สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการอยู่ร่วมกันของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 และ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

นาย กมล ตันติรักษ์
นางสาว สุเปรมปรีดิ์ สุพรหมอินทร์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2540

ป/ว.
ก 132ก
เลขหมู่ 2540
เลขทะเบียน 30610
วัน, เดือน, ปี 29 ก.ค. 2541

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Study on mixed culture of *Saccharomyes carlsbergensis* ATCC 44732 and *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 for ethanol fermentation

Mr. Kamol Tantirak

Miss. Susprempree Suprom-in

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1997

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการอยู่ร่วมกันของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 และ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

โดย นาย กมล ตันติรักษ์

นางสาว สุเปรมปรีดิ์ สุพรหมอินทร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อรไท สุขเจริญ

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ

(ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

..... กรรมการ

(รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

..... กรรมการ

(ผศ. อรไท สุขเจริญ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาการอยู่ร่วมกันของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 และ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

โดย นาย กมล ตันติรักษ์
นางสาว สุเปรมปรีดิ์ สุพรหมอินทร์

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ. อรไท สุขเจริญ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

ปีการศึกษา 2540

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44723 และ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล พบว่าเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิด เมื่อเลี้ยงโดยใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอล ได้ดีกว่าเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และการอยู่ร่วมกันของเชื้อยีสต์ทั้งสองชนิด ที่มีจำนวนเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีอัตราส่วนของเชื้อทั้งสองเป็น 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเท่ากับ 6 และมีอัตราการกวนผสมเท่ากับ 200 รอบต่อนาที สามารถให้ผลผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดเป็นร้อยละ 13.9 ในชั่วโมงที่ 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Study on mixed culture of ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 and ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 for ethanol fermentation

Name Mr. Kamol Tantirak
Miss. Suprempree Suprom-in

Special project Advisor Assistant Professor Orathai Sukcharoen

Department Applied Biology

Academic Year 1997

ABSTRACT

Mixed culture of ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44723 and ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 for ethanol production was studied. The result showed that both stains can grow and produce ethanol in sucrose higher than using glucose. At the ratio of ***Saccharomyces carlsbergensis*** ATCC 44732 and ***Schizosaccharomyces pombe*** ATCC 2476 are 1:1 by volume. It was found that the 10^4 cell per millilitre can produce ethanol 13.9% in 54 hrs in the culture meidum pH6 and agitation rate at 200 rpm.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาไทย	ก.
บทคัดย่อปัญหาพิเศษภาษาอังกฤษ	ข.
กิตติกรรมประกาศ	ค.
สารบัญตาราง	ง.
สารบัญรูป	จ - ฉ.
บทที่ 1 บทนำ	1.
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3.
บทที่ 3 อุปกรณ์ และขั้นตอนดำเนินการทดลอง	16.
บทที่ 4 ผลการทดลอง	20.
บทที่ 5 บทสรุป และข้อเสนอแนะ	38.
ภาคผนวก	
เอกสารอ้างอิง	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต และสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ. อรไท สุขเจริญ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษที่ให้ความรู้ ข้อเสนอแนะ รวมทั้งได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษา และให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ ในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้ รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์ และ ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง กรรมการสอบโครงงานพิเศษ และได้กรุณาตรวจทานแก้ไขทางด้านภาษาด้วย รวมทั้ง คุณพยอม เกียรติกำจร คุณวิทยา เขียวเขิน คุณธวัชชัย เปรมศรี เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ยืมอุปกรณ์ และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับทำการทดลอง

สุดท้ายคณะผู้จัดทำขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่านที่ให้ยืมอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมทั้งเพื่อนนักศึกษาทุกท่านที่ช่วยเหลือในการจัดทำโครงงานพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำ

มีนาคม 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แสดงแหล่งคาร์บอนที่ผลิตเอทานอลของยีสต์จีนัส *Saccharomyces*	3.
2.	แสดงแหล่งคาร์บอนที่ผลิตเอทานอลของยีสต์จีนัส *Schizosaccharomyces*	5.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	แสดงวงชีวิตของยีสต์โดยการแตกหน่อ	4.
2.	ลักษณะรูปร่าง *Saccharomyces cerevisiae*	5.
3.	ลักษณะรูปร่าง *Schizosaccharomyces pombe*	6.
4.	การใช้น้ำตาลกลูโคสโดยเซลล์ของยีสต์	7.
5.	แผนภาพแสดงการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปที่ใช้ในอุตสาหกรรม	9.
6.	แผนภาพแสดงวิถี Embden-Meyerhof-Parnas Pathway	11.
7.	กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส	20.
8.	กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส	21.
9.	กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ต่างกัน	23.
10.	กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ต่างกัน	24.
11.	กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อทั้งสอง ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:1 3:1 และ 1:3 ตามลำดับ	26.
12.	กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อทั้งสอง ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:1 3:1 และ 1:3 ตามลำดับ	27.
13.	กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อทั้งสอง ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:1 3:1 และ 1:3 ตามลำดับ	28.
14.	กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* หรือ *Schizosaccharomyces pombe* หรือ การอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสอง ในอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 ที่พีเอช 4	30.
15.	กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* หรือ *Schizosaccharomyces pombe* หรือ การอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสอง ในอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 ที่พีเอช 5	31.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ **หน้า**

16. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* **หรือ** *Schizosaccharomyces pombe* **หรือ** การอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสอง **ในอัตราส่วน** 1:1 และ 3:1 **ที่พีเอช** 6 **32.**

17. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* **หรือ** *Schizosaccharomyces pombe* **หรือ** การอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสอง **ในอัตราส่วน** 1:1 และ 3:1 **ที่พีเอช** 7 33.

18. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อยีสต์ทั้งสอง **ในสภาวะต่างๆ โดยมีพีเอชเริ่มต้นเป็น** 6 36.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่1
บทนำ

แอลกอฮอล์เป็นสารที่มีความสำคัญในทางอุตสาหกรรม เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ การใช้เป็นตัวทำละลาย น้ำยาฆ่าเชื้อ เชื้อเพลิง และสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีอื่นๆ นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการผลิตสี และน้ำมันชักเงา เครื่องสำอาง พลาสติก และอื่นๆ สำหรับในประเทศไทย ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ประมาณร้อยละ 70 จะนำไปใช้ทำสุรา และอีกประมาณร้อยละ 30 จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ

แอลกอฮอล์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ จะได้จากการหมักน้ำตาลโดยเชื้อยีสต์ในสภาพไร้ออกซิเจน โดยสภาวะดังกล่าว ยีสต์สามารถเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งแสดงดังสมการที่ 1

$$C_6H_{12}O_6 \xrightarrow[\text{yeast}]{} 2C_2H_5OH + 2CO_2 \qquad \text{สมการที่ 1}$$

ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ยีสต์สามารถผลิตได้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ อุณหภูมิและความเข้มข้นของน้ำตาลซึ่งต้องควบคุมให้เหมาะสมกับยีสต์แต่ละสายพันธุ์ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ เมื่อใช้ยีสต์ที่มีคุณสมบัติต่างกัน 2 ชนิด คือ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 และ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 โดย *Saccharomyces carlsbergensis* เป็นยีสต์ประเภท bottom yeast เนื่องจาก ในระหว่างการหมักยีสต์จะแขวนลอยอยู่ในถังหมัก และเมื่อปริมาณน้ำตาลถูกใช้เกือบหมด ยีสต์จะเริ่มเกาะกันเป็นกลุ่มและจมลงสู่ก้นถังหมัก ในขณะที่ *Schizosaccharomyces pombe* เป็นยีสต์ประเภท top yeast เนื่องจากในระหว่างการหมักยีสต์จะลอยขึ้นมาอยู่ที่ผิวหน้าของน้ำหมัก จากคุณสมบัติที่ต่างกันทั้งสองชนิดนี้ จึงคาดว่าการอยู่ร่วมกันของยีสต์ทั้งสอง อาจมีส่วนเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแอลกอฮอล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะการอยู่ร่วมกันของเชื้อยีสต์ 2 ชนิด (*Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 , *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476) เปรียบเทียบกับการอยู่โดยลำพัง ของเชื้อยีสต์แต่ละชนิด ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำตาล

2. เพื่อศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้น และสัดส่วนของเชื้อยีสต์ที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอทานอล

3. เพื่อศึกษา พีเอช เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

4. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการผลิตแอลกอฮอล์ในถังหมักได้แก่ ความเร็วรอบ และอัตราการให้อากาศ

ขอบเขต

1. ศึกษาปริมาณเซลล์เริ่มต้นและสัดส่วนที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 และ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 ต่อการผลิตแอลกอฮอล์

2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการอยู่ร่วมของเชื้อยีสต์ 2 ชนิด เช่น ความเร็วรอบ พีเอชเริ่มต้นที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบลักษณะของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 และ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 ตลอดจนลักษณะการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสอง ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

ยีสต์ และคุณสมบัติของยีสต์ที่ผลิตเอทานอล

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญ ในปัจจุบันอุตสาหกรรมหลักที่ใช้ยีสต์ในการผลิต จัดเป็นอุตสาหกรรมหมักที่ใหญ่ที่สุด มีดังนี้

1. เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ (Alcoholic beveranges) ได้แก่เบียร์ และสุราชนิดต่างๆ
2. ยีสต์ในการทำขนมปัง (Bakers' yeast)
3. ยีสต์อาหารคนและอาหารสัตว์ (Food and fodder yeast)
4. แอลกอฮอล์เชื้อเพลิง (Fule alcohol)

1. วงจรชีวิตของยีสต์

ยีสต์จีนัส *Saccharomyces* มีรูปร่างเป็นเซลล์เดียว (uniceilular) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6-8 ไมครอน เจริญได้ดีในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) ดังแสดงในรูปที่ 1

2. ยีสต์ที่ผลิตเอทานอล

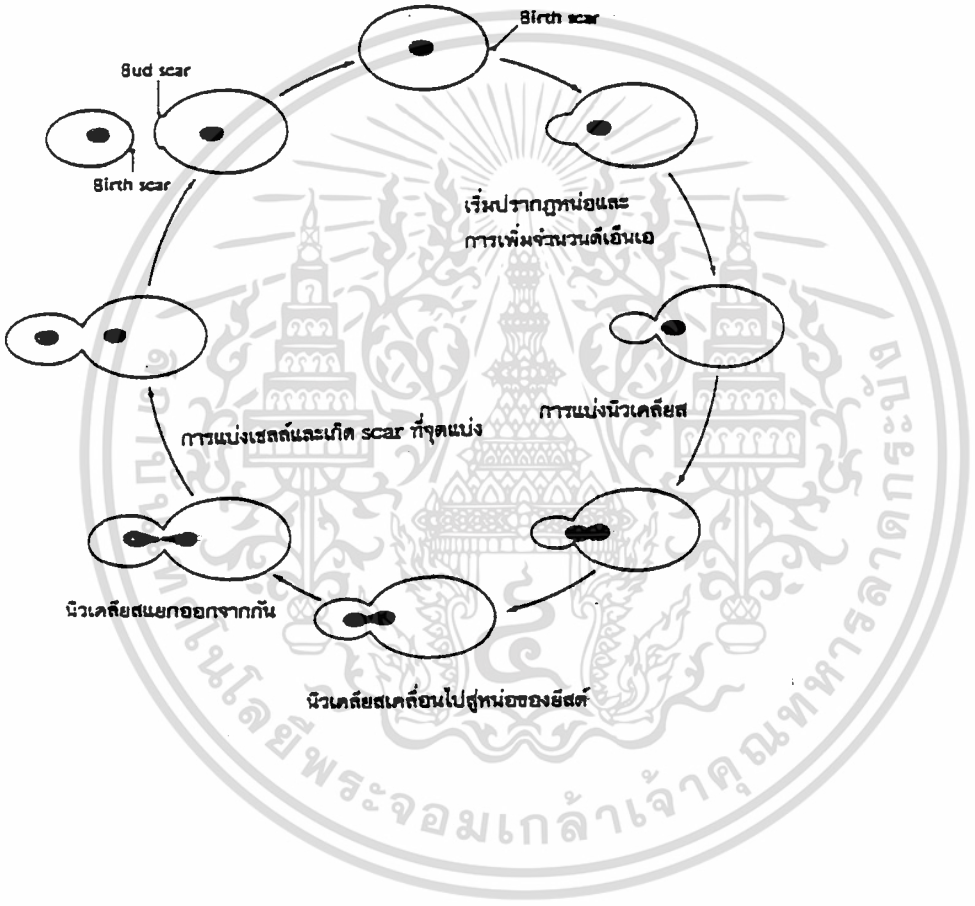
2.1 จีนัส *Saccharomyces*

ได้แก่ *Saccharomyces cerevisiae* , *Saccharomyces uvarum* , *Saccharomyces batatae* , *Saccharomyces carlsbergensis* , *Saccharomyces globosus*

ตารางที่ 1. แสดงแหล่งคาร์บอนที่ผลิตเอทานอลของยีสต์จีนัส *Saccharomyces*

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์ของยีสต์
กลูโคส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
กาแลคโตส	ผลิตได้บางสายพันธุ์
ซูโครส	ผลิตได้บางสายพันธุ์
มอลโตส	ผลิตได้บางสายพันธุ์
แลคโตส	ไม่มีสายพันธุ์ที่ผลิตได้

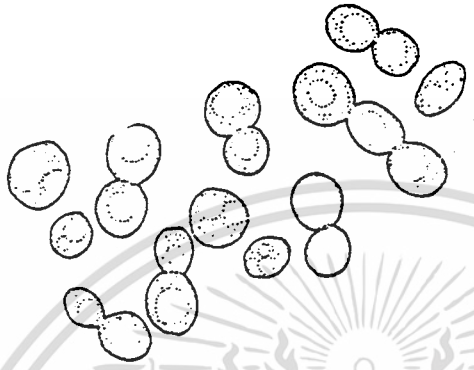
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1. แสดงวงจรชีวิตของยีสต์โดยการแตกหน่อ (Atlas,1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะรูปร่าง



รูปที่ 2. *Saccharomyces cerevisiae* , CBS 1171 (The yeast, et al, 1956)

2.2 จีนัส *Schizosaccharomyces*

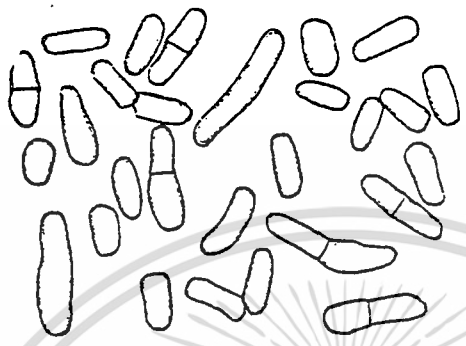
ได้แก่ *Schizosaccharomyces pombe* , *Schizosaccharomyces mellacei* , *Schizosaccharomyces formosensis* , *Schizosaccharomyces vordermani*

ตารางที่ 2. แสดงแหล่งคาร์บอนที่ผลิตเอทานอลของยีสต์จีนัส *Schizosaccharomyces*

แหล่งคาร์บอน	สายพันธุ์ของยีสต์
กลูโคส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
กาแลคโตส	ไม่มีสายพันธุ์ที่ผลิตได้
ซูโครส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
มอลโตส	ผลิตได้ทุกสายพันธุ์
แลคโตส	ไม่มีสายพันธุ์ที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะรูปร่าง



รูปที่ 3. *Schizosaccharomyces pombe* (The yeast , ed. al , 1952)

3. คุณสมบัติของยีสต์ต่อการผลิตเอทานอล

ยีสต์ที่มีการนำมาศึกษามากคือ Bakers ' yeast (ยีสต์ทำขนมปัง) และยีสต์ที่ใช้ผลิตแอลกอฮอล์(Brever ' s yeast) ซึ่งเป็นยีสต์ในจีนัส Saccharomyces ที่สามารถเปลี่ยนเมตาบอลิสมจากการหมักไปเป็นการหายใจแบบใช้ออกซิเจนได้ และพลังงานที่ได้จะมีค่าต่างกันถึง 19 เท่า นอกจากนั้นยีสต์ยังแสดงบทบาทที่สำคัญในกระบวนการทำเบียร์ ไม่เฉพาะแต่การเปลี่ยนน้ำตาลในการหมักให้เป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์เท่านั้น แต่จะผลิตสารประกอบที่ไม่ให้กลิ่นรส และสารประกอบที่ให้กลิ่นรสต่างๆของเบียร์

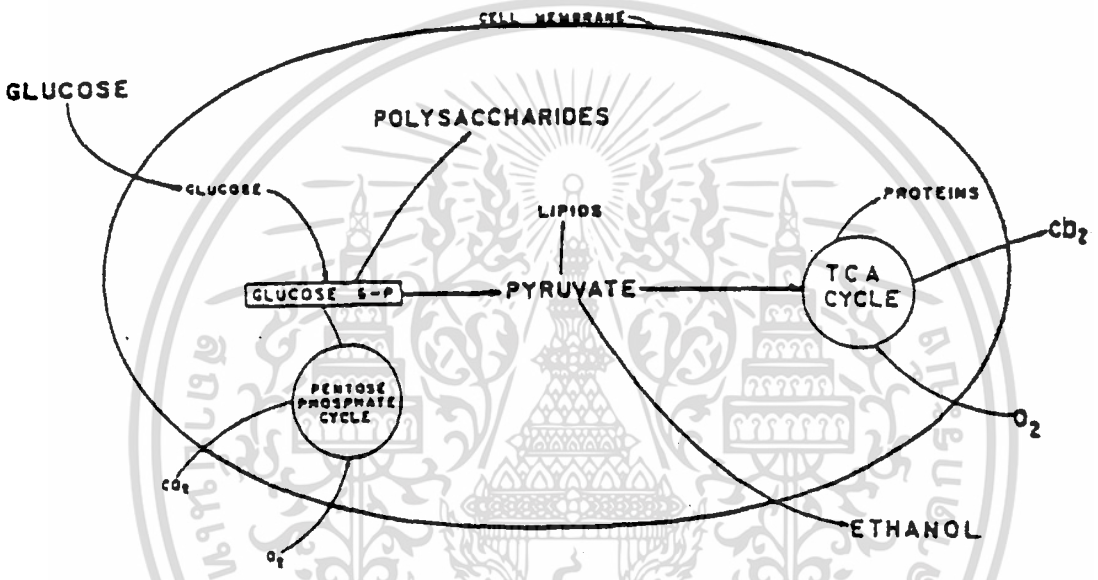
เชื้อยีสต์เพื่อผลิตเอทานอล มีความแตกต่างกันที่สายเชื้อของยีสต์ที่ใช้ในการหมัก และสภาวะที่ใช้ในการหมัก คือ

2.1 Bottom Fermentation เป็นกระบวนการหมัก โดยใช้ยีสต์สายเชื้อ *Saccharomyces uvarum (Saccharomyces carlsbergensis)* ในการหมักยีสต์จะแขวนลอยอยู่ในถังหมักและใช้น้ำตาล เมื่อน้ำตาลในน้ำหมักลดลงเกือบหมดแล้ว ยีสต์จะเริ่มเกาะกันเป็นกลุ่มและจมลงสู่ก้นถังหมัก การตกตะกอนนี้เรียกว่า flocculation ยีสต์ที่ตกตะกอนนี้จะถูกแยกไปหลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดลง

2.2 Top Fermentation เป็นกระบวนการหมัก โดยใช้ยีสต์สายเชื้อ *S.cerevisiae* , *Schizosaccharomyes pombe* ในระหว่างการหมักเชื้อยีสต์จะลอยขึ้นมาอยู่ที่ผิวหน้าของน้ำหมัก มีลักษณะเป็นชั้นยีสต์ที่หนา หลังจากกระบวนการหมักสิ้นสุดลง ยีสต์ที่ผิวหน้าจะถูกแยกออกไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล ยีสต์จะนำกลูโคสไปใช้ในกระบวนการเมทาบอลิสม ซึ่งภายใต้สภาวะที่เหมาะสม กระบวนการเมทาบอลิสมที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ยีสต์แสดงไว้ในรูปที่ 4



รูปที่ 4. การใช้น้ำตาลกลูโคสโดยเซลล์ของยีสต์ (Stewart, 1987)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. เอทานอล

แอลกอฮอล์ในที่นี้หมายถึงเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) หรือเอทานอล (ethanol) มีสูตรทางเคมี คือ CH_3CH_2OH ซึ่งเอทานอลสามารถผลิตได้ 2 วิธี (จรัญ,2527) ดังแผนภาพแสดงการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปที่ใช้ในอุตสาหกรรมในรูปที่ 5 คือ

1. การสังเคราะห์ทางเคมีโดยใช้เอทีลีน ที่เป็นผลิตผลพลอยได้จาก การใช้ปิโตเลียมเป็นวัตถุดิบ

2. การหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ โดยใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบ ซึ่งอาจเป็นน้ำตาลที่ได้จากพืชโดยตรง เช่น จากอ้อย หัวผักกาดหวาน หรือเป็นน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งหรือเซลลูโลส

5. การผลิตเอทานอลจากยีสต์

การผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่นั้น เป็นการใช้ยีสต์เพื่อเป็นการผลิตโดยกลไกการผลิตเอทานอลนั้น พบว่าในสภาพที่มีออกซิเจนยีสต์จะใช้กลูโคสเพื่อสร้างพลังงาน ผลผลิตที่ได้จะเป็นน้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานซึ่งอยู่ในรูป ATP เรียกกระบวนการนี้ว่า การหายใจ (Respiration) ดังสมการที่ 2

$$C_6H_{12}O_6 + 6CO_2 \longrightarrow 6H_2O + 6CO_2 + 38\ ATP \qquad \text{สมการที่ 2}$$

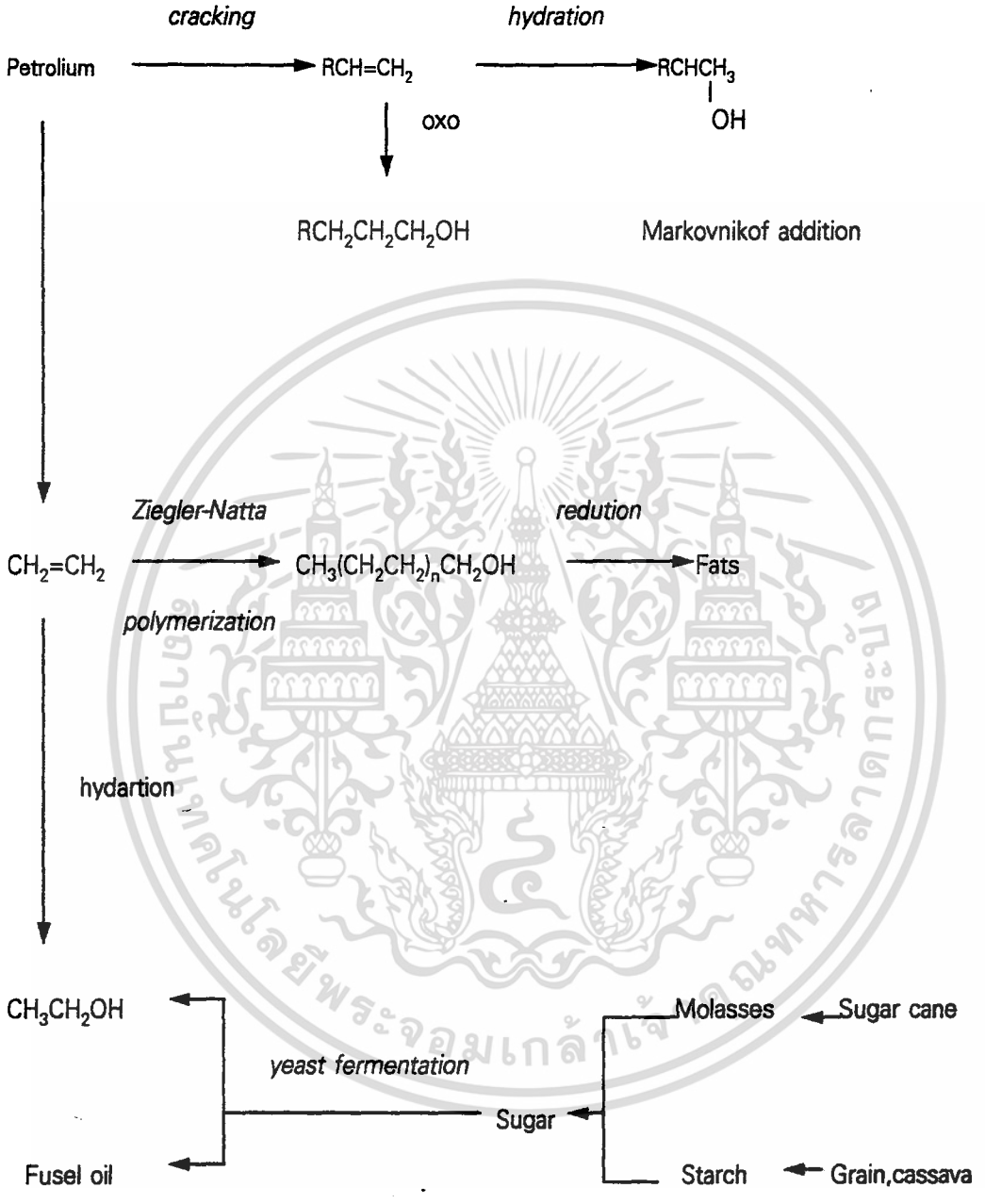
ส่วนในสภาพที่ไร้ออกซิเจน ยีสต์จะเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นเอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานในรูป ATP แต่จำนวน ATP จะได้น้อยกว่าการหายใจมาก เพราะพลังงานส่วนใหญ่สามารถเก็บอยู่ในโมเลกุลของเอทานอล ซึ่งยีสต์ไม่สามารถนำพลังงานในส่วนนี้ไปใช้ได้ ปรากฏการณ์นี้คือ การหมักเอทานอล (Ethanol Fermentation) ดังในสมการที่ 3

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2\ ATP \qquad \text{สมการที่ 3}$$

จากสมการเคมีที่แสดงการหายใจ และการหมักเอทานอลข้างต้นนี้ เป็นเพียงการสรุปผลที่ได้จากกระบวนทั้งสอง แต่ในความเป็นจริงแล้ว ก่อนที่จะได้ผลิตผลเหล่านี้ จำเป็นต้องผ่านขั้นตอนอันประกอบด้วยปฏิกิริยาต่างๆหลายปฏิกิริยา ซึ่งเรียกว่า วิถีของปฏิกิริยา การหมักเอทานอลในยีสต์ (Embden-Meyerhof-Parnas Pathway) แสดงดังรูปที่ 6

จากสมการแสดงปฏิกิริยาการหมักของเอทานอลนั้น กลูโคส 1 โมเลกุลจะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 2 โมเลกุล และเมื่อคิดในแง่น้ำหนักแล้ว กลูโคส 1 กรัม จะให้เอทานอล 0.511 กรัม ซึ่งเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



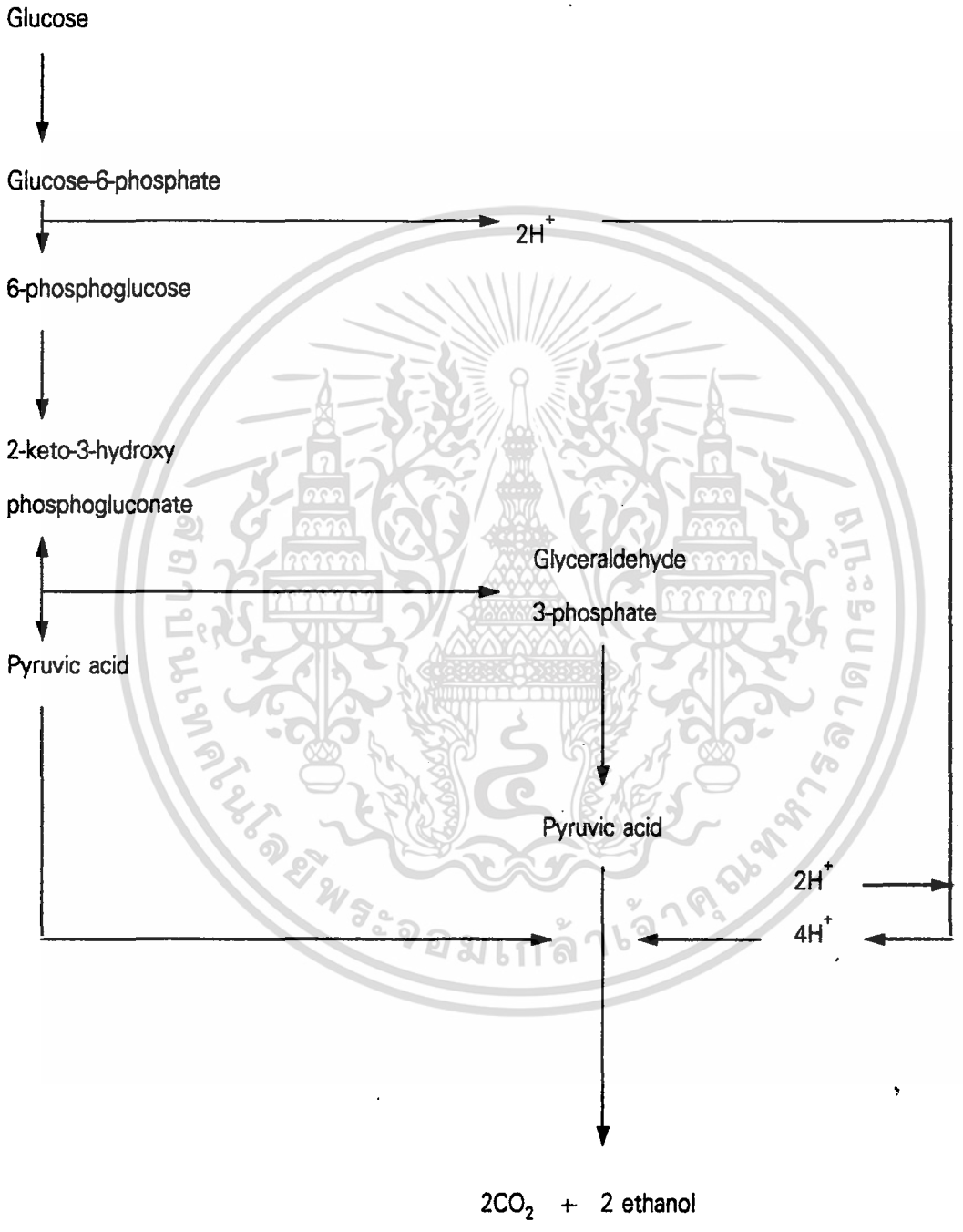
รูปที่ 5. แผนภาพแสดงการผลิตเอทานอลโดยทั่วไปที่ใช้ในอุตสาหกรรม (Arora และ คณะ, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริมาณสูงสุดที่ผลิตในทางทฤษฎี แต่ในการหมักทั่วไปพบว่าจะไม่ได้ปริมาณเอทานอลสูงเท่าค่าดังกล่าว เนื่องจากปฏิกิริยาข้างเคียง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อื่นนอกเหนือจากเอทานอล เช่น กลีเซอรอล (glycerol) ซัคซิเนต (succinate) และฟิวเซลออยล์ (fusel oil) เป็นต้น นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการใช้กลูโคสในการสร้างเซลล์ใหม่ และสร้างพลังงานเพื่อการดำรงชีวิตของเซลล์อีกด้วย โดยทั่วไปยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิด เช่น กลูโคส(glucose) ฟรุกโทส(fructose) กาแลกโทส(galactose) และแมนโนส (mannose) เป็นต้น ซึ่งเป็นน้ำตาลเชิงเดี่ยวจำพวกเฮกโซส และยังใช้น้ำตาลเชิงซ้อนบางชนิดได้ เช่น ซูโครส(sucrose) และแรฟฟิโนส(raffinose) แต่ยีสต์ส่วนใหญ่ จะไม่ใช้น้ำตาลพวก เพนโตส(pentose) เช่น ไซโลส(xylose) ยกเว้นยีสต์ไม่กี่ชนิดเช่น *Candida utilis* และ *Pachysolen tanrophilus* สำหรับแป้งและเซลลูโลสนั้น ยีสต์ไม่สามารถใช้ได้โดยตรง เนื่องจากยีสต์ไม่มีเอนไซม์ที่ใช้ย่อยสารประกอบโมเลกุลใหญ่เหล่านั้นได้ ดังนั้นในการหมักเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบประเภทแป้งและเซลลูโลส จะต้องมีการย่อยสารประกอบเหล่านี้ให้เป็นน้ำตาลเสียก่อน จากนั้นยีสต์จะสามารถใช้น้ำตาลเหล่านั้นมาเปลี่ยนให้เป็นเอทานอลต่ออีกที

การเลือกชนิดของยีสต์ที่ใช้เพื่อการผลิตเอทานอล มักขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้หมัก เช่น อทานอลที่ได้จากแป้งและน้ำตาล นิยมใช้ *Saccharomyces cerevisiae* หรือ *S.elipsoideus* ถ้าเป็นวัตถุดิบจำพวกหางนม (whey) ที่แยกโปรตีนออกแล้วจะใช้ *Candida pseudotropicalis* และถ้าใช้น้ำเสียจากโรงงานกระดาษ (sulfite-waste liqour) ก็มักจะใช้ *Candida utilis* ในการหมักเป็นต้น (Frazier et al, 1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 6. แผนภาพแสดงวิถี Embden-Meyerhof-Parnas Pathway (Rawn, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอล

1. ความเข้มข้นของน้ำตาล

กรณีที่อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินขีดจำกัด คือ ประมาณร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จะเกิดการรบกวนของสารตั้งต้นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ ทำให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นได้ยาก และการหมักจะเป็นไปอย่างช้าและไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดกรดแลกติก กรดน้ำส้ม และสารอินทรีย์ต่างๆ ขึ้นได้ ซึ่งส่วนมากจะเกิดในบรรยากาศของออกซิเจน แต่บางที สามารถเกิดในบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ได้ โดยปกติแล้วในกระบวนการหมักจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลร้อยละ 18 โดยปริมาตร เพื่อให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปได้โดยปกติ และให้เอทานอลในปริมาณสูงเหมาะแก่การนำไปกลั่น คือประมาณร้อยละ 10 โดยปริมาตรต่อปริมาตร

จากการทดลองการหมักแบบต่อเนื่องของน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส โดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* CP4 โดย Buzato และคณะ ในปีค.ศ 1994 สามารถผลิตเอทานอลได้ มากกว่า 2.6 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง ที่ 0.3 ต่อชั่วโมง 1.8 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง ที่ 0.21 ต่อชั่วโมง และ 2.53 กรัมต่อลิตร ที่อัตราการเจือจาง ที่ 0.32 กรัมต่อชั่วโมง เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส ฟรุกโตส และซูโครส ตามลำดับ

2. ความเข้มข้นของเอทานอล

ในขณะที่มีเอทานอล ในปริมาณมาก จะมีผลทำให้การหมักช้าลง และเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้นเกินขีดจำกัด หรือมีความเข้มข้นของเอทานอลสูงกว่าร้อยละ 15 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ซึ่งขีดจำกัดอาจสูงหรือต่ำกว่านี้ ขึ้นกับชนิดของยีสต์ แต่เท่าที่พบจะสูงไม่เกินร้อยละ 18 โดยปริมาตรต่อปริมาตร สามารถขัดขวางและหยุดการทำงานของยีสต์ได้

3. คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน

คาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากปฏิกิริยาในการใช้น้ำตาลของยีสต์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ด้วย ถ้าไม่มีการระบายคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบการหมัก ซึ่งมีผลต่อการเพิ่มความดันของคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งถ้าความดันสูงถึง 7.5 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลงจนกระทั่งความดันสูงถึง 8.0 บรรยากาศ อัตราความเร็วของการหมักจะช้ามากหรือเกือบจะไม่เกิดเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ออกซิเจน

ออกซิเจนจะถูกใช้ในการเจริญเติบโตและการแตกหน่อในกระบวนการหายใจ เพื่อทำให้เกิดพลังงานในการดำเนินชีวิต ซึ่งการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของยีสต์ในที่มีออกซิเจน จะไม่ให้เอทานอลออกมา แต่จะมีเพียงคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้นเท่านั้น

5. กรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติก

กรดน้ำส้มหรือกรดอะซิติกจะมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ โดยความเข้มข้นของกรดที่มากกว่าร้อยละ 0.1 จะมีผลต่อการเจริญเติบโต ถ้ามีกรดโพรพิโอนิกและกรดบิวทาริกเกิดขึ้นด้วย ก็จะมีผลเช่นเดียวกับกรดน้ำส้ม

6. ความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออน

ยีสต์จะสามารถเจริญเติบโตได้ดีระหว่าง พีเอช 3-5 จึงมีผลทำให้อัตราการเจริญของยีสต์และอัตราการหมักเพิ่มมากขึ้น ความเป็นกรดจะกีดขวางการเจริญของแบคทีเรียและราบางชนิด ซึ่งความเป็นกรดในช่วงดังกล่าว จะสามารถป้องกันการเจริญของแบคทีเรีย และราบางชนิดได้

7. สารเร่งการเจริญเติบโต

นอกจากน้ำตาลแล้ว ยีสต์ยังต้องการสารประกอบอื่นๆ เพื่อการเจริญเติบโตสารเหล่านี้ ได้แก่ วิตามินบีรวม เช่น ไบโอติน ไทอามีน ไรโบฟลาวิน กรดนิโคตินิก และกรดแพนทาโนอิก นอกจากนี้ไทอามีนฟอสเฟต ยังเป็นโคแฟคเตอร์ที่ใช้ในการเปลี่ยนกรดไพรวิก ให้กลายเป็นเอทานอลอีกด้วย

8. โลหะ

ในพวกธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าวจะมีพวกธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม ทองแดง เหล็ก แมกนีเซียม และแมงกานีส ซึ่งเป็นธาตุที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ และในกระบวนการหมักเอทานอลจากกลูโคส ถ้าปริมาณของโลหะมากเกินไป จะกลายเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ สารประกอบพวกซัลเฟอร์จะทำให้ยีสต์แก่เร็ว ส่วนพวกเหล็ก อลูมิเนียม สังกะสี ไม่ค่อยมีผลมากนักต่อปฏิกิริยาการหมัก แต่ถ้าเป็นพวกแคดเมียม ทองแดง ปรอท ออสเมียม และเงิน จะเป็นสารหน่วงการเจริญเติบโตของยีสต์อย่างมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีผลโดยตรงต่อการทำงานของยีสต์ และมีผลทางอ้อมต่อปริมาณเอทานอล และสารประกอบอะโรมาติกต่างๆ อุณหภูมิส่วนใหญ่ที่ใช้ในการหมักจะอยู่ประมาณ 10-30 องศาเซลเซียส ถ้าอุณหภูมิเพิ่มขึ้นในช่วงนี้ จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตของยีสต์เพิ่มมากขึ้นเป็นสองเท่า ถ้าอุณหภูมิสูงมากๆ จะทำให้เอนไซม์ในยีสต์เกิดสภาพว่องไวต่อปฏิกิริยาลดลง ในช่วงระหว่างอุณหภูมิ 55-56 องศาเซลเซียส ซึ่งจะทำให้ยีสต์ตายได้ ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของยีสต์ที่นำมาใช้ในการหมัก ถ้าอุณหภูมิในการหมักต่างกัน จะทำให้ผลิตภัณฑ์ข้างเคียงที่เกิดขึ้นแตกต่างกันได้ เช่น ที่อุณหภูมิการหมักต่ำๆ จะเกิดสารพวกเอสเทอร์ อะซีตอล

จากการทดลองศึกษาผลของจากการทดลองผลของอุณหภูมิ และค่า pH ต่อการผลิตเอทานอล ในระหว่างการหมักซูโครส โดยเชื้อ *Zymomonas mobilis* โดย Diez และ Yokoya ในปีค.ศ 1996 พบว่าอุณหภูมิในช่วงที่ศึกษาที่อุณหภูมิระหว่าง 30-40 องศาเซลเซียส และ pH 5.7 พบว่าที่อุณหภูมิ 34 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ทำให้ ได้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุด 0.483 กรัม ต่อน้ำตาล 1 กรัม

นอกจากนั้นการผลิตเอทานอล โดยการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อ *Zymomonas mobilis* และ *Saccharomyces* sp. โดยAbate และคณะ ในปีค.ศ 1995 สามารถผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ปริมาณเอทานอล 0.5 กรัมต่อน้ำตาล 1 กรัม และปริมาณเอทานอลที่วัดได้เท่ากับ 1.5 กรัมต่อขั่วโมง

7. กระบวนการผลิตเอทานอลโดยการหมัก

7.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล โดยทั่วไปจะเป็นคาร์โบไฮเดรตในรูปแป้งและน้ำตาล วัตถุดิบพวกแป้งได้มาจากพืชต่างๆ เช่น มันสำปะหลังและธัญพืช เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง เป็นต้น ส่วนวัตถุดิบจำพวกน้ำตาลมักเป็นพวกกากน้ำตาล และอ้อย

7.2 วัตถุดิบจำพวกแป้ง

แป้งจะต้องผ่านการย่อยให้เป็นน้ำตาลก่อน โดยกระบวนการไฮโดรไลซีส ซึ่งมี 2 วิธี คือ การไฮโดรไลซ์ด้วยกรด เช่น กรดเกลือ หรือ กรดกำมะถันและการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ ในการไฮโดรไลซ์ด้วยกรดนั้น จะใช้อุณหภูมิ 120-140 องศาเซลเซียส จากนั้นปรับพีเอชให้สูงขึ้นด้วยด่างก่อนที่จะเข้าสู่ขั้นตอนหมัก ข้อดีของการใช้กรด คือ มีค่าใช้จ่ายต่ำ แต่ได้ปริมาณน้ำตาลที่ต่ำกว่าวิธีใช้การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ เนื่องจากการที่ต้องใช้อุณหภูมิสูง และค่าพีเอช ต่ำมาก จึงทำให้น้ำตาลที่ได้บางส่วนถูกเปลี่ยนไปเป็นไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูราล (hydroxymethyl furfural) และนอกจากนี้กรดที่ใช้ยังทำให้เกิดการกัดกร่อนเครื่องมืออีกด้วย ส่วนการใช้เอนไซม์นั้น เอนไซม์ที่ใช้คือ แอลฟา-อะไมเลส (α -amylase) และ อะไมโลกลูโคซิเดส (amyloglucosidase) โดยการควบคุมความเข้มข้นของแป้ง พีเอช อุณหภูมิ และสภาวะต่างๆ ในการย่อยให้เหมาะสม จะทำให้น้ำตาลมากกว่าวิธีการใช้กรด

7.3 วัตถุดิบจำพวกน้ำตาล

น้ำตาลที่ใช้หมักซึ่งอยู่ใน กากน้ำตาล หรือ อ้อยเป็นน้ำตาลซูโครสซึ่งจะถูกเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ในยีสต์ย่อยให้เป็นกลูโคสและฟรักโทส จากนั้นจึงถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลต่อไป

7.4 การหมัก

ในขั้นตอนการหมักนี้ ยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลในถังหมักโดยทั่วไปถังหมักที่ใช้หมักเป็นแบบครั้งคราว ซึ่งต้องมีการเตรียมเชื้อเริ่มต้นก่อนการหมักทุกครั้ง ในการหมักนี้จะมีการปรับ พีเอช ของน้ำหมักในตอนเริ่มต้นเป็น 4.5 อุณหภูมิในการหมักประมาณ 30 องศาเซลเซียส เวลาที่ใช้หมัก 36-48 ชั่วโมง ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลหรือผลได้ (yield) อยู่ในช่วง 90-95% ของค่าสูงสุดทางทฤษฎีทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัตถุดิบที่ใช้ด้วย และปริมาณเอทานอลหลังการหมักสิ้นสุดลงแล้วมีความเข้มข้นประมาณ 6-12% (น้ำหนักต่อปริมาตร)

การหมักแบบครั้งคราวได้รับความนิยมมาก เนื่องจากง่ายต่อการดำเนินการผลิตไม่จำเป็นต้องฆ่าเชื้อในน้ำหมักอย่างสมบูรณ์ และมีความเสี่ยงต่อการสูญเสียทางเศรษฐกิจน้อยมาก เพราะเป็นวิธีที่ทำกันมานานแล้ว และให้ผลผลิตที่ค่อนข้างแน่นอน แต่มีข้อเสีย คือ อัตราการผลิตต่อปริมาตรถังหมักต่ำเนื่องจากมีช่วงล็อค ในตอนเริ่มต้นของการหมัก และปริมาณยีสต์ในถังหมักที่ได้ไม่สูง ถึงแม้จะสิ้นสุดการหมักแล้วก็ตาม นอกจากนี้ยังเสียเวลาในช่วงก่อนและหลังการหมัก เช่น การเตรียมเชื้อเริ่มต้น การล้างทำความสะอาดถังหมัก เป็นต้น ในระยะหลังจึงได้มีการปรับปรุงวิธีการหมัก เช่น การใช้ถังหมักแบบต่อเนื่อง ที่อาจมีการป้อนเซลล์ย้อนกลับ หรือ ไม่มีก็ได้ และการหมักโดยยีสต์ที่สามารถเกาะกลุ่มกัน (floc yeast) ในหอหมัก ซึ่งได้มีการใช้กันบ้างแล้ว ในระดับการผลิต แต่อย่างไรก็ตามการพัฒนาด้วยการหมักก็ยังต้องดำเนินต่อไป เพื่อให้การหมักมีประสิทธิภาพ และมีต้นทุนการผลิตที่ต่ำที่สุดเท่าที่จะทำได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ และขั้นตอนดำเนินการทดลอง

วัสดุ และอุปกรณ์

1. หลอดทดลอง
2. บีกเกอร์
3. ฟลาสก์
4. แท่งแก้วคนสาร
5. ไมโครปิเปตต์
6. ช้อนตักสาร
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. ลูปและเข็มเขี่ยเชื้อ
9. หม้อนึ่งความดัน (autoclave)
10. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟฟี
11. กล้องจุลทรรศน์
12. เครื่องเขย่า (shaker)
13. เครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (spectophotometer)
14. เครื่องชั่ง
15. ขวดเก็บตัวอย่าง (vial)
16. เครื่องอบความร้อน (hot air oven)
17. ฮีมาไซโตมิเตอร์ (haemacytometer)
18. ถังหมักขนาด 2 ลิตร
19. กระบอกตวง
20. กระบอกน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ขั้นตอนการดำเนินงานทดลอง

1. เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการดำเนินงานทดลอง

เชื้อจุลิทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง เป็นเชื้อยีสต์ 2 สายพันธุ์ แต่ละสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตเอทานอลสูง ได้แก่

1. *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44372 (A)
2. *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 (B)

2. การเก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เขี่ยเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44372 หรือ *Shizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 (B) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อลากลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (YM slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อเชื้อเจริญเต็มที่แล้วจึงนำไปเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. ขั้นตอนในการดำเนินงานทดลอง

3.1 การศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ต่อการผลิตเอทานอล

3.1.1 เปรียบเทียบแหล่งคาร์บอนระหว่างน้ำตาลซูโครส และกลูโคส

1. เตรียมสารแขวนลอยของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe*ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ลงไปในหลอดทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อ (YM slant agar) ที่มีเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* ตามลำดับ

2. ตรวจนับจำนวนเซลล์ของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* โดยใช้เฮมาไซโตมิเตอร์ เพื่อให้ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3. ปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* ปริมาตร 1 % (ปริมาตรต่อปริมาตร)

4. ใส่ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว โดยมีแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส และกลูโคส อยู่ 100 มิลลิลิตร ตามภาคผนวก ก. เพื่อเปรียบเทียบปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

30610

5. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบเท่ากับ 150 รอบต่อนาที

6. เก็บตัวอย่างมาทำการวิเคราะห์หา ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.2 การศึกษาหาสัดส่วน และปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์

1. เตรียมสารละลายแขวนลอยของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^6 10^5 และ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยวิธีการเดียวกับข้อ 3.1.1

2. เตรียมสารละลายแขวนลอยของเชื้อยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* โดยวิธีเดียวกับข้อ 3.1.2

3. ปิเปตสารละลายแขวนลอยของเชื้อยีสต์ทั้ง 2 ปริมาตร 1% (ปริมาตรต่อปริมาตร) ในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในอัตราส่วน 1:1 1:3 3:1 ตามลำดับ โดยให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเซลล์ยีสต์รวมทั้งหมดเป็น 10^6 10^5 และ 10^4 ตามลำดับ

4. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

5. เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลเป็นเวลา 1 สัปดาห์

3.3 การศึกษาหา พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

1. เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร

2. ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4, 5, 6 และ 7 ตามล

3. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชแล้ว ไปนึ่งฆ่าเชื้อ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. ปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* ในอัตราส่วนและปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ให้ปริมาณเอทานอลได้สูงสุด จากผลการทดลองตามข้อ 3.2 ในฟลาสก์ที่เตรียมไว้ จำนวน 1% (ปริมาตร ต่อ ปริมาตร) ตามลำดับ

5. นำไปบ่มบนเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้อง ด้วยความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที

6. เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ผลเป็นเวลา 1 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

1. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 6 ปริมาณ 1 ลิตร ใส่ลงไปในถังหมักขนาด 2 ลิตร

2. นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ ภายใต้ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. เติมเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* ในอัตราส่วนผสม 1:1 (ปริมาตร ต่อ ปริมาตร) ให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นรวมทั้งสิ้นเป็น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

4. นำไปศึกษาที่สภาวะต่างๆ ในถังหมักขนาด 2 ลิตร คือ

4.1 ในสภาวะที่มีการให้อากาศ 1 วีวีเอ็ม และมีการกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

4.2 ในสภาวะที่มีการกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยไม่เติมอากาศ

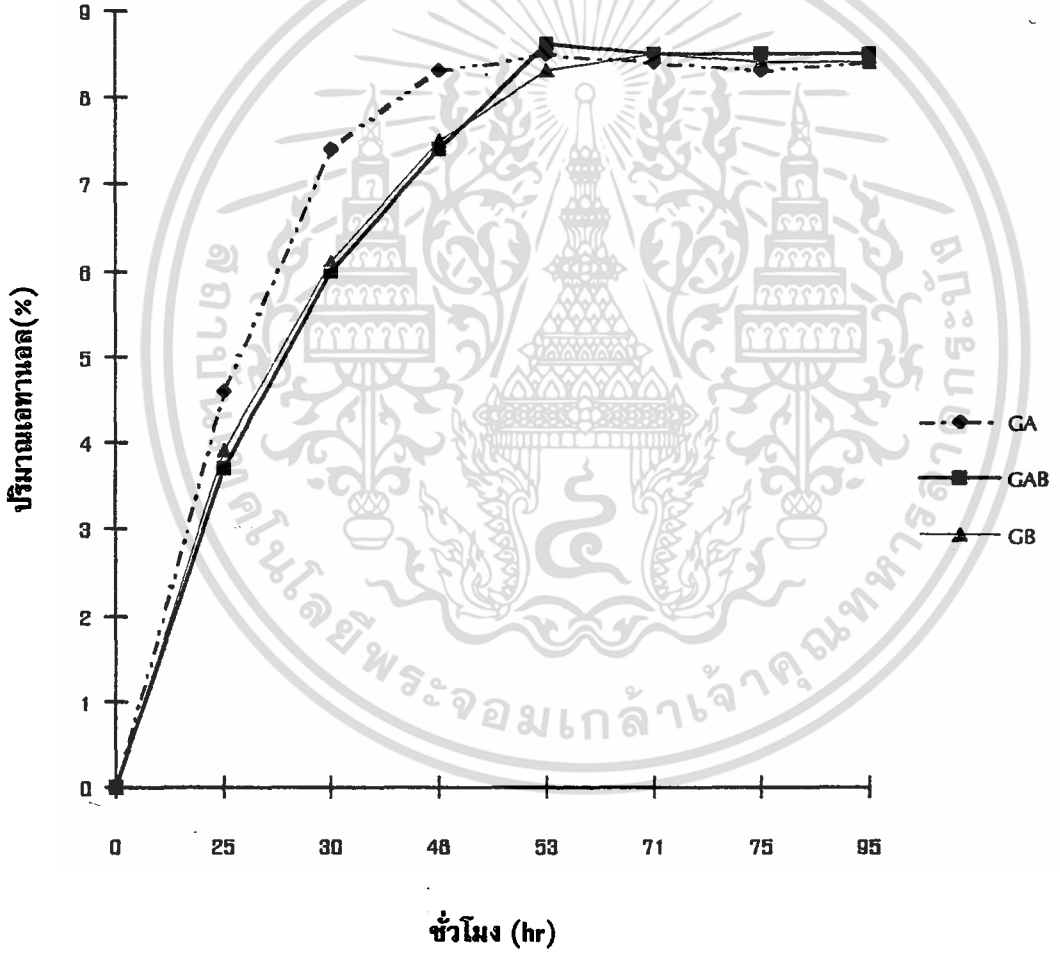
4.3 ในสภาวะที่ไม่มีการให้อากาศ และการกวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4
ผลการทดลอง

1. การศึกษาหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ ต่อการผลิตเอทานอล

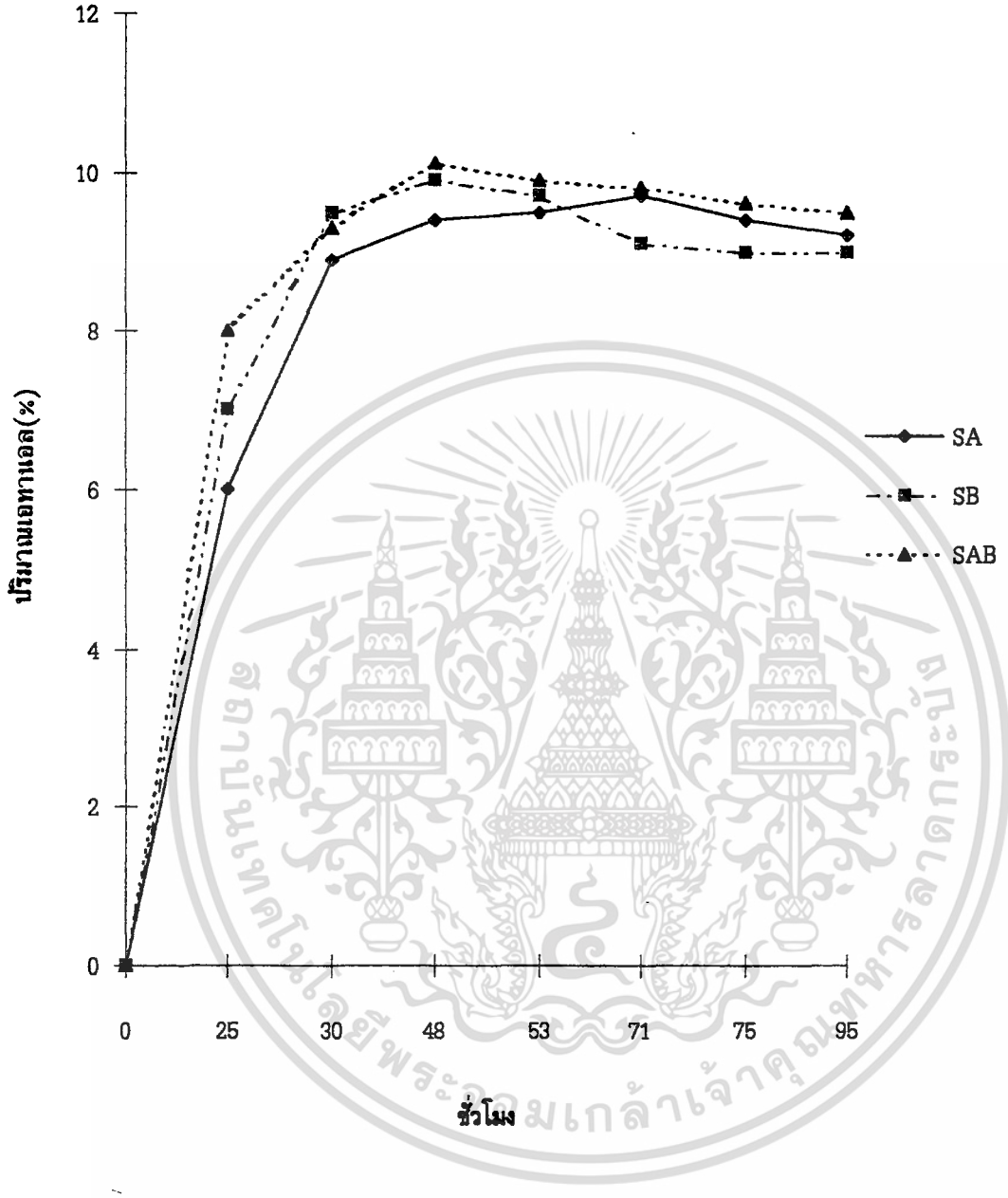
จากการศึกษาเบื้องต้นของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* ATCC 44732 และเชื้อยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* ATCC 2476 ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นกลูโคส และซูโครส ตามลำดับ แสดงได้ดังรูปที่ 7 และ8



รูปที่ 7. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นกลูโคส

หมายเหตุ GA (*Saccharomyces carlsbergensis*) , GB (*Schizosaccharomyces pombe*) , GAB (*Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากแหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส

หมายเหตุ SA (*Saccharomyces carlsbergensis*) , SB (*Schizosaccharomyces pombe*) , SAB (*Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe*)

จากผลการทดลองตามรูปที่ 7 และ 8 พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* หรือ เชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* หรือการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสองนั้น สามารถผลิตเอทานอลในแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครสได้สูงกว่า การใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

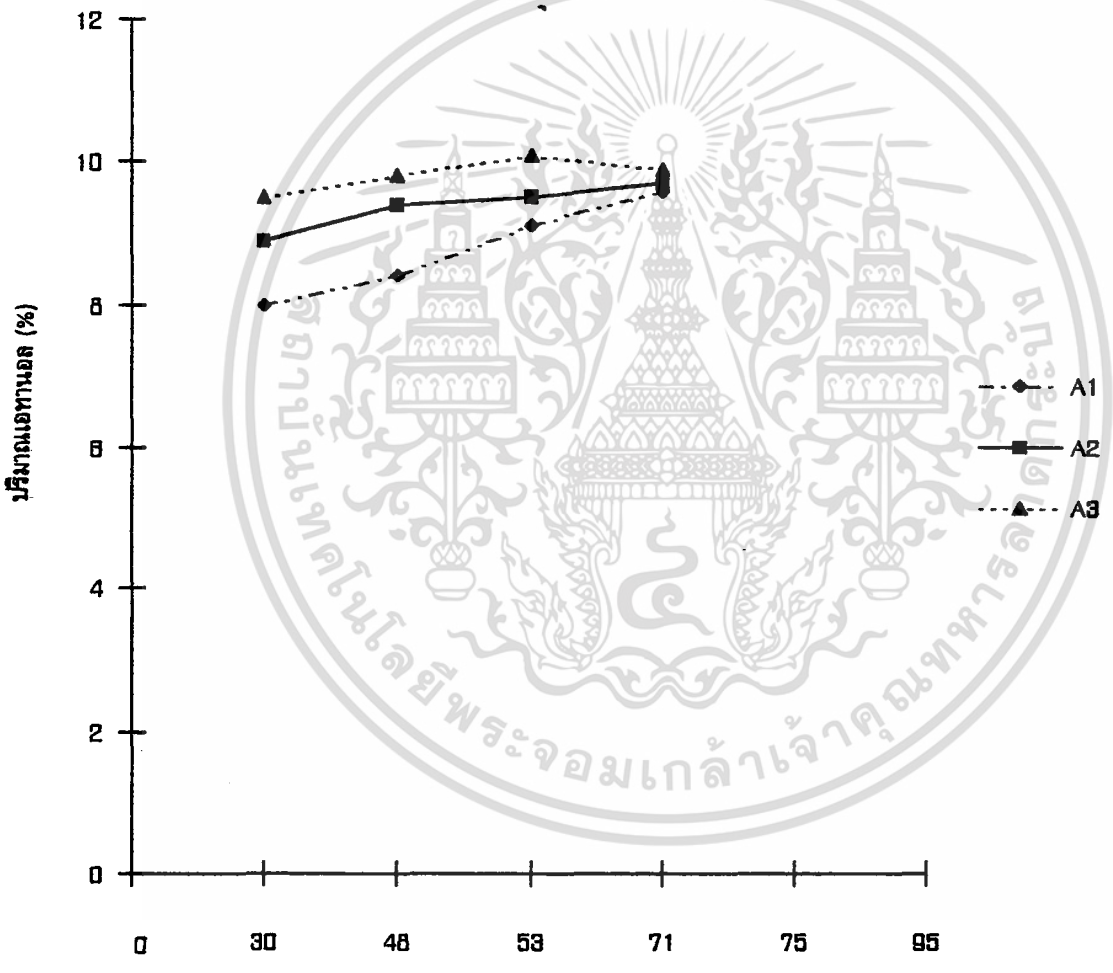
เชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเป็นร้อยละ 9.7 ในชั่วโมงที่ 69 และเชื้อ*Schizosaccharomyces pombe* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเป็นร้อยละ 9.2 ในชั่วโมงที่ 44 ส่วนการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสอง พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุดเป็นร้อยละ 10.1 ในชั่วโมงที่ 44 นอกจากนั้นยังพบว่า การอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสอง จะสามารถให้ปริมาณเอทานอลทั้งในแหล่งกลูโคส และซูโครสได้สูงกว่าการใช้เชื้อเพียงตัวเดียว โดยปริมาณเอทานอลที่ได้ เป็นร้อยละ 8.6 และ 10.1 ในชั่วโมงที่ 53 และ 44 ตามลำดับ เมื่อใช้กลูโคสและซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน

ดั้งนั้นในการทดลองต่อไป จะเลือกใช้ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อศึกษาหาปริมาณ และสัดส่วนของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การศึกษาหาสัดส่วน และปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์

ในการทดลองหาสัดส่วน และปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมของ เชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* เมื่อใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็นซูโครส โดยใช้เชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 1.5×10^6 , 2.6×10^5 และ 1.3×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 1.8×10^6 , 4.5×10^5 และ 1.8×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยมีอัตราส่วนของเชื้อทั้งสอง เป็น 1:1 , 3:1 และ 1:3 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากผลการทดลองแสดงได้ดังรูปที่ 9 , 10 , 11 ,12 และ13

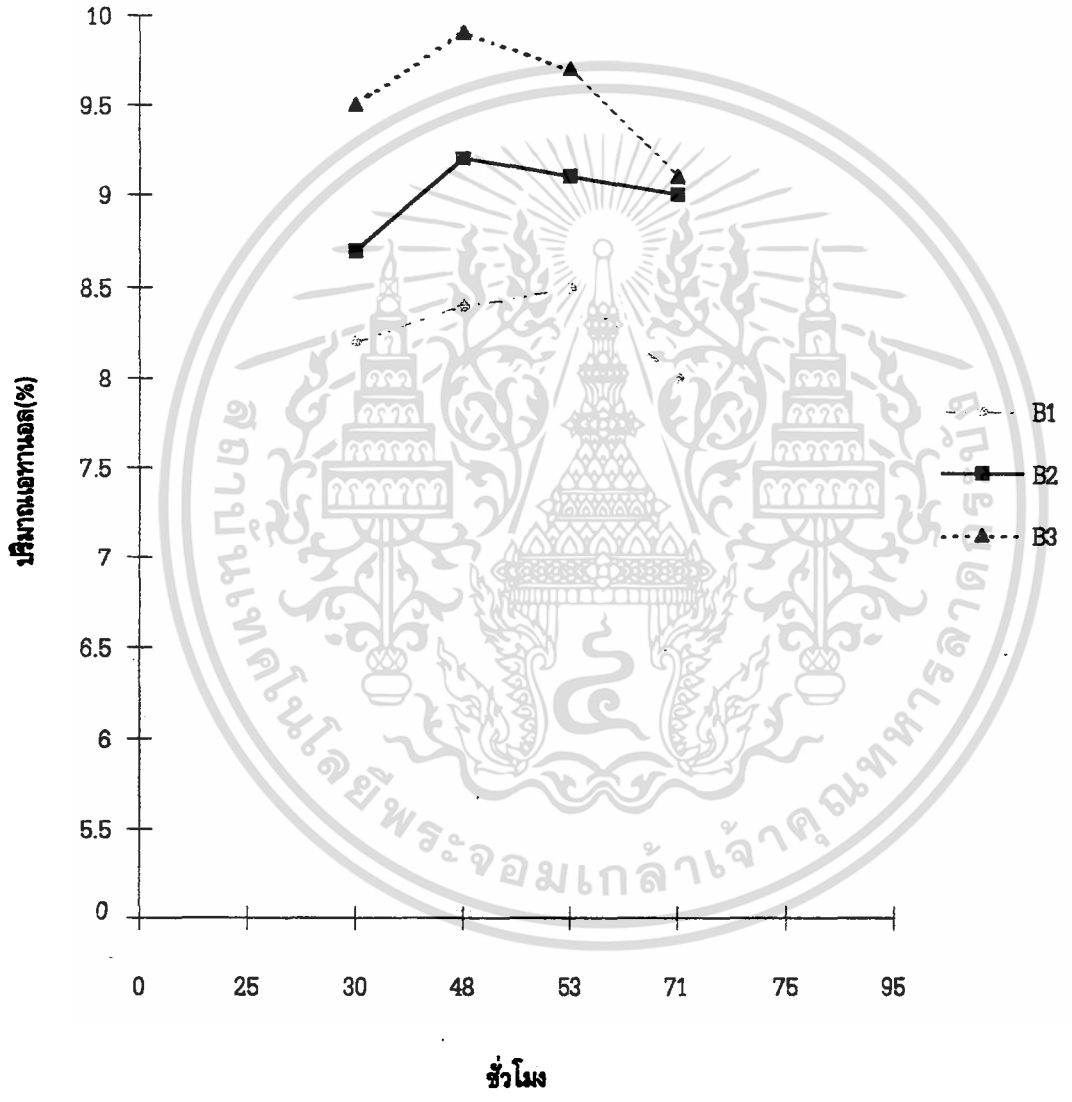


รูปที่ 9. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis(A)* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ต่างกัน

หมายเหตุ A1 (*Saccharomyces carlsbergensis* 1.5×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) , A2 (*Saccharomyces carlsbergensis* 2.6×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) , A3 (*Saccharomyces carlsbergensis* 1.3×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากรูปที่ 9 ที่แสดงถึงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อผันแปรปริมาณเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* เป็น 10^6 , 10^5 และ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พบว่าการลดปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง จะมีผลให้ปริมาณเอทานอลที่ได้เพิ่มขึ้นตามลำดับ และเมื่อใช้เชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* ที่มีปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^4 จะพบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีปริมาณสูงสุดเป็นร้อยละ 10.1 ในชั่วโมงที่ 50



รูปที่ 10. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe (B)* ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นต่างกัน

หมายเหตุ B1 (*Schizosaccharomyces pombe* 1.8 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) , B2 (*Schizosaccharomyces pombe*4.5 x10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) , B3 (*Schizosaccharomyces pombe* 1.8 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

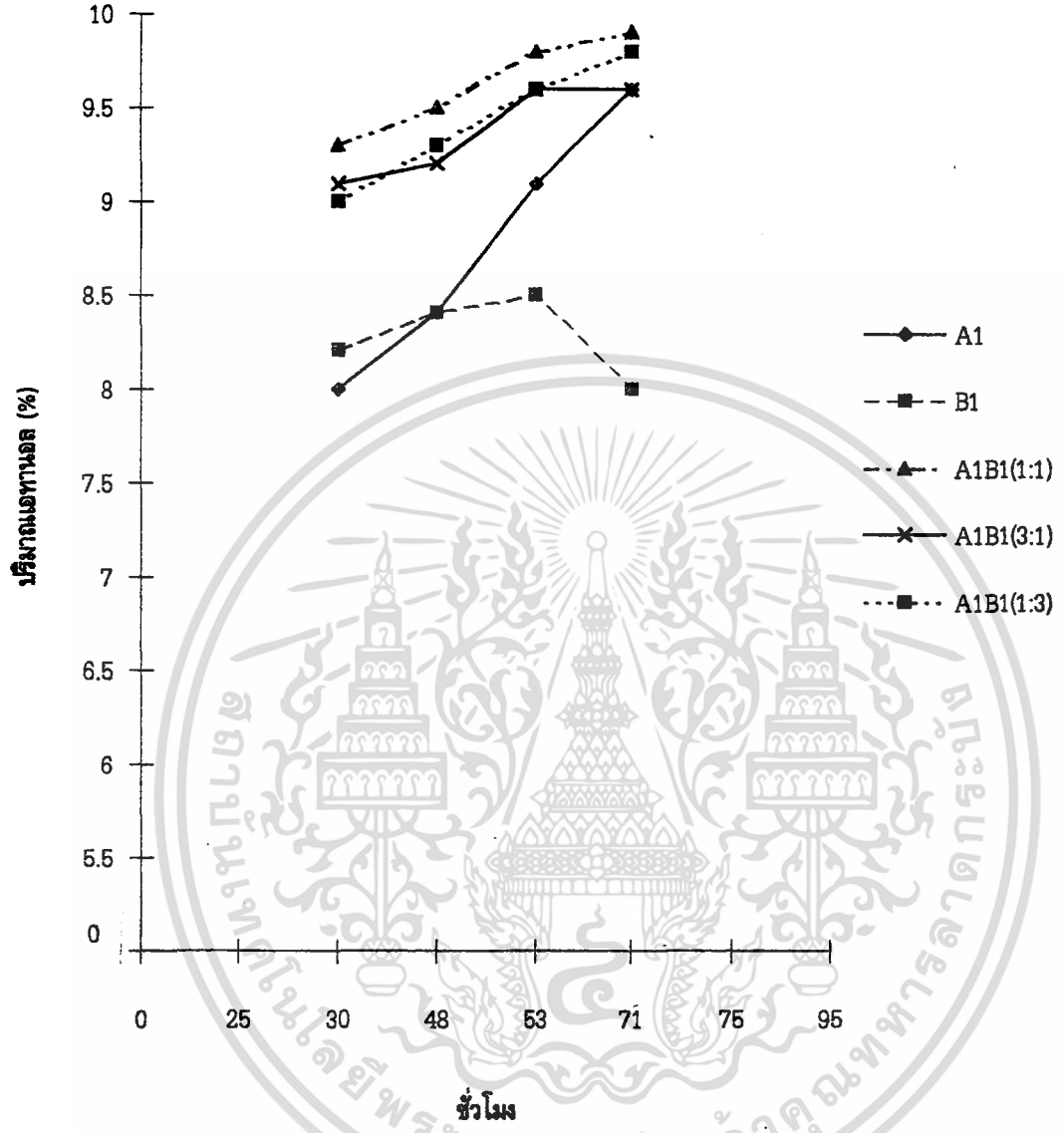
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เมื่อผันแปรปริมาณยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* เป็น 10^6 , 10^5 และ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 10 พบว่าการเพิ่มปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเชื้อยีสต์ที่ใช้ในการทดลอง จะมีผลให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลงตามลำดับเช่นกัน และเมื่อใช้เชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* ที่ปริมาณเซลล์เป็น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะพบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีปริมาณสูงสุดเป็นร้อยละ 9.9 ในชั่วโมงที่ 44

จากลักษณะของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* จะพบว่าเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดได้เร็วกว่าเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และในขณะเดียวกันปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะมีปริมาณที่ลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 44 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่ช่วงดังกล่าวเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* ยังคงรักษาปริมาณเอทานอลที่มีอยู่ได้

จากคุณสมบัติของการผลิตเอทานอลที่ต่างกันของเชื้อทั้งสองดังกล่าว ในการทดลองต่อไป จะได้ศึกษาผลของการอยู่ร่วมกันของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* ที่มีต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ เมื่อใช้อัตราส่วนของเชื้อทั้งสองเป็น 1:1 , 1:3 และ 3:1 โดยผันแปรปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเชื้อทั้งสองด้วย จากผลการทดลองที่ได้แสดงได้ในรูปที่ 11 , 12 และ 13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

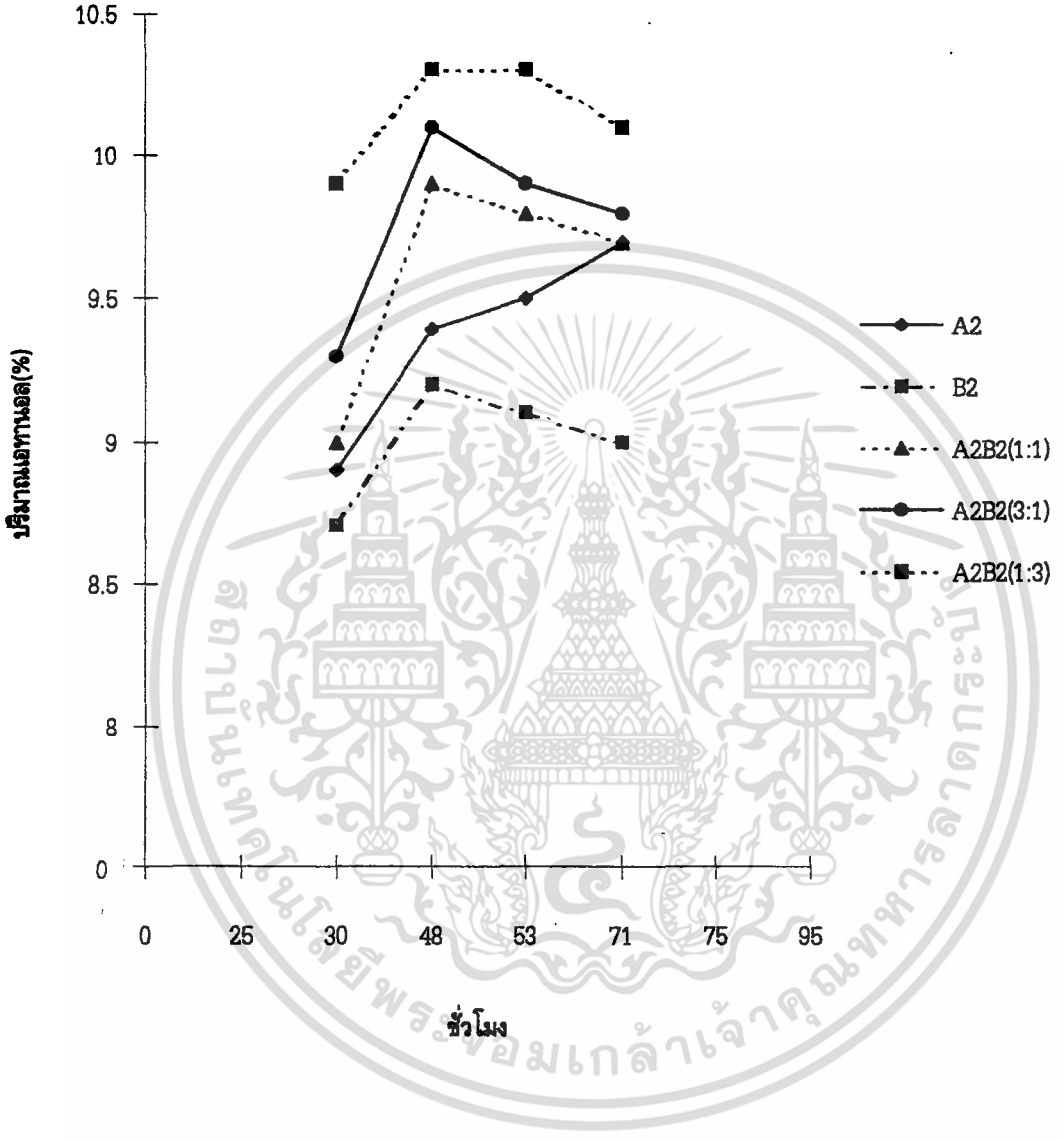


รูปที่ 11. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis(A1)* และ *Schizosaccharomyces pombe(B1)* ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในอัตราส่วน 1:1 , 3:1 และ 1:3 ตามลำดับ

จากรูปที่ 11. เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* เป็น 1.5 x 10^6 และ 1.8 x 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าการอยู่ร่วมกันของเชื้อยีสต์ทั้งสอง ในอัตราส่วน 1:1 , 3:1 และ 1: 3 ตามลำดับ ต่างทำให้ได้ปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงที่ มีช่วงที่กว้างขึ้นกว่าการใช้ยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schizosaccharomyces pombe เพียงตัวใดตัวหนึ่ง โดยอัตราส่วนของเชื้อทั้งสองที่ใช้เป็น 1:1 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเป็นร้อยละ 9.6 ในชั่วโมงที่ 69

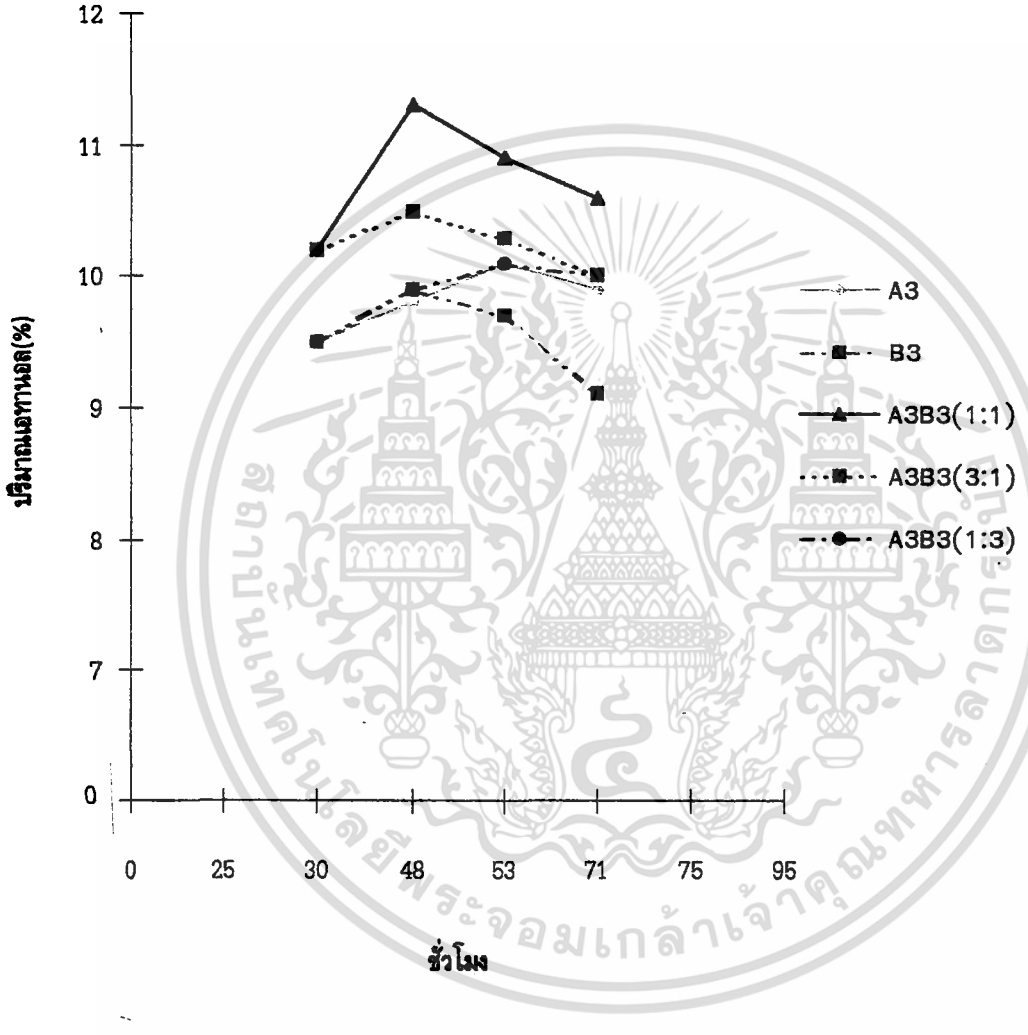


รูปที่12. กราฟแสดงปริมาณเอทานอล ที่ผลิตได้จากการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis (A2)* และ*Schizosaccharomyces pombe(B2)* ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^5 ในอัตราส่วน 1:1 , 3:1 และ 1:3 ตามลำดับ

จากรูปที่ 12 เมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* เป็น 2.6×10^5 และ 4.5×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าการเลี้ยงร่วมกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของยีสต์ทั้งสอง ในอัตราส่วน 1:1 , 3:1 และ 1:3 ตามลำดับ ต่างทำให้ได้ปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการเพาะเลี้ยงให้ช่วงที่กว้างขึ้นกว่าการใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* เพียงตัวใดตัวหนึ่ง โดยอัตราส่วนของยีสต์ทั้งสองที่ใช้เป็น 1:3 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเป็นร้อยละ 10.3 ในชั่วโมงที่ 50



รูปที่ 13. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis(A3)* และ *Schizosaccharomyces pombe (B3)* ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^4 ในอัตราส่วน 1:1 , 3:1 และ 1:3 ตามลำดับ

จากรูปที่ 13. เมื่อใช้ปริมาณเชื้อเซลล์เริ่มต้นของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* และเชื้อ ยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* เป็น1.3 x 10^4 และ 1.8 x 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร พบว่าการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เลี้ยงร่วมกันของเชื้อทั้งสอง ในอัตราส่วน 1:1 , 3:1 และ 1:3 ตามลำดับ ต่างทำให้ได้ปริมาณเอทานอลที่เพิ่มขึ้น ในระหว่างการเพาะเลี้ยงให้ช่วงที่กว้างขึ้นกว่าการใช้ยีสต์ *Ssaccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* เพียงตัวใดตัวหนึ่ง โดยอัตราส่วนของเชื้อทั้งสองที่ใช้เป็น 1:1 และ 3 :1 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเป็นร้อยละ 11.3 และ10.5 ในชั่วโมงที่ 44 ตามลำดับ

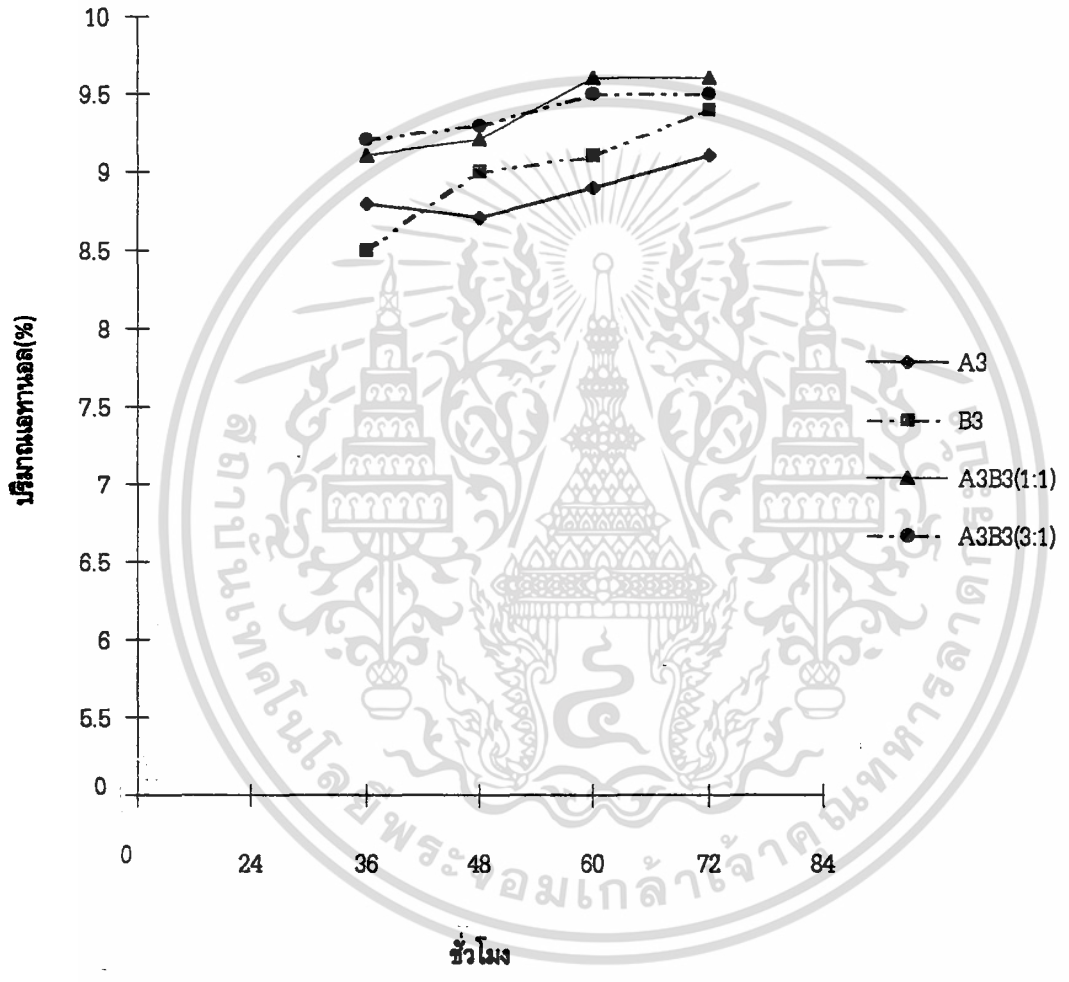
จากการศึกษาหาสัดส่วน และปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมของเชื้อทั้งสอง พบว่าการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เท่ากันเป็น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเป็นร้อยละ 11.3 และ 10.5 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 44 โดยการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า การใช้เชื้อยีสต์เพียงตัวใดตังหนึ่ง และเมื่อใช้สัดส่วนของเซลล์เริ่มต้นระหว่าง *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* เป็น 1:1 และ 3:1 สามารถให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่า การเพาะเลี้ยงโดยเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* เพียงลำพังร้อยละ 12 และ 4 ตามลำดับ และสูงกว่าการเพาะเลี้ยงโดยเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* เพียงลำพังร้อยละ 14 และ 6 ตามลำดับ ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เท่ากัน คือ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ดังนั้นในการทดลองต่อไป ได้ศึกษาหาค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* โดยใช้การเพาะเลี้ยงเชื้อทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 ที่ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเป็น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาหาพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสม ต่อการผลิตเอทานอล

ในการทดลองหา พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อทำการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* ในปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^4 อัตราส่วน 1:1 และ 3:1 โดยผันแปรพีเอชเริ่มต้น 4 , 5 ,.6 และ 7 ดังแสดงในรูปที่ 14 , 15 , 16 , และ 17

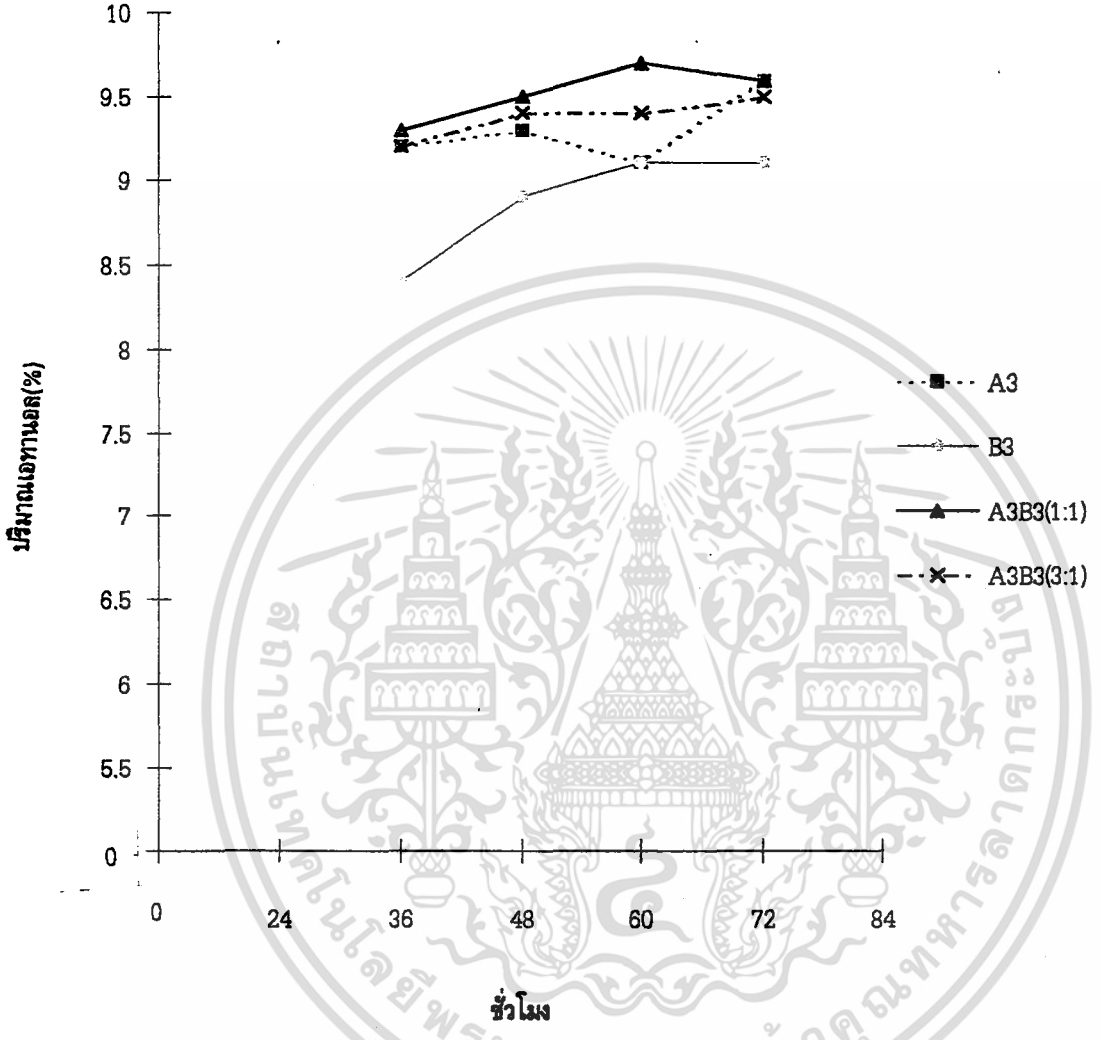


รูปที่ 14. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ*Saccharomyces carlsbergensis(A3)* หรือ *Schizosaccharomy pombe(B3)* หรือ การอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 ที่พีเอช 4

จากรูปที่ 14. การเพาะเลี้ยงร่วมกันของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* และเชื้อยีสต์ *Schizosaccharomyces pombe* ในอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 ปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^4 ที่พีเอช 4 ต่างให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

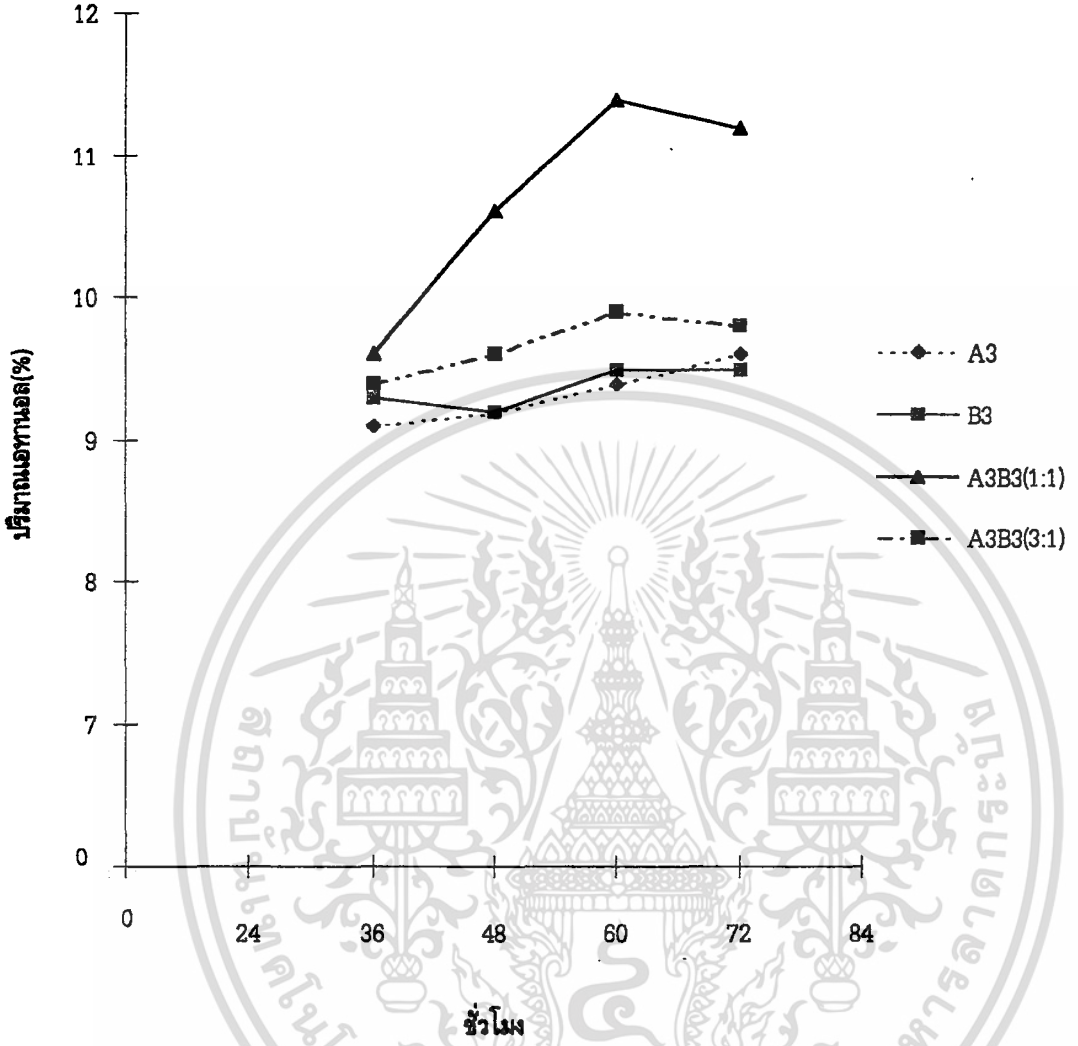
ปริมาณเอทานอลสูง กว่าการเลี้ยงเชื้อเพียงตัวใดตัวหนึ่ง โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เป็นร้อยละ 9.6 และ 9.5 ตามลำดับ ในชั่วโมงที่ 60



รูปที่ 15. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis(A3)* หรือ *Schizosaccharomyces pombe(B3)* หรือการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสองในอัตรา 1:1 และ 3:1 ที่พีเอช 5

จากรูปที่ 15 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5 ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* หรือ *Schizosaccharomyces pombe* ต่ำกว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อร่วมกัน โดยการเลี้ยงเชื้อร่วมกันที่อัตราส่วน 1:1 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดเป็นร้อยละ 9.7 ในชั่วโมงที่ 60

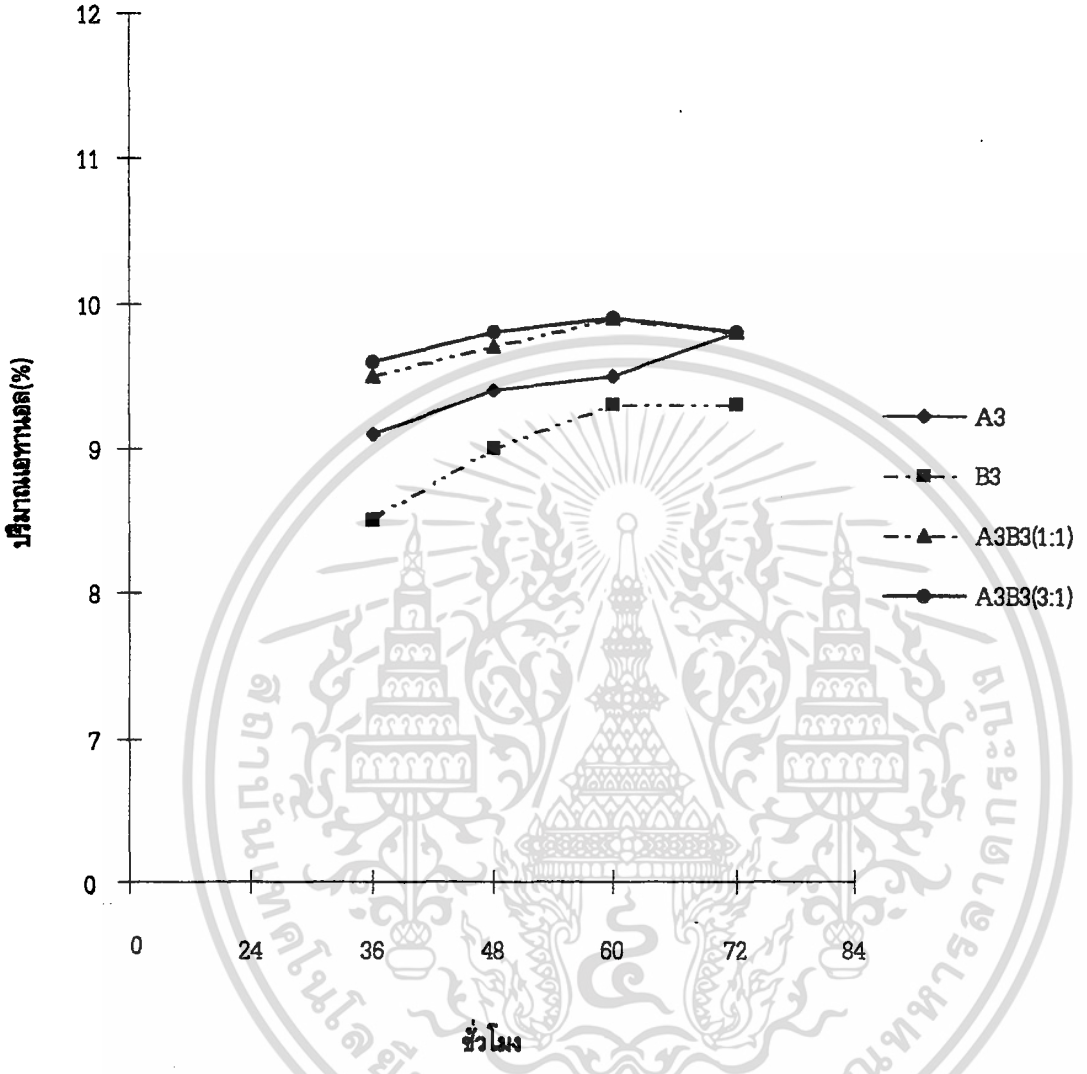
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16. การพแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis(A3)* หรือ *Schizosaccharomyces pombe(B3)* หรือการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 ที่พีเอช 6

จากรูปที่ 16. เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 6 พบว่าเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ *Saccharomyces carlsberensis* หรือ *Schizosaccharomyces pombe* จะต่ำกว่าปริมาณเอทานอลที่ได้จากการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อทั้งสอง ในอัตราส่วน 1:1 มีปริมาณเอทานอลสูงเป็นร้อยละ 11.4 ในชั่วโมงที่ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากเชื้อ*Saccharomyces carlsbergensis(A3)* **หรือ** *Schizosacharomy pombe(B3)* หรือการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 ที่พีเอช 7

จากรูปที่ 17. เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 7 พบว่า ปริมาณเอทานอลสูงที่สุดที่ผลิตได้ จากการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และ*Schizosaccharomyces pombe* ในอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 ต่างผลิตเอทานอลได้สูงกว่า การใช้เชื้อเพียงตัวใดตัวหนึ่ง โดยมีปริมาณเอทานอลใกล้เคียงกันมาก เป็นร้อยละ 9.9 ในชั่วโมงที่ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการศึกษาหาค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีต่อการผลิตเอทานอล เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ*Saccharomyces carlsbergensis* ร่วมกับเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* ในอัตราส่วน 1:1 และ 3:1 เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* หรือ *Schizosaccharomyces pombe* เพียงตัวใดตัวหนึ่ง โดยแปรผันค่าพีเอช ของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสอง ต่างให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงกว่า การเลี้ยงเชื้อเพียงตัวใดตัวหนึ่ง ในทุกพีเอชเริ่มต้นที่ใช้ในการทดลอง และเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 6 จะให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด โดยอัตราส่วนของการอยู่ร่วมกันของเชื้อ *Saccharomyces carlsberfensis* และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* ที่ 1:1 จะให้ปริมาณเอทานอลได้สูงสุดเป็นร้อยละ 11.4 ในชั่วโมงที่ 60

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

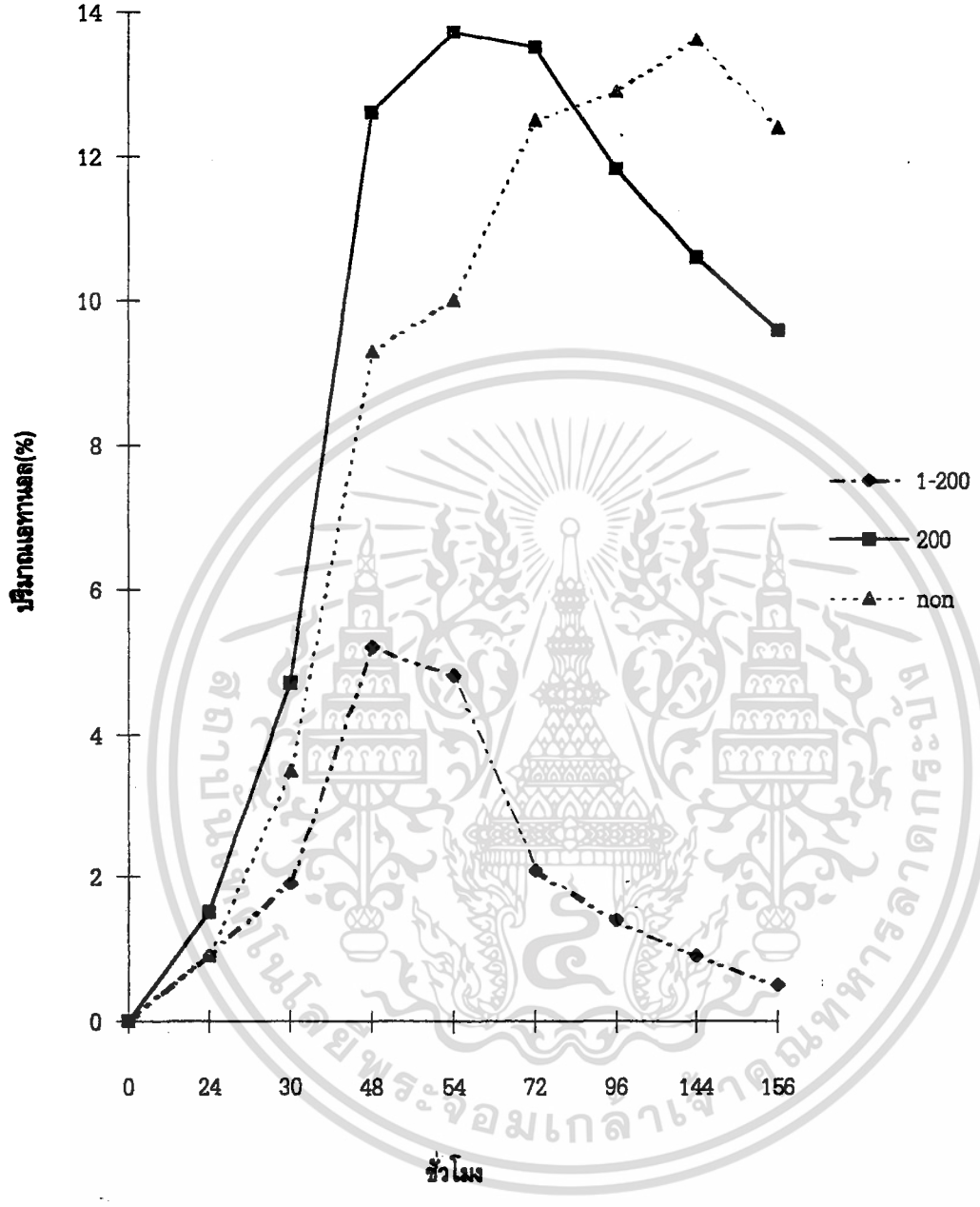
จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม ในการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* เพื่อผลิตเอทานอล ในถังหมักขนาด 2 ลิตร โดยเชื้อยีสต์ทั้งสองมีปริมาณเซลล์เริ่มต้น 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) และมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6 โดยมีสภาวะต่างๆดังนี้

4.1 สภาวะที่ให้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที และมีการกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

4.2 สภาวะที่มีการกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยไม่มีการเติมอากาศ

4.3 สภาวะที่ไม่มีการเติมอากาศ และการกวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 18. กราฟแสดงปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ จากการเลี้ยงร่วมกันของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe* ในสภาวะต่างๆ โดยมีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6

หมายเหตุ 1-200 แสดงสภาวะที่มีทั้งการกวน และการเติมอากาศ

200 แสดงสภาวะที่มีการกวนอย่างเดียว

non แสดงสภาวะที่ไม่มีทั้งการกวน และการเติมอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาปริมาณอากาศ และความเร็วรอบที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ในถังหมักขนาด 2 ลิตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 18 จากผลดังกล่าวพบว่า ในสภาวะที่มีการกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที จะสามารถให้ปริมาณเอทานอลได้เร็วกว่าทุกสภาวะ และเมื่อมีการให้อากาศในปริมาณ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที ในสภาวะที่มีการกวน จะพบว่าปริมาณอากาศที่ให้จะมีผลทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลง จากผลดังกล่าวจะพบว่าสภาวะที่มีการกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาทีเพียงอย่างเดียว เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล โดยสภาวะดังกล่าว ทำให้ได้ปริมาณเอทานอลเร็วและสูงสุดเป็นร้อยละ 13.7 ในชั่วโมงที่ 54 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเชื้อ ในสภาวะที่ไม่มีการกวน และไม่มีการเติมอากาศ จะได้เอทานอลในปริมาณสูงเป็นร้อยละ 13.6 ในชั่วโมงที่ 144

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
บทสรุป และข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาหาชนิดของ แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล โดยการเปรียบเทียบแหล่งคาร์บอน ระหว่างน้ำตาลซูโครส และกลูโคส จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน เชื้อยีสต์ทั้งสองสามารถเจริญ และผลิตเอทานอลได้ดีกว่า เมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเชื้อ*Saccharomyces carlsbergensis* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงเป็นร้อยละ 9.7 ในชั่วโมงที่ 96 และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงเป็นร้อยละ 9.2 ในชั่วโมงที่ 44 และการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสอง สามารถผลิตเอทานอลได้สูงร้อยละ 10.1 ในชั่วโมงที่ 44

2. จากการศึกษาหาสัดส่วน และปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ทั้งสอง พบว่าเมื่อใช้ปริมาณเซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด โดยเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเป็นร้อยละ 10.1 ในชั่วโมงที่ 50 และเชื้อ *Schizosaccharomyces pombe* สามารถผลิตเอทานอลได้เป็นร้อยละ 9.9 ในชั่วโมงที่ 44 ส่วนการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสองในอัตราส่วน 1:1 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด คือร้อยละ 11.3 ในชั่วโมงที่ 44

3. การอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสอง ต่างให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อเพียงตัวใดตัวหนึ่ง ในทุกค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง และเมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6 จะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงที่สุด คือร้อยละ 11.4 ในชั่วโมงที่ 60

4. ในสภาวะที่มีการกวนด้วยความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที โดยไม่มีการเติมอากาศ เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล ซึ่งจะได้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือร้อยละ 13.7 ในชั่วโมงที่ 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการใช้แหล่งอาหารชนิดอื่นแทนอาหารสังเคราะห์ เช่น กากน้ำตาล เพื่อใช้ในการศึกษาการอยู่ร่วมกันของเชื้อทั้งสองชนิด ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

2. ควรมีการศึกษาการนำสารปฏิชีวนะ เช่น Vantocil IB มาผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะจะช่วยทำให้สภาวะในการหมักสามารถกระทำได้ในสภาพที่ไม่ปลอดเชื้อ

3. ควรมีการศึกษาการหมักแบบต่อเนื่อง และแบบ fed batch culture เพื่อเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 1

1. สูตรอาหารเหลว เพื่อการผลิตเอทานอล ตามสูตรของ Abate และคณะ,1996

ซูโครส	200	กรัมต่อลิตร
ยีสต์สกัด (yeast extract)	10	กรัมต่อลิตร
เปปโทน (peptone)	5	กรัมต่อลิตร
โปตัสเซียมเปอร์ฟอสเฟต	1	กรัมต่อลิตร
แอมโมเนียมไดซัลเฟต	2	กรัมต่อลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 .7H_2O$)	1	กรัมต่อลิตร

2. สูตรอารหาร YM เพื่อทำอาหารเอียงในการเก็บรักษาเชื้อ *Saccharomyces carlsbergensis* และ *Schizosaccharomyces pombe*

ยีสต์สกัด	3	กรัมต่อลิตร
มอลต์สกัด	3	กรัมต่อลิตร
เปปโทน	5	กรัมต่อลิตร
กลูโคส	10	กรัมต่อลิตร
วุ้น (agar)	20	กรัมต่อลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที นำมาเขี่ยเชื้อใส่ในหลอดทดลอง (sub culture) แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก 2

3. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล (total sugar) โดยวิธีของ Nelson

เตรียมสารละลายเนลซัน

1. เตรียมสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.8 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
2. เติมสารละลาย กรดไดไนโตรซาลิไซลิก 0.5 กรัม
3. เติมสารละลาย โซเดียมโพแทสเซียมซัลเฟต 15 กรัม
4. นำมาปรับปริมาตรให้เป็น 50 มิลลิลิตร และเขย่าให้เข้ากัน

วิธีตรวจสอบ

เติมสารละลาย กรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 10 นาที แล้วเขย่าให้เข้ากัน ก่อนนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร

4. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธี แก๊สโครมาโทรกราฟฟี

นำสารตัวอย่างมาหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที และนำส่วนใสไปวิเคราะห์เอทานอลโดยใช้วิธีแก๊สโครมาโทรกราฟฟี ซึ่งประกอบด้วยคอลัมน์ ขนาด 3.3 มิลลิลิตร x 2 เมตร ที่บรรจุด้วย Porapak Q โดยมีการควบคุมอุณหภูมิของเครื่องตรวจวัด (detector temperature) และอุณหภูมิของตำแหน่งที่ฉีดสารตัวอย่าง (injection temperature) เป็น 240 องศาเซลเซียส และใช้แก๊สไนโตรเจนเป็นแก๊สตัวพาด้วยอัตราการไหล 45 มิลลิลิตรต่อนาที ตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่องตรวจวัดแบบเฟลมไอออนไนเซชั่น โดยวิธีนี้เวลาที่อยู่ในคอลัมน์ของเอทานอลเป็น 2.43 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

1. Arora , Dilip K. , Mukerji , K.G and Marth , Elmer H. 1991 . Handbook of Applied Micrology (Food and Feed) . vol 3. , Marcel Dekker Inc.
2. Buzato-JB . 1994 ; Continous fermentation of glucose , fructose and sucrose by *Zymomnas mobilis* . Biologycal Tecnologia 37:3, 527-538:22
3. C. Abate , D. Callieri , E. Rodriguez , O. Garro 1995 : Ethanol production by mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobillis* and *Saccharomyces* sp. Appl Microbiol Biotechol . 45, 580-583.
4. Diez-JC , Yokoya-F. 1996 : Effect of temperture and pH on ethanol and levan production during sucrose fermentation by *Zymomonas mobilis*. Arquivos-de-Biologia-e-Tecnologia. 36 : 1 , 129-137 , 28
5. Hideo , T , Noboru , N ,and Hiroshi , M 1986 : Ethanol Productiom from Starch by a coimmobilized Mixed Culture System of *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis* . Biotechnol.Bioeng 28 , 1761-1768.
6. Hiroshi , K , Noboru , N and Hideo, T. 1989 : Ethanol Production from Starch by a coimmobilized Mixed Culture system of *Aspergillus awamori* and *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol.Bioeng. 33,716-723.
7. Kroll, R,G. , Gilmour , A and Sussman , M. 1993 .New Teacniques in Food and Beverage Microbiology , Black Well Scientific Publication.
8. Rodriguez E, Callieri DAS .1983 : Conversion of sucrose to ethanol by a flocculent *Zymomonas sp.* strain in acontinuous upflow-flock reactor. Eur J Appl Microbiol Biotechnol 18:186-188
9. Strandberg GW , Donaldson TL , Arcuri EJ .1982 : Continous ethanol production by a flocculent strain of *Zymomonas mobilis.* Biotechnol Lett 4:347-352

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้