บทที่ 1

บทนำ

ที่มาและความสำคัญ

น้ำมันเชื้อเพลิงเป็นปัญหาสำคัญของประเทศไทยมาช้านาน เนื่องจากแหล่งผลิตในประเทศมีไม่เพียงพอกับความต้องการที่สูงขึ้นตามความเจริญเติบโตทางเศรษฐกิจ จึงต้องพึ่งพาการนำเข้าเป็นหลัก ประเทศไทยสูญเสียเงินตราต่างประเทศเพื่อนำเข้าน้ำมันเชื้อเพลิงกว่าแสนล้านบาท นอกจากนี้ราคาน้ำมันมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ มีการประมาณการเมื่อรวมปริมาณน้ำมันจากแหล่งผลิตใหญ่ๆของโลกเราจะมีน้ำมันสำรองใช้ได้อีก40ปี (http://www.espower.co.th/knowledge_detail.php?info=7&from=แหล่งเรียนรู้) ในปัจจุบันแหล่งพลังงานทดแทนที่มีความน่าสนใจ และมีการศึกษาอย่างมาก คือ เอทานอล พบว่า ข้อดีของการใช้เอทานอลจะช่วยรักษาสภาพแวดล้อมเนื่องจากเป็นเชื้อเพลิงที่ปราศจาก มลพิษ เช่น ซัลเฟอร์ และ มีโมเลกุลออกซิเจนเป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 35 โดยน้ำหนัก เมื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรถยนต์จึงเกิดการเผาไหม้ที่สมบูรณ์กว่าเชื้อเพลิงทั่วไประบบเครื่องยนต์ที่ใช้เอทานอลจึงสะอาดกว่าเครื่องยนต์ที่ใช้น้ำมันเบนซินหรือดีเซล (http://www.thaiethanol.com/th/2013-04-06-13-53-49/importance-ethanol.html) การผลิตไบโอเอทานอลในปัจจุบันนิยมใช้วัตถุดิบที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบเป็นสับสเตรท ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล บีทรูต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น เนื่องจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล ซึ่งยีสต์สามารถย่อยสลายวัตถุดิบประเภทนี้ได้เลยทันที โดยไม่ต้องผ่านการย่อยเพื่อเป็นน้ำตาล (Pretreatment) ในพื้นที่จังหวัดมหาสารคามและจังหวัดใกล้เคียงมีพื้นที่ในการปลูกอ้อย ประกอบด้วยพื้นที่เพาะปลูกอ้อยจำนวน 20 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดเลย หนองบัวลำภู อุดรธานี หนองคาย บึงกาฬ สกลนคร นครพนม ชัยภูมิ ขอนแก่น มหาสารคาม ร้อยเอ็ด กาฬสินธุ์ มุกดาหาร อำนาจเจริญ ยโสธร นครราชสีมา บุรีรัมย์ สุรินทร์ ศรีสะเกษ และอุบลราชธานี มีพื้นที่ปลูกอ้อยทั้งหมด 4,317,002ไร่ เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2555-2556 จำนวน 380,631 ไร่ หรือร้อยละ 9.67 (สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย, 2557) ทำให้มีโรงงานน้ำตาลหลายแห่ง น้ำอ้อยเป็นผลิตภัณฑ์อีกประการหนึ่งจากการผลิตของโรงงานน้ำตาล โดยน้ำอ้อยประกอบด้วยน้ำ 78-86%,น้ำตาลซูโครส10-20%, น้ำตาลรีดิวซ์ 1-2 %, เถ้า 0.3-0.5%, และสารประกอบไนโตรเจน 0.5-1%, โดยมีพีเอชอยู่ในช่วง 5.2-6.8 (Sobrinho *et al.* , 2011) ดังนั้นน้ำอ้อยจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความน่าสนใจในการเป็นสับสเตรทสำหรับการหมักเอทานอล เนื่องจากมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบค่อนข้างสูง

กระบวนการหมักเอทานอลในสภาพอากาศร้อนตลอดปีของประเทศไทยโดยเฉพาะในช่วงเดือนเมษายนนั้นจะมีผลผลิตต่ำ โดยความร้อนที่สูงนั้นนอกจากจะมาจากการที่อุณหภูมิของสภาพอากาศร้อนแล้ว ในกระบวนการหมักเอทานอลเมื่อมีอัตราการหมักสูงจะมีความร้อนเกิดขึ้นในอัตราที่สูงด้วย การหมักด้วยยีสต์สายพันธุ์ใช้ทั่วไปซึ่งมักเป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ชอบ

อุณหภูมิปานกลางเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นความสามารถในการผลิตของเอทานอลลดลงอย่างมาก เนื่องจากการยับยั้งด้วยเอทานอลมีมากขึ้นเมื่อร่วมกับความร้อนที่สูงขึ้น แนวทางการแก้ปัญหานี้อย่างหนึ่ง คือ การใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่ทนอุณหภูมิสูงซึ่งนอกจากสามารถเจริญและหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางแล้ว ยังคงเจริญและหมักเอทานอลได้ถึงแม้มีอุณหภูมิสูงขึ้น ประโยชน์ของการใช้ยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงสำหรับการผลิตเอทานอลในอุตสาหกรรม คือ ลดการใช้ระบบหล่อเย็นซึ่งทำให้ค่าใช้จ่ายในส่วนนี้ลดลง เป็นผลให้ต้นทุนการผลิตโดยรวมลดลงด้วย นอกจากนั้นการหมักในที่อุณหภูมิสูงยีสต์มักมีอัตราการหมักสูง ทำให้สามารถผลิตเอทานอลได้เร็วยิ่งไปกว่านั้นยังช่วยลดปัญหาการปะปนของจุลินทรีย์อื่นในระหว่างการหมักเอทานอล (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตส แต่มีข้อจำกัดในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลเท่ากับ 30-35 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลให้นำไปสู่การศึกษาความสามารถของยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์อื่นๆ โดยลักษณะที่สำคัญของยีสต์ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในโรงงานอุตสาหกรรม จำเป็นต้องมีผลผลิตเอทานอลที่สูง (>90.0%ของผลผลิตทางทฤษฎี)มีความทนทานต่อ เอทานอล (>40.0 กรัม/ ลิตร) มีอัตราการผลิตเอทานอลสูง (>1.0 กรัม / ลิตร / ชั่วโมง) สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่ง่ายและราคาไม่แพง มีความต้านทานต่อสารยับยั้ง และมีความทนต่อพีเอชที่เป็นกรด หรืออุณหภูมิที่สูงขึ้น จากรายงานพบยีสต์ทนอุณหภูมิสูงและสามารถผลิตเอทานอลได้ เช่น *S. cerevisiae* (สายพันธุ์ที่มีการปรับปรุงพันธุกรรม)*, S. diastaticus*, *Kluyveromyces marxianus* และ *Pichia kudriavzevii,* (Hossain *et al*., 2014) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจในการเพิ่มมูลค่าน้ำอ้อยซึ่งเป็นวัตถุดิบต้นทุนต่ำที่มีอย่างแพร่หลายในท้องถิ่นเพื่อการผลิตเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดแยกจากชานอ้อยซึ่งผ่านการคัดเลือกคุณสมบัติที่ดีในการใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการหมักเอทานอล

วัตถุประสงค์

1. เปรียบเทียบความสามารถของยีสต์ทนอุณหภูมิสูงในการหมักเอทานอลในอาหารสังเคราะห์และอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

2. ศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาที่มีต่อการหมักเอทานอล

ขอบเขตการวิจัย

1. ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง คัดเลือกจากยีสต์สายพันธุ์ที่สามารถเจริญที่อุณหภูมิตั้งแต่ 37 องศาเซลเซียส และสร้างแก๊สได้ดี ทำการคัดแยกจากชานอ้อยของโรงงานน้ำตาลมิตรภูเวียง อำเภอภูเวียง จังหวัดขอนแก่น

2. น้ำอ้อยที่ใช้ในการทดลองจากตลาดเทศบาลเมือง จังหวัดมหาสารคาม

สมมติฐาน

1. ถ้ายีสต์ทนอุณหภูมิสูงสามารถใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี ดังนั้นจะให้ผลได้เอทานอลสูง

2. ถ้าอุณหภูมิสูงมีผลต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ ดังนั้นจะเกิดความแตกต่างของผลได้เอทานอลที่อุณหภูมิต่างกัน

ตัวแปรในการทดลอง

1. ตัวแปรต้น ได้แก่ สายพันธุ์ยีสต์ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการหมักเอทานอล
2. ตัวแปรตาม ได้แก่ ผลได้เอทานอล กำลังผลิตเอทานอล และชีวมวล
3. ตัวแปรควบคุม ได้แก่ ความเข้มข้นของเชื้อตั้งต้น และองค์ประกอบของอาหารหมัก

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบศักยภาพในการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนอุณหภูมิสูงสายพันธุ์ที่คัดแยกได้ในท้องถิ่น
2. ทราบความเป็นไปได้ในการใช้น้ำอ้อยที่มีอย่างแพร่หลายในท้องถิ่นเพื่อเป็นวัตถุดิบต้นทุนต่ำในการผลิตเอทานอล
3. ทราบระยะเวลาและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล

สถานที่ดำเนินการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา อาคาร 5 คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม
2. ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

นิยามศัพท์

ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง (ชุติมา, 2548)

ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง (Thermotolerant yeast) หมายถึง ยีสต์ที่เจริญเติบโตได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ถึง 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีรายงานว่ายีสต์ทนร้อนมีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงสารเคมี สารทำความสะอาด และผลิตสารที่มีความสามารถในการทนต่อความร้อน เช่น เอนไซม์ต่างๆ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด

น้ำอ้อย (Serrat *et al*., 2011)

น้ำอ้อย หมายถึง น้ำหวานที่ได้จากต้นอ้อย โดยองค์ประกอบของน้ำอ้อยเป็นน้ำตาลซูโครส (sucrose) ที่เรียกกันทั่วไปว่า น้ำตาลทราย ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) 2 ชนิด คือ น้ำตาลฟรุกโทส (fructose) และน้ำตาลกลูโคส (glucose)

ระยะเวลาในการดำเนินงานวิจัย

เริ่มตั้งแต่ เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2558 ถึง เดือน มีนาคม พ.ศ.2559

		พ.ศ. 2558-2559							
ลำดับ	ขั้นตอน	สค.	กย.	ตค.	พย.	ธค.	มค.	กพ.	มีค.
1	เปรียบเทียบความสามารถของยีสต์ทนอุณหภูมิสูงการหมักเอทานอลในอาหารสังเคราะห์	←	→						
2	เปรียบเทียบความสามารถของยีสต์ทนอุณหภูมิสูงในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน		←	→					
3	ศึกษาผลของอุณหภูมิและระยะเวลาในการผลิตเอทานอล				←		→		
4	สรุปผลการทดลองและเขียนเล่ม						←	→	
5	เผยแพร่ผลงานวิจัยในวารสารหรือการประชุมวิชาการ							←	→

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ประเภทของเอทานอล (กรมการพัฒนาพลังทดแทนและอนุรักษ์พลัง กระทรวงพลังงาน, มปป.)

เอทานอล (Ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (Ethyl alcohol) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนจำพวกแอลกอฮอล์ชนิดหนึ่ง เอทานอลเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน สามารถละลายทั้งในน้ำและสารละลายอินทรีย์อื่นๆ เป็นแอลกอฮอล์ที่สามารถนำมาบริโภค นอกจากนี้สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงในรูปเอทานอลไร้น้ำ (Anhydrous ethanol) ที่มีความบริสุทธิ์สูง (เข้มข้นร้อยละ 99.5 โดยปริมาตร) หรืออาจใช้เป็นเอทานอลที่มีน้ำ (hydrous ethanol) การนำเอาเอทานอลไปใช้นั้นสามารถนำไปใช้ได้หลายทางดังนี้

2.1.1 แอลกอฮอล์ ที่รับประทานได้โดยตรง (Portable Alcohol) ส่วนใหญ่จะถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมสุราเครื่องสำอางและยา

2.1.2 แอลกอฮอล์ ที่ไม่ใช้รับประทานได้โดยตรง (Industrial Alcohol) ตัวอย่างเช่น กรดอะซิตริกหรือกรดน้ำส้ม กรดมะนาว ที่สามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมทางการแพทย์ และนอกจากนี้ยังมีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมเส้นใยและโลหะ

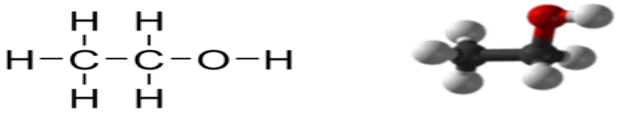
2.1.3 แอลกอฮอล์ที่ใช้เป็นเชื้อเพลิงมีความบริสุทธิ์สูง 95% หรือ 99.5-99.6% แอลกอฮอล์ที่มีความบริสุทธิ์แตกต่างกันนี้ สามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้ 3 แบบดังต่อไปนี้

2.1.3.1 แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 95% ใช้เป็นชื้อเพลิงโดยตรงทดแทนน้ำมันเบนซินหรือดีเซลใช้กับเครื่องยนต์ที่มีอัตราส่วนการอัดสูง

2.1.3.2 แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 99.5% - 99.6% เมื่อผสมกับน้ำมันเบนซิน จะเรียกกันว่า แก๊ซโซฮอล์ โดยที่แก๊ซโซฮอล์ 95 หมายถึง การผสมน้ำมันเบนซิน 95 กับเอทานอลในสัดส่วน 9:1 โดยที่ยังรักษาค่าออกเทนไว้ได้ในระดับเดิม สัดส่วนการผสมเอทานอลกับน้ำมันนั้นมีใช้กันอยู่ หลายประเภทในหลากหลายประเทศ E85 เป็นชื่อที่เรียก เชื้อเพลิงที่ได้จากการผสมน้ำมันกับเอทานอล โดยมีสัดส่วนของเอทานอลสูงถึง 85% และมีค่าออกเทนสูง มีใช้กันในประเทศในแถบบราซิล อเมริกา และยุโรป อย่างไรก็ดีน้ำมันชนิดนี้ไม่สามารถใช้ได้กับรถยนต์รุ่นส่วนใหญ่ที่ใช้อยู่ในประเทศไทย เนื่องจากต้องเป็นรถยนต์ที่มีเครื่องยนต์ที่ทนต่อการกัดกร่อนสูง

กว่าปกติ ดังนั้นในการใช้น้ำมันชนิดนี้จึงจำเป็นต้องใช้เวลาในการเตรียมความพร้อมทั้งในด้านของผู้ใช้รถยนต์และรวมถึงผู้จำหน่ายน้ำมันที่ต้องคำนึงถึงกระบวนการผลิตและขั้นตอนการจัดจำหน่าย (Electricity and Industry Magazine)

2.1.3.4 เป็นสารเคมีที่ช่วยเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมัน โดยการเปลี่ยนรูปเอทานอล เป็น ETBE (EthylTertiary Butyl Ether) สามารถใช้ทดแทนสาร MTBE (Methyl Tertiary Butyl Ether) ซึ่ง MTBEเป็นสารเติมแต่งในน้ำมันเบนซินที่หลายประเทศประกาศห้ามใช้เนื่องจากก่อให้เกิดมลภาวะในอากาศที่สูงกว่าสารเติมแต่งอื่นๆ



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของเอทานอลแบบโซ่ตรง ประกอบด้วยโมเลกุลของ ไฮดรอกไซด์ (-OH) ที่ยึดเหนี่ยวกับอะตอมของคาร์บอน (C)

ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน (มปป.)

2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล (คณะกรรมาธิการการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร, 2545)

กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis) และกระบวนการหมัก (fermentation)

2.2.1 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) เป็นการผลิตจากอนุพันธ์สารปิโตรเลียม เช่น เอทิลีนด้วยปฏิกิริยาการระเหยน้ำ (dehydration) เป็นต้น

2.2.2 กระบวนการหมัก (Fermentation) เป็นการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วยเชื้อยีสต์ ประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ขั้นแรกยีสต์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) เป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยกระบวนการไกลโคไลซิสในภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ดังสมการแสดงดังภาพที่ 2.2

$$\underset{100\text{ กรัม}}{C_2H_{12}O_6 + \text{ยีสต์}} \longrightarrow \underset{51.11\text{ กรัม}}{2C_2H_5O_{12}} + \underset{48.89\text{ กรัม}}{2CO_2} + 28.7\text{ kcal}$$

ภาพที่ 2.2 กระบวนการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน (มปป.)

โดยตามทฤษฎีน้ำตาลกลูโคส 100% จะถูกเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล 48.89 และ 51.11% โดยน้ำหนัก ตามลำดับ แต่ในทางปฏิบัติจะเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่น ๆ หรือใช้ในการสร้างเซลล์ยีสต์ ทำให้ได้เอทานอลประมาณ 48% เมื่อได้เอทานอลแล้ว ขั้นตอนที่ 2 จึงเป็นการทำให้เอทานอลมีความเข้มข้น และบริสุทธิ์สูงขึ้นโดยการกลั่น

2.3 วัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอล

วัตถุดิบที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบสามารถนำมาใช้ในการหมักเอทานอล โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 ประเภท ได้แก่ วัตถุดิบประเภทน้ำตาล เช่น อ้อย และกากน้ำตาล วัตถุดิบประเภทแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และอื่นๆ และประเภทสุดท้ายคือ ประเภทลิกโนเซลลูโลสที่ประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน เช่น ข้าวฟ่าง กากอ้อย และซังข้าวโพด เป็นต้น

2.3.1 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทน้ำตาล

วัตถุดิบประเภทน้ำตาลที่ใช้ในการผลิตเอทานอล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และบีท น้ำตาล ซึ่งวัตถุดิบเหล่านี้มีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นน้ำตาลซูโครส (Sucrose) ที่เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 ชนิด คือ น้ำตาลกลูโคส และน้ำตาลฟรุกโตส ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครส มีขั้นตอนดังนี้ คือ ขั้นแรกน้ำตาลซูโครสเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส (Hydrolysis) ได้น้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสอย่างละโมเลกุล จากนั้นน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสจะถูกยีสต์เปลี่ยนไปเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 4 โมเลกุล

$$C_{12}H_{22}O_{11} + H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + C_6H_{12}O_6 \xrightarrow{\text{ยีสต์}} 4C_2H_5OH + 4CO_2$$

(ซูโครส)	(น้ำ)	(กลูโคส)	(ฟรุกโตส)		
342 กรัม	18 กรัม	180 กรัม	18กรัม	4×46 กรัม	4×46 กรัม
คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับน้ำตาลซูโครส				0.5380 กรัม	0.5146 กรัม

ภาพที่ 2.3 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส
ที่มา: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2549)

2.3.2 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง

วัตถุดิบประเภทแป้งที่ใช้ในการผลิต ได้แก่ มันสำปะหลัง (ทั้งหัวมันสด และหัวมันเส้น) ข้าวโพด ข้าว และเมล็ดข้าวฟ่าง เป็นต้น โดยแป้งเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคส เมื่อนำแป้งมาผ่านกระบวนการย่อย (Hydrolysis) ด้วยกรดหรือเอนไซม์จะได้น้ำตาลกลูโคสที่

สามารถเข้าสู่กระบวนการ หมักเอทานอล โดยปัจจุบันจะนิยมย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ที่มีความบริสุทธิ์มากกว่า

การย่อยแป้งด้วยเอนไซม์จะประกอบด้วยการย่อย 2 ครั้งคือ

2.3.2.1 การย่อยแป้งครั้งแรกหรือทำให้แป้งเหลว (Liquefaction) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์แอลฟาอะไมเลส (α-amylase) ย่อยแป้งที่อุณหภูมิ 90-100 องศาเซลเซียส ใช้เวลาประมาณ 1-2 ชั่วโมง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่า เด็กซ์ตริน (Dextrin)

2.3.2.2 การย่อยแป้งครั้งสุดท้ายหรือการเปลี่ยนแป้งน้ำตาล (Saccharification) ขั้นตอนนี้จะใช้เอนไซม์กลูโคสอะไมเลส (Glucoamylase) ย่อยเด็กซ์ตรินที่อุณหภูมิ 55-65 องศาเซลเซียส ให้ได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งยีสต์สามารถใช้หมักเอทานอลได้ โดยกะบวนการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทแป้ง สามารถแสดงได้ดังภาพที่ 2.4

อะไมโลโลติกเอนไซม์ ยีสต์

$$H(C_6H_{10}O_5)OH \xrightarrow[\text{น้ำ}]{} nC_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2nC_6H_5OH + 2nCO_2$$

(แป้ง)	(กลูโคส)	(เอทานอล)	
162 กรัม (มอนอเมอร์)	180 กรัม	2×46 กรัม	2×44 กรัม
คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับแป้ง		0.5111 กรัมต่อกรัม	0.4889 กรัมต่อกรัม

ภาพที่ 2.4 การหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส
ที่มา: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (2549)

2.3.3 การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ข้าวฟ่าง กากอ้อย ซังข้าวโพด และ เศษไม้ เป็นต้นวัตถุดิบประเภทนี้มีองค์ประกอบเป็นเซลลูโลส(Cellulose),เฮมิเซลลูโล (Hemicellulose) และ ลิกนิน (Lignin) โดยเซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึกมีลักษณะเป็น เส้นใยเหนียวและไม่ละลายน้ำ เฮมิเซลลูโลสเป็นโพลีเมอร์ของน้ำตาลเพนโตส (Pantose) หลายชนิด เช่น ไซโลส (Xylose) แมนโนส (Mannose) และอะราบิโนส (Arabinose) เป็นต้น ส่วนลิกนินเป็นโพลีเมอร์ของฟีนอลโพเพน (Phenylpropane) ซึ่งทนต่อการย่อยสลายอย่างมาก

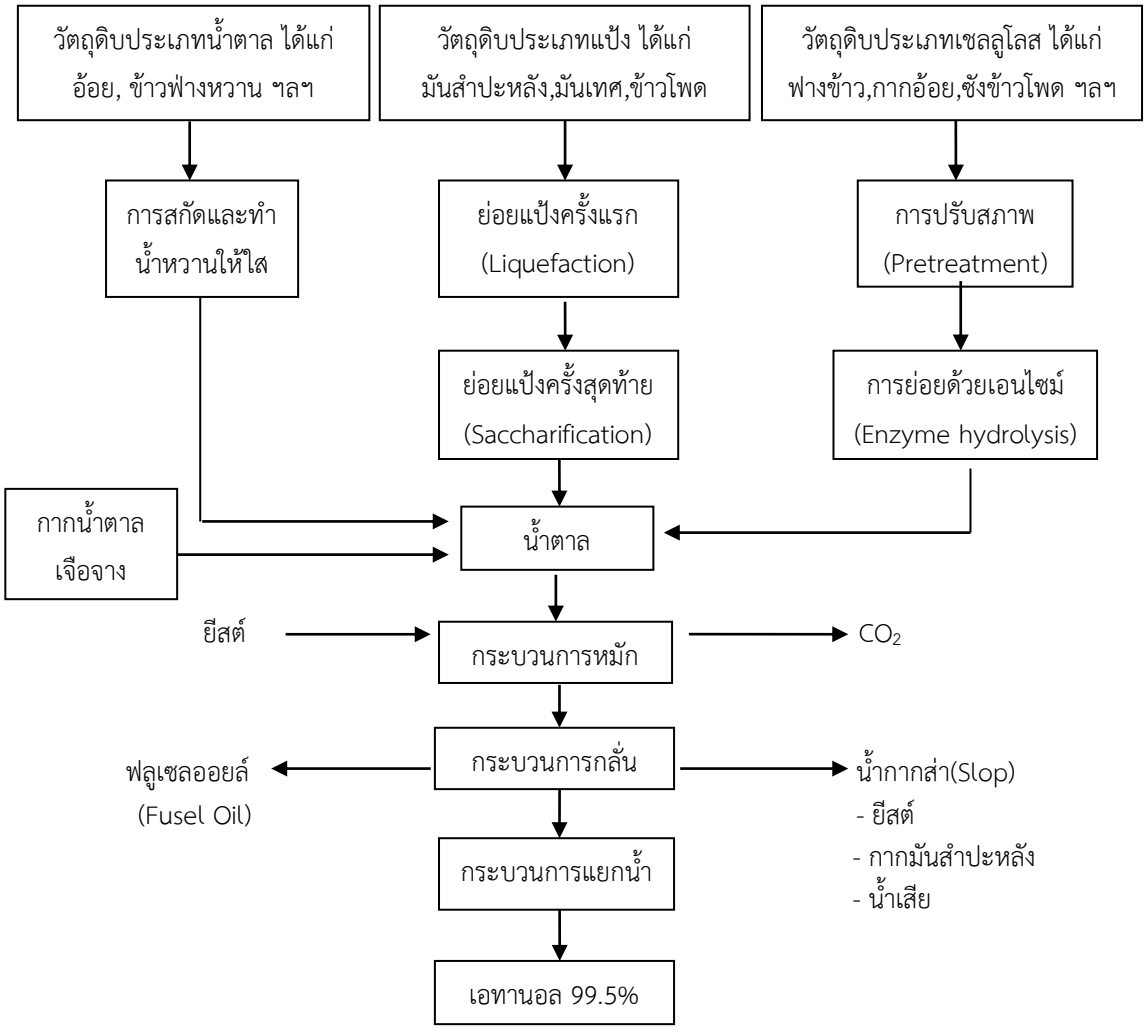
เซลลูโลไลติก
เอนไซม์

$(C_6H_{10}O)n + nH_2O \xrightarrow[\text{น้ำ}]{} nC_6H_2O_6 \longrightarrow 2nC_2H_5OH + 2nCO_2$

เซลลูโลส 162 กรัม กลูโคส180 กรัม 4×46 กรัม 4×44 กรัม

คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับเซลลูโลส 0.5679 กรัม 0.5432 กรัม

ภาพที่ 2.5 การหมักเอทานอลจากเซลลูโลส
ที่มา : Samsuri *et al*. (2009)



ภาพที่ 2.6 สรุปการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการหมักจากวัตถุดิบทางการเกษตร
ที่มา: กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงาน กระทรวงพลังงาน (มปป.)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของยีสต์ในระหว่างกระบวนการหมัก (วรลักษณ์, 2556)

เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการหมักสูงสุด และได้ปริมาณเอทานอลสูง จำเป็นต้องมีควบคุมสิ่งแวดล้อมในการหมักในทุกขั้นตอน เพื่อให้เหมาะสมต่อการทำงานของยีสต์ในการหมักเอทานอล ดังนี้

2.4.1 อุณหภูมิ

อุณหภูมิมีคามสำคัญต่อกระบวนการหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ เนื่องจากในระหว่างการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้นในระบบ ซึ่งเกิดจากการทำงานของยีสต์ โดยการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสจะเกิดความร้อนประมาณ 140.2 แคลลอรี่ต่อกรัมกลูโคส ซึ่งจะถ่ายเทความร้อนลงในน้ำหมัก ทำให้น้ำหมักมีอุณหภูมิสูงขึ้น ยีสต์สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางในช่วง 30-35 องศาเซลเซียส ในสภาพที่อาหารอุดมสมบูรณ์ ยีสต์จะทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดี และจะหยุดเจริญเมื่ออุณหภูมิต่ำกว่า 0 และเกินกว่า 40 องศาเซลเซียส โดยพบว่าเซลล์ยีสต์ในระยะที่มีการเจริญเกิดการตายได้ ถ้านำไปไว้ตั้งแต่ 50-60 องศาเซลเซียส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจะแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับสายพันธุ์เชื้อยีสต์ที่ใช้

2.4.2 ค่าพีเอช

ยีสต์เจริญได้ดีที่ค่าพีเอชในช่วงที่เป็นกรด คือ ในช่วงพีเอช 3.0-6.5 แต่พีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ระหว่าง 4.5-5.0 ซึ่งในสภาพกรดอ่อนนี้สามารถช่วยควบคุมการปนเปื้อนแบคทีเรียได้ดี ซึ่งการหมักเอทานอลจากซูโครสมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชมากกว่าการใช้กลูโคสสำหรับอาหารที่มีบัฟเฟอร์ต่ำพีเอชเริ่มต้นสำหรับการหมักที่เหมาะสมควรมีค่าประมาณ 5.5 แต่อาหารที่มีบัฟเฟอร์สูงพีเอชที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 4.5-4.7

2.4.3 ความเข้มข้นของน้ำตาล

การที่กลูโคสหรือแป้ง(คาร์โบไฮเดรต) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นสูง ทำให้ความสามารถในการหายใจเสียไปที่เรียกว่า Crabtree หรือ Glucose effect ซึ่งเป็นการกดดันเมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้น เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีคาร์โบไฮเดรตความเข้มข้นระดับหนึ่ง คือ กลูโคส หรือ ซูโครส ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 0.021-0.1 โดยมวล ทำให้การหายใจถูกยับยั้งอย่างรุนแรง

2.4.4 ความเข้มข้นของเอทานอล

ในสภาพที่มีเอทานอลสูงการเจริญและการหมักเอทานอลด้วยยีสต์จะถูกยับยั้ง เพราะเอทานอลมีผลต่อเอนไซม์และสรีรวิทยาของเซลล์ยีสต์ เมื่อเอทานอลมีความเข้มข้น 4.7-7.8 เปอร์เซ็นต์ ยีสต์จะหยุดการเจริญเติบโต การที่ยีสต์ไม่เจริญเติบโตจะส่งผลให้อัตราการหมักลดลงด้วย

2.4.5 ปริมานออกซิเจน

เนื่องจากยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงในสภาวะที่มีออกซิเจน แต่จะมีผลให้การหมักลดลง ยีสต์จะให้ออกซิเจนในการหายใจเพื่อการเจริญเติบโตและแตกหน่อ (Budding) โดยจะไม่ให้เอทานอลออกมาแต่จะมีเพียงคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำเกิดขึ้นเท่านั้น ดังนั้นการหมักอย่าง

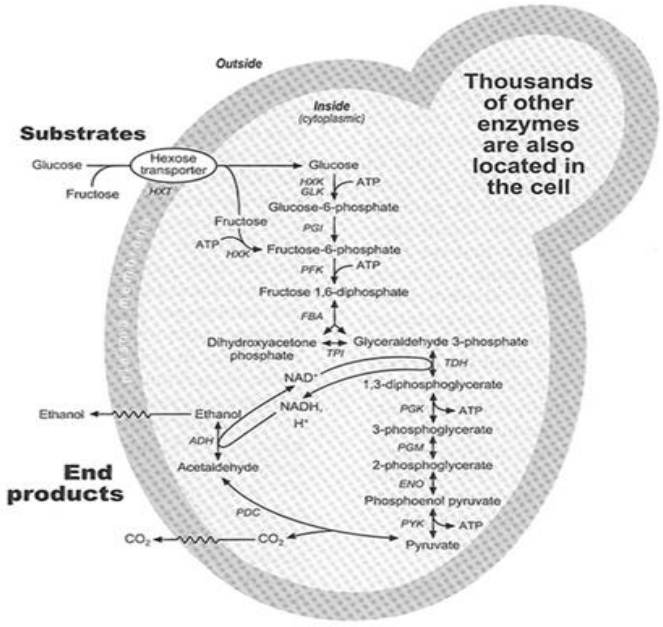
ต่อเนื่องควรมีอากาศบ้างในระหว่างการหมัก เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ทดแทนเซลล์ที่ตายลงและยังพบว่าการให้อากาศเพียงเล็กน้อย จะทำให้มีการใช้กลูโคสได้มากขึ้น และช่วยให้ยีสต์มีความทนต่อเอทานอลได้ดีอีกด้วย

2.4.6 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์ ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ที่ความดันบรรยากาศปกติ หากมีคาร์บอนไดออกไซด์สูงจะเกิดการยับยั้งการเจริญและการหมักอย่างรุนแรง

2.5 เมแทบอลิซึมและปฏิกิริยาชีวเคมีของยีสต์ในการผลิตเอทานอล

สำหรับกระบวนการผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมัก จะอาศัยกระบวนการทำงานของเชื้อยีสต์โดยเชื้อนั้นจะใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นอาหารในการเปลี่ยนและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยผ่านกระบวนการ ไกลโคไลซีส (glycolysis) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนซึ่งตามทฤษฎีแล้วในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของยีสต์นั้น น้ำตาลกลูโคส 100 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 51.11 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.89 กรัม นอกจากนี้ยังมีพลังงานความร้อนเกิดขึ้นอีก 28.7 กิโลแคลอรี่ (Kcal)



ภาพที่ 2.7 กระบวนการผลิตเอทานอลในเซลล์ของยีสต์

ที่มา: http://www.responsiblebusing+sugar+crops?sortBy=createddate

จากภาพที่ 2.7 ในการผลิตเอทานอลกระบวนการแรกคือ วิถีไกลโคลิซิส และวัฏจักรเครปส์เป็นการสลายกลูโคสและสารอาหารอื่นๆ ให้ได้สารพลังงานสูงคือ ATP, NADH และ $FADH_2$ ซึ่งสะสมพลังงานเคมีไว้ในตัว ไกลโคไลซิส (glycolysis) เป็นกระบวนการสลายกลูโคสที่เกิดขึ้นต่อเนื่องหลายขั้นตอนให้เกิดเป็นไพรูเวต (pyruvate) โดยจะได้พลังงานทั้งในรูป ATP และ NADH กระบวนการนี้เกิดขึ้นกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกชนิดโดยเกิดขึ้นในส่วนไซโตซอล เป็นปฏิกิริยาที่ไม่ต้องใช้ออกซิเจน คือเกิดได้ไม่ว่าจะมีออกซิเจนหรือไม่มีก็ตาม แต่ไพรูเวตที่เกิดขึ้นนั้นสามารถถูกนำไปใช้ต่อได้ การผลิตเอทานอลในเซลล์ของยีสต์ไพรูเวตจะถูกเปลี่ยนให้เป็นอะซิทัลดีไฮด์ (Acetaldehtde) และให้คาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ปฏิกิริยานี้มีแมกนีเซียมไอออน และ ไธอะมินไพโรฟอสเฟต (Thiamine pyrophosphate) เป็นโคเอนไซม์ จากนั้นอะซิทัลดีไฮด์จะถูกรีดิวซ์โดย NADH เพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอลซึ่งเป็นสาร C_2 โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (Alcohol dehydrogenase) และ NAD^+ ที่ได้ทดแทนตัวที่ถูกใช้ไปในปฏิกิริยาที่ 6 ฉะนั้น จึงไม่สูญเสีย NAD^+ หรือ NADH เช่นเดียวกันกับกระบวนการไกลโคไลซิส ปฏิกิริยารวมของการหมักจึงเป็นดังนี้ (https://th.wikipedia.org/wiki/การหายใจระดับเซลล์)

$$\text{Glucose} + 2\text{ADP} + 2\text{Pi} \longrightarrow 2\text{Ethanol} + 2CO_2 + 2\text{ATP} + 2H_2O$$

2.6 ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง

ยีสต์ทนอุณหภูมิสูง (Thermotolerant yeast) เป็นยีสต์ที่เจริญเติบโตได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ถึง 50 องศาเซลเซียส เนื่องจากมีรายงานว่ายีสต์ทนร้อนมีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงสารเคมี สารทำความสะอาด และผลิตสารที่มีความสามารถในการทนต่อความร้อน เช่น เอนไซม์ต่างๆ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิดเช่น อุตสาหกรรมอาหารเภสัชกรรม การผลิตสารสำหรับทำความสะอาด หรือการผลิตเอทานอล เป็นต้น นอกจากนี้ยีสต์ทนร้อนยังช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายทั้งพลังงาน และน้ำในการทำระบบ หล่อเย็น ในโรงงานอุตสาหกรรมการหมัก นำไปสู่การพัฒนาเชิงพาณิชย์ได้ และยังมีรายงานในการควบคุมโรคแอนแทรคโนส (Anthracnose) ในพริกได้อีกด้วย ยีสต์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้มากกว่าถ้ายีสต์สายพันธุ์นั้นเป็นยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง โดยยีสต์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสแต่ละสายพันธุ์จะมีการผลิตเอทานอลในปริมาณที่ต่างกัน (ชุติมา, 2548) (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 สายพันธุ์ยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุด (%v/v)
Kluyveromyces fragilis YKL1	4.00
Kluyveromyces marxianus NCYC 587	5.03
Candida lusitaniae Y-5394	4.57
Candida psuedotropicallis Yca9	6.87
Candida tropicalis NCYC 405	3.43
Saccharomyces cerevisia ATCC	6.39
Saccharomyces cerevisiae Ysa86	6.38
Saccharomyces cerevisiae NP3	7.58
Saccharomyces cerevisiae Y24	10.27
Saccharomyces sp. 1400	7.00
Saccharomyces uvarum	7.82
Shizosacchamyces pombe YSC3	2.15
Hansenula polymorpha ATCC 4516	1.80

ที่มา : ชุติมา (2548)

2.7 อ้อย

2.7.1 ลักษณะทั่วไปของอ้อย

อ้อย (Sugar cane) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Saccharum officinarum L.* เป็นพืชในวงศ์เดียวกับ ไผ่ หญ้าและธัญพืช เช่น ข้าวสาลี ข้าว ข้าวโพด และ ข้าวบาร์เลย์ คือ ตระกูล Gramineae มีแหล่งกำเนิดที่เกาะนิวกินี ในมหาสมุทรแปซิฟิค อ้อยเป็นพืชเขตร้อน ความยาวของช่วงวันที่เหมาะสมประมาณ 11.5-12.5 ชั่วโมง และอุณหภูมิเฉลี่ยที่เหมาะสมตลอดฤดูการปลูกประมาณ 26-30 องศาเซลเซียส สามารถปลูกในดินทรายจนถึงดินเหนียวจัด แต่ดินที่เหมาะสมสำหรับปลูกอ้อย คือ ดินร่วนทรายหรือดินร่วนเหนียว มีค่าความเป็นกรด-ด่างตั้งแต่ 4.5 ถึง 8.5 และมีความลึกของหน้าดินพอสมควร และระบายน้ำหรืออากาศได้ดีจนถึงปานกลาง อ้อยเป็นพืชที่ปลูกง่าย สามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมแปรปรวน เช่น สภาพน้ำท่วมหรือแห้งแล้งเป็นต้น ในลำต้นอ้อยมีปริมาณซูโครสประมาณ 17-35% ลักษณะภายนอกประกอบด้วย ลำต้นที่มีข้อและปล้องชัดเจน มีใบเกิดสลับข้างกัน และมีส่วนกาบใบหุ้มลำต้นไว้ โดยกาบใบและใบจะมีไขและขนอยู่ด้วยราก อ้อยเป็นระบบรากฝอยแต่แข็งแรงสามารถหยั่งลงไปในดินได้ลึก ลำต้นอ้อยสามารถแตกหน่อได้จากตาของข้อล่าง (https://app.enit.kku.ac.th/mis/administrator/doc_upload/20121018110604.pdf)

2.7.2 การใช้ประโยชน์จากอ้อย

แทบจะกล่าวได้ว่า ทุกส่วนของอ้อยตั้งแต่ยอดจนถึงราก ล้วนมีประโยชน์ทั้งสิ้น แต่ส่วนที่นำมาใช้ประโยชน์มากที่สุด เห็นจะได้แก่ ส่วนของลำต้น ซึ่งทำหน้าที่เก็บน้ำตาลไว้นั่นเอง อย่างไรก็ดีการใช้ประโยชน์จากอ้อยอาจกล่าวกว้างๆ ได้ 2 ประการ คือ (1) การใช้ประโยชน์โดยตรงและ (2) การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

2.7.2.1 การใช้ประโยชน์โดยตรง

1) ใช้เป็นอาหารมนุษย์ ส่วนของลำต้นที่เก็บน้ำตาล สามารถนำมาเป็นอาหารของมนุษย์ได้ เช่น ทำเป็นอ้อยควั่น หรือบีบเอาน้ำอ้อยเพื่อบริโภคโดยตรง

2) ใช้เป็นอาหารสัตว์ ใบ ยอด และส่วนของลำต้นที่ยังอ่อนใช้เป็นอาหารสัตว์ เช่น วัวควายได้โดยตรง

3) ใช้เป็นเชื้อเพลิง ใบอ้อยแห้ง (trash) อาจจะเป็นแหล่งของพลังงาน และเชื้อเพลิงที่สำคัญทั้งนี้ เพราะใบอ้อยแห้งให้พลังงานค่อนข้างสูงมาก

4) ใช้เป็นวัตถุคลุมดิน หรือบำรุงดิน ใบอ้อยแห้งเมื่อใช้คลุมดินจะช่วยรักษาความชื้น และป้องกันวัชพืชด้วย ในขณะเดียวกัน ก็จะกลายเป็นอาหารของจุลินทรีย์ต่างๆ ซึ่งบางพวกสามารถตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้

2.7.2.2 การใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม

1) ใช้เป็นอาหารมนุษย์ น้ำตาลมีความสำคัญ และจำเป็นต่อชีวิต ในฐานะที่เป็นอาหารทั้งในรูปของอาหารคาวและหวาน นอกจากจะใช้เป็นอาหารโดยตรงแล้ว น้ำตาลยังใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น สับปะรดกระป๋อง ผลิตภัณฑ์นม น้ำ ผลไม้กระป๋อง และเครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ ซึ่งได้แก่ น้ำขวด หรือน้ำอัดลมชนิดต่างๆ เป็นต้น

2) ใช้ประโยชน์อย่างอื่น น้ำตาล (รวมทั้งแป้ง) สามารถใช้ประโยชน์ได้กว้างขวางนับตั้งแต่ใช้ผลิตแอลกอฮอล์ โดยขบวนการหมักดอง หรือเฟอร์เมนเตชัน . (fermentation) ซึ่งอาศัยเชื้อยีสต์ (yeast) จนถึงการผลิตผงซักฟอก (detergents) โดยอาศัยปฏิกิริยาโดยตรงระหว่างน้ำตาล และไขมัน (fat) ผงซักฟอกประเภทนี้เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมน้อยมาก เพราะสามารถสลายตัวได้ โดยจุลินทรีย์ (biodegradable) นอกจากนี้ น้ำตาลยังใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตสารเคลือบผิว (surfactant) สำหรับใช้ในการเกษตร สารดังกล่าวสลายตัวได้โดยจุลินทรีย์ เช่นเดียวกัน อย่างไรก็ดีการใช้ประโยชน์ของน้ำตาลในรูปที่มิใช่เป็นอาหาร กำลังได้รับความสนใจเพิ่มขึ้นโดยลำดับ ซึ่งจะเห็นได้จากผลิตภัณฑ์ใหม่ๆ ที่ใช้น้ำตาลเป็นวัตถุดิบเกิดขึ้นเรื่อยๆ

1) ใช้เป็นเชื้อเพลิง สำหรับผลิตไอน้ำ และกระแสไฟฟ้าสำหรับใช้ภายในโรงงานน้ำตาลนั่นเอง ชานอ้อยสามารถใช้แทนน้ำมันเชื้อเพลิง (fueloil) ได้

2) ใช้ผลิตวัสดุก่อสร้างโดยอาศัยกาว เช่น อัดเป็นแผ่น (particle board) ไม้อัดผิวเส้นใย (fiber-overlaid plywood) และแผ่นกันความร้อน (insulating board) เป็นต้น

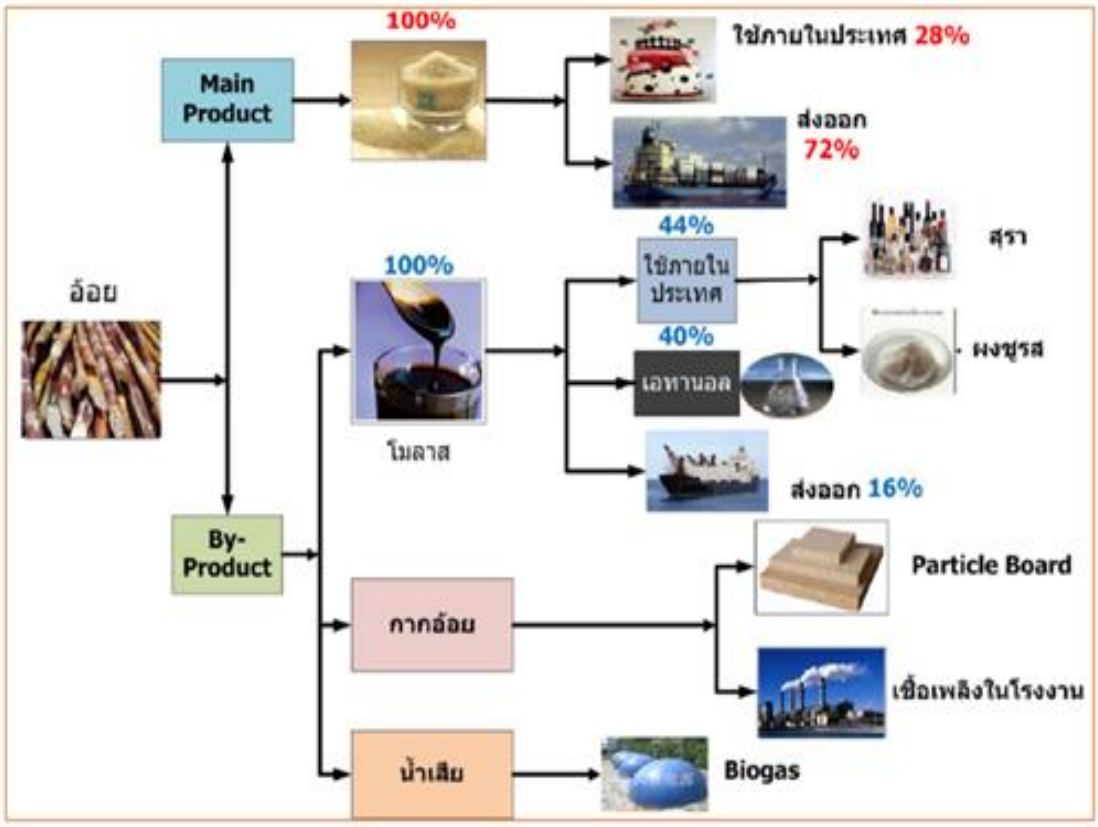
3) ใช้ผลิตเยื่อกระดาษ (pulp) และกระดาษชนิดต่างๆ ชานอ้อยส่วนใหญ่ประกอบด้วย ลิกนิน (lignin) และมีเซลลูโลสอยู่บ้างเล็กน้อย ไฟเบอร์ของชานอ้อยค่อนข้างสั้น คือ มีความยาวเฉลี่ย 1.4 มิลลิเมตร เท่านั้น ในขณะที่เยื่อใยของไม้ไผ่เฉลี่ย 2.5-4.0 มิลลิเมตร

4) ใช้เป็นอาหารสัตว์ ชานอ้อย ถ้าให้สัตว์กินโดยตรงมักจะเกิดปัญหาเกี่ยวกับรสชาติ การย่อยของสัตว์ ตลอดจนมีอัตราส่วนต่ำระหว่างอาหารที่สัตว์กินกับน้ำหนักตัวที่เพิ่ม

5) ใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับอุตสาหกรรมผลิต (เฟอร์ฟูรอล), (เฟอร์ฟูรอลแอลกอฮอร์),(ไซลิทอล)

6) ใช้ทำปุ๋ยหมัก โดยหมักร่วมกับปุ๋ยคอก กากตะกอน หรือปุ๋ยวิทยาศาสตร์ นอกจากนี้ยังใช้ปูคอกสัตว์เพื่อรองรับมูลสัตว์ และทำปุ๋ยหมักต่อไป

7) ใช้เป็นวัตถุคลุมดิน เพื่อรักษาความชื้นของดิน และป้องกันวัชพืช



ภาพที่ 2.8 การใช้ประโยชน์จากอ้อยในด้านต่างๆ

ที่มา: การพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงานกระทรวงพลังงาน (มปป.)

2.7.3 องค์ประกอบของน้ำอ้อย

น้ำตาลซูโครส (sucrose) เป็นน้ำตาล (sugar) ที่เรียกกันทั่วไปว่า น้ำตาลทราย ที่ใช้เป็นสารให้ความหวาน (sweetener) อย่างกว้างขวางทั่วโลก พบอยู่ในพืชและผลไม้หลายชนิด แต่ที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบผลิตน้ำตาลทางการค้า คือ อ้อย และหัวบีท (beat root) น้ำตาลซูโครสเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ (disaccharide) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) 2 ชนิด คือน้ำตาลฟรุกโทส (fructose) และน้ำตาลกลูโคส (glucose) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไกลโคไซด์ (glycolysis bond) มีสูตรโมเลกุล คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ น้ำตาลซูโครส เป็นน้ำตาลนอน-รีดิวซ์ (non-reducing sugar) เพราะไม่มีหมู่ฟังชันเหลืออยู่ในโมเลกุล

น้ำตาลที่ได้จากอ้อย และหัวบีท เป็นน้ำตาลซูโครสหรือน้ำตาลทรายซึ่งสามารถเตรียมเป็นน้ำตาลอินเวิร์ต (invert sugar) ซึ่งเป็นน้ำเชื่อมที่เตรียมจากการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์อินเวอร์เทส ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตส

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบของน้ำอ้อยที่ใช้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

Characteristics	Average measured
value pH[a]	6.0
Total acidity (% w/w)[a,b]	0.087
Soluble solids (^{o}Brix)[a]	22.6
Sucrose (% w/w)[a]	17.7
Free reducing sugars (% w/w)[a]	0.76
Total reducing sugars (% w/w)[a]	19.41
Soluble proteins (g/l)	0.80
Mg (% w/v)[c]	0.23
Ca (% w/v)[c]	0.13
Absorbance (620 nm)	0.520

[a]ตามเกณฑ์ ICINAZ (Cuba) 1996

[b]วัดในรูปของกรดอะซิติก

[c]Mg และ Ca ที่อยู่ในรูปของ MgO และ CaO ตามลำดับ ซึ่งเป็นของแข็งที่ละลายน้ำได้

ที่มา: Serrat *et al*., (2011)

จากตารางที่ 2.2 ในน้ำอ้อยมีองค์ประกอบของน้ำอ้อยมีค่าความเป็นกรดทั้งหมด 0.087 เปอร์เซนต์ ของแข็งที่ละลายน้ำได้ 22.6 องศาบริกซ์ ซูโครส 17.7 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลริดิวซ์ 0.76 เปอร์เซ็นต์ น้ำตาลทั้งหมด 19.41 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความน่าสนใจในการใช้เป็นสับสเตรทเพื่อการผลิตเอทานอลเนื่องจากมีน้ำตาลพอเหมาะในการเจริญเติบโตของยีสต์เพื่อเปลี่ยนเป็นเอทานอล

2.8 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Anderson *et al*., (1986) คัดแยกยีสต์จำนวนหลายสายพันธุ์จากโรงงานผลิตน้ำตาล และจัดจำแนกเป็น *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* ทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคสและน้ำอ้อยที่อุณหภูมิสูง ซึ่งมียีสต์หลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในกระบวนการหมักที่อุณหภูมิสูงถึง 47 องศาเซลเซียส และพบว่าที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียสจะให้เอทานอลสูงกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) หลังจากเวลา 12-14 ชั่วโมง ผลของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีค่าสูง (> 80 เปอร์เซ็นต์) ถึงแม้ว่าสายพันธุ์ CBS 712 ของ *K. marxianus* var. *marxianus* จะสามารถผลิตเอทานอลได้ถึง 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส แต่อัตราการรอดชีวิตลดลงเหลือเพียง 30-50 เปอร์เซ็นต์ ที่เวลาในการหมักเท่ากับ 24-30 ชั่วโมง ดังนั้น อาจปรับปรุงสายพันธุ์ดังกล่าวโดยใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมสำหรับยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เพื่อผลิตเอทานอล 10-15 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) โดยให้มีอัตราการรอดชีวิตสูงที่เวลา 12-18 ชั่วโมง

Dhaliwal *et al*., (2011) ทำการคัดแยกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงจากน้ำอ้อยโดยเทคนิคเฉพาะ และจำแนกเป็น *Pichia Kudriavzevii* (Issatchenkia orientalis) ด้วยวิธีทางโมเลกุล ของเซลล์ *P. Kudriavzevii* ที่มีการปรับตัวในอาหาร galactose medium จะสามารถผลิตเอทานอลมากกว่าเซลล์ที่ไม่มีการปรับตัว โดยใช้อาหารที่มีน้ำอ้อย 30 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่า การนำเซลล์กลับมาใช้ 4 รอบไม่ทำให้ความสามารถในการผลิตเอทานอลลดลง การหมักของ *P. Kudriavzevii* สำหรับเซลล์ที่มีการปรับตัวในอาหาร galactose medium ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสให้เอทานอลและอัตราการผลิตเท่ากับ 71.9 กรัมต่อลิตร และ 40 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง จากน้ำอ้อยที่มีซูโครส 14 เปอร์เซ็นต์ ,กลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ และ ฟรุกโตส 1 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และการผลิตเอทานอลจะเพิ่มขึ้นเมื่อเติมอะราบิทอล3.30และกลีเซอรอล 4.19กรัมต่อลิตร

Gupta *et al.*, (2009) ทำการคัดแยกยีสต์หลายสายพันธุ์ ได้แก่ SCP-1, SCP -3, SCP-4, SCP-7 จากเนื้อเยื่อของต้นปาล์ม (Phoenix dactylifera) โดยตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส, การผลิตเอทานอล และการทนต่อเอทานอล เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิงคือ *S.cerevisiae* พบว่า ปริมาณแอลกอฮอล์ของยีสต์ที่คัดแยกได้มีค่าในช่วง 8.9-12.5 เปอร์เซ็นต์ จากการวัดด้วยเครื่อง GLC (Gas Liguid Chromatogrophy) ผลของความสามารถทนต่อเอทานอลได้ที่ความเข้มข้น 3-12% และพบว่าไอโซเลต SCP-1 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 12.5 เปอร์เซ็นต์ โดยมีกิจกรรมของเอ็นไซม์ ADH เท่ากับ 4.38 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และสามารถทนต่อเอทานอลได้สูงถึง 12 เปอร์เซ็นต์ในอาหาร YPD ที่เวลา 48 ชั่วโมง

Limtong *et al.,* (2007*)* คัดแยกเชื้อยีต์ *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ DMKU 3-1042, โดยใช้ enrichment technigue ในอาหารที่มีน้ำอ้อยที่เติมเอทานอล 4 เปอร์เซ็นต์ (w / v) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่า สามารถผลิตเอทานอลความเข้มข้นสูงทั้งอุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียส โดยการผลิตเอทานอลโดยสายพันธุ์นี้ในระดับฟลาสก์ในอาหารที่มีน้ำอ้อยที่อุณหภูมิ 37 เซลเซียสมีค่าสูงสุด (อาหารประกอบด้วยน้ำตาลทั้งหมด 22 เปอร์เซ็นต์, $(NH4)_2SO_4$ 0.05 เปอร์เซ็นต์, KH_2PO_4 0.05 เปอร์เซ็นต์, และ $MgSO_4$ $.7H_2O$ 0.15 เปอร์เซ็นต์ พีเอชเท่ากับ 5.0) พบว่า มีความเข้มข้นของเอทานอล ถึง 8.7 เปอร์เซ็นต์ (w / v) กำลังการผลิต 1.45 กรัม / ลิตร / ชั่วโมง และผลได้ตามทฤษฎีที่ได้ 77.5 เปอร์เซ็นต์ การผลิตที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า เอทานอลมีความเข้มข้นสูงสุด 6.78 เปอร์เซ็นต์ (w / v) กำลังการผลิต 1.13 และผลได้ตามทฤษฎีที่ 60.4 เปอร์เซ็นต์ จากอาหารชนิดเดียวกัน แต่มีการปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 การศึกษาการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร ความเร็วในการกวน 300 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 0.2 vvm ตลอดการกระบวนการหมักพบว่า *K. marxianus* สายพันธุ์ DMKU 3-1042 ให้เอทานอลความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 6.43 เปอร์เซ็นต์ (w / v) กำลังการผลิต 1.3กรัม/ลิตร/ชั่วโมง และผลได้ตามทฤษฎี 57.1 เปอร์เซ็นต์

สมศรี ลีปิพัฒนวิทย์ (2532) หมักเอทานอลจากยีสต์ *Sacchaaromyces cervisiae* สายพันธุ์ Sc 90/และSYA_2 โดยใช้น้ำอ้อยที่มีน้ำตาล 20.4 องศาบริกซ์ เติมแอมโมเนียซัลเฟต, โปตัสเซียมไดไฮโดเจนฟอสเฟตและยีสต์เอ็กซ์แทร็กซ์ ปรับพีเอชเท่ากับ 4 อัตราการให้อากาศ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่งโมง และลดความเร็วเป็น 100 รอบต่อนาที จะให้ผลได้เอทานอลเท่ากับ 9.4และ 8.03 % ตามลำดับ ส่วนน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า ยีสต์สายพันธุ์ Sc 90 กับ SYA_2 ในชั่วโมงที่ 72 ให้เอทานอล เท่ากับ 7.25% และ 6.2% ตามลำดับ เป็นที่น่าสังเกตว่า ในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 36 อีกเล็กน้อย และภายหลังจากการหมักที่ชั่วโมงที่ 49 เปอร์เซนต์เอทานอลจะเพิ่มน้อยมาก ทั้งนี้อาจเป็นผลจากสารอาหารลดน้อยลงและเอทานอลที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ด้วย การทดลองนี้ได้เห็นความแตกต่างว่าน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมาหมักจะได้เปอร์เซ็นต์เอทานอลต่ำลง เพราะในน้ำอ้อยมีจุลินทรีย์อื่นปนอยู่ ซึ่งมักพบจุลินทรีย์ต่างๆปะปนผลไม้ เช่น ในน้ำอ้อย น้ำตาลเมา น้ำองุ่นจุลินทรีย์ที่ปะปนอยู่จะไปใช้น้ำตาลที่มีอยู่ ซึ่งมีผลให้เปอร์เซ็นต์เอทานอลต่ำลงได้ นอกจากนั้นจุลินทรีย์อื่นที่ไม่ให้ผลในการหมักเอทานอลยังอาจใช้น้ำตาลที่มีอยู่ และเอทานอลที่ได้จากการหมักไปในการเปลี่ยนไปเป็นสารประกอบอินทรีย์อื่นๆด้วย

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องมือ

3.1.1.1 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectophotometer)

3.1.1.2 เครื่อง High Performance Liquid Chromtography (HPLC)

3.1.1.3 เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Micro centrifuge)

3.1.1.4 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave)

3.1.1.5 เครื่องชั่ง (balance)

3.1.1.6 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.1.1.7 ตู้บ่มเชื้อแบบเขย่า (Incubater shaker)

3.1.1.8 Haemacytometer

3.1.2 สารเคมี

3.1.2.1 ยีสต์เอ็กแทร็กซ์ (yeast extract)

3.1.2.2 มอลท์เอ็กแทร็กซ์ (Malt extract)

3.1.2.3 เปปโตน (Peptone)

3.1.2.3 เดกซ์โทรส (Dextrose)

3.1.2.4 เอทานอลบริสุทธิ์ (absolute ethanol)

3.1.2.5 กลูโคส(Glucose)

3.1.2.6 แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate)

3.1.2.7 โปแทสเซียมไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate)

3.1.2.8 แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรท (Magnesium sulphate heptahydrate)

3.1.2.9 โซเดียม โปแทสเซียม ตาร์เทรต (Sodium potassium tartrate)

3.1.2.10 โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide)

3.1.3 อุปกรณ์

3.1.3.1 ขวดรูปชมพู่ (Elenmayer Flask)

3.1.3.2 ไมโครปิเปตต์ (Micro Pipette)

3.1.3.3 กระบอกตวง (Cylinder)

3.1.3.4 บีกเกอร์ (Beaker)

3.1.3.5 ขวดปริมาตร (Volumetric Flasks)

3.1.3.6 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.1.3.7 หลอดทดลอง (Test tube)

3.2 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.2.1 สายพันธุ์ยีสต์

ยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่คัดแยกจากชานอ้อยของโรงงานน้ำตาลเก็บใน yeast extract-Malt extract (YM) agar slant อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.2.2 การเตรียมวัตถุดิบ

น้ำอ้อยจากตลาดเทศบาลเมือง จังหวัดมหาสารคาม วิเคราะห์ความหวานด้วยเครื่อง refractometer และ ปริมาณน้ำตาลกลูโคสด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

3.2.3 การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เขี่ยเชื้อยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YM medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 nm กำหนดเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0)

3.2.4 การคัดเลือกสายพันธุ์ยีสต์ที่ผลิตเอทานอลในอาหารสังเคราะห์ และอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นองค์ประกอบ

เติมเชื้อยีสต์ที่เตรียมจากข้อ 3.2.3 ลงในอาหารหมัก fermentation medium ที่มีกลูโคสและน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 (Limtong *et al.*2007) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างโดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC โดยใช้คอลัมน์ชนิด Aminex HPx – 87 H (ขนาดคอลัมน์ 300 × 7.8 mm) โดยใช้ 0.05M H_2SO_4 เป็น mobile phase

$$\text{ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเป็นเอทานอล (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{เอทานอล (กรัม)}}{\text{น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัม)}} \times 100$$

3.2.5 การแปรผันอุณหภูมิที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นองค์ประกอบ

เชื้อยีสต์ที่คัดเลือกจากข้อ 3.2.4 จำนวน 3 ไอโซเลต เติมเชื้อในอาหาร Sugarcane juice medium นำไปบ่มบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง แปรผันอุณหภูมิในการบ่มที่ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 12, 24, 36, 48 ,60 และ 72 ชั่วโมง โดยการนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Centrifuge) อัตรา 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลและปริมาณน้ำตาลด้วย

เครื่อง HPLC วัดชีวมวลโดยการวัดค่าความขุ่นที่เปลี่ยนแปลงด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอล

ยีสต์จำนวน 15 ไอโซเลตคัดเลือกจากคุณสมบัติของความสามารถการสร้างแก๊สตั้งแต่ 4.0-5.0 เซนติเมตร และความสามารถในการตกตะกอน โดยการทดสอบความสามารถในการสร้างแก๊สเป็นวิธีการคัดเลือกแบบทางอ้อมสำหรับยีสต์ที่มีความสามารถผลิตเอทานอล เนื่องจากการเปลี่ยนสับสเตรทเป็นเอทานอลจะเกิดผลพลอยได้คือก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยในทางทฤษฎีกลูโคส 180 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล 51.1 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม โดยน้ำหนัก ดังนั้นยีสต์ที่ให้ปริมาณแก๊สในหลอดดักแก๊สสูงจึงคาดว่าน่าจะมีศักยภาพที่ดีในการผลิตเอทานอลดังนั้นจึงถูกคัดเลือก เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอทานอลในขั้นตอนถัดไป สัณฐานวิทยาและความสามารถในการสร้างแก๊สแสดงดังตาราง ที่ 4.1

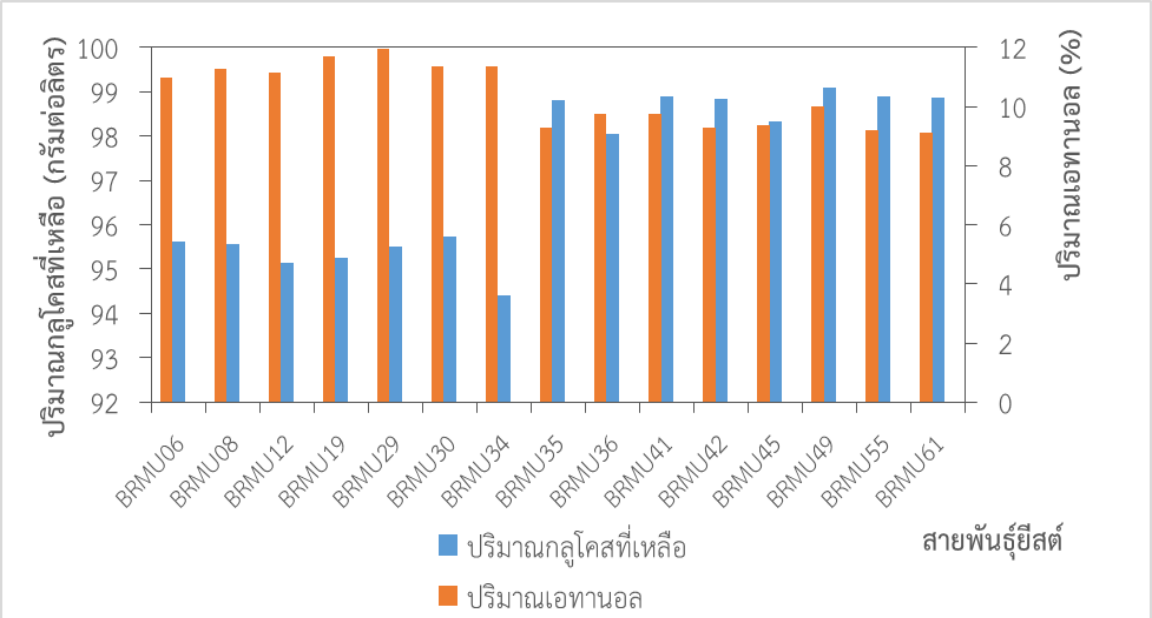
ตารางที่ 4.1 สัณฐานวิทยา การสร้างแก๊ส และการตกตะกอนของยีสต์ที่คัดเลือกได้

หน้าที่ 25-29 (อยู่อีกไฟล์ค่ะ)

จากตารางที่ 4.1 ยีสต์รหัส BRMU12 , BRMU19, BRMU35, BRMU49, BRMU55, BRMU29 และ BRMU45 มีปริมาณแก๊สในหลอดดักแก๊สสูงสุด เท่ากับ 5.0 ,4.8, 4.8, 4.8, 4.8, 4.7 และ 4.7 เซนติเมตร ตามลำดับ สำหรับยีสต์สายพันธุ์อื่นๆ มีปริมาณแก๊สในหลอดดักแก๊สอยู่ในช่วงตั้งแต่ 4.0-4.5 เซนติเมตร แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการเป็นเชื้อตั้งต้นที่สามารถผลิตเอทานอล นอกจากนี้เมื่อพิจารณาความสามารถในการตกตะกอน พบว่า ยีสต์ที่คัดเลือกได้เกือบทุกไอโซเลตมีความสามารถในการเจริญบริเวณก้นหลอดทดลอง (ตกตะกอน) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ยกเว้น ยีสต์รหัส BRMU06, BRMU19 และBRMU29 ซึ่งมีการเจริญบริเวณด้านบนของอาหารเหลว โดยคุณสมบัติดังกล่าวเป็นข้อดีในการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม คือ ทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยว และสามารถนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ใหม่ได้

4.2 การผลิตเอทานอลในอาหารสังเคราะห์

ทำการเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวนทั้งหมด 15 ไอโซเลตจากข้อ 4.1 โดยหมักเอทานอลในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงสุด ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 ปริมาณเอทานอล และน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักในอาหารสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากรายงานวิจัยของ Hacking และคณะ (1984) นำยีสต์ 55 สายพันธุ์ จากศูนย์เก็บรวบรวมสายพันธุ์มาคัดเลือกยีสต์ทนร้อนเพื่อดูการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 ° C พบว่ามี 8 สายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลได้มากกว่า 4% (W/V) ภายในเวลา 62-72 ชั่วโมง ทั้งหมดจัดอยู่ในจีนัส *Candida, Kluyveromyces* และ *Saccharomyces* โดย *C. pseudotropicaliess, S. cevevisiae* และ *K. uvarum* สามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่า 8% (V/V) ที่อุณหภูมิ 40 ° C ในเวลา 72 ชั่วโมงจากกลูโคส 140 g/l และ จากรายงานวิจัยของ อภิชญา และคณะ (มปป.) การผลิตเอทานอลโดยการหมักด้วยยีสต์*Saccharomyces cerevisiae* Sc90 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่มีกลูโคส ไซโลส และกลูโคสผสมไซโลส เป็นสับสเตรท พบว่า ผลได้ของเอทานอล (YP/S) เท่ากับ 0.38 กรัม เอทานอล/กรัมกลูโคส, 0.17 กรัมเอทานอล/กรัมไซโลส, 0.35 กรัมเอทานอล/กรัมกลูโคสและไซโลส ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า น้ำตาลกลูโคสเป็นน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่ยีสต์ทุกสายพันธุ์ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนในการแบ่งเซลล์เพื่อการเจริญเติบโต โดยจะเกิดการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดไพรูวิกผ่านวัฏจักรไกลโคไลซีสและเข้าสู่กระบวนการหมักจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอล และผลพลอยได้ คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ตารางที่ 4.3 ปริมาณเอทานอล และการใช้น้ำตาลในอาหารสังเคราะห์ที่มีกลูโคสเป็นสับสเตรทของยีสต์ทนอุณหภูมิสูง

รหัสยีสต์	**ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)**	**ปริมาณเอทานอล (เปอร์เซ็นต์)**	**ผลได้เอทานอล (เปอร์เซ็นต์)**	**ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเป็นผลได้เอทานอล (เปอร์เซ็นต์)**
BRMU 06	17.32	1.27	11.25	73.15
BRMU 08	17.30	1.32	11.69	76.30
BRMU 12	17.77	1.30	11.51	73.15
BRMU 19	17.65	12.4	10.98	70.25
BRMU 29	17.39	1.32	11.96	75.90
BRMU 30	17.19	1.28	11.34	74.46

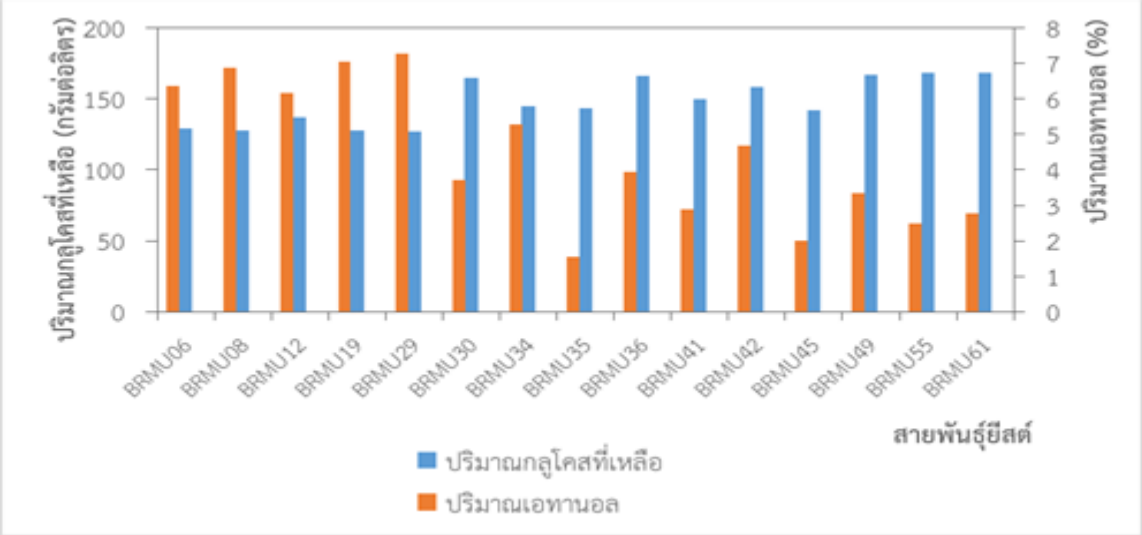
ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสยีสต์	**ปริมาณน้ำตาลที่ถูกใช้ไป (กรัมต่อลิตร)**	**ปริมาณเอทานอล (เปอร์เซ็นต์)**	**ผลได้เอทานอล (เปอร์เซ็นต์)**	**ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเป็นผลได้เอทานอล (เปอร์เซ็นต์)**
BRMU 34	18.51	1.28	11.34	69.15
BRMU 35	14.10	1.05	9.30	74.46
BRMU 36	14.31	1.10	9.74	76.81
BRMU 41	14.01	1.10	9.74	78.51
BRMU 42	14.06	1.05	9.30	76.67
BRMU 45	14.59	1.04	9.38	71.28
BRMU 49	13.81	1.13	10.00	81.82
BRMU 55	14.02	1.04	9.21	73.23
BRMU 61	14.04	1.03	9.12	73.36

ผลการทดลองจากกราฟที่ 4.2 พบว่า และตารางที่ 4.3 ความสามารถในการใช้น้ำตาลของยีสต์จะสอดคล้องกับผลได้เอทานอล โดยยีสต์ทั้งหมด 15 ไอโซเลต สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อการเจริญเติบโตของเซลล์ และเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ดี ซึ่งยีสต์ที่ให้ผลได้เอทานอลสูงสุด ได้แก่ รหัส BRMU29, BRMU19 และ BRMU08 เท่ากับ 11.96, 11.69 และ 11.25 % ตามลำดับ โดยมีผลได้ทางประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเป็นผลได้เอทานอล เท่ากับ 75.90, 70.25 และ73.32 % ยีสต์รหัส BRMU 29 โดยเกิดการสูญเสียได้เป็นสารประกอบอื่นๆ ตัวอย่าง เช่น อะซีตัลดีไฮด์, กรดอะซีติก, กลีเซอรีน, กรดแลคติก, กรดซักซินิก หรือ ฟลูเซลลออยล์ (ธีรภัทร, 2544)

4.3 การผลิตเอทานอลในน้ำอ้อย

ทำการเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อยีสต์ที่ผ่านการคัดเลือกจำนวนทั้งหมด 15 ไอโซเลตจากข้อ 4.1 โดยหมักเอทานอลในอาหารหมักที่มีน้ำอ้อยเป็นสับสเตรท โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงสุด ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.4 ปริมาณเอทานอล และน้ำตาลกลูโคสในระหว่างการหมักในอาหารที่มีน้ำอ้อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากกราฟที่ 4.4 พบว่าเชื้อยีสต์รหัส BRMU29, BRMU19 และ BRMU08 ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 7.28, 7.05 และ 6.89 % ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อยีสต์ทั้งหมด 15 ไอโซเลตในอาหารสังเคราะห์ จึงทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลตใช้ในการศึกษาขั้นตอนถัดไป โดยทำการหมักเอทานอลในน้ำอ้อยซึ่งมีการแปรผันอุณหภูมิแตกต่างกัน น้ำอ้อยประกอบด้วยน้ำ 78-86%, น้ำตาลซูโครส 10-20%, น้ำตาลรีดิวซ์ 1-2 %, เถ้า 0.3-0.5%, และสารประกอบไนโตรเจน 0.5-1% โดยมีพีเอชอยู่ในช่วง 5.0 (Pimpakan *et al.*, 2012) ดังนั้นน้ำอ้อยจึงเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีความน่าสนใจในการเป็นสับสเตรทสำหรับการหมักเอทานอล ซึ่งในน้ำอ้อยนอกจากจะมีน้ำตาลรีดิวซ์ที่สามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลแล้ว น้ำตาลซูโครสหลังการย่อยยังได้เป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ 2 ชนิด คือ ฟรุกโตส และกลูโคส ซึ่งเชื้อยีสต์สามารถสามารถใช้กลูโคสเพื่อเป็นสับสเตรทในการให้เอทานอลได้เช่นเดียวกัน งานทดลองในการใช้ยีสต์เพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำอ้อยเป็นสับสเตรทเริ่มเป็นที่น่าสนใจสำหรับนักวิจัยที่อยู่ในประเทศเกษตรกรรมที่มีการปลูกอ้อยแพร่หลายเนื่องจากเป็นการเพิ่มมูลค่าน้ำอ้อยซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากโรงงานน้ำตาล

จากรายงานการวิจัย Anderson *et al*., (1986) ทำการคัดแยกยีสต์หลายสายพันธุ์จากโรงงานผลิตน้ำตาล สามารถจัดจำแนกเป็น *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* โดยทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลกลูโคส และน้ำอ้อยที่อุณหภูมิสูงถึง 47 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส จะให้เอทานอลสูงกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก / ปริมาตร) หลังจากเวลา 12-14 ชั่วโมง ผลของอัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีค่าสูง (> 80 เปอร์เซ็นต์) และสำหรับงานวิจัยในประเทศไทยมีการวิจัยของ สาวิตรี ลิ่มทอง และคณะ (2552) ได้ทำการศึกษาความสามารถของเชื้อยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ *K. marxianus* โดยสภาวะการหมักที่เหมาะสมจะอยู่ที่อุณหภูมิประมาณ 35 องศาเซลเซียส ในระยะแรกจะช่วยเร่งการเพิ่มจำนวนเซลล์ และส่งเสริมให้การหมักเอทานอลให้รวดเร็วยิ่งขึ้นพีเอชเริ่มต้น 5.0 ได้เอทานอลสูงสุดถึง 7.84 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักจะทำให้ยีสต์สามารถเจริญแข่งขันกับแบคทีเรียปนเปื้อนได้ และยังส่งผลดีต่อปริมาณเอทานอลสุดท้ายให้สูงขึ้นเล็กน้อยนอกจากนี้ยังมีงานวิจัย สมศรี ลีปิพัฒนวิทย์ (2532) ทำการหมักเอทานอลจากยีสต์ *Sacchaaromyces cervisiae* สายพันธุ์ Sc 90 และSYA_2 โดยใช้น้ำอ้อยที่มีความหวาน 20.4 องศาบริกซ์ อัตราการให้อากาศ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 9 ชั่งโมง และลดความเร็วเป็น 100 รอบต่อนาที จะให้ผลได้เอทานอลเท่ากับ 9.4 และ 8.03 % ตามลำดับ ส่วนน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ยีสต์สายพันธุ์ Sc 90 กับ SYA2 ให้เอทานอล เท่ากับ 7.25% และ 6.2% ตามลำดับในชั่วโมงที่ 72 เป็นที่น่าสังเกตว่าในชั่วโมงที่ 48 ปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 36 อีกเล็กน้อย ผลจากสารอาหารลดน้อยลง และ เอทานอลที่เกิดขึ้นจะเป็นตัวยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ยีสต์ด้วย

4.4 การแปรผันอุณหภูมิ และระยะเวลาที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลในน้ำอ้อย

เชื้อยีสต์จำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลตที่ทำการคัดเลือกจากข้อ 4.2 และ 4.4 ทำการหมักเอทานอลในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นสับสเตรท โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่ม เท่ากับ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.5, 4.6 และ 4.7

ตารางที่ 4.5 พารามิเตอร์จากหมักเอทานอลในน้ำอ้อย บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

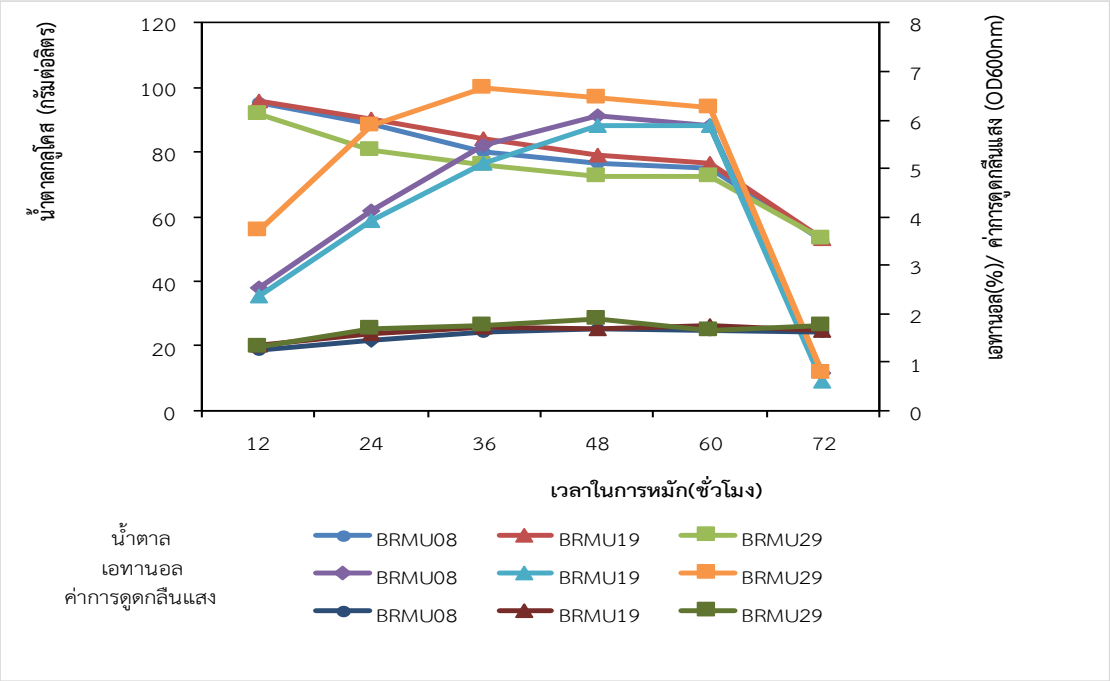
สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณเอทานอล (%)	Yp/s	Yield (%)	น้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ค่าดูดกลืนแสง (OD_{600nm})
BRMU 08-12	1.43	0.013	2.55	95.53	1.232
BRMU 08-24	2.33	0.021	4.12	88.62	1.452
BRMU 08-36	3.10	0.028	5.49	79.90	1.606
BRMU 08-48	3.36	0.031	6.09	76.78	1.679
BRMU 08-60	3.29	0.030	5.88	74.98	1.661
BRMU 08-72	0.44	0.004	0.78	52.64	1.633
BRMU 19-12	1.33	0.012	2.35	96.12	1.360
BRMU 19-24	2.18	0.020	3.92	90.49	1.587
BRMU 19-36	2.85	0.026	5.10	84.24	1.726
BRMU 19-48	3.23	0.030	5.88	79.06	1.700
BRMU 19-60	3.23	0.030	5.88	76.61	1.765
BRMU 19-72	0.38	0.003	0.59	53.43	1.638
BRMU 29-12	2.13	0.019	3.72	91.62	1.320
BRMU 29-24	3.32	0.030	5.88	80.80	1.680
BRMU 29-36	3.76	0.034	6.67	76.31	1.769
BRMU 29-48	3.67	0.033	6.47	72.68	1.896
BRMU 29-60	3.57	0.032	6.27	72.68	1.667
BRMU 29-72	0.48	0.004	0.78	53.01	1.765

ตารางที่ 4.6 พารามิเตอร์จากหมักเอทานอลในน้ำอ้อย บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

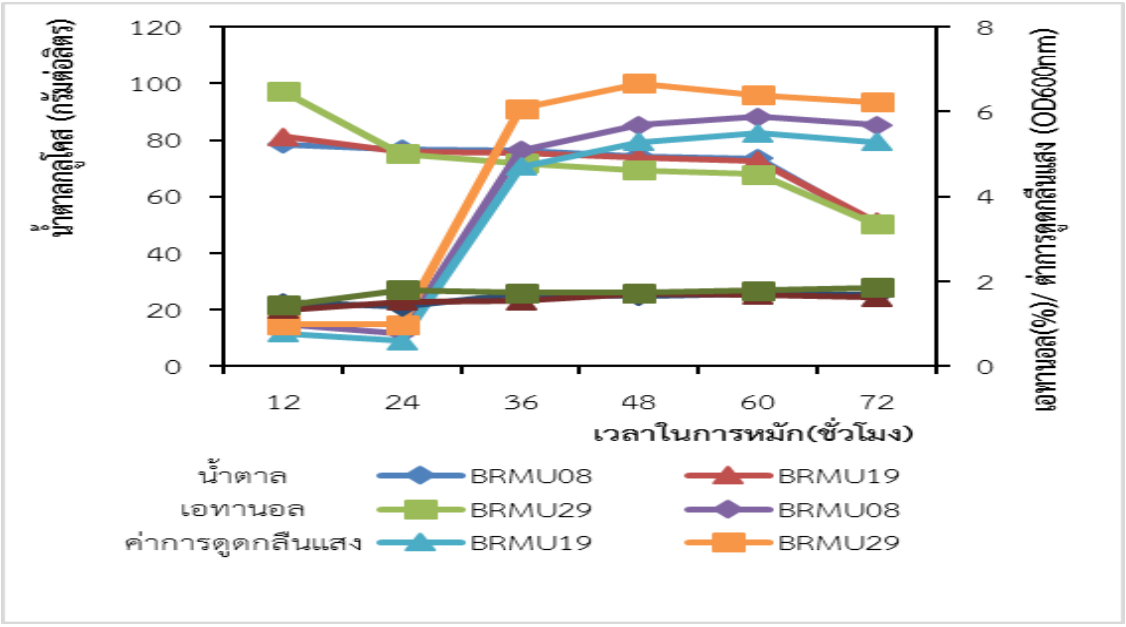
สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณเอทานอล (%)	Yp/s	Yield (%)	น้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ค่าดูดกลืนแสง (OD_{600nm})
BRMU 08-12	0.52	0.005	0.98	73.50	1.507
BRMU 08-24	0.45	0.004	0.78	50.19	1.396
BRMU 08-36	2.87	0.026	5.09	78.39	1.707
BRMU 08-48	3.20	0.029	5.69	76.89	1.655
BRMU 08-60	3.26	0.03	5.88	76.12	1.707
BRMU 08-72	3.22	0.029	5.69	74.38	1.680
BRMU 19-12	0.45	0.004	0.78	72.59	1.332
BRMU 19-24	0.32	0.003	0.59	51.05	1.517
BRMU 19-36	2.65	0.024	4.71	81.16	1.532
BRMU 19-48	3.02	0.027	5.29	75.84	1.705
BRMU 19-60	3.11	0.028	5.49	75.58	1.678
BRMU 19-72	3.03	0.027	5.29	73.92	1.626
BRMU 29-12	0.56	0.005	0.98	97.14	1.446
BRMU 29-24	0.53	0.005	0.98	50.22	1.799
BRMU 29-36	3.46	0.031	6.07	75.06	1.728
BRMU 29-48	3.64	0.034	6.67	71.88	1.730
BRMU 29-60	3.56	0.032	6.40	69.44	1.780
BRMU 29-72	3.46	0.032	6.23	69.93	1.850

ตารางที่ 4.7 พารามิเตอร์จากหมักเอทานอลในน้ำอ้อย บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

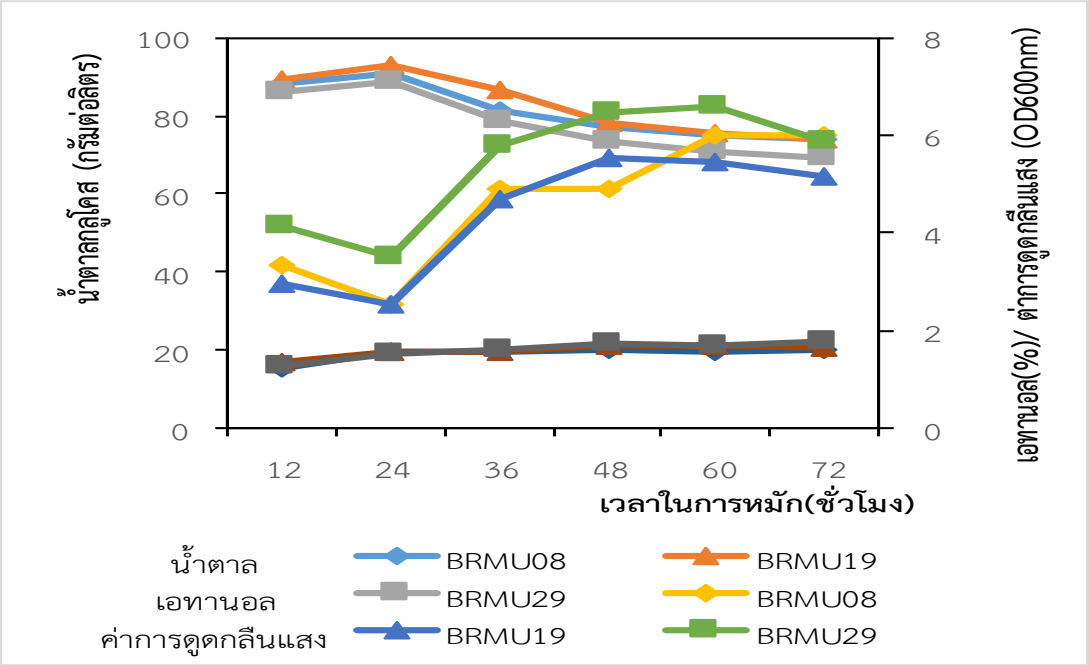
สายพันธุ์ยีสต์	ปริมาณเอทานอล (%)	Yp/s	Yield (%)	น้ำตาลที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)	ค่าดูดกลืนแสง (OD600nm)
BRMU 08-12	1.83	0.017	3.33	88.11	1.233
BRMU 08-24	1.49	0.013	2.54	90.86	1.549
BRMU 08-36	2.77	0.025	4.90	81.34	1.563
BRMU 08-48	2.77	0.025	4.90	77.18	1.638
BRMU 08-60	3.33	0.030	5.99	74.94	1.563
BRMU 08-72	3.28	0.030	5.99	73.81	1.605
BRMU 19-12	1.70	0.015	2.94	89.34	1.45
BRMU 19-24	1.50	0.013	2.54	92.89	1.55
BRMU 19-36	2.61	0.023	4.69	86.60	1.565
BRMU 19-48	3.07	0.028	5.55	78.27	1.607
BRMU 19-60	3.04	0.027	5.46	75.67	1.674
BRMU 19-72	2.87	0.026	5.16	74.04	1.635
BRMU 29-12	2.31	0.021	4.15	85.92	1.46
BRMU 29-24	1.99	0.018	3.51	88.84	1.517
BRMU 29-36	3.23	0.029	5.81	78.78	1.592
BRMU 29-48	3.61	0.033	6.49	73.44	1.712
BRMU 29-60	3.68	0.033	6.61	71.05	1.687
BRMU 29-72	3.29	0.030	5.88	69.48	1.759



ภาพที่ 4.8 ปริมาณน้ำตาล เอทานอล และค่าการดูดกลืนแสงในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นสับสเตรท อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส



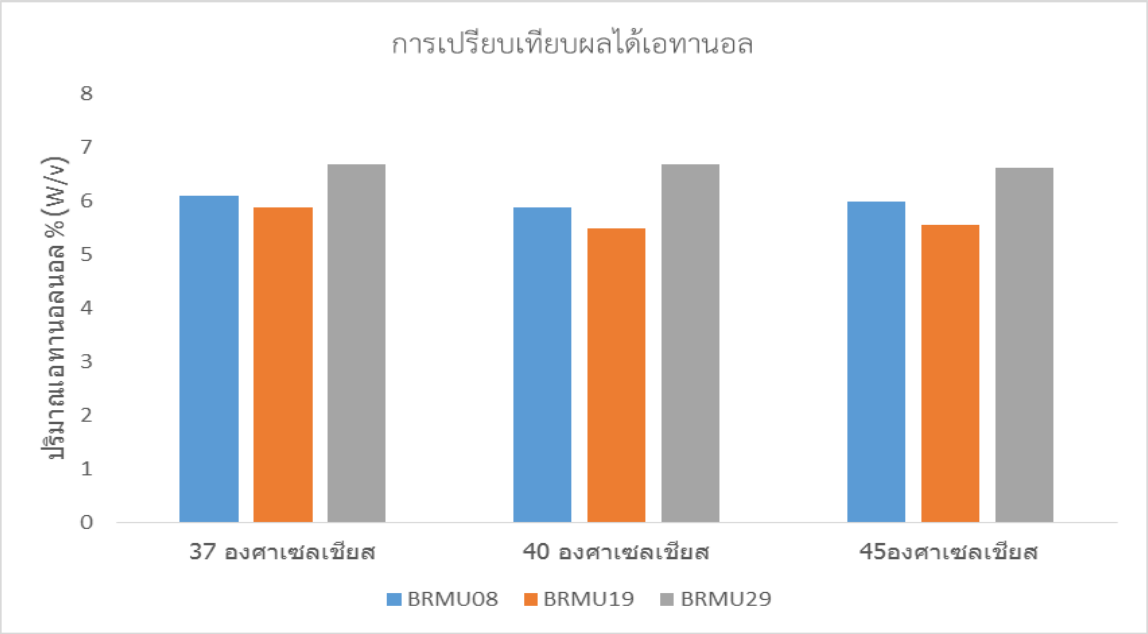
ภาพที่ 4.9 ปริมาณน้ำตาล เอทานอล และค่าการดูดกลืนแสงในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นสับสเตรท อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.10 ปริมาณน้ำตาล เอทานอล และค่าการดูดกลืนแสงในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นสับสเตรท อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

จากภาพที่ 4.8, 4.9 และ 4.10 การผลิตเอทานอลในน้ำอ้อยที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อยีสต์ที่ให้ปริมาณเอทานอลสูงสุด คือรหัส BRMU29 โดยให้เอทานอลสูงสุด เท่ากับ 6.67% (เวลา 36 ชั่วโมง) 6.67% (เวลา 48 ชั่วโมง) และ 6.61% (เวลา 60 ชั่วโมง) ตามลำดับ รองลงมา คือ รหัส BRMU08 โดยให้ปริมาณเอทานอล เท่ากับ 6.09% (เวลา 48 ชั่วโมง) 5.88% (เวลา 60 ชั่วโมง) และ 5.99% (เวลา 60 ชั่วโมง) และเชื้อยีสต์ที่ให้ปริมาณเอทานอลต่ำสุด คือรหัส BRMU19 โดยมีผลได้เอทานอล เท่ากับ 5.88% (ที่เวลา 48 ชั่วโมง) 5.49% (ที่เวลา 60 ชั่วโมง) และ 5.55% (ที่เวลา 48 ชั่วโมง) ตามลำดับ โดยเอทานอลเป็นสารเมแทบอไลท์ประเภทปฐมภูมิ (Primary metabolite) สามารถผลิตได้พร้อมกับการเจริญของเซลล์ยีสต์ เมื่อพิจารณาผลของความสามารถในการใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารสังเคราะห์สอดคล้องกับผลการผลิตเอทานอล พบว่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยีสต์สามารถใช้น้ำตาลได้ดีที่สุด เพราะเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ยีสต์ เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเท่ากับ 40 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส จะเห็นได้ว่าความสามารถในการใช้น้ำตาลของยีสต์จะต่ำกว่าอุณหภูมิที่ 37 เนื่องจากอุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะส่งผลต่อกิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าสู่เซลล์ยีสต์ลดลง จึงทำให้การใช้น้ำตาลของยีสต์ลดลง และสามารถผลิตเอทานอลได้น้อยลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้น เมื่อพิจารณาอัตราการเจริญของเซลล์จากงานวิจัยนี้พบว่า ระยะ

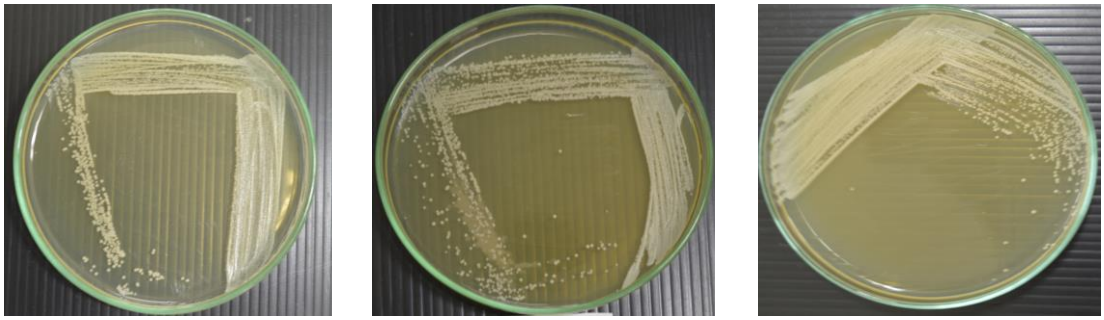
ล็อกกาลิทึมของอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะใช้เวลาสั้นกว่าอุณหภูมิอื่นๆ โดยยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลต มีเวลาของระยะการเจริญในช่วง 12-24 ชั่วโมง และพบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 40 และ 45 องศาเซลเซียส จะทำให้มีระยะพักตัว (log phase) และใช้เวลานานขึ้นในการเข้าสู่ระยะล็อกกาลิทึม ซึ่งอยู่ในช่วงเวลา 36-48 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่า การเจริญของยีสต์ที่ลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงมีผลมาจากการแตกหน่อของยีสต์ผิดปกติ ผนังเซลล์เจริญไม่สมบูรณ์ ทำให้การเพิ่มขนาดของเซลล์ผิดปกติ นอกจากนี้อุณหภูมิสูงยังมีผลต่อความสามารถในการเลือกผ่านของสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง กรดไขมันไม่อิ่มตัวในเยื่อหุ้มเซลล์ลดลง ทำลายพันธะไฮโดรเจนทำให้โปรตีน และกรดนิวคลีอิกเสื่อมสภาพ ขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิด เมื่อมีการสังเคราะห์โปรตีนลดลง ส่งผลให้กิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ยีสต์ลดลงด้วยยับยั้งกระบวนการหายใจ และกระบวนการหมัก จึงทำให้ยีสต์สามารถเอทานอลได้น้อยลงในอุณหภูมิที่สูงขึ้น (สาวิตรี, 2540)



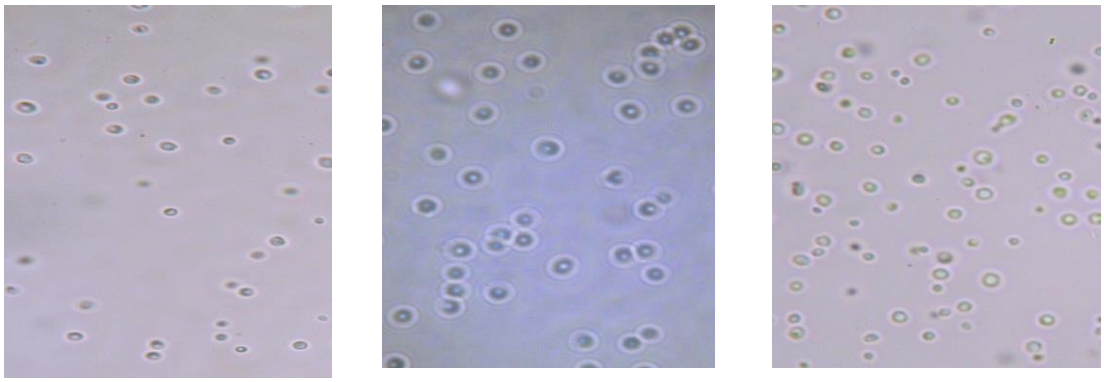
กราฟที่ 4.11 เปรียบเทียบการแปรผันอุณหภูมิและระยะเวลาในการผลิตเอทานอลในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นองค์ประกอบ

จากกราฟที่ 4.11 เปรียบเทียบผลได้เอทานอลทั้งสามอุณหภูมิจะเห็นได้ว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นปริมาณเอทานอลจะลดลง เนื่องจากการสังเคราะห์โปรตีนลดลงส่งผลให้กิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าสู้เซลล์ยีสต์ลดลงด้วยยับยั้งกระบวนการหายใจ และกระบวนการหมัก จึงทำให้ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้น้อยลงดัง (กราฟที่ 4.8-4.10) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลได้

เอทานอลสูงสุด คือรหัส BRMU29, BRMU08 และ BRMU19 เท่ากับ 6.67, 6.09 และ5.88 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ผลได้เอทานอลสูงสุด คือรหัส BRMU29, BRMU08 และ BRMU19 เท่ากับ 6.67, 5.88 และ5.49 ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผลได้เอทานอลสูงสุด คือรหัส BRMU29, BRMU08 และ BRMU19 เท่ากับ 6.61, 5.99 และ5.55 จะเห็นได้ว่า อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด



ก. BRMU08 ข. BRMU19 ค. BRMU29



ง. BRMU08 จ. BRMU19 ฉ. BRMU29

ภาพที่ 4.12 สัณฐานวิทยาของเชื้อรหัส BRMU08, BRMU19 และ BRMU29 (ก-ค) โคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง YM Agar (ง-ฉ) รูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากงานวิจัยนี้สามารถคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลโดยทำการหมักในอาหารสังเคราะห์จำนวน 15 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ รหัส BRMU 29 รองลงมา คือ BRMU 08 และ BRMU 19 ตามลำดับ

การคัดเลือกเชื้อยีสต์ที่มีความสามารถในการหมักเอทานอลในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอนจำนวน 15 ไอโซเลต ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ รหัส BRMU 29 รองลงมา คือ BRMU 08 และ BRMU 19 ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อยีสต์ทั้งหมด 15 ไอโซเลตในอาหารสังเคราะห์

จากการทดลองทำให้ทราบว่าเชื้อจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ BRMU 29, BRMU 19 และ BRMU 08 ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงสุด จาก 15 ไอโซเลต เมื่อทำการหมักในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน และแปรผันอุณหภูมิที่เท่ากับ 37,40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้สูงสุดทั้ง 3 อุณหภูมิ คือ รหัส BRMU 29

ปัญหาและอุปสรรค

1. ในการหมักเอทาเอทานอลในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน พบปัญหาน้ำอ้อยขาดแคลน เนื่องจากช่วงระยะเวลาที่ทำการทดลองอยู่นอกฤดูการหีบอ้อย

2. เครื่องมือบางประเภทมีไม่ครบ ทำให้ต้องไปใช้ศูนย์เครื่องมือกลางมหาวิทยาลัยมหาสารคาม ส่งผลให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย

ข้อเสนอแนะ

1.ในการทำวิจัยครั้งถัดไป ควรมีการศึกษาถึงความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล และมีการตรวจวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลซูโครสในน้ำอ้อย

2.อาจมีการใช้วัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรเป็นสับสเตรทเพื่อผลิตเอทานอล

บรรณานุกรม

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงานกระทรวงพลังงาน.มปป. **คู่มือการพัฒนาและการลงทุนผลิตพลังงานทดแทนชุดที่ 7 เชื้อเพลิงเอทานอล**. หน้า 3.

คณะกรรมาธิการการพลังงานสภาผู้แทนราษฎร. 2545. **พลังงานทดแทนเอทานอลและไบโอดีเซล**.แปลนพริ้นท์ติ้ง : กรุงเทพฯ.

ชุติมา ศรีงิ้ว.2548.**การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตสาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 202 หน้า.

ธีระพงษ สิงหาปด และคณะ. 2549.**การผลิตแอลกอฮอลโดยการหมักจากน้ำออย**. ปริญญานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 72 หน้า.

ธีรภัทร ศรีนรคุตร. 2544 . **เชื้อเพลิงเอทานอล** . ทฤษฎีเกี่ยวกับเอทานอล ตอนที่ 1. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี ปีที่ 16 ฉบับที่ 1. 57-64.

วรลักษณ์ คงจินดามุณี**.** 2556. **การผลิตเอทานอลจากแกนข้าวโพด.** วิทยานิพนธ์ ปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต มหาวิยาลัยสงขลานครินทร์. 158 หน้า.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2540 . **ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี**. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 304 หน้า.

สาวิตรี ลิ่มทอง. 2549 . **ยีสต์ : ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลผลิตทางการเกษตร และอุตสาหกรรมการเกษตร. (2549) . กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สมศรี ลีปิพัฒนวิทย์. 2532. **การหมักเอทานอลจากน้ำอ้อยด้วยยีสต์**. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์;กระทรวงเกษตรศาสตร์; กระทรวงวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการพลังงาน, กรุงเทพมหานคร.521 หน้า.

สำนักงานคณะกรรมการอ้อยและน้ำตาลทราย 2557. **รายงานพื้นที่ปลูกอ้อยปีการผลิต 2556/57**. หน้า 10.

อภิชญา จันทร์มั่น, สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และกิติพงษ์ รัตนาภรณ์.**การหมักเอทานอลด้วยยีสต์ Saccharomyces cerevisiae Sc90 และ การหมักด้วยจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ร่วมกัน ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว YPD ที่มีกลูโคสและไซโลส .** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร; มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

Anderson, P. J., Mcneil, K. and Watson, K. 1986 . High-efficiency carbohydrate fermentationof ethanol at temperature above 40°C by *Kluveromyces marxianus* var *marxianus*. Isolated from sugar mills. **Applie Environmental Microbiology**. 51 : 1314-1320.

Dhaliwal, S.S., Oberoi, H.S., Sandhu, S.K. and Nanda, D. 2011. Enhanced ethanol production from sugarcane juice by galactose adaptation of newly isolated thermotolerant strain of *Pichia kudriavzevii*. **Bioresource Technology**.

Gupta, N., Dubey, A., and Tewari, L. 2009 a. High efficiency alcohol tolerant *saccharomyces* isolates of phoenix dactylifera for bioconversion of sugarcane juice into bioethanol. **Journal of Scientific & Industrial Research.** 68 : 401-405.

Hacking, A.J., Taylor, I.W.F. and Hanas, C.M. (1984). Selection of yeast able to produce ethanol from glucose at 40 °C . **Applied Microbiology and Biotechnology**. 19: 361.

Hossain, Z. Golam, F. Jaya NS, Mohmmad, SA., Rosli, H., Amru, NB. (2014). **Bio ethanol Production from Fermentable Sugar Juice .**Scientific j. World . 1: 1-11

Limtong, S., Sringiew, C., Yongmanitchai, W. 2007 . Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*. **Bioresource Technology**. 68 : 3367–3374.

Pimpaka, P., Yongmanitchai, W. and Limtong, S. 2012. Bioethanol Production from Sugar Cane Syrup by Thermo-tolerant Yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3- 1042, using Fed-batch and Repeated-batch Fermentation in a Nonsterile System**. Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 46 : 582– 591.

Samsuri, m., Gozon, M., prasetga, B. and Nasiuin, M. 2009. Enzymatic Hydrolysis of Lignocellulosic Bagassc for Bioethanol production.**Journol of Biotechnology Reseaech in Tropical Region**. 2(2):1-5.

Serrat, M., Rodríguez, O., Camacho, M., Juan, A., Vallejo, M. and Tomás, G. V. 2011. Influence of nutritional and environmental factors on ethanol and

endopolygalacturonase co-production by *Kluyveromyces marxianus* CCEBI 2011. **International microbiology**.14:41-49 .

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงานกระทรวงพลังงาน. 2010. (สืบค้นเมื่อ 11 สิงหาคม 2558). **Water Pacific Company Limited : รู้จักเอทานอล.** http://water-pacific.com /index.php/2010-08-14-10-07-37

การหายใจระดับเซลล์. (สืบค้นเมื่อ17 สิงหาคม 2558) . https://th.wikipedia.org/wiki/การหายใจ ระดับเซลล์.

การผลิตเอทานอลจากอ้อย. 2013. (สืบค้นเมื่อ 24 มิถุนายน 2558) http://www.espower.co.th/knowledge_detail.php?info= 7&from=แหล่งเรียนรู้

ความสำคัญของเอทานอล. 2556.(สืบค้นเมื่อ 24 มิถุนายน 2558) https://app.enit.kku.ac.th/mis/ administrator/doc_upload/ 20121018110604. pdf สมาคมการค้าผู้ผลิตเอทานอลไทย.

Glycosidic bond / พันธะไกลโคไซด์. (สืบค้นเมื่อ 3 ก.ย. 2558) . http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1630/glycosidic bond.

Production of bioethanol using sugar crops.(12 September 2015). http: //www .thaiethanol.com/th/2013-04- 06-13-53-49/importance-ethanol.htm Bioenergy – Renewable energy.

Yeast physiology in ethanol production. 2009. (12 September 2015). http://www.responsiblebusing+sugar+crops?sortBy=createddate.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

ก-1. อาหารสูตร Yeast extract -Malt extract (YM) broth

Yeast extract	3 กรัม
Malt extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Glucose	10 กรัม
Agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ก-2. อาหารสูตร Yeast extract-Malt extract (YM) Agar

Yeast extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
Glucose	10 กรัม
Agar	20 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ก-3. อาหารสูตร Fermentation medium

Glucose	18 เปอร์เซ็นต์
$(NH_4)_2\ SO_4$	0.1 เปอร์เซ็นต์
Yeast extract	1.8 เปอร์เซ็นต์
kH_2PO_4	0.1 เปอร์เซ็นต์
$MgSO_4.7H_2O$	0.1 เปอร์เซ็นต์
pH	5.0

ภาคผนวก ข

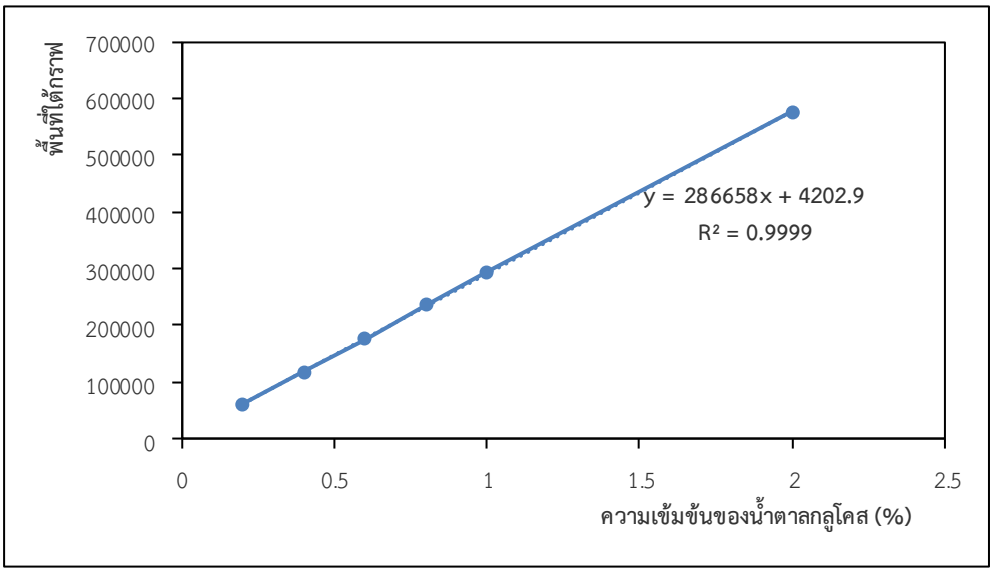
กราฟมาตรฐาน

ภาคผนวก ข

กราฟมาตรฐาน

ข-1 กราฟมาตรฐานกลูโคส

1. เตรียม glucose stock solution โดยละลายกลูโคส 1 g น้ำกลั่น ในปริมาตร 50 ml
2. เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีความเข้มข้น 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 และ2.0 %(w/v)
3. วิเคราะห์สารละลายมาตรฐานน้ำตาลกลูโคสที่เตรียมจากข้อ 1-2 ด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromtography (HPLC)
4. สร้างกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคสโดยหาความสัมพันธ์ในเชิงเส้น ระหว่างความเข้มข้นกลูโคสที่ 0.2,0.4,0.6,0.8,1.0 และ2.0 %(w/v) กับพื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งแสดงดังกราฟที่ ข-1

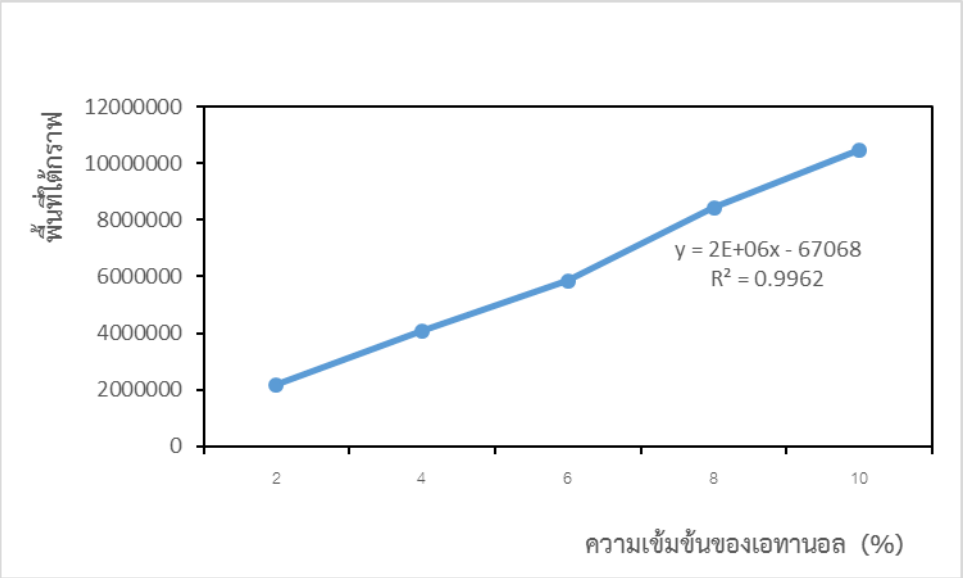


กราฟที่ ข-1. สมการเชิงเส้นของน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

ข-2 กราฟมาตรฐานเอทานอล

การเตรียมกราฟมาตรฐานสำหรับสารละลายเอทานอล โดยเตรียมจากเอทานอลบริสุทธ์ 100 โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย

1. เตรียมความเข้มข้นเริ่มต้นของสารมาตรฐานเอทานอล (Stock solution) ความเข้มข้น 10 % โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย
2. เตรียมสารละลายเอทานอลที่ความเข้มข้น 2,4,6,8,10 %(v/v) โดยเตรียมจากความเข้มข้นเริ่มต้น (Stock solution) 10% จากข้อ 1
3. วิเคราะห์องค์ประกอบของสารละลายมาตรฐานเอทานอล โดยเครื่องเครื่อง High Performance Liquid Chromtography (HPLC)
4. สร้างกราฟมาตรฐานของเอทานอลโดยหาความสำพันธ์ในเชิงเส้น ระหว่างค. เข้มข้นเอทานอลที่ 2,4,6,8,10 %(v/v) กับพื้นที่ใต้กราฟ ซึ่งแสดงดังกราฟที่ ข-2



กราฟ ข-2. สมการเชิงเส้นของเอทานอลมาตรฐาน

ภาคผนวก ค
สัณฐานวิทยา

ภาคผนวก ค
สัณฐานวิทยา

ค-1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ค-1.1 ลักษณะขอบ (Margin)

1.1.1 ขอบเรียบ (Entire)
1.1.2 ขอบหยักมาก (Undulate)
1.1.3 ขอบหยักห่าง (Lobate)
1.1.4 ขอบหยักถี่ (Filamentous)
1.1.5 ขอบหยักเป็นฟันที่ไม่สม่ำเสมอ(Erose)
1.1.6 ขอบเป็นเส้นซ้อนๆกัน และหยักไปมารูปร่างไม่แน่นอน (Curled)

ค-1.2 ความนูน (Elevation)

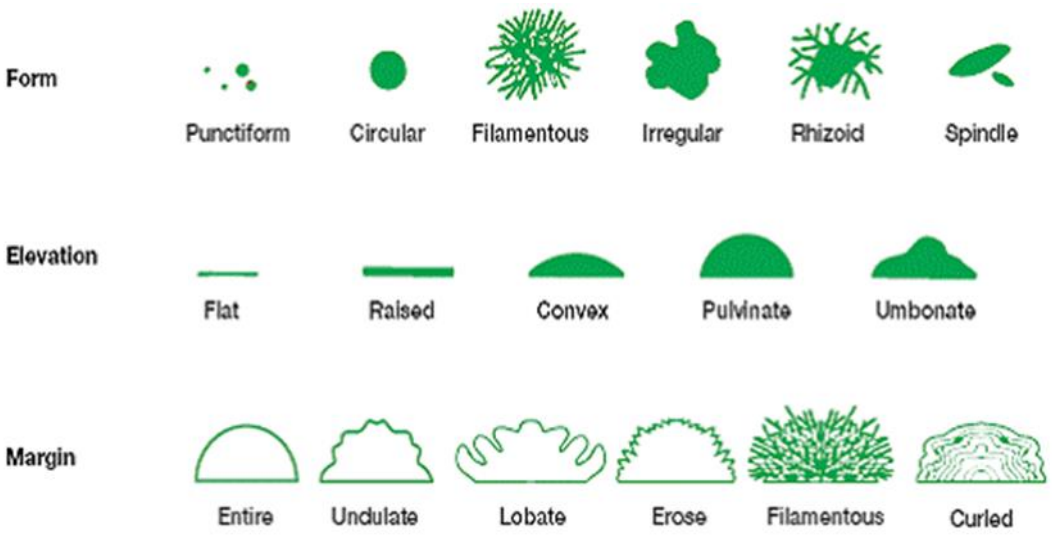
1.2.1 แบนราบ (Flat)
1.2.2 นูนน้อย (Rised)
1.2.3 นูนโค้ง (Convex)
1.2.4 นูนคล้ายหมวก (Umbella)
1.2.5 นูนโค้งมาก (Pulvinate)

ค-1.3 รูปแบบโคโลนี (Form)

1.3.1 กลม (Circular)
1.3.2 หยักห่าง (Irregular)
1.3.3 หยักถี่ (Filamentous)
1.3.4 ขนาดของโคโลนีเล็กมาก แต่ยังสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไม่เกิน 1 มม. (Punctiform)
1.3.5 โคโลนีเจริญเป็นเส้นหยาบกว่าพวก Filamentous และแผ่ขยายคล้ายราก (Rhizoid)
1.3.6 โคโลนีมีรูปร่างทรงกระสวย มีลักษณะหัวแหลมท้ายแหลม

ค-1.4 เนื้อโคโลนี (Surface)

1.4.1 หยาบ (Rough)
1.4.2 มันวาว (Glistering)



ภาพที่ ข-1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อยีสต์

ภาคผนวก ง

วิธีการวัดความหวานในน้ำอ้อย

ภาคผนวก ง

วิธีการวัดความหวานในน้ำอ้อย

ง-1 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในหน่วย °Brix โดยใช้ Hand refractometer

หลักการ

เป็นการวัดปริมาณของแข็งที่ละลายได้สารละลาย ซึ่งในน้ำอ้อยสมมติว่ามีน้ำตาลเป็นส่วนใหญ่

วิธีการทดลอง

1. หยดสารตัวอย่างลงในด้านที่เป็นกระจกใส ของ Hand refractometer แล้วปิดแผ่นปิดทับ

2. มองผ่านช่องอ่านระดับเส้นแบ่งระหว่างแสงสีขาวและสีน้ำเงินค่าที่อ่านได้เป็นค่า °Brix

3. ทำความสะอาดกระจกของ Hand refractometer ทุกครั้งก่อนวิเคราะห์สารตัวอย่างอื่น

ภาคผนวก จ

ข้อมูลดิบ

ภาคผนวก จ
ข้อมูลดิบ

ตารางภาคผนวก จ-1 ข้อมูลดิบปริมาณเอทานอล และการใช้น้ำตาลในอาหารสังเคราะห์ที่มีที่กลูโคสเป็นสับสเตรทของยีสต์ทนอุณหภูมิสูง (น้ำตาลเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร)

ไอโซเลต	เอทานอล (%)			ผลได้ (%)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)			กลูโคสที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)
	1	2	ค่าเฉลี่ย		1	2	ค่าเฉลี่ย	
BRNU06	1.27	1.27	1.27	11.25	95.60	95.52	95.56	17.32
BRNU08	1.29	1.34	1.32	11.69	96.05	95.17	95.61	17.30
BRNU12	1.35	1.25	1.30	11.51	95.12	95.16	95.14	17.77
BRNU19	1.24	1.24	1.24	10.98	95.03	95.48	95.26	17.65
BRNU29	1.34	1.35	1.35	11.96	97.34	93.69	95.52	17.39
BRNU30	1.33	1.23	1.28	11.34	95.73	95.71	95.72	17.19
BRNU34	1.32	1.23	1.28	11.34	95.06	93.73	94.40	18.51
BRNU35	1.06	1.03	1.05	9.30	98.14	99.47	98.81	14.10
BRNU36	1.09	1.10	1.10	9.74	98.28	97.84	98.06	14.31
BRNU41	1.13	1.07	1.10	9.74	98.07	99.73	98.90	14.01
BRNU42	1.07	1.02	1.05	9.30	99.29	98.40	98.85	14.06
BRNU45	1.01	1.06	1.04	9.38	98.05	98.59	98.32	14.59
BRNU49	1.17	1.09	1.13	10	98.63	99.56	99.10	13.81
BRNU55	1.03	1.05	1.04	9.21	98.68	99.10	98.89	14.02
BRNU61	1.02	1.03	1.03	9.12	98.53	99.20	98.87	14.04

ตารางภาคผนวก จ-2 ข้อมูลดิบปริมาณเอทานอล และการใช้น้ำตาลในอาหารน้ำอ้อยเป็นสับสเตรทของยีสต์ทนอุณหภูมิสูง (น้ำตาลเริ่มต้น 112.91 กรัมต่อลิตร)

ไอโซเลต	เอทานอล (%)			ผลได้ (%)	กลูโคสที่เหลือ (กรัมต่อลิตร)			กลูโคสที่ใช้ (กรัมต่อลิตร)
	1	2	ค่าเฉลี่ย		1	2	ค่าเฉลี่ย	
BRNU06	1.19	1.11	1.15	6.38	125.87	132.58	129.23	50.77
BRNU08	1.30	1.17	1.24	6.89	128.13	127.68	127.90	52.29
BRNU12	1.16	1.05	1.11	6.17	136.92	137.83	137.40	42.60
BRNU19	1.28	1.25	1.27	7.05	129.37	126.83	128.10	51.90
BRNU29	1.33	1.28	1.31	7.28	128.2	125.78	127	53
BRNU30	0.63	0.71	0.67	3.72	165.86	163.17	164.52	15.48
BRNU34	0.88	1.02	0.95	5.28	132.37	157.59	144.97	35.03
BRNU35	0.26	0.30	0.28	1.56	143.03	144.39	143.71	36.29
BRNU36	0.72	0.70	0.71	3.94	165.39	167.22	166.31	13.69
BRNU41	0.44	0.60	0.52	2.89	142.19	157.84	150.02	29.80
BRNU42	0.90	0.77	0.84	4.67	157.49	159.83	158.66	21.34
BRNU45	0.35	0.37	0.36	2	140.8	142.75	141.77	38.23
BRNU49	0.60	0.60	0.60	3.33	166.03	167.93	166.98	13.02
BRNU55	0.47	0.43	0.45	2.50	164.99	171.38	168.19	11.81
BRNU61	0.45	0.55	0.50	2.78	167.95	168.87	168.31	11.69

ตารางภาคผนวก จ-3 ข้อมูลดิบปริมาณเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยโดยหมัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ปริมาณน้ำตาล เริ่มต้น109 กรัมต่อลิตร)

Sample	Peak area (11นาที)	น้ำตาลที่เหลือ (g/l)	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (g/l)	ค่า OD_{600nm}	Peak area (26 นาที)	Ethanol (%)
BRMU 08-12	15095140	52.64	56.36	1.235	374218	0.44
	14912279	52.64		1.230	360361	0.43
	average	52.64		1.232	average	1.43
BRMU 08-24	27376174	95.49	13.47	1.486	1375991	1.44
	27399824	95.57		1.418	1342547	1.41
	average	95.53		1.452	average	2.33
BRMU 08-36	25373967	88.50	20.38	1.548	2318517	2.39
	25438675	88.73		1.664	2199800	2.27
	average	88.62		1.606	average	3.10
BRMU 08-48	22914345	79.92	29.10	1.743	3087177	3.15
	22898274	79.87		1.653	2975133	3.04
	average	79.90		1.679	average	3.36
BRMU 08-60	22003304	76.74	32.22	1.718	3230913	3.30
	22021428	76.81		1.604	3344257	3.41
	average	76.78		1.661	average	3.29
BRMU 08-72	21756637	75.88	34.02	1.651	3183800	3.25
	21239524	74.08		1.616	3264856	3.33
	average	74.98		1.633	average	0.44
BRMU 19-12	15348247	53.46	55.75	1.387	307742	0.38
	15311765	53.40		1.334	311829	0.38
	average	53.43		1.360	average	0.38

ตารางภาคผนวก จ-3 (ต่อ)

Sample	Peak area (11นาที)	น้ำตาลที่เหลือที่เหลือ	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (g/l)	ค่า OD_{600nm}	Peak area (26 นาที)	Ethanol (%)
BRMU 19-24	27516596	95.98	12.88	1.640	1284350	1.35
	27598549	96.26		1.534	1224629	1.30
	average	96.12		1.587	average	1.33
BRMU 19-36	25780311	89.92	18.51	1.710	2120197	2.19
	26104855	91.05		1.743	2104000	2.17
	average	90.49		1.726	average	2.18
BRMU 19-48	23948785	83.53	24.76	1.755	2827890	2.90
	24352661	84.94		1.646	2730524	2.80
	average	84.24		1.700	average	2.85
BRMU 19-60	22609496	78.86	29.94	1.700	3179744	3.25
	22723118	79.25		1.831	3140459	3.21
	average	79.06		1.765	average	3.23
BRMU 19-72	21714811	75.74	32.39	1.630	3079351	3.15
	22212225	77.47		1.646	3189708	3.26
	average	76.61		1.638	average	3.23
BRMU 29-12	14809693	51.64	55.99	1.340	424153	0.49
	15590052	54.37		1.300	394383	0.46
	average	53.01		1.320	average	0.48
BRMU 29-24	26354081	91.92	17.38	1.660	1902783	1.97
	26182609	91.32		1.700	2204254	2.28
	average	91.62		1.68	average	2.13
BRMU 29-36	23618662	82.38	28.2	1.759	3077336	3.14
	22711398	79.21		1.780	3421800	3.49
	average	80.80		1.769	average	3.76

ตารางภาคผนวก จ-3 (ต่อ)

Sample	Peak area	น้ำตาลที่เหลือ	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป	ค่า OD_{600nm}	Peak area	Ethanol
	(11นาที)	**ที่เหลือ**			**(26 นาที)**	**(%)**
BRMU 29-48	21897453	76.37	**(g/l)**	1.894	3762124	3.83
	average	76.31		1.896	average	3.32
BRMU 29-60	21619717	75.41	36.32	1.583	3675041	3.74
	20057247	69.95		1.751	3504043	3.57
	average	72.68		1.667	average	3.67
BRMU 29--72	21127729	73.69	36.32	1.723	3488714	3.56
	20545666	71.66		1.807	3507062	3.57
	average	72.68		1.765	average	3.57

ตารางภาคผนวก จ-4 ข้อมูลดิบปริมาณเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยโดยหมัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (ปริมาณน้ำตาล เริ่มต้น109 กรัมต่อลิตร)

Sample	Peak area (11นาที)	น้ำตาลที่เหลือ (g/l)	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (g/l)	ค่า OD_{600nm}	Peak area (26 นาที)	Ethanol (%)
BRMU 08-12	14201767	49.53	35.5	1.493	391430	0.46
	27946017	97.47		1.52	508226	0.58
	average	73.5		1.51	average	0.52
BRMU 08-24	14305907	50.13	58.81	1.161	368144	0.44
	14477413	59.05		1.577	403803	0.47
	average	72.59		1.37	average	0.45
BRMU 08-36	22528518	97.42	30.61	1.7	3068974	3.14
	22443473	96.86		1.715	2538114	2.6
	average	97.14		1.71	average	2.87
BRMU 08-48	21721161	49.89	32.11	1.611	3211984	3.28
	22373276	50.49		1.7	3054290	3.12
	average	50.19		1.65	average	3.2
BRMU 08-60	21497852	51.27	32.88	1.743	3258475	3.32
	22147658	50.83		1.672	3141650	3.21
	average	51.05		1.71	average	3.26
BRMU 08-72	20985231	49.76	34.62	1.776	3195954	3.26
	21664914	50.67		1.585	3112677	3.18
	average	50.22		1.68	average	3.22
BRMU 19-12	14375899	78.58	36.41	1.257	355972	0.42
	27244091	78.28		1.407	426852	0.49
	average	78.39		1.33	average	0.45

ตารางภาคผนวก จ-4 (ต่อ)

Sample	Peak area (11นาที)	น้ำตาลที่เหลือที่เหลือ	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (g/l)	ค่า OD_{600nm}	Peak area (26 นาที)	Ethanol (%)
BRMU 19-24	14701515	85.85	57.95	1.445	288132	0.35
	14574863	76.47		1.59	288224	0.29
	average	81.16		1.52	average	0.32
BRMU 19-36	24613485	76.5	27.84	1.405	2068977	2.14
	21924063	73.63		1.66	3107025	3.17
	average	75.06		1.53	average	2.65
BRMU 19-48	22830402	75.76	33.16	1.73	2735686	2.80
	20657317	78.03		1.68	3182146	3.25
	average	76.89		1.70	average	3.02
BRMU 19-60	22561411	79.63	33.42	1.648	2898621	2.96
	20780490	72.05		1.708	3188518	3.25
	average	75.84		1.68	average	3.11
BRMU 19-72	21959744	73.28	35.08	1.549	2868057	2.94
	20430851	70.48		1.703	3047607	3.11
	average	71.88		1.63	average	3.03
BRMU 29-12	27932015	74.98	11.86	1.493	498402	0.57
	27770259	77.25		1.40	488688	0.56
	average	76.12		1.45	average	0.56
BRMU 29-24	14268872	78.69	58.78	1.925	567858	0.63
	14528291	72.48		1.673	359029	0.43
	average	75.58		1.78	average	0.53
BRMU 29-36	21934857	70.63	33.94	1.755	3301627	3.37
	21111282	68.26		1.702	3489151	3.56
	average	69.44		1.73	average	3.46

ตารางภาคผนวก จ-4 (ต่อ)

Sample	Peak area (11นาที)	น้ำตาลที่เหลือ (g/l)	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (g/l)	ค่า OD_{600nm}	Peak area (26 นาที)	Ethanol (%)
BRMU 29-48	21009366	73.19	37.12	1.03	3516814	3.58
	20208604	75.56		1.755	3697031	3.70
	average	74.38		1.39	average	3.64
BRMU 29-60	20252077	76.59	39.56	1.924	3411010	3.48
	19570307	71.26		1.772	3572787	3.64
	average	73.92		1.85	average	3.56
BRMU 29--72	19847771	69.22	41.07	1.71	3367375	3.43
	19103038	66.63		1.75	3424524	3.49
	average	67.93		1.73	average	3.46

ตารางภาคผนวก จ-5 ข้อมูลดิบปริมาณเอทานอลในอาหารน้ำอ้อยโดยหมัก ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ปริมาณน้ำตาล เริ่มต้น109 กรัมต่อลิตร)

Sample	Peak area (11นาที)	น้ำตาลที่เหลือ (g/l)	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (g/l)	ค่า OD_{600nm}	Peak area (26 นาที)	Ethanol (%)
BRMU 08-12	24723483	86.22	24.8	1.217	2021316	2.09
	25802708	88.11		1.250	1514321	1.58
	average	88.11		1.233	average	1.83
BRMU 08-24	26033571	90.8	22.05	1.571	1444367	1.51
	26025085	90.91		1.527	1413026	1.48
	average	90.86		1.549	average	1.49
BRMU 08-36	23258799	81.12	31.57	1.660	2758381	2.83
	23382714	81.56		1.467	2647395	2.71
	average	81.34		1.563	average	2.77
BRMU 08-48	21869859	76.28	35.73	1.622	3265272	3.4
	22383538	78.07		1.615	3197664	3.26
	average	77.18		1.638	average	2.77
BRMU 08-60	21325736	74.08	37.97	1.569	3235421	3.30
	21735421	75.81		1.557	3294210	3.36
	average	74.94		1.563	average	3.33
BRMU 08-72	20795286	72.53	39.1	1.612	3202493	3.27
	21533278	75.1		1.598	3232395	3.3
	average	73.81		1.605	average	3.28
BRMU 19-12	26392118	92.05	23.57	1.443	1249513	1.32
	24838142	89.34		1.457	2014238	2.08
	average	89.34		1.450	average	1.7
BRMU 19-24	26280914	91.67	20.02	1.559	1153243	1.62
	26977458	94.18		1.526	1313970	1.38
	average	92.89		1.55	average	1.5

ตารางที่ จ-5 (ต่อ)

Sample	Peak area (11นาที)	น้ำตาลที่เหลือ (g/l)	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (g/l)	ค่า OD_{600nm}	Peak area (26 นาที)	Ethanol (%)
BRMU19-36	23467824	81.86	34.13	1.608	275486	2.82
	24469577	85.35		1.523	2343358	2.41
	average	86.6		1.565	average	2.61
BRMU 19-48	22068357	76.97	34.64	1.688	2979153	3.04
	22817812	79.58		1.653	3039864	3.10
	average	78.27		1.607	average	3.07
BRMU 19-60	21541150	75.13	37.24	1.741	2789048	2.86
	21903514	76.4		1.607	3164800	3.23
	average	75.67		1.674	average	3.04
BRMU 19-72	21023992	73.23	38.87	1.653	2498315	2.57
	21460900	74.85		1.617	3102339	3.17
	average	74.04		1.635	average	2.87
BRMU 29-12	24633493	85.92	26.99	1.440	2147413	2.21
	24165159	85.92		1.481	2344365	2.41
	average	85.92		1.460	average	2.31
BRMU 29-24	224354342	84.94	24.51	1.590	2321235	2.39
	26587639	92.74		1.445	1514333	1.59
	average	88.84		1.517	average	1.99
BRMU 29-36	21263381	74.16	34.13	1.66	3632835	3.7
	23911887	83.4		1.525	2698033	2.77
	average	78.78		1.592	average	3.23
BRMU 29-48	20187414	70.4	39.48	1.704	3651247	3.72
	21924486	76.48		1.72	3437823	3.5
	average	73.44		1.712	average	3.61
BRMU 29-60	19636895	68.4	41.86	1.727	3437823	3.85
	20980517	73.81		1.648	3287264	3.51
	average	71.05		1.687	average	3.68

ตารางที่ จ-5 (ต่อ)

Sample	Peak area (11นาที)	น้ำตาลที่เหลือ (g/l)	น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (g/l)	ค่า OD_{600nm}	Peak area (26 นาที)	Ethanol (%)
BRMU 29-72	1936443	67.54	43.43	1.841	3049716	3.12
	20760843	74.4		1.677	3395931	3.46
	average	69.48		1.759	average	3.29

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ	นางสาวจิรานันท์ สำโรงพล
เกิด	วันที่ 27 เดือน กันยายน 2536
ภูมิลำเนา	อำเภอหนองสองห้อง จังหวัดขอนแก่น
การศึกษา	พ.ศ. 2555-ปัจจุบัน กำลังศึกษาในระดับอุดมศึกษา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม พ.ศ.2554 สำเร็จการศึกษาในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจาก โรงเรียนพล อำเภอพล จังหวัดขอนอแก่น พ.ศ.2551 สำเร็จ การศึกษาในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นจาก โรงเรียนพล อำเภอพล จังหวัดขอนแก่น
ชื่อ	นางสาวพรสุดา แก่นนาคำ
เกิด	วันที่ 16 เดือน กันยายน 2536
ภูมิลำเนา	อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม
การศึกษา	พ.ศ. 2555-ปัจจุบัน กำลังศึกษาในระดับอุดมศึกษา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม พ.ศ.2554 สำเร็จการศึกษาในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจาก โรงเรียนหนองสอพิทยาคม อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์ พ.ศ.2551 สำเร็จการศึกษาในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นจาก โรงเรียนหนองสอพิทยาคม อำเภอเมือง จังหวัดกาฬสินธุ์
ชื่อ	นางสาวพัชรีพร บุญลิตร
เกิด	วันที่ 5 เดือน พฤษภาคม 2537
ภูมิลำเนา	อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี
การศึกษา	พ.ศ. 2555-ปัจจุบัน กำลังศึกษาในระดับอุดมศึกษา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม พ.ศ.2554 สำเร็จการศึกษาในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจาก โรงเรียนพิบูลมังสารหาร อำเภอพิบูลมังสาหาร จังหวัดอุบลราชธานี พ.ศ.2551 สำเร็จการศึกษาในระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นจาก โรงเรียนชุมชนบ้านหวังสะแบง อำเภอโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี