รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์และแบคทีเรีย

Feasibility Study of Bio-ethanol Production from Expired Carbonated Soft Drink by Yeast and Bacteria

โดย ธันวดี เตชะภัททวรกุล สุขสาโรจน์

นอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2551 ประเภทพัฒนานักวิจัย

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ประจำปีงบประมาณ 2551 ประเภทพัฒนานักวิจัย มหาวิทยาลัยสงลานครินทร์ สำหรับทุนสนับสนุนในการทำวิจัยครั้งนี้ และงานวิจัยนี้จะสำเร็จลุล่วงไปไม่ได้เลยหากการสนับสนุนจากคณะการจัดการสิ่งแวดล้อม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. ดวงพร คันธโชติ เป็นอย่างยิ่ง สำหรับความกรุณาและคำแนะนำอันเป็นแนวทางที่ทำให้งานวิจัยครั้งนี้ดำเนินการไปได้เป็นอย่างดี ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. นุกูล อินทรสังขา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ และ ดร. ปิยะรัตน์ บุญแสวง คณะอุตสาหกรรมเกษตร สำหรับคำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัยครั้งนี้ สุดท้ายขอขอบพระคุณบริษัท หาดทิพย์ จำกัด (มหาชน) โดยเฉพาะคุณเฉลา ภู่พิชชาพันธุ์ สำหรับตัวอย่างน้ำอัดลมและความร่วมมือเป็นอย่างดีที่มีให้แก่คณะผู้วิจัยเสมอมา

คณะผู้วิจัย

กรกฎาคม 2552

คณะผู้วิจัย

1. ดร. ธันวดี เตชะภัททวรกุล สุขสาโรจน์ หัวหน้าโครงการ

2. น.ส. ฟางทิพย์ ทองศรี ผู้ช่วยวิจัย

3. น.ส. รัชนีกร หมวดพล ผู้ช่วยวิจัย

คณะการจัดการสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

น้ำอัดลมหมดอายุเป็นของเสียประเภทหนึ่งของอุตสาหกรรมน้ำอัดลม ซึ่งมีน้ำตาลในปริมาณสูง ทำให้ไม่สามารถส่งเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียได้โดยตรง จึงก่อให้เกิดความยุ่งยากในการจัดการขวดบรรจุภัณฑ์ซึ่งต้องนำกลับมาใช้ซ้ำในกระบวนการผลิต จากสมบัติที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลัก และไม่มีสารพิษปนเปื้อน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำน้ำอัดลมหมดอายุมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอล สำหรับงานวิจัยนี้ ได้ทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยกระบวนการหมักด้วยยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์หมักเอทานอลที่มีประสิทธิภาพ โดยทำการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิตเอทานอลที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุ และทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด จากการทดลองหมักเอทานอลเบื้องต้นพบว่า ยีสต์ *S.cerevisiae* (S_1) ไม่สามารถเจริญเติบโตในน้ำอัดลมหมดอายุที่ไม่เจือจางแต่แบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 สามารถเจริญเติบโตและหมักเอทานอลได้

ผลการศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S.cerevisiae* (S_1) พบว่า สูตรอาหารที่ใช้น้ำอัดลมหมดอายุที่เจือจางให้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 9.02 กรัมต่อลิตร มีผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น ($Y_{P/S}$) เท่ากับ 0.384 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งพบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าต่ำ เพื่อยืนยันถึงความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลงหมดอายุ จึงทำการศึกษาโดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) โดยใช้สูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากการศึกษาด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ผลการศึกษาพบว่า เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) สามารถทนต่อความเข้มข้นที่น้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุได้สูงกว่ายีสต์ *S. cerevisiae* (S_1)โดยที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 98 กรัมต่อลิตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด 48.72 กรัมต่อลิตร มีผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 0.504 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และมีปริมาณมวลชีวภาพเท่ากับ 5.97 กรัมต่อลิตร

สำหรับการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 พบว่า การเลี้ยงแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุไม่เจือ

จาง เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มภายใต้สภาวะการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง แบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 6.72 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้นเท่ากับ 0.11 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งผลผลิตเอทานอลที่ได้มีค่าต่ำกว่าค่าผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้นทางทฤษฎี (0.50) มาก จึงทำการทดลองปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุให้ลดลง และศึกษาหาค่า pH เริ่มต้นและปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุเจือจางอีกครั้ง ผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับการทดลองที่ใช้น้ำอัดลมหมดอายุไม่เจือจาง แต่สามารถให้ค่าเอทานอลเพิ่มขึ้นและ มีค่าผลผลิตเอทานอลใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี (0.50) โดยพบว่าเมื่อนำน้ำอัดลมหมดอายุมาเจือจางปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นให้เท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 10.67 กรัมต่อลิตร และมีค่าผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.35 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

งานวิจัยนี้ยังทำการศึกษาผลของวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้การฆ่าเชื้อด้วยแรงดันไอน้ำที่ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการกับการใช้สารเคมีโปแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) ซึ่งใช้ในระดับอุตสาหกรรม ผลการทดลองพบว่า *cerevisiae* (S_1) ไม่มีความต้านทานต่อสาร KMS ที่ความเข้มข้นทดสอบ (0.2 กรัมต่อลิตร) โดยที่ความเข้มข้นดังกล่าว เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ไม่สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ แต่สำหรับยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักที่ฆ่าเชื้อด้วยสาร KMS (0.2 กรัมต่อลิตร)และฆ่าเชื้อด้วย Autoclave มีค่าไม่แตกต่างกัน ส่วนการทดลองใช้โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ 0.5 กรัมต่อลิตร สำหรับการหมักเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้แรงดันไอน้ำ

จากผลการวิจัย พบว่าทั้งยีสต์ *S.cerevisiae* และแบคทีเรีย *Z.mobilis* สามารถใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอลได้ แสดงให้เห็นว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล สำหรับงานวิจัยนี้ ยีสต์ *S.cerevisiae* มีความเหมาะสมในการนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์หมักมากกว่า แบคทีเรีย *Z.mobilis* แต่ทั้งนี้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เป็นสำคัญ และเนื่องด้วยลักษณะสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุที่มีเพียงน้ำตาลเป็น

องค์ประกอบหลัก แต่มีสารอาหารอย่างอื่นน้อยมาก จึงต้องเติมสารอาหารร่วมด้วย และการใช้สารเคมี KMS เป็นวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพื่อใช้ผลิตเอทานอลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2)

คำสำคัญ : ไบโอเอทานอล, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, น้ำอัดลมหมดอายุ

ABSTRACT

Expired carbonated soft drink is one of wastes generated from soft drink process. Due to its characteristic that contains high sugar concentration and has high quantity, it could be treated directy by wastewater treatment unit of the factory and originates the problem of reuse bottle management. When the main composition of this waste is sugar and does not contaminated by toxic substances therefore it may be used as carbon sourece for bioethanol production. This research was conducted to study the possibility of bioethanol production using expired carbonated soft drink as substrate. The microorganisms used included yeast *Saccharomyces cerevisiae* and bacteria *Zymomonas mobilis* which are the effective ethanol fermented microorganisms. The preliminary study showed that the non-diluted expired carbonated soft drink inhibited the growth of *S.cerevisiae* (S_1) but *Z.mobilis* Z_4 could grow and ferment ethanol in expired carbonated soft drink.

The results showed the appropriate culture broth and culture condition for *S. cerevisiae* (S_1) were the culture contained diluted expired carbonated soft drink with initial sugar composition by 25 g/L, added 0.1 g/L of $(NH_4)_2SO_4$, adjusted initial pH to be 5.0, incubated at 30 ^{0}C with agitation vate of 100 rpm for 48 hr. With these appropriate condition, *S. cerevisiae* (S_1) yielded highest ethanol production by 9.02 g/L and 0.384 g ethanol/g sugar of Yp/s. It could be seem that ethanol produced from *S. cerevisiae* (S_1) fermentation was low in comparing with other researchs. 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 previous study with *S. cerevisiae* (S_1). The result of this secondary study showed *S. cerevisiae* (S_2) can tolerate higher initial sugar concentration in culture broth than *S. cerevisiae* (S_1). *S. cerevisiae* (S_2) could produce ethanol in the culture prepared from non-diluted expired carbonated soft drink with the initial sugar concentration of 98 g/L. This fermentation yielded 48.72 g/L of ethanol and 0.504 g/g of Yp/s.

According to the result of preliminary study, the culture of *Z. mobilis* Z_4 was conducted in non-diluted expired carbonated soft drink. The result was found that the *Z.mobilis* Z_4 culture in media prepared from non-diluted carbonated soft drink added with 1 g/L of $(NH_4)_2SO_4$, adjusted initial pH to 5.5,

incubated at 30 °C under agitation condition at 100 rpm for 36 hr yielded the highest ethanol production by 6.72 g/L with ethanol yield by 0.11 g_p/g_s. The ethanol yield obtained was very low therefore the later experiment was conducted with diluted expired carbonated soft drink sample and the optimization of $(NH_4)_2SO_4$ concentration and initial pH were repeated. The results showed that the optimal $(NH_4)_2SO_4$ concentratiion and initial pH did not change from that obtained from previous study. The dilution of expired carbonated soft drink could enhance the ethanol production of *Z.mobilis* Z_4. The diluted expired carbonated soft drink that contained 60 g/L of initial sugar added with 1 g/L of $(NH_4)_2SO_4$, adjusted initial pH to 5.5 and incubated under agitation condition of 100 rpm at 30°C for 36 hr yielded highest ethanol production by 10.67 g/L and 0.35 g_p/g_s.

This research also studied the effect of media sterilization methods, autoclave (115°C under pressure 10 lbs/inch^2 for 15 min.) and use of potassium metabisulphite (KMS) on ethanol production. The result was found that *S.cerevisiae* (S_1) could be inhibited by 0.2 g/L of KMS whereas the 0.2 g/L of KMS did not affect on ethanol production of *S.cerevisiae* (S_2). The ethanol yield obtained from *S.cerevisiae* (S_2) cultured in media sterilized by autoclaving did not different from that obtained from sterilization by KMS. For *Z.mobilis* Z_4 culture, the 0.5 g/L of KMS decreases ethanol production of this bacteria in comparing with autoclaving.

From these results, either *S.cerevisiae* and *Z.mobilis* could use expired carbonated soft drink as a carbon source for ethanol production. It could be seem that it is possible to use this waste for ethanol production. The *S.cerevisiae* may be appropriate to be used as fermented microorganisms than *Z.mobilis* however the ethanol production efficiency also depends on the isolate of microorganisms. The nutrient supplement is necessary for expired carbonated soft drink culture and the KMS could be used effectively in stead of autoclave for *S.cerevisiae* (S_2) culture.

Keywords: Bioethanol, *Saccharomyces cerevisiae*, *Zymomonas mobilis*, Expired carbonated soft drink

สารบัญ

หน้า

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ขอบเขตการวิจัย 2

บทที่ 2 บทตรวจเอกสาร

2.1 น้ำอัดลม 3

2.2 เอทานอล (ethanol) 6

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล 7

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล 13

2.5 ยีสต์ *S. cerevisiae* 15

2.6 แบคทีเรีย *Z. mobilis* 18

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์และแบคทีเรีย 20

บทที่ 3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ 24

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์ 26

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย 28

3.4 การตรวจวิเคราะห์และรายงานผล 34

3.5 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ 35

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุ 36

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมของต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน 37

4.2.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน 37

4.2.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน 53

4.3 ผลการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) 68

4.4 ผลการกำจัดเชื้อในน้ำอัดลมหมดอายุโดยการเติม KMS 74

4.5 ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน 76

4.5.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุชนิดไม่เจือจางของแบคทีเรีย *Z. mobiilis* Z_4 76

4..5.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 86

4.5.3 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุเจือจางของแบคทีเรีย *Z. mobiilis* Z_4 98

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

5.1 ความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *S.cerevisiae* 116

5.2 ความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยแบคทีเรีย *Z.mobilis* 117

เอกสารอ้างอิง 119

ภาคผนวก 125

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4-1	สมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุ	36
4-2	ผลการศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 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	39
4-3	ผลการศึกษาปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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 บ่มที่อุณหภูมิ30 องศาเซลเซียสด้วยอัตราการเขย่า100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง	44
4-4	ผลการศึกษาค่า pH เริ่มต้น ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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	49
4-5	ผลการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากจากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0	54
4-6	ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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	59
4-7	ผลการศึกษาระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมสำหรับการการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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	64
4-8	ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer กับ เครื่อง Gas chromatography	68
4-9	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	70

ตารางที่ **หน้า**

4-10 ผลการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) จากการผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 กำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยวิธี Autoclave และการเติม KMS 200 ppm ใช้ปริมาณเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) เริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 75

4-11 ผลการศึกษาปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 3 และ 4.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 78

4-12 ผลการศึกษาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5, 5, 5.5, 6.0 และ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 83

4-13 ผลการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 87

4-14 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1ต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง 91

4-15 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง 95

4-16 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง 100

4-17 ผลการศึกษาปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง 104

ตารางที่ **หน้า**

4-18 ผลการศึกษาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง 108

4-19 ผลการศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง 112

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2-1	โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล	6
2-2	การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล	8
2-3	การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร	10
2-4	แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*	16
2-5	การผลิตเอทานอลจากกลูโคสโดย Emboden-Meyerhof-Parns Pathway	18
2-6	แสดงลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *Zymomonas sp.*	19
2-7	Entner-Doudoroff pathway	20
4-1	ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/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	40
4-2	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	41
4-3	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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	42
4-4	ผลของปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณมวลชีวภาพและผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/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	45
4-5	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	46
4-6	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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	47

ภาพที่		หน้า
4-7	ผลของ pH ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/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	50
4-8	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	51
4-9	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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	52
4-10	ผลของอัตราการเขย่าต่อปริมาณมวลชีวภาพ 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	55
4-11	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	56
4-12	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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	57
4-13	ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักต่อปริมาณชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/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	60
4-14	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	61

ภาพที่		หน้า
4-15	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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 ชั่วโม	62
4-16	ผลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/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	65
4-17	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	66
4-18	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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	67
4-19	ปริมาณมวลชีวภาพและผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) ของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) 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	71
4-20	ผลการหมักเอทานอลและผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) 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	72
4-21	ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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	73
4-22	ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	79

ภาพที่		หน้า
4-23	ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน$(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	80
4-24	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักด้วยปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	81
4-25	ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	84
4-26	ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48ชั่วโมง	84
4-27	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	85
4-28	ผลของอัตราการเขย่า ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	88
4-29	ผลของอัตราการเขย่า ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	89
4-30	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีอัตราการเขย่าแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	90

ภาพที่ **หน้า**

4-31 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 92

4-32 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ใน อาหารเลี้ยงเชื้ อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 93

4-33 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่า ทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มี ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง 94

4-34 ผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm 96

4-35 ผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm 97

4-36 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่า ทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีระยะเวลาหมักแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลม หมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm 97

4-37 ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L ปรับ pH เริ่มต้น เท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 101

4-38 ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง 102

ภาพที่		หน้า
4-39	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุที่แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	103
4-40	ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	105
4-41	ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	106
4-42	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักด้วยปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	107
4-43	ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	109
4-44	ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	110
4-45	ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	111
4-46	ผลของการฆ่าเชื้อในอาหาร ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง	113

ภาพที่ **หน้า**

4-47 ผลของฆ่าเชื้อในอาหาร ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราการเขย่า 100 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง 113

4-48 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm และการใช้ความร้อนอุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราการเขย่า 100 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง 114

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของงานวิจัย

นอกจากน้ำเสียจากกระบวนการผลิตแล้ว โรงงานอุตสาหกรรมผลิตน้ำอัดลมยังมีน้ำของเสียอีกประเภทหนึ่งซึ่งบริษัทฯผู้ผลิตเป็นผู้รับผิดชอบจำกัด คือน้ำอัดลมหมดอายุ น้ำอัดลมหมดอายุในที่นี้ หมายถึงน้ำอัดลมที่หมดอายุด้วยระยะเวลา(น้ำอัดลมที่ส่งออกไปจำหน่ายเกินเวลา 45 วัน) มีปริมาณน้ำตาลไม่ได้มาตรฐาน หรือผลิตออกมาแล้วมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ไม่ได้มาตรฐานจากกระบวนการผลิต มีปริมาณที่ต้องกำจัดประมาณ 50 ลบ.ม.ต่อเดือน น้ำอัดลมหมดอายุนี้ ไม่สามารถปล่อยทิ้งลงสู่ธรรมชาติได้โดยตรง ไม่สามารถกำจัดได้ด้วยระบบบำบัดน้ำเสียโดยทันที เนื่องจากลักษณะสมบัติที่มีน้ำตาลปริมาณสูงและแตกต่างจากน้ำเสียจากกระบวนการผลิต อีกทั้งมีข้อจำกัดในการรับภาระบรรทุกของระบบบำบัดน้ำเสียของโรงงาน การกำจัดของเสียประเภทนี้ของบริษัทฯผู้ผลิตน้ำอัดลมที่ดำเนินการอยู่ในปัจจุบัน คือ การสร้างถังเก็บกักขนาดใหญ่ แล้วจึงสูบเข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียทีละปริมาณน้อยๆ ผู้วิจัยจึงมีความเห็นว่าควรทำการศึกษาเพื่อหาแนวทางในการนำของเสียนี้กลับมาใช้ประโยชน์แทนการปล่อยทิ้งไว้เป็นของเสียที่ไม่มีคุณค่า เสียพื้นที่ในการเก็บกัก และต้องเฝ้าระวังการกัดกร่อนถังกักเก็บ การนำของเสียกลับมาใช้ประโยชน์หรือเพิ่มมูลค่าให้แก่ของเสียโดยนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีมูลค่า เป็นแนวทางหนึ่งของการจัดการสิ่งแวดล้อมที่ได้รับการยอมรับและศึกษาวิจัยอย่างกว้างขวางในปัจจุบัน โดยเฉพาะการใช้จุลินทรีย์เป็นตัวทำปฏิกิริยา เนื่องด้วย จุลินทรีย์มีคุณสมบัติในการเปลี่ยนแปลงสารอินทรีย์ที่มีอยู่ในแหล่งอาหารเป็นสารอินทรีย์ชนิดอื่นที่มีประโยชน์มากมายหลายชนิด กระบวนการนี้มีราคาถูกกว่าการใช้สารเคมีเป็นตัวทำปฏิกิริยาและไม่เกิดผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม โดยผลิตภัณฑ์ชนิดหนึ่งที่ได้รับความสนใจในปัจจุบัน คือ เอทานอล เอทานอลเป็นแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทมากในปัจจุบัน โดยถูกนำมาผสมกับน้ำมันเบนซินเพื่อผลิตเป็น แก๊สโซฮอลล์ เพื่อเป็นเชื้อเพลิงทดแทนน้ำมันเบนซิน สามารถลดการนำเข้าและปริมาณการใช้น้ำมันปิโตรเลียมที่มีอยู่จำกัดและมีราคาสูงขึ้น เอทานอลสามารถผลิตได้จากการสังเคราะห์และการหมักทางชีวภาพ โดยร้อยละ 95 ของเอทานอลที่ใช้กันทั่วโลกผลิตจากกระบวนการหมักทางชีวภาพ โดยใช้พืชเกษตรเป็นวัตถุดิบ สำหรับประเทศไทยเองก็ให้ความสนใจเกี่ยวกับการผลิตเอทานอลจากพืชเกษตรเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทนเช่นกัน และมีโรงงานผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมเกิดขึ้นแล้วในหลายพื้นที่ ทั้งนี้วัตถุดิบที่สามารถใช้ผลิตเอทานอล มี 3 ประเภท (กมลศักดิ์ ตั้งธรรมเนียม, 2540) คือ วัตถุดิบประเภทแป้ง (เช่น มัน สำปะหลัง) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล (เช่น อ้อย ซูการ์บีช) และเศษวัสดุที่เป็นเซลลูโลส (เช่น หญ้าสวิทช์) โดยที่วัตถุดิบประเภทแป้งและเซลลูโลส จะถูกย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลก่อน แล้วจึงค่อย

เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยอาศัยยีสต์หรือแบคทีเรียบางชนิด สำหรับวัตถุดิบประเภทที่เป็นน้ำตาลอยู่แล้วสามารถนำไปใช้หมักเอทานอลได้เลย (ระวีวรรณ แกล้วกล้า, 2538) ในอุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ขั้นตอนที่มีต้นทุนสูงคือการย่อยวัตถุดิบระเภทแป้งและเซลลูโลสเป็นน้ำตาล เพราะต้องใช้กรดหรือเอนไซม์ช่วยย่อย ดังนั้นหากสามารถใช้วัตถุดิบที่เป็นน้ำตาลได้ ก็จะเป็นโอกาสในการลดต้นทุนและเวลาในการผลิตเอทานอล

ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยทำการศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Sacharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ชนิดที่ใช้กันโดยทั่วไปในการผลิตแอลกอฮอล์ และแบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียผลิตแอลกอฮอล์ที่ได้รับความสนใจมาก จากงานวิจัยหลายชิ้นที่ผ่านมาระบุว่ามีศักยภาพในการผลิตเอทานอลได้สูงกว่ายีสต์ นอกจากนี้ยังสามารถทนต่อเอทานอลได้สูง แต่ทั้งนี้ *Z. mobilis* ใช้น้ำตาล 3 ชนิดเท่านั้นคือ กลูโคส ฟรุกโตส และ ซูโครส ในขณะที่ยีสต์ใช้น้ำตาลได้หลากหลายชนิดมากกว่า ผลจากการศึกษาครั้งนี้อาจใช้เป็นแนวทางในการจัดการของเสียและได้เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้ที่มีมูลค่าคือ เอทานอล ซึ่งอาจนำไปประยุกต์ใช้เป็นกระบวนการผลิตที่สร้างรายได้ให้แก่บริษัทผู้ผลิตน้ำอัดลมอีกทางหนึ่งได้

1.2 วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อยีสต์ *S.cerevisiae* และ แบคทีเรีย *Z. mobilis* ในการผลิตเอทานอล โดยมีน้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน

2.2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุของเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* และ แบคทีเรีย *Z. mobilis*

1.3 ขอบเขตการวิจัย

การทดลองครั้งนี้เป็นการทดลองในระดับห้องปฏิบัติการ ตัวอย่างน้ำอัดลมที่นำมาศึกษาเป็นของเสียของบริษัท หาดทิพย์ จำกัด (มหาชน) โดยทำศึกษาความเป็นไปได้ในการนำน้ำอัดลมหมดอายุมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตไบโอเอทานอล ในขั้นต้นทำการศึกษาหาปริมาณของส่วนประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ แหล่งไนโตรเจน เพื่อเติมลงในน้ำอัดลมหมดอายุ เมื่อได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมแล้ว จึงทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S.cerevisiae* และแบคทีเรีย *Z. mobilis* (การเติมออกซิเจน อุณหภูมิ ระยะเวลาในการหมักปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น และการฆ่าเชื้อด้วย Autoclave เปรียบเทียบกับการเติม Potassium metabisulfite) ซึ่ง ผลที่ได้จะเป็นความรู้ที่อาจสามารถนำไปขยายเป็นการศึกษาระดับ Pilot-Scale เพื่อเป็นทางเลือกหนึ่งในการจัดการของเสียของอุตสาหกรรมน้ำอัดลมได้ต่อไป

บทที่ 2

บทตรวจเอกสาร

2.1 น้ำอัดลม

น้ำอัดลม หมายถึง เครื่องดื่มที่ผสมด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อทำให้เกิดความซ่า น้ำอัดลมแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ ประเภทไม่มีการผสมน้ำหวาน หรือ โซดาส่วนอีกประเภท คือ มีผสมน้ำหวาน ปรุงแต่งกลิ่นและรสชาติ

น้ำอัดลมได้มีขึ้นเป็นครั้งแรกในประเทศไทยในสมัยพระบาทสมเด็จพระจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 4 การผลิตน้ำอัดลมดังกล่าวไม่มีการปรุงแต่ง กลิ่น และรสชาติ เรียกว่าน้ำโซดา ต่อมาได้มีการทำน้ำอัดลมโดยการปรุงแต่ง กลิ่น และรสชาตินำ้มะนาว และมีการอัดก๊าซ เช่นเดียวกับโซดา ต่อมาในสมัยพระบาทสมเด็จพระจุลจอมเกล้าเจ้าอยู่หัว รัชกาลที่ 5 ได้มีการผลิตน้ำอัดลมโดยชาวยุโรปและชาวจีน แต่ยังไม่แพร่หลายในประเทศไทย และหลังการเปลี่ยนแปลงการปกครองในปี พ.ศ. 2475 รัฐบาลได้อนุญาตให้เอกชนผลิตเบียร์ไทยขึ้น และมีการผลิตน้ำโซดารวมทั้งน้ำหวานด้วย การผลิตน้ำอัดลมประเภทผสมน้ำหวานในสมัยเริ่มแรกเป็นน้ำหวานสีต่างๆ ผสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บรรจุขวดอย่างง่ายๆ ออกจำหน่ายปริมาณไม่มาก หลังจากสงครามโลกครั้งที่ 2 สิ้นสุดลง จึงเริ่มมีการพัฒนาอุตสาหกรรมน้ำอัดลม เนื่องจากความต้องการในการบริโภคของทหารต่างชาติที่เข้ามาอยู่ในประเทศไทย เพื่อเข้าร่วมกับการแก้ไขวิกฤติการณ์ยุ่งยากในแถบอินโดจีน ประกอบด้วยผู้บริโภคน้ำอัดลมต้องการบริโภคน้ำอัดลมที่มีคุณภาพ และถูกสุขลักษณะ จึงทำให้เกิดโรงงานน้ำอัดลมเพิ่มขึ้น และแพร่หลายไปทั่วประเทศจนถึงปัจจุบัน

2.2.1 ประเภทของน้ำอัดลม

น้ำอัดลม แบ่งตามระบบตลาดที่มีการซื้อขายในปัจจุบันจะแบ่งออกได้เป็น 3 ประเภท ดังนี้

- เครื่องดื่มประเภทน้ำดำ (black carbonated drinks) หมายถึงน้ำอัดลมชนิดโคล่า
- เครื่องดื่มประเภทน้ำสี (fruit flavoured drinks) หมายถึง น้ำอัดลมที่มีการผสมน้ำหวานและแต่งสี เช่น น้ำแดง น้ำเขียว น้ำส้ม เป็นต้น ซึ่งน้ำอัดลมประเภทน้ำสียังแบ่งออกอีกเป็น ชนิดอัดก๊าซ กับชนิดที่ไม่อัดก๊าซ
- เครื่องดื่มประเภทไม่มีสี (lime drinks) หมายถึงน้ำอัดลมที่มีสีขาว ได้แก่ สไปรท์ และเซเว่นอัพ

2.2.2 ตลาดน้ำอัดลมในประเทศไทย

อุตสาหกรรมน้ำอัดลม มีผู้ผลิตทั้งสิ้น 9 ราย แต่มีผู้ประกอบการรายใหญ่อยู่เพียงแค่ 2 รายเท่านั้น คือ บริษัทไทยน้ำทิพย์จำกัด (มหาชน) ผลิตน้ำอัดลมโดยใช้เครื่องหมายการค้า โคคา–โคลา แฟนต้า และสไปร์ท และบริษัทเสริมสุขจำกัด (มหาชน) ซึ่งใช้เครื่องหมายการค้า เป๊ปซี่ มิรินด้า เซเว่นอัพ ซึ่งสัดส่วนการครองตลาดของบริษัทรายใหญ่สองรายนี้ รวมกันคิดเป็นร้อยละ 90 ของตลาดทั้งหมด ดังนั้นอุตสาหกรรมน้ำอัดลมจึงมีลักษณะเป็นตลาดผู้ขายน้อยราย (oligopoly) ถึงแม้จะไม่มีการกีดกัน หรือจำกัดโควตาจากภาครัฐในการเข้าตลาด แต่ด้วยเป็นอุตสาหกรรมที่ต้องลงทุนสูงจึงไม่ค่อยมีผู้ประกอบรายใหม่ที่เข้ามาในตลาด สินค้าในตลาดมีลักษณะคล้ายๆกัน หรือสามารถทดแทนกันได้ในสายตาของผู้บริโภค ผู้ประกอบการจึงต้องสร้างความแตกต่างให้กับผลิตภัณฑ์ของตนเอง ด้วยการผลิตสินค้าตัวใหม่ออกสู่ตลาดอยู่เสมอ เพื่อครองส่วนแบ่งการตลาด

หากแบ่งตลาดน้ำอัดลมออกเป็นประเภทพบว่าจากส่วนแบ่งตลาดน้ำอัดลมทั้งหมดมูลค่าประมาณ 30,000 ล้านบาท จะแบ่งได้เป็น

- ตลาดน้ำดำ มีมูลค่าตลาดประมาณ 22,000 ล้านบาท หรือ 74 % ของตลาดน้ำอัดลม มีสินค้าในตลาด 2 ยี่ห้อ คือ เป๊ปซี่ ซึ่งมีส่วนแบ่งทางการตลาดถึง 63.5 % และโค้ก ซึ่งมีส่วนแบ่งทางการตลาด 36.5 % และในปัจจุบันได้มีผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ทั้ง 2 บริษัทรายใหญ่นำเสนอเพื่อเป็นทางเลือกของผู้ที่ต้องการดื่มน้ำอัดลม แต่ไม่ต้องการน้ำตาล ก็คือ เป๊ปซี่แมกซ์จากค่ายไทยน้ำทิพย์ และโค้กซีโร่ จากค่ายเสริมสุข ซึ่งส่วนแบ่งทางการตลาดของน้ำอัดลมไม่มีน้ำตาลนี้คิดเป็น 3 %ของตลาดน้ำดำ ถึงปัจจุบันจะมีมูลค่าตลาดน้อย แต่ก็มีอัตราการเติบโตกว่า 50% ในปีพ.ศ. 2549 ซึ่งคาดว่าจะมีมูลค่าตลาดมากขึ้นในอนาคต

- ตลาดน้ำสี มีมูลค่าตลาดประมาณ 6,000 ล้านบาท คิดเป็น 20 %ของตลาดน้ำอัดลมทั้งหมด มีสินค้าหลักๆในตลาดอยู่ 2 ยี่ห้อ คือ แฟนต้า จากค่ายไทยน้ำทิพย์ ครองส่วนแบ่งทางการตลาด 77% ส่วนมิรินด้า จากค่ายเสริมสุข มีส่วนแบ่งทางการตลาด 20% และที่เหลือเป็นสินค้าจากบริษัทรายย่อย

- น้ำเลมอน–ไลม์ มีมูลค่าตลาดประมาณ 1,800 ล้านบาท คิดเป็น 6 %ของตลาดน้ำอัดลมทั้งหมด มีสินค้าในตลาดอยู่ 2 ยี่ห้อ คือ สไปรท์ จากค่ายไทยน้ำทิพย์ และเซเว่น อัพ จากค่ายเสริมสุข

2.2.3 ส่วนประกอบของน้ำอัดลม

- น้ำ : เป็นน้ำที่สะอาด อาจจะใช้น้ำประปา หรือน้ำบาดาลที่ผ่านการกรองและฆ่าเชื้อโรคด้วยคลอรีน

- สารให้ความหวาน : ได้แก่น้ำตาลทราย (ซูโครส) ร้อยละ 10.5-14 ซึ่งในอดีตการผลิตน้ำอัดลมชนิดธรรมดา (ไม่ใช่แบบจำกัดพลังงานที่เรียกกันว่าแบบไดเอท) จะใช้น้ำตาลทรายเพียงอย่างเดียวนำมาผสมน้ำแล้วต้มเป็นน้ำเชื่อมและกรอง แต่ในปัจจุบันมีการใช้สารให้ความหวานตัวอื่นเพิ่มเข้ามา เช่น

น้ำเชื่อมข้าวโพด (corn syrup) น้ำเชื่อมข้าวโพดแบบฟรุคโตสสูง (high fructose corn syrup- HFCS) เป็นต้น

- สารปรุงแต่งหรือหัวน้ำเชื้อ : เป็นส่วนผสมของสารที่ให้กลิ่น สี และกรดบางชนิดที่ใช้ในอาหาร เช่น กรดมะนาว

- ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ : ทำให้เกิดฟอง ซึ่งเป็นก๊าซที่เกิดขึ้นในชั้นบรรยากาศของโลกตามธรรมชาติแล้วก๊าซนี้ เป็นก๊าซที่ไม่มีสี และไม่มีกลิ่น

นอกจากนี้น้ำอัดลมยังมีการใช้สารปรุงแต่ง กลิ่น สี รส และวัตถุกันเสีย น้ำอัดลมบางชนิดมีองค์ประกอบที่สำคัญอีกอย่างคือ คาเฟอีน แต่ไม่ได้มีการระบุที่ข้างขวด

2.2.4 กระบวนการผลิตน้ำอัดลม

โรงงานผลิตน้ำอัดลมในประเทศไทยมีอยู่หลายโรงงาน สำหรับที่ผลิตน้ำอัดลมโคคา-โคลา มีจำนวน 5 โรงงาน กรรมวิธีการผลิตเหมือนกัน อาจมีขั้นตอนอื่นๆ เพิ่มขึ้นเฉพาะในการเตรียมน้ำสะอาดเท่านั้น เนื่องจากแหล่งน้ำดิบต่างกัน วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ประกอบด้วย น้ำสะอาด น้ำตาล หัวน้ำเชื้อ (concentrate base) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

น้ำบาดาลที่สูบมาจะต้องผ่านการปรับปรุงคุณภาพน้ำขั้นต้นก่อน โดยการเติมออกซิเจนเพื่อแยกสารละลายเหล็กออกจากน้ำดิบและเติมคลอรีนเพื่อฆ่าเชื้อ แล้วผ่านการกรองด้วยถังกรองทราย จากนั้นจึงผ่านการปรับคุณภาพน้ำอีกครั้งหนึ่งโดยการใช้สารเคมี ขั้นตอนนี้จะใช้ Lime process คือใช้ $FeSO_4Ca(OH)_2$ และ $Ca(OCl)_2$ หลังจากนั้นต้องผ่านการกรองเพื่อแยกตะกอนที่ยังแขวนลอยด้วยถังกรองทรายและผ่านถังกรองเพื่อกำจัดสี กลิ่น และคลอรีนที่ตกค้างในน้ำ น้ำจากขั้นตอนนี้จะต้องผ่านถังกรองละเอียด (polishing filter) อีกครั้งหนึ่งเพื่อกรองสิ่งเจือปนเล็กๆ ขนาด 10 ไมครอนออก

น้ำตาลทรายขาวบริสุทธิ์ จะถูกผสมกับน้ำที่สะอาดแล้วในถังต้มที่มีอุณหภูมิประมาณ 80 องศาเซลเซียสเพื่อละลายน้ำตาลและฆ่าเชื้อ หลังจากนั้นน้ำตาลจะถูกกรองและทำให้เย็นแล้วฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตร้าไวโอเลตอีกครั้งหนึ่ง ก่อนที่จะนำไปผสมกับน้ำเชื้อสำเร็จ ที่ผลิตส่งมาจากต่างประเทศเป็นส่วนๆ เพื่อผลิตน้ำเชื้อสำเร็จรูป (finished syrup)

น้ำเชื้อสำเร็จส่งไปผสมกับน้ำสะอาด และทำให้เย็นแล้วอัดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แล้วบรรจุขวดโดยเครื่องบรรจุขวดอัตโนมัติ พร้อมทั้งปิดฝาทันที แล้วผ่านการตรวจสอบทุกขั้นตอนเพื่อคุณภาพผลิตภัณฑ์ที่สม่ำเสมอและดีเยี่ยม ภาชนะบรรจุมีทั้งกระป๋องและขวด ขวดที่ใช้มีทั้งชนิดที่ใช้แล้วทิ้ง (one-way bottles) และชนิดหมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ (returnable bottles) สำหรับขวดชนิดที่หมุนเวียนกลับมาใช้ใหม่ เป็นขวดแก้ว ต้องผ่านการล้างอย่างดี โดยผ่านเครื่องล้างขวดอัตโนมัติซึ่งภายในจะมีอุณหภูมิสูงและมีสารทำความสะอาด ได้แก่ โซดาไฟ และฟอสเฟต ช่วยในการล้างด้วย นอกจากนี้มีการฉีดทำความ

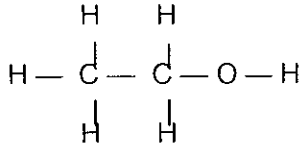
สะอาดด้วยน้ำสะอาดหลาย ครั้ง ก่อนออกมาจากเครื่องล้าง และมีการตรวจสอบก่อนผ่านเข้าเครื่องบรรจุ (เฉลา ศรีทวี, 2535)

ต้นทุนในการผลิตน้ำอัดลม ส่วนใหญ่เป็นค่าหัวเชื้อประมาณร้อยละ 39 ของต้นทุนการผลิตทั้งหมด ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ต้องอาศัยการนำเข้าจากต่างประเทศ รองลงมาเป็นค่าวัตถุดิบภายในประเทศ ประมาณร้อยละ 38 ได้แก่ น้ำตาลทราย ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ขวดพลาสติก ขวดแก้ว ฝาจุกเกลียว ฝาจุกจีบ เป็นต้น ค่าจ้างแรงงานประมาณร้อยละ 7 ส่วนที่เหลือเป็นต้นทุนการผลิตในด้านอื่นๆ อีกร้อยละ 16 ซึ่งได้แก่ ค่าไฟฟ้า ค่าน้ำมันเชื้อเพลิง ค่าบำรุงรักษาโรงงาน ค่าเสื่อมราคาของโรงงานและเครื่องจักร เป็นต้น

2.2 เอทานอล (ethanol)

2.2.1 ลักษณะสมบัติทางเคมีของเอทานอล

เอทานอลหรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) หรือเกรนแอลกอฮอล์ (grain alcohol) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบ มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี จุดติดไฟ และระเหยง่าย มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_5OH มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 46.07 มีจุดเดือดที่ 78.32 องศาเซลเซียส จุดเยือกแข็งที่ -117.3 องศาเซลเซียส (Zoecklein *et al.*, 1995) สามารถละลายในน้ำและสารละลายอื่นๆ ได้ดี เช่น เมทธิลแอลกอฮอล์ อีเธอร์ คลอโรฟอร์ม โดยหนึ่งโมเลกุลของเอทานอลจะประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) หนึ่งหมู่ ดังภาพที่ 1



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล

2.2.2 ประโยชน์ของเอทานอล

- สามารถใช้เป็นเชื้อเพลิง (fuel) เพื่อให้ความร้อน (heat) ในการเผาไหม้เอทานอลนั้นไม่มีกลิ่นและสี ให้ค่าพลังงานความร้อนประมาณ 7,100 แคลอรีต่อกรัม เอทานอลยังสามารถใช้ประโยชน์ในที่ที่กระแสไฟฟ้าเข้าไม่ถึง ซึ่งจะให้แสงสว่างเป็น 3 เท่าครึ่งของแรงเทียน รวมทั้งสามารถให้พลังงาน โดยนำมาผสมกับน้ำมันเพื่อใช้สำหรับการเผาไหม้เครื่องยนต์

- เพื่อใช้ประโยชน์ทั่วไป เช่น ใช้ในโรงพยาบาล ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

- ใช้เป็นตัวทำละลาย (solvent) แอลกอฮอล์ใช้เป็นตัวทำละลายได้อย่างกว้างขวาง เช่น ใช้กับพวก Dye nitrocellulose และ Lacquers processes เป็นต้น

- ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการเตรียมสารเคมีอื่นๆ เช่น Ethylene และ Polyethylene เป็นต้น (ณัฐกิตต์ ธรรมเจริญ, 2543)

2.3 กระบวนการผลิตเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธีหลักๆ คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) และกระบวนการหมัก (fermentation) ซึ่งในปัจจุบันเอทานอลที่ผลิตส่วนใหญ่จะได้จากกระบวนการหมัก โดยคิดเป็นประมาณร้อยละ 95 ของปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ทั้งหมดในโลก

2.3.1 เอทานอลจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี

เป็นการใช้กระบวนการทางเคมีในการสังเคราะห์เอทานอลซึ่งมีเอทิลีน (ethylene) เป็นวัตถุดิบผ่านกระบวนการดไฮเดรชันโดยเอทิลีนจะถูกเปลี่ยนเป็นแอลกอฮอล์จากการใช้กรดซัลฟิวริกทำปฏิกิริยาร่วมกับน้ำ ดังสมการ (1)

$$\underset{\text{เอทิลีน}}{CH_2CH_2} + \underset{\text{กรดซัลฟูริก}}{H_2SO_4} \xrightarrow{} CH_3CH_2OSO_3H \xrightarrow{H_2O} \underset{\text{เอทานอล}}{CH_3CH_2OH} \qquad (1)$$

2.3.2 เอทานอลจากกระบวนการหมัก (fermentation)

เป็นการใช้กระบวนการทางชีวเคมีในการผลิตเอทานอล สามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนหลักๆ คือ ขั้นวัตถุดิบและการเตรียมวัตถุดิบ ขั้นตอนการหมัก และขั้นตอนการกลั่น ซึ่งแต่ละขั้นตอนจะมีผลต่อคุณภาพของเอทานอลที่ผลิตได้ (กมลศักดิ์ ตั้งธรรมเนียม, 2540)

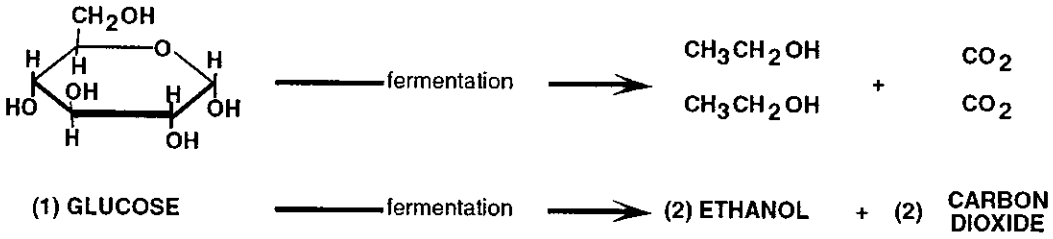
- วัตถุดิบ

วัตถุดิบส่วนใหญ่ที่นำมาใช้ในการหมักเป็นวัตถุดิบทางการเกษตร เอทานอลที่ได้จึงเรียกว่า ไบโอเอทานอล แบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ

ก) วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ น้ำอ้อย กากน้ำตาล บีซน้ำตาล เป็นต้น โดยยีสต์สามารถใช้วัตถุดิบประเภทนี้ได้โดยตรง ซึ่งขั้นตอนที่จุลินทรีย์เปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายเป็นเอทานอล ดังสมการ (2)

$$\text{น้ำตาล} + \text{ยีสต์} \longrightarrow \text{เอทานอล} + \text{คาร์บอนไดออกไซด์} + \text{พลังงาน} \qquad (2)$$

การเปลี่ยนแปลงน้ำตาลเป็นเอทานอล จากน้ำตาลแต่ละประเภท พบว่าน้ำตาลแต่ละประเภทเมื่อนำมาหมักเป็นเอทานอลจะได้ปริมาณเอทานอล และผลผลิตอื่นๆที่แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น กลูโคส 1 โมเลกุล เมื่อนำมาหมักเป็นเอทานอล จะได้เอทานอล 2 โมเลกุล และคาร์บอนไดออกไซด์ 2 โมเลกุล (MURPHY AND MCCARTHY, 2005 อ้างโดย ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2551) ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 2-2 การเปลี่ยนแปลงของน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอล

ที่มา : Murphy and Mccarthy, 2005 อ้างโดย ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2551

ข) วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ผลผลิตทางการเกษตรพวกธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟาง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น ในการผลิตเอทานอลนั้นแป้งในวัตถุดิบจะต้องถูกย่อยสลาย (starch hydrolysis) ได้น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน ยีสต์จึงสามารถเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นเอทานอลได้ โดยการย่อยแป้งประกอบด้วย 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการย่อยครั้งแรกหรือการทำให้เหลว (liquefaction) ขั้นตอนนี้จะใช้กรดหรือเอนไซม์กลุ่มแอลฟาอะมิเลส (α-amylase) ที่มีกิจกรรมการย่อยแป้งที่อุณหภูมิสูงประมาณ 80-95 องศาเซลเซียส ให้ได้โมเลกุลขนาดเล็กลงและมีความหนืดลดลง ซึ่งของเหลวที่ได้ เรียกว่า เด็กซ์ทริน (Krishna and Chowdary, 2000)

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการย่อยครั้งสุดท้ายหรือการทำให้หวาน (saccharification) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์กลูโคอะไมเลส (glucoamylase) ย่อยเด็กซ์ทรินให้ได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ยีสต์สามารถนำไปใช้ได้ ซึ่งโดยทั่วไปเอนไซม์ในกลุ่มนี้จะมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงปานกลาง คือ ประมาณ 55-65 องศาเซลเซียส (Punnapayak and Emert, 1986)

ค) วัตถุดิบประเภทเซลลูโลส ส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น ซึ่งขั้นตอนในการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบในกลุ่มนี้ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนหลักๆ ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบ แบ่งได้เป็น 4 วิธี ดังนี้

- วิธีทางกายภาพ เป็นการปรับสภาพโดยการลดขนาดของวัตถุดิบและทำให้เส้นใยเซลลูโลสแตกออกเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการเกิดปฏิกิริยา เช่น การบด การใช้ความร้อน โดยเป็นการทำลายความเป็นผลึกของเซลลูโลส และเพิ่มการย่อยสลายได้ (Sun and Cheng, 2002)

- วิธีทางเคมี เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยการใช้สารละลายกรด เช่น กรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) และ กรดไฮโดรคลอริก (HCl) โดยจากการศึกษาเตรียมฟางข้าวด้วยการต้มฟางข้าวที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ในสารละลายกรดซัลฟิวริก (H_2SO_4) ความเข้มข้นร้อยละ 0.75 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นใช้ฟางข้าวที่เตรียมแล้วเป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลพบว่าให้ผลผลิตเอทานอลได้ 19 ±1 กรัมต่อลิตร และ Yield เท่ากับ 0.24 กรัมต่อกรัมน้ำหนักแห้ง (Saha *et al.*, 2005) นอกจากปรับสภาพวัตถุดิบด้วยสารละลายกรดแล้วยังปรับได้ด้วยสารละลายด่าง ตัวทำละลายอินทรีย์ หรือสารออกซิแดนท์

- วิธีทางเคมีกายภาพ เป็นการปรับสภาพวัตถุดิบโดยใช้วิธีทางกายภาพร่วมกับการใช้สารเคมี โดยการระเบิดด้วยไอน้ำ วิธีนี้วัตถุดิบจะถูกเตรียมที่ความดันไอน้ำสูง แล้วลดความดันอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะทำให้วัตถุดิบระเบิดแล้วเกิดการสลายตัว การระเบิดด้วยไอน้ำจะเริ่มต้นที่อุณหภูมิ 160-260 องศาเซลเซียส ความดัน 0.69-4.83 MPa เป็นเวลาหลายวินาทีถึงสองหรือสามนาที หลังจากนั้นเอาออกมาที่อุณหภูมิปกติ (Sun and Cheng, 2002)

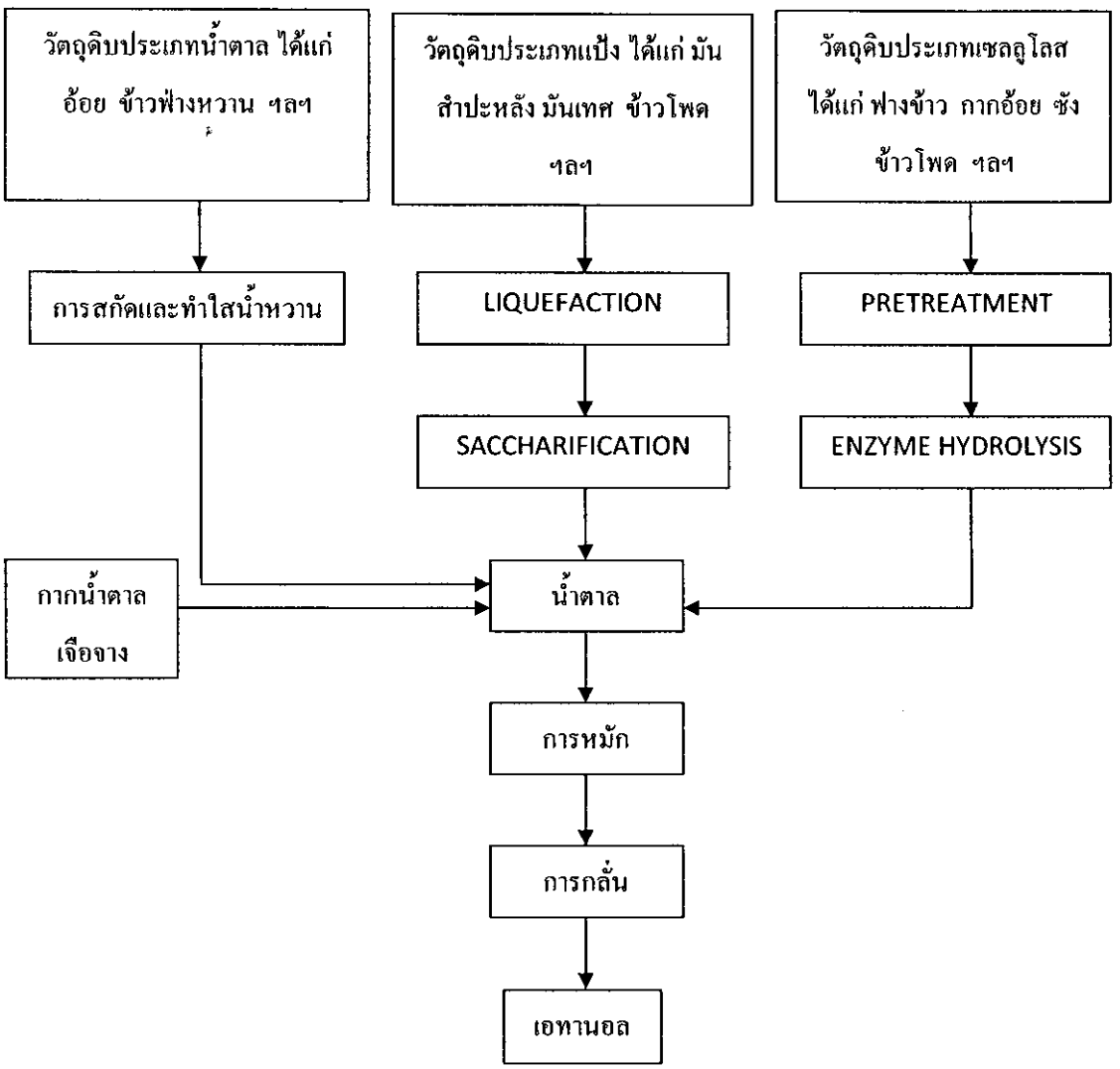
- วิธีทางชีวภาพ เป็นการใช้เอนไซม์จากเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเปลี่ยนโครงสร้างที่ซับซ้อนของเซลลูโลสให้เปลี่ยนอยู่ในรูปโซ่ตรงและช่วยลดความเป็นผลึก ข้อได้เปรียบของการเตรียมด้วยวิธีทางชีวภาพ คือใช้พลังงานต่ำและใช้สภาวะแวดล้อมธรรมดา แต่การไฮโดรไลซีสด้วยจุลินทรีย์ หรือวิธีทางชีวภาพนั้นจะให้ผลผลิตต่ำมาก

ขั้นตอนที่ 2 การย่อย แบ่งได้เป็น 2 วิธี ดังนี้

- การย่อยด้วยสารเคมี สามารถทำได้โดยใช้กรดเข้มข้น หรือกรดเจือจาง ซึ่งเป็นวิธีการย่อยเซลลูโลสเพื่อให้ได้กลูโคสโดยตรง แต่ได้ผลผลิตค่อนข้างน้อย เพราะมีการทำลายน้ำตาลที่เกิดขึ้น โดยน้ำตาลจะทำปฏิกิริยาต่อไปทำให้ได้ผลพลอยได้อื่นๆเช่น Furfural และกรดยังทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่ไม่ใช่เซลลูโลสทำให้ได้ผลผลิตภัณฑ์ที่ไม่ต้องการ สำหรับกรดที่ใช้ในวิธีนี้ได้แก่ กรดซัลฟุริกเข้มข้นร้อยละ70ขึ้นไป กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นร้อยละ40ขึ้นไป กรดซัลฟุริกเจือจางร้อยละ 1 เป็นต้น และในการเกิดปฏิกิริยาต้องใช้อุณหภูมิสูงประมาณ 140-160 องศาเซลเซียส ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดรุนแรงและไม่เฉพาะเจาะจง โดยภาชนะที่ใช้ต้องทนต่อการกัดกร่อนจึงมีราคาแพง นอกจากนี้น้ำทิ้งจากการย่อยจะก่อให้เกิดมลพิษต่อสิ่งแวดล้อมเพราะมีกรดเจือปน (อรุณวรรณ นุชพ่วง, 2547 อ้างโดย ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2551)

- การย่อยด้วยเอนไซม์ เอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยาการย่อยเซลลูโลส คือ เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในจุลินทรีย์หลายชนิด เซลลูเลสเป็นเอนไซม์พวกไกลโคโปรตีนที่มีอัตราส่วน

ของคาร์โบไฮเดตร ต่อ โปรตีนเท่ากับ 1 : 1 ละลายน้ำได้ดี ไม่ต้องการโคเฟคเตอร์ หรือโลหะอื่น ในการเร่ง โดยทั่วไป เอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์มีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานคือ 50 องศาเซลเซียส แต่อาจจะต่ำ หรือ สูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ขึ้นกับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่นำมาผลิต (เบญจวรรณ ชิตมณี, 2534 อ้างโดย ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2551) โดยเอนไซม์มีความคงทนต่อสารเคมีได้ดี มีเพียงอินออนของปรอทที่สามารถยับยั้งการทำงานได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนโลหะอื่นๆอย่างเช่น เงิน ทองแดง สังกะสี มีผลยับยั้งเอนไซม์เพียงเล็กน้อย (วรรณภา ยงสุวรรณไพศาล, 2546 อ้างโดย ยุทธศักดิ์ สุบการี, 2551)



ภาพที่ 2-3 การผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร

ที่มา : (เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ และคณะ, 2548)

2.3.3 กระบวนการหมักเอทานอล

การหมักเอทานอลที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ต่างชนิดหรือต่างสายพันธุ์กัน มีผลให้เกิดปฏิกิริยาทางเคมีต่างกัน และปริมาณของผลิตภัณฑ์ที่ได้ก็ต่างกัน การหมักเอทานอลเป็นการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลด้วยยีสต์หรือแบคทีเรีย โดยการหมักเอทานอลด้วยยีสต์ในสภาวะที่ไร้ออกซิเจน (anaerobic condition) สามารถเจริญได้ในน้ำหมักที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 14 ถึง 15 โดยปริมาตร โดยมีความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นเอทานอล ดังสมการ (3)

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

กลูโคส เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์

ร้อยละ 100 ร้อยละ 51.1 ร้อยละ 48.9

จากสมการเคมีพบว่าตามทฤษฎีแล้วในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของยีสต์นั้น น้ำตาลกลูโคส 100 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็น เอทานอล 51.1 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม นอกจากนั้นยังมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้นอีก 28.7 กิโลแคลอรี่ (KCal) แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่นๆ เช่น อะเซตัลดีไฮด์ กรดอะซีติก กรดแลกติก และกรีเซอรอล หรือหรือใช้ในการสร้างเซลล์และการเจริญเติบโตของยีสต์ (Zoecklein *et al.*, 1995)

การหมักแอลกอฮอล์เป็นกรรมวิธีที่รู้จักกันมานาน เนื่องจากปัญหาพลังงานทำให้เทคโนโลยีการผลิตแอลกอฮอล์ก้าวหน้าไปอย่างมาก มีการค้นคว้าวิจัยหลายแนวทางโดยมีวิธีการที่แตกต่างกันออกไป ทั้งนี้ก็เพื่อหาทางลดต้นทุนการผลิตลงให้มากที่สุด เทคโนโลยีการหมักแอลกอฮอล์แบ่งออกเป็น

ก) การหมักแบบครั้งคราว (batch fermentation)

เป็นการหมักที่ต้องมีการเตรียมเชื้อตั้งต้นใหม่ทุกครั้ง ถ้าคิดเฉพาะช่วงเวลาของการหมักใช้เวลาประมาณ 48 ชั่วโมง เพื่อให้ได้แอลกอฮอล์ประมาณร้อยละ 8 – 10 เป็นวิธีที่ใช้กันมากในโรงงานอุตสาหกรรม โดยเป็นถังสำหรับใส่สารอาหารและจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักแล้วกวนให้ผสมกัน มีการควบคุมอุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นๆ (contamination) จนได้ผลผลิตตามที่ต้องการ จึงถ่ายออกเพื่อนำไปแยกแอลกอฮอล์ให้บริสุทธิ์อีกขั้นตอนหนึ่ง โดยการหมักรูปแบบนี้มีข้อดีและข้อเสีย คือ

<u>ข้อดี</u> <u>ข้อเสีย</u>

- เหมาะกับการผลิตที่มีปริมาตรไม่มากนัก

- ในการหมักแต่ละครั้ง ยีสต์ที่ใช้ต้องมีความแข็งแรงและว่องไวดี ทั้งนี้เพราะต้องเตรียมยีสต์ขึ้นใหม่เสมอ ทำให้การผ่าเหล่า (Mutation) เกิดขึ้นยาก

- การควบคุมให้ระบบอยู่ในสภาวะปลอดเชื้อตลอดช่วงการหมักทำได้ง่าย

- การควบคุมระบบทำได้ง่ายไม่ซับซ้อน

- ต้องเตรียมยีสต์เริ่มต้นและวัตถุดิบทุกครั้งของการหมักแต่ละชุด ทำให้เสียเวลาและค่าใช้จ่ายมาก

- ต้องเสียเวลาเพื่อให้ยีสต์เจริญเติบโตในช่วงแรกทุกครั้ง

ข) การหมักแบบกึ่งกะ (fed-batch fermentation)

คำว่า "Fed-batch culture" เป็นกระบวนการหมักที่มีการเติมสารอาหารอย่างต่อเนื่องหรือเป็นช่วงๆ หลังจากที่ใส่เชื้อเริ่มต้นแล้วโดยไม่มีการถ่ายออกซึ่งจะแตกต่างจากการเลี้ยงเซลล์แบบครั้งคราวที่ปริมาตรของอาหารในการหมักแบบกึ่งกะจะเพิ่มขึ้นตลอดเวลาไม่คงที่ ส่วนการเลี้ยงแบบต่อเนื่องนั้นปริมาตรของอาหารจะคงที่แม้ว่าจะเติมอาหารด้วยปริมาตรเท่าใด อาหารเก่าพร้อมกับเซลล์จุลินทรีย์ก็จะถูกดึงออกมาด้วยปริมาตรเท่ากันภายในเวลาเดียวกัน ปัจจุบันเทคนิคการเลี้ยงเซลล์แบบ Fed-batch ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ เช่น การผลิตเพนนิซิลิน การผลิตยีสต์ทำขนมปังเป็นต้น เทคนิคการหมักแบบกึ่งกะมีข้อได้เปรียบกว่าการหมักแบบครั้งคราวหลายประการ ดังนี้ (กลยุทธ โชติพัฒนา และนิสิต ตัณฑวิเชฐ, 2535)

- ช่วยลดผลการยับยั้งของอาหาร (substrate Inhibition) สารอาหารที่เป็นแหล่งธาตุคาร์บอน เช่น กรดน้ำส้ม แอลกอฮอล์ เมทธานอล และสารประกอบพวกอะโรมาติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์ได้แม้ในปริมาณความเข้มข้นน้อยๆ ดังนั้นการเติมอาหารเหล่านี้ในปริมาณที่เหมาะสมอย่างต่อเนื่องจะช่วยให้เซลล์สามารถเจริญได้โดยปราศจากการยับยั้งของสารอาหาร

- สามารถผลิตเซลล์ได้เป็นจำนวนมาก (high cell concentration) ในการเลี้ยงเซลล์แบบธรรมดา จะได้ปริมาณเซลล์ไม่มากเท่ากับการเลี้ยงแบบ fed-batch ซึ่งสามารถผลิตเซลล์ได้สูงมาก

- ช่วยลดความหนืดของอาหารซึ่งเกิดจากผลพลอยได้ที่โดยจุลินทรีย์ เช่น Dextran Pullulan และxanthan gum เราสามารถควบคุมความหนืดของน้ำหมักโดยการค่อยๆ เติมสารอาหารอย่างต่อเนื่อง ซึ่งหากความหนืดเพิ่มมากขึ้นจะมีผลต่อระบบการเติมอากาศ เช่น ใบพัดกวนจะต้องใช้กำลังไฟฟ้าเพิ่มขึ้น เกิดฟองมากขึ้นทำให้การละลายของออกซิเจนไม่ดีพอ

- สามารถป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆได้

โดยจากการศึกษาทดสอบยีสต์ *S. cerevisiae* จำนวน 9 สายพันธุ์ ในการหมักสารตั้งต้นที่ไฮโดรไลซีสด้วยกรดเจือจางที่มีสารยับยั้ง (Furfural, 5-Hydroxymethyl furfural, Acetate) ทั้งในระบบแบบกะ และแบบกึ่งกะ ปรากฏว่ายีสต์ *S. cerevisia* ATCC 96581 สามารถทนต่อตัวยับยั้งได้ดีที่สุด โดยจะสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส และแมนโนส ได้ทั้งหมดในระบบแบบกึ่งกะ

ค) การหมักแบบต่อเนื่อง (continuous fermentation)

เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิด จำนวนจุลินทรีย์จะถูกรักษาระดับสมดุลโดยการกำจัดน้ำหมักออกไปบางส่วนแล้วแทนที่ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ ในอัตราการไหลเดียวกันระบบการหมักแบบต่อเนื่องแบ่งได้เป็น 2 แบบคือ Chemostat และ Turbidostat ใน Chemostat อัตราการป้อนจะถูกตั้งไว้ที่ค่าหนึ่งและอัตราการเจริญของการเพาะเลี้ยงปรับตามอัตราการไหล ส่วนใน Turbidostat ค่าความขุ่นของเซลล์จะถูกตั้งไว้ที่ระดับคงที่โดยการปรับอัตราการไหล

ข้อดี	ข้อเสีย
-สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้	-การเจริญแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานานอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งอาจทำให้เกิดการแทนที่ของสายพันธุ์อื่นที่เจริญได้เร็วกว่า
-สามารถศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนพารามิเตอร์ทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญและการก่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่	-การเจริญในช่วงเวลานานอาจเกิดปัญหาการปนเปื้อน
-สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของมวลชีวภาพให้คงที่โดยการแปรค่าอัตราเจือจาง (Dilution rate)	

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล

จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล จะต้องมีคุณสมบัติที่ดีที่ส่งเสริมให้กระบวนการหมักเอทานอลเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็วสมบูรณ์ และให้ระดับปริมาณแอลกอฮอล์สูงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก โดยทั่วไป จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ควรมีลักษณะดังนี้ คือ

- มีความสามารถในการใช้น้ำตาลหลายชนิด ทั้งน้ำตาลชนิดเฮกโซสและเพนโตส
- สามารถผลิตเอทานอล โดยมีค่าผลผลิตต่อหน่วยวัตถุดิบและอัตราการผลิตที่สูง
- ผลิต by-products อื่นๆ เช่น กลีเซอรอล และ ซัคซิเนท น้อยมาก
- มีความทนทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่สูงในการหมักได้

- มีความทนทานต่อสารยับยั้งอื่นๆ ที่อาจเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการผลิต
- มีความทนทานต่อสภาวะที่ผันแปรในถังหมัก เช่น ค่าpH และความเข้มข้นของเกลือ
- มีความสามารถในการตกตะกอน
- มีพันธุกรรมที่เสถียร (Zaldivar *et al.*, 2001)

จุลินทรีย์ที่ถูกใช้ในกระบวนการหมักเอทานอล มีดังนี้

2.4.1 จุลินทรีย์ธรรมชาติ

ได้มีการศึกษายีสต์ในผลไม้ต่างๆ พบว่าในเนื้อผลไม้มียีสต์น้อย จะพบมากที่ผิวผลไม้ภายนอก โดยเฉพาะผลไม้ที่สุกจัดหรือแก่จัด มีรสหวาน ผลไม้ที่ผิวแตกหรือช้ำ เมื่อทำการคั้นเอาน้ำผลไม้ปล่อยทิ้งไว้ น้ำผลไม้จะเกิดการหมักเองโดยจุลินทรีย์ที่ติดมากับผลไม้ จุลินทรีย์ในอากาศและจุลินทรีย์ที่อยู่บนผิว ภาชนะหรืออุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการเตรียมน้ำผลไม้หรือภาชนะที่ใช้หมัก ในระหว่างการหมักจะพบประชากรทั้งยีสต์และแบคทีเรีย จุลินทรีย์ที่มักพบช่วงแรกๆ ของการหมักคือยีสต์ในสายพันธุ์ *Kloeckera apiculata* รวมทั้งที่อยู่ในรูปของสปอร์ *Hanseniaspora guilliermondii* และ *Hanseniaspora uvarum* และยังพบ *Candida pulcherrima* ยีสต์เหล่านี้มีลักษณะทนต่อแอลกอฮอล์ได้แค่ 5-7% ดังนั้นเมื่อกระบวนการหมักดำเนินต่อไปและมีแอลกอฮอล์สูงขึ้น ยีสต์เหล่านี้ก็จะตายไป โดยมียีสต์อื่นที่สามารถทนต่อแอลกอฮอล์ในปริมาณสูงเจริญขึ้นมาแทนซึ่ง ได้แก่ *S. rosei* และ *S. cerevisiae* (อรพิน ภูมิภมร, 2526)

2.4.2 เชื้ออีเอ็ม (EM หรือ effective microorganisms)

EM คือ จุลินทรีย์กลุ่มดีมีประสิทธิภาพเป็นการนำมาใช้เป็นกลุ่มๆซึ่งในอีเอ็มประกอบด้วย Yeast, Photosynthetic Bacteria, Lactic acid Bacteria และ Actinomyces รวมกัน 80 ชนิด มีการนำมาใช้ประโยชน์หลายรูปแบบ เช่น ใช้ในการหมักหากอยู่ในสภาวะปลอดอากาศก็จะได้ผลผลิตเป็นเอทานอล ใช้ในการประกอบอาหาร ใช้ในการกำจัดโรคที่มาจากจุลินทรีย์ได้ ซึ่งเชื่อว่าเป็นเทคนิคทางธรรมชาติ คือทำให้จุลินทรีย์กลุ่มดีมากกว่ากลุ่มก่อโรค

2.4.3 จุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกแล้ว

ได้แก่ เชื้อยีสต์หรือ เชื้อแบคทีเรียบางชนิด เชื้อยีสต์และแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักเอทานอลอยู่ในสภาพการเก็บ 2 แบบ คือ สภาพเชื้อสดเพาะเลี้ยงบนอาหารวุ้น (nutrient agar) และสภาพผงแห้ง (active dried yeast powder) ซึ่งแบบผงแห้งเก็บได้นานและมีประสิทธิภาพดีกว่าแบบเชื้อสด ในการผลิตเอทานอลเชิงอุตสาหกรรมจึงนิยมใช้เชื้อยีสต์และเชื้อแบคทีเรียชนิดผงแห้ง วิธีใช้ไม่ยากจะกล่าวไว้ที่ซอง กล่องหรือภาชนะบรรจุเชื้อจุลินทรีย์นั้น (ประดิษฐ์ ครุวัณณา, 2545)

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิดโดยเฉพาะยีสต์ *Saccharomyces* ที่ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเพราะสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีปริมาณมาก แต่ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์พบว่า แบคทีเรียสายพันธุ์ *Z. mobilis* มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ เช่น ระยะเวลาในการหมักสั้นกว่า 3-4 เท่าเมื่อใช้น้ำตาลเท่ากัน ให้ผลเอทานอลใกล้เคียงกับทฤษฎี แต่ข้อด้อยกว่ายีสต์ก็มีคือแบคทีเรียใช้น้ำตาลได้จำกัดคือใช้ได้ 3 ชนิดคือ กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส แต่เพื่อให้แบคทีเรียสามารถใช้ประโยชน์ได้เยอะขึ้นจึงมีการแก้ไขทางพันธุ์วิศวกรรม (genetic engineering) เพื่อปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้นคือ สามารถใช้น้ำตาลได้หลากหลาย ทนต่อสภาวะที่ไม่เหมาะสมได้ดีขึ้น

สำหรับงานวิจัยนี้ สนใจศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้น้ำตาลในของเสียชนิดนี้เป็นแหล่งคาร์บอน สำหรับจุลินทรีย์ที่สนใจนำมาทดสอบคือ ยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้กันโดยทั่วไปในอุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ และแบคทีเรีย *Z. mobilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอทานอลนอล และสามารถใช้น้ำตาลซูโครสในน้ำอัดลมหมดอายุได้

2.5 **ยีสต์** *S. cerevisiae*

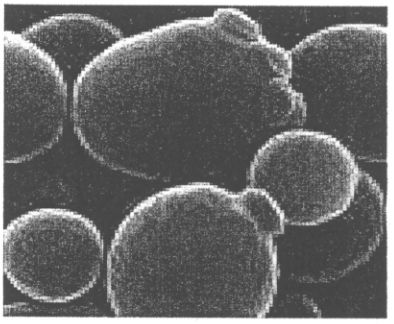
2.5.1 **การจำแนกยีสต์** *S. cerevisiae* **ในทางจุลชีววิทยา**

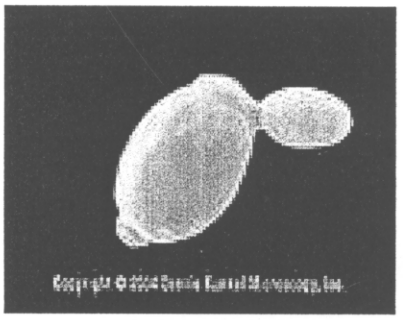
Phylum	*Ascomycetes*
Order	*Saccharomycetales*
Family	*Saccharomycetaceae*
Subfamily	*Saccharomycetoideae*
Genus	*Saccharomyces*
Species	*Saccharomyces cerevisiae*

2.5.2 **ลักษณะทางสัณฐานวิทยา** (morphological characteristics) **ของยีสต์** *S. cerevisiae*

S. cerevisiae เป็นจุลินทรีย์พวก Eukaryote ดำรงชีวิตในลักษณะเซลล์เดี่ยว (Unicellular organism) พบมากในแหล่งที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูง เช่น น้ำผลไม้ น้ำผึ้ง และผลไม้ที่มีรสหวาน มีลักษณะรูปร่างกลมไปถึงรูปไข่ (round or oval shape) (ภาพที่ 4) อยู่ในลักษณะเซลล์เดี่ยวๆขนาดทั่วไปของยีสต์มีความกว้างประมาณ 2.5 – 10.5 ไมครอน ยาวประมาณ 4.5 – 2.1 ไมครอน (สมใจ ศิริโภค, 2544) สืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศโดยการสร้างสปอร์ เกิดภายใต้สภาวะที่มีสารอาหารต่ำ ยีสต์ที่สามารถขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นมีการสร้าง Ascospores และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ

จากเซลล์แม่ภายใต้สภาวะแวดล้อมที่อำนวย เมื่อหน่อใหม่เจริญวัยจนเป็นยีสต์สมบูรณ์แล้วก็จะแยกตัวออกจากเซลล์แม่ไปเป็นยีสต์เซลล์ใหม่ต่อไป (ศิริพร ล้านแปง, 2539)





ภาพที่ 2-4 แสดงลักษณะรูปร่างของเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ที่มา : http://pathmicro.med.sc.edu/mycology/yeast-dk1.jpg

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

การใช้น้ำตาลกลูโคสผ่านกระบวนการสร้างพลังงานของยีสต์ ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (Anaerobic Condition) โดยทั่วไปเรียกว่าการหมัก (Fermentation) ซึ่งกระบวนการหมักแบบไม่มีอากาศ จะได้พลังงานในรูป ATP จากการใช้สับสเตรทผ่านกระบวนการ Emboden-Meyerhof-Parns Pathway (EMP Pathway) ดังภาพที่ 5 นอกจากจะได้แอลกอฮอล์และคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตหลักแล้วยังได้สารอื่นๆ เช่น กลีเซอรอล อะซีเตท เอสเตอร์ และสารประกอบคาร์บอนิลที่มีส่วนในการเพิ่มกลิ่นและรสชาติของแอลกอฮอล์ได้อีกด้วย (Oranut, 1999)

ขั้นตอนของ Emboden-Meyerhof-Parns Pathway เพื่อให้ได้เป็นเอทานอล แบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

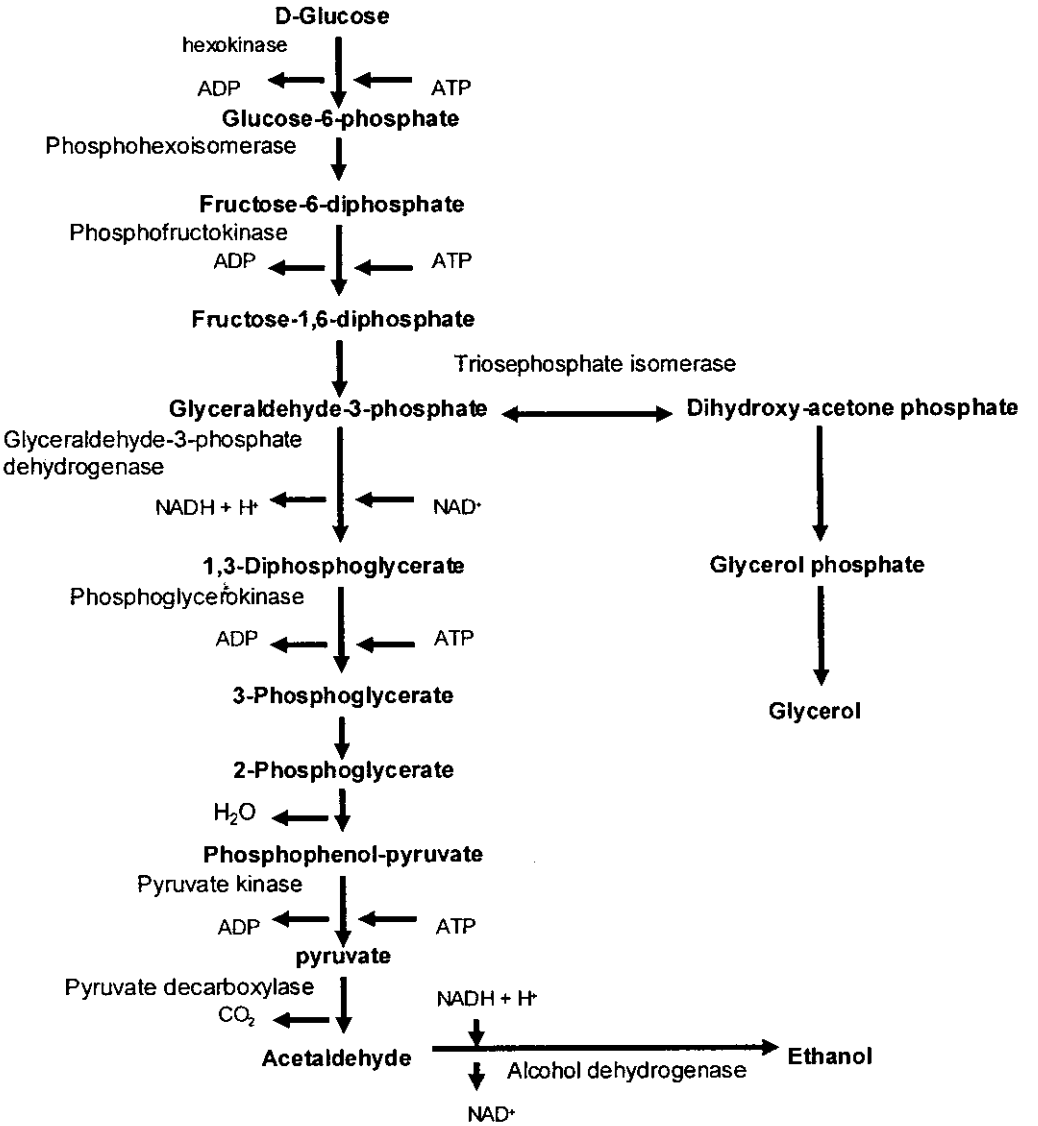
1. การสลายกลูโคสให้เป็น 2 ไทรโอสฟอสเฟท (triose phosphate)
2. การเปลี่ยนไทรโอสฟอสเฟทให้เป็นไพรูเวท (pyruvate)
3. การเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสาร 2 คาร์บอน เช่น เอทานอล หรือ 3 คาร์บอน

ขั้นตอนที่ 1 ประกอบด้วย 4 ปฏิกิริยา ปฏิกิริยาของ Hexokinase หรือglucokinase 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

ขั้นตอนที่ 2 มี 6 ปฏิกิริยาเริ่มด้วย DHAP เปลี่ยนเป็น G3P โดยเอนไซม์ triosephosphate isomerase ต่อจากนั้น G3P จะทำปฏิกิริยากับฟอสเฟทให้ได้ 1,3-diphosphoglycerate (DPG) ขณะเดียวกันก็ปล่อยอิเล็กตรอนให้แก่ NAD^+ ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งด้วย glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase ซึ่ง DPG จะทำปฏิกิริยากับ ADP ได้ 3-phosphoglycerate (3PG) และ ATP ในปฏิกิริยาของเอนไซม์ phosephoglycerate kinase ปฏิกิริยานี้สร้าง ATP โดยวิธี substrate level phosphorylation โดย 3PG จะเปลี่ยนแปลงเป็น phosphoenol-pyruvate (PEP) ซึ่งจะให้ ATP อีกหนึ่งโดยวิธี substrate level phosphorylation เช่นเดียวกัน รวมทั้งให้ไพรูเวทด้วย ปฏิกิริยานี้ถูกเร่งโดย pyruvate kinase

ขั้นตอนที่ 3 จะเป็นการเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสารประกอบที่มี 2 หรือ 3 คาร์บอน ทั้งนี้ขึ้นกับเอนไซม์ที่เหมาะสมต่อการเปลี่ยนแปลงนั้นๆ ในกรณีขาดออกซิเจนหรือไม่สามารถใช้ออกซิเจนไพรูเวทจะเปลี่ยนเป็นแลคเตท (lactate) โดยใช้ NADH เป็นตัวอิเล็คตรอนในปฏิกิริยาของ 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^+ กลายเป็นอะซิเตท (acetate) หรือถูกรีดิวซ์ด้วย NADH โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ได้เป็นเอทานอล (มนตรี จุฬาวัฒนทล, 2542 อ้างโดย อริสรา รอดมุ้ย, 2546)



ภาพที่ 2-5: การผลิตเอทานอลจากกลูโคสโดย Emboden-Meyerhof-Parns Pathway

ที่มา : (อริสรา รอดมุ้ย, 2546)

2.6 แบคทีเรีย *Z. mobilis*

2.6.1 การจำแนกแบคทีเรีย *Z. mobilis* ในทางจุลชีววิทยา

Phylum

Order

Family

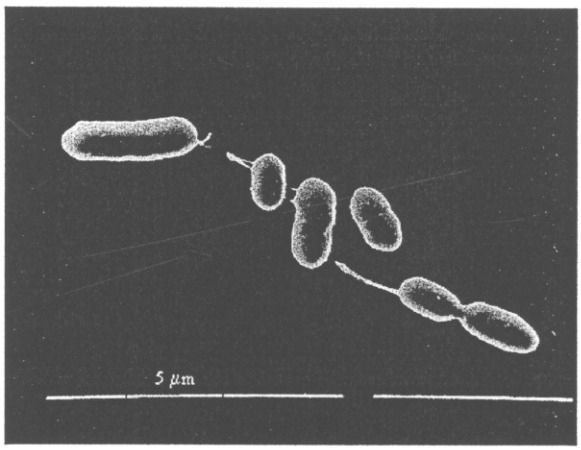
Subfamily

Genus

Species

2.6.2 **ลักษณะทางสัณฐานวิทยา** (morphological characteristics)**ของแบคทีเรีย** *Z. mobilis*

ถ้าจำแนกตาม Bergey's Manual of Determinative Bacteriology แบคทีเรีย *Zymomonas* เป็น Gram–negative facultative anaerobic rods เซลล์จะมีลักษณะเป็นรูปแท่งที่มีปลายโค้ง ขนาดกว้าง 1–1.4ไมครอน และยาว 2–6 ไมครอน (ภาพที่ 5) มักอยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นคู่ ย้อมติดสีกรัมลบ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยอาศัยแฟลกเจลลาที่ขั้วเซลล์ Catalase ให้ผลบวก และ Oxidase ให้ผลลบ เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส pH 3.5-4.0 ไม่เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร nutrient agar หรือ nutrient broth ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต แต่สามารถเจริญเติบโตได้ในที่มีออกซิเจน สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) และฟรุคโตส (fructose) ได้เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

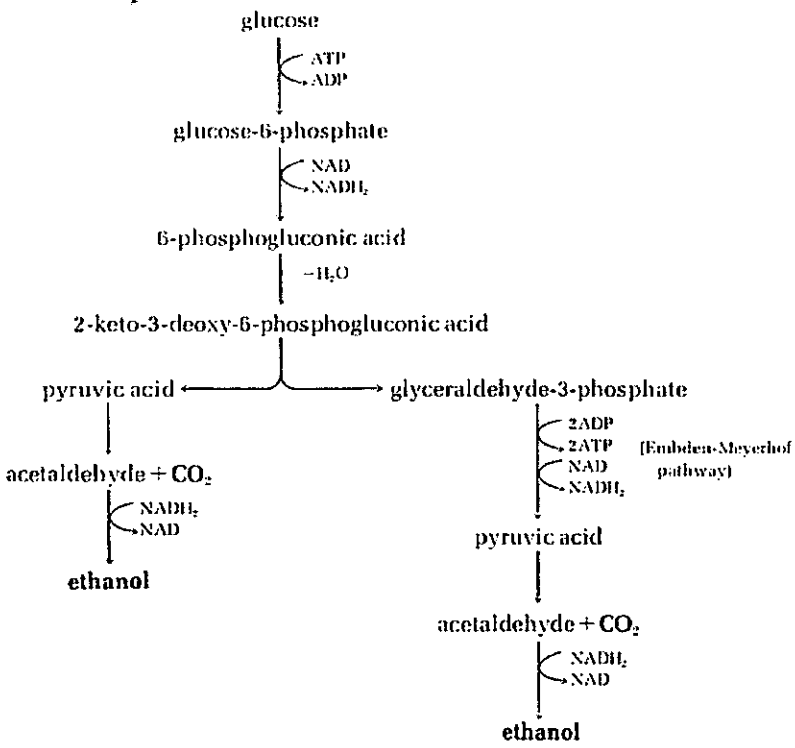


ภาพที่ 2-6 แสดงลักษณะรูปร่างของแบคทีเรีย *Zymomonas sp.*
ที่มา : http// www.scielo.cl

แบคทีเรีย *Zymomonas* สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 สปีชีส์ คือ *Z. mobilis* และ *Z. anaerobia* โดยอาศัยความสามารถในการหมักน้ำตาล แบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส (sucrose) ได้โดย Entner-Doudoroff parthway ดังภาพที่ 6 ได้ผลผลิตเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ (Lindner, 1924 อ้างใน ธนาสิน, 2526) ดังสมการต่อไปนี้

1 Glucose ⟶ (1.58-1.93) ethanol + (1.7-1.9) CO_2 + (0.02-0.2) lactate + (0.011) cell material

ส่วนแบคทีเรีย *Z. anaerobia* จะหมักน้ำตาลได้เพียง 2 ชนิดเท่านั้น คือ กลูโคส และ ฟรุคโตส แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ (Buchanan *et al.*, 1974) วิถีการสลายกลูโคสโดย Entner-Doudoroff pathway เกิดได้ทั้งในสภาพมีอากาศและไร้อากาศของพวกโปรคารีโอท โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ แต่ไม่พบในพวกยูคารีโอท วิถีนี้พบในหลายๆ species ของPseudomonas ตลอดจนพวก Gram-negative rods อย่างไรก็ตาม *Z. mobilis* สกุลเดียวเท่านั้นที่ใช้วิถีนี้ในสภาพไร้อากาศ เพราะเชื้อนี้ขาด oxidative transport system ดังนั้นจึงเป็นพวก obligately fermentation เป็นวิถีที่ขาดประสิทธิภาพเพราะมีเพียง 1 โมลของ ATP เกิดขึ้นต่อการหมัก 1 โมลของน้ำตาล C6 (hexose) แต่เป็นที่สนใจสำหรับการประยุกต์ใช้ทางอุตสาหกรรมเพราะให้ 2 โมล เอทานอลต่อโมลสับสเตรท จึงผลิตเอทานอลได้รวดเร็ว ซึ่งเป็นผลจากการที่เชื้อมี pyruvate decarboxylase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ไม่ค่อยพบในแบคทีเรียอื่นๆ (ดวงพร คันธโชติ, 2546)



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

ภาพที่ 2-7 Entner-Doudoroff pathway

ที่มา : www.textbookofbacteriology.net

2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตเอทานอลของยีสต์และแบคทีเรีย

2.7.1 อุณหภูมิ

ในขั้นตอนระหว่างการหมักจะมีพลังงานความร้อน ที่ปลดปล่อยออกจากปฏิกิริยาสูงถึง 149.5 kcal/g ซูโครส ซึ่งเป็นผลจากการที่จุลินทรีย์ใช้น้ำตาลซูโครสในการหมัก เอทานอล ความร้อนนี้มีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งด้านสรีระวิทยาของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำหมักและอัตราการหมักเอทานอล แม้จุลินทรีย์จะสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิค่อนข้างสูงแต่ก็ทำให้เกิดการฉีกขาดของ plasma membrane ของเซลล์และการอยู่รอดของเซลล์ลดลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้ยังมีการระเหยของเอทานอลและเกิดฟองมากในน้ำหมัก การเพิ่มอุณหภูมิของการหมักถึง 32 องศาเซลเซียสสามารถเพิ่มอัตราการหมักเอทานอลให้สูงขึ้นได้ อย่างไรก็ตามการใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปทำให้การเจริญของจุลินทรีย์และอัตราการผลิตเอทานอลต่ำกว่าที่อุณหภูมิการหมักปกติ (Amerine *et al.*, 1980)

2.7.2 ออกซิเจน

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

2.7.3 ความเข้มข้นเอทานอล

ในระหว่างกระบวนการหมัก ความเข้มข้นเอทานอลจะสูงขึ้นเรื่อย ๆ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ โดยทั่วไปยีสต์ถูกยับยั้งการเจริญเมื่อความเข้มข้นเอทานอลประมาณ 14 %โดยปริมาตร แต่มียีสต์บางสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อความเข้มข้นเอทานอลประมาณ 18% โดยปริมาตร เช่น *S. cerevisiae* (โชคชัย วนภูและคณะ, 2546) สำหรับแบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถเจริญได้ในที่มีแอลกอฮอล์ เข้มข้นได้สูงถึง 10-16% *Z. mobilis* สามารถต้านทานต่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นในถังหมักได้ระดับหนึ่งเช่นเดียวกับยีสต์ และมีระดับความต้านทานแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลท จากการทดลองเติมเอทานอลเข้าไปในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่มี *Z. mobilis* CP4 ระหว่างการหมักเอทานอล พบว่าครึ่งหนึ่งของปฏิกิริยาการเผาผลาญจะถูกยับยั้งเมื่อเอทานอลมีความเข้มข้น 2.2 M (10% w/v) และปฏิกิริยาจะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์เมื่อมีความเข้มข้นของเอทานอลเท่ากับ 4.4 M (20% w/v) (Osman & Ingram, 1985) ในขณะที่เซลของ *Z. mobilis* CP3 ในถังหมัก จะเริ่มตายลงที่ความเข้มข้นของเอทานอล 5% w/v แต่ทั้งนี้จากการทดลองแบบ batch โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* การเก็บเกี่ยวเอทานอลออกจากถังหมักมีผลต่อประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในการหมักเอทานอลในกะต่อมา เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมฉับพลันในถังหมัก (Dombek & Ingram, 1987) นอกจากนี้ความทนทานของ จุลินทรีย์ใน

ถังหมักต่อความเข้มข้นของเอทานอลยังมีความสัมพันธ์กับความทนทานต่อความเค็มหรือปริมาณเกลือในวัตถุดิบอีกด้วย (Sukesh *et al.*, 1996)

2.7.4 ความเข้มข้นของน้ำตาลในสารละลาย

น้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และการผลิตเอทานอล การใช้สับสเตรทที่มีความเข้มข้นสูงๆ ในการหมักเอทานอลมีผลช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่การใช้สับสเตรทความเข้มข้นสูงๆมีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอลเช่นกัน ซึ่งเกิดจากแรงดันออสโมซิสทำให้เซลล์เกิดพลาสโมไลซิสเมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 14% โดยน้ำหนัก และมีผลยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส ส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลลดลง (สาวิตรี, 2540; Lachance, 1990; Panchal and Tavares, 1990)

แม้จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดจะมีคุณสมบัติในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์อื่นตามที่เราต้องการ แต่ความเข้มข้นของน้ำตาลก็มีผลต่อประสิทธิภาพของกระบวนการดังกล่าว ใน *Z. mobilis* โมเลกุลของกลูโคสและฟรุกโตสสามารถแพร่ได้โดยง่าย (facilitate diffusion) ความเข้มข้นของกลูโคสจึงมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของเอนไซม์ใน E-D pathway ไม่มาก เพราะการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยแบคทีเรียชนิดนี้เกิดขึ้นเร็วมาก ความสมดุลของกลูโคสภายนอกและภายในจะถูกทำให้สมดุลอย่างรวดเร็ว จึงไม่เกิดความเสียหายต่อเซล *Z. mobilis* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส 100 g/L จากช่วงการทดสอบ 75-150 g/L (King & Hossain, 2004)และที่ความเข้มข้นฟรุกโตสเท่ากับ 100 G/L เช่นกัน (Toran-Diaz et al., 1983) แต่หากเป็นโมเลกุลเกลือ *Z. mobilis* มีความต้านทานต่อความเข้มข้นเกลือต่ำ จึงเป็นปัญหาในกรณีที่นำกากน้ำตาล (molasses) มาเป็นวัตถุดิบ เพราะในกากน้ำตาลมีเกลืออยู่สูง (Gunasekaran & Chandra Raj, 1990) ดังนั้นหากเป็นวัตถุดิบอื่นนอกเหนือจากสารละลายน้ำตาลแล้ว ต้องพิจารณาองค์ประกอบอื่นๆด้วยที่มีผลทำให้แรงดันออสโมติกในสารละลายเพิ่มขึ้น ปัญหาที่เกิดในขึ้นในกรณีของกากน้ำตาล พบเช่นเดียวกันในกรณีที่ใช้ไม้สนมาเป็นวัตถุดิบ พบว่า *Z. mobilis* สามารถทนต่อความเข้มข้นกลูโคสในไม้สนได้สูงสุด 60 g/L (Kademi & Baratti, 2004)

2.7.5 pH เริ่มต้น

การปรับ pH ของอาหารมีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม การเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างขึ้นอยู่กับสปีชีส์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ (Walker, 1998) pH ของอาหารมีผลต่ออัตราการหมัก อีกทั้งมีบทบาทในการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นอีกด้วย ปกติเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ยอมให้ประจุไฮโดรเจนหรือประจุไฮ ดรอกซิลผ่านเข้าออกได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น รวมทั้งภายในไซโตรพลาสซึมของเซลล์จะมีระบบบัฟเฟอร์ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของ pH (วราวุฒิ, 2538) การเลือกค่า pH เริ่มต้นของอาหารขึ้นอยู่กับ buffer capacity ของอาหารที่ใช้ในการหมัก

ในอาหารที่มี buffer capacity ต่ำ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมมีค่าประมาณ 5.5 ส่วนอาหารที่มี buffer capacity สูง pH เริ่มต้นที่ควรใช้จะอยู่ในช่วง 4.5-4.7 (สาวิตรี, 2540)

ทั้ง *S. cerevisiae* และ *Z. mobilis* สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้ดีในช่วง pH เริ่มต้นที่ 5-7.5 สำหรับ *S. cerevisiae* ให้ค่าเอทานอลสูงสุดที่ pH ประมาณ 5.5 (Kiran Sree *et al.*, 2000) ส่วน *Z. mobilis* จะให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของวัตถุดิบ เช่น หากเป็นกลูโคส การให้ผลผลิตสูงสุดอยู่ในช่วงค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 6-7.5 (King and Hossain, 2004) ส่วนฟรุกโตสให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 (Toran Diaz *et al.*, 1983)

2.7.6 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล มีรายงานหลายฉบับที่รายงานผลการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่างกัน พบว่าส่วนใหญ่มักใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ในช่วง 5-10% (v/v) ในการผลิตเอทานอล

2.7.7 คาร์บอนไดออกไซด์และความดัน

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจากปฏิกิริยาในการใช้น้ำตาลของจุลินทรีย์ มีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ด้วยเช่นกัน ถ้าไม่มีการระบายคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากระบบ ความดันในถังหมักจะสูงขึ้น ซึ่งถ้าสูงขึ้นจนถึง 7.5 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลง จนกระทั่งความดันสูงถึง 8.0 บรรยากาศ อัตราเร็วของการหมักจะต่ำมากหรือเกือบจะไม่เกิดเลย

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ

3.1.1 น้ำอัดลมหมดอายุ

น้ำอัดลมหมดอายุที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นน้ำอัดลมที่ไม่ผ่านเกณฑ์ควบคุมคุณภาพจากกระบวนการผลิตและเก็บคืนจากตัวแทนจำหน่ายของบริษัทหาดทิพย์ จำกัด (มหาชน)โดยเป็นน้ำอัดลมผสมไม่แยกชนิดในสัดส่วนที่เท่ากัน ได้แก่ โค้ก สไปร์ท ส้ม แดงและ เขียว ก่อนนำมาใช้ในการทดลองได้ทำการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง sonicator เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ได้แก่ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (S_1) *S.cerevisiae* (S_2) และ แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* Z_4 โดยจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับ *S.cerevisiae* (S_1) และ *S.cerevisiae* (S_2) เลี้ยงบนอาหาร YM (yeast malt extract agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Subculture) เดือนละ 1 ครั้ง ส่วน แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis* Z_4 นำมาเลี้ยงบน Zymomonas sucrose agar (Sucrose 20 กรัมต่อลิตร, Yeast extract 10 กรัมต่อลิตร และ Bacto peptone 10 กรัมต่อลิตร) ที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์ *S.cerevisiae*

- 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

- สูตรอาหารสำหรับเตรียมยีสต์ *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

- สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอลโดยยีสต์ *S.cerevisiae* 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 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.1.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับยีสต์ *Z.mobilis* Z_4

- สูตรอาหารสำหรับเก็บรักษาเชื้อ *Z. mobilis* Z_4 (Zymomonas sucrose agar) ประกอบด้วย

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

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

- สูตรอาหารสำหรับเตรียมเชื้อ *Z. mobilis* Z_4 เริ่มต้น (Zymomons sucrose broth) ประกอบด้วย

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

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

- สูตรอาหารที่ใช้สำหรับการผลิตเอทานอล ประกอบด้วย

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

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

3.2 สารเคมีและอุปกรณ์

3.2.1 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการเก็บตัวอย่างน้ำอัดลม

1) ถังเก็บตัวอย่างน้ำ
2) ปากกาเขียนฉลาก
3) ฉลากสำหรับปิดขวด

3.2.2 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1) ปิเปต (pipet)
2) หลอดทดลอง (tube)

3) บีกเกอร์ (beaker)

4) กระบอกตวง (cylinder)

5) เข็มเขี่ยเชื้อ (loop)

6) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate)

7) กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

8) เครื่องชั่ง (balance)

9) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave)

10) เครื่องเขย่าแบบควบคุมอุณหภูมิ (Incubator shaker)

3.2.3 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับตรวจวิเคราะห์ pH

1) เครื่องวัด pH (pH meter)

2) น้ำกลั่น (distilled water)

3) บีกเกอร์ (beaker)

4) 0.5 N NaOH

5) H_2SO_4

3.2.4 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับการตรวจวิเคราะห์น้ำตาล

1) เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer)

2) น้ำกลั่น (distilled water)

3) สารละลายซูโครสมาตรฐาน

4) conc sulfuric acid

5) 5% phenol

3.2.5 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับตรวจวิเคราะห์เอทานอล

1) เครื่องวัดปริมาณแอลกอฮอล์ (ebulliometer)

2) เครื่อง GC (gas chromatography)

3.2.6 สารเคมีและอุปกรณ์สำหรับตรวจวิเคราะห์มวลชีวภาพและตรวจนับจุลินทรีย์

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

2) เครื่องกรอง

3) ตู้อบแห้ง (hot-air oven)

4) ตู้ดูดความชื้น (dasicator)

5) เครื่องชั่ง (balance)

6) Hemacytometer

3.3 วิธีการดำเนินงานวิจัย

3.3.1 ศึกษาลักษณะสมบัติน้ำอัดลมหมดอายุ

นำน้ำอัดลมผสมหมดอายุในสัดส่วนที่เท่ากัน ไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยเครื่อง sonicator ก่อน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ115°C ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น ค่า pH ค่าCOD และ BOD โดยทำการตรวจวัดทั้งก่อนและหลังการฆ่าเชื้อ

3.3.2 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

ถ่ายเชื้อยีสต์ *S.cerevisiae* ที่เจริญบนอาหารแข็ง (YM agar) ลงในอาหารเหลว (YM broth) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที และนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น สำหรับแบคทีเรีย *Z.mobilis* ทำการถ่ายเชื้อจากที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง (Zymomonas sucrose agar) ลงในอาหารเหลว (Zymomonas sucrose media) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

3.3.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S.cerevisiae* (S_1)

3.3.3.1 การศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (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 10 นาที เติมเชื้อ

S. cerevisiae (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.3.3.2 การศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) 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 ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นเติมเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.3.3.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสม

ทำการศึกษา 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 10 นาที เติมเชื้อ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.3.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1)

3.3.4.1. การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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

3.3.4.2. การศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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

3.3.4.3 การศึกษาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม

ทำการศึกษาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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

3.3.5 การศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2)

ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) โดยการใช้สูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ (3.2) และสภาวะที่เหมาะสมจากข้อ (3.3) ของการศึกษาผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 12 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 3 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

3.3.6 การศึกษาวิธีกำจัดเชื้อปนเปื้อนในน้ำอัดลมหมดอายุ

ทำการศึกษาวิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในน้ำอัดลมหมดอายุด้วยวิธี Autoclave เปรียบเทียบกับการเติมสาร Potassium metabisulfite (KMS) โดยการเตรียมสูตรอาหารที่เหมาะสมจากข้อ (3.3) ทำการฆ่า

เชื้อด้วยวิธี Autoclave โดยการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ เป็นระยะเวลา 10 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

3.3.7 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4

3.3.7.1 การศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยแหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหาร คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 3 และ 4.5 g / L ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ใน ฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณ เอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และpH หลังหมัก

3.3.7.2 การศึกษา pH ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วย 2N NaOH โดยใช้อาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ได้จากข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ ใน ฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และpH หลังหมัก

3.3.8 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4

3.3.8.1 การศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรด้วยน้ำอัดลมหมดอายุเป็น 100 mL ในฟลาสก์ 250 mL ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.2 ด้วย 2N NaOH ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ก่อนเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) จำนวน 5% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า 0, 50, 100 และ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

3.3.8.2 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสม

ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยทำการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้บ่มที่ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับที่ได้จากการข้อ 2.3.2.2 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5% (v/v) บ่มด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

3.3.8.3 ศึกษาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม

ทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยทำการหมักเป็นระยะเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้สูตรอาหารที่มีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.2 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 ด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

3.3.9 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 เมื่อมีการปรับเปลี่ยนปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุ

3.3.9.1 การศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ100 กรัมต่อลิตร ด้วยการเจือจางน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.2 ใน ฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 ด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 เป็นระยะเวลาที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.3 นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

3.3.9.2 การศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยแหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหาร คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1 และ1.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.4.1 ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.2 ในฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5%(v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 ด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 เป็นระยะเวลาที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.3 นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

3.3.9.3 การศึกษา pH ที่เหมาะสม

ทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วย 2N NaOH โดยใช้อาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มี

ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.4.1 ในฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5%(v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 ด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 เป็นระยะเวลาที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.3 นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

3.3.9.4 การศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารที่เหมาะสม

ทำการศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และการใช้ Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm ในการฆ่าเชื้อในอาหาร โดยใช้อาหารที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.1 ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.4.1 ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ ปริมาณที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.2.2 ในฟลาสก์ 250 mL จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5%(v/v) บ่มที่อุณหภูมิที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.2 ด้วยอัตราการเขย่าที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.1 เป็นระยะเวลาที่ได้จากการทดลองข้อ 2.3.3.3 แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

3.4 การตรวจวิเคราะห์และรายงานผล

3.4.1 pH

ตรวจวัดโดยใช้เครื่อง pH meter รายงานผลจากค่าที่อ่านได้จากจอแสดงผลของเครื่องตรวจวัด

3.4.2 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 จากนั้นเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง กับปริมาณน้ำตาล เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบหาปริมาณน้ำตาลในสารละลายตัวอย่าง ซึ่งสารละลายซูโครสมาตรฐานที่ใช้ คือ 10, 35, 50 และ 70 ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร

3.4.3 ปริมาณเอทานอล

ทำการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างด้วยเครื่อง Ebulliometer 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 Inlet 200°C; Detector 200 องศาเซลเซียส; Oven temperature: 50°C hold 6 minutes

3.4.4 มวลชีวภาพ

นับจำนวนเซลล์ยีสต์ที่มีชีวิตโดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า ด้วย Hemacytometer และทำการกรองตัวอย่างผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 µm (Cellulose nitrate membrame) โดยนำกระดาษกรองไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักกระดาษก่อนและหลังกรอง รายงานผลเป็น กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร

3.5 การควบคุมคุณภาพการทดสอบ

ทุกพารามิเตอร์รายงานผลด้วยค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานจากการตรวจวัด 3 ซ้ำค่าเฉลี่ยผลที่ได้จะต้องมีค่า RPD ไม่เกิน 10 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการวิเคราะห์ผลทางสถิติใช้ One-way ANOVA ในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพระหว่างชุดการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาลักษณะสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุ

ผลการศึกษาสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุหลังผ่านการไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลด้วยเครื่อง GC (Gas Chromatography) วิเคราะห์หา pH ด้วยเครื่อง pH Meter วิเคราะห์หาค่า BOD และ COD พบว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีสมบัติ ดังแสดงในตารางที่ 4-1

ตารางที่ 4-1 สมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุ

สมบัติที่ตรวจวัด	ก่อน Autoclave	หลัง Autoclave
ปริมาณน้ำตาลซูโครส (g/L)	145 ± 0.064	108 ± 0.052
pH	3.02 ± 0.035	4.63 ± 0.028
BOD (mg/L)	83,541 ± 88	-
COD (mg/L)	152,470 ± 122	-

จากสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุข้างต้นจะพบว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีปริมาณน้ำตาลเป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงและมีสภาพเป็นกรด ซึ่งน้ำตาลในน้ำอัดลมหมดอายุนั้นมีปริมาณมากพอที่จะนำมาศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำน้ำอัดลมหมดอายุมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ โดยในการศึกษานั้นจะต้องคำนึงถึงสูตรอาหาร และสภาวะที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆด้วยเป็นสำคัญ เนื่องจากน้ำอัดลมหมดอายุมีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักและไม่มีสารอาหารอื่น ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* และแบคทีเรีย *Z.mobilis* ผลการศึกษาเป็นดังต่อไปนี้

4.2 ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมของต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน

4.2.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน

การกำหนดสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากในกระบวนการหมักโดยองค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้มีความจำเป็นต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ยีสต์ และการสร้างเมทาบอไลท์ นอกจากนี้ยังเกี่ยวข้องกับการรักษาสภาพของเซลล์อีกด้วย (อิศรา รอดมุ้ย, 2546)

4.2.1.1 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสม

ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลที่สูงจะช่วยลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ดี แต่ความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงเกินขีดจำกัดระดับหนึ่ง จะทำให้เกิดการรบกวนต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ได้ โดยจะทำให้การหมักจะเป็นไปอย่างเชื่องช้าและไม่สมบูรณ์ โดยปราโมทย์ และคณะ (2525) ได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 12, 14, 20 และ 26 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเพิ่มมากขึ้นจะได้เอทานอลเพิ่มขึ้น แต่ถ้าน้ำตาลสูงเกินความสามารถของยีสต์ในการเจริญเติบโตและหมักเอทานอล เช่นสูงถึง 26 เปอร์เซ็นต์ กลับมีผลยับยั้งการหมักเอทานอลของยีสต์ ทั้งนี้ได้เสนอแนะเกี่ยวกับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในการหมักว่า การเพิ่มน้ำตาลให้สูงขึ้นในปริมาณที่เหมาะสมที่ยีสต์หมักเอทานอลได้สูงสุดโดยไม่มีน้ำตาลเหลือตกค้างจะดีที่สุดสำหรับการหมัก แต่ถ้าน้ำตาลเริ่มต้นสูงจนเกินไปก็จะมีผลยับยั้งการหมัก นอกจากจะทำให้ได้เอทานอลลดลงแล้ว ยังมีน้ำตาลเหลือทิ้งโดยเปล่าประโยชน์

ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้ได้ทำการศึกษาหาความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆหลัง Autoclave คือ 25, 30, 40, และ 50 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ได้ทดลองศึกษาใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นเท่ากับ 108 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลในตัวอย่างน้ำอัดลมหมดอายุที่ยังไม่ผ่านการเจือจาง ผลจากการทดลองพบว่าเชื้อยีสต์ไม่สามารถผลิตให้ผลเอทานอลได้ เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตและการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ พบว่าเซลล์หยุดการเจริญเติบโตและแบ่งตัวเพิ่มจำนวนได้น้อยมาก สาเหตุอาจเนื่องมาจากเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ที่นำมาใช้อาจมีความสามารถในการทนต่อปริมาณของน้ำตาลเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นสูงได้ไม่ดีมากนัก จึงได้ออกแบบการทดลองให้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นดังกล่าวมาแล้วข้างต้น โดยการเจือจางน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 ด้วย 0.5 M NaOH ในฟลาส์ขนาด

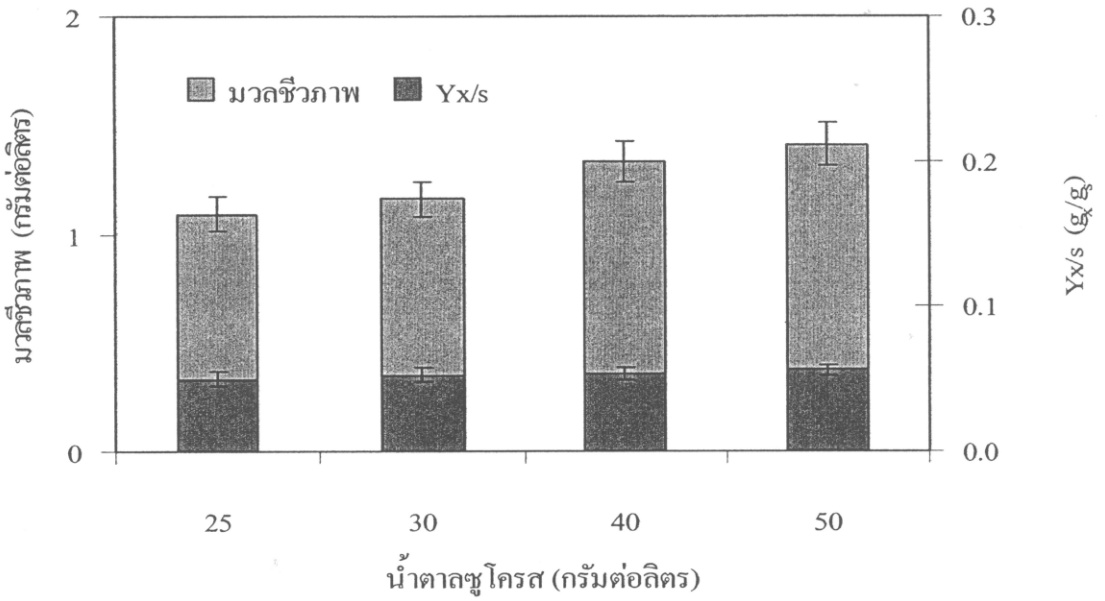
250 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ เป็นระยะเวลา 15 นาที จากนั้นเติมยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา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

ผลจากการทดลองพบว่า ที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 4-2 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.92 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.72 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 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 พบว่าเอทานอลที่ได้มีค่าลดลงตามลำดับและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 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 อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เหลือพบว่ามีค่าเท่ากับ 7.02, 15.03 และ 24.71 กรัมต่อลิตร สำหรับชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 30, 40, และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่าให้ค่าใกล้เคียงกันดังแสดงในภาพที่ 4-1 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) มีความสามารถในการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอาทานอลที่ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่ำได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสูงและที่ปริมาณน้ำตาลเข้มข้นสูงนี้ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) มีความสามารถในการนำน้ำตาลมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนได้ดี สำหรับ pH หลังการหมักของทุกความเข้มข้นพบว่ามีค่าลดลงจากเดิม ทั้งนี้เนื่องจากในระหว่างการหมักนอกจากเชื้อใช้น้ำตาลในการเจริญเติบโตและสร้างผลผลิตพลอยได้เป็นเอทานอลแล้ว พบว่ายังมีการสร้างกรดเกิดขึ้นด้วย (Underkofler and Hickley, 1954)

ตารางที่ 4-2 ผลการศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุ ที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 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

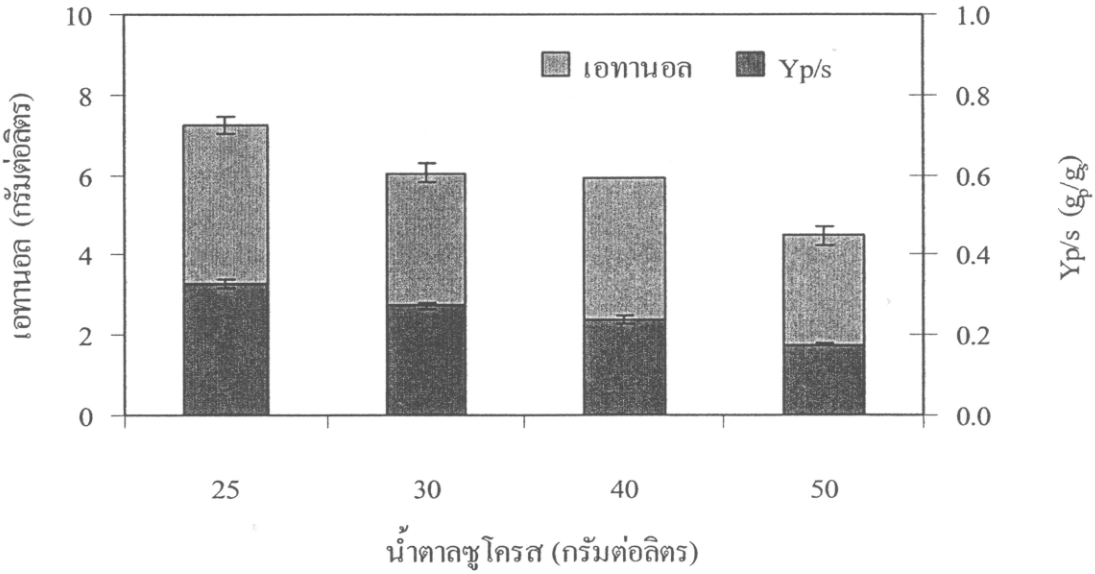
น้ำตาลเริ่มต้น (g/L)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(w/v)	%(v/v)			
25	2.97	3.94	7.24[a]	0.72	0.92	1.093[a]	0.329[a]	0.050
30	7.02	3.98	6.06[b]	0.61	0.77	1.162[a]	0.273[b]	0.053
40	15.03	4.08	5.93[b,c]	0.59	0.75	1.334[b]	0.238[c]	0.054
50	24.71	4.13	4.48[d]	0.45	0.57	1.410[c]	0.177[d]	0.056

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



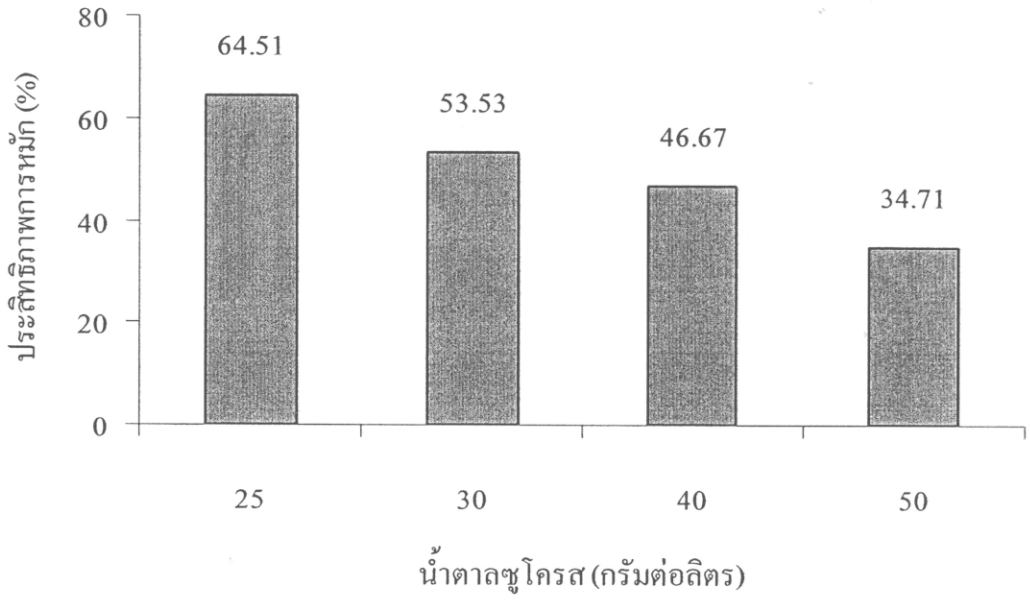
ภาพที่ 4-1 ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าในภาวะที่มีการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตรดังแสดงในภาพที่ 4-2 มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.329 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล รองลงมาเป็นปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 30 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าให้ค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.273 และ 0.238 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ ในขณะที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้น 30 และ 40 กรัมต่อลิตร มีค่าน้อยกว่ามาก คือ 0.177 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำตาลมากขึ้นส่งผลให้เอทานอลที่ได้มีค่าลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาวิจัยถึงผลของความเข้มข้นน้ำตาลในกระบวนการหมักเอทานอลแบบขั้นตอนเดียวของเชื้อ *S. cerevisiae* พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในการหมักจาก 150 เป็น 280 กรัมต่อลิตร ทำให้ค่า Yp/s ลดลงจาก 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เหลือเพียง 0.03 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล (Takeshige and Ouchi, 1995)



ภาพที่ 4-2 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 4-3 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด คือ 64.51 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และใช้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-3 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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

4.2.1.2 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 $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรมการหมัก

เอทานอล 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 ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นหลังการ Autoclave เท่ากับ 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

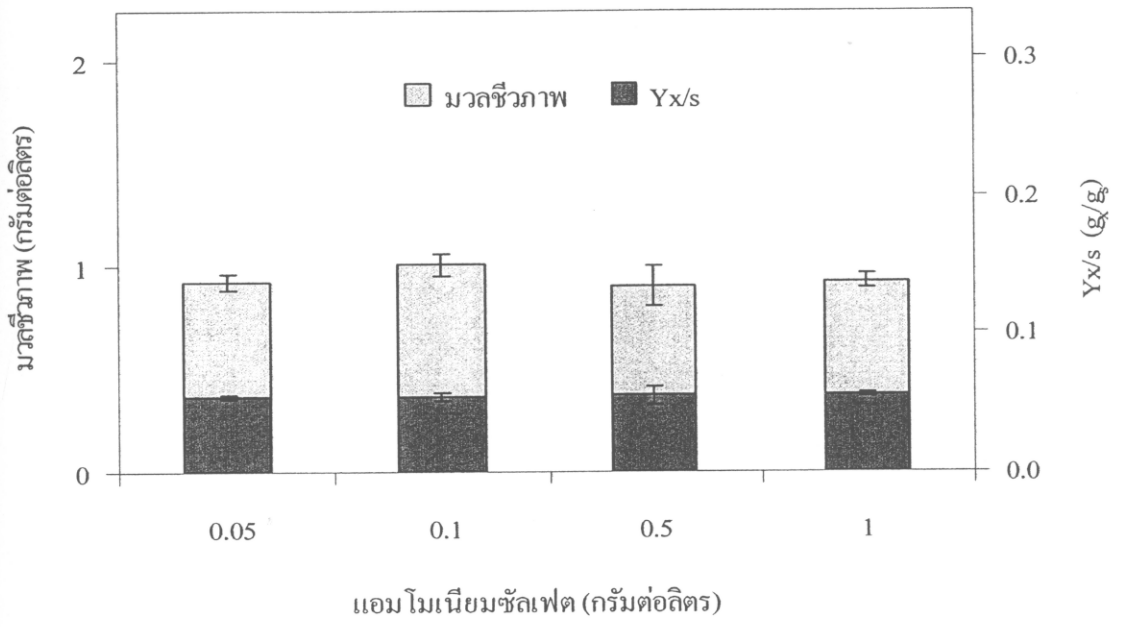
ผลจากการทดลองพบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร เชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 4-3 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.82 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.65 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 6.45 กรัมต่อลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นอื่นๆ พบว่าค่าเอทานอลที่ได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 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 และ1 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 หลังการหมักลดลงมาอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกันโดยมีค่าเท่ากับ 3.65, 3.62 และ 3.66 ตามลำดับ มีน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.937, 0.920 และ 0.940 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.048, 0.049 และ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาลดังแสดงในภาพที่ 4-4

ตารางที่ 4-3 ผลการศึกษาปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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 บ่มที่อุณหภูมิ30 องศาเซลเซียสด้วยอัตราการเขย่า100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

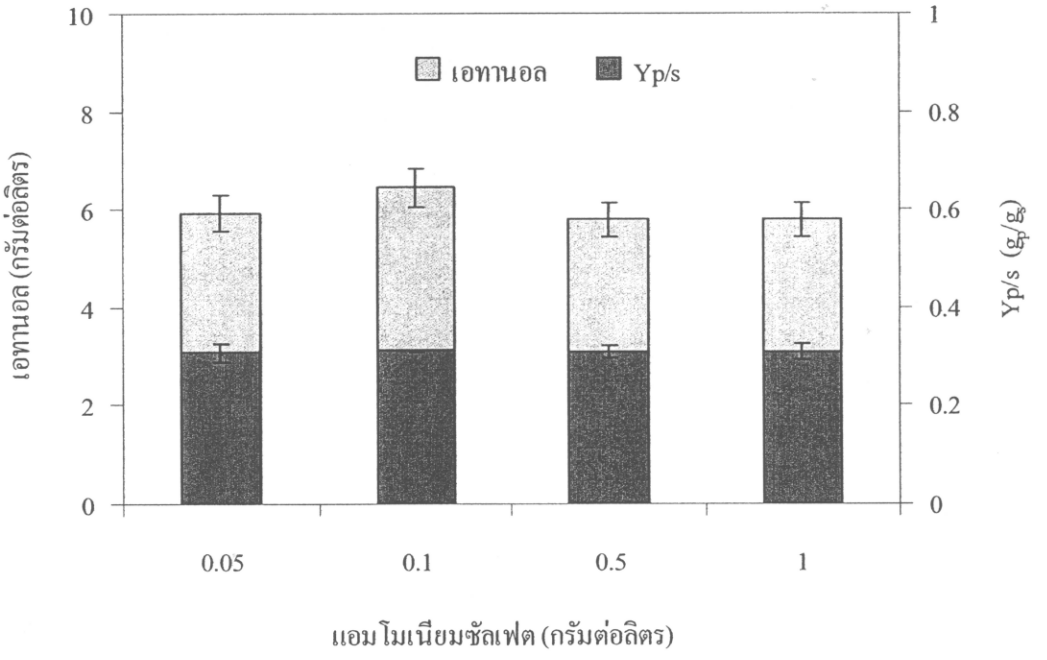
ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(w/v)	%(v/v)			
0.05	5.67	3.65	5.93[a]	0.59	0.75	0.937[a]	0.307[a]	0.048
0.10	4.24	3.62	6.45[b]	0.65	0.82	1.007[a]	0.311[a]	0.049
0.5	6.26	3.66	5.79[a]	0.58	0.73	0.920[a]	0.309[a]	0.049
1.0	6.22	3.67	5.79[a]	0.58	0.73	0.940[a]	0.309[a]	0.050

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



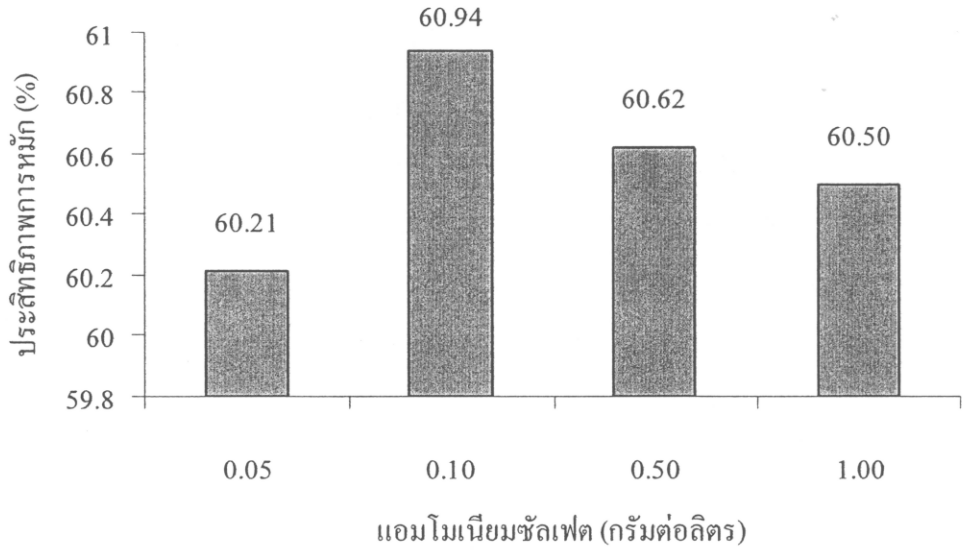
ภาพที่ 4-4 ผลของปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณมวลชีวภาพและผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5 และ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า ผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) พบว่าชุดการทดลองที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ แตกต่างกันมีค่า Yp/s ใกล้เคียงกัน ดังแสดงในภาพที่ 4-5 โดยที่ความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0.10 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s สูงกว่าที่ความเข้มข้นอื่นๆ เล็กน้อย 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 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4-5 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

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองในงานวิจัยนี้กับค่าทางทฤษฎีดังแสดงในภาพที่ 4-6 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุด คือ 60.98 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือก $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และใช้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-6 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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

4.2.1.3 pH ที่เหมาะสม

pH มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ อัตราการหมัก และการสร้างผลผลิตพลอยได้ตลอดจนการควบคุมจุลินทรีย์ปนเปื้อน โดยทั่วไปยีสต์เจริญได้ดีในช่วง pH 3.5-5.0 เนื่องจากในระหว่างการหมักเอทานอลยีสต์จะมีการสร้างกรดเกิดขึ้นด้วย (Brandberg *et al.*, 2004) แต่ในระหว่างการหมักหากเกิดสภาพความเป็นกรดสูง อาจเป็นเหตุให้ประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลลดลง ส่งผลให้ความสามารถในการผลิตเอทานอลต่ำกว่าปกติ (จรูญ คำนวณตา และคณะ, 2525) ในกระบวนการหมักจึงควรปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4.0-5.0 (Chen and Jin, 2006) ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาหา pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ โดยนำอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็น $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้นของ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นหลัง Autoclave เท่ากับ 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

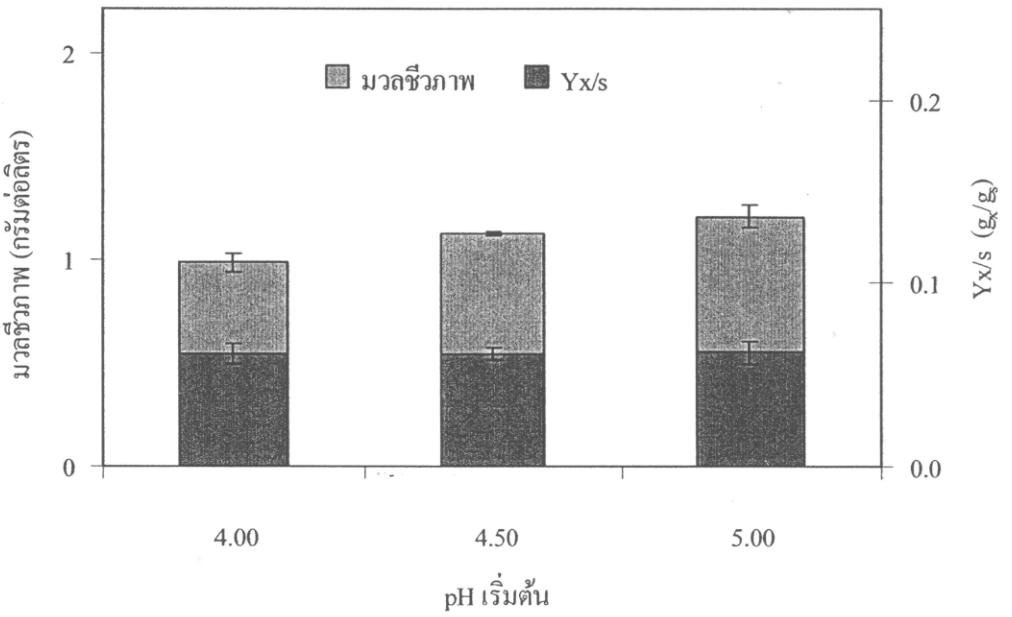
ผลจากการทดลองพบว่าที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 4-4 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.92 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.72 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 7.24 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 2.97 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 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 ดังแสดงในภาพที่ 4-7 ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลของ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 กับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 และ 4.0 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่าให้ผลสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ ชุติมา ศรีงิ้ว (2548) ซึ่งทำการศึกษาผล pH เริ่มต้นของอาหารที่ใช้ในการหมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* DMKU 3-1042 โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่เตรียมให้มีน้ำตาล 22 เปอร์เซ็นต์ 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 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยีสต์ *S. cerevisiae* DMKU 3-1042 หมักเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยที่ปรับ pH เท่ากับ 5.0 ได้ดีที่สุด โดยเอทานอลที่ได้มีค่าเท่ากับ 11.15 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ตารางที่ 4-4 ผลการศึกษาค่า pH เริ่มต้น ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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

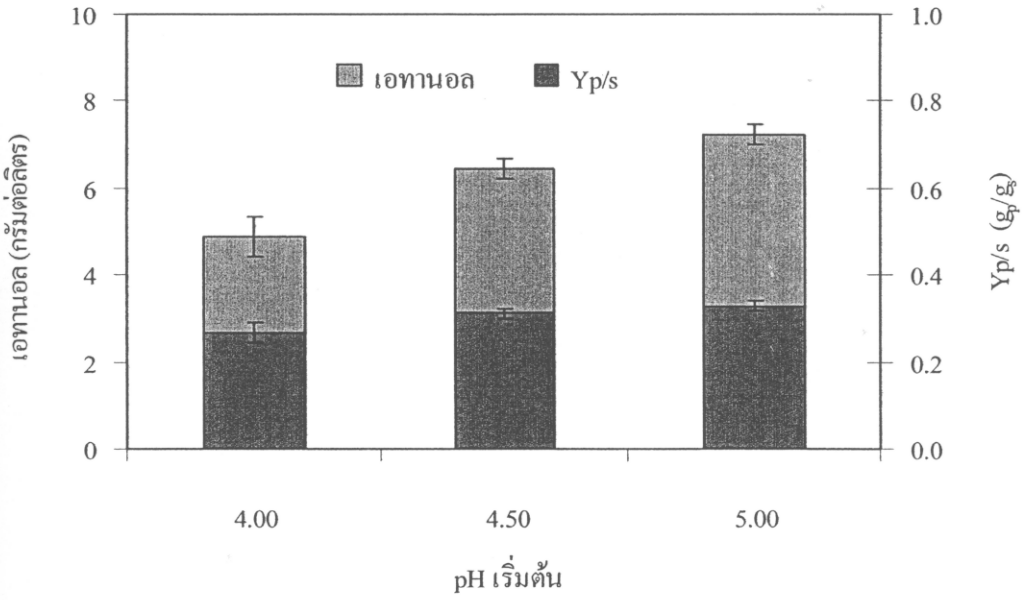
pH เริ่มต้น	pH หลังหมัก	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(w/v)	%(v/v)			
4.0	3.45	6.78	4.87[a]	0.49	0.62	0.892[a]	0.267[a]	0.049
4.5	3.62	4.32	6.45[b]	0.65	0.82	1.018[b]	0.312[b]	0.049
5.0	3.94	2.97	7.24[c]	0.72	0.92	1.093[c]	0.329[b,c]	0.050

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



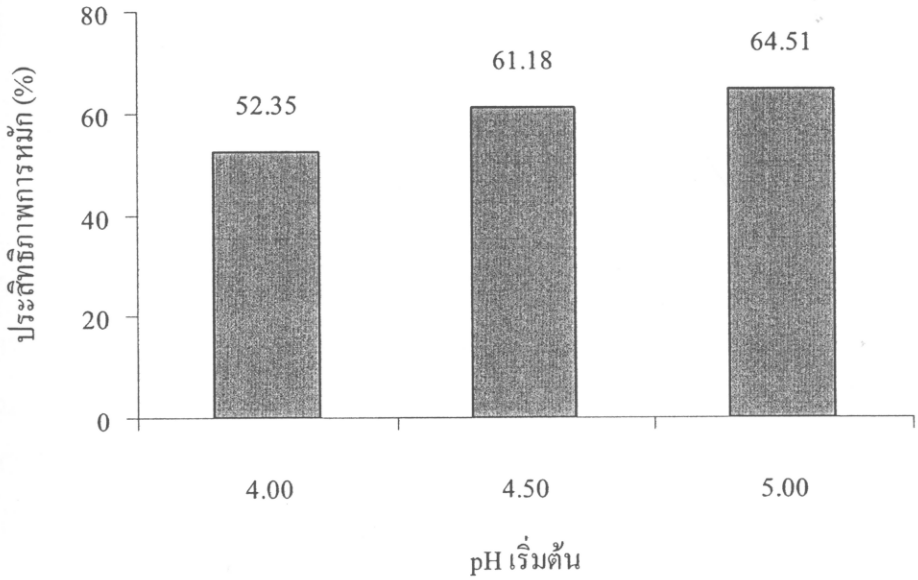
ภาพที่ 4-7 ผลของ pH ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0, 4.5 และ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

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 4-8 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 อย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ แต่ในขณะที่ค่า Yp/s ของการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เมื่อเปรียบเทียบกับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าการเปลี่ยนแปลงของ pH จะทำให้การผลิตเอทานอลและค่า Yp/s เปลี่ยนแปลงด้วยเช่นกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำตาล และสายพันธุ์ของเชื้อที่ใช้ในการหมักด้วย (Latif and Rajoka, 2001)



ภาพที่ 4-8 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 4-9 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ให้ผลดีที่สุด คือ 64.51 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือก pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เป็น pH ที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และใช้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-9 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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

4.2.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน

4.2.2.1 อัตราการเขย่าที่เหมาะสม

ในกระบวนการผลิตเอทานอล อัตราการเขย่านับว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากอัตราการเขย่าที่เหมาะสมในกระบวนการหมักจะทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ดีขึ้น ส่งผลต่อการผลิตเอทานอลให้มีปริมาณมากขึ้นด้วย ในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาทดลองหาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) โดยนำสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นหลังการ Autoclave เท่ากับ 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 4-5 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.92 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.72 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 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 มาก เมื่อเปรียบเทียบปริมาณการผลิตเอทานอลที่อัตราการเขย่า 100, 50 และ 0 พบว่าผลที่ได้มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อพิจารณาผลของเอทานอลจากการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่ามากขึ้นจะทำให้มีผลผลิตเอทานอลแตกต่างกัน คือ มีปริมาณมากขึ้นตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการเขย่ามีความสำคัญต่อการผสมกันระหว่างเซลล์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และปริมาณออกซิเจน (เท่าที่มี) โดยการเขย่าช่วยให้ฟองอากาศแตกตัวเป็นเม็ดเล็กๆ ซึ่งจะช่วยให้ออกซิเจนเข้ากับเซลล์ได้ดี และยังส่งผลให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เชื้อสร้างขึ้นอยู่ห่างจากเซลล์มากขึ้น (Jones and Greenfield, 1982) เนื่องจากปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะมีผลยับยั้งการเติบโตของยีสต์ ซึ่งปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ถ้าสูงจนถึง 7.5- 8.0 บรรยากาศ จะทำให้อัตราเร็วของการหมักลดลง โดยอัตราเร็วของการหมักจะช้ามากหรือเกือบไม่เกิดเลย (King and Hossain, 2004) ซึ่งผลจากการทดลองมีความสอดคล้องกับรายงานวิจัยของปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์ (2547) ในการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์

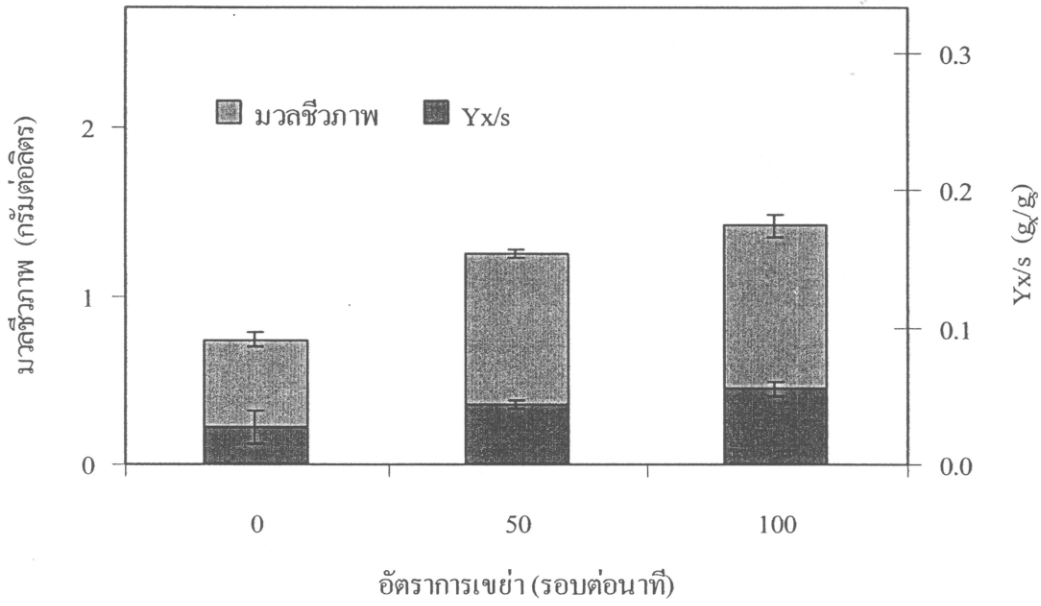
S. cerevisiae SKP1 โดยเลี้ยงในภาวะน้ำตาลรวมเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100, 150 และ 200 รอบต่อนาที ผลจากการทดลองพบว่า อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* SKP1 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 ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ น้ำหนักเซลล์แห้ง และ Yx/s มีค่าต่ำกว่าที่อัตราการเขย่า 100 และ 50 รอบต่อนาที มากดังแสดงในภาพที่ 4-10 ทั้งนี้เนื่องจากภายใต้สภาวะที่ขาดอากาศเป็นปัจจัยในการควบคุมจำนวนและอัตราการเจริญของเซลล์ *S. cerevisiae* ซึ่งอาจมีผลทำให้เชื้อนำเอาน้ำตาลมาใช้ในการเจริญเติบโตได้น้อย และส่งผลต่อการผลิตเอทานอลด้วยเช่นกัน (สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์, 2530)

ตารางที่ 4-5 ผลการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากจากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 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

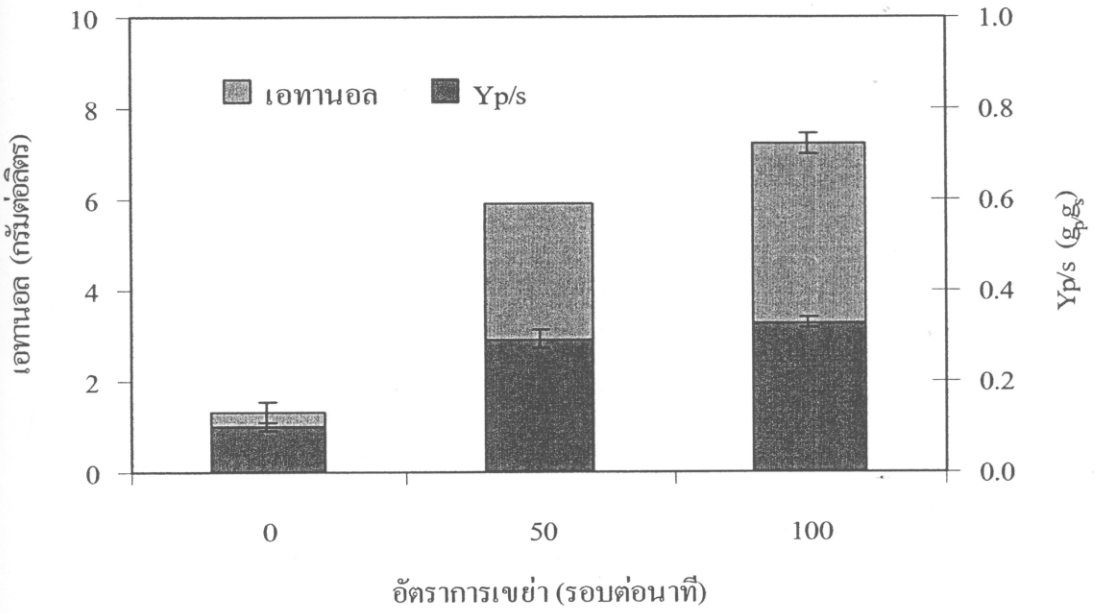
อัตราการเขย่า (rpm)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(w/v)	%(v/v)			
0	11.86	4.48	1.32[a]	0.13	0.17	0.620[a]	0.100[a]	0.025
50	4.63	3.39	5.93[b]	0.59	0.75	0.977[b]	0.292[b]	0.039
100	2.97	3.94	7.24[c]	0.72	0.92	1.093[c]	0.329[c]	0.050

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



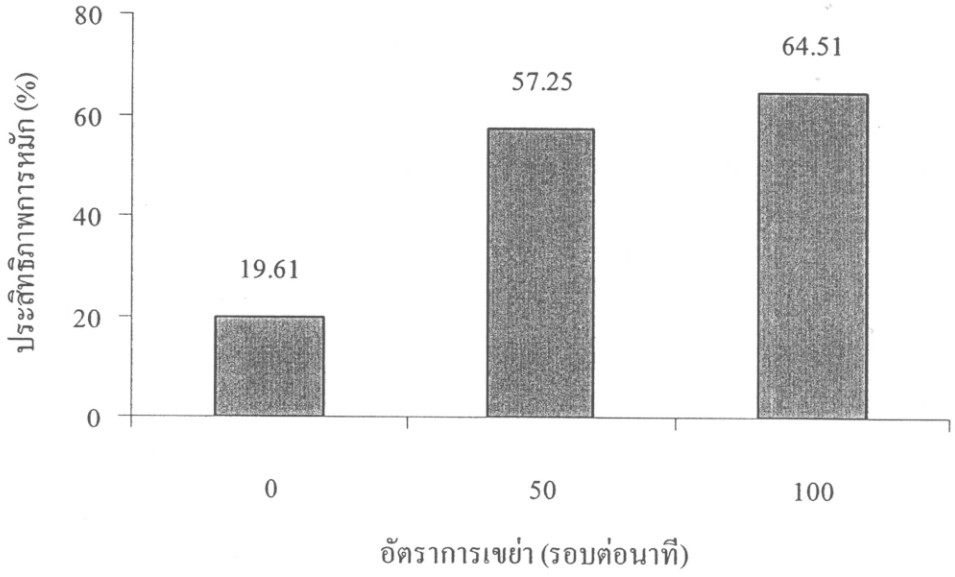
ภาพที่ 4-10 ผลของอัตราการเขย่าต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าที่อัตราการเขย่า 0, 50 และ 100 rpm ดังแสดงในภาพที่ 4-11 มีค่า Yp/s เพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ 0.100, 0.292 และ 0.329 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เมื่อนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกันโดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติพบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 4-11 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 4-12 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที ให้ผลดีที่สุดคือ 64.51 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงเลือกใช้อัตราการเขย่าที่ 100 รอบต่อนาที เป็นอัตราการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และใช้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-12 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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

4.2.2.2 ผลอุณหภูมิที่เหมาะสม

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อยีสต์ พบว่ายีสต์ *S. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่เจริญเติบโตและหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง และจะเจริญเติบโตช้าและหมักเอทานอลได้ต่ำที่อุณหภูมิสูง ดังนั้นในการหมักควรควบคุมอุณหภูมิไม่ให้เกิน 37 องศาเซลเซียส เพราะนอกจากจะทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ลดลงแล้ว ยังมีผลทำให้จำนวนเซลล์ลดลงด้วย (King and Hossain, 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 ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นหลังการ Autoclave เท่ากับ 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 ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

ผลจากการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 4-6 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.92 เปอร์เซ็นต์โดย

ปริมาตร คิดเป็น 0.72 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตรหรือ 7.24 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 2.97 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 3.94 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.093 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล

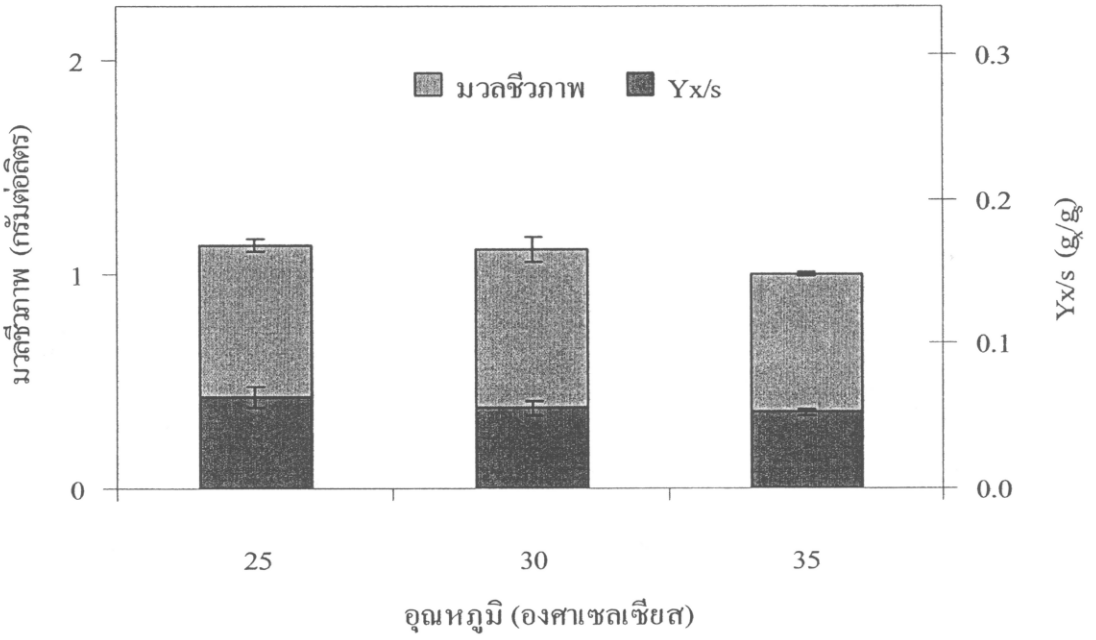
รองลงมาเป็นอุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเอทานอลเท่ากับ 6.19 และ 5.14 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีน้ำตาลที่เหลือเท่ากับ 5.43 และ 4.00 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ pH หลังการหมักมีค่าอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน คือ 4.14 และ 4.19 ตามลำดับ มีน้ำหนักเซลล์แห้งที่ให้ค่าใกล้เคียงกัน คือ 1.108 และ 1.000 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าลดลงตามลำดับ คือ 0.057 และ 0.048 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล เมื่อคำนวณทางสถิติพบว่า ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีมวลชีวภาพต่ำกว่าชุดการทดลองที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส แต่เมื่อพิจารณาค่า Yx/s พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4-13

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการหมักด้วยอุณหภูมิที่แตกต่างกันจะให้ปริมาณเอทานอลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ 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 4-6 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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

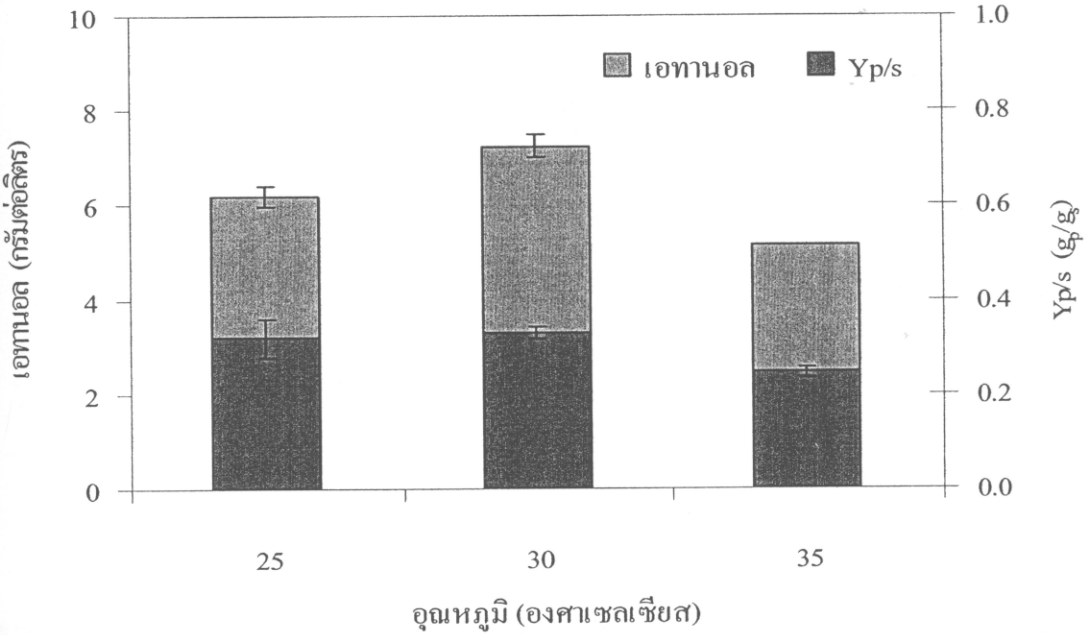
อุณหภูมิ (°C)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(w/v)	%(v/v)			
25	5.43	4.14	6.19[a]	0.62	0.78	1.108[a]	0.319[a]	0.057
30	2.97	3.94	7.24[b]	0.72	0.92	1.093[a]	0.329[a]	0.050
35	4.00	4.19	5.14[c]	0.51	0.65	1.000[b]	0.245[b]	0.048

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



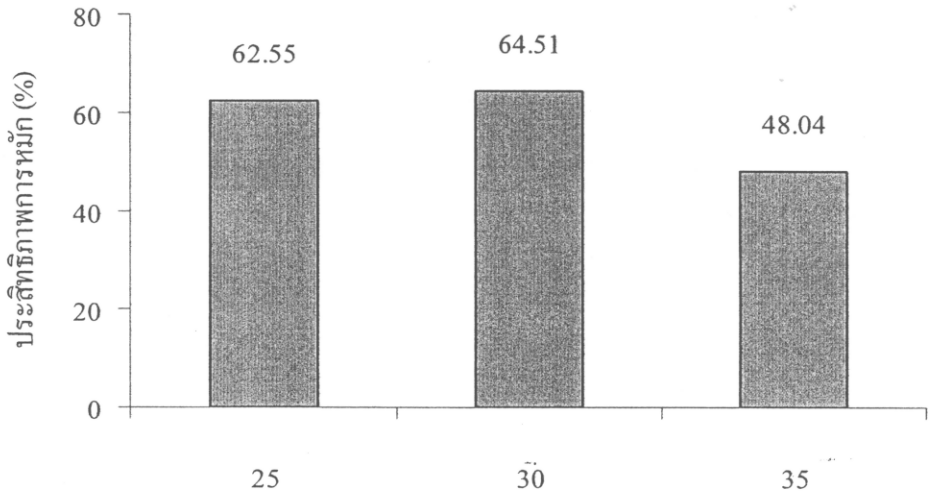
ภาพที่ 4-13 ผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักต่อปริมาณชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าการบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ดังแสดงในภาพที่ 4-14 มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.329 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และมีค่าใกล้เคียงกับการบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส คือ 0.319 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งเมื่อนำมาเปรียบเทียบกันโดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่า Yp/s ต่ำสุดเมื่อเทียบกับอุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่ง Yp/s ที่ได้มีค่า 0.245 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล



ภาพที่ 4-14 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 4-15 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสภาวะการบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ให้ผลดีที่สุดคือ 64.51 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงเลือกใช้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และใช้ในการทดลองศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-15 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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

4.2.2.3 ระยะเวลาในการหมักเอทานอลที่เหมาะสม

Bilford และคณะ (1942) ได้ทำการหมักเอทานอลในถังเดี่ยวแบบต่อเนื่องจากกากน้ำตาล โดยใช้ยีสต์ *S. cerevisiae* (Seagram No.1) พบว่ายีสต์สายพันธุ์นี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเริ่มต้น 12-13 เปอร์เซ็นต์ ให้เป็นเอทานอลได้สมบูรณ์ภายใน 4-10 ชั่วโมง ซึ่งการผลิตเอทานอลให้ได้ปริมาณสูงในระยะเวลาสั้นนั้นจะสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตลงได้ ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการจากการศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล โดยนำสูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นหลังการ Autoclave เท่ากับ 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 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หา pH ปริมาณน้ำตาลที่เหลือ ปริมาณเอทานอล และมวลชีวภาพ

ผลจากการทดลองพบว่าที่ระยะเวลาในการหมัก 48 ชั่วโมง ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดดังแสดงในตารางที่ 4-7 โดยปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 1.17 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 0.92 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร หรือ 9.20 กรัมต่อลิตร มีน้ำตาลที่

เหลือเท่ากับ 1.02 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.03 และมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 1.2 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.050 กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อกรัมน้ำตาล

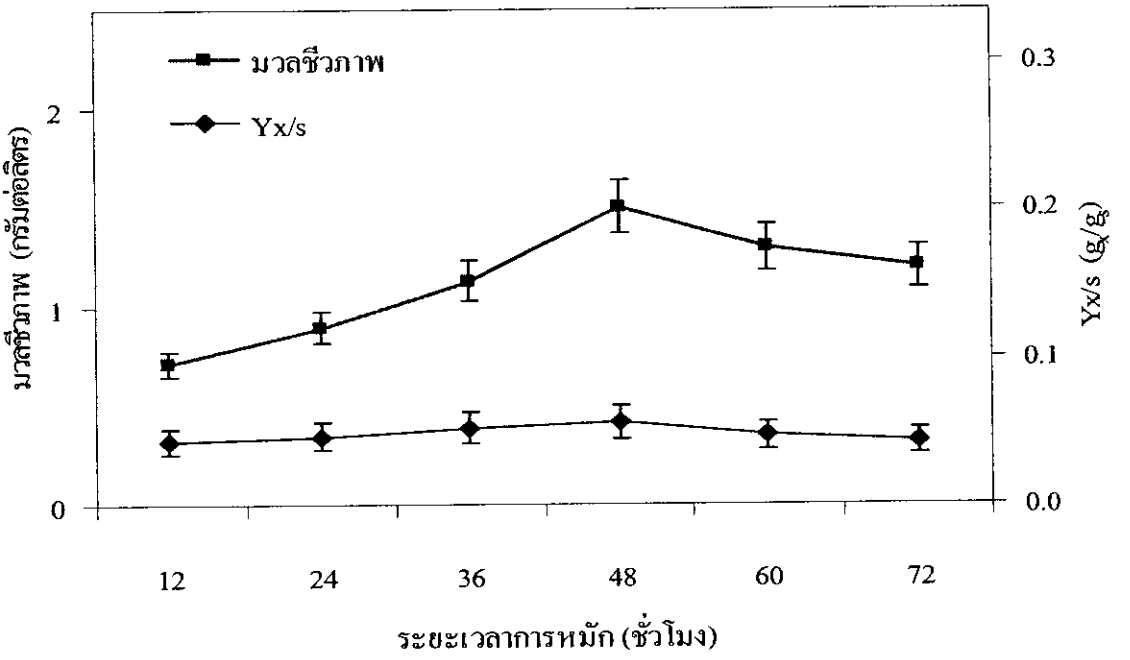
เมื่อเปรียบเทียบระยะเวลาในการหมักชั่วโมงที่ 12, 24, 36 และ 48 พบว่าเอทานอล และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับเช่นกัน และเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เหลือพบว่าปริมาณน้ำตาลลดลงตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ใช้เวลาในการหมักเพิ่มขึ้นจาก 48 ชั่วโมง เป็น 60 และ 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าคงที่ และเมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งกลับมีค่าลดลง คือ 1.040 และ 0.960 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่ามีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันกับน้ำหนักเซลล์แห้ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการหมักในชั่วโมงที่ 60 และ 72 ไม่มีปริมาณน้ำตาลเหลืออยู่เลย ทำให้ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ขาดอาหารสำหรับใช้ในการเจริญเติบโตและส่งผลต่อการผลิตเอทานอลด้วยเช่นกัน ดังแสดงในภาพที่ 4-16

ตารางที่ 4-7 ผลการศึกษาระยะเวลาการหมักที่เหมาะสมสำหรับการการผลิตเอทานอลของยีสต์ *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

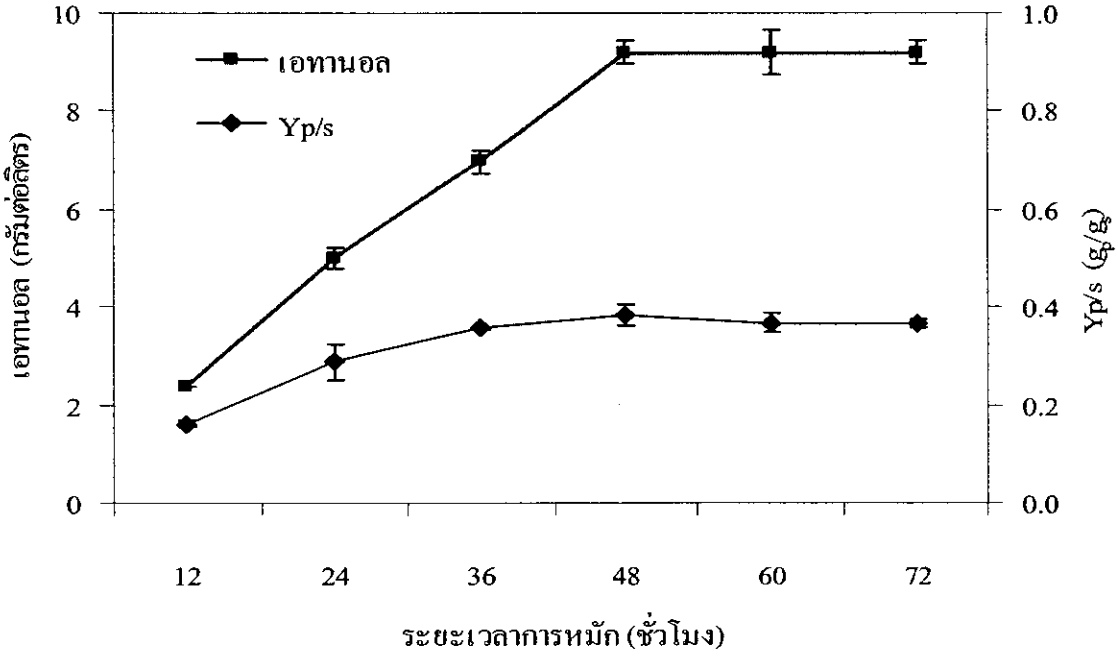
ระยะเวลาการหมัก (ชม.)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(w/v)	%(v/v)			
12	10.23	4.36	2.37^{a}	0.24	0.30	0.570^{a}	0.160^{a}	0.039
24	7.65	4.31	4.99^{b}	0.50	0.63	0.720^{b}	0.288^{b}	0.041
36	5.47	4.25	6.97^{c}	0.70	0.88	0.900^{c}	0.357^{c}	0.046
48	1.02	4.03	9.20^{d}	0.92	1.17	1.200^{d}	$0.384^{c,d}$	0.050
60	0	3.90	$9.20^{d,e}$	0.92	1.17	1.040^{e}	$0.369^{c,d,e}$	0.042
72	0^{f}	3.86	$9.20^{d,e,f}$	0.92	1.17^{f}	0.960^{f}	$0.369^{c,d,e,f}$	0.038

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับค่าเอทานอลที่ได้ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น โดยระยะเวลาในการหมักชั่วโมงที่48 ดังแสดงในภาพที่ 4-17 มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.384 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

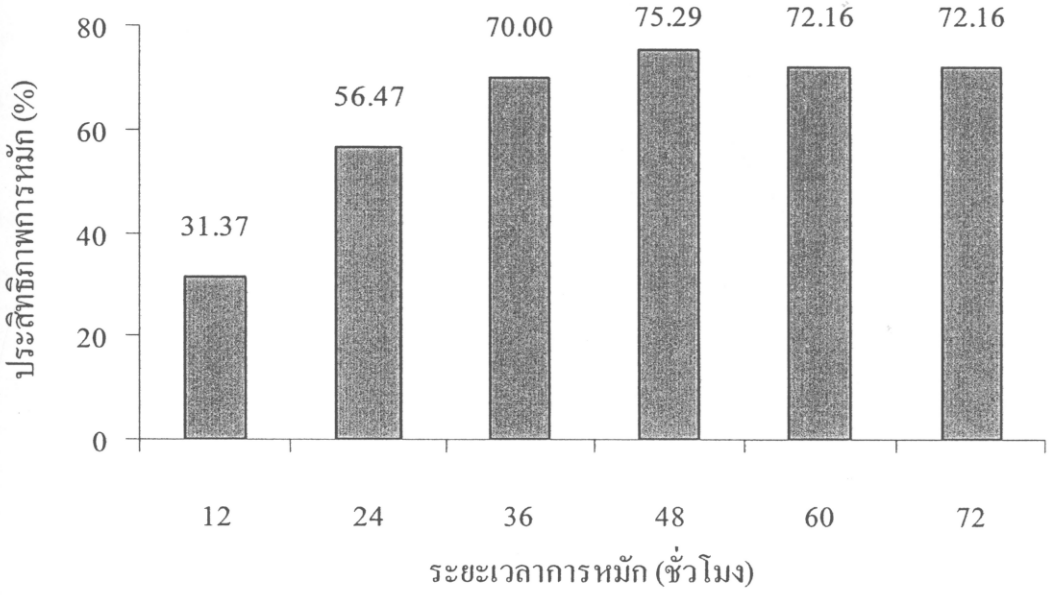


ภาพที่ 4-16 ผลของระยะเวลาในการหมักต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) จากการผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-17 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 4-18 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลในสภาวะการบ่มเลี้ยงเชื้อที่ระยะเวลา 48 ให้ผลดีที่สุดคือ 75.10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้ระยะเวลาการหมักเอทานอล 48 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* (S_1)



ภาพที่ 4-18 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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-Paris เพื่อหาค่าเอทานอลที่ได้ ซึ่งค่าเอทานอลที่วัดได้อาจจะมีความคลาดเคลื่อนอยู่บ้าง ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการยืนยันผลโดยการวัดค่าเอทานอลที่ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ผลิตได้ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC) ที่อุณหภูมิคอลัมน์ 200 องศาเซลเซียส โดยการเลือกเอาตัวอย่างเอทานอลของการศึกษาหาระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ไปทำการตรวจวัด ซึ่งผลจากการตรวจวัดค่าเอทานอลที่ได้ดังแสดงในตารางที่ 4-8 พบว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC ให้ค่าเอทานอลมากกว่าการตรวจวัดด้วยเครื่อง

Ebulliometer ของทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจวัด และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนความต่างระหว่างการตรวจวัดด้วยเครื่อง GC กับ การตรวจวัดด้วยเครื่อง Ebulliometer พบว่า มีความแตกต่างกันเท่ากับ 0.23±0.024 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

ตารางที่ 4-8 ผลการเปรียบเทียบการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer กับ เครื่อง Gas chromatography

ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	เอทานอลวัดด้วยเครื่อง Ebulliometer %(v/v)	เอทานอลวัดด้วยเครื่อง Gas chromatography %(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

4.3 ผลการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2)

จากผลการศึกษาหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) พบว่า การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ให้ผลผลิตเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่า Yield ค่อนข้างต่ำ ซึ่งไม่สอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาที่กล่าวถึงคุณสมบัติของเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* ว่ามีคุณสมบัติที่ดีในกระบวนการหมักเอทานอลสามารถหมักเอทานอลได้รวดเร็วและให้ผลผลิตสูง (Bilford *et al.*, 1942) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากส่วนประกอบบางประการในน้ำอัดลมหมดอายุ เช่น สารปรุงแต่ง รส กลิ่น สี และวัตถุกันเสีย ที่มีผลทำให้ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) มีประสิทธิภาพในการหมักลดลง แต่อย่างไรก็ตามอาจเนื่องมาจากความสามารถและคุณสมบัติของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ในการหมักและให้ผลผลิตเอทานอลเองด้วยเช่นกัน ดังนั้นเพื่อให้มั่นใจว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอล รวมถึงสามารถให้ผลผลิตเอทานอลและมีประสิทธิในการหมักสูงสุดในงานวิจัยฉบับนี้จึงได้ทำการศึกษาเลือกยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) ซึ่งพบว่าเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ดีโดยเป็นเชื้อยีสต์ที่ใช้สำหรับการหมักไวน์ ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มาทำการศึกษาทดลองเพื่อยืนยันประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลของยีสต์ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุ โดยทำการศึกษาด้วยการนำผลการศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) มาใช้เป็นสูตรอาหารและควบคุมสภาวะแวดล้อมในการ

หมักเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) ทั้งนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้สูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นหลังการ Autoclave เท่ากับ 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 4-9 โดยเอทานอลที่ได้มีปริมาณเท่ากับ 6.17 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร คิดเป็น 4.87 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร 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 และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ คือ 12.37, 14.75, 20.01 และ 25.15 กรัมต่อลิตร เมื่อตรวจวัดปริมาณน้ำตาลหลังการหมักพบว่าไม่มีน้ำตาลเหลืออยู่เลย อาจเนื่องมาจากยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) นำไปใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ เช่น เอทานอล เมื่อพิจารณา pH หลังการหมักพบว่าในทุกความเข้มข้น pH มีค่าลดลงจากเดิม ซึ่งจากผลการรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า นอกจากยีสต์ใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ผลพลอยได้ เช่น เอทานอลแล้วยังมีการสร้างกรดเกิดขึ้นด้วย (Krishna *et al.*, 1998 อ้างโดย ยุทธิศักดิ์ สุบการี, 2551)

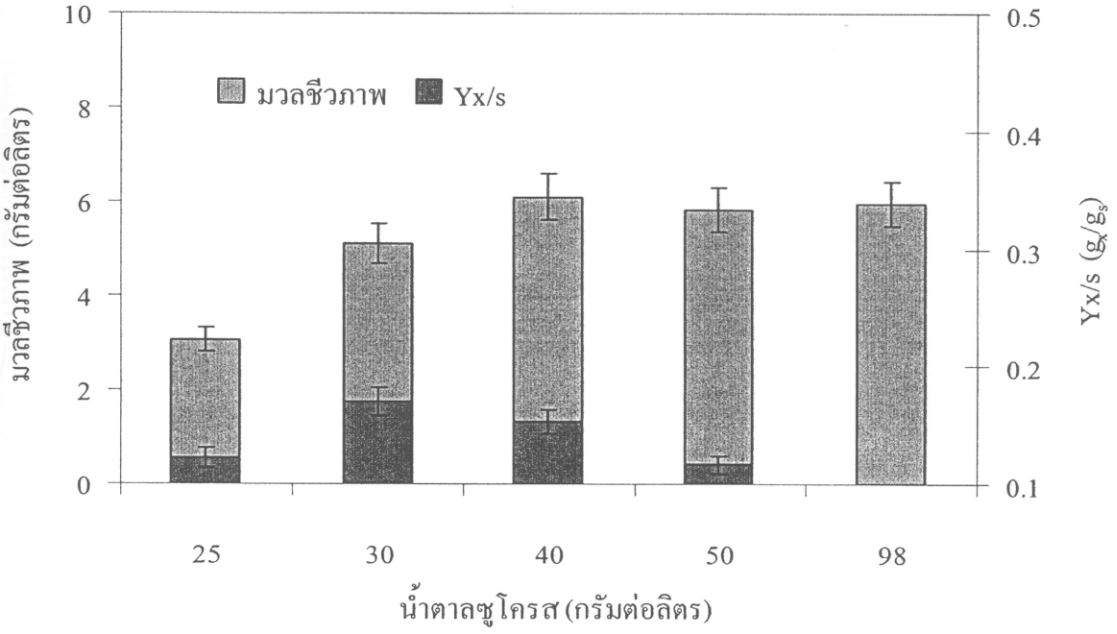
เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า ที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25, 30 และ 40 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งมีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ คือ 3.060, 5.103 และ 6.100 กรัมต่อลิตร และมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 50 และ 98 กรัมต่อลิตร กลับมีค่าลดลงโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s พบว่าให้ค่าไปในทิศทางเดียวกับน้ำหนักเซลล์แห้งดังแสดงในภาพที่ 4-19 ทั้งนี้อาจเนื่องจากความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มมากขึ้นจากกระบวนการหมัก มีผลต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) โดยจากผลรายงานวิจัยของ Loureiro and Uden (1982) พบว่าสภาวะที่เอทานอลถูกผลิตขึ้นมากจะมีผลต่ออัตราการตายของเซลล์ยีสต์ โดยปริมาณเอทานอลที่ถูกผลิตขึ้นนี้จะไปเปลี่ยนองค์ประกอบของลิปิดและฟอสโฟลิปิดของเมมเบรนของเชื้อยีสต์ ทำให้

ความสามารถในการทนต่อความร้อนของยีสต์ลดลง การที่ยีสต์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้จึงเป็นผลให้อัตราการผลิตเอทานอลลดลงด้วย (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2536)

ตารางที่ 4-9 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

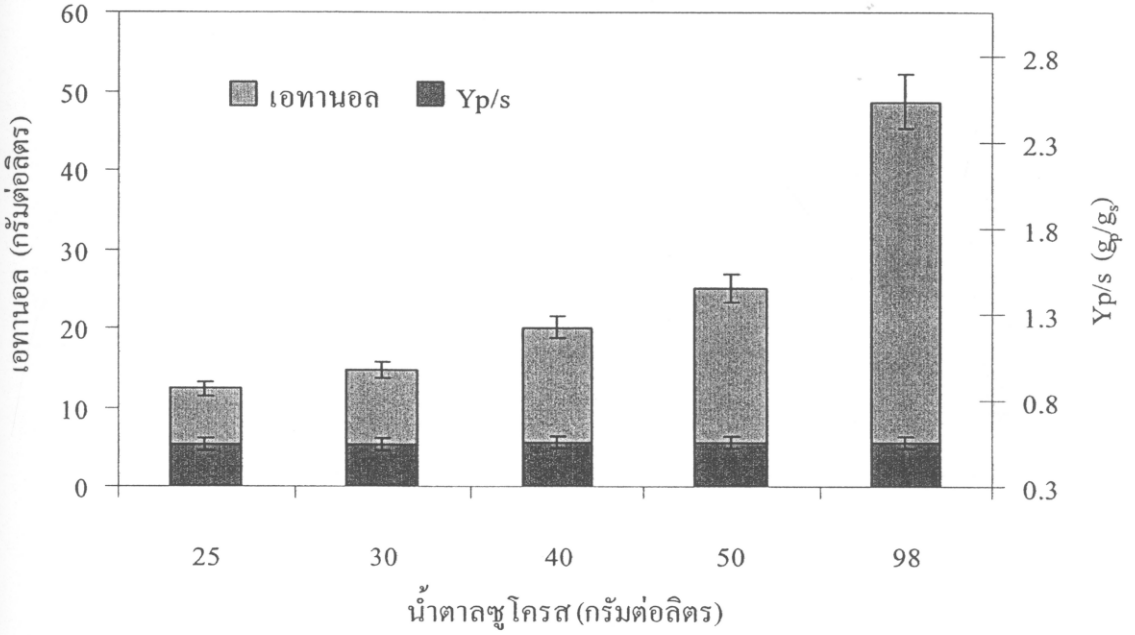
ปริมาณน้ำตาล (g/L)	น้ำตาลที่เหลือ (g/L)	pH	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			(g/L)	%(w/v)	%(v/v)			
25	0	4.43	12.37[a]	1.24	1.57	3.06[a]	0.490[a]	0.120
30	0	4.34	14.75[b]	1.47	1.87	5.103[b]	0.490[a]	0.170
40	0	4.30	20.01[c]	2.00	2.53	6.100[c]	0.500[a]	0.152
50	0	4.28	25.15[d]	2.51	3.18	5.820[d]	0.503[a,b]	0.126
98	1.30	4.28	48.72[e]	4.87	6.17	5.970[e]	0.504[a,b]	0.062

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



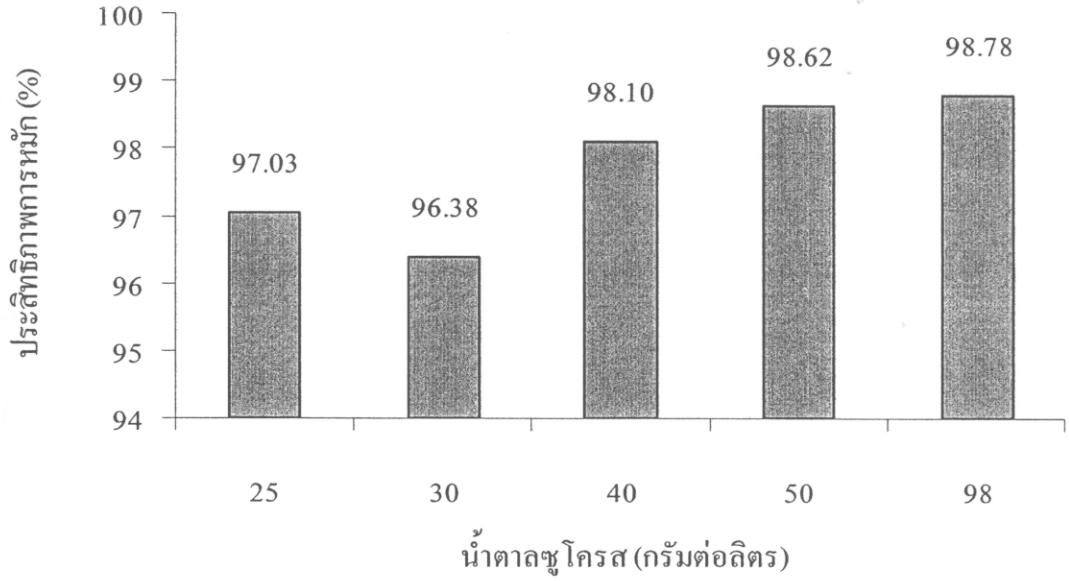
ภาพที่ 4-19 ปริมาณมวลชีวภาพและผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) ของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) จากการหมักด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25, 30, 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ในปริมาณ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาพิจารณาคำนวณหาค่า Yp/s ดังแสดงในตารางที่ 4-9 พบว่า ที่เข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 25 และ 30 กรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากัน คือ 0.490 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 40, 50 และ 98 กรัมต่อลิตร มีค่าใกล้เคียงกัน คือ 0.50, 0.503 และ 0.504 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ตามลำดับ แต่เมื่อนำค่า Yp/s มาเปรียบเทียบกันโดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4-20



ภาพที่ 4-20 ผลการหมักเอทานอลและผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) 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 4-21 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเป็นเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 98 กรัมต่อลิตร ให้ผลดีที่สุดคือ 98.78 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2)



ภาพที่ 4-21 ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลด้วยยีสต์ *S.cerevisiae* (S_2) เมื่อคิดเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ของค่าทฤษฎี (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) เป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักและทนต่อสภาวะแวดล้อมในการหมักได้ดีกว่ายีสต์ *S.cerevisiae* (S_1)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการเลือกใช้ยีสต์ต่างสายพันธุ์กันส่งผลต่อปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ต่างกันด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ปนิดา กิตติหมาย (2546) ที่ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลระหว่าง *S.cerevisiae* สายพันธุ์ที่ใช้ในโรงงานสุราทั่วไปคือ *S.cerevisiae* Sc90 และสายพันธุ์ต่างๆที่สามารถตกตะกอนได้คือ *S.cerevisiae* M30, AM12, TJI และ TJ3 ในสูตรอาหารที่มีการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นจากกากน้ำตาล 18 เปอร์เซ็นต์ เติม $(NH_4)_2SO_4$ 0.05 เปอร์เซ็นต์ ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5 และในสภาวะการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตรการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 37 ชั่วโมง ผลจากการศึกษาพบว่า *S. cerevisiae* Sc90 สามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 9.49 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร รองลงมาคือ *S. cerevisiae* M30, TJ1, TJ3 และ AM12 สามารถหมักเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 8.69, 7.49, 6.47 และ 6.27 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร ตามลำดับ

สำหรับในงานวิจัยฉบับนี้นอกจากจะทำการศึกษาหาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอลของยีสต์แล้ว ยังได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการฆ่าเชื้อด้วยวิธี Autoclave และวิธีเติมสารเคมี คือ Potassium metabisulfite (KMS) ด้วย ซึ่งเป็นแนวทางเลือกอีกอย่างหนึ่งเพื่อความสะดวกในการนำไปใช้ในการทำลายเชื้อที่ปนเปื้อนสำหรับกระบวนการผลิตเอทานอล และเพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดและการหมักเป็นไปอย่างรวดเร็ว

4.4 ผลการกำจัดเชื้อในน้ำอัดลมหมดอายุโดยการเติม KMS

ทำการศึกษาโดยใช้สูตรอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นหลังการ Autoclave เท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ปรับ pH ของอาหารเป็น 5.0 ด้วย 0.5 M NaOH เติม KMS 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 200 ppm ในการกำจัดเชื้อปนเปื้อนเพื่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) เมื่อนำตัวอย่างมาตรวจวัดหาปริมาณเอทานอลพบว่าไม่มีเอทานอลเกิดขึ้นเลย ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก KMS 200 ppm ที่เติมไปนั้นมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตและส่งผลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) แต่ในขณะที่ผลการกำจัดเชื้อปนเปื้อนเพื่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) กลับให้ค่าเอทานอลเท่ากันกับผลการทดลองการกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยวิธี Autoclave โดยปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าเท่ากัน คือ 12.37 กรัมต่อลิตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า Yp/s และ Yx/s มีค่าใกล้เคียงกันกับการกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยวิธี Autoclave ดังแสดงในตารางที่ 4-10

เมื่อเปรียบเทียบผลปริมาณการผลิตเอทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่า Yp/s และ ค่า Yx/s ของการฆ่าเชื้อด้วยวิธี Autoclave และวิธีการเติม KMS 200 ppm ของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) โดยอาศัยหลักการคำนวณทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 4-10 ผลการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) จากการผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 25 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ที่ความเข้มข้น 0.1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 กำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยวิธี Autoclave และการเติม KMS 200 ppm ใช้ปริมาณเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) เริ่มต้นในอาหารเท่ากับ $1x10^8$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

ยีสต์	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)	%(w/v)	%(v/v)			
S_1	Autoclave	25	2.97	3.94	7.24	0.72	0.92	1.09	0.329	0.050
S_1	KMS	25	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
S_2	Autoclave	25	0[a]	4.43	12.37	1.24	1.57[a]	3.06[a]	0.490[a]	0.120[a]
S_2	KMS	25	0[a]	3.71	12.37	1.24	1.57[a]	3.07[a]	0.495[a]	0.123[a]

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

จากผลการทดลองผลิตเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *S.cerevisiae* (S_1) และ *S.cerevisiae* (S_2) ดังกล่าวข้างต้นสามารถสรุปได้ว่า น้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้ในการนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล และเมื่อเปรียบเทียบการหมักเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุกับวัตถุดิบชนิดอื่นเช่น กากน้ำตาล พบว่าน้ำอัดลมหมดอายุซึ่งมีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบหลักเพียงอย่างเดียวในการหมักเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุจึงมีความจำเป็นต้องเติมแหล่งอาหารอย่างอื่น เช่น แหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) เพิ่มเข้าไปด้วยเพื่อให้ยีสต์ *S.cerevisiae* นำไปใช้ในการเจริญเติบโตได้ดีและสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพ และนอกจากนี้ในการหมักเอทานอลด้วยน้ำอัดลมหมดอายุยังต้องมีการไล่ก๊าซคาร์บอนออกก่อนทำการหมักเพื่อไม่ให้มีผลยับยั้งและรบกวนกิจกรรมการหมักเอทานอลของยีสต์

4.5 ผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 เมื่อใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอน

4.5.1 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุชนิดไม่เจือจางของแบคทีเรีย *Z. mobiilis* Z_4

การศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นกระบวนการที่มีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล เพราะสารอาหารต่างๆมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย ทั้งนี้การเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสมก็ขึ้นอยู่กับสายพันธ์ของแบคทีเรียด้วย จากการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 ในเบื้องต้น พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลในอาหารที่ใช้น้ำอัดลมหมดอายุที่ไม่มีการเจือจางได้ โดยน้ำอัดลมหมดอายุที่ทำมาใช้ในการศึกษานี้มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร

4.5.1.1 ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสม

ดังที่ได้กล่าวข้างต้นว่า น้ำอัดลมหมดอายุนั้นมีส่วนประกอบเฉพาะแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาลซูโครส เป็นแหล่งอาหารเพียงอย่างเดียว จึงจำเป็นต้องเติมธาตุอาหารเพิ่มเติม โดยเฉพาะแหล่งไนโตรเจน (ในน้ำอัดลมมีแหล่งไนโตรเจน น้อยกว่า 0.01%(w/v)) ไนโตรเจนเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบประมาณ 12-15 เปอร์เซ็นต์โดยมวลน้ำหนักแห้ง (Stanbury and Whitaker, 1984 อ้างถึงใน สมใจ, 2550) ดังนั้นไนโตรเจนจึงเป็นธาตุอาหารที่จำเป็น โดยทั่วไปแบคทีเรียสามารถใช้ ammonium ions เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ แต่แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมการหมักแอลกอฮอล์ นิยมใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นส่วนใหญ่ เนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำได้สูง มีราคาถูก และมีความบริสุทธิ์สูง ทั้งยังไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์อีกด้วย จากการศึกษาของ ชูศรี สุขุมาลไพบูลย์ (2530) พบว่าการเติม $(NH_4)_2SO_4$ 0.5% (w/v) เป็นอาหารเสริมจะทำให้ได้ปริมาณ เอทานอลสูงกว่าการไม่เติมอาหารเสริม

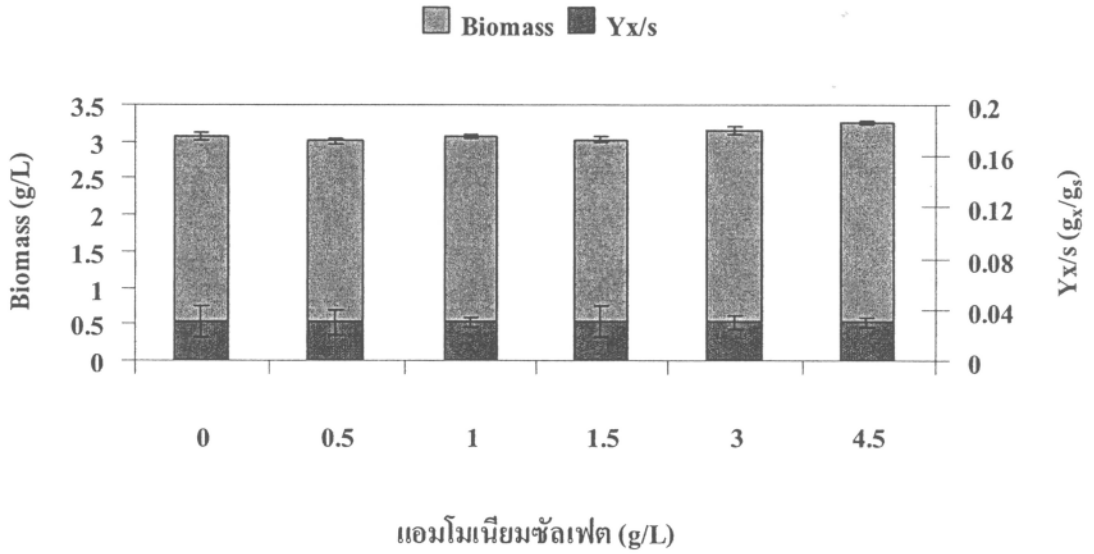
งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยแหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหาร คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 3 และ 4.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

ผลจากการทดลองพบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 4-11 โดยเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.48% (v/v) คิดเป็น 0.38% (w/v) หรือ 3.79 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 52.06 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 3 และ 4.5 g / L แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 2.61, 2.61, 2.69, 2.61 และ 2.45 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับค่ามวลชีวภาพ พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่ามวลชีวภาพหลังการหมัก 48 ชั่วโมง พบว่าทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยทุกสูตรอาหารมีค่ามวลชีวภาพอยู่ในช่วง 3.01-3.25 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณค่า Yx/s พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่า Yx/s เท่ากับ 0.03 g_x/g_s ดังแสดงในภาพที่ 4-22 สำหรับ pH อาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโต จะมีการผลิตกรดขึ้น ซึ่งหากเชื้อสร้างกรดสูงแสดงว่าเชื้อนำน้ำตาลไปใช้ในการสร้างกรดได้มาก มีผลทำให้สร้างเอทานอลได้น้อยลง (มารศรี, 2548)

ตารางที่ 4-11 ผลการศึกษาปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1, 1.5, 3 และ 4.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

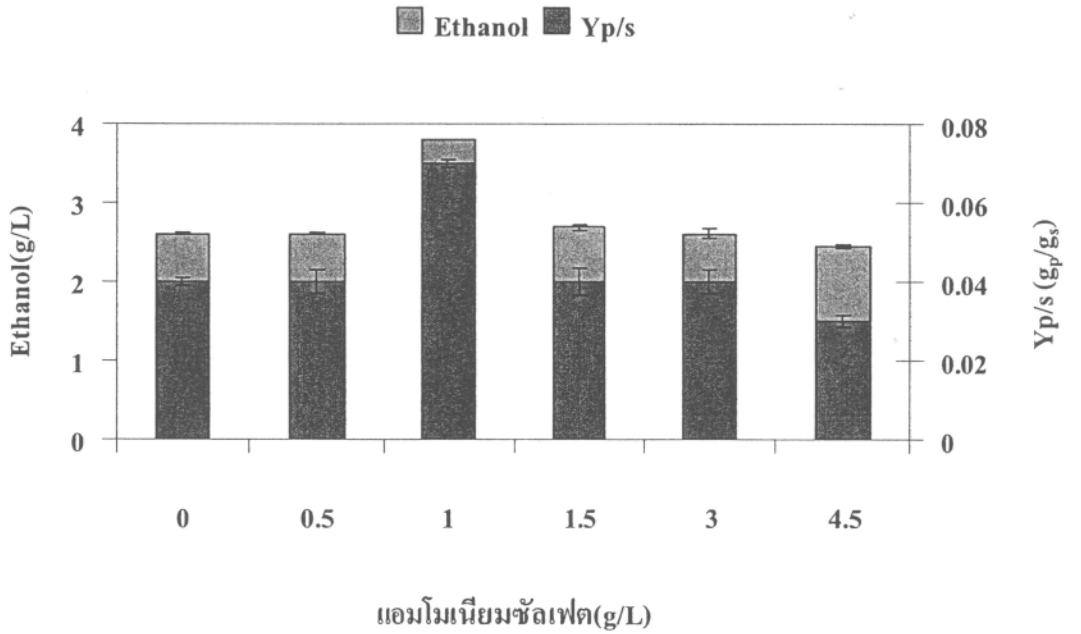
ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	น้ำตาลที่ใช้ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			g/L	% w/v	% v/v			
0	69.76	4.98	2.61[a]	0.26	0.33	3.07[a]	0.04[a]	0.03
0.5	62.14	5.01	2.61[a]	0.26	0.33	3.01[a]	0.04[a]	0.03
1	52.06	5.06	3.79[b]	0.38	0.48	3.08[a]	0.07[b]	0.03
1.5	63.34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

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



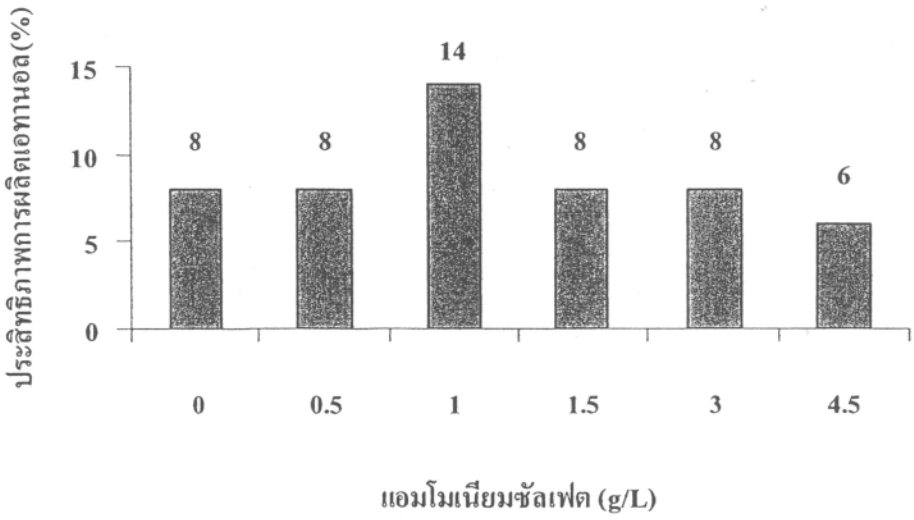
ภาพที่ 4-22 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าการหมักด้วยสูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น1 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.07 g_p/g_s ส่วนที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.5, 3 และ 4.5 กรัมต่อลิตร มีค่า 0.04, 0.04, 0.04, 0.04 และ0.03 g_p/g_s ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-23 โดยชุดการทดลองที่ใช้สูตรอาหารที่มีปริมาณ$(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ให้ค่าYp/s สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4-11 แม้ว่า มาโนช โพธิ์สูง (2546) ได้ศึกษาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* TISTR 548 โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ และ NH_4Cl ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้ NH_4Cl จะให้ค่า Yp/s สูงกว่า การใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เพียงเล็กน้อย (0.419 และ 0.412 g_p/g_s ตามลำดับ) แม้ว่าการเลือกใช้ NH_4Cl จะให้ผลได้ของเอทานอลสูงกว่าการเลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ แต่เมื่อพิจารณาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการนำไปใช้ พบว่าโดยทั่วไปจะนิยมใช้ $(NH_4)_2SO_4$ เนื่องจากมีความสามารถในการละลายน้ำได้สูง มีราคาถูก และมีความบริสุทธิ์สูง ทั้งยังไม่มีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์อีกด้วย



ภาพที่ 4-23 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน$(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักด้วยค่าผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ทุกชุดการทดลองกับค่าทางทฤษฎี (0.50) ดังแสดงในภาพที่ 4-24 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้น1 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 14 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร สำหรับเตรียมสูตรอาหารเพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 ในขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-24 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักด้วยปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3.1.2 pH เริ่มต้นที่เหมาะสม

การปรับค่า pH ของอาหารมีความสำคัญอย่างมากโดยเฉพาะต่อการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม การเจริญได้ดีในสภาวะที่เป็นกรดหรือด่างขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ (Walker, 1998) pH ของอาหารมีผลต่ออัตราการหมัก อีกทั้งมีบทบาทในการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นอีกด้วย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตร standard medium สำหรับการหมักเอทานอล แบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถทำงานได้ดีในสภาวะที่มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.9-6.5 (Beckers *et al.*, 2001) โดย Swings และ De Ley (1977) ได้รายงานว่าค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Z. mobilis* มีค่าอยู่ในช่วง 5-7

งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วย 2N NaOH ใช้อาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วย

อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

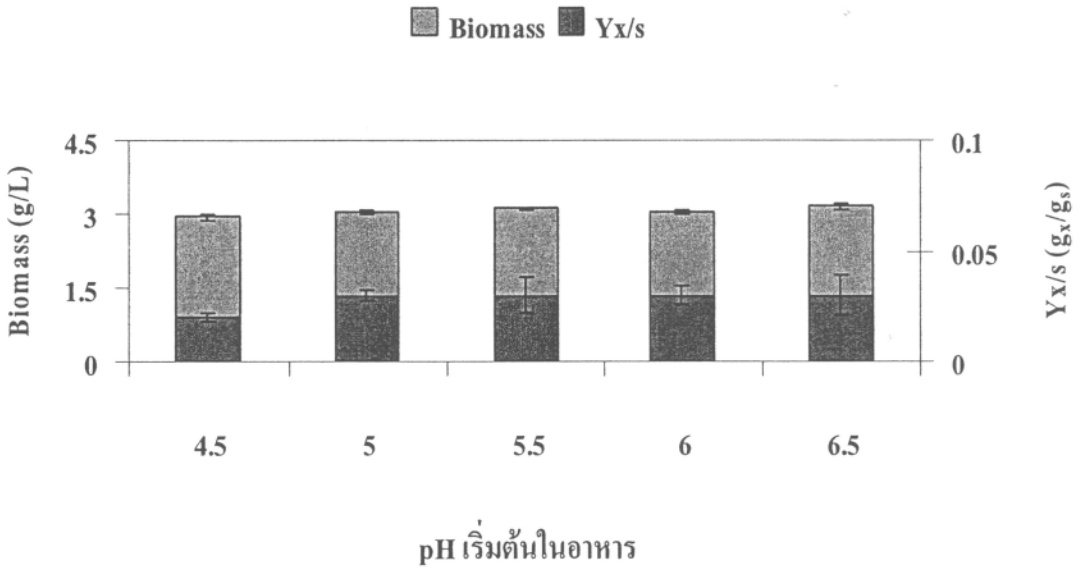
ผลจากการทดลองพบว่า ที่ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 และ 6 แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากัน ดังแสดงในตารางที่ 4-12 โดยเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.65% (v/v) คิดเป็น 0.51% (w/v) หรือ 5.14 กรัมต่อลิตร มีปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไปเท่ากับ 60.25 และ 61.05 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0 และ 6.5 (1.58, 3.16 และ 4.74 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยค่าเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 แต่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับผลของค่า pH เริ่มต้นต่อมวลชีวภาพ พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่ามวลชีวภาพหลังการหมัก 48 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 2.95-3.16 กรัมต่อลิตร มีค่า Yx/s อยู่ในช่วง 0.02-0.03 ดังแสดงในภาพที่ 4-25 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ pH ของอาหารหลังการหมักนั้นพบว่า pH ของอาหารลดลงซึ่งอาจเกิดจากคาร์บอนไดออกไซด์และกรดที่เกิดขึ้นระหว่างหมัก (Swings and De Ley, 1977)

ตารางที่ 4-12 ผลการศึกษาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5, 5, 5.5, 6.0 และ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

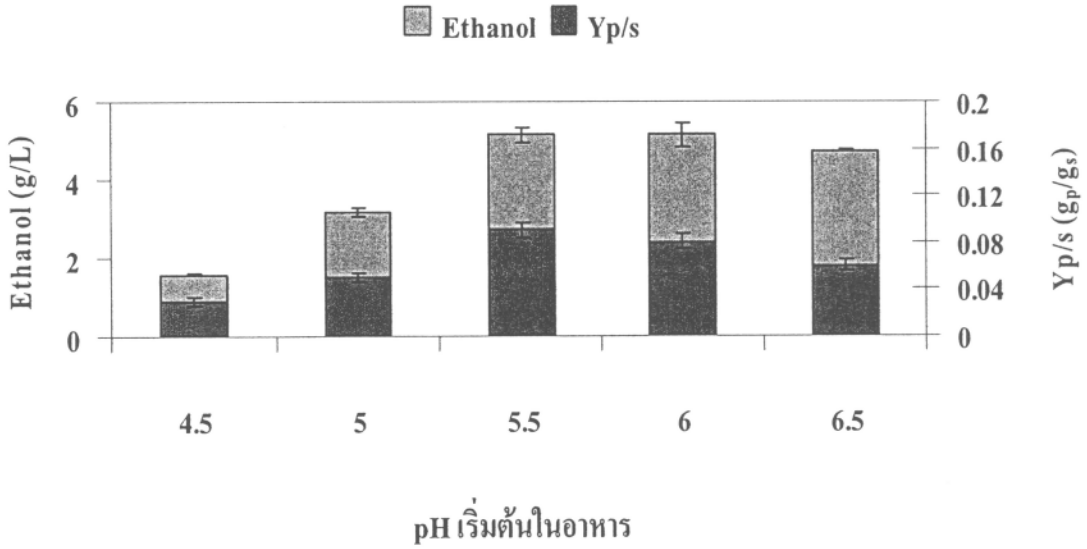
pH เริ่มต้น	น้ำตาลที่ใช้ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			g/L	%w/v	% v/v			
4.5	63.10	4.16	1.58[a]	0.16	0.2	2.95[a]	0.03[a]	0.02
5.0	60.42	4.79	3.16[b]	0.32	0.4	3.04[a]	0.05[b]	0.03
5.5	60.25	4.85	5.14[c]	0.51	0.65	3.11[a]	0.09[c]	0.03
6.0	61.05	5.08	5.14[c]	0.51	0.65	3.06[a]	0.08[c]	0.03
6.5	75.21	5.21	4.74[d]	0.47	0.6	3.16[a]	0.06[d]	0.03

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

สำหรับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ เมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.09 g_p/g_s ส่วนที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 6.0 และ 6.5 มีค่า 0.03, 0.05, 0.08 และ 0.06 g_p/g_s ตามลำดับ โดยค่า Yp/s ของชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 ดังแสดงในภาพที่ 4-26 แต่มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4-12) สอดคล้องกับการศึกษา pH เริ่มต้นที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 ของ มาโนช โพธิ์สูง (2546) ที่พบว่าการเลือกใช้ค่า pH เริ่มต้นของอาหารในช่วง 5.5-6.5 จะได้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุด

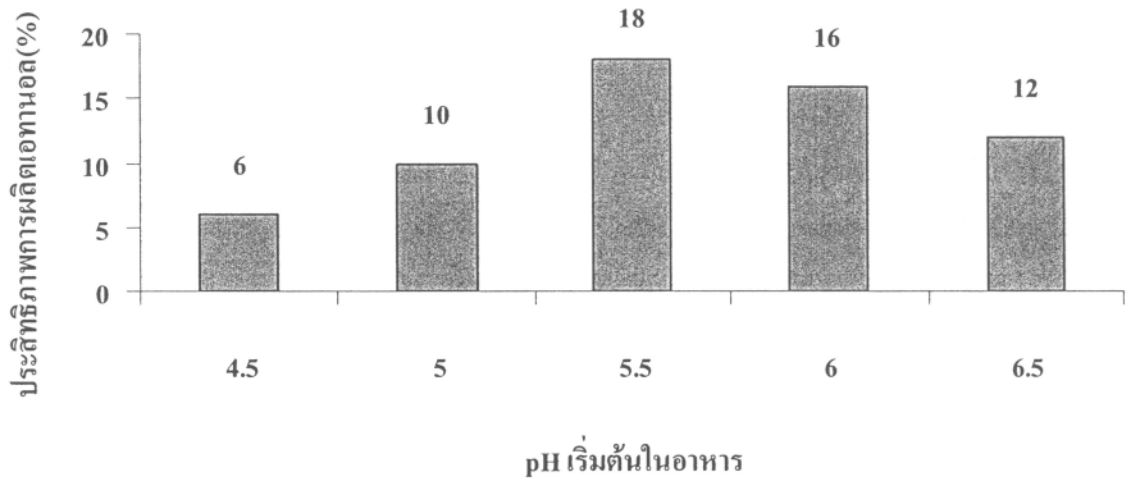


ภาพที่ 4-25 ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-26 ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในรูปร้อยละของผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองต่อค่าทางทฤษฎี (0.50) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 18 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4-27 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกการปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 สำหรับการศึกษาในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4-27 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 ข้างต้น สามารถสรุปได้ว่า สูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่ไม่เจือจางโดยเติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร และการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ก่อนทำการหมักด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถให้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 5.14 กรัมต่อลิตร มีค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.09 g_p/g_s โดยใช้น้ำตาลไป 60.25 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.85 มีมวลชีวภาพเท่ากับ 3.11 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณหาค่าผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) มีค่าเท่ากับ 0.03 g_x/g_s

สำหรับการผลิตเอทานอลนอกจากการเลือกใช้สูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อกระบวนการผลิตเอทานอลแล้ว ยังพบว่าสภาวะในการผลิตเอทานอลก็มีความสำคัญด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้

จึงได้ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยศึกษาอัตราการเขย่า อุณหภูมิที่ใช้ในการหมัก และระยะเวลาในการหมัก ผลการศึกษาเป็นดังต่อไปนี้

4.5.2 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4

4.5.2.1 อัตราการเขย่าที่เหมาะสม

เนื่องจากการเขย่าช่วยให้แบคทีเรียได้สัมผัสกับอาหารได้อย่างทั่วถึง ทำให้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเพื่อการผลิตเอทานอลได้มากขึ้นโดยวนิดา พรมขาวทอง (2547) ได้ทำการศึกษาอัตราเร็วที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* ใช้อัตราเร็วที่ 0, 100, 120 และ 200 rpm พบว่าเมื่อมีการเขย่าเชื้อจะสามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีกว่าสภาวะที่ไม่มีการเขย่า

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร เป็น 100 mL ในฟลาสก์ 250 mL ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที ก่อนเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) จำนวน 5% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ที่อัตราการเขย่า 0, 50, 100 และ 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

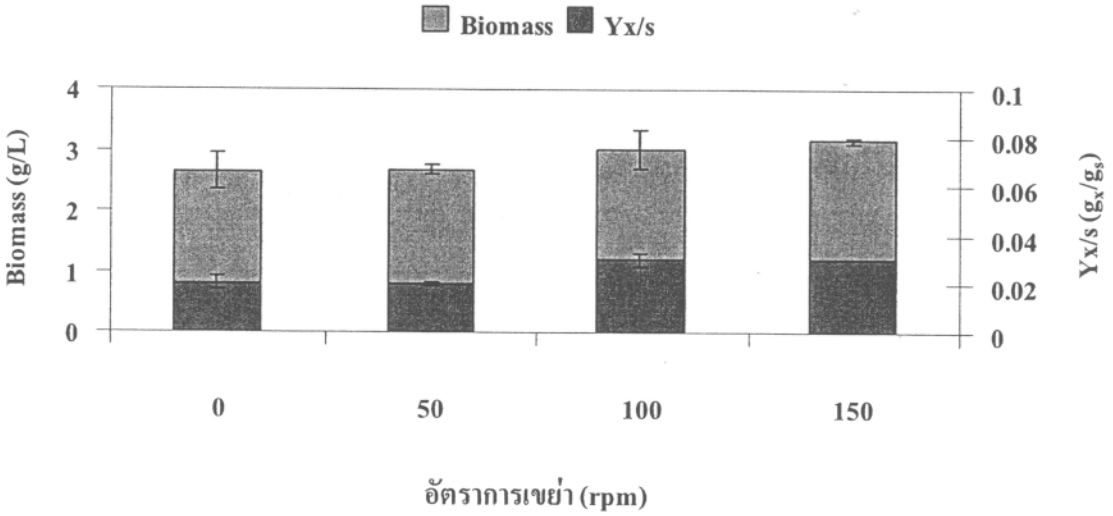
ผลจากการทดลองพบว่า ที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 100 rpm แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด และเมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าจาก 0 rpm เป็น 50 rpm และ 100 rpm ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเพิ่มขึ้นตามลำดับ แต่เมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าเป็น 150 rpm พบว่าแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 กลับผลิตเอทานอลได้ลดลง ดังแสดงในตารางที่ 4-13 โดยที่อัตราการเขย่า 100 rpm แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 0.83% (v/v) คิดเป็น 0.66% (w/v) หรือ 6.56 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีค่ามากกว่าเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่ใช้อัตราการเขย่าเท่ากับ 50 rpm (0.80%(v/v) คิดเป็น 0.63%(w/v) หรือ 6.32 กรัมต่อลิตร) และที่ 0 rpm (0.75%(v/v) คิดเป็น 0.59%(w/v) หรือ 5.93 กรัมต่อลิตร) ตามลำดับ แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าทั้ง 3 ชุดการทดลองมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่สูงกว่าค่าเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่ใช้อัตราการเขย่า 150 rpm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับมวลชีวภาพ พบว่าที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 0, 50, 100 และ 150 rpm มีมวลชีวภาพเท่ากับ 2.65, 2.67, 3.02 และ 3.16 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณค่า Yx/s พบว่ามีค่า 0.02, 0.02, 0.03 และ 0.03 g_x/g_s ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-28 ใกล้เคียงกับผลการศึกษาของ Siva Kesava และคณะ (1995) ที่ได้ค่า Yx/s เท่ากับ 0.04 g_x/g_s เมื่อใช้อัตราการเขย่า 100 rpm ซึ่งค่ามวล

ชีวภาพจากทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4-13 เมื่อพิจารณาแล้วพบว่าการเพิ่มอัตราการเขย่าจะทำให้ปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้น แต่ทั้งนี้เมื่อเพิ่มอัตราการเขย่าเป็น 150 rpm ค่าเอทานอลที่ได้กลับลดลง จากการสังเกตพบว่าที่อัตราการเขย่านี้มีการเกิดฟองบริเวณเหนืออาหารจำนวนมาก เนื่องจากเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* เป็นพวก facultative anaerobe เมื่อมีการเขย่าในอัตราเร็วสูง ส่งผลให้มีก๊าซออกซิเจนละลายมากทำให้เชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* ผลิตเอทานอลได้น้อยลง และการใช้น้ำตาลของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* โดยผ่าน Entner-Doudoroff parthway ได้ผลผลิตเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และกรด ทำให้ pH อาหารหลังการหมักมีค่าลดลง

ตารางที่ 4-13 ผลการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 0, 50, 100 และ 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

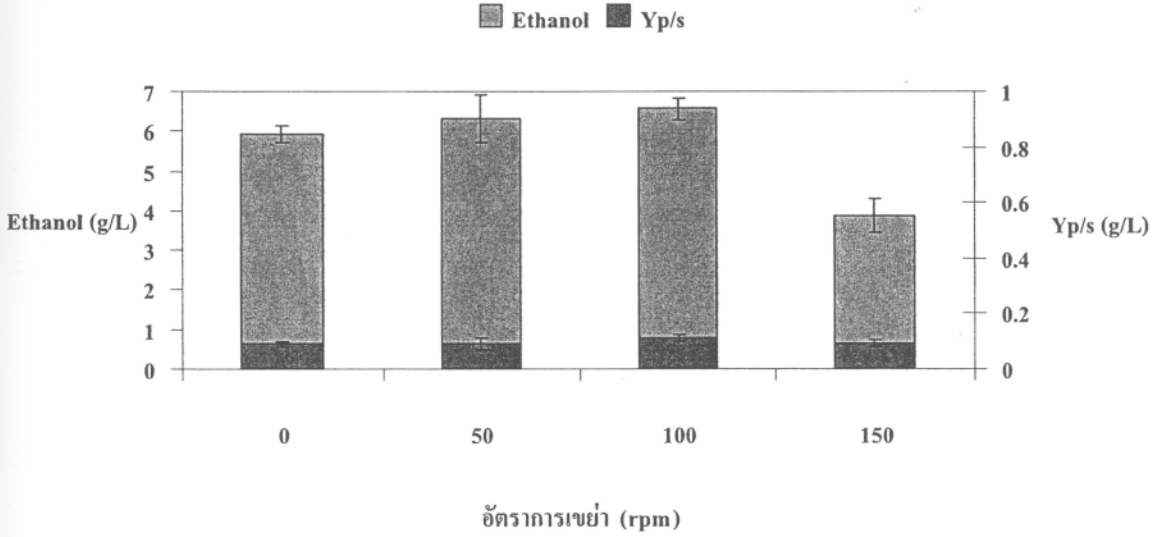
อัตราการเขย่า (rpm)	น้ำตาลที่ใช้ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			g/L	%w/v	% v/v			
0	69.29	4.88	5.93[a]	0.59	0.75	2.65[a]	0.09[a]	0.02
50	70.48	4.98	6.32[a]	0.63	0.80	2.67[a]	0.09[a]	0.02
100	61.10	5.20	6.56[a]	0.66	0.83	3.02[a]	0.11[a]	0.03
150	70.00	4.83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

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



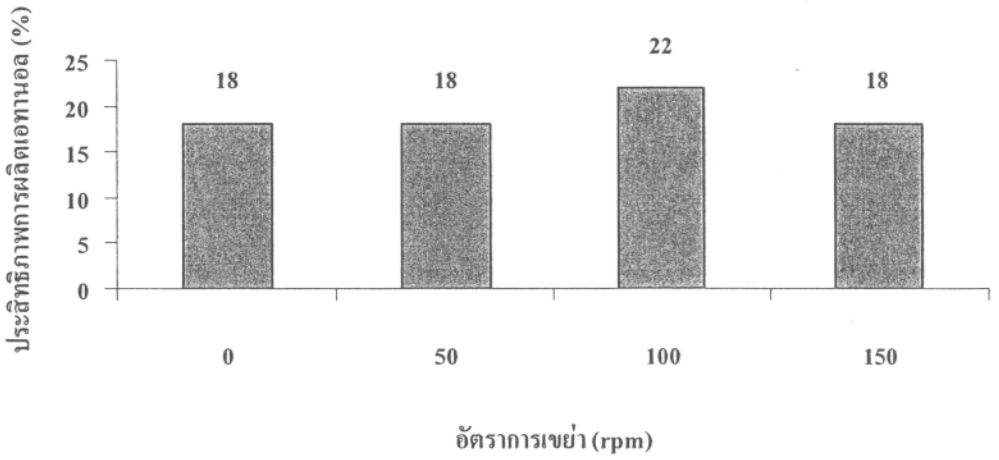
ภาพที่ 4-28 ผลของอัตราการเขย่า ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ เมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าที่อัตราการเขย่าเท่ากับ 100 rpm มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.11 g_p/g_s ส่วนที่ อัตราการเขย่าเท่ากับ 0, 50 และ 150 rpm มีค่าเท่ากันคือ 0.09 g_p/g_s ดังแสดงในภาพที่ 4-29 แต่ค่า Yp/s ทุกชุดการทดลองไม่แตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4-13 ซึ่งจากผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาของ มาโนช โพธิ์สูง (2546) ที่ได้ทำการศึกษาอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 โดยใช้น้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ที่ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.5 พบว่าการใช้อัตราการเขย่าเท่ากับ 100 rpm เป็นอัตราการเขย่าที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR 548 โดยให้ค่า Yp/s ของการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.463 g_p/g_s



ภาพที่ 4-29 ผลของอัตราการเขย่า ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองเปรียบเทียบกับค่าทางทฤษฎี พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราการเขย่าเท่ากับ 100 rpm มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 22 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4-30 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกอัตราการเขย่าเท่ากับ 100 rpm เป็นอัตราการเขย่าที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 และใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-30 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีอัตราการเขย่าแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.5.2.2 อุณหภูมิที่เหมาะสม

โดยทั่วไป *Zymomonas* สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 30-38 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนระหว่างการหมักจะมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้น ซึ่งเป็นผลจากการที่จุลินทรีย์ใช้น้ำตาลในการหมักเอทานอล ความร้อนนี้มีผลกระทบต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ทั้งด้านสรีระวิทยาของเซลล์ การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของน้ำหมักและอัตราการหมักเอทานอล นอกจากนี้ยังมีการระเหยของ เอทานอลและเกิดฟองมากในน้ำหมัก อย่างไรก็ตามการใช้อุณหภูมิที่สูงเกินไปทำให้การเจริญของจุลินทรีย์และอัตราการผลิตเอทานอลต่ำกว่าที่อุณหภูมิการหมักปกติ (Amerine *et al.*, 1980)

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยทำการศึกษาอุณหภูมิที่ใช้บ่มที่ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยสูตรอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิอุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5% (v/v) บ่มด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

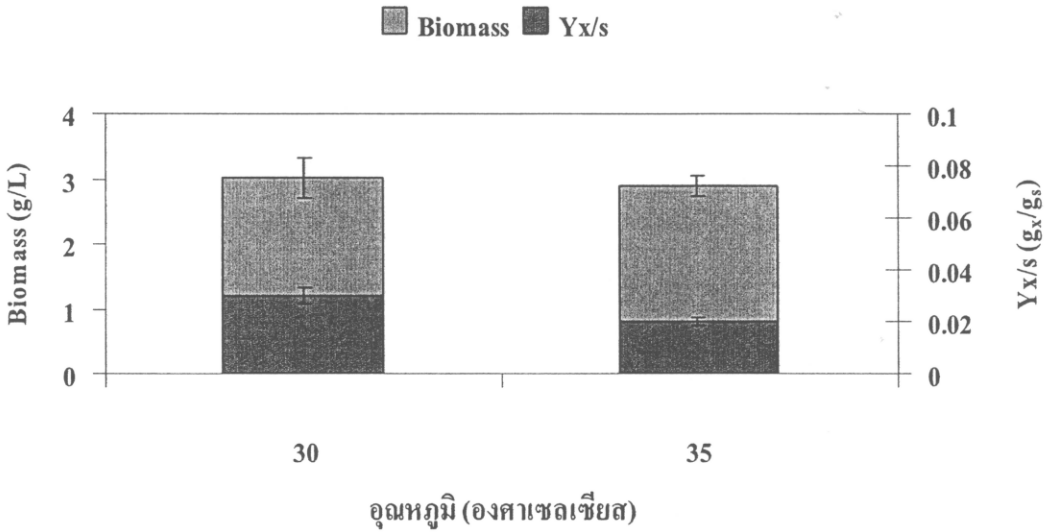
ผลจากการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 4-14 โดยเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าเท่ากับ 0.83% (v/v) คิดเป็น

0.66% (w/v) หรือ 6.56 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 61.10 กรัมต่อลิตร ส่วนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 0.54% (v/v) คิดเป็น 0.43% (w/v) หรือ 4.27 กรัมต่อลิตร โดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้มากกว่าชุดการทดลองที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับมวลชีวภาพทั้ง 2 ชุดการทดลอง มีค่ามวลชีวภาพหลังการหมัก 48 ชั่วโมง ใกล้เคียงกัน คือ ชุดการทดลองที่บ่มอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 3.02 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่า Yx/s เท่ากับ 0.03 g_x/g_s ส่วนที่ 35 องศาเซลเซียส มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 2.89 กรัมต่อลิตร หรือมีค่า Yx/s เท่ากับ 0.02 g_x/g_s ดังแสดงในภาพที่ 4-31 โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4-14 สำหรับ pH ของอาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาของ มาโนช โพธิ์สูง (2546) รายงานว่าค่า pH หลังหมักจะอยู่ในช่วง 4.8-5.2 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการหมักที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส pH ของอาหารหลังหมักลดลงถึง 4 (pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.1)

ตารางที่ 4-14 ผลการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1ต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

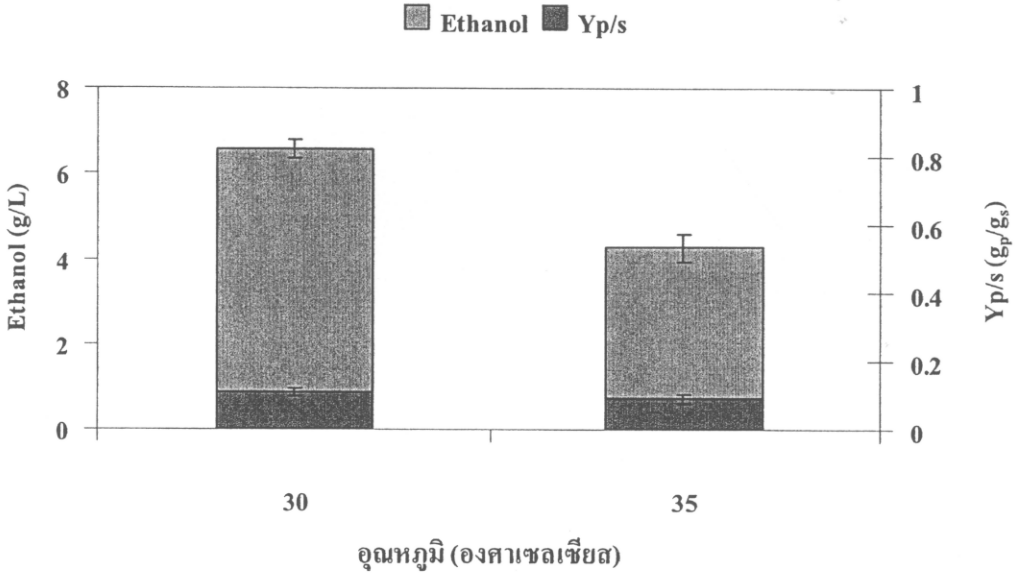
อุณหภูมิ (°C)	น้ำตาลที่ใช้ไป (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ g/L	Yx/s (g_p/g_s)	Yp/s (g_x/g_s)
			g/L	%w/v	% v/v			
30	61.10	5.20	6.56[a]	0.66	0.83	3.02[a]	0.03	0.11[a]
35	42.86	4.63	4.27[b]	0.43	0.54	2.89[a]	0.02	0.09[a]

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



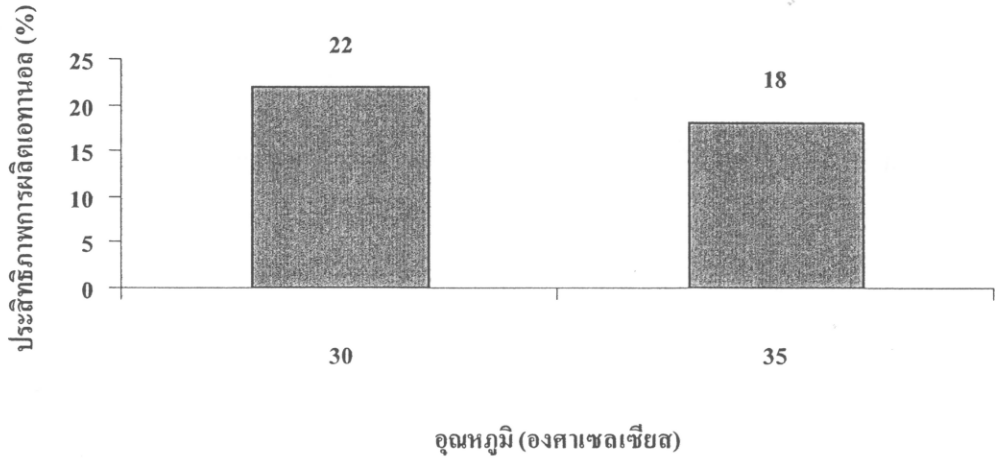
ภาพที่ 4-31 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าชุดการทดลองที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.11 g_p/g_s ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เล็กน้อย โดยที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.09 g_p/g_s ดังแสดงในภาพที่ 4-32 แต่ทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในตารางที่ 4-14 โดย Skotnicki และคณะ (1981) รายงานว่าการผลิตเอทานอลจะลดลง เมื่ออุณหภูมิของการหมักมีค่าเพิ่มสูงขึ้นเกินกว่า 30 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4-32 ผลของอุณหภูมิต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองกับค่าทางทฤษฎี พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลของชุดการทดลองที่บ่มด้วยอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 22 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4-33 โดยสอดคล้องกับรายงานของ Ohta และคณะ (1981) ซึ่งได้รายงานผลของสภาวะแวดล้อมต่อการผลิตเอทานอลของ *Z. mobilis* ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรียชนิดนี้ คือ 30 องศาเซลเซียส ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิสำหรับการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 และใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-33 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีอุณหภูมิแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.3.2.3 ระยะเวลาในการหมักที่เหมาะสม

การผลิตเอทานอลที่ดีจะต้องใช้ระยะเวลาในการหมักที่สั้นและให้ผลผลิตสูง ซึ่งระยะเวลาในการหมักก็จะขึ้นอยู่กับชนิดของสับสเตรต ชนิดของจุลินทรีย์ และสภาวะแวดล้อมต่างๆด้วย งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยทำการหมักเป็นระยะเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้สูตรอาหารที่มีการเติม $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

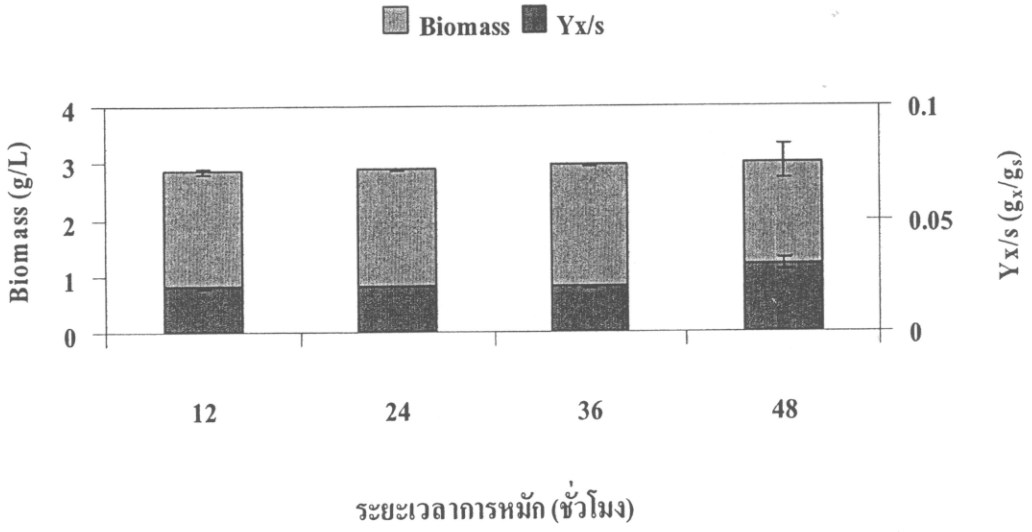
ผลจากการทดลองพบว่า ที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 4-15 โดยเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 0.85% (v/v) คิดเป็น 0.67% (w/v) หรือ 6.72 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 64.60 กรัมต่อลิตร สำหรับที่ระยะเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่าเอทานอลเท่ากับ 4.19, 4.42 และ 6.56 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าเอทานอลที่ผลิตได้ที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง มีค่าไม่แตกต่างกับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง แต่มีค่าแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับมวลชีวภาพที่

ผลิตได้จากการหมัก พบว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาการหมักแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 มีค่ามวลชีวภาพเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยที่ระยะเวลาการหมักเท่ากับ12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มีค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 2.85, 2.89, 2.96 และ 3.02 กรัมต่อลิตร และคิดเป็นค่า Yx/s เท่ากับ 0.02, 0.02, 0.02 และ 0.03 g_x/g_s ตามลำดับดังแสดงในภาพที่ 4-34 โดยทุกชุดการทดลองมีค่ามวลชีวภาพไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ pH ของอาหารหลังการหมักนั้น พบว่าเมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นค่า pH ลดลงเล็กน้อยตามลำดับ

ตารางที่ 4-15 ผลการศึกษาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 น้ำอัดลมหมดอายุ โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

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

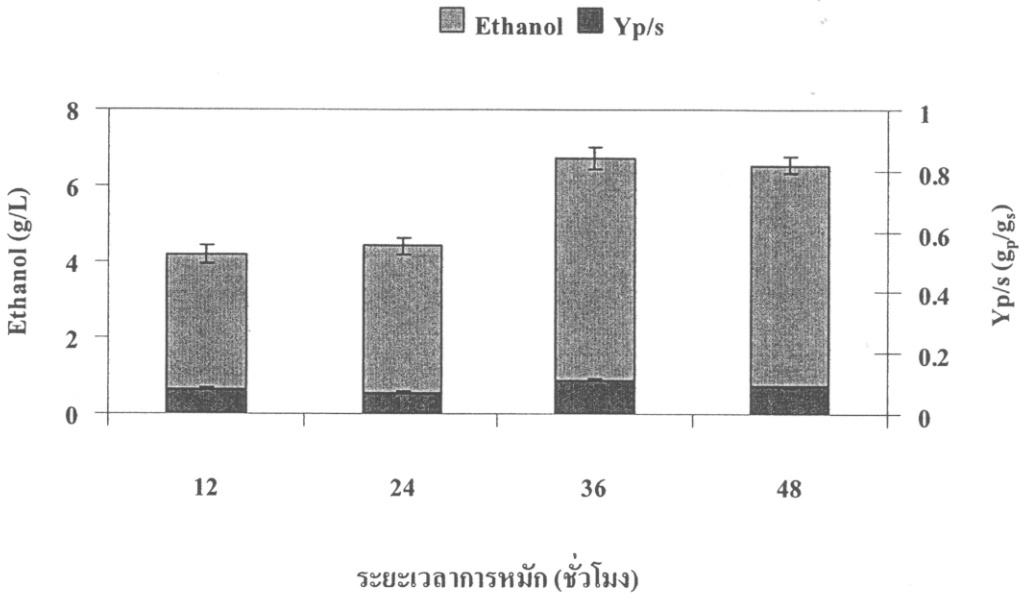
หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



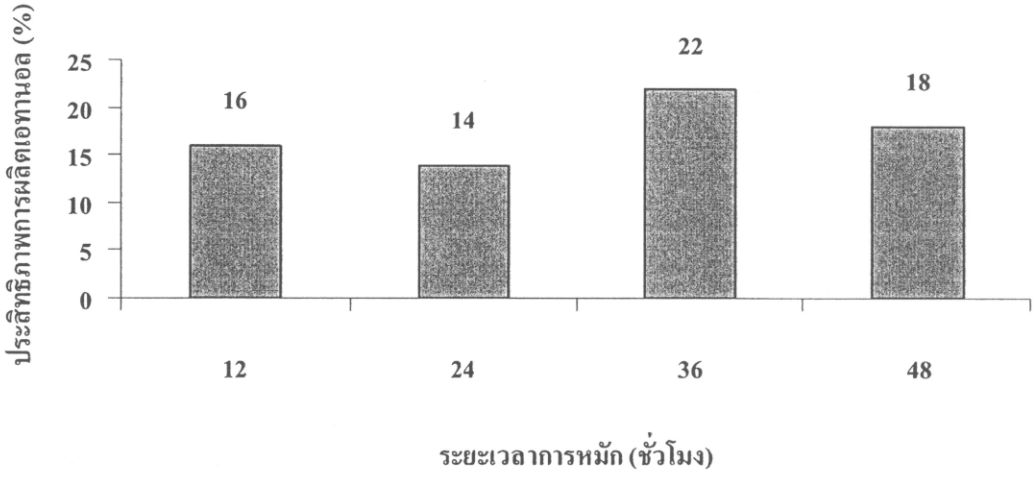
ภาพที่ 4-34 ผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าที่ระยะเวลา 36 ชั่วโมง มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.11 g_p/g_s ส่วนที่ ระยะเวลา 12, 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่า 0.08, 0.07 และ 0.09 g_p/g_s ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-35 โดยทุกชุดการทดลองมีค่า Yp/s ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองกับค่าทางทฤษฎี (0.50) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการหมักเป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 22 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4-36 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกระยะเวลา 36 ชั่วโมง เป็นระยะเวลาการหมักสำหรับการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 และใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-35 ผลของระยะเวลาการหมักต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm



ภาพที่ 4-36 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีระยะเวลาหมักแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm

จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถสรุปได้ว่า สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยการเขย่าด้วยอัตราเร็ว 100 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยที่สภาวะดังกล่าวแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 ผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 6.72 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.11 g_p/g_s โดยใช้น้ำตาลไป 64.60 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 5.15 มีมวลชีวภาพเท่ากับ 2.96 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณหาค่าผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) มีค่าเท่ากับ 0.02 g_x/g_s

แต่เมื่อพิจารณาผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลแล้ว พบว่าค่าเอทานอลที่ได้ (Yp/s) มีค่าน้อยกว่าค่าทฤษฎี (0.5) มาก ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุที่ใช้ในการทดลองอาจมีความเข้มข้นสูงเกินไป แม้ว่าในน้ำอัดลมหมดอายุดังกล่าวซึ่งที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถเจริญเติบโตได้ แต่อาจมีผลต่อการผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์ เพื่อให้แน่ใจถึงความเป็นไปได้ของการนำน้ำอัดลมหมดอายุมาเป็นแหล่งสารอาหารสำหรับการผลิตเอทานอล ทางผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองปรับลดปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุโดยการเจือจาง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุในสภาวะที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่ำกว่า

4.5.3 สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุเจือจางของแบคทีเรีย *Z. mobiilis*

4.5.3.1 ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (น้ำอัดลมหมดอายุ) ที่เหมาะสม

น้ำตาลหรือแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์และการผลิตเอทานอล การใช้น้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงๆ ในการหมักเอทานอลมีผลช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่การใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงๆ ก็มีผลยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอลด้วยเช่นกัน ซึ่งเกิดจากแรงดันออสโมซิสทำให้เซลล์เกิดพลาสโมไลซิสเมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงและมีผลยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส ส่งผลให้ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลลดลง (สาวิตรี, 2540; Lachance, 1990; Panchal and Tavares, 1990) โดยชูศรี สุขุมาลไพบูลย์ (2530) ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 5, 10, 15, 20, 25 และ 30% (w/v) ในการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* IFO 13756 และ CM 141 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในอาหารเพิ่มขึ้น อัตราการหมักเอทานอลจะลดลง

ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยเตรียมอาหารที่มีความเข้มข้นของ $(NH_4)_2SO_4$ 1

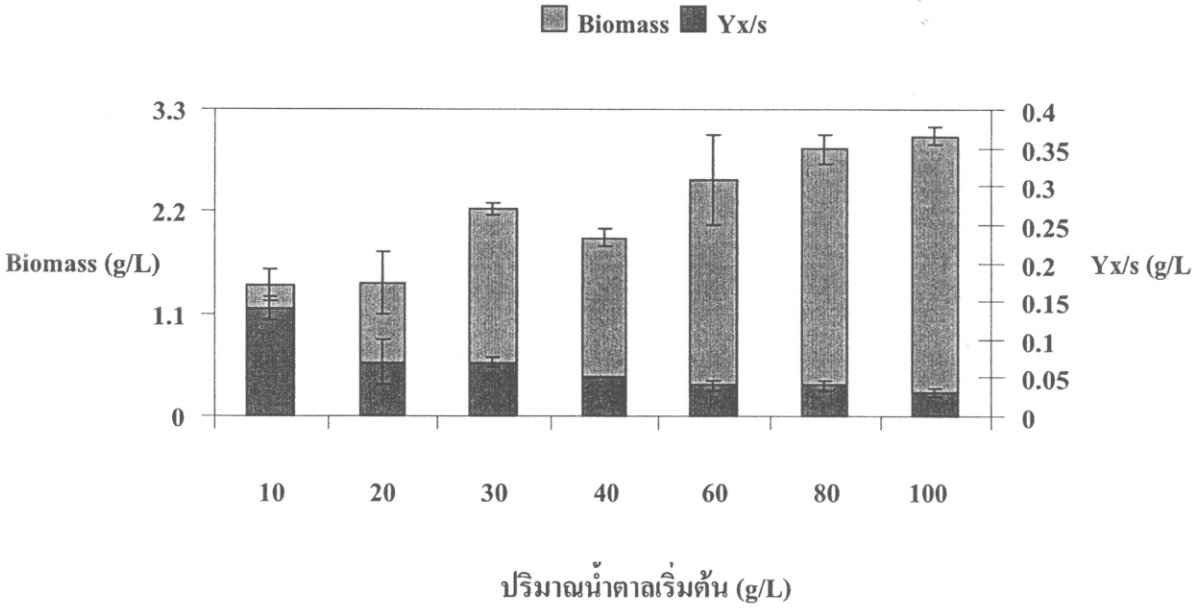
กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่างๆ คือ 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ100 กรัมต่อลิตร ด้วยการเจือจางน้ำอัดลมหมดอายุด้วยน้ำกลั่น ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ใน ฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5% (v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

ผลการทดลองพบว่า ที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 4-16 โดยเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 1.60% (v/v) คิดเป็น 1.26% (w/v) หรือ 12.64 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 33.86 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 10, 20, 30, 40, 60 และ 100 กรัมต่อลิตร (3.24, 5.93, 7.51, 9.48, 12.25 และ 6.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยค่าเอทานอลที่ผลิตได้จากชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร แต่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อมวลชีวภาพ พบว่าที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีมวลชีวภาพเท่ากับ 2.87 กรัมต่อลิตร ส่วนชุดการทดลองอื่น มีมวลชีวภาพเท่ากับ 1.41, 1.43, 2.23, 1.92, 2.54 และ3.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อคำนวณค่า Yx/s พบว่ามีค่า 0.14, 0.07, 0.07, 0.05, 0.05,0.04 และ 0.03 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-37 โดยที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ให้ค่ามวลชีวภาพที่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้งนี้พบว่าที่ปริมาณของน้ำตาลเริ่มต้นต่ำเชื้อแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 นำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญเติบโตมากกว่าการผลิตเอทานอล สำหรับ pH อาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง

ตารางที่ 4-16 ผลการศึกษาปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

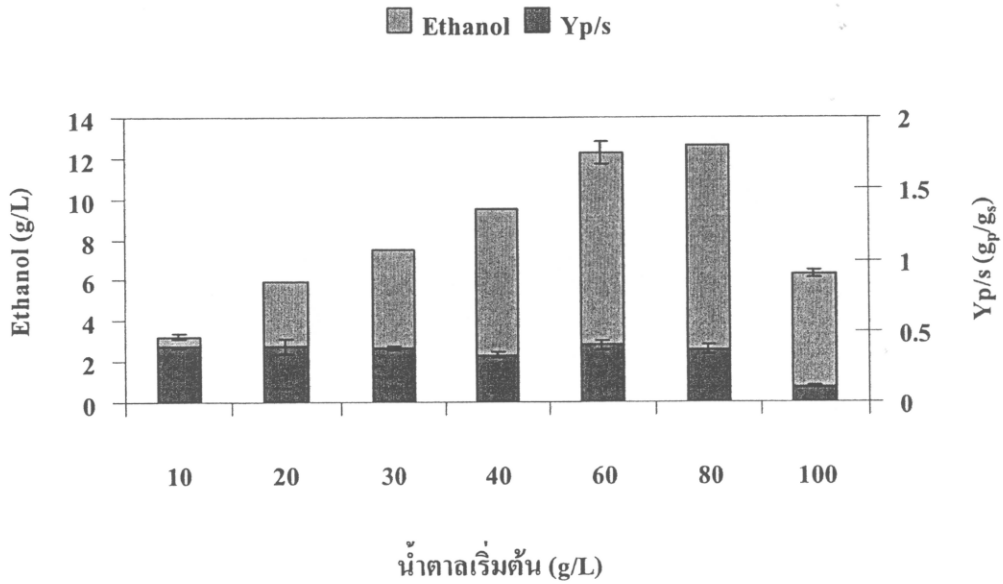
น้ำตาลเริ่มต้น (g/L)	น้ำตาลที่ใช้ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			g/L	%w/v	% v/v			
10	8.25	4.83	3.24[a]	0.32	0.41	1.41[a]	0.39[a]	0.14
20	15.10	4.94	5.93[b]	0.59	0.75	1.43[a]	0.39[a]	0.07
30	19.69	5.01	7.51[c]	0.75	0.95	2.23[b]	0.38[a]	0.07
40	28.36	4.82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

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



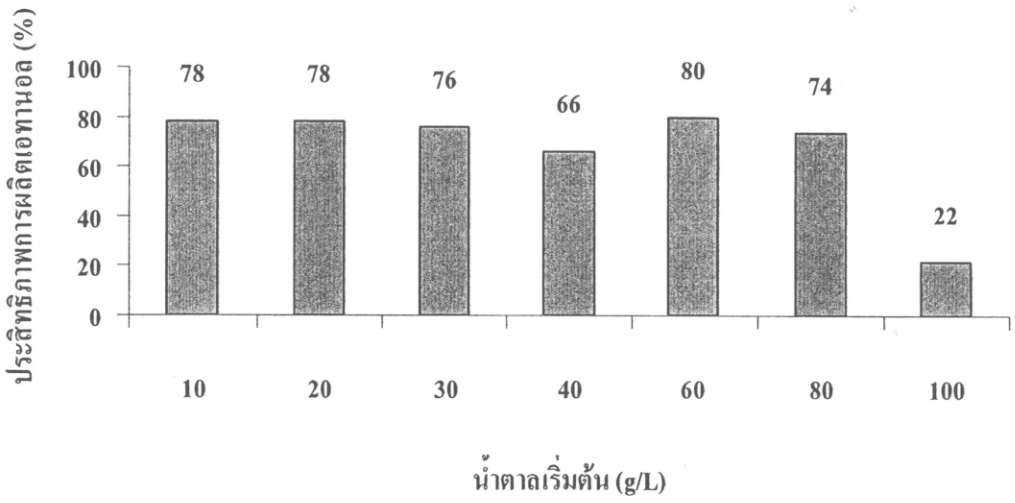
ภาพที่ 4-37 ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าการใช้ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.40 g_p/g_s ส่วนที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นความเข้มข้น10, 20, 30, 40, 80และ100 กรัมต่อลิตร มีค่า 0.39, 0.39, 0.38, 0.33, 0.37 และ0.11 g_p/g_s ตามลำดับ โดยค่า Yp/s ของชุดการทดลองที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร แตกต่างจากชุดการทดลองที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร แต่ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในภาพที่ 4-38 จากผลการทดลองเห็นได้ว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลส่งผลให้เอทานอลที่ได้มีค่าเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Siva Kesava *et al.* (1995) ที่รายงานว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นจาก 50 เป็น 150 กรัมต่อลิตร ค่า Yp/s จะเพิ่มขึ้นจาก 0.45 เป็น 0.50 g_p/g_s แต่จุลินทรีย์จะสามารถทนต่อปริมาณน้ำตาลในสารละลายที่ใช้หมักที่เพิ่มขึ้นได้ในระดับหนึ่ง หากน้ำตาลในปริมาณสูงเกินไป จะมีผลยับยั้งการผลิตเอทานอลของจุลินทรีย์แทน



ภาพที่ 4-38 ผลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองต่อค่าทางทฤษฎี (0.50) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 80 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4-39 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เป็นปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นสำหรับการศึกษาการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 และใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-39 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุที่แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

จากผลการทดลองข้างต้น พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้มีค่าสูงขึ้นจากการศึกษาสูตรอาหารก่อนหน้านี้ โดยเมื่อทำการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ดังนั้นเพื่อให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสม และเพื่อให้แน่ใจว่าน้ำตาลเริ่มต้นที่เปลี่ยนไปมีผลต่อปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลหรือไม่ จึงทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมด้วย

4.3.3.2 ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ($(NH_4)_2SO_4$) ที่เหมาะสม

งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยแหล่งไนโตรเจนที่เติมในอาหาร คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1และ 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5%(v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณ เอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

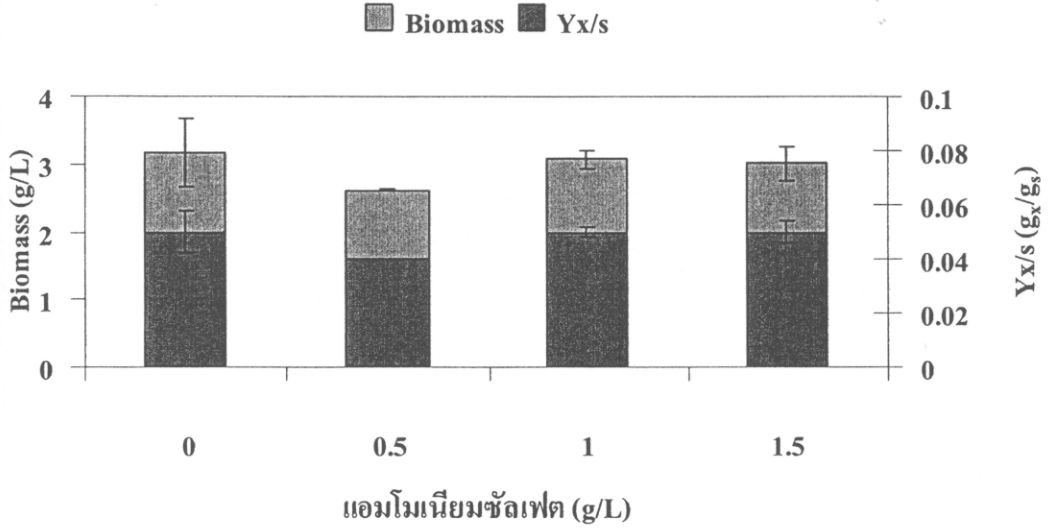
ผลจากการทดลองพบว่า เมื่อใช้อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 4-17

โดยเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 1.55% (v/v) คิดเป็น 1.23% (w/v) หรือ 12.25 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 30.52 กรัมต่อลิตร ส่วนที่ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.5 กรัมต่อลิตร แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิต เอทานอลได้เท่ากับ 11.06, 10.67 และ 10.90 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งสูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับค่ามวลชีวภาพ พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่ามวลชีวภาพหลังการหมัก 36 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยทุกสูตรอาหารมีค่ามวลชีวภาพอยู่ในช่วง 2.67-3.17 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณค่า Yx/s พบว่าทุกชุดการทดลองมีค่าอยู่ในช่วง 0.04 -0.05 g_x/g_s ดังแสดงในภาพที่ 4-40 สำหรับ pH อาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง ในทุกชุดการทดลอง

ตารางที่ 4-17 ผลการศึกษาปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

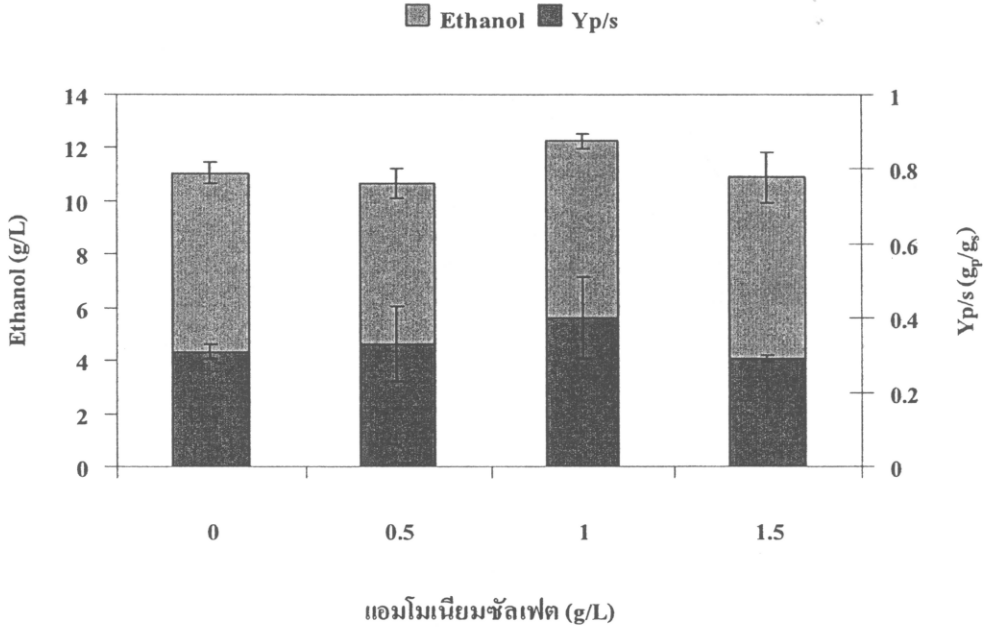
$(NH_4)_2SO_4$ (g/L)	น้ำตาลที่ใช้ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			g/L	%w/v	% v/v			
0	35.76	4.90	11.06[a]	1.11	1.40	3.17[a]	0.31[a]	0.05
0.5	32.31	4.95	10.67[b]	1.07	1.35	2.62[a]	0.33[a]	0.04
1.0	30.52	4.94	12.25[c]	1.23	1.55	3.07[a]	0.40[a]	0.05
1.5	37.31	5.02	10.90[d]	1.09	1.38	3.01[a]	0.29[a]	0.05

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



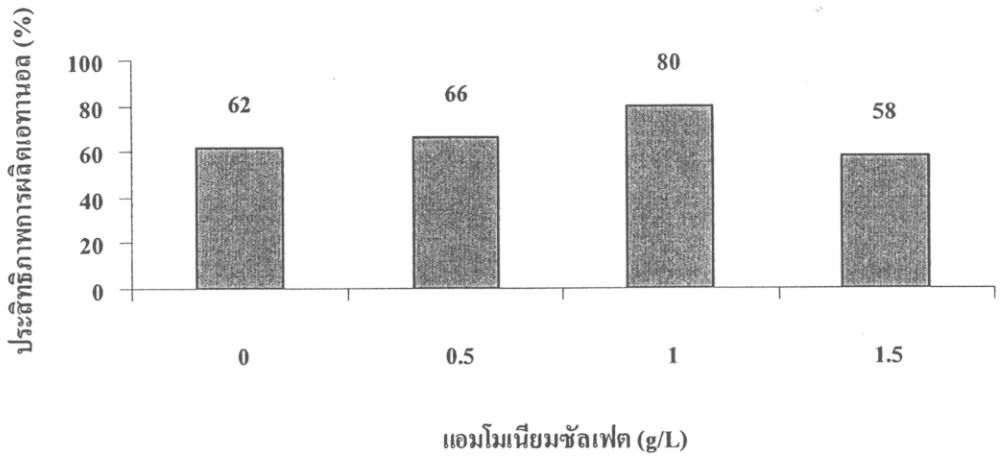
ภาพที่ 4-40 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าการหมักด้วยสูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้น1 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.40 g_p/g_s ส่วนที่ความเข้มข้น 0, 0.5 และ 1.5 กรัมต่อลิตร มีค่า 0.31, 0.33 และ0.29 g_p/g_s ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 4-41 โดยชุดการทดลองที่ใช้สูตรอาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ให้ค่า Yp/s สูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%



ภาพที่ 4-41 ผลของปริมาณแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ทุกชุดการทดลองกับค่าทางทฤษฎี ดังแสดงในภาพที่ 4-42 พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี $(NH_4)_2SO_4$ ที่มีความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 80 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร สำหรับเตรียมสูตรอาหารเพื่อศึกษาการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 ในขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-42 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักด้วยปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ แตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

แม้ว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุเปลี่ยนเป็น 60 กรัมต่อลิตร แต่ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ก็ยังเป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในก่อนหน้าที่ไม่มีการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุ

ดังนั้นเพื่อให้ได้สูตรอาหารที่เหมาะสม และเพื่อให้แน่ใจว่าน้ำตาลเริ่มต้นที่เปลี่ยนไปมีผลต่อ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลหรือไม่ จึงทำการศึกษาหา pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมด้วย

4.5.3.3 pH เริ่มต้น ที่เหมาะสม

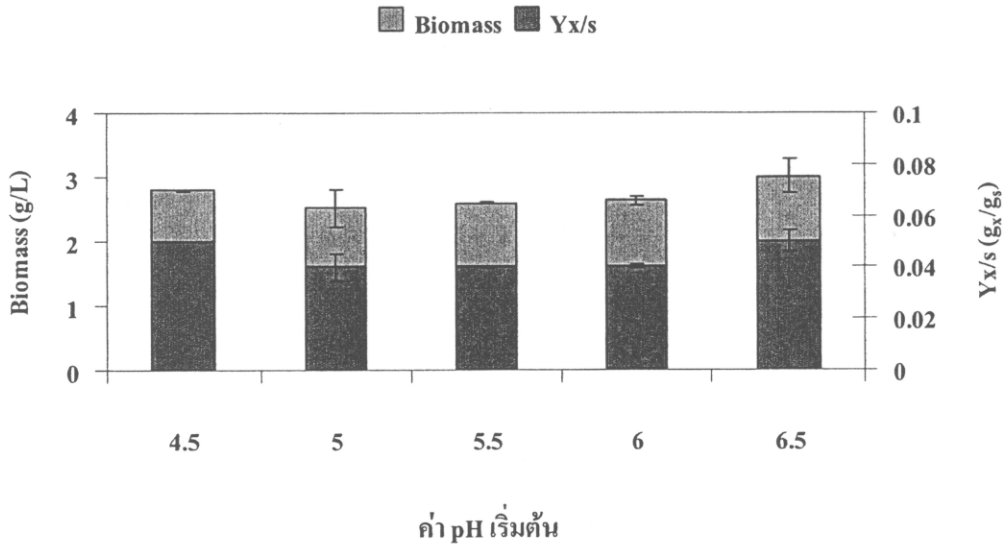
งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารให้มีค่าเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วย 2N NaOH ใช้อาหารที่มีปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ในฟลาสก์ 250 mL ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5%(v/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง นำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

ผลจากการทดลองพบว่าที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด ดังแสดงในตารางที่ 4-18 โดยเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 1.35% (v/v) คิดเป็น 1.07% (w/v) หรือ 10.67 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 30.25 กรัมต่อลิตร ซึ่งสูงกว่าชุดการทดลองที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 6.0 และ 6.5 (5.93, 9.48, 10.51 และ 7.35 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ) โดยค่าเอทานอลที่ ผลิตได้จากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 6 แต่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับผลของค่า pH เริ่มต้นต่อมวลชีวภาพหลังการหมัก 36 ชั่วโมง อยู่ในช่วง 2.52-3.01 กรัมต่อลิตร เมื่อคำนวณหาค่า Yx/s อยู่ในช่วง 0.04-0.05 g_x/g_s ดังแสดงในภาพที่ 4-43 เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับ pH อาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง ทั้งนี้เนื่องจากมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และกรดที่เกิดขึ้นระหว่างการหมัก

ตารางที่ 4-18 ผลการศึกษาค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ สำหรับการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 5.0 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

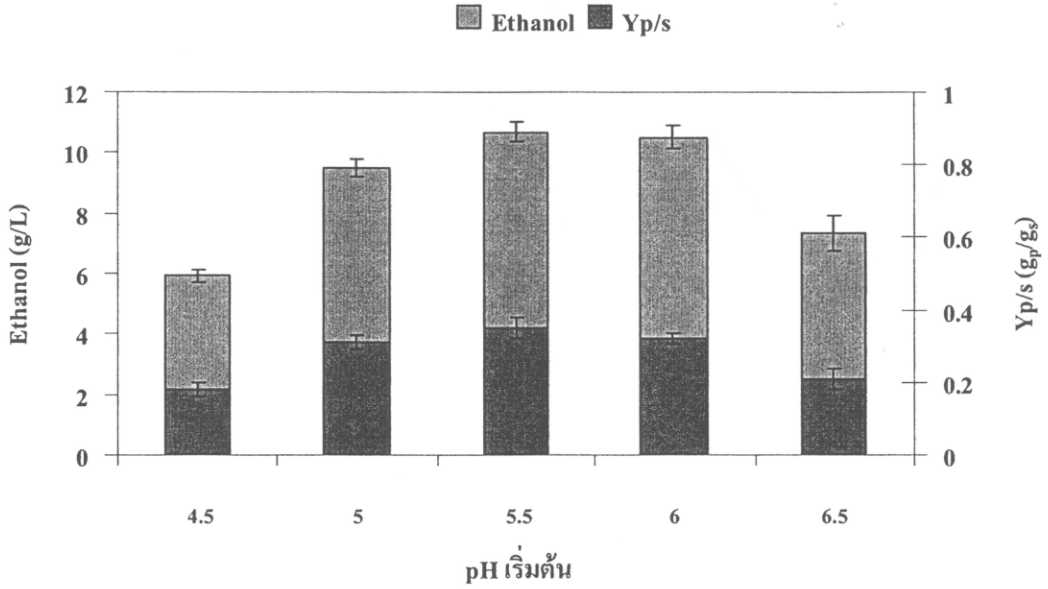
pH เริ่มต้น	น้ำตาลที่ใช้ (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			g/L	%w/v	% v/v			
4.5	33.10	4.36	5.93[a]	0.59	0.75	2.80[a]	0.18[a]	0.05
5	30.82	4.79	9.48[b]	0.95	1.20	2.52[a]	0.31[b]	0.04
5.5	30.25	4.74	10.67[b]	1.07	1.35	2.59[a]	0.35[b]	0.04
6	31.95	4.98	10.51[b]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

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



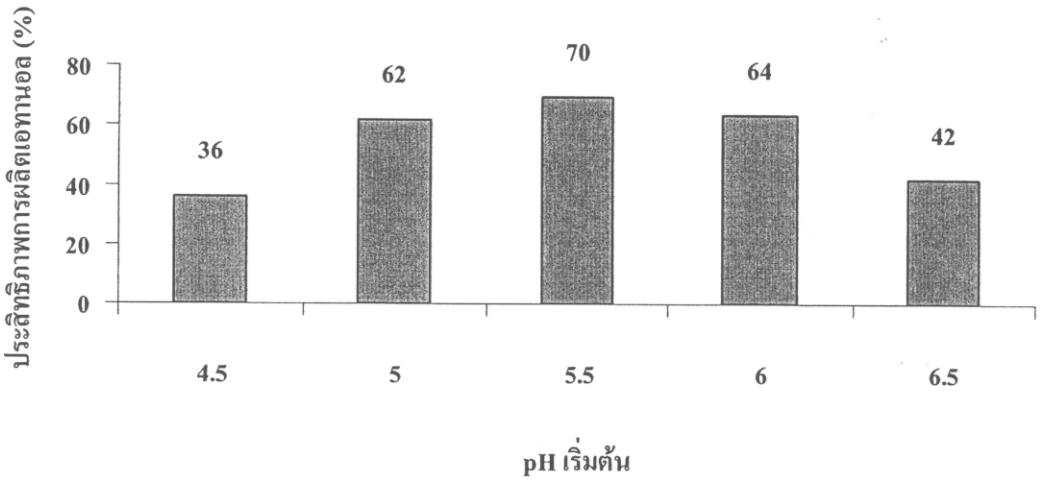
ภาพที่ 4-43 ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 มีค่า Yp/s สูงสุดเท่ากับ 0.35 g_p/g_s ส่วนที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 6.0 และ 6.5 มีค่า 0.18, 0.31, 0.32 และ 0.21 g_p/g_s ตามลำดับ โดยค่า Yp/s ของชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 และ 6 แต่มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในภาพที่ 4-44



ภาพที่ 4-44 ผลของค่า pH เริ่มต้น ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองต่อค่าทางทฤษฎี (0.50) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 มีประสิทธิภาพดีที่สุด คือ 70 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4-45 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกการปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 สำหรับการศึกษาในขั้นต่อไป



ภาพที่ 4-45 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

ซึ่งจากการศึกษา pH เริ่มต้นของอาหาร พบว่าเมื่อปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุเปลี่ยนเป็น 60 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 ก็ยังเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมในก่อนหน้าที่ไม่มีการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุ และการศึกษาของทัศนพร แก้วทองมา (2544) พบว่าที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 แบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด

4.5.3.4 การฆ่าเชื้อในอาหาร

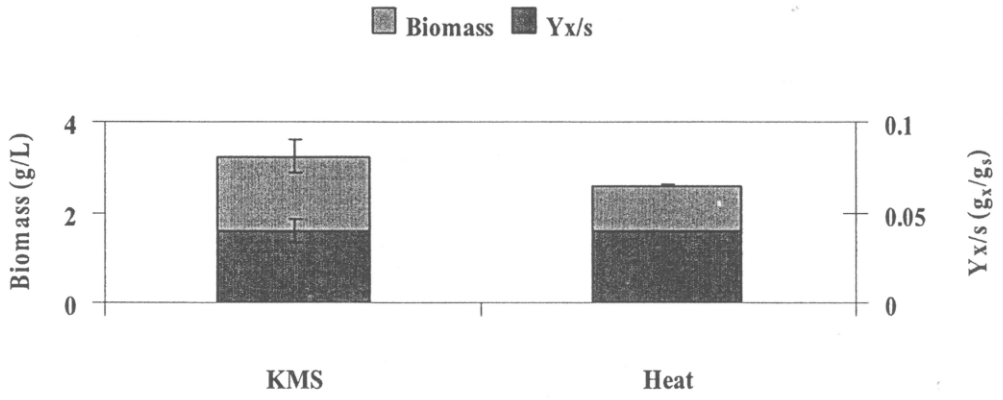
การฆ่าเชื้อในอาหารที่ใช้หมักเอทานอลนั้น นอกจากการใช้ความร้อนโดย Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาทีแล้ว ยังมีการฆ่าเชื้อด้วยสารแอนติไบโอติก ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้เลือกใช้ Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm ในการฆ่าเชื้อในอาหารแทนการใช้ความร้อน โดยใช้อาหารที่มีแหล่งไนโตรเจน $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตร ปรับปริมาตรเป็น 100 mL ด้วยน้ำอัดลมหมดอายุที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น 60 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 ด้วย 2N NaOH ในฟลาสก์ 250 mL จากนั้นเติมแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 (ค่า OD ที่ 660 nm เท่ากับ 0.5) ปริมาตร 5%(v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมงแล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล ปริมาณน้ำตาล มวลชีวภาพ และ pH หลังหมัก

ผลจากการทดลองพบว่าการฆ่าเชื้อในอาหาร โดยใช้ Autoclave ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า การเติม Potassium metabisulfite (KMS) 500 ppm โดยการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนมีค่าเอทานอลเท่ากับ 1.35% (v/v) คิดเป็น 1.07% (w/v) หรือ 10.67 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลไปเท่ากับ 30.25 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในตารางที่ 4-19 ส่วนที่การฆ่าเชื้อในอาหารด้วยการเติม Potassium metabisulfite (KMS) 500 ppm แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้ 7.90 กรัมต่อลิตร เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% สำหรับมวลชีวภาพพบว่า การฆ่าเชื้อด้วยความร้อนมีมวลชีวภาพเท่ากับ 2.59 กรัมต่อลิตร ส่วนการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm ให้ค่ามวลชีวภาพเท่ากับ 3.24 กรัมต่อลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4-46 ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่เมื่อพิจารณาจากค่า Yx/s พบว่าทั้งสองชุดการทดลองมีค่าเท่ากับ 0.04 g_x/g_s สำหรับ pH อาหารหลังการหมักนั้นพบว่ามีค่าลดลง

ตารางที่ 4-19 ผลการศึกษาการฆ่าเชื้อในอาหารต่อการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร โดยใช้ $(NH_4)_2SO_4$ ที่ความเข้มข้น 1.0 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

การฆ่าเชื้ออาหาร	น้ำตาลที่ใช้ไป (g/L)	pH หลังหมัก	เอทานอล			มวลชีวภาพ (g/L)	Yp/s (g_p/g_s)	Yx/s (g_x/g_s)
			g/L	%w/v	% v/v			
KMS	30.95	4.76	7.90[a]	0.79	1.00	3.24[a]	0.26[a]	0.04
Autoclave	30.25	4.74	10.67[b]	1.07	1.35	2.59[b]	0.35[b]	0.04

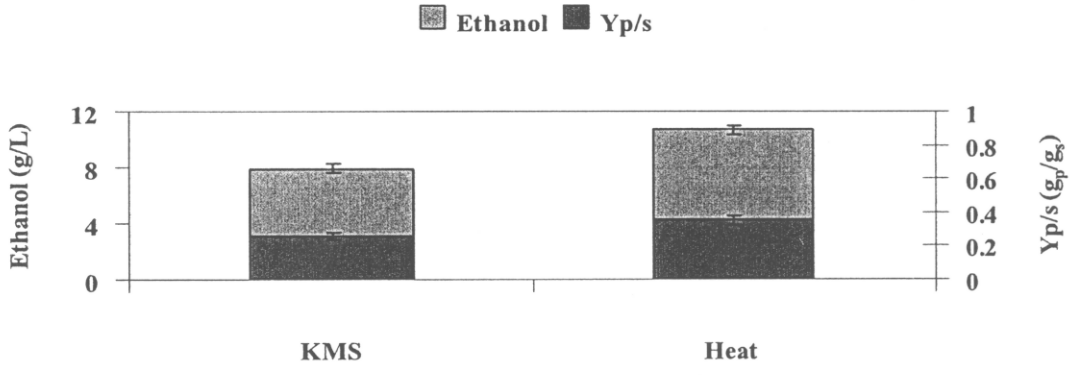
หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์



การฆ่าเชื้อในอาหารสำหรับผลิตเอทานอล

ภาพที่ 4-46 ผลของการฆ่าเชื้อในอาหาร ต่อปริมาณมวลชีวภาพ และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเขย่า 100 rpm เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

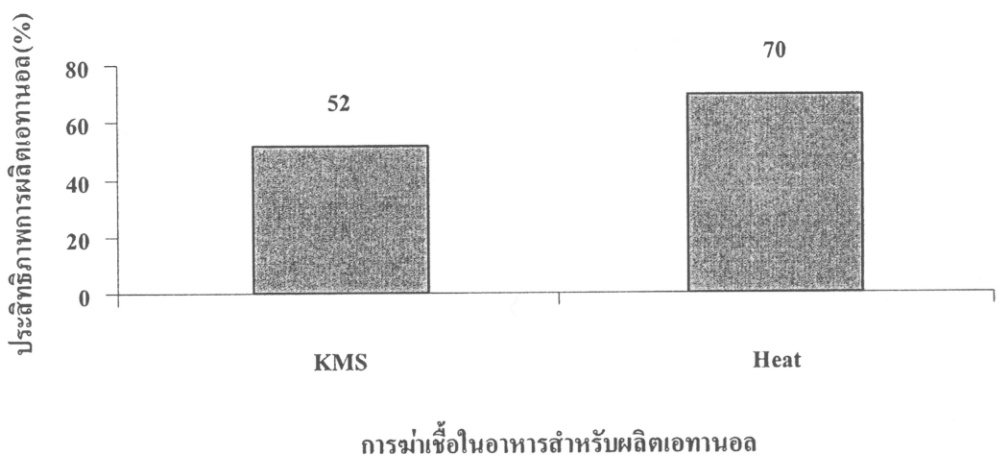
สำหรับการผลิตเอทานอลเมื่อนำมาคำนวณหาค่า Yp/s พบว่าการฆ่าเชื้อด้วยการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อมีค่า Yp/s สูงกว่าเท่ากับ 0.35 g_p/g_s ส่วนการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.26 g_p/g_s โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ดังแสดงในภาพที่ 4-47



การฆ่าเชื้อในอาหารสำหรับผลิตเอทานอล

ภาพที่ 4-47 ผลของฆ่าเชื้อในอาหาร ต่อปริมาณเอทานอล และผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เมื่อเลี้ยง *Z.mobilis* Z_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราการเขย่า 100 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักในด้านผลผลิตที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) ของผลการทดลองกับค่าทางทฤษฎี (0.50) พบว่าประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm คือ 52 เปอร์เซ็นต์ ส่วนประสิทธิภาพการใช้น้ำตาลเพื่อผลิตเอทานอลในสูตรอาหารเลี้ยงที่ใช้ความร้อนฆ่าเชื้อเท่ากับ 70 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4-48 เมื่อพิจารณาแล้วการฆ่าเชื้อในอาหารโดยใช้ความร้อนมีประสิทธิภาพที่ดีกว่า การเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm แม้ว่าการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm สามารถใช้เป็นวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารได้ เนื่องจากแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตและผลิตเอทานอลได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามค่าการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 ด้วยวิธีนี้ให้ค่าเอทานอลน้อยกว่าการใช้ความร้อน แม้มีการรายงานว่าเชื้อ *Z. mobilis* สามารถทนต่อสารฆ่าเชื้อได้ดี แต่ก็ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อที่นำมาใช้ในการทดลอง โดยการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาของศุภนิต หิรัญประดิษฐ์ (2530) ที่พบว่าการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที ทำให้ได้เอทานอลสูงกว่าการใช้ Actidione (Cycloheximind) เท่ากับ 0.1 กรัมต่อลิตร เป็นสารฆ่าเชื้อในน้ำอ้อยเพื่อใช้ในการหมักเอทานอลด้วย *Z. mobilis*



ภาพที่ 4-48 ประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลด้วย *Z.mobilis* Z_4 โดยเปรียบเทียบกับค่า Yp/s จากการทดลองกับค่าทฤษฎี (0.50) สำหรับการหมักด้วยสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติม Potassium metabisulfite (KMS) เท่ากับ 500 ppm และการใช้ความร้อนอุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในสูตรอาหารที่เตรียมจากน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 อัตราการเขย่า 100 rpm บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 ข้างต้นนั้น สรุปได้ว่า สูตรอาหารที่ใช้ต้องมีการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร เติม $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร ทำการปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 และใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ในการฆ่าเชื้อ พบว่าการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 ด้วยสูตรอาหารนี้สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับ 10.67 กรัมต่อลิตร ให้ค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.35 g_p/g_s โดยใช้น้ำตาลไป 30.25 กรัมต่อลิตร มีค่า pH หลังการหมักเท่ากับ 4.74 มีมวลชีวภาพเท่ากับ 2.59 กรัมต่อลิตร และเมื่อคำนวณหาค่าผลผลิตเซลล์ที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yx/s) มีค่าเท่ากับ 0.04 g_x/g_s เป็นสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 และทำให้ค่า Yp/s เพิ่มขึ้นจนใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี (0.50)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 ความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยยีสต์ *S.cerevisiae*

จากการศึกษาการทดลองหมักเอทานอลโดยใช้เชื้อยีสต์สองสายพันธุ์คือ *S.cerevisiae* (S_1) และ *S. cerevisiae* (S_2) พบว่าทั้งสองสายพันธุ์ สามารถใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอลได้ แสดงให้เห็นว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้ในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล เนื่องด้วยลักษณะสมบัติของน้ำอัดลมหมดอายุที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบหลักในปริมาณสูงเท่ากับ 145 กรัมต่อลิตร และมีสภาพความเป็นกรดเท่ากับ 3.02 แต่น้ำอัดลมหมดอายุมีสารอาหารอย่างอื่นน้อยมาก จึงจำเป็นต้องศึกษาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มแหล่งไนโตรเจนให้แก่จุลินทรีย์หมัก และศึกษาสภาวะในการหมักที่เหมาะสม ซึ่งเมื่อนำน้ำอัดลมหมดอายุมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอล โดยทำการศึกษาหาสูตรอาหารที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล โดยใช้ยีสต์ *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) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 0.92 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หรือ 7.24 กรัมต่อลิตร มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.329 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล คิดเป็นค่าประสิทธิภาพการหมักโดยเทียบกับค่าทางทฤษฎีเท่ากับ 64.51 เปอร์เซ็นต์

จากนั้นใช้สูตรอาหารที่ได้จากการศึกษาข้างต้นเพื่อทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) คือ สภาวะที่มีการใช้อัตราการเขย่า 100 รอบต่อนาที บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 1.17 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร หรือ 9.20 กรัมต่อลิตร มีค่าYp/s เท่ากับ 0.384 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล คิดเป็นค่าประสิทธิภาพการหมักโดยเทียบกับค่าทางทฤษฎีเท่ากับ 75.29 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งเอทานอลที่ได้มีค่าต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ ทั้งนี้เพราะ *S.cerevisiae* (S_1) ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสารละลายที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูง จึงต้องเจือจางน้ำอัดลมหมดอายุ ส่งผลให้ปริมาณน้ำตาลที่เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลมีไม่มากนัก ดังนั้นแม้ *S.cerevisiae* (S_1) จะมีค่า Yp/s ค่อนข้างสูง (0.384) แต่เอทานอลที่ผลิตได้ก็มีค่าต่ำ ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าน้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล จึงได้ทำการศึกษาผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุด้วยยีสต์อีกสายพันธุ์หนึ่ง คือ *S. cerevisiae* (S_2) โดยใช้สูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมของใน

การผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) พบว่า ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ในปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นสูง และเมื่อคิดเป็นค่าประสิทธิภาพการหมักในด้าน Yp/s ของการทดลองโดยเทียบกับค่าทางทฤษฎีมีค่าเท่ากับ 98.78 เปอร์เซ็นต์ ผลจากการผลิตเอทานอลของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) สามารถยืนยันได้ว่า น้ำอัดลมหมดอายุมีความเป็นไปได้สำหรับใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล และให้ค่าปริมาณเอทานอลเท่ากับ 6.17 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร 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) ของทุกพารามิเตอร์

นอกจากนี้ ในงานวิจัยนี้ยังได้ทำการการศึกษาเปรียบเทียบการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในน้ำอัดลมหมดอายุด้วยวิธี Autoclave และวิธีเติมสารเคมี KMS เพื่อเป็นแนวทางในการเลือกใช้วิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม ซึ่งผลจากการศึกษา พบว่าวิธีการกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยการเติมสาร KMS 200 ppm ยับยังทำให้ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) ไม่สามารถผลิตเอทานอลได้ เนื่องจาก KMS 200 ppm มีผลไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่ในขณะที่ยีสต์ *S. cerevisiae* (S_2) สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุที่ฆ่าเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวได้ โดยค่าเอทานอลที่ได้จากการกำจัดเชื้อปนเปื้อนด้วยวิธี Autoclave และวิธีการเติมสาร KMS มีค่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

5.2 ความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุโดยแบคทีเรีย *Z.mobilis*

จากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่า เชื้อแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นเชื้อที่สามารถเจริญเติบได้ในน้ำอัดลมหมดอายุไม่เจือจาง (มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 120 g/L) จึงได้ทำการศึกษาสูตรอาหารและสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลของเชื้อดังกล่าวโดยใช้อัดลมหมดอายุไม่เจือจางเป็นแหล่งคาร์บอน ผลการศึกษา พบว่า มีความเป็นไปได้ในการใช้น้ำอัดลมหมดอายุเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อผลิตเอทานอลโดยแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 โดยมีสูตรอาหารที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือ น้ำอัดลมหมดอายุที่ทำการเติมแหล่งไนโตรเจน คือ $(NH_4)_2SO_4$ ปริมาณ 1 g/L และปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 5.14 g/L มีค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.09 g_p/g_s

ส่วนการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำอัดลมหมดอายุของเชื้อแบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 โดยใช้สูตรอาหารที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้า พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 คือ การบ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาะการเข่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง ที่สภาวะดังกล่าว แบคทีเรีย *Z.mobilis* Z_4 สามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 6.72 g/L มีค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เท่ากับ 0.11 g_p/g_s เมื่อพิจารณา

แล้ว พบว่าค่าเอทานอลที่ได้ มีค่าน้อยกว่าค่าทฤษฎี (0.5) มาก ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุที่ใช้ในการทดลองมีความเข้มสูง แม้ว่าในน้ำอัดลมหมดอายุที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 120 g/L แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 สามารถเจริญเติบโตได้ แต่ความเข้มข้นน้ำตาลที่สูงอาจมีผลยับยั้งการผลิตเอทานอลได้

ดังนั้น การศึกษาขั้นต่อมาจึงได้ทำการเจือจางปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำอัดลมหมดอายุลง และศึกษาหาปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ และค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมอีกครั้ง โดยใช้สภาวะการหมักที่ได้จากการศึกษาก่อนหน้า (การบ่มภายใต้สภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 100 rpm ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง) ผลการศึกษาพบว่า สูตรอาหารที่มีการเจือจางปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นลงเท่ากับ 60 g/L ทำให้ *Z.mobilis* Z_4 ผลิตเอทานอลสูงขึ้น ส่วนปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ ที่เหมาะสมและค่า pH เริ่มต้นที่เหมาะสมมีค่าไม่เปลี่ยนแปลง (ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ 1 g/L และ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5) ด้วยสูตรอาหารดังกล่าว *Z.mobilis* Z_4 สามารถผลิต เอทานอลได้สูงสุดเท่ากับ 10.67 g/L ให้ค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s) เพิ่มขึ้นเท่ากับ 0.35 g_p/g_s จนใกล้เคียงกับค่าทางทฤษฎี (0.50)

สำหรับผลการศึกษาทดลองใช้ โพแทสเซียมเมตาไบซัลไฟต์ (KMS) ความเข้มข้น 500 ppm เพื่อการฆ่าเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อแทนการฆ่าเชื้อด้วย Autoclave พบว่าปริมาณ KMS ดังกล่าวมีผลยับยั้งการผลิตเอทานอลของแบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 ทำให้ปริมาณเอทานอลที่แบคทีเรีย *Z. mobilis* Z_4 ผลิตได้ลดลงเหลือเท่ากับ 7.90 g/L มีค่า Yp/s เท่ากับ 0.26 g_p/g_s

สำหรับผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลในตัวอย่างจากการทดลองทั้งหมด ซึ่งทำการตรวจวัดในเบื้องต้นด้วยเครื่อง Ebulliometer และสุ่มยืนยันผลด้วยการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC พบว่า การตรวจวัดหาปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง GC ให้ค่าเอทานอลมากกว่าการตรวจวัดปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Ebulliometer ของทุกตัวอย่างที่ทำการตรวจวัด และเมื่อเปรียบเทียบสัดส่วนความต่างพบว่ามีความแตกต่างกันเท่ากับ 0.23±0.024 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

เอกสารอ้างอิง

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

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

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

จรูญ คำนวนตา, ประดิษฐ์ ครุวัณณา, ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ และวิชชุพร ว่องสุวรรณเลิศ. 2525. รายงานการสำรวจการหมักแอลกอฮอล์ของโรงงานแห่งหนึ่งในช่วงวิกฤติการของการ หมัก. วารสารชมรมผู้หมักแอลกอฮอล์แห่งประเทศไทย. 1 (1): 6-13.

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

ชุติมา ศรีงิ้ว. 2548. การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

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

ณัฐกิตติ์ ธรรมเจริญ. 2543. เหล้าพื้นบ้าน. กรุงเทพฯ : บริษัทนาคาอินเตอร์มีเดียจำกัด. 190 หน้า.

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

ทัศนพร แก้วทองมา. 2544. การผลิตเอธานอลโดยระบบ pH-auxostat : ผลของรูปแบบการควบคุมอัตโนมัติ และความ เป็นกรดด่าง ต่อการเจริญของ *Zymomonas mobilis*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

เทพปัญญา เจริญรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากมันสำปะหลังแบบครั้งคราวโดยการเติมสับสเทรตขึ้นกับพีเอช. วิทยานิพนธ์ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร. หน้า 1-117.

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

ปนิดา กิตติรัตน์หมาย. 2546. การปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลโดยใช้ยีสต์ตกตะกอน และเทคนิครีพีทเฟดแบทช์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์. 2547. การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำอ้อยโดย *S. cerevisiae* SKP1 ในการเลี้ยงเชื้อแบบ เฟด-แบตช์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปราโมทย์ ธรรมรัตน์ ประดิษฐ์ ครุวัณณา และจรูญ คำนวนตา. 2525. การศึกษาผลของสภาพการหมักต่อประสิทธิภาพการหมักแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาล. รายงานผลการวิจัยเรื่อง ขบวนการที่เหมาะสมสำหรับการหมักแอลกอฮอล์จากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้าสันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์วิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มารศรี จันสี. 2548. การปรับปรุง *Zymomonas* sp. เพื่อเพิ่มการผลิตเอทานอลโดยใช้รังสีอัลตร้า ไวโอเลตและสารฟีนอล. โครงงานทางเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มาโนช โพธิ์สูง. 2546. การผลิตเอทานอลจากน้ำเชื่อมที่ได้จากการย่อยกากมันสำปะหลังโดย แบคทีเรีย *Zymomonas mobilis*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

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

ระวีวรรณ แกล้วกล้า. 2538. การผลิตเอทานอลจากฟางข้าว. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. ภาควิชาเคมีเทคนิคบัณฑิตวิทยาลัย. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วนิดา พรมขาวทอง. 2547. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตเอทานอล. โครงงานทางจุล ชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

ศิริพร ล้านแปง. 2539. การผลิตเอธานอลแบบต่อเนื่องโดยยีสต์ที่ชอบเกาะกลุ่มสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* TJ1. เชียงใหม่. ภาควิชาชีวเคมีและชีวเคมีเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

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

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

สมใจ ศิริโภค. 2550. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์พิมพ์ดี จำกัด.

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

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

Amerine, M.A. and Ough, C.S., 1980. Methods of Analysis of Mustc and Wines. New York: John Wiley & Sons. 121 p.

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

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

Brandberg, T., C. J. Franzen and L. Gustafsson. 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., S. Jin. 2006. Effect of ethanol and yeast on cellulase activity and hydrolysis of crystalline cellulose. Enzyme and Microb. Technol. 39 : 1430-1432.

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

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

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

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.

Kiran Sree 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.

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

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

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

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

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

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.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Zoecklein, B.W., K.C. Fugelsang., B.H. Gump and F.S. Nury. 1995. Wine Analysis and Production. New York: The Chapman and Hall. 621 p.

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 และสมารถดูดซับแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่นแสง 480-490 นาโนเมตร สำหรับกลไกการเกิดปฏิกิริยาเชื่อว่าในกรณีน้ำตาล oligo- และ polysaccharide ถูกตัดพันธะอีเธอร์ระหว่างโมเลกุลให้ออกจากกันด้วยกรด พร้อมกันนั้นก็เกิดปฏิกิริยาขจัดน้ำออก และมีการแทนที่ด้วยอนุพันธ์ของเฟอร์ฟูรอล (Furfural derivatives) ซึ่งจะเกิดการรวมตัวกับฟีนอล กลายไปเป็นสีไตรเอริลมีเทน เป็นสารประกอบสีส้ม (Triarylmethane dyes)

1.2 สารเคมี

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

1.3 วิธีการวิเคราะห์

1. ใส่สารตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง (ใช้น้ำกลั่นเป็น Blank)
2. เติมสารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ลงในสารผสมในข้อ
3. ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) (ระวังกรดผสมน้ำจะเดือด) ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที

[พิมพ์ข้อความ]

4. นำสารตัวอย่างในแต่ละหลอดไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เทียบความเข้มข้นกับกราฟสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน (Standard curve)

1.4 การคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดสามารถคำนวณได้จากสมการต่อไปนี้

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

โดยที่ความชัน = ค่าความชัน (Slope) ของกราฟมาตรฐาน

การเจือจาง = ค่าการเจือจางตัวอย่างที่ใช้วิเคราะห์

2. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยใช้เครื่องมือ Ebulliometer

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 และทำการปรับตำแหน่งค่าอุณหภูมิ ของแผ่นแสดงอุณหภูมิ ที่อ่านได้ให้ตรงกับตำแหน่งเลขศูนย์ของค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์

3. ทำการตวงน้ำตัวอย่างลงในหลอดแก้วจนถึงขีด Eau แล้วนำไปเติมลงในช่องตัวอย่างและทำการต้มจนน้ำเดือดอีกครั้ง จากนั้นอ่านค่าอุณหภูมิที่ได้จากปรอท และอ่านค่าอุณหภูมิที่ได้เทียบกับค่าเปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์บนแผ่นแสดงอุณหภูมิ

3. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง Gas chromatography

แก๊สโครมาโตกราฟี เป็นการแยกสารอีกชนิดหนึ่งโดยให้สารที่ต้องการแยกกระจายไประหว่าง 2 Phase คือ Mobile phase ซึ่งเป็นก๊าซ 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

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 เซลล์ที่อยู่คาบเส้นทั้งด้านขวา และ ด้านล่าง ส่วนเซลล์ที่คาบเส้นอยู่ทางดานซ้าย และ ด้านบนจะไม่นับ จำนวนเซลล์ที่นับได้ต้องอยู่ระหว่าง 10-30 เซลล์ ถ้ามาก หรือน้อยกว่านั่นจะต้องทำการเจือจางใหม่ ทำการนับทีละ Filled ตามแนวทะแยงซ้ายขวา จนกระทั่งได้จำนวนเซลล์รวมทั้งหมดประมาณ 300 เซลล์

4.3 การคำนวณ

ขนาดความลึกของ Hemacytometer = 0.1 mm

ขนาดพื้นที่ 1 ช่องใหญ่ของ Hemacytometer = 0.2×0.2 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

โดยนำกระดาษกรองไปอบที่ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักกระดาษก่อนและหลังกรอง รายงานผลเป็น กรัมน้ำหนักเซลล์แห้งต่อลิตร

5. การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

5.1 หลักการ

กรองน้ำตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง (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. การคำนวณปริมาณแอลกอฮอล์จากเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร %(v/v) เป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (กรัมต่อลิตร)

สมมติปริมาณแอลกอฮอล์ที่วัดได้จากวิธีแก๊สโครมาโตรกราฟี (GC) ได้ Aเปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

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 กรัมต่อมิลลิลิตร

2. การคำนวณค่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ต่อสารตั้งต้น (Yp/s)

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

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

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 (ΔP) = 5.97 กรัมต่อลิตร

(ΔS) = (98 —1.30) กรัมต่อลิตร

= 96.7 กรัมต่อลิตร

Yx/s = 5.97 / 96.7

= 0.061 กรัมน้ำหนักแห้งต่อกรัมน้ำตาล

4. การคำนวณค่าประสิทธิภาพผลได้ (Yield efficiency)

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

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 0.504 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสมารถนำมาคำนวณหาค่าประสิทธิภาพผลได้เมื่อเทียบกับค่าทฤษฎี จากสูตรได้ดังนี้

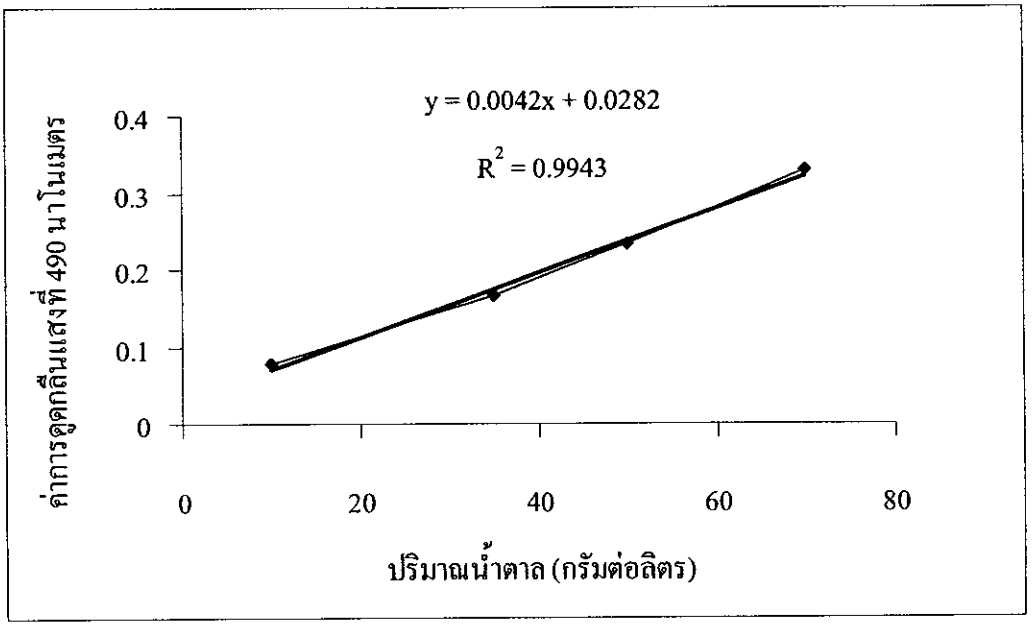
$$\text{ค่าประสิทธิภาพผลได้ (\%)} = \frac{0.504 \times 100}{0.51}$$

$$= 98.82$$

ภาคผนวก ค

กราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ค-1 กราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสโดยวิธี phenol sulfuric



ภาคผนวก ง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ทำการวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS (Vertion 11.5) โดยใช้ ANOVA วิธี least-significant different (LSD)

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

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
ปริมาณน้ำตาล	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
ปริมาณน้ำตาล	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
ปริมาณน้ำตาล	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.

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

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
ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$	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
ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$	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
ปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$	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.

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

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
pH เริ่มต้น	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
pH เริ่มต้น	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
pH เริ่มต้น	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.

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

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
อัตราการเขย่า	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
อัตราการเขย่า	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
อัตรการเขย่า	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.

ภาคผนวก ง-5 การหมักเอทานอลและการเจริญของยีสต์ *S. cerevisiae* (S_1) จากน้ำอัดลมหมดอายุโดยบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 35 องศาเซลเซียส

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
อุณหภูมิ	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
อุณหภูมิ	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
อุณหภูมิ	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.

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

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
ระยะเวลาการหมัก	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
ระยะเวลาการหมัก	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
ระยะเวลาการหมัก	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.

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

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
ยีสต์ (S_2)	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
ยีสต์ (S_2)	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

Dependen Variable	(I) GRP	(J) GRP	Mean Difference(I-J)	Std.Error	Sig.	95% Confidence Interval	
						Lower Bound	Upper Bound
Yp/s	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.

ภาคผนวก ง-8 การหมักเอทานอลและการเจริญของ *Z.mobilis* (Z_4) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ความเข้มข้น $(NH_4)_2SO_4$ 0.5, 1.0, 1.5, 3.0 และ 4.5 กรัมต่อลิตร

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3.550	5	.710	78.889	.000
Within Groups	.108	12	.009		
Total	3.658	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
เอทานอล	.00	.50	-.00183	.07746	.982	-.1706	.1669
		1	-1.18500(*)	.07746	.000	-1.3538	-1.0162
		1.50	-.10750	.07746	.190	-.2763	.0613
		3	.00000	.07746	1.00	-.1688	.1688
		4.50	.09217	.07746	.257	-.0766	.2609
	.50	.00	.00183	.07746	.982	-.1669	.1706
		1	-1.18317(*)	.07746	.000	-1.3519	-1.0144
		1.50	-.10567	.07746	.198	-.2744	.0631
		3	.00183	.07746	.982	-.1669	.1706
		4.50	.09400	.07746	.248	-.0748	.2628
	1	.00	1.18500(*)	.07746	.000	1.0162	1.3538
		.50	1.18317(*)	.07746	.000	1.0144	1.3519
		1.50	1.07750(*)	.07746	.000	.9087	1.2463
		3	1.18500(*)	.07746	.000	1.0162	1.3538
		4.50	1.27717(*)	.07746	.000	1.1084	1.4459
	1.50	.00	.10750	.07746	.190	-.0613	.2763
		.50	.10567	.07746	.198	-.0631	.2744
		1	-1.07750(*)	.07746	.000	-1.2463	-.9087

		3	.10750	.07746	.190	-.0613	.2763
		4.50	.19967(*)	.07746	.024	.0309	.3684

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.010	5	.002	.201	.956
Within Groups	.117	12	.010		
Total	.127	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
มวลชีวภาพ	.00	.50	.06000	.08076	.472	-.1160	.2360
		1	-.01000	.08076	.904	-.1860	.1660
		1.50	.04000	.08076	.629	-.1360	.2160
		3	.02000	.08076	.809	-.1560	.1960
		4.50	.02000	.08076	.809	-.1560	.1960
	.50	.00	-.06000	.08076	.472	-.2360	.1160
		1	-.07000	.08076	.403	-.2460	.1060
		1.50	-.02000	.08076	.809	-.1960	.1560
		3	-.04000	.08076	.629	-.2160	.1360
		4.50	-.04000	.08076	.629	-.2160	.1360
	1	.00	.01000	.08076	.904	-.1660	.1860
		.50	.07000	.08076	.403	-.1060	.2460
		1.50	.05000	.08076	.547	-.1260	.2260
		3	.03000	.08076	.717	-.1460	.2060
		4.50	.03000	.08076	.717	-.1460	.2060
	1.50	.00	-.04000	.08076	.629	-.2160	.1360
		.50	.02000	.08076	.809	-.1560	.1960

		1	-.05000	.08076	.547	-.2260	.1260
		3	-.02000	.08076	.809	-.1960	.1560
		4.50	-.02000	.08076	.809	-.1960	.1560
	3	.00	-.02000	.08076	.809	-.1960	.1560
		.50	.04000	.08076	.629	-.1360	.2160
		1	-.03000	.08076	.717	-.2060	.1460
		1.50	.02000	.08076	.809	-.1560	.1960
		4.50	.00000	.08076	1.000	-.1760	.1760
	4.50	.00	-.02000	.08076	.809	-.1960	.1560
		.50	.04000	.08076	.629	-.1360	.2160
		1	-.03000	.08076	.717	-.2060	.1460
		1.50	.02000	.08076	.809	-.1560	.1960
		3	.00000	.08076	1.000	-.1760	.1760

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.003	5	.001	23.726	.000
Within Groups	.000	12	.000		
Total	.003	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
Yp/s	.00	.50	-.00455	.00408	.287	-.0134	.0044
		1	-.03572(*)	.00408	.000	-.0446	-.0268
		1.50	-.00540	.00408	.211	-.0143	.0035
		3	-.00302	.00408	.473	-.0119	.0059
		4.50	.00269	.00408	.523	-.0062	.0116
	.50	.00	.00455	.00408	.287	-.0044	.0134

		1	-.03117(*)	.00408	.000	-.0401	-.0223
		1.50	-.00086	.00408	.837	-.0098	.0080
		3	.00152	.00408	.716	-.0074	.0104
		4.50	.00724	.00408	.102	-.0017	.0161
	1	.00	.03572(*)	.00408	.000	.0268	.0446
		.50	.03117(*)	.00408	.000	.0223	.0401
		1.50	.03032(*)	.00408	.000	.0214	.0392
		3	.03270(*)	.00408	.000	.0238	.0416
		4.50	.03841(*)	.00408	.000	.0295	.0473
	1.50	.00	.00540	.00408	.211	-.0035	.0143
		.50	.00086	.00408	.837	-.0080	.0098
		1	-.03032(*)	.00408	.000	-.0392	-.0214
		3	.00238	.00408	.571	-.0065	.0113
		4.50	.00809	.00408	.071	-.0008	.0170
	3	.00	.00302	.00408	.473	-.0059	.0119
		.50	-.00152	.00408	.716	-.0104	.0074
		1	-.03270(*)	.00408	.000	-.0416	-.0238
		1.50	-.00238	.00408	.571	-.0113	.0065
		4.50	.00571	.00408	.187	-.0032	.0146
	4.50	.00	-.00269	.00408	.523	-.0116	.0062
		.50	-.00724	.00408	.102	-.0161	.0017
		1	-.03841(*)	.00408	.000	-.0473	-.0295
		1.50	-.00809	.00408	.071	-.0170	.0008
		3	-.00571	.00408	.187	-.0146	.0032

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

ภาคผนวก ง-9 การหมักเอทานอลและการเจริญของ *Z.mobilis* (Z_4) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, และ 6.5

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19.387	4	4.847	433.517	.000
Within Groups	.056	5	.011		
Total	19.443	9			

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
เอทานอล	4.50	5.00	-1.57000(*)	.10574	.000	-1.8418	-1.2982
		5.50	-3.55500(*)	.10574	.000	-3.8268	-3.2832
		6.00	-3.56000(*)	.10574	.000	-3.8318	-3.2882
		6.50	-3.15500(*)	.10574	.000	-3.4268	-2.8832
	5.00	4.50	1.57000(*)	.10574	.000	1.2982	1.8418
		5.50	-1.98500(*)	.10574	.000	-2.2568	-1.7132
		6.00	-1.99000(*)	.10574	.000	-2.2618	-1.7182
		6.50	-1.58500(*)	.10574	.000	-1.8568	-1.3132
	5.50	4.50	3.55500(*)	.10574	.000	3.2832	3.8268
		5.00	1.98500(*)	.10574	.000	1.7132	2.2568
		6.00	-.00500	.10574	.964	-.2768	.2668
		6.50	.40000(*)	.10574	.013	.1282	.6718
	6.00	4.50	3.56000(*)	.10574	.000	3.2882	3.8318
		5.00	1.99000(*)	.10574	.000	1.7182	2.2618
		5.50	.00500	.10574	.964	-.2668	.2768

		6.50	.40500(*)	.10574	.012	.1332	.6768
	6.50	4.50	3.15500(*)	.10574	.000	2.8832	3.4268
		5.00	1.58500(*)	.10574	.000	1.3132	1.8568
		5.50	-.40000(*)	.10574	.013	-.6718	-.1282
		6.00	-.40500(*)	.10574	.012	-.6768	-.1332

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.054	4	.014	.156	.952
Within Groups	.434	5	.087		
Total	.489	9			

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
BIOMASS	4.50	5.00	-.08000	.29472	.797	-.8376	.6776
		5.50	-.16500	.29472	.600	-.9226	.5926
		6.00	-.10000	.29472	.748	-.8576	.6576
		6.50	-.21500	.29472	.498	-.9726	.5426
	5.00	4.50	.08000	.29472	.797	-.6776	.8376
		5.50	-.08500	.29472	.785	-.8426	.6726
		6.00	-.02000	.29472	.949	-.7776	.7376
		6.50	-.13500	.29472	.666	-.8926	.6226
	5.50	4.50	.16500	.29472	.600	-.5926	.9226
		5.00	.08500	.29472	.785	-.6726	.8426
		6.00	.06500	.29472	.834	-.6926	.8226
		6.50	-.05000	.29472	.872	-.8076	.7076

	6.00	4.50	.10000	.29472	.748	-.6576	.8576
		5.00	.02000	.29472	.949	-.7376	.7776
		5.50	-.06500	.29472	.834	-.8226	.6926
		6.50	-.11500	.29472	.712	-.8726	.6426
	6.50	4.50	.21500	.29472	.498	-.5426	.9726
		5.00	.13500	.29472	.666	-.6226	.8926
		5.50	.05000	.29472	.872	-.7076	.8076
		6.00	.11500	.29472	.712	-.6426	.8726

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.005	4	.001	9.036	.016
Within Groups	.001	5	.000		
Total	.006	9			

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
Yp/s	4.50	5.00	-.02000	.01183	.152	-.0504	.0104
		5.50	-.06000(*)	.01183	.004	-.0904	-.0296
		6.00	-.05500(*)	.01183	.006	-.0854	-.0246
		6.50	-.02500	.01183	.088	-.0554	.0054
	5.00	4.50	.02000	.01183	.152	-.0104	.0504
		5.50	-.04000(*)	.01183	.020	-.0704	-.0096
		6.00	-.03500(*)	.01183	.032	-.0654	-.0046
		6.50	-.00500	.01183	.690	-.0354	.0254
	5.50	4.50	.06000(*)	.01183	.004	.0296	.0904

		5.00	.04000(*)	.01183	.020	.0096	.0704
		6.00	.00500	.01183	.690	-.0254	.0354
		6.50	.03500(*)	.01183	.032	.0046	.0654
	6.00	4.50	.05500(*)	.01183	.006	.0246	.0854
		5.00	.03500(*)	.01183	.032	.0046	.0654
		5.50	-.00500	.01183	.690	-.0354	.0254
		6.50	.03000	.01183	.052	-.0004	.0604
	6.50	4.50	.02500	.01183	.088	-.0054	.0554
		5.00	.00500	.01183	.690	-.0254	.0354
		5.50	-.03500(*)	.01183	.032	-.0654	-.0046
		6.00	-.03000	.01183	.052	-.0604	.0004

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

ภาคผนวก ง-10 การหมักเอทานอลและการเจริญของ *Z.mobilis* (Z_4) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่สภาวะการเขย่าเท่ากับ 0, 50, 100, 150 rpm

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9.012	3	3.004	21.079	.007
Within Groups	.570	4	.143		
Total	9.582	7			

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
เอทานอล	0.00	50.00	-.39000	.37751	.360	-1.4381	.6581
		100.00	-.59000	.37751	.193	-1.6381	.4581
		150.00	2.07500(*)	.37751	.005	1.0269	3.1231
	50.00	.00	.39000	.37751	.360	-.6581	1.4381
		100.00	-.20000	.37751	.624	-1.2481	.8481
		150.00	2.46500(*)	.37751	.003	1.4169	3.5131
	100.00	.00	.59000	.37751	.193	-.4581	1.6381
		50.00	.20000	.37751	.624	-.8481	1.2481
		150.00	2.66500(*)	.37751	.002	1.6169	3.7131
	150.00	.00	-2.07500(*)	.37751	.005	-3.1231	-1.0269
		50.00	-2.46500(*)	.37751	.003	-3.5131	-1.4169
		100.00	-2.66500(*)	.37751	.002	-3.7131	-1.6169

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.279	3	.093	3.093	.152
Within Groups	.120	4	.030		
Total	.399	7			

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
BIOMASS	0.00	50.00	.40500	.17342	.080	-.0765	.8865
		100.00	.05000	.17342	.787	-.4315	.5315
		150.00	-.08500	.17342	.650	-.5665	.3965
	50.00	.00	-.40500	.17342	.080	-.8865	.0765
		100.00	-.35500	.17342	.110	-.8365	.1265
		150.00	-.49000(*)	.17342	.048	-.9715	-.0085
	100.00	.00	-.05000	.17342	.787	-.5315	.4315
		50.00	.35500	.17342	.110	-.1265	.8365
		150.00	-.13500	.17342	.480	-.6165	.3465
	150.00	.00	.08500	.17342	.650	-.3965	.5665
		50.00	.49000(*)	.17342	.048	.0085	.9715
		100.00	.13500	.17342	.480	-.3465	.6165

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	3	.000	.596	.650
Within Groups	.002	4	.000		
Total	.002	7			

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
Yp/s	0.00	50.00	-.01000	.02031	.648	-.0664	.0464
		100.00	-.01500	.02031	.501	-.0714	.0414
		150.00	.01000	.02031	.648	-.0464	.0664
	50.00	.00	.01000	.02031	.648	-.0464	.0664
		100.00	-.00500	.02031	.818	-.0614	.0514
		150.00	.02000	.02031	.381	-.0364	.0764
	100.00	.00	.01500	.02031	.501	-.0414	.0714
		50.00	.00500	.02031	.818	-.0514	.0614
		150.00	.02500	.02031	.286	-.0314	.0814
	150.00	.00	-.01000	.02031	.648	-.0664	.0464
		50.00	-.02000	.02031	.381	-.0764	.0364
		100.00	-.02500	.02031	.286	-.0814	.0314

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

ภาคผนวก ง-11 การหมักเอทานอลและการเจริญของ *Z.mobilis* (Z_4) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.153	1	5.153	103.058	.010
Within Groups	.100	2	.050		
Total	5.253	3			

ANOVA

BIOMASS

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.001	1	.001	.309	.634
Within Groups	.004	2	.002		
Total	.005	3			

ภาคผนวก ง-12 การหมักเอทานอลและการเจริญของ *Z.mobilis* (Z_4) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ระยะเวลาการหมัก 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10.890	3	3.630	9.200	.029
Within Groups	1.578	4	.395		
Total	12.468	7			

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
ETHANOL	12.00	24.00	-.29500	.62815	.663	-2.0390	1.4490
		36.00	-2.56500(*)	.62815	.015	-4.3090	-.8210
		48.00	-2.37000(*)	.62815	.020	-4.1140	-.6260
	24.00	12.00	.29500	.62815	.663	-1.4490	2.0390
		36.00	-2.27000(*)	.62815	.022	-4.0140	-.5260
		48.00	-2.07500(*)	.62815	.030	-3.8190	-.3310
	36.00	12.00	2.56500(*)	.62815	.015	.8210	4.3090
		24.00	2.27000(*)	.62815	.022	.5260	4.0140
		48.00	.19500	.62815	.772	-1.5490	1.9390
	48.00	12.00	2.37000(*)	.62815	.020	.6260	4.1140
		24.00	2.07500(*)	.62815	.030	.3310	3.8190
		36.00	-.19500	.62815	.772	-1.9390	1.5490

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.034	3	.011	.452	.730
Within Groups	.100	4	.025		
Total	.134	7			

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
BIOMASS	12.00	24.00	-.04000	.15827	.813	-.4794	.3994
		36.00	-.11000	.15827	.525	-.5494	.3294
		48.00	-.17000	.15827	.343	-.6094	.2694
	24.00	12.00	.04000	.15827	.813	-.3994	.4794
		36.00	-.07000	.15827	.681	-.5094	.3694
		48.00	-.13000	.15827	.458	-.5694	.3094
	36.00	12.00	.11000	.15827	.525	-.3294	.5494
		24.00	.07000	.15827	.681	-.3694	.5094
		48.00	-.06000	.15827	.724	-.4994	.3794
	48.00	12.00	.17000	.15827	.343	-.2694	.6094
		24.00	.13000	.15827	.458	-.3094	.5694
		36.00	.06000	.15827	.724	-.3794	.4994

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.002	3	.001	.572	.663
Within Groups	.005	4	.001		
Total	.007	7			

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
Yp/s	12.00	24.00	.02000	.03446	.593	-.0757	.1157
		36.00	-.02500	.03446	.508	-.1207	.0707
		48.00	.00000	.03446	1.000	-.0957	.0957
	24.00	12.00	-.02000	.03446	.593	-.1157	.0757
		36.00	-.04500	.03446	.262	-.1407	.0507
		48.00	-.02000	.03446	.593	-.1157	.0757
	36.00	12.00	.02500	.03446	.508	-.0707	.1207
		24.00	.04500	.03446	.262	-.0507	.1407
		48.00	.02500	.03446	.508	-.0707	.1207
	48.00	12.00	.00000	.03446	1.000	-.0957	.0957
		24.00	.02000	.03446	.593	-.0757	.1157
		36.00	-.02500	.03446	.508	-.1207	.0707

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

ภาคผนวก ง-13 การหมักเอทานอลและการเจริญของ *Z.mobilis* (Z_4) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 10, 20, 30, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร

ANOVA

ETHANOL

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

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
ETHANOL	10.00	20.00	-2.67000(*)	.21781	.000	-3.1850	-2.1550
		30.00	-4.25000(*)	.21781	.000	-4.7650	-3.7350
		40.00	-6.22000(*)	.21781	.000	-6.7350	-5.7050
		60.00	-8.98500(*)	.21781	.000	-9.5000	-8.4700
		80.00	-9.38000(*)	.21781	.000	-9.8950	-8.8650
		100.00	-3.06500(*)	.21781	.000	-3.5800	-2.5500
	20.00	10.00	2.67000(*)	.21781	.000	2.1550	3.1850
		30.00	-1.58000(*)	.21781	.000	-2.0950	-1.0650
		40.00	-3.55000(*)	.21781	.000	-4.0650	-3.0350
		60.00	-6.31500(*)	.21781	.000	-6.8300	-5.8000
		80.00	-6.71000(*)	.21781	.000	-7.2250	-6.1950
		100.00	-.39500	.21781	.113	-.9100	.1200
	30.00	10.00	4.25000(*)	.21781	.000	3.7350	4.7650
		20.00	1.58000(*)	.21781	.000	1.0650	2.0950
		40.00	-1.97000(*)	.21781	.000	-2.4850	-1.4550
		60.00	-4.73500(*)	.21781	.000	-5.2500	-4.2200
		80.00	-5.13000(*)	.21781	.000	-5.6450	-4.6150
		100.00	1.18500(*)	.21781	.001	.6700	1.7000
	40.00	10.00	6.22000(*)	.21781	.000	5.7050	6.7350
		20.00	3.55000(*)	.21781	.000	3.0350	4.0650
		30.00	1.97000(*)	.21781	.000	1.4550	2.4850
		60.00	-2.76500(*)	.21781	.000	-3.2800	-2.2500
		80.00	-3.16000(*)	.21781	.000	-3.6750	-2.6450
		100.00	3.15500(*)	.21781	.000	2.6400	3.6700
	60.00	10.00	8.98500(*)	.21781	.000	8.4700	9.5000
		20.00	6.31500(*)	.21781	.000	5.8000	6.8300

		30.00	4.73500(*)	.21781	.000	4.2200	5.2500
		40.00	2.76500(*)	.21781	.000	2.2500	3.2800
		80.00	-.39500	.21781	.113	-.9100	.1200
		100.00	5.92000(*)	.21781	.000	5.4050	6.4350
	80.00	10.00	9.38000(*)	.21781	.000	8.8650	9.8950
		20.00	6.71000(*)	.21781	.000	6.1950	7.2250
		30.00	5.13000(*)	.21781	.000	4.6150	5.6450
		40.00	3.16000(*)	.21781	.000	2.6450	3.6750
		60.00	.39500	.21781	.113	-.1200	.9100
		100.00	6.31500(*)	.21781	.000	5.8000	6.8300
	100.00	10.00	3.06500(*)	.21781	.000	2.5500	3.5800
		20.00	.39500	.21781	.113	-.1200	.9100
		30.00	-1.18500(*)	.21781	.001	-1.7000	-.6700
		40.00	-3.15500(*)	.21781	.000	-3.6700	-2.6400
		60.00	-5.92000(*)	.21781	.000	-6.4350	-5.4050
		80.00	-6.31500(*)	.21781	.000	-6.8300	-5.8000

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5.033	6	.839	14.247	.001
Within Groups	.412	7	.059		
Total	5.445	13			

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
BIOMASS	10.00	20.00	-.02500	.24265	.921	-.5988	.5488
		30.00	-.82000(*)	.24265	.012	-1.3938	-.2462
		40.00	-.51500	.24265	.071	-1.0888	.0588
		60.00	-1.13500(*)	.24265	.002	-1.7088	-.5612
		80.00	-1.46500(*)	.24265	.001	-2.0388	-.8912
		100.00	-1.60000(*)	.24265	.000	-2.1738	-1.0262
	20.00	10.00	.02500	.24265	.921	-.5488	.5988
		30.00	-.79500(*)	.24265	.014	-1.3688	-.2212
		40.00	-.49000	.24265	.083	-1.0638	.0838
		60.00	-1.11000(*)	.24265	.003	-1.6838	-.5362
		80.00	-1.44000(*)	.24265	.001	-2.0138	-.8662
		100.00	-1.57500(*)	.24265	.000	-2.1488	-1.0012
	30.00	10.00	.82000(*)	.24265	.012	.2462	1.3938
		20.00	.79500(*)	.24265	.014	.2212	1.3688
		40.00	.30500	.24265	.249	-.2688	.8788
		60.00	-.31500	.24265	.235	-.8888	.2588
		80.00	-.64500(*)	.24265	.033	-1.2188	-.0712
		100.00	-.78000(*)	.24265	.015	-1.3538	-.2062
	40.00	10.00	.51500	.24265	.071	-.0588	1.0888
		20.00	.49000	.24265	.083	-.0838	1.0638
		30.00	-.30500	.24265	.249	-.8788	.2688
		60.00	-.62000(*)	.24265	.038	-1.1938	-.0462
		80.00	-.95000(*)	.24265	.006	-1.5238	-.3762
		100.00	-1.08500(*)	.24265	.003	-1.6588	-.5112
	60.00	10.00	1.13500(*)	.24265	.002	.5612	1.7088
		20.00	1.11000(*)	.24265	.003	.5362	1.6838

		30.00	.31500	.24265	.235	-.2588	.8888
		40.00	.62000(*)	.24265	.038	.0462	1.1938
		80.00	-.33000	.24265	.216	-.9038	.2438
		100.00	-.46500	.24265	.097	-1.0388	.1088
	80.00	10.00	1.46500(*)	.24265	.001	.8912	2.0388
		20.00	1.44000(*)	.24265	.001	.8662	2.0138
		30.00	.64500(*)	.24265	.033	.0712	1.2188
		40.00	.95000(*)	.24265	.006	.3762	1.5238
		60.00	.33000	.24265	.216	-.2438	.9038
		100.00	-.13500	.24265	.595	-.7088	.4388
	100.00	10.00	1.60000(*)	.24265	.000	1.0262	2.1738
		20.00	1.57500(*)	.24265	.000	1.0012	2.1488
		30.00	.78000(*)	.24265	.015	.2062	1.3538
		40.00	1.08500(*)	.24265	.003	.5112	1.6588
		60.00	.46500	.24265	.097	-.1088	1.0388
		80.00	.13500	.24265	.595	-.4388	.7088

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.137	6	.023	26.556	.000
Within Groups	.006	7	.001		
Total	.143	13			

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
Yp/s	10.00	20.00	-.00500	.02928	.869	-.0742	.0642
		30.00	.01500	.02928	.624	-.0542	.0842
		40.00	.06000	.02928	.080	-.0092	.1292
		60.00	-.00500	.02928	.869	-.0742	.0642
		80.00	.02000	.02928	.516	-.0492	.0892
		100.00	.29000(*)	.02928	.000	.2208	.3592
	20.00	10.00	.00500	.02928	.869	-.0642	.0742
		30.00	.02000	.02928	.516	-.0492	.0892
		40.00	.06500	.02928	.062	-.0042	.1342
		60.00	.00000	.02928	1.000	-.0692	.0692
		80.00	.02500	.02928	.421	-.0442	.0942
		100.00	.29500(*)	.02928	.000	.2258	.3642
	30.00	10.00	-.01500	.02928	.624	-.0842	.0542
		20.00	-.02000	.02928	.516	-.0892	.0492
		40.00	.04500	.02928	.168	-.0242	.1142
		60.00	-.02000	.02928	.516	-.0892	.0492
		80.00	.00500	.02928	.869	-.0642	.0742
		100.00	.27500(*)	.02928	.000	.2058	.3442
	40.00	10.00	-.06000	.02928	.080	-.1292	.0092
		20.00	-.06500	.02928	.062	-.1342	.0042
		30.00	-.04500	.02928	.168	-.1142	.0242
		60.00	-.06500	.02928	.062	-.1342	.0042
		80.00	-.04000	.02928	.214	-.1092	.0292
		100.00	.23000(*)	.02928	.000	.1608	.2992
	60.00	10.00	.00500	.02928	.869	-.0642	.0742
		20.00	.00000	.02928	1.000	-.0692	.0692

		30.00	.02000	.02928	.516	-.0492	.0892
		40.00	.06500	.02928	.062	-.0042	.1342
		80.00	.02500	.02928	.421	-.0442	.0942
		100.00	.29500(*)	.02928	.000	.2258	.3642
	80.00	10.00	-.02000	.02928	.516	-.0892	.0492
		20.00	-.02500	.02928	.421	-.0942	.0442
		30.00	-.00500	.02928	.869	-.0742	.0642
		40.00	.04000	.02928	.214	-.0292	.1092
		60.00	-.02500	.02928	.421	-.0942	.0442
		100.00	.27000(*)	.02928	.000	.2008	.3392
	100.00	10.00	-.29000(*)	.02928	.000	-.3592	-.2208
		20.00	-.29500(*)	.02928	.000	-.3642	-.2258
		30.00	-.27500(*)	.02928	.000	-.3442	-.2058
		40.00	-.23000(*)	.02928	.000	-.2992	-.1608
		60.00	-.29500(*)	.02928	.000	-.3642	-.2258
		80.00	-.27000(*)	.02928	.000	-.3392	-.2008

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

ภาคผนวก ง-14 การหมักเอทานอลและการเจริญของ *Z.mobilis* (Z_4) จากน้ำอัดลมหมดอายุเจือจางที่เติมปริมาณ $(NH_4)_2SO_4$ เท่ากับ 0, 0.5, 1.0 และ 1.5 กรัมต่อลิตร

ANOVA

ETHANOL

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

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
ETHANOL	0.00	0.50	-.51750	1.30074	.693	-3.1390	2.1040
		1.00	-.82250	1.30074	.530	-3.4440	1.7990
		1.50	-.30417	1.30074	.816	-2.9256	2.3173
	0.50	0.00	.51750	1.30074	.693	-2.1040	3.1390
		1.00	-.30500	1.30074	.816	-2.9265	2.3165
		1.50	.21333	1.30074	.870	-2.4081	2.8348
	1.00	0.00	.82250	1.30074	.530	-1.7990	3.4440
		0.50	.30500	1.30074	.816	-2.3165	2.9265
		1.50	.51833	1.30074	.692	-2.1031	3.1398
	1.50	0.00	.30417	1.30074	.816	-2.3173	2.9256
		0.50	-.21333	1.30074	.870	-2.8348	2.4081
		1.00	-.51833	1.30074	.692	-3.1398	2.1031

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.092	3	.031	.108	.955
Within Groups	12.465	44	.283		
Total	12.557	47			

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
BIOMASS	0.00	0.50	-.01250	.21729	.954	-.4504	.4254
		1.00	-.05500	.21729	.801	-.4929	.3829
		1.50	-.11167	.21729	.610	-.5496	.3263
	0.50	0.00	.01250	.21729	.954	-.4254	.4504
		1.00	-.04250	.21729	.846	-.4804	.3954
		1.50	-.09917	.21729	.650	-.5371	.3388
	1.00	0.00	.05500	.21729	.801	-.3829	.4929
		0.50	.04250	.21729	.846	-.3954	.4804
		1.50	-.05667	.21729	.795	-.4946	.3813
	1.50	0.00	.11167	.21729	.610	-.3263	.5496
		0.50	.09917	.21729	.650	-.3388	.5371
		1.00	.05667	.21729	.795	-.3813	.4946

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.004	3	.001	.603	.617
Within Groups	.109	44	.002		
Total	.113	47			

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
Yp/s	0.00	0.50	.01750	.02031	.393	-.0234	.0584
		1.00	-.00333	.02031	.870	-.0443	.0376
		1.50	.01750	.02031	.393	-.0234	.0584
	0.50	0.00	-.01750	.02031	.393	-.0584	.0234
		1.00	-.02083	.02031	.311	-.0618	.0201
		1.50	.00000	.02031	1.000	-.0409	.0409
	1.00	0.00	.00333	.02031	.870	-.0376	.0443
		0.50	.02083	.02031	.311	-.0201	.0618
		1.50	.02083	.02031	.311	-.0201	.0618
	1.50	0.00	-.01750	.02031	.393	-.0584	.0234
		0.50	.00000	.02031	1.000	-.0409	.0409
		1.00	-.02083	.02031	.311	-.0618	.0201

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

ภาคผนวก ง-15 การหมักเอทานอลและการเจริญของ *Z.mobilis* (Z_4) จากน้ำอัดลมหมดอายุเจือจางที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	33.990	4	8.497	36.244	.001
Within Groups	1.172	5	.234		
Total	35.162	9			

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
ETHANOL	4.50	5.00	-3.55000(*)	.48420	.001	-4.7947	-2.3053
		5.50	-4.68500(*)	.48420	.000	-5.9297	-3.4403
		6.00	-4.54000(*)	.48420	.000	-5.7847	-3.2953
		6.50	-1.38000(*)	.48420	.036	-2.6247	-.1353
	5.00	4.50	3.55000(*)	.48420	.001	2.3053	4.7947
		5.50	-1.13500	.48420	.066	-2.3797	.1097
		6.00	-.99000	.48420	.096	-2.2347	.2547
		6.50	2.17000(*)	.48420	.007	.9253	3.4147
	5.50	4.50	4.68500(*)	.48420	.000	3.4403	5.9297
		5.00	1.13500	.48420	.066	-.1097	2.3797
		6.00	.14500	.48420	.777	-1.0997	1.3897
		6.50	3.30500(*)	.48420	.001	2.0603	4.5497
	6.00	4.50	4.54000(*)	.48420	.000	3.2953	5.7847
		5.00	.99000	.48420	.096	-.2547	2.2347
		5.50	-.14500	.48420	.777	-1.3897	1.0997
		6.50	3.16000(*)	.48420	.001	1.9153	4.4047
	6.50	4.50	1.38000(*)	.48420	.036	.1353	2.6247
		5.00	-2.17000(*)	.48420	.007	-3.4147	-.9253
		5.50	-3.30500(*)	.48420	.001	-4.5497	-2.0603
		6.00	-3.16000(*)	.48420	.001	-4.4047	-1.9153

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

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.375	4	.094	1.390	.357
Within Groups	.337	5	.067		
Total	.711	9			

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
BIOMASS	4.50	5.00	.35000	.25956	.235	-.3172	1.0172
		5.50	.30500	.25956	.293	-.3622	.9722
		6.00	.22000	.25956	.435	-.4472	.8872
		6.50	-.16000	.25956	.565	-.8272	.5072
	5.00	4.50	-.35000	.25956	.235	-1.0172	.3172
		5.50	-.04500	.25956	.869	-.7122	.6222
		6.00	-.13000	.25956	.638	-.7972	.5372
		6.50	-.51000	.25956	.107	-1.1772	.1572
	5.50	4.50	-.30500	.25956	.293	-.9722	.3622
		5.00	.04500	.25956	.869	-.6222	.7122
		6.00	-.08500	.25956	.757	-.7522	.5822
		6.50	-.46500	.25956	.133	-1.1322	.2022
	6.00	4.50	-.22000	.25956	.435	-.8872	.4472
		5.00	.13000	.25956	.638	-.5372	.7972
		5.50	.08500	.25956	.757	-.5822	.7522
		6.50	-.38000	.25956	.203	-1.0472	.2872
	6.50	4.50	.16000	.25956	.565	-.5072	.8272
		5.00	.51000	.25956	.107	-.1572	1.1772

		5.50	.46500	.25956	.133	-.2022	1.1322
		6.00	.38000	.25956	.203	-.2872	1.0472

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

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.045	4	.011	14.597	.006
Within Groups	.004	5	.001		
Total	.049	9			

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
BIOMASS	4.50	5.00	-.13000(*)	.02775	.005	-.2013	-.0587
		5.50	-.17000(*)	.02775	.002	-.2413	-.0987
		6.00	-.15000(*)	.02775	.003	-.2213	-.0787
		6.50	-.03500	.02775	.263	-.1063	.0363
	5.00	4.50	.13000(*)	.02775	.005	.0587	.2013
		5.50	-.04000	.02775	.209	-.1113	.0313
		6.00	-.02000	.02775	.503	-.0913	.0513
		6.50	.09500(*)	.02775	.019	.0237	.1663
	5.50	4.50	.17000(*)	.02775	.002	.0987	.2413
		5.00	.04000	.02775	.209	-.0313	.1113
		6.00	.02000	.02775	.503	-.0513	.0913
		6.50	.13500(*)	.02775	.005	.0637	.2063
	6.00	4.50	.15000(*)	.02775	.003	.0787	.2213
		5.00	.02000	.02775	.503	-.0513	.0913
		5.50	-.02000	.02775	.503	-.0913	.0513

		6.50	.11500(*)	.02775	.009	.0437	.1863
	6.50	4.50	.03500	.02775	.263	-.0363	.1063
		5.00	-.09500(*)	.02775	.019	-.1663	-.0237
		5.50	-.13500(*)	.02775	.005	-.2063	-.0637
		6.00	-.11500(*)	.02775	.009	-.1863	-.0437

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

ภาคผนวก ง-14 การหมักเอทานอลและการเจริญของ *Z.mobilis* (Z_4) จากน้ำอัดลมหมดอายุที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วย Autoclave และ KMS

ANOVA

ETHANOL

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7.317	1	7.317	36.783	.026
Within Groups	.398	2	.199		
Total	7.715	3			

ANOVA

BIOMASS

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.490	1	.490	10.595	.083
Within Groups	.093	2	.046		
Total	.583	3			

ANOVA

Yp/s

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	.008	1	.008	81.000	.012
Within Groups	.000	2	.000		
Total	.008	3			