ความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* เพื่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุ

Feasibility Study of Using Bacteria *Zymomonas mobilis* for Ethanol Production from Expired Carbonated Soft Drink

ฟางทิพย์ ทองศรี

Fangtip Thongsri

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Environmental Management
Prince of Songkla University
2552

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ ความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* เพื่อผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุ

ผู้เขียน นางสาวฟางทิพย์ ทองศรี

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

……
(ดร.ธันวดี เตชะภัททวรกุล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

……
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

คณะกรรมการสอบ

……...ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ)

…….....กรรมการ
(ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง)

…….....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)

…….....กรรมการ
(ดร.ธันวดี เตชะภัททวรกุล)

…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

……..……
(รองศาสตราจารย์ ดร.เกริกชัย ทองหนู)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	ความเป็นไปได้ในการใช้เชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* เพื่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุ
ผู้เขียน	นางสาวฟางทิพย์ ทองศรี
สาขาวิชา	การจัดการสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2552

บทคัดย่อ

น้ำอัดลมหมดอายุเป็นน้ำเสียประเภทหนึ่งของอุตสาหกรรมน้ำอัดลม มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารสำหรับจุลินทรีย์ได้ งานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองเพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุในระดับห้องปฏิบัติการ โดยใช้เชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* Z4 การทดลองแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมและสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถเจริญเติบโตได้ในน้ำอัดลมหมดอายุไม่เจือจางที่มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร จึงทำการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมโดยใช้น้ำอัดลมหมดอายุไม่เจือจางเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการศึกษาพบว่า การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 5.14 กรัมต่อลิตรและมีผลผลิตเอทานอล (Yp/s) เท่ากับ 0.09 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล หลังจากนั้นจึงทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดลองสูตรอาหารที่เหมาะสม พบว่าการบ่มภายใต้สภาวะการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ทำให้เชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้นมีค่าเท่ากับ 6.72 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลผลิตเอทานอล เท่ากับ 0.11 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งผลเอทานอลที่ได้มีค่าต่ำกว่าค่าทางทฤษฎี (0.50) มาก ดังนั้นเพื่อให้แน่ใจถึงความเป็นไปได้ของการนำน้ำอัดลมหมดอายุมาเป็นแหล่งสารอาหารสำหรับการผลิตเอทานอล จึงได้ทำการทดลองปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุให้ลดลง และศึกษาหาค่า pH เริ่มต้นและการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุเจือจาง ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการทดลองที่ใช้น้ำอัดลมหมดอายุไม่เจือจาง แต่สามารถให้ค่าเอทานอลเพิ่มขึ้นและ มีค่าผลผลิตเอทานอลใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี (0.50) โดยพบว่าเมื่อนำน้ำอัดลมหมดอายุมาเจือจางปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นให้เท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร

เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 10.67 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.35 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล นอกจากนี้ยังได้ทดลองใช้โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) 0.5 กรัมต่อลิตร เพื่อทำการฆ่าเชื้อในอาหาร พบว่าค่าเอทานอลที่ได้จากการหมักมีค่าเท่ากับ 7.90 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.26 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งการใช้ KMS 0.5 กรัมต่อลิตรนี้ ส่งผลกระทบต่อเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ทำให้ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ความร้อนที่ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับการฆ่าเชื้อในอาหาร

คำสำคัญ : *Zymomonas mobilis*, เอทานอล, น้ำอัดลมหมดอายุ

Thesis Title	Feasibility Study of Using bacteria *Zymomonas mobilis* for Ethanol Production from Expired Carbonated Soft Drink
Author	Miss Fangtip Thongsri
Major Program	Environmental Management
Academic Year	2009

ABSTRACT

The expired carbonated soft drink is an one type of wastes from carbonated soft drink industry. The main composition of this waste is sugar which could be used as a carbon source for the microorganisms culture. This study was the determination of the ethanol production from expired carbonated soft drink by *Zymomonas mobilis* Z4 that was done in laboratory scale. The experiments were divided to 2 parts; the study of culture preparation and the culture condition for ethanol production from expired carbonated soft drink by *Z. mobilis* Z4. The preliminary results showed that *Z. mobilis* Z4 can grow in nondiluted expired carbonated soft drink which contains 120 g/L of sugar. Hence the experiments using nondiluted sample were conducted. The result of an appropriate culture formula investigation showed that the *Z. mobilis* Z4 culture prepared from nondiluted expired carbonated soft drink added with 1 g/L of $(NH_4)_2SO_4$ and adjusted initial pH to 5.5 yielded the highest ethanol concentration of 5.14 g/L with ethanol yield (Yp/s) 0.09 g_p/g_s. Then the appropriate culture formula obtained was used to optimize the culture conditions. The optimal conditions was found that incubation under agitation rate of 100 rpm at 30°C for 36 hr. At this condition, *Z. mobilis* Z4 produced ethanol concentration of 6.72 g/L and yield of 0.11 g_p/g_s. But the ethanol yield was low when comparing with theoretical yield. Therefore the later experiment was conducted with diluted expired carbonated soft drink sample and the optimization of $(NH_4)_2SO_4$ concentration and initial pH were done again. The results found that the optimal $(NH_4)_2SO_4$ concentration and initial pH did not changed from that obtained from the previous study but the dilution of expired carbonated soft drink could gave the higher ethanol production and increase ethanol yield by *Z. mobilis* Z4. The expired carbonated soft drink culture with initial sugar of 60 g/L added with 1 g/L of $(NH_4)_2SO_4$, adjusted initial pH to 5.5 and incubated with 100 rpm of agitation rate at 30°C for 36 hr yielded the

highest ethanol production, 10.67 g/L with 0.35 g_p/g_s. In addition, the using of potassium metabisulfite (KMS) in stead of autoclaving for medium sterilization was studied. The 0.5 g/L of KMS decreased ethanol production by *Z. mobilis* Z4 to be 7.90 g/L with 0.26 g_p/g_s of yield in comparing to autoclaving at 115°C under pressure 10 psi for 15 min, that produced 10.67 g/L of ethanol and yielded 0.35 g_p/g_s.

Keyword : *Zymomonas mobilis*, Ethanol, Expired Carbonated Soft Drink

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีเพราะได้รับการช่วยเหลือจากหลายๆท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ดร.ธันวดี เตชะภัททวรกุล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาในการทำวิจัย และตรวจแก้ไขข้อบกพร่อง ด้วยความเอาใจใส่ดูแลเป็นอย่างดียิ่งโดยตลอด ทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ ประธานกรรมการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา และ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ และเครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)

ขอขอบคุณคณะวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ เครื่องเขย่า (Shaker)

ขอขอบคุณบริษัทหาดทิพย์ จำกัดมหาชน ที่ให้ความอนุเคราะห์น้ำอัดลมและข้อมูลในการทำวิจัยนี้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย และทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ จากเงินรายได้ ประจำปี 2551 มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อโสภณ คุณแม่สุชาดา ทองศรี สำหรับทุนในการศึกษา และเป็นกำลังใจสำคัญเสมอ ขอบคุณเพื่อน พี่ น้องทุกคน ที่คอยช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

ฟางทิพย์ ทองศรี

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพ	(11)
บทที่ 1 บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บทตรวจเอกสาร	3
1.1 น้ำอัดลม	3
1.2 เอทานอล	5
1.3 กระบวนการผลิตเอทานอล	7
1.4 *Zymomonas mobilis*	22
1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	31
วัตถุประสงค์	32
บทที่ 2 วัสดุอุปกรณ์และวิธีวิจัย	33
2.1 วัสดุ	33
2.1.1 น้ำอัดลมหมดอายุ	33
2.2.2 เชื้อจุลินทรีย์	33
2.2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ	33
2.2 สารเคมีและอุปกรณ์	34
2.3 วิธีดำเนินการวิจัย	35
บทที่ 3 ผลการทดลองและอภิปราย	41
3.1 ลักษณะสมบัติน้ำอัดลมหมดอายุ	41
3.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อ	42
การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4	
3.2.1 ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม	43
3.2.2 pH ที่เหมาะสม	47

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต เอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4	52
3.3.1 อัตราการเขย่าที่เหมาะสม	52
3.3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม	56
3.3.3 ระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม	60
3.4 ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิต เอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อมีการปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุ	65
3.4.1 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสม	65
3.4.2 ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม	69
3.4.3 pH ที่เหมาะสม	73
3.4.4 การฆ่าเชื้อในอาหาร	77
บทที่ 4 สรุปผลการทดลอง	82
บรรณานุกรม	84
ภาคผนวก	90
ประวัติผู้เขียน	123

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1 องค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย *Zymomonas*	24
1.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Zymomonas* เมื่อเพาะเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรstandard medium ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ	29
3.1 สภาวะของตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุ	41
3.2 ผลการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	44
3.3 ผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	48
3.4 ผลการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล	53
3.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล	57
3.6 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล	61
3.7 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	66
3.8 ผลการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$)ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	70
3.9 ผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	74
3.10 ผลการศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารต่อการผลิตเอทานอล	78
ภาคผนวก	
ค-1 การศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	96
ค-2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	101
ค-3 การศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล	104
ค-4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล	106
ค-5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล	107
ค-6 การศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	109
ค-7 การศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน($(NH_4)_2SO_4$)ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	115
ค-8 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ	118
ค-9 การศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารต่อการผลิตเอทานอล	121
ง-1 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer กับ เครื่อง Gas chromatography ที่ระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล	122

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1.1 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของน้ำตาลซูโครส	4
1.2 การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบต่างๆ	8
1.3 แสดงวิถี Entner-Doudoroff pathway	25
1.4 แสดงลักษณะรูปร่างของ *Zymomonas* sp.	26
3.1 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน$(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	45
3.2 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน$(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	46
3.3 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักด้วยปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	47
3.4 ผลของค่า pH เริ่มต้นต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	49

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.5 ผลของค่า pH เริ่มต้นต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	50
3.6 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	51
3.7 ผลของอัตราการเขย่า ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	54
3.8 ผลของอัตราการเขย่าต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	55
3.9 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มีอัตราการเขย่าแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	56

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.10 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก น้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	58
3.11 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก น้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	59
3.12 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจาก น้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	60
3.13 ผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก น้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm	62
3.14 ผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจาก น้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm	63

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.15 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4โดยเปรียบเทียบ กับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มี ระยะเวลาหมักแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจาก น้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm	64
3.16 ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อทำการหมักใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	67
3.17 ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	68
3.18 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับ ค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มี ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุที่แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	69
3.19 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	71

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.20 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	72
3.21 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักด้วยปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	73
3.22 ผลของค่า pH เริ่มต้นต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 g/L เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	75
3.23 ผลของค่า pH เริ่มต้นต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 g/L เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	76
3.24 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 g/L เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	77

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.25 ผลของการฆ่าเชื้อในอาหารต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 g/L เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	79
3.26 ผลของฆ่าเชื้อในอาหารต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 g/L เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราการเขย่า 100 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง	80
3.27 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm และการใช้ความร้อนอุณหภูมิ 115°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 g/L เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราการเขย่า 100 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง	81
ภาคผนวก	
ก-1 แผ่นสเกลสำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์	92
ก-2 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์	92
ก-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายซูโครสที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร	93
ก-4 การกรองตัวอย่างด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ	94

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันหลายประเทศทั่วโลกประสบกับปัญหาราคาน้ำมันในตลาดโลกผันผวนและมีการปรับตัวสูงขึ้น การพิจารณาหาแหล่งพลังงานใหม่ๆเพื่อใช้ทดแทนน้ำมันจึงเป็นสิ่งสำคัญและได้รับการผลักดันจากหลายฝ่ายอย่างต่อเนื่อง แหล่งพลังงานทดแทนที่สำคัญอันหนึ่งคือพลังงานชีวมวล ซึ่งหมายถึงพลังงานที่ได้จากสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ รวมถึงผลพลอยได้และของเสียที่ได้มาจากสิ่งมีชีวิต จุดเด่นของพลังงานชีวมวลคือช่วยลดการเกิดมลภาวะของสิ่งแวดล้อม ซึ่งพลังงานชีวมวลที่สำคัญที่สามารถนำมาใช้เพื่อเป็นเชื้อเพลิงเครื่องยนต์มีอยู่ 2 ประเภทหลักคือ เอทานอล และไบโอดีเซล

สำหรับประเทศไทยได้หันมาใช้เอทานอลเป็นส่วนผสมในน้ำมันเชื้อเพลิง เช่น แก๊ซโซฮอล์ ซึ่งเป็นส่วนผสมกันระหว่างน้ำมันเบนซิน 80 เปอร์เซ็นต์ และเอทานอล (บริสุทธิ์ 99.5 เปอร์เซ็นต์) 20 เปอร์เซ็นต์ (บุณยพัต สุภานิชและคณะ, 2546) นอกจากนี้ยังให้ความสำคัญกับการทำงานวิจัยและเทคนิคต่างๆ ในการผลิตเอทานอลจากพืชและของเหลือใช้เพื่อเป็นพลังงานเชื้อเพลิงทดแทน เอทานอลสามารถผลิตได้ 2 วิธีคือ วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีโดยกระบวนการ คะตะลิสต์ของเอทิลีน และวิธีการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล ซึ่งเอทานอลที่ผลิตส่วนใหญ่ได้มาจากกระบวนการหมัก โดยคิดเป็น 95 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลก สำหรับการผลิตเอทานอลในปัจจุบันมีวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต 3 ประเภทด้วยกัน ได้แก่ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล แป้ง และ เส้นใย ซึ่งวัตถุดิบประเภทแป้งและประเภทเส้นใยนั้น ต้องมีการเตรียมวัตถุดิบก่อนการหมัก โดยอาจใช้การย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลก่อน ซึ่งต้นทุนในการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่อยู่ในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาล อีกทั้งประสิทธิภาพของขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบยังมีผลอย่างมากต่อการผลิตเอทานอลในขั้นตอนต่อมา (กมลศักดิ์ ตั้งธรรมเนียม, 2540) แต่หากวัตถุดิบที่ใช้เป็นวัตถุดิบประเภทน้ำตาลซึ่งสามารถนำมาหมักเอทานอลได้ทันที

น้ำอัดลมหมดอายุเป็นน้ำอัดลมที่ผ่านกระบวนการผลิตแล้วไม่ได้ตามมาตรฐานที่ทางบริษัทผู้ผลิตกำหนด เช่น มีปริมาณน้ำตาล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์น้อยไป หรือ มีสิ่งปนเปื้อน ทั้งนี้รวมถึงน้ำอัดลมที่ส่งออกไปจำหน่ายเกินเวลา 45 วัน สำหรับคุณสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุมีความแตกต่างจากน้ำเสียจากกระบวนการผลิตส่วนอื่น คือ มีปริมาณน้ำตาลที่สูงทำให้ไม่

สามารถกำจัดได้ด้วยระบบบำบัดน้ำเสียโดยทันที ทางบริษัทผู้ผลิตจึงประสบปัญหาในการกักเก็บน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณมาก ทั้งนี้น้ำอัดลมหมดอายุมีองค์ประกอบหลัก คือน้ำตาลซูโครส จึงน่าจะมีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำอัดลมหมดอายุมาใช้ประโยชน์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงานในอาหารของเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตเป็นเอทานอล โดยทั่วไปการผลิตเอทานอลด้วยวิธีการหมักมักจะนิยมใช้เชื้อยีสต์โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Saccharomyces cerevisiae* อย่างไรก็ดีได้มีการศึกษาหาจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้รวมทั้งแบคทีเรีย *Zymomonas* sp. (อรพิน ภูมิภมร, 2526) แบคทีเรีย *Z. mobilis* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง มีขนาดกว้าง 1-1.4 ไมครอน และยาว 2-6 ไมครอนจัดอยู่ในแฟมิลี่ *Pseudomonadaceae* เคลื่อนที่ได้ ไม่มีสปอร์ (Buchanan, 1974) สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นระหว่าง 5-7 เป็น facultative anaerobe bacteria ทำให้ไม่ต้องคุมปริมาณออกซิเจนเพื่อรักษาปริมาณเซลล์เหมือนกับยีสต์ แบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครสได้โดยผ่าน Entner-Doudoroff pathway ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นจะได้เป็นเอทานอลและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ *Z. mobilis* มีศักยภาพ ที่จะผลิตเอทานอลได้มากถึง 97 เปอร์เซ็นต์ของค่าเอทานอลที่สามารถผลิตได้ตามทฤษฎี (Swings and De Ley, 1977) เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์พบว่าแบคทีเรีย *Z. mobilis* จะผลิตมวลเซลล์ได้ต่ำกว่า ให้ผลได้ของเอทานอลมากกว่า 3-4 เท่าของยีสต์ ทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลและน้ำตาลได้สูง รวมทั้งสามารถปรับปรุงพันธุ์ได้ง่ายกว่าเชื้อยีสต์ (Rogers *et al.,* 1980) จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้แบคทีเรีย *Z. mobilis* มาใช้ในการหมักเพื่อผลิตเอทานอลจากอัดลมหมดอายุ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และหาสภาวะที่เหมาะสมของแบคทีเรีย *Z. mobilis* ต่อประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล ผลการศึกษาครั้งนี้อาจใช้เป็นแนวทางในการจัดการของเสียและได้เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่มีมูลค่า คือ เอทานอล ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นกระบวนการผลิตที่สร้างรายได้ให้แก่บริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลมได้อีกทางหนึ่ง

บทตรวจเอกสาร

1.1 น้ำอัดลม

น้ำอัดลม หมายถึง เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ผสมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะทำให้เกิดความซ่า น้ำอัดลมแบ่งเป็น 2 ประเภท ประเภทแรกไม่มีการผสมน้ำหวาน หรือที่เรียกว่า โซดา ส่วนอีกประเภทคือประเภทที่ผสมน้ำหวานปรุงแต่งกลิ่น และรสชาติ

1.1.1 ประเภทของน้ำอัดลม

หากแบ่งประเภทของน้ำอัดลมตามสายการผลิต สามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

- น้ำดำ หมายถึง น้ำอัดลมชนิดโคล่า
- น้ำสี หมายถึง น้ำอัดลมที่มีการผสมน้ำหวาน และแต่งสีเป็นหลาย ๆ แบบ เช่น น้ำแดง น้ำเขียว น้ำส้ม เป็นต้น
- เลมอน – ไลม์ (ไม่มีสี) หมายถึง น้ำอัดลมที่มีสีขาว ได้แก่ สไปรท์ และเซเว่น – อัพ

1.1.2 ส่วนประกอบของน้ำอัดลม

ส่วนประกอบของน้ำอัดลม ซึ่งประกอบด้วย น้ำ น้ำตาล วัตถุกันเสีย (โซเดียมเบนโซเอท) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสารปรุงแต่งรสและกลิ่น (ข้อมูลจากบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน))

นอกจากนี้น้ำอัดลมบางชนิดยังมีองค์ประกอบที่สำคัญอีกอย่างคือ คาเฟอีน แต่จะเห็นว่าไม่ได้มีการระบุที่ข้างขวด ถึงแม้ผู้ผลิตจะอ้างว่าเป็นองค์ประกอบของคาเฟอีนในธรรมชาติ

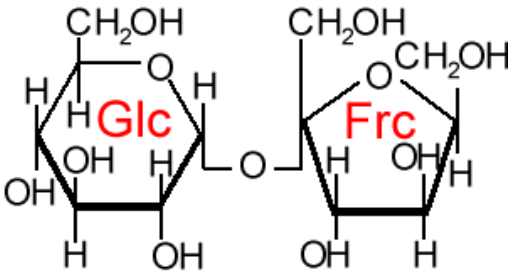
น้ำอัดลมประกอบด้วยน้ำและสารให้ความหวาน ได้แก่ น้ำตาลซูโครส เป็นหลัก ในอดีตการผลิตน้ำอัดลมชนิดธรรมดา (ไม่ใช่แบบจำกัดพลังงานหรือที่เรียกกันว่าแบบไดเอท) จะใช้น้ำตาลทรายเพียงอย่างเดียวนำมาผสมน้ำแล้วต้มทำเป็นน้ำเชื่อมแล้วกรอง ปัจจุบันมีการใช้สารให้ความหวานตัวอื่นเพิ่มขึ้นมา เช่น น้ำเชื่อมข้าวโพด (Corn syrup) น้ำเชื่อมข้าวโพดแบบฟรุคโตสสูง (High Fructose Corn Syrup-HFCS) หรือ Aspatam (สารทดแทนความหวาน) เป็นต้น นอกจากนี้ในน้ำอัดลมยังมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งเกิดจากผลึกกรดซิตริกที่ละลายน้ำได้เป็นกรดซิตริก กรดซิตริกเมื่อทำปฏิกิริยากับโซดาไบคาร์บอเนตที่เติมลงไป เกิดเป็นฟองก๊าซขึ้น นอกจากนี้แล้วจะเป็นสารปรุงแต่งรส สารปรุงแต่งกลิ่นและวัตถุกันเสีย คุณค่าทางโภชนาการของน้ำอัดลมอยู่ที่น้ำตาลซึ่งร่างกายสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานได้ จึงเป็นเครื่องดื่มที่ทำให้ผู้ดื่มได้พลังงานเพียงอย่างเดียวโดยไม่มีสารอาหารอื่น (Empty calories)

1.1.3 น้ำตาลซูโครส (Sucrose)

ซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) หรือน้ำตาลดับเบิ้ลซูการ์ (Double sugar) ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 โมเลกุล (ภาพที่ 1.1) โดยสูญเสียน้ำไป 1 โมเลกุล มีสูตรโมเลกุลของน้ำตาลคือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำตาลซูโครส หรือน้ำตาลทราย มีผลึกสีขาว รสหวาน ละลายน้ำได้ดี พบในอ้อย ตาล มะพร้าว ผลไม้สุก เมื่อถูกย่อยจะได้ น้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล และน้ำตาลฟรุคโตส 1 โมเลกุล ดังสมการที่ (1) ร่างกายมนุษย์ดูดซึมน้ำตาลนี้ได้เมื่อถูกย่อยโดยเอนไซม์ในลำไส้ให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวคือกลูโคสและฟรุคโตสก่อน

น้ำตาลซูโครส + น้ำ ⟶ น้ำตาลกลูโคส + น้ำตาลฟรุคโตส (1)

$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6$



Sucrose, a disaccharide

ภาพที่ 1.1 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของน้ำตาลซูโครส

ที่มา : http//www.nmt.ac.thhomechemistrypicmaltose.gif

1.1.4 สภาพตลาดน้ำอัดลมในประเทศไทย

จากการสำรวจในปี พ.ศ. 2549 พบว่า ในอุตสาหกรรมน้ำอัดลม มีผู้ผลิตทั้งสิ้น 9 ราย แต่มีผู้ประกอบการรายใหญ่อยู่เพียงแค่ 2 รายเท่านั้น คือ บริษัท ไทยน้ำทิพย์ จำกัด (มหาชน) ผลิตน้ำอัดลมโดยใช้เครื่องหมายการค้า โคคา –โคลา แฟนต้า และสไปร์ท และ บริษัท เสริมสุข จำกัด (มหาชน) ซึ่งใช้เครื่องหมายการค้า เป๊ปซี่ มิรินด้า เซเว่นอัพ และเมาเทนดิว ดังนั้น อุตสาหกรรมน้ำอัดลมจึงมีลักษณะเป็นตลาดผู้ขายน้อยราย (Oligopoly) ถึงแม้จะไม่มีการกีดกัน

หรือจำกัดโควตาจากภาครัฐในการเข้าสู่ตลาด แต่ด้วยเป็นอุตสาหกรรมที่ต้องลงทุนสูง จึงไม่ค่อยมีผู้ประกอบรายใหม่ที่เข้ามาในตลาด สินค้าในตลาดมีลักษณะคล้ายๆ กัน หรือสามารถทดแทนกันได้ในสายตาของผู้บริโภค ผู้ประกอบการจึงต้องสร้างความแตกต่างให้กับผลิตภัณฑ์ของตนเองด้วยการผลิตสินค้าตัวใหม่ออกสู่ตลาดอยู่เสมอ เพื่อครองส่วนแบ่งการตลาด ทั้งนี้ส่วนแบ่งทางการตลาดจะตกอยู่ที่ 2 บริษัทรายใหญ่ดังกล่าว จากมูลค่าทางตลาดรวมกว่า 30,000 ล้านบาทต่อปี (http://econ.tu.ac.th/class/archan/Nantavut)

1.1.5 ส่วนแบ่งการตลาดตามสายการผลิต

หากแบ่งตลาดน้ำอัดลมออกเป็นประเภทพบว่าจากส่วนแบ่งตลาดน้ำอัดลมทั้งหมดซึ่งมีมูลค่าประมาณ 30,000 ล้านบาท สามารถแบ่งได้เป็น

- ตลาดน้ำดำ มีมูลค่าตลาดประมาณ 22,000 ล้านบาท หรือ 74 เปอร์เซ็นต์ของตลาดน้ำอัดลมมีสินค้าในตลาด 2 ยี่ห้อ คือ เป๊ปซี่ ซึ่งมีส่วนแบ่งทางการตลาดถึง 63.5 เปอร์เซ็นต์ และโค้ก ซึ่งมีส่วนแบ่งทางการตลาด 36.5 เปอร์เซ็นต์ และในปัจจุบันได้มีผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ทั้ง 2 บริษัทรายใหญ่นำเสนอเพื่อเป็นทางเลือกของผู้ที่ต้องการดื่มน้ำอัดลม แต่ไม่ต้องการน้ำตาล คือ เป๊ปซี่แมกซ์จากบริษัทไทยน้ำทิพย์ และโค้กซีโร่ จากบริษัทเสริมสุข ซึ่งส่วนแบ่งทางการตลาดของน้ำอัดลมไม่มีน้ำตาลนี้คิดเป็น 3 เปอร์เซ็นต์ ของตลาดน้ำดำ ถึงปัจจุบันจะมีมูลค่าตลาดน้อย แต่ก็มีอัตราการเติบโตกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ในปี พ.ศ. 2549 ซึ่งคาดว่าจะมีมูลค่าตลาดมากขึ้นในอนาคต

- ตลาดน้ำสี มีมูลค่าตลาดประมาณ 6,000 ล้านบาท คิดเป็น 20 เปอร์เซ็นต์ของตลาดน้ำอัดลมทั้งหมด มีสินค้าหลักๆในตลาดอยู่ 2 ยี่ห้อ คือ แฟนต้า จากบริษัทไทยน้ำทิพย์ครองส่วนแบ่งทางการตลาด 77 เปอร์เซ็นต์ ส่วนมิรินด้า จากบริษัทเสริมสุข มีส่วนแบ่งทางการตลาด 20 เปอร์เซ็นต์ และที่เหลือเป็นสินค้าจากบริษัทรายย่อย

- น้ำเลมอน–ไลม์ มีมูลค่าตลาดประมาณ 1,800 ล้านบาท คิดเป็น 6 เปอร์เซ็นต์ของตลาดน้ำอัดลมทั้งหมด มีสินค้าในตลาดอยู่ 2 ยี่ห้อ คือ สไปรท์ จากบริษัทไทยน้ำทิพย์ และเซเว่นอัพ จากบริษัทเสริมสุข (http://econ.tu.ac.th/class/archan/Nantavut)

1.2 เอทานอล(Ethanol)

1.2.1 ลักษณะสมบัติ

เอทานอล หรือ เอธิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารประกอบอินทรีย์ หรือรู้จักกันในชื่ออื่น เช่น Grain-spirit หรือ Neutral spirit เป็นต้น เป็นสารไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ติดไฟได้ มีความถ่วงจำเพาะเท่ากับ 0.7939 ที่ความ

เข้มข้นเอทานอล 100 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร มีสูตรเคมี คือ CH_3CH_2OH มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 มีจุดเดือดอยู่ที่ 78.5 องศาเซลเซียส เอทานอลบริสุทธิ์มีเนื้อแอลกอฮอล์ประมาณ 99.7 เปอร์เซ็นต์ โดยทั่วไปมีน้ำเจือปนไม่เกิน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ให้เปลวไฟสีน้ำเงินที่ไม่มีควัน โดยปกติเอทานอลสามารถรวมตัวกับน้ำ อีเทอร์ หรือ คลอโรฟอร์ม

1.2.2 ประโยชน์ของเอทานอล

เอทานอล เป็นสารอินทรีย์ที่สามารถผลิตได้จากการหมักพืช เช่น อ้อยหรือมันสำปะหลัง โดยมีการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล และเปลี่ยนน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์ แล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นเอทานอลที่นำไปผสมน้ำมันเพื่อใช้เติมเครื่องยนต์เป็นแอลกอฮอล์ที่บริสุทธิ์ตั้งแต่ 99.5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตรและสามารถนำมาผสมน้ำมันเบนซินใช้เป็นเชื้อเพลิงของเครื่องยนต์ได้ เอทานอลที่นำมาผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิงเป็นเอทานอลที่ได้จากกระบวนการหมักของจุลินทรีย์ในสภาวะไร้ออกซิเจนโดยน้ำตาลส่วนใหญ่ในน้ำหมักถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและสารพลอยได้อื่นๆ ขณะที่น้ำตาลบางส่วนจุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญและกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ (Zoecklein *et. al.,*1995)

เอทานอลสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย (วสันต์ จันทร์สัจจา, 2546) ดังต่อไปนี้

- ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ต่างๆ เช่น ไวน์ สุรา บรั่นดี ว้อดกา สาเก เป็นต้น
- ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้
- ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง เป็นส่วนประกอบในการทำเครื่องสำอาง เช่น น้ำหอม แชมพูสระผม และน้ำยาบำรุงผิว
- ใช้ในอุตสาหกรรมยา กระบวนการสกัด (extraction process) สารอื่นๆในสมุนไพร และการทำให้บริสุทธิ์ (purification process) ใช้เป็นส่วนประกอบในการผสมยา ใช้เป็นตัวทำละลายเวชภัณฑ์ที่มีอำนาจในการฆ่าแมลง ฆ่าเชื้อโรค และยาดับกลิ่น
- ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสี เป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิตสีเป็นตัวทำละลายของน้ำยาเคลือบ น้ำมันชักเงา และน้ำยาแลกเกอร์
- ใช้เป็นสารผสมในน้ำมันเชื้อเพลิงสำหรับเครื่องยนต์ (additive) ต่างๆ ได้แก่ นำมาผสมกับน้ำมันเบนซินเป็นก๊าซโซฮอล์ ช่วยเพิ่มค่าออกเทน ในเมืองไทยมีการเลือกใช้สูตร E10 ซึ่งก็คือ น้ำมันเบนซิน 91 (90 เปอร์เซ็นต์) ผสมกับเอทานอล 10 เปอร์เซ็นต์ คิดโดยปริมาตร (ณัฐกิตต์ ธรรมเจริญ, 2543) และใช้กันโดยทั่วไปสำหรับเป็นเชื้อเพลิงของรถยนต์ และมีโรงงานอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลเกิดขึ้นแล้วภายในประเทศ

1.2.3 การใช้เอทานอลในต่างประเทศ

บราซิลเป็นประเทศที่ผลิตและใช้เอทานอลมากที่สุดในโลก มีการใช้เอทานอลอย่างแพร่หลาย ตั้งแต่ปี 1975 ในปัจจุบันมีการผลิตเอทานอลรวม 13,000 ล้านลิตรต่อปี และนำไปใช้ประโยชน์อย่างเต็มที่ โดยใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงโดยตรงกับรถยนต์ที่ได้รับการปรับแต่งเครื่องยนต์แล้วมีประมาณ 4 ล้านคัน และใช้ เอทานอลจำนวน 22 เปอร์เซ็นต์ ผสมในน้ำมันเบนซินเพื่อใช้กับเครื่องยนต์ปกติประมาณ 12 ล้านคัน

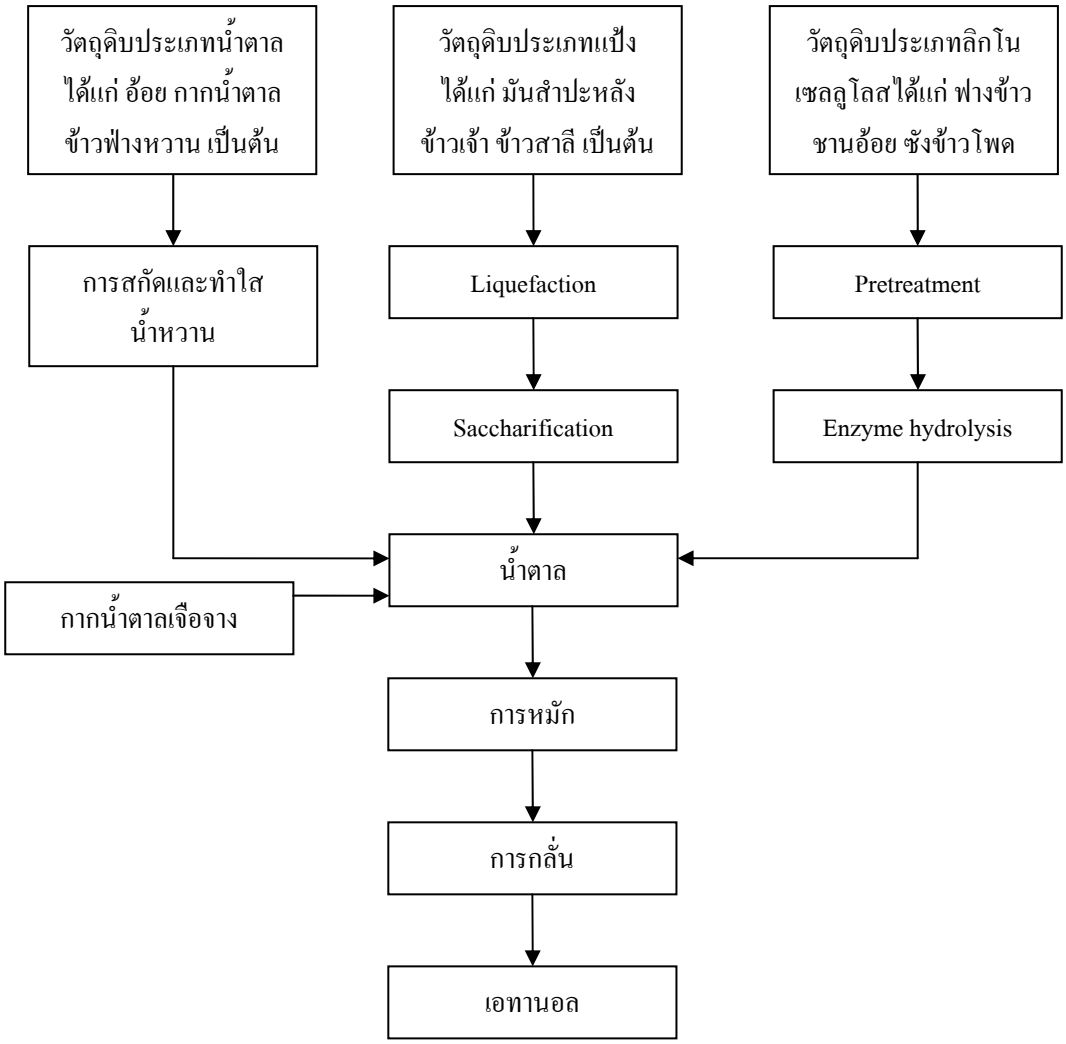
สำหรับสหรัฐอเมริกาได้พัฒนาเชื้อเพลิงทดแทนตั้งแต่ปี ค.ศ. 1979 มีการออกกฎหมายและมาตรการสนับสนุนด้านการลงทุนให้เงินกู้ดอกเบี้ยต่ำและช่วยเหลือทางด้านภาษีเพื่อเป็นแรงจูงใจ ทั้งผู้ผลิตและผู้ใช้ หันมาให้ความนิยมเชื้อเพลิงทดแทนโดยเฉพาะเอทานอลมากยิ่งขึ้น มีปริมาณการผลิตรวม 7,000 ล้านลิตรต่อปี เป็นอันดับสองรองจากบราซิล

1.3 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอล สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลัก ได้แก่ วัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ ขั้นตอนการหมัก และขั้นตอนการกลั่น ซึ่งแต่ละขั้นตอนจะมีผลต่อคุณภาพของเอทานอลที่ผลิตได้ (กมลศักดิ์ ตั้งธรรมเนียม, 2540)

1.3.1 วัตถุดิบ

ในอดีตจนถึงปัจจุบันวัตถุดิบที่นิยมนำมาใช้ในการหมักเอทานอลส่วนใหญ่ คือ อ้อย และมันสำปะหลังอย่างไรก็ตามมีการนำวัตถุดิบอื่น ๆ มาใช้ในการผลิตเอทานอลได้เช่นกัน ชนิดของวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการผลิตมีผลต่อสารองค์ประกอบทางเคมีและคุณภาพของเอทานอลที่ผลิตได้ โดยมีกระบวนการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบต่างๆ ดังภาพที่ 1.2



ภาพที่ 1.2 การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบต่างๆ
ที่มา : เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญและคณะ (2548)

โดยสามารถแบ่งวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอลแบ่งเป็น 3 ประเภท คือ

1.3.1.1 สารจำพวกน้ำตาล (Saccharine materials) ที่สำคัญได้แก่ อ้อยและกากน้ำตาล ซึ่งนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลได้โดยตรง

1.3.1.2 สารจำพวกแป้ง (Starchy material) ได้แก่พวกข้าว ข้าวโพด ข้าวฟ่าง และมันสำปะหลัง โดยที่ก่อนจะเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอล สารจำพวกแป้งจะต้องถูกเปลี่ยนไปเป็นสารจำพวกน้ำตาลโดยเอนไซม์ (Enzymatic hydrolysis) เสียก่อน

1.3.1.3 สารจำพวกเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส (Cellulose and Hemicelluloses) ก่อนที่จะนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลจะต้องถูกเปลี่ยนไปเป็นสารจำพวกน้ำตาลเสียก่อน

เนื่องจากเซลลูโลสที่นำมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลอยู่ในรูปที่เป็นสารผลึกของสารประกอบเชิงซ้อน (Complex) กับลิกนินและเฮมิเซลลูโลส ซึ่งส่วนที่นำมาใช้จริง คือ ส่วนของเซลลูโลสเท่านั้น ขั้นตอนแรกจึงต้องแยกเฮมิเซลลูโลสและลิกนินออกจากโครงสร้างของวัตถุดิบก่อนเพราะส่วนประกอบทั้งสองทำให้พื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยากับเอนไซม์ลดลง ซึ่งลิกนินเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ทำให้ประสิทธิภาพในการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไม่ดีเท่าที่ควร และยังเป็นอุปสรรคต่อการหมักด้วย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการปรับสภาพวัตถุดิบก่อนการผลิตเอทานอล คือ เพื่อแยกลิกนินและเฮมิเซลลูโลสออก และเป็นการปรับโครงสร้างของเซลลูโลสให้อยู่ในสภาพเหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยาการย่อยด้วยเอนไซม์

การปรับสภาพวัตถุดิบแบ่งได้เป็น 4 วิธี คือ

- การปรับสภาพด้วยวิธีทางกายภาพ (Physical pretreatment) เป็นการลดขนาดของวัตถุดิบ และทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยาให้มากขึ้น เช่น การบด การใช้ความร้อน

- การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมี (Chemical pretreatment) จะใช้สารละลายกรดเพื่อเพิ่มความสามารถในการย่อยเฮมิเซลลูโลส เพราะเฮมิเซลลูโลสสามารถย่อยสลายในสารละลายกรดได้ดีกว่าเซลลูโลส หรือใช้สารละลายด่างเพื่อเพิ่มปริมาณการละลายของ เฮมิเซลลูโลสและลิกนิน

- การปรับสภาพด้วยวิธีทางเคมีกายภาพ (Physico-chemical pretreatment) เป็นวิธีที่ใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี เช่น การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อนในสภาวะความดันสูงเพื่อปรับสภาพฟางข้าวซึ่งในกระบวนการย่อยสลายวัตถุดิบด้วยเอนไซม์ พบว่าประสิทธิภาพของการย่อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ และความร้อนที่เพิ่มขึ้น แต่เมื่อใช้ความร้อนภายใต้สภาวะความดันสูงเพียงอย่างเดียว พบว่าการย่อยสลายลดลง เมื่อเกิดความร้อนเพิ่มขึ้น เนื่องจากการแตกตัวของน้ำตาล ที่เกิดขึ้น เปลี่ยนเป็นสารประเภทเฟอฟูรัล (Furfural) สารฟอร์มัลดีไฮด์ (Formaldehyde) หรือกรดฟอร์มิก (Formic acid) ซึ่งเป็นตัวขัดขวางการทำงานของเอนไซม์

- การปรับสภาพด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biological pretreatment) เป็นการใช้เอนไซม์จากจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้อยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก

1.3.2 การหมักเอทานอล

เอทานอลสามารถผลิตได้ทั้งจากกระบวนการสังเคราะห์ (Synthesis) และจากกระบวนการหมัก (Fermentation) ทั้งนี้ 95 เปอร์เซ็นต์ ของเอทานอลที่ใช้กันโดยทั่วไปได้มาจากกระบวนการหมัก (สมใจ ศิริโภค, 2550)

1.3.2.1 เอทานอลจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

เป็นการใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์เอทานอล โดยมีเอทิลีน (Ethylene) เป็นวัตถุดิบ ผ่านกระบวนการไฮเดรชัน (Hydration) คือ การทำปฏิกิริยากับน้ำร่วมกับกรดฟอสฟอริกซึ่งถูกดูดซับไว้ในซีโอไลท์หรือ ซิลิกา แอโรเจล (Substarte) เอทานอลที่ได้เช่นนี้เรียกว่า “เอทานอลสังเคราะห์” (Synthetic ethanol) ดังสมการที่ (2)

$$H_2C = CH_2 + H_2PO_3 + H_2O \text{ --------> } CH_2CH_3OH + H_2PO_3 \quad (2)$$

substrate substrate

1.3.2.2 เอทานอลจากกระบวนการหมัก

เป็นการใช้กระบวนการทางชีวเคมีในการผลิตเอทานอล วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอลส่วนใหญ่เป็นวัตถุดิบทางการเกษตร เอทานอลที่ได้เรียกว่า “ไบโอเอทานอล”

การหมักเอทานอลที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์กันมีผลทำให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีต่างกันตลอดระยะเวลาการหมักเอทานอล (สุมณฑา วัตนสินธุ์, 2545) จุลินทรีย์ที่มีผลต่อการหมักเอทานอลประกอบด้วย ยีสต์ รา แบคทีเรียจำพวกผลิตกรดแลคติก และแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ จุลินทรีย์เหล่านี้มีผลต่อคุณภาพเอทานอลในลักษณะต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการนำความรู้ทางพันธุวิศวกรรมตัดต่อยีน ที่เกี่ยวข้องเพื่อให้ได้ยีสต์ที่ทนต่อความเข้มข้นเอทานอลสูงหรือให้ได้จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง เช่น การใช้วิธี Hybridization ซึ่งอาศัยคุณสมบัติการจับคู่เบสอย่างจำเพาะของ ดี เอ็น เอ นำมาใช้ในการพัฒนากระบวนการหมักเอทานอล

การผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมัก มีสองขั้นตอนสำคัญ คือ

ขั้นตอนที่ 1 การเปลี่ยนวัตถุดิบประเภทแป้งและวัตถุดิบที่มีเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาล ขั้นตอนนี้อาศัยกรดหรือเอนไซม์เป็นตัวทำปฏิกิริยา ดังสมการที่ (3)

$$\underset{\text{แป้ง}}{C_6H_{10}O_5} + \underset{\text{น้ำ}}{H_2O} \xrightarrow{\text{เอนไซม์/กรด}} \underset{\text{น้ำตาล}}{C_6H_{12}O_6} \qquad (3)$$

ขั้นตอนที่ 2 การเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลโดยยีสต์หรือแบคทีเรีย ดังสมการที่ (4)

$$\underset{\text{น้ำตาล}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{ยีสต์/แบคทีเรีย}} \underset{\text{เอทิลแอลกอฮอล์}}{2\ CH_3CH_2OH} + \underset{\text{คาร์บอนไดออกไซด์}}{2\ CO_2} + 28.7\ \text{kcal} \qquad (4)$$

	น้ำตาล	เอทิลแอลกอฮอล์	คาร์บอนไดออกไซด์
สัดส่วน	100	51.1	48.9

จากสมการเคมีพบว่าน้ำตาลกลูโคส 100 กรัม เมื่อทำการหมักด้วยเชื้อยีสต์จะได้เอทานอล 51.1 กรัม และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม แต่ในทางปฏิบัติน้ำตาลที่สามารถใช้ได้จะมีเพียง 95 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น หรือคิดเป็นประสิทธิภาพการผลิตผลิตภัณฑ์จากสับสเตรต (Yp/s) ไม่เกิน 0.485 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล สำหรับน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือยีสต์จะนำไปใช้ในการเจริญเติบโตเพื่อสร้างพลังงานและสารพลอยได้ (By product) เช่น อะเซตัลดีไฮด์ กรดอะซีติก กรดแลกติก และกลีเซอรอล เป็นต้น การหมักเอทานอลจะทำการหมักที่อุณหภูมิ 18 - 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลานาน 14 - 21 วัน (Zoecklein *et al.,* 1995)

สำหรับการศึกษาในงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาโดยใช้สารจำพวกน้ำตาล (Saccharine materials) นั่นก็คือ น้ำอัดลมหมดอายุ ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่สามารถนำเข้าสู่กระบวนการผลิตเอทานอลได้โดยทันที

1.3.3 วิธีการหมักแอลกอฮอล์

การหมักแอลกอฮอล์เป็นกรรมวิธีที่รู้จักกันมานาน เนื่องจากปัญหาพลังงานทำให้เทคโนโลยีการผลิตแอลกอฮอล์ก้าวหน้าไปอย่างมาก มีการค้นคว้าวิจัยหลายแนวทางโดยมีวิธีการที่แตกต่างกันออกไป แต่ทั้งนี้ก็เพื่อหาทางลดต้นทุนการผลิตลงให้มากที่สุด เทคโนโลยีการหมักแอลกอฮอล์แบ่งออกเป็น 3 ประเภท คือ

1.3.3.1 การหมักแบบครั้งคราว (Batch Fermentation) กล่าวคือในการหมักแต่ละชุดต้องมีการเตรียมเชื้อตั้งต้นใหม่ทุกครั้ง ถ้าคิดเฉพาะช่วงเวลาของการหมักใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ประมาณ 8 – 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นวิธีที่ใช้กันมากในโรงงานอุตสาหกรรม โดยเป็นถังสำหรับใส่สารอาหารและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักแล้วกวนให้ผสมกัน มีการควบคุมอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ (Contamination) จนได้ผลผลิตตามที่ต้องการ จึงถ่ายออกเพื่อนำไปแยกแอลกอฮอล์ให้บริสุทธิ์อีกขั้นตอนหนึ่ง

ข้อดีของการหมักแบบครั้งคราว

- เหมาะกับการผลิตที่มีปริมาตรไม่มากนัก
- ในการหมักแต่ละครั้งจุลินทรีย์ที่ใช้มีความแข็งแรงและว่องไวดี ทั้งนี้เพราะต้องเตรียมจุลินทรีย์ขึ้นใหม่เสมอ ทำให้การผ่าเหล่า (Mutation) เกิดขึ้นยาก
- การควบคุมให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดช่วงการหมักทำได้ง่าย
- การควบคุมระบบทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน

ข้อเสียของการหมักแบบครั้งคราว

- ต้องเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นและวัตถุดิบทุกครั้งของการหมักแต่ละชุด ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก
- ต้องเสียเวลาเพื่อให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง

1.3.3.2 การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-Batch Fermentation) คำว่า “fed-batch culture” เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารเป็นช่วงๆ หลังจากที่ใส่เชื้อเริ่มต้นแล้ว ไม่มีการถ่ายออกซึ่งแตกต่างจากการเลี้ยงเซลล์แบบครั้งคราวตรงที่ปริมาตรอาหารในการหมักแบบกึ่งกะจะเพิ่มขึ้นตลอดเวลาไม่คงที่ ส่วนการเลี้ยงแบบต่อเนื่องนั้นปริมาตรอาหารคงที่แม้ว่าจะเติมอาหารด้วยปริมาตรเท่าใด อาหารเก่าพร้อมกับเซลล์จุลินทรีย์ก็จะถูกดึงออกมาด้วยปริมาตรเท่ากันภายในเวลาเดียวกัน ปัจจุบันเทคนิคการเลี้ยงเซลล์แบบ fed-batch ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ เช่น การผลิตเพนนิซิลิน การผลิตยีสต์ทำขนมปัง เป็นต้น

เทคนิคการหมักแบบกึ่งกะมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบครั้งคราวหลายประการ (กลยุทธ โชติพัฒนาและ นิสิต ตัณฑวิเชฐ, 2535) เช่น

- ช่วยลดการยับยั้งของอาหาร (substrate inhibition) สารอาหารที่เป็นแหล่งธาตุคาร์บอน เช่น กรดน้ำส้ม แอลกอฮอล์ เมทธานอล และสารประกอบพวกอะโรมาติก สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้แม้ในความเข้มข้นน้อยๆ ก็ตาม การเติมอาหารเหล่านี้ในปริมาณที่เหมาะสมอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยปราศจากการยับยั้งของสารอาหาร

- สามารถผลิตเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก (high cell concentration) การเลี้ยงเซลล์แบบธรรมดา (batch) จะได้ปริมาณเซลล์ไม่มากเท่ากับการเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งสามารถผลิตเซลล์ได้สูงมาก เช่น 100 กรัมต่อลิตร เป็นต้น

- ช่วยลดผลกระทบจากความเข้มข้นของกลูโคส (glucose effect) เช่น การผลิตยีสต์ขนมปังจากน้ำตาลมอลท์ หรือกากน้ำตาลก็ตาม พบว่ามีเอทานอลละลายปะปนอยู่กับยีสต์ในถังหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อสูง ซึ่งเอทานอลทำให้ปริมาณเซลล์ของยีสต์ลดลง เพื่อที่จะลดผลกระทบจากความเข้มข้นของกลูโคส จึงได้นำเทคนิคการเลี้ยงแบบ fed–batch มาใช้ในการผลิตยีสต์ในปัจจุบัน

- ช่วยลดความหนืดของอาหาร ซึ่งเกิดจากสารจำพวก dextran, pullulan และ xanthan gum สามารถควบคุมความหนืดของน้ำหมักโดยการค่อยๆเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่อง หากความหนืดเพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อระบบการเติมอากาศ เช่น ใบพัดกวนจะต้องใช้กำลังไฟฟ้าเพิ่มขึ้น เกิดฟองมากขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ

- ป้องกันการปะปนของจุลินทรีย์อื่น กรณีการหมักแอลกอฮอล์ด้วยยีสต์การหมักแบบครั้งคราวอาจพบปัญหาเรื่องการปะปนของจุลินทรีย์อื่น ทำให้ผลผลิตแอลกอฮอล์ลดลง หากใช้เทคนิคการหมักแบบกึ่งกะเข้าช่วยแล้วปัญหาเหล่านี้ก็จะหมดไป การใช้เทคนิคการหมักแบบกึ่งกะสามารถประกันการเสียของได้ หากเกิดมีกรณีส่าเสียหรือไม่ดีก็สามารถหยุดการเติมกากน้ำตาลที่จะเติมในช่วงหลังไม่ให้เกิดการสูญเสียมากยิ่งขึ้นได้

การหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลแบบกึ่งกะ สามารถช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับน้ำที่ใช้ในการหมักและการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับกากน้ำตาล ซึ่งพบว่ามี 6 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1) เชื้อรา ตัวอย่างเช่น *Aspergillus, Penicillium* และ *Mucor*

2) ยีสต์ ตัวอย่างเช่น *Saccharomyces cerevisiae, Candida krusei* และ *Torulopsis stellata*

3) แบคทีเรียที่สร้างสปอร์ทั่วไป ตัวอย่างเช่น *Bacillus subtilis, B. cereus* และ *B. mesentericus*

4) แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารโดยสร้างกรดแต่ไม่สร้างก๊าซ ซึ่งชอบเจริญที่อุณหภูมิสูง (55 องศาเซลเซียส) ตัวอย่างเช่น *B. stearothermophilus*

5) แบคทีเรียจำพวกที่ชอบเจริญในสภาพที่ขาดออกซิเจน และที่อุณหภูมิสูง (Thermophilic anaerobe, T.A) ซึ่งไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์แต่สร้างก๊าซไฮโดรเจนและคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างเช่น *Clostridium thermosaccharolyticum* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้อาหารกระป๋องบวม

6) *Clostridium* จำพวก Sulfide spoilage thermophiles จะสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟท์ ตัวอย่างเช่น *C. nigricans* และ *C. bifermentans*

1.3.3.3 การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous Fermentation) เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด จำนวนของจุลินทรีย์จะถูกรักษาระดับสมดุลโดยการกำจัดน้ำหมักออกไปบางส่วนแล้วแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ในอัตราการไหลเดียวกันระบบการหมักแบบต่อเนื่องแบ่งได้เป็น 2 แบบคือ Chemostat และ Turbidostat

ใน Chemostat อัตราการป้อนจะถูกตั้งไว้ที่ค่าหนึ่งและอัตราการเจริญของการเพาะเลี้ยง จะปรับตามอัตราการไหล ส่วนใน Turbidostat ค่าความขุ่นของเซลล์จะถูกตั้งไว้ที่ระดับคงที่ โดยทำการปรับอัตราการไหล ในทางปฏิบัติระบบการหมักแบบ Chemostat ทำได้ง่ายกว่าการหมักแบบ Turbidostat เพราะว่าสามารถทำได้โดยการตั้งปั๊มให้ดูดสารอาหารที่อัตราการไหลคงที่ ส่วน Turbidostat ต้องใช้ Optical sensing และเครื่องควบคุม

ข้อดีของการหมักแบบต่อเนื่อง

- สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้
- สามารถศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนพารามิเตอร์ทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญและการก่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่
- สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของมวลชีวภาพให้คงที่โดยการแปรค่าอัตราเจือจาง (dilution rate)

ข้อเสียของการหมักแบบต่อเนื่อง

- ไม่เหมาะกับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ
- การเจริญแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานานอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์เกิดจากการแทนที่ของสายพันธุ์อื่นที่เจริญได้เร็วกว่า
- การเจริญในช่วงเวลานานอาจเกิดปัญหาการปนเปื้อน

1.3.4 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมักเอทานอล

1.3.4.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล จะต้องมีคุณสมบัติที่ดีที่ส่งเสริมให้กระบวนการหมัก เอทานอลเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วสมบูรณ์ และให้ระดับปริมาณแอลกอฮอล์สูงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก

การใช้จุลินทรีย์ในการหมัก เอทานอล มีดังนี้

1) ใช้จุลินทรีย์ธรรมชาติ จุลินทรีย์หลากหลายตามธรรมชาติ ได้มีการศึกษาจุลินทรีย์ในผลไม้ต่างๆ พบว่าในเนื้อผลไม้มีจุลินทรีย์น้อย จะพบมากที่ผิวผลไม้ภายนอก โดยเฉพาะผลไม้ที่สุกจัดหรือแก่จัด มีรสหวาน ผลไม้ที่ผิวแตกหรือช้ำ เมื่อทำการคั้นเอาน้ำผลไม้ปล่อยทิ้งไว้ น้ำผลไม้จะเกิดการหมักเองโดยจุลินทรีย์ที่ติดมากับผลไม้ จุลินทรีย์ในอากาศและจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิวภาชนะหรืออุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมน้ำผลไม้หรือภาชนะที่ใช้หมัก ในระหว่างการหมักจะพบประชากรทั้งยีสต์และแบคทีเรีย จุลินทรีย์ที่มักพบช่วงแรกๆ ของการหมักคือยีสต์ในสายพันธุ์ *Kloeckera apiculata* รวมทั้งที่อยู่ในรูปของสปอร์ เช่น *Hanseniaspora guilliermondii* และ *Hanseniaspora uvarum* และยังพบ *Candida pulcherrima* ยีสต์เหล่านี้มีลักษณะทนต่อแอลกอฮอล์ได้แค่ 5-7 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นเมื่อกระบวนการหมักดำเนินต่อไปและมีแอลกอฮอล์สูงขึ้น ยีสต์เหล่านี้ก็จะตายไป โดยมียีสต์อื่นที่สามารถทนต่อแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงเจริญขึ้นมาแทนซึ่ง ได้แก่ *Saccharomyces rosei* และ *Saccharomyces cerevisiae* (อรพิน ภูมิภมร, 2526)

2) เชื้ออีเอ็ม (EM หรือ Effective Microorganisms) คือ จุลินทรีย์กลุ่มดีมีประสิทธิภาพ ซึ่งในอีเอ็มประกอบด้วย Yeast, Photosynthetic Bacteria, Lactic acid Bacteria และ

Actinomyces รวมกัน 80 ชนิด มีการนำมาใช้ประโยชน์หลายรูปแบบ เช่น ใช้ในการหมักหากอยู่ในสภาวะปลอดอากาศก็จะได้ผลผลิตเป็นเอทานอล ใช้ในการประกอบอาหาร ใช้ในการกำจัดโรคที่มาจากจุลินทรีย์ได้ ซึ่งการใช้จุลินทรีย์อีเอ็มเป็นเทคนิคทางธรรมชาติ คือทำให้ปริมาณจุลินทรีย์กลุ่มดีมีมากกว่ากลุ่มก่อโรค

3) ใช้จุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกแล้ว ได้แก่ เชื้อยีสต์หรือเชื้อแบคทีเรียบางชนิด ไม่ต้องการเชื้อรา เชื้อยีสต์และแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักเอทานอลอยู่ในสภาพการเก็บ 2 แบบ คือ สภาพเชื้อสดเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (Nutrient agar) และสภาพผงแห้ง (Active dried yeast powder) ซึ่งแบบผงแห้งเก็บได้นานและมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าแบบเชื้อสด ในการผลิตเอทานอลเชิงอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้เชื้อยีสต์และเชื้อแบคทีเรียชนิดผงแห้ง วิธีใช้ไม่ยากจะกล่าวไว้ที่ซอง กล่องหรือภาชนะบรรจุเชื้อจุลินทรีย์นั้น (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2545)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิดโดยเฉพาะยีสต์ ที่ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีปริมาณมาก แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ เช่น ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า 3-4 เท่าเมื่อใช้น้ำตาลเท่ากัน และให้ผลเอทานอลใกล้เคียงกับทฤษฎี (0.50) แต่ข้อด้อยกว่ายีสต์ก็มีคือแบคทีเรียใช้น้ำตาลได้จำกัดคือใช้ได้ 3 ชนิดคือ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แต่เพื่อให้แบคทีเรียสามารถใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นจึงมีการแก้ไขทางพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering) เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นคือ สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ควรมีลักษณะดังนี้ (Zaldivar *et al.,* 2001)

- มีความสามารถในการใช้น้ำตาลหลายชนิด ทั้งน้ำตาลชนิดเฮกโซสและเพนโตส
- สามารถผลิตเอทานอล โดยมีค่าผลผลิตต่อหน่วยวัตถุดิบและอัตราการผลิตที่สูง
- ผลิต by-products อื่นๆ เช่น กลีเซอรอล และ ซัคซิเนท น้อยมาก
- มีความทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงในการหมักได้
- มีความทนทานต่อสารยับยั้งอื่นๆ ที่อาจเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต
- มีความทนทานต่อสภาวะที่ผันแปรในถังหมัก เช่น ค่า pH และความเข้มข้นของเกลือ
- มีความสามารถในการตกตะกอน
- มีพันธุกรรมที่เสถียร

Rogers และคณะ (1980) ได้ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรีย *Z. mobilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคส 10–25 เปอร์เซ็นต์ (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ทำการหมักแบบกะ พบว่าแบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถเปลี่ยนน้ำตาล

กลูโคสเป็นเอทานอลได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces uvarum* พบว่าแบคทีเรีย *Z. mobilis* จะมีอัตราจำเพาะของการใช้น้ำตาลกลูโคสกับอัตราจำเพาะของการผลิตเอทานอลสูงกว่ายีสต์ และให้มวลเซลล์ต่ำ ซึ่งได้ศึกษาเปรียบเทียบการหมักเพื่อผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด โดยทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ทำการหมักแบบกะ

1.3.4.2 อุณหภูมิ

ในขั้นตอนระหว่างการหมักจะมีพลังงานความร้อนที่ปลดปล่อยออกจากปฏิกิริยาสูงถึง 149.5 กิโลแคลอรี่ต่อกรัมซูโครส ซึ่งเป็นผลจากการที่จุลินทรีย์ใช้น้ำตาลซูโครสในการหมักเอทานอล ซึ่งความร้อนนี้มีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งด้านสรีระวิทยาของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำหมักและอัตราการหมักเอทานอล แม้จุลินทรีย์จะสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงแต่ก็ทำให้เซลล์เกิดการฉีกขาดได้และการอยู่รอดของเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีการระเหยของเอทานอลและการเกิดฟองปริมาณมากในน้ำหมัก การเพิ่มอุณหภูมิของการหมักถึง 32 องศาเซลเซียสสามารถเพิ่มอัตราการหมักเอทานอลให้สูงขึ้นได้ อย่างไรก็ตามการใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปทำให้การเจริญของจุลินทรีย์และอัตราการผลิตเอทานอลต่ำกว่าที่อุณหภูมิการหมักปกติ (Amerine *et al.,* 1980) สำหรับการหมักเอทานอล พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการหมักจะสูงกว่าอุณหภูมิสำหรับการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส

1.3.4.3 ปริมาณของออกซิเจน

ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ ยีสต์จะสามารถแบ่งตัวเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าได้ในเวลาไม่ถึงชั่วโมงในระยะเจริญ การเจริญของยีสต์ช่วงนี้จะให้ปริมาณแอลกอฮอล์น้อยมาก ยีสต์จะผลิตกรดน้ำส้มขึ้นมาแทน ทำให้มีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นบูด แต่ในสภาวะไม่มีอากาศยีสต์จะแบ่งเซลล์ได้น้อยกว่าแต่จะให้แอลกอฮอล์ได้ดีกว่า (โชคชัย วนภูและคณะ, 2546) แต่สำหรับแบคทีเรีย *Z. mobilis* นั้นจะสามารถเจริญได้โดยไม่ต้องมีการควบคุมออกซิเจนเหมือนยีสต์ เนื่องจากสามารถเจริญได้ที่ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ ซึ่งกระบวนการผลิตเอทานอลต้องการออกซิเจนในปริมาณไม่มากนัก

1.3.4.4 เอทานอล

ในระหว่างกระบวนการหมัก ความเข้มข้นเอทานอลจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ โดยทั่วไปยีสต์ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อความเข้มข้นเอทานอลประมาณ 14 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร แต่มียีสต์บางสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอลประมาณ 18 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร เช่น *S cerevisiae* (โชคชัย วนภูและคณะ, 2546) สำหรับแบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถเจริญได้ในที่มีแอลกอฮอล์เข้มข้นได้สูงถึง 10-16 เปอร์เซ็นต์

Z. mobilis สามารถต้านทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นในถังหมักได้ระดับหนึ่งเช่นเดียวกับยีสต์ และมีระดับความต้านทานแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท จากการทดลองเติมเอทานอลเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี *Z. mobilis* CP4 ระหว่างการหมักเอทานอล พบว่าครึ่งหนึ่งของปฏิกิริยาการเผาผลาญจะถูกยับยั้งเมื่อเอทานอลมีความเข้มข้นที่ 2.2 โมล (10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และปฏิกิริยาจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อมีความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 4.4 โมล (20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) (Osman and Ingram, 1985) ในขณะที่เซลล์ของ *Z. mobilis* CP3 ในถังหมักจะเริ่มตายลงที่ความเข้มข้นของเอทานอล 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร นอกจากนี้ความทนทานของจุลินทรีย์ในถังหมักต่อความเข้มข้นของเอทานอลยังมีความสัมพันธ์กับความทนทานต่อความเค็มหรือปริมาณเกลือในวัตถุดิบอีกด้วย (Sukesh *et al.,* 1996)

1.3.4.5 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เริ่มต้นของอาหาร

การปรับ pH ของอาหารมีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม การเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ (Walker, 1998) pH ของอาหารมีผลต่ออัตราการหมัก อีกทั้งมีบทบาทในการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นอีกด้วย ปกติเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ยอมให้ประจุไฮโดรเจนหรือประจุไฮดรอกซิลผ่านเข้าออกได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น รวมทั้งภายในไซโตรพลาสซึมของเซลล์จะมีระบบบัฟเฟอร์ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ pH (วราวุฒิ ครูส่ง, 2538) การเลือกค่า pH เริ่มต้นของอาหารขึ้นอยู่กับ buffer capacity ของอาหารที่ใช้ในการหมัก ในอาหารที่มี buffer capacity ต่ำ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมมีค่าประมาณ 5.5 ส่วนอาหารที่มี buffer capacity สูง pH เริ่มต้นที่ควรใช้จะอยู่ในช่วง 4.5-4.7 (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

ทั้งนี้ *S. cerevisiae* และ *Z. mobilis* สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ดีในช่วงของค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5-7.5 สำหรับ *S. cerevisiae* ให้ค่าเอทานอลสูงสุดที่ pH เริ่มต้นประมาณ 5.5 (Kiran *et al.,* 2000) ส่วน *Z. mobilis* จะให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดได้แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบที่ใช้ เช่น หากเป็นกลูโคส การให้ผลผลิตสูงสุดอยู่ในช่วงค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6-7.5 (King and Hossain, 2004) ส่วนฟรุกโตสให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 (Toran-Diaz *et al.,* 1983)

1.3.4.6 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล มีรายงานหลายฉบับที่รายงานผลการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกัน พบว่ามีการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5-10 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ในการผลิตเอทานอล

จากการศึกษาของมัลลิกา บุญมีและคณะ (2548) พบว่าเมื่อนำน้ำย่อยเมล็ดข้าวฟ่างหวานมาทดสอบการผลิตเอทานอลในระดับ ฟลาสก์โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิด คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5339 และแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* TISTR 548 การเพาะเลี้ยงโดยใช้กล้าเชื้อจาก 5 เป็น 10 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

1.3.4.7 ชนิดและความเข้มข้นของสับสเตรท

สับสเตรทหรือแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และการผลิตเอทานอล การใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูงๆ ในการหมักเอทานอลมีผลช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่การใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูงๆมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล ซึ่งเกิดจากแรงดันออสโมซิส ทำให้เซลล์เกิดพลาสโมไลซิสเมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และมีผลยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส ส่งผลให้ประสิทธิภาพของการผลิตเอทานอลลดลง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

แม้จุลินทรีย์ทั้งสองชนิด (แบคทีเรียและยีสต์) จะมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์อื่นตามที่เราต้องการ แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลก็มีผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการดังกล่าว ซึ่งใน *Z. mobilis* โมเลกุลของกลูโคสและฟรุกโตสสามารถแพร่ได้โดยง่าย (Facilitate diffusion) ความเข้มข้นของกลูโคสจึงมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ใน E-D pathway ไม่มาก เพราะการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยแบคทีเรียชนิดนี้เกิดขึ้นเร็วมาก ความสมดุลของกลูโคสภายนอกและภายในจะถูกทำให้สมดุลอย่างรวดเร็ว จึงไม่เกิดความเสียหายต่อเซลล์ *Z. mobilis* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร จากช่วงการทดสอบ 75-150 กรัมต่อลิตร (King and Hossain, 2004) และที่ความเข้มข้นฟรุกโตสเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร เช่นกัน (Toran-Diaz *et al.,* 1983) แต่หากเป็นโมเลกุลเกลือ *Z. mobilis* มีความต้านทานต่อความเข้มข้นเกลือต่ำ จึงทำให้เป็นปัญหาในกรณีที่นำกากน้ำตาล (Molasses) มาใช้เป็นวัตถุดิบ เพราะในกากน้ำตาลมีเกลืออยู่สูง (Gunasekaran and Chandra , 1990) ดังนั้นหากเป็นวัตถุดิบอื่นนอกเหนือจากสารละลายน้ำตาลแล้วต้องพิจารณาองค์ประกอบอื่นๆด้วยที่มีผลทำให้แรงดันออสโมติกในสารละลายเพิ่มขึ้น ปัญหาที่เกิดในขึ้นในกรณีของกากน้ำตาล พบว่าเป็นเช่นเดียวกันกับการใช้ไม้สนมาเป็นวัตถุดิบ พบว่า *Z. mobilis* สามารถทนต่อความเข้มข้นกลูโคสจากไม้สนได้สูงสุด 60 กรัมต่อลิตร (Kademi and Baratti, 2004)

Viikari (1984) ได้รายงานว่าการหมักน้ำตาลซูโครสโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* จะให้ผลผลิตเอทานอลต่ำกว่าการหมักน้ำตาลกลูโคส หรือฟรุคโตส ทั้งนี้เนื่องจากการหมักน้ำตาลซูโครสจะให้สารลีแวนและซอร์บิทอลเกิดขึ้น

Skotnicki และคณะ (1981) ได้ศึกษาเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรีย *Zymomonas* จำนวน 11 สายพันธุ์ ทำการหมักแบบกะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสหรือซูโครสเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* CP4 สามารถที่จะผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 33.7 และ 25 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการหมักนาน 20 ชั่วโมง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสหรือซูโครสเป็น 200 กรัมต่อลิตร พบว่าแบคทีเรีย *Z. mobilis* CP4 ยังคงที่จะผลิตเอทานอลได้สูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ คือ 2.00 และ 1.21 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อทำการศึกษาถึงผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอล พบว่าเมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสหรือซูโครสเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* CP4 สามารถที่จะผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดคือ 81 และ 56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตเอทานอลคือ 30 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพของการหมักเอทานอลจะลดลง เมื่ออุณหภูมิของการหมักมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเกินกว่า 30 องศาเซลเซียส

1.3.4.8 คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาในการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ จะมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วย ถ้าไม่มีการระบายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบความดันในถังหมักจะสูงขึ้น ซึ่งถ้าสูงขึ้นจนถึง 7.5 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลงจนกระทั่งความดันสูงถึง 8.0 บรรยากาศ อัตราเร็วของการหมักจะต่ำมากหรือเกือบจะไม่เกิดเลย

1.3.5 การกลั่นเอทานอล

มนุษย์ค้นพบการกลั่นเอทานอลมาเป็นเวลานานกว่า 4,000 ปี หลังจากการค้นพบวิธีการผลิตไวน์หรือเบียร์ โดยมีการสันนิษฐานกันว่าค้นพบโดยชาวจีนแต่เทคนิคนี้ยังไม่แพร่หลายจนกระทั่งในคริสต์ศตวรรษที่ 12 นักวิทยาศาสตร์การแพทย์ชาวอิตาลีได้ทดลองนำไวน์มาต้มและปล่อยให้ไอระเหยขึ้นไปกระทบกับความเย็นจนกลั่นตัวเป็นหยดน้ำ เพื่อปรุงยาสูตรพิเศษเพื่อใช้ในทางการแพทย์ วิธีดังกล่าวจึงกลายมาเป็นสูตรลับในการผลิตสุราที่มีปริมาณแอลกอฮอล์สูงกว่าเดิม การกลั่นใช้หลักการแยกสารที่ผสมกันอยู่โดยอาศัยความแตกต่างของจุดเดือด หากต้องการเอทานอลที่มีดีกรีสูงก็ทำการกลั่นแยกจากน้ำ โดยการต้มสุราแช่จนถึงจุดเดือดของแอลกอฮอล์คือ 78 องศาเซลเซียส เอทานอลก็จะระเหยออกมาแล้วไอระเหยนี้เมื่อกระทบกับความเย็นไอน้ำจะควบแน่น กลายเป็นหยดน้ำที่มีความเข้มข้นเอทานอลมากขึ้น

เครื่องกลั่นแบบหม้อต้มที่ได้มาตรฐานคือ หม้อที่มีส่วนคอนแดนเซอร์ที่ควบแน่นน้ำ เอทานอลจะระเหยที่อุณหภูมิ 80-85 องศาเซลเซียส อุณหภูมิจะคงที่อยู่ระยะหนึ่งซึ่งเป็นช่วงที่เอทานอลระเหยออกมาหลังจากนั้นอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียสควรหยุดกลั่นเพราะเป็นช่วงของน้ำระเหยออกมา ซึ่งในกระบวนการแยกน้ำออกจากเอทานอลที่ใช้กันทั่วไปมี 3 วิธี คือ

1.3.5.1 การดูดซับด้วย Molecular sieve

Molecular sieve เป็นสารประเภทซีโอไลต์ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยทั่วไปจะเป็นชนิด 3A [$(K_2O.Na_2O).Al_2O_3.\ 2SiO_2.xH_2O$] ซึ่งมีสมบัติพิเศษคือ สามารถดูดน้ำในสภาวะที่เย็นและคายน้ำออกเมื่อได้รับความร้อน หลักการของเทคโนโลยีชนิดนี้ จะใช้สมบัติพิเศษนี้ในการกำจัดน้ำออกจากเอทานอล โดยยอมให้โมเลกุลน้ำผ่านเข้าไปในโมเลกุลของ Molecular sieve ขณะที่โมเลกุลของเอทานอลที่มีขนาดใหญ่กว่าจะผ่านไปไม่ได้ กระบวนการแยกน้ำนี้ เริ่มจากการใช้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ในช่วง 92-96 เปอร์เซ็นต์ ผ่านไปยังปฏิกรณ์ที่บรรจุ Molecular sieve ภายในเป็นชั้นๆ ประมาณ 2-3 ชั้น ในแนวขนาน โมเลกุลน้ำจะถูกจับไว้ ในขณะที่เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ถึง 99.8-99.9 เปอร์เซ็นต์ จะผ่านลงมา และถูกนำไปยังถังเก็บ หลังจากเสร็จสิ้นจากกระบวนการแยกน้ำชั้นของ Molecular sieve แต่ละชั้นจะชุ่มไปด้วยน้ำ ซึ่งสามารถทำให้แห้งทำได้โดยผ่านไอน้ำเพื่อไล่น้ำที่ถูกดูดซับใน Molecular sieve ออก ข้อดีของเทคโนโลยีนี้ คือ เป็นเทคโนโลยีที่ง่าย ใช้ไอน้ำและพลังงานที่ต่ำเมื่อเทียบกับวิธีการกลั่น นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้สารเคมีอื่นๆ มาช่วยในการแยกน้ำ การกำจัดของเสียจึงไม่จำเป็นต้องคำนึงถึง แต่เทคโนโลยีนี้มีข้อเสียตรงที่ อัตราการสึกกร่อน หรือเกิดการเน่า (Fouling of media) ของ Molecular sieve มีค่อนข้างสูง เมื่อมีการใช้งานมากกว่า 5 ปี จำเป็นต้องเปลี่ยนใหม่ทำให้ค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตค่อนข้างสูง

1.3.5.2 การกลั่นอะซีโอโทรป (Azeotropic distillation)

ตามหลักทฤษฎี การกลั่นเอทานอลเพื่อให้มีความบริสุทธิ์สูง จะพบปัญหาของการแยกออกจากกันไม่ได้ของน้ำและเอทานอล จุดนี้เรียกว่า จุดอะซีโอโทรป การกลั่นเอทานอลจึงจำเป็นต้องเติมสารประกอบที่ 3 เพื่อทำให้น้ำแยกออกจากเอทานอลได้ดียิ่งขึ้น สารประกอบนี้เรียกว่า entrainer ได้แก่ ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane) เบนซีน (Benzene) โทลูอีน (Toluene) อีเทอร์ (Ether) หรือคีโตน (Ketone) วิธีนี้เป็นวิธีที่คิดค้นกันมานานและเป็นที่นิยมใช้กันอย่างมาก ถึงแม้มีข้อเสียอยู่หลายประการ ข้อเสียที่สำคัญมากที่สุดคือ การใช้พลังงานมหาศาลในการกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่บริสุทธ์มากๆ ข้อเสียอีกประการหนึ่ง คือ สารที่ใช้เป็น entrainer บางชนิดเป็นสารพิษและมีลักษณะสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งอีกด้วย

1.3.5.3 เทคโนโลยีแผ่นเยื่อบาง (Membrane technology)

เทคโนโลยีนี้เป็นเทคโนโลยีใหม่ล่าสุด เป็นเทคโนโลยีที่ง่ายและใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพ ในการแยกสารละลายผสมผ่านเยื่อแผ่น (Membrane) โดยใช้เทคนิคการซึมผ่าน (Permeation) ของน้ำผ่านแผ่นเยื่อบางในรูปของไอน้ำ ด้วยแรงดึงดูดจากภายนอกที่มีความดันต่ำกว่า (Evaporation) สารที่ผ่านเยื่อแผ่น เรียกว่า เพอมีเอท (Permeate) การแยกเกิดขึ้นได้เนื่องจากองค์ประกอบของสารในสารผสมมีความเป็นขั้ว (Hydrophilicity) ต่างกัน เช่นในกรณีของ น้ำในเอทานอล น้ำมีความเป็นขั้วที่สูงกว่าเอทานอล ความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อแผ่นของน้ำจึงมีค่าสูงกว่า ขณะที่มีการซึมผ่านของน้ำ ความดันต่ำจากภายนอกจะช่วยดึงน้ำออกมาในรูปของไอน้ำ เมื่อทำการลดอุณหภูมิไอน้ำจะกลั่นตัวเป็นของเหลว

เยื่อแผ่นที่นำมาใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ ชนิดที่เป็นพอลิเมอร์และชนิดที่เป็นเซรามิก ชนิดที่เป็นเยื่อแผ่นเซรามิกได้รับความสนใจมากกว่า เนื่องจากสามารถทนต่ออุณหภูมิ สารเคมี และจุลินทรีย์ได้ดี เยื่อแผ่นเซรามิกที่นิยมใช้ในการแยกน้ำออกจากเอทานอลคือ ซีโอไลต์ชนิดโซเดียมเอ (NaA zeolite) ซึ่งมีสมบัติของความมีขั้วสูงกว่าซีโอไลต์ชนิดอื่นๆ ทำให้เป็นปัจจัยสำคัญในการคัดสรรโมเลกุลที่ถูกดูดซับ โดยอาศัยความเข้ากันได้ของระหว่างความมีขั้วของโมเลกุลน้ำกับเยื่อแผ่น นอกจากนี้ปัจจัยสำคัญอีกประการในการเลือกใช้ซีโอไลต์ชนิดโซเดียมเอ คือ ความแตกต่างของขนาดโมเลกุลที่ผ่านรูเปิดของซีโอไลต์ เนื่องจากซีโอไลต์มีโครงร่างเป็นผลึกที่มีรูพรุน และมีรูเปิดขนาดเล็ก (4 อังสตรอม) เหมาะสำหรับการคัดสรรโมเลกุลน้ำที่มีขนาดเล็ก การขึ้นรูปซีโอไลต์ที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดของผลึกให้เป็นเยื่อเลือกผ่านโดยตรงนั้นไม่สามารถกระทำได้ จำเป็นต้องผ่านกระบวนการการสังเคราะห์จากสารตั้งต้นที่มีส่วนประกอบของซิลิกาและอลูมินา มาทำปฏิกิริยากันบนแผ่นของแข็งรองรับที่มีรูพรุน เช่น อลูมินา เป็นต้น เมื่อเกิดผลึกซีโอไลต์ชนิดโซเดียมเอขึ้น ผลึกที่เกิดเหล่านั้นจะมารวมตัวกันเป็นแผ่นต่อเนื่อง (Polycrystalline) เป็นฟิล์มบางขึ้น (ณีรนุช ควรเชิดชูและ สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์, 2550)

1.4 *Zymomonas mobilis*

Zymomonas mobilis เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอทานอลได้สูงกว่ายีสต์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ดั้งเดิมที่ใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรม เมื่อทำการเปรียบเทียบปัจจัยทางจลศาสตร์ระหว่างจุลินทรีย์สองชนิดนี้ พบว่า *Z. mobilis* ให้ผลผลิตเอทานอล (ethanol yield) สูงกว่าและ ผลผลิตของเซลล์ (biomass yield) ต่ำกว่ายีสต์ แบคทีเรีย *Z. mobilis* มีอัตราการใช้น้ำตาลที่จำเพาะ (specific glucose consumption rate) และอัตราการผลิตเอทานอลจำเพาะ (specific ethanol production rate) โดยสูงกว่ายีสต์ประมาณ 3 - 4 เท่า *Z. mobilis* สามารถให้ปริมาณผลิตผล

(ethanol productivity) สูงถึง 120 - 200 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในกระบวนการหมักต่อเนื่องแบบดึงเซลล์ย้อนกลับ (cell recycle system) ขณะที่ยีสต์ให้ปริมาณผลิตผลเพียง 30 - 40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง นอกจากนี้ *Z. mobilis* สามารถทนต่อเอทานอลได้สูงถึง 16 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ซึ่งยีสต์สามารถทนได้สูงเพียง 12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (Tripetchkul *et .al.,* 1993) แต่สำหรับการการนำ *Z. mobilis* ไปใช้ในระดับอุตสาหกรรมพบว่า ยังไม่เป็นที่แพร่หลายมากนัก ทั้งนี้เนื่องจาก *Z. mobilis* ใช้น้ำตาลได้เพียง 3 ชนิดเท่านั้นคือ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ดังนั้นจึงได้มีการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้สามารถใช้แหล่งอาหารมากขึ้น เช่น การถ่ายโอนยีนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นเข้าสู่ *Zymomonas* โดยวิธี Conjugation, Transformantion การใช้พันธุวิศวกรรม การทำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการใช้สารเคมีหรือใช้รังสีไวโอเลตซึ่ง *Zymomonas* สายพันธุ์กลายเหล่านี้นอกจากสามารถใช้สารอาหารได้กว้างขึ้นแล้ว ยังมีคุณสมบัติที่ ดีต่างๆ ตามมา เช่น เจริญได้ที่ pH ต่ำ ที่สำคัญคือ เพิ่มการผลิตเอทานอลให้มีปริมาณสูงขึ้นได้ (เจริญศักดิ์ โรคนฤธิ์พิเชษฐ์ , 2546)

ดังนั้น ในปัจจุบัน มีผู้สนใจใช้ *Zymomonas sp.* ในกระบวนการผลิตเอทานอล โดยเฉพาะ *Z. mobilis* กันมาก โดยมีเป้าหมายคือ เพื่อต้องการพัฒนากระบวนการผลิตเอทานอลให้มีปริมาณและศักยภาพสูงที่สุด

1.4.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis*

Zymomonas เป็นแบคทีเรียจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology จะเป็น Gram–negative facultative anaerobic rods เซลล์จะมีลักษณะเป็นรูปแท่งที่มีปลายโค้ง ขนาดกว้าง 1–1.4 ไมครอน และยาว 2–6 ไมครอน มักอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ ย้อมติดสีแกรมลบ เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ไม่สร้างสปอร์ แคปซูล ลิปิด หรือไกลโคเจน องค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย แสดงดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 องค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย *Zymomonas*

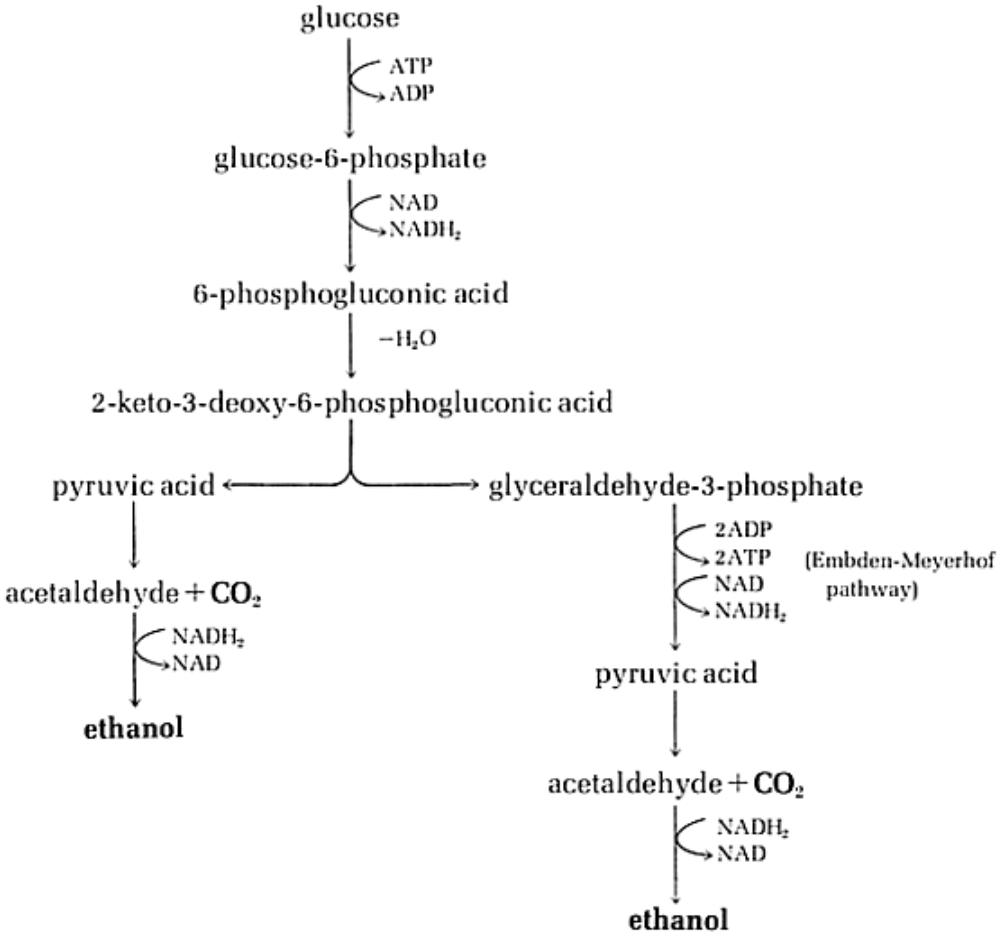
องค์ประกอบ	ปริมาณที่ตรวจพบ (เปอร์เซ็นต์โดยมวลน้ำหนักแห้ง)
Proteins	
Growth phase	65-69
Stationary phase	54
RNA	17-22
DNA	2.7
Carbohydrate	4-5
Poly-β-hydroxybutyrate	0
Polyphosphate	0
Sulfur	0.5
Ammonia	0.1–0.5 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม
Amino acids	0.02-0.2 ไมโครโมลต่อมิลลิกรัม
ATP	
Exponential phase	1-5 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม
Starvation	0-0.04 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม

ที่มา : Swings and De Ley (1977)

เมื่อทำการทดสอบ Catalase ให้ผลบวก และ Oxidase ให้ผลลบ เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส pH 3.5-4.0 ไม่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Nutrient agar หรือ Nutrient broth ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในที่มีออกซิเจน สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตส ได้เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ สามารถที่จะแบ่งแบคทีเรีย *Zymomonas* ออกได้เป็น 2 สปีชีส์ คือ *Z. mobilis* และ *Z. anaerobia* โดยอาศัยความสามารถในการหมักน้ำตาลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส ได้โดย Entner-Doudoroff parthway ดังภาพที่ 1.3 ได้ผลผลิตเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ (Lindner, 1924 อ้างใน ธนาสิน สุทธิรักษ์, 2526) ดังสมการที่ (5)

$$1\ \text{Glucose} \longrightarrow (1.58\text{-}1.93)\ \text{ethanol} + (1.7\text{-}1.9)\ CO_2 + (0.02\text{-}0.2)\ \text{lactate} + (0.011)\ \text{cell material} \quad (5)$$

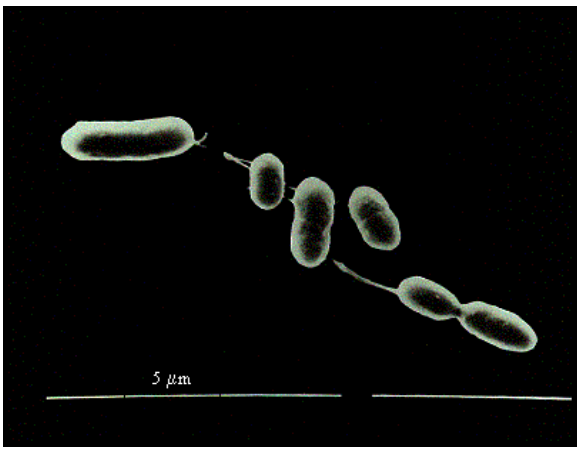
ส่วนแบคทีเรีย *Z. anaerobia* จะหมักน้ำตาลได้เพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ กลูโคส และฟรุคโตส แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ (Buchanan, 1974) วิถีการสลายกลูโคสโดยผ่าน Entner-Doudoroff pathway ซึ่งเกิดได้ทั้งในสภาพมีอากาศและไร้อากาศของพวกโปรคารีโอท โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่พบในพวกยูคารีโอท วิถีนี้พบในหลายๆ species ของ *Pseudomonas* ตลอดจนพวก Gram-negative rods อย่างไรก็ตาม *Z. mobilis* สกุลเดียวเท่านั้นที่ใช้วิถีนี้ในสภาพไร้อากาศ เพราะเชื้อนี้ขาด oxidative transport system ดังนั้นจึงเป็นพวก obligately fermentation ซึ่งเป็นวิถีที่ขาดประสิทธิภาพเพราะมีเพียง 1 โมลของ ATP เกิดขึ้นต่อการหมัก 1 โมลของน้ำตาล C6 (hexose) แต่เป็นที่สนใจสำหรับการประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมเพราะให้ 2 โมลเอทานอลต่อโมลสับสเตรท จึงสามารถผลิตเอทานอลได้รวดเร็ว ซึ่งเป็นผลจากการที่เชื้อมี pyruvate decarboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่ค่อยพบในแบคทีเรียอื่นๆ (ดวงพร คันธโชติ, 2546)



Net reaction : Glucose ⟶ 2Ethanol + 2CO_2 + ATP

ภาพที่ 1.3 แสดงวิถี Entner-Doudoroff pathway

ที่มา : http//www.textbookofbacteriology.net



ภาพที่ 1.4 แสดงลักษณะรูปร่างของ *Zymomonas sp.*
ที่มา : http// www.scielo.cl

1.4.2 ประวัติการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรีย *Zymomonas sp.*

Barker and Hillier (1912) เป็นกลุ่มแรกที่ศึกษาเกี่ยวกับ cider sickness เพิ่มเติมและได้บรรยายเกี่ยวกับแบคทีเรียที่ทำให้กลิ่นและรสของไซเดอร์เปลี่ยนไป โดยพบว่าลักษณะเริ่มแรกที่สังเกตได้คือ มีฟองก๊าซเกิดขึ้น และมีการสะสมมากขึ้นในช่วงเวลา 2-3 วัน ซึ่งหลังจากนั้นต่อมาแรงดันของก๊าซที่เพิ่มขึ้นจะทำให้ขวดทดลองระเบิดได้ ในขณะเดียวกันพบว่าแบคทีเรียที่กำลังมีการเจริญเติบโตอยู่จะทำให้กลิ่น และรสของไซเดอร์เปลี่ยนไปจากเดิม และทำให้ความหวานของไซเดอร์ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าไซเดอร์จะมีสีขุ่นสังเกตได้อย่างชัดเจน ซึ่งหลังจากนั้นต่อมาไซเดอร์จะเริ่มใสและมีตะกอนของแบคทีเรียเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาสภาวะที่ทำให้เกิด cider sickness พบว่าขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ไซเดอร์มีความเป็นกรดต่ำ มีน้ำตาลในไซเดอร์และการเก็บไซเดอร์ไว้ในที่มีอุณหภูมิสูง เมื่อทำการแยกเชื้อและทำการศึกษาแบคทีเรียที่พบใน cider sickness พบว่าแบคทีเรียมีลักษณะเซลล์รูปแท่ง เคลื่อนที่ได้ มักอยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ มีขนาดกว้าง 1 ไมครอน และยาว 2 ไมครอน บริเวณส่วนปลายของเซลล์จะโค้งมน สำหรับเซลล์ที่เก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อนาน ๆ พบว่าจะมีความยาวเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในระยะ involution form จะมีความยาวถึง 200 ไมครอน และส่วนปลายเซลล์จะมีรูปร่างกลม หรือมีลักษณะเป็น dumb–bell มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากถึง 25 ไมครอน เซลล์ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน จะเจริญเติบโตได้ช้าบนอาหารแข็ง โคโลนีจะมีสีขาวขุ่น และเป็นเมือกเหลว แบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส และฟรุคโตสได้อย่างรวดเร็ว ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอลและ

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ไม่สามารถที่จะหมักน้ำตาลซูโครส มอลโตสและ แลคโตสได้ แบคทีเรียที่ค้นพบใหม่นี้ยังไม่ได้มีการตั้งชื่อใหม่ จึงให้ชื่อว่าสายพันธุ์ A (strian A)

Lindner (1931) ได้ศึกษาเกี่ยวกับ aguamiel fermentation (aguamiel เป็นน้ำหวานที่ได้จากต้น agave) ซึ่งภายหลังจากการหมักจะได้เครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์ชื่อ " Pulque " ที่มีแอลกอฮอล์ประมาณ 4–6 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร การหมักดังกล่าวนี้เกิดจากแบคทีเรียที่ Lindner ได้ตั้งชื่อว่า "*Termobacterium mobile*" ซึ่งปัจจุบันคือ *Z. mobilis* subsp. *mobilis* แบคทีเรีย *T. mobile* เป็นแบคทีเรียที่เคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็ว สามารถหมักน้ำตาลซูโครส ฟรุคโตส และกลูโคส ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และกรดแลกติค เกิดขึ้นเพียงเล็กน้อย แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลมอลโตส และแลคโตส อย่างไรก็ตาม Lindner ได้รายงานว่าแบคทีเรียชนิดนี้จะพบได้เฉพาะในพื้นที่เขตร้อน ซึ่งได้มีการนำมาใช้ในการหมักปาล์มไวน์และชิคาเบียร์ เป็นต้น รวมทั้งได้นำมาใช้ในโรงงานผลิตขนมปัง

Shimwell (1937 and 1950) สามารถที่จะแยกเชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas* ได้จากเบียร์เป็นครั้งแรก โดยแยกเชื้อได้จากบริเวณผิวหน้าของเบียร์ในถังหมัก และจากเครื่องมือที่ใช้ในการทำความสะอาดถังหมักเบียร์ โดยแบคทีเรียที่แยกได้ เซลล์จะมีลักษณะเป็นแท่งอ้วนๆ ย้อมติดสีแกรมลบ เซลล์ที่มีอายุไม่มาก จะมีขนาดกว้าง 1–1.5 ไมครอน และยาว 2–3 ไมครอน แต่เซลล์ที่มีอายุมากจะมีความยาวมากขึ้น ไม่สร้างสปอร์มีทั้งสายพันธุ์ที่เคลื่อนที่ได้และเคลื่อนที่ไม่ได้จากเบียร์แหล่งเดียวกัน สำหรับสายพันธุ์ที่เคลื่อนที่ไม่ได้ มีการตั้งชื่อให้ว่า "*Saccharomonas anaerobia* var. *immobilis*" โดยที่ความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จะหายไปภายใน 3 วัน และเซลล์จะมีการรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อนเล็ก ๆ (rosette-like clusters) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร glucose beer agar ในสภาวะที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ พบว่าโคโลนีจะมีลักษณะกลมไม่สม่ำเสมอ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร มีสีครีม บางโคโลนีจะมีผิวหน้านูนโค้งขึ้นเพียงเล็กน้อยจากอาหาร โคโลนีจะมีขอบเรียบ ไม่มีรอยหักเว้า เนื้อโคโลนีจะคล้ายเนยเหลว และมีเม็ดแข็ง ๆ ปะปนอยู่ภายในเนื้อโคโลนี สำหรับโคโลนีที่ฝังอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีลักษณะกลมนูน สำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Glucose beer agar พบว่าการเจริญเติบโตจะเกิดขึ้นอย่างสม่ำเสมอตามรอยแทง แต่เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร nutrient broth yeast extract sugar-free beer หรือในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคสหรือฟรุคโตส พบว่าแบคทีเรียจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ สำหรับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร glucose yeast extract broth พบว่าแบคทีเรียจะเจริญเติบโตโดยรวมกลุ่มกันบริเวณผนังและสะสมรวมตัวกันหนาแน่นบริเวณก้นหลอดทดลอง เมื่อเพาะเลี้ยงใน agar slant ในสภาวะที่มีออกซิเจน พบว่าแบคทีเรียจะไม่สามารถเจริญเติบโตได้ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญเติบโตคือ 30 องศาเซลเซียส

ส่วนค่า thermal death time พบว่าจะใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ดี พบว่าจะมีค่าระหว่าง 3.4 – 7.5

Goncalves และคณะ (1970) ได้แยกเชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas* จากน้ำอ้อยหมักในประเทศบราซิล พบว่าแบคทีเรียที่สามารถแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง มีขนาดกว้าง 1–2 ไมครอน และยาว 2–6 ไมครอน เซลล์มักอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ ซึ่งบางครั้งจะมีการต่อกันเป็นสายยาว แบคทีเรียสามารถเคลื่อนที่ได้อย่างรวดเร็วโดยใช้แฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ โคโลนีที่ได้จะมีลักษณะเป็นเมือก แบคทีเรียจะมีการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วในอาหารเหลว โดยจะมีลักษณะเป็นก้อนฟอล์คเล็ก ๆ (flocculent deposit) แบคทีเรียสามารถที่จะทนต่ออุณหภูมิได้สูงถึง 42 องศาเซลเซียส สำหรับการเจริญของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นภายหลังจากเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 15–18 ชั่วโมง ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน แบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และแซคคาโรสได้ แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส มอลโตส ไซโลส แรฟฟิโนส แรมโนส อินโนซิทอล อะราบิโนส กาแลคโตส แมนนิทอล และแมนโนสได้ แบคทีเรียจะไม่ผลิตอะเซทิลเมทิลคาร์บินอล อินโดล ยูรีเอส และก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

1.4.3 คุณสมบัติของ *Zymomonas sp.* ในการผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.4.3.1 ความสามารถสร้างแอลกอฮอล์ได้ในปริมาณสูง

จากการรายงานพบว่า *Zymomonas* สามารถสร้างเอทานอลได้สูงถึง 1.5-1.9 โมล ต่อกลูโคส 1 โมล โดยใช้น้ำตาล 98เปอร์เซ็นต์ เพื่อสร้างแอลกอฮอล์ ส่วนอีก 2เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือใช้สำหรับเจริญเติบโต (Swings and De Lay, 1984) ปริมาณเซลล์ที่สร้างขึ้นน้อยกว่ายีสต์ ดังนั้นน้ำตาล ที่ใช้จึงนำไปแปรเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์ได้สูงกว่าการใช้ยีสต์

1.4.3.2 คุณภาพของเอทานอลที่ได้

เอทานอลที่ผลิตจาก *Zymomonas* มี higher alcohol (แอลกอฮอล์ที่มีโมเลกุลสูง เช่น โพรพานอล เพนทานอล) เจือปนอยู่เพียง 0.6 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักต่อน้ำตาล 1 กรัม ซึ่งน้อยกว่ายีสต์ *Saccharomyces* ที่หมักในสภาพเดียวกันถึง 40 เท่า ดังนั้นคุณภาพของเอทานอลที่ผลิตได้จาก *Zymomonas* ดีกว่าการหมักด้วยยีสต์ในสภาพเดียวกัน ซึ่งการหมักของ *Zymomonas* ใช้น้ำตาลกลูโคสและผลิตเอทานอล โดยผ่าน Entner-Doudoroff parthway ในขณะที่ยีสต์จะใช้น้ำตาลและผลิตเอทานอลโดยผ่าน Embden-Meyerhof Parnas parthway (Michael *et al.,* 2001)

1.4.3.3 ความสามารถเจริญในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง

Zymomonas ส่วนใหญ่สามารถเจริญและหมักให้แอลกอฮอล์ในสภาพที่มีน้ำตาลเข้มข้นถึง 25 เปอร์เซ็นต์ และบางสายพันธุ์สูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ (De Ley and Swing, 1977 อ้างใน วิเชียร กิจปรีชาวนิช, 2522)

1.4.3.4 ความสามารถเจริญในที่มีแอลกอฮอล์สูง

ความสามารถเจริญในทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในที่มีแอลกอฮอล์สูง 5.5 เปอร์เซ็นต์ และมีบางสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นของแอลกอฮอล์ได้สูงถึง 10-16 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถเจริญและการหมักให้แอลกอฮอล์ในสภาพที่มีความเข้มข้นสูง (ธนาสิน สุทธิรักษ์, 2526)

1.4.3.5 ความสามารถเจริญในที่มีอุณหภูมิสูง

โดยทั่วไป *Zymomonas* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-38 องศาเซลเซียส แต่มีบางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 40-42 องศาเซลเซียส ส่วนระดับของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุด (ตารางที่ 1.1) แต่เมื่อมีระดับอุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นความสามารถในการเจริญเติบโตจะเริ่มลดลง

ตารางที่ 1.2 การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Zymomonas* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร standard medium ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยงเชื้อ (องศาเซลเซียส)	เปอร์เซ็นต์ของการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
30	100
34	97
36	97
38	74
40	5

ที่มา : Swings and De Ley (1977)

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์ (2545) ได้ทำการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลรีดิวส์ที่ได้จากการไฮโดรไลซีสเหง้ามันสำปะหลัง ด้วยเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 405 โดยใช้น้ำตาลรีดิวส์เริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิการหมัก 30 องศาเซลเซียส pH เริ่มต้น 5.0 พบว่าภายในเวลา 60 ชั่วโมง ได้เอทานอล 10.60 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 69.84 เปอร์เซ็นต์

1.4.3.6 ความสามารถเจริญในที่มีกรดสูง

โดยสามารถทนกรดในสภาพ pH 3.5-4.0 ซึ่งจัดว่าเป็น pH ที่ต่ำมากลักษณะเช่นนี้ดีเพราะสามารถ ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้ออื่นๆ

1.4.3.7 ความสามารถเจริญในการทนต่อ KMS (Potassium metabisulfite)

สามารถทน Potassium metabisulfite ถึง 500 ppm ซึ่งเป็นปริมาณที่จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆถูกยับยั้ง ลักษณะเช่นนี้เป็นประโยชน์เมื่อใช้ Potassium metabisulfite เป็นตัวทำลายเชื้อที่ปนเปื้อนมาและ Potassium metabisulfite ที่ตกค้างอยู่จะไม่มีผลต่อการเจริญของ *Zymomonas*

สำหรับ Potassium metabisulfite ($K_2S_2O_5$) เป็นสารที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการให้เกิดขึ้น ซึ่งคล้ายกับ Sodium metabisulfite นิยมใช้เป็นสารปรุงแต่งในอุตสาหกรรมไวน์และเบียร์

1.4.3.8 ลักษณะการตกตะกอนของเซลล์

การตกตะกอนของเซลล์จะจับตัวตกตะกอน เรียกลักษณะนี้ว่า Flocculation ซึ่งเหมาะและสะดวกในการแยกเซลล์หลังการหมักได้ง่ายต่อไป

1.4.3.9 ความสามารถเจริญในสภาพที่ปราศจากออกซิเจน

สามารถเจริญในสภาพที่ปราศจากออกซิเจนได้ดีกว่ายีสต์ จึงไม่ต้องการการควบคุมออกซิเจนเหมือนยีสต์ที่ต้องมีการควบคุมปริมาณออกซิเจน เพื่อรักษาปริมาณเซลล์ให้มากเพียงพอสำหรับการผลิตเอทานอล

Bringer และคณะ (1984) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรีย *Z. mobilis* ATCC 29191 ทำการหมักแบบต่อเนื่องในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) คงที่ 5.0 อัตราเจือจาง 0.08 ต่อชั่วโมง โดยทำการเปรียบเทียบการหมักในสภาวะที่ไร้ออกซิเจนซึ่งใช้น้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 3 ระดับ คือ 11.1, 100.2 และ 140.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ส่วนในสภาวะที่มีออกซิเจน (10 เปอร์เซ็นต์ของ air saturation) ใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้น 3 ระดับคือ 10.4, 100.2 และ 144.3 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่าการหมักในสภาวะไร้ออกซิเจนจะผลิตเอทานอลเท่ากับ 5.4, 47.8 และ 63.4 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และในสภาวะที่มีออกซิเจนจะมีค่าเท่ากับ 4.4, 18.9 และ 20.1 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าการหมักในสภาวะที่มีออกซิเจนจะมีการสะสมของอะเซตัลดีไฮด์เพิ่มสูงขึ้นตามความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เพิ่มขึ้น ซึ่งอะเซตัลดีไฮด์จะเป็นพิษต่อแบคทีเรียและทำให้แบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสได้ สำหรับการหมักในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน พบว่าการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะถูกยับยั้งโดยความเข้มข้นของเอทานอลเป็นสำคัญ อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *Z. mobilis* ATCC 29191 จะเจริญเติบโตได้ดีกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน

1.4.3.10 สามารถใช้เทคนิคทางด้านพันธุกรรมมาประยุกต์ใช้กับ *Zymomonas*

เพื่อที่จะได้ตัวผ่าเหล่าที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลได้สูง หรือทนต่อความเข้มข้นของเอทานอลได้สูงขึ้น เช่น มีการตัดต่อพันธุกรรมของแบคทีเรียหรือ Genetically Modified Bacteria (GMB) ขึ้นมาโดยใช้แบคทีเรียแกรมลบคือ *Escherichia coli* กับยีนในการผลิตเอทานอลจากแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* (pdc และ adh) เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลทั้งจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นเอทานอลได้ (Dien *et al.,* 2003) หรืออาจใช้สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี เช่น Nitrosoguanidine (NTG) , Phenol เป็นต้น

Ingram and Doran (1995) ได้ตัดต่อพันธุกรรมโดยการรวมสายพันธุ์ของแบคทีเรียแกรมลบ (*Escherichia coli* or *Klebsiella oxytoca* or *Erwinia* sp) กับยีนในการผลิตเอทานอลจาก *Z. mobilis* (pdc และ adh) ซึ่งสายพันธุ์ที่ได้มีประสิทธิภาพในการเปลี่ยนน้ำตาลจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสเป็นเอทานอลได้ และเมื่อใช้สายพันธุ์นี้ในการผลิตเอทานอลโดยใช้ผลึกของเซลลูโลส (Sigmacell 50, Sigma Chemical Company, St. Louis, MO) เป็นสารตั้งต้นสามารถผลิตเอทานอลได้ 47 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลลูโลส ในเวลา 144 ชั่วโมง

Kannan และคณะ (1998) ได้ทำการทดลองผลิตเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส โดยใช้การตรึงเซลล์ *Z. mobilis* LS1A ที่กลายพันธุ์จากสายพันธุ์เดิม(B-806)โดยไม่ให้มี levansucrase (Sac B) และ intracellular sucrase (Sac A) พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้สูงถึง 73.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้ระยะเวลาในการหมักเพียง 18 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์เดิมที่ผลิตเอทานอลได้เพียง 65.2 กรัมต่อลิตร เนื่องจากผู้วิจัยพบว่า การที่ไม่มี levansucrase (Sac B)และ intracellular sucrase (Sac A) จะช่วยลดการเกิด by-product 2 ชนิด คือ levan และ sorbitol ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ประสิทธิภาพในการหมักลดลง

1.5 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การผลิตเอทานอลโดยเชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* นั้นได้มีการทดลองใช้วัตถุดิบในการผลิตเอทานอลหลายชนิด เช่น การใช้ fish soluble จากโรงงานแปรรูปปลาทูน่า brewer's yeast จากโรงงานผลิตเบียร์ Ami-Ami solution จากโรงงานทำผงชูรส และเปลือกหรือแกนสับปะรดจากโรงงานผลิตสับปะรดกระป๋อง เป็นต้น (Tripetchkul *et .al.,* 1993) ซึ่งของเหลือทิ้งเหล่านี้มีสารอาหารอยู่มากมายโดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจน โดยในขั้นตอนการผลิตเอทานอลมีการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการหมัก เช่น สำหรับวัตถุดิบที่เป็นกากน้ำตาลพบว่ามีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร

มีระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ที่สภาวะดังกล่าว *Z. mobilis* สามารถผลิตเอทานอลได้ 55.8 กรัมต่อลิตร (Cazetta *et al.,*2007) และ pH ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อ *Z. mobilis* ในการหมักจะอยู่ในช่วง 5.5-6.5 (Lawford *et al.,* 1988) นอกจากนั้นยังมีการทดลองเติมแหล่งไนโตรเจนต่างๆให้แก่เชื้อเพื่อช่วยในการเจริญเติบโต เช่น การเติมยูเรียในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร (Ruanglek *et al.,* 2006) หรือการเติมกลูตาเมท 0.2 กรัมต่อลิตร (Jutta and Reinhard, 1992) ซึ่งก็สามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่ในทางอุตสาหกรรมการหมักมักจะนิยมใช้จำพวก แอมโมเนีย เกลือแอมโมเนียม และไนเตรท เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (สมใจ ศิริโภค, 2550)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อแบคทีเรีย *Z. mobilis* ในการผลิตเอทานอลโดยมีน้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* โดยมีน้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 วัสดุ

2.1.1 น้ำอัดลมหมดอายุ

น้ำอัดลมหมดอายุที่ใช้ในการศึกษาเป็นน้ำอัดลมที่ไม่ผ่านเกณฑ์ควบคุมคุณภาพจากกระบวนการผลิตและเก็บคืนจากตัวแทนจำหน่ายของบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน)โดยเป็นน้ำอัดลมผสม ไม่แยกชนิดในสัดส่วนที่เท่ากัน ได้แก่ โค้ก สไปร์ท ส้ม แดงและ เขียว นำไปไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง sonicator เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* Z4 จากความอนุเคราะห์ของ รศ.ดร.ดวงพร คันธโชติ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำมาเลี้ยงใน Zymomonas surose media ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนแล้ว โดยบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ *Z. mobilis* (Zymomonas sucrose media) ประกอบด้วย

Yeast extract	10.0	กรัมต่อลิตร
Bacto peptone	10.0	กรัมต่อลิตร
Sucrose	20.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร

- สูตรอาหารสำหรับเตรียมเชื้อ *Z. mobilis* เริ่มต้น ประกอบด้วย

Sucrose	20.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	10.0	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	1.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร

- สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล ประกอบด้วย

Yeast extract	10.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
KH_2PO_4	1.0	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	(ปริมาณที่เหมาะสมจากการทดสอบ)	
น้ำอัดลมหมดอายุ	1.0	ลิตร

2.2 สารเคมีและอุปกรณ์

2.2.1 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำอัดลม

1) ถังเก็บตัวอย่างน้ำ

2) ปากกาเขียนฉลาก

3) ฉลากสำหรับปิดขวด

2.2.2 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

1) plate

2) Duran bottom

3) loop

4) pipette

5) Incubator

6) Autoclave

7) erlenmeyer flask

8) เครื่องชั่ง

9) เครื่องเขย่า

2.2.3 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับตรวจวิเคราะห์ pH

1) pH meter

2) น้ำกลั่น

3) beaker

4) 2N NaOH

5) 2N H_2SO_4

2.2.4 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์น้ำตาล

1) conc. sulfuric acid

2) 5% phenol

3) สารละลายซูโครสมาตรฐาน

4) Spectrophotometer

5) น้ำกลั่น

2.2.5 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับตรวจวิเคราะห์เอทานอล

1) Ebulliometer

2) เครื่อง GC (Gas Chromatography)

2.2.6 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับตรวจวิเคราะห์มวลชีวภาพ

1) กระดาษกรอง cellulose nitrate filter (Sartorius) ขนาด 0.45 µm

2) เครื่องกรอง

3) Hot-air oven

4) Dasicator

5) เครื่องชั่ง

2.3 วิธีดำเนินการวิจัย

2.3.1 ศึกษาสมบัติน้ำอัดลมหมดอายุ

นำน้ำอัดลมผสมหมดอายุในสัดส่วนที่เท่ากัน ซึ่งผ่านการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง sonicator แล้ว นำไปฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น ค่า pH ค่า COD และ BOD โดยทำการตรวจวัดทั้งก่อนและหลังการฆ่าเชื้อ

2.3.2 ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z4

2.3.2.1 ศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยแหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหาร คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 3 และ 4.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5)

ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

2.3.2.2 ศึกษา pH ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วย 2N NaOH โดยใช้อาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ได้จากข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วย ความร้อน ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

2.3.3 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

2.3.3.1 ศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ เป็น 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.2 ด้วย 2N NaOH ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ก่อนเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) จำนวน 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า 0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

2.3.3.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยทำการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้บ่มที่ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับที่ได้จากการข้อ 2.3.2.2 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร

5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

2.3.3.3 ศึกษาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม

ทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยทำการหมักเป็นระยะเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้สูตรอาหารที่มีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.2 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 ด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

2.3.4 ศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อมีการปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุ

2.3.4.1 ศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ100 กรัมต่อลิตร ด้วยการเจือจางน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.2 ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 ด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 เป็นระยะเวลาที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.3 นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

2.3.4.2 ศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยแหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหาร คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ1.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.4.1 ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับปริมาณที่ได้จากการ

ทดลองข้อ 2.3.2.2 ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 ด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 เป็นระยะเวลาที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.3 นำตัวอย่างวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และpH หลังหมัก

2.3.4.3 ศึกษา pH ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วย 2N NaOH โดยใช้อาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.4.1 ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 ด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 เป็นระยะเวลาที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.3 นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

2.3.4.4 ศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารที่เหมาะสม

ทำการศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และการใช้ Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm ในการฆ่าเชื้อในอาหาร ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ดูการปนเปื้อน โดยใช้อาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.4.1 ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.2 ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 ด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 เป็นระยะเวลาที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.3 แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

2.3.5 การตรวจวิเคราะห์และรายงานผล

- pH

ตรวจวัดโดยใช้เครื่อง pH meter รายงานผลจากค่าที่อ่านได้จากจอแสดงผลของเครื่องตรวจวัด

- ปริมาณเอทานอล

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างด้วยเครื่อง Ebulliometer (ภาคผนวก ก) และสำหรับชุดการทดลองที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดจะทำการยืนยันเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC โดยมีสภาวะการทดสอบ (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ดังนี้

Inlet temperature: 200°C

Oven temperature: 50°C, hold 6 minutes

Detecter temperature: 200°C

Column: HP-Innowax, length 30 m., 250 μm I.D, 0.25 μm film thickness

- ปริมาณน้ำตาล

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างด้วยวิธี phenol sulfuric acid total sugar (ภาคผนวก ก) และทำการยืนยันเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง HPLC โดยมีสภาวะการทดสอบ (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) ดังนี้

Column: Zorbax Carbohydrate 4.6*150 mm, 5 μm

Flow rate: 0.5 mL/min, Temperature 35°C

Mobile phase: Acetonitrile : Water (75:25)

Detector: Refractive Index Detector

- มวลชีวภาพ

กรองตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง cellulose nitrate filter (Sartorius) ขนาด 0.45 ไมครอน เพื่อหาค่ามวลชีวภาพโดยการชั่งน้ำหนักแห้ง (ภาคผนวก ก)

ทุกพารามิเตอร์รายงานผลด้วยค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการตรวจวัด 3 ซ้ำ

- การควบคุมคุณภาพการทดสอบ

ในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบปริมาณน้ำตาลและเอทานอลทำซ้ำ 3 ครั้ง สำหรับตัวอย่างนั้น ค่าเฉลี่ยสองค่าของผลที่ได้จะต้องมีค่า RPD ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการรายงาน

ผลการทดลองทางสถิติ มีการหาค่าเฉลี่ย ($\overline{X}$) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของผลการทดลองแต่ละอย่าง และใช้ One-way Anova ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดการทดลอง

บทที่ 3

ผลการทดลองและอภิปราย

3.1 สมบัติน้ำอัดลมหมดอายุ

น้ำอัดลมหมดอายุ ที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นน้ำอัดลมหมดอายุที่ไม่ได้มาตรฐานจากการผลิต โดยมีปริมาณน้ำตาล หรือปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์น้อยกว่าที่ทางบริษัทกำหนด จึงมีปริมาณน้ำตาลไม่แน่นอนขึ้นกับครั้งที่ผลิต น้ำอัดลมหมดอายุที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นน้ำอัดลมผสมหมดอายุในสัดส่วนที่เท่ากัน ประกอบด้วย น้ำแดง โค้ก ส้ม เขียว และสไปร์ท ซึ่งก่อนที่จะนำมาใช้ในการทดลองต้องมีการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหลืออยู่ในน้ำอัดลมหมดอายุออกด้วยเครื่อง sonicator เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลในการขัดขวางการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำน้ำอัดลมหมดอายุมาตรวจวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้น ซึ่งผลการวิเคราะห์แสดงดัง ตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สมบัติของตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุ

สมบัติที่ตรวจวัด	ก่อนฆ่าเชื้อ	หลังฆ่าเชื้อ	
		ไม่เติมสารอาหาร	เติมสารอาหาร*
ปริมาณน้ำตาลซูโครส (g/L)	145 ± 0.064	122 ± 0.108	120 ± 0.070
pH	3.02 ± 0.035	3.54 ± 0.021	4.72 ± 0.046
COD (mg/L)	152,470 ± 122	-	-
BOD (mg/L)	83,541 ± 88	-	-
Nitrogen (% w/v)	< 0.01	-	-

หมายเหตุ : (-) คือ ไม่มีการวิเคราะห์

* Yeast extract 10 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g/L

จากการศึกษาน้ำอัดลมหมดอายุ พบว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบสูงและมีสภาพเป็นกรด ส่งผลให้มีค่า COD และ BOD ที่สูงมาก เมื่อมีการฆ่าเชื้อในน้ำอัดลมหมดอายุด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที พบว่าปริมาณน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุลดลงเหลือเท่ากับ 122 กรัมต่อลิตร และเมื่อมีการทดลองเพิ่มสารอาหาร (Yeast extract 10 g/L, $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 g/L) ลงไปในน้ำอัดลมหมดอายุแล้วทำการฆ่าเชื้อพบว่า สูตรอาหารมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ซึ่งน้อยกว่าปริมาณน้ำตาลที่ตรวจวิเคราะห์ได้ในน้ำอัดลมหมดอายุก่อนการฆ่าเชื้อ ที่มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 145 กรัมต่อลิตร อาจเนื่องจากการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่สูงจะไปทำลายพันธะ ของน้ำตาล ทำให้น้ำตาลในน้ำอัดลมบางส่วนเสียสภาพไป ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลลดลงจากเดิม สำหรับค่า pH ของน้ำอัดลม หลังการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนและการเติมสารอาหารลงไป ส่งผลให้ pH ของน้ำอัดลมเพิ่มขึ้น เนื่องจากการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และการเติมสารอาหารที่มีความเป็นด่างทำให้ค่า pH น้ำอัดลมเพิ่มขึ้นได้ อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุ พบว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้ที่จะนำมาศึกษาใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* แต่ทั้งนี้น้ำอัดลมหมดอายุมีเพียงแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักและมีแหล่งไนโตรเจน น้อยกว่า 0.01 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรีย *Z. mobilis* ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) และ pH เพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ ผลการศึกษาเป็นดังต่อไปนี้

3.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

การศึกษาสูตรอาหารเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล เพราะสารอาหารต่างๆมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย ทั้งนี้การเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมก็ขึ้นอยู่กับสายพันธ์ของแบคทีเรียด้วย จากการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ในเบื้องต้น พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลในอาหารที่ใช้น้ำอัดลมหมดอายุที่ไม่มีการเจือจางปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นได้ ดังนั้นจึงทำการทดลองหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนและ ค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับอาหารที่ใช้ในการผลิตเอทานอลของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ต่อไป

3.2.1 ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

เนื่องจากน้ำอัดลมหมดอายุนั้นมีส่วนประกอบเฉพาะแหล่งคาร์บอน คือน้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งอาหารเพียงอย่างเดียว จึงจำเป็นต้องเติมธาตุอาหารเพิ่มเติม โดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจน เพราะไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 12 - 15 เปอร์เซ็นต์โดยมวลน้ำหนักแห้ง (สมใจ ศิริโภค, 2550 อ้างถึงใน Stanbury and Whitaker, 1984) ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น โดยทั่วไปแบคทีเรียสามารถใช้ ammonium ion เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ นิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำได้สูง มีราคาถูก และมีความบริสุทธิ์สูง ทั้งยังไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์อีกด้วย

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยแหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหาร คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 3 และ 4.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วย ความร้อน ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

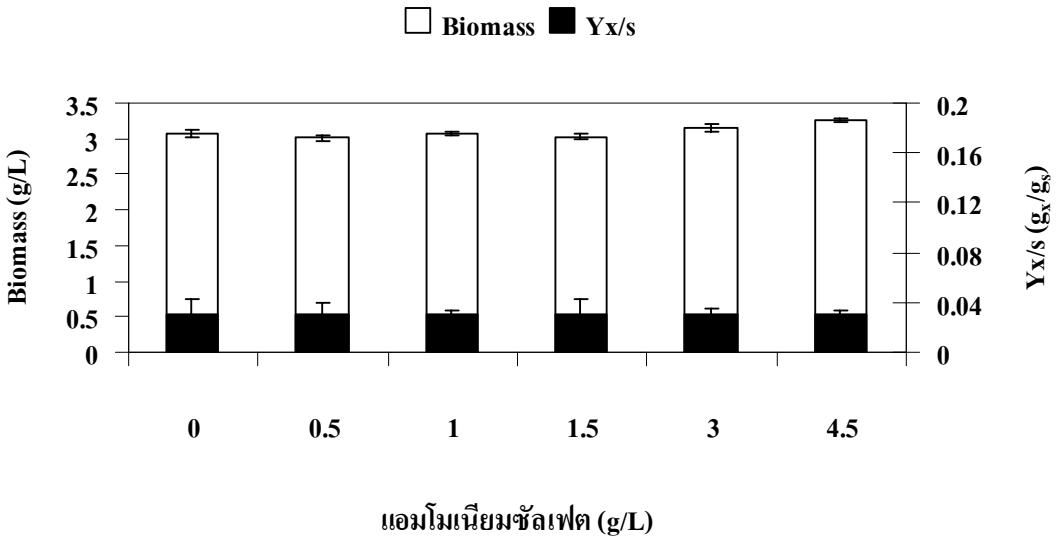
ผลจากการทดลองพบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด (ดังตารางที่ 3.2) โดยเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.48 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร คิดเป็น 0.38 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 3.79 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 52.06 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 3 และ 4.5 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 2.61, 2.61, 2.69, 2.61 และ 2.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่ามวลชีวภาพ พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่ามวลชีวภาพหลังการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่าทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทุกสูตรอาหารมีค่ามวลชีวภาพอยู่ในช่วง 3.01-3.25 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณค่ามวลชีวภาพที่ได้ต่อสารตั้งต้น ($Y_{x/s}$) พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่าเท่ากับ

0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล (ภาพที่ 3.1) สำหรับ pH อาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโต จึงมีการผลิตกรดแลกติกขึ้น ซึ่งหากเชื้อสร้างกรดสูงแสดงว่าเชื้อนำน้ำตาลไปใช้ในการสร้างกรดได้มาก มีผลทำให้สร้างเอทานอลได้น้อยลง (มารศรี จันสี, 2548)

ตารางที่ 3.2 ผลการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสมสำหรับเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

$(NH_4)_2SO_4$	เอทานอล				น้ำตาลที่ใช้	มวลชีวภาพ		pH หลังหมัก
(g/L)	% v/v	%w/v	g/L	Yp/s	(g/L)	(g/L)	Yx/s	
0	0.33	0.26	2.61^{ab}	0.04^{a}	69.76	3.07^{a}	0.03	4.98
0.5	0.33	0.26	2.61^{ab}	0.04^{a}	62.14	3.01^{a}	0.03	5.01
1	0.48	0.38	3.79^{c}	0.07^{b}	52.06	3.08^{a}	0.03	5.06
1.5	0.34	0.27	2.69^{b}	0.04^{a}	63.34	3.03^{a}	0.03	5.00
3	0.33	0.26	2.61^{ab}	0.04^{a}	64.53	3.15^{a}	0.03	4.99
4.5	0.31	0.25	2.45^{a}	0.03^{a}	72.86	3.25^{a}	0.03	4.90

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

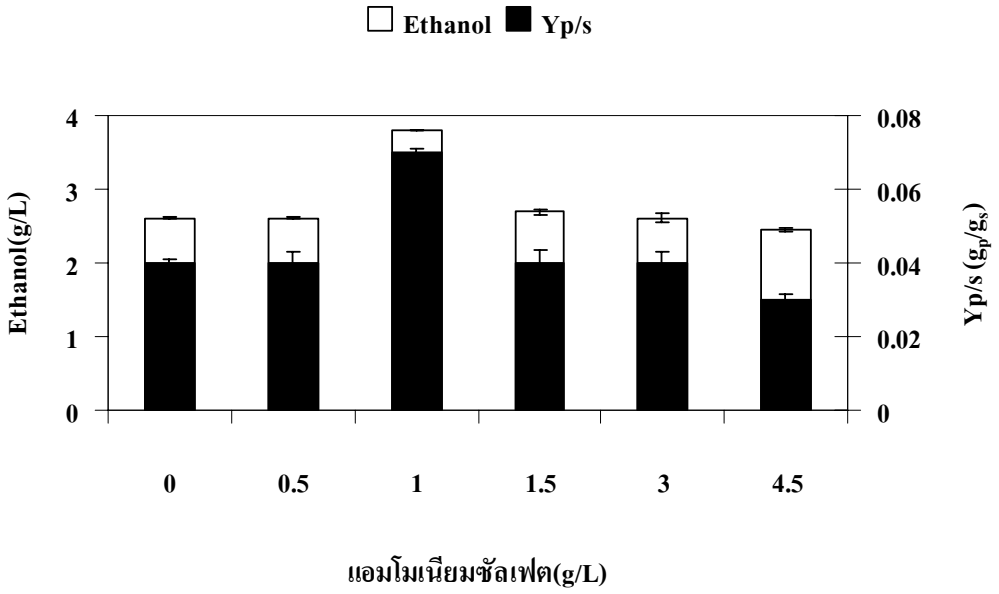


ภาพที่ 3.1 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่าผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) พบว่าการหมักด้วยสูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น1 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.07 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ส่วนที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 3 และ 4.5 กรัมต่อลิตร มีค่า 0.04, 0.04, 0.04, 0.04 และ0.03 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ (ภาพที่ 3.2) โดยชุดการทดลองที่ใช้สูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ให้ค่า Yp/s สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.3) ซึ่งจากการศึกษาของ ชูศรี สุขุมาลไพบูลย์ (2530) พบว่าการเติม $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นอาหารเสริมจะทำให้ได้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าการที่ไม่เติม $(NH_4)_2SO_4$ เป็นอาหารเสริม

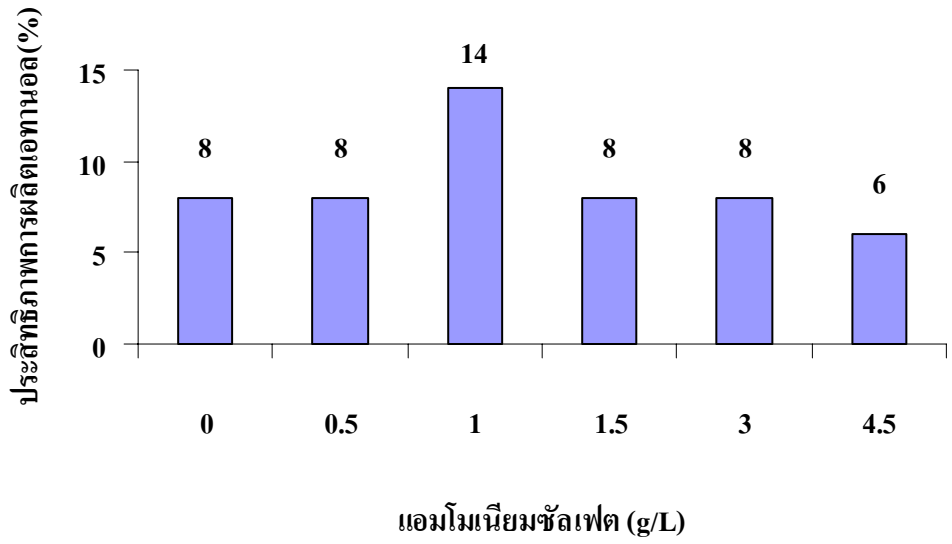
มาโนช โพธิ์สูง (2546) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* TISTR 548 โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4Cl ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ NH_4Cl จะให้ค่า Yp/s สูงกว่า การใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เล็กน้อย (0.419 และ 0.412 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ) แม้ว่าการเลือกใช้ NH_4Cl จะให้ผลได้ของ เอทานอลสูงกว่าการเลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ แต่เมื่อพิจารณาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการนำไปใช้ พบว่าโดยทั่วไป

นิยมใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำได้สูง มีราคาถูก และมีความบริสุทธิ์สูง (สมใจ ศิริโภค, 2550)



ภาพที่ 3.2 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน$(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักด้วยค่าผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ทุกชุดการทดลองกับค่าทางทฤษฎี (0.50) (ภาพที่ 3.3) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 14 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร สำหรับเตรียมสูตรอาหารเพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z4 ในขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.3 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักด้วยปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.2 pH ที่เหมาะสม

การปรับ pH ของอาหารมีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม การเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ (Walker, 1998) pH ของอาหารมีผลต่ออัตราการหมัก อีกทั้งมีบทบาทในการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นอีกด้วย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร standard medium สำหรับการหมักเอทานอล แบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.9-6.5 (Beckers *et al*., 2000)

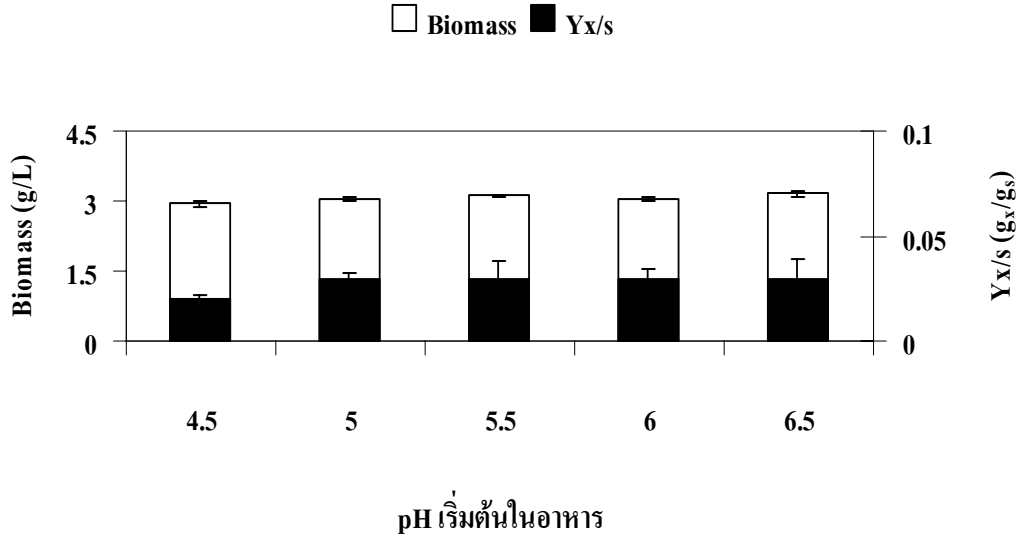
งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วย 2N NaOH ใช้อาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วย ความร้อน ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

ผลจากการทดลองพบว่า ที่ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 และ 6 แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากัน (ดังตารางที่ 3.3) โดยเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.65 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.51 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 5.14 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 60.25 และ 61.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0 และ 6.5 (1.58, 3.16 และ 4.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยค่าเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 แต่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่น อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลของค่า pH เริ่มต้นต่อมวลชีวภาพ พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่ามวลชีวภาพหลังการหมัก 48 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 2.95-3.16 กรัมต่อลิตร มีค่า Yx/s อยู่ในช่วง 0.02-0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล (ภาพที่ 3.4) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ pH ของอาหารหลังการหมักนั้นพบว่าค่า pH ของอาหารลดลงซึ่งอาจเกิดจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และกรดที่เกิดขึ้นระหว่างหมัก (Swings and De Ley, 1977)

ตารางที่ 3.3 ผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

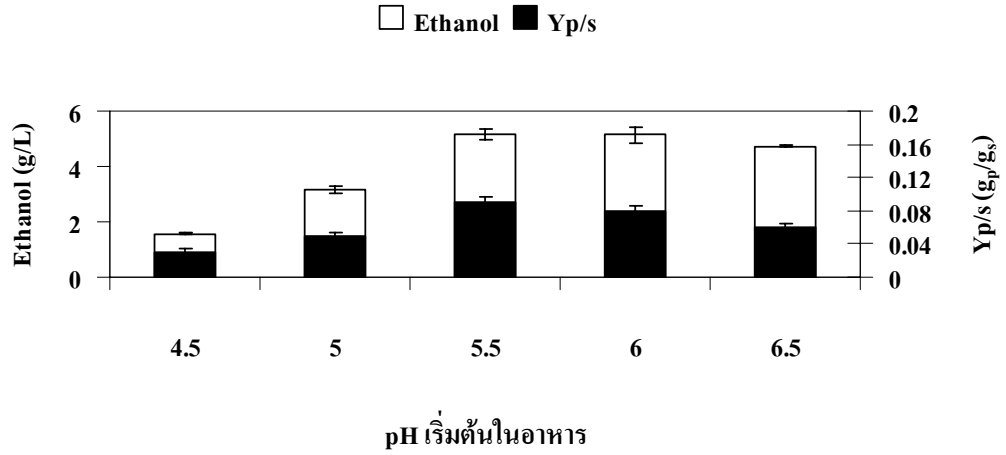
pH เริ่มต้น	เอทานอล				น้ำตาลที่ใช้	มวลชีวภาพ		pH หลังหมัก
	% v/v	%w/v	g/L	Yp/s	(g/L)	(g/L)	Yx/s	
4.5	0.2	0.16	1.58^{a}	0.03^{a}	63.10	2.95^{a}	0.02	4.16
5	0.4	0.32	3.16^{b}	0.05^{a}	60.42	3.04^{a}	0.03	4.79
5.5	0.65	0.51	5.14^{d}	0.09^{c}	60.25	3.11^{a}	0.03	4.85
6	0.65	0.51	5.14^{d}	0.08^{bc}	61.05	3.06^{a}	0.03	5.08
6.5	0.6	0.47	4.74^{c}	0.06^{ab}	75.21	3.16^{a}	0.03	5.21

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



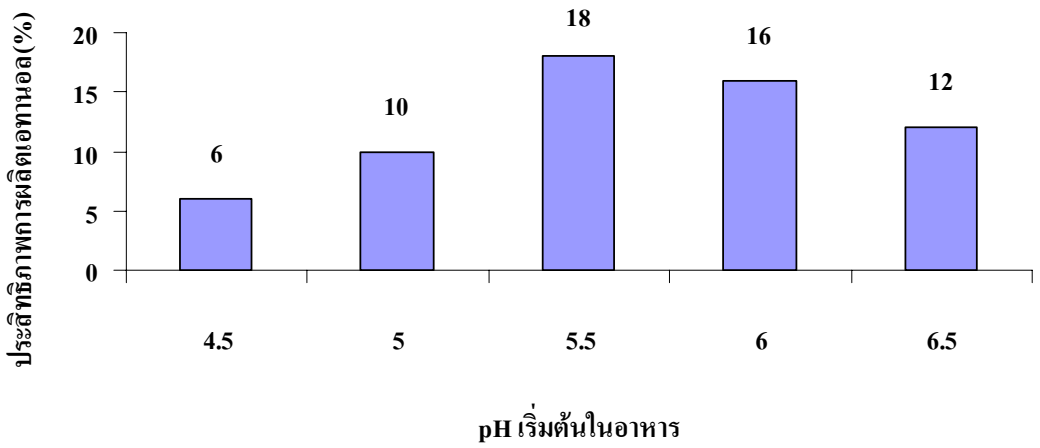
ภาพที่ 3.4 ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.09 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ส่วนที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 6.0 และ 6.5 มีค่า 0.03, 0.05, 0.08 และ 0.06 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ โดยค่า Yp/s ของชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 (ภาพที่ 3.5) แต่มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.4) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 โดย มาโนช โพธิ์สูง (2546) ที่พบว่าการเลือกใช้ค่า pH เริ่มต้นของอาหารในช่วง 5.5-6.5 จะได้ผลเอทานอลสูงที่สุด



ภาพที่ 3.5 ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในรูปร้อยละของผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองต่อค่าทางทฤษฎี (0.50) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 18 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.6) โดย Swings and De Ley (1977) ได้รายงานว่าค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Z. mobilis* มีค่าอยู่ในช่วง 5-7 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกการปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 3.6 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ข้างต้นนั้น สรุปได้ว่า สูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยมีการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ก่อนทำการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 5.14 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.09 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล โดยใช้น้ำตาลไป 60.25 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.85 มีมวลชีวภาพเท่ากับ 3.11 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณหาค่า Yx/s มีค่าเท่ากับ 0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล

สำหรับการผลิตเอทานอลนอกจากการเลือกใช้สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อกระบวนการผลิตเอทานอลแล้ว ยังพบว่าสภาวะในการผลิตเอทานอลก็มีความสำคัญด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยศึกษาอัตราการเขย่า อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก และระยะเวลาในการหมัก

3.3 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

3.3.1 อัตราการเขย่าที่เหมาะสม

เนื่องจากการเขย่าช่วยให้แบคทีเรียได้สัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึง ทำให้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพื่อการผลิตเอทานอลได้มากขึ้น

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เป็น 100 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ก่อนเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) จำนวน 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

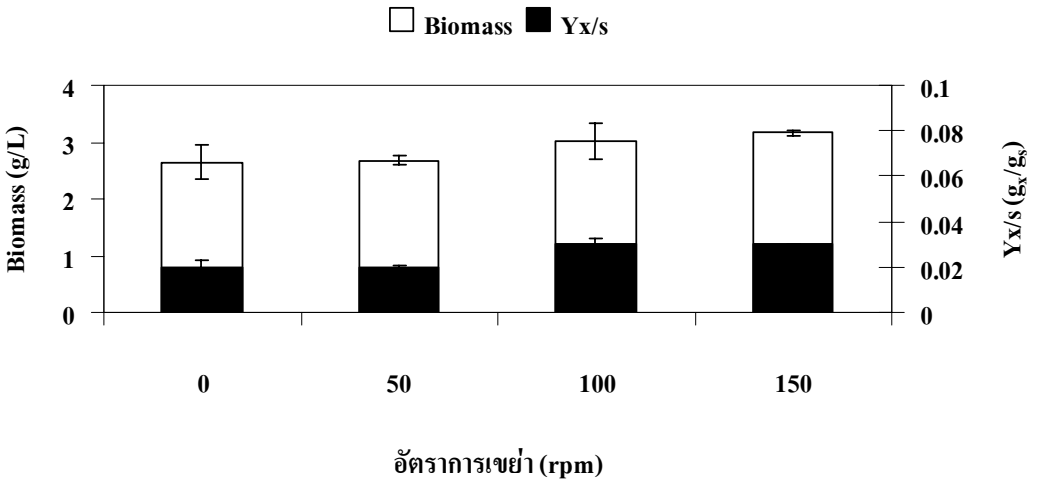
ผลจากการทดลองพบว่า ที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด และเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าจากที่ 0 รอบต่อนาที เป็น 50 รอบต่อนาที และ 100 รอบต่อนาที ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าเป็น 150 รอบต่อนาที พบว่าแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 กลับผลิตเอทานอลได้ลดลง (ตารางที่ 3.4) โดยที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 0.83 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.66 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 6.56 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่ใช้อัตราการเขย่าเท่ากับ 50 รอบต่อนาที (0.80 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.63 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 6.32 กรัมต่อลิตร) และที่ 0 รอบต่อนาที (0.75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.59 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 5.93 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าทั้ง 3 ชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สูงกว่าค่าเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่ใช้อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับมวลชีวภาพพบว่าที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที มีมวลชีวภาพเท่ากับ 2.65, 2.67, 3.02 และ 3.16 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณค่า Yx/s พบว่ามีค่า 0.02, 0.02, 0.03 และ 0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ (ภาพที่ 3.7) ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Siva และคณะ (1995) ที่ได้ค่า Yx/s เท่ากับ 0.04 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล เมื่อใช้อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที ซึ่งค่ามวลชีวภาพจากทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.5) เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าการเพิ่มอัตราการเขย่าจะทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้เมื่อเพิ่ม

อัตราการเขย่าเป็น 150 รอบต่อนาที ค่าเอทานอลที่ได้กลับลดลง เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* เป็นพวก facultative anaerobe เมื่อมีการเขย่าในอัตราเร็วสูง ส่งผลให้มีก๊าซออกซิเจนละลายมากทำให้เชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* ผลิตเอทานอลได้น้อยลง และการใช้น้ำตาลของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* โดยผ่าน Entner-Doudoroff parthway ได้ผลผลิตเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล ทำให้ pH อาหารหลังการหมักมีค่าลดลง อย่างไรก็ตามการศึกษาของ วนิดา พรมขาวทอง (2547) ในการหาอัตราเร็วที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* ใช้อัตราเร็วที่ 0, 100, 120 และ 200 รอบต่อนาที พบว่าเมื่อมีการเขย่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีการเขย่า

ตารางที่ 3.4 ผลการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

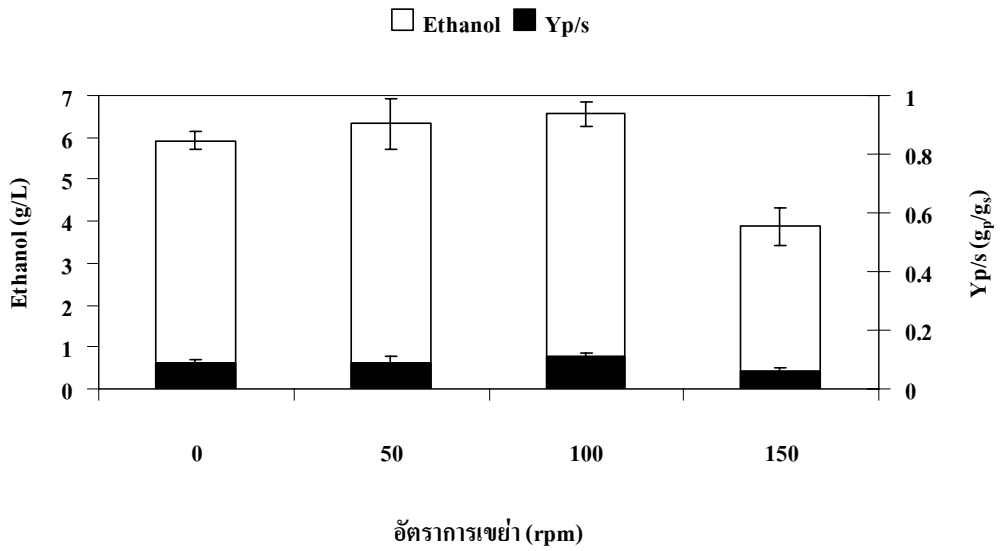
อัตราการเขย่า	เอทานอล				น้ำตาลที่ใช้	มวลชีวภาพ		pH หลังหมัก
(rpm)	% v/v	%w/v	g/L	Yp/s	(g/L)	(g/L)	Yx/s	
0	0.75	0.59	5.93[a]	0.09[a]	69.29	2.65[a]	0.02	4.88
50	0.80	0.63	6.32[a]	0.09[a]	70.48	2.67[a]	0.02	4.98
100	0.83	0.66	6.56[a]	0.11[a]	61.10	3.02[a]	0.03	5.20
150	0.49	0.39	3.87[b]	0.06[a]	70.00	3.16[a]	0.03	4.83

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



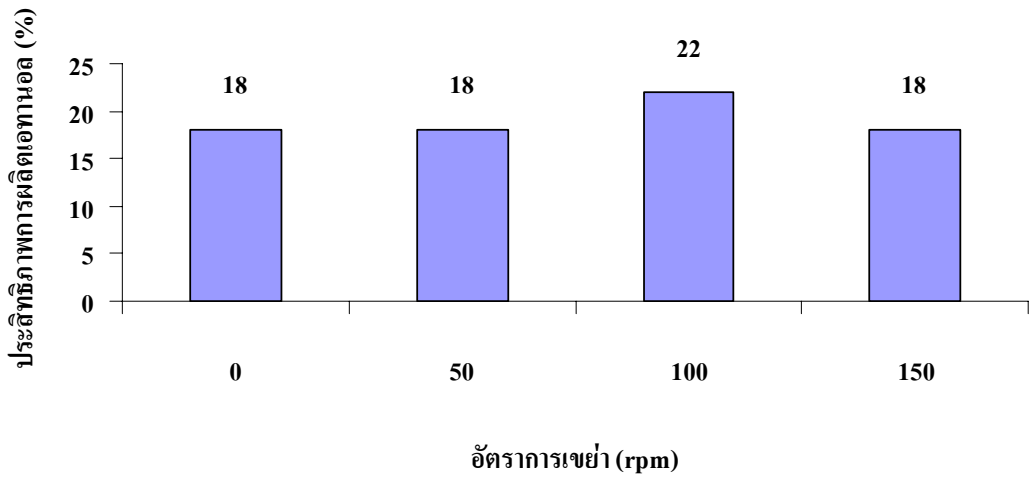
ภาพที่ 3.7 ผลของอัตราการเขย่า ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.11 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ส่วนที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 0 และ 50 รอบต่อนาที มีค่าเท่ากันคือ 0.09 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 0 และ 50 รอบต่อนาที มีค่า 0.06 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล (ภาพที่ 3.8) แต่ค่า Yp/s ทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.5) ซึ่งจากผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ มาโนช โพธิ์สูง (2546) ที่ทำการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 โดยใช้น้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 พบว่าการใช้อัตราการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เป็นอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 โดยให้ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.463 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล



ภาพที่ 3.8 ผลของอัตราการเขย่า ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองเปรียบเทียบกับค่าทางทฤษฎี พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 22 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.9) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกอัตราการเขย่าเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เป็นอัตราการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z4 และใช้ในการศึกษา ขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.9 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มีอัตราการเขย่าแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

โดยทั่วไป *Zymomonas* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-38 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนระหว่างการหมักจะมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการที่จุลินทรีย์ใช้น้ำตาลในการหมักเอทานอล ความร้อนนี้มีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งด้านสรีระวิทยาของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำหมักและอัตราการหมักเอทานอล นอกจากนี้ยังมีการระเหยของเอทานอลและการเกิดฟองมากในน้ำหมัก

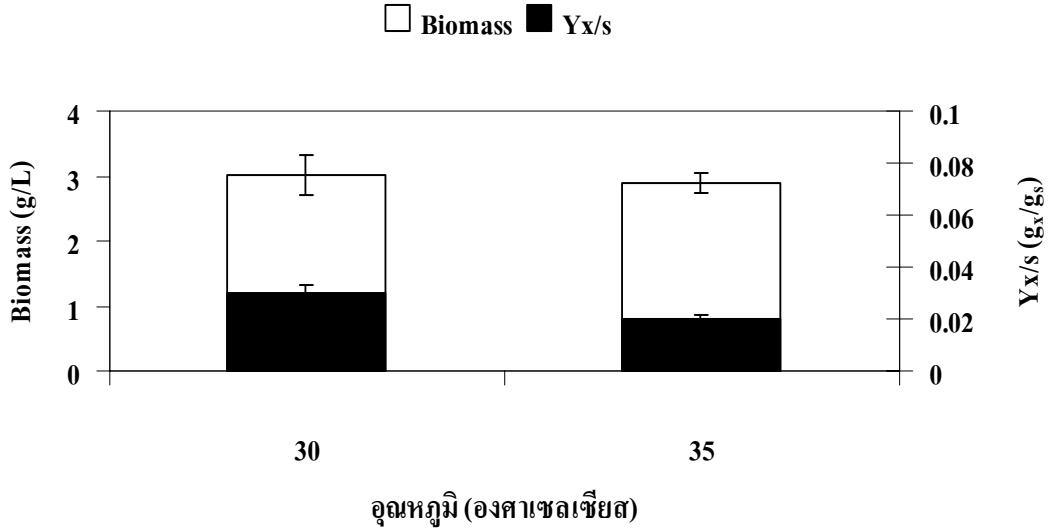
งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยทำการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้บ่มที่ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนคือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มด้วยอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

ผลจากการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด (ดังตารางที่ 3.5) โดยเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.83 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.66 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 6.56 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 61.10 กรัมต่อลิตร ส่วนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 0.54 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.43 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 4.27 กรัมต่อลิตร โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าชุดการทดลองที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับมวลชีวภาพทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีค่ามวลชีวภาพหลังการหมัก 48 ชั่วโมง ใกล้เคียงกันคือ ชุดการทดลองที่บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 3.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yx/s เท่ากับ 0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ส่วนที่ 35 องศาเซลเซียส มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 2.89 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yx/s ได้เท่ากับ 0.02 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล (ภาพที่ 3.10) โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.5) สำหรับ pH ของอาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง โดยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 มีการผลิตกรดมากกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ทำให้ค่า pH ของอาหารหลังการหมักลดลงมากทำให้มีการผลิตเอทานอลได้ลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ มาโนช โพธิ์สูง (2546) รายงานว่าค่า pH หลังหมักจะอยู่ในช่วง 4.8-5.2 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส pH ของอาหารหลังหมักลดลงถึง 4 (pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.1) ทั้งนี้การใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไป ทำให้การเจริญของจุลินทรีย์และอัตราการผลิตเอทานอลต่ำกว่าที่อุณหภูมิการหมักปกติได้ (Amerine *et al.,* 1980)

ตารางที่ 3.5 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

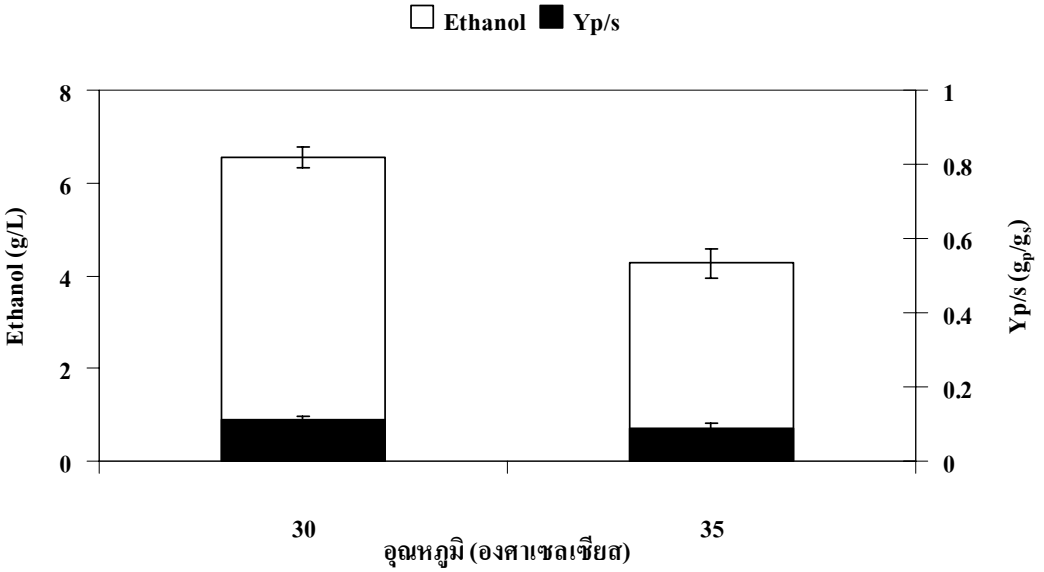
อุณหภูมิ	เอทานอล				น้ำตาลที่ใช้ไป	มวลชีวภาพ		pH หลังหมัก
(°C)	% v/v	%w/v	g/L	Yp/s	(g/L)	g/L	Yx/s	
30	0.83	0.66	6.56[a]	0.11[a]	61.10	3.02[a]	0.03	5.20
35	0.54	0.43	4.27[b]	0.09[a]	42.86	2.89[a]	0.02	4.63

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



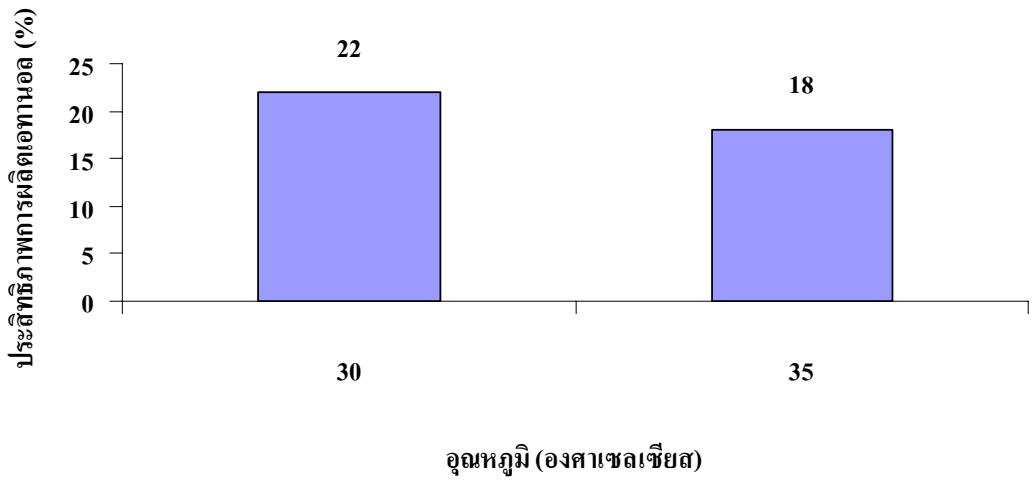
ภาพที่ 3.10 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าชุดการทดลองที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.11 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.09 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล (ภาพที่ 3.11) แต่ทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3.5) โดยสอดคล้องกับการรายงานของ Skotnicki และคณะ (1981) ว่าการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* จะลดลงเมื่ออุณหภูมิของการหมักมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเกินกว่า 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 3.11 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณเอทานอลและผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองกับค่าทางทฤษฎี พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลของชุดการทดลองที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 22 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.12) โดยสอดคล้องกับรายงานของ Ohta และคณะ (1981) ซึ่งได้รายงานผลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตเอทานอลของ *Z. mobilis* ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรียชนิดนี้ คือ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิสำหรับการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z4 และใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.12 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.3.3 ระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม

การผลิตเอทานอลที่ดีจะต้องใช้ระยะเวลาในการหมักที่สั้นและให้ผลผลิตสูง ซึ่งระยะเวลาในการหมักก็จะขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรต ชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะแวดล้อมต่างๆด้วย งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยทำการหมักเป็นระยะเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้สูตรอาหารที่มีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

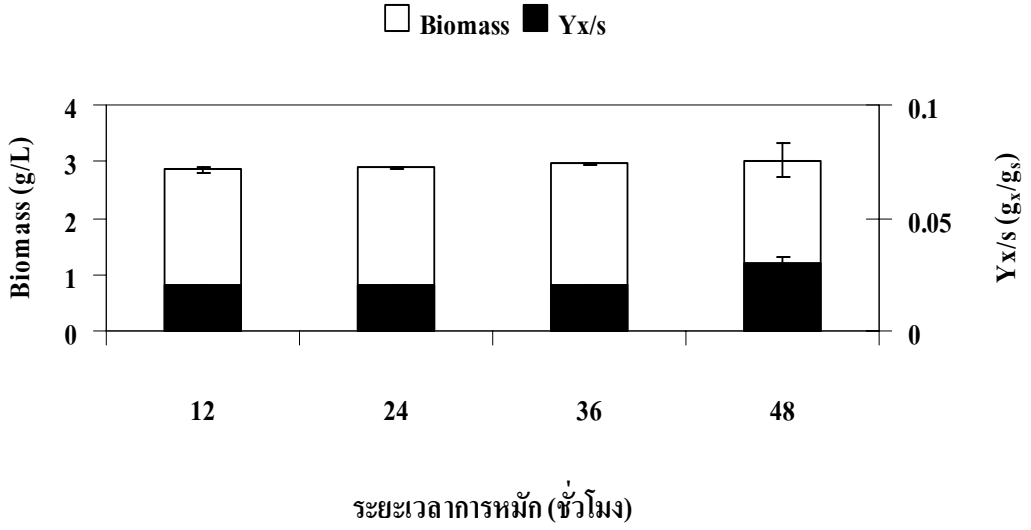
ผลจากการทดลองพบว่า ที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด (ดังตารางที่ 3.6) โดยเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.85 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.67 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 6.72 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 64.60 กรัมต่อลิตร สำหรับที่ระยะเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเอทานอล

เท่ากับ 4.19, 4.42 และ 6.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าเอทานอลที่ผลิตได้ที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง มีค่าไม่แตกต่างกับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง แต่มีค่าแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับมวลชีวภาพที่ผลิตได้จากการหมัก พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมักแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 มีค่ามวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยที่ระยะเวลาการหมักเท่ากับ 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 2.85, 2.89, 2.96 และ 3.02 กรัมต่อลิตร และคิดเป็นค่า Yx/s เท่ากับ 0.02, 0.02, 0.02 และ 0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ (ภาพที่ 3.13) โดยทุกชุดการทดลองมีค่ามวลชีวภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ pH ของอาหารหลังการหมักนั้น พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นค่า pH ลดลงเล็กน้อยตามลำดับ

ตารางที่ 3.6 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

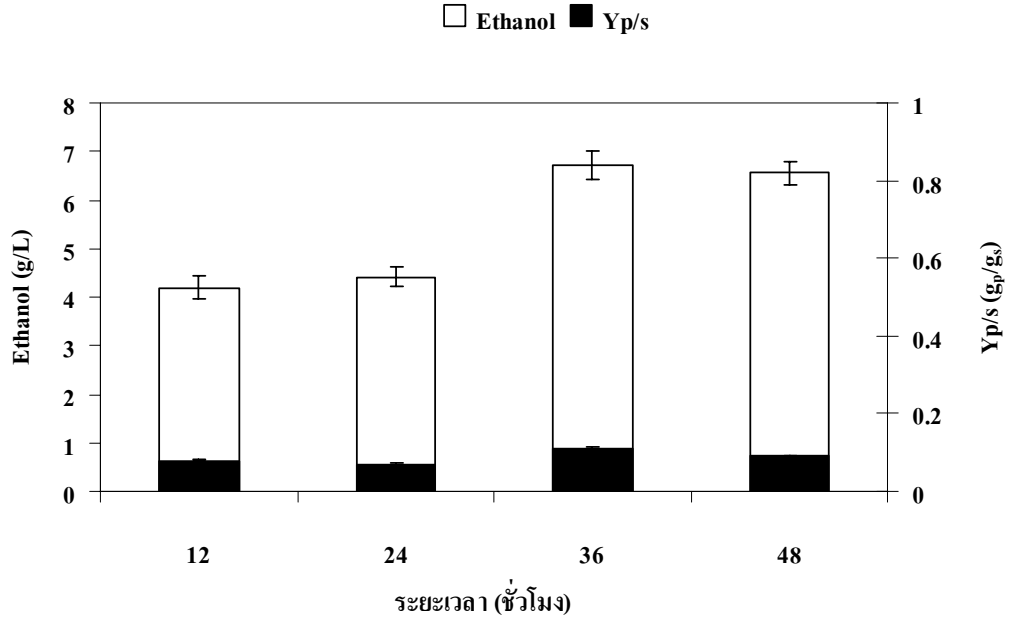
ระยะเวลา	เอทานอล				น้ำตาลที่ใช้	มวลชีวภาพ		pH หลังหมัก
(ชั่วโมง)	% v/v	%w/v	g/L	Yp/s	(g/L)	(g/L)	Yx/s	
12	0.53	0.42	4.19[a]	0.08[a]	54.05	2.85[a]	0.02	5.41
24	0.56	0.44	4.42[a]	0.07[a]	61.43	2.89[a]	0.02	5.35
36	0.85	0.67	6.72[b]	0.11[a]	64.60	2.96[a]	0.02	5.15
48	0.83	0.66	6.56[b]	0.09[a]	70.48	3.02[a]	0.03	5.20

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



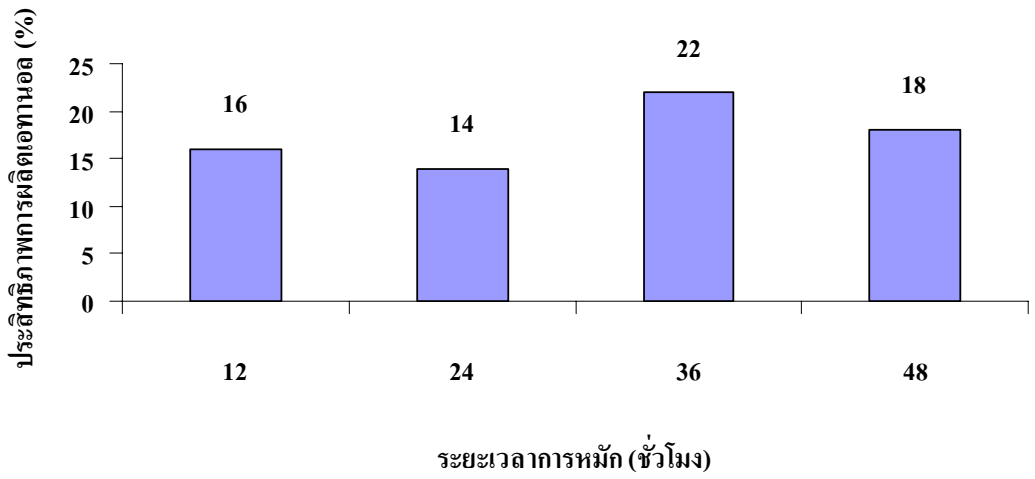
ภาพที่ 3.13 ผลของระยะเวลาการหมักน้ำอัดลมหมดอายุต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.11 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ส่วนที่ระยะเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่า 0.08, 0.07 และ 0.09 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ (ภาพที่ 3.14) โดยทุกชุดการทดลองมีค่า Yp/s ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.14 ผลของระยะเวลาการหมักน้ำอัดลมหมดอายุต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองกับค่าทางทฤษฎี (0.50) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการหมักเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 22 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.15) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกระยะเวลา 36 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาสำหรับการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 และใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.15 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มีระยะเวลาหมักแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุที่ไม่เจือจาง (ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร) โดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 คือการบ่มในสภาวะเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง โดยที่สภาวะดังกล่าวแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 6.72 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.11 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล โดยแบคทีเรียใช้น้ำตาลไป 64.60 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 5.15 มีมวลชีวภาพเท่ากับ 2.96 กรัมต่อลิตร และ เมื่อคำนวณหาค่าผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) มีค่าเท่ากับ 0.02 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล

เมื่อพิจารณาผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลแล้ว พบว่าค่าเอทานอลที่ได้มีค่าน้อยกว่าค่าทฤษฎี (0.50) มาก ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มสูง แม้ว่าในน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 จะสามารถเจริญได้ แต่อาจมีผลต่อการผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ เพื่อให้แน่ใจถึงความเป็นไปได้ของการนำน้ำอัดลมหมดอายุมาเป็นแหล่งสารอาหารและพลังงานสำหรับการผลิตเอทานอล ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองปรับปริมาณ

น้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุให้ลดลง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุในสภาวะที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่ำกว่า

3.4 ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อมีการปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุ

3.4.1 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสม

น้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และการผลิตเอทานอล การใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงๆ ในการหมักเอทานอลมีผลช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่การใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงๆ ก็มีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอลด้วยเช่นกัน ซึ่งเกิดจากแรงดันออสโมซิสทำให้เซลล์เกิดพลาสโมไลซิสเมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงและมีผลยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส ส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลลดลง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ100 กรัมต่อลิตร ด้วยการเจือจางน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

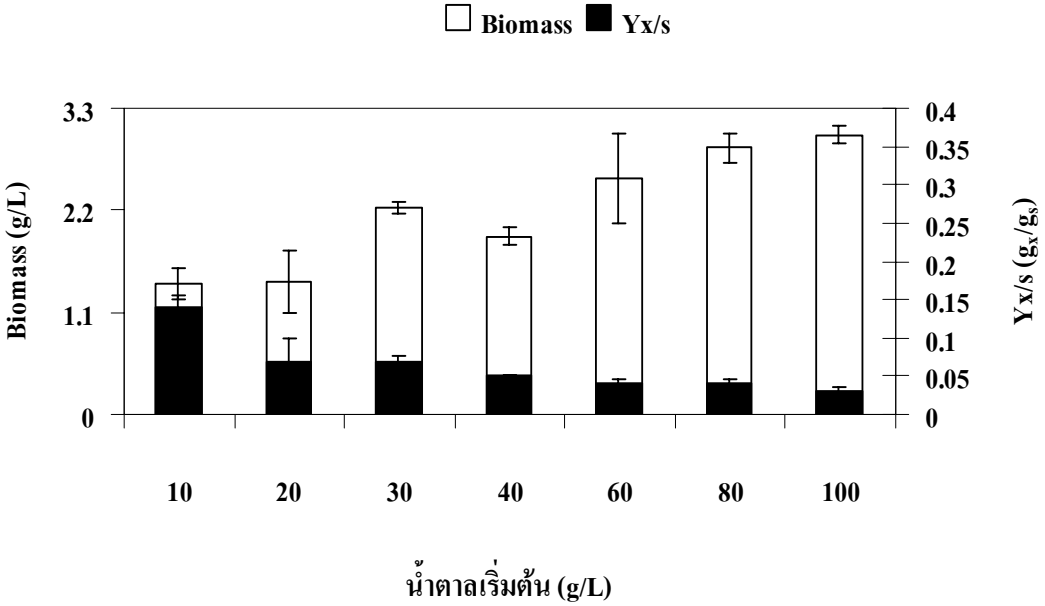
ผลการทดลองพบว่าที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด (ตารางที่ 3.7) โดยค่าเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 1.60 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 1.26 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 12.64 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 33.86 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 10, 20, 30, 40, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร (3.24, 5.93, 7.51, 9.48, 12.25 และ 6.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยค่าเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร แต่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อมีการเพิ่มปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นมากขึ้น ทำให้การผลิตเอทานอลสูงขึ้นได้ในระดับหนึ่ง สำหรับผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น

ต่อมวลชีวภาพ พบว่าที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีมวลชีวภาพเท่ากับ 2.87 กรัมต่อลิตร ส่วนชุดการทดลองอื่น มีมวลชีวภาพเท่ากับ 1.41, 1.43, 2.23, 1.92, 2.54 และ 3.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า Yx/s พบว่ามีค่า 0.14, 0.07, 0.07, 0.05, 0.05,0.04 และ 0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ (ภาพที่ 3.16) โดยที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ให้ค่ามวลชีวภาพไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 และ 100 กรัมต่อลิตร แต่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้พบว่าที่ปริมาณของน้ำตาลเริ่มต้นต่ำเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าการผลิตเอทานอล สำหรับ pH อาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นนั้น ชูศรี สุขุมาลไพบูลย์ (2530) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ในการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* IFO 13756 และ CM 141 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเพิ่มขึ้น ส่งผลให้อัตราการหมักเอทานอลลดลง

ตารางที่ 3.7 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ *Z. mobilis* Z4

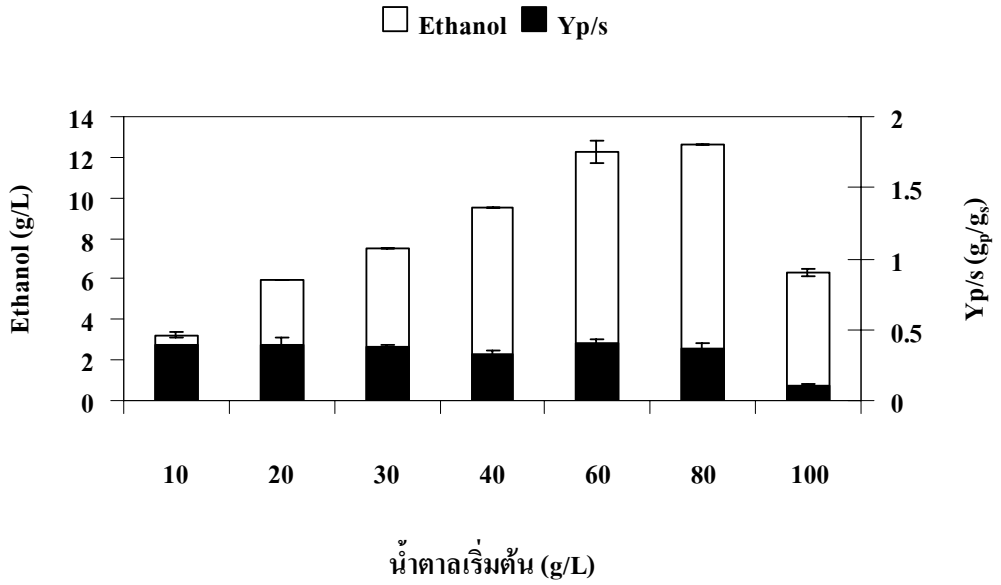
น้ำตาลเริ่มต้น (g/L)	เอทานอล				น้ำตาลที่ใช้ (g/L)	มวลชีวภาพ		pH หลังหมัก
	% v/v	%w/v	g/L	Yp/s		(g/L)	Yx/s	
10	0.41	0.32	3.24^{a}	0.39^{a}	8.25	1.41^{a}	0.14	4.83
20	0.75	0.59	5.93^{b}	0.39^{a}	15.10	1.43^{a}	0.07	4.94
30	0.95	0.75	7.51^{c}	0.38^{a}	19.69	2.23^{bd}	0.07	5.01
40	1.20	0.95	9.48^{d}	0.33^{a}	28.36	1.92^{ab}	0.05	4.82
60	1.55	1.22	12.25^{e}	0.40^{a}	30.52	2.54^{cd}	0.05	4.95
80	1.60	1.26	12.64^{e}	0.37^{a}	33.86	2.87^{c}	0.04	5.48
100	0.80	0.63	6.32^{b}	0.11^{b}	58.21	3.01^{c}	0.03	4.89

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



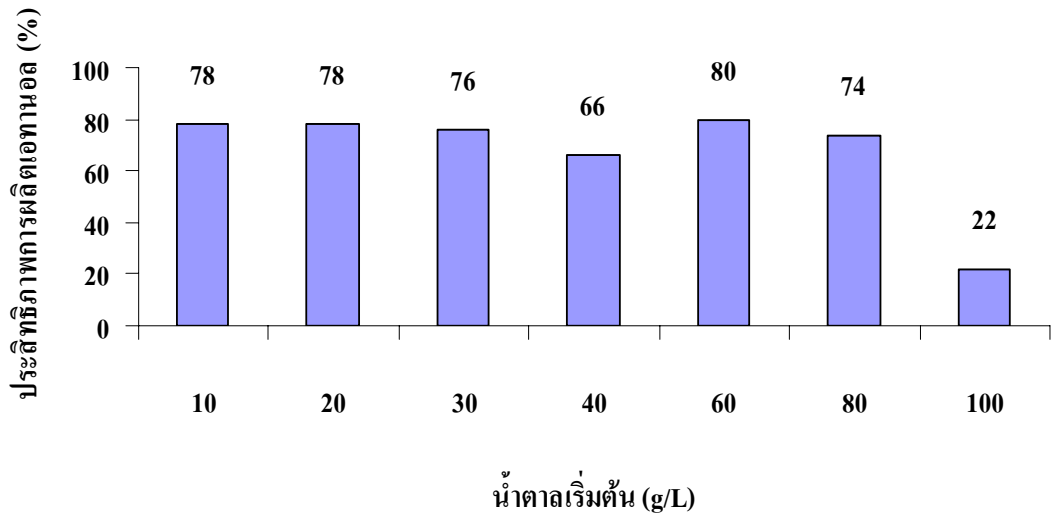
ภาพที่ 3.16 ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.40 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ส่วนที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นความเข้มข้น10, 20, 30, 40, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร มีค่า 0.39, 0.39, 0.38, 0.33, 0.37 และ 0.11 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ โดยค่า Yp/s ของชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร แตกต่างจากชุดการทดลองที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร แต่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.17) จากผลการทดลองเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลส่งผลให้เอทานอลที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น แต่จะเพิ่มขึ้นได้ในระดับหนึ่ง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Siva และคณะ (1995) ที่รายงานว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นจาก 50 เป็น 150 กรัมต่อลิตร ค่า Yp/s จะเพิ่มขึ้นจาก 0.45 เป็น 0.50 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล



ภาพที่ 3.17 ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองต่อค่าทางทฤษฎี (100%) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 80 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.18) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสำหรับการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 และใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.18 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุที่แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าสูงขึ้นจากการศึกษาสูตรอาหารก่อนหน้านี้ โดยเมื่อทำการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ดังนั้นเพื่อให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสม และเพื่อให้แน่ใจว่าน้ำตาลเริ่มต้นที่เปลี่ยนไปมีผลต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลหรือไม่ จึงทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมด้วย

3.4.2 ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

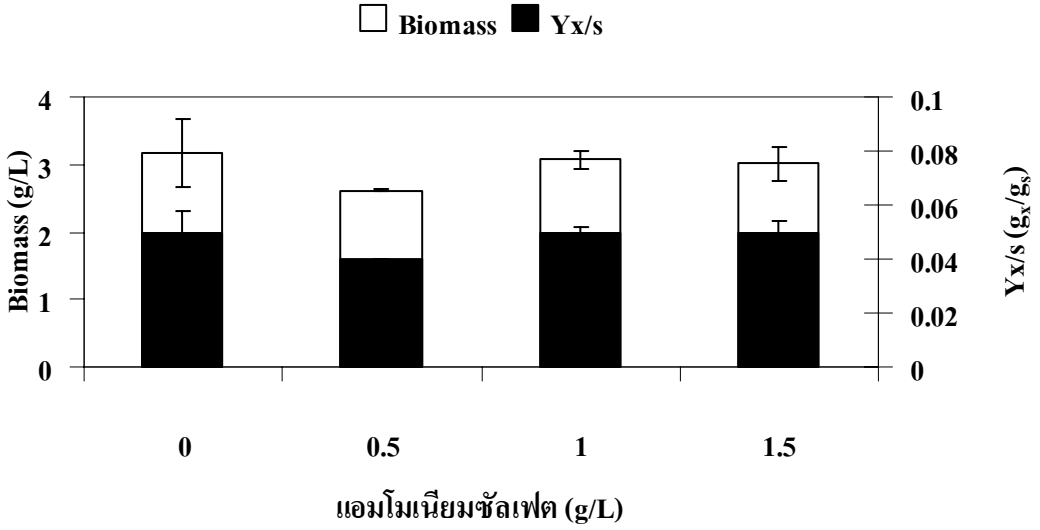
งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยแหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหาร คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1และ 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) 5 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

ผลจากการทดลองพบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด (ดังตารางที่ 3.8) โดยเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 1.55 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 1.23 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 12.25 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.5 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 11.06, 10.67 และ 10.90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับค่ามวลชีวภาพ พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่ามวลชีวภาพหลังการหมัก 36 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยทุกสูตรอาหารมีค่ามวลชีวภาพอยู่ในช่วง 2.67-3.17 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณค่า Yx/s พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 0.04 -0.05 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล (ภาพที่ 3.19) สำหรับ pH อาหารหลังการหมักนั้น พบว่ามีค่าลดลง ในทุกชุดการทดลอง

ตารางที่ 3.8 ผลการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$)ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

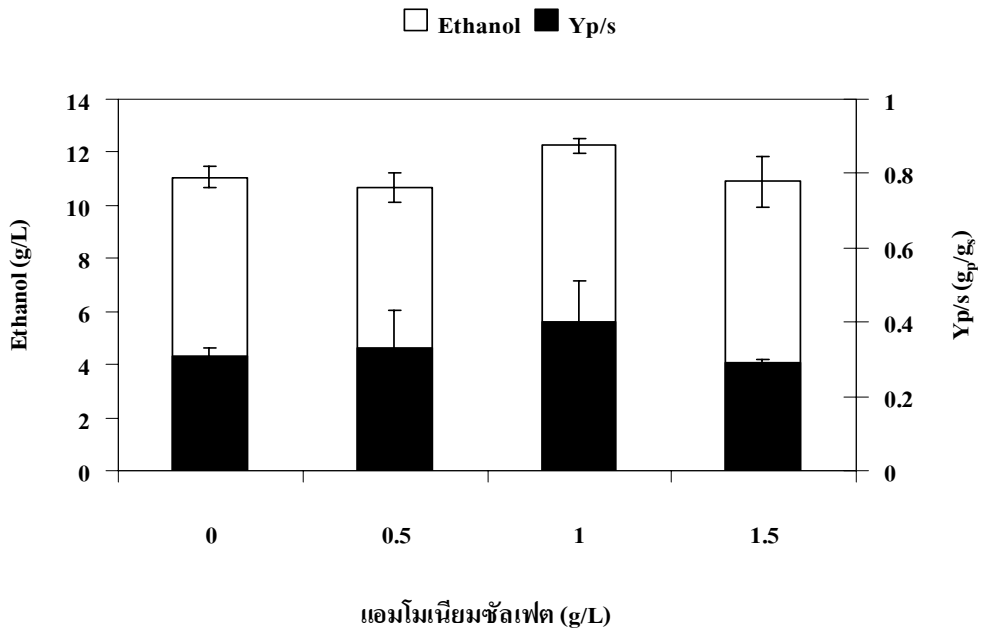
$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	เอทานอล				น้ำตาลที่ใช้ (g/L)	มวลชีวภาพ		pH หลังหมัก
	% v/v	%w/v	g/L	Yp/s		(g/L)	Yx/s	
0	1.40	1.11	11.06[a]	0.31[a]	35.76	3.17[a]	0.05	4.90
0.5	1.35	1.07	10.67[a]	0.33[a]	32.31	2.62[a]	0.04	4.95
1	1.55	1.23	12.25[a]	0.40[a]	30.52	3.07[a]	0.05	4.94
1.5	1.38	1.09	10.90[a]	0.29[a]	37.31	3.01[a]	0.05	5.02

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



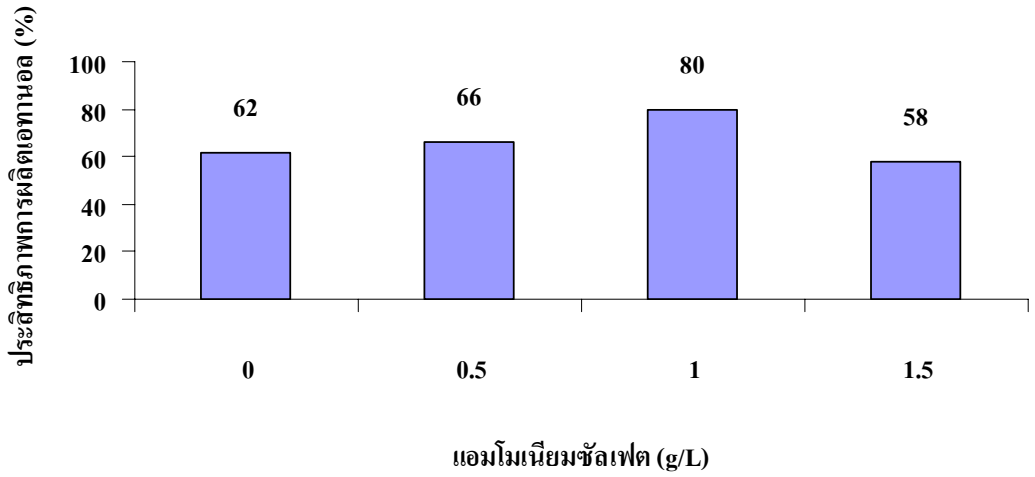
ภาพที่ 3.19 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าการหมักด้วยสูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.40 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ส่วนที่ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.5 กรัมต่อลิตร มีค่า 0.31, 0.33 และ 0.29 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ (ภาพที่ 3.20) โดยชุดการทดลองที่ใช้สูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ให้ค่า Yp/s สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3.20 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ทุกชุดการทดลองกับค่าทางทฤษฎี (0.50) (ภาพที่ 3.21) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร สำหรับเตรียมสูตรอาหารเพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z4 ในขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.21 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักด้วยปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

แม้ว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุจะเปลี่ยนเป็น 60 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ก็ยังเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z4 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในก่อนหน้าที่ไม่มีการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุ แต่ทั้งนี้ค่าเอทานอลที่ได้จากการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร มีค่าที่สูงกว่าเนื่องจากค่าอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนที่น้อยกว่านั้น (C/N = 60/1) ส่งผลให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารในการผลิตเอทานอลได้ดีขึ้น

ดังนั้นเพื่อให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสม และเพื่อให้แน่ใจว่าน้ำตาลเริ่มต้นที่เปลี่ยนไปมีผลต่อค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลหรือไม่ จึงทำการศึกษาหาค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมด้วย

3.4.3 pH เริ่มต้นที่เหมาะสม

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วย 2N NaOH ใช้อาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

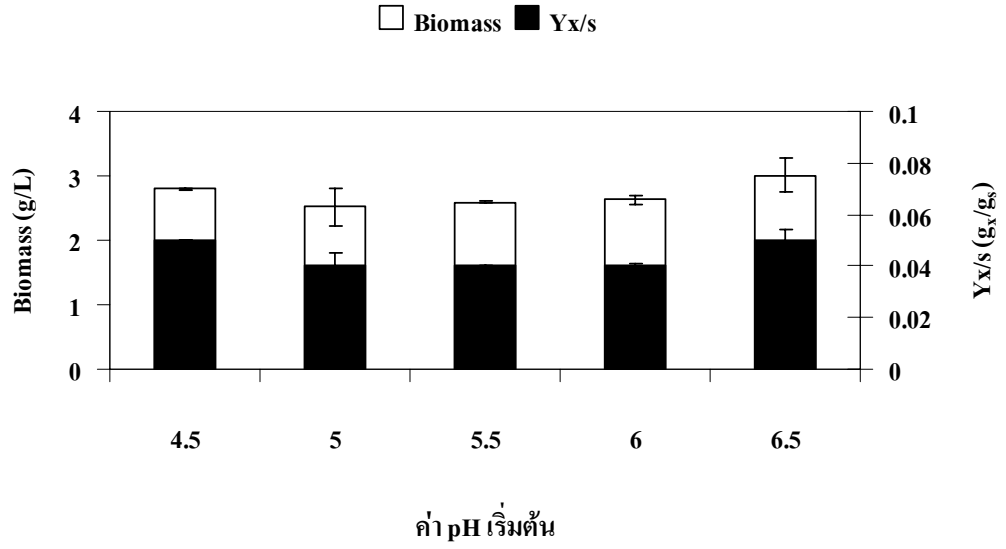
จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

ผลจากการทดลองพบว่าที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด (ดังตารางที่ 3.9) โดยเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 1.35 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร คิดเป็น 1.07 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 10.67 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 30.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 6.0 และ 6.5 (5.93, 9.48, 10.51 และ 7.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยค่าเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 6 แต่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลของค่า pH เริ่มต้นต่อมวลชีวภาพหลังการหมัก 36 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 2.52 - 3.01 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s อยู่ในช่วง 0.04 - 0.05 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล (ภาพที่ 3.22) เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับ pH อาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง ทั้งนี้เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก

ตารางที่ 3.9 ผลการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

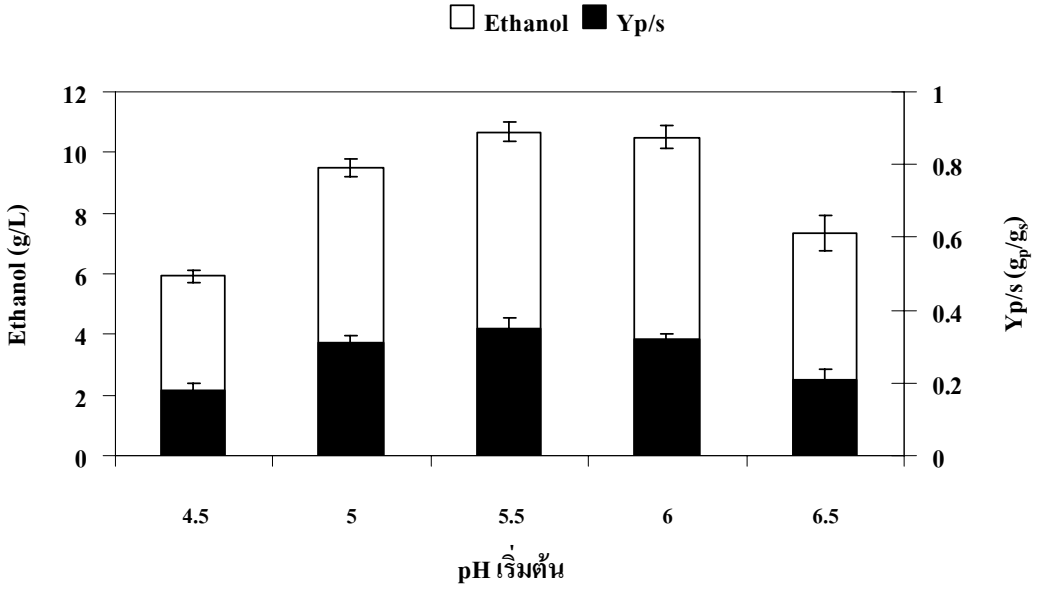
pH เริ่มต้น	เอทานอล				น้ำตาลที่ใช้	มวลชีวภาพ		pH หลังหมัก
	% v/v	%w/v	g/L	Yp/s	(g/L)	(g/L)	Yx/s	
4.5	0.75	0.59	5.93[a]	0.18[a]	33.10	2.80[a]	0.05	4.36
5	1.20	0.95	9.48[b]	0.31[b]	30.82	2.52[a]	0.04	4.79
5.5	1.35	1.07	10.67[b]	0.35[b]	30.25	2.59[a]	0.04	4.74
6	1.33	1.05	10.51[b]	0.32[b]	31.95	2.63[a]	0.04	4.98
6.5	0.93	0.74	7.35[c]	0.21[a]	35.25	3.01[a]	0.05	5.15

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



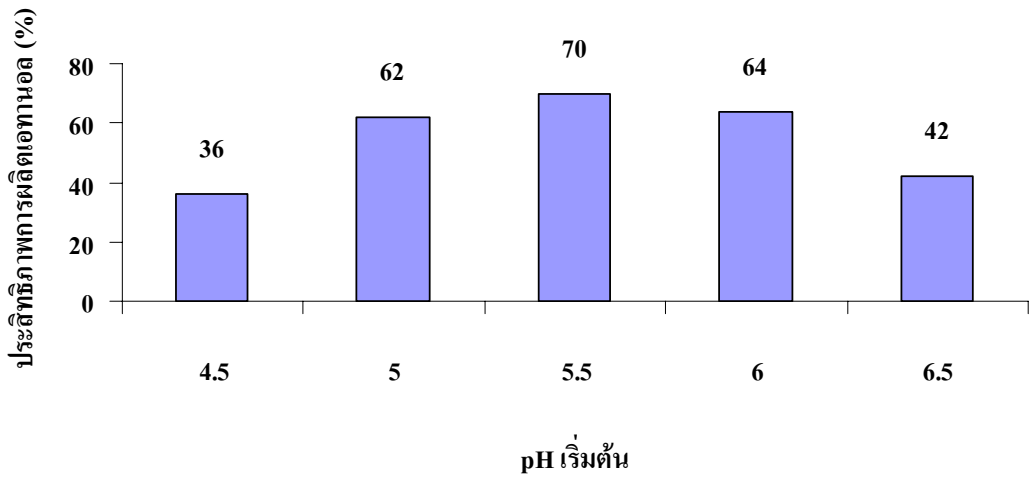
ภาพที่ 3.22 ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.35 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ส่วนที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 6.0 และ 6.5 มีค่า 0.18, 0.31, 0.32 และ 0.21 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ โดยค่า Yp/s ของชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 6 แต่มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.23)



ภาพที่ 3.23 ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองต่อค่าทางทฤษฎี (0.50) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.24) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกการปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป



ภาพที่ 3.24 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (100%) สำหรับการหมักที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ซึ่งจากการศึกษา pH เริ่มต้นของอาหาร พบว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุเปลี่ยนเป็น 60 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ก็ยังเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในก่อนหน้าที่ไม่มีการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุ เช่นเดียวกับการศึกษาของทัศนพร แก้วทองมา (2544) ที่พบว่า แบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5

3.4.4 การฆ่าเชื้อในอาหาร

การฆ่าเชื้อในอาหารที่ใช้หมักเอทานอลนั้น นอกจากการใช้ความร้อนโดยความร้อน ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว ยังมีการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm สำหรับการฆ่าเชื้อในอาหารแทนการใช้ความร้อน โดยใช้อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 มิลลิลิตร จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 (ค่า OD ที่ 660 nm

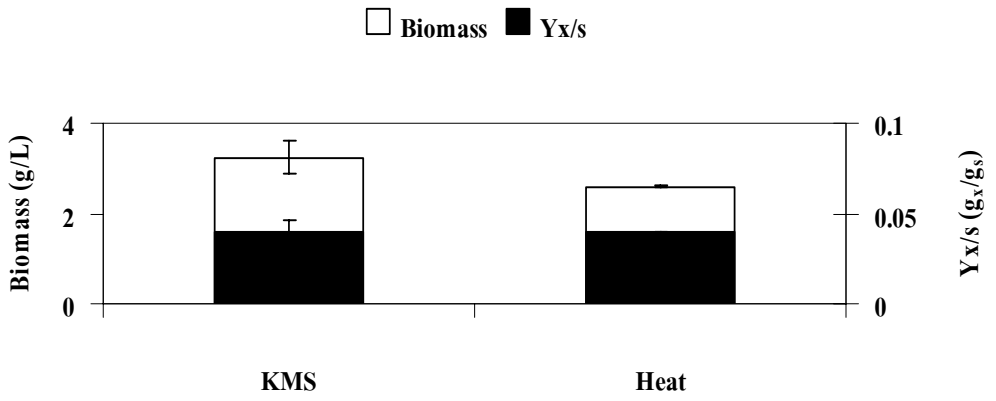
เท่ากับ 0.5) 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

ผลจากการทดลองพบว่าการฆ่าเชื้อในอาหาร โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า การเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm โดยการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนมีค่าเอทานอลเท่ากับ 1.35 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 1.07 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 10.67 กรัมต่อลิตร ใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 30.25 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ 3.10) ส่วนที่การฆ่าเชื้อในอาหารด้วยการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้ 7.90 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ สำหรับมวลชีวภาพพบว่าการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนมีมวลชีวภาพเท่ากับ 2.59 กรัมต่อลิตร ส่วนการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm มีค่าของมวลชีวภาพเท่ากับ 3.24 กรัมต่อลิตร (ภาพที่ 3.25) เมื่อวิเคราะห์ค่าทางสถิติพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาจากค่า Yx/s พบว่าทั้งสองชุดการทดลอง มีค่าเท่ากันคือ 0.04 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล สำหรับ pH อาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง

ตารางที่ 3.10 ผลการศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

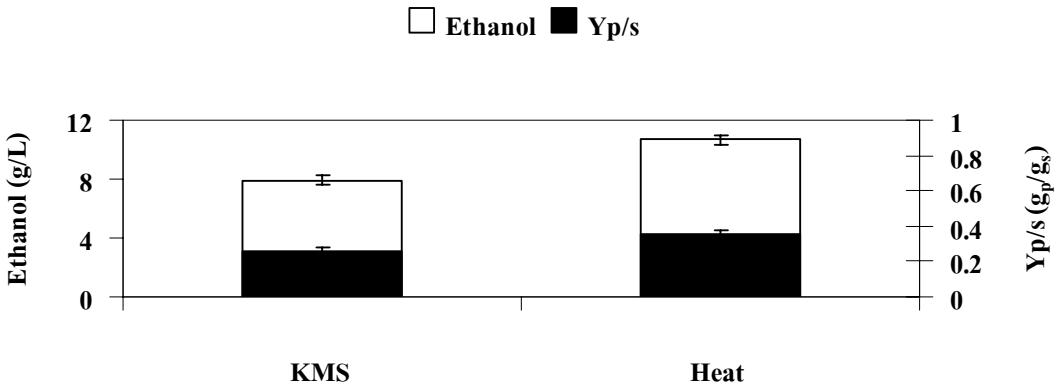
การฆ่าเชื้อ	เอทานอล				น้ำตาลที่ใช้ไป	มวลชีวภาพ		pH หลัง
ในอาหาร	% v/v	%w/v	g/L	Yp/s	(g/L)	g/L	Yx/s	หมัก
KMS 500 ppm	1.00	0.79	7.90[a]	0.26[a]	30.95	3.24[a]	0.04	4.76
ความร้อน 115°C	1.35	1.07	10.67[b]	0.35[b]	30.25	2.59[a]	0.04	4.74

หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละสดมภ์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



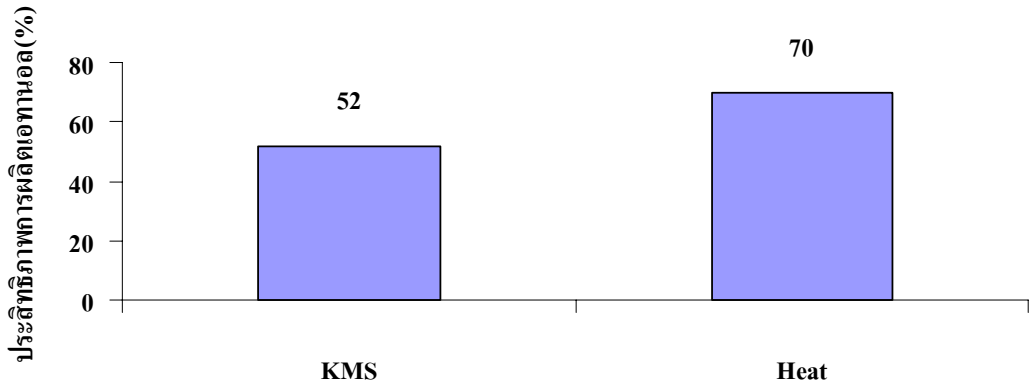
ภาพที่ 3.25 ผลของการฆ่าเชื้อในอาหาร ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าการฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อมีค่า Yp/s สูงกว่าเท่ากับ 0.35 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ส่วนการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.26 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.26)



ภาพที่ 3.26 ผลของฆ่าเชื้อในอาหาร ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองกับค่าทางทฤษฎี (0.50) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm คือ 52 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงที่ใช้ความร้อนฆ่าเชื้อเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 3.27) เมื่อพิจารณาแล้วการฆ่าเชื้อในอาหารโดยใช้ความร้อนมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า การเติม Potassium metabisulfite (KMS) ที่ความเข้มข้น 500 ppm แม้ว่าการเติม Potassium metabisulfite (KMS) สามารถใช้เป็นวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารได้ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามค่าการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ด้วยวิธีนี้ให้ค่าเอทานอลน้อยกว่าการใช้ความร้อน แม้มีการรายงานว่าเชื้อ *Z. mobilis* สามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อได้ดี แต่ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลองด้วย โดยการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของ ศุภนิต หิรัญประดิษฐ์ (2530) ที่พบว่าการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที ทำให้ได้เอทานอลสูงกว่าการใช้ Actidione (Cycloheximind) เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นสารฆ่าเชื้อในน้ำอ้อยเพื่อใช้ในการหมักเอทานอลด้วย *Z. mobilis*



ภาพที่ 3.27 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm และการใช้ความร้อนอุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ข้างต้นนั้น สรุปได้ว่า สูตรอาหารที่ใช้ต้องมีการเจือจางปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ทำการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในการฆ่าเชื้อ พบว่าการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ด้วยสูตรอาหารนี้สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 10.67 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.35 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล โดยใช้น้ำตาลไป 30.25 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.74 มีมวลชีวภาพเท่ากับ 2.59 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณหาค่าผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) มีค่าเท่ากับ 0.04 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 และทำให้ค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี (0.50)

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 พบว่าน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน มีความเป็นไปได้ในการใช้ผลิตเอทานอล โดยมีสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เติมแหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 5.14 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.09 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุ พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 คือ ที่ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 6.72 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.11 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เมื่อพิจารณาแล้ว พบว่าค่าเอทานอลที่ได้ มีค่าน้อยกว่าค่าทฤษฎี (0.50) มาก ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มข้นสูง แม้ว่าในน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 จะสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ก็ตาม

เมื่อทดลองปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุ พบว่าสูตรอาหารที่ใช้ต้องมีการเจือจางปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยเติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ทำการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง และใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในการฆ่าเชื้อ ทำให้การผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ด้วยสูตรอาหารนี้สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 10.67 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.35 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล จนใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี (0.50) และพบว่าเมื่อใช้โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) 500 ppm ในการฆ่าเชื้อในอาหาร ทำให้ปริมาณเอทานอลที่เชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ผลิตได้ลดลงเท่ากับ 7.90 กรัมต่อลิตร มีผลผลิตเอทานอลต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.26 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

แม้ว่าเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 จะสามารถเจริญเติบโตที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุที่สูงได้ แต่ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นมีปริมาณน้อย ซึ่งการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นให้ลดลง จะทำให้เชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น สำหรับการใช้ KMS 500 ppm เพื่อฆ่าเชื้อในอาหาร พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ แม้ว่ามีผลยับยั้งการผลิตเอทานอลจากเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ทำให้ปริมาณเอทานอลลดลง แต่สำหรับจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จะถูกยับยั้ง ทำให้ไม่สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้

ข้อเสนอแนะ

1. การใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเพื่อผลิตเอทานอล ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลกระทบของวัตถุกันเสีย และสารปรุงแต่งรสและกลิ่นที่มีอยู่ในน้ำอัดลม ต่อเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ในการผลิตเอทานอล
2. ควรทดลองหมักแบบกึ่งกะ เพื่อดูประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ว่ามีความแตกต่างกับการหมักแบบครั้งคราวที่ใช้ในการทดลองหรือไม่
3. ควรทดลองเติม KMS ที่มีความเข้มข้นลดลงเพื่อหาปริมาณที่เหมาะสมและไม่ส่งผลกระทบต่อเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ในการผลิตเอทานอล

บรรณานุกรม

กมลศักดิ์ ตั้งธรรมเนียม. 2540. คู่มือไวน์. ดวงกมล. กรุงเทพฯ.

กลยุทธ โชติพัฒนา และ นิสิต ตัณฑวิเชฐ. 2535. การศึกษาแบบจำลองทางคณิตศาสตร์ของระบบหมักยีสต์ขนมปัง. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, สิทธิโชค วัลลภาทิตย์, บุญเรียง ล้ำชัยภูมิ และกล้าณรงค์ ศรีรอต. 2548. โอกาสของมันสำปะหลังกับอุตสาหกรรม. หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีแปรรูปมันสำปะหลังและแป้ง ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตผลทางการเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เจริญศักดิ์ โรคนฤธิ์พิเชษฐ์. 2546. การศึกษาต้นแบบโรงงานเอทานอลโดยการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตจากมันเส้น. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ.

ชูศรี สุขุมาลไพบูลย์. 2530. การผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยเชื้อ *Zymomonas mobiles*. สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

โชคชัย วนภู, นันทพร บุญเกิด และ ลำไพร ดิษฐวิบูลย์. 2546. Wine maker คนทำไวน์. สมบูรณ์พริ้นติ้ง. นครราชสีมา.

ดวงพร คันธโชติ. 2546. สรีรวิทยาของจุลินทรีย์ : เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรท และการได้พลังงาน. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ทัศนพร แก้วทองมา. 2544. การผลิตเอธานอลโดยระบบ pH-auxostat : ผลของรูปแบบการควบคุมอัตโนมัติและความเป็นกรดด่างต่อการเจริญของ *Zymomonas mobilis*. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

ธนาสิน สุทธิรักษ์. 2526. การผลิตเอทานอลที่มีกำลังผลิตสูงโดยเชื้อ *Zymomonas* โดยสายพันธุ์ต่างๆ. คณะทรัพยากรธรรมชาติ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ณัฐกิตติ์ ธรรมเจริญ. 2543. เหล้าพื้นบ้าน. บริษัทนาคาอินเตอร์มีเดีย จำกัด. กรุงเทพฯ

ณีรนุช ควรเชิดชู และ สุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์. 2550. แก๊สโซฮอล์ : เทคโนโลยีสะอาดช่วยเศรษฐกิจประเทศชาติ.

นงนุช ชวพันธุ์. 2529. การผลิตแอลกอฮอล์โดย *Zymomonas mobilis*. สาขาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

บุณยพัต สุภานิช, รัตนา จิระรัตนานนท์, สุวิทย์ เตีย, วิทยา เทพไพฑูรย์, อนวิช สังข์เพ็ชร, จิระเดช ฮายุกต์ และปนัดดา ภูอากาศ. 2546. การบูรณาการกระบวนการผลิตเอทานอลกับโรงงานน้ำตาลและโรงงานแป้งมันสำปะหลังเชิงเทคโนโลยีในการทำเอทานอลให้บริสุทธิ์. รายงานการวิจัย. สำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ.

ประดิษฐ์ ครุวัณณา. 2545. ไวน์ : ศาสตร์และศิลป์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง. คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มัลลิกา บุญมี, วิชัย ลีลาวัชรมาศ และ สามารถ มูลอามาตย์. 2548. การผลิตเอทานอลจากเมล็ดข้าวฟ่างหวานโดย *Zymomonas mobilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* และการใช้กากยีสต์จากโรงงานเบียร์เป็นแหล่งอาหารเสริม. งานวิจัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น. คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มารศรี จันสี. 2548. การปรับปรุง *Zymomonas* sp. เพื่อเพิ่มการผลิตเอทานอลโดยใช้รังสีอัลตร้าไวโอเลตและสารฟีนอล. โครงงานทางเทคโนโลยีชีวภาพ1 คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มาโนช โพธิ์สูง. 2546. การผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดยแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis*. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วนิดา พรมขาวทอง. 2547. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอทานอล. โครงงานทางจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. สำนักพิมพ์โอ เอส พริ้นติ้ง. กรุงเทพฯ.

วสันต์ จันทร์สัจจา. 2546. น่ารู้เกี่ยวกับเอทานอล. วารสาร For Quality. 10: 41-45.

วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2522. บักเตรีที่สามารถสร้างเอทธิลแอลกอฮอล์. วารสารอาหาร11(4) : 271- 275.

ศุภนิต หิรัญประดิษฐ์, สุธัญญา สารารักษ์ และ พันธุ์ทวี ภักดีดินแดน. 2530. ศึกษาวิธีการเตรียมน้ำอ้อยในการหมักเป็นแอลกอฮอล์ด้วย *Zymomonas* sp. สาขาอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมใจ ศิริโภค. 2550. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. บริษัทพิมพ์ดี จำกัด. กรุงเทพฯ.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมณฑา วัตนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพ.

อรพิน ภูมิภมร. 2520. แนวโน้มการผลิตเอทธิลแอลกอฮอล์โดยบักเตรี *Zymomonas*. วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย. 1(1): 33–38.

อรพิน ภูมิภมร. 2526. ระบบชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ เล่มที่2 : จุลินทรีย์ในเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอาหารพื้นเมือง. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Amerine, M.A. and Ough, C.S., 1980. Methods of Analysis of Mustc and Wines. New York: John Wiley & Sons.

Bekers, M., Vigants, A., Laukevics, J., Toma, M., Rapoports, A. and Zikmanis, P., 2000. The effect of osmo-induced Stress on product formation by *Zymomonas mobilis* on sucrose. Internal. J. Food Microbiol. 55: 147-150.

Barker, B.T.P. and Hillier, V.F., 1912. Cider sickness. Agri. Scien. 5: 67-85.

Bringer, S. and Sahm, H., 1984. Ethanol production by *Zymomonas mobilis* and its application on an industrial scale. Biotechnol. Bioeng. Symp. 14: 311–319.

Buchanan, R E., 1974. Bergey' s Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Baltimore: The William and Wilkin's Co.

Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B., and Scarmino, I.S., 2007. Fermentation of molasses by *Zymomonas mobilis*: Effects of temperature and sugar concentration on ethanol production. Appl. Bioresource. Technology. 98: 2824-2828.

Dien, B.S., Cotta, M.A. and Jeffries, T.W., 2003. Bacteria engineered for ethanol production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63:258-266.

Dombek, K.M. and Ingram, L.O., 1987. Ethanol production during batch fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*: changes in glycolytic enzymes and internal pH. Appl. Environ. Microbiol. 53(6):1386-1391.

Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A. and Smith, F., 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem. 28: 350-356.

Goncalves, D.L.O., Araujo, J.M., Schumacher, I.E. and Cavalcanti, D.S.E. 1970. Estudos de microrganismos antagonistas presentes nas bebidas fermentadas usadas pelo povo do Recife. I. Sobre uma variedade de *Zymomonas mobilis* var. Antibiot. 10:3-15.

Gunasekaran, P. and Raj, K.C., 1990. Ethanol fermentation technology *Zymomonas mobilis*. Current Science. 77(1): 56-68.

Ingram, L.O. and Doran, J.B., 1995. Conversion of cellulosic materials to ethanol. Appl. Microb. 16: 235-241.

Jutta, R. and Reinhard, K., 1992. Mechanism of Glutamate Uptake in *Zymomonas mobilis*. J. Bacteriol. 7579-7584.

Kademi, A., Ait-Abdelkader, N., Fakhreddine, L. and Baratti, J.C., 2000. Characterization of a thermostable esterase from the moderate thermophilic bacterium Bacillus circulans. Enzym. 54: 173-179.

Kannan, T.R., Sangiliyandi, G. and Gunasekaran, P., 1998. Improved ethanol production from sucrose by a mutant of *Zymomonas mobilis* lacking sucrases in immobilized cell fermentation. Enzym. Microb. 22 : 179 – 184.

King, F.G. and Hossain, M.A., 2004. The effect of temperature, pH and initial glucose concentration on the kinetics of ethanol production by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation. Biotechnology Letters. 4(8): 531-536.

Kiran, S.N., Sridhar, M., Suresh, K., Banat, I.M. and Venkateswar, R.L., 2000. Isolation of thermotolerant, osmotolerant, flocculating *Saccharomyces cerevisiae* for ethanol production. Appl. Bioresource technology. 72(1): 43-46.

Lawford, H.G., 1988. Effect of pH on growth and ethanol production by *Zymomonas*. Biotechnol. 10(11): 809-814.

Lindner, P., 1931. Termobacterium mobile, ein mexikanisches Bakterium als neues Einsauerungbakterium furRubenschnitzel. Z. Ver. Dsch. Zuckerind. 81: 25-36.

Michael, J.W., Neil, L.M., John, S.R. and Gary, N., 2001. Industrial Microbiology. Appl. Science. London. 147-150.

Ohta, K., Supanwong, K. and Hayashida, S., 1981. Environmental effect on ethanol tolerance of *Zymomonas mobilis*. Ferm. Technol**.** 59(6): 435–439.

Osman, A.Y. and Ingram, L.O., 1985. Mechanism of Ethanol Inhibition of Fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. J. Bacteriol. 173-180.

Rogers, P.L., Lee, K.L. and Tribe, D.E., 1980. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis*. Process Biochem. 15 (6): 7–11.

Rogers, P.L., Lee, K.L. and Tribe, D.E., 1980. High productivity ethanol fermentation with *Zymomonas mobilis*. Process. Biochem. 15: 7-11.

Rogers, P.L., Strzelecki, A.T. and Goodman, A.E., 1986. Commercial potential of *Zymomonas* process for ethanol production. Biotech. Indust. Ferment. 4: 63 – 79.

Ruanglek, V., Maneewatthana, D. and Tripetchkul, S., 2006. Evaluation of Thai agro-industrial wastes for bio-ethanol production by Zymomonas mobilis. Appl. Biochemistry. 41(6): 1432-1437.

Shimwell, J.L., 1937. Study of a new type of beer disease bacterium (*Achromobacter anaerobium* sp. nov) Producing alcoholic fermentation of glucose. J. Inst. Brew. London. 43: 507-509.

Shimwell, J.L., 1950. *Saccharomonas*, a proposed new genus for bacteria producing a quantitative alcohol fermentation of glucose. J. Inst. Brew. London. 56: 179-182.

Siva, K.S., Rakshit, S.K. and Panda, T., 1995. Production of ethanol by *Zymomonas mobilis* : The effect of batch step- feeding of glucose and relevant growth factors. Process Biochem. 30: 41–47.

Skotnicki, M.L, Lee, K J, Tribe, D.E. and Rogers, P.L., 1981.Comparison of ethanol production by different *Zymomonas* Strains . Appl. Environ. Microbiol. 41(4): 889–893.

Sukesh, C.S., Raj, D., Forouzandeh, M. and Bansal, M.P., 1996. Salt induced changes in lipid composition and ethanol torelance in *S. cerevisiae*. Appl. Biochem. Biotechnol. 56(2): 189-195.

Swings, J. and De Ley, J., 1977. The Biology of *Zymomonas*. Bacterial Rev. 1: 1–46.

Swing, J. and De Ley, J., 1984. The Biology of *Zymomonas*. Appl. Bacteriol. 41:1-41.

Toran-Diaz, I., Jain, W.K. and Baratti, J., 1983. Preparation and characterization of immobilized growing cells of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. Biotechnol. 27(3): 273-279.

Tripetchkul, S., Ruanglek, V. and Dandusitapunth, Y., 1993. Development of ethanol production from agroindustrial waste. Appl. Biochemistry.

Viikari, L., 1984. Formation of Levan and Sorbitol from Sucrose by *Zymomonas mobilis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 19: 252-255.

Walker, G.M., 1998. Yeast Physiology and Piotechnology. 3th ed. Chichester: John Wiley and Sons Ltd.

Zaldivar, J., Nielsen, J. and Olsson, L., 2001. Fuel ethanol ethanol production from lignocellulose: a challenge for metabolic engineering and process integration. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56:17-34.

Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., Gump, B.H. and Nury, F.S., 1995. Wine Analysis and Production. NewYork: The Chapman & Hall.

เครื่องกรองแบบสุญญากาศ (Online). สืบค้นเมื่อ : 25 มิถุนายน 2552
จาก : http://www. chemsci.kku.ac.th

Ebulliometer (Online). สืบค้นเมื่อ : 27 มิถุนายน 2552
จาก : http://www.dujardin-salleron.net

ตลาดน้ำอัดลม (Online). สืบค้นเมื่อ : 9 พฤษภาคม 2551
จาก : http://econ.tu.ac.th/class/archan/Nantavut

โครงสร้างโมเลกุลน้ำตาลซูโครส (Online). สืบค้นเมื่อ : 18 พฤษภาคม 2551
จาก : http://www.nmt.ac.thhomechemistrypicmaltose.gif

ซูโครส (Online). สืบค้นเมื่อ : 18 พฤษภาคม 2551
จาก : http://www2.pn.ac.th/webpn/Elearnning/Wit/Food/food.html

Zymomonas (Online). สืบค้นเมื่อ : 22 มิถุนายน 2551
จาก : http:// www.scielo.cl

Entner-Doudoroff pathway (Online). สืบค้นเมื่อ : 27 มิถุนายน 2552
จาก : http://www.textbookofbacteriology.net

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยใช้เครื่องวัดแอลกอฮอล์ (Ebulliometer) ตามวิธีของ Zoecklein และคณะ (1995)

Ebulliometer เป็นเครื่องมือที่ใช้หาปริมาณแอลกอฮอล์โดยการหาจุดเดือดแล้วเปิดเทียบกับแผ่นสเกลไว้สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ (DUJARDIN-SALLERON scale) เครื่องมือประกอบด้วยโลหะทรงกระบอก 2 ส่วนคือ ส่วน A และ B ต่อกัน ทรงกระบอกส่วน A จะเป็นที่บรรจุสารละลายที่ต้องการหาปริมาณแอลกอฮอล์ โดยบรรจุสารละลายที่ต้องการวัดลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้ สำหรับอ่านค่าอุณหภูมิ ใส่น้ำสำหรับหล่อเย็นลงในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E ส่วน F เป็นที่ใช้สำหรับเปิดถ่ายสารละลายออก และท่อ G เป็นตำแหน่งสำหรับรวมเปลวไฟจากตะเกียง แสดงในภาพที่ 2ก

วิธีการวิเคราะห์

1.1 การหาจุดเดือดของน้ำกลั่น

ก. เติมน้ำกลั่นปริมาตร 30 มิลลิลิตร ลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้

ข. เติมน้ำหล่อเย็นลงในช่อง D จากนั้นสวมต่อทรงกระบอก A และ B ตรงช่อง E

ค. จุดตะเกียงแล้ววางใต้ท่อ G

ง. เมื่อน้ำเดือดแล้วอ่านค่าอุณหภูมิที่คงที่ (ประมาณ 15-30 วินาที)

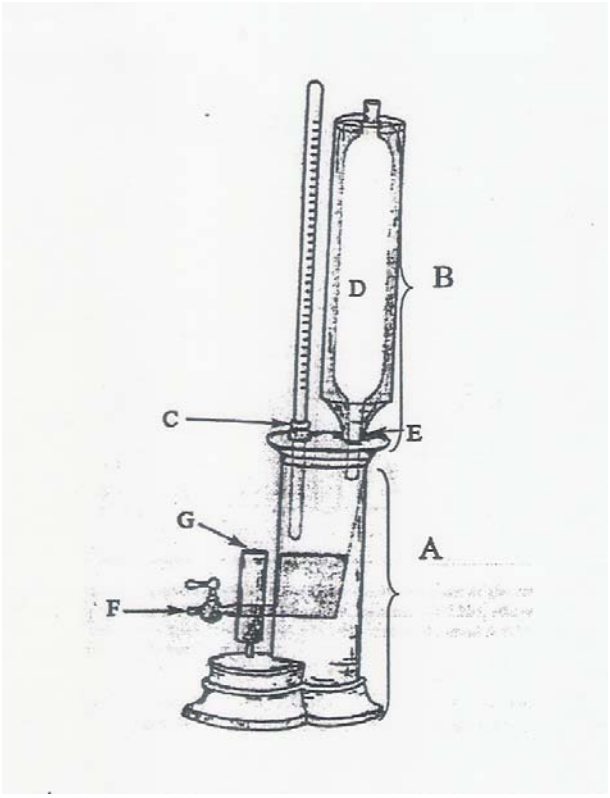
จ. นำค่าของอุณหภูมิที่ได้ไปปรับสเกล โดยให้ขีดศูนย์ของสเกลวงนอกตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของน้ำกลั่น

1.2 การหาจุดเดือดของตัวอย่าง

เติมสารละลายตัวอย่างปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในช่อง C และเสียบเทอร์โมมิเตอร์ปิดไว้ จากนั้นนำไปวิเคราะห์เช่นเดียวกับข้อ 1.1 ตั้งแต่ข้อ ข. ถึง ง. การอ่านค่าปริมาณแอลกอฮอล์อ่านค่าจากสเกลวงนอกที่ตรงกับค่าอุณหภูมิจุดเดือดของสารละลายตัวอย่างที่ได้ หน่วยของปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้คือ เปอร์เซ็นต์ ปริมาตรต่อปริมาตร

ภาพที่ ก-1 แผ่นสเกลสำหรับอ่านค่าอุณหภูมิและเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์

ที่มา : http//www.dujardin-salleron.net



ภาพที่ ก-2 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ Ebulliometer

2. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล โดยวิธี Phenol sulfuric acid total sugar (Dubois *et al.*, 1956)

วิธีการวิเคราะห์

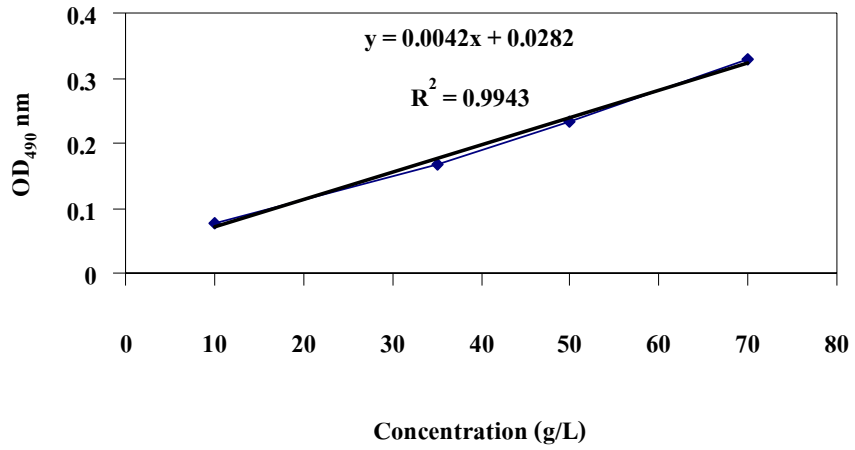
1. ดูดสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง(แช่ในน้ำแข็ง) เติมสารละลายฟีนอล 5% ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 2-3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
2. เติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ลงไปแล้วเขย่าให้เข้ากัน
3. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่อง Spectrophotometer (ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น UV-1601) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
4. นำค่า OD ที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง

การคำนวณ

$$\text{ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ค่า } OD_{490}\text{ nm}) - (0.0282)}{(0.0042)}$$

กราฟมาตรฐานน้ำตาลซูโครส

เตรียมสารละลายซูโครสให้มีระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10, 35, 50 และ 70 กรัมต่อลิตร แล้วทำการวิเคราะห์เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่าง นำค่า OD ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ ก-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายซูโครสที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

3. การวิเคราะห์หามวลชีวภาพ

วิธีการวิเคราะห์

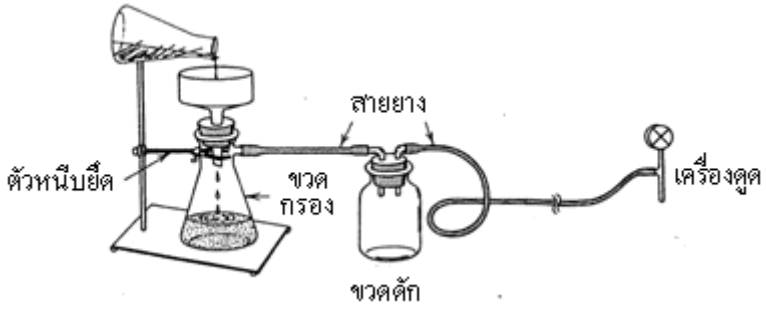
1. นำกระดาษกรอง cellulose nitrate filter (Sartorius) ขนาด 0.45 μm ไปอบไล่ความชื้นที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (Dasicater) ชั่งน้ำหนักกระดาษก่อนนำไปกรอง (W_1)

2. กรองตัวอย่างปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผ่านกระดาษกรอง โดยใช้แรงดึงสุญญากาศจากเครื่องกรอง (Vaccuum filter)

3. นำกระดาษกรองที่มีตัวอย่างไปอบที่อุณหภูมิ 105°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น (Dasicater) แล้วนำกระดาษกรองไปชั่งน้ำหนักหามวลชีวภาพของตัวอย่าง (W_2) หน่วยที่ได้คือ กรัมต่อลิตร

การคำนวณ

มวลชีวภาพ = $(W_2 - W_1) * 100$



ภาพที่ ก-4 การกรองตัวอย่างด้วยเครื่องกรองแบบสุญญากาศ

ที่มา : http//www. chemsci.kku.ac.th

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1. ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s)

$$Yp/s = \frac{\text{ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)}}$$

2. ปริมาณมวลชีวภาพที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s)

$$Yx/s = \frac{\text{ปริมาณมวลชีวภาพ (กรัมต่อลิตร)}}{\text{ปริมาณน้ำตาลซูโครส (กรัมต่อลิตร)}}$$

3. ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล

$$\text{ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอล} = \frac{\text{ปริมาณผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น}}{\text{ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (0.50)}} * 100$$

4.ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)

$$\text{ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)} = \text{ปริมาณเอทานอล (v/v)} * (10) * (0.79)$$

ภาคผนวก ค

ข้อมูลทางสถิติ

1. ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

1.1 ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

ตารางที่ ค-1 การศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ethanol	Between Groups	3.550	5	.710	78.889	.000
	Within Groups	.108	12	.009		
	Total	3.658	17			
yield	Between Groups	.003	5	.001	23.726	.000
	Within Groups	.000	12	.000		
	Total	.003	17			
biomass	Between Groups	.010	5	.002	.201	.956
	Within Groups	.117	12	.010		
	Total	.127	17			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) ammonium	(J) ammonium	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
ethanol	.00	.50	-.00183	.07746	.982	-.1706	.1669
		1	-1.18500(*)	.07746	.000	-1.3538	-1.0162
		1.50	-.10750	.07746	.190	-.2763	.0613
		3	.00000	.07746	1.00	-.1688	.1688
		4.50	.09217	.07746	.257	-.0766	.2609
	.50	.00	.00183	.07746	.982	-.1669	.1706
		1	-1.18317(*)	.07746	.000	-1.3519	-1.0144
		1.50	-.10567	.07746	.198	-.2744	.0631
		3	.00183	.07746	.982	-.1669	.1706
		4.50	.09400	.07746	.248	-.0748	.2628
	1	.00	1.18500(*)	.07746	.000	1.0162	1.3538
		.50	1.18317(*)	.07746	.000	1.0144	1.3519
		1.50	1.07750(*)	.07746	.000	.9087	1.2463
		3	1.18500(*)	.07746	.000	1.0162	1.3538
		4.50	1.27717(*)	.07746	.000	1.1084	1.4459
	1.50	.00	.10750	.07746	.190	-.0613	.2763
		.50	.10567	.07746	.198	-.0631	.2744
		1	-1.07750(*)	.07746	.000	-1.2463	-.9087
		3	.10750	.07746	.190	-.0613	.2763
		4.50	.19967(*)	.07746	.024	.0309	.3684
	3	.00	.00000	.07746	1.00	-.1688	.1688
		.50	-.00183	.07746	.982	-.1706	.1669
		1	-1.18500(*)	.07746	.000	-1.3538	-1.0162
		1.50	-.10750	.07746	.190	-.2763	.0613

Dependent Variable	(I) ammonium	(J) ammonium	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
		4.50	.09217	.07746	.257	-.0766	.2609
	4.50	.00	-.09217	.07746	.257	-.2609	.0766
		.50	-.09400	.07746	.248	-.2628	.0748
		1	-1.27717(*)	.07746	.000	-1.4459	-1.1084
		1.50	-.19967(*)	.07746	.024	-.3684	-.0309
		3	-.09217	.07746	.257	-.2609	.0766
yield	.00	.50	-.00455	.00408	.287	-.0134	.0044
		1	-.03572(*)	.00408	.000	-.0446	-.0268
		1.50	-.00540	.00408	.211	-.0143	.0035
		3	-.00302	.00408	.473	-.0119	.0059
		4.50	.00269	.00408	.523	-.0062	.0116
	.50	.00	.00455	.00408	.287	-.0044	.0134
		1	-.03117(*)	.00408	.000	-.0401	-.0223
		1.50	-.00086	.00408	.837	-.0098	.0080
		3	.00152	.00408	.716	-.0074	.0104
		4.50	.00724	.00408	.102	-.0017	.0161
	1	.00	.03572(*)	.00408	.000	.0268	.0446
		.50	.03117(*)	.00408	.000	.0223	.0401
		1.50	.03032(*)	.00408	.000	.0214	.0392
		3	.03270(*)	.00408	.000	.0238	.0416
		4.50	.03841(*)	.00408	.000	.0295	.0473
	1.50	.00	.00540	.00408	.211	-.0035	.0143
		.50	.00086	.00408	.837	-.0080	.0098
		1	-.03032(*)	.00408	.000	-.0392	-.0214
		3	.00238	.00408	.571	-.0065	.0113

Dependent Variable	(I) ammonium	(J) ammonium	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
		4.50	.00809	.00408	.071	-.0008	.0170
	3	.00	.00302	.00408	.473	-.0059	.0119
		.50	-.00152	.00408	.716	-.0104	.0074
		1	-.03270(*)	.00408	.000	-.0416	-.0238
		1.50	-.00238	.00408	.571	-.0113	.0065
		4.50	.00571	.00408	.187	-.0032	.0146
	4.50	.00	-.00269	.00408	.523	-.0116	.0062
		.50	-.00724	.00408	.102	-.0161	.0017
		1	-.03841(*)	.00408	.000	-.0473	-.0295
		1.50	-.00809	.00408	.071	-.0170	.0008
		3	-.00571	.00408	.187	-.0146	.0032
biomass	.00	.50	.06000	.08076	.472	-.1160	.2360
		1	-.01000	.08076	.904	-.1860	.1660
		1.50	.04000	.08076	.629	-.1360	.2160
		3	.02000	.08076	.809	-.1560	.1960
		4.50	.02000	.08076	.809	-.1560	.1960
	.50	.00	-.06000	.08076	.472	-.2360	.1160
		1	-.07000	.08076	.403	-.2460	.1060
		1.50	-.02000	.08076	.809	-.1960	.1560
		3	-.04000	.08076	.629	-.2160	.1360
		4.50	-.04000	.08076	.629	-.2160	.1360
	1	.00	.01000	.08076	.904	-.1660	.1860
		.50	.07000	.08076	.403	-.1060	.2460
		1.50	.05000	.08076	.547	-.1260	.2260
		3	.03000	.08076	.717	-.1460	.2060

Dependent Variable	(I) ammonium	(J) ammonium	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
		4.50	.03000	.08076	.717	-.1460	.2060
	1.50	.00	-.04000	.08076	.629	-.2160	.1360
		.50	.02000	.08076	.809	-.1560	.1960
		1	-.05000	.08076	.547	-.2260	.1260
		3	-.02000	.08076	.809	-.1960	.1560
		4.50	-.02000	.08076	.809	-.1960	.1560
	3	.00	-.02000	.08076	.809	-.1960	.1560
		.50	.04000	.08076	.629	-.1360	.2160
		1	-.03000	.08076	.717	-.2060	.1460
		1.50	.02000	.08076	.809	-.1560	.1960
		4.50	.00000	.08076	1.000	-.1760	.1760
	4.50	.00	-.02000	.08076	.809	-.1960	.1560
		.50	.04000	.08076	.629	-.1360	.2160
		1	-.03000	.08076	.717	-.2060	.1460
		1.50	.02000	.08076	.809	-.1560	.1960
		3	.00000	.08076	1.000	-.1760	.1760

* The mean difference is significant at the .05 level.

1.2 pH ที่เหมาะสม

ตารางที่ ค-2 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ethanol	Between Groups	19.387	4	4.847	433.517	.000
	Within Groups	.056	5	.011		
	Total	19.443	9			
yield	Between Groups	.005	4	.001	9.036	.016
	Within Groups	.001	5	.000		
	Total	.006	9			
biomass	Between Groups	.054	4	.014	.156	.952
	Within Groups	.434	5	.087		
	Total	.489	9			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
ethanol	4.50	5.00	-1.57000(*)	.10574	.000	-1.8418	-1.2982
		5.50	-3.55500(*)	.10574	.000	-3.8268	-3.2832
		6.00	-3.56000(*)	.10574	.000	-3.8318	-3.2882
		6.50	-3.15500(*)	.10574	.000	-3.4268	-2.8832
	5.00	4.50	1.57000(*)	.10574	.000	1.2982	1.8418
		5.50	-1.98500(*)	.10574	.000	-2.2568	-1.7132
		6.00	-1.99000(*)	.10574	.000	-2.2618	-1.7182
		6.50	-1.58500(*)	.10574	.000	-1.8568	-1.3132

Dependent Variable	(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
	5.50	4.50	3.55500(*)	.10574	.000	3.2832	3.8268
		5.00	1.98500(*)	.10574	.000	1.7132	2.2568
		6.00	-.00500	.10574	.964	-.2768	.2668
		6.50	.40000(*)	.10574	.013	.1282	.6718
	6.00	4.50	3.56000(*)	.10574	.000	3.2882	3.8318
		5.00	1.99000(*)	.10574	.000	1.7182	2.2618
		5.50	.00500	.10574	.964	-.2668	.2768
		6.50	.40500(*)	.10574	.012	.1332	.6768
	6.50	4.50	3.15500(*)	.10574	.000	2.8832	3.4268
		5.00	1.58500(*)	.10574	.000	1.3132	1.8568
		5.50	-.40000(*)	.10574	.013	-.6718	-.1282
		6.00	-.40500(*)	.10574	.012	-.6768	-.1332
yield	4.50	5.00	-.02000	.01183	.152	-.0504	.0104
		5.50	-.06000(*)	.01183	.004	-.0904	-.0296
		6.00	-.05500(*)	.01183	.006	-.0854	-.0246
		6.50	-.02500	.01183	.088	-.0554	.0054
	5.00	4.50	.02000	.01183	.152	-.0104	.0504
		5.50	-.04000(*)	.01183	.020	-.0704	-.0096
		6.00	-.03500(*)	.01183	.032	-.0654	-.0046
		6.50	-.00500	.01183	.690	-.0354	.0254
	5.50	4.50	.06000(*)	.01183	.004	.0296	.0904
		5.00	.04000(*)	.01183	.020	.0096	.0704
		6.00	.00500	.01183	.690	-.0254	.0354
		6.50	.03500(*)	.01183	.032	.0046	.0654
	6.00	4.50	.05500(*)	.01183	.006	.0246	.0854

Dependent Variable	(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
		5.00	.03500(*)	.01183	.032	.0046	.0654
		5.50	-.00500	.01183	.690	-.0354	.0254
		6.50	.03000	.01183	.052	-.0004	.0604
	6.50	4.50	.02500	.01183	.088	-.0054	.0554
		5.00	.00500	.01183	.690	-.0254	.0354
		5.50	-.03500(*)	.01183	.032	-.0654	-.0046
		6.00	-.03000	.01183	.052	-.0604	.0004
biomass	4.50	5.00	-.08000	.29472	.797	-.8376	.6776
		5.50	-.16500	.29472	.600	-.9226	.5926
		6.00	-.10000	.29472	.748	-.8576	.6576
		6.50	-.21500	.29472	.498	-.9726	.5426
	5.00	4.50	.08000	.29472	.797	-.6776	.8376
		5.50	-.08500	.29472	.785	-.8426	.6726
		6.00	-.02000	.29472	.949	-.7776	.7376
		6.50	-.13500	.29472	.666	-.8926	.6226
	5.50	4.50	.16500	.29472	.600	-.5926	.9226
		5.00	.08500	.29472	.785	-.6726	.8426
		6.00	.06500	.29472	.834	-.6926	.8226
		6.50	-.05000	.29472	.872	-.8076	.7076
	6.00	4.50	.10000	.29472	.748	-.6576	.8576
		5.00	.02000	.29472	.949	-.7376	.7776
		5.50	-.06500	.29472	.834	-.8226	.6926
		6.50	-.11500	.29472	.712	-.8726	.6426
	6.50	4.50	.21500	.29472	.498	-.5426	.9726
		5.00	.13500	.29472	.666	-.6226	.8926

Dependent Variable	(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
		5.50	.05000	.29472	.872	-.7076	.8076
		6.00	.11500	.29472	.712	-.6426	.8726

* The mean difference is significant at the .05 level.

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4

2.1 อัตราการเขย่าที่เหมาะสม

ตารางที่ ค-3 การศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ethanol	Between Groups	9.012	3	3.004	21.079	.007
	Within Groups	.570	4	.143		
	Total	9.582	7			
yield	Between Groups	.001	3	.000	.596	.650
	Within Groups	.002	4	.000		
	Total	.002	7			
biomass	Between Groups	.279	3	.093	3.093	.152
	Within Groups	.120	4	.030		
	Total	.399	7			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) rpm	(J) rpm	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
ethanol		50.00	-.39000	.37751	.360	-1.4381	.6581
	0.00	100.00	-.59000	.37751	.193	-1.6381	.4581
		150.00	2.07500(*)	.37751	.005	1.0269	3.1231
		.00	.39000	.37751	.360	-.6581	1.4381
	50.00	100.00	-.20000	.37751	.624	-1.2481	.8481
		150.00	2.46500(*)	.37751	.003	1.4169	3.5131
		.00	.59000	.37751	.193	-.4581	1.6381
	100.00	50.00	.20000	.37751	.624	-.8481	1.2481
		150.00	2.66500(*)	.37751	.002	1.6169	3.7131
		.00	-2.07500(*)	.37751	.005	-3.1231	-1.0269
	150.00	50.00	-2.46500(*)	.37751	.003	-3.5131	-1.4169
		100.00	-2.66500(*)	.37751	.002	-3.7131	-1.6169
yield	0.00	50.00	-.01000	.02031	.648	-.0664	.0464
		100.00	-.01500	.02031	.501	-.0714	.0414
		150.00	.01000	.02031	.648	-.0464	.0664
	50.00	.00	.01000	.02031	.648	-.0464	.0664
		100.00	-.00500	.02031	.818	-.0614	.0514
		150.00	.02000	.02031	.381	-.0364	.0764
	100.00	.00	.01500	.02031	.501	-.0414	.0714
		50.00	.00500	.02031	.818	-.0514	.0614
		150.00	.02500	.02031	.286	-.0314	.0814
	150.00	.00	-.01000	.02031	.648	-.0664	.0464
		50.00	-.02000	.02031	.381	-.0764	.0364
		100.00	-.02500	.02031	.286	-.0814	.0314

Dependent Variable	(I) rpm	(J) rpm	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
biomass	0.00	50.00	.40500	.17342	.080	-.0765	.8865
		100.00	.05000	.17342	.787	-.4315	.5315
		150.00	-.08500	.17342	.650	-.5665	.3965
	50.00	.00	-.40500	.17342	.080	-.8865	.0765
		100.00	-.35500	.17342	.110	-.8365	.1265
		150.00	-.49000(*)	.17342	.048	-.9715	-.0085
	100.00	.00	-.05000	.17342	.787	-.5315	.4315
		50.00	.35500	.17342	.110	-.1265	.8365
		150.00	-.13500	.17342	.480	-.6165	.3465
	150.00	.00	.08500	.17342	.650	-.3965	.5665
		50.00	.49000(*)	.17342	.048	.0085	.9715
		100.00	.13500	.17342	.480	-.3465	.6165

* The mean difference is significant at the .05 level.

2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

ตารางที่ ค-4 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ethanol	Between Groups	5.153	1	5.153	103.058	.010
	Within Groups	.100	2	.050		
	Total	5.253	3			
yield	Between Groups	.001	1	.001	.309	.634
	Within Groups	.004	2	.002		
	Total	.005	3			

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
biomass	Between Groups	.002	1	.002	.028	.883
	Within Groups	.145	2	.072		
	Total	.147	3			

2.3 ระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม

ตารางที่ ค-5 การศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ethanol	Between Groups	10.890	3	3.630	9.200	.029
	Within Groups	1.578	4	.395		
	Total	12.468	7			
yield	Between Groups	.002	3	.001	.572	.663
	Within Groups	.005	4	.001		
	Total	.007	7			
biomass	Between Groups	.034	3	.011	.452	.730
	Within Groups	.100	4	.025		
	Total	.134	7			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
ethanol	12.00	24.00	-.29500	.62815	.663	-2.0390	1.4490
		36.00	-2.56500(*)	.62815	.015	-4.3090	-.8210
		48.00	-2.37000(*)	.62815	.020	-4.1140	-.6260
	24.00	12.00	.29500	.62815	.663	-1.4490	2.0390
		36.00	-2.27000(*)	.62815	.022	-4.0140	-.5260
		48.00	-2.07500(*)	.62815	.030	-3.8190	-.3310
	36.00	12.00	2.56500(*)	.62815	.015	.8210	4.3090
		24.00	2.27000(*)	.62815	.022	.5260	4.0140
		48.00	.19500	.62815	.772	-1.5490	1.9390
	48.00	12.00	2.37000(*)	.62815	.020	.6260	4.1140
		24.00	2.07500(*)	.62815	.030	.3310	3.8190
		36.00	-.19500	.62815	.772	-1.9390	1.5490
yield	12.00	24.00	.02000	.03446	.593	-.0757	.1157
		36.00	-.02500	.03446	.508	-.1207	.0707
		48.00	.00000	.03446	1.000	-.0957	.0957
	24.00	12.00	-.02000	.03446	.593	-.1157	.0757
		36.00	-.04500	.03446	.262	-.1407	.0507
		48.00	-.02000	.03446	.593	-.1157	.0757
	36.00	12.00	.02500	.03446	.508	-.0707	.1207
		24.00	.04500	.03446	.262	-.0507	.1407
		48.00	.02500	.03446	.508	-.0707	.1207
	48.00	12.00	.00000	.03446	1.000	-.0957	.0957
		24.00	.02000	.03446	.593	-.0757	.1157
		36.00	-.02500	.03446	.508	-.1207	.0707

Dependent Variable	(I) time	(J) time	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
biomass	12.00	24.00	-.04000	.15827	.813	-.4794	.3994
		36.00	-.11000	.15827	.525	-.5494	.3294
		48.00	-.17000	.15827	.343	-.6094	.2694
	24.00	12.00	.04000	.15827	.813	-.3994	.4794
		36.00	-.07000	.15827	.681	-.5094	.3694
		48.00	-.13000	.15827	.458	-.5694	.3094
	36.00	12.00	.11000	.15827	.525	-.3294	.5494
		24.00	.07000	.15827	.681	-.3694	.5094
		48.00	-.06000	.15827	.724	-.4994	.3794
	48.00	12.00	.17000	.15827	.343	-.2694	.6094
		24.00	.13000	.15827	.458	-.3094	.5694
		36.00	.06000	.15827	.724	-.3794	.4994

* The mean difference is significant at the .05 level.

3. การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 เมื่อมีการปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุ

3.1 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสม

ตารางที่ ค-6 การศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ethanol	Between Groups	142.524	6	23.754	500.688	.000
	Within Groups	.332	7	.047		
	Total	142.857	13			

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
yield	Between Groups	.137	6	.023	26.556	.000
	Within Groups	.006	7	.001		
	Total	.143	13			
biomass	Between Groups	5.033	6	.839	14.247	.001
	Within Groups	.412	7	.059		
	Total	5.445	13			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) sucrose type	(J) sucrose type	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
ethanol	10.00	20.00	-2.67000(*)	.21781	.000	-3.1850	-2.1550
		30.00	-4.25000(*)	.21781	.000	-4.7650	-3.7350
		40.00	-6.22000(*)	.21781	.000	-6.7350	-5.7050
		60.00	-8.98500(*)	.21781	.000	-9.5000	-8.4700
		80.00	-9.38000(*)	.21781	.000	-9.8950	-8.8650
		100.00	-3.06500(*)	.21781	.000	-3.5800	-2.5500
	20.00	10.00	2.67000(*)	.21781	.000	2.1550	3.1850
		30.00	-1.58000(*)	.21781	.000	-2.0950	-1.0650
		40.00	-3.55000(*)	.21781	.000	-4.0650	-3.0350
		60.00	-6.31500(*)	.21781	.000	-6.8300	-5.8000
		80.00	-6.71000(*)	.21781	.000	-7.2250	-6.1950
		100.00	-.39500	.21781	.113	-.9100	.1200
	30.00	10.00	4.25000(*)	.21781	.000	3.7350	4.7650
		20.00	1.58000(*)	.21781	.000	1.0650	2.0950
		40.00	-1.97000(*)	.21781	.000	-2.4850	-1.4550

Dependent Variable	(I) sucrose type	(J) sucrose type	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
		60.00	-4.73500(*)	.21781	.000	-5.2500	-4.2200
		80.00	-5.13000(*)	.21781	.000	-5.6450	-4.6150
		100.00	1.18500(*)	.21781	.001	.6700	1.7000
	40.00	10.00	6.22000(*)	.21781	.000	5.7050	6.7350
		20.00	3.55000(*)	.21781	.000	3.0350	4.0650
		30.00	1.97000(*)	.21781	.000	1.4550	2.4850
		60.00	-2.76500(*)	.21781	.000	-3.2800	-2.2500
		80.00	-3.16000(*)	.21781	.000	-3.6750	-2.6450
		100.00	3.15500(*)	.21781	.000	2.6400	3.6700
	60.00	10.00	8.98500(*)	.21781	.000	8.4700	9.5000
		20.00	6.31500(*)	.21781	.000	5.8000	6.8300
		30.00	4.73500(*)	.21781	.000	4.2200	5.2500
		40.00	2.76500(*)	.21781	.000	2.2500	3.2800
		80.00	-.39500	.21781	.113	-.9100	.1200
		100.00	5.92000(*)	.21781	.000	5.4050	6.4350
	80.00	10.00	9.38000(*)	.21781	.000	8.8650	9.8950
		20.00	6.71000(*)	.21781	.000	6.1950	7.2250
		30.00	5.13000(*)	.21781	.000	4.6150	5.6450
		40.00	3.16000(*)	.21781	.000	2.6450	3.6750
		60.00	.39500	.21781	.113	-.1200	.9100
		100.00	6.31500(*)	.21781	.000	5.8000	6.8300
	100.00	10.00	3.06500(*)	.21781	.000	2.5500	3.5800
		20.00	.39500	.21781	.113	-.1200	.9100
		30.00	-1.18500(*)	.21781	.001	-1.7000	-.6700
		40.00	-3.15500(*)	.21781	.000	-3.6700	-2.6400

Dependent Variable	(I) sucrose type	(J) sucrose type	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
yield	10.00	60.00	-5.92000(*)	.21781	.000	-6.4350	-5.4050
		80.00	-6.31500(*)	.21781	.000	-6.8300	-5.8000
		20.00	-.00500	.02928	.869	-.0742	.0642
		30.00	.01500	.02928	.624	-.0542	.0842
		40.00	.06000	.02928	.080	-.0092	.1292
		60.00	-.00500	.02928	.869	-.0742	.0642
		80.00	.02000	.02928	.516	-.0492	.0892
		100.00	.29000(*)	.02928	.000	.2208	.3592
	20.00	10.00	.00500	.02928	.869	-.0642	.0742
		30.00	.02000	.02928	.516	-.0492	.0892
		40.00	.06500	.02928	.062	-.0042	.1342
		60.00	.00000	.02928	1.000	-.0692	.0692
		80.00	.02500	.02928	.421	-.0442	.0942
		100.00	.29500(*)	.02928	.000	.2258	.3642
	30.00	10.00	-.01500	.02928	.624	-.0842	.0542
		20.00	-.02000	.02928	.516	-.0892	.0492
		40.00	.04500	.02928	.168	-.0242	.1142
		60.00	-.02000	.02928	.516	-.0892	.0492
		80.00	.00500	.02928	.869	-.0642	.0742
		100.00	.27500(*)	.02928	.000	.2058	.3442
	40.00	10.00	-.06000	.02928	.080	-.1292	.0092
		20.00	-.06500	.02928	.062	-.1342	.0042
		30.00	-.04500	.02928	.168	-.1142	.0242
		60.00	-.06500	.02928	.062	-.1342	.0042
		80.00	-.04000	.02928	.214	-.1092	.0292

Dependent Variable	(I) sucrose type	(J) sucrose type	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
		100.00	.23000(*)	.02928	.000	.1608	.2992
	60.00	10.00	.00500	.02928	.869	-.0642	.0742
		20.00	.00000	.02928	1.000	-.0692	.0692
		30.00	.02000	.02928	.516	-.0492	.0892
		40.00	.06500	.02928	.062	-.0042	.1342
		80.00	.02500	.02928	.421	-.0442	.0942
		100.00	.29500(*)	.02928	.000	.2258	.3642
	80.00	10.00	-.02000	.02928	.516	-.0892	.0492
		20.00	-.02500	.02928	.421	-.0942	.0442
		30.00	-.00500	.02928	.869	-.0742	.0642
		40.00	.04000	.02928	.214	-.0292	.1092
		60.00	-.02500	.02928	.421	-.0942	.0442
		100.00	.27000(*)	.02928	.000	.2008	.3392
	100.00	10.00	-.29000(*)	.02928	.000	-.3592	-.2208
		20.00	-.29500(*)	.02928	.000	-.3642	-.2258
		30.00	-.27500(*)	.02928	.000	-.3442	-.2058
		40.00	-.23000(*)	.02928	.000	-.2992	-.1608
		60.00	-.29500(*)	.02928	.000	-.3642	-.2258
		80.00	-.27000(*)	.02928	.000	-.3392	-.2008
biomass	10.00	20.00	-.02500	.24265	.921	-.5988	.5488
		30.00	-.82000(*)	.24265	.012	-1.3938	-.2462
		40.00	-.51500	.24265	.071	-1.0888	.0588
		60.00	-1.13500(*)	.24265	.002	-1.7088	-.5612
		80.00	-1.46500(*)	.24265	.001	-2.0388	-.8912
		100.00	-1.60000(*)	.24265	.000	-2.1738	-1.0262

Dependent Variable	(I) sucrose type	(J) sucrose type	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
	20.00	10.00	.02500	.24265	.921	-.5488	.5988
		30.00	-.79500(*)	.24265	.014	-1.3688	-.2212
		40.00	-.49000	.24265	.083	-1.0638	.0838
		60.00	-1.11000(*)	.24265	.003	-1.6838	-.5362
		80.00	-1.44000(*)	.24265	.001	-2.0138	-.8662
		100.00	-1.57500(*)	.24265	.000	-2.1488	-1.0012
	30.00	10.00	.82000(*)	.24265	.012	.2462	1.3938
		20.00	.79500(*)	.24265	.014	.2212	1.3688
		40.00	.30500	.24265	.249	-.2688	.8788
		60.00	-.31500	.24265	.235	-.8888	.2588
		80.00	-.64500(*)	.24265	.033	-1.2188	-.0712
		100.00	-.78000(*)	.24265	.015	-1.3538	-.2062
	40.00	10.00	.51500	.24265	.071	-.0588	1.0888
		20.00	.49000	.24265	.083	-.0838	1.0638
		30.00	-.30500	.24265	.249	-.8788	.2688
		60.00	-.62000(*)	.24265	.038	-1.1938	-.0462
		80.00	-.95000(*)	.24265	.006	-1.5238	-.3762
		100.00	-1.08500(*)	.24265	.003	-1.6588	-.5112
	60.00	10.00	1.13500(*)	.24265	.002	.5612	1.7088
		20.00	1.11000(*)	.24265	.003	.5362	1.6838
		30.00	.31500	.24265	.235	-.2588	.8888
		40.00	.62000(*)	.24265	.038	.0462	1.1938
		80.00	-.33000	.24265	.216	-.9038	.2438
		100.00	-.46500	.24265	.097	-1.0388	.1088

Dependent Variable	(I) sucrose type	(J) sucrose type	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
	80.00	10.00	1.46500(*)	.24265	.001	.8912	2.0388
		20.00	1.44000(*)	.24265	.001	.8662	2.0138
		30.00	.64500(*)	.24265	.033	.0712	1.2188
		40.00	.95000(*)	.24265	.006	.3762	1.5238
		60.00	.33000	.24265	.216	-.2438	.9038
		100.00	-.13500	.24265	.595	-.7088	.4388
	100.00	10.00	1.60000(*)	.24265	.000	1.0262	2.1738
		20.00	1.57500(*)	.24265	.000	1.0012	2.1488
		30.00	.78000(*)	.24265	.015	.2062	1.3538
		40.00	1.08500(*)	.24265	.003	.5112	1.6588
		60.00	.46500	.24265	.097	-.1088	1.0388
		80.00	.13500	.24265	.595	-.4388	.7088

* The mean difference is significant at the .05 level.

3.2 ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

ตารางที่ ค-7 การศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$)ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
etanol	Between Groups	4.332	3	1.444	.142	.934
	Within Groups	446.667	44	10.152		
	Total	450.999	47			

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
yield	Between Groups	.004	3	.001	.603	.617
	Within Groups	.109	44	.002		
	Total	.113	47			
biomass	Between Groups	.092	3	.031	.108	.955
	Within Groups	12.465	44	.283		
	Total	12.557	47			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) ammonium type	(J) ammonium type	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
etanol	0.00	0.50	-.51750	1.30074	.693	-3.1390	2.1040
		1.00	-.82250	1.30074	.530	-3.4440	1.7990
		1.50	-.30417	1.30074	.816	-2.9256	2.3173
	0.50	0.00	.51750	1.30074	.693	-2.1040	3.1390
		1.00	-.30500	1.30074	.816	-2.9265	2.3165
		1.50	.21333	1.30074	.870	-2.4081	2.8348
	1.00	0.00	.82250	1.30074	.530	-1.7990	3.4440
		0.50	.30500	1.30074	.816	-2.3165	2.9265
		1.50	.51833	1.30074	.692	-2.1031	3.1398
	1.50	0.00	.30417	1.30074	.816	-2.3173	2.9256
		0.50	-.21333	1.30074	.870	-2.8348	2.4081
		1.00	-.51833	1.30074	.692	-3.1398	2.1031
yield	0.00	0.50	.01750	.02031	.393	-.0234	.0584
		1.00	-.00333	.02031	.870	-.0443	.0376
		1.50	.01750	.02031	.393	-.0234	.0584

Dependent Variable	(I) ammonium type	(J) ammonium type	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
	0.50	0.00	-.01750	.02031	.393	-.0584	.0234
		1.00	-.02083	.02031	.311	-.0618	.0201
		1.50	.00000	.02031	1.000	-.0409	.0409
	1.00	0.00	.00333	.02031	.870	-.0376	.0443
		0.50	.02083	.02031	.311	-.0201	.0618
		1.50	.02083	.02031	.311	-.0201	.0618
	1.50	0.00	-.01750	.02031	.393	-.0584	.0234
		0.50	.00000	.02031	1.000	-.0409	.0409
		1.00	-.02083	.02031	.311	-.0618	.0201
biomass	0.00	0.50	-.01250	.21729	.954	-.4504	.4254
		1.00	-.05500	.21729	.801	-.4929	.3829
		1.50	-.11167	.21729	.610	-.5496	.3263
	0.50	0.00	.01250	.21729	.954	-.4254	.4504
		1.00	-.04250	.21729	.846	-.4804	.3954
		1.50	-.09917	.21729	.650	-.5371	.3388
	1.00	0.00	.05500	.21729	.801	-.3829	.4929
		0.50	.04250	.21729	.846	-.3954	.4804
		1.50	-.05667	.21729	.795	-.4946	.3813
	1.50	0.00	.11167	.21729	.610	-.3263	.5496
		0.50	.09917	.21729	.650	-.3388	.5371
		1.00	.05667	.21729	.795	-.3813	.4946

3.3 pH ที่เหมาะสม

ตารางที่ ค-8 การศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมสำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ethanol	Between Groups	33.990	4	8.497	36.244	.001
	Within Groups	1.172	5	.234		
	Total	35.162	9			
yield	Between Groups	.045	4	.011	14.597	.006
	Within Groups	.004	5	.001		
	Total	.049	9			
biomass	Between Groups	.375	4	.094	1.390	.357
	Within Groups	.337	5	.067		
	Total	.711	9			

Multiple Comparisons

Dependent Variable	(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
ethanol	4.50	5.00	-3.55000(*)	.48420	.001	-4.7947	-2.3053
		5.50	-4.68500(*)	.48420	.000	-5.9297	-3.4403
		6.00	-4.54000(*)	.48420	.000	-5.7847	-3.2953
		6.50	-1.38000(*)	.48420	.036	-2.6247	-.1353
	5.00	4.50	3.55000(*)	.48420	.001	2.3053	4.7947
		5.50	-1.13500	.48420	.066	-2.3797	.1097
		6.00	-.99000	.48420	.096	-2.2347	.2547
		6.50	2.17000(*)	.48420	.007	.9253	3.4147

Dependent Variable	(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
	5.50	4.50	4.68500(*)	.48420	.000	3.4403	5.9297
		5.00	1.13500	.48420	.066	-.1097	2.3797
		6.00	.14500	.48420	.777	-1.0997	1.3897
		6.50	3.30500(*)	.48420	.001	2.0603	4.5497
	6.00	4.50	4.54000(*)	.48420	.000	3.2953	5.7847
		5.00	.99000	.48420	.096	-.2547	2.2347
		5.50	-.14500	.48420	.777	-1.3897	1.0997
		6.50	3.16000(*)	.48420	.001	1.9153	4.4047
	6.50	4.50	1.38000(*)	.48420	.036	.1353	2.6247
		5.00	-2.17000(*)	.48420	.007	-3.4147	-.9253
		5.50	-3.30500(*)	.48420	.001	-4.5497	-2.0603
		6.00	-3.16000(*)	.48420	.001	-4.4047	-1.9153
yield	4.50	5.00	-.13000(*)	.02775	.005	-.2013	-.0587
		5.50	-.17000(*)	.02775	.002	-.2413	-.0987
		6.00	-.15000(*)	.02775	.003	-.2213	-.0787
		6.50	-.03500	.02775	.263	-.1063	.0363
	5.00	4.50	.13000(*)	.02775	.005	.0587	.2013
		5.50	-.04000	.02775	.209	-.1113	.0313
		6.00	-.02000	.02775	.503	-.0913	.0513
		6.50	.09500(*)	.02775	.019	.0237	.1663
	5.50	4.50	.17000(*)	.02775	.002	.0987	.2413
		5.00	.04000	.02775	.209	-.0313	.1113
		6.00	.02000	.02775	.503	-.0513	.0913
		6.50	.13500(*)	.02775	.005	.0637	.2063
	6.00	4.50	.15000(*)	.02775	.003	.0787	.2213
		5.00	.02000	.02775	.503	-.0513	.0913

Dependent Variable	(I) pH	(J) pH	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Upper Bound	Lower Bound
		5.50	-.02000	.02775	.503	-.0913	.0513
		6.50	.11500(*)	.02775	.009	.0437	.1863
	6.50	4.50	.03500	.02775	.263	-.0363	.1063
		5.00	-.09500(*)	.02775	.019	-.1663	-.0237
		5.50	-.13500(*)	.02775	.005	-.2063	-.0637
		6.00	-.11500(*)	.02775	.009	-.1863	-.0437
biomass	4.50	5.00	.35000	.25956	.235	-.3172	1.0172
		5.50	.30500	.25956	.293	-.3622	.9722
		6.00	.22000	.25956	.435	-.4472	.8872
		6.50	-.16000	.25956	.565	-.8272	.5072
	5.00	4.50	-.35000	.25956	.235	-1.0172	.3172
		5.50	-.04500	.25956	.869	-.7122	.6222
		6.00	-.13000	.25956	.638	-.7972	.5372
		6.50	-.51000	.25956	.107	-1.1772	.1572
	5.50	4.50	-.30500	.25956	.293	-.9722	.3622
		5.00	.04500	.25956	.869	-.6222	.7122
		6.00	-.08500	.25956	.757	-.7522	.5822
		6.50	-.46500	.25956	.133	-1.1322	.2022
	6.00	4.50	-.22000	.25956	.435	-.8872	.4472
		5.00	.13000	.25956	.638	-.5372	.7972
		5.50	.08500	.25956	.757	-.5822	.7522
		6.50	-.38000	.25956	.203	-1.0472	.2872
	6.50	4.50	.16000	.25956	.565	-.5072	.8272
		5.00	.51000	.25956	.107	-.1572	1.1772
		5.50	.46500	.25956	.133	-.2022	1.1322
		6.00	.38000	.25956	.203	-.2872	1.0472

3.4 การฆ่าเชื้อในอาหาร

ตารางที่ ค-9 การศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารต่อการผลิตเอทานอล

ANOVA

		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
ethanol	Between Groups	7.317	1	7.317	36.783	.026
	Within Groups	.398	2	.199		
	Total	7.715	3			
yield	Between Groups	.008	1	.008	81.000	.012
	Within Groups	.000	2	.000		
	Total	.008	3			
biomass	Between Groups	.490	1	.490	10.595	.083
	Within Groups	.093	2	.046		
	Total	.583	3			

ภาคผนวก ง

1. การเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer กับ เครื่อง Gas chromatography (GC)

ตารางที่ ง-1 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer กับ เครื่อง Gas chromatography ที่ระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	เอทานอลวัดด้วยเครื่อง Ebulliometer %(v/v)	เอทานอลวัดด้วยเครื่อง Gas chromatography %(v/v)
12	0.53	1.10
24	0.56	1.16
36	0.85	1.33
48	0.83	1.35

การยืนยันผลโดยการวัดค่าเอทานอลที่แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ผลิตได้ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC) ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 200 องศาเซลเซียส โดยการเลือกเอาตัวอย่างเอทานอลของการศึกษาหาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z4 ไปทำการตรวจวัด ซึ่งผลจากการตรวจวัดค่าเอทานอลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ ง-1 พบว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC ให้ค่าเอทานอลมากกว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง Ebulliometer ของทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจวัด และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนความต่างระหว่างการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC กับ การตรวจวัดด้วยเครื่อง Ebulliometer พบว่า มีค่าความแตกต่างเท่ากับ 0.54 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวฟางทิพย์ ทองศรี

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010920020

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ จากเงินรายได้ สัญญาเลขที่ ENV512201002S มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2551

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

ฟางทิพย์ ทองศรี ธันวดี เตชะภัททวรกุล สุขสาโรจน์ และ ดวงพร คันธโชติ. 2552. การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุ. การประชุมวิชาการทางวิศวกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ครั้งที่ 7. 21-22 พฤษภาคม 2552.