การผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

Ethanol Production from Expired Carbonated Soft Drink Using *Saccharomyces cerevisiae*

รัชนีกร หมวดพล

Ratchaneekon Muadpon

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 การผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *Saccharomyce scerevisiae*
ผู้เขียน นางสาวรัชนีกร หมวดพล
สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	**คณะกรรมการสอบ**
……	……...ประธานกรรมการ
(ดร.ธันวดี เตชะภัททวรกุล)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ)
	…….....กรรมการ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา)
……	…….....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)	(ดร.ธันวดี เตชะภัททวรกุล)
	…….....กรรมการ
	(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม

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

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ผู้เขียน นางสาวรัชนีกร หมวดพล

สาขาวิชา การจัดการสิ่งแวดล้อม

ปีการศึกษา 2552

บทคัดย่อ

จากสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณสูง จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมัก เมื่อทำการศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (S_1) โดยใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสม ได้แก่ น้ำอัดลมหมดอายุเจือจางให้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่สภาวะดังกล่าวยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 1.17 โดยปริมาตร หรือ 9.02 กรัมต่อลิตร มีผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 0.384 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และมีปริมาณมวลชีวภาพเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเอทานอลที่ตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง Ebulliometer กับค่าที่ตรวจวัดได้ด้วยเครื่อง Gas Chromatography (GC) พบว่าการตรวจวัดหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC ให้ปริมาณเอทานอลมากกว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง Ebulliometer ของทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจวัด โดยเฉลี่ยร้อยละ 0.23±0.024 โดยปริมาตร

ซึ่งจากผลการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* (S_1) พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับผลงานวิจัยที่ผ่านมา ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) ในการผลิตเอทานอลด้วยเพื่อยืนยันผลความเป็นไปได้ในการใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน โดยใช้สูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมจากการศึกษาผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ผลการศึกษาพบว่า เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) สามารถทนต่อความเข้มข้นที่น้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุได้สูงกว่ายีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 98 กรัมต่อลิตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดร้อยละ 6.17 โดยปริมาตร หรือ 48.72 กรัมต่อลิตร มีผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 0.504 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และมีปริมาณมวลชีวภาพเท่ากับ 5.97 กรัมต่อลิตร การศึกษานี้ยังได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของวิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในน้ำอัดลมหมดอายุด้วยหม้อฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอ

น้ำ และการเติมสารเคมี Potassium metabisulfite (KMS) ต่อประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของเชื้อยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการศึกษาพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ไม่สามารถต้านทานต่อสาร KMS ที่ความเข้มข้นทดสอบ (200 ppm) โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าว เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ไม่สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ แต่สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักที่ฆ่าเชื้อด้วยการเติมสาร KMS (200 ppm) และฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำมีค่าไม่แตกต่างกัน (ร้อยละ 1.57 โดยปริมาตร หรือ 12.37 กรัมต่อลิตร)

คำสำคัญ: เอทานอล, น้ำอัดลมหมดอายุ, *Saccharomyces cerevisiae*

Thesis Title	Ethanol Production from Expired Carbonated Soft Drink Using *Saccharomyces cerevisiae*
Author	Miss. Ratchaneekon Muadpon
Major Program	Environmental Management
Academic Year	2009

ABSTRACT

From the characteristic of expired carbonated soft drink that contains high sugarconcentration, it is possible to use this wastewater as a carbon source for ethanol production. The culture broth composition prepared from expired carbonated soft drink and culture condition for ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* (S_1) were optimized. The results showed the appropriate culture broth and culture condition for *S. cerevisiae* (S_1) were the diluted expired carbonated soft drink contained initial sugar concentration of 25 g/L, added 0.1 g/L of $(NH_4)_2SO_4$, adjusted initial pH to be 5.0, incubated at 30 ^{o}C and 100 revolutions per minute of agitation rate for 48 hr. With these appropriate conditions, *S. cerevisiae* (S_1) yielded highest ethanol production by 1.17 %(v/v) or 9.02 g/L with 0.384 g ethanol/g sugar in Yp/s and the biomass obtained was 1.2 g/L. The ethanol concentration in samples were measured by Ebulliometer and the values obtained from Ebulliometer were compared with the values analyzed by Gas chromatography (GC). It was found that the ethanol concentration in each sample analyzed by GC was higher than that obtained from ebulliometer measure obtained ment by 0.23 $\pm$ 0.024 %(v/v)

Tthe ethanol production from *S. cerevisiae* (S_1) fermentation in this study was low in comparing with other studies. Therefore other isolate, *S. cerevisiae* (S_2) was also studied. The culture broth composition and culture condition used for *S. cerevisiae* (S_2) was the condition optimized from the previous study with *S. cerevisiae* (S_1). The results showed *S. cerevisiae* (S_2) could tolerate to higher initial sugar concentration than *S. cerevisiae* (S_1). *S. cerevisiae* (S_2) could produced ethanol in the non-diluted expired carbonated soft drink contained the initial sugar concentration of 98 g/L. This culture yielded 6.17 %(v/v) or 48.72 g/L of ethanol, 0.504 g/g of Yp/s and 5.97 g/L of biomass. In addition, this study also investigated the effect of autoclaving and using Potassium metabisulfite (KMS) on ethanol production. It was

found that *S. cerevisiae* (S_1) could not tolerate to KMS at 200 ppm whereas the ethanol production of *S. cerevisiae* (S_2) in autoclaved culture did not different from that produced by the culture decontaminated with 200 ppm of KMS (1.57 %(v/v) or 12.37 g/L).

Key words: Ethanol, expired carbonated soft drink, *Saccharomyces cerevisiae*

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีด้วยความช่วยเหลือจากหลายๆท่าน ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณ ดร.ธันวดี เตชะภัทวรกุล สุขสาโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และรองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา คำชี้แนะแนวทางในการทำวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทาน แก้ไข จึงทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุวิทย์ สุวรรณโณ ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการสอบ ทั้งนี้ได้ให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไข จึงทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นุกูล อินทระสังขา และ ดร.ปิยะรัตน์ บุญแสวง ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ ทั้งนี้ได้ให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไข จึงทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องตรวจวัดปริมาณเอทานอล (Ebuliometer) และเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สำหรับใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ บริษัท หาดทิพย์ จำกัด (มหาชน) ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุและข้อมูลที่เป็นประโยชน์ ทำให้การทำวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณทุนจากบัณฑิตวิทยาลัย และทุนอุดหนุนการวิจัยประเภทพัฒนานักวิจัย สัญญาเลขที่ ENV512201002S มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2551

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ-คุณแม่ เป็นอย่างสูงที่สนับสนุนเงินทุนในการศึกษาตลอดจนให้ความรัก ความห่วงใย และเป็นกำลังใจเสมอมา

รัชนีกร หมวดพล

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพ	(11)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	33
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	33
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	34
3. ผลการทดลองและวิจารณ์	41
4. สรุปผลการทดลอง	79
ข้อเสนอแนะ	80
เอกสารอ้างอิง	81
ภาคผนวก	92
ประวัติผู้เขียน	137

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1-1	จุลินทรีย์ผลิตเอทานอล	25
3-1	สมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุ	41
3-2	การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	44
3-3	การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	49
3-4	การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้น 4.0, 4.5 และ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	53
3-5	การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	58
3-6	การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	62
3-7	การหมักเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง	66

3-8 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer กับเครื่อง Gas chromatography 69

3-9 การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 72

3-10 ผลการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) จากการผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 กำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยหม้อฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ และการเติม KMS 200 ppm จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 77

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
1-1	โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล	6
1-2	การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล	9
1-3	การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล	10
1-4	การไฮโดรไลซีสน้ำตาลซูโครส	10
1-5	การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร	13
1-6	แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*	29
1-7	การผลิตเอทานอลจากกลูโคสโดย Emboden-meyerhof-parns pathway	32
3-1	ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	45
3-2	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	46
3-3	ปริมาณเอทานอลและผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	50
3-4	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	51

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3-5	ผลของ pH ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	54
3-6	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	55
3-7	ผลของอัตราการเขย่าต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	59
3-8	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในสภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	60
3-9	ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	63

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3-10	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในสภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	64
3-11	ผลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง	67
3-12	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง	68
3-13	ผลการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	73
3-14	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	74

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ในสภาวะปัจจุบันประเทศไทยประสบปัญหาเกี่ยวกับพลังงานและเชื้อเพลิง เนื่องจากความต้องการน้ำมันเชื้อเพลิงเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานมีปริมาณสูง และมีแนวโน้มที่จะสูงมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เป็นพลังงานในการขับเคลื่อนรถยนต์ ซึ่งในอนาคตอาจเกิดวิกฤตการขาดแคลนได้ การแก้ปัญหาในเรื่องพลังงานจึงเป็นเรื่องสำคัญ และได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก โดยเฉพาะการหาแหล่งพลังงานทดแทน เอทานอลเป็นแหล่งพลังงานทดแทนอย่างหนึ่งที่มีศักยภาพสูง เพราะเป็นพลังงานสะอาดไม่ก่อให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อม และสามารถใช้ประโยชน์จากเอทานอลได้ในหลายรูปแบบ เช่น ใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยตรงเพื่อทดแทนน้ำมันเบนซิน และน้ำมันดีเซล ใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน เรียกว่า แก๊สโซฮอล์ (Gasohol) หรือผสมกับน้ำมันดีเซล เรียกว่า ดีโซฮอล์ (Desohol) ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกแทนในน้ำมันให้กับเครื่องยนต์ เป็นต้น

เอทานอลสามารถผลิตได้จาก 2 วิธี คือ วิธีสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) โดยกระบวนการคะตะลิสต์ของเอทิลีน และวิธีกระบวนการหมัก (Fermentation) โดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล ซึ่งในปัจจุบันเอทานอลที่ผลิตส่วนใหญ่ได้จากกระบวนการหมัก คิดเป็นประมาณร้อยละ 95 ของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลก สำหรับการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมัก สามารถแบ่งวัตถุดิบที่นำมาผลิตออกเป็น 3 ประเภท คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง และวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส โดยวัตถุดิบประเภทแป้ง และวัตถุดิบประเภทเซลลูโลส จะต้องผ่านขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบให้อยู่ในรูปของน้ำตาลที่เชื้อจุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในกิจกรรมการหมักได้ สำหรับวัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น น้ำอ้อย กากน้ำตาล และบีชน้ำตาล เป็นต้น วัตถุดิบประเภทนี้สามารถดำเนินการหมักได้ง่าย โดยเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตและผลิตเป็นเอทานอลได้โดยตรง

สำหรับน้ำอัดลมหมดอายุ หมายถึง น้ำอัดลมที่หมดอายุด้วยระยะเวลา หรือหมดอายุจากการที่ผลิตออกมาแล้วมีปริมาณน้ำตาล หรือมีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ไม่ได้มาตรฐาน ซึ่งทางบริษัทฯผู้ผลิตที่เป็นผู้รับผิดชอบไม่สามารถปล่อยทิ้งลงสู่ธรรมชาติได้โดยตรง และไม่สามารถกำจัดด้วยระบบบำบัดน้ำเสียได้โดยทันที เนื่องด้วยคุณลักษณะของน้ำอัดลม

หมดอายุที่ประกอบด้วยน้ำตาลปริมาณสูง และมีความแตกต่างจากน้ำเสียจากกระบวนการผลิต อีกทั้งมีข้อจำกัดในการรับภาระบรรทุกของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน การกำจัดของบริษัทฯผู้ผลิตน้ำอัดลมกรณีศึกษาที่ดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน คือ การสร้างถังเก็บกักน้ำอัดลมหมดอายุขนาดใหญ่แล้วจึงสูบปล่อยเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียทีละปริมาณน้อยๆ ทำให้สิ้นเปลืองพื้นที่ในการเก็บกัก และต้องเฝ้าระวังการกัดกร่อนของถังเก็บอีกด้วย ดังนั้นหากมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำเอาน้ำอัดลมหมดอายุ ซึ่งจัดเป็นวัตถุดิบประเภทน้ำตาลมาใช้เป็นสารตั้งต้นในผลิตเอทานอล ผลจากการศึกษาอาจใช้เป็นแนวทางในการจัดการของเสีย และได้ผลพลอยได้ที่มีมูลค่าคือ เอทานอล ซึ่งอาจพัฒนาเป็นกระบวนการผลิตที่สร้างรายได้ให้แก่บริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลมอีกทางหนึ่ง

สำหรับงานวิจัยนี้ มุ่งเน้นศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสม และหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการผลิตเอทานอล โดยใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน เพื่อเป็นการนำเอาของเสียกลับมาใช้ประโยชน์ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีมูลค่า

การตรวจเอกสาร

1. น้ำอัดลม

1.1 ความหมายของน้ำอัดลม

น้ำอัดลม หมายถึง เครื่องดื่มที่ผสมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสามารถแบ่งน้ำอัดลมออกเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทไม่มีการผสมน้ำหวานหรือโซดา และประเภทที่มีการผสมน้ำหวาน ปรุงแต่งกลิ่น และรสชาติ

1.2 ประเภทของน้ำอัดลม (เนตรนภิส วัฒนสุชาติ, 2535)

หากแบ่งประเภทของน้ำอัดลมตามระบบตลาดที่มีการซื้อขายในปัจจุบัน สามารถแบ่งน้ำอัดลมออกเป็น 3 ประเภท ได้แก่

1.2.1 เครื่องดื่มประเภทน้ำดำ (Black carbonated drinks) หมายถึง น้ำอัดลมชนิดโคล่า

1.2.2 เครื่องดื่มประเภทน้ำสี (Fruit flavoured drinks) หมายถึง น้ำอัดลมที่มีการผสมน้ำหวาน และแต่งสี เช่น น้ำแดง น้ำเขียว และน้ำส้ม ซึ่งน้ำอัดลมประเภทน้ำสียังแบ่งออกเป็น ชนิดอัดก๊าซ และไม่อัดก๊าซ

1.2.3 เครื่องดื่มประเภทไม่มีสี (Lime drinks) หมายถึง น้ำอัดลมที่ไม่แต่งสี ได้แก่ สไปรท์ และเซเว่นอัพ

1.3 ส่วนประกอบของน้ำอัดลม (เฉลา ศรีทวี, 2535)

1.3.1 น้ำ ต้องเป็นน้ำที่สะอาดอาจใช้น้ำประปา หรือน้ำบาดาลที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีน

1.3.2 สารให้ความหวาน ได้แก่ น้ำตาลทราย (ซูโครส) ร้อยละ 10.5-14 ซึ่งในอดีตการผลิตน้ำอัดลมชนิดธรรมดาจะใช้น้ำตาลทรายเพียงอย่างเดียวนำมาผสมน้ำจากนั้นต้มเป็นน้ำเชื่อมและกรอง แต่ในปัจจุบันมีการใช้สารให้ความหวานตัวอื่นเพิ่มเข้ามา เช่น น้ำเชื่อมข้าวโพด (Corn syrup) และน้ำเชื่อมข้าวโพดแบบฟรุคโตสสูง (High fructose corn syrup)

1.3.3 สารปรุงแต่งหรือหัวน้ำเชื้อ เป็นส่วนผสมของสารที่ให้กลิ่น สี และกรดบางชนิดที่ใช้ในอาหาร เช่น กรดมะนาว

1.3.4 ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เติมเพื่อทำให้เกิดฟอง ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นก๊าซไม่มีสี และกลิ่น

นอกจากนี้น้ำอัดลมยังประกอบด้วยสารปรุงแต่ง กลิ่น สี รส วัตถุกันเสีย และบางชนิดมีการเติมคาเฟอีนเป็นส่วนประกอบด้วย

1.4 อุตสาหกรรมน้ำอัดลมในประเทศไทย

การผลิตน้ำอัดลมมีขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศไทยในสมัยพระบาทสมเด็จพระจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 4 การผลิตน้ำอัดลมดังกล่าวไม่มีการปรุงแต่ง กลิ่น และรสชาติ เรียกว่า น้ำโซดา ต่อมาได้มีการทำน้ำอัดลมโดยการปรุงแต่ง กลิ่น และเติมรสชาติของน้ำมะนาว และมีการอัดก๊าซ เช่นเดียวกับโซดา ต่อมาในสมัยพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 5 ได้มีการผลิตน้ำอัดลมโดยชาวยุโรปและชาวจีน แต่ยังไม่แพร่หลายในประเทศไทย และหลังการเปลี่ยนแปลงการปกครองในปี พ.ศ. 2475 รัฐบาลได้อนุญาตให้เอกชนผลิตเบียร์ไทยขึ้น และมีการผลิตน้ำโซดารวมทั้งน้ำหวานด้วย การผลิตน้ำอัดลมประเภทผสมน้ำหวานในสมัยเริ่มแรกเป็นน้ำหวานสีต่างๆ ผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บรรจุขวดอย่างง่ายๆ ออกจำหน่ายในปริมาณไม่มาก หลังจากสงครามโลกครั้งที่ 2 สิ้นสุดลง จึงเริ่มมีการพัฒนาอุตสาหกรรมน้ำอัดลม เนื่องจากความต้องการในการบริโภคของทหารต่างชาติที่เข้ามาอยู่ในประเทศไทย เพื่อเข้าร่วมกับการแก้ไขวิกฤติการณ์ยุ่งยากในแถบอินโดจีน ประกอบกับผู้บริโภคน้ำอัดลมต้องการบริโภคน้ำอัดลมที่มีคุณภาพ และถูกสุขลักษณะ จึงทำให้เกิดโรงงานน้ำอัดลมเพิ่มขึ้น และแพร่หลายไปทั่วประเทศจนถึงปัจจุบัน (เนตรนภิส วัฒนสุชาติ, 2535)

1.5 สภาพตลาดน้ำอัดลมในประเทศไทย

อุตสาหกรรมน้ำอัดลมในประเทศไทย มีผู้ผลิตทั้งสิ้น 9 ราย แต่มีผู้ประกอบการรายใหญ่เพียง 2 รายเท่านั้น คือ บริษัทไทยน้ำทิพย์จำกัด (มหาชน) ผลิตน้ำอัดลมโดยใช้เครื่องหมายการค้า โคคา-โคล่า แฟนต้า และสไปร์ท และบริษัทเสริมสุขจำกัด (มหาชน) ซึ่งใช้เครื่องหมายการค้า เป๊ปซี่ มิรินด้า และเซเว่นอัพ ซึ่งสัดส่วนการครองตลาดของบริษัทรายใหญ่ 2 รายนี้รวมกันคิดเป็นร้อยละ 90 ของตลาดทั้งหมด ดังนั้นอุตสาหกรรมน้ำอัดลมจึงมีลักษณะเป็นตลาดผู้ขายน้อยราย (Oligopoly) ถึงแม้จะไม่มีการกีดกัน หรือจำกัดโควต้าจากภาครัฐในการเข้าตลาด แต่ด้วยเป็นอุตสาหกรรมที่ต้องลงทุนสูงจึงไม่ค่อยมีผู้ประกอบรายใหม่ที่เข้ามาในตลาด สินค้าในตลาดมีลักษณะคล้ายๆ กัน หรือสามารถทดแทนกันได้ในสายตาของผู้บริโภค ผู้ประกอบการจึง

ต้องสร้างความแตกต่างให้กับผลิตภัณฑ์ของตนเอง ด้วยการผลิตสินค้าตัวใหม่ออกสู่ตลาดอยู่เสมอ เพื่อครองส่วนแบ่งการตลาด

1.6 กรรมวิธีผลิตน้ำอัดลม (เฉลา ศรีทวี, 2535)

โรงงานผลิตน้ำอัดลมในประเทศไทยมีอยู่หลายโรงงาน ซึ่งโรงงานที่ผลิตน้ำอัดลมประเภทโคคา-โคล่า มีจำนวน 5 โรงงาน วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ประกอบด้วย น้ำสะอาด น้ำตาล หัวน้ำเชื้อสำเร็จ (Concentrate base) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยกรรมวิธีหลักในการผลิตน้ำอัดลมเหมือนกัน ทั้งนี้อาจมีความแตกต่างกันในขั้นตอนการเตรียมน้ำสะอาด เนื่องจากแหล่งน้ำดิบที่นำมาใช้มีความแตกต่างกัน

สำหรับแหล่งน้ำดิบที่เป็นน้ำบาดาลต้องผ่านการปรับปรุงคุณภาพน้ำขั้นต้นก่อน โดยการเติมออกซิเจนเพื่อแยกสารละลายเหล็กออกจากน้ำดิบและเติมคลอรีนเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วผ่านการกรองด้วยถังกรองทราย จากนั้นจึงผ่านการปรับคุณภาพน้ำอีกครั้งโดยการใช้สารเคมี ได้แก่ $FeSO_4$ $Ca(OH)_2$ และ $Ca(OCl)_2$ หลังจากนั้นผ่านการกรองเพื่อแยกตะกอนที่ยังแขวนลอยด้วยถังกรองทรายและผ่านถังกรองเพื่อกำจัดสี กลิ่น และคลอรีนที่ตกค้างในน้ำ ซึ่งน้ำจากขั้นตอนนี้ต้องผ่านถังกรองละเอียดอีกครั้งเพื่อกรองสิ่งเจือปนเล็กๆ ขนาดต่ำกว่า 10 ไมครอน

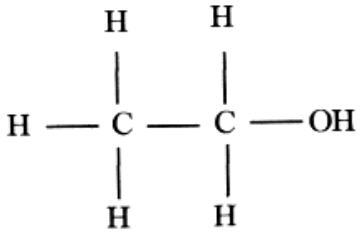
น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ ถูกผสมกับน้ำที่สะอาดแล้วในถังต้มที่มีอุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียสเพื่อละลายน้ำตาลและฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นน้ำตาลจะถูกกรองและทำให้เย็นแล้วฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลตอีกครั้งหนึ่ง ก่อนที่นำไปผสมกับน้ำเชื้อสำเร็จ เพื่อผลิตเป็นน้ำเชื้อสำเร็จรูป (Finished syrup)

น้ำเชื้อสำเร็จส่งไปผสมกับน้ำสะอาด ทำให้เย็นและอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้วบรรจุขวดโดยเครื่องบรรจุขวดอัตโนมัติ พร้อมทั้งปิดฝาทันที แล้วผ่านการตรวจสอบทุกขั้นตอนเพื่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่สม่ำเสมอและดีเยี่ยม ภาชนะบรรจุมีทั้งกระป๋องและขวด ซึ่งขวดที่ใช้มีทั้งชนิดที่ใช้แล้วทิ้ง (One-way bottles) และชนิดหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ (Returnable bottles) สำหรับขวดชนิดที่หมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่เป็นขวดแก้ว ต้องผ่านการล้างอย่างดี โดยผ่านเครื่องล้างขวดอัตโนมัติซึ่งภายในมีอุณหภูมิสูง และมีสารทำความสะอาด ได้แก่ โซดาไฟ และฟอสเฟต ช่วยในการล้างด้วย นอกจากนี้มีการฉีดทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดหลายครั้งก่อนนำออกมาจากเครื่องล้าง และมีการตรวจสอบก่อนผ่านเข้าเครื่องบรรจุ

2 เอทานอล (Ethanol)

2.1 สมบัติทางเคมี

เอทานอล (Ethanol) หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH น้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 จุดเดือดประมาณ 78 องศาเซลเซียส เป็นของเหลวใสไม่มีสี ระเหยง่าย ติดไฟง่ายให้เปลวไฟสีน้ำเงินไม่มีควัน จุดหลอมเหลวอยู่ที่ -115 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นที่ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.789 (รำไพ ศิริมนกุล, 2534) ให้ค่าพลังงานความร้อน (Calorific value) โดยการเผาไหม้ประมาณ 12,800 บีทียูต่อปอนด์ (Zoecklein *et al.,* 1995) และสามารถละลายในน้ำและสารละลายอื่นๆได้ดี เช่น เมทธิลแอลกอฮอล์ อีเธอร์ และคลอโรฟอร์ม เอทานอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (OH - group) ดังแสดงในภาพที่ 1-1



ภาพที่ 1-1 โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล
ที่มา :. http//www.mail.vcharkarn.com

2.2 ประโยชน์ของเอทานอล

2.2.1 ใช้เป็นเชื้อเพลิง (Fuel) (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

เพื่อให้ความร้อน (Heat) ในการเผาไหม้เอทิลแอลกอฮอล์นั้นไม่มีกลิ่นและสี ให้ค่าพลังงานความร้อนประมาณ 7,100 แคลอรีต่อกรัม

เพื่อให้แสงสว่าง (Light) แอลกอฮอล์ยังสามารถใช้ประโยชน์ในที่ที่กระแสไฟฟ้าเข้าไม่ถึง ซึ่งจะให้แสงสว่างเป็น 3 เท่าครึ่งของแรงเทียน

เพื่อให้พลังงาน (Power absolute alcohol) โดยนำมาผสมกับน้ำมันเพื่อใช้สำหรับการเผาไหม้เครื่องยนต์

ข้อดีของเอทานอลสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิง คือ เอทานอลเป็นของเหลวใช้ได้ทันทีต่างกับปิโตรเลียมที่ต้องการกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ที่ซับซ้อน สามารถผลิตจากทรัพยากรธรรมชาติที่สร้างขึ้นมาทดแทนได้หลายชนิด ช่วยแก้ปัญหาเกี่ยวกับราคาผลผลิตทางการเกษตรบางชนิด และการเผาไหม้ของเอทานอลนั้นสะอาดกว่าการเผาไหม้ของน้ำมันเบนซิน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540) ซึ่งจะช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ และสารไฮโดรคาร์บอนที่เกิดจากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์เป็นการช่วยลดมลพิษในอากาศ (Wyman, 1996) โดยการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงช่วยลดปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ได้ถึงร้อยละ 60-90 ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นี้เป็นตัวการสำคัญที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์เรือนกระจก นอกจากนี้เอทานอลมีความเป็นพิษต่ำสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติจึงไม่เกิดการสะสม (Mcmillan, 1997) และพบว่ามีการใช้เอทานอลเป็นสารป้องกันการกระตุกของเครื่องยนต์แทนการใช้สารตะกั่วซึ่งก่อเกิดมลพิษอีกด้วย (Anon, 1996)

Zaldivar และคณะ (2001) ได้เปรียบเทียบการใช้เอทานอลกับการใช้น้ำมันเบนซิน ในแง่ของประสิทธิภาพ เนื่องจากเอทานอลให้ค่าออกเทนที่สูงกว่าน้ำมันเบนซินจึงเป็นจุดเสริมให้การใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงในเครื่องยนต์มีประสิทธิภาพสูงกว่า นอกจากนี้การที่แรงดันในการระเหย และความร้อนของการระเหยเอทานอลสูงกว่าน้ำมันเบนซินจะเป็นการช่วยเพิ่มพลังให้เครื่องยนต์ด้วย

ถึงอย่างไรก็ตามการเผาไหม้เอทานอลก็มีข้อเสียตรงที่จะทำให้ได้ปริมาณสารกลุ่มอัลดีไฮด์ (Aldehyde) โดยเฉพาะอะซิตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำมันเบนซิน ปัจจุบันการใช้เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงให้แก่เครื่องยนต์เบนซินและดีเซลสามารถทำได้ดังนี้ สำหรับเครื่องยนต์เบนซินสามารถใช้เอทานอลร้อยละ 95 ล้วนเป็นเชื้อเพลิงแทนน้ำมันเบนซินได้แต่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์เล็กน้อย (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540) หรือใช้เอทานอลร้อยละ 85 ผสมกับน้ำมันเบนซินแทนโดยไม่ต้องดัดแปลงเครื่องยนต์ และมีความสิ้นเปลืองเชื้อเพลิงในระดับเดียวกับการใช้น้ำมันเบนซิน สำหรับเครื่องยนต์ดีเซลสามารถใช้เอทานอลแทนน้ำมันดีเซลได้ (Mielenz, 2001) หรือใช้เชื้อเพลิงทั้งสองชนิดร่วมกันโดยวิธีป้อนเชื้อเพลิงทั้งสองชนิดเข้าเครื่องยนต์คนละทาง เนื่องจากเอทานอลไม่สามารถผสมกับน้ำมันดีเซลได้ ปัจจุบันพบว่าสามารถใช้เอทานอลและน้ำมันดีเซลอัตราร้อยละ 50 : 50 เป็นเชื้อเพลิงได้เป็นอย่างดี (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

2.2.2 ใช้ประโยชน์ทั่วไป (General utilities) เช่น ใช้ในโรงพยาบาล และใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไปสำหรับทำความสะอาด

2.2.3 ใช้เป็นตัวทำละลาย (Solvent) แอลกอฮอล์ใช้เป็นตัวทำละลายได้อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้กับพวก Dye nitrocellulose และ Lacquers processes

2.2.4 ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการเตรียมสารเคมีอื่นๆ (Raw material in chemical processes) เช่น Ethylene และ Polyethylene เป็นต้น (ณัฐกิตต์ ธรรมเจริญ, 2543)

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) และวิธีการหมัก (Fermentation) วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีเป็นการใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์เอทานอลซึ่งมีเอทิลีน (Ethylene) เป็นวัตถุดิบ โดยการนำเอาเอธิลีนซึ่งเป็นก๊าซที่เป็นผลพลอยได้จากการกลั่นน้ำมันดิบมาทำปฏิกิริยากับกรดกำมะถันจะได้สารผสมของเอธิลซัลเฟต (Ethylsulphate) จากนั้นนำไปไฮโดรไลซ์ (Hydrolyze) จนได้เอทานอลกับกรดกำมะถันเจือจาง แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่นอีกครั้งหนึ่ง นอกจากนี้ยังสามารถสังเคราะห์ได้โดยการนำเอาเอธิลีนมาทำปฏิกิริยาไฮเดรชัน (Hydration) โดยมีกรดฟอสฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Catalyst) (วิมล วิริยะวิทย์, 2526) ดังแสดงในสมการที่ (1)

$$\underset{\text{เอธิลีน}}{CH_2 = CH_2} + H_2O \text{ ----------> } \underset{\text{เอทานอล}}{CH_3CH_2OH} \qquad (1)$$

สำหรับการผลิตเอทานอลโดยวิธีการหมักจะอาศัยเอนไซม์ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ช่วยให้เกิดปฏิกิริยาโดยเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบได้เป็นเอทานอล ซึ่งในปัจจุบันเอทานอลที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะมาจากวิธีการหมัก คิดเป็นประมาณ 95 ของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลก (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540) โดยวิธีการหมักสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ ขั้นวัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ ขั้นตอนการหมัก และขั้นตอนการกลั่น ซึ่งในแต่ละขั้นตอนจะมีผลต่อคุณภาพของเอทานอลที่จุลินทรีย์ผลิตได้ (กมลศักดิ์ ตั้งธรรมเนียม, 2540)

2.3.1 วัตถุดิบ

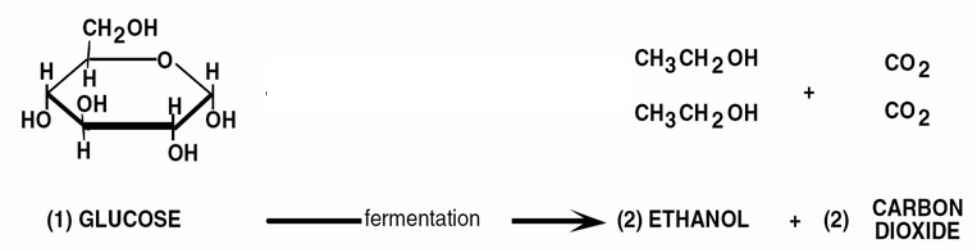
วัตถุดิบส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการหมักเป็นวัตถุดิบทางการเกษตร ซึ่งเอทานอลที่ได้เรียกว่า ไบโอเอทานอล (Bio-ethanol) สามารถแบ่งวัตถุดิบได้เป็น 3 ประเภท คือ

1) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำอ้อย กากน้ำตาล และน้ำตาลจากหัวบีช เป็นต้น โดยจุลินทรีย์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้โดยตรง ซึ่งขั้นตอนที่จุลินทรีย์เปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายเป็นเอทานอล ดังแสดงในสมการที่ (2)

$$C_6H_{12}O_6 + \text{ยีสต์} \text{ ----------> } 2C_2H_5OH + 2CO_2 + \text{พลังงาน} \quad (2)$$

Glucose Ethanol

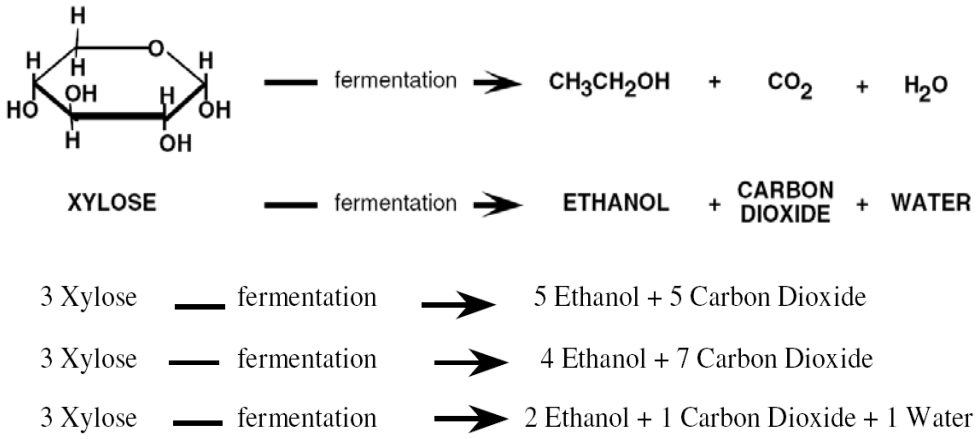
การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเอทานอล ของน้ำตาลแต่ละประเภท พบว่าน้ำตาลแต่ละประเภทเมื่อนำมาหมักเป็นเอทานอลจะได้ปริมาณเอทานอล และผลผลิตอื่นๆที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น กลูโคส 1 โมเลกุล เมื่อนำมาหมักเป็นเอทานอล จะได้เอทานอล 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล (Murphy and Mcarthy, 2005) ดังแสดงในภาพที่ 1-2



ภาพที่ 1-2 การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล

ที่มา : Murphy and Mccarthy (2005)

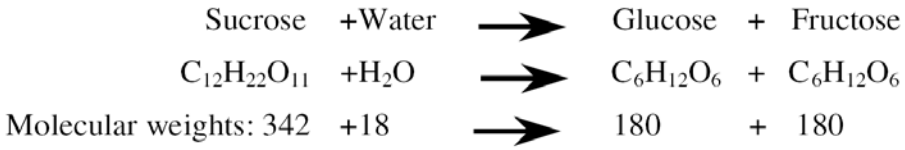
ส่วนน้ำตาล Xylose เมื่อนำมาหมักจะเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ และน้ำ ส่วนเอทานอลที่ได้ขึ้นอยู่กับสภาวะ และสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ ดังแสดงในภาพที่ 1-3



ภาพที่ 1-3 การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลไซโลสเป็นเอทานอล

ที่มา : Murphy and McCarthy (2005)

นอกจากน้ำตาล Glucose และ Xylose แล้วยังมีน้ำตาล Fructose ที่สามารถหมักเป็นเอทานอล ซึ่งน้ำตาล Fructose เกิดจากการไฮโดรไลซีสน้ำตาล Sucrose ดังแสดงในภาพที่ 1-4 น้ำตาล Fructose มีสูตรโมเลกุลเหมือนกับ Glucose แต่มีสูตรโครงสร้างแตกต่างกัน เพราะฉะนั้นการหมักน้ำตาล Fructose 1 โมเลกุล จะเปลี่ยนได้เอทานอลเหมือนกับน้ำตาล Glucose



ภาพที่ 1-4 การไฮโดรไลซีสน้ำตาลซูโครส

ที่มา : Murphy and McCarthy (2005)

2) วัตถุดิบประเภทแป้ง

วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น ในการผลิตเอทานอลนั้น แป้งในวัตถุดิบจะต้องถูกย่อยสลาย (Starch hydrolysis) เป็นน้ำตาล

โมเลกุลเดี่ยวก่อน จุลินทรีย์จึงสามารถเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นเอทานอลได้ ซึ่งการย่อยแป้งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

2.1) ขั้นตอนที่ 1 เป็นการย่อยครั้งแรกหรือการทำให้เหลว (Liquefaction) ขั้นตอนนี้จะใช้กรดหรือเอนไซม์กลุ่มแอลฟาอะมิเลส (α-Amylase) ที่มีกิจกรรมการย่อยแป้งที่อุณหภูมิสูงประมาณ 80-95 องศาเซลเซียส ให้ได้โมเลกุลขนาดเล็กลงและมีความหนืดลดลง ซึ่งของเหลวที่ได้ เรียกว่า เด็กซ์ทริน (Krishna and Chowdary, 2001)

2.2) ขั้นตอนที่ 2 เป็นการย่อยครั้งสุดท้ายหรือการทำให้หวาน (Saccharification) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (Glucoamylase) ย่อยเด็กซ์ทรินให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงปานกลาง คือ ประมาณ 55-65 องศาเซลเซียส (Punnapayak and Emert, 1986 อ้างโดย ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2551

3) วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทเซลลูโลสส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย และวัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ ซึ่งขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

3.1) เป็นขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบ แบ่งได้เป็น 4 วิธี ดังนี้

- วิธีทางกายภาพ เป็นการปรับสภาพโดยการลดขนาดของวัตถุดิบและทำให้เส้นใยเซลลูโลสมีขนาดเล็กลงเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยา เช่น การบด และการใช้ความร้อน โดยเป็นการทำลายความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มประสิทธิภาพการย่อยสลายได้ (Sun and Cheng, 2002)

- วิธีทางเคมี เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยการใช้สารละลายกรด เช่น กรดซัลฟิวริก และ กรดไฮโดรคลอริก ซึ่งจากการศึกษาเตรียมฟางข้าวด้วยการต้มฟางข้าวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ในสารละลายกรดซัลฟิวริก ความเข้มข้นร้อยละ 0.75 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นใช้ฟางข้าวที่เตรียมแล้ว เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลพบว่า ให้ผลผลิตเอทานอลได้ 19 ± 1 กรัมต่อลิตร และให้ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อสารตั้งต้น 0.24 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล นอกจากปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดแล้วยังปรับได้ด้วยสารละลายด่าง และตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารออกซิแดนท์ (Saha *et al.,* 2005)

- วิธีทางเคมีกายภาพ เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี โดยการระเบิดด้วยไอน้ำ วิธีนี้วัตถุดิบจะถูกเตรียมที่ความดันไอน้ำสูง แล้วลด

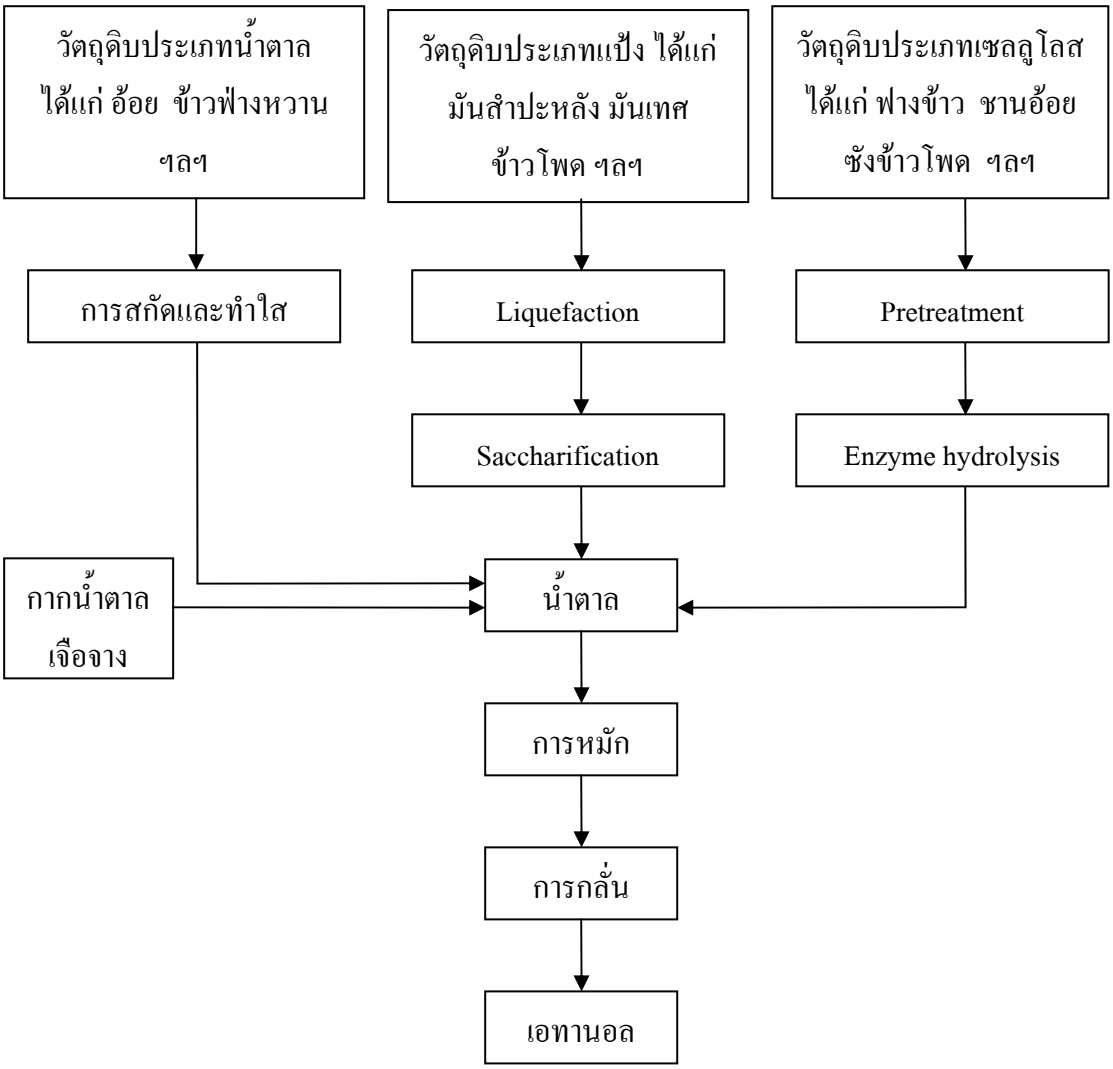
ความดันอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้วัตถุดิบเกิดการสลายตัว การระเบิดด้วยไอน้ำจะเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 160-260 องศาเซลเซียส ความดัน 0.69-4.83 MPa เป็นเวลาสองหรือสามนาที หลังจากนั้นนำออกมาที่อุณหภูมิปกติ (Sun and Cheng, 2002)

- วิธีทางชีวภาพ เป็นการใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้เปลี่ยนอยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก ข้อได้เปรียบของการเตรียมด้วยวิธีทางชีวภาพ คือ ใช้พลังงานต่ำและใช้สภาวะแวดล้อมธรรมดา แต่การไฮโดรไลซีสด้วยจุลินทรีย์ หรือวิธีทางชีวภาพนั้นให้ผลผลิตต่ำมาก

3.2) ขั้นตอนที่ 2 การย่อย แบ่งได้เป็น 2 วิธี ดังนี้

- การย่อยด้วยสารเคมี สามารถทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสโดยตรง แต่ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย เพราะมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้น โดยน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาต่อไปทำให้ได้ผลพลอยได้อื่นๆ เช่น Furfural และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสทำให้ได้ผลผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ สำหรับกรดที่ใช้ในวิธีนี้ได้แก่ กรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 70 ขึ้นไป หรือกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ 40 ขึ้นไป และในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160 องศาเซลเซียส ซึ่งปฏิกิริยาเกิดรุนแรงและไม่เฉพาะเจาะจง โดยภาชนะที่ใช้ต้องทนต่อการกัดกร่อนจึงมีราคาแพง นอกจากนี้น้ำทิ้งจากการย่อยก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมเพราะมีกรดเจือปน (อรุณวรรณ นุชพ่วง, 2547)

- การย่อยด้วยเอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิด เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีนที่มีอัตราส่วนของคาร์โบไฮเดรตต่อโปรตีนเท่ากับ 1 : 1 ละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการโคเฟคเตอร์ โดยทั่วไปเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงาน คือ 50 องศาเซลเซียส แต่อาจจะต่ำหรือสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาผลิต (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534) โดยเอนไซม์มีความคงทนต่อสารเคมีได้ดี มีเพียงอิออนของปรอทที่สามารถยับยั้งการทำงานได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนโลหะอื่นๆ เช่น เงิน ทองแดง และสังกะสี มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อย (วรรณภา ยงสุวรรณไพศาล, 2546)



ภาพที่ 1-5 การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร
ที่มา : เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ และคณะ (2548)

2.3.2 การหมัก

การหมักเอทานอลที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์กัน มีผลให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีต่างกันและปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่างกัน

การหมักเอทานอลเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล ด้วยยีสต์หรือแบคทีเรีย โดยการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (Anaerobic condition) สามารถเจริญได้ในน้ำหมักที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 14-15 โดยปริมาตร โดยมีความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล ดังแสดงในสมการที่ (3)

$C_6H_{12}O_6$ ----------> 2 CH_3CH_2OH + 2 CO_2 + 28.7 KCAL (3)

กลูโคส เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

100 51.1 48.9

จากสมการเคมีพบว่า ตามทฤษฎีแล้วในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของยีสต์นั้น น้ำตาลกลูโคส 100 กรัม ถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 51.1 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม นอกจากนั้นยังมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้นอีก 28.7 กิโลแคลอรี่ แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่นๆ เช่น อะเซตัลดีไฮด์ กรดอะซีติก กรดแลกติก และกลีเซอรอล หรือใช้ในการสร้างเซลล์ และการเจริญเติบโตของยีสต์ด้วย (Zoecklein *et al.,* 1995)

2.3.2.1 วิธีการหมักแอลกอฮอล์

การหมักแอลกอฮอล์เป็นกรรมวิธีที่รู้จักกันมานาน เนื่องจากปัญหาพลังงานทำให้เทคโนโลยีการผลิตแอลกอฮอล์ก้าวหน้าไปอย่างมาก มีการค้นคว้าวิจัยหลายแนวทาง โดยมีวิธีการที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ก็เพื่อหาทางลดต้นทุนการผลิตลงให้มากที่สุด เทคโนโลยีการหมักแอลกอฮอล์สามารถแบ่งออกเป็น

1) การหมักแบบกะ (Batch fermentation)

เป็นการหมักที่ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ภายในระบบปิด และต้องมีการเตรียมเชื้อเริ่มต้นใหม่ทุกครั้ง การเลี้ยงเชื้อนิยมทำในขวดเขย่าหรือในถังหมัก โดยควบคุมสารอาหารและสภาวะต่างๆ เช่น อุณหภูมิ และความเป็นกรด-ด่างให้มีเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต สารอาหารที่ใช้ในระบบจะมีปริมาณจำกัด เนื่องจากไม่มีการเติมสารอาหารเพิ่มเข้าไป ทำให้ภาวะในระบบมีการเปลี่ยนแปลง สารอาหารถูกใช้หมดไป ความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลง และมีการสร้างผลิตภัณฑ์และสารอื่นๆ ออกมา เช่น เอทานอล (Prescott and Dunn, 1959)

1.1) ข้อดีของการหมักแบบกะ

- เหมาะกับการผลิตที่มีปริมาตรไม่มากนัก
- กระบวนการจัดการการผลิตง่ายไม่ซับซ้อน
- มีความเสี่ยงต่อความเสียหายต่ำ
- ง่ายต่อการควบคุมให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดช่วงการหมัก
- ลดความเสี่ยงต่อการเกิดการกลายพันธุ์ของจุลินทรีย์ เนื่องจากมีระยะเวลาในการหมักสั้น

1.2) ข้อเสียของการหมักแบบกะ

ต้องเตรียมยีสต์เริ่มต้นและวัตถุดิบทุกครั้งของการหมักแต่ละชุด ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก

ต้องเสียเวลาเพื่อให้ยีสต์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง

2) การหมักแบบกึ่งกะ (Fed-batch fermentation)

การเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบกึ่งกะ เป็นการเพาะเลี้ยงแบบกะที่มีการเติมสารอาหารเข้าไปอย่างต่อเนื่อง หรือเป็นระยะๆ หลังจากที่ใส่เชื้อเริ่มต้นแล้ว โดยไม่มีการถ่ายอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแล้วออกซึ่งจะแตกต่างจากการเลี้ยงเซลล์แบบกะโดยปริมาตรของอาหารในการหมักแบบกึ่งกะจะเพิ่มขึ้นตลอดเวลาไม่คงที่ ส่วนการเลี้ยงแบบต่อเนื่องนั้นปริมาตรของอาหารจะคงที่ แม้ว่าจะเติมอาหารด้วยปริมาตรเท่าใดอาหารเก่าพร้อมกับเซลล์จุลินทรีย์ก็ถูกดึงออกมาด้วยปริมาตรเท่ากันภายในเวลาเดียวกัน ปัจจุบันเทคนิคการเลี้ยงเซลล์แบบกึ่งกะนิยมนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ ได้แก่ การผลิตเพนนิซิลิน การผลิตยีสต์ทำขนมปัง การผลิตสุราในประเทศไทย และการผลิตเอทานอลในบราซิล เป็นต้น (Echegaray *et al.*, 2000)

2.1) ข้อดีของการหมักแบบกึ่งกะ

- ลดปัญหาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จากสับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งจากการศึกษาของ (Rickard, 1978) พบว่าถ้าใช้น้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้นสูง ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดจะต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมน้ำตาลครั้งละเล็กน้อย และการเติมน้ำตาลครั้งละน้อย บ่อยครั้งมากก็จะทำให้มีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตรอดมากขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Limtong (1987) ได้ทำเปรียบเทียบระหว่างการใช้เทคนิคการหมักแบบกะและการหมักแบบกึ่งกะในการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลพบว่า การหมักแบบกึ่งกะให้ผลการผลิตเอทานอลสูงกว่าการหมักแบบกะ และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นร้อยละ 10-14 เมื่อค่อยๆเติมน้ำตาลซูโครส (Krauter *et al.*, 1987) เช่นเดียวกับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลซึ่งได้จากหัวบีชที่ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่า เมื่อนำมาทดลองหมักแบบกึ่งกะให้ผลผลิตเอทานอลดีกว่าการหมักแบบกะ(Roukas, 1996)

- สามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆได้

- สามารถผลิตเซลล์ได้จำนวนมากกว่าการเลี้ยงเซลล์แบบกะ

- ช่วยลดความหนืดของอาหารโดยจุลินทรีย์ ซึ่งสารที่ทำให้เกิดความหนืดของอาหาร ได้แก่ Dextran Pullulan และ Xanthan gum เราสามารถควบคุมความหนืดของน้ำหมักโดยการค่อยๆ เติมสารอาหารอย่างต่อเนื่อง ซึ่งหากความหนืดเพิ่มมากขึ้นมีผลต่อระบบการเติม

อากาศ เช่น ใบพัดกวนต้องใช้กำลังไฟฟ้าเพิ่มขึ้นเกิดฟองมากขึ้น ทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ (กลยุทธ โชติพัฒนา และนิสิต ตัณฑวิเชฐ, 2535)

2.2) ข้อเสียของการหมักแบบกึ่งกะ

- อุปกรณ์การเพาะเลี้ยงค่อนข้างมีความซับซ้อน และมีราคาสูง

3) การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด ซึ่งจำนวนจุลินทรีย์จะถูกรักษาให้อยู่ในระดับสมดุลโดยการกำจัดน้ำหมักออกไปบางส่วนแล้วแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ในอัตราการไหลเดียวกันของระบบ

3.1) ข้อดีของการหมักแบบต่อเนื่อง

- สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้
- สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของมวลชีวภาพให้คงที่
- สามารถศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนพารามิเตอร์ทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่

3.2) ข้อเสียของการหมักแบบต่อเนื่อง

- การหมักในช่วงเวลานานอาจทำให้เกิดปัญหาการปนเปื้อนได้
- การเจริญแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานานอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ซึ่งอาจทำให้เกิดการแทนที่ของสายพันธุ์อื่นที่เจริญได้เร็ว

2.3.2.2 ปัจจัยที่จำเป็นและมีผลต่อการผลิตเอทานอล

เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการหมักที่ดี และได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดจึงจำเป็นต้องมีแหล่งอาหารและสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการทำงานของยีสต์ในระหว่างการหมัก ดังนี้

1) แหล่งอาหารของยีสต์

1.1) แหล่งคาร์บอน (Carbon source)

แหล่งคาร์บอนหรือแหล่งน้ำตาลที่หาได้ง่าย ได้แก่ กากน้ำตาล น้ำอ้อย ข้าวฟ่างหวาน และน้ำตาลจากหัวบีช น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ ได้แก่ แป้งมันชนิดต่างๆรวมทั้งมันสำปะหลัง ข้าวโพด และธัญพืชต่างๆ น้ำตาลที่ได้จากการย่อยเซลลูโลสด้วยกระบวนการชีวเคมีหรือกระบวนการเคมี ได้แก่ น้ำตาลจากกระดาษ จากใยต้นพืช และขี้เลื่อย (Karsch *et al.,* 1983) ซึ่งยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้โดยใช้แหล่งคาร์บอนจากน้ำตาลได้หลากหลายชนิด และเมื่อพิจารณาจากกระบวนการชีวเคมีในการผลิตเอทานอลพบว่า

น้ำตาลที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอล ได้แก่ กลูโคสและฟรุกโตส โดยทั้งสองน้ำตาลให้ผลผลิตไม่แตกต่างกัน (Prior *et al.,* 1989)

1.2) แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sourec)

ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของยีสต์และเป็นสับสเตรทสำหรับการสังเคราะห์โปรตีนทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นจึงเป็นส่วนสำคัญที่จะกระตุ้นการหมักหรือการผลิตเอทานอล โดยเซลล์ยีสต์มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักแห้งโดยส่วนใหญ่ยีสต์จะสามารถใช้ไนโตรเจนได้ทั้งในรูปของของสารอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะมิโน และโปรตีนชนิดต่างๆ (เทพปัญญา เจริญรัตน์, 2544) ส่วนแหล่งไนโตรเจนจากสารอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียม ไนเตรท และแอมโมเนีย ซึ่งอาจใช้อยู่ในรูปของก๊าซ หรือสารละลายแอมโมเนียความเข้มข้นร้อยละ 25 สำหรับอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลพบว่า แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ ได้แก่ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต เนื่องจากมีราคาถูกและเป็นแหล่งกำมะถันไปพร้อมกัน

1.3) แหล่งฟอสฟอรัส (Phosphorus source)

ฟอสฟอรัสเป็นธาตุที่จำเป็นต่อกระบวนการหมักเอทานอล โดยยีสต์ใช้ฟอสเฟตในการสร้างพลังงานในรูป ATP สังเคราะห์นิวคลีโอโปรตีนภายในเซลล์ การแตกตัวของฟอสเฟตจะทำให้เกิดสภาพบัฟเฟอร์ (Buffer) ซึ่งช่วยรักษาค่า pH ให้คงที่ และกรณีที่เซลล์ของยีสต์ขาดฟอสเฟตเซลล์จะอ่อนแอ โดยทั่วไปยีสต์จะใช้ฟอสฟอรัสในรูปเกลือฟอสเฟต ซึ่งใช้ในความเข้มข้นประมาณ 0.6 มิลลิโมล (เทพปัญญา เจริญรัตน์, 2544)

1.4) แหล่งกำมะถัน (Sulphur source)

กำมะถันเป็นธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ โดยเซลล์ยีสต์มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบประมาณร้อยละ 0.4 โดยน้ำหนักเซลล์แห้ง ซึ่งพบว่าแหล่งกำมะถันที่ยีสต์ใช้ได้ดี คือ เกลือซัลเฟตในรูปแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งมีราคาถูกและเป็นแหล่งไนโตรเจนไปพร้อมกัน (Lucero *et al.,* 2000)

1.5) แร่ธาตุอื่นๆ (Trace element)

แร่ธาตุที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและกระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์สามารถแบ่งออกเป็น 3 พวก ได้แก่ (Karsch *et al.,* 1983)

1. Macroelements ได้แก่ K, Mg, Zn, Fe, Mn และ Cl โดยยีสต์ต้องการประมาณ 10-100 มิลลิโมล และแร่ธาตุเหล่านี้จะเข้าสู่เซลล์ยีสต์โดยอาศัย Facilitated diffusion

2. Microelements ได้แก่ Co, B, Cd, Cr, Cu, I, Mo, Ni และ Va ซึ่งยีสต์ต้องการประมาณ 10-100 มิลลิโมล

3. Inhibitors ได้แก่ Ag, As, Bd, Mg, Li, Os, Pd, Se และ Te แร่ธาตุเหล่านี้เมื่อมีความเข้มข้นสูงกว่า 10-100 มิลลิโมล จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโต และการผลิตเอทานอลของยีสต์

แหล่งอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นที่นิยมมากที่สุดในการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ คือ Glucose medium ซึ่งมีส่วนผสมของ Yeast extract Ammonium sulphate และ Magnesium sulphate แต่สิ่งสำคัญที่ต้องพิจารณาในการเลือกใช้แหล่งอาหารที่ดีและมีความเหมาะสม คือ ต้องพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิต ความรู้เกี่ยวกับกลไกในการผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ และงานวิจัยสนับสนุนที่ผ่านมาด้วย (เทพปัญญา เจริญรัตน์, 2544)

2) สภาวะแวดล้อมที่จำเป็นต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์

การหมักเชิงอุตสาหกรรมต้องมีการควบคุมสิ่งแวดล้อมของการหมักในทุกขั้นตอนเพื่อให้ประสิทธิภาพการหมักสูงสุด ทั้งนี้ต้องมีความสอดคล้องกับคุณลักษณะสายพันธุ์ของยีสต์ที่ใช้ด้วย ดังนี้

2.1) จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น

จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้น หมายถึง มวลชีวภาพที่ใส่ลงไปในถังหมักเมื่อเริ่มต้นกระบวนการผลิต หากพิจารณาผลกระทบของการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักต่อผลผลิตเอทานอล ต้องพิจารณาถึงเอทานอลที่ผลิตได้โดยจะพิจารณาเฉพาะที่ถูกปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ (Extracellular) อยู่ในสารละลาย ถ้าเป็นเช่นนี้พบว่าประสิทธิภาพของการหมักเอทานอลจะลดลงเมื่อเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้หมัก แต่หากพิจารณาเอทานอลที่อยู่ภายในเซลล์ (Intracellular) ร่วมด้วยพบว่า จำนวนจุลินทรีย์หมักไม่มีความสัมพันธ์กับผลผลิตเอทานอล D'Amor *et al.* (1989) และ Borzani (2006) ได้เปรียบเทียบการใช้เชื้อ *S. diastaticus* NO.62 เริ่มต้นในปริมาณที่ต่างกัน ได้แก่ ร้อยละ 0.35, 1, 2 และ 3.5 มาผลิตเอทานอลจากกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่ายีสต์มีการเจริญและมีการผลิตเอทานอลได้ใกล้เคียงกันทุกระดับที่ทำการศึกษาที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 70, 78, 82 และ 80 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

2.2) ชนิดและความเข้มข้นของน้ำตาล

ในสภาพการหมักที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ดี แต่ความเข้มข้นน้ำตาลสูงเกินขีดจำกัดระดับหนึ่ง คือ ประมาณร้อยละ 22 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลาย จะเกิดการรบกวนการเจริญเติบโตของยีสต์ การหมักจะเป็นไปอย่างเชื่องช้าและไม่สมบูรณ์ ทำให้เกิดกรดแลคติก กรดน้ำส้ม และสารอินทรีย์ต่างๆขึ้นได้

ซึ่งส่วนมากจะเกิดในบรรยากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยปกติแล้วกระบวนการหมักเอทานอลจะใช้ความเข้มข้นของน้ำตาลไม่เกินร้อยละ 18 โดยน้ำหนักต่อปริมาตรสารละลาย เพื่อให้การเจริญเติบโตของยีสต์เป็นไปโดยปกติและได้เอทานอลในปริมาณสูงเหมาะแก่การนำไปกลั่นคือประมาณร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก พบว่าอัตราการหมักของยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* จะลดลงเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกิน 200 กรัมต่อลิตร หรือประมาณ 20 บริกส์ (โชคชัย วนภู และคณะ, 2546) แต่ถ้ามีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของถังหมัก เช่นการตรึงเซลล์มีผลทำให้ยีสต์ *S. cerevisiae* ต้านทานต่อความเข้มข้นน้ำตาลตั้งต้นได้สูงขึ้น (Najafpour *et al.,* 2004)

2.3) ระดับอุณหภูมิ

อุณหภูมิมีความสำคัญต่อการหมักเอทานอล โดยการหมักเอทานอลที่มีอัตราการหมักสูง จะมีความร้อนเกิดขึ้นในอัตราที่สูงเช่นกัน ในขั้นตอนระหว่างการหมักจะมีพลังงานความร้อนที่ปลดปล่อยออกจากปฏิกิริยาสูงถึง 149.5 แคลอรี่ต่อกรัมซูโครส ซึ่งความร้อนที่เกิดขึ้นนี้จะมีผลกระทบต่อการเจริญของยีสต์ด้านสรีระวิทยาของเซลล์ โดยมีผลทำให้อัตราการใช้น้ำตาลของยีสต์ลดลงเนื่องจากการดูดซึมไนโตรเจนลดลง (Amerine *et al.,* 1980) Nagodawithana *et al.,* (1974) พบว่ายีสต์จะมีการรอดชีวิตต่ำลงเมื่ออุณหภูมิการหมักสูงถึง 40 องศาเซลล์เซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นจะเกิดการสะสมของเอทานอลในเซลล์มากขึ้น ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนไปส่งผลให้การทำงานของเซลล์เสียไป (Lucero *et al.,* 2000) และอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักยังมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในอาหารที่ใช้หมักอีกด้วย โดยที่อุณหภูมิสูงจะมีการระเหยของเอทานอลและเกิดฟองมาก นอกจากนี้เมื่ออุณหภูมิการหมักสูงขึ้นจะมีการสร้างสารเมแทบอไลต์อื่นๆ เช่น กลีเซอรอล ซัคซิเนต กรดอะซีติก และอะซิตัลดีไฮด์ เพิ่มขึ้นทำให้ผลผลิตเอทานอลลดลง (Torija *et al.,* 2003 อ้างโดย ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546)

ปัจจัยสำคัญที่จุลินทรีย์สามารถทนต่ออุณหภูมิได้มากน้อยต่างกันมีหลายประการ เช่น การสังเคราะห์เอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ กลไกการควบคุมภายในเซลล์ การถ่ายทอด Anabolic information จากยีสต์ไปยังไรโบโซม การนำอาหารเข้ามาภายในเซลล์ และองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น (Rose, 1971)

อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับยีสต์ที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมอยู่ในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส (Kadar *et al.,* 2004) และยีสต์สามารถทนได้ถึง 37 องศาเซลเซียส หากอุณหภูมิสูงกว่า 37 องศาเซลเซียส อัตราการหมักจะค่อยๆลดลง อาจทำให้เกิดปัญหาแบคทีเรียเจริญขึ้นมามากเกินไป เป็นผลให้ยีสต์ไม่สามารถเจริญต่อไปได้ และเมื่ออุณหภูมิสูงกว่า 43 องศาเซลเซียส การหมักเกือบจะไม่เกิดขึ้นเลย (เทพอำนวย ชื่นมุนีวงศ์ และพุทธพล วสันตดิลก,

2533 อ้างโดย ธีรพร กงบังเกิด, 2546) ดังนั้นในอุตสาหกรรมการหมักเอทานอลจึงต้องมีระบบหล่อเย็น (Cooling system) เข้ามาช่วยเพื่อลดอุณหภูมิในระหว่างการหมักซึ่งจะต้องลดอุณหภูมิของถังหมักลง และรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 32-33 องศาเซลเซียส ด้วยวิธีการต่างๆ เช่น พ่นน้ำให้เป็นฝอยทั่วผิวนอกของถังหมัก หรือใช้ Cooling coil ในถังหมัก เป็นต้น (Nagodawithana *et al.*, 1974)

2.4) ค่าพีเอช (pH)

pH มีความสำคัญในการหมักเอทานอล เนื่องจาก pH มีผลต่ออัตราการหมัก การสร้างผลผลิตพลอยได้ ตลอดจนการควบคุมจุลินทรีย์ปนเปื้อน โดยปกติยีสต์สามารถเจริญได้ในสภาพการหมักเอทานอลที่มี pH ในช่วง 3.5-7.0 (Underkofler and Hickley, 1954) แต่สำหรับยีสต์สายพันธุ์ *S. cerevisiae* สามารถเจริญได้ดีในสภาพการหมักเอทานอลที่ pH ช่วง 2.4 - 8.6 (Roukas, 1994) การเลือก pH ที่ใช้ในการหมักซึ่งไม่มีระบบควบคุม pH ระหว่างการหมักนั้นขึ้นอยู่กับ Buffer capacity ของอาหารที่ใช้ในหมักเพื่อให้อยู่ในสภาวะ pH ที่ยีสต์สามารถเกิดการหมักได้ตลอดกระบวนการหมัก เนื่องจากในระหว่างการหมักเอทานอลจะมีการสร้างกรดเกิดขึ้นโดยยีสต์ด้วย โดยทั่วไปช่วง pH ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของยีสต์ หรือนิยมใช้ในการหมักเอทานอลจะอยู่ในช่วง 4.0-4.5 (Krishna *et al.,* 1998 อ้างโดย ยุทธิศักดิ์ สุบการี, 2551) หรือช่วง pH 4.0-5.0 (Underkofler and Hickley, 1954) โดยทั่วไปจะปรับ pH ด้วยกรดซัลฟิวริก หรือกรดแลคติก (Roukas, 1994)

2.5) ความเข้มข้นของเอทานอล

โดยทั่วไปการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์จะถูกยับยั้งด้วยเอทานอล จากผลการศึกษาการหมักเอทานอลด้วยน้ำอ่อนพบว่า ปริมาณเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.6 โดยน้ำหนัก ไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ แต่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.85 โดยน้ำหนัก มีผลต่อการเจริญของยีสต์ โดยเอทานอลมีบทบาทไปยับยั้งการสังเคราะห์กรดไรโบนิวคลีอิกและโปรตีน ส่งผลทำให้อัตราการเจริญลดลง และการที่เซลล์ยีสต์ตายเกิดจากปฏิกิริยาที่เอทานอลทำให้โปรตีนในเซลล์เสื่อมสภาพ ส่วนการยับยั้งการหมักโดยเอทานอลนั้นมีการตั้งสมมุติฐานว่าเอทานอลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสียหายหรือมีคุณสมบัติเปลี่ยนแปลงไป เช่น คุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านทำให้เกิดการรั่วไหลของอิออนต่างๆในเซลล์ (Holzberg *et al.,* 1967)

นอกจากนี้ระดับการยับยั้งยังสัมพันธ์กับสภาวะแวดล้อมอื่นๆอีกด้วย โดยเฉพาะเมื่อมีน้ำตาลความเข้มข้นสูงและอุณหภูมิสูงทำให้การยับยั้งรุนแรงขึ้น โดยยีสต์ทั่วไปถูกยับยั้งการเจริญเมื่อความเข้มข้นเอทานอลประมาณร้อยละ 14 โดยน้ำหนัก (โชคชัย วนภู และคณะ, 2546) สำหรับ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อเอทานอลได้ดี โดยพบว่าสามารถทนต่อปริมาณเอทานอลได้ถึงร้อยละ 21 โดยน้ำหนัก (Walker, 1998) เชื่อกันว่าความทนต่อเอทานอลของยีสต์นั้น

เนื่องจากองค์ประกอบส่วนที่เป็นไขมันพวกสเตอรอล และฟอสโฟลิปิด รวมทั้งคาร์โบไฮเดรตที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่ช่วยป้องกันการผ่านเข้าออกและส่งเสริมการขับ (Excretion) เอทานอลออกจากเซลล์ ทำให้ปริมาณเอทานอลที่เป็นพิษภายในเซลล์ลดลง (Thomas and Rose, 1978) และพบว่าการเติมกรดไขมันและสเตอรอล ช่วยเสริมให้ยีสต์ทนต่อเอทานอลได้มากขึ้น ซึ่ง Watson (1982) รายงานว่า *S. cerevisiae* ที่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวเป็นองค์ประกอบในฟอสโฟลิปิดของเยื่อหุ้มเซลล์จะทนความเข้มข้นของเอทานอลสูง โดยเซลล์ที่มีเออร์กอสเตอรอล (Ergosterol) ต่ำแต่มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวสูงและจะผลิตเอทานอลได้สูงถึงร้อยละ 13-15.5 โดยน้ำหนัก

2.6) ปริมาณออกซิเจน

ในขั้นตอนการเตรียมหัวเชื้อออกซิเจนมีความสำคัญมาก เนื่องจากยีสต์ใช้ออกซิเจนในการหายใจเพื่อการเจริญเติบโตและส่งเสริมให้ยีสต์มีความแข็งแรง แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจนมาก จะมีผลทำให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลลดลง ออกซิเจนมีบทบาทต่อกระบวนการหมักเอทานอล โดยมีหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในห่วงโซ่การหายใจ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็น Growth factor ที่ดีของยีสต์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น กรดโอลิอิก และกรดไลโนลิอิก ทำให้ยีสต์มีความทนต่อเอทานอลได้มากขึ้น โดยส่งเสริมให้เกิดการขนถ่ายเอทานอลออกจากเซลล์ เช่น ถ้ามีกรดไขมันไม่อิ่มตัวในผนังเซลล์มากจะทำให้เกิดการขนถ่ายเอทานอลออกจากเซลล์มากเช่นกัน ในที่สุดความเข้มข้นของเอทานอลในเซลล์จะลดลง สำหรับในสภาวะที่ขาดออกซิเจน ยีสต์จะไม่สามารถสังเคราะห์กรดไขมันไม่อิ่มตัวได้จึงต้องมีการเติมกรดไขมันไม่อิ่มตัวเพื่อให้ยีสต์สามารถอยู่รอดได้ พบว่าการเติมกรดไขมันไม่อิ่มตัว เช่น เออร์กอสเตอรอล ลงในอาหารหมักสามารถทดแทนความต้องการออกซิเจนได้ แต่ไม่เหมาะกับการผลิตในอุตสาหกรรมเพราะกรดไขมันชนิดนี้มีราคาแพง (เทพปัญญา เจริญรัตน์, 2544) และพบว่าการให้ออกซิเจนในการหมักเอทานอลแบบต่อเนื่องในปริมาณความดัน 0.07 มิลลิเมตรปรอท เป็นปริมาณที่เหมาะสม (Cysewski and Wilke, 1978) นอกจากนี้ยังพบว่า *S. cerevisiae* บางสายพันธุ์ต้องการออกซิเจนเล็กน้อยในระหว่างการหมัก แต่ในสภาพที่มีออกซิเจนมากๆ คือ สูงกว่า 300 มิลลิเมตรปรอท จะยับยั้งทั้งการเจริญและการหมักเอทานอลได้ (ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2551)

2.7) ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเติบโตของยีสต์ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยที่ความดันบรรยากาศของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูง จะเกิดการยับยั้งการเติบโตและการหมักอย่างรุนแรง ถ้าไม่มีการระบายก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบความดันในถังหมักจะสูงขึ้น และถ้าสูงขึ้นจนถึง 7.5 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลง

จนกระทั่งความดันสูงถึง 8.0 บรรยากาศ อัตราเร็วของการหมักจะช้ามากหรือเกือบไม่เกิดเลย (King and Hossain, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสามารถในการขนถ่ายสารเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลโดยรวมให้อัตราการผลิตเอทานอลและการสร้างชีวมวลลดลง (เทพปัญญา เจริญรัตน์, 2545)

2.8) สารเคมีป้องกันจุลินทรีย์อื่นๆ

ก่อนการหมักมีการเติมสารเคมีลงไปเพื่อป้องกันและกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ โดยไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เหล่านั้น ซึ่งสารเคมีที่ใช้ ได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (Sulfur dioxide) หรือ โปแตสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (Potassium metabisulfite)

2.3.3 การกลั่น

เอทานอลที่ได้จากการหมักหรือการสังเคราะห์ต้องผ่านขั้นตอนสุดท้ายก่อนนำไปใช้ประโยชน์หรือวางจำหน่าย คือ ต้องผ่านการกลั่นเอทานอล เพื่อให้ได้เอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 95-99.5 ความบริสุทธิ์ของเอทานอลที่กลั่นได้ขึ้นอยู่กับวิธีการกลั่นที่เลือกใช้กระบวนการแยกน้ำออกจากเอทานอลซึ่งโดยทั่วไปมี 3 วิธี คือ

2.3.3.1) การดูดซับด้วย Molecular Sieve

Molecular sieve เป็นสารประเภทซีโอไลต์ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยทั่วไปจะเป็นชนิด 3A $[(K_2O.Na_2O).Al_2O_3.\ 2SiO_2.xH_2O]$ ซึ่งมีสมบัติพิเศษ คือ สามารถดูดน้ำในสภาวะเย็นและคายน้ำออกเมื่อได้รับความร้อน หลักการของเทคโนโลยีชนิดนี้ใช้สมบัติพิเศษในการกำจัดน้ำออกจากเอทานอล โดยยอมให้โมเลกุลน้ำผ่านเข้าไปในโมเลกุล ขณะที่โมเลกุลของเอทานอลที่มีขนาดใหญ่กว่าจะผ่านไปไม่ได้ กระบวนการแยกน้ำนี้เริ่มจากการใช้เอทานอลที่มีความบริสุทธ์ในช่วงร้อยละ 92-96 ผ่านไปยังปฏิกรณ์ที่บรรจุ Molecular sieve ภายในเป็นชั้นๆ ประมาณ 2-3 ชั้นในแนวขนาน โมเลกุลน้ำจะถูกจับไว้ในขณะที่เอทานอลบริสุทธ์ร้อยละ 99.8-99.9 จะผ่านลงมาและถูกนำไปยังถังเก็บหลังจากเสร็จสิ้นจากกระบวนการแยกน้ำ ชั้นของ Molecular Sieve แต่ละชั้นจะชุ่มไปด้วยน้ำ ซึ่งสามารถทำให้แห้งโดยผ่านไอน้ำ เพื่อไล่น้ำที่ถูกดูดซับใน Molecular sieve ออก ข้อดีของเทคโนโลยีนี้ คือ เป็นเทคโนโลยีที่ง่ายใช้ไอน้ำและพลังงานต่ำเมื่อเทียบกับวิธีการกลั่น นอกจากนี้ยังไม่ต้องใช้สารเคมีอื่นๆ มาช่วยในการแยกน้ำ การกำจัดของเสียจึงไม่จำเป็นต้องคำนึงถึง แต่เทคโนโลยีนี้มีข้อเสียที่อัตราการสึกกร่อน หรือเกิดการเน่า (Fouling of media) ของ Molecular sieve มีค่อนข้างสูง เมื่อมีการใช้งานมากกว่า 5 ปี ซึ่งจำเป็นต้องเปลี่ยนใหม่ทำให้ค่าใช้จ่ายในกระบวนการผลิตค่อนข้างสูง

2.3.3.2) การกลั่นอะซีโอโทรป (Azeotropic distillation)

ตามหลักทฤษฎี การกลั่นเอทานอลเพื่อให้มีความบริสุทธิ์สูงจะพบปัญหาของการแยกออกจากกันไม่ได้ของน้ำและเอทานอล จุดนี้เรียกว่า จุดอะซีโอโทรป การกลั่นเอทานอลจึงจำเป็นต้องเติมสารประกอบที่ 3 เพื่อทำให้น้ำแยกออกจากเอทานอลได้ดียิ่งขึ้น สารประกอบนี้เรียกว่า Entrainer ได้แก่ ไซโคลเฮกเซน (Cyclohexane) เบนซีน (Benzene) โทลูอีน (Toluene) อีเทอร์ (Ether) และคีโตน (Ketone) วิธีนี้เป็นวิธีที่คิดค้นกันมานานและเป็นที่นิยมใช้กันอย่างมากถึงแม้มีข้อเสียอยู่หลายประการ ซึ่งข้อเสียที่สำคัญมากที่สุด คือ การใช้พลังงานมหาศาลในการกลั่นเพื่อให้ได้เอทานอลที่บริสุทธ์มากๆ ข้อเสียอีกประการหนึ่ง คือ สารที่ใช้เป็น Entrainer บางชนิดเป็นสารพิษและมีลักษณะสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง

2.3.3.3) เทคโนโลยีแผ่นเยื่อบาง (Membrane technology)

เทคโนโลยีนี้เป็นเทคโนโลยีใหม่ล่าสุด เป็นเทคโนโลยีที่ง่ายและใช้พลังงานอย่างมีประสิทธิภาพในการแยกสารละลายผสมผ่านเยื่อแผ่น (Membrane) โดยใช้เทคนิคการซึมผ่าน (Permeation) ของน้ำผ่านแผ่นเยื่อบางในรูปของไอน้ำด้วยแรงดึงดูดจากภายนอกที่มีความดันต่ำกว่า (Evaporation) สารที่ผ่านเยื่อแผ่น เรียกว่า เพอมีเอท (Permeate) การแยกเกิดขึ้นได้เนื่องจากองค์ประกอบของสารในสารผสมมีความเป็นขั้ว (Hydrophilicity) ต่างกัน เช่นในกรณีของน้ำในเอทานอล โดยน้ำมีความเป็นขั้วสูงกว่าเอทานอล ความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อแผ่นของน้ำจึงมีค่าสูงกว่า ขณะที่มีการซึมผ่านของน้ำความดันต่ำจากภายนอกจะช่วยดึงน้ำออกมาในรูปของไอน้ำ จากนั้นทำการลดอุณหภูมิเพื่อให้ไอน้ำกลั่นตัวเป็นของเหลว

เยื่อแผ่นที่นำมาใช้แบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่เป็นพอลิเมอร์และชนิดที่เป็นเซรามิก เยื่อแผ่นที่เป็นชนิดเซรามิกได้รับความสนใจมากกว่า เนื่องจากสามารถทนต่ออุณหภูมิ สารเคมี และจุลินทรีย์ได้ดี เยื่อแผ่นเซรามิกที่นิยมใช้ในการแยกน้ำออกจากเอทานอล คือ ซีโอไลต์ชนิดโซเดียมเอ (NaA zeolite) ซึ่งมีสมบัติของความมีขั้วสูงกว่าซีโอไลต์ชนิดอื่นๆทำให้เป็นปัจจัยสำคัญในการคัดสรรโมเลกุลที่ถูกดูดซับ โดยอาศัยความเข้ากันได้ของระหว่างความมีขั้วของโมเลกุลน้ำกับเยื่อแผ่น นอกจากนี้ปัจจัยสำคัญอีกประการหนึ่งในการเลือกใช้ซีโอไลต์ชนิดโซเดียมเอ คือ ความแตกต่างของขนาดโมเลกุลที่ผ่านรูเปิดของซีโอไลต์ เนื่องจากซีโอไลต์มีโครงร่างเป็นผลึกที่มีรูพรุน และมีรูเปิดขนาดเล็ก (4 อังสตรอม) เหมาะสำหรับการคัดสรรโมเลกุลน้ำที่มีขนาดเล็ก การขึ้นรูปซีโอไลต์ที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดของผลึกให้เป็นเยื่อเลือกผ่านโดยตรงนั้นไม่สามารถกระทำได้ จำเป็นต้องผ่านกระบวนการการสังเคราะห์จากสารตั้งต้นที่มีส่วนประกอบของซิลิกาและอลูมินา มาทำปฏิกิริยากันบนแผ่นของแข็งรองรับที่มีรูพรุน เมื่อเกิดผลึกซีโอไลต์ชนิด

โซเดียมเอขึ้น ผลึกเหล่านั้นจะมารวมตัวกันเป็นแผ่นต่อเนื่อง (Polycrystalline) เกิดเป็นฟิล์มบางๆ ขึ้น (ณีรนุช ควรเชิดชู และสุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์, 2550)

3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมัก

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ดังแสดงในตารางที่ 1-1 จุลินทรีย์ซึ่งเป็นที่สนใจสำหรับการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uravrum* และ *Schizosaechoromyces pombe* ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ได้เหมือนกัน แต่เนื่องจาก *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น ทำให้การผลิตเอทานอลส่วนใหญ่ใช้เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* นอกจากนั้นปัจจุบันได้มีการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียจีนัส *Zymomonas* คือ *Z. mobilis* และจีนัส *Clostridium* คือ *Cl. thercoellum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนสามารถหมักเซลลูโลสและเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (วรณี แพ่งจันทึก และวิชัย เพ็ชรดี, 2546) แต่แบคทีเรียทั้ง 2 จีนัสดังกล่าวมีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์ ดังนั้นจึงไม่นิยมนำแบคทีเรียมาใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม (Wailes and Michael, 2001)

ตารางที่ 1-1 จุลินทรีย์ผลิตเอทานอล

ชนิดจุลินทรีย์	สายพันธุ์
Bacteria	*Clostridium thermohydrosulfuricum*
	Clostridium thermocellum
	Thermoanareobacter ethanolicus
	Zymomonas mobilis
Yeast	*Candida pseudotropicalis*
	Candida tropicalis
	Candida spp.
	Kluyveromyces lactis
	Kluyveromyces marxianus
	Pachysolen tannophilus
	Pichai stipitis
	Saccharomyces cerevisiae
	Saccharomyces var. distaticus
	Saccharomyces alluvius
Mold	*Fusarium* spp.
	Monilia spp.
	Mucor spp.

ที่มา : Wailes and Michael (2001)

3.1 ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ดีในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล

ลักษณะของจุลินทรีย์ที่ดีในการหมักเพื่อผลิตเอทานอล มีดังนี้

3.1.1 สามารถหมักเอทานอลได้รวดเร็วและให้ผลผลิตสูง

เนื่องจากการผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงในระยะเวลาสั้นจะช่วยให้ต้นทุนในการผลิตลดลง Bilford และคณะ (1942) ได้ทำการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* (Seagram No.1) พบว่ายีสต์ชนิดนี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 12-13 ให้เป็นเอทานอลได้สมบูรณ์ภายใน 4-10 ชั่วโมง

3.1.2 ทนทานต่อเอทานอลและสารต่างๆที่สามารถยับยั้งการหมักและการเจริญของเชื้อยีสต์

จากรายงานผลการวิจัยของ Thomas และคณะ (1978) พบว่ายีสต์มีความทนทานต่อเอทานอลได้ถึงร้อยละ 3-4 โดยน้ำหนัก ขณะที่จุลินทรีย์อื่นๆ ทนไม่ได้อาจเนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของยีสต์มีการสะสมของพวกไขมัน Sterol และ Phospholipids fatty acyl รวมทั้งคาร์โบไฮเดรต ซึ่งช่วยป้องกันการผ่านเข้าออกของเอทานอล ต่อมา Thomas และคณะ (1978) ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับผลของเอทานอลต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ จากผลการทดลองสามารถยืนยันได้ว่าเอทานอลมีผลต่อการเจริญของยีสต์ โดยเอทานอลมีผลทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นจึงส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ลดลง

นอกจากเอทานอลแล้วยังมีกรดอะมิโนบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* ได้เช่นกัน เช่น Histidine, Lysine และ Proline (Yammashita *et al.*, 1981) และแร่ธาตุหลายชนิด เช่น Ag, Co, Mg, Cu, Ni, Pb, Fe และ Zn ซึ่งที่ความเข้มข้นปกติมีประโยชน์ต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ แต่เมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นแร่ธาตุบางชนิดอาจเป็นพิษต่อเชื้อยีสต์ได้ เช่น Ca และ Hg ดังนั้นเมื่อเชื้อยีสต์มีคุณสมบัติที่ทนต่อเอทานอลและแร่ธาตุดังกล่าวแล้ว การผลิตเอทานอลก็จะสามารถดำเนินต่อไปได้โดยไม่มีการหยุดชะงัก (Kajiwara *et al.*, 2000)

3.1.3 ทนทานต่อสภาพความเป็นกรดได้ดี

ในกระบวนการหมักจะมีการสร้างกรดเกิดขึ้นด้วยทำให้ pH ของอาหารลดลง ยีสต์ที่สามารถทน pH ต่ำ และทนต่อชนิดของกรดที่สร้างขึ้นจากกระบวนการหมักได้จะช่วยให้มีผลผลิตเอทานอลสูงขึ้น (จรูญ คำนวนตา และคณะ, 2525) โดย Moon (1983) ได้ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยกรดชนิดต่างๆ คือ กรดอะซิติค กรดแลคติค และกรดโพรพิโอนิค ในยีสต์บางชนิดพบว่า กรดอะซิติคและกรดแลคติค เป็นกรดที่มีระดับความสามารถของการยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ใกล้เคียงกัน ส่วนกรดโพรพิโอนิค มีความสามารถในการยับยั้งมากกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าใช้กรดความเข้มข้นต่ำๆ คือ ประมาณ

ร้อยละ 1 มีผลในการยับยั้งการผ่านเข้าออกของโมเลกุลสับสเตรทเข้าสู่ภายในเซลล์ส่งผลให้อัตราการเจริญลดลงแต่ไม่ทำให้เซลล์ตาย นอกจากนี้ Warth (1977) ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของกรดบางชนิดที่มีต่อ *S. balii* พบว่ากรดจะมีผลโดยทำให้ประสิทธิภาพต่างๆ ของเซลล์ลดลงบางครั้งกรดอาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงขนาด และรูปร่างของเซลล์ทำให้การวัดอัตราหรือปริมาณการเจริญของเชื้อเบี่ยงเบนไปได้

3.1.4 ทนอุณหภูมิสูงได้ดี

เนื่องจากในกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการปลดปล่อยพลังงานความร้อนออกมาทำให้อุณหภูมิในการหมักสูงขึ้น มีผลต่อการอยู่รอดและกิจกรรมการทำงานของยีสต์ การเลือกยีสต์ที่ทนอุณหภูมิได้สูงจึงช่วยให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น (Hughes*et et al.*, 1984)

3.1.5 มีความสามารถในการตกตะกอน

ยีสต์ที่มีความสามารถในการตกตะกอนได้ดี ทำให้มีความสะดวกและเป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายในการแยกผลผลิตเอทานอลในขั้นตอนสุดท้าย อีกทั้งสะดวกในการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ และง่ายต่อการเก็บเกี่ยว (สิรินทร์ เวสกิจกุล, 2530)

3.1.6 ทนต่อแรงดันออสโมซิส

เนื่องจากการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในการหมักเอทานอลสูงจะเป็นการเพิ่มแรงดันออสโมซิสทางหนึ่ง Alfenore และคณะ (2002) รายงานว่าการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรมจะใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นน้อยกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 20 โดยน้ำหนัก ซึ่งถ้ามากกว่านี้การเจริญของเชื้อจะชะลอลงส่งผลให้การหมักเอทานอลลดลง ทำให้มีน้ำตาลเหลือทิ้งโดยเปล่าประโยชน์และสร้างปัญหาในการกำจัดน้ำเสีย แต่ถ้าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่ำเกินไปปริมาณเอทานอลที่ได้ก็จะต่ำด้วยทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายในการกลั่น และในการหมักยังต้องเติมอาหารเสริมเป็นจำนวนมาก ดังนั้นการเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซิสได้ดี นอกจากจะช่วยลดปัญหาดังกล่าวแล้วยังเป็นการช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นได้อีกด้วย

3.1.7 มีพันธุกรรมที่เสถียรไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่ายภายใต้สภาวะต่างๆ

ในทางอุตสาหกรรม เพื่อให้การหมักเอทานอลด้วยยีสต์เกิดประสิทธิภาพในการหมักสูงสุด ยีสต์ที่นำมาใช้ควรเป็นยีสต์ที่มีความคงทนต่อแรงกระตุ้นที่จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (สิรินทร์ เวสกิจกุล, 2530)

3.1.8 สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิด

ยีสต์ที่เลือกใช้ควรมีความสามารถใช้น้ำตาลได้ทั้งกลุ่มน้ำตาลเพนโตสและน้ำตาลเฮกโซส (Zaldivar *et al.*, 2001) Sitton และคณะ (1979) ศึกษาการใช้ซังข้าวโพดเป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอล โดยย่อยเซลลูโลสด้วยกรดซัลฟิวริกเพื่อให้ได้น้ำตาลกลูโคสและ

ไซโลส แล้วจึงหมักให้เป็นเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์ผสม คือ *S. cerevisiae* ATCC 24858 เปลี่ยนกลูโคสให้เป็นเอทานอล และ *Candida utilis* เปลี่ยนไซโลสให้เป็นเอทานอลซึ่งเอทานอลที่ได้ประมาณ 0.031 แกลลอนต่อปอนด์ของวัสดุที่ใช้ และ Destroy และคณะ (1982) ได้ศึกษาการใช้ฟางของข้าวสาลีโดยใช้เชื้อยีสต์ผสมคือ *S. uvarum* NRRL 1347 และ *Pachysolen tannophilus* NRRL Y-2460 พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 40-60

โดยการผลิตเอทานอลจากยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถใช้วัตถุดิบทางการเกษตรเป็นวัตถุดิบเริ่มต้นได้หลากหลายชนิด โดยวัตถุดิบเหล่านี้จะผ่านกระบวนการเตรียม เช่น การย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ก่อนเพื่อให้ได้เป็นน้ำตาลซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับยีสต์ในการหมักเอทานอล ซึ่ง ระวีวรรณ แกล้วกล้า (2538) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากฟางข้าว โดยใช้เชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5013 พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยสลายฟางข้าวด้วยเอนไซม์เซลลูเลสเป็นแหล่งคาร์บอนในการเลี้ยงเชื้อในกระบวนการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน ได้เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ทั้งนี้ซังข้าวโพดก็สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ได้เช่นกัน โดยซังข้าวโพดที่เตรียมด้วยสารละลายกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 1 ที่อุณหภูมิ 108 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และผ่านกระบวนการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์จะได้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้น 95.3 กรัมต่อลิตร และเมื่อหมักด้วยด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* 316 สามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 45.7 กรัมต่อลิตร ภายในระยะเวลาเพียง 18 ชั่วโมง (Chen *et al*., 2007 อ้างโดย ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2551)

สำหรับของเสียจากอุตสาหกรรมบางประเภทก็สามารถนำมาผลิตเอทานอลโดยยีสต์ได้ เช่น ของเสียจากโรงงานแป้งมันสำปะหลัง เมื่อผ่านกระบวนการไฮโดรไลซีสด้วยเอนไซม์ พบว่าจะได้ปริมาณน้ำตาล 122.4 กรัมต่อลิตร ต่อจากนั้นเมื่อหมักด้วยเชื้อ *S. cerevisiae* TISTR 5596 ประมาณร้อยละ 10 ของความเข้มข้นเชื้อ 1×10^{7} โคโลนีต่อมิลลิลิตร ใช้อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อสามารถผลิตเอทานอลได้มากที่สุดร้อยละ 3.84 ในเวลา 36 ชั่วโมง แต่มีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ 24 ชั่วโมง ได้เอทานอลร้อยละ 3.62 (Srinorakutara *et al*., 2004)

ในขั้นตอนการหมักเอทานอลพบว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอลได้ทั้งในกระบวนการหมักแบบไร้ออกซิเจนและมีออกซิเจน เมื่อใช้อาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่า *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้ทั้งในสภาวะที่มีการเขย่าและในสภาวะนิ่ง โดยในสภาวะเขย่าจะให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าสภาวะนิ่งประมาณร้อยละ 33 ของการหมัก (มัลลิกา บุญมี, 2548)

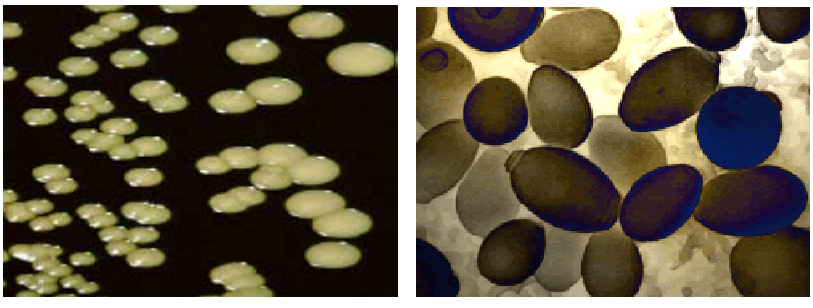
และเมื่อมีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* กับยีสต์สายพันธุ์อื่น เช่น *Kluyveromyces marxianus* พบว่า *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า *K. marxianus* ในอาหารที่มีกลูโคสที่สภาวะเดียวกันถึง 3.6 เท่า และเมื่อนำเชื้อยีสต์ทั้ง 2 ชนิดมาเลี้ยงร่วมกันในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส และไซโลสที่ความเข้มข้นเท่ากันพบว่าการผลิตเอทานอลในการเลี้ยงเชื้อร่วมนี้เกิดจากการผลิตโดยเชื้อ *S. cerevisiae* เพียงชนิดเดียว (มัลลิกา บุญมี, 2548)

3.2 การจำแนกยีสต์ *S. cerevisiae* ในทางจุลชีววิทยา

Phylum	*Ascomycetes*
Order	*Saccharomycetales*
Family	*Saccharomycetaceae*
Genus	*Saccharomyces*
Species	*Saccharomyces cerevisiae*

3.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological characteristics)

S. cerevisiae เป็นจุลินทรีย์พวก Eukaryote ดำรงชีวิตในลักษณะเซลล์เดี่ยว (Unicellular organism) พบมากในแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง และผลไม้ที่มีรสหวาน มีลักษณะรูปร่างกลมไปถึงรูปไข่ (Round or oval shape) อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยวๆ ขนาดทั่วไปของยีสต์มีความกว้างประมาณ 2.5-10.5 ไมครอน ยาวประมาณ 4.5-2.1 ไมครอน (สมใจ ศิริโภค, 2544) สืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อจากเซลล์แม่ (ศิริพร ล้านแปง, 2539)



ก) **ข)**

ภาพที่ 1-6 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : http//www.jpkc.njau.edu.cn

3.4 ลักษณะทางชีวเคมี (Biochemistry Characteristics)

ผนังเซลล์ของ *S. cerevisiae* มีโครงสร้างทางเคมีเป็นลักษณะ Bi-Layered องค์ประกอบหลักของผนังเซลล์ประมาณร้อยละ 85-90 ประกอบด้วย Mannoprotein และ ß-D Glucan ซึ่งเป็นสารประกอบ Polysaccharide ที่มีน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ ß1,3-Linkage และ ß1,6-Linkage สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ ซึ่งกระบวนการผลิตพลังงานและผลผลิตที่ได้ทั้งสองสภาวะจะแตกต่างกัน ตัวแปรสำคัญที่ยีสต์ใช้ในกระบวนการผลิตพลังงานและได้ผลผลิตออกมานั้นขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของน้ำตาลในสภาวะแวดล้อมที่ยีสต์เจริญเติบโต (ระวีวรรณ แกล้วกล้า, 2538)

การใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสร้างพลังงานของยีสต์ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Anaerobic condition) โดยทั่วไปเรียกว่าการหมัก (Fermentation) ซึ่งกระบวนการหมักแบบไม่มีอากาศ จะได้พลังงานในรูป ATP จากการใช้สับสเตรทผ่านกระบวนการ Emboden-Meyerhof-Parns pathway (EMP Pathway) ดังแสดงในภาพที่ 1-7 นอกจากจะได้แอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตหลักแล้วยังได้สารอื่นๆ เช่น กลีเซอรอล อะซีเตท เอสเตอร์ และสารประกอบคาร์บอนิลที่มีส่วนในการเพิ่มกลิ่นและรสชาติของแอลกอฮอล์ได้อีกด้วย (Oranut, 1999)

ขั้นตอนของ Emboden-Meyerhof-Parns pathway เพื่อให้ได้เป็นเอทานอล สามารถแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

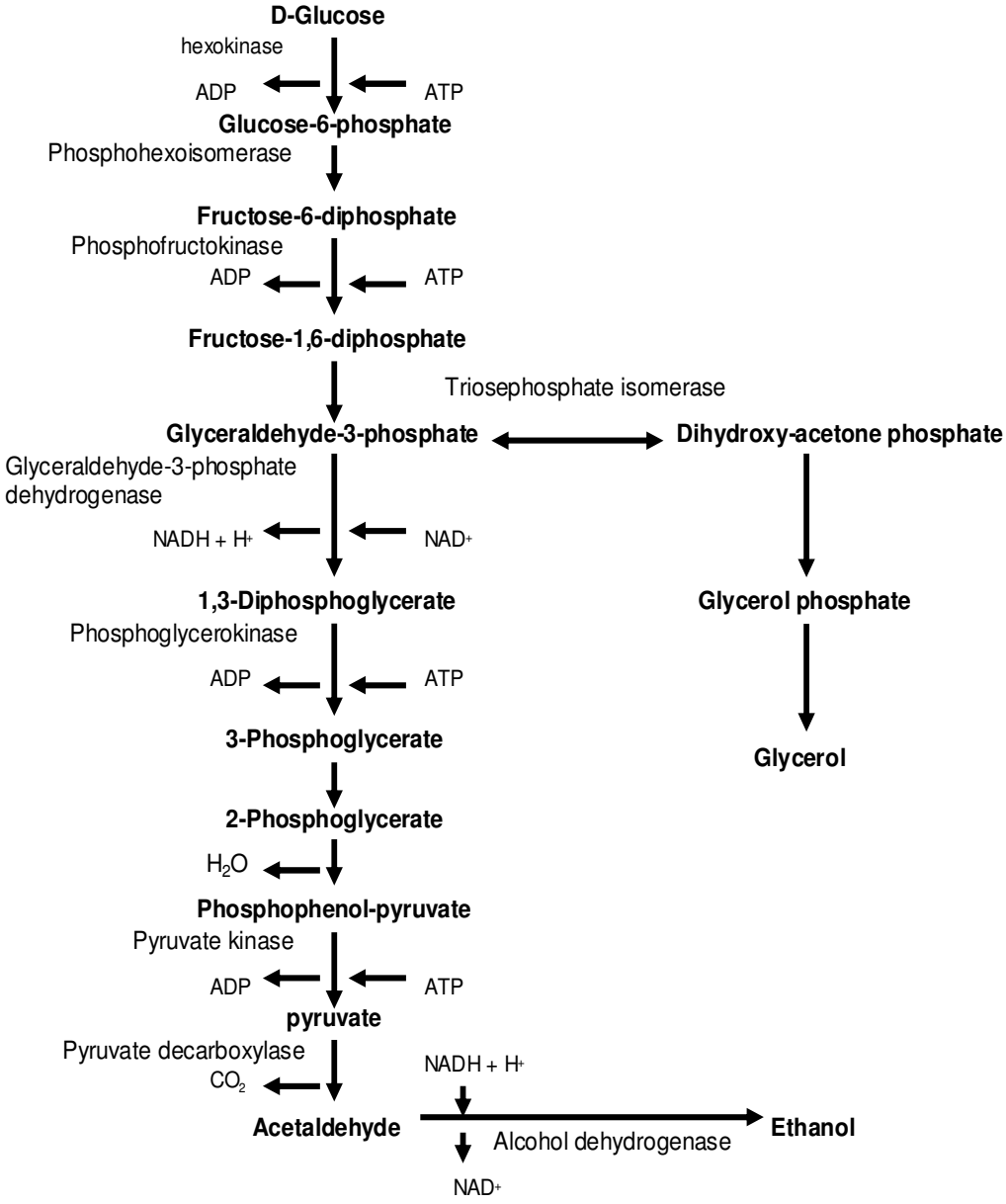
1. การสลายกลูโคสให้เป็น 2 ไทรโอสฟอสเฟท (Triose phosphate)
2. การเปลี่ยนไทรโอสฟอสเฟทให้เป็นไพรูเวท (Pyruvate)
3. การเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสาร 2 คาร์บอน เช่น เอทานอล หรือ 3 คาร์บอน เช่น

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> ประกอบด้วย 4 ปฏิกิริยา ปฏิกิริยาของ Hexokinase หรือ Glucokinase ใช้ ATP เพื่อเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น Glucose-6-phosphate (G6P) ซึ่งเปลี่ยนเป็น Fructose-6-phosphate (F6P) ด้วย Phosphohexoisomerase จากนั้น Phosphofructokinase จะเปลี่ยน F6P ให้เป็น Fructose1,6-diphosphate (FDP) ซึ่งแตกตัวเป็นสารที่มีสามคาร์บอน 2 ชนิด คือ Glyceraldehydes-3-phosphate (G3P) และ Dihydroxyacetonephosphate (DHAP) โดยอาศัยการเร่งของเอนไซม์ Aldolase จากนั้น DHAP จะเปลี่ยนเป็น Glycerol phosphate และได้ Glycerol ในที่สุด

<u>ขั้นตอนที่ 2</u> มี 6 ปฏิกิริยาเริ่มด้วย DHAP เปลี่ยนเป็น G3P โดยเอนไซม์ Triosephosphate isomerase ต่อจากนั้น G3P จะทำปฏิกิริยากับฟอสเฟตให้ได้ 1,3-Diphosphoglycerate (DPG) ขณะเดียวกันก็ปล่อยอิเล็กตรอนให้แก่ NAD^+ ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งด้วย

Glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ซึ่ง DPG จะทำปฏิกิริยากับ ADP ได้ 3-Phosphoglycerate (3PG) และ ATP ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ Phosphoglycerate kinase ปฏิกิริยานี้สร้าง ATP โดยวิธี Substrate level phosphorylation โดย 3PG จะเปลี่ยนแปลงเป็น Phosphoenol-pyruvate (PEP) ซึ่งจะให้ ATP อีกหนึ่งโดยวิธี Substrate level phosphorylation เช่นเดียวกันรวมทั้งให้ไพรูเวทด้วย ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดย Pyruvate kinase

ขั้นตอนที่ 3 จะเป็นการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสารประกอบที่มี 2 หรือ 3 คาร์บอน ทั้งนี้ขึ้นกับเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ ในกรณีขาดออกซิเจนหรือไม่สามารถใช้ออกซิเจนไพรูเวทจะเปลี่ยนเป็นแลคเตต (Lactate) โดยใช้ NADH เป็นตัวรับอิเล็คตรอนในปฏิกิริยาของ Lactate dehydrogenase เมื่อมีออกซิเจนไพรูเวทอาจเปลี่ยนเป็น Acetyl CoA โดยเอนไซม์ Pyruvate dehydrogenase complex ซึ่ง Acetyl CoA จะเข้าสู่วัฏจักรเครบส์ต่อไป เอนไซม์นี้อยู่ในไมโทคอนเดรีย และเป็น Enzyme complex ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดไพรูเวทอาจสูญเสียคาร์บอนไดออกไซด์กลายเป็น Acetaldehyde โดยการเร่งของ Pyruvate decarboxylase ต่อจากนั้น Acetaldehyde จะถูกออกซิไดซ์ด้วย NAD^+ กลายเป็นอะซิเตต (Acetate) หรือถูกรีดิวซ์ด้วย NADH โดยเอนไซม์ Alcohol dehydrogenase ได้เป็นเอทานอล (มนตรี จุฬาวัฒนทล, 2542)



ภาพที่ 1-7 การผลิตเอทานอลจากกลูโคสโดย Emboden-meyerhof-parns pathway

ที่มา : มนตรี จุฬาวัฒนทล (2542)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* โดยมีน้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน

2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* จากน้ำอัดลมหมดอายุ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำเอาของเสียมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดมูลค่าได้

2. ทราบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* จากน้ำอัดลมหมดอายุ

3. ช่วยลดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อม เพราะเป็นการนำของเหลือใช้กลับมาใช้ให้เกิดประโยชน์

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. วัสดุ

1.1 ตัวอย่างน้ำอัดลม

เก็บตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุ ซึ่งประกอบด้วย น้ำสไปรท์ น้ำโค้ก น้ำเขียว น้ำส้ม และน้ำแดง มาผสมกัน ทำการถ่ายเทจากขวดบรรจุภัณฑ์ลงในขวดเก็บตัวอย่างน้ำ จากนั้นทำการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ (sonicator) แล้วนำเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 เชื้อจุลินทรีย์

S. cerevisiae (S_1) และ *S. cerevisiae* (S_2) ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เลี้ยงในอาหาร YM (Yeast malt extract agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Subculture) เดือนละ 1 ครั้ง

1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

- สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ *S. cerevisiae* (YM agar) ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	10.0	กรัมต่อลิตร
Agar	15.0	กรัมต่อลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

- สูตรอาหารสำหรับเตรียมเชื้อ *S.cerevisiae* เริ่มต้น ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Malt extract	3.0	กรัมต่อลิตร
Glucose	20.0	กรัมต่อลิตร

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

- สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล ประกอบด้วย

Yeast extract	1.0	กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	0.5	กรัมต่อลิตร
$(NH_4)_2SO_4$	ปริมาณที่เหมาะสมจากการทดลอง	

ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ ปรับ pH เป็น 4.5 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อุปกรณ์และสารเคมี

2.1 สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae*

2.1.1 ปิเปต (Pipet)

2.1.2 หลอดทดลอง (Tube)

2.1.3 บีกเกอร์ (Beaker)

2.1.4 กระบอกตวง (Cylinder)

2.1.5 เข็มเขี่ยเชื้อ (Loop)

2.1.6 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Plate)

2.1.7 กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)

2.1.8 เครื่องชั่ง (Balance)

2.1.9 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)

2.1.10 เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

2.2 สำหรับตรวจวิเคราะห์ pH

2.2.1 เครื่องวัด pH (pH meter)

2.2.2 น้ำกลั่น (distilled water)

2.2.3 บีกเกอร์ (beaker)

2.2.4 0.5 N NaOH

2.2.5 H_2SO_4

2.3 สำหรับการตรวจวิเคราะห์น้ำตาล

2.3.1 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

2.3.2 น้ำกลั่น

2.3.3 สารละลายซูโครสมาตรฐาน

2.3.4 conc sulfuric acid

2.3.5 5% phenol

2.4 สำหรับตรวจวิเคราะห์เอทานอล

2.4.1 เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (Ebulliometer)

2.4.2 เครื่อง Gas Chromatography (GC)

2.4 สำหรับตรวจวิเคราะห์มวลชีวภาพ

2.4.1 ตู้อบแห้ง (Hot air oven)

2.4.2 ตู้ดูดความชื้น (dessicator)

2.4.3 เครื่องชั่ง (balance)

2.4.4 Hemacytometer

2.4.5 เครื่องกรอง

2.4.6 กระดาษกรองขนาด 0.45 μm (cellulose nitrate filter)

3. วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* ที่เจริญบนอาหารแข็ง (YM agar) ลงในอาหารเหลว (YM broth) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที และนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3.2 การศึกษาสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุ

ทำการศึกษาลักษณะของน้ำอัดลมหมดอายุ ที่ผ่านการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่องโซนิเคเตอร์ เป็นเวลา 30 นาที โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล pH BOD และ COD

3.3 การศึกษาหาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S.cerevisiae* (S_1)

3.3.1 การศึกษาหาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสม

ศึกษาความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยการเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ของอาหารเป็น 4.5 ด้วย 0.5 M NaOH ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ เป็นระยะเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี Hemacytometer (ภาคผนวก ก) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.3.2 การศึกษาหาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

ศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S.cerevisiae* (S_1) โดยการเตรียมอาหาร ซึ่งประกอบด้วย Yeast extract 1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ (3.3.1) ปรับ pH ของอาหารเป็น 4.5 ด้วย 0.5 M NaOH ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่

อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.3.3 การศึกษาหา pH ที่เหมาะสม

ศึกษา pH ของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยการเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสมจากข้อ (3.3.2) ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมจากข้อ (3.3.1) จากนั้นปรับ pH ของอาหารเท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 ด้วย 0.5 M NaOH ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ เป็นระยะเวลา 15 นาที เติมเชื้อ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1)

3.4.1. การศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยการเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ (3.3) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.4.2. การศึกษาหาอัตราการเขย่าที่เหมาะสม

ศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยการเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ (3.3) นำไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ (3.4.1) ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.4.3 การศึกษาหาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม

ศึกษาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยการเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ

$1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงในสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ (3.3) นำไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ (3.4.1) ด้วยอัตราการเขย่าที่เหมาะสมจากข้อ (3.4.2) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 3 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.5 การศึกษาผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2)

ศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) โดยใช้สูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมจากผลการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) และทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 3 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.6 การศึกษาวิธีกำจัดเชื้อปนเปื้อนในน้ำอัดลมหมดอายุ

ศึกษาวิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในน้ำอัดลมหมดอายุด้วยวิธี Autoclave เปรียบเทียบกับการเติมสาร Potassium metabisulfite (KMS) โดยการเตรียมสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ (3.3) ทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธี Autoclave โดยการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ เป็นระยะเวลา 15 นาที และทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีเติม KMS โดยการเติม KMS ในปริมาณ 200 ppm ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะทำการศึกษาทั้งยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) และยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) โดยเติมเชื้อเริ่มต้นลงในอาหารให้มีปริมาณเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ (3.4) นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

4. การตรวจวิเคราะห์และรายงานผล

4.1 pH

ตรวจวัดโดยใช้เครื่อง pH meter รายงานผลจากค่าที่อ่านได้จากจอแสดงผลของเครื่องตรวจวัด

4.2 ปริมาณน้ำตาล

ทำการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างด้วยวิธี phenol sulfuric acid total sugar โดยเติมสารละลายตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร ในหลอดทดสอบ (แช่ในน้ำแข็ง) แล้วเติม 5% phenol solution ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เติม sulfuric acid 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 10 นาที เขย่าให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 490 นาโนเมตร จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการ

ดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาล (ภาคผนวก ก) เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ใช้ คือ 10, 35, 50 และ 70 ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร

4.3 ปริมาณเอทานอล

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างด้วยเครื่อง Ebulliometer (ภาคผนวก ก) และสำหรับชุดการทดลองที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดจะทำการยืนยันผลเปรียบเทียบกับการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC รุ่น HP 6850 Gas Chromatography with Flame Ionization Detector โดยใช้ column: HP-Innowax, length 30 m, 250 μm I.D, 0.25 μm film thickness ที่อุณหภูมิ Detector 200 องศาเซลเซียส

4.4 มวลชีวภาพ

นับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ด้วย Hemacytometer (ภาคผนวก ก) และทำการกรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 μm (Cellulose nitrate membrame) โดยนำกระดาษกรองไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักกระดาษก่อนและหลังกรอง รายงานผลเป็น กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตรทุกพารามิเตอร์ รายงานผลด้วยค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการตรวจวัด 3 ซ้ำ

5. การควบคุมคุณภาพการทดสอบ

ในแต่ละครั้งที่ทำการทดสอบปริมาณน้ำตาลและเอทานอลโดยทำซ้ำ 3 ครั้ง และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (One-way anova) โดยใช้โปรแกมสำเร็จรูป SPSS (Statistic Package for the Social Science) Version 11.5

บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาลักษณะของน้ำอัดลมหมดอายุ

ผลการศึกษาสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุหลังผ่านการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล pH BOD และ COD พบว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีสมบัติ ดังแสดงในตารางที่ 3-1

ตารางที่ 3-1 สมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุ

สมบัติที่ตรวจวัด	ก่อนฆ่าเชื้อ	หลังฆ่าเชื้อ
ปริมาณน้ำตาลซูโครส (g/L)	145-148	98-108
pH	3.02	4.63
BOD (mg/L)	83,541	-
COD (mg/L)	152,470	-

จากสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุข้างต้นพบว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีปริมาณน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงและมีสภาพเป็นกรด และเมื่อทำการฆ่าเชื้อ พบว่ามีปริมาณน้ำตาลลดลงและมีค่า pH เพิ่มขึ้น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำอาจทำให้น้ำตาลในน้ำอัดลมบางส่วนเสียสภาพไป จึงมีปริมาณน้ำตาลลดลงจากเดิม

เมื่อพิจารณาแล้วเห็นว่าน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุนั้นมีปริมาณมากพอที่จะนำมาศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำน้ำอัดลมหมดอายุมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ โดยในการศึกษานั้นจะต้องคำนึงถึงสูตรอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆด้วยเป็นสำคัญ เนื่องจากน้ำอัดลมหมดอายุมีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักและไม่มีสารอาหารอื่น ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae*

2. ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมของต่อการผลิตเอทานอลยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน

การกำหนดสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในกระบวนการหมัก โดยองค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้มีความจำเป็นต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์ และการสร้างเมทาบอไลท์ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพของเซลล์อีกด้วย (อิศรา รอดมุ้ย, 2546)

2.1 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสม

ความเข้มข้นน้ำตาลสูงจะช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ดี แต่ความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงเกินขีดจำกัดระดับหนึ่ง จะทำให้เกิดการรบกวนต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ โดยจะทำให้การหมักจะเป็นไปอย่างเชื่องช้าและไม่สมบูรณ์ โดยปราโมทย์ และคณะ (2525) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นร้อยละ 12, 14, 20 และ 26 พบว่าเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นจะได้เอทานอลเพิ่มขึ้น แต่ถ้าน้ำตาลสูงเกินความสามารถของยีสต์ในการเจริญเติบโตและหมักเอทานอล เช่นสูงถึงร้อยละ 26 กลับมีผลยับยั้งการหมักเอทานอลของยีสต์ ทั้งนี้ได้เสนอแนะเกี่ยวกับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในการหมักว่าการเพิ่มน้ำตาลให้สูงขึ้นในปริมาณที่เหมาะสมที่ยีสต์หมักเอทานอลได้สูงสุดโดยไม่มีน้ำตาลเหลือตกค้างจะดีที่สุดสำหรับการหมัก แต่ถ้าน้ำตาลเริ่มต้นสูงจนเกินไปก็จะมีผลยับยั้งการหมัก นอกจากจะทำให้ได้เอทานอลลดลงแล้ว ยังมีน้ำตาลเหลือทิ้งโดยเปล่าประโยชน์

ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้ได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ คือ 25, 30, 40, และ 50 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ได้ทดลองศึกษาใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 108 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุที่ยังไม่ผ่านการเจือจาง ผลจากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ไม่สามารถผลิตให้ผลเอทานอลได้ เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์พบว่าเซลล์หยุดการเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้น้อยมาก สาเหตุอาจเนื่องมาจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ที่นำมาใช้อาจมีความสามารถในการทนต่อปริมาณของน้ำตาลเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นสูงได้ไม่ดีมากนัก จึงได้ออกแบบการทดลองให้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นดังกล่าวมาแล้วข้างต้น โดยการเจือจางน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 ด้วย 0.5 M NaOH ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มี

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

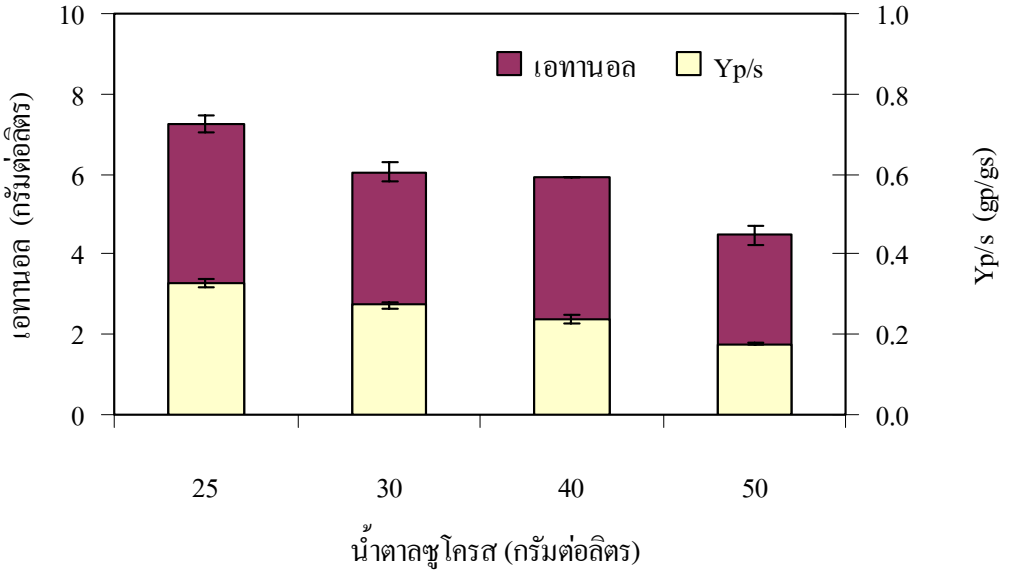
ผลจากการทดลองพบว่า ที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 3-2 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับร้อยละ 0.92 โดยปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.72 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 7.24 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 2.97 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 3.94 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.093 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล และเมื่อเทียบกับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 30, 40, และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเอทานอลที่ได้มีค่าลดลงตามลำดับและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คือ 6.06, 5.93 และ 4.48 กรัมต่อลิตร ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้งกลับมีค่าสูงขึ้นตามลำดับ เช่นกัน คือ 1.162, 1.334 และ 1.410 กรัมต่อลิตร โดยพบว่าที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งไม่แตกต่างจากการหมักที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร แต่มีค่าแตกต่างจากชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 40 และ 50 กรัมต่อลิตร อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เหลือพบว่ามีค่าเท่ากับ 7.02, 15.03 และ 24.71 กรัมต่อลิตร สำหรับชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 30, 40, และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่าให้ค่าใกล้เคียงกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) มีความสามารถในการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอาทานอลที่ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่ำได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูงและที่ปริมาณน้ำตาลเข้มข้นสูงนี้ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) มีความสามารถในการนำน้ำตาลมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ดี สำหรับ pH หลังการหมักของทุกความเข้มข้นพบว่ามีค่าลดลงจากเดิม ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการหมักนอกจากเชื้อใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตและสร้างผลผลิตพลอยได้เป็นเอทานอลแล้ว พบว่ายังมีการสร้างกรดเกิดขึ้นด้วย (Bazas *et al*., 1989)

ตารางที่ 3-2 การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

น้ำตาลเริ่มต้น (g/L)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล		มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(v/v)			
25	2.97±1.20[a]	3.94±0.03	7.24±0.23	0.92±0.03[a]	1.093±0.048[a]	0.329±0.012[a]	0.050±0.005[a]
30	7.02±1.49[b]	3.98±0.03	6.06±0.23	0.77±0.03[b]	1.162±0.041[a]	0.273±0.009[b]	0.053±0.005[a]
40	15.03±0.02[c]	4.08±1.22	5.93±0.00	0.75±0.00[b,c]	1.334±0.034[b]	0.238±0.012[c]	0.054±0.004[a]
50	24.71±0.03[d]	4.13±0.86	4.48±0.23	0.57±0.03[d]	1.410±0.032[c]	0.177±0.004[d]	0.056±0.003[a]

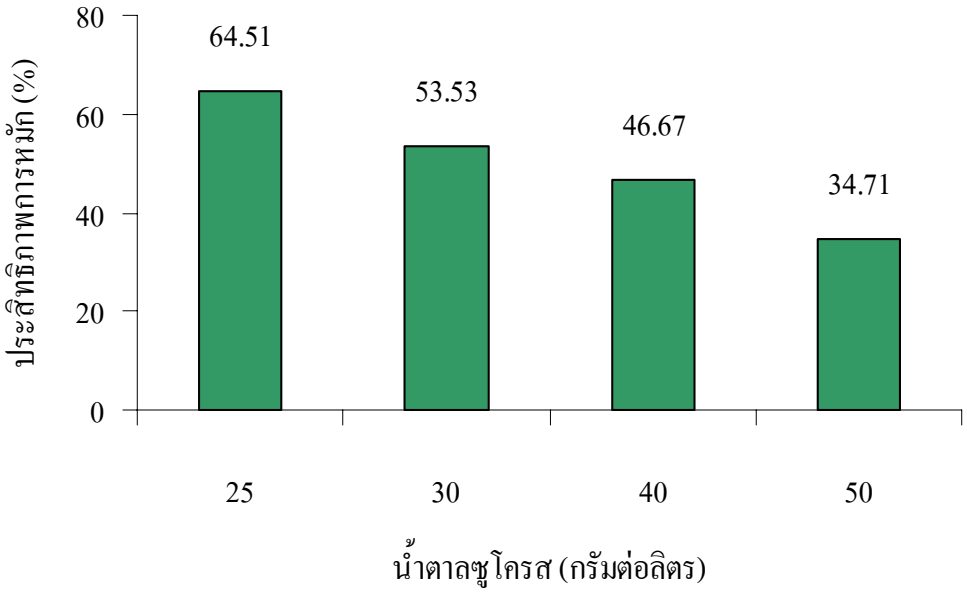
หมายเหตุ: ในแนวตั้งค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ง)

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าในภาวะที่มีการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตรดังแสดงในภาพที่ 3-1 มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.329 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล รองลงมาเป็นปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 30 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าให้ค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.273 และ 0.238 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้น 30 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าน้อยกว่ามาก คือ 0.177 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นส่งผลให้เอทานอลที่ได้มีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยถึงผลของความเข้มข้นน้ำตาลในกระบวนการหมักเอทานอลแบบขั้นตอนเดียวของเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในการหมักจาก 150 เป็น 280 กรัมต่อลิตร ทำให้ค่า Yp/s ลดลงจาก 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เหลือเพียง 0.03 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล (Takes□ge and Ouc□, 1995)



ภาพที่ 3-1 ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองในงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎีดังแสดงในภาพที่ 3-2 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด คือ ร้อยละ 64.51 (วิธีการคำนวนแสดงในข้อ 4 ภาคผนวก ข) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และใช้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 3-2 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

2.2 ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

เนื่องจากส่วนประกอบของน้ำอัดลมหมดอายุมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก เพียงอย่างเดียวที่เป็นแหล่งอาหาร หรือเป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญต่อกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ ซึ่งจากรายงานการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า นอกจากแหล่งคาร์บอนซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญต่อการหมักเอทานอลของยีสต์แล้ว ยีสต์ยังต้องการแหล่งอาหารและแร่ธาตุอื่นๆที่จำเป็นต่อการหมักด้วยเช่นกัน โดยเทพปัญญา เจริญรัตน์ (2544) ได้ทำการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ

S. cerevisiae TISTR 5013 ในอาหาร 2 สูตร โดยสูตรที่ 1 เป็นการหมักน้ำตาลที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังที่ไม่มีการเติมสารอาหารชนิดอื่น และสูตรที่ 2 มีการเติมแหล่งไนโตรเจนที่เป็นไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต พบว่าสูตรอาหารที่ 2 จะให้ค่า Yp/s ที่สูงกว่าในสูตรอาหารที่ 1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตส่งเสริมให้ยีสต์นำกลูโคสไปใช้เพื่อวัตถุประสงค์อื่นนอกเหนือจากการส่งเสริมการเติบโต เช่น การผลิตเอทานอล

ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ซึ่งแหล่งไนโตรเจนที่นำมาใช้ในการศึกษา คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) ทั้งนี้เนื่องจาก $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมการหมักเอทานอล เพราะนอกจากจะเป็นตัวกระตุ้นการเจริญของเชื้อยีสต์ในบางโอกาสแล้ว ยังได้อิออนซัลเฟตเข้ามาเสริมเป็นสารอาหารไปพร้อมกัน ทั้งนี้ยังรวมถึงความสามารถของยีสต์ในการทนทานต่อเอทานอลในระหว่างการหมักด้วยเช่นกัน (พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545) ซึ่งทำการศึกษาโดยการเตรียมอาหาร ที่ประกอบด้วย Yeast extract 1 กรัมต่อลิตร $MgSO_4.7H_2O$ 0.5 กรัมต่อลิตร และ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.05, 0.1, 0.5, และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ของอาหารเป็น 4.5 ด้วย 0.5 M NaOH ในฟลาส์ขนาด 250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

ผลจากการทดลองพบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 3-3 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับร้อยละ 0.82 โดยปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.65 โดยปริมาตร หรือ 6.45 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นอื่นๆ พบว่าค่าเอทานอลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 4.24 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 3.67 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.00 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่าผลได้ของเซลล์ต่อปริมาณน้ำตาลที่ใช้ (Yx/s) พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.049 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล

ในขณะที่ความเข้มข้นอื่นๆ คือ 0.05, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้ค่าใกล้เคียงกัน คือ 5.93, 5.79 และ 5.79 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 5.667, 6.26 และ 6.22 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ pH หลังการหมัก

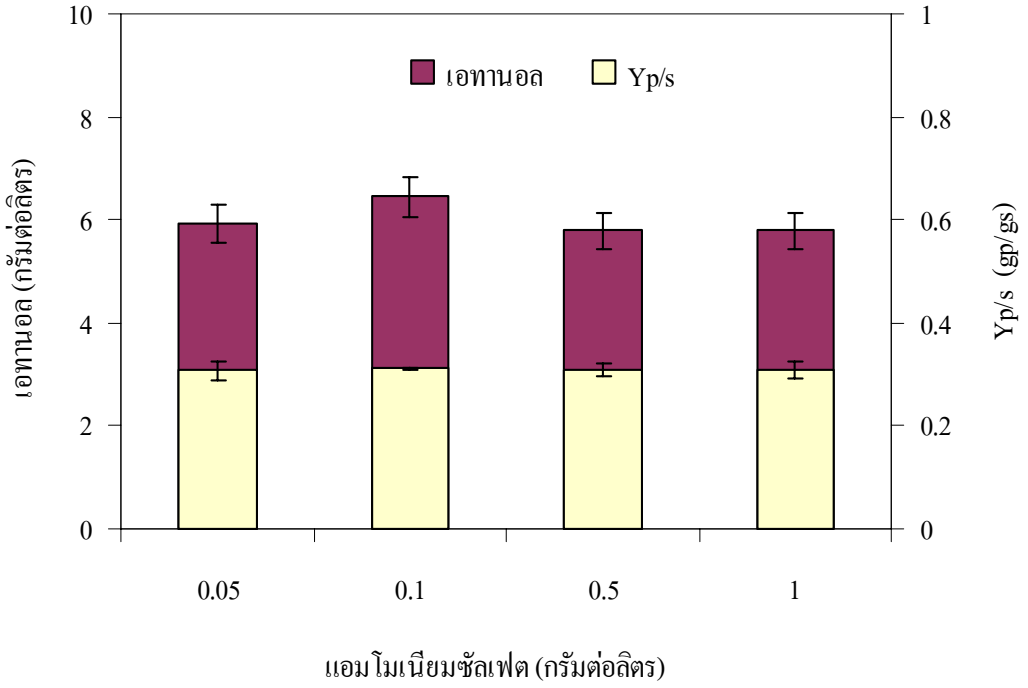
ลดลงมาอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันโดยมีค่าเท่ากับ 3.65, 3.62 และ 3.66 ตามลำดับ มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.937, 0.920 และ 0.940 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.048, 0.049 และ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล

ตารางที่ 3-3 การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล		มวลชีวภาพ(g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(v/v)			
0.05	5.67±1.04[a]	3.65±0.26	5.93±0.00	0.75±0.00[a]	0.937±0.031[a]	0.307±0.017[a]	0.048±0.002[a]
0.10	4.24±0.82[b]	3.62±0.04	6.45±0.23	0.82±0.03[b]	1.007±0.042[a]	0.311±0.001[a]	0.049±0.002[a]
0.5	6.26±0.485[a]	3.66±0.026	5.79±0.23	0.73±0.03[a]	0.920±0.079[a]	0.309±0.011[a]	0.049±0.005[a]
1.0	6.22±1.83[a]	3.67±0.02	5.79±0.23	0.73±0.03[a]	0.940±0.026[a]	0.309±0.015[a]	0.050±0.001[a]

หมายเหตุ: ในแนวตั้งค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น ร้อยละ95 (ภาคผนวก ง)

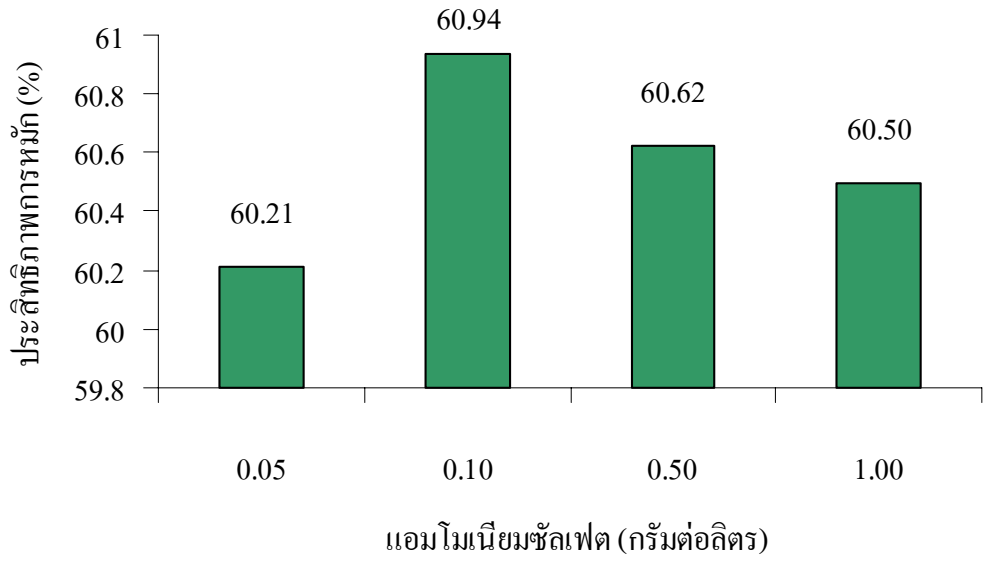
สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า ผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) พบว่าชุดการทดลองที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ แตกต่างกันมีค่า Yp/s ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในภาพที่ 3-3 โดยที่ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆเล็กน้อย คือ 0.311 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ในขณะที่ใช้ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร มีค่า (Yp/s) เท่ากัน คือ 0.309 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และที่ความเข้มข้น 0.05 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s ต่ำสุดเท่ากับ 0.307 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันโดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 3-3ปริมาณเอทานอลและผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองในงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎีดังแสดงในภาพที่ 3-4 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด คือ ร้อยละ 60.98 (วิธีการคำนวนแสดงในข้อ 4 ภาคผนวก ข) ดังนั้นใน

งานวิจัยนี้จึงเลือก $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และใช้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 3-4 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

2.3 pH ที่เหมาะสม

pH มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ อัตราการหมัก และการสร้างผลผลิตพลอยได้ ตลอดจนการควบคุมจุลินทรีย์ปนเปื้อน โดยทั่วไปยีสต์เจริญได้ดีในช่วง pH 3.5-5.0 เนื่องจากในระหว่างการหมักเอทานอลยีสต์จะมีการสร้างกรดเกิดขึ้นด้วย (Brandberg *et al*., 2004) แต่ในระหว่างการหมักหากเกิดสภาพความเป็นกรดสูง อาจเป็นเหตุให้ประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลลดลง ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำกว่าปกติ (จรูญ คำนวณตา และคณะ, 2525) ในกระบวนการหมักจึงควรปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4.0-4.5 (Bazas *et al*., 1989) หรือ 4.0-5.0 (C□en and J□n, 2006) ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาหา pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยนำอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นของ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ

25 กรัมต่อลิตร จากนั้นปรับ pH ของอาหารให้มีค่าเริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 ด้วย 0.5 M NaOH เติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

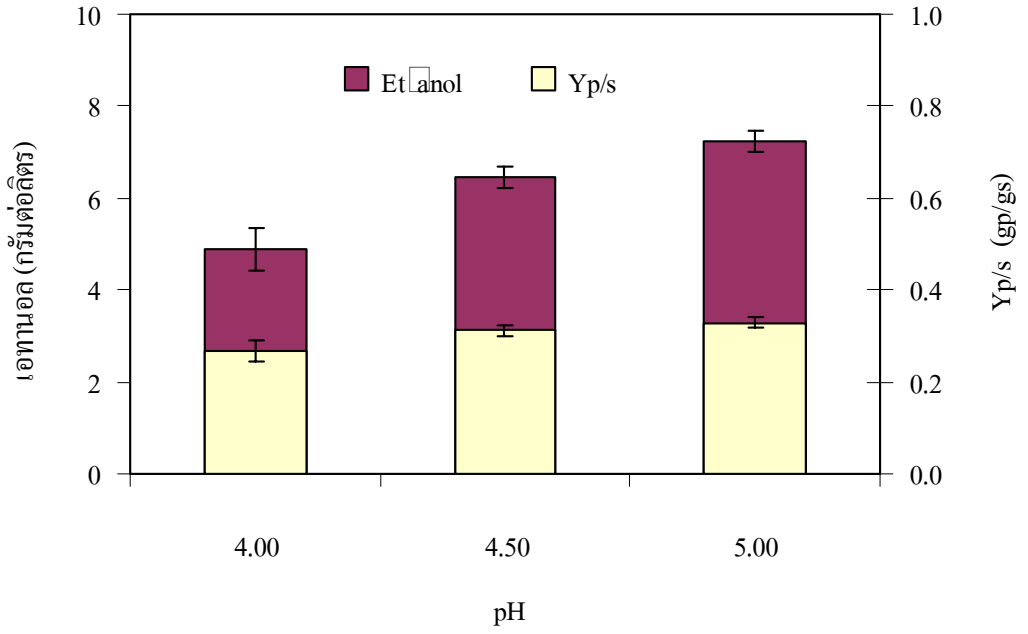
ผลจากการทดลองพบว่าที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 3-4 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับร้อยละ 0.92 โดยปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 0.72 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 7.24 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 2.97 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 3.94 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.093 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล รองลงมาเป็น pH 4.5 และ pH 4.0 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ เท่ากับ 6.45 และ 4.87 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 4.32 และ 6.78 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 3.62 และ 3.45 ตามลำดับ และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.018 และ 0.892 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเท่ากัน คือ 0.049 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลของ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 กับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 4.0 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการทดลองพบว่าให้ผลสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ ชุติมา ศรีงิ้ว (2548) ซึ่งทำการศึกษาผล pH เริ่มต้นของอาหารที่ใช้ในการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* DMKU 3-1042 โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่เตรียมให้มีน้ำตาลร้อยละ 22 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.05 กรัมต่อลิตร เติม KH_2PO_4 0.05 กรัมต่อลิตร เติม $MgSO_4.7H_2O$ 0.15 กรัมต่อลิตร และปรับ pH ของอาหารเริ่มต้นให้เท่ากับ 4.0, 4.5, 5.0 และ 5.5 ตามลำดับ บ่มที่อัตราการเขย่า 110 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลอง พบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยีสต์ *S. cerevisiae* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยที่ปรับ pH เท่ากับ 5.0 ได้ดีที่สุด โดยเอทานอลที่ได้มีค่าเท่ากับร้อยละ 11.15 โดยปริมาตร

ตารางที่ 3-4 การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้น 4.0, 4.5 และ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

pH เริ่มต้น	pH หลังหมัก	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	เอทานอล		มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(v/v)			
4.0	3.45±0.00	6.78±0.96[a]	4.87±0.46	0.62±0.06[a]	0.892±0.892[a]	0.267±0.022[a]	0.049±0.005[a]
4.5	3.62±0.04	4.32±0.99[b]	6.45±0.23	0.82±0.03[b]	1.018±0.010[b]	0.312±0.011[b]	0.049±0.003[a]
5.0	3.94±0.03	2.97±1.20[b,c]	7.24±0.23	0.92±0.03[c]	1.093±0.048[c]	0.329±0.012[b,c]	0.050±0.005[a]

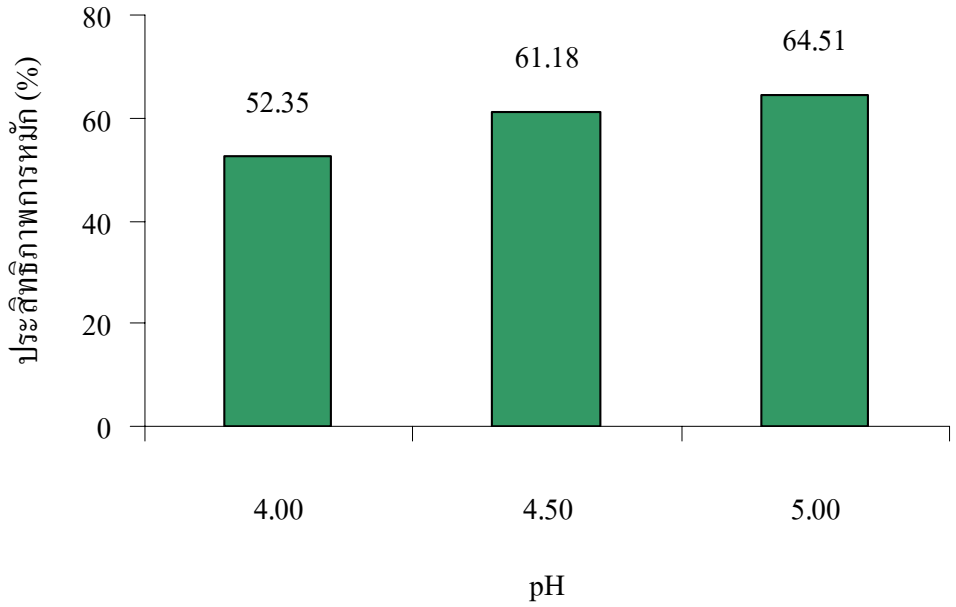
หมายเหตุ: ในแนวตั้งค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ง)

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าในภาวะที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 มีค่า Yp/s เพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ 0.267, 0.312 และ 0.329 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ดังแสดงในภาพที่ 3-5 เมื่อนำค่า Yp/s ของการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 เปรียบเทียบกับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 5.0 พบว่าที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ผลิตเอทานอลต่ำกว่าชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 5.0 อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่ในขณะที่ค่า Yp/s ของการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบกับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของ pH จะทำให้การผลิตเอทานอลและค่า Yp/s เปลี่ยนแปลงด้วยเช่นกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาล และสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการหมักด้วย (Latif and Rajoka, 2001)



ภาพที่ 3-5 ผลของ pH ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองในงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎีดังแสดงในภาพที่ 3-6 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ให้ผลดีที่สุด คือ ร้อยละ 64.51 (วิธีการคำนวนแสดงในข้อ 4 ภาคผนวก ข) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือก pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เป็น pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และใช้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 3-6 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ผลจากการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ดังกล่าวข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า สูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) คือ สูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร แล้วเติมแหล่งไนโตรเจนคือ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร และมีการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 พบว่าการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ด้วยสูตรอาหารที่เตรียมนี้สามารถทำให้ผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 7.24 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.329 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 2.97 กรัมต่อลิตร

มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 3.94 มีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.093 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) มีค่าเท่ากับ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล

ในกระบวนการหมักเอทานอล นอกจากการเลือกใช้สูตรอาหารที่มีความจำเป็นและมีความเหมาะสมต่อกระบวนการผลิตเอทานอลแล้ว ยังพบว่าการควบคุมสภาวะแวดล้อมในทุกขั้นตอนของการหมักก็มีความจำเป็นด้วยเช่นกัน ทั้งนี้ต้องมีความสอดคล้องกับคุณลักษณะสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ด้วย ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยทำการหาอัตราการเขย่า อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก และระยะเวลาในการหมักเอทานอลที่เหมาะสม ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษามีดังต่อไปนี้

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน

2.1 อัตราการเขย่าที่เหมาะสม

ในกระบวนการผลิตเอทานอล อัตราการเขย่านับว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากอัตราการเขย่าที่เหมาะสมในกระบวนการหมักจะทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ดีขึ้นเนื่องจาก ส่งผลต่อการผลิตเอทานอลให้มีปริมาณมากขึ้นด้วย ในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาทดลองหาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยนำสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.0 ด้วย 0.5 M NaOH เติมเชื้อ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50 และ100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

ผลจากการทดลองพบว่า ที่อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 3-5 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับร้อยละ 0.92 โดยปริมาตร หรือ 7.24 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 2.97 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 3.94 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.093 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อน้ำตาล

รองลงมาเป็นอัตราการเขย่าที่ 50 และ 0 รอบต่อนาที ตามลำดับ โดยที่อัตราการเขย่า 50 รอบต่อนาที มีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 5.93 กรัมต่อลิตร ซึ่งมากกว่าที่อัตราการเขย่า 0

รอบต่อนาที ที่มีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 1.32 กรัมต่อลิตร มากเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตเอทานอลที่อัตราการเขย่า 100, 50 และ 0 พบว่าผลที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่อพิจารณาผลของเอทานอลจากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่ามากขึ้นจะทำให้มีผลผลิตเอทานอลแตกต่างกัน คือ มีปริมาณมากขึ้นตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเขย่ามีความสำคัญต่อการผสมกันระหว่างเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการเขย่าช่วยให้ฟองอากาศแตกตัวเป็นเม็ดเล็กๆ ซึ่งจะช่วยให้ออกซิเจนเข้ากับเซลล์ได้ดี และยังส่งผลให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เชื้อสร้างขึ้นอยู่ห่างจากเซลล์มากขึ้น (Jones and Greenfield, 1982) เนื่องจากปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะมีผลยับยั้งการเติบโตของยีสต์ ซึ่งปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ถ้าสูงจนถึง 7.5- 8.0 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลง โดยอัตราเร็วของการหมักจะช้ามากหรือเกือบไม่เกิดเลย (King and Hossain, 2004) ซึ่งผลจากการทดลองมีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์ (2547) ในการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* SKP1 โดยเลี้ยงในภาวะน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ผลจากการทดลองพบว่า อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* SKP1 โดยเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 53.02 กรัมต่อลิตร

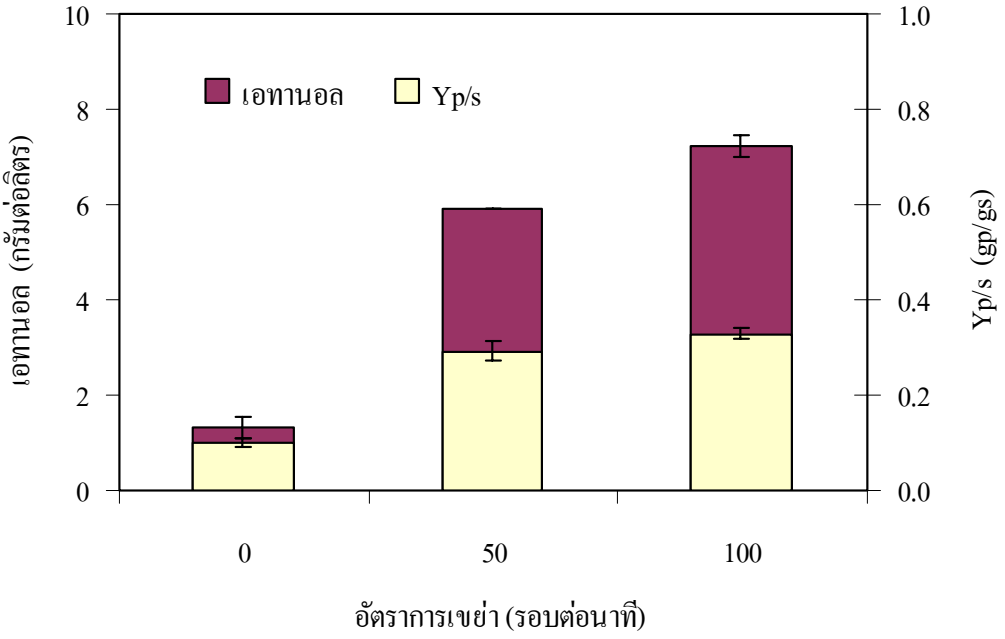
เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง และ Yx/s พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ ที่อัตราการเขย่า 100 และ 50 รอบต่อนาที ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง และ Yx/s ของแต่ละพารามิเตอร์มีค่าใกล้เคียงกัน ในขณะที่อัตราการเขย่า 0 รอบต่อนาที ปริมาณน้ำตาลที่เหลือมีค่าสูงกว่า ในขณะที่น้ำหนักเซลล์แห้ง และ Yx/s มีค่าต่ำกว่าที่อัตราการเขย่า 100 และ 50 รอบต่อนาทีมาก ทั้งนี้เนื่องจากภายใต้สภาวะที่ขาดอากาศเป็นปัจจัยในการควบคุมจำนวนและอัตราการเจริญของเซลล์ *S. cerevisiae* ซึ่งอาจมีผลทำให้เชื้อนำเอาน้ำตาลมาใช้ในการเจริญเติบโตได้น้อย และส่งผลต่อการผลิตเอทานอลด้วยเช่นกัน (สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์, 2530) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Magdalena และคณะ (1988) ได้ศึกษาความต้องการออกซิเจนของเชื้อยีสต์ในการหมักน้ำตาลไซโลสและกลูโคสให้เป็นเอทานอล โดยศึกษาอิทธิพลของออกซิเจนที่มีต่อการใช้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิดของเชื้อยีสต์ในเมทาบอลิซึม ซึ่งจากผลการศึกษาพบว่าถึงแม้ว่าออกซิเจนจะไม่เป็นที่ต้องการในการหมักเอทานอลของยีสต์ตามหลักทฤษฎีแต่จะเป็นตัวกระตุ้นอัตราการผลิตเอทานอลจากน้ำตาล

ตารางที่ 3-5 การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

อัตราการเขย่า (rpm)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล		มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(v/v)			
0	11.86±2.27[a]	4.48±0.036	1.32±0.23	0.17±0.03[a]	0.620±0.034[a]	0.100±0.008[a]	0.025±0.001[a]
50	4.63±1.46[b]	3.39±0.072	5.93±0.00	0.75±0.00[b]	0.977±0.015[b]	0.292±0.020[b]	0.039±0.003[a]
100	2.97±1.20[b,c]	3.94±0.032	7.24±0.23	0.92±0.03[c]	1.093±0.048[c]	0.329±0.012[c]	0.050±0.005[a]

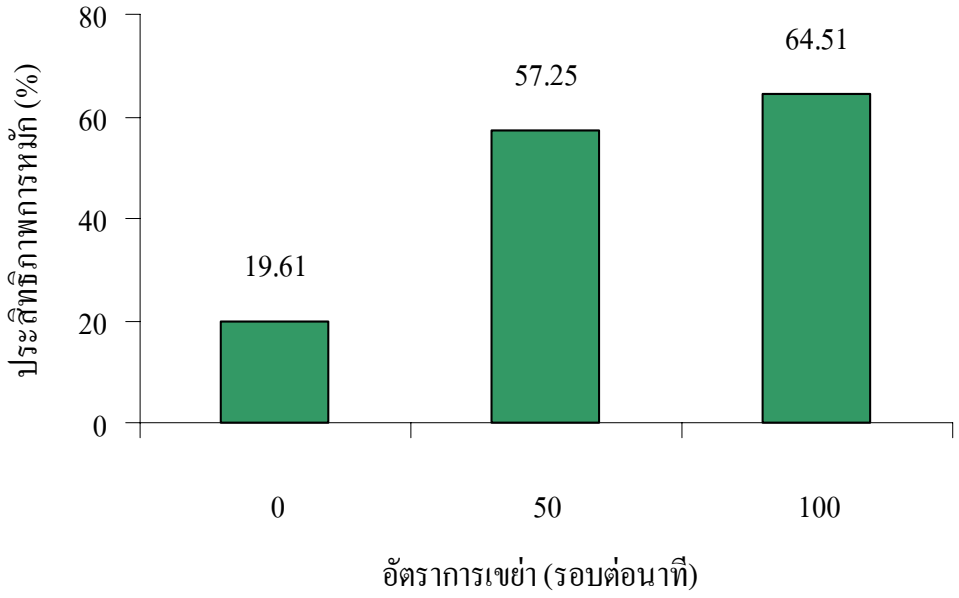
หมายเหตุ: ในแนวตั้งค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ง)

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าที่อัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที ดังแสดงในภาพที่ 3-7 มีค่า Yp/s เพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ 0.100, 0.292 และ 0.329 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เมื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกันโดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติ พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 3-7 ผลของอัตราการเขย่าต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองในงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎีดังแสดงในภาพที่ 3-8 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ให้ผลดีที่สุด คือ ร้อยละ 64.51 (วิธีการคำนวนแสดงในข้อ 4 ภาคผนวก ข) ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงเลือกใช้อัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เป็นอัตราการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และใช้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 3-8 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในสภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

2.2 ผลอุณหภูมิที่เหมาะสม

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตและหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง และจะเจริญเติบโตช้าและหมักเอทานอลได้ต่ำที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นในการหมักควรควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 37 องศาเซลเซียส เพราะนอกจากจะทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลงแล้ว ยังมีผลทำให้จำนวนเซลล์ลดลงด้วย (K□ng and Hossa□n, 2004) ในระดับอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะใช้อุณหภูมิในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล (Kada *et al.,* 2004) ในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยนำสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.0 ด้วย 0.5 M NaOH เติมเชื้อ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการ

เขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

ผลจากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 3-6 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับร้อยละ 0.92 โดยปริมาตร หรือ 7.24 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 2.97 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 3.94 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.093 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล

รองลงมาเป็นอุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 6.19 และ 5.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 5.43 และ 4.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ pH หลังการหมักมีค่าอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน คือ 4.14 และ 4.19 ตามลำดับ มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ให้ค่าใกล้เคียงกัน คือ 1.108 และ 1.000 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าลดลงตามลำดับ คือ 0.057 และ 0.048 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล

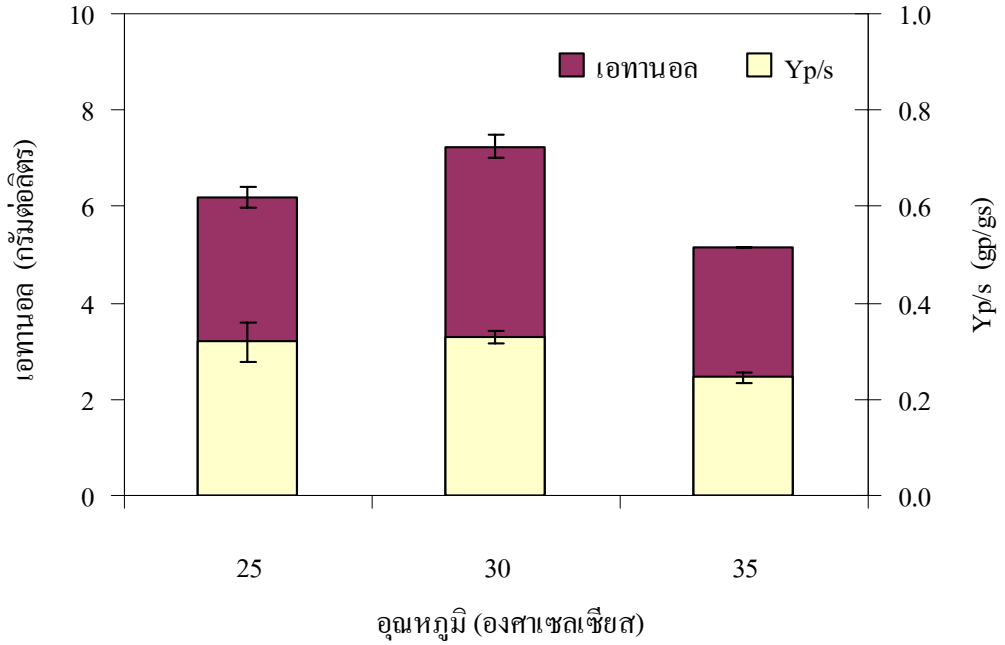
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการหมักด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกันจะให้ปริมาณเอทานอลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เพราะเมื่อเปรียบเทียบอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักพบว่าเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 25 องศาเซลเซียส เป็น 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักมากขึ้นเป็น 35 องศาเซลเซียส กลับพบว่ามีปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่สูงสำหรับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ส่งผลให้การเจริญเติบโตได้ไม่ดีมากนักจึงมีผลให้การผลิตเอทานอลลดลงด้วยเช่นกัน อย่างไรก็ตามพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมและเชื้อจุลินทย์สามารถทนได้สูงสุดสำหรับการเจริญและการหมักเอทานอล ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ด้วย (ปนิดา กิตติรัตน์หมาย, 2546) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Roukas (1996) ที่ได้ทำการทดลองผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลที่ได้จากหัวบีช ด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* ในการหมักแบบแบทช์ โดยมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 250 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 500 รอบต่อนาที ผลจากการทดลองพบว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 53 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 3-6 การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

อุณหภูมิ (°C)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล		มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(v/v)			
25	5.43±1.95[a]	4.14±0.021	6.19±0.23	0.78±0.03[a]	1.108±0.024[a]	0.319±0.042[a]	0.057±0.007[a]
30	2.97±0.03[a]	3.94±1.20	7.24±0.23	0.92±0.03[b]	1.093±0.048[a]	0.329±0.012[a]	0.050±0.005[a]
35	4.00±1.10[a]	4.19±0.026	5.14±0.00	0.65±0.00[c]	1.000±0.010[b]	0.245±0.013[b]	0.048±0.002[a]

หมายเหตุ: ในแนวตั้งค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ง)

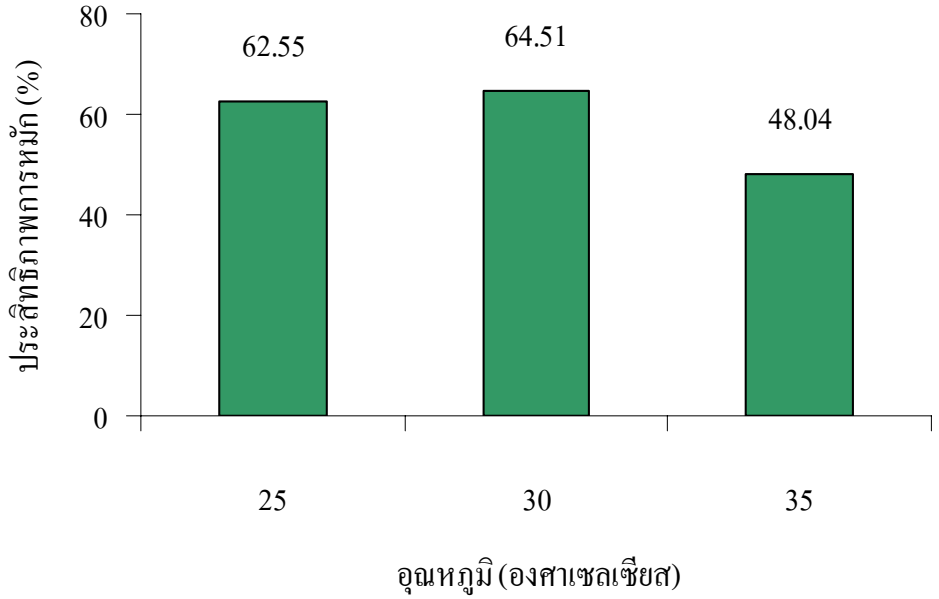
สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสดังแสดงในภาพที่ 3-9 มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.329 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และมีค่าใกล้เคียงกับการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือ 0.319 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันโดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในขณะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่า Yp/s ต่ำสุดเมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่ง Yp/s ที่ได้มีค่า 0.245 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล



ภาพที่ 3-9 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองในงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎีดังแสดงในภาพที่ 3-10 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสภาวะการบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลดีที่สุด คือ ร้อยละ 64.51 (วิธีการคำนวนแสดงในข้อ 4 ภาคผนวก ข) ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงเลือกใช้

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และใช้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 3-10 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในสภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

2.3 ระยะเวลาในการหมักเอทานอลที่เหมาะสม

B□lford และคณะ (1942) ได้ทำการหมักเอทานอลในถังเดี่ยวแบบต่อเนื่องจากกากน้ำตาลโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* (Seagram No.1) พบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเริ่มต้น 12-13 ร้อยละ ให้เป็นเอทานอลได้สมบูรณ์ภายใน 4-10 ชั่วโมง ซึ่งการผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณสูงในระยะเวลาสั้นนั้นจะสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตลงได้ ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการจากการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล โดยนำสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.0 ด้วย 0.5 M NaOH เติมเชื้อ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง คือ 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 นำมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

ผลจากการทดลองพบว่าที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 3-7 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับร้อยละ 1.17 โดยปริมาตร หรือ 9.20 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.03 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล

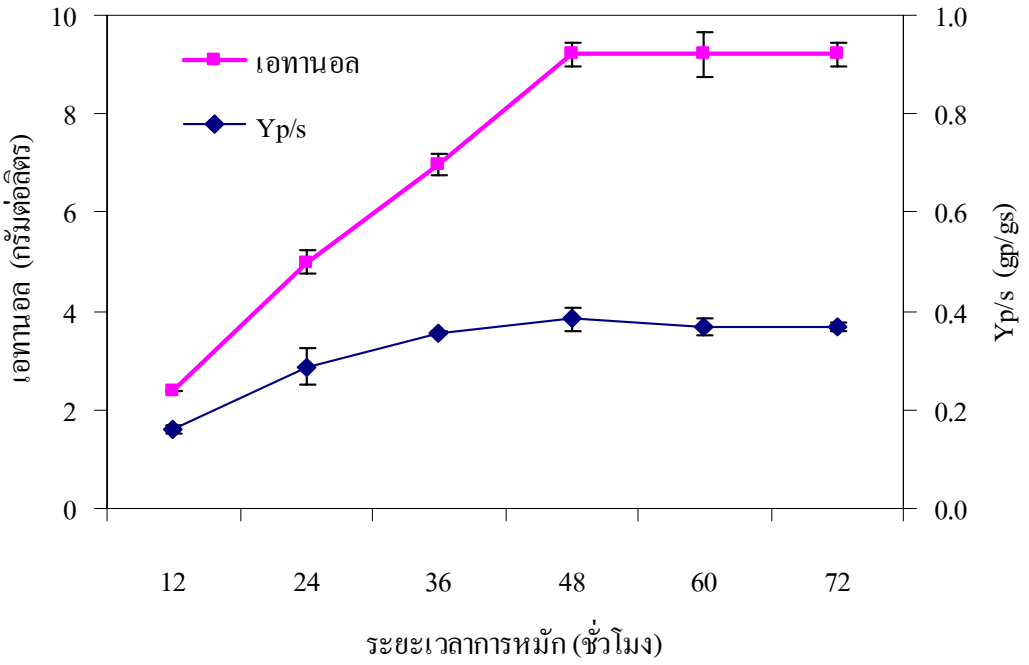
เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการหมักชั่วโมงที่ 12, 24, 36 และ 48 พบว่าเอทานอลและน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ซึ่งเมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับเช่นกัน และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เหลือพบว่าปริมาณน้ำตาลลดลงตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในขณะที่ใช้เวลาในการหมักเพิ่มขึ้นจาก 48 ชั่วโมง เป็น 60 และ 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าคงที่ และเมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งกลับมีค่าลดลง คือ 1.040 และ 0.960 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการหมักในชั่วโมงที่ 60 และ 72 ไม่มีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่เลย ทำให้ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ขาดอาหารสำหรับใช้ในการเจริญเติบโตและส่งผลต่อการผลิตเอทานอลด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 3-7 การหมักเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง

ระยะเวลาการหมัก (ชม.)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH หลังการหมัก	เอทานอล		มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s	Yx/s
			(g/L)	%(v/v)		(g_p/g_s)	(g_x/g_s)
12	10.23±0.06[a]	4.36±0.06	2.37±0.00	0.30±0.00[a]	0.570±0.010[a]	0.160±0.010[a]	0.039±0.000[a]
24	7.65±1.50[b]	4.31±0.03	4.99±0.23	0.630.03[b]	0.720±0.036[b]	0.288±0.036[b]	0.041±0.002[a]
36	5.47±0.74[c]	4.25±0.03	6.97±0.23	0.88±0.03[c]	0.900±0.025[c]	0.357±0.024[c]	0.046±0.003[b]
48	1.02±0.93[d]	4.03±0.03	9.20±0.23	1.17±0.03[d]	1.200±0.025[d]	0.384±0.023[c,d]	0.050±0.001[c]
60	0[d,e]	3.90±0.01	9.20±0.23	1.17±0.03[d,e]	1.040±0.052[e]	0.369±0.018[c,d,e]	0.042±0.002[a]
72	0[d,e,f]	3.86±0.01	9.20±0.23	1.17±0.03[d,e,f]	0.960±0.020[f]	0.369±0.001[c,d,e,f]	0.038±0.001[a]

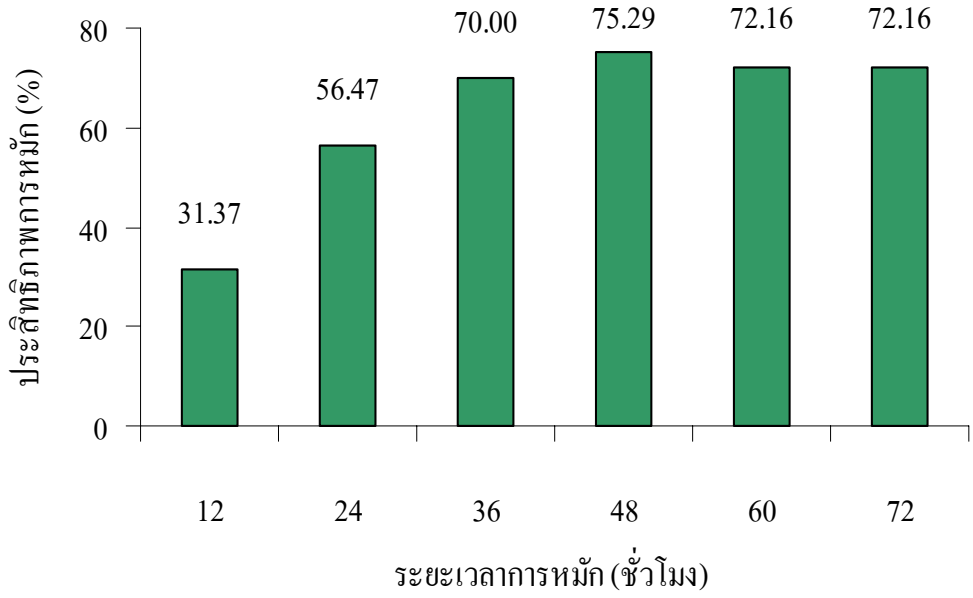
หมายเหตุ: ในแนวตั้งค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ95 (ภาคผนวก ง)

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับค่าเอทานอลที่ได้ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น โดยระยะเวลาในการหมักชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในภาพที่ 3-11 มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.384 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล



ภาพที่ 3-11 ผลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองในงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎีดังแสดงในภาพที่ 3-12 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสภาวะการบ่มเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลา 48 ให้ผลดีที่สุด คือ ร้อยละ 75.10 (วิธีการคำนวนแสดงในข้อ 4 ภาคผนวก ข) ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้ระยะเวลาการหมักเอทานอล 48 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* (S_1)



ภาพที่ 3-12 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) คือ สภาวะที่มีการหมักด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง โดยพบว่าค่าเอทานอลสูงสุดที่ได้เท่ากับ 9.20 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.03 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล

สำหรับในงานวิจัยฉบับนี้ได้ทำการวัดหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer ซึ่งเป็นเครื่องมือที่ใช้วัดเอทานอลโดยการหาจุดเดือดของน้ำเทียบกับจุดเดือดของตัวอย่างที่วัด แล้วเปิดตารางของ Dujardin, Successeur De Salleron-Pariset เพื่อหาค่าเอทานอลที่ได้ ซึ่งค่าเอทานอลที่วัดได้อาจจะมีความคลาดเคลื่อนอยู่บ้าง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการยืนยันผลโดยการวัดค่าเอทานอลที่ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ผลิตได้ด้วยเครื่อง (GC) ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 200 องศาเซลเซียส โดยการเลือกเอาตัวอย่างเอทานอลของการศึกษาหาระยะเวลาในการหมักที่

เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ไปทำการตรวจวัด ซึ่งผลจากการตรวจวัดค่าเอทานอลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 3-8 พบว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC ให้ค่าเอทานอลมากกว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง Ebull□ometer ของทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจวัด และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนความต่างระหว่างการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC กับ การตรวจวัดด้วยเครื่อง Ebull□ometer พบว่า มีความแตกต่างกันเท่ากับร้อยละ 0.23±0.024 โดยปริมาตร

ตารางที่ 3-8 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebull□ometer กับ เครื่อง Gas c□romatograp□y

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	เอทานอลวัดด้วยเครื่อง Ebull□ometer %(v/v)	เอทานอลวัดด้วยเครื่อง Gas c□romatograp□y %(v/v)
12	0.30	0.55
24	0.63	0.88
36	0.88	1.14
48	1.17	1.38
60	1.17	1.35
72	1.17	1.38

2.4 ผลการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2)

จากผลการศึกษาหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) พบว่า การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้ผลผลิตเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้นมีค่าค่อนข้างต่ำ ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาที่กล่าวถึงคุณสมบัติของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ว่ามีคุณสมบัติที่ดีในกระบวนการหมักเอทานอลสามารถหมักเอทานอลได้รวดเร็วและให้ผลผลิตสูง (B□lford *et al.*, 1942) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบบางประการในน้ำอัดลมหมดอายุ เช่น สารปรุงแต่ง รสกลิ่น และสี ที่มีผลทำให้ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) มีประสิทธิภาพในการหมักลดลง แต่อย่างไรก็ตามอาจเนื่องมาจากความสามารถและคุณสมบัติของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ในการหมักและให้ผลผลิตเอทานอลเองด้วยเช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้มั่นใจว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอล รวมถึงสามารถให้ผลผลิตเอทานอลและมีประสิทธิในการหมักสูงสุดในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาเลือกยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) ซึ่งพบว่าเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ดี

โดยเป็นเชื้อยีสต์ที่ใช้สำหรับการหมักไวน์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มาทำการศึกษาทดลองเพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลของยีสต์ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ โดยทำการศึกษาด้วยการนำผลการศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) มาใช้เป็นสูตรอาหารและควบคุมสภาวะแวดล้อมในการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) ทั้งนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้สูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร (98 กรัมต่อลิตร คือ น้ำอัดลมหมดอายุที่ยังไม่ผ่านการเจือจาง) ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.0 ด้วย 0.5 M NaOH เติมเชื้อ *S. cerevisiae* (S_2) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

ผลจากการทดลองพบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 98 กรัมต่อลิตร ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 3-9 โดยเอทานอลที่ได้มีปริมาณเท่ากับร้อยละ 6.17 โดยปริมาตร หรือ 48.72 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 1.30 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.28 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 5.97 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.06 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล

เมื่อพิจารณาที่เข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นอื่นๆ คือ 25, 30 , 40 และ 50 กรัมต่อลิตร พบว่าเอทานอลที่ได้มีค่าลดลงตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คือ 12.37, 14.75, 20.01 และ 25.15 กรัมต่อลิตร เมื่อตรวจวัดปริมาณน้ำตาลหลังการหมัก พบว่าไม่มีน้ำตาลเหลืออยู่เลย อาจเนื่องมาจากยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) นำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ เช่น เอทานอล เมื่อพิจารณา pH หลังการหมัก พบว่าในทุกความเข้มข้น pH มีค่าลดลงจากเดิม ซึ่งจากผลการรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า นอกจากยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ เช่น เอทานอลแล้วยังมีการสร้างกรดเกิดขึ้นด้วย (Krishna *et al.,* 1998 อ้างโดย ยุทธิศักดิ์ สุบการี, 2551)

เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ 3.060, 5.103 และ 6.100 กรัมต่อลิตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในขณะที่ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 50 และ 98 กรัมต่อลิตร กลับมีค่าลดลงโดยมีความแตกต่างกัน

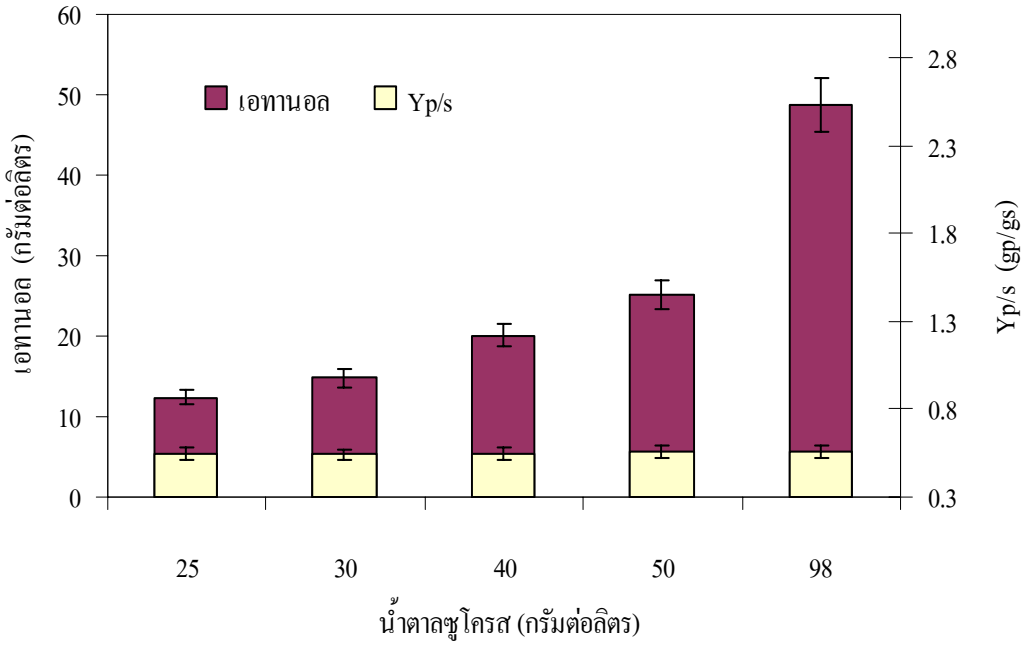
อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่าให้ค่าไปในทิศทางเดียวกับน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มมากขึ้นจากกระบวนการหมักมีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) โดยจากผลรายงานวิจัยของ Loureiro and Uden (1982) พบว่าสภาวะที่เอทานอลถูกผลิตขึ้นมากจะมีผลต่ออัตราการตายของเซลล์ยีสต์ โดยปริมาณเอทานอลที่ถูกผลิตขึ้นนี้จะไปเปลี่ยนองค์ประกอบของลิปิด และฟอสโฟลิปิดของเมมเบรนของเชื้อยีสต์ ทำให้ความสามารถในการทนต่อความร้อนของยีสต์ลดลง การที่ยีสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้จึงเป็นผลให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลงด้วย (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2536)

ตารางที่ 3-9 การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ปริมาณน้ำตาล (g/L)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH	เอทานอล		มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(v/v)			
25	0[a]	4.43±0.01	12.37±0.23	1.57±0.03[a]	3.06±0.040[a]	0.490±0.009[a]	0.120±0.002[a]
30	0[a]	4.34±0.01	14.75±0.23	1.87±0.03[b]	5.103±0.025[b]	0.490±0.008[a]	0.170±0.001[b]
40	0[a]	4.30±0.01	20.01±0.23	2.53±0.03[c]	6.100±0.065[c]	0.500±0.006[a]	0.152±0.002[c]
50	0[a]	4.28±0.01	25.15±0.23	3.18±0.03[d]	5.820±0.035[d]	0.503±0.005[a,b]	0.126±0.001[d]
98	1.30±0.364[b]	4.28±0.01	48.72±0.23	6.17±0.03[e]	5.970±0.021[e]	0.504±0.001[a,b]	0.062±0.000[e]

หมายเหตุ: ในแนวตั้งค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ง)

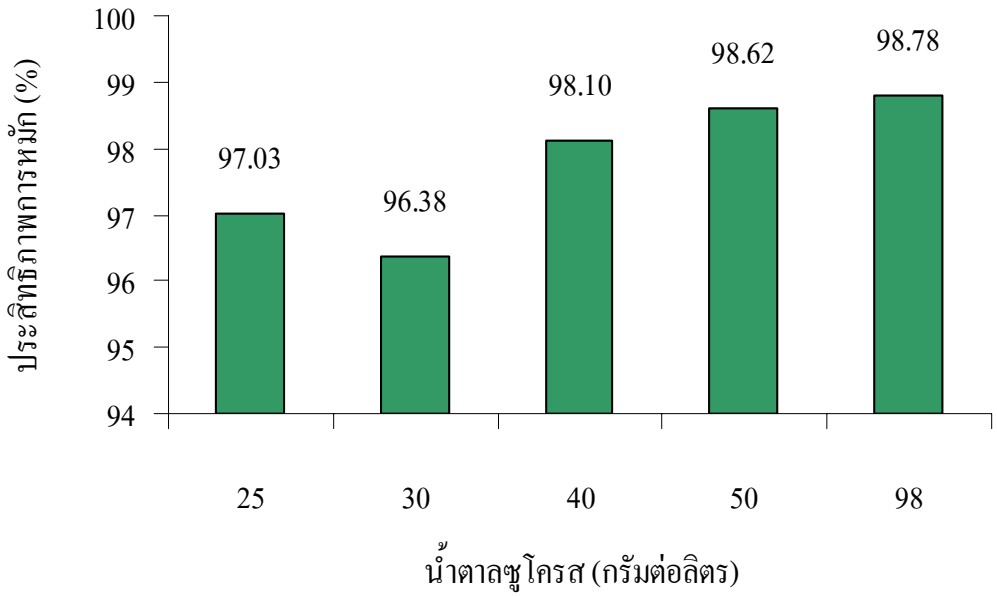
สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s ดังแสดงในตารางที่ 3-13 พบว่า ที่เข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 และ 30 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากัน คือ 0.490 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ในขณะที่ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.50, 0.503 และ 0.504 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำค่า Yp/s มาเปรียบเทียบกันโดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 3-13 ผลการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองในงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎีดังแสดงในภาพที่ 3-14 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 98

กรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด คือ ร้อยละ 98.78 (วิธีการคำนวนแสดงในข้อ 4 ภาคผนวก ข) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2)



ภาพที่ 3-14 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) เมื่อคิดเทียบเป็นร้อยละของค่าทฤษฎี (Yp/s = 0.51) ในภาวะการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

จากผลการทดลองผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) ดังกล่าวข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า ยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) สามารถผลิตให้ค่าเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า Yp/s และ Yx/s ได้สูงกว่าการผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *S.cerevisiae* (S_1) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก *S.cerevisiae* (S_2) เป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้นสูงในการหมักได้ดีกว่ายีสต์ *S.cerevisiae* (S_1)

จากผลการทดลองจะกล่าวได้ว่าการเลือกใช้ยีสต์ต่างสายพันธุ์กันส่งผลต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ต่างกันด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ปนิดา กิตติหมาย (2546) ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลระหว่าง *S.cerevisiae* สายพันธุ์ที่ใช้ในโรงงานสุราทั่วไปคือ *S.cerevisiae* Sc90 และสายพันธุ์ต่างๆที่สามารถตกตะกอนได้คือ *S.cerevisiae*

M30, AM12, TJI และ TJ3 ในสูตรอาหารที่มีการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นจากกากน้ำตาลร้อยละ 18 เติม $(NH_4)_2SO_4$ 0.05 ร้อยละ ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 และในสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 37 ชั่วโมง ผลจากการศึกษาพบว่า *S. cerevisiae* Sc90 สามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 9.49 โดยปริมาตร รองลงมาคือ *S. cerevisiae* M30, TJ1, TJ3 และ AM12 สามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.69, 7.49, 6.47 และ 6.27 โดยปริมาตร ตามลำดับ

สำหรับในงานวิจัยฉบับนี้นอกจากจะทำการศึกษาหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของยีสต์แล้ว ยังได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการวิธีฆ่าเชื้อด้วยหม้อฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำและวิธีเติมสารเคมี คือ Potassium metabisulfite (KMS) ด้วย ซึ่งเป็นแนวทางเลือกอีกอย่างหนึ่งเพื่อความสะดวกในการนำไปใช้ในการทำลายเชื้อที่ปนเปื้อนสำหรับกระบวนการผลิตเอทานอล และเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดและการหมักเป็นไปอย่างรวดเร็ว

2.5 ผลการกำจัดเชื้อในน้ำอัดลมหมดอายุโดยการเติม KMS

ทำการศึกษาโดยใช้สูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.0 ด้วย 0.5 M NaOH เติม KMS ความเข้มข้น 200 ppm ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยทำการศึกษาทั้ง *S. cerevisiae* (S_1) และ *S. cerevisiae* (S_2) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงนำมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

ผลจากการทดลองการเติมสาร KMS ความเข้มข้น 200 ppm ในการกำจัดเชื้อปนเปื้อนเพื่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อนำตัวอย่างมาตรวจวัดหาปริมาณเอทานอลพบว่าไม่มีเอทานอลเกิดขึ้นเลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก KMS ความเข้มข้น 200 ppm ที่เติมไปนั้นมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและส่งผลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) แต่ในขณะที่ผลการกำจัดเชื้อปนเปื้อนเพื่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) กลับให้ค่าเอทานอลเท่ากันกับผลการทดลองกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยการฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ โดยปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าเท่ากัน คือ 12.37 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า Yp/s และ Yx/s มีค่าใกล้เคียงกันกับวิธีกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยการฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ ดังแสดงในตารางที่ 3-10

เมื่อเปรียบเทียบผลปริมาณการผลิตเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า Yp/s และ ค่า Yx/s ของการฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ และวิธีการเติม KMS ความเข้มข้น 200 ppm ของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) โดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ตารางที่ 3-10 ผลการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) จากการผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 กำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยวิธีการฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ และการเติม KMS 200 ppm จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

เชื้อยีสต์ *S.cerevisiae*	วิธีการฆ่าเชื้อ	ปริมาณน้ำตาล (g/L)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล		มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
					(g/L)	%(v/v)			
S_1	ฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ	25	2.97	3.94±0.03	7.24±0.23	0.92±0.03	1.09±0.048	0.329±0.012	0.050±0.005
S_1	KMS	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S_2	ฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ	25	0[a]	4.43±0.01	12.37±0.23	1.57±0.03[a]	3.06±0.040[a]	0.490±0.009[a]	0.120±0.002[a]
S_2	KMS	25	0[a]	3.71±0.01	12.37±0.23	1.57±0.03[a]	3.07±0.025[a]	0.495±0.008[a]	0.123±0.003[a]

หมายเหตุ: ในแนวตั้งค่าที่มีตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกันมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาคผนวก ง)

ND = (Non Detectable) ไม่สามารถตรวจวัดได้ที่ความละเอียดของเครื่องมือ

จากผลการทดลองผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *S.cerevisiae* (S_1) และ *S.cerevisiae* (S_2) ดังกล่าวข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า น้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้ในการนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล และเมื่อเปรียบเทียบการหมักเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุกับวัตถุดิบชนิดอื่นเช่น กากน้ำตาล พบว่าน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักเพียงอย่างเดียว ในการหมักเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุจึงมีความจำเป็นต้องเติมแหล่งอาหารอย่างอื่น เช่น แหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) เพิ่มเข้าไปด้วยเพื่อให้ยีสต์ *S.cerevisiae* นำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีและสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และนอกจากนี้ในการหมักเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ ยังต้องมีการไล่ก๊าซคาร์บอนออกก่อนทำการหมักเพื่อไม่ให้มีผลยับยั้งและรบกวนกิจกรรมการหมักเอทานอลของยีสต์

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุสรุปได้ว่า น้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล เนื่องด้วยสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณสูงเท่ากับ 145 กรัมต่อลิตร และมีสภาพความเป็นกรดเท่ากับ 3.02 ซึ่งเมื่อนำเอาน้ำอัดลมหมดอายุมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล โดยทำการศึกษาหาสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) พบว่าสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) คือ สูตรอาหารที่มีการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยเติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณเท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร และปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 ซึ่งเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 0.92 โดยปริมาตร หรือ 7.24 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.329 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล คิดเป็นค่าประสิทธิภาพการหมักโดยเทียบกับค่าทางทฤษฎีเท่ากับร้อยละ 64.51

เมื่อได้สูตรอาหารที่เหมาะสม ทำการศึกษาต่อโดยหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) พบว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) คือ สภาวะที่มีการใช้อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 1.17 โดยปริมาตร หรือ 9.20 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.384 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล คิดเป็นค่าประสิทธิภาพการหมักโดยเทียบกับค่าทางทฤษฎีเท่ากับร้อยละ 75.29 และได้ทำการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer กับเครื่อง GC เพื่อศึกษาเปรียบเทียบถึงความแม่นยำของเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณเอทานอล ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า การตรวจวัดหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC ให้ค่าเอทานอลมากกว่าการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer ของทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจวัด และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนความต่างพบว่ามีความแตกต่างกันเท่ากับร้อยละ 0.23±0.024 โดยปริมาตร

ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล จึงได้ทำการศึกษาผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์

S. cerevisiae (S_2) โดยใช้สูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) พบว่าผลจากการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) สามารถยืนยันได้ว่า น้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล และให้ค่าปริมาณเอทานอลเท่ากับร้อยละ 6.17 โดยปริมาตร หรือ 48.72 กรัมต่อลิตร ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.97 กรัมต่อลิตร ให้ค่า Yp/s เท่ากับ 0.504 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และให้ค่า Yx/s เท่ากับ 0.06 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งมีค่ามากกว่าการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ของทุกปัจจัยและจากการศึกษายังพบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) ยังสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ในปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นสูง และเมื่อคิดเป็นค่าประสิทธิภาพการหมักในด้าน Yp/s ของการทดลองโดยเทียบกับค่าทางทฤษฎีมีค่าเท่ากับร้อยละ 98.78

นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในน้ำอัดลมหมดอายุด้วยวิธีการฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ และวิธีเติมสารเคมี KMS เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้วิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อน ให้มีความสะดวกต่อการผลิต การหมักเป็นไปอย่างรวดเร็วและเพื่อประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลสูงสุด ซึ่งผลจากการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) พบว่าวิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยการเติมสาร KMS 200 ppm ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ เนื่องจาก KMS 200 ppm มีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่ในขณะที่การผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) KMS 200 ppm สามารถกำจัดเชื้อปนเปื้อนและสามารถผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุได้ โดยค่าเอทานอลที่ได้จากการกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยวิธีการฆ่าเชื้อภายใต้ความดันไอน้ำ และวิธีการเติมสาร KMS มีค่าเท่ากันซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ข้อเสนอแนะ

สำหรับการผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) พบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้สามารถใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงในการเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ ซึ่งมีประสิทธิภาพการหมักสูงสุดถึงร้อยละ 98.78 และเพื่อให้มั่นใจถึงประสิทธิภาพการหมักหากมีการนำไปใช้ในระดับโรงงานจริงจึงควรทำการทดลองหมักเอทานอลในระดับโรงงานต้นแบบด้วย (Pilot scale)

เอกสารอ้างอิง

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

กมลศักดิ์ ตั้งธรรมเนียม. 2540. คู่มือไวน์. กรุงเทพฯ: ดวงกมล. 248 หน้า.

เกศมล ไทยทอง. 2542. ผลของแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces. cerevisiae*. สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

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

จรูญ คำนวนตา, ประดิษฐ์ ครุวัฒณา, ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และวิชชุพร ว่องสุวรรณเลิศ. 2525. รายงานการสำรวจการหมักแอลกอฮอล์ของโรงงานแห่งหนึ่งในช่วงวิกฤติการของการหมัก.วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย. 1 (1): 6-13.

เฉลา ศรีทวี. 2535. สารอาหารที่เหมาะสมในการบำบัดน้ำเสียจากโรงงานผลิตน้ำอัดลมด้วยระบบ Aerated lagoon. สาขาการจัดการสิ่งแวดล้อม. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ชุติมา ศรีงิ้ว. 2548. การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

โชคชัย วนภู นันทพร บุญเกิด และลำไพร ดิษฐวิบูลย์. 2546. Wine maker คนทำไวน์. นครราชสีมา: สมบูรณ์พริ้นติ้ง. 222 หน้า.

ณัฐกิตติ์ ธรรมเจริญ. 2543. เหล้าพื้นบ้าน. กรุงเทพฯ : บริษัทนาคาอินเตอร์มีเดีย จำกัด.190 หน้า.

ณีรนุช ควรเชิดชู และสุจิตรา วงศ์เกษมจิตต์. 2550. แก๊สโซฮอล์ : เทคโนโลยีสะอาดช่วยเศรษฐกิจประเทศชาติ.

เทพปัญญา เจริญรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังแบบครั้งคราวโดยการเติมสับสเตรทขึ้นกับพีเอช. สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 1-117.

ธีรพร กงบังเกิด. 2537. จุลชีววิทยาอาหาร. สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยนเรศวร.

นฤมล โตอ่อน. 2549. ยีสต์สายพันธุ์ทนร้อนและการประยุกต์ใช้ในการผลิตเอทานอล. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เนตรนภิส วัฒนสุชาติ. 2535. อาหาร. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 1-4.

เบญจวรรณ ชิตมณี. 2534. การผลิตเอ็นไซม์เซลลูเลสในน้ำทิ้งโรงงานน้ำมันปาล์มโดยใช้เชื้อราที่แยกได้. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปนิดา กิตติรัตน์หมาย. 2546. การปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ตกตะกอนและเทคนิครีพีทเฟดแบทช์. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์. 2547. การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำอ้อยโดย *Saccharomyces. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ ประดิษฐ์ ครุวัณณา และจรูญ คำนวนตา. 2525. การศึกษาผลของสภาพการหมักต่อประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล. รายงานผลการวิจัยเรื่องขบวนการที่เหมาะสมสำหรับการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง. คณะวิศวกรรมศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มัลลิกา บุญมี. 2548. การผลิตเอทานอลโดยการหมักร่วมของจุลินทรีย์ที่ใช้กลูโคสและจุลินทรีย์ที่ใช้ไซโลส. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

มนตรี จุฬาวัฒนทล, 2542, เมตาบอลิสมของคาร์โบไฮเดรต, สาขาวิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, หน้า 193-213.

ยุทธศักดิ์ สุบการี. 2551. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากเส้นใยปาล์มโดยใช้วิธี Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF). สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ระวีวรรณ แกล้วกล้า. 2538. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. สาขาวิชาเคมีเทคนิค. บัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

รำไพ ศิริมนกุล. 2534. แอลกอฮอล์ เคมีอินทรีย์เบื้องต้น. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยรามคำแหง. หน้า 440 – 446.

วิมล วิริยะวิทย์. 2526. ความก้าวหน้าของอุตสาหกรรมไทย. กรมส่งเสริมอุตสาหกรรม. กระทรวงอุตสาหกรรม. 96 หน้า

วรณี แพ่งจันทึก และวิชัย เพ็ชรดี. 2546. โครงการการศึกษาการสกัดเอทานอลจากฟางข้าว. สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี. คณะวิศวกรรมศาสตร์. มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

วรรณภา ยงสุวรรณไพศาล. 2546. การผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวัสดุเศษเหลือทิ้งจากกล้วยโดย *Aspergillus niger*. สาขาอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยนเรศวร.

ศิริพร ล้านแปง. 2539. การผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องโดยยีสต์ที่ชอบเกาะกลุ่มสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TJ1. เชียงใหม่. สาขาวิชาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

สิรินทร์ เวศกิจกุล. 2530. การปรับปรุงพันธุ์ยีสต์ที่ผลิตเอทานอลให้ทนกรด. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์. 2530. เทคโนโลยีการหมัก. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง. 393 หน้า.

สมใจ ศิริโภค. 2544. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์พิมพ์ดี จำกัด. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

อริสรา รอดมุ้ย. 2546. การศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสโดยเชื้อยีสต์ผสม *S. cerevisiae* 5019 และ *C. tropicalis* 5045. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวเคมี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

อรุณวรรณ นุชพ่วง. 2547. การย่อยสลายหญ้าแฝกห้อม *Vetiveria zizanioides* nash โดยใช้เชื้อราที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้. สาขาพฤกษศาสตร์. คณะ วิทยาศาสตร์. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อรพิน ภูมิภมร. 2526. ระบบชีวภาพที่สำคัญต่อเทคโนโลยีชีวภาพ เล่มที่ 2: จุลินทรีย์ในเครื่อง- ดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอาหารพื้นเมือง. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 156 หน้า.

Alfenore, S., C. Molina-Jouve., S.E. Guillouet., J.L. Uribelarrea., G. Goma and L. Benbadis. 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60 (12): 67-72.

Amerine, M. A. and Ough, C. S., 1974. Methods of Analysis of Mustc and Wines. New York: John Wiley and Sons. 121 p.

Anon. 1996. Oxygenates could displace 4% of U.S. gasoline needs. says GAO. Hart's Oxy-Fuel News. 8 (27): 1.

Bilford, H.R., Scalf, R.E., Stark, W.H., and Kolachov, P.J., 1942. Alcoholic fermentation of molasses: rapid continuous fermentation process. Ind. Eng. Chem. 34: 193-203.

Brandberg, T., Franzen, C. J., and Gustafsson, L., 2004. The fermentation performance of nine strain of *Saccharomyces cerevisiae* in batch and fed-batch culyure in dilute-acid wood hydrolysate. J. Biosci. Bioeng. 98 : 122-125.

Chen, H., Jin, S., 2006. Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose. Enzyme and Microb. Technol. 39 : 1430-1432.

Cysewski, G.R. and C.R. Wilke. 1978. Process design and economic studies of alternative fermentation methods for the production of ethanol. Biotechnol. Bioeng. 20: 1421-1444.

D'Amore, T., Celotto, G. I., and Stewart, G.G., 1989. Selection and optimization of yeast suitable for ethanol production at 40 °c. Enzyme Microb. Technol. 11: 411-416.

Detroy, R.W., Cunningham, R.L., Bothast, R.J., Bagby, M.O., and Herman, A., 1982. Bioconversion of wheat straw cellulose hemicellulose to ethanol by *Saccharomyces uvarum* and *Pachysolen tannophilus*. Biotechnol. Bioeng. 24: 1105 1113.

Echegaray, O.F., Carvalho, J.C.M., Fernandes, A.N.R., Sato, S., Aquarone, M., and Vitolo, M., 2000. Fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae* in sugar-cane blackstrap molasses: invertase activity of intact cell in ethanol fermentation. Biomass and Bioenergy. 19:39- 50.

Holzberg, I., Finn, R.K., and Steinkraus, K.H., 1967. A kinetic study of the alcoholic fermentation of grapes juice. Biotechnol. Bioeng. 9: 413-427.

Hughes, P.B., Tuoroszen, N.J., and Moye, C.J., 1984. The effect of temperature on the kinetics of ethanol production by a thermotolerant strain of *Kluyveromyces marxianus*. Biotechnol. Lett. 6: 1-6.

Jones, R.P., Pamment, N., and Greenfield, P.F., 1981. Alcohol fermentation by yeasts the effect of environmental and other variables. Proc. Biochem. 16 (3): 42-49.

Kadar, Zs., Szengyel, Zs., and Reczey, K., 2004. Simultaneous saccharification and fermentation of industrial wastes for the production of ethanol. Ind. Crop Prod. 20 : 103-110.

Kajiwara, S., Aritomi, T. K., Suga, Ohtaguchi, K., and Kobayashi, O., 2000. Overexpression of the OLE1 gene enhances ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 568-574.

King, F.G. and Hossain, M. A., 1982. 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.

Kiransree, N., Sridhar, M., Venkateswar Rao, L., and Pandey, A., 1999. Ethanol production in solid substrate fermentation using thermotolerant yeast. Proc. Biochem. 34: 115-119.

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

Krauter, M., E. Aquarone, S. Sato, Perego, Jr.L., and Borzani, W., 1987. Influence of linearly decreasing feeding rates on fed-batch ethanol fermentation of sugar cane blackstrap molasses. Biotechnol. Lett. 9: 647-650.

Krishna, S.H., Prasanthi, K., Chowdary, G.V., and Ayyanna, C., 1998. Simultaneou Saccharification and Fermentation of Pretreated Sugar Cane Leaves to Ethanol. Process Biochemistry. Vol. 33 (8). pp. 825-830.

Krishna, S.H., Reddy, T.J. and Chowdary, G.V. 2001. Simutaneous saccharification and fermentation of lignocellulosic wastes to ethanol using a thermotolerant yeast. Biores. Technol. 77 : 193-196.

Latif, F., Rajoka, M.I., 2001. Production of ethanol and xylitol from corn cobs by yeasts. Biores. Technol. 77: 57-63

Limtong, S., Kishimoto, M. H., Funahashi, T., Seki., T., Yoshida and Tagushi, H., 1987. Simulation and optimization of fed-batch culture for ethanol production from molasses. Bioproc. Eng. 2: 141 - 147.

Loureiro, V., Uden, N.V., 1982. Effect of ethanol on the maximum temperature for growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Bioengineering. Vol. 14. pp.1881-1884.

Lucero, P., Penalver, E., Moreno, E., and Lagunas, R., 2000. Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ.Microbiol. 66 (10): 4456-4461

Magdalena, E.L., Bernard, A.P., and James, C.D.P., 1988, The oxygen requirements of yeasts for fermentation of D-xylose and D-glucose to ethanol. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol.28. pp.63-68.

Mcmillan, J.D., 1997. Bioethanol production: status and prospects. Renewable Energy. 10 (2/3): 295-302.

Mielenz, J.R., 2001. Ethanol production from biomass: technology and commercialization status. Curr. Opin. Biotechnol. 4: 324-329.

Moon, N.J., 1983. Inhibition of the growth of acid tolerant yeasts by acetate lactate and propionate and their synergistic mixtures. J. Appl. Bacteriol. 55: 453-460.

Murphy, J.D., and McCarthy, K., 2004. Ethanol production from energy crops and wastes for use as a transport fuel in Ireland. Appl. Energ. 82 : 148–166

Nagodawithana, T.W., Castellano, C., and Steinkrans, K.H., 1974. Effect of dissolved oxygen, temperature, initial cell count and sugar concentration on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in rapid fermentation. Appl. Microbiol. 28 (3): 383-391.

Najafpour G., Younesi, H., Syahidah, Ku., and Ismail, K., 2004. Ethanol fermentation in an immobilized cell reactor using *Saccharomyces cerevisiae*. Bioresource Technology. 92 (3): 251-260.

Oranut, P., 1999. Utilization of Mixed Sugar for Alcoholic Fermentation by *Saccharomyces cerivisiae*. Journal Science Technology. Vol. 4. pp. 23-31.

Prescott, S.C., and Dunn, C.G., 1959. Industrial Microbiology. 3rd ed. McGraw-Hill Book Co., New York.

Prior, B.A., Kilian, S.G., and du Preez, J.C., 1989. Fermentation of D-xylose by the yeast *C. shehatae* and *P. stipitis* : prospects and problem. Process Biochemistry. Vol. 24. pp. 21-32.

Rickard, P., 1978. Effect of the glyoxylic acid cycle on the respiratory quotient of *Saccharomyces* sp**.** Biotechnol. Bioeng. 20: 1111-1115.

Rose, A.H., and Harrison, J.S., 1971. Physiology and Biochemistry of Yeast. The Yeast. Vol.2. Academic Press. London.

Roukas, T., 1994. Ethanal production from nonsterilized carob pod extract by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. Biotechnology and Bioengineering. 43 : 189-194

Roukas, T., 1996. Ethanol production from non-sterilized beet molasses by free and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* cells using fed-batch culture. J. Food Eng. 27: 87-96.

Sitton, O.C., G.L. Foutch., N.L. Book and J.L. Gaddy. 1979. Ethanol from agricultural residues. Proc. Biochem. 14: 7-10.

Saha, B.C., Iten, L.B., Cotta, M.A., and Wu, Y.V., 2005. Dilute acid pretreatment, enzymatic saccharification and fermentation of wheat straw to ethanol. Proc. Biochem. 40 : 3693 – 3700.

Srinorakutara, T., Suesat, C., Pitiyont, B., Kitpreechavanit, W., and Cattithammanit, S., 2004. Utilization of waste from cassava starch plant for ethanol production. The Joint International Conference On Sustainable Energy and Environment (SEE). Hua Hin. Thailand. p: 344 –349.

Sun, Y., and Chang, J., 2002. Hydrolysis of linocellulosic material for ethanol production : a review. Biores. Technol. 83 : 1-11.

Takeshige, K., and Ouchi, K., 1995. Effects of yeast invertase on ethanol production in molasses. J. Ferment. Bioeng. 79: 513-515.

Thomas, D.S., Hossack, J.A., and Rose, A.H., 1978. Plasmamembrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. 117: 239-245.

Thomas, D.S., and Rose, A.H., 1979. Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by *Saccharomyces cerevisiae* as affected by plasma-membrane lipid composition. Arch. Microbiol. 122: 49-55.

Underkofler, L.A., and Hickley, B.J., 1954. Industrial Fermentation. Chemical Publ. Co. Inc.

Waites, M.J., Morgan, NL., Rockey, JS., and Higton, G., 2001. Fuels and industrial chemicals. Industrial microbiology : an introduction. London: Blackwell science.

Walker, G., 1998. Yeast growth, pp. 101-202. In G. Walker, ed. Yeast:physiology andbiotechnology. Wiley, New York.

Warth, A., 1977. Mechanism of resistance of *Saccharomyces bailii* to benzoic sorbic and other weak acid used as food preservative**.** J. Appl. Microbiol. 43: 215-230.

Watson, K., 1982. Unsaturated fatty acid but not erosterol is essential for high ethanol production in *Saccharomyces*. Biotechnology Letters. Vol. 4. No. 6. pp. 397-402.

Wyman, C.E., 1996. Ethanol production from lignocellulosic biomass: overview. pp. 1-18. In C.E. Wyman. ed. Handbook on bioethanol:production and utilization. Taylor AndFrancis. Washington. D.C.

Yamashita, K., Fukada, H., Muratta, K., and Kimura, A., 1981. Transfer of mitochondria of *Hansenula wingii* into protoplast of *Saccharomyces cerevisiae* by mini-protoplast fusion. FEBS. Lett. 132 (2): 305-307.

Zaldivar, J., Nleisen, J., and Olsson, L., 2001. Fuel ethanol production from lignocellulose:a challenge for metabolic engineering and processs 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. New York: The Chapman and Hall. 621 p.

Saccharomyces cerevisiae (Online). สืบค้นเมื่อ : 26 กรกฎาคม 2551
จาก : http//www.jpkc.njau.edu.cn

โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล (Online). สืบค้นเมื่อ : 12 มิถุนายน 2552
จาก : http://www.mail.vcharkarn.com

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol sulfuric

การหาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธีนี้สามารถตรวจวัดปริมาณน้ำตาลได้ในช่วง 1-100 ไมโครกรัมกลูโคส และเป็นวิธีการที่รวดเร็วที่จะใช้วิเคราะห์หาปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่ไม่จำเพาะเจาะจง เพราะไม่ว่าน้ำตาลนั้นจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์ หรือน้ำตาลในธรรมชาติที่พบอยู่ในรูป mono-, tri-, oligo- และ polysaccharide ก็สามารถวิเคราะห์หาปริมาณด้วยวิธีนี้ได้

1.1 หลักการทางปฏิกิริยา (Scherz and Bonn, 1998)

น้ำตาล mono-, tri-, oligo- และ polysaccharide ทำปฏิกริยากับกับฟีนอลและกรดซัลฟูริกเข้มข้นที่อุณหภูมิสูง ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงเป็นสารที่มีสี และสมารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 480-490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligo- และ polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรดพร้อมกันนั้นก็เกิดปฏิกิริยาขจัดน้ำออก และมีการแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (Furfural derivatives) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกับฟีนอล กลายไปเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (Triarylmethane dyes)

1.2 สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลร้อยละ 5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) เตรียมได้โดยละลายผลึกของฟีนอล 5.0 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

1.3 วิธีการวิเคราะห์

1. ใส่สารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank)
2. เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ลงในสารผสมในข้อ 1

3. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำจะเดือด) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที

4. นำสารตัวอย่างในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับกราฟสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (Standard curve)

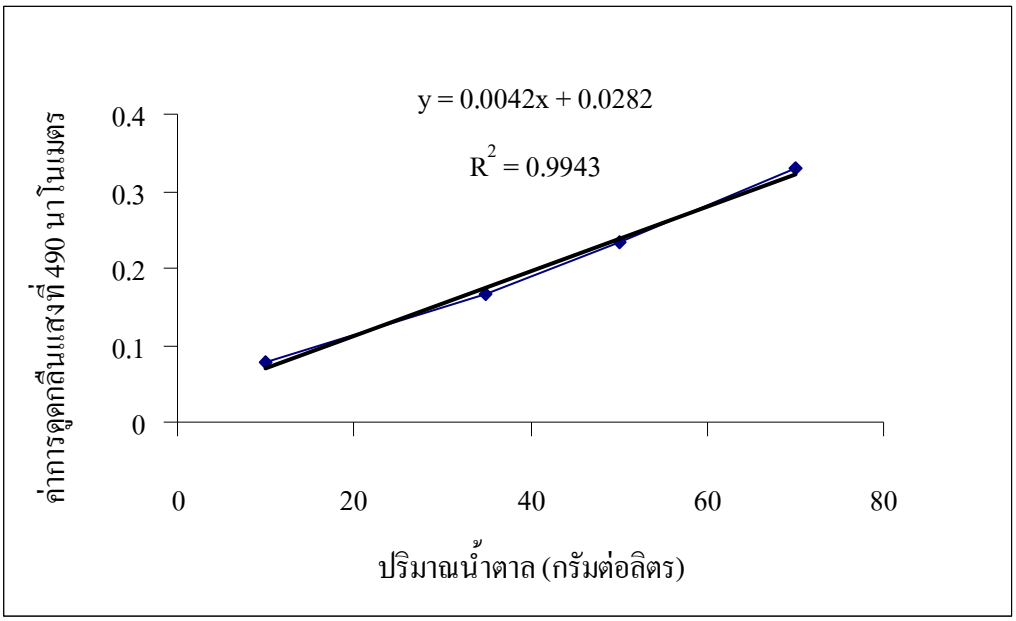
1.4 การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (กรัมต่อลิตร) = ค่าการดูดกลืนแสง $\frac{(OD_{490})X(\text{การเจือจาง})}{(\text{ความชัน X } 1000)}$

โดยที่ความชัน = ค่าความชัน (Slope) ของกราฟมาตรฐาน

การเจือจาง = ค่าการเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์



ภาคผนวก ก-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี phenol sulfuric

2. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องมือ Ebulliometer (นฤมล โตอ่อน, 2549)

Ebulliometer เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดเอทานอลโดยการหาจุดเดือดของน้ำเทียบกับจุดเดือดของตัวอย่างที่วัด แล้วอ่านค่าเอทานอลที่ได้จากตาราง Dujardin, Successeur De Salleron-Paris

2.1 หลักการ

เป็นการวัดอุณหภูมิของจุดเดือดที่แตกต่างกันของน้ำกับน้ำที่มีแอลกอฮอล์ปนอยู่ด้วย ซึ่งน้ำที่มีแอลกอฮอล์ปนอยู่ด้วยจะมีจุดเดือดต่ำกว่า

2.2 วิธีการวิเคราะห์

1. เทน้ำกลั่นลงในหลอดแก้วตวง (Graduated glass) ให้ถึงขีดที่มีตัวอักษร Eau แล้วนำไปใส่ลงในช่องเติมตัวอย่างของเครื่องมือ (ช่องที่ไว้ใส่ปรอทวัดอุณหภูมิ) และนำปรอทมาใส่ในช่องเติมตัวอย่างและเติมน้ำลงในส่วนของหอกลั่นของเครื่องมือ จากนั้นทำการต้นจนให้น้ำเดือดคงที่ (น้ำเดือดที่อุณหภูมิคงที่นานประมาณ *5* นาที)

2. เมื่อน้ำเดือดคงที่แล้วให้ดูอุณหภูมิที่ปรอท และทำการปรับตำแหน่งค่าอุณหภูมิของแผ่นแสดงอุณหภูมิ ที่อ่านได้ให้ตรงกับตำแหน่งเลขศูนย์ของค่าร้อยละแอลกอฮอล์

3. ทำการตวงน้ำตัวอย่างลงในหลอดแก้วจนถึงขีด Eau แล้วนำไปเติมลงในช่องตัวอย่างและทำการต้มจนน้ำเดือดอีกครั้ง จากนั้นอ่านค่าอุณหภูมิที่ได้จากปรอท และอ่านค่าอุณหภูมิที่ได้เทียบกับค่าร้อยละแอลกอฮอล์บนแผ่นแสดงอุณหภูมิ

3. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography

แก๊สโครมาโตกราฟี เป็นการแยกสารอีกชนิดหนึ่งโดยให้สารที่ต้องการแยกกระจายไประหว่าง 2 Phase คือ Mobile phase ซึ่งเป็นก๊าช และ Stationaly phase ที่เป็นของเหลวหรือของแข็ง

3.1 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์

เครื่องมือทดสอบ	:	HP 6850 Gas chromatography with flame ionized detector
Column	:	HP-Innowax
Column description	:	Length 30 m., 250 µm I.D, 0.25 µm film thickness
Oven tempurature	:	50 °C hold 6 minutes
Inlet tempurature	:	200 °C
Detector tempurature	:	200 °C
Carier gas, flow rate	:	Helium

3.2 วิธีการวิเคราะห์

1. เตรียมสารละลาย Absolute ethyl alcohol (99.8%) โดยเตรียมความเข้มข้นเป็น 1.0-5.0 กรัม/ลิตร

2. ฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครโมโตรกราฟีบันทึกพื้นที่กราฟ

3. นำค่าพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอลเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานเพื่อหาความเข้มข้นของเอทานอล

4. วิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ (ภูพิง สีสังข์, 2547)

4.1 วัสดุอุปกรณ์

1. Methylene blue

2 Hemacytometer

3. กล้องจุลทรรศน์

4.2 วิธีการวิเคราะห์

1. ปิเปตตัวอย่างมาเจือจางในสารละลาย 0.2% Methyl blue ในหลอดทดสอบ โดยกะอัตราส่วนอย่างคร่าวๆ ผสมให้เข้ากัน

2. เช็ดสไลด์ และ Cover glass ของ Hemacytometer ให้สะอาดวาง Cover glass ให้อยู่ตรงกลางสไลด์ แล้วใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารละลายตัวอย่างจาก (ข้อ 1) มาแตะที่ขอบ Cover

glass ปล่อยให้สารละลายของเซลล์แทรกไประหว่าง Cover glass และสไลด์จนเต็มพอดี และทำอีกด้านหนึ่งในทำนองเดียวกัน

3. นำไปนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า โดยถือว่าเซลล์ที่ติดสีทึบหมดทั้งเซลล์เป็นเซลล์ที่ตายแล้ว ส่วนเซลล์ที่ไม่ติดสีเป็นเซลล์ที่มีชีวิต การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะนับเซลล์ที่ไม่ติดสีทั้งหมดที่อยู่ในตารางใหญ่ เซลล์ที่อยู่คาบเส้นทั้งด้านขวาและ ด้านล่าง ส่วนเซลล์ที่คาบเส้นอยู่ทางดานซ้าย และ ด้านบนจะไม่นับ จำนวนเซลล์ที่นับได้ต้องอยู่ระหว่าง 10-30 เซลล์ ถ้ามาก หรือน้อยกว่านั่นจะต้องทำการเจือจางใหม่ ทำการนับทีละ Filled ตามแนวทะแยงซ้ายขวา จนกระทั้งได้จำนวนเซลล์รวมทั้งหมดประมาณ 300 เซลล์

4.3 การคำนวณ

ขนาดความลึกของ Hemacytometer = 0.1 mm

ขนาดพื้นที่ 1 ช่องใหญ่ของ Hemacytometer = 0.2 x 0.2 mm^2

ปริมาตร 1 ช่องใหญ่ของ Hemacytometer = 0.2 mm x 0.2 mm x 0.1 mm

= 0.02 cm x 0.02 cm x 0.01 cm

= 0.000004 cm^3

= 0.000004 mL

= 4×10^{-6} mL

เซลล์ต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์เฉลี่ยที่นับได้ใน 1 ช่องใหญ่ (Y) x 10^6 x (1/4) x Dilution

= Y x 10^6 x (1/4) x Dilution

5. การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

5.1 หลักการ

กรองน้ำตัวอย่างเลี้ยงเชื้อผ่านกระดาษกรอง (Cellulose nitrate membrame) ขนาด 0.45 μm ที่ทราบน้ำหนัก ตะกอนที่ติดอยู่บนแผ่นกระดาษกรองนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส และทำให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งหาน้ำหนักที่เพิ่มขึ้น คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง

5.2 วัสดุอุปกรณ์

1. แผ่นกระดาษกรอง (Cellulose nitrate membrame) ขนาด 0.45 μm
2. อลูมิเนียมฟลอยด์
3. คีมคีบ
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง

5.3 วิธีการวิเคราะห์

1. นำแผ่นกระดาษกรองวางบนอลูมิเนียมฟลอยด์ และนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น แล้วชั่งน้ำหนัก
2. ใช้คีมคีบแผ่นกระดาษกรองวางบนกรวยที่ต่อกับเครื่องดูดสุญญากาศ
3. ฉีดน้ำกลั่นบนแผ่นกระดาษกรองให้เปียก แล้วเปิดเครื่องดูดสุญญากาศเพื่อให้แผ่นกรองติดกับกรวย
4. กรองตัวอย่างที่ผสมเข้ากันดีแล้ว โดยอาศัยแรงดึงจากเครื่องดูดอากาศ
5. ปิดเครื่องดูดสุญญากาศ ใช้คีมคีบแผ่นกระดาษกรองแล้วนำใส่อลูมิเนียมฟลอยด์อันเดิม จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้นแล้วนำไปชั่งน้ำหนัก

5.4 การคำนวณ

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(A-B) \times 1000}{\text{volume of sample (mL)}}$$

โดยที่ A = น้ำหนักแผ่นกระดาษกรอง + อลูมิเนียมฟลอยด์ + เซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)

B = น้ำหนักแผ่นกระดาษกรอง + อลูมิเนียมฟลอยด์ (กรัมต่อลิตร)

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1. การคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์จากร้อยละโดยปริมาตร %(v/v) เป็นร้อยละโดยน้ำหนักต่อปริมาตร (กรัมต่อลิตร)

สมมติปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากวิธีแก๊สโครมาโตรกราฟี (GC) ได้ A ร้อยละโดยปริมาตร

หมายถึงสารตัวอย่าง 100 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์ = A มิลลิลิตร

และถ้าสารสารตัวอย่าง 1,000 มิลลิลิตร มีปริมาณแอลกอฮอล์ = $\frac{A \times 1,000}{100}$

= A X 10 มิลลิลิตรต่อลิตร

จากความหนาแน่นของเอทานอล = 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร

เพราะฉะนั้นปริมาณแอลกอฮอล์ = A X 10 มิลลิลิตรต่อลิตร X 0.789 กรัมต่อลิตร

2. การคำนวณค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) (เกศกมล ไทยทอง, 2542)

ในการหมักสารอาหารของเชื้อยีสต์นอกจากจะใช้สารอาหารในการสร้างเซลล์แล้วยังมีการผลิตผลิตภัณฑ์เป็นผลพลอยได้ ซึ่งผลได้ของผลิตภัณฑ์ (Product yield) สามารถคำนวณจากอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้น (ΔP) ต่อปริมาณสารอาหารที่ถูกใช้ไป (ΔS) ดังสูตรต่อไปนี้

$$Yp/s = (\Delta P) / (\Delta S)$$

Yp/s = ผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น มีหน่วยเป็น กรัมผลิตภัณฑ์ต่อกรัมสารตั้งต้น

ตัวอย่างการคำนวณ

จากผลการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร ผลจากการศึกษาพบว่าที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 98 กรัมต่อลิตร ยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 48.72 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 1.30 กรัมต่อลิตรซึ่งสามารถคำนวณหาค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากสูตรได้ดังนี้

โดย (ΔP) = 48.72 กรัมต่อลิตร

(ΔS) = (98 −1.30) กรัมต่อลิตร

= 96.7 กรัมต่อลิตร

Yp/s = 48.72 / 96.7

= 0.5034 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

3. การคำนวณค่าผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s)

ผลได้ของเซลล์จากสารอาหาร (Growth yield for substrate) เกิดจากเชื้อยีสต์ใช้สารอาหารเป็นแหล่งคาร์บอน (ΔS) เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ (ΔX) ซึ่งสามารถคำนวณจากอัตราส่วนของปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นต่อปริมาณสารอาหาร ดังสูตรต่อไปนี้

$$Yx/s = (\Delta X)/(\Delta S)$$

Yx/s = ผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อสารตั้งต้น มีหน่วยเป็น กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมสารตั้งต้น

ตัวอย่างการคำนวณ

จากผลการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร ผลจากการศึกษาพบว่าที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 98 กรัมต่อลิตร ยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 48.72 กรัมต่อลิตร มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 5.97 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 1.30 กรัมต่อลิตรซึ่งสามารถคำนวณหาค่าผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) จากสูตรได้ดังนี้

โดย (ΔX) = 5.97 กรัมต่อลิตร

(ΔS) = (98 −1.30) กรัมต่อลิตร

= 96.7 กรัมต่อลิตร

Yx/s = 5.97 / 96.7

= 0.061 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมน้ำตาล

4. การคำนวณค่าประสิทธิภาพผลได้ (Yield efficiency) (ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์, 2547)

$$\text{ค่าประสิทธิภาพผลได้ (\%)} = \frac{\text{ผลได้เอทานอล X 100}}{\text{ผลได้เอทานอลทางทฤษฎี (0.51)}}$$

ตัวอย่างการคำนวณ

จากผลการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร ผลจากการศึกษาพบว่าที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 98 กรัมต่อลิตร ยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด และมีค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.503 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสามารถนำมาคำนวณหาค่าประสิทธิภาพผลได้เมื่อเทียบกับค่าทฤษฎี จากสูตรได้ดังนี้

$$\text{ค่าประสิทธิภาพผลได้ (\%)} = \frac{0.503 \text{ X } 100}{0.51}$$

= 98.82

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Vertion 11.5) โดยใช้วิธี least-significant different (LSD)

ภาคผนวก ค-1 การหมักเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร

ANOVA

Sugar

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	804.848	3	268.283	182.196	.000
Within Groups	11.780	8	1.472		
Total	816.628	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Sugar

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	-4.8433(*)	.99079	.001	-7.1281	-2.5586
		40	-12.0600(*)	.99079	.000	-14.3448	-9.7752
		50	-21.7433(*)	.99079	.000	-24.0281	-19.4586
	30	25	4.8433(*)	.99079	.001	2.5586	7.1281
		40	-7.2167(*)	.99079	.000	-9.5014	-4.9319
		50	-16.9000(*)	.99079	.000	-19.1848	-14.6152
	40	25	12.0600(*)	.99079	.000	9.7752	14.3448
		30	7.2167(*)	.99079	.000	4.9319	9.5014
		50	-9.6833(*)	.99079	.000	-11.9681	-7.3986

	50	25	21.7433(*)	.99079	.000	19.4586	24.0281
		30	16.9000(*)	.99079	.000	14.6152	19.1848
		40	9.6833(*)	.99079	.000	7.3986	11.9681

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

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11.533	3	3.844	99.377	.000
Within Groups	.309	8	.039		
Total	11.842	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: ETHANOL

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	1.1833(*)	.16059	.000	.8130	1.5537
		40	1.3133(*)	.16059	.000	.9430	1.6837
		50	2.7633(*)	.16059	.000	2.3930	3.1337
	30	25	-1.1833(*)	.16059	.000	-1.5537	-.8130
		40	.1300	.16059	.442	-.2403	.5003
		50	1.5800(*)	.16059	.000	1.2097	1.9503
	40	25	-1.3133(*)	.16059	.000	-1.6837	-.9430
		30	-.1300	.16059	.442	-.5003	.2403
		50	1.4500(*)	.16059	.000	1.0797	1.8203
	50	25	-2.7633(*)	.16059	.000	-3.1337	-2.3930
		30	-1.5800(*)	.16059	.000	-1.9503	-1.2097
		40	-1.4500(*)	.16059	.000	-1.8203	-1.0797

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.195	3	.065	42.471	.000
Within Groups	.012	8	.002		
Total	.208	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: BIOMASS

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	-.0687	.03197	.064	-.1424	.0051
		40	-.2410(*)	.03197	.000	-.3147	-.1673
		50	-.3170(*)	.03197	.000	-.3907	-.2433
	30	25	.0687	.03197	.064	-.0051	.1424
		40	-.1723(*)	.03197	.001	-.2461	-.0986
		50	-.2483(*)	.03197	.000	-.3221	-.1746
	40	25	.2410(*)	.03197	.000	.1673	.3147
		30	.1723(*)	.03197	.001	.0986	.2461
		50	-.0760(*)	.03197	.045	-.1497	-.0023
	50	25	.3170(*)	.03197	.000	.2433	.3907
		30	.2483(*)	.03197	.000	.1746	.3221
		40	.0760(*)	.03197	.045	.0023	.1497

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.036	3	.012	132.006	.000
Within Groups	.001	8	.000		
Total	.037	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yp/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	.0553(*)	.00783	.000	.0373	.0734
		40	.0910(*)	.00783	.000	.0729	.1091
		50	.1517(*)	.00783	.000	.1336	.1697
	30	25	-.0553(*)	.00783	.000	-.0734	-.0373
		40	.0357(*)	.00783	.002	.0176	.0537
		50	.0963(*)	.00783	.000	.0783	.1144
	40	25	-.0910(*)	.00783	.000	-.1091	-.0729
		30	-.0357(*)	.00783	.002	-.0537	-.0176
		50	.0607(*)	.00783	.000	.0426	.0787
	50	25	-.1517(*)	.00783	.000	-.1697	-.1336
		30	-.0963(*)	.00783	.000	-.1144	-.0783
		40	-.0607(*)	.00783	.000	-.0787	-.0426

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

ANOVA

Yx/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	.957	.458
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.000	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yx/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	-.0030	.00361	.430	-.0113	.0053
		40	-.0040	.00361	.300	-.0123	.0043
		50	-.0060	.00361	.135	-.0143	.0023
	30	25	.0030	.00361	.430	-.0053	.0113
		40	-.0010	.00361	.789	-.0093	.0073
		50	-.0030	.00361	.430	-.0113	.0053
	40	25	.0040	.00361	.300	-.0043	.0123
		30	.0010	.00361	.789	-.0073	.0093
		50	-.0020	.00361	.595	-.0103	.0063
	50	25	.0060	.00361	.135	-.0023	.0143
		30	.0030	.00361	.430	-.0053	.0113
		40	.0020	.00361	.595	-.0063	.0103

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

ภาคผนวก ค-2 การหมักเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร

ANOVA

SUGAR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.037	3	2.679	5.297	.026
Within Groups	4.046	8	.506		
Total	12.083	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: SUGAR

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0.05	0.1	1.4300(*)	.58066	.039	.0910	2.7690
		0.5	-.5933	.58066	.337	-1.9323	.7457
		1	-.5500	.58066	.371	-1.8890	.7890
	0.1	0.05	-1.4300(*)	.58066	.039	-2.7690	-.0910
		0.5	-2.0233(*)	.58066	.008	-3.3623	-.6843
		1	-1.9800(*)	.58066	.009	-3.3190	-.6410
	0.5	0.05	.5933	.58066	.337	-.7457	1.9323
		0.1	2.0233(*)	.58066	.008	.6843	3.3623
		1	.0433	.58066	.942	-1.2957	1.3823
	1	0.05	.5500	.58066	.371	-.7890	1.8890
		0.1	1.9800(*)	.58066	.009	.6410	3.3190
		0.5	-.0433	.58066	.942	-1.3823	1.2957

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

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.879	3	.293	7.324	.011
Within Groups	.320	8	.040		
Total	1.199	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: ETHANOL

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0.05	0.1	-.5233(*)	.16330	.013	-.8999	-.1468
		0.5	.1333	.16330	.438	-.2432	.5099
		1	.1333	.16330	.438	-.2432	.5099
	0.1	0.05	.5233(*)	.16330	.013	.1468	.8999
		0.5	.6567(*)	.16330	.004	.2801	1.0332
		1	.6567(*)	.16330	.004	.2801	1.0332
	0.5	0.05	-.1333	.16330	.438	-.5099	.2432
		0.1	-.6567(*)	.16330	.004	-1.0332	-.2801
		1	.0000	.16330	1.000	-.3766	.3766
	1	0.05	-.1333	.16330	.438	-.5099	.2432
		0.1	-.6567(*)	.16330	.004	-1.0332	-.2801
		0.5	.0000	.16330	1.000	-.3766	.3766

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.013	3	.004	1.815	.222
Within Groups	.019	8	.002		
Total	.032	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: BIOMASS

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0.05	0.1	-.0700	.04014	.119	-.1626	.0226
		0.5	.0167	.04014	.689	-.0759	.1092
		1	-.0033	.04014	.936	-.0959	.0892
	0.1	0.05	.0700	.04014	.119	-.0226	.1626
		0.5	.0867	.04014	.063	-.0059	.1792
		1	.0667	.04014	.135	-.0259	.1592
	0.5	0.05	-.0167	.04014	.689	-.1092	.0759
		0.1	-.0867	.04014	.063	-.1792	.0059
		1	-.0200	.04014	.632	-.1126	.0726
	1	0.05	.0033	.04014	.936	-.0892	.0959
		0.1	-.0667	.04014	.135	-.1592	.0259
		0.5	.0200	.04014	.632	-.0726	.1126

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	.046	.986
Within Groups	.001	8	.000		
Total	.001	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yp/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0.05	0.1	-.0037	.01030	.731	-.0274	.0201
		0.5	-.0020	.01030	.851	-.0257	.0217
		1	-.0010	.01030	.925	-.0247	.0227
	0.1	0.05	.0037	.01030	.731	-.0201	.0274
		0.5	.0017	.01030	.875	-.0221	.0254
		1	.0027	.01030	.802	-.0211	.0264
	0.5	0.05	.0020	.01030	.851	-.0217	.0257
		0.1	-.0017	.01030	.875	-.0254	.0221
		1	.0010	.01030	.925	-.0227	.0247
	1	0.05	.0010	.01030	.925	-.0227	.0247
		0.1	-.0027	.01030	.802	-.0264	.0211
		0.5	-.0010	.01030	.925	-.0247	.0227

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

ANOVA

Yx/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	3	.000	.288	.833
Within Groups	.000	8	.000		
Total	.000	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yx/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0.05	0.1	.0000	.00248	1.000	-.0057	.0057
		0.5	-.0007	.00248	.795	-.0064	.0051
		1	-.0020	.00248	.444	-.0077	.0037
	0.1	0.05	.0000	.00248	1.000	-.0057	.0057
		0.5	-.0007	.00248	.795	-.0064	.0051
		1	-.0020	.00248	.444	-.0077	.0037
	0.5	0.05	.0007	.00248	.795	-.0051	.0064
		0.1	.0007	.00248	.795	-.0051	.0064
		1	-.0013	.00248	.606	-.0071	.0044
	1	0.05	.0020	.00248	.444	-.0037	.0077
		0.1	.0020	.00248	.444	-.0037	.0077
		0.5	.0013	.00248	.606	-.0044	.0071

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

ภาคผนวก ค-3 การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ pH เริ่มต้น 4.0, 4.5 และ 5.0

ANOVA

SUGAR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	22.356	2	11.178	10.037	.012
Within Groups	6.682	6	1.114		
Total	29.038	8			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: SUGAR

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	4	4.5	2.4600(*)	.86166	.029	.3516	4.5684
		5	3.8067(*)	.86166	.004	1.6983	5.9151
	4.5	4	-2.4600(*)	.86166	.029	-4.5684	-.3516
		5	1.3467	.86166	.169	-.7617	3.4551
	5	4	-3.8067(*)	.86166	.004	-5.9151	-1.6983
		4.5	-1.3467	.86166	.169	-3.4551	.7617

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

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	8.711	2	4.356	41.521	.000
Within Groups	.629	6	.105		
Total	9.340	8			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: ETHANOL

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	4	4.5	-1.5767(*)	.26445	.001	-2.2238	-.9296
		5	-2.3667(*)	.26445	.000	-3.0138	-1.7196
	4.5	4	1.5767(*)	.26445	.001	.9296	2.2238
		5	-.7900(*)	.26445	.024	-1.4371	-.1429
	5	4	2.3667(*)	.26445	.000	1.7196	3.0138
		4.5	.7900(*)	.26445	.024	.1429	1.4371

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.062	2	.031	23.232	.001
Within Groups	.008	6	.001		
Total	.070	8			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: BIOMASS

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	4	4.5	-.1267(*)	.02991	.005	-.1998	-.0535
		5	-.2017(*)	.02991	.001	-.2748	-.1285
	4.5	4	.1267(*)	.02991	.005	.0535	.1998
		5	-.0750(*)	.02991	.046	-.1482	-.0018
	5	4	.2017(*)	.02991	.001	.1285	.2748
		4.5	.0750(*)	.02991	.046	.0018	.1482

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.006	2	.003	11.701	.008
Within Groups	.002	6	.000		
Total	.008	8			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yp/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	4	4.5	2.4600(*)	.86166	.029	.3516	4.5684
		5	3.8067(*)	.86166	.004	1.6983	5.9151
	4.5	4	-2.4600(*)	.86166	.029	-4.5684	-.3516
		5	1.3467	.86166	.169	-.7617	3.4551
	5	4	-3.8067(*)	.86166	.004	-5.9151	-1.6983
		4.5	-1.3467	.86166	.169	-3.4551	.7617

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

ANOVA

Yx/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	.006	.994
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.000	8			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yx/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	4	4.5	.0000	.00359	1.000	-.0088	.0088
		5	-.0003	.00359	.929	-.0091	.0085
	4.5	4	.0000	.00359	1.000	-.0088	.0088
		5	-.0003	.00359	.929	-.0091	.0085
	5	4	.0003	.00359	.929	-.0085	.0091
		4.5	.0003	.00359	.929	-.0085	.0091

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

ภาคผนวก ค-4 การผลิตเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่อัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที

ANOVA

SUGAR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	136.886	3	45.629	44.975	.000
Within Groups	8.116	8	1.015		
Total	145.002	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: SUGAR

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0	50	7.2267(*)	1.38980	.002	3.8260	10.6274
		100	8.8900(*)	1.38980	.001	5.4893	12.2907
	50	0	-7.2267(*)	1.38980	.002	-10.6274	-3.8260
		100	1.6633	1.38980	.277	-1.7374	5.0640
	100	0	-8.8900(*)	1.38980	.001	-12.2907	-5.4893
		50	-1.6633	1.38980	.277	-5.0640	1.7374

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

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	120.194	5	24.039	346.321	.000
Within Groups	.833	12	.069		
Total	121.027	17			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: ETHANOL

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0	50	-4.6100(*)	.15205	.000	-4.9820	-4.2380
		100	-5.9233(*)	.15205	.000	-6.2954	-5.5513
	50	0	4.6100(*)	.15205	.000	4.2380	4.9820
		100	-1.3133(*)	.15205	.000	-1.6854	-.9413
	100	0	5.9233(*)	.15205	.000	5.5513	6.2954
		50	1.3133(*)	.15205	.000	.9413	1.6854

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.774	5	.155	170.188	.000
Within Groups	.011	12	.001		
Total	.785	17			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: BIOMASS

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0	50	-.3550(*)	.02867	.000	-.4252	-.2848
		100	-.4717(*)	.02867	.000	-.5418	-.4015
	50	0	.3550(*)	.02867	.000	.2848	.4252
		100	-.1167(*)	.02867	.007	-.1868	-.0465
	100	0	.4717(*)	.02867	.000	.4015	.5418
		50	.1167(*)	.02867	.007	.0465	.1868

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.110	5	.022	56.688	.000
Within Groups	.005	12	.000		
Total	.114	17			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yp/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0	50	-.1913(*)	.01169	.000	-.2199	-.1627
		100	-.2280(*)	.01169	.000	-.2566	-.1994
	50	0	.1913(*)	.01169	.000	.1627	.2199
		100	-.0367(*)	.01169	.020	-.0653	-.0081
	100	0	.2280(*)	.01169	.000	.1994	.2566
		50	.0367(*)	.01169	.020	.0081	.0653

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

ANOVA

Yx/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	5	.000	16.579	.000
Within Groups	.000	12	.000		
Total	.000	17			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yx/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0	50	.0003	.00586	.957	-.0140	.0147
		100	-.0013	.00586	.828	-.0157	.0130
	50	0	-.0003	.00586	.957	-.0147	.0140
		100	-.0017	.00586	.786	-.0160	.0127
	100	0	.0013	.00586	.828	-.0130	.0157
		50	.0017	.00586	.786	-.0127	.0160

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

ภาคผนวก ค-5 การหมักเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส

ANOVA

SUGAR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	134.023	2	67.012	23.129	.002
Within Groups	17.384	6	2.897		
Total	151.407	8			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: SUGAR

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	0	50	.0003	.00586	.957	-.0140	.0147
		100	-.0013	.00586	.828	-.0157	.0130
	50	0	-.0003	.00586	.957	-.0147	.0140
		100	-.0017	.00586	.786	-.0160	.0127
	100	0	.0013	.00586	.828	-.0130	.0157
		50	.0017	.00586	.786	-.0127	.0160

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

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	58.063	2	29.031	837.176	.000
Within Groups	.208	6	.035		
Total	58.271	8			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: ETHANOL

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	-1.0533(*)	.15205	.000	-1.4254	-.6813
		35	1.0500(*)	.15205	.000	.6780	1.4220
	30	25	1.0533(*)	.15205	.000	.6813	1.4254
		35	2.1033(*)	.15205	.000	1.7313	2.4754
	35	25	-1.0500(*)	.15205	.000	-1.4220	-.6780
		30	-2.1033(*)	.15205	.000	-2.4754	-1.7313

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.362	2	.181	146.800	.000
Within Groups	.007	6	.001		
Total	.370	8			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: BIOMASS

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	.0143	.02580	.599	-.0488	.0775
		35	.1077(*)	.02580	.006	.0445	.1708
	30	25	-.0143	.02580	.599	-.0775	.0488
		35	.0933(*)	.02580	.011	.0302	.1565
	35	25	-.1077(*)	.02580	.006	-.1708	-.0445
		30	-.0933(*)	.02580	.011	-.1565	-.0302

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.090	2	.045	219.477	.000
Within Groups	.001	6	.000		
Total	.091	8			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yp/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	-.0097	.02147	.668	-.0622	.0429
		35	.0743(*)	.02147	.013	.0218	.1269
	30	25	.0097	.02147	.668	-.0429	.0622
		35	.0840(*)	.02147	.008	.0315	.1365
	35	25	-.0743(*)	.02147	.013	-.1269	-.0218
		30	-.0840(*)	.02147	.008	-.1365	-.0315

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

ANOVA

Yx/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	2	.000	.045	.956
Within Groups	.000	6	.000		
Total	.000	8			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yx/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	.0073	.00396	.114	-.0024	.0170
		35	.0093	.00396	.057	-.0004	.0190
	30	25	-.0073	.00396	.114	-.0170	.0024
		35	.0020	.00396	.632	-.0077	.0117
	35	25	-.0093	.00396	.057	-.0190	.0004
		30	-.0020	.00396	.632	-.0117	.0077

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

ภาคผนวก ค-6 การหมักเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยบ่มที่ระยะเวลา 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง

ANOVA

SUGAR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	136.886	3	45.629	44.975	.000
Within Groups	8.116	8	1.015		
Total	145.002	11			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: SUGAR

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	12	24	2.5800(*)	.67149	.002	1.1169	4.0431
		36	4.7600(*)	.67149	.000	3.2969	6.2231
		48	9.2067(*)	.67149	.000	7.7436	10.6697
		60	10.2300(*)	.67149	.000	8.7669	11.6931
		72	10.2300(*)	.67149	.000	8.7669	11.6931
	24	12	-2.5800(*)	.67149	.002	-4.0431	-1.1169
		36	2.1800(*)	.67149	.007	.7169	3.6431
		48	6.6267(*)	.67149	.000	5.1636	8.0897
		60	7.6500(*)	.67149	.000	6.1869	9.1131
		72	7.6500(*)	.67149	.000	6.1869	9.1131
	36	12	-4.7600(*)	.67149	.000	-6.2231	-3.2969
		24	-2.1800(*)	.67149	.007	-3.6431	-.7169
		48	4.4467(*)	.67149	.000	2.9836	5.9097
		60	5.4700(*)	.67149	.000	4.0069	6.9331
		72	5.4700(*)	.67149	.000	4.0069	6.9331
	48	12	-9.2067(*)	.67149	.000	-10.6697	-7.7436
		24	-6.6267(*)	.67149	.000	-8.0897	-5.1636
		36	-4.4467(*)	.67149	.000	-5.9097	-2.9836
		60	1.0233	.67149	.153	-.4397	2.4864
		72	1.0233	.67149	.153	-.4397	2.4864
	60	12	-10.2300(*)	.67149	.000	-11.6931	-8.7669
		24	-7.6500(*)	.67149	.000	-9.1131	-6.1869
		36	-5.4700(*)	.67149	.000	-6.9331	-4.0069
		48	-1.0233	.67149	.153	-2.4864	.4397
		72	.0000	.67149	1.000	-1.4631	1.4631
	72	12	-10.2300(*)	.67149	.000	-11.6931	-8.7669
		24	-7.6500(*)	.67149	.000	-9.1131	-6.1869
		36	-5.4700(*)	.67149	.000	-6.9331	-4.0069
		48	-1.0233	.67149	.153	-2.4864	.4397
		60	.0000	.67149	1.000	-1.4631	1.4631

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

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	120.194	5	24.039	346.321	.000
Within Groups	.833	12	.069		
Total	121.027	17			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: ETHANOL

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	12	24	-2.6297(*)	.21512	.000	-3.0984	-2.1610
		36	-4.6025(*)	.21512	.000	-5.0712	-4.1338
		48	-6.8380(*)	.21512	.000	-7.3067	-6.3693
		60	-6.8380(*)	.21512	.000	-7.3067	-6.3693
		72	-6.8380(*)	.21512	.000	-7.3067	-6.3693
	24	12	2.6297(*)	.21512	.000	2.1610	3.0984
		36	-1.9728(*)	.21512	.000	-2.4415	-1.5041
		48	-4.2083(*)	.21512	.000	-4.6770	-3.7396
		60	-4.2083(*)	.21512	.000	-4.6770	-3.7396
		72	-4.2083(*)	.21512	.000	-4.6770	-3.7396
	36	12	4.6025(*)	.21512	.000	4.1338	5.0712
		24	1.9728(*)	.21512	.000	1.5041	2.4415
		48	-2.2355(*)	.21512	.000	-2.7042	-1.7668
		60	-2.2355(*)	.21512	.000	-2.7042	-1.7668
		72	-2.2355(*)	.21512	.000	-2.7042	-1.7668
	48	12	6.8380(*)	.21512	.000	6.3693	7.3067
		24	4.2083(*)	.21512	.000	3.7396	4.6770
		36	2.2355(*)	.21512	.000	1.7668	2.7042
		60	.0000	.21512	1.000	-.4687	.4687
		72	.0000	.21512	1.000	-.4687	.4687
	60	12	6.8380(*)	.21512	.000	6.3693	7.3067
		24	4.2083(*)	.21512	.000	3.7396	4.6770
		36	2.2355(*)	.21512	.000	1.7668	2.7042
		48	.0000	.21512	1.000	-.4687	.4687
		72	.0000	.21512	1.000	-.4687	.4687
	72	12	6.8380(*)	.21512	.000	6.3693	7.3067
		24	4.2083(*)	.21512	.000	3.7396	4.6770
		36	2.2355(*)	.21512	.000	1.7668	2.7042
		48	.0000	.21512	1.000	-.4687	.4687
		60	.0000	.21512	1.000	-.4687	.4687

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.774	5	.155	170.188	.000
Within Groups	.011	12	.001		
Total	.785	17			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: BIOMASS

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	12	24	-.1470(*)	.02462	.000	-.2006	-.0934
		36	-.3337(*)	.02462	.000	-.3873	-.2800
		48	-.6337(*)	.02462	.000	-.6873	-.5800
		60	-.4703(*)	.02462	.000	-.5240	-.4167
		72	-.3903(*)	.02462	.000	-.4440	-.3367
	24	12	.1470(*)	.02462	.000	.0934	.2006
		36	-.1867(*)	.02462	.000	-.2403	-.1330
		48	-.4867(*)	.02462	.000	-.5403	-.4330
		60	-.3233(*)	.02462	.000	-.3770	-.2697
		72	-.2433(*)	.02462	.000	-.2970	-.1897
	36	12	.3337(*)	.02462	.000	.2800	.3873
		24	.1867(*)	.02462	.000	.1330	.2403
		48	-.3000(*)	.02462	.000	-.3536	-.2464
		60	-.1367(*)	.02462	.000	-.1903	-.0830
		72	-.0567(*)	.02462	.040	-.1103	-.0030
	48	12	.6337(*)	.02462	.000	.5800	.6873
		24	.4867(*)	.02462	.000	.4330	.5403
		36	.3000(*)	.02462	.000	.2464	.3536
		60	.1633(*)	.02462	.000	.1097	.2170
		72	.2433(*)	.02462	.000	.1897	.2970
	60	12	.4703(*)	.02462	.000	.4167	.5240
		24	.3233(*)	.02462	.000	.2697	.3770
		36	.1367(*)	.02462	.000	.0830	.1903
		48	-.1633(*)	.02462	.000	-.2170	-.1097
		72	.0800(*)	.02462	.007	.0264	.1336
	72	12	.3903(*)	.02462	.000	.3367	.4440
		24	.2433(*)	.02462	.000	.1897	.2970
		36	.0567(*)	.02462	.040	.0030	.1103
		48	-.2433(*)	.02462	.000	-.2970	-.1897
		60	-.0800(*)	.02462	.007	-.1336	-.0264

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.110	5	.022	56.688	.000
Within Groups	.005	12	.000		
Total	.114	17			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yp/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	12	24	-.1296(*)	.01605	.000	-.1645	-.0946
		36	-.1965(*)	.01605	.000	-.2314	-.1615
		48	-.2240(*)	.01605	.000	-.2590	-.1891
		60	-.2078(*)	.01605	.000	-.2427	-.1728
		72	-.2078(*)	.01605	.000	-.2427	-.1728
	24	12	.1296(*)	.01605	.000	.0946	.1645
		36	-.0669(*)	.01605	.001	-.1019	-.0319
		48	-.0945(*)	.01605	.000	-.1295	-.0595
		60	-.0782(*)	.01605	.000	-.1132	-.0432
		72	-.0782(*)	.01605	.000	-.1132	-.0432
	36	12	.1965(*)	.01605	.000	.1615	.2314
		24	.0669(*)	.01605	.001	.0319	.1019
		48	-.0276	.01605	.112	-.0625	.0074
		60	-.0113	.01605	.495	-.0463	.0237
		72	-.0113	.01605	.495	-.0463	.0237
	48	12	.2240(*)	.01605	.000	.1891	.2590
		24	.0945(*)	.01605	.000	.0595	.1295
		36	.0276	.01605	.112	-.0074	.0625
		60	.0163	.01605	.330	-.0187	.0513
		72	.0163	.01605	.330	-.0187	.0513
	60	12	.2078(*)	.01605	.000	.1728	.2427
		24	.0782(*)	.01605	.000	.0432	.1132
		36	.0113	.01605	.495	-.0237	.0463
		48	-.0163	.01605	.330	-.0513	.0187
		72	.0000	.01605	1.000	-.0350	.0350
	72	12	.2078(*)	.01605	.000	.1728	.2427
		24	.0782(*)	.01605	.000	.0432	.1132
		36	.0113	.01605	.495	-.0237	.0463
		48	-.0163	.01605	.330	-.0513	.0187
		60	.0000	.01605	1.000	-.0350	.0350

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

ANOVA

Yx/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	5	.000	16.579	.000
Within Groups	.000	12	.000		
Total	.000	17			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yx/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	12	24	-.0028	.00161	.109	-.0063	.0007
		36	-.0077(*)	.00161	.000	-.0112	-.0042
		48	-.0116(*)	.00161	.000	-.0151	-.0081
		60	-.0030	.00161	.090	-.0065	.0005
		72	.0002	.00161	.890	-.0033	.0037
	24	12	.0028	.00161	.109	-.0007	.0063
		36	-.0049(*)	.00161	.010	-.0084	-.0014
		48	-.0088(*)	.00161	.000	-.0123	-.0053
		60	-.0002	.00161	.910	-.0037	.0033
		72	.0030	.00161	.086	-.0005	.0065
	36	12	.0077(*)	.00161	.000	.0042	.0112
		24	.0049(*)	.00161	.010	.0014	.0084
		48	-.0039(*)	.00161	.033	-.0074	-.0004
		60	.0047(*)	.00161	.012	.0012	.0082
		72	.0079(*)	.00161	.000	.0044	.0114
	48	12	.0116(*)	.00161	.000	.0081	.0151
		24	.0088(*)	.00161	.000	.0053	.0123
		36	.0039(*)	.00161	.033	.0004	.0074
		60	.0086(*)	.00161	.000	.0051	.0121
		72	.0118(*)	.00161	.000	.0083	.0153
	60	12	.0030	.00161	.090	-.0005	.0065
		24	.0002	.00161	.910	-.0033	.0037
		36	-.0047(*)	.00161	.012	-.0082	-.0012
		48	-.0086(*)	.00161	.000	-.0121	-.0051
		72	.0032	.00161	.070	-.0003	.0067
	72	12	-.0002	.00161	.890	-.0037	.0033
		24	-.0030	.00161	.086	-.0065	.0005
		36	-.0079(*)	.00161	.000	-.0114	-.0044
		48	-.0118(*)	.00161	.000	-.0153	-.0083
		60	-.0032	.00161	.070	-.0067	.0003

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

ภาคผนวก ค-7 การหมักเอทานอลและการเจริญของ *S.cerevisiae* (S_2) จากน้ำอัดลมหมดอายุ จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร

ANOVA

SUGAR

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4.056	4	1.014	37.723	.000
Within Groups	.269	10	.027		
Total	4.325	14			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: SUGAR

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		40	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		50	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		98	-1.3000(*)	.13387	.000	-1.5983	-1.0017
	30	25	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		40	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		50	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		98	-1.3000(*)	.13387	.000	-1.5983	-1.0017
	40	25	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		30	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		50	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		98	-1.3000(*)	.13387	.000	-1.5983	-1.0017
	50	25	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		30	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		40	.0000	.13387	1.000	-.2983	.2983
		98	-1.3000(*)	.13387	.000	-1.5983	-1.0017
	98	25	1.3000(*)	.13387	.000	1.0017	1.5983
		30	1.3000(*)	.13387	.000	1.0017	1.5983
		40	1.3000(*)	.13387	.000	1.0017	1.5983
		50	1.3000(*)	.13387	.000	1.0017	1.5983

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

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2546.417	4	636.604	12295.988	.000
Within Groups	.518	10	.052		
Total	2546.935	14			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: ETHANOL

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	-2.3767(*)	.18578	.000	-2.7906	-1.9627
		40	-7.6433(*)	.18578	.000	-8.0573	-7.2294
		50	-12.7767(*)	.18578	.000	-13.1906	-12.3627
		98	-36.3467(*)	.18578	.000	-36.7606	-35.9327
	30	25	2.3767(*)	.18578	.000	1.9627	2.7906
		40	-5.2667(*)	.18578	.000	-5.6806	-4.8527
		50	-10.4000(*)	.18578	.000	-10.8140	-9.9860
		98	-33.9700(*)	.18578	.000	-34.3840	-33.5560
	40	25	7.6433(*)	.18578	.000	7.2294	8.0573
		30	5.2667(*)	.18578	.000	4.8527	5.6806
		50	-5.1333(*)	.18578	.000	-5.5473	-4.7194
		98	-28.7033(*)	.18578	.000	-29.1173	-28.2894
	50	25	12.7767(*)	.18578	.000	12.3627	13.1906
		30	10.4000(*)	.18578	.000	9.9860	10.8140
		40	5.1333(*)	.18578	.000	4.7194	5.5473
		98	-23.5700(*)	.18578	.000	-23.9840	-23.1560
	98	25	36.3467(*)	.18578	.000	35.9327	36.7606
		30	33.9700(*)	.18578	.000	33.5560	34.3840
		40	28.7033(*)	.18578	.000	28.2894	29.1173
		50	23.5700(*)	.18578	.000	23.1560	23.9840

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.125	4	4.781	2927.282	.000
Within Groups	.016	10	.002		
Total	19.141	14			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: BIOMASS

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	-2.0467(*)	.03300	.000	-2.1202	-1.9731
		40	-3.0400(*)	.03300	.000	-3.1135	-2.9665
		50	-2.7600(*)	.03300	.000	-2.8335	-2.6865
		98	-2.9100(*)	.03300	.000	-2.9835	-2.8365
	30	25	2.0467(*)	.03300	.000	1.9731	2.1202
		40	-.9933(*)	.03300	.000	-1.0669	-.9198
		50	-.7133(*)	.03300	.000	-.7869	-.6398
		98	-.8633(*)	.03300	.000	-.9369	-.7898
	40	25	3.0400(*)	.03300	.000	2.9665	3.1135
		30	.9933(*)	.03300	.000	.9198	1.0669
		50	.2800(*)	.03300	.000	.2065	.3535
		98	.1300(*)	.03300	.003	.0565	.2035
	50	25	2.7600(*)	.03300	.000	2.6865	2.8335
		30	.7133(*)	.03300	.000	.6398	.7869
		40	-.2800(*)	.03300	.000	-.3535	-.2065
		98	-.1500(*)	.03300	.001	-.2235	-.0765
	98	25	2.9100(*)	.03300	.000	2.8365	2.9835
		30	.8633(*)	.03300	.000	.7898	.9369
		40	-.1300(*)	.03300	.003	-.2035	-.0565
		50	.1500(*)	.03300	.001	.0765	.2235

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.000	4	.000	2.185	.144
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.001	14			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yp/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	.0037	.00519	.496	-.0079	.0152
		40	-.0057	.00519	.301	-.0172	.0059
		50	-.0083	.00519	.140	-.0199	.0032
		98	-.0087	.00519	.126	-.0202	.0029
	30	25	-.0037	.00519	.496	-.0152	.0079
		40	-.0093	.00519	.103	-.0209	.0022
		50	-.0120(*)	.00519	.043	-.0236	-.0004
		98	-.0123(*)	.00519	.039	-.0239	-.0008
	40	25	.0057	.00519	.301	-.0059	.0172
		30	.0093	.00519	.103	-.0022	.0209
		50	-.0027	.00519	.619	-.0142	.0089
		98	-.0030	.00519	.576	-.0146	.0086
	50	25	.0083	.00519	.140	-.0032	.0199
		30	.0120(*)	.00519	.043	.0004	.0236
		40	.0027	.00519	.619	-.0089	.0142
		98	-.0003	.00519	.950	-.0119	.0112
	98	25	.0087	.00519	.126	-.0029	.0202
		30	.0123(*)	.00519	.039	.0008	.0239
		40	.0030	.00519	.576	-.0086	.0146
		50	.0003	.00519	.950	-.0112	.0119

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

ANOVA

Yx/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.021	4	.005	4075.447	.000
Within Groups	.000	10	.000		
Total	.021	14			

least-significant different (LSD)

Dependent Variable: Yx/s

Dependent Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
	25	30	-.0477(*)	.00092	.000	-.0497	-.0456
		40	-.0303(*)	.00092	.000	-.0324	-.0283
		50	.0060(*)	.00092	.000	.0040	.0080
		98	.0607(*)	.00092	.000	.0586	.0627
	30	25	.0477(*)	.00092	.000	.0456	.0497
		40	.0173(*)	.00092	.000	.0153	.0194
		50	.0537(*)	.00092	.000	.0516	.0557
		98	.1083(*)	.00092	.000	.1063	.1104
	40	25	.0303(*)	.00092	.000	.0283	.0324
		30	-.0173(*)	.00092	.000	-.0194	-.0153
		50	.0363(*)	.00092	.000	.0343	.0384
		98	.0910(*)	.00092	.000	.0890	.0930
	50	25	-.0060(*)	.00092	.000	-.0080	-.0040
		30	-.0537(*)	.00092	.000	-.0557	-.0516
		40	-.0363(*)	.00092	.000	-.0384	-.0343
		98	.0547(*)	.00092	.000	.0526	.0567
	98	25	-.0607(*)	.00092	.000	-.0627	-.0586
		30	-.1083(*)	.00092	.000	-.1104	-.1063
		40	-.0910(*)	.00092	.000	-.0930	-.0890
		50	-.0547(*)	.00092	.000	-.0567	-.0526

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

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวรัชนีกร หมวดพล

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5010920024

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2549

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ จากเงินรายได้ สัญญาเลขที่ ENV512201002S มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปี 2551

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

รัชนีกร หมวดพล ธันวดี เตชะภัทวรกุล สุขสาโรจน์ และ ดวงพร คันธโชติ. 2552. การผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*. การประชุมวิชาการทางสมาคมวิศวกรรมเกษตรแห่งประเทศไทย. ครั้งที่ 10. นครราชสีมา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.