ 5.0 และทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งพีเอชเริ่มต้น ความเข้มข้นของยีสต์สกัด และอุณหภูมิในการหมักดังกล่าวเป็นสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลตามที่ได้ศึกษาในหัวข้อ 4.1.1 4.1.2 และ 4.1.3 ทำการเก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากการทดลองวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 48 ทุกระดับความเข้มข้นของกลูโคส *S. cerevisiae* TISTR 5088 จะมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด โดยพบว่าการหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร ที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง จุลินทรีย์มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 19.90 ± 0.09 23.47 ± 0.02 18.45 ± 0.07 17.67 ± 0.29 และ 17.15 ± 0.04 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังรูปที่ 4.13 หลังจากนั้นน้ำหนักเซลล์แห้งจะลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก ที่เวลาในการหมัก 96 ชั่วโมง การหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งต่ำสุด 6.93 ± 0.03 9.51 ± 0.06 3.52 ± 0.06 2.98 ± 0.02 และ 1.95 ± 0.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.16 เมื่อเปรียบเทียบการหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารหมัก 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารหมัก 250 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเพิ่มหรือลดลงจาก 250 กรัมต่อลิตร จะมีผลให้เชื้อยีสต์เจริญได้น้อยลง น้ำหนักเซลล์แห้งจึงลดลงทุกระยะเวลาของการหมัก จากการวิเคราะห์ทางสถิติการหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร ที่

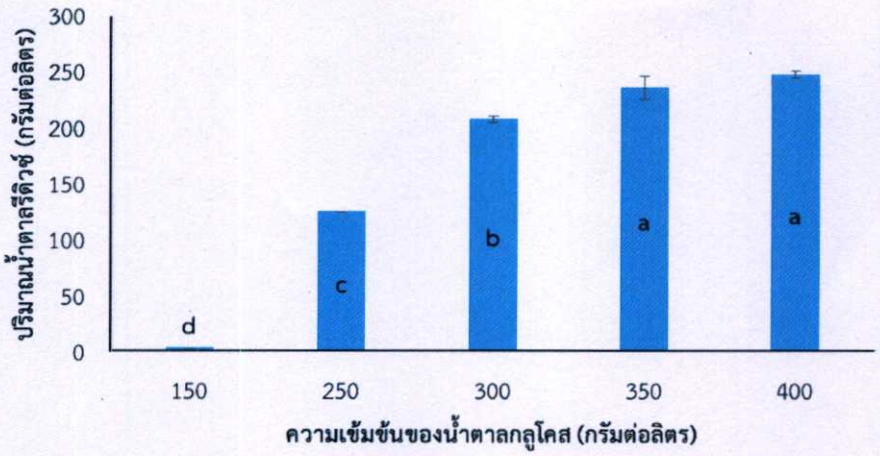
เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด จะมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.13



ภาพที่ **4.13** น้ำหนักเซลล์แห้งของ *S. cerevisiae* TISTR 5088 หมักในอาหาร YFM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกัน ที่เวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

4.1.4.2 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

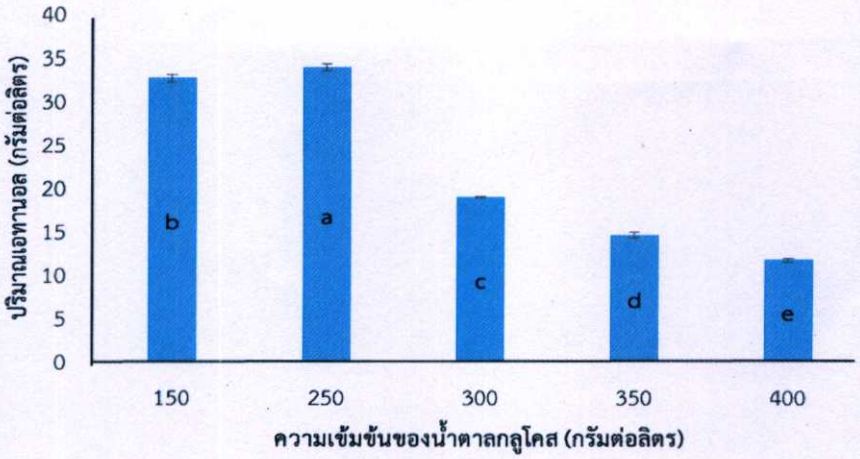
จากการทดลองพบว่า การหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในลักษณะเดียวกัน เมื่อระยะเวลาในการหมักนานขึ้นปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์จะลดลงตามระยะเวลาการหมัก จนถึงวันสุดท้ายของการหมัก(96 ชั่วโมง) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าต่ำสุด0.73 ± 0.01 110.32 ± 0.07 192.89 ± 0.91 201.51 ± 0.33 และ 236.94±16.66 กรัมต่อลิตร เมื่อหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.14



ภาพที่ 4.14 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

4.1.4.3 ปริมาณเอทานอล

จากการหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร โดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการหมักและสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 โดยพบว่าการหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอล 32.63 ± 0.40 36.87 ± 0.38 18.95 ± 0.07 14.52 ± 0.33 และ 11.67 ± 0.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังตารางที่ 4.18 และรูปที่ 4.15 หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลจะลดลงจนถึงวันสุดท้ายของการหมัก(96 ชั่วโมง) โดยการหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอล 22.38 ± 0.72 28.23 ± 0.52 10.31 ± 0.18 8.33 ± 0.21 และ 2.60 ± 0.26 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าการหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 250 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 150 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร ทุกระยะเวลาของการหมัก แสดงดังภาพที่ 4.15

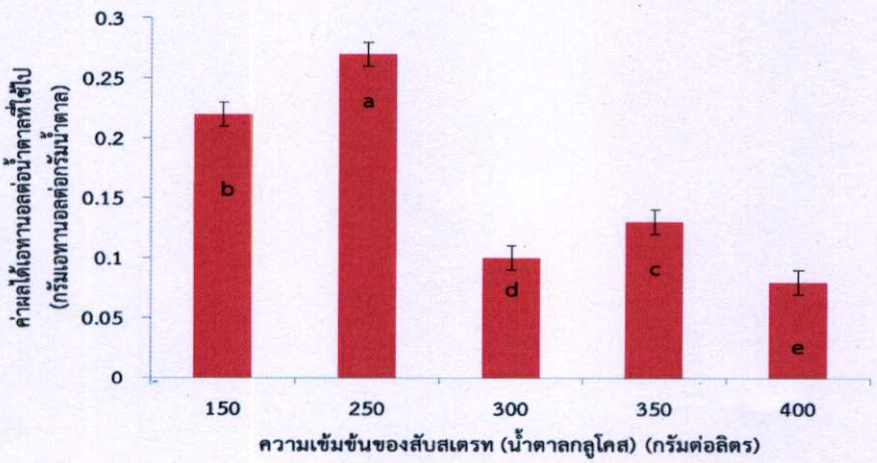


ภาพที่ 4.15 ปริมาณเอทานอลในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่แตกต่างกัน

ที่เวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

เมื่อวิเคราะห์ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป($Y_{p/s}$) จากการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารหมักYFM ที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่าการหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร มีผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้เป็น 0.22 0.27 0.10 0.13 และ 0.08 กรัม เอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ

เมื่อนำค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปมาวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการหมักในอาหาร YFM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 250 กรัมต่อลิตร ให้ผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไปสูงสุดและแตกต่างทางสถิติ กับการใช้น้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้น 150 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แสดงดังภาพที่ 4.16



ภาพที่ 4.16 ค่าผลได้เอทานอลต่อน้ำตาลที่ใช้ไป ($Y_{p/s}$) ในอาหาร YFM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน หมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง

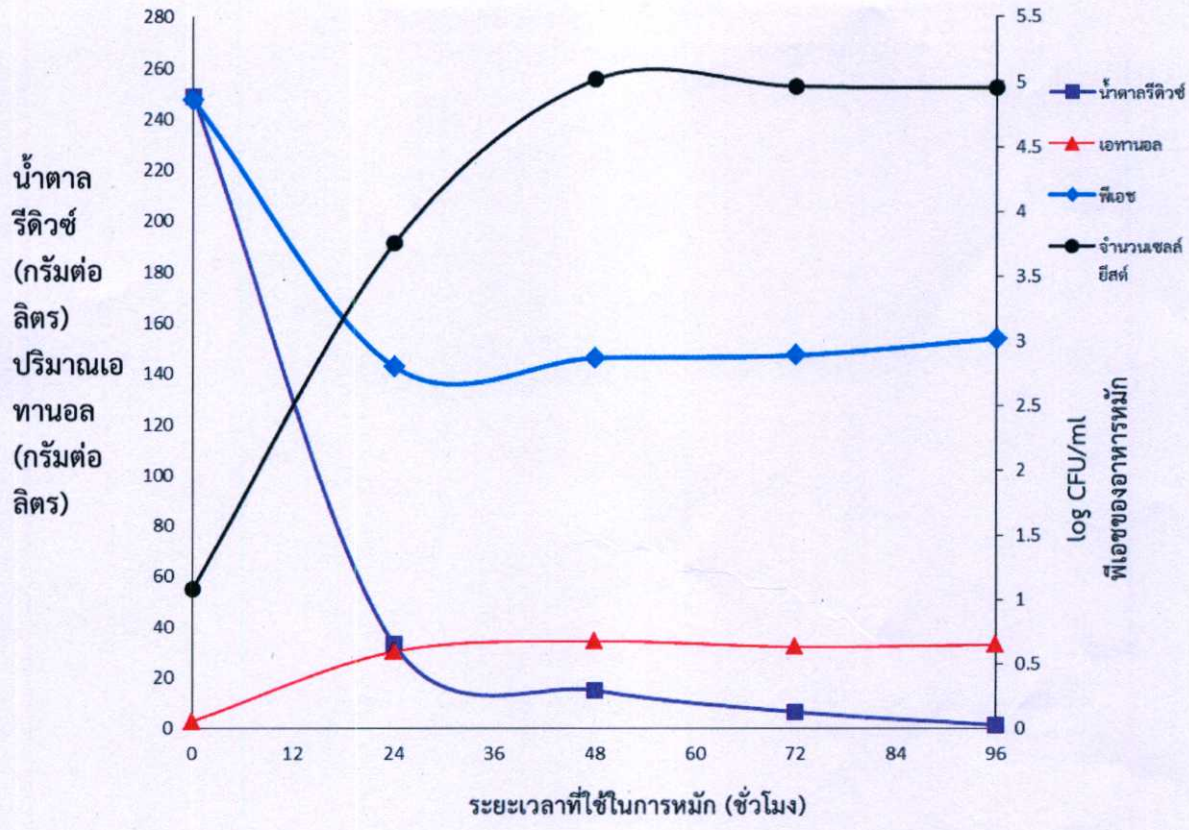
4.1.4.4 พีเอชของอาหารหมัก

จากการทดลองพบว่า พีเอชของอาหารหมักลดลงต่ำสุดใน 24 ชั่วโมงแรกของการหมัก หลังจากนั้นพีเอชของอาหารหมักจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยทุกระดับความเข้มข้นของกลูโคสในอาหารหมัก ซึ่งการหมักในอาหารYFM ที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร อาหารหมักจะมีค่าพีเอชลดลงมากสุดเมื่อเทียบกับการหมักในอาหารที่มีความเข้มข้นของกลูโคส 250 300 350 และ 400 กรัมต่อลิตร ทุกระยะเวลาของการหมัก

จากการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5088 พบว่าจุลินทรีย์สามารถเจริญและให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่เวลา 48 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นของกลูโคส 250 กรัมต่อลิตร ในขณะที่การใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่สูงขึ้นในอาหารหมัก มีผลทำให้เชื้อสามารถใช้น้ำตาลในอาหารหมักได้ลดลง การผลิตเอทานอลลดลงไปด้วย

4.2 ผลการศึกษาการเจริญและการหมักเอทานอลในอาหารหมัก YFM ในสภาวะที่เหมาะสม

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในอาหารหมักYFM ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง วิเคราะห์จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตโดยวิธี Spread plate ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และพีเอชของอาหารหมัก จากการทดลองพบว่าการผลิตเอทานอลสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยพบว่าชั่วโมงที่ 48 เชื้อเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงสุด โดยมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต log 5.02 CFU/ml (5.02×10^{10} CFU/ml) และให้ปริมาณเอทานอล 34.13 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หลังจากนั้นการเจริญของเซลล์ยีสต์มีแนวโน้มค่อนข้างคงที่และให้ปริมาณเอทานอลค่อนข้างคงที่เช่นเดียวกันจนถึง 96 ชั่วโมงของการหมัก สำหรับปริมาณน้ำตาล รีดิวซ์จะลดลงตลอดระยะเวลาของการหมัก เช่นเดียวกับพีเอชที่มีค่าลดลงในระหว่างการหมักจนถึง 96 ชั่วโมง แสดงดังภาพที่ 4.17



ภาพที่ 4.17 การเจริญและการผลิตเอทานอลจากอาหารหมัก YFM ในสภาวะที่เหมาะสมโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ในอาหารหมัก YFM ที่อุณหภูมิต่างๆ เก็บตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ 48 ชั่วโมงของการหมัก คือ 29.61 ± 0.17 กรัมต่อลิตร จากการทดลอง พบว่าเมื่ออุณหภูมิในการหมักเพิ่มขึ้น ปริมาณเอทานอลที่ได้จะลดลง จึงได้ใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงมาทำการศึกษาพีเอชเริ่มต้นของอาหารหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล พบว่าที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในอาหารหมักที่ปรับพีเอชเริ่มต้น 5.0 คือ 33.05 ± 0.42 กรัมต่อลิตร จึงได้ใช้พีเอชเริ่มต้นในอาหารหมัก 5.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงมาทำการศึกษาความเข้มข้นของยีสต์สกัดซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน ในการผลิตเอทานอล พบว่าที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตร คือ 33.62 ± 0.48 กรัมต่อลิตร ในขณะที่อาหารหมักที่มีความเข้มข้นของยีสต์สกัด 0 กรัมต่อลิตร(ไม่เติมยีสต์สกัด) ให้ปริมาณเอทานอลต่ำสุด คือ 23.06 ± 0.59 กรัมต่อลิตร จึงใช้ความเข้มข้นของยีสต์สกัด 6 กรัมต่อลิตรในอาหารหมัก ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงมาทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นสับสเตรทในการผลิตเอทานอล พบว่าที่ระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 250 กรัมต่อลิตร คือ 36.87 ± 0.38 กรัมต่อลิตร รองลงมาคือ อาหารหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอล 32.63 ± 0.40 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ความเข้มข้นของ น้ำตาลกลูโคสในอาหารหมักสูงขึ้น ปริมาณเอทานอลที่ได้จะลดลง ซึ่งอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300, 350 และ 400 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอล 18.95 ± 0.07, 14.52 ± 0.33 และ 11.67 ± 0.17 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

จากการศึกษาการเจริญและการหมักเอทานอลในอาหารหมัก YFM ในสภาวะที่เหมาะสมโดยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5088 พบว่าชั่วโมงที่ 48 เชื้อมีการเจริญและผลิตเอทานอลได้สูงสุด หลังจากนั้นการเจริญและการผลิตเอทานอลจะลดลงและคงที่ แสดงให้เห็นว่าเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ

เอกสารอ้างอิง

กมล สุขสวัสดิ์ และ สุเปรมปรีดิ์ นาคา. 2549. ยีสต์ในอุตสาหกรรมไบโอเอทานอล. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 2. 318 น. หน้า 98-117

ไกรพัฒน์ จีนขจร. 2550. พลังงานหมุนเวียน. สำนักพิมพ์สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น). กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 1. 168 น. หน้า 12-17.

จิรศักดิ์ คงเกียรติขจร. 2554. กระบวนการกลั่นเอทานอลในระบบอุตสาหกรรม. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ปีที่ 49. ฉบับที่7. หน้า 34-42

ชุติมาศรีงิ้ว. 2548. การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง. ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยาภาควิชาจุลชีววิทยา,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดาวัลย์ ฉิมภู่. 2553. ชีวเคมี. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 4. 572 น. หน้า 213-237

ถกลวรรณ ภักดี และ เยาวลักษณ์ วัฒนาวรสกุล. 2550. การหาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอลจากมันสำปะหลังโดยใช้เทคนิคการออกแบบ. วารสารวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. ปี ที่ 32. ฉบับที่4. หน้า 65-72.

ธีรภัทร ศรีนรคุตร. 2543. เชื้อเพลิงเอทานอลจากวัสดุการเกษตร :แหล่งพลังงานทางเลือกใหม่ของคนไทย. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. ปีที่ 15. ฉบับที่ 3 กันยายน – ธันวาคม 2543. หน้า 5 -8.

นคร ทิพยาวงศ์. 2552. เทคโนโลยีการแปลงสภาพชีวมวล. สำนักพิมพ์สมาคมส่งเสริมเทคโนโลยี (ไทย-ญี่ปุ่น). กรุงเทพฯ. พิมพ์ครั้งที่ 1. 662 น. หน้า 122-147.

นวลจิตต์ นาคบำรุง.2543. สรีระวิทยาของยีสต์. จุลชีววิทยา. สำนักพิมพ์ภูมิบัณฑิต.กรุงเทพฯ. 520 น. หน้า 47-56

พรรณี ทองจีน. 2557. สถานการณ์การใช้เอทานอลเป็นพลังงานทดแทนในประเทศไทย. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. ปีที่ 30. ฉบับที่ 2. หน้า 811-820.

วิโรจน์ พุทธวิถี. 2553. เอทานอล. [เมื่อ 27 ธันวาคม 2557] ได้จาก http://waterpacific.com/index.php

สมใจ ศิริโภช. 2555. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. กรุงเทพฯ. 352 น. หน้า 87-98

สุวภัทร จันทโชติ, ปวีณา แก้วสวย และชาติชาย เหล่าเจริญ. 2555. ชีววิทยาของกระบวนการหมัก.ชีวเคมี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 23-26

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ 249 น. หน้า 77-79

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

อนุสิษฐ์ธนะพิมพ์เมธา. 2554. ยีสต์ :ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 611 น. หน้า 1-11.

Amrane, A. and Y. Prigent, Y. 1999. Differentiation of pH and free lactic acid effects on the various growth and production phases of *Lactobacillus helveticus*. *Chem. Technol. Biotechnol*. 74: 33-40.

Anderson, P.J., Mcneil, K. and Watson, K. 1986. High-efficiency carbohydrate fermentation of ethanol at temperature above 40°C by *Kluveromycesmarxianus*var. *Marxianus* isolated from sugar mills. *Applied and Environmental Microbiology*.51 : 1314 - 1320.

Anuradha, R., Suresh, A. K. andVenkatesh, K. V. 1999. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid.*Process Biochem*. 35: 367-375.

Berry, A. R., Franco, C. M., Zhang, W. and Middelberg, A. P. J. 1999.Ammonium lactate production by *Saccharomyces cerevisiae*BME5-18M in pH-controlled fed-batch fermentation.*Biochem. Eng. J*. 19: 47-51.

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

Dombek, K.M, Ingram, L.O. 1986. Effect of ethanol on the *Escherichia coli* plasma membrane. *Bacteriol*.157 : 233-239.

Fu. R.K., Shibata., R.B. and Allen,. H. 1999. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonasmobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*, Vol.22 : 179-184

Hacking, T.l., Aris, M. and Elias Nerantzis. 1984. Production of Ethanol from Molasses and Whey Permeate Using Yeasts and Bacterial Strains. *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci*, 3(3): 804-818

He, M.X., Feng, H., Bai, F., Li, Y., Liu, X., and Zhang , Y. Z. 2009. Direct production of ethanol from raw sweet potato starch using genetically engineered *Zymomonasmobilis*. African *Journal of Microbiology Research*, 3.721-726.

Kaido, Y., Rita, W. and. Mathews, A. P. 1999. Ethanol production from glucose by *Saccharomycescerevisiae*: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. *Biochem. Eng*. J. 3. : 163-170.

Krishna, D.L., Tomis, Y.R. and Irini A.N.2001.Optimization of ethanol production process from cassava starch by surface response.*J. Mex. Chem. Soc*, 54(4), 198-203.

Lee.I-Chu Chen, Wen-ShiangChebg-Hsiung Chang, Shang-Shyng Yang. 2012. Bioethanol production from sweet potato by co-immobilization of saccharolytic molds and *Saccharomyces cerevisiae.Renewable Energy*. 39. 216-222.

Lin, C.Y. 2006.Potential and future direction in local and global development of biomass energy.In : Lin LF, KuoMc, Yang SS, Chen CY, editors. Development and utilization of biomass energy.Taiwan : National Taiwan University. P. 39-55.

Lin, Yan., Zhang, Wei. Li Chunjie, Kei Sakakibara, Shuzo Tanaka, Hainan Kong, 2012. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY 4742.*Biomass andBioenergy*. 47. 395-401.

Luong, P. 1990. Kinetic of ethanol inhibition in alcohol fermentation : on the inhibition of ethanol. *Biotechnol. Bioeng*. 27(3) : 280-285.

Miller., T.R. 1959. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae* .*FEMS Microbiology Letters*.Vol.24 , no.2 : 375-379

Nagarjun, K. and Adachi, T., 2005.Optimization of ethanol production in SSF by *Kluveromyces marxianus*NRRL B-4542 using Taguchi methodology.*J. Microbiol*. 43 : 38-45

Spencer, S., Jane, J., and Maner, L.M. L, 2007. Physicochemical properties of starch affected by molecular composition and structures : a review. *Food Science and Biotechnology*, 16. 663 – 674.

Sree, K., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I.M. and Venkateswar, R.L. 2000. Characterisation of thermotolerant,ethanol tolerant fermentative *Saccharomyces cerevisiae*for ethanol production. *Bioprocess Engineering*.72 : 43-46.

Sree, K., Sridhar, S.K, Banat, I.M., Venkateswar, R.L. 2000.Isolation of thermotolerant, osmotolorant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production *Bioresource Technology*.54 : 11-19.

Swanson, U., Ellen, C., and Barbosa, M., 1992.Bioethanol production from renewable polymer lichenan using lichenase from an alkalothermophilic*Thermomonospora* sp. Andthermotolerant yeast. *Fuel Processing Technology* : 401–406

Walker, P.B. 1998 .Bioethanol Production by Carbohydrate -Enriched Biomass of Arthrospira

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการวิจัย

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)	นางสาวปรียานุช ศรีไพบูลย์
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	Miss. Priyanuch Sripaiboon
ตำแหน่งทางวิชาการ	นักวิทยาศาสตร์
ภาควิชา	ชีววิทยา หน่วยงานต้นสังกัด คณะวิทยาศาสตร์
โทรภายใน 6257	โทรสาร 02-3298427

E.mail : priyanuch.sr@kmiti.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)	นางสาวเบญจมาศ เขตรดง
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	Miss. Benjamas Kaddong
ตำแหน่งทางวิชาการ	นักวิทยาศาสตร์
ภาควิชา	ชีววิทยา หน่วยงานต้นสังกัด คณะวิทยาศาสตร์
โทรภายใน 6348	โทรสาร 02-3298427

E.mail : Benjamas.ka@kmitl.ac.th

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ-สกุล (ภาษาไทย)	รศ.ดวงใจ โอชัยกุล
ชื่อ-สกุล (ภาษาอังกฤษ)	Mrs.Duangjai Ochaikul
ตำแหน่งทางวิชาการ	รองศาสตราจารย์
ภาควิชา	ชีววิทยา หน่วยงานต้นสังกัด คณะวิทยาศาสตร์

E.mail : kodaungj@kmitl.ac.th