

องค์ประกอบของสารอาหารและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อย

นางสาวพงษ์พรรณิ ภูมิเขต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

OPTIMAL NUTRIENT COMPOSITION AND CONDITION FOR ETHANOL FERMENTATION
FROM SUGARCANE MOLASSES

Miss Pongpannee Phomikhet



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Microbiology and Microbial
Technology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	องค์ประกอบของสารอาหารและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อย
โดย	นางสาวพงษ์พรรณิ ภูมิเขต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป นภทร)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัสญา)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธานีวัน)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช)

พงษ์พรณี ภูมิเขต : องค์ประกอบของสารอาหารและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อย (OPTIMAL NUTRIENT COMPOSITION AND CONDITION FOR ETHANOL FERMENTATION FROM SUGARCANE MOLASSES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร. อัญชริตา อัครจรัสญา, 84 หน้า.

การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยเจือจางที่มีน้ำตาล 200 กรัม/ลิตร ไนโตรเจน 2.8 กรัม/ลิตร (กรดอะมิโนอิสระ 200 มิลลิกรัม/ลิตร) แคลเซียม 2.8 กรัม/ลิตร ฟอสฟอรัส 0.21 กรัม/ลิตร แมกนีเซียม 1.2 กรัม/ลิตร กรดแอสติค (กรดระเหยง่าย) 5.5 กรัม/ลิตร แมงกานีส 19 มิลลิกรัม/ลิตร ซิงค์ 2.1 มิลลิกรัม/ลิตร และไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอล 400 มิลลิกรัม/ลิตร โดย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596 การหมักเอทานอลที่มีการเติมกากใยลิกโนเซลลูโลสของมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัสดุทิ้งหลังการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ทำให้ผลผลิตเอทานอลสูงขึ้น 8.15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สรุปได้ว่ากากใยของหัวมันสำปะหลังให้กรดอะมิโนอิสระ และปกป้องเซลล์จากภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม ส่วนการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.13% (น้ำหนัก/ปริมาตร); KH_2PO_4 0.27% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงไปในกากน้ำตาลเจือจางทำให้ได้เอทานอลสูงสุด (87.28 กรัม/ลิตร) การเติมไอออน Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ในกากน้ำตาลเจือจางที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ช่วยเพิ่มผลิตผลเอทานอล (90.42 กรัม/ลิตร) โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมของ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} คือ 512, 44 และ 25.1 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ความเข้มข้นของกรดแอสติคมากกว่า 5.5 กรัม/ลิตร ยับยั้งการผลิตเอทานอล

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา จุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2557

5672024923 : MAJOR MICROBIOLOGY AND MICROBIAL TECHNOLOGY

KEYWORDS: CANE MOLASSES, CASSAVA TUBER FIBER, *S. CEREVISIAE*, 84 PRODUCTION

PONGPANNEE PHOMIKHET: OPTIMAL NUTRIENT COMPOSITION AND
CONDITION FOR ETHANOL FERMENTATION FROM SUGARCANE MOLASSES.
ADVISOR: ASSOC. PROF. ANCHARIDA AKARACHARANYA, Ph.D., pp.

Diluted cane molasses containing 200 g/l sugar, 2.8 g/l nitrogen, 19.99 g/l (free amino acids, 2.8 mg/l Ca^{2+} , 0.21 g/l phosphorus, 1.2 g/l magnesium, 5.5 g/l acetic acid (volatile acids), 19 mg/l Mn^{2+} , 2.1 mg/l Zn^{2+} and 400 mg/l hydroxymethylfurfural was fermented to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596. Ethanol fermentation in the presence of 5% (w/v) cassava tuber fiber, a waste of ethanol production from cassava tuber, increased maximum ethanol production by 8.15% (w/v). In conclusion, Cassava tuber fiber provided free amino acid and protected cells from environmental stresses was concluded. Maximum ethanol (87.28 g/l) was obtained when the dilute molasses was supplemented with 0.13% (w/v) $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 0.27% (w/v) KH_2PO_4 and 0.05% (w/v) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Cu^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} ions in the dilute molasses without yeast extract supplementation increased an ethanol produced (90.42 g/l). Optimal (final) concentration of the Cu^{2+} , Mn^{2+} and Zn^{2+} were 512, 44 and 25.1 mg/l, respectively. Acetic acid concentration more than 5.5 g/l inhibited the ethanol production.

Department: Microbiology

Student's Signature

Field of Study: Microbiology and
Microbial Technology

Advisor's Signature

Academic Year: 2014

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร. อัญชริตา อัครจรัสญา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ท่านได้กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำ อันมีค่าและข้อคิดเห็นต่างๆของงานด้วยดีตลอดมา รวมทั้งได้ช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาติดา จันทร์ประทีป นภทร ที่กรุณารับเป็น ประธานกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน และ รองศาสตราจารย์ ดร. วิเชียร กิจปรีชาวนิช ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ทุกคนที่ให้กำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือที่ดี รวมถึง พี่ๆ น้องๆ และเจ้าหน้าที่ของภาควิชาจุลชีววิทยาที่ให้ความสะดวกในการทำงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ โรงงานอ่างเวียง (ราชสีมา) จังหวัดนครราชสีมา ที่ได้อนุเคราะห์นำ กากน้ำตาลมาให้ใช้สำหรับงานวิจัย

ขอขอบคุณ บริษัท ทรัพย์ทิพย์ จำกัด จังหวัดลพบุรี ที่ได้อนุเคราะห์นำกากใยลิกโน เซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังมาให้ใช้สำหรับงานวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ น้องชาย และครอบครัว ที่ให้ความรัก กำลังใจ และคำชี้แนะอันมีค่าที่หาสิ่งใดเปรียบมิได้ ตลอดมา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน.....	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม	5
2.1 พลังงานทางเลือก	5
2.2 สถานการณ์เอทานอล	5
2.2.1 สถานการณ์ต่างประเทศ.....	5
2.2.2 สถานการณ์ในประเทศ.....	5
2.3 เอทานอล.....	7
2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล.....	9
2.4.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล	9
2.4.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง.....	11
2.4.3 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสชีวมวล	12
2.5 จุลินทรีย์ผลิตเอทานอล.....	17

2.6 เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase).....	20
2.6.1 ความจำเพาะของเอนไซม์อินเวอร์เทส.....	21
2.6.2 แหล่งและสมบัติของเอนไซม์อินเวอร์เทส.....	21
2.6.3 คุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์อินเวอร์เทส.....	22
2.7 สรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์กับกระบวนการหมักเอทานอล.....	22
2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์.....	25
2.8.1 ความเข้มข้นของเอทานอล.....	25
2.8.2 ชนิดของสารตั้งต้น.....	25
2.8.3 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น.....	26
2.8.4 วิตามิน.....	27
2.8.5 ความเป็นกรด-เบส.....	27
2.8.6 อุณหภูมิ.....	27
2.8.7 ออกซิเจน.....	28
2.8.8 คาร์บอนไดออกไซด์.....	28
2.9 ประเภทของการหมัก.....	28
2.9.1 การแบ่งประเภทการหมักตามผลผลิตของการหมัก.....	29
2.9.2 การแบ่งประเภทการหมักตามความต้องการอากาศหรือออกซิเจน.....	29
2.9.3 การแบ่งประเภทการหมักตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น.....	29
2.9.4 การแบ่งประเภทการหมักตามลักษณะหรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	30
2.9.5 การแบ่งประเภทการหมักตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้.....	30
2.10 การตรึงเซลล์ยีสต์.....	31
2.11 กระบวนการผลิตไบโอเอทานอล.....	33
2.11.1 การเตรียมวัตถุดิบก่อนหมัก.....	33

2.11.2 การหมัก.....	33
2.11.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น	33
2.11.4 การตั้งน้ำออกจากเอทานอล	33
2.12 การบำบัดน้ำเสียจากการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล.....	33
2.13 Central Composite Design (CCD).....	34
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง.....	38
3.1 กากน้ำตาล (molasses).....	38
3.2 กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง (cassava tuber fiber).....	38
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	38
3.5 จุลินทรีย์	41
3.6 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	42
3.6.1 ศึกษาลักษณะสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาล	42
3.6.2 หาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสของยีสต์ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596	42
3.6.3 หาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล	43
3.6.4 หาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลร่วมกับกากใยของหัวมัน สำปะหลัง.....	43
3.6.5 หาปริมาณกากใยของหัวมันสำปะหลังที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจาก อาหารหมักกากน้ำตาล	43
3.6.6 ศึกษาลักษณะกากใยของหัวมันสำปะหลังในอาหารหมักกากน้ำตาลก่อนและหลัง การหมักเอทานอลผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด.....	44
3.6.7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลเมื่อเติมและไม่เติม Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ลงในอาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยของหัวมันสำปะหลัง.....	44

3.6.8 หาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากอาหารหมัก กากน้ำตาล.....	44
3.6.9 หาชนิดของสารอาหารที่จำเป็นต่อเติมในอาหารหมักกากน้ำตาล	45
3.6.10 เปรียบเทียบประสิทธิผลการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลซึ่งเติมและ ไม่เติม Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+}	46
3.6.11 หาความเข้มข้นของ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทา นอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล	46
3.6.12 หาปริมาณกรดแอสติค (กรดระเหยง่าย) ที่มีผลยับยั้งการหมักเอทานอลจาก อาหารหมักกากน้ำตาล	46
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	47
4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลเจือจาง	47
4.2 ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสของ <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596	48
4.3 ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล.....	48
4.4 ผลของกากใยของหัวมันสำปะหลังต่อประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล ..	49
4.5 ผลของปริมาณกากใยของหัวมันสำปะหลังที่เติมในอาหารหมักกากน้ำตาลต่อการหมักเอ ทานอล	49
4.6 ผลการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะกากใยหัวมันสำปะหลังก่อนและหลังการหมักเอทานอล ผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	50
4.7 ผลของ Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล ที่เติมกากใยของหัวมันสำปะหลัง	53
4.8 ผลการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล.....	54
4.9 ผลของสารอาหารต่อการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล.....	55
4.10 ผลของ Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากอาหารหมัก กากน้ำตาล	65

4.11 ผลการหาความเข้มข้นของ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิผล การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล	66
4.12 ปริมาณกรดแอสซิดิก (กรดระเหยง่าย) ที่มีผลยับยั้งการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล .	68
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	69
รายการอ้างอิง	71
ภาคผนวก.....	75
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ	76
ภาคผนวก ข การเตรียมวัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย.....	77
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน	82
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	84

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเอทานอล.....	8
ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกากน้ำตาลหัวบีทและกากน้ำตาลอ้อย	10
ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในชีวมวลต่างๆ.....	12
ตารางที่ 2.4 ยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักเอทานอล.....	18
ตารางที่ 2.5 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักเอทานอล	19
ตารางที่ 2.6 ผลได้ของเอทานอลต่อสารตั้งต้นและองค์ประกอบของสารตั้งต้นที่นำมาผลิตเอทานอล.....	26
ตารางที่ 2.7 การเปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบเซลล์อิสระกับแบบตรึงเซลล์.....	32
ตารางที่ 2.8 การเก็บข้อมูลของ CCD สำหรับ 3 Factors ที่ค่า Alpha=1	35
ตารางที่ 2.9 การเก็บข้อมูลของ Central Composite Design สำหรับกระบวนการบรรจุสารเคมี.....	36
ตารางที่ 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย.....	38
ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย	40
ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบอาหารหมักสูตรต่างๆ.....	45
ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลเจือจาง.....	47
ตารางที่ 4.2 ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลชูโครส โดย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596.....	48
ตารางที่ 4.3 ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596.....	48
ตารางที่ 4.4 ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลร่วมกับกากใยฯของหัวมันสำปะหลังโดย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596	49
ตารางที่ 4.5 ผลของปริมาณกากใยฯของหัวมันสำปะหลังที่เติมในอาหารหมักกากน้ำตาลต่อการหมักเอทานอลโดย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596	50
ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในกากน้ำตาลและกากน้ำตาลที่เติมกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง (ALS Laboratory group (Thailand) CO., LTD.).....	53

ตารางที่ 4.7 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 54

ตารางที่ 4.8 องค์ประกอบของอาหารหมักกากน้ำตาลที่ทดสอบ 56

ตารางที่ 4.9 ผลของสารอาหารต่อการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 56

ตารางที่ 4.10 การแปรผันความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมในกากน้ำตาล..... 57

ตารางที่ 4.11 องค์ประกอบของอาหารหมักกากน้ำตาลดัดแปลงที่แปรผันความเข้มข้นของสารอาหารที่เติม 58

ตารางที่ 4.12 ผลการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลดัดแปลง ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 58

ตารางที่ 4.13 การแปรผันปริมาณของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่เติมในอาหารหมัก..... 66

ตารางที่ 4.14 ผลการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลดัดแปลงเมื่อแปรผันความเข้มข้นของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่เติม..... 67

สารบัญภาพ

	หน้า
รูปที่ 2.1 ปริมาณการผลิตและการใช้เอทานอลของโลก.....	5
รูปที่ 2.2 โรงงานผลิตเอทานอลของไทย	6
รูปที่ 2.3 ปริมาณการผลิตเอทานอลจำแนกตามวัตถุดิบและปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล ...	6
รูปที่ 2.4 ปริมาณการใช้น้ำมันเบนซินและแก๊สโซฮอล์กับการผลิตและการใช้เอทานอลของไทย ..	7
รูปที่ 2.5 ปริมาณส่งออกเอทานอลและตลาดส่งออกเอทานอลจากไทยปี 2556.....	7
รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล (ที่มา: http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/aqa_pre_2011/oils/poly_mersrev3.shtml)	7
รูปที่ 2.7 (ก) โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสและ (ข) ลักษณะการจัดเรียงของโมเลกุลกลูโคสใน เซลลูโลส.....	13
รูปที่ 2.8 (ก) กลุ่มไมโครไฟบริลที่เรียงตัวขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน และ (ข) ภาพตัดตามยาว ของไมโครไฟบริล	14
รูปที่ 2.9 โครงสร้างเซลลูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป.....	14
รูปที่ 2.10 ผนังเซลล์ของพืชเมื่อเซลล์เริ่มแก่.....	15
รูปที่ 2.11 โครงสร้างโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลส	16
รูปที่ 2.12 โครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน	17
รูปที่ 2.13 โครงสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทส	20
รูปที่ 2.14 การเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทส.....	21
รูปที่ 2.15 การเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลในรูปของปริมาณสารสัมพันธ์ทางเคมี.....	24
รูปที่ 2.16 สรุปลิทธิกลไกโคไลซิสและการหมักเอทานอล	24
รูปที่ 2.17 กระบวนการหมักเอทานอล	24
รูปที่ 2.18 การหมักแบบต่อเนื่อง	30

รูปที่ 2.19 เทคนิคการตรึงเซลล์แบบต่างๆ.....	32
รูปที่ 2.20 Central Composite Design สำหรับ 3 Factors.....	35
รูปที่ 2.21 การแทนค่าตัวแปรใน Model ด้วยการ ใช้ Response Optimizer ใน MINITAB....	37
รูปที่ 4.1 พื้นผิวของกากใยของหัวมันสำปะหลังก่อน (กำลังขยาย 1,000 เท่า).....	51
รูปที่ 4.2 เซลล์ยีสต์ที่ติดมากากใยของหัวมันสำปะหลัง (กำลังขยาย 1,000 เท่า).....	51
รูปที่ 4.3 เซลล์รูปไข่ที่มีรอยหลุดของหน่อบนผิวเซลล์ (กำลังขยาย 10,000 เท่า).....	52
รูปที่ 4.4 เซลล์ยีสต์ที่ตรึงอยู่ในโครงสร้างที่เป็นรูพรุนของกากใยของหัวมันสำปะหลังหลังการหมัก (กำลังขยาย 1,000 เท่า).....	52
รูปที่ 4.5 ผลของ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ต่อการผลิตเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยหัวมันสำปะหลัง โดย (A) เติมและ (B) ไม่เติม $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ และ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ โดย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596.....	54
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ $(NH_4)_2SO_4$ กับ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	62
รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ $(NH_4)_2SO_4$ กับ KH_2PO_4	63
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ KH_2PO_4 และ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	64
รูปที่ 4.9 ผลของ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ต่อการผลิตเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลซึ่งเติม (A) และไม่เติม (B) $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ และ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ โดย <i>S. cerevisiae</i> TISTR 5596.....	66
รูปที่ 4.10 ผลของปริมาณกรดแอสซิติคต่อการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย <i>S. cerevisiae</i>	68

บทที่ 1 บทนำ

1.1 แนวเหตุผล ทฤษฎีที่สำคัญ หรือสมมติฐาน

กากน้ำตาลเป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากกระบวนการผลิตน้ำตาล มีลักษณะเป็นของเหลวสีดำที่เหนียวข้น กากน้ำตาล 100 กรัม มีซูโครส 30-40 กรัม กลูโคส 4-9 กรัม ฟรุกโตส 5-12 กรัม โดยประมาณ (Chen & Chou, 1993) มีราคาถูกเมื่อเทียบกับวัตถุดิบที่มีปริมาณน้ำตาลหมักเท่ากัน นอกจากนั้นกากน้ำตาลยังมีส่วนประกอบอื่น ได้แก่ โปรตีน เกลือแร่ (โพแทสเซียม แคลเซียม โซเดียม แมกนีเซียม คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส ซิงค์ คลอไรด์ และซัลเฟอร์) และวิตามิน (ไบโอติน กรดโฟลิก ไบโอฟลาวิน ไทอามีน และไนอาซิน) ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญและเมแทบอลิซึมของยีสต์ ข้อดีของกากน้ำตาลอีกประการหนึ่งคือเป็นวัตถุดิบที่ไม่ต้องผ่านการปรับสภาพก่อนการหมัก (Bouallagui, Touhami, Hanafi, Ghariani, & Hamdi, 2013) ดังนั้นกากน้ำตาลจึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจสำหรับอุตสาหกรรมการหมักด้วยยีสต์ แต่ปัญหาที่ตามมาของการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล คือ การจัดการกับระบบน้ำเสียที่มีปริมาณมาก โรงงานต้องจัดเก็บขนาดใหญ่บำบัดด้วยแบคทีเรีย และก่อให้เกิดแก๊สชีวภาพส่งกลิ่นเหม็น ปัญหานี้แก้ไขได้โดยโรงงานจะต้องมีการติดตั้งอุปกรณ์เพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการดึงไดไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ออกจากแก๊สชีวภาพเพื่อให้มีคุณสมบัติเป็นแก๊สมีเทน (CH_4) แล้วนำมาเป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อต้มไอน้ำและผลิตไฟฟ้าใช้ในโรงงาน อย่างไรก็ตามน้ำเสียในกระบวนการผลิตเอทานอลไม่สามารถบำบัดให้เป็นน้ำบริสุทธิ์คืนสู่ธรรมชาติได้ เนื่องจากยังมีสารไนโตรเจนและฟอสเฟตตกค้างอยู่มาก ซึ่งหากพิจารณาสมบัติน้ำเสียดังกล่าวแล้ว สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในภาคการเกษตรได้ ดังนั้นถ้าโรงงานต้องการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอลก็สามารถแก้ปัญหาได้จากวิธีข้างต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและระบุว่าสามารถช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ (Michailides et al., 2015)

เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล องค์ประกอบทางเคมีจึงไม่คงที่ เอทานอลที่ได้จากการหมักจึงมีความแตกต่างกันมาก (Chotineeranat et al., 2010) การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลด้วยยีสต์ เอทานอลที่ได้จะต่ำกว่าการหมักเอทานอลจากน้ำตาลหมักปริมาณเท่ากัน สาเหตุเพราะกากน้ำตาลมีสารปนเปื้อน ได้แก่ 1) แคลเซียมไอออน ประมาณ 10-20% ของเถ้าคาร์บอนทั้งหมด จากการใช้ปูนขาวหรือแคลเซียมออกไซด์ในการทำให้น้ำอ้อยใส แคลเซียมไอออนสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase) ของ *S. cerevisiae* จึงทำให้ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลมีประสิทธิภาพต่ำกว่าจากสารละลายน้ำตาลซูโครสที่ความเข้มข้นเท่ากัน ความเข้มข้นต่ำสุดของแคลเซียมไอออนที่สามารถยับยั้งอินเวอร์เทสเท่ากับ 0.18 % (น้ำหนัก/

ปริมาตร) และ 2.16 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ยับยั้งอินเวอร์เทสอย่างสมบูรณ์ (Chotineeranat et al., 2010) 2) ไฮดรอกซีเมธิลเฟอฟูรอล (hydroxymethyl furfural) จากการตกผลึกน้ำอ้อยเป็นน้ำตาล และจากปฏิกิริยาเคมีระหว่างกรดอะมิโนและน้ำตาลรีดิวซ์ในกากน้ำตาลที่อุณหภูมิสูง (Taherzadeh & Karimi, 2011) 3) คอปเปอร์ไอออนและโพแทสเซียมไอออน ซึ่งทนความร้อนที่ 90°C และเป็นสารที่สามารถแพร่ผ่านเยื่อเลือกผ่านได้ (dialyzable substances) โดยคอปเปอร์ไอออน 0.7 มิลลิโมลาร์ สามารถยับยั้งอินเวอร์เทสได้ 50% 4) โลหะหนัก ได้แก่ อะลูมิเนียม อาร์ซีนิก คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส และซิงค์ (Takeshige & Ouchi, 1995) เฟอฟูรอล ฟีนอล วานิลลิน เฮกซานอล เฮพทานอล (Gough, Barron, Zubov, Lozinsky, & McHale, 1998) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถยับยั้ง การเจริญและยับยั้งการหมักเอทานอลของยีสต์

แม้ว่ากากน้ำตาลจะมีสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆมากมาย แต่พบว่าปริมาณของคอปเปอร์ แมงกานีส และซิงค์ ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของยีสต์ต่ำ เพราะธาตุเหล่านี้จับกับสารอินทรีย์ในกากน้ำตาล ซิงค์เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์หลายชนิด เช่น แอลคาไลน์ฟอสฟาเตส (alkaline phosphatase) คาร์บอนิกแอนไฮเดรส (carbonicanhydrase) คาร์บอกซีเปปติเดส (carboxypeptidases) และแอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenase) ซึ่งจำเป็นในการผลิตเอทานอลโดยตรง นอกจากนี้ยังเป็นโครงสร้างที่สำคัญของเอนไซม์และโปรตีนที่ไม่ได้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (noncatalytic protein) หลายชนิด การมีซิงค์ปริมาณที่เหมาะสม (5-15 ไมโครโมลาร์) ในอาหารจะทำให้อัตราการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์เพิ่มขึ้น ในทางตรงกันข้ามถ้าขาดซิงค์ยีสต์หยุดการเจริญและการหมักเอทานอล อย่างไรก็ตามหากในอาหารเลี้ยงเชื้อตั้งต้นมีความเข้มข้นของซิงค์ที่สูงเกินไปจะเป็นพิษต่อเซลล์ เนื่องจากซิงค์มีผลต่อการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้โพแทสเซียมในเซลล์ลดลง คอปเปอร์เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์บางชนิด เช่น ไซโตโครมซี ออกซิเดส (cytochrome c oxydase) แลคเตส (lactase) และคอปเปอร์ซิงค์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Cu, Zn-superoxide dismutase) ความเข้มข้นของคอปเปอร์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ อยู่ในช่วง 1-10 ไมโครโมลาร์ ความเข้มข้นสูงกว่านี้จะเป็นพิษต่อเซลล์ สำหรับแมงกานีส ยีสต์ต้องการความเข้มข้น 2-10 ไมโครโมลาร์ สำหรับการเจริญโดยเป็นโคแฟกเตอร์ของไพรูเวตคาร์บอกซิเลส (pyruvate carboxylase) ดังนั้นการเติมคอปเปอร์ แมงกานีส และซิงค์ลงไปในกากน้ำตาลจะช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักเอทานอลของยีสต์ได้ (Stehlik-Tomas, Zetic, Stanzer, Grba, & Vahcic, 2004)

ในระหว่างการหมักเอทานอล ยีสต์ต้องเผชิญกับภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและต่อการหมักเอทานอลหลายชนิด เช่น แรงดันออสโมติก อุณหภูมิที่สูงขึ้น และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ไม่เหมาะสม (Laopaiboon, Nuanpeng, Srinophakun, Klanrit, & Laopaiboon, 2008) มีการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้การหมักร่วมกับวัสดุจาก

ธรรมชาติ ช่วยปกป้องเซลล์ยีสต์จากภาวะที่ไม่เหมาะสมข้างต้น ส่งผลให้ประสิทธิผลการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้นและเร็วขึ้น Pradeep และ Reddy (Pradeep & Reddy, 2010) รายงานว่า การเติมรำข้าวสาลี 1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงไปร่วมกับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด 24 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดย *S. cerevisiae* ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงขึ้น สันนิษฐานว่ารำข้าวทำหน้าที่เป็นแหล่งของสารอาหาร และเป็นวัสดุที่ช่วยให้เซลล์ยีสต์อยู่ในสภาพแรงดันออสโมติกสูงได้ Razmovski และ Vucurovic (Razmovski & Vucurovic, 2011) รายงานว่าการผสมผงลำต้นข้าวโพดอบแห้งที่มีขนาด 1000 ไมครอน ปริมาณ 0.3 กรัม/200 มิลลิลิตร ลงไปในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล ทำให้ *S. cerevisiae* ใช้น้ำตาลเร็วขึ้นและประสิทธิผลการหมักเอทานอลสูงขึ้น เพราะผงลำต้นข้าวโพดทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารและปกป้องเซลล์ยีสต์จากภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอล และการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae* ร่วมกับการเติมรำใหม่ซึ่งมีคุณสมบัติที่ดี คือ เป็นวัสดุที่แข็งแรง น้ำหนักเบา พื้นที่ผิวมาก เข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ยีสต์ ทำให้ประสิทธิผลการหมักเอทานอลมากกว่าแบบไม่เติมรำใหม่ 11.5% (Rattanapan, Limtong, & Phisalaphong, 2011) สำหรับงานวิจัยที่เกี่ยวข้องของห้องปฏิบัติการได้มีการทดสอบประสิทธิผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของเซลล์ยีสต์ร่วมกับกากใยลิกโนเซลลูโลสจากหัวมันสำปะหลัง เปรียบเทียบกับการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสของเซลล์ยีสต์ในรูปเม็ดปืที่มีกากใยๆ พบว่าการหมักเอทานอลร่วมกับกากใยๆ โดยไม่ใช้เม็ดปืที่มีประสิทธิผลการหมักเอทานอลที่มากกว่า และกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังเป็นของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการหมักเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง มีปริมาณมากและปัจจุบันยังไม่ถูกนำมาใช้ประโยชน์ ดังนั้นจึงมีแนวคิดที่จะปรับปรุงการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยการหมักร่วมกับกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง และการปรับความเข้มข้นของคอปเปอร์ แมงกานีส และซิงค์ในกากน้ำตาลให้เหมาะสม เพื่อประสิทธิผลในการหมักเอทานอลที่ดียิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์

ศึกษาองค์ประกอบของสารอาหารและภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

- 3.1 ค้นคว้าเอกสารและข้อมูลที่เกี่ยวข้อง
- 3.2 เก็บตัวอย่างและศึกษาลักษณะสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีที่มีผลต่อการหมักเอทานอลของกากน้ำตาล

3.3 ศึกษาปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลคงเหลือจากการหมักน้ำตาลซูโครสของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5596

3.4 ศึกษาสภาวะเหมาะสมของการหมักเอทานอลจากกาก น้ำตาลร่วมกับกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง

3.5 ศึกษาสภาวะเหมาะสมของการหมักเอทานอลจากกาก น้ำตาลโดยการปรับความเข้มข้นของคอปเปอร์ แมงกานีส และซิงค์ในกากน้ำตาล

3.6 วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล เขียนวิทยานิพนธ์และบทความทางวิชาการ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบภาวะเหมาะสมในกระบวนการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยการปรับความเข้มข้นของคอปเปอร์ แมงกานีส และซิงค์ในกากน้ำตาลและการหมักร่วมกับกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลและเป็นการทำให้กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัสดุทิ้งทางอุตสาหกรรมการหมักเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังมีมูลค่าเพิ่มขึ้น

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม

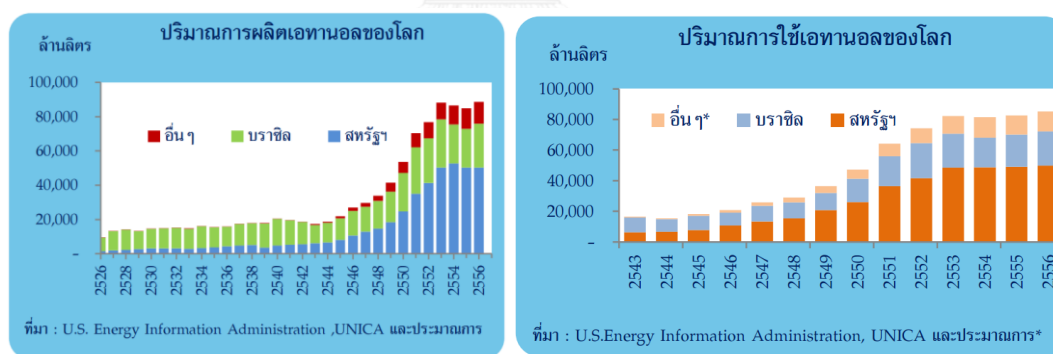
2.1 พลังงานทางเลือก

อุตสาหกรรมและประชากรโลกเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้มีการใช้พลังงานสูงขึ้น ไม่ว่าจะเป็นเป็นเอทานอล น้ำมันดิบ ถ่านหิน และก๊าซธรรมชาติ ความต้องการพลังงานที่สูงแต่มีทรัพยากรไม่มาก พอกับความต้องการจึงนำไปสู่การพัฒนาพลังงานทดแทน เชื้อเพลิงชีวภาพ ได้แก่ ไบโอดีเซล ไบโอดีเซล และก๊าซชีวภาพเป็นพลังงานทดแทนที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน (Tesfaw & Assefa, 2014)

2.2 สถานการณ์เอทานอล

2.2.1 สถานการณ์ต่างประเทศ

สถานการณ์การผลิตเอทานอลของโลกในปี 2556 มีปริมาณ 88,620.4 ล้านลิตร (เฉลี่ย 246.2 ล้านลิตรต่อวัน) เพิ่มขึ้นร้อยละ 4.3 ตามการเพิ่มขึ้นของผู้ผลิตรายใหญ่อย่างสหรัฐอเมริกาและบราซิล รวมกันแล้วคิดเป็นร้อยละ 85.6 ของการผลิตทั่วโลก สอดคล้องกับความต้องการใช้ที่เพิ่มขึ้นร้อยละ 3.2 (ปริมาณ 85,306.1 ล้านลิตร) (ธนาคารแห่งประเทศไทย, 2556)



รูปที่ 2.1 ปริมาณการผลิตและการใช้เอทานอลของโลก

2.2.2 สถานการณ์ในประเทศไทย

ปัจจุบันมีโรงงานเอทานอลที่เปิดดำเนินการแล้ว 21 แห่ง กำลังการผลิตรวม 4.2 ล้านลิตรต่อวัน กำลังการผลิตที่ผลิตจากกากน้ำตาลร้อยละ 61.9 จากน้ำอ้อยร้อยละ 4.7 และจากมันสำปะหลังร้อยละ 33.4 ของกำลังการผลิตรวม (ธนาคารแห่งประเทศไทย, 2556)

โรงงานผลิตเอทานอลของไทย

ภาค	จำนวนโรงงานแยกตามการใช้วัตถุดิบ				กำลังการผลิต(ล้านลิตร/วัน)			
	กากน้ำตาล	น้ำอ้อย	มันฯ	รวม	กากน้ำตาล	น้ำอ้อย	มันฯ	รวม
กลาง	10	-	4	14	1.6	-	0.9	2.5
เหนือ	-	1	-	1	-	0.2	-	0.2
อีสาน	4	-	2		1.0	-	0.5	1.5
รวม	14	1	6	21	2.6	0.2	1.4	4.2

ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน และผู้ผลิตเอทานอล

รูปที่ 2.2 โรงงานผลิตเอทานอลของไทย

สำหรับปริมาณการผลิตเอทานอลของไทยปี 2556 มีปริมาณ 949.1 ล้านลิตร หรือ 2.9 ล้านลิตรต่อวัน เพิ่มขึ้นจากปีก่อนร้อยละ 46.6 คิดเป็นร้อยละ 69.3 ของกำลังการผลิตทั้งหมด โดยเป็นเอทานอลที่ผลิตจากกากน้ำตาล 627.0 ล้านลิตร จากน้ำอ้อย 56.9 ล้านลิตร และจากหัวมันสำปะหลัง 265.2 ล้านลิตร คิดเป็นสัดส่วน 66.1 : 6.0 : 27.9 ของผลผลิตรวม สำหรับปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิตเอทานอล พบว่าในปี 2556 ใช้กากน้ำตาล 2.6 ล้านตัน น้ำอ้อย 0.8 ล้านตัน และมันสำปะหลัง 1.7 ล้านตัน (ธนาคารแห่งประเทศไทย, 2556)

ปริมาณการผลิตเอทานอลจำแนกตามวัตถุดิบ

ล้านลิตร

ปี	กากน้ำตาล	น้ำอ้อย	มันสำปะหลัง	รวม
2554	381.4	36.5	102.6	520.5
2555	531.8	49.0	74.7	655.5
2556	627.0	56.9	265.2	949.1

ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน

ปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล

ล้านตัน

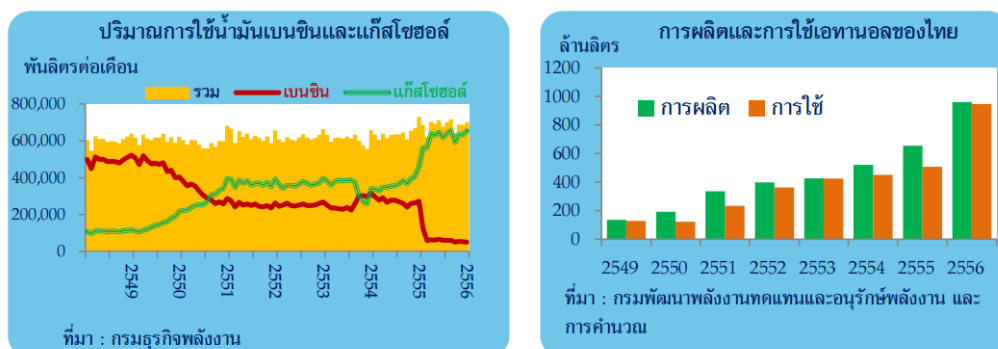
ปี	กากน้ำตาล	น้ำอ้อย	มันสำปะหลัง
2554	1.6	0.5	0.6
2555	2.2	0.6	0.5
2556	2.6	0.8	1.7

ที่มา : กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน

รูปที่ 2.3 ปริมาณการผลิตเอทานอลจำแนกตามวัตถุดิบและปริมาณวัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล

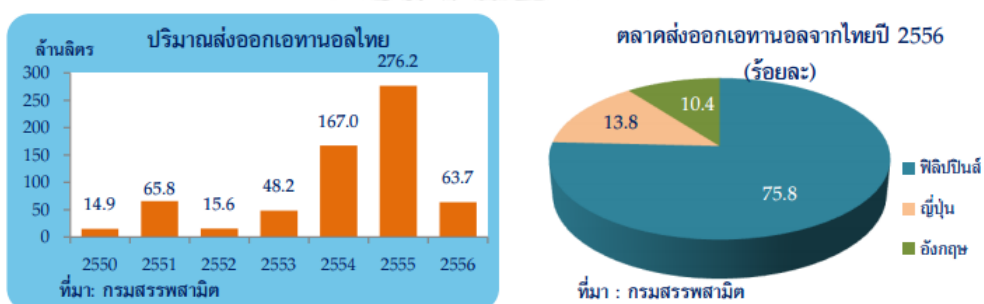
ในปี 2556 การผลิตกากน้ำตาลมีปริมาณ 4.6 ล้านตัน เพิ่มขึ้น (คำนวณตามปีปฏิทิน) ร้อยละ 3.3 เนื่องจากการเพิ่มพื้นที่เพาะปลูกอ้อยของเกษตรกร ทั้งนี้มีการส่งออกกากน้ำตาลจำนวน 0.5 ล้านตัน มูลค่า 1,702.7 ล้านบาท ส่วนการนำเข้ากากน้ำตาลมีจำนวน 0.1 ล้านตัน มูลค่าการนำเข้า 508.9 ล้านบาท (ธนาคารแห่งประเทศไทย, 2556)

ปริมาณการใช้น้ำมันแก๊สโซฮอล์ปี 2556 พบว่ามีปริมาณ 7,469.9 ล้านลิตร เพิ่มขึ้นร้อยละ 67.7 เนื่องจากช่วงต้นปีรัฐบาลได้ยกเลิกการใช้เบนซิน 91 ส่งผลให้ความต้องการใช้เอทานอลของไทยเพิ่มขึ้นอยู่ที่ 948.7 ล้านลิตร (เฉลี่ย 2.6 ล้านลิตรต่อวัน) เพิ่มขึ้นร้อยละ 86.5



รูปที่ 2.4 ปริมาณการใช้น้ำมันเบนซินและแก๊สโซฮอล์กับการผลิตและการใช้เอทานอลของไทย

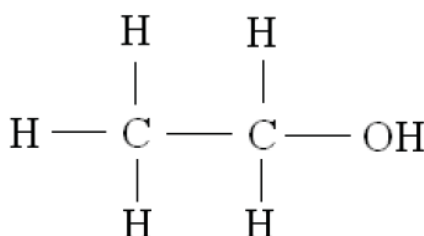
ปริมาณการส่งออกเอทานอลของไทยปี 2556 รวม 63.7 ล้านลิตร ลดลงถึงร้อยละ 76.9 เนื่องจากความต้องการภายในประเทศสูงขึ้น ทำให้การส่งออกเอทานอลไปยังต่างประเทศเหลือเพียง 3 ประเทศเท่านั้น คือ ฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่น และอังกฤษ (ธนาคารแห่งประเทศไทย, 2556)



รูปที่ 2.5 ปริมาณส่งออกเอทานอลและตลาดส่งออกเอทานอลจากไทยปี 2556

2.3 เอทานอล

เอทานอล (Ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีหมู่ไฮดรอกซิล (-OH) เชื่อมด้วยสายโซ่ของไฮโดรคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 2.3 และคุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีแสดงดังตารางที่ 2.1 (Walker, 2010)



รูปที่ 2.6 โครงสร้างทางเคมีของเอทานอล

(ที่มา: http://www.bbc.co.uk/schools/gcsebitesize/science/aqa_pre_2011/oils/polymers_rev3.shtml)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมีของเอทานอล

คุณสมบัติ (properties)	เอทานอล
สูตรโมเลกุล (Molecular formula)	C ₂ H ₅ OH
มวลโมเลกุล (Molecular mass)	46.07 กรัม/โมล
ลักษณะทางกายภาพ (Appearance)	ของเหลวใสไม่มีสี (ระหว่าง -117°ซ - 78°ซ)
การละลายน้ำ (Water solubility)	ละลายได้ดี
ความหนาแน่น (Density)	0.789 กิโลกรัม/ลิตร
จุดเดือด (Boiling temp.)	78.5 °ซ (173°ฟ)
จุดหลอมเหลว (Freezing point)	-117°ซ
จุดวาบไฟ (Flash point)	12.8°ซ
จุดเผาไหม้ (Ignition temp.)	425°ซ
จุดระเบิด (Explosion limits)	ต่ำกว่า 3.5 %(v/v) สูงกว่า 19 %(v/v)
ความดันไอ (Vapour pressure)	38°ซ 50 มิลลิเมตรปรอท
ค่าความร้อนสูงสุด (Higher heating value) (ที่ 20°ซ)	29,800 กิโลจูล/กิโลกรัม
ค่าความร้อนต่ำสุด (Lower heating value) (ที่ 20°ซ)	21,090 กิโลจูล/ลิตร
ความร้อนจำเพาะ, กิโลแคลอรี/กิโลกรัม (Specific heat)	60°ซ
ความเป็นกรด (Acidity:pK _a)	15.9
ความหนืด (Viscosity)	1.200 มิลลิปาสกาล·วินาที (20°ซ)
ดัชนีการหักเหแสง (Refractive index:n _D)	1.36 (25°ซ)
เลขออกเทน (Octane number)	99

เอทานอลสามารถผลิตได้ 2 วิธี คือ

- 1) การสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical Synthesis) โดยใช้เอทิลีน (Ethylene) ที่เป็นผลิตภัณฑ์พลอยได้จากปิโตรเลียมเป็นวัตถุดิบ เอทานอลที่ผลิตโดยวิธีนี้ไม่สามารถนำมาบริโภคได้
- 2) การหมักโดยใช้จุลินทรีย์ (Yeast Fermentation) โดยเชื้อยีสต์จะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารและเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่าไกลโคไลซิส (Glycolysis) ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจน

(ที่มา:<http://www.liquor.or.th/liquor/fileupload/Ethanol.pdf>, 2558)

2.4 วัตถุดิบที่ใช้ในการหมักเอทานอล

ไบโอเอทานอลสามารถผลิตได้จากวัตถุดิบทางการเกษตร ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 ประเภท คือ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล, แป้ง และลิกโนเซลลูโลส

2.4.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

ได้แก่ น้ำอ้อย น้ำตาลจากบีท และกากน้ำตาล ซึ่งยีสต์สามารถย่อยสลายวัตถุดิบประเภทนี้ได้เลยทันที โดยไม่ต้องผ่านการย่อย (pretreatment) เพื่อเป็นน้ำตาล

กากน้ำตาล (molasses) เป็นผลผลิตพลอยได้จากระบวนการผลิตน้ำตาล มีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลที่เหนียวข้น molasses เป็นคำที่มาจากภาษาละติน mel มีความหมายว่าน้ำผึ้ง (honey) เมื่อเวลาผ่านไปกลายเป็นคำว่า malaza ในภาษาสเปน ที่มีความหมายว่า crude-honey-like substance ในภาษาฝรั่งเศส หรือ melasse ในภาษาเยอรมันและดัตช์ สุดท้ายกลายเป็นคำว่า molasses ในปัจจุบัน (Paturau, 1987)

สมาคมควบคุมอาหารสัตว์อเมริกา (The Association of American Feed Control officials : AAFCO, 1982) แบ่งกากน้ำตาลออกเป็น 5 ประเภท

- 1) กากน้ำตาลจากอ้อย (Cane Molasses) เป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากอ้อย มีน้ำตาลไม่น้อยกว่า 46% มีความชื้นมากกว่า 27% ความเข้มข้น 79.5 บริกซ์
- 2) กากน้ำตาลจากหัวบีท (Beet Molasses) เป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลทรายจากหัวบีท มีน้ำตาลไม่น้อยกว่า 48% มีความเข้มข้น 79.5 บริกซ์
- 3) กากน้ำตาลจากส้ม (Citrus Molasses) เป็นน้ำส้มที่ถูกเอาน้ำออกบางส่วน ได้จากโรงงานทำเยื่อส้มแห้ง มีน้ำตาลไม่น้อยกว่า 45% ความเข้มข้น 71.0 บริกซ์
- 4) สารสกัดจากเฮมิเซลลูโลส เป็นผลผลิตพลอยได้จากโรงงานทำไม้อัดแข็ง ในขั้นตอนแปรสภาพไม้โดยใช้อุณหภูมิสูงและความดัน โดยไม่ใช้กรด, ด่าง หรือเกลือ มีน้ำตาลเพนโทสและเฮกโซสเป็นองค์ประกอบ และมีคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดไม่น้อยกว่า 55%
- 5) กากน้ำตาลจากแป้ง เป็นผลผลิตพลอยได้จากการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากแป้งข้าวโพดหรือข้าวฟ่าง แป้งจะถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์หรือกรด มีน้ำตาลรีดิวซ์ไม่น้อยกว่า 43% และน้ำตาลทั้งหมดไม่น้อยกว่า 50% มีปริมาณของแข็งทั้งหมดไม่น้อยกว่า 73% (Curtin, 1983)

กากน้ำตาลที่นิยมนำมาใช้ในการผลิตเอทานอล คือ กากน้ำตาลจากอ้อย และกากน้ำตาลจากหัวบีท การพิจารณาว่าควรเลือกใช้กากน้ำตาลชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับสภาพอากาศของแต่ละภูมิภาค อ้อยจะให้ผลผลิตดีในสภาพอากาศร้อน แต่หัวบีทจะให้ผลผลิตดีในสภาพอากาศเย็น ประเทศไทยค่อนข้างร้อนจึงปลูกอ้อยเพื่อผลิตน้ำตาลและได้ผลผลิตพลอยได้เป็นกากน้ำตาลอ้อยที่สามารถผลิตเอ

ทานอลได้ (Jenkins, 1966) องค์ประกอบโดยประมาณของกากน้ำตาล 2 ชนิดแสดงในตารางที่ 2.2 (Olbrich, 2006)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของกากน้ำตาลหัวปีทและกากน้ำตาลอ้อย

องค์ประกอบ	กากน้ำตาลหัวปีท (%)	กากน้ำตาลอ้อย (%)
น้ำ	16.5	20.0
องค์ประกอบที่เป็นสารอินทรีย์		
น้ำตาล : Saccharose	51.0	32.0
Glucose	-	14.0
Fructose	-	16.0
หรือ Invert sugar	1.0	-
Raffinose	1.0	-
Nonsugar : Nitrogenous materials, free และ bound acids, soluble gummy substances	19.0	10.0
องค์ประกอบที่เป็นสารอนินทรีย์ (เถ้า)		
SiO ₂	0.1	0.5
K ₂ O	3.9	3.5
CaO	0.26	1.5
MgO	0.16	0.1
P ₂ O ₂	0.06	0.2
Na ₂ O	1.3	} 0.2
Fe ₂ O ₂	0.02	
Al ₂ O ₂	0.07	
Soda และ Carbonate residue (as CO ₂)	3.5	
Sulfate residue (as SO ₂)	0.55	1.6
Chlorides	1.6	0.4
	100.0	100.0

ส่วนประกอบของกากน้ำตาลแตกต่างกันไปตามโรงงาน อย่างไรก็ตามส่วนประกอบโดยประมาณคิดเป็นร้อยละตามน้ำหนักของกากน้ำตาลมีดังนี้ คือ 1) น้ำ 17-25% 2) น้ำตาลซูโครส 30-40% น้ำตาลกลูโคส 4-9% น้ำตาลฟรุกโทส 5-12% (Chen & Chou, 1993) มีราคาถูกเมื่อเทียบกับวัตถุดิบที่มีปริมาณน้ำตาลหมักเท่ากัน นอกจากนั้นกากน้ำตาลยังมีส่วนประกอบอื่น ได้แก่ โปรตีน กาลีอแร่ (โพแทสเซียม แคลเซียม โซเดียม แมกนีเซียม คอปเปอร์ เหล็ก แมงกานีส ซิงค์ คลอไรด์ และซัลเฟอร์) และวิตามิน (ไบโอติน กรดโฟลิก ไบโอฟลาวิน ไทอามีน และไนอาซิน) ซึ่งจำเป็นสำหรับการเจริญและเมแทบอลิซึมของยีสต์ ข้อดีของกากน้ำตาลอีกประการหนึ่งคือ เป็นวัตถุดิบที่ไม่ต้องผ่านการปรับสภาพก่อนการหมัก (Bouallagui et al., 2013)

ประโยชน์ที่ได้จากกากน้ำตาลมีมากมาย เช่น ใช้ทำปุ๋ย ใช้เลี้ยงสัตว์ ใช้ผลิตแอลกอฮอล์ ใช้ในอุตสาหกรรมยีสต์ ใช้ทำผงชูรส และใช้ทำกรดน้ำส้ม เป็นต้น แม้ว่าจะใช้ประโยชน์ได้กว้างขวาง แต่ก็ปรากฏว่ากากน้ำตาล ส่วนใหญ่ใช้ประโยชน์ 2 ประการ คือใช้เป็นอาหารสัตว์ และใช้ผลิตแอลกอฮอล์

- 1) ใช้เป็นอาหารสัตว์ กากน้ำตาลมีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะใช้เป็นอาหารสำหรับสัตว์เคี้ยวเอื้อง เช่น โค กระบือ แพะ ฯลฯ ทั้งนี้เพราะว่ากากน้ำตาลนอกจากจะช่วยเพิ่มรสชาติแก่อาหารแล้ว ยังช่วยกระตุ้นการทำงานของแบคทีเรียในกระเพาะซึ่งจะช่วยย่อยอาหารหยาบ เช่น ยอดอ้อย ฟางข้าว และแม้กระทั่งขานอ้อย ทำให้สัตว์พวกนี้ใช้ ประโยชน์จากอาหารดังกล่าวได้มากขึ้น ในกรณีที่ใช้ขานอ้อยเป็นอาหารหยาบอาจใช้สูตร คิดเป็นร้อยละดังนี้ คือ กากน้ำตาล 74% ขานอ้อย 14% กากถั่วลิสง 8% ยูเรีย 2% ไตแคลเซียมฟอสเฟต 15% และโซเดียมคลอไรด์ 0.5%
- 2) ใช้ผลิตแอลกอฮอล์ การผลิตแอลกอฮอล์จากกากน้ำตาลกระทำได้โดยนำเอากากน้ำตาลมาทำให้เจือจางด้วยน้ำแล้วหมักด้วยเชื้อยีสต์พวก *Saccharomyces cerevisiae* เปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นแอลกอฮอล์ จากนั้นก็นำมากลั่นแยกแอลกอฮอล์ออก ซึ่งจะได้แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์ประมาณ 95% ปริมาณแอลกอฮอล์ที่ได้แตกต่างกันไปตามคุณภาพของกากน้ำตาล ตลอดจนกรรมวิธีการผลิตแอลกอฮอล์ของโรงงานนั้น โดยทั่วไปกากน้ำตาลหนัก 1 ตันจะให้แอลกอฮอล์ประมาณ 340 ลิตร (กระทรวงพลังงาน, 2555) ดังนั้นกากน้ำตาลจึงเป็นวัตถุดิบที่น่าสนใจสำหรับอุตสาหกรรมการหมักด้วยยีสต์

2.4.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง

ได้แก่ มันสำปะหลัง (รวมทั้งมันเส้น) ธัญพืช และมันฝรั่ง เป็นต้น โดยแป้งจะเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำมาผ่านกระบวนการย่อยจะได้น้ำตาลกลูโคสที่สามารถ เข้าสู่การหมัก ในกระบวนการผลิตเอทานอลนั้น แป้งในวัตถุดิบจะต้องถูกย่อยให้ได้ น้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาล

โมเลกุลเดี่ยวก่อน ยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ ซึ่งการย่อยแบ่งประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

- 1) การย่อยครั้งแรกหรือการทำให้เหลว (Liquefaction) ขั้นตอนนี้จะใช้กรดหรือเอนไซม์กลุ่ม แอลฟาอะมิเลส (alpha-amylase) ย่อยแบ่งที่อุณหภูมิประมาณ 100-105°C ให้ได้โมเลกุลขนาดเล็ก ลง และมีความหนืดลดลง ของเหลวที่ได้จะมีค่าสมมูลเด็กโทรส (Dextrose equivalent ; DE) อยู่ใน ช่วง 10-15% เรียกว่า มอลโตเด็กซ์ทริน (Maltodextrin)
- 2) การย่อยครั้งสุดท้ายหรือการทำให้หวาน (Saccharification) สารละลายน้ำตาลที่ได้จากการย่อย แบ่งควรมีสสมมูลเด็กโทรส (Dextrose equivalent : DE) สูง ยีสต์จึงจะทำงานได้ดี ขั้นตอนนี้จะใช้ เอนไซม์กลูโคอะมิเลส (glucoamylase) เข้าไปย่อยให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว โดยจะใช้เวลาในการ ย่อยระหว่าง 60-72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60°C เมื่อสิ้นสุดการย่อยจะให้ความร้อนเพื่อหยุดกิจกรรม เอนไซม์และฆ่าเชื้อที่อาจปนเปื้อนก่อนที่จะเข้ากระบวนการหมักยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล เมื่ออยู่ในสภาพปราศจากอากาศ (หรือมีอากาศจำกัด) (กระทรวงพลังงาน, 2558)

2.4.3 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลสชีวมวล

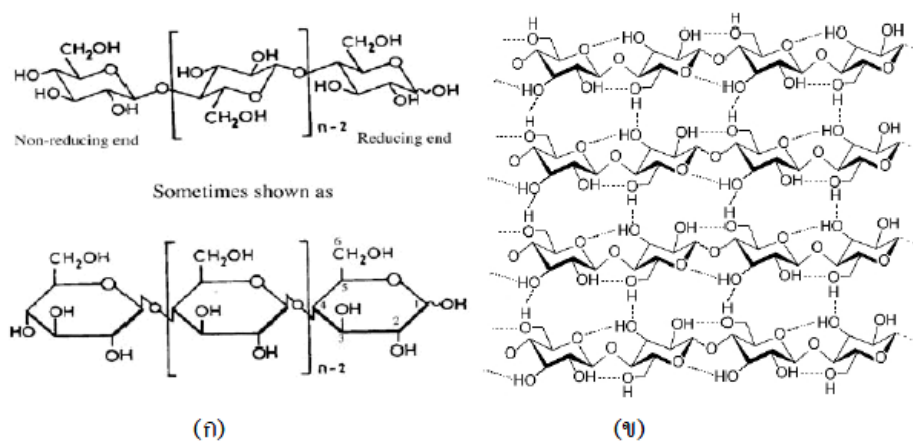
เป็นวัตถุดิบที่ต้องผ่านการย่อย (pretreatment) เพื่อเป็นน้ำตาล ยีสต์จึงจะเปลี่ยนน้ำตาล เป็นเอทานอลได้ องค์ประกอบหลักของลิกโนเซลลูโลสชีวมวล ได้แก่ เซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และ ลิกนิน โดยปกติปริมาณองค์ประกอบจะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และภาวะที่ เจริญเติบโตของพืชนั้นๆ (Sun, 2002) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 องค์ประกอบของลิกโนเซลลูโลสในชีวมวลต่างๆ

Lignocellulosic materials	Cellulose (%)	Hemicellulose (%)	Lignin (%)
Hardwoods stems	40-55	24-40	18-25
Softwood stems	45-50	25-35	25-35
Nut shells	25-30	25-30	30-40
Corn cobs	45	35	15
Grasses	25-40	35-50	10-30
Paper	85-99	0	0-15
Wheat straw	30	50	15
Sorted refuse	60	20	20
Leaves	15-20	80-85	0
Cotton seed hairs	80-95	5-20	0
Newspaper	40-55	25-40	18-30
Waste papers from chemical pulps	60-70	10-20	5-10
Primary wastewater solids	8-15	NA	24-29
Swine waste	6.0	28	NA
Solid cattle manure	1.6-4.7	1.4-3.3	2.7-5.7
Coastal Bermuda grass	25	35.7	6.4
Switchgrass	45	31.4	12.0

1) เซลลูโลส

เป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในเซลล์พืช เซลลูโลสมีสูตรเคมีทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ เมื่อ n คือจำนวนหน่วยของดี-กลูโคสทั้งหมดที่ประกอบกันเป็นโครงสร้าง ซึ่งเกิดจากกลูโคสประมาณ 50,000 โมเลกุล มาเชื่อมต่อกันเป็นสายยาว แต่ละสายของสายเซลลูโลสเรียงขนานกันไปโดยมีแรงยึดเหนี่ยวระหว่างสายทำให้มีลักษณะเป็นเส้นใยสะสมไว้ในพืช โดยมีหน่วยย่อยพื้นฐาน คือ เซลโลไบโอส ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก เบต้า-(1,4-glycosidic bond) ที่คาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 1 ของกลูโคสกับคาร์บอนอะตอมตำแหน่งที่ 4 ของกลูโคสโมเลกุลถัดไป โดยรูปแบบการจัดเรียงตัวของหน่วยดี-กลูโคสจะอยู่ในลักษณะเป็นรูปเก้าอี้ (Chair form) ซึ่งแต่ละโมเลกุลในสายเซลลูโลสจะเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen bond) ระหว่างหมู่ไฮดรอกซิล (Hydroxyl group, -OH) ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 3 กับออกซิเจนที่อยู่ในวงแหวน (Ring) ของโมเลกุลถัดไป และเชื่อมต่อบริเวณระหว่างสายเซลลูโลสที่ขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 กับออกซิเจนที่เชื่อมระหว่างโมเลกุลดี-กลูโคสในอีกสายหนึ่ง โดยการจัดเรียงตัวของโมเลกุลเซลลูโลสมีลักษณะเป็นเส้นตรงไม่มีแขนงย่อย (ดังแสดงในรูปที่ 2.7)

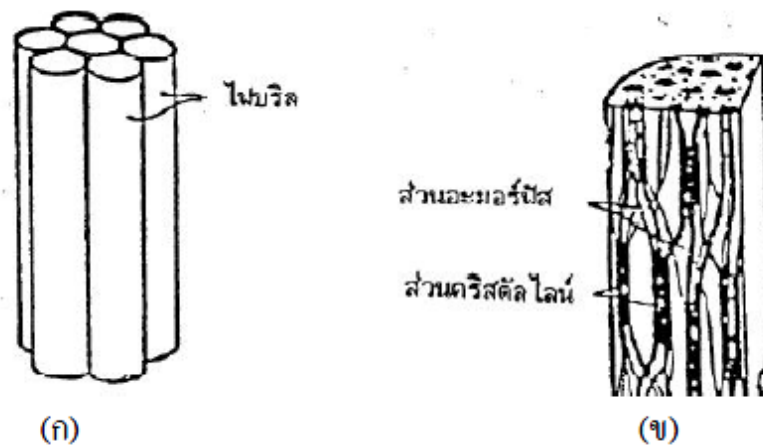


รูปที่ 2.7 (ก) โครงสร้างโมเลกุลของเซลลูโลสและ (ข) ลักษณะการจัดเรียงของโมเลกุลกลูโคสในเซลลูโลส

(ที่มา : (ก) <https://chempolymerproject.wikispaces.com/Cellulose-D-TPNR>

(ข) <http://mypersonalsciencenerd.com/overallblog/bio1/foundations-understanding-organic-macromolecules/>)

จากลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลลูโลสที่เรียงตัวขนานซึ่งกันและกันอย่างมีระเบียบดังกล่าว เรียกว่า คลิสตัลไลน์ไมเซล (Crystalline micelles) โดยแต่ละไมเซลประกอบด้วยโมเลกุลเซลลูโลสประมาณ 100 โมเลกุล เรียงตัวเป็นรูปร่างแถบหนาและประมาณ 10-20 ไมเซลจะมีการเรียงตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้นเรียกว่า ไมโครไฟบริล (Microfibril) ดังรูปที่ 2.8

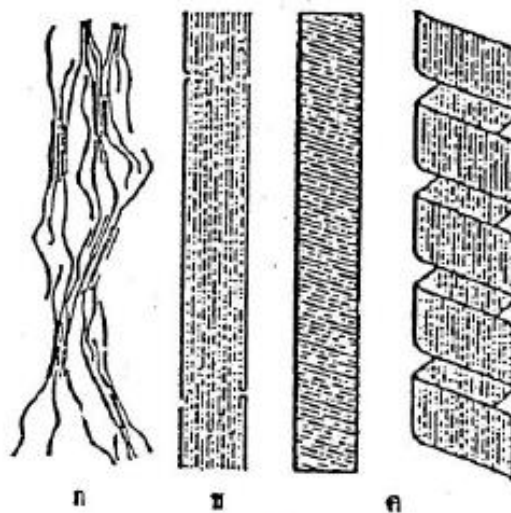


รูปที่ 2.8 (ก) กลุ่มไมโครไฟบริลที่เรียงตัวขนานกันด้วยพันธะไฮโดรเจน และ (ข) ภาพตัดตามยาวของไมโครไฟบริล

(ที่มา: <http://webkc.dede.go.th/testmax/sites/default/files/Final%20Report.pdf>, 2558)

สามารถแบ่งลักษณะโครงสร้างเซลล์ูโลสในผนังเซลล์พืชตามการจัดเรียงตัวของไมโครไฟบริลได้ 3 ลักษณะ คือ

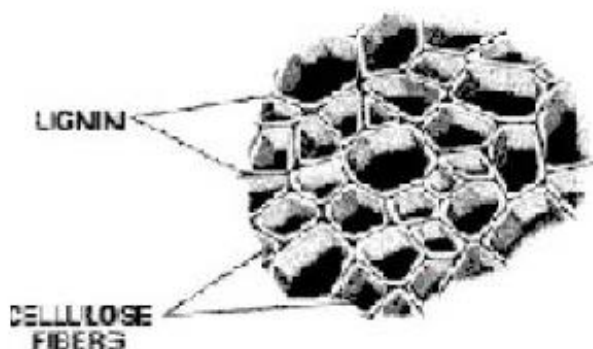
- (1) ฟริงจ์ไมเซลล์ (fringe micelles) คือ ไมโครไฟบริลที่เรียงตัวเป็นริ้วๆ ประกอบด้วยส่วนที่เป็นผลึก (crystalline) และอสัณฐาน (amorphous) (รูปที่ 2.9(ก))
- (2) โครงสร้างเซลล์ูโลสที่ม้วนหรือพับไปมาตามแกนของเส้นใยเซลล์ูโลส (รูปที่ 2.9(ข))
- (3) โครงสร้างเซลล์ูโลสที่มีลักษณะเป็นริบบิ้นหนา เกิดจากการม้วนไปมาโดยตั้งฉากกับแกนของริบบิ้น และริบบิ้นจะม้วนเป็นเกลียว (helix) (รูปที่ 2.9(ค))



รูปที่ 2.9 โครงสร้างเซลล์ูโลสที่พบในผนังเซลล์ของพืชทั่วไป

(ที่มา: <http://webkc.dede.go.th/testmax/sites/default/files/Final%20Report.pdf>, 2558))

จากที่กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าภายในผนังเซลล์ของพืชจะมีเซลลูโลสจัดเรียงตัวเป็นแถบๆ ไม่ติดต่อกันโดยตลอด เมื่อเซลล์แก่เต็มที่จะเกิดช่องว่างที่เต็มไปด้วยลิกนิน ดังรูปที่ 2.10 นอกจากนี้ยังมี โพลีแซคคาไรด์อื่นๆที่ปะปนอยู่กับเซลลูโลสในผนังเซลล์พืช ได้แก่ ไซแลน (xylan) แมนแนน (mannan) โพลียูโรไนด์ (polyuronide) อะราแบน (araban) และกาแลคแตน (galactan) โดยมีพบในปริมาณที่น้อยกว่าเซลลูโลส



รูปที่ 2.10 ผนังเซลล์ของพืชเมื่อเซลล์เริ่มแก่

(ที่มา:<http://webkc.dede.go.th/testmax/sites/default/files/Final%20Report.pdf>, 2558)

เซลลูโลสมีคุณสมบัติไม่ละลายในน้ำ สารอินทรีย์ใดๆ และสารละลายต่างอ่อน หรือกรดอ่อน แต่สามารถละลายได้ดีในกรดแก่หรือต่างแก่ ดังนั้นจึงสามารถแบ่งชนิดเซลลูโลสตามลักษณะการละลายได้ดีในกรดแก่หรือต่างแก่ได้เป็น 3 ชนิด คือ

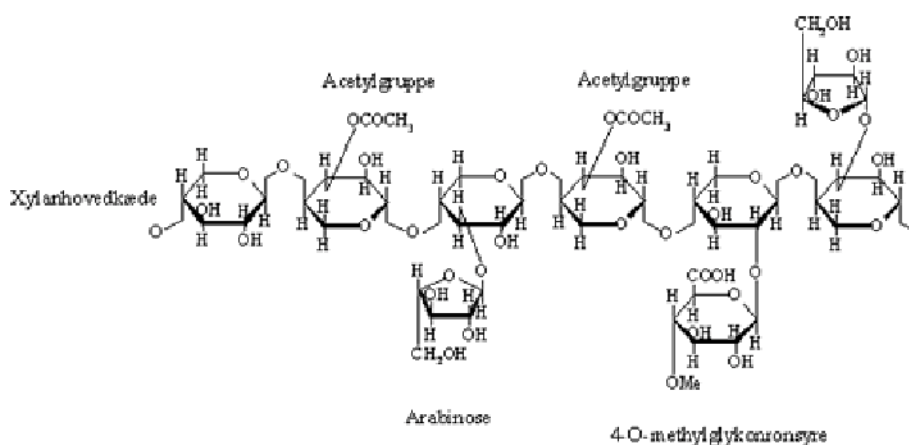
- (1) แอลฟา-เซลลูโลส (α -cellulose) เป็นเซลลูโลสที่แท้จริง ไม่สามารถละลายได้ในสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง
- (2) เบต้า-เซลลูโลส (β -cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง แต่สามารถตกตะกอนได้ง่ายในสารละลายที่มีสภาพเป็นกรด
- (3) แกมมา-เซลลูโลส (γ -cellulose) เป็นเซลลูโลสที่ละลายได้ในสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง และละลายได้ในสารละลายกรด แต่สามารถตกตะกอนได้โดยใช้แอลกอฮอล์

2) เฮมิเซลลูโลส

เป็นอินทรีย์สารในเนื้อเยื่อของพืช ที่พบมากเป็นอันดับสองรองมาจากเซลลูโลส และมักรวมอยู่กับลิกนิน มีลักษณะเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (Pentose) ซึ่งส่วนมากเป็นดีไซแลน (D-xylan) ที่ประกอบด้วยน้ำตาลไซโลส (Xylose) หลายๆโมเลกุลต่อกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก โดยสาย

โพลีเมอร์ของเฮมิเซลลูโลส มีลักษณะเป็นเฮเทอโรจีนัส (heterogeneous) ที่ประกอบด้วยโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดปนกันคือ

- (1) เพนโตแซน (pentosan) ส่วนใหญ่เป็นไซแลน และอะราแบน (araban) ซึ่งเมื่อนำไปย่อยจะได้ น้ำตาลไซโลส และอะราบินอส (arabinose) โดยไซแลนเป็นสารที่มีอยู่ในเฮมิเซลลูโลสมากกว่าสารอื่น
- (2) เฮกโซแซน (hexosan) ส่วนใหญ่เป็นแมนแนน (mannan) กาแลคแทน (galactan) และกลูแคน (glucan) ซึ่งเมื่อถูกย่อยจะได้ น้ำตาลแมนโนส (mannose) กาแลคโตส (galactose) และกลูโคส (glucose) ตามลำดับ
- (3) โพลียูโรนิก (polyuronides) ส่วนมากเป็นสารประกอบของกรดโพลียูโรนิก (polyuronic acid) และยังพบกรดยูโรนิก (uronic acid) ปนอยู่ด้วย



รูปที่ 2.11 โครงสร้างโมเลกุลของเฮมิเซลลูโลส

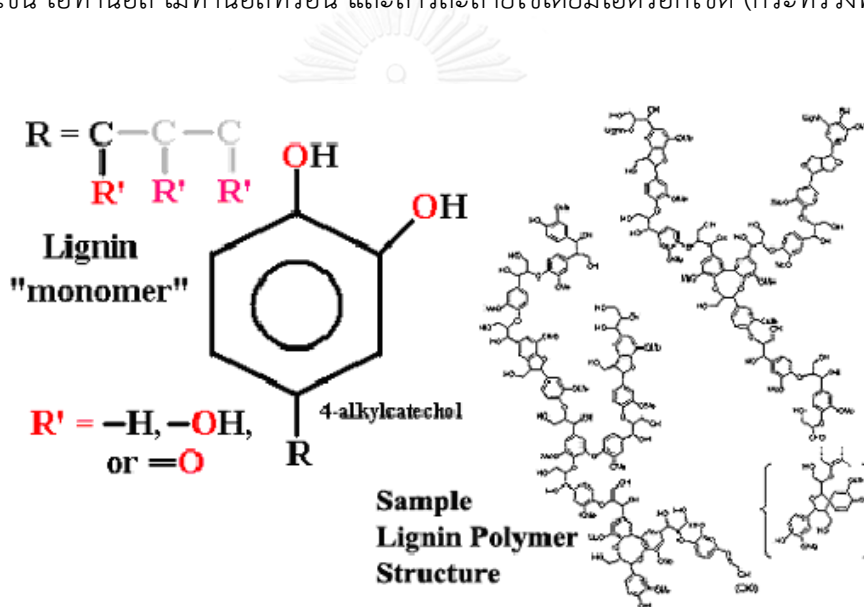
(ที่มา: http://www.science.ku.dk/forskning/online_artikler/artikler/marken_en_stor_solfa_nger.aspx)

เฮมิเซลลูโลสกับเซลลูโลสแตกต่างกันที่ เฮมิเซลลูโลสสามารถถูกย่อยด้วยสารละลายกรดเจือจาง ที่อุณหภูมิสูง และสามารถละลายได้ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 17.5% นอกจากนี้สายโพลีเมอร์ของเฮมิเซลลูโลสยังมีลักษณะเป็นกิ่งก้านสาขามากกว่า แต่มีความยาวของสายโพลีเมอร์สั้นกว่า โดยมีความยาวประมาณ 40 หน่วยกลูโคส

3) ลิกนิน

เป็นสารประกอบที่มีอยู่ในพืชรองลงมาจากเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลส โดยโมเลกุลของลิกนินจะแทรกอยู่ในช่องว่างระหว่าง cellulose fibrils และสายของเฮมิเซลลูโลส เพื่อทำหน้าที่เสริมสร้างความแข็งแรงโดยการเชื่อมจับเส้นใยผนังเซลล์เข้าไว้ด้วยกัน ช่วยลดการผ่านเข้าออกของน้ำที่ผ่านผนังเซลล์ของเนื้อเยื่อไซเลม (xylem) ช่วยต้านทานการเข้าทำลายของจุลินทรีย์โดยในพืชที่อ่อนนุ่มจะมีลิกนินเพียงเล็กน้อยและจะเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ เมื่อพืชแก่ขึ้น เมื่อพืชตายลิกนินจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ลิกเนส (Lignase) หรือ ลิกนินเนส (Ligninase) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่สำคัญในรา ลักษณะโครงสร้าง

โมเลกุลโดยทั่วไปของลิกนินจะประกอบด้วยโพลีเมอร์ของสารประกอบอะโรมาติก (aromatic compound) ที่มีโครงสร้างซับซ้อนประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน รวมตัวกันเป็นหน่วยย่อย เรียกว่า ฟีนอลิกโพลีเมอร์ (phenolic polymer) โดยหน่วยย่อยของโครงสร้างนี้ คือ ฟีนิลโพรเพน (phenylpropane unit) ซึ่งมีลักษณะเป็นโมโนเมอร์ (monomer) ที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ C-O-C หรือ C-C สานต่อกันเป็นโพลีเมอร์ขนาดใหญ่ ดังแสดงในรูปที่ 2.12 โดยที่ตำแหน่งแอลฟาและเบต้าของโมเลกุลลิกนิน อาจเกิดการเชื่อมกันระหว่างโมเลกุล หรือคาร์บอนในหน่วยฟีนอลอาจเกิดพันธะกับคาร์บอนในอีกหน่วยหนึ่งภายในสายโพลีเมอร์ที่ประกอบกันเป็นโมเลกุลลิกนิน จึงทำให้ลิกนินมีโครงสร้างที่แข็งแรง ไม่มีสมบัติทางการยืดหยุ่น และไม่ละลายน้ำ จึงเป็นอุปสรรคต่อการย่อยสลายเซลล์ูโลสเพื่อการผลิตน้ำตาลและเอทานอล แต่ลิกนินสามารถละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์บางชนิด เช่น เอทานอล เมทานอลที่ร้อน และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (กระทรวงพลังงาน, 2555)



รูปที่ 2.12 โครงสร้างโมเลกุลของลิกนิน

(ที่มา:<http://www.palaeos.com/Plants/Lists/Glossary/GlossaryL.html>, 2558)

2.5 จุลินทรีย์ผลิตเอทานอล

ในอุตสาหกรรมหมักแอลกอฮอล์ ใช้ยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์หลัก และยังใช้ในการผลิตเบียร์หรือขนมปังอีกด้วย ลักษณะยีสต์เป็นราเซลล์เดียว มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรม, สิ่งแวดล้อม, วิทยาศาสตร์ทางการแพทย์ (Waites, Morgan, J.S., & Higton, 2001) นอกจากสายพันธุ์ *S. cerevisiae*, ยีสต์อื่นๆที่ไม่ใช่ *Saccharomyces* ก็สามารถผลิตเอทานอลได้เช่นกัน แสดงในตารางที่ 2.4 และตารางที่ 2.5 แสดงแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ (Walker, 2010)

ตารางที่ 2.4 ยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักเอทานอล

สายพันธุ์ยีสต์	ลักษณะเด่น	ลักษณะด้อย
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ยีสต์ที่สามารถใช้น้ำตาลจากสารตั้งต้น ขั้นแรก:first-generation feedstocks (เช่น กลูโคส, ฟรุคโตส, ซูโครส,มอลโทส) ในการหมักเอทา นอลภายใต้สภาวะการผลิตระดับ อุตสาหกรรม	ไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโตส ได้(เช่น ไชโลส, อะราบิโนส) ยกเว้นสายพันธุ์ที่มีการตัดแต่ง พันธุกรรม จึงได้รับน้ำตาลจาก สารตั้งต้นขั้นสอง:second generation lignocelluloses feedstocks อัตราการผลิตเอ ทานอลของสายพันธุ์ GM ที่ หมักไชโลสค่อนข้างต่ำ (0.23- 0.24 กรัม/กรัม น้ำตาล)
<i>Pichia stipitis</i> , <i>Candida shehatae</i> , <i>Kluyveromyces marxianus</i> , <i>Pachysolen tannophilus</i>	ยีสต์อื่นๆที่ไม่ใช่ <i>Saccharomyces</i> ที่ สามารถหมักน้ำตาลเพนโทสได้ (เช่น ไชโลส, อะราบิโนส) ได้รับน้ำตาลจาก สารตั้งต้นขั้นสอง:second generation lignocelluloses feedstocks	ไม่ทนเอทานอลและยังรอการ ใช้ในกระบวนการหมักระดับ อุตสาหกรรม
<i>Hansenula polymorpha</i>	ยีสต์ที่สามารถหมักไชโลสที่อุณหภูมิสูง (Ishchuk et al, 2008)	ไม่มีการทดสอบในระดับ อุตสาหกรรม
<i>Dekkera bruxellensis</i>	ยีสต์ที่แยกได้จากการหมักในโรงต้ม กลั่นซึ่งอาจมีสามารถผลิตเอทานอลได้ ภายใต้สภาวะเครียด	ยังไม่มีการใช้เชิงพาณิชย์อย่าง สมบูรณ์และรอการวิจัยเพื่อใช้ ในระดับอุตสาหกรรม
<i>Candida krusei</i>	ยีสต์ที่ผลิตสารเมตาบอไลต์ขั้นสองจาก การหมัก:secondary fermentation metabolites ในระดับต่ำ เช่น กรด ซัคซินิก	เหมือน <i>D. bruxellensis</i>

ตารางที่ 2.5 แบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักเอทานอล

สายพันธุ์แบคทีเรีย	ลักษณะ	อัตราการผลิตเอทานอล (กรัม/กรัม น้ำตาล)
แบคทีเรียอื่นๆที่ไม่ใช่ สายพันธุ์ GM	แบคทีเรียที่สามารถผลิตเอทานอล (ethanologenic bacteria) มี มากมาย บางสายพันธุ์ (เช่น <i>Zymomonas mobilis</i>) มี ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล มากกว่ายีสต์ <i>Klebsiella oxytoca</i> ก็ มีศักยภาพเช่นกัน แต่อาจไม่สามารถ อยู่รอดได้ในสภาวะเครียดในระดับที่ ใหญ่ขึ้น และอัตราการผลิตเอทานอล ยังค่อนข้างช้า	<i>Z. mobilis</i> 0.46 <i>K. oxytoca</i> 0.34-0.42
สายพันธุ์ GM (สำหรับไฮโดรไล เซลลูลิโนเซลลูโลส)	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> เป็นแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิสูง (thermophile) ซึ่งหมักน้ำตาล C5 และ C6 รวมทั้งพอลิเมอร์สายสั้นที่ อุณหภูมิสูงกว่า 60°C ได้ yield สูงสุด ประมาณ 80% เป็นสายพันธุ์ดัดแปลง พันธุกรรมที่ผลิตเอทานอลได้มากกว่า แลคเทสและฟอรัมเอส แต่ไม่ทนเอทา นอล (5 %v/v) (Candy, 2009) <i>Escherichia coli</i> (มียีนไพรูเวตดีคาร์ บอกซิเลสและแอลกอฮอล์ดีไฮโดร จีเนสของ <i>Z. mobilis</i>) และ <i>Erwinia</i> <i>chrysanthermi</i> (มียีนไพรูเวตดีคาร์ บอกซิเลส) ก็มีศักยภาพเช่นกัน	<i>G. stearothermophilus</i> 0.40 <i>Escherichia coli</i> 0.41 <i>E. chrysanthermi</i> 0.45

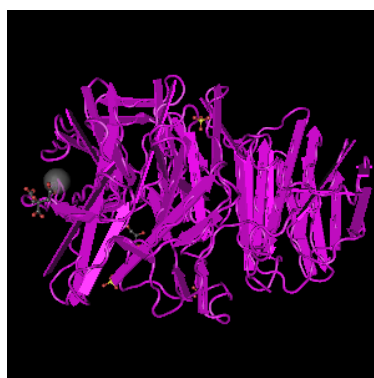
จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลต้องมีเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการหมัก และไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส ยีสต์จำนวนมากและแบคทีเรียจำนวนหนึ่งมีการแสดงออกของแอกติวิตีนี้ แบคทีเรียตาม

ธรรมชาติสายพันธุ์เดียว (ไม่มีการตัดต่อทางพันธุกรรม) ที่สามารถหมักเอทานอลเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจนคือ *Zymomonas* spp. (*Z. mobilis* และ *Z. palmae*) (Graeme M. Walker, 2010) และจุลินทรีย์ที่จะใช้สำหรับการผลิตเอทานอล ควรมีลักษณะที่ดีมีดังนี้ (ลิ้มทอง, 2536)

1. ให้ผลผลิตสูง
2. มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง
3. มีความทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)
4. ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)
5. ทนความเป็นกรด-เบสต่ำ หรือทนกรด (acid tolerance)
6. มีความสามารถในการจับตัวเป็นก้อนตกลงกันภษาชนะ (flocculation)
7. มีลักษณะพันธุกรรมที่ไม่เปลี่ยนแปลงได้ง่าย
8. ทนต่อแรงดันออสโมซิส (osmotolerance)

2.6 เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase)

ในกาณน้ำตาลมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลัก ยีสต์จึงผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสเพื่อย่อยซูโครส เอนไซม์อินเวอร์เทส (invertase), ซูเครส (sucrase) หรือ แซคคาเรส (saccharase) มีชื่อสามัญคือ เบต้าฟรุคโตฟูราโนไซด์เอส (β -fructofuranosidase) IUBMB ได้จำแนกเอนไซม์ให้อยู่ในกลุ่ม EC 3 เป็นกลุ่มไฮโดรเลส (BRENDA, 2015) การศึกษาเอนไซม์อินเวอร์เทสได้เริ่มในปี ค.ศ. 1860 Berthelot ได้พบว่าอินเวอร์เทสสามารถสกัดได้จากยีสต์และสามารถย่อยซูโครส ในปี ค.ศ. 1909 Sorensen ได้รายงานการศึกษาอินเวอร์เทสด้านผลของพีเอชต่อแอกติวิตีของเอนไซม์ และในปี ค.ศ. 1913 Michaelis-Menten ได้นำอินเวอร์เทสมาใช้ในการศึกษาด้านจลนพลศาสตร์ และสามารถนำไปสู่สมการคณิตศาสตร์ซึ่งมีชื่อว่า Michaelis-Menten equation (WHITAKER, 1972)

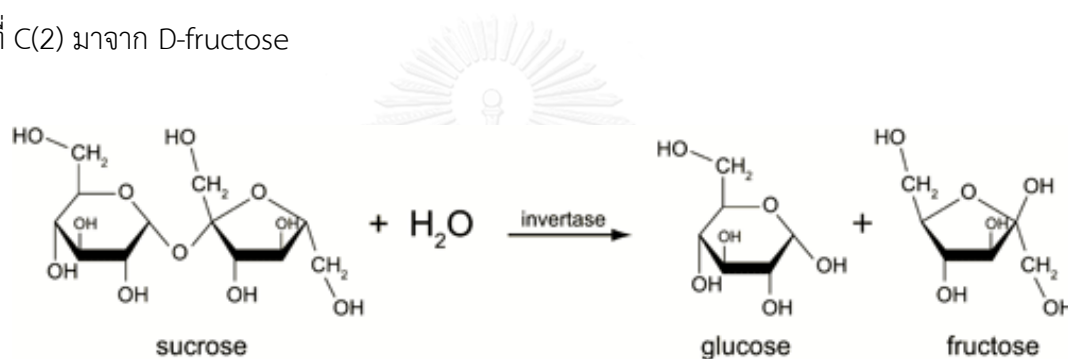


รูปที่ 2.13 โครงสร้างเอนไซม์อินเวอร์เทส

(ที่มา : NCBI, 2015)

2.6.1 ความจำเพาะของเอนไซม์อินเวอร์เทส

อินเวอร์เทสเป็นเอนไซม์ที่สามารถเร่งการสลายตัวของสารตั้งต้น เช่น ซูโครส (sucrose) ราฟฟิโนส (raffinose) และสตาซีโอส (stacheose) ซึ่งเป็นสารที่เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ โดยโครงสร้างของสารตั้งต้นเหล่านี้มีพันธะไกลโคไซด์ (glycosidic linkage) เชื่อมระหว่างแอลฟาดีกลูโคส และเบต้าดีฟรุกโตสเหมือนกัน การเรียกชื่อเอนไซม์อินเวอร์เทสนั้น เนื่องมาจากการย่อยสลายซูโครสแล้วน้ำตาลซูโครสเปลี่ยนค่าการบิดเฟลนของแสงในเครื่องโพลาไรมิเตอร์ไปในลักษณะตรงข้ามคือ จาก +(dextrorotatory) เป็น -(levorotatory) โดยได้ผลิตภัณฑ์คือ กลูโคสและฟรุกโตส อย่างละ 1 โมเลกุล เนื่องจากซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) ที่มีพันธะไกลโคไซด์ 2 ลักษณะคือ C(1)-o โดยที่ C(1) นั้นมาจาก D-glucose อีกลักษณะคือ C(2)-o โดยที่ C(2) มาจาก D-fructose



รูปที่ 2.14 การเร่งปฏิกิริยาย่อยสลายน้ำตาลซูโครสโดยเอนไซม์อินเวอร์เทส

(ที่มา: NCBI, 2014)

2.6.2 แหล่งและสมบัติของเอนไซม์อินเวอร์เทส

เอนไซม์อินเวอร์เทสเป็นเอนไซม์ที่พบได้ทั่วไปทั้งในจุลินทรีย์ พืช และสัตว์ โดยในจุลินทรีย์พบทั่วไป เช่นในยีสต์ ซึ่งพบว่ายีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* และ *Saccharomyces carlsbergensis* เป็นแหล่งของเอนไซม์อินเวอร์เทสแหล่งแรกที่น่าไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม (Reed, 1982) ตั้งตัวอย่างงานวิจัยของ Unger C. และคณะ, 1994 ซึ่งได้ทำการแยกและศึกษา ลักษณะของ β -fructofuranosidase จาก *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่พบในการหมักเบียร์ ส่วนในเชื้อรา พบว่ามีราหลายชนิดที่ผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทส ได้แก่ *Aspergillus niger*, *A. Oryzae*, *A. Japonicas*, *A. phoenicis*, *Aureobasidium pullulans* และ *Furasium onyפוריום* ส่วนใหญ่เอนไซม์อินเวอร์เทสที่พบนั้นมีหลายรูปแบบอาจแบ่งตามที่อยู่ และแบ่งตามสภาวะกรด-เบส ในกรณีที่แบ่งตามที่อยู่จะมี 2 แบบ คือเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายนอกเซลล์ โดยพบบริเวณผนังเซลล์ และเป็นเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ พบในไซโตพลาสซึม หรือถ้าแบ่งตามสภาวะกรด-เบส สามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะคือ เอนไซม์อินเวอร์เทสในรูปที่เป็นกรด และในรูปที่เป็นกลาง

2.6.3 คุณสมบัติที่สำคัญของเอนไซม์อินเวอร์เทส

การศึกษาเอนไซม์อินเวอร์เทสในพืชนั้นส่วนใหญ่เอนไซม์นี้จะทำงานได้ดีต้องอยู่ในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมซึ่งมีอิทธิพลมาจากความเป็นกรด-เบสและอุณหภูมิ โดยค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมคือ 4.0-5.0 หรืออาจอยู่ในช่วง 3.5-5.5 (ทั้งนี้แล้วแต่แหล่งที่พบเอนไซม์อินเวอร์เทส) ซึ่งการทำงานและการถูกยับยั้งจะแตกต่างกันไปตามแหล่งและสภาพแวดล้อมที่ต่างกัน และเอนไซม์อินเวอร์เทสที่ใช้ผลิตทางการค้า เมื่อทำการผลิตเอนไซม์อินเวอร์เทสที่อุณหภูมิ 55°C เอนไซม์มีแอกติวิตีสูงสุด และเกิดการสูญเสียแอกติวิตีเมื่อทำการผลิตที่อุณหภูมิ 59°C และใช้ความเข้มข้นของซูโครสต่ำ แต่เมื่อเปลี่ยนมาใช้ความเข้มข้นของซูโครสสูง พบว่าที่อุณหภูมิ 65°C-70°C เอนไซม์ยังคงทำงานได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าอุณหภูมิที่ไม่คงที่将有ผลกระทบต่อแอกติวิตีของเอนไซม์อินเวอร์เทส (รัตนสุวรรณ, 2538)

2.7 สรีรวิทยาและชีวเคมีของยีสต์กับกระบวนการหมักเอทานอล

S. cerevisiae เป็นสายพันธุ์ยีสต์สำคัญ สำหรับการผลิตเอทานอล การศึกษาสรีรวิทยาของยีสต์ (สารอาหาร, การเจริญเติบโตและกระบวนการเผาผลาญอาหาร) ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักแอลกอฮอล์ จึงได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก

สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญและการหมักของยีสต์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

- สารอาหารที่ต้องการในปริมาณมาก (macronutrients) ได้แก่ คาร์บอน, ไนโตรเจน, ออกซิเจน, ซัลเฟอร์, ฟอสฟอรัส, โพแทสเซียม และแมกนีเซียม ซึ่งจำเป็นต้องมีในอาหารเลี้ยงเชื้อระดับมิลลิโมลาร์
- สารอาหารที่ต้องการในปริมาณน้อย (micronutrients) ได้แก่ แร่ธาตุ (trace elements) ต่างๆ เช่น แคลเซียม, คอปเปอร์, เหล็ก, แมงกานีส และซิงค์ ซึ่งมีในอาหารเลี้ยงเชื้อระดับไมโครโมลาร์ก็เพียงพอ

ยีสต์เจริญได้ค่อนข้างดีในอาหารเลี้ยงเชื้ออย่างง่าย คือมีสารอาหารคาร์บอนและไนโตรเจนเป็นหลักและมีไอออนจากสารอินทรีย์เล็กน้อย ในส่วนของสารอินทรีย์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาจำเพาะหรือเป็นโครงสร้างสำคัญในยีสต์แต่ไม่ได้ใช้เป็นแหล่งพลังงาน ความเข้มข้นที่ต้องการจะต่ำมาก วิตามินเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของโคเอนไซม์ซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญ เพียวรีนและไพริมิดีน นิวคลีโอไซด์และนิวคลีโอไทด์ กรดอะมิโน กรดไขมัน สเตอรอล และสารประกอบอื่นๆอีกมากมาย (เช่น โพลีเอมีน และโคลีน)

ส่วนมากยีสต์เจริญในสิ่งแวดล้อมที่มีอุณหภูมิอบอุ่น, สภาวะเป็นกรด และมีออกซิเจน *S. cerevisiae* สายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมจะเจริญได้ดีในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส และมีพีเอช 4.5-5.5 สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจนก็ได้ และไม่สามารถเจริญได้ดีภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนอย่างแท้จริง เพราะออกซิเจนจำเป็นต่อการเจริญเติบโตในส่วนของกระบวนการสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์ โดยเฉพาะกรดไขมัน (เช่น กรดโอเลอิก) และการสังเคราะห์สเตอรอล (เช่น เออร์โกสเตอรอล)

S. cerevisiae สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ และสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการคอนจูเกตของเซลล์ที่มีเพศ (mating type) ตรงข้ามกัน มีรูปร่างรีเส้นผ่าศูนย์กลางยาว 5-10 ไมโครเมตรและกว้าง 1-7 ไมโครเมตร เป็นจุลินทรีย์จำพวกยูคาริโอต มีองค์ประกอบภายในเซลล์เหมือนกับเซลล์ยูคาริโอตชั้นสูง คือมีนิวเคลียส, ไมโทคอนเดรีย, เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม, กอลจิคอมเพล็กซ์, แวกิวโอล, ไมโครบอดี และเวสิเคิล การเจริญของยีสต์ที่แตกหน่อ เช่น *S. cerevisiae* จะเกี่ยวกับการขนส่งสารและการดูดซึมสารอาหารของเซลล์แล้วจึงรวมองค์ประกอบต่างๆในเซลล์เพื่อเพิ่มมวลและแบ่งเซลล์ในที่สุด การแตกหน่อจะเกิดขึ้นเมื่อเริ่มมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ต่อมาผนังเซลล์จะอ่อนลงเพื่อให้ไซโตพลาซึมไหลออกมาในผนังเซลล์ใหม่ *S. cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีการแตกหน่อหลายตำแหน่ง (multilateral budding) เซลล์ลูก (daughter cell) ที่ได้จะมีบริเวณรอยแผล (bud scar) บนเซลล์แม่ (mother cell) อยู่ที่ตำแหน่งแตกต่างไปจากเดิม ขนาดเซลล์ที่แบ่งแล้วไม่สมมาตร และเซลล์ลูกจะเล็กกว่าเซลล์แม่ ภายใต้ภาวะในห้องปฏิบัติการ *S. cerevisiae* สามารถเพิ่มจำนวนทุก 90 นาที แต่ในถังหมักในอุตสาหกรรมจะใช้เวลาานานกว่า เนื่องจากความเครียดทางกายภาพและเคมีจากภาวะแวดล้อม

S. cerevisiae หมักแอลกอฮอล์โดยใช้น้ำตาล (fermentable sugars) จาก first-generation feedstocks : ซูโครส, กลูโคส และฟรุกโตส (ในกากน้ำตาล) กลูโคสและมอลโทส (ในธัญพืชไฮโดรไลเสท) และจาก second-generation feedstocks : กลูโคส, ไซโลส และอะราบิโนส (ในลิกโนเซลลูโลสไฮโดรไลเสท) อย่างไรก็ตาม *S. cerevisiae* ไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทส (C5) ไซโลส และอะราบิโนส ความหลากหลายของจุลินทรีย์และการตัดต่อพันธุกรรมสามารถทำให้หมักสารประกอบเหล่านี้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

กระบวนการใช้กลูโคสได้เป็นไพรูเวทเรียกว่า ไกลโคไลซิส (Glycolysis, the Embden Meyerhof Parnas pathway) สรุปได้ดังนี้ $\text{Glucose} + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i + 2\text{NAD}^+ \rightarrow 2\text{Pyruvate} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+$

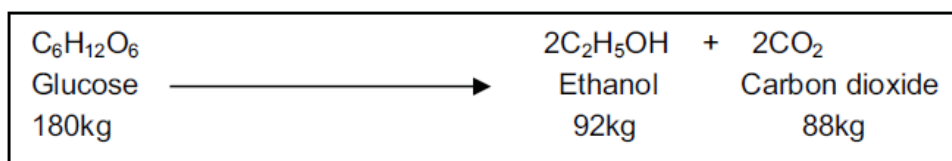
ATP = adenosine tri phosphate (พลังงานชีวภาพ)

NAD = nicotinamide adenine dinucleotide (โคเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับออกซิเดชันและรีดักชัน ;

NAD⁺ เป็นตัวออกซิไดซ์ และ NADH เป็นตัวรีดิวซ์)

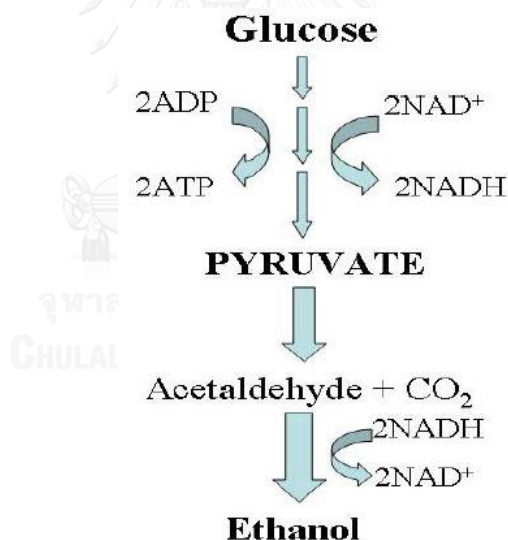
Pi = inorganic phosphate

การเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลในรูปของปริมาณสารสัมพันธ์ทางเคมี แสดงในรูปที่ 2.15



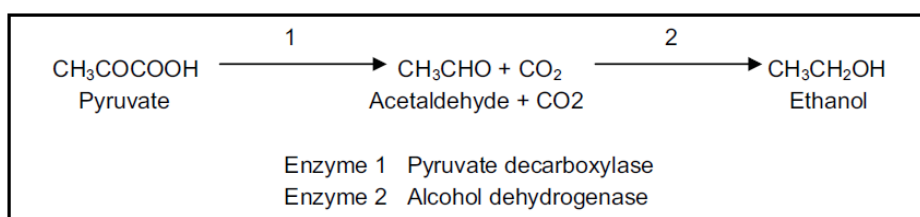
รูปที่ 2.15 การเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลในรูปของปริมาณสารสัมพันธ์ทางเคมี กลูโคส 1,000 กรัม สามารถผลิตเอทานอลได้ประมาณ 470 กรัม (<50%) ค่าสูงสุดตามทฤษฎีคิดเป็นผลผลิต (yield) 92% อย่างไรก็ตามการหมักในอุตสาหกรรมผลผลิตที่ดีที่สุดได้ประมาณ 90% (ใช้กากน้ำตาลอ้อยเป็นวัตถุดิบ) เนื่องจากคาร์บอนที่ได้จากการหมักถูกนำมาใช้ในการสร้างชีวมวลของยีสต์และสารเมแทบอลิท์ (กรดอินทรีย์, เอสเทอร์, แอลดีไฮด์, ฟิวเซลอย)

กระบวนการเปลี่ยนกลูโคสเป็นเอทานอลและเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักสรุปในรูปที่ 2.16 ยีสต์เริ่มหมักน้ำตาลในภาวะไม่มีออกซิเจนเป็นตัวให้อิเล็กตรอน, ตัวรับอิเล็กตรอน และแหล่งคาร์บอน ดังนั้น *S. cerevisiae* จึงออกซิไดซ์อีกครั้ง รีดิวซ์โคเอนไซม์ NADH เป็น NAD⁺ ในขั้นตอนสุดท้ายได้เป็นไฟรูเวต



รูปที่ 2.16 สรุปวิถีไกลโคไลซิสและการหมักเอทานอล

กระบวนการหมักเริ่มจากเอนไซม์ไฟรูเวตดีคาร์บอกซิเลส เปลี่ยนไฟรูเวตเป็นอะซีทัลดีไฮด์สุดท้ายจะรีดิวซ์โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสเป็นเอทานอล



รูปที่ 2.17 กระบวนการหมักเอทานอล

ปฏิกิริยานี้จะปล่อย NAD อีกครั้งเพื่อรักษาสสมดุลของปฏิกิริยารีดอกซ์และทำให้กระบวนการไกลโคไลซิสดำเนินต่อไป จุดสำคัญในวิถีไกลโคไลซิสสรุปได้ดังนี้

- เอนไซม์ในปฏิกิริยาออกซิเดชัน/ฟอสโฟริเลชันจะเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นไพรูเวต 2 โมเลกุล (น้ำตาล C6 1 โมเลกุล แบ่งเป็นสารประกอบ C3 2 โมเลกุล)
- กระบวนการออกซิเดชันผลิตตัวรีดิวซ์โคเอนไซม์ (NADH)
- ปล่อย NAD⁺ โดยเอนไซม์สุดท้ายของการหมัก, แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส

ทั้งยีสต์ *Saccharomyces* และแบคทีเรีย *Zymomonas* เปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลผ่านวิถีโฮโมเอทานอล (homoethanol pathways) แต่กระบวนการแตกต่างกัน *S. cerevisiae* ใช้วิถี Embden-Meyerhof-Parnas ในขณะที่ *Z. mobilis* ใช้วิถี Etner-Doudoroff (Jarboe, Shanmugam, & Ingram, 2009)

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์

2.8.1 ความเข้มข้นของเอทานอล

ความเข้มข้นของเอทานอลเป็นปัจจัยอันดับแรกที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล โดยส่งผลต่อการเจริญของยีสต์และการหมักเอทานอล การยับยั้งเห็นได้ชัดเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เกิดระหว่างการหมักเพิ่มขึ้นก็จะมีผลให้การเจริญเริ่มลดลง ส่วนความสามารถในการทนต่อเอทานอลความเข้มข้นสูงขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นลักษณะประจำสายพันธุ์ของยีสต์เพียงบางจีโนส ได้แก่ *Saccharomyces* และ *Schizosaccharomyces* โดยพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่มีผลต่อการเจริญและการหมัก คือ 10% น้ำหนักต่อปริมาตร และ 20% น้ำหนักต่อปริมาตร ตามลำดับ ผลของการยับยั้งที่เกิดจากเอทานอลสามารถยับยั้งอัตราการเจริญและการมีชีวิตของเซลล์ พบว่าหากมีการเติมเอทานอลในช่วงที่เชื้อเจริญอยู่ในระยะ log phase มีผลทำให้อัตราการเจริญและอัตราการสร้างเอทานอลลดลงอย่างรวดเร็ว แต่พบว่ามีผลต่อการเจริญมากกว่าการหมักเอทานอล (Brown, Oliver, Harrison, & Righelato, 1981)

2.8.2 ชนิดของสารตั้งต้น

สารตั้งต้นที่นำมาผลิตเอทานอลมีหลายชนิด ได้แก่ ประเภทน้ำตาล (กากน้ำตาล อ้อย และน้ำอ้อย) ประเภทแป้ง (แป้งข้าวโพด และแป้งมันสำปะหลัง) เซลลูโลส (ฟางข้าว วัชพืช และเศษไม้เหลือทิ้ง) และของเสียจากโรงงานผลไม้มักกระป๋อง ชนิดของสารตั้งต้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อ

การผลิตเอทานอล เพราะสารตั้งต้นแต่ละชนิดสามารถให้ผลได้ของเอทานอลต่อสารตั้งต้น แตกต่าง กันขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของสารตั้งต้นที่นำมาใช้ (Kim & Dale, 2004) ดังตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ผลได้ของเอทานอลต่อสารตั้งต้นและองค์ประกอบของสารตั้งต้นที่นำมาผลิตเอทานอล

	Dry matter (%)	Lignin (%)	Carbohydrates (%)	Ethanol yield (L kg ⁻¹ of dry biomass)
Barley	88.7	2.90	67.10	0.41
Barley straw	81.0	9.00	70.00	0.31
Corn	86.2	0.60	73.70	0.46
Corn stover	78.5	18.69	58.29	0.29
Oat	59.1	4.00	65.50	0.41
Oat straw	90.1	13.75	59.10	0.26
Rice	88.6	-	87.50	0.48
Rice straw	88.0	7.13	49.33	0.28
Sorghum	89.0	1.40	71.60	0.44
Sorghum straw	88.0	15.00	61.00	0.27
Wheat	89.1	-	35.85	0.40
Wheat straw	90.1	16.00	54.00	0.29
Sugarcane	26.0	-	67.00	0.50
Bagassw	71.0	14.50	667.15	0.28

2.8.3 ความเข้มข้นของสารตั้งต้น

การใช้สารตั้งต้นความเข้มข้นสูงในการหมักเอทานอลเป็นการลดปริมาณน้ำที่ใช้สำหรับเจือจางสารตั้งต้นที่จะนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอล แต่ในขณะที่การใช้สารตั้งต้นความเข้มข้นสูง ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลสูงส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญและการหมักเอทานอล การยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้ส่วนหนึ่งเกิดจากแรงดันออสโมติก ซึ่งเซลล์ของยีสต์จะเกิด plasmolysis เมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 14% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลที่สามารถยับยั้งการหมักนั้น แท้ที่จริงแล้วเกิดจากลักษณะของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ซึ่งหากความเข้มข้นของ

น้ำตาลสูงกว่า 14%(น้ำหนัก/ปริมาตร) จะส่งผลให้อัตราการหมักเริ่มต้นลดลง แต่ผลการยับยั้งที่เกิดจากน้ำตาลนี้น้อยกว่าผลของความเข้มข้นของเอทานอล หรืออาจเป็นผลยับยั้งร่วมกันระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาลและความเข้มข้นของเอทานอล (Jones, Pamment, & Greenfield, 1981)

2.8.4 วิตามิน

ยีสต์ทั่วไปต้องการวิตามินสำหรับการเจริญ ยีสต์ทำขนมปังทุกสายพันธุ์ต้องการไบโอติน กรดแพนโททินิก และอินโนซิทอล (Rosen, 1977) โดยทั่วไปกากน้ำตาลมีวิตามินเหล่านี้เพียงพอ และพบว่าไบโอตินมีความสำคัญต่อการผลิตเอทานอล คือ เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชัน โดยปริมาณไบโอตินที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลคือ 0.05-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร (Jones et al., 1981)

2.8.5 ความเป็นกรด-เบส

โดยทั่วไปยีสต์ส่วนมากเจริญได้ดีในช่วงความเป็นกรด-เบส 3.5-7.0 ค่าความเป็นกรด-เบสเริ่มต้นและ buffer capacity ของการหมักเอทานอลอยู่ในสภาพที่ยีสต์จะเกิดการหมักได้ตลอด กระบวนการหมักเนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการสร้างกรดโดยยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญอยู่ด้วย (Rose & Harrison, 1970) จึงต้องมีการปรับค่าความเป็นกรด-เบสเพื่อให้ยีสต์อยู่ในช่วงที่เหมาะสมและเพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญอยู่ด้วย ดังนั้นจึงปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้อยู่ระหว่าง 4.0-4.5 (Buzas, Dallmann, & Szajani, 1989) หรือ 4.0-5.0 หรือ 4.8-5.0 (Paturau, 1987) ด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น หรือ mineral acid อื่นๆ อย่างไรก็ตามค่าความเป็นกรด-เบสที่ให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงสุดย่อมขึ้นอยู่กับคุณภาพของกากน้ำตาลที่ใช้ และพบว่าการหมักน้ำตาลซูโครส จะมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงที่ค่าความเป็นกรด-เบสต่ำมากกว่า (Jones et al., 1981)

2.8.6 อุณหภูมิ

ในระหว่างการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้น โดยกลูโคส 1 โมเลกุลจะให้ปริมาณความร้อน 26 แคลอรี ดังนี้ $C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 26.0$ แคลอรี ยีสต์ส่วนใหญ่จะเจริญได้รวดเร็วที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส มียีสต์บางสายพันธุ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่านี้เล็กน้อย ไม่มีรายงานว่ามียีสต์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ปัจจัยที่สำคัญที่จุลินทรีย์สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากน้อยแตกต่างกันมีหลายประการ เช่น การสังเคราะห์เอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ กลไกการควบคุมภายในเซลล์ การถ่ายทอด anaerobic information จากยีสต์

ไปยังไรโบโซม การนำอาหารเข้ามาภายในเซลล์ และองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น การเพาะเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส จะเพิ่มอัตราการเกิด respiration difficiency “petite” mutant มากกว่าปกติ (Hutter & Oliver, 1998) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส เนื่องจากปฏิกิริยาการหมักเอทานอลเกิดความร้อนทำให้อุณหภูมิในถังหมักสูงขึ้น ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะต้องลดอุณหภูมิของถังหมักและรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 32-33 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส โดยวิธีการต่างๆ เช่น การพ่นน้ำให้เป็นฝอย ส่งออกไปทำให้เย็นลงนอกถังหมัก (Paturau, 1987)

2.8.7 ออกซิเจน

ออกซิเจนมีบทบาทต่อกระบวนการหมักเอทานอล โดยพบว่าออกซิเจนมีหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจ นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็น growth factor ที่ดีของยีสต์ โดยเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไขมันที่มีพันธะคู่ รวมทั้งกรดโอเลอิก (oleic acid) กรดลินอเลอิก (linoleic acid) และ ergosterol ซึ่งนอกจากช่วยส่งเสริมการหายใจภายใต้ภาวะที่ปราศจากออกซิเจนของยีสต์แล้ว ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการทนต่อเอทานอลของยีสต์ (Jones et al., 1981)

2.8.8 คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน ในความดันที่สูงกว่าบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์จะยับยั้งการเจริญและการหมักได้มากขึ้น เช่นเดียวกันกับในภาวะที่อาหารมีความเป็นกรด-เบสต่ำ และมีเอทานอลเข้มข้นสูง คาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งปฏิกิริยา decarboxylation และมีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมบางอย่างของเอนไซม์ เปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึมได้ และการขนส่งของตัวถูกละลาย ความสัมพันธ์นี้ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงผลที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล ซึ่งส่งผลโดยรวมให้อัตราการผลิตเอทานอลและการสร้างชีวมวลลดลง (Jones & Greenfield, 1982)

2.9 ประเภทของการหมัก

ประเภทของการหมักแบ่งได้หลากหลาย ขึ้นอยู่กับเกณฑ์พิจารณาที่นำมาใช้ โดยแบ่งเป็น 5 ประเภท ดังนี้

2.9.1 การแบ่งประเภทการหมักตามผลผลิตของการหมัก

- ผลผลิตเป็นตัวเซลล์จุลินทรีย์ (microbial cell) เช่น การผลิตยีสต์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมขนมอบ (bakers' yeast) การผลิตเซลล์จุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรตีนเซลล์เดี่ยว (Single Cell Protein; SCP)
- ผลผลิตเป็นเอนไซม์จากจุลินทรีย์ (microbial enzyme) ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น เอนไซม์อะไมเลส (amylase) เอนไซม์ไลเปส (lipase) เอนไซม์โปรตีเอส (proteases) เป็นต้น
- ผลผลิตเป็นสารเมแทบอลิท์ (microbial metabolite) อาจเป็นสารเมแทบอลิท์ปฐมภูมิ (primary metabolite) เช่น เอทานอล บิวทานอล ไลซีน วิตามิน เป็นต้น จุลินทรีย์จะผลิตสารเหล่านี้ในระยะระยะลอกของการเจริญ (log phase) และสารเมแทบอลิท์ทุติยภูมิ (secondary metabolite) ซึ่งเป็นผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมปฐมภูมิ ซึ่งพบในจุลินทรีย์บางชนิดในระยะสแตชันนารี (stationary phase) ของการเจริญ แต่มี ความสำคัญ เช่น ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้เป็นสารส่งเสริมการเจริญเติบโต (growth promoter) หรือมีคุณสมบัติเป็นยาต้านจุลชีพ เป็นต้น
- ผลผลิตที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของสารประกอบที่เติมลงไป (transformation process) เป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารประกอบให้อยู่ในรูปที่คล้ายกัน แต่มีราคาสูงขึ้น เช่น กระบวนการผลิต น้ำส้มสายชู(การเปลี่ยนเอทานอลไปเป็นกรดน้ำส้ม) การผลิตสารปฏิชีวนะ เป็นต้น

2.9.2 การแบ่งประเภทการหมักตามความต้องการอากาศหรือออกซิเจน

- การหมักแบบให้อากาศ (aerobic fermentation) เป็นการหมักภายใต้สภาวะที่มีการเติมอากาศให้แก่ จุลินทรีย์ระหว่างที่เกิดกระบวนการหมัก เช่น การหมักกรดซิตริก และกรดน้ำส้ม เป็นต้น
- การหมักแบบไม่ให้อากาศ (anaerobic fermentation) เป็นการหมักที่ไม่มีการให้อากาศให้แก่ จุลินทรีย์ระหว่างการหมัก เช่น การหมักแอสิตอนและบิวทานอล

2.9.3 การแบ่งประเภทการหมักตามสภาพการควบคุมการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น

- การหมักแบบไม่ปลอดเชื้อ (septic fermentation) เป็นการหมักในสภาพเปิด ไม่จำเป็นต้องกำจัด จุลินทรีย์อื่นก่อนเริ่มการหมัก เช่น การผลิตอาหารหมัก การผลิตสุรากลั่น การผลิตแอลกอฮอล์และ เซลล์ยีสต์จากน้ำทิ้งบางประเภท
- การหมักแบบกึ่งปลอดเชื้อ (semi-septic fermentation) เป็นการหมักในสภาพปิด เพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจากภายนอก แต่ไม่จำเป็นต้องกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ
- การหมักแบบปลอดเชื้อ (aseptic fermentation) เป็นการหมักที่ต้องกำจัดจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบก่อนเริ่มหมัก และในระหว่างกระบวนการหมักต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อกับทุกขั้นตอนการ

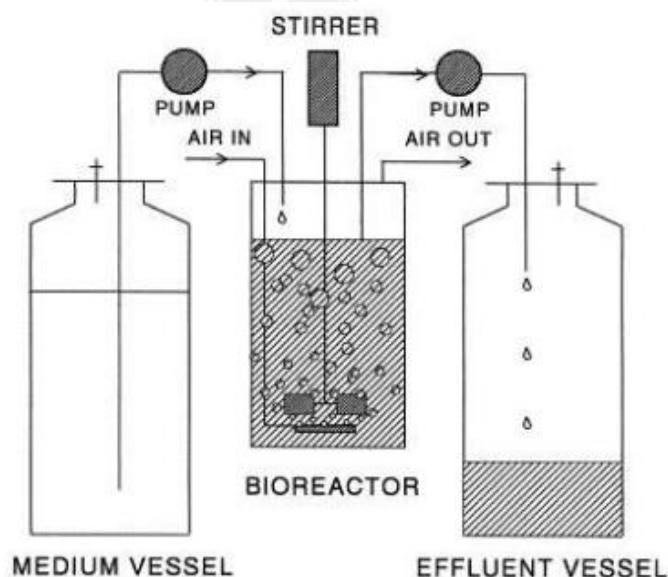
ดำเนินงาน การหมักแบบนี้จึงปราศจากจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดอื่น นอกจากจุลินทรีย์ที่มีบทบาทหลักของกระบวนการ เช่น การหมัก สารเมแทบอลิท์ที่มีมูลค่าสูงหลายชนิด

2.9.4 การแบ่งประเภทการหมักตามลักษณะหรือปริมาณน้ำในอาหารเลี้ยงเชื้อ

- การหมักบนอาหารแข็ง (solid state fermentation) อาหารแข็งที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์อาจเป็นวัตถุดิบตั้งต้นของการหมัก เช่น การหมักมันสำปะหลังหรือเมล็ดข้าว เพื่อให้ราสร้างสารสี การหมักถั่วเหลืองเพื่อทำเต้าเจี้ยวหรือซีอิ๊ว
- การหมักในอาหารเหลว (submerged state fermentation) เป็นการหมักที่ทำได้โดยการเพาะเลี้ยง จุลินทรีย์ในอาหารที่มีลักษณะเป็นของเหลว เช่น อาหารกากน้ำตาล อาหารสังเคราะห์ที่ปรุงแต่งให้มีสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการครบ

2.9.5 การแบ่งประเภทการหมักตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้

- การหมักแบบแบตช์ (Batch fermentation) เป็นการหมักในระบบปิดคือให้สารอาหารเริ่มต้นในปริมาณมากเกินพอกับความต้องการเพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ และเมื่อเพาะกล้าจุลินทรีย์ลงไปในระบบแล้วปล่อยให้จุลินทรีย์มีการเจริญและการหมักโดยไม่มีการเติมสารอาหารลงไปอีก



รูปที่ 2.18 การหมักแบบต่อเนื่อง

(ที่มา: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141022901003313>, 2015)

- การหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation) เป็นการหมักในระบบเปิดที่มีการเติมอาหารใหม่พร้อมๆกับการถ่ายอาหารเก่าและเซลล์จุลินทรีย์ออกจากระบบในอัตราเดียวกันตลอดเวลา ดัง

แสดงในภาพที่ 2.18 จุลินทรีย์จึงมีการเจริญและการหมักอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาที่มีการเติมอาหารใหม่เข้าในระบบ

- การหมักแบบเฟดแบตช์ (Fed-batch fermentation) คือการหมักแบบแบตช์ซึ่งมีการให้อาหารเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่องหรือให้อาหารเป็นลำดับ โดยไม่มีการถ่ายอาหารเก่าและเซลล์จุลินทรีย์ออกจากระบบ การหมักแบบนี้เริ่มต้นหมักในลักษณะเดียวกับการหมักแบบแบตช์แต่เมื่อสารอาหารใกล้หมดจะมีการเติมสารอาหารบางอย่างเพิ่มลงไปให้อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อยืดการเจริญและกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ออกไป (สีสุข, 2555)

2.10 การตรึงเซลล์ยีสต์

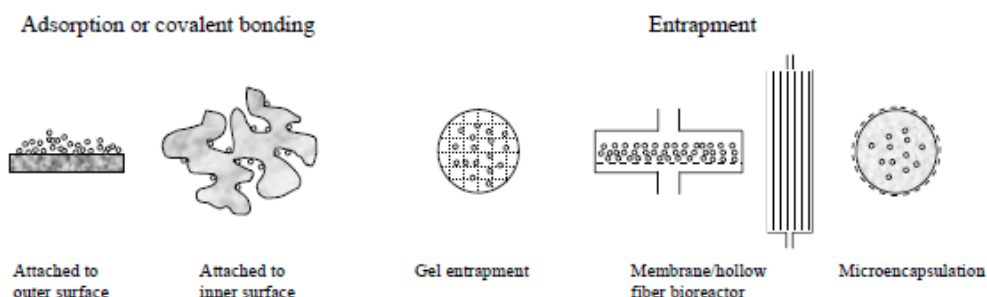
ในระหว่างการหมักเอทานอล ยีสต์ต้องเผชิญกับภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและต่อการหมักเอทานอลหลายชนิด เช่น แร่งดันออสโมติก อุณหภูมิที่สูงขึ้น และปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ที่ไม่เหมาะสม (Laopaiboon et al., 2008) มีการศึกษาก่อนหน้านี้รายงานว่า การหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดยใช้การหมักร่วมกับวัสดุจากธรรมชาติ ช่วยปกป้องเซลล์ยีสต์จากภาวะที่ไม่เหมาะสมข้างต้น ส่งผลให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้นและเร็วขึ้น Pradeep และ Reddy (2010) รายงานว่า การเติมรำข้าวสาลี 1.0 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงไปร่วมกับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมด 24 % (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดย *S. cerevisiae* ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงขึ้น สันนิษฐานว่ารำข้าวทำหน้าที่เป็นแหล่งของสารอาหาร และเป็นวัสดุที่ช่วยให้เซลล์ยีสต์อยู่ในสภาพแรงแดันออสโมติกสูงได้ Razmovski และ Vucurovic (2011) รายงานว่าการผสมผงลำต้นข้าวโพดอบแห้งที่มีขนาด 1000 ไมครอน ปริมาณ 0.3 กรัม/200 มิลลิลิตร ลงไปในการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล ทำให้ *S. cerevisiae* ใช้น้ำตาลเร็วขึ้นและประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงขึ้น เพราะผงลำต้นข้าวโพดทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารและปกป้องเซลล์ยีสต์จากภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอล และการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae* ร่วมกับการเติมรำไหมซึ่งมีคุณสมบัติที่ดี คือ เป็นวัสดุที่แข็งแรง น้ำหนักเบา พื้นที่ผิวมาก เข้ากันได้ทางชีวภาพกับเซลล์ยีสต์ ทำให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลมากกว่าแบบไม่เติมรำไหม 11.5% (Rattanapan et al., 2011) การเปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบเซลล์อิสระกับแบบตรึงเซลล์ (Zhu, 2007) แสดงในตารางที่ 2.7

ตารางที่ 2.7 การเปรียบเทียบระหว่างการหมักแบบเซลล์อิสระกับแบบตรึงเซลล์

	Immobilized cell fermentation	Free cell fermentation
Cell growth	Faster fermentation due to the reduction of non-productive growth phase High cell density	Slower fermentation because cell growth is required for the production phase Low cell density
Production	High substrate concentration High cell productivity High product yield High final product concentration Improved resistance of cells to inhibitory substrates or products	Low substrate concentration to prevent inhibition Low cell productivity Low product yield Product inhibition often results in low final product concentration achieved
Process operation	Batch, fed-batch, or continuous process operation mode in immobilized bioreactor No cell wash-out in continuous fermentation even at high dilution rate Smaller fermentor size needed due to the high cell density Simplified process design due to the separation of products and cells Reuse of cells for prolonged period of time due to cell regeneration Long-term operational stability and constant product quality Reduced risk for microbial contamination	Batch or fed-batch fermentation using stirred tank reactor Difficult to perform continuous process due to cell wash-out Large fermentor required Effective separation and concentration steps are necessary in downstream processing Cells cannot be reused Product quality varies lot by lot More prone to contamination

CHULALONGKORN UNIVERSITY

เทคนิคการตรึงเซลล์ แบ่งได้ 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ carrier binding และ entrapment (Rosevear & Chem., 1984) แสดงในรูปที่ 2.19 (Zhu, 2007)



รูปที่ 2.19 เทคนิคการตรึงเซลล์แบบต่างๆ

2.11 กระบวนการผลิตไบโอเอทานอล

มีทั้งหมด 4 ขั้นตอน

2.11.1 การเตรียมวัตถุดิบก่อนหมัก

เป็นการเปลี่ยนวัตถุดิบตั้งต้นให้เป็นน้ำตาล โดยการใช้เอนไซม์หรือกรดในการย่อยสลาย แต่ถ้าวัตถุดิบเป็นน้ำตาลอยู่แล้วสามารถนำเข้าสู่การผลิตในขั้นตอนที่สองได้ทันที

2.11.2 การหมัก

เป็นการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลโดยกิจกรรมของยีสต์หรือแบคทีเรีย ซึ่งการหมักปกติทำภายในถังหมัก (fermentor) ที่มีการปรับสภาวะให้เหมาะสมกับการหมัก ภายใต้สภาพที่ปราศจากออกซิเจนหรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยจะใช้ระยะเวลาในการหมัก 2-3 วัน เอทานอลที่ได้จะมีความเข้มข้นประมาณ 8-12 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

2.11.3 การทำให้บริสุทธิ์โดยการกลั่น

เป็นการทำให้เอทานอลที่ได้จากการหมักมีความบริสุทธิ์ 95 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร

2.11.4 การดึงน้ำออกจากเอทานอล

เพื่อให้ได้เอทานอลที่มีความบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร (เอทานอลไร้น้ำ) ซึ่งเอทานอลที่จะนำไปใช้เป็นเชื้อเพลิงได้จะต้องมีความบริสุทธิ์ที่ระดับนี้จึงจะไม่มีผลกระทบต่อเครื่องยนต์ (สีสุข, 2555)

2.12 การบำบัดน้ำเสียจากการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล

ปัญหาที่ตามมาของการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาล คือ การจัดการกับระบบน้ำเสียที่มีปริมาณมาก โรงงานต้องขุดบ่อจัดเก็บขนาดใหญ่ บำบัดด้วยแบคทีเรีย และก่อให้เกิดแก๊สชีวภาพส่งกลิ่นเหม็น ปัญหานี้แก้ไขได้โดยโรงงานจะต้องมีการติดตั้งอุปกรณ์เพิ่มเติม เพื่อใช้เป็นเครื่องมือในการดึงไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) ออกจากแก๊สชีวภาพเพื่อให้มีคุณสมบัติเป็นแก๊สมีเทน (CH_4) แล้วนำมาเป็นเชื้อเพลิงสำหรับหม้อต้มไอน้ำและผลิตไฟฟ้าใช้ในโรงงาน อย่างไรก็ตามน้ำเสียในกระบวนการผลิตเอทานอลไม่สามารถบำบัดให้เป็นน้ำบริสุทธิ์คืนสู่ธรรมชาติได้ เนื่องจากยังมีสารไนโตรเจนและฟอสเฟตตกค้างอยู่มาก ซึ่งหากพิจารณาสมบัติน้ำเสียดังกล่าวแล้ว สามารถนำไปใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในภาคการเกษตรได้ ดังนั้นถ้าโรงงานต้องการใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบในการหมักเอทานอลก็สามารถแก้ปัญหาบำบัดน้ำเสียได้จากวิธีข้างต้น นอกจากนี้ยังมีการใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและระบุว่าจะสามารถช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมได้ (Michailides et al., 2015)

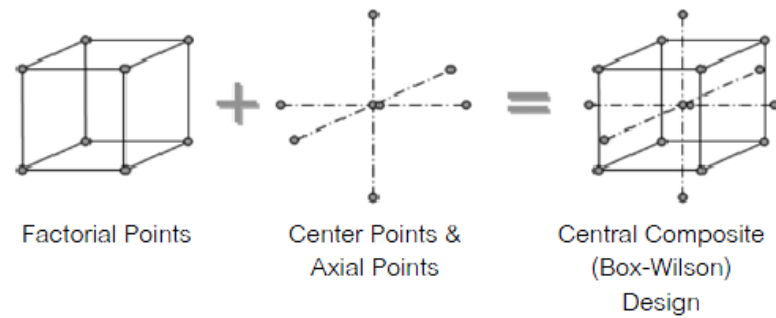
2.13 Central Composite Design (CCD)

ในการออกแบบการทดลอง (design of experiment) หรือเรียกว่า DOE เราอาจต้องการศึกษากระบวนการที่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง (quadratic relationship) กล่าวคือเมื่อตัวแปรตัวใดตัวหนึ่งเพิ่มหรือลดค่า Response อาจเปลี่ยนแปลงในลักษณะที่ไม่เป็นเส้นตรง แต่มีลักษณะเป็นเส้นโค้งแทน เราจะสามารถพบกระบวนการต่าง ๆ ที่มีลักษณะเช่นนี้ได้อยู่บ่อย ๆ บางกระบวนการในหลายอุตสาหกรรม เช่น กระบวนการทางเคมี กระบวนการแปรรูปโลหะ เป็นต้น

วิศวกร นักวิจัย หรือนักวิทยาศาสตร์หลายคนที่ยังไม่รู้เรื่อง DOE มาไม่มากนัก เมื่อต้องเผชิญกับสถานการณ์ดังกล่าว อาจไม่รู้ว่าจะใช้ DOE ศึกษาผลกระทบของตัวแปรดังกล่าวอย่างไรดี บางคนเรียนรู้เรื่อง Full Factorial Design มาบ้าง แต่ต้องการศึกษาตัวแปร 3 ตัว จำนวนจำนวน Runs (สถานะของการทดลอง) ก็จะได้ว่าต้องการจำนวน Runs คือ $3^3 = 27$ Runs และหากต้องศึกษาตัวแปร 4 ตัว ก็ต้องใช้ $3^4 = 81$ Runs และหากศึกษา 5 ตัวแปรก็ $3^5 = 243$ Runs แนวทางดังกล่าวถือว่าไม่เหมาะสมสำหรับการทดลองในอุตสาหกรรม ซึ่งมีทรัพยากรสำหรับใช้ในการทำ DOE ที่จำกัดทางออกของปัญหานี้ง่าย ๆ ทางหนึ่งก็คือ การใช้ Central Composite Design ซึ่งเป็นการทำ DOE สำหรับการศึกษาตัวแปรที่อาจมีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้ง แต่ใช้จำนวน Runs ไม่มากนัก เช่น ศึกษาตัวแปร 3 ตัวแปร ใช้เพียง 16 Runs ศึกษา 4 ตัวแปร ใช้เพียง 28 Runs และศึกษา 5 ตัวแปร ใช้เพียง 30 Runs จะเห็นได้ว่าใช้ทรัพยากรในการทดลองน้อยลงอย่างมาก ในขณะที่สามารถให้ Information จากการทดลองที่สำคัญไม่ต่างจาก Full Factorial มากนัก เรื่องนี้เป็นเรื่องที่น่าเสียดายอย่างหนึ่งก็คือ บุคลากรในหลายองค์กรที่จำเป็นต้องทำ DOE อยู่บ่อย ๆ กลับขาดความรู้ความเข้าใจ หรือไม่ตระหนักถึงการทำ DOE แบบนี้ เรามาลองดูว่า Central Composite Design ที่ว่ามานั้นเป็นอย่างไรกัน

Central Composite Design (หรือ box-wilson design) เป็นการทดลองที่ 3 ระดับ (นิยมแทนด้วยสัญลักษณ์ $-1, 0, +1$) กล่าวคือ จะปรับตัวแปรที่ต้องการศึกษาไปตัวแปรละ 3 ค่า แต่แทนที่จะปรับตัวแปรแบบ Full Combination หรือ Full Factorial กลับเลือกบาง Runs หรือบางสถานะการทดลองที่จำเป็น เพื่อให้ได้ข้อมูลเพียงพอต่อการสร้างแบบจำลองทางสถิติ โดย Model ที่ได้จะยังคงมีทั้ง Main Effect, Interaction และ Quadratic Terms โดยใช้ทรัพยากรไม่มากจนเกินไป ตัวอย่างของ Central Composite Design สำหรับการศึกษาตัวแปร 3 ตัว ถูกแสดงไว้ดังรูปที่ 2.20 และตารางที่ 2.8 ซึ่งจะเห็นได้ว่า DOE ประกอบไปด้วย 3 ส่วน คือ 1. Factorial Points ซึ่งในที่นี้เป็นการนำ 2-Level Full Factorial มาเป็นส่วนหนึ่งของการทดลองนั่นเอง 2. Axial Points เป็นการปรับค่าตัวแปรใดตัวแปรหนึ่งในขณะที่ Fix ให้ค่าตัวแปรอื่นอยู่ที่ค่ากลาง (หรือค่า 0) และ 3. Center Points เป็นการปรับค่าของตัวแปรทุกตัวแปรที่ค่ากลาง (หรือค่า 0) สำหรับตัวอย่างในตาราง

ที่ 2.8 เลือกค่า Alpha = 1 หรือ ระยะจาก Axial Point ไปยัง Center Point เป็น 1 ซึ่งค่าดังกล่าว มักจะเหมาะสมในทางปฏิบัติ (บางครั้งเรียก design ที่ alpha = 1 แบบนี้ว่า face centered design)



รูปที่ 2.20 Central Composite Design สำหรับ 3 Factors

(ที่มา: http://www.tpa.or.th/publisher/pdfFileDownloadS/FQ145_p72-74.pdf, 2558)

ตารางที่ 2.8 การเก็บข้อมูลของ CCD สำหรับ 3 Factors ที่ค่า Alpha=1

A	B	C	Point Types
-1	-1	-1	Factorial Point
1	-1	-1	Factorial Point
-1	1	-1	Factorial Point
1	1	-1	Factorial Point
-1	-1	1	Factorial Point
1	-1	1	Factorial Point
-1	1	1	Factorial Point
1	1	1	Factorial Point
-1	0	0	Axial Point
1	0	0	Axial Point
0	-1	0	Axial Point
0	1	0	Axial Point
0	0	-1	Axial Point
0	0	1	Axial Point
0	0	0	Center Point
0	0	0	Center Point

ตัวอย่างการทำ Central Composite Design

ในกระบวนการบรรจุสารเคมีลงในภาชนะ วิศวกรต้องการที่จะบรรจุสารเคมีซึ่งอาจมีความหนืด (viscosity) ค่าต่าง ๆ ด้วยการปรับค่าความดัน (pressure) และเวลา เพื่อให้ได้ระดับ (level) ของสารเคมีตามที่ต้องการ ระดับที่ต้องการของผลิตภัณฑ์หนึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 70 mm ตัวแปรที่ 3 ที่นำมาศึกษาคาดว่าอาจมีความสัมพันธ์แบบ Quadratic และ Interaction วิศวกรจึงทำ DOE แบบ Central Composite Design ดังตารางที่ 2 ซึ่งจะเห็นได้ว่าการปรับค่าของตัวแปรทั้ง 3 ตัวแปร ๓ ระดับ ๓ ระดับ และมีการปรับตัวแปรต่าง ๆ 16 สภาวะ (สภาวะที่ 15 และ 16 เหมือนกัน) และแต่ละสภาวะมีการเก็บตัวอย่างมาวัดระดับของสารเคมี 3 ค่า บางครั้งเรียกการเก็บข้อมูลซึ่งไม่มีการ Setup ให้แบบนี้ว่า Repetition ซึ่งมักจะมีความเหมาะสมในการทำ DOE ในอุตสาหกรรมจริง

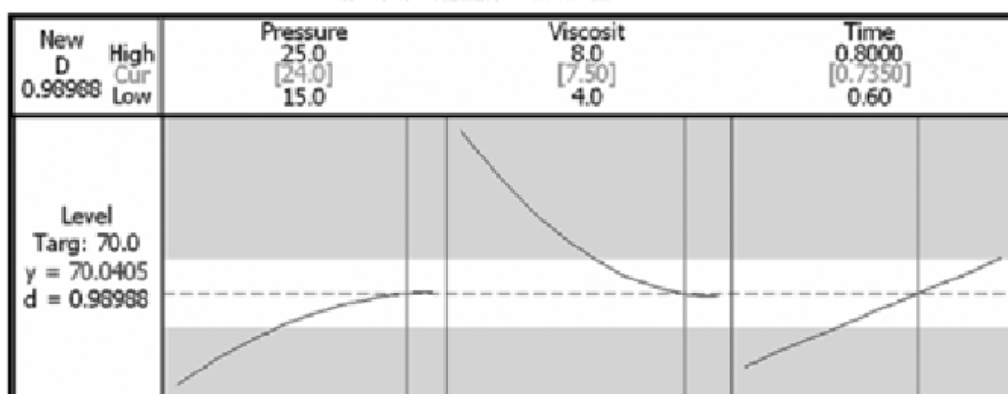
ตารางที่ 2.9 การเก็บข้อมูลของ Central Composite Design สำหรับกระบวนการบรรจุสารเคมี

	Pressure	Viscosity	Time		Level_1	Level_2	Level_3
1	15	4	0.6		72.5	74.3	74.7
2	25	4	0.6		79.9	79.6	79.7
3	15	8	0.6		51.3	51.4	52.0
4	25	8	0.6		63.1	57.3	65.8
5	15	4	0.8		85.6	85.0	86.4
6	25	4	0.8		93.0	92.5	92.7
7	15	8	0.8		60.8	66.5	60.6
8	25	8	0.8		74.1	74.4	73.3
9	15	6	0.7		63.6	58.5	62.5
10	25	6	0.7		72.8	75.9	70.1
11	20	4	0.7		86.4	86.8	86.4
12	20	8	0.7		60.0	62.5	66.3
13	20	6	0.6		66.1	60.2	64.0
14	20	6	0.8		76.2	80.8	78.1
15	20	6	0.7		70.0	69.8	71.2
16	20	6	0.7		66.5	72.0	70.4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากตารางที่ 2.9 ด้วยโปรแกรมทางสถิติทำให้ได้ Model หรือสมการทางสถิติดังนี้

$$\text{Level} = 56.9638 + 4.31724 * \text{Pressure} - 22.4159 * \text{Viscosity} + 62.7133 * \text{Time} - 0.101339 * \text{Pressure}^2 + 1.24496 * \text{Viscosity}^2 + 0.110167 * \text{Pressure} * \text{Viscosity}$$

จะเห็นว่า Model จะมีทั้ง Main Effect (เช่น pressure) Interaction Term (pressure * viscosity) และ Quadratic Term (เช่น pressure²) ข้อได้เปรียบของ Central Composite Design ที่เหนือ 2-Level Full Factorial ก็คือ การได้ Quadratic Terms ซึ่งแสดงถึงความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งนั่นเอง เมื่อนำค่าตัวแปรดังกล่าวไปแทนค่าใน Model ก็จะทำให้เราสามารถเลือกปรับค่าตัวแปรต่าง ๆ ให้เหมาะสมได้ดังตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Response Optimizer ใน MINTAB แนวทางนี้จะทำให้เราสามารถประมาณผลกระทบของความสัมพันธ์ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้นโค้งได้ดีขึ้น และจากตัวอย่างนี้จะสังเกตได้ว่าเรายังสามารถเลือกปรับค่า Pressure และ Viscosity ให้อยู่ในตำแหน่งซึ่งไกลยอด หรือจุดต่ำสุดของเส้นโค้งได้ การปรับค่าในลักษณะดังกล่าวจะทำให้กระบวนการมีความผันแปรเปลี่ยนไปไม่มากหากค่า Pressure และ Viscosity ของกระบวนการมีความผันแปรไป (เรียกเทคนิคนี้ว่า taking advantage of quadratic relationship)



รูปที่ 2.21 การแทนค่าตัวแปรใน Model ด้วยการใช Response Optimizer ใน MINITAB

จากตัวอย่างดังกล่าวจะเห็นได้ว่าเราสามารถศึกษาผลกระทบของตัวแปรซึ่งมีความสัมพันธ์เชิงเส้นโค้งและหาสถานะที่เหมาะสมในการปรับค่าพารามิเตอร์ของกระบวนการได้โดยใช้จำนวนการทดลองไม่มากนัก (ทรัพย์เสรี, 2009)

บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการดำเนินการทดลอง

3.1 กากน้ำตาล (molasses)

งานวิจัยนี้ได้รับความอนุเคราะห์ ตัวอย่างกากน้ำตาลจากโรงงานอุตสาหกรรม อ่างเวียน (ราชสีมา) จังหวัดนครราชสีมา โดยเก็บตัวอย่างกากน้ำตาลในแกลลอนพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้งาน

3.2 กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง (cassava tuber fiber)

กากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลังจากกระบวนการผลิตเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท ทรัพย์ทิพย์ จำกัด จังหวัดลพบุรี เก็บตัวอย่างกากใยหัวมันสำปะหลังในห้องอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์และเครื่องมือวิจัยแสดงดังตารางที่ 3.1
ตารางที่ 3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัย

อุปกรณ์/เครื่องมือ	รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
กล้องจุลทรรศน์เชิงประกอบชนิดใช้แสง (Light Compound Microscope)	CH30	Olympus Co. Ltd., Japan
กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope)	JSM-5410LV	JEOL Co. Ltd., Japan
เครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hot plate magnetic stirrer)	502P-2	PMC Industries Inc., U.S.A.
เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 2 ตำแหน่ง (2-digital balance)	PG6002-S	Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
เครื่องชั่งดิจิตอล ทศนิยม 4 ตำแหน่ง (4-digital balance)	AG285	Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	Allegra™ 25R	Beckman Coulter Inc., U.S.A.

เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วรอบสูงแบบ ควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge)	Avanti™ J-301	Beckman Coulter Inc., U.S.A.
เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)	G560	Scientific Industries Inc., U.S.A.
เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-เบส (pH meter)	S20 SevenEasy™	Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Genesys™ 10S-UV- VIS	Thermo Scientific Inc., U.S.A.
ตู้บ่มเพาะเชื้อแบบเขย่า (Incubator shaker)	Innova™ 4330	New Brunswick Scientific Co. Ltd, UK
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow)	H2	LAB service Ltd., Thailand
ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)	UE600	Memmert Co. Ltd., Germany
ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)	ขนาด 5 มล.	Mettler Toledo Co. Ltd., Switzerland
ไมโครปิเปตต์ (Micropipette)	ขนาด 1 มล.	Gilson Company Inc., U.S.A.
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	ES-215	TOMY Digital Biology Co. Ltd., Japan
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	SS-325	TOMY Digital Biology Co. Ltd., Japan
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	SS40-D	Grant Instrument Co. Ltd., UK
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (Water bath shaker)	Gyromax™ 939XL	Amerex Instrument Inc., U.S.A.

3.4 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัยแสดงดังตารางที่ 3.2

ตารางที่ 3.2 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	บริษัท
กรดแอสिटิก (Acetic acid : $C_2H_4O_2$)	Sigma Inc., Germany
วุ้นผง (Agar)	Merck Co. Ltd., Germany
แอมโมเนียมเฮปตะโมลิบเดตเตตระไฮเดรต (Ammonium heptamolybdatetetrahydrate : $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$)	Merck Co. Ltd., Germany
แอมโมเนียมฟอสเฟตไดเบสิก (Ammonium phosphate dibasic : $((NH_4)_2HPO_4)$)	Sigma Inc., Germany
แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulfate : $((NH_4)_2SO_4)$)	Merck Co. Ltd., Germany
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต (Copper (II) sulfate pentahydrate : $CuSO_4 \cdot 5H_2O$)	Merck Co. Ltd., Germany
ไดโซเดียมไฮโดรเจนอาร์เซนเตเฮปตะไฮเดรต (di-Sodium hydrogen arsenate heptahydrate : $Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$)	Sigma Inc., Germany
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต (di-Sodium hydrogen phosphate dodecahydrate : $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$)	Merck Co. Ltd., Germany
เอทานอล (Ethanol 99% (ปริมาตร/ปริมาตร))	Sigma Inc., Germany
กลูโคส (Glucose : $C_6H_{12}O_6$)	Sigma Inc., Germany
กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid : HCl)	Sigma Inc., Germany
ไฮดรอกซีเมทิลเฟอฟูรอล (Hydroxymethylfurfural)	Sigma Inc., Germany
แมงกานีสซัลเฟตเตตระไฮเดรต (Manganese (II) sulfate tetrahydrate : $MnSO_4 \cdot 4H_2O$)	Merck Co. Ltd., Germany

แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (Magnesium sulfate heptahydrate : $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	Merck Co. Ltd., Germany
ฟีนอล (Phenol 5% (w/v))	Merck Co. Ltd., Germany
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogenphosphate : KH_2PO_4)	Merck Co. Ltd., Germany
โพแทสเซียมโซเดียมทาทาเทตเพนตะไฮเดรต (Potassium sodium tartatepentahydrate : $KNaC_4H_4O_6 \cdot 5H_2O$) (Rocelle salt)	Merck Co. Ltd., Germany
ซูโครส (Sucrose : $C_{12}H_{22}O_{11}$)	Sigma Inc., Germany
โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide : NaOH)	Merck Co. Ltd., Germany
กรดซัลฟูริก (Sulfuric acid : H_2SO_4)	Merck Co. Ltd., Germany
โซเดียมซัลเฟต (Sodium sulphate : Na_2SO_4)	Merck Co. Ltd., Germany
โพลีเพปโตน (Polypeptone)	Becton Co. Ltd., Germany
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	Becton Co. Ltd., Germany
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต (Zinc sulfate heptahydrate : $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$)	Sigma Inc., Germany

3.5 จุลินทรีย์

Saccharomyces cerevisiae สายพันธุ์ TISTR 5596 ได้รับมาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

3.6 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.6.1 ศึกษาลักษณะสมบัติและองค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาล

นำตัวอย่างกากน้ำตาลจากโรงงานอ่างเวียน จังหวัดนครราชสีมา มาวัดค่าความเป็นกรด-เบส วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี phenol-sulfuric (Dubois et al., 1956) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครส น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟรุกโตส ไนโตรเจน กรดระเหยง่าย กรดระเหยยาก แร่ธาตุ ได้แก่ แคลเซียม คอปเปอร์ ซิงค์ แมงกานีส โพแทสเซียม ฟอสฟอรัส และแมกนีเซียมที่ห้องปฏิบัติการวิจัย และทดสอบอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Food Research and Testing Laboratory (FRTL)) วิเคราะห์ไฮดรอกซีเมธิลเฟอฟูรอลที่ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Scientific and Technological Research Equipment Centre (STREC)) วิเคราะห์ปริมาณกรดอะมิโนอิสระที่ บริษัท เอแอลเอส แลบบอราทอรี กรุ๊ป (ประเทศไทย) จำกัด (ALS Laboratory group (Thailand) CO., LTD.)

3.6.2 หาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสของยีสต์ *S. cerevisiae* TISTR 5596

นำเชื้อบริสุทธิ์ของ *S. cerevisiae* TISTR 5596 เจริญที่ 30°C 48 ชม. 1 หลุม มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวซูโครส 10% ประกอบด้วยซูโครส 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เปปโตน 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดจากยีสต์ 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ความเป็นกรด-เบส 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มที่ 30°C 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่ได้ 0.5 มิลลิลิตร หรือ 1% (ปริมาตร/ปริมาตร) ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวชนิดเดิม บ่มที่ สภาวะเดิมต่ออีก 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บเซลล์ 5 มิลลิลิตร ที่ 4°C 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

ถ่ายเซลล์ที่ได้ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวซูโครส 15% ประกอบด้วยซูโครส 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) เปปโตน 0.76% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดจากยีสต์ 0.46% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ค่าความเป็นกรด-เบส 5.0 ปริมาตร 50 มิลลิลิตรในขวดดูแรน (Duran bottle) ขนาด 100 มิลลิลิตร จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 1.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร บ่มที่ 30°C เขย่าผสมที่ 130 รอบต่อนาที ปิดฝาเกลียวให้แน่น เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ทุก 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงเก็บส่วนน้ำใสมาวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลโดยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟี (gas chromatography) (Jutakanoke et al., 2012) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์คงเหลือโดยวิธี (Somogyi, 1952)

3.6.3 หาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล

เตรียมอาหารหมักกากน้ำตาลโดยเจือจางกากน้ำตาลให้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยผสมกากน้ำตาล (555 กรัม) ในน้ำกลั่น 998 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิห้อง 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เพื่อแยกตะกอนออก เก็บส่วนน้ำใสมาเตรียมอาหารหมักโดยเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) KH_2PO_4 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดจากยีสต์ 1.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ อย่างละ 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 4.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 3 นาที หมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 ตามวิธีเดียวกันกับข้อ 3.6.2

3.6.4 หาประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลร่วมกับกากใยของหัวมันสำปะหลัง

เตรียมกากใยของหัวมันสำปะหลังโดยนำกากใยของหัวมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัสดุทิ้งหลังกระบวนการหมักเอทานอลจากหัวมันสำปะหลัง ขนาดอนุภาค 100-1000 ไมครอน มาล้างด้วยน้ำกลั่นในสัดส่วน กากใย 15 กรัม : น้ำ 100 มิลลิลิตร ล้างซ้ำ 5 ครั้ง จนน้ำล้างกากใยของหัวมันสำปะหลัง มีค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.0 อบแห้งกากใยของหัวมันสำปะหลังที่ได้ 65°C จนน้ำหนักคงที่ (24 ชั่วโมง)

เติมกากใยของหัวมันสำปะหลังที่เตรียมได้ลงไปเป็นอาหารหมักกากน้ำตาลที่เตรียม ตามวิธีเดียวกันกับข้อ 3.6.3 และเติมกากใยปริมาณ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ปรับค่าความเป็นกรด-เบส เป็น 4.5 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 3 นาที หมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยของหัวมันสำปะหลัง โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 ตามวิธีเดียวกันกับข้อ 3.6.2 โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 1.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

3.6.5 หาปริมาณกากใยของหัวมันสำปะหลังที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล

แปรผันปริมาณกากใยของหัวมันสำปะหลังที่เติมลงในอาหารหมักกากน้ำตาล (ข้อ 3.6.3) เป็น 10, 5.0 และ 2.5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) หมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใย

ของหัวมันสำปะหลัง โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 ตามวิธีเดียวกันกับข้อ 3.6.2 โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 2.4×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

3.6.6 ศึกษาลักษณะกากใยของหัวมันสำปะหลังในอาหารหมักกากน้ำตาลก่อนและหลังการหมักเอทานอลผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

แช่ตัวอย่างกากใยของหัวมันสำปะหลัง ซึ่งผสมอยู่ในอาหารหมักกากน้ำตาลก่อนการลงเชื้อ และหลังการหมักเอทานอลใน 2.5% (ปริมาตร/ปริมาตร) สารละลายกลูตาโรลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟตเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส 7.2 เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หรือข้ามคืนที่ 4 °C ล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ฟอสเฟต 2 ครั้ง ตามด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ครึ่งละ 10-15 นาที เอน้ำออก (dehydrate) จากตัวอย่างโดยแช่ในสารละลายเอทานอลเข้มข้น 30%, 50%, 70%, 95% และ 100% (ปริมาตร/ปริมาตร) ความเข้มข้นละ 10 นาที แล้วตามด้วยเอทานอลเข้มข้น 100% (3 ครั้ง) ทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่อง critical point dryer (Quorum model K850, UK) ติดตัวอย่างที่เตรียมได้บนแท่นวาง (stub) ด้วยเทปกาวสองหน้านำไปฉายทอง (sputter coater, Balzers model SCD 040, Liechtenstein) แล้วดูด้วยกล้อง SEM (JEOL, modal JSM-5410LV, JAPAN)

3.6.7 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลเมื่อเติมและไม่เติม Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ลงในอาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยของหัวมันสำปะหลัง

หมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลที่มีกากใยของหัวมันสำปะหลัง 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งเติมและไม่เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ชนิดละ 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามวิธีเดียวกันกับข้อ 3.6.2 โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 9.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

3.6.8 หาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล

หมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 ตามวิธีเดียวกันกับข้อ 3.6.3 แต่แปรผันจำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 1.6, 1.92, 2.4, 4.8, 7.2, 9.6×10^8 และ 1.2×10^9 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ

3.6.9 หาชนิดของสารอาหารที่จำเป็นต้องเติมในอาหารหมักกากน้ำตาล

เตรียมกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามวิธีเดียวกับข้อ 3.6.3 (แต่ไม่เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) เก็บส่วนใสมาใช้เตรียมอาหารหมักสูตรต่างๆตามตารางที่ 3.3 ปรับค่าความเป็นกรด-เบส 4.5 บรรจุ 50 มิลลิลิตร ในขวดดูแวนขนาด 100 มิลลิลิตร ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 3 นาที หมักเอทานอลจากอาหารหมักๆ ที่เตรียมได้โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 9.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชม.

ตารางที่ 3.3 องค์ประกอบอาหารหมักสูตรต่างๆ

สารอาหาร % (น้ำหนัก/ ปริมาตร)	หมายเลขอาหารหมัก							
	1	2	3	4	5	6	7	8
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.2%)	-	+	+	-	-	-	+	-
KH_2PO_4 (0.2%)	-	+	-	+	-	-	+	+
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.075%)	-	+	-	-	+	-	-	+
Yeast extract (1.0%)	-	+	-	-	-	+	-	-

สารอาหาร % (น้ำหนัก/ ปริมาตร)	หมายเลขอาหารหมัก							
	9	10	11	12	13	14	15	16
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (0.2%)	-	+	+	-	+	+	+	-
KH_2PO_4 (0.2%)	-	-	-	+	+	+	-	+
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (0.075%)	+	-	+	-	+	-	+	+
Yeast extract (1.0%)	+	+	-	+	-	+	+	+

+ เติม, - ไม่เติม

3.6.10 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลซึ่งเติมและไม่เติม Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+}

หมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลซึ่งไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ โดยเติมและไม่เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ชนิดละ 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามวิธีเดียวกันกับข้อ 3.6.2 โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 9.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

3.6.11 หาความเข้มข้นของ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล

เตรียมอาหารหมักกากน้ำตาลซึ่งไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ แปรผันความเข้มข้นของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ เป็น 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ เป็น 0.01, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เป็น 0.01, 0.1, 0.2, 0.4% (น้ำหนัก/ปริมาตร) หมักเอทานอลจากอาหารหมักที่เตรียมได้ ตามวิธีเดียวกันกับข้อ 3.6.2 โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 9.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

3.6.12 หาปริมาณกรดแอสติก (กรดระเหยง่าย) ที่มีผลยับยั้งการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล

หมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลซึ่งไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ชนิดละ 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และเติมกรดแอสติกโดยแปรผันความเข้มข้นของกรดแอสติกที่เติมเป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามวิธีเดียวกันกับข้อ 3.6.2 โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 9.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร

บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล

4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลเจือจาง

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลเจือจางซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลเจือจาง

องค์ประกอบ	ความเข้มข้น (กรัม/ลิตร)	วิธีการทดสอบ	ค่าต่ำสุดที่ วิเคราะห์ได้ (กรัม/ลิตร)
แคลเซียม	2.8	Inhouse method based on AOAC(2010),984.27,975.03	3.6x10 ⁻⁴
คอปเปอร์	ND		
ซิงค์	2.1 มิลลิกรัม/ลิตร		
แมงกานีส	19 มิลลิกรัม/ลิตร		
โพแทสเซียม	9.8		
ฟอสฟอรัส	210 มิลลิกรัม/ลิตร		
ไนโตรเจน	2.8	Inhouse method based on AOAC(2012),991.20	
แมกนีเซียม	1.2	Inhouse method based on AOAC(2010),984.27,975.03	
กรดแอสติค (กรดระเหยง่าย)	5.5	AOAC(2010),935.57,942.15	
กรดแลคติก (กรดระเหยยาก)	8.2		
ซูโครส	112.8	Asean Manual of Food Analysis (2011) p.27-32	1
กลูโคส	ND		
ฟรุคโตส	96.5		
HMF	0.4	HPLC	

*ND : ไม่สามารถตรวจหาได้

4.2 ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสของ *S. cerevisiae* TISTR 5596

ผลการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ TISTR 5596 ในอาหารหมักซึ่งมีน้ำตาลซูโครส 15% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่า ณ เวลาที่ 96 ชั่วโมง ได้เอทานอลสูงสุด 83.47 กรัม/ลิตร คิดเป็น 0.585 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 ผลการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596

ชั่วโมงที่	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)
0	172.14±3.08	0
24	158.60±6.67	68.85±2.65
48	18.60±2.56	76.95±0.80
72	38.73±2.18	80.90±1.39
96	29.55±1.48	83.47±1.12
120	27.12±2.02	82.51±0.65

4.3 ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล

ผลการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล โดยใช้ *S. cerevisiae* TISTR 5596 โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 1.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ที่ 30°C สภาวะจำกัดออกซิเจน เขย่าผสม 130 รอบ/นาที ได้เอทานอลสูงสุด 64.53 กรัม/ลิตร คิดเป็น 0.593 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ณ เวลาที่ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.3 ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)
0	137.11±2.59	0
24	45.19±2.29	55.89±2.44
48	28.22±1.76	64.53±1.85
72	29.93±0.27	61.07±0.55
96	33.43±0.54	58.37±2.41
120	29.79±0.81	61.23±0.89

เมื่อเปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส (ตารางที่ 4.2) และการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล (ตารางที่ 4.3) จะเห็นได้ว่ายีสต์ใช้น้ำตาลในกากน้ำตาลได้เร็วกว่าในสารละลายซูโครส เนื่องจากในกากน้ำตาลมีส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ โปรตีน วิตามิน และโดยเฉพาะแร่ธาตุบางชนิด ซึ่งทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ ช่วยเร่งปฏิกิริยาทำให้ยีสต์ใช้น้ำตาลและนำไปผลิตเอทานอลได้เร็วขึ้น

4.4 ผลของกากใยของหัวมันสำปะหลังต่อประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล

ผลการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลที่ไม่เติมเปรียบเทียบกับเติมกากใยของหัวมันสำปะหลัง ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 1.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ผลการหมักพบว่า ณ เวลา 48 ชั่วโมง อาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยของหัวมันสำปะหลัง ได้เอทานอลสูงสุด 69.79 กรัม/ลิตร คิดเป็น 0.641 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลรีตีวซ์ (ตารางที่ 4.4) มากกว่าเอทานอลที่ได้จากการหมักอาหารหมักกากน้ำตาลที่ไม่เติมกากใยของหัวมันสำปะหลังซึ่งได้เอทานอลสูงสุดเพียง 64.53 กรัม/ลิตร คิดเป็น 8.15%

ตารางที่ 4.4 ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลร่วมกับกากใยของหัวมันสำปะหลังโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำตาลรีตีวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)
0	137.11±2.59	0
24	45.19±2.29	56.85±1.33
48	28.22±1.76	69.79±1.98
72	29.93±0.27	66.01±1.58
96	33.43±0.54	59.99±2.50
120	29.79±0.81	62.59±1.91

4.5 ผลของปริมาณกากใยของหัวมันสำปะหลังที่เติมในอาหารหมักกากน้ำตาลต่อการหมักเอทานอล

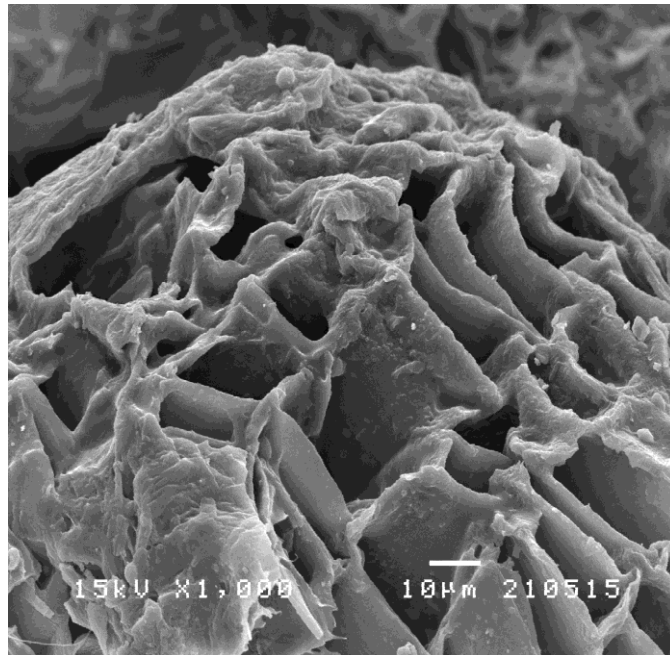
ผลการแปรผันปริมาณกากใยของหัวมันสำปะหลังที่เติมลงไปในการหมักกากน้ำตาล โดยใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 2.4×10^8 เซลล์/มิลลิลิตรพบว่าการเติมกากใยของหัวมันสำปะหลัง 5.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ได้เอทานอลสูงสุด 73.47 กรัม/ลิตร คิดเป็น 0.627 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลรีตีวซ์ ณ เวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.5)

ตารางที่ 4.5 ผลของปริมาณกากใยฯของหัวมันสำปะหลังที่เติมในอาหารหมักกากน้ำตาลต่อการหมักเอทานอลโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596

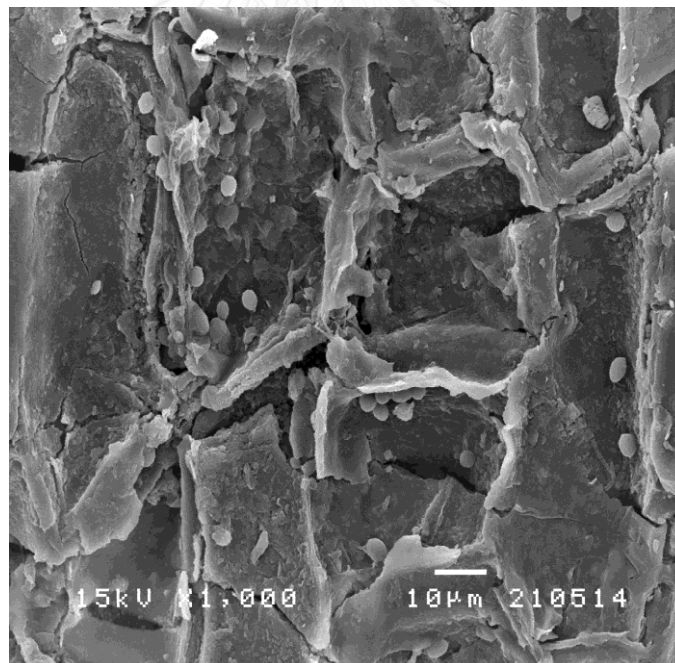
เวลา (ชม.)	กากใยฯ 2.5%		กากใยฯ 5.0%		กากใยฯ 10.0%	
	น้ำตาลรีตีวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีตีวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีตีวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)
0	132.22±1.84	0	132.22±1.84	0	132.22±1.84	0
24	36.64±0.27	62.11±2.43	33.97±0.17	65.28±0.57	34.64±0.59	63.97±0.52
48	18.83±0.08	70.52±0.64	15.06±0.71	73.47±1.43	17.86±0.71	72.74±2.18
72	20.00±0.08	67.14±0.19	18.50±0.44	71.20±1.58	19.85±0.23	69.64±0.43
96	19.75±0.37	65.95±1.59	18.69±0.24	69.75±0.85	19.47±0.12	69.72±1.77

4.6 ผลการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะกากใยหัวมันสำปะหลังก่อนและหลังการหมักเอทานอลผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

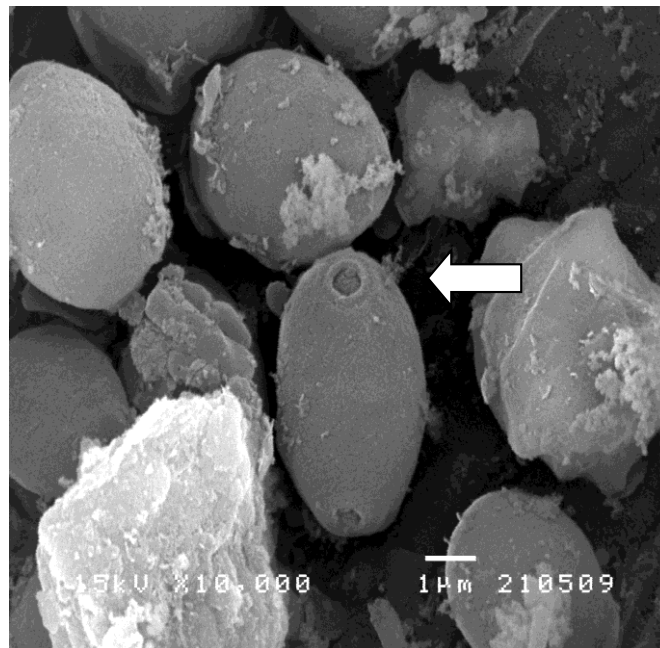
กากใยฯของหัวมันสำปะหลังที่นำมาใช้ในการศึกษา มีลักษณะพื้นผิวขรุขระและเป็นรูพรุน (รูปภาพที่ 4.1) เซลล์ยีสต์จากการหมักเอทานอลจากหัวมันสำปะหลังติดอยู่ภายในรูพรุน สังเกตได้จากลักษณะของเซลล์ที่มีรอยหน่อ (budscar) ที่ติดอยู่บนผนังเซลล์ (รูปภาพที่ 4.2 และ 4.3) โดยพบจำนวนเซลล์ยีสต์ที่เกาะอยู่กับพื้นผิวของกากใยฯของหัวมันสำปะหลังโดยเฉพาะในรูพรุนเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดหลังการหมักเอทานอล (รูปภาพที่ 4.4) ในขณะที่หมักเอทานอล เซลล์ยีสต์ต้องเผชิญกับภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญและการหมักเอทานอล (Laopaiboon et al., 2008) โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอทานอลซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ เพราะเอทานอลสามารถทำลายผนังเซลล์ของยีสต์ มีผลต่อการทำงานเอนไซม์ที่ผนังเซลล์โดยเฉพาะ ATPase ทำให้การเจริญและการหมักเอทานอลของยีสต์ลดลง (Quintas, Lima-Costa, & Loureiro-Dias, 2000) กากใยฯของหัวมันสำปะหลังทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากพิษของเอทานอล นอกจากนั้นเซลล์ยีสต์ที่ติดมากับกากใยฯก่อนการหมัก ยังทำหน้าที่เป็นแหล่งกรดอะมิโนอิสระแก่ยีสต์ (ตารางที่ 4.6) จึงทำให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยฯของหัวมันสำปะหลังสูงกว่าจากอาหารหมักกากน้ำตาลที่ไม่เติมกากใยฯของหัวมันสำปะหลัง



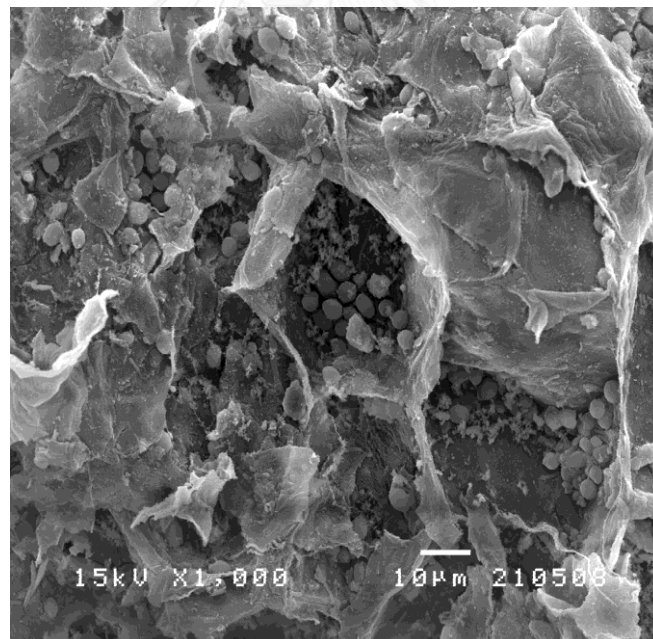
รูปที่ 4.1 พื้นผิวของกากใยของหัวมันสำปะหลังก่อน (กำลังขยาย 1,000 เท่า)



รูปที่ 4.2 เซลล์เยื่อที่ติดมากากใยของหัวมันสำปะหลัง (กำลังขยาย 1,000 เท่า)



รูปที่ 4.3 เซลล์รูปไข่ที่มีรอยหลุดของหน่อบนผิวเซลล์ (กำลังขยาย 10,000 เท่า)



รูปที่ 4.4 เซลล์ยีสต์ที่ตรึงอยู่ในโครงสร้างที่เป็นรูพรุนของกากใยของหัวมันสำปะหลังหลังการหมัก (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

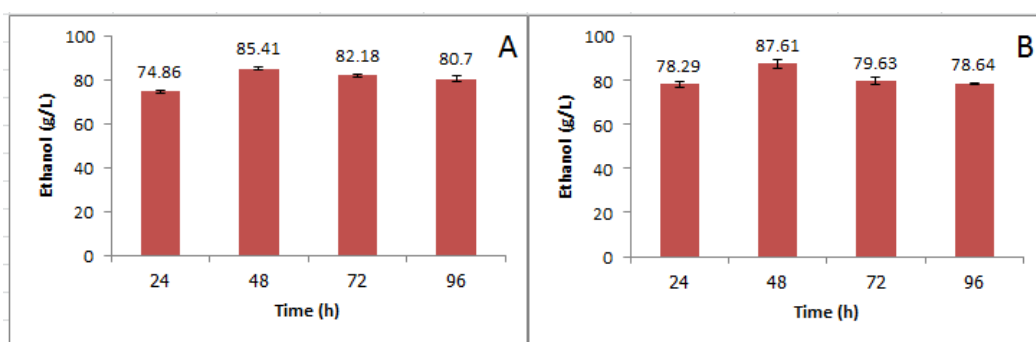
ตารางที่ 4.6 ผลการวิเคราะห์กรดอะมิโนในกากน้ำตาลและกากน้ำตาลที่เติมกากใยลิกโนเซลลูโลสของหัวมันสำปะหลัง (ALS Laboratory group (Thailand) CO., LTD.)

กรดอะมิโน (หน่วยเป็น มิลลิกรัม/100 มิลลิลิตร)	กากน้ำตาล	กากน้ำตาลที่เติมกากใย ของหัวมันสำปะหลัง
Alanine	164	163
Arginine	Not Detected	Not Detected
Aspartic Acid	832	524
Cystine	Not Detected	Not Detected
Glutamic Acid	283	340
Glycine	51.5	100
Histidine	13.3	66.0
Hydroxylysine	Not Detected	Not Detected
Hydroxyproline	Not Detected	Not Detected
Isoleucine	59.4	44.1
Leucine	55.4	93.3
Lysine	18.6	112
Methionine	96.6	57.2
Phenylalanine	33.6	51.6
Proline	60.6	65.8
Serine	49.0	171
Threonine	47.7	57
Tryptophan	Not Detected	Not Detected
Tyrosine	122	274
Valine	113	88.2

4.7 ผลของ Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยของหัวมันสำปะหลัง

การศึกษาผลการเติมและไม่เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ต่อการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยของหัวมันสำปะหลัง 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดย $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่เติมชนิดละ 0.01% (ปริมาตร/ปริมาตร) ใช้

จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 9.6×10^9 เซลล์/มิลลิลิตร พบว่า ณ เวลา 48 ชั่วโมง อาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยฯ และเติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ได้เอทานอล 85.41 กรัม/ลิตร ในขณะที่อาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยฯของหัวมันสำปะหลัง และไม่เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ได้เอทานอลเพิ่มขึ้นเล็กน้อยคือ 87.61 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.5A และ 4.5B) เป็นไปได้ว่าในกากใยฯของหัวมันสำปะหลังมี Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} แล้ว ซึ่งเมื่อรวมกับ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ที่เติมลงไปในการหมักกากน้ำตาลอีก จึงทำให้ความเข้มข้นสูงจนเป็นพิษต่อยีสต์



รูปที่ 4.5 ผลของ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ต่อการผลิตเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลที่เติมกากใยฯหัวมันสำปะหลัง โดย (A) เติมและ (B) ไม่เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596

4.8 ผลการหาปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล

ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล โดยแปรผันปริมาณเชื้อเริ่มต้นสุทธิเป็น 1.6, 1.92, 2.4, 4.8, 7.2, 9.6×10^8 และ 1.2×10^9 เซลล์/มิลลิลิตร ตามลำดับ พบว่าได้เอทานอลสูงสุด 88.62 กรัม/ลิตร คิดเป็น 0.760 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลรีดิวซ์ ณ เวลา 72 ชั่วโมง เมื่อใช้เชื้อเริ่มต้น 9.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ผลของปริมาณเชื้อเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596

เวลา (ชม.)	กล้าเชื้อ 1.6×10^8 เซลล์/มล.		กล้าเชื้อ 1.92×10^8 เซลล์/มล.		กล้าเชื้อ 2.4×10^8 เซลล์/มล.	
	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)
0	132.44±1.26	0	132.44±1.26	0	132.44±1.26	0
24	40.03±1.73	59.31±0.18	38.97±1.55	60.16±0.56	36.22±1.63	62.13±1.40
48	24.97±0.32	66.37±1.17	23.03±0.83	67.78±0.92	20.97±1.21	69.77±1.01
72	25.40±0.58	63.72±1.08	24.75±0.99	64.84±0.70	22.68±1.06	67.93±1.33
96	26.58±0.08	63.21±1.23	25.89±0.93	64.70±0.94	23.36±0.72	65.93±0.49

เวลา (ชม.)	กล้าเชื้อ 2.4×10^8 เซลล์/มล.		กล้าเชื้อ 4.8×10^8 เซลล์/มล.		กล้าเชื้อ 7.2×10^8 เซลล์/มล.	
	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)
0	133.14±0.98	0	133.14±0.98	0	133.14±0.98	0
24	35.85±1.14	62.02±1.11	26.91±0.66	68.65±0.46	23.11±1.02	72.45±0.55
48	20.32±1.06	69.16±1.54	22.54±1.43	78.12±1.03	19.59±0.23	81.30±1.26
72	21.18±1.35	68.11±1.01	20.22±2.14	76.17±0.63	20.64±1.61	78.44±0.28
96	21.06±0.55	65.56±0.63	18.48±1.87	76.26±0.77	18.11±0.22	77.23±0.81

เวลา (ชม.)	กล้าเชื้อ 7.2×10^8 เซลล์/มล.		กล้าเชื้อ 9.6×10^8 เซลล์/มล.		กล้าเชื้อ 1.2×10^9 เซลล์/มล.	
	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลรีดิวซ์ (กรัม/ลิตร)	เอทานอล (กรัม/ลิตร)
0	133.14±0.98	0	133.14±0.98	0	133.14±0.98	0
24	22.74±1.00	71.91±0.12	20.61±0.76	74.30±0.44	19.66±0.25	75.08±0.61
48	19.26±0.67	81.46±0.55	17.23±0.92	85.58±0.64	18.39±0.63	82.54±0.49
72	20.85±0.58	78.86±0.77	16.59±1.05	88.62±0.69	18.30±1.37	83.08±0.63
96	18.03±0.29	78.91±1.53	16.35±0.77	88.46±1.17	18.01±0.58	80.27±0.38

4.9 ผลของสารอาหารต่อการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล

ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลที่มีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และแปรผันชนิดของสารอาหารที่เติม (ตารางที่ 4.8) โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 9.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าได้เอทานอลสูงสุด เมื่อเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ลงไปผสมในกากน้ำตาลไม่จำเป็นต้องเติมสารสกัดจากยีสต์ ทั้งนี้เพราะอาหารหมัก (อาหารหมายเลข 2) และอาหารหมักที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ (อาหารหมายเลข 13) ให้ผลเอทานอลสูงสุดเท่ากันคือ 85.03 และ 85.21 กรัม/ลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.8 องค์ประกอบของอาหารหมักกากน้ำตาลที่ทดสอบ

สารอาหาร % (น้ำหนัก/ปริมาตร)	อาหารหมายเลข							
	1	2	3	4	5	6	7	8
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.2%)	-	+	+	-	-	-	+	-
KH ₂ PO ₄ (0.2%)	-	+	-	+	-	-	+	+
MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.075%)	-	+	-	-	+	-	-	+
Yeast extract (1.0%)	-	+	-	-	-	+	-	-

สารอาหาร % (น้ำหนัก/ปริมาตร)	อาหารหมายเลข							
	9	10	11	12	13	14	15	16
(NH ₄) ₂ SO ₄ (0.2%)	-	+	+	-	+	+	+	-
KH ₂ PO ₄ (0.2%)	-	-	-	+	+	+	-	+
MgSO ₄ ·7H ₂ O (0.075%)	+	-	+	-	+	-	+	+
Yeast extract (1.0%)	+	+	-	+	-	+	+	+

+ เต็ม, - ไม่เต็ม

ตารางที่ 4.9 ผลของสารอาหารต่อการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae* TISTR 5596

อาหารหมายเลข	เอทานอล (กรัม/ลิตร)
1	76.92±0.93
2	85.03±0.36
3	80.25±0.48
4	78.02±1.16
5	79.18±0.62
6	79.31±0.25

7	80.03±0.44
8	79.45±0.06
9	81.05±0.42
10	79.16±0.32
11	81.18±0.07
12	80.27±0.30
13	85.21±0.38
14	82.12±0.57
15	82.48±0.15
16	84.15±1.22

ณ เวลา 72 ชั่วโมง

จากผลการทดลองข้างต้น ซึ่งเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร), KH_2PO_4 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075% (น้ำหนัก/ปริมาตร) จึงได้หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ควรเติมลงไปในการหมักน้ำตาลเจือจาง โดยโปรแกรม Central Composite Design (CCD) แปรผันความเข้มข้นของสารอาหารทั้ง 3 ชนิดดังแสดงในตารางที่ 4.10 พบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 ผลิตเอทานอลสูงสุด 87.17 กรัม/ลิตร หลังการบ่ม 72 ชั่วโมง เมื่อเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.1% (น้ำหนัก/ปริมาตร) KH_2PO_4 0.3% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (อาหารหมายเลข 3) (ตารางที่ 4.11 และ 4.12)

ตารางที่ 4.10 การแปรผันความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมในการหมักน้ำตาล

ตัวแปร	สารอาหาร (กรัม/ลิตร)	ช่วงและระดับ				
		-1.68	-1	0	1	+1.68
X_1	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.32	1	2	3	3.68
X_2	KH_2PO_4	0.32	1	2	3	3.68
X_3	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.09	0.25	0.75	1.25	1.59

ตารางที่ 4.11 องค์ประกอบของอาหารหมักกากน้ำตาลดัดแปลงที่แปรผันความเข้มข้นของสารอาหารที่เติม

อาหารหมายเลข	X ₁	X ₂	X ₃
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1.68	0	0
10	1.68	0	0
11	0	-1.68	0
12	0	1.68	0
13	0	0	-1.68
14	0	0	1.68
15	0	0	0

ตารางที่ 4.12 ผลการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลดัดแปลง ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของ (NH₄)₂SO₄, KH₂PO₄ และ MgSO₄·7H₂O

อาหารหมายเลข	เอทานอล (กรัม/ลิตร)
1	83.09±0.85
2	78.59±1.25
3	87.17±0.98
4	84.50±0.92
5	79.30±1.57
6	74.31±1.92
7	82.83±1.04
8	78.86±1.47

9	83.05±0.70
10	79.05±2.37
11	81.58±0.91
12	82.81±1.27
13	82.39±0.71
14	80.30±2.22
15	85.12±0.80

ณ เวลา 72 ชั่วโมง

จากนั้นนำผลการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลตัดแปลง ซึ่งแปรผันความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ตารางที่ 4.9) มาวิเคราะห์ทางสถิติ ผลที่ได้คือ

การทดสอบทางสถิติโดยใช้ SPSS

Model summary

Model	R	R Square	Adjusted R Square	Std. Error of the Estimate	Change Statistics				
					R Square Change	F Change	df1	df2	Sig. F Change
1	.866	.750	.696	1.95612	.750	13.702	9	41	.000

ANOVA

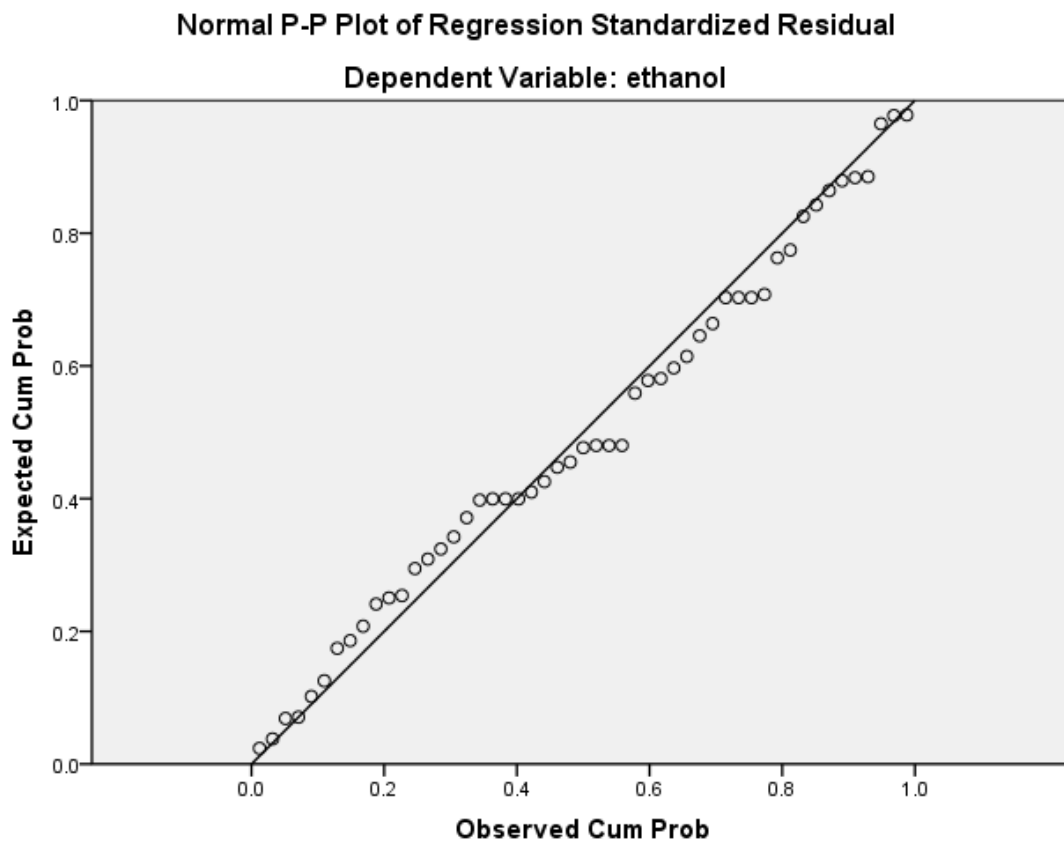
Model		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
1	Regression	471.881	9	52.431	13.702	.000
	Residual	156.883	41	3.826		
	Total	628.764	50			

Coefficient

Model	Unstandardized Coefficients		Standardized Coefficients	t	Sig.	99.0% Confidence Interval for B	
	B	Std. Error	Beta			Lower Bound	Upper Bound
1 (Constant)	74.618	3.229		23.106	.000	65.895	83.341
X1	3.405	1.688	.869	2.018	.050	-1.154	7.964
x2	5.773	1.688	1.473	3.421	.001	1.214	10.332
x3	6.249	3.393	.765	1.842	.073	-2.915	15.413
x1x1	-1.485	.332	-1.560	-4.480	.000	-2.381	-.590
x2x2	-1.081	.332	-1.135	-3.260	.002	-1.976	-.185
x3x3	-6.001	1.548	-1.208	-3.876	.000	-10.184	-1.819
x1x2	.136	.399	.102	.340	.735	-.943	1.214
x1x3	.303	.799	.099	.380	.706	-1.854	2.460
x2x3	-.035	.799	-.011	-.044	.965	-2.192	2.122

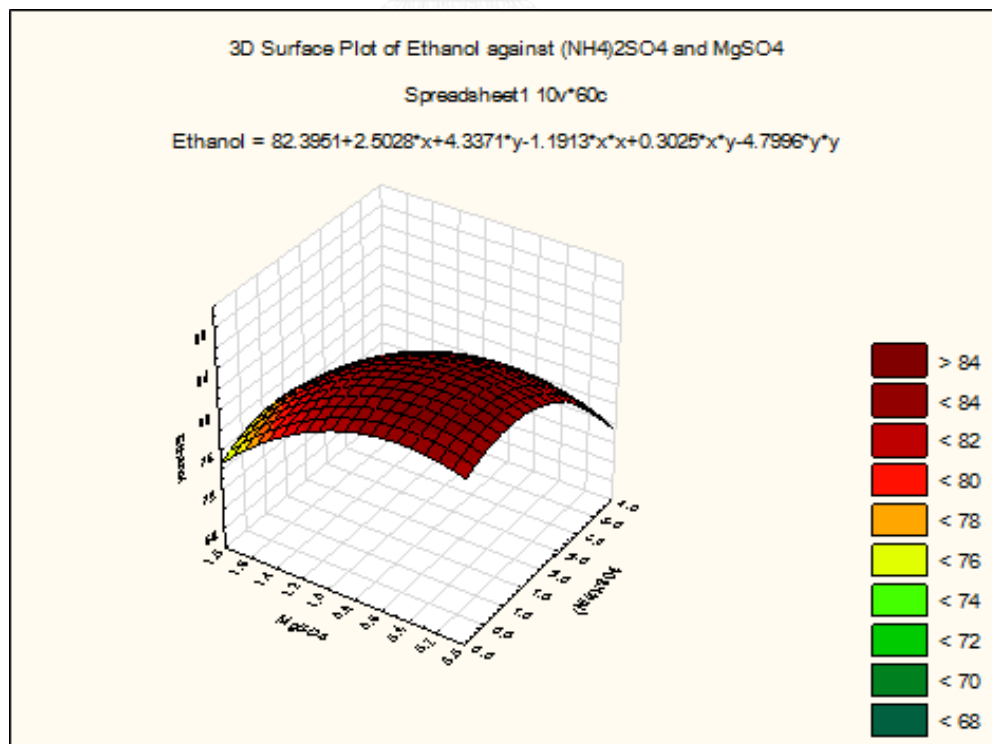
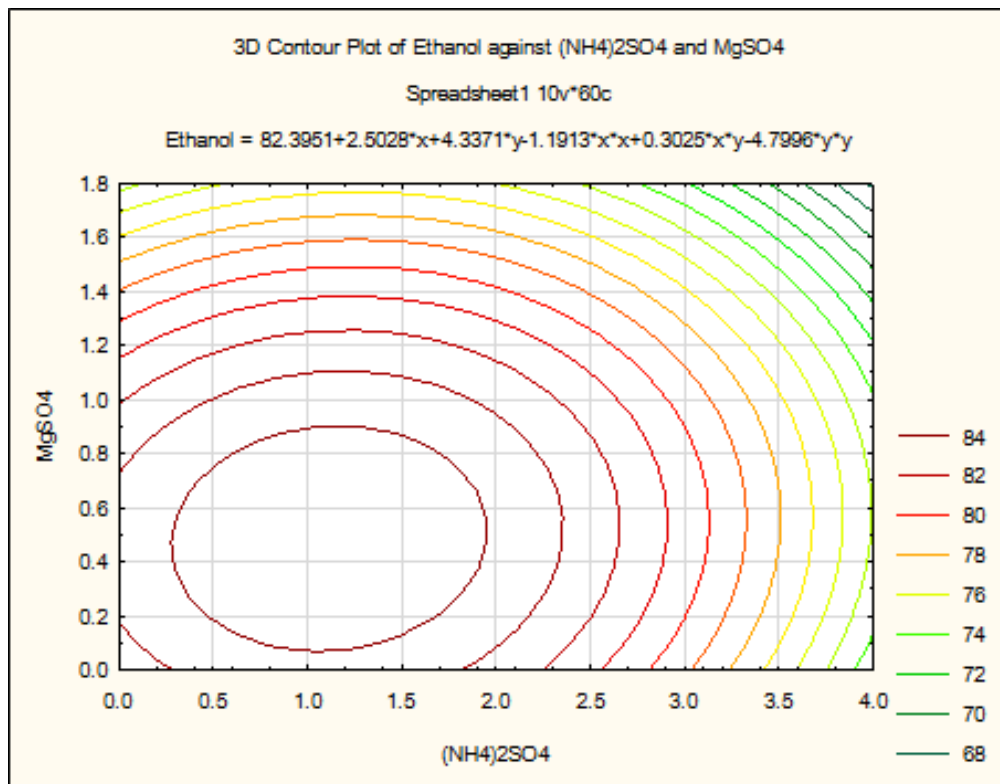
ค่าสัมประสิทธิ์ที่นำมาเขียนสมการ

$$\text{Ethanol} = 74.618 + (3.405 * X1) + (5.773 * X2) + (6.249 * X3) - (1.485 * X1^2) - (1.081 * X2^2) - (6.001 * X3^2) + (0.136 * X1 * X2) + (0.303 * X1 * X3) - (0.035 * X2 * X3).$$



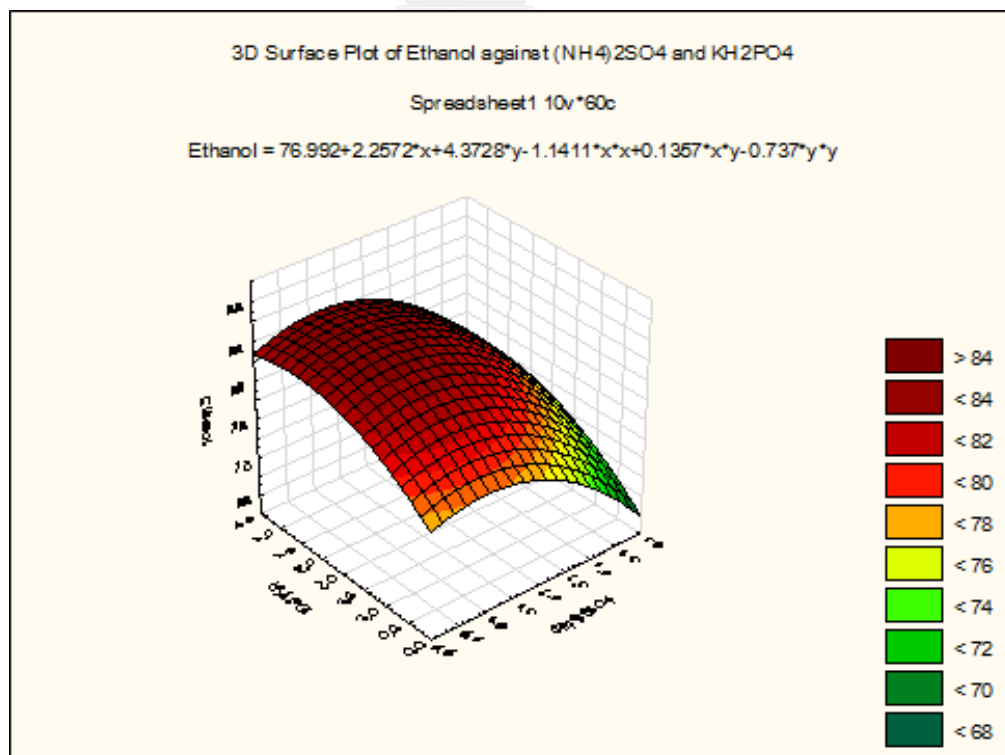
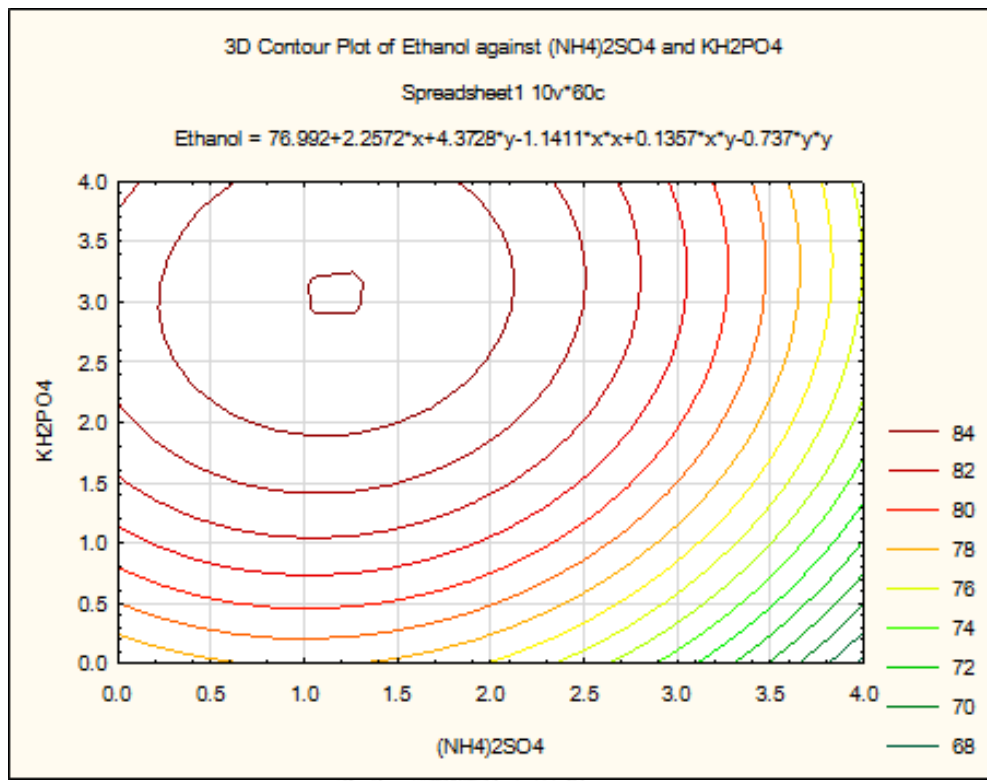
เมื่อนำผลการทดลองข้างต้นมาทดสอบทางสถิติ จากการวิเคราะห์แผนภาพพื้นผิวและแผนภาพคอนทัวร์ โดยโปรแกรม statistica เพื่อหาความสัมพันธ์ของสารอาหารทั้ง 3 ชนิด โดยจับคู่หาความสัมพันธ์ที่ละเอียด ดังนี้ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ กับ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ กับ KH_2PO_4 และ KH_2PO_4 กับ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (รูปที่ 4.6-4.8)

1. ความสัมพันธ์ของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ กับ MgSO_4



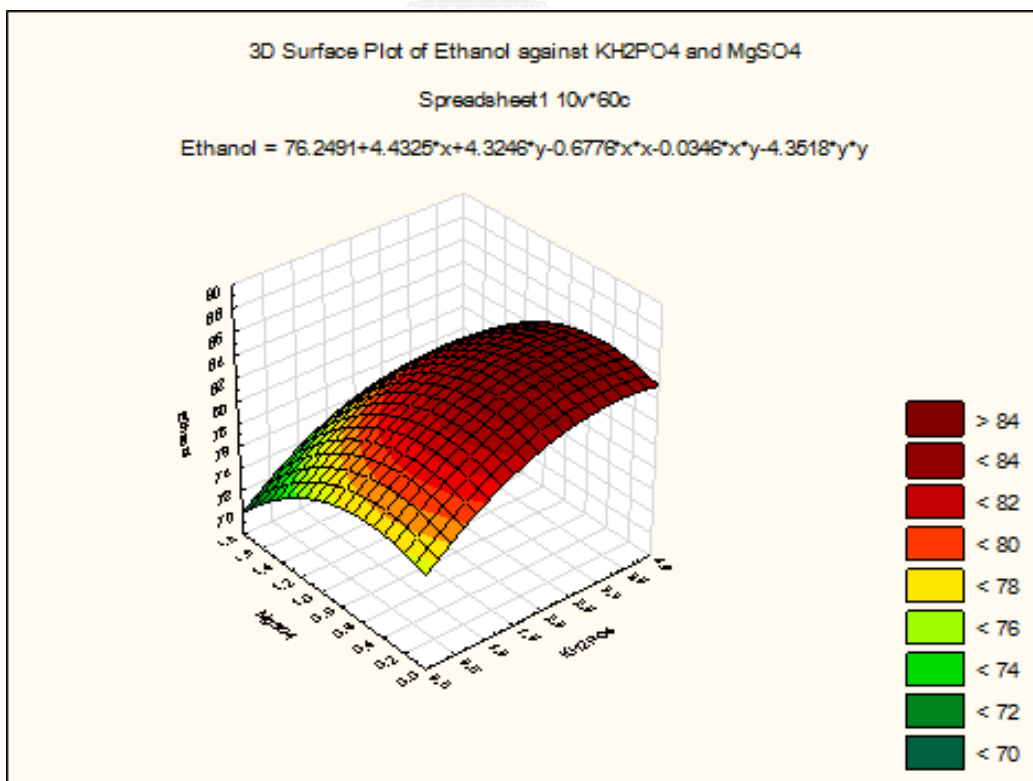
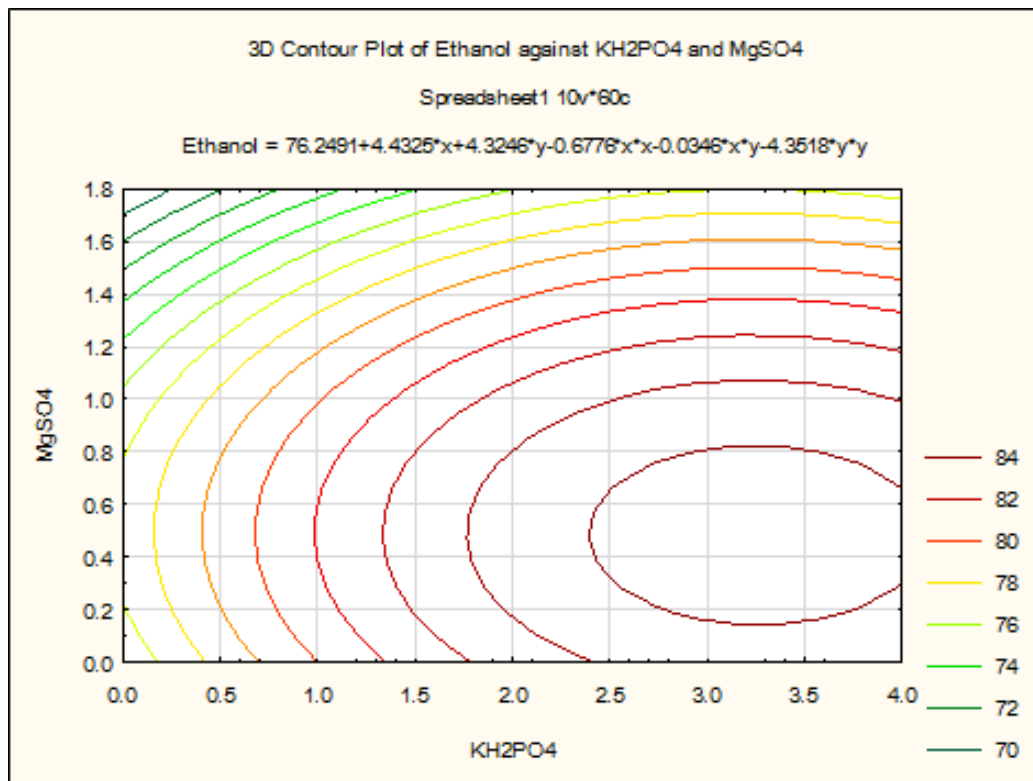
รูปที่ 4.6 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ กับ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

2. ความสัมพันธ์ของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ กับ KH_2PO_4



รูปที่ 4.7 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ กับ KH_2PO_4

3. ความสัมพันธ์ KH_2PO_4 กับ MgSO_4



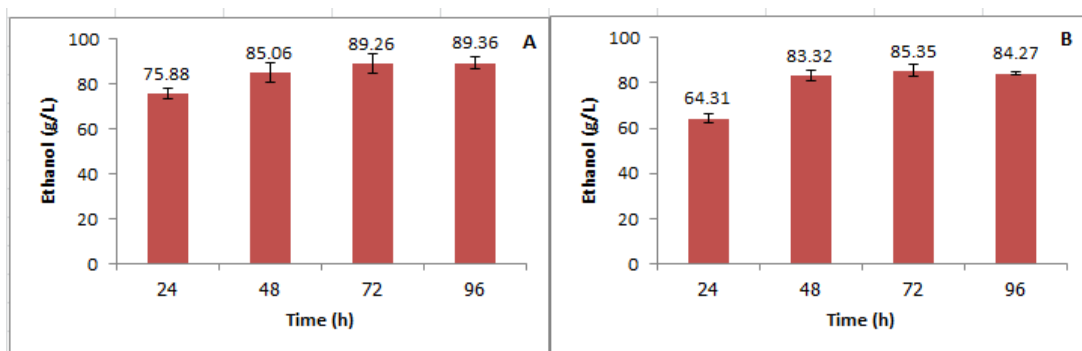
รูปที่ 4.8 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของ KH_2PO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

ผลการทำนายจากสมการ Regression โดยการใช้โปรแกรม SPSS หาค่าสัมประสิทธิ์ ความสัมพันธ์ของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ แสดงให้เห็นว่าไม่มีปฏิสัมพันธ์ (interaction) ร่วมกันระหว่าง 3 ปัจจัยโดยสังเกตจากค่า Significant (P-value) ซึ่งมากกว่า 0.05 ที่ระดับความเชื่อมั่น 99% ทั้ง 3 ปัจจัยจึงเป็นอิสระต่อกัน และภายหลังการกำหนดค่ากราฟแบบ Contour plot หรือ RSM ได้จุดที่สูงที่สุดโดยประมาณเท่ากับ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$: $X_1=1.3$, KH_2PO_4 : $X_2=2.7$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: $X_3=0.5$ กรัม/ลิตร ผลการทำนายค่าเอทานอลสูงสุดที่ผลิต เมื่อกำหนดค่าความเข้มข้นของสารอาหารทั้ง 3 ชนิด ตามค่าที่ทำนายได้ พบว่าเท่ากับ 86.49277 กรัม/ลิตร และเมื่อทำการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลตัดแปลงที่เติมสารอาหารทั้ง 3 ชนิดตามความเข้มข้นที่ทำนายได้ ได้เอทานอลสูงสุดเท่ากับ 87.28 กรัม/ลิตร ซึ่งใกล้เคียงกับค่าเอทานอลที่ได้จากการทำนาย แสดงว่าความเข้มข้นของ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลจากอาหารหมักเอทานอลกากน้ำตาลตัดแปลงซึ่งไม่เติมสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 0.13, 0.27 และ 0.05% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ

4.10 ผลของ Cu^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} ต่อประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาล

การทดลองนี้ใช้อาหารหมัก ซึ่งประกอบด้วยกากน้ำตาลเจือจาง $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร), KH_2PO_4 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075% (น้ำหนัก/ปริมาตร) (ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์) โดยเติมและไม่เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ชนิดละ 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นสุทธิ 9.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร พบว่า ณ เวลา 72 ชั่วโมง อาหารหมักที่เติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ได้เอทานอล 89.26 กรัม/ลิตร ในขณะที่อาหารหมักที่ไม่เติม CuSO_4 , MnSO_4 และ ZnSO_4 ได้เอทานอลลดลง 85.35 กรัม/ลิตร (รูปที่ 4.9A และ 4.9B) แสดงให้เห็นว่าการเติม Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ลงไปเพิ่มในกากน้ำตาลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลได้

Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์สำคัญในวิถีเมแทบอลิซึมและการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* โดย Cu^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไซโตโครมซีออกซิเดส และคอปเปอร์ซิงค์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 1-10 ไมโครโมลาร์ Mn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 2-10 ไมโครโมลาร์ ส่วน Zn^{2+} เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส แอลคาไลน์ฟอสฟาเทส ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือ 0-15 ไมโครโมลาร์ ปริมาณของ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ที่มากเกินไปเป็นพิษต่อเซลล์ (Stehlik-Tomas et al., 2004)



รูปที่ 4.9 ผลของ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ต่อการผลิตเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลซึ่งเติม (A) และไม่เติม (B) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596

4.11 ผลการหาความเข้มข้นของ Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล

เนื่องจาก Cu^{2+} , Mn^{2+} และ Zn^{2+} ปริมาณมากเกินไปเป็นพิษต่อ *S. cerevisiae* การทดลองนี้จึงแปรผันความเข้มข้นของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ตารางที่ 4.13) ที่เติมลงในอาหารหมักกากน้ำตาลดัดแปลงที่เติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์

ผลการทดลองพบว่า *S. cerevisiae* TISTR 5596 ผลิตเอทานอลได้มากที่สุด 90.42 กรัม/ลิตร ในอาหารหมายเลข 3 (ตารางที่ 4.14) ซึ่งเติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ลงไปเท่ากับ 0.2, 0.01 และ 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ

ตารางที่ 4.13 การแปรผันปริมาณของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่เติมในอาหารหมัก

หมายเลข	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (กรัม/ลิตร)	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (กรัม/ลิตร)	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (กรัม/ลิตร)
ตัวควบคุม 1	0.1	0.1	0.1
ตัวควบคุม 2	-	-	-
1	0.5	0.1	0.1
2	1.0		
3	2.0		
4	3.0		

5	0.1	0.5	0.1
6		1.0	
7		2.0	
8		3.0	
9	0.1	0.1	1.0
10			2.0
11			4.0

ตารางที่ 4.14 ผลการหมักเอทานอลจากอาหารหมักกากน้ำตาลดัดแปลงเมื่อแปรผันความเข้มข้นของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่เติม

อาหารเลี้ยงเชื้อ หมายเลข	เอทานอล (กรัม/ลิตร)
ตัวควบคุม 1	89.26±0.46
ตัวควบคุม 2	84.48±0.62
1	88.70±0.22
2	89.07±0.55
3	90.42±0.42
4	84.24±0.18
5	89.43±0.44
6	89.89±0.52
7	87.34±0.30
8	85.16±0.19
9	90.09±0.33
10	86.53±0.25
11	84.04±0.35

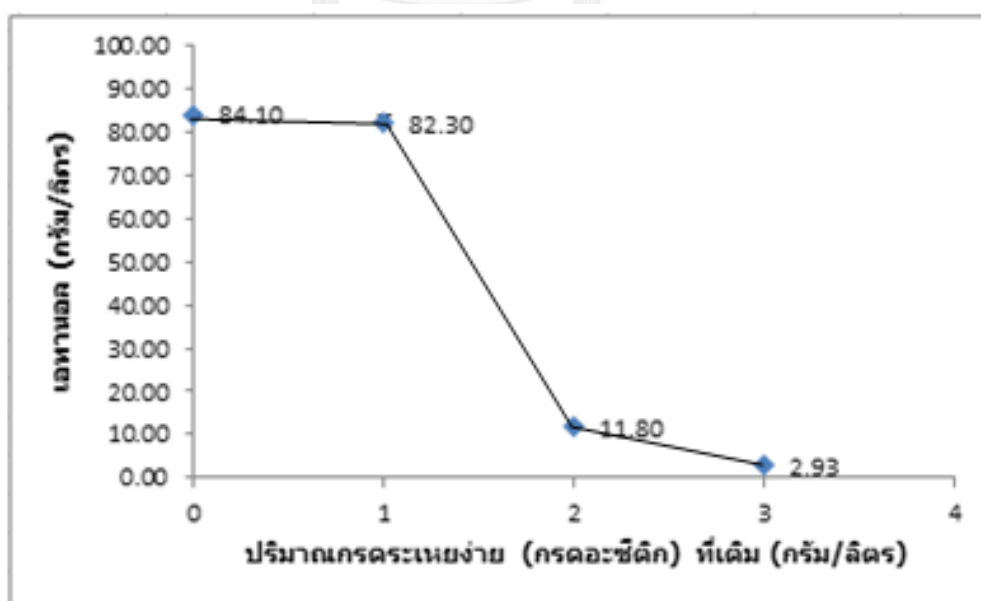
จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลเจือจางซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ควรมีปริมาณ Cu^{2+} 512 มิลลิกรัม/ลิตร และไม่ควรมี

Mn^{2+} และ Zn^{2+} มากกว่า 44 และ 25.1 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ (ไม่มีปริมาณ Cu^{2+} ในกากน้ำตาล เจือจางที่มีน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และมีปริมาณ Mn^{2+} และ Zn^{2+} เท่ากับ 19 และ 2.1 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ)

สรุปได้ว่าผลการหมักจะได้เอทานอลสูงสุดเมื่อมีความเข้มข้นของ $CuSO_4 \cdot 5H_2O$, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ และ $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ เท่ากับ 2,000, 119 และ 102.1 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

4.12 ปริมาณกรดแอสติค (กรดระเหยง่าย) ที่มีผลยับยั้งการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล

ผลการเติมกรดแอสติค 1, 2 และ 3 กรัม/ลิตร ลงไปในอาหารหมักเอทานอลจากกากน้ำตาล ดัดแปลงซึ่งไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ พบว่าทำให้ผลิตผลเอทานอลลดลงจาก 84.10 กรัม/ลิตร เป็น 82.30, 11.80 และ 2.93 กรัม/ลิตร (ตามลำดับ) ณ เวลา 72 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์กากน้ำตาลเจือจางซึ่งมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) พบว่ามีปริมาณกรดแอสติค 5.5 กรัม/ลิตร แสดงว่าในอาหารหมักกากน้ำตาลดัดแปลง ปริมาณกรดแอสติค 6.5 กรัม/ลิตร มีผลยับยั้งการผลิตเอทานอลซึ่งต่ำกว่าที่ Maiorella (1983) ได้รายงานไว้ว่ากรดแอสติค 7.5 กรัม/ลิตร ยับยั้งการหมักเอทานอล โดย *S. cerevisiae* เนื่องจาก Maiorella ศึกษาในสารละลายน้ำตาลกลูโคสไม่ใช่กากน้ำตาล (Maiorella et al., 1983) จึงสรุปได้ว่าปริมาณกรดแอสติคที่มีมากในกากน้ำตาลจะทำให้ยีสต์ยับยั้งการผลิตเอทานอล (ไม่ได้มีผลมาจากความเป็นกรด-เบสในอาหารหมัก เนื่องจากการทดลองนี้มีการปรับความเป็นกรด-เบสให้มีค่าเท่ากัน)



รูปที่ 4.10 ผลของปริมาณกรดแอสติคต่อการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลโดย *S. cerevisiae*

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง

การเติมกากใยฯของหัวมันสำปะหลัง ปริมาณ 10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงในอาหารหมักกากน้ำตาล ทำให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด ณ เวลาที่ 48 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นเป็น 69.79 กรัม/ลิตร (0.641 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลรีดิวซ์) มากกว่าเอทานอลที่ได้จากการหมักกากน้ำตาลโดยไม่เติมกากใยฯของหัวมันสำปะหลัง (64.53 กรัม/ลิตร) คิดเป็น 8.15% การลดปริมาณกากใยฯที่เติมลงในอาหารหมักเป็น 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และเพิ่มเชื้อเริ่มต้นเป็น 2.4×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ทำให้เอทานอลสูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 73.47 กรัม/ลิตร (0.627 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลรีดิวซ์) ภาวะที่มีการเติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ชนิดละ 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ลงไป ทำให้เอทานอลลดลง 2.51 %

ผลการหมักเอทานอลจากกากน้ำตาลเจือจางที่มีน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมด 20% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ซึ่งเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) KH_2PO_4 0.2% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.075% (น้ำหนัก/ปริมาตร) สารสกัดจากยีสต์ 1.0% (น้ำหนัก/ปริมาตร) และ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ อย่างละ 0.01% (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดย *S. cerevisiae* TISTR 5596 (1.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร) ได้เอทานอลสูงสุด 64.53 กรัม/ลิตร (0.593 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลรีดิวซ์) ณ เวลา 48 ชั่วโมง การเพิ่มปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 9.6×10^8 เซลล์/มิลลิลิตร ทำให้เอทานอลสูงสุดเพิ่มขึ้นเป็น 88.62 กรัม/ลิตร (0.760 กรัมเอทานอล/กรัมน้ำตาลรีดิวซ์) ณ เวลา 72 ชั่วโมง

สารอาหารที่ต้องเติมลงไปในกากน้ำตาลเพื่อให้ได้เอทานอลสูงสุดคือ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เท่านั้น ไม่จำเป็นต้องเติมสารสกัดจากยีสต์ ปริมาณ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, KH_2PO_4 และ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่ต้องเติมเพื่อให้ได้เอทานอลสูงสุด (87.28 กรัม/ลิตร) จากผลการออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลโดย central composite design (CCD) เท่ากับ 0.13, 0.27 และ 0.05% (น้ำหนัก/ปริมาตร) ตามลำดับ

การเติม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ซึ่งเป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ในวิถีเมแทบอลิซึมและการหมักเอทานอลลงในอาหารหมักกากน้ำตาล ทำให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นโดยแปรผันปริมาณของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ที่เติมลงในอาหารหมักกากน้ำตาลดัดแปลงซึ่งไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ สรุปได้ว่าผลการหมักจะได้เอทานอลสูงสุด (90.42 กรัม/ลิตร) เมื่อมีความเข้มข้นของ $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ และ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ เท่ากับ 2,000, 119 และ 102.1 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ

กากน้ำตาลเจือจางที่มีปริมาณกรดแอสติกเริ่มต้น 5.5 กรัม/ลิตร เมื่อมีปริมาณกรดแอสติกเพิ่มเป็น 6.5, 7.5 และ 8.5 กรัม/ลิตร จะทำให้ปริมาณเอทานอลลดลง 2.14, 85.97 และ 96.52 % ณ เวลา 72 ชั่วโมง ตามลำดับ แสดงว่าปริมาณกรดแอสติกที่มีมากส่งผลให้เกิดการยับยั้งการผลิตเอทานอลในอาหารหมักกากน้ำตาล



รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- กระทรวงพลังงาน. (2555). โครงการศึกษาศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส
เชิงพาณิชย์: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและบริษัทจีอีเอ็มเนจเมนท์จำกัด.
- กระทรวงพลังงาน. (2558). เชื้อเพลิงเอทานอล. คู่มือการพัฒนาและการลงทุนผลิตเอทานอลเพื่อเป็น
เชื้อเพลิง, 7, 12.
- จรัส ทรัพย์เสรี. (2009). Central Composite Design. *Quality production*, 72-74.
- ธนาคารแห่งประเทศไทย. (2556). รายงานสถานการณ์เอทานอล ปี 2556 และแนวโน้มปี 2557:
สำนักงานภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.
- เพ็ญประภา รัตนสุวรรณ. (2538). อินเวอร์เทสจากต้นกล้วยและการประยุกต์. (วิทยานิพนธ์
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต), มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- สาวิตรี ลิ้มทอง. (2536). ยีสต์และชีวเคมีของการหมักเอธิลแอลกอฮอล์ น.1-6 ในเทคนิคการหมัก
แบบ *fed-batch* และการประยุกต์ใช้สำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ทางอุตสาหกรรม. ภาควิชา
จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นันทนา สีสุข. (2555). เทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช.

ภาษาอังกฤษ

- Bouallagui, H., Touhami, Y., Hanafi, N., Ghariani, A., & Hamdi, M. (2013). Performances
comparison between three technologies for continuous ethanol production
from molasses. *Biomass and Bioenergy*, 48, 25-32.
- Brenda. (2015). Retrieved 25 May, 2015, from <http://www.brenda-enzymes.org/>
- Brown, S. W., Oliver, S. G., Harrison, D. E. F., & Righelato, R. C. (1981). Ethanol
Inhibition of Yeast Growth and Fermentation : Differences in the Magnitude
and Complexity of the Effect *Appl Microbiol Biotechnol*, 11, 151-155.
- Buzas, Z., Dallmann, K., & Szajani, B. (1989). Influence of pH on the Growth and
Ethanol Production of Free and Immobilized *Saccharomyces cerevisiae* Cells.
Biotechnol. Bioeng, 34, 882-884.
- Chen, J. C. P., & Chou, C. C. (1993). *Cane Sugar Handbook*. New York: Wiley.

- Chotineeranat, S., Wansuksri, R., Piyachomkwan, K., Chatakanonda, P., Weerathaworn, P., & Sriroth, K. (2010). Effect of calcium ions on ethanol production from molasses. *Sugar Technology*, 12(2), 120-124.
- Curtin, L. V. (1983). Molasses - general considerations. *Molasses in animal nutrition*.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A., & Smith, F. (1956). Colorometric Method for Determination of Sugars and Related Substances. *Analytical chemistry*, 28(3), 350-356.
- Gough, S., Barron, N., Zubov, A. L., Lozinsky, V. I., & McHale, A. P. (1998). Production of ethanol from molasses at 45 °C using *Kluyveromyces marxianus* IMB3 immobilized in calcium alginate gels and poly(vinyl alcohol) cryogel. *Bioprocess Engineering*, 19, 87-90.
- Hutter, A., & Oliver, S. G. (1998). Ethanol production using nuclear petite yeast mutants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 49, 511-516.
- Jarboe, L., Shanmugam, K., & Ingram, L. (2009). *Ethanol*. In: *The desk Encyclopedia of Microbiology* (E. M. Schaechter Ed. 2 ed.). Elsevier Oxford San Diego.
- Jenkins, G. H. (1966). *Introduction to cane sugar technology*. Amsterdam: Elsevier.
- Jone, R. P., & Greenfield, P. F. (1982). Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation *Enzyme Microb Technol*, 4, 210-223.
- Jone, R. P., Pamment, N., & Greenfield, P. F. (1981). Alcohol Fermentation by Yeasts - the Effect of Environmental and Other Variables. *Process Biochemistry*, 16(3), 42-49.
- Jutakanoke, R., Leepipatpiboon, N., Tolieng, V., Kitpreechavanich, V., Srinorakutara, T., & Akaracharanya, A. (2012). Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomass and Bioenergy*, 39, 283-289.
- Kim, S., & Dale, B. E. (2004). Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues. *Biomass and Bioenergy*, 26(4), 361-375.
- Laopaiboon, L., Nuanpeng, S., Srinophakun, P., Klanrit, P., & Laopaiboon, P. (2008). Selection of *S. cerevisiae* and Investigation of its Performance for Very High Gravity Ethanol Fermentation. *Biotechnology*, 7(3), 493-498.

- Maiorella, B., Blanch, H. W., & Wilke, C. R. (1983). By-Product Inhibition Effects on Ethanolic fermentation by *S. cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 25, 103-121.
- Michailides, M. K., Tekerlekopoulou, A. G., Akratos, C. S., Coles, S., Pavlou, S., & Vayenas, D. V. (2015). Molasses as an efficient low-cost carbon source for biological Cr(VI) removal. *J Hazard Mater*, 281, 95-105.
- Olbrich, H. (2006). *Molasses*. Berlin: Biotechnology-Kempe GmbH.
- Paturau, J. M. (1987). *By-product of cane sugar industry*. Amsterdams: Elsevier.
- Pradeep, P., & Reddy, O. V. (2010). High gravity fermentation of sugarcane molasses to produce ethanol: Effect of nutrients. *Indian J Microbiol*, 50(Suppl 1), 82-87.
- Quintas, C., Lima-Costa, E., & Loureiro-Dias, M. C. (2000). The Effect of Ethanol on the Plasma Membrane Permeability of Spoilage Yeasts. *Food Technology Biotechnology*, 38(1), 47-51.
- Rattanapan, A., Limtong, S., & Phisalaphong, M. (2011). Ethanol production by repeated batch and continuous fermentations of blackstrap molasses using immobilized yeast cells on thin-shell silk cocoons. *Applied Energy*, 88(12), 4400-4404.
- Razmovski, R., & Vucurovic, V. (2011). Ethanol production from sugar beet molasses by *S. cerevisiae* entrapped in an alginate-maize stem ground tissue matrix. *Enzyme Microb Technol*, 48(4-5), 378-385.
- Reed, G. (1982). *Enzyme in food processing*, Academic Press. New York in Pancoast, H.M.: The AVI publish company Inc.
- Rose, A. H., & Harrison, J. S. (1970). *Yeast technology*. London : Academic Press.
- Rosen, K. (1977). Production of baker's yeast. *Process Biochemistry*, 12(3), 10-12.
- Rosevear, A., & Chem., J. (1984). (Vol. 34B).
- Somogyi, M. (1952). *Notes on Sugar Determination*.
- Stehlik-Tomas, V., Zetic, V. G., Stanzer, D., Grba, S., & Vahcic, N. (2004). Zinc, Copper and Manganese Enrichment in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology Biotechnology*, 42(2), 115-120.
- Sun, Y. a. J. C. (2002). Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: A reviw. *Bioresource Technology*, 83(1), 1-11.

- Taherzadeh, M. J., & Karimi, K. (2011). Fermentation Inhibitors in Ethanol Processes and Different Strategies to Reduce Their Effects. *Biofuels Alternative Feedstocks and Conversion Processes*, 287-311.
- Takehige, K., & Ouchi, K. (1995). Factors Affecting the Ethanol Productivity of Yeast in Molasses. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 79(5), 449-452.
- Tesfaw, A., & Assefa, F. (2014). Current Trends in Bioethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: Substrate, Inhibitor Reduction, Growth Variables, Coculture, and Immobilization. *International Scholarly Research Notices*, 2014, 1-11.
- Waites, M. J., Morgan, N. L., & Higton, G. (2001). *Fuels and industrial chemicals*. London : Blackwell science.
- Walker, G. M. (2010). *bioethanol : Science and technology of fuel alcohol* (1st ed.).
- Whitaker, J. R. (1972). *Principles of Enzymology for Food Sciences*. In: *Enzyme Inhibitors*. New York: Marcel Dekker Ltd.
- Zhu, Y. (2007). *Chapter 14. Immobilized Cell Fermentation for Production of Chemicals and Fuels*: Elsevier.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Yeast extract peptone dextrose (YPD) medium (Agar)

D-Glucose	10	กรัม
Yeast extract	0.3	กรัม
Bacto-peptone	0.3	กรัม
Agar	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 5.0 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 110°C, ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

2. Yeast extract peptone sucrose (YPS) medium (Broth) (10% sucrose)

Sucrose	10	กรัม
Yeast extract	0.3	กรัม
Bacto-peptone	0.3	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 5.0 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 110°C, ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

3. Fermentation medium (Broth) (15% sucrose)

Sucrose	15	กรัม
Yeast extract	0.76	กรัม
Bacto-peptone	0.76	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 5.0 ทำให้ปราศจากเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่ 110°C, ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

ภาคผนวก ข การเตรียมวัตถุดิบและสารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

1.การเตรียมกากน้ำตาล

- 1.1 นำกากน้ำตาลมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น ในสัดส่วน กากน้ำตาล 555 กรัม: น้ำ 998 มิลลิลิตร
- 1.2 แบ่งกากน้ำตาลที่เจือจางแล้วใส่ในหลอดเซนตริฟิวก์
- 1.3 นำไปปั่นแยกตะกอนที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที
- 1.4 กากน้ำตาลที่ผ่านการปั่นแยกตะกอน นำมาเทแยกเอาตะกอนออก
- 1.5 นำกากน้ำตาลที่ผ่านการแยกตะกอนออกมาวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

2.การเตรียมกากใยของหัวมันสำปะหลัง

- 2.1 นำกากใยของหัวมันสำปะหลัง ขนาดอนุภาค 100-1000 ไมครอน มาล้างด้วยน้ำกลั่น ในสัดส่วน กากใย 15 กรัม : น้ำ 100 มิลลิลิตร
- 2.2 ล้างซ้ำ 5 ครั้ง จนน้ำล้างกากใยของหัวมันสำปะหลัง มีค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.0
- 2.3 อบแห้งกากใยของหัวมันสำปะหลังที่ได้ 65°C จนน้ำหนักคงที่ (24 ชั่วโมง)

3.การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล

การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน โดยปิเปตเอทานอล 99% มา 1.28 มิลลิลิตร ใน น้ำกลั่น 8.72 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ได้สารละลายเอทานอล 100 กรัม/ลิตร) แล้วปิเปตสารละลาย ดังกล่าวมา 9.00 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 1.00 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน (ได้สารละลายเอทานอล 90 กรัม/ลิตร) ปิเปตสารตามตาราง ข.1 จะได้สารละลายเอทานอลมาตรฐาน 10 – 100 กรัม/ลิตร นำไป วิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟีตามสถานะตามตาราง ข.2 ค่าที่ได้นำไปสร้างกราฟมาตรฐาน ของเอทานอล

ตาราง ข.1 ปริมาตรของเอทานอลและน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆสำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ความเข้มข้นของสารละลายเอทานอล (กรัม/ลิตร)	ปริมาตรของเอทานอล (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
100	1.28	8.72
90	9.00	1.00

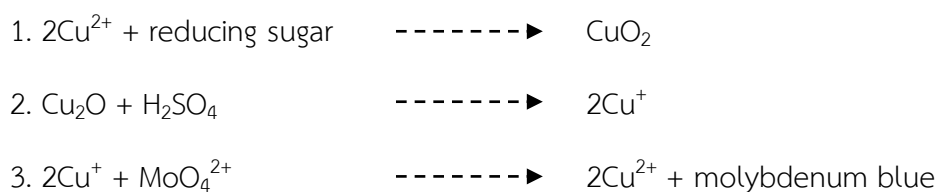
80	8.89	1.11
70	8.75	1.25
60	8.87	1.43
50	8.33	1.67
40	8.00	2.00
30	7.50	2.50
20	6.67	3.33
10	5.00	5.00

ตาราง ข.2 สภาวะที่ใช้ในการวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี

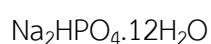
รุ่นของเครื่องแก๊สโครมาโทกราฟี	7AG บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น
เครื่องตรวจวัด (detector)	ชนิด FID
คอลัมน์ (column)	ชนิด PQ
อุณหภูมิ (°ซ)	อุณหภูมิเครื่องตรวจวัด 220 °ซ อุณหภูมิหัวฉีด 170 °ซ
อัตราของแก๊ส (ml/min.)	แก๊สตัวพา (mobile gas) : N2 เท่ากับ 50 ml/min
ปริมาณที่ฉีด (volume injection)	1 ไมโครลิตร

4.วิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (Nelson, 1992)

วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ เช่น กลูโคส โดยการทำปฏิกิริยากับสารละลายคอปเปอร์ เกิดสีมอลิบดินัมบลู (molybdenum blue) ดังปฏิกิริยา



1.1 Alkaline Copper Reagent



71 กรัม

$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Rochelle salt)	40	กรัม
1N NaOH	100	มิลลิลิตร
10% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (ละลาย 8 กรัม $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 80 มล.)	80	มิลลิลิตร
Na_2SO_4	180	กรัม

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มล.)

1.2 Nelson's Reagent

$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	53.2	กรัม
กรดซัลฟิวริกเข้มข้น	21	มิลลิลิตร
12% (น้ำหนัก/ปริมาตร) $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (ละลาย 6 กรัม $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น 50 มล.)	50	มิลลิลิตร

(ละลายสารละลายข้างต้นในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 1,000 มล.)

วิธีการวิเคราะห์

- ใช้สารละลายน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้น 20-200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลกลูโคส 1 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (สำหรับ blank) ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง
- เติม Alkaline Copper Reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปต้มในน้ำเดือดนาน 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันที
- เติม Nelson's reagent 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- เติมน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

1.3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส

เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามตาราง ข.3 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลกลูโคส

ตาราง ข.3 ปริมาตรของกลูโคสและน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆสำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคส (กรัม/ลิตร)	ปริมาตรของกลูโคส (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	1
20	0.02	0.98
40	0.04	0.96
60	0.06	0.94
80	0.08	0.92
100	0.10	0.90
120	0.12	0.88
150	0.15	0.85
180	0.18	0.82
200	0.20	0.80

5.การวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol-sulfuric (Dubois และคณะ, 1956)

สารเคมีที่ใช้

1. ฟีนอล 5%(น้ำหนัก/ปริมาตร)
2. กรดซัลฟูริก

การเตรียมฟีนอล 5%(น้ำหนัก/ปริมาตร)

ชั่งฟีนอล 2.5 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

วิธีการวิเคราะห์

1. ใช้สารละลายน้ำตาลซูโครส ความเข้มข้น 20-200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร สำหรับทำกราฟมาตรฐาน โดยใช้น้ำตาลซูโครส 1 มิลลิลิตร หรือตัวอย่างที่เจือจางเหมาะสม 1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร (สำหรับ blank) ใส่ในหลอดทดลองขนาดกลาง
2. เติมฟีนอล 5% (น้ำหนัก/ปริมาตร) 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
3. เติมกรดซัลฟูริก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

4. เหย้าให้เขากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลซูโครส การเตรียมสารละลายมาตรฐานซูโครส

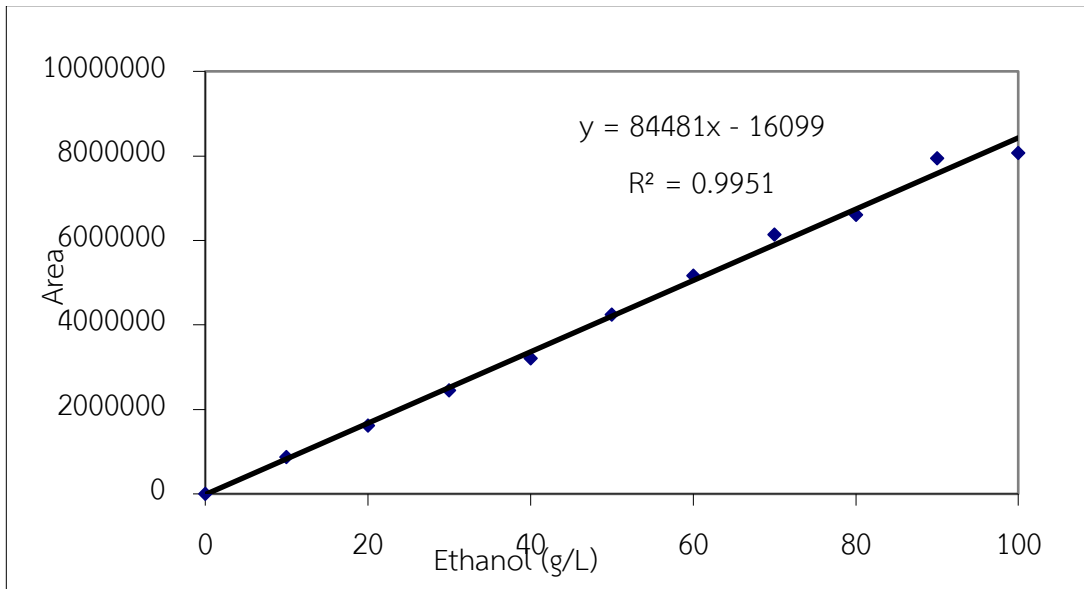
เตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคสที่ความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180 และ 200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามตาราง ข.4 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 480 นาโนเมตร เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณน้ำตาลซูโครส

ตาราง ข.4 ปริมาตรของซูโครสและน้ำที่ความเข้มข้นต่างๆสำหรับเตรียมสารละลายมาตรฐาน

ความเข้มข้นของสารละลายซูโครส (กรัม/ลิตร)	ปริมาตรของซูโครส (มิลลิลิตร)	ปริมาตรของน้ำกลั่น (มิลลิลิตร)
0	0	1
20	0.02	0.98
40	0.04	0.96
60	0.06	0.94
80	0.08	0.92
100	0.10	0.90
120	0.12	0.88
150	0.15	0.85
180	0.18	0.82
200	0.20	0.80

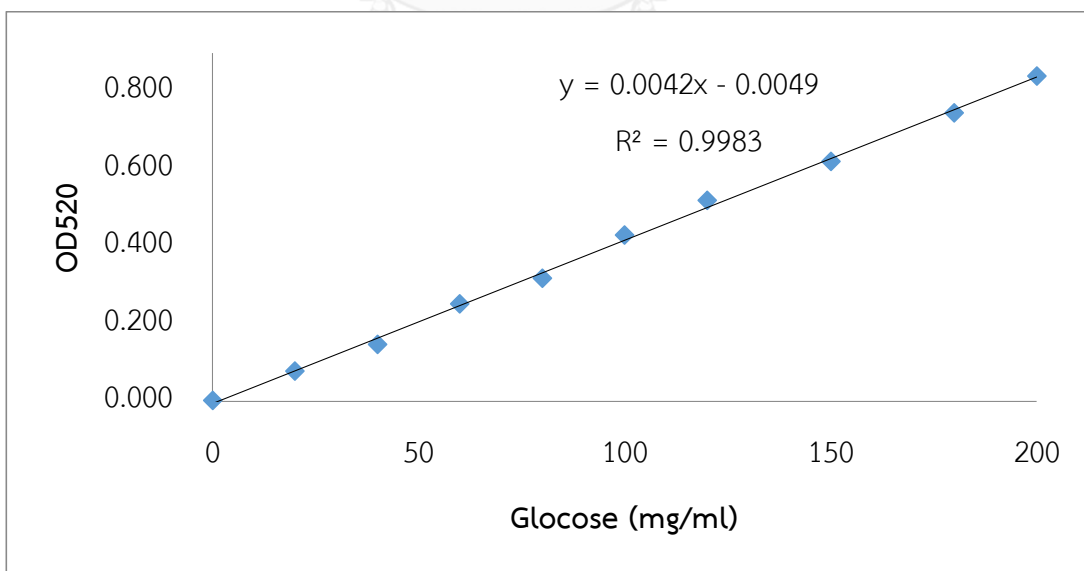
ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน

1.กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล



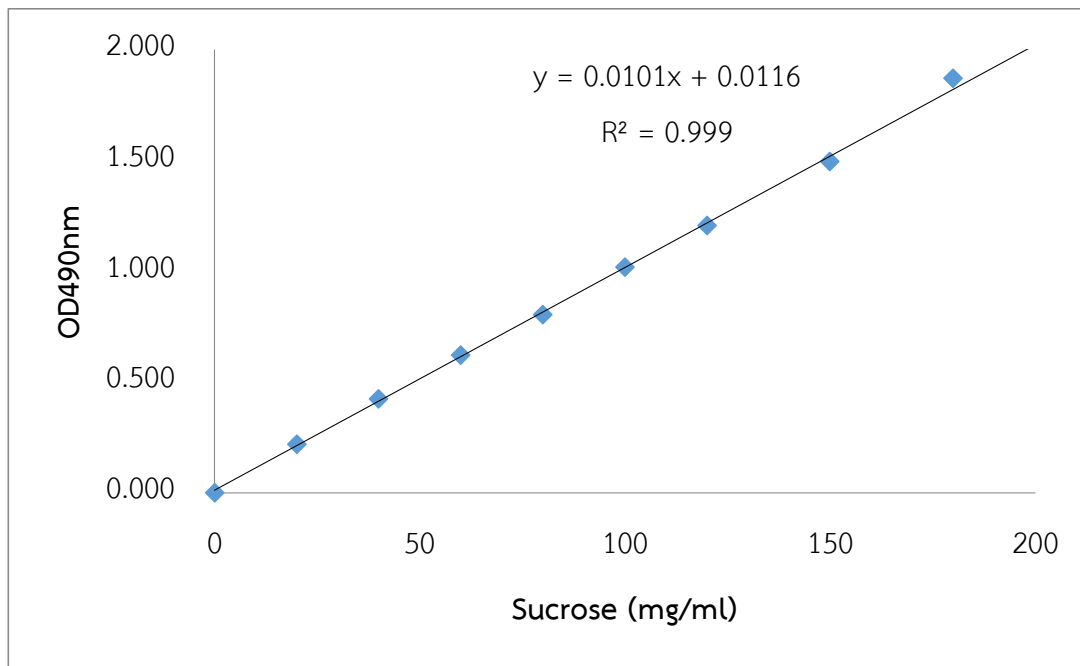
กราฟ ค.1 กราฟมาตรฐานของสารละลายเอทานอลวิเคราะห์ด้วยวิธี GC

2.กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กลูโคส)



กราฟ ค.2 กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคสวิเคราะห์ด้วยวิธี Somogyi- Nelson

3.กราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (ซูโครส)



กราฟ ค.3 กราฟมาตรฐานของสารละลายซูโครสวิเคราะห์ด้วยวิธี Phenol-Sulfuric



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวพงษ์พรรณณี ภูมิเขต เกิดวันที่ 25 เมษายน 2534 ที่อำเภอเมือง จังหวัด เพชรบูรณ์ สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เมื่อปีการศึกษา 2555 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับ บัณฑิต หลักสูตรจุลชีววิทยาและเทคโนโลยีจุลินทรีย์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2556 ระหว่างการศึกษาได้ร่วมเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ มหาวิทยาลัยบูรพา พ.ศ.2558 (Burapha University International Conference 2015 : Moving Forward to a Prosperous and Sustainable Community) จัดขึ้นเมื่อวันที่ 10-12 กรกฎาคม 2558 ณ โรงแรมบางแสนเฮอริเทจ ผลการทดลองส่วนหนึ่งได้เผยแพร่ในงานประชุม วิชาการนี้

