การผลิตเอทานอลจากปลายข้าว โดย *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ในการหมักแบบกึ่งกะ

นายเกษมชัย ทิวากรศศิธร

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5072221623

ETHANOL PRODUCTION FROM BROKEN RICE-GRAINS BY *Zymomonas mobilis* TISTR 405 IN FED-BATCH FERMENTATION

Mr. Kaseamchai Thiwakornsasithorn

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตเอทานอลจากปลายข้าว โดย *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ในการหมักแบบกึ่งกะ
โดย	นายเกษมชัย ทิวากรศศิธร
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. สมชาย ดารารัตน์)

เกษมชัย ทิวากรศศิธร : การผลิตเอทานอลจากปลายข้าว โดย *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ในการหมักแบบกึ่งกะ (ETHANOL PRODUCTION FROM BROKEN RICE-GRAINS BY *Zymomonas mobilis* TISTR 405 IN FED-BATCH FERMENTATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์, 97 หน้า.

งานวิจัยนี้ ศึกษาการผลิตเอทานอลในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ โดยใช้น้ำต้อยที่ได้จากการย่อยปลายข้าวเป็นแหล่งคาร์บอน จุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการหมักเป็นเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Zymomonas mobilis* TISTR 405 การทดลองเริ่มจากการคัดเลือกลูกแป้งข้าวหมากที่รวบรวบจากแหล่งต่างๆ มาศึกษาความสามารถในการเปลี่ยนปลายข้าวที่นึ่งจนสุก ให้กลายเป็นน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงที่สุด โดยลูกแป้งที่มีความสามารถสูงสุดในการย่อยปลายข้าวให้เป็นน้ำต้อย คือ ลูกแป้งรหัสอุบลราชธานี 2 โดยสามารถผลิตน้ำต้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมด 400-420 กรัมต่อลิตร จากนั้นหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล โดยเชื้อ *Z. mobilis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรอุดม ใช้น้ำตาลกลูโคส 20 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน จากการทดลองด้วยวิธีแฟคตอเรียล และนำมาวิเคราะห์ผลโดยวิธี response surface methodology (RSM) พบว่า ภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้นที่ 150 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่ 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการผลิต 48 ชั่วโมง การทดลองกระบวนการหมักแบบกะในขวดทดลองขนาด 500 มิลลิลิตร ด้วยน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร พบว่า ได้ปริมาณเอทานอล และอัตราการผลิตเอทานอล เท่ากับ 49.72 กรัมต่อลิตร และ 1.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อขยายขนาดการผลิตเอทานอลเป็นถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยมีปริมาตรทำการ 1.0 ลิตร ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมที่กล่าวมาแล้ว ได้ปริมาณเอทานอล และอัตราการผลิตเอทานอล เท่ากับ 59.73 กรัมต่อลิตร และ 2.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ โดยให้ความเข้มข้นเริ่มต้นของน้ำตาลเป็น 150 กรัมต่อลิตร เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 ปริมาณน้ำตาลถูกใช้จนใกล้หมดจึงทำการเติมน้ำต้อยลงไปเพื่อให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมีค่าเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตรอีกครั้งหลังจากการเอาอาหารออกและเติมอาหารใหม่ดังที่กล่าวมาแล้ว การหมักเป็นไปคล้ายเดิมแต่ช้าลงเล็กน้อย อัตราการใช้น้ำตาลเหลือ 4.83 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและอัตราการผลิตเอทานอล เท่ากับ 2.41 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

ภาควิชา.....จุลชีววิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม..ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา..2553.....

5072221623: MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: ETHANOL / *Zymomonas mobilis*

KASEAMCHAI THIWAKORNSASITHORN: ETHANOL PRODUCTION FROM BROKEN RICE-GRAINS BY *Zymomonas mobilis* TISTR 405 IN FED-BATCH FERMENTATION. THESIS ADVISOR: ASST.PROF. CHARNWIT KOSITANONT, Ph.D., 97 pp.

The ethanol production in batch and fed-batch fermentations by *Zymomonas mobilis* TISTR 405 using broken rice grains as a C-source for fermentation were investigated in this research. The experiments firstly selected the best loog-pang for digest the broken rice grains and produce the highest total sugar. Look pang code Ubonratchathani 2 give a highest sugar concentration 400-420 gL^{-1}, was used in investigation for optimal ethanol production by *Z. moblis* with 20% glucose in the rich culture medium. From factorial design experiments, and analysis by response surface methodology (RSM), the optimal conditions for ethanol production were 150 gL^{-1} glucose initial pH of 5.5, 30 ^{0}C and 48 h incubation. In 500 ml Erlenmeyer flask under the optimal conditions ethanol yield and productivity of 49.72 gL-1 and 1.03 $gL^{-1}h^{-1}$ were obtained. Scaling up to a 2 L bioreactor with the working volume of 1.0 L, the ethanol yield and productivity 59.73 gL^{-1} and 2.13 $gL^{-1}h^{-1}$,respectively. In fed-batch production, Initial sugar concentration of 150 gL^{-1}. After the 24th h , sugar was almost depleted. Five hundred ml of the medium was taken out then one litre of the newly hydrolyzed broken rice grain was added to keep total sugar concentration close to 150 gL^{-1}. The fermentation was a little bit slower than the previous experiments. The total sugar consumption rate and ethanol production rate were 4.83 $gL^{-1}h^{-1}$ and 2.41 $gL^{-1}h^{-1}$ respectively.

Department : .....Microbiology…….....Student's Signature.....

Field of Study : .....Industrial Microbiology.....Advisor's Signature.....

Academic Year : ..2010…….....

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชาญวิทย์ โฆษิตานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ และข้อคิดต่างๆ ในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ตลอดจนได้กรุณาปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์มากขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธาน ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุชาดา จันทร์ประทีป และดร. สมชาย ดารารัตน์ ที่กรุณารับเป็นคณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ ตลอดจนปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณกองทุนส่งเสริมและพัฒนาพลังงานทดแทน สำนักนโยบายและแผนพลังงาน กระทรวงพลังงาน ที่มอบทุนสนับสนุนในการศึกษาวิจัยนี้

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาอำนวยความสะดวกและเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยนี้

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ห้องวิจัย 453 ที่คอยให้คำปรึกษา ให้กำลังใจและความช่วยเหลือตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่สาว ที่ได้ช่วยเหลือสนับสนุนและให้กำลังใจในการทำงานวิจัยตลอดมาจนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฎ

สารบัญภาพ..... ฏ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฑ

บทที่

1. บทนำ..... 1

1.1 ประวัติความเป็นมา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

1.3 ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย..... 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 3

2. ปริทัศน์วรรณกรรม..... 4

2.1 เอทานอล (ethanol)..... 4

2.2 ปลายข้าว..... 11

2.3 ลูกแป้ง..... 12

2.4 *Zymomonas mobilis*..... 17

2.5 ประเภทของการหมัก..... 22

2.6 Factorial design..... 26

2.7 การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Design)..... 27

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล..... 28

2.9 การวิเคราะห์เอทานอล โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี

(Gas Chromatography; GC)..... 30

บทที่	หน้า
3. อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย.....	33
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	33
3.2 เคมีภัณฑ์.....	35
3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	36
3.3.1 การเลี้ยงและการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	36
3.3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	36
3.3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย.....	36
3.3.2 การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง.....	37
3.3.3 การเตรียมปลายข้าวเหนียวนึ่งและการหมักปลายข้าวเหนียวนึ่งกับลูกแป้ง.....	37
3.3.4 การเตรียมตัวอย่างน้ำต้อยสำหรับนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาล.....	37
3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Dinitrosalicylic acid.....	37
3.3.6 ศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยวิธี 2^n factorial design analysis.....	38
3.3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ.....	38
3.3.6.2 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล.....	38
3.3.6.3 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล.....	38
3.3.6.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล.....	39
3.3.6.5 ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล.....	39
3.3.6.6 การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	39
3.3.7 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตเอทานอลในระดับขวดทดลอง.....	39
3.3.8 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ.....	40
3.3.9 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Z. mobilis*.....	40
3.3.10 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller.....	40

บทที่ หน้า

3.3.11 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric acid..... 40
3.3.12 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล..... 41
3.3.12.1 การเตรียมสารเคมี..... 41
3.3.12.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน..... 41
3.3.12.3 วิธีการวิเคราะห์..... 41

4. ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง..... 42
4.1 การคัดเลือกตัวอย่างลูกแป้งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำต้อย..... 42
4.1.1 เก็บตัวอย่างลูกแป้งเพื่อคัดเลือกลูกแป้งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำต้อย..... 42
4.1.2 การคัดเลือกลูกแป้งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำต้อย..... 44
4.2 หาภาวะที่ดีที่สุดในการหมักปลายข้าวให้เป็นน้ำตาลโดยลูกแป้งรหัสอุบลราชธานี 2..... 46
4.2.1 ปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการนึ่งปลายข้าวเหนียว..... 46
4.2.2 ผลของวิธีการนึ่งต่อการย่อยแป้ง..... 47
4.2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตน้ำต้อย..... 48
4.2.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักปลายข้าว..... 48
4.3 ศึกษาผลของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลในระดับขวดทดลองโดยวิธี 2^n factorial design analysis..... 50
4.4 การผลิตเอทานอลในระดับขวดทดลองจากน้ำต้อยความเข้มข้น 150 300 และ 400 กรัมต่อลิตร..... 67
4.5 การผลิตเอทานอลจากน้ำต้อยที่ได้จากการย่อยปลายข้าวด้วยลูกแป้งข้าวหมากโดยใช้ *Z. mobilis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร..... 70
4.6 การผลิตเอทานอลจากปลายข้าวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ด้วยการหมักแบบกึ่งกะ..... 72

บทที่ หน้า

5. สรุปผลการทดลอง..... 75

รายการอ้างอิง..... 79

ภาคผนวก..... 85

ภาคผนวก ก สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ..... 85

ภาคผนวก ข สารเคมีและวิธีเตรียมที่ใช้ในการทดลอง..... 87

ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐาน..... 89

ภาคผนวก ง ตาราง 2^4 Factorial experimental designs..... 94

ภาคผนวก จ แสดงค่า R^2 และค่าสัมประสิทธิ์ของ RSM..... 95

ภาคผนวก ฉ แผนผังงานวิจัย..... 96

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 97

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ลูกแป้งชนิดต่างๆ และจุลินทรีย์ในลูกแป้งของแต่ละประเทศ.....	13
2.2	ส่วนประกอบภายในเซลล์ *Zymomonas mobilis*.....	18
2.3	ความสามารถในการเจริญของ *Z. mobilis* ที่ pH ต่างๆ.....	18
2.4	ความสามารถในการเจริญ ของ *Z. mobilis* ที่อุณหภูมิต่างๆ	19
2.5	เปรียบเทียบไคเนติกส์พารามิเตอร์ของเชื้อ *Z. mobilis* ในการผลิตแบบถังหมักแบบกะ (250 g 1^{-1} glucose media, pH = 5.0, T = 30 °C).....	19
4.1	จำนวนตัวอย่างลูกแป้งที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ.....	43
4.2	ความสามารถในการผลิตน้ำต้อยของลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ.....	44
4.3	ความสามารถในการผลิตน้ำต้อยของตัวอย่างลูกแป้งทั้ง 8 ตัวอย่าง.....	45
4.4	ผลของการแปรผันปริมาณน้ำที่ใช้ในการนึ่งข้าวเพื่อผลิตน้ำต้อย.....	46
4.5	ความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำต้อยจากปลายข้าวเหนียวที่นึ่งด้วยวิธีต่างกัน.....	47
4.6	ผลของอุณภูมิต่อการผลิตน้ำต้อย.....	48
4.7	ผลของระยะเวลาในการหมักน้ำต้อย.....	49
4.8	แสดงผลการผลิตเอทานอลจากปัจจัย 4 ปัจจัย โดยวิธี 2^n factorial design analysis.....	50
4.9	เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล โดยดูผลของปัจจัยทีละ 1ปัจจัย.....	51
4.10	ผลการผลิตเอทานอลจากการทดลอง 2^n factorial design analysis และค่าเอทานอลที่ได้จากสมการทำนาย.....	53
4.11	แสดงความสัมพันธ์ของทุกปัจจัยและการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล.....	65
4.12	ผลความเข้มข้นของน้ำต้อยตั้งต้นต่อการผลิตเอทานอลจากปลายข้าวโดยการหมักแบบกะในระดับขวดทดลอง.....	69

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แผนผังกระบวนการผลิตเอทานอลด้วยการทำแคตาไลติกไฮเดรชันของเอธิลีน.....	6
2.2	แผนผังกระบวนการผลิตเอทานอลด้วยการทำเอสเทอริฟิเคชันและไฮโดรไลซีสของเอธิลีน.....	7
2.3	สมการเคมีแสดงกระบวนการหมัก 11 ขั้นตอน.....	9
2.4	แสดงลักษณะของปลายข้าว.....	11
2.5	แสดงลักษณะตัวอย่างลูกแป้ง.....	13
2.6	ลักษณะเซลล์ของ *Zymomonas mobilis*.....	17
2.7	แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสของ *Zymomonas mobilis*.....	20
2.8	แสดงระบบการทำงานของเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี.....	31
4.1	แสดงตัวอย่างลักษณะลูกแป้ง.....	42
4.2	แสดงภาพ Response surface ของค่าความเป็นกรดเบส และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล.....	54
4.3	แสดงภาพ Contour plot ของค่าความเป็นกรดเบส และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล.....	55
4.4	แสดงภาพ Response surface ของอุณหภูมิ และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล.....	56
4.5	แสดงภาพ Contour plot ของอุณหภูมิ และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล.....	57
4.6	แสดงภาพ Response surface ของเวลา และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล.....	58
4.7	แสดงภาพ Contour plot ของเวลา และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล.....	59
4.8	แสดงภาพ Response surface ของความเป็นกรดเบส และอุณหภูมิในการผลิตเอทานอล.....	60
4.9	แสดงภาพ Contour plot ของความเป็นกรดเบส และอุณหภูมิในการผลิตเอทานอล.....	61

ภาพที่ หน้า

4.10 แสดงภาพ Response surface ของความเป็นกรดเบส และเวลาในการผลิตเอทานอล..... 62
4.11 แสดงภาพ Contour plot ของค่าความเป็นกรดเบส และระยะเวลาในการผลิตเอทานอล..... 63
4.12 แสดงภาพ Response surface ของอุณหภูมิ และระยะเวลาในการผลิตเอทานอล..... 64
4.13 แสดงภาพ Contour plot ของค่าความเป็นกรดเบสและระยะเวลาในการผลิตเอทานอล..... 65
4.14 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 โดยการแปรผันความเข้มข้นตั้งต้นเป็น 150 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดทดลอง..... 68
4.15 แสดงการการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ*Z. mobilis* TISTR 405 โดยการแปรผันความเข้มข้นตั้งต้นเป็น 150 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดทดลอง..... 68
4.16 แสดงการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 โดยการแปรผันความเข้มข้นตั้งต้นเป็น 150 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดทดลอง..... 69
4.17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นน้ำตาล ความเข้มข้นของเอทานอล และการเจริญของเซลล์ที่ช่วงเวลาต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยการเลี้ยงแบบกะที่มีปริมาตรทำการเท่ากับ 1 ลิตร..... 70
4.18 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 ในการหมักแบบกึ่งกะ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร..... 72
4.19 แสดงความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 ในการหมักแบบกึ่ง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร..... 73
4.20 แสดงการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 ในการหมักแบบกึ่ง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร..... 73

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

:	=	อัตราส่วนต่อ
OD	=	ค่าการดูดกลืนแสง
pH	=	ค่าความเป็นกรดเบส
%	=	เปอร์เซ็นต์

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ประวัติความเป็นมา

ปัญหาเรื่องพลังงานทดแทน และเชื้อเพลิงกำลังได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เพราะเป็นปัญหาสำคัญที่ทั่วโลกกำลังเผชิญอยู่ ปริมาณของพลังงานเชื้อเพลิงที่มีสำรองไว้กำลังจะหมดสิ้นลง ทำให้ประเทศที่ต้องพึ่งพาน้ำมันจากต่างชาติต้องประสบกับราคาน้ำมันเพิ่มขึ้นและผันผวนมาก ส่งผลกระทบต่อสภาพเศรษฐกิจ (Davis และคณะ, 2005) และประเทศไทยก็ยังขาดเสถียรภาพทางด้านพลังงาน พลังงานทดแทนจึงได้รับความสนใจมากขึ้น ซึ่งพลังงานทดแทนที่กำลังได้รับความสนใจอยู่ในขณะนี้ ได้แก่ พลังงานลม พลังงานแสงอาทิตย์ และพลังงานชีวมวล (Cazetta และคณะ, 2007)

ประเทศไทยได้ขึ้นชื่อว่าเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงควรหันมาให้ความสนใจพลังงานที่มาจากชีวมวลที่เป็นการแปรรูปผลผลิตทางการเกษตร กระบวนการที่น่าสนใจ ได้แก่ การหมักชีวมวลให้เป็นแอลกอฮอล์ กระบวนการนี้จะมีผลเชิงเศรษฐกิจได้จะต้องใช้วัตถุดิบราคาถูก หมักได้ง่าย และไม่ส่งผลต่อราคาอาหารของคนเรา ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญอย่างยิ่ง (Tanaka และคณะ, 1999) พืชที่กำลังได้รับความสนใจนำมาแปรรูปเป็นเอทานอล ได้แก่ อ้อย มันสำปะหลัง ข้าวฟ่างหวาน ข้าวโพด อย่างไรก็ตามวัตถุดิบเหล่านี้ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอื่นๆอีกหลายชนิด เช่น โรงงานน้ำตาล โรงงานผลิตกรดอินทรีย์ หรือเพื่อการส่งออก อาจส่งผลให้วัตถุดิบเหล่านี้ไม่เพียงพอ ทั้งนี้วัตถุดิบที่เราให้ความสนใจคือ ปลายข้าว เนื่องจากข้าวถือเป็นอาหารหลักของคนไทย และปลายข้าวเป็นผลพลอยได้จากการสีข้าว ซึ่งมักถูกใช้เป็นอาหารสัตว์ เพราะเป็นแหล่งของคาร์โบไฮเดตรต โครงสร้างทางเคมีของแป้ง ประกอบด้วยอะไมเลส และอะไมโลเพคติน ดังนั้นจึงต้องมีการย่อยให้ได้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อนแล้วจึงนำไปหมักเป็นเอทานอลต่อไป (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) โดยในการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลจะมี 2 ขั้นตอนหลัก คือ ขั้นตอนที่หนึ่ง เป็นกระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลโดยในขั้นตอนนี้จะประกอบด้วยการย่อยสองครั้ง โดยการย่อยครั้งแรกคือการทำให้เหลว (liquefaction) และการย่อยครั้งสุดท้ายเป็นน้ำตาลหรือการทำให้หวาน (saccharification) การย่อยครั้งแรกนี้เป็นการทำให้แป้งเหลวโดยเอนไซม์ในกลุ่ม แอลฟาอะมิเลส (α - amylase) โดยเวลาในการใช้ย่อยจะขึ้นอยู่กับชนิดและความเข้มข้นของเอนไซม์ โดยจะย่อยแป้งให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง ได้เป็นเด็กซ์ตริน (dextrin) จากนั้นจะเป็นการย่อยโดยเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (Glucoamylase) เพื่อเปลี่ยนเด็กซ์ตรินเป็นน้ำตาลกลูโคส เมื่อแป้งถูกย่อยเป็นน้ำตาลแล้วจึงจะถูกนำมาหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ให้เป็นแอลกอฮอล์ต่อไป การเปลี่ยนปลายข้าวให้กลายเป็นน้ำตาลแทน

การใช้เอนไซม์บริสุทธิ์ราคาแพง อาจใช้จุลินทรีย์สร้างเอนไซม์ขึ้นมาย่อย ซึ่งการใช้จุลินทรีย์ย่อยแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลได้มีการทำเป็นอุตสาหกรรมพื้นบ้านมานานแล้ว คือ การทำข้าวหมาก

การทำข้าวหมากจะต้องใช้ลูกแป้งข้าวหมาก ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนแป้งครึ่งวงกลม สีขาวนวล น้ำหนักเบา ในลูกแป้งข้าวหมากจะประกอบไปด้วยเชื้อราที่สร้างเอนไซม์ amylase เช่น *Amylomyces* sp. *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp. (Sukumavasi และคณะ,1973) ราเหล่านี้จะสร้างเอนไซม์อะไมเลสออกมาย่อยคาร์โบไฮเดรตจากข้าวเหนียวให้เป็นน้ำตาล ปัจจุบันมีการศึกษาเชื้อราที่มีอยู่ในลูกแป้ง เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่มีความสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ดีสำหรับนำไปเป็นวัตถุดิบตั้งต้นในการผลิตเอทานอล ในการผลิตเอทานอลโดยกระบวนการทางชีวเคมีจะใช้การหมัก ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสภายใต้สภาวะที่ปราศจากออกซิเจน หรือมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ให้เป็นเอทานอล หรือเอทิลแอลกอฮอล์ ซึ่งจุลินทรีย์ได้พลังงานจากกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลเพื่อดำรงชีวิต ดังนั้นเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลจึงค่อนข้างมีความเฉพาะเจาะจง โดยทั่วไปจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์มักจะนิยมใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces* sp. ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่มีความสามารถผลิตเอทานอล เช่น แบคทีเรีย *Zymomonas* sp. (Kositanont และคณะ, 1990) พบว่า *Zymomonas mobilis* เป็นแบคทีเรียที่มีศักยภาพในการผลิตเอธานอลได้สูง และเร็วกว่ายีสต์ เมื่อเปรียบเทียบจุลินทรีย์สองชนิดนี้ พบว่าแบคทีเรีย *Z. mobilis* จะผลิตมวลเซลล์ต่ำกว่าให้ผลได้ของเอทานอล และการใช้น้ำตาลสูงกว่า ทนต่อเอทานอลได้สูงกว่า รวมทั้งสามารถที่จะปรับปรุงพันธุ์ได้ง่ายกว่าเชื้อยีสต์ (Roger และคณะ, 1980)

งานวิจัยนี้มีความสนใจคัดเลือกลูกแป้งข้าวหมากที่รวบรวมจากแหล่งต่างๆที่มีความสามารถในการเปลี่ยนปลายข้าวให้เป็นน้ำตาลได้สูงสุด โดยนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยปลายข้าวมาใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตเอทานอลโดย *Zymomonas mobilis* TISTR405 และศึกษาอิทธิพลระหว่างปัจจัย 4 ปัจจัย รวมถึงหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดยใช้ Factorial experimental design โดยปัจจัยที่เลือกในการศึกษาครั้งนี้คือ ความเข้มข้นของน้ำตาล อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรดด่าง และระยะเวลาในการผลิต ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อผลิตเอทานอลจากแบคทีเรีย *Z. mobilis* TISTR405 จากปลายข้าว ด้วยวิธีการหมักแบบกึ่งกะ

1.3 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1. เก็บตัวอย่างลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ และคัดเลือกลูกแป้งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำต้อยได้มากที่สุด
2. หาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลในระดับขวดทดลอง
3. ศึกษาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการเติมน้ำตาลในระหว่างกระบวนการผลิตเอทานอลในถังหมักขนาด 2 ลิตร
4. การนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยปลายข้าวมาเป็นสารตั้งต้นสำหรับผลิตเอทานอลโดย *Z. mobilis* TISTR405 โดยการหมักแบบกึ่งกะ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้เอทานอลที่ผลิตจากปลายข้าวด้วยแบคทีเรีย และกระบวนการผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้สามารถเป็นทางเลือกหนึ่งในการแปรรูปวัตถุดิบทางการเกษตรเพื่อใช้เป็นพลังงานทดแทน เพื่อลดปัญหาเรื่องพลังงานและเชื้อเพลิงในปัจจุบัน

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

ปัญหาพลังงานที่กำลังพบในปัจจุบัน คือปัญหาราคาน้ำมันที่ส่งผลต่อราคาสินค้า ค่าครองชีพ ตลอดจนปัญหาความไม่สงบของโลกแถบตะวันออกกลางที่เป็นแหล่งผลิตน้ำมันเป็นอันดับต้นของโลก เป็นเหตุปัจจัยที่ทำให้ราคาน้ำมันเพิ่มสูงขึ้น และประเทศไทยก็ยังไม่มีเสถียรภาพด้านพลังงาน เพราะต้องใช้น้ำมันนำเข้ามาเป็นส่วนใหญ่ ส่งผลกระทบทางด้านเศรษฐกิจ และสังคม ดังนั้นจึงควรมองหาพลังงานทางเลือก เพื่อนำมาใช้ทดแทนพลังงานเชื้อเพลิงที่กำลังจะหมดไป หรือเพื่อเป็นแหล่งพลังงานทางเลือกได้ในอนาคต

2.1 **เอทานอล** (ethanol)

เอทานอล (ethanol) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่มีหมู่ ไฮดรอกซิล (OH) ต่ออยู่กับสายโซ่ของไฮโดรคาร์บอน มีสูตรทางเคมี คือ C_2H_5OH เอทานอลเป็นเชื้อเพลิงเหลวที่เกิดจากการหมักพืชที่มีสารประเภทแป้ง โดยจะเกิดจากการย่อยสลายแป้งด้วยเอนไซม์ให้เป็นน้ำตาลแล้วเปลี่ยนจากน้ำตาลเป็นแอลกอฮอล์อีกครั้ง

2.1.1 ประโยชน์ของเอทานอล

กระบวนการผลิตเอทานอลเปลี่ยนแปลงไปตามความก้าวหน้าทางวิชาการและความแตกต่างของทรัพยากรในประเทศ การแข่งขันระหว่างผู้ผลิตเองก็มีส่วนผลักดันให้มีการปรับปรุงกระบวนการผลิตให้ดีขึ้นตลอดเวลา มีการนำเอทานอลมาใช้งานอย่างกว้างขวางและหลากหลาย เช่น ใช้เป็นเครื่องดื่มแอกอฮอล์ เช่น เหล้า ไวน์ และเบียร์ ใช้ในอุตสาหกรรมยา ใช้เป็นตัวทำละลายในผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม เช่น สี แล็กเกอร์ ยาเคลือบน้ำมันและขี้ผึ้ง (ครีมขัดรองเท้า) เรซิน ใช้เป็นวัตถุดิบในการสังเคราะห์สารเคมีและชีวเคมี ใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนในน้ำมันเบนซินที่เรียกว่าแก๊สโซฮอล์ ใช้เป็นอาหาร เช่น น้ำส้มสายชู เจลาติน ใช้ทางด้านการแพทย์ เช่น ใช้เช็ดแผล ใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้เป็นตัวรีเอเจนต์ในห้องปฏิบัติการและอื่นๆ เป็นต้น

2.1.2 กระบวนการสังเคราะห์เอทานอล

เมื่อเทคโนโลยีทางด้านเคมีสูงขึ้น จึงมีการสังเคราะห์เอทานอลจากสารเคมีพวกปิโตรเลียม (Petrochemical product) ดังนั้นในกระบวนการผลิตเอทานอลที่ใช้กันอยู่จึงมี 2 ชนิดคือ กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis) และกระบวนการหมักสารพวกคาร์โบไฮเดรต (Alcoholic fermentation of carbohydrate) (ธีรภัทร ศรีนรคุตร, 2544)

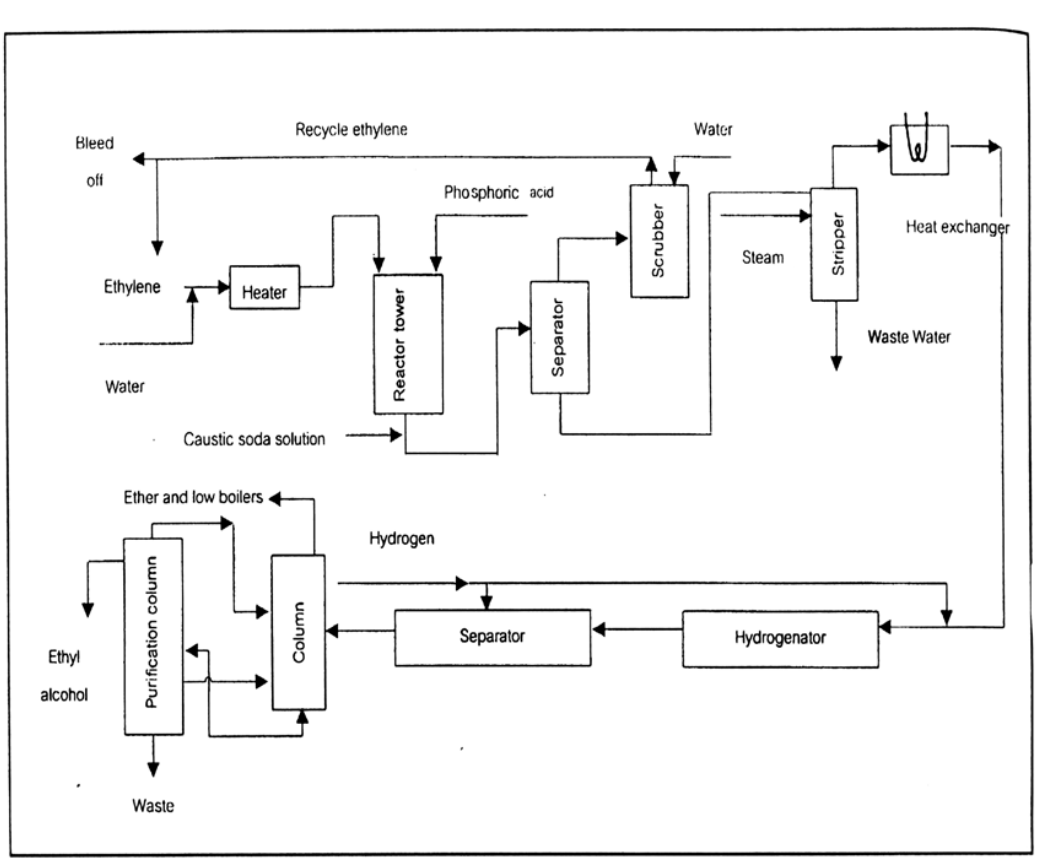
2.1.2.1 กระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (Chemical synthesis)

2.1.2.1.1 เอทานอลจากกระบวนการแคตาไลติกไฮเดรชันของเอธิลีน (ethanol from ethylene by catalytic hydration) ดังแสดงในรูปที่ 2.1

เป็นวิธีการผลิตเอทานอลโดยการสังเคราะห์ขึ้นจากเอทิลีนกับน้ำ โดยมีกรดฟอสฟอริกเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะได้เอทานอลดังสมการ

$$CH_2 = CH_2 + H_2O \xrightarrow{H_2PO_4} C_2H_5OH$$

เนื่องจากเอทิลีนที่ใช้มักจะมีอะเซทิลีนเป็นสิ่งเจือปนด้วย และ hydration ของ acethylene จะทำให้มีอะเซทัลดีไฮด์ปนมากับสารละลายเอทานอลอีกด้วย หลังจากถูกทำให้เข้มข้นขึ้น เอทานอลที่มีอะเซทัลดีไฮด์ปนนี้จะถูกทำให้ระเหยเป็นไอแล้วผสมกับไฮโดรเจนก่อนผ่านไปบน nickel hydrogenation catalyse ซึ่งอะเซทัลดีไฮด์จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล



รูปที่ 2.1 แผนผังกระบวนการผลิตเอทานอลด้วยการทำแคตาไลติกไฮเดรชันของเอธิลีน (ธีรภัทร ศรีนรคุตร, 2544)

2.1.2.1.2 เอทานอลจากกระบวนการเอสเทอริฟิเคชันและไฮโดรไลซีสของเอธิลีน (Ethanol from ethylene by esterification and hydrolysis) ดังแสดงในรูปที่ 2.2

เป็นวิธีการผลิตเอทานอล โดยการสังเคราะห์ขึ้นจากเอทิลีนกับน้ำ โดยมีกรดซัลฟูริกเป็นตัวเร่งปฏิกริยา จะได้เอทานอลดังสมการ

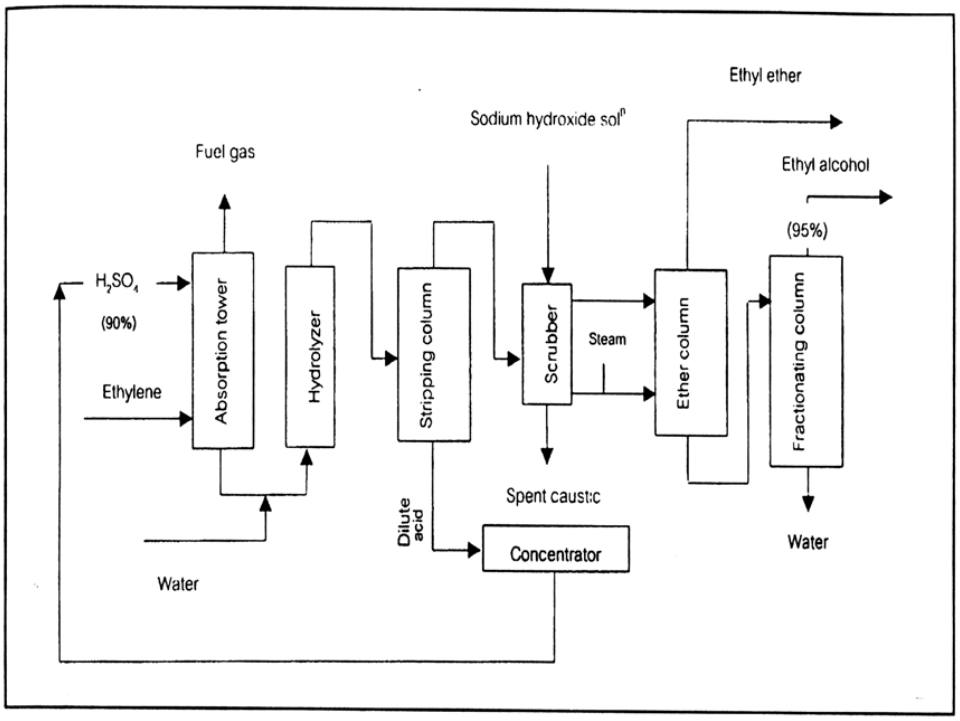
$$CH_2 = CH_2 + H_2SO_4 \longrightarrow C_2H_5OSO_2OH$$

$$2CH_2 = CH_2 + H_2SO_4 \longrightarrow C_2H_5OSO_2OC_2H_5$$

$$C_2H_5OSO_2OH + C_2H_5OSO_2OC_2H_5 + 3H_2O \longrightarrow 3C_2H_5OH + 2H_2SO_4$$

$$2C_2H_5OH \xrightarrow{H_2SO_4} C_2H_5OC_2H_5 + H_2O$$

นอกจากเอทานอลแล้วยังเกิด ethyl ether อีกด้วย ethyl ether เมื่อทำ catalytic hydration จะได้เอทานอล



รูปที่ 2.2 แผนผังกระบวนการผลิตเอทานอลด้วยการทำเอสเทอริฟิเคชันและไฮโดรไลซีสของเอธิลีน (ธีรภัทร ศรีนรคุตร, 2544)

วิธีการสังเคราะห์ทางเคมีของเอทานอล ทั้ง 2 วิธีที่กล่าวมาแต่เดิมนิยมใช้กันมากและนิยมใช้มากกว่าวิธีการหมัก ทั้งนี้เพราะเป็นกระบวนการที่รวดเร็วและไม่ยุ่งยาก กระบวนการผลิตขึ้นอยู่กับปัจจัย (factor) เพียงไม่กี่อย่าง แต่เนื่องจากวิธีการสังเคราะห์ดังกล่าวต้องใช้สารเริ่มต้นที่เป็นผลผลิตจากปิโตรเลียม ซึ่งในช่วงระยะหลังที่มีการขึ้นราคาน้ำมันปิโตรเลียม จึงทำให้ต้นทุนการผลิตในวิธีทั้งสองนี้สูงขึ้นมาก (แต่เดิมต่ำกว่าวิธีการผลิตแบบการหมัก) จนทำให้มีผู้สนใจและหันเหการผลิตเอทานอลมาทางด้านการหมักจากสารพวกคาร์โบไฮเดรตแทน

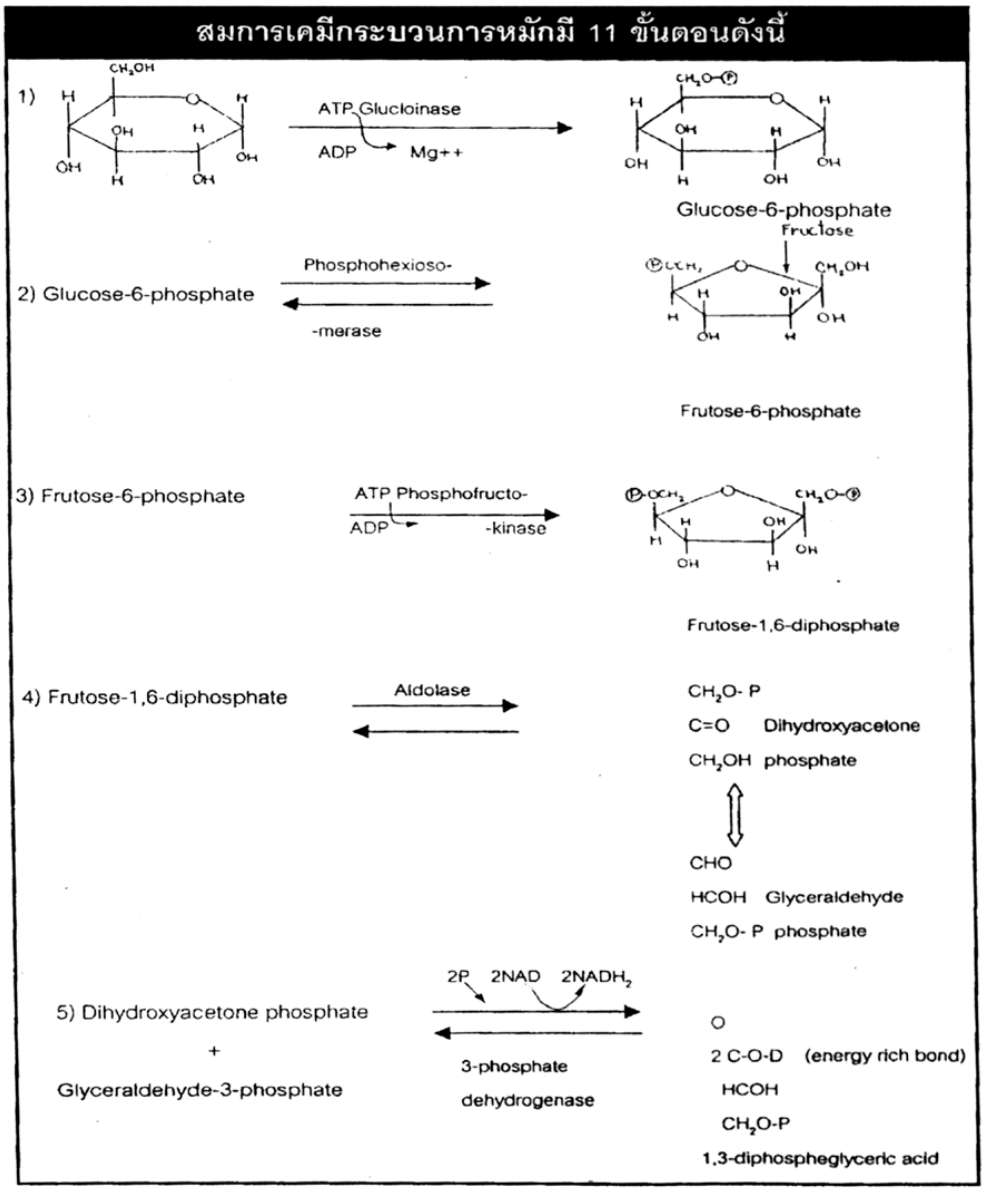
2.1.2.2 กระบวนการหมักสารพวกคาร์โบไฮเดรต (Alcoholic fermentation of carbohydrate)

การเปลี่ยนสารพวกคาร์โบไฮเดรตอันได้แก่ แป้งและน้ำตาลให้เป็นเอทานอลนั้น ถ้าสารเริ่มต้นเป็นน้ำตาลก็สามารถจะใช้ยีสต์ทำการหมักได้เลย ยีสต์ที่นิยมใช้กันเป็นยีสต์กลุ่ม *Saccharomyces* ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลที่ต้องการความเข้มข้นเอทานอลสูงๆ ส่วนใหญ่ใช้ยีสต์ในสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae*

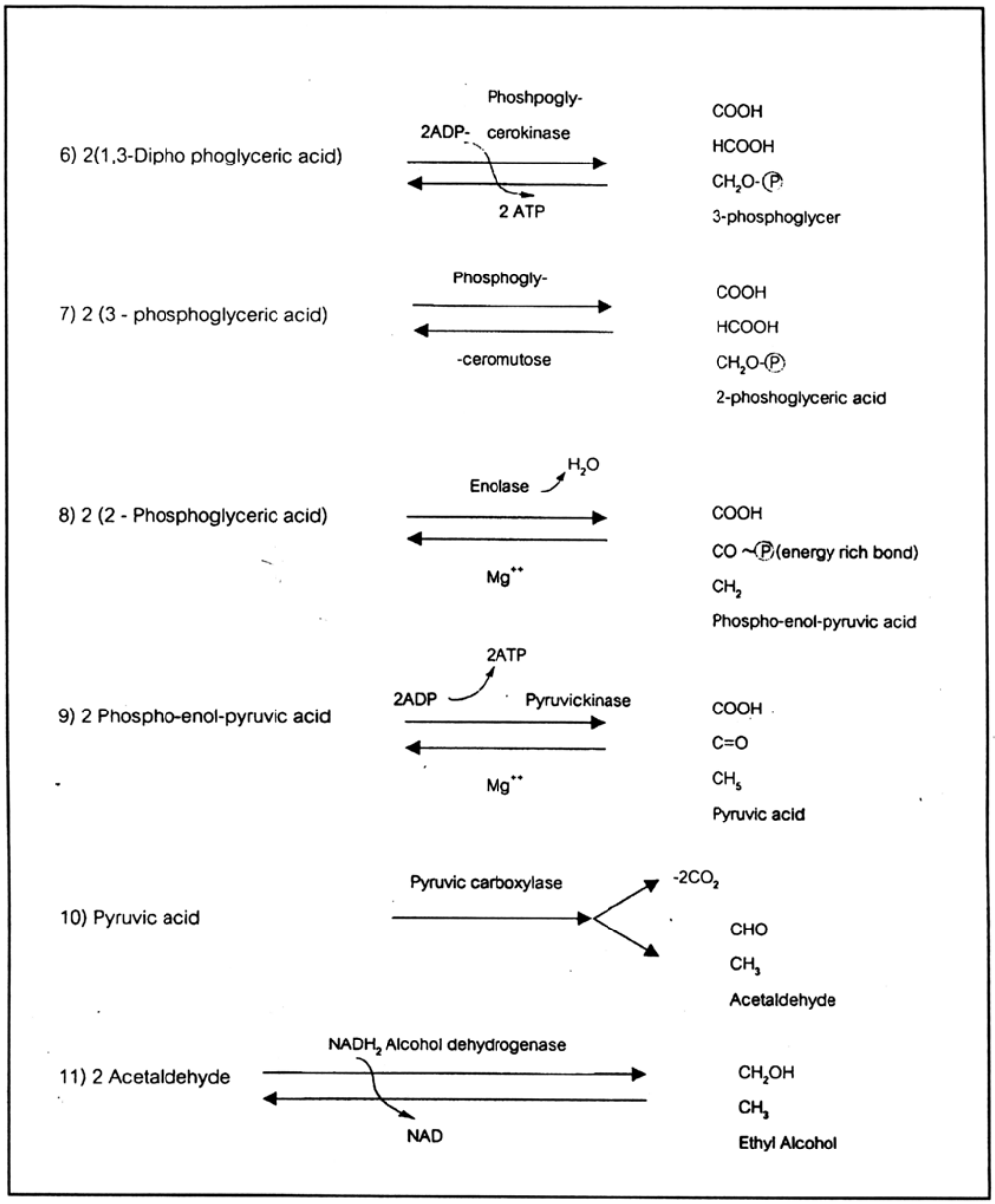
2.1.2.2.1 เมื่อสารเริ่มต้นเป็นพวกแป้ง เช่น มันสำปะหลัง ข้าวโพด ข้าว สามารถใช้ malt enzyme หรือ maltase enzyme ซึ่งได้จากพวกราใน Class Phycomycetes และ Ascomycetes มาเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล นอกจากเชื้อราแล้วยังสามารถใช้กรดเกลือไปรวมกับแป้งแล้วต้มให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ก็จะได้น้ำตาลที่มีโมเลกุลเล็กกว่าที่ใช้ย่อยด้วย เอนไซม์ (ซึ่งสามารถใช้ทำให้เกิดแอลกอฮอล์ได้ดีกว่าน้ำตาลโมเลกุลใหญ่) แต่การใช้กรดจะต้องควบคุมปริมาณให้พอเหมาะ โดยปริมาณกรดที่เหลือกจะต้องไม่ทำให้น้ำตาลเสียไป (เนื่องจากปฏิกิริยารุนแรงเกินไป) และจะต้องทำการปรับความเป็นกรดเบสให้เหมาะสมในปฏิกิริยาการหมักที่จะดำเนินการต่อไป

การหมักกลูโคสจะเริ่มโดยปฏิกิริยาทางชีวเคมี ซึ่งจะใช้ ATP (adenosine triphosphate) ซึ่งมีพันธะที่มีพลังงานสูงเพื่อเกิดเป็น กลูโคส-6-ฟอสเฟต ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นคีโตแอซิด, ไพรูวิกแอซิด 2 โมล ในที่สุดจะได้อะซิตัลดีไฮด์ ซึ่งจะแตกตัวเป็คาร์บอนไดออกไซด์และเอธิลแอลกอฮอล์ ดังแสดงในรูปที่ 2.3

2.1.2.2.2 เมื่อสารเริ่มต้นเป็นน้ำตาลโมเลกุลใหญ่ เช่น น้ำตาลจากอ้อย สดกากน้ำตาล หรือผลไม้บางชนิด เอนไซม์ ต่างๆ ที่ใช้ย่อยสลายน้ำตาลชนิดต่างๆ จนกลายเป็นเอทานอลล้วนแล้วแต่ได้จากยีสต์ทั้งสิ้น



รูปที่ 2.3 สมการเคมีแสดงกระบวนการหมัก 11 ขั้นตอน (ธีรภัทร ศรีนรคุตร, 2544)



รูปที่ 2.3 สมการเคมีแสดงกระบวนการหมัก 11 ขั้นตอน (ต่อ) (ธีรภัทร ศรีนรคุตร, 2544)

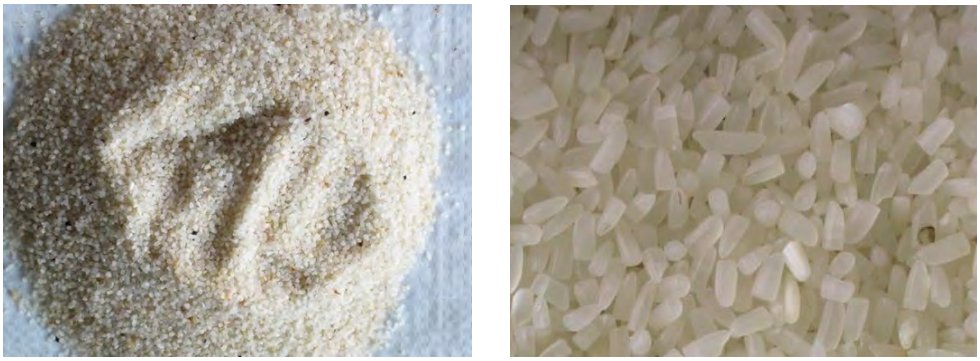
นอกจากได้เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ แล้วยังมีพวก อัลดีไฮด์, เอสเทอร์ (เอทธิลอะซีเตท) แอลกอฮอล์ที่มีคาร์บอนน้อยกว่า 2 ตัว และมากกว่า 2 ตัว ในโมเลกุล ซึ่งเรียกว่า น้ำมันเชื้อเพลิง, กรดไขมัน, สารประกอบอะโรมาติก

2.2 ปลายข้าว

ข้าวเป็นอาหารหลักของคนไทย เป็นส่วนสำคัญของวัฒนธรรมไทย และเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญ ประเทศไทยสามารถผลิตข้าวเปลือกได้ปีละประมาณ 29 ล้านตัน (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2550) และยังเป็นผู้ส่งออกข้าวไปจำหน่ายยังประเทศต่างๆเป็นอันดับต้นๆของโลก และผลพลอยได้จากการผลิตข้าว คือ ปลายข้าว โดยเป็นผลพลอยได้ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการสีข้าว ซึ่งจะได้ส่วนของปลายข้าวประมาณ 15% ของปริมาณข้าวที่ใช้สีในแต่ละครั้ง ปลายข้าวจัดได้ว่าเป็นวัตถุดิบที่ให้พลังงานสูงคล้ายกับข้าวเต็มเมล็ด โดยปกติปลายข้าวจะถูกนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ หรือนำไปใช้ทำเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เช่น การหมักสาโท หรือนำไปบดเป็นส่วนผสมของแป้งสำหรับประกอบอาหาร

ส่วนประกอบของปลายข้าว

ปลายข้าวประกอบด้วยเศษข้าวที่หัก ที่เหลือเป็นคาร์โบไฮเดรตและส่วนของจมูกข้าว ปลายข้าวโดยทั่วไปมีโปรตีนประมาณ 8 เปอร์เซ็น มีไขมันและเยื่อใยต่ำ ปลายข้าวมี 3 ขนาด คือ ขนาดเล็ก ขนาดกลางและ ขนาดใหญ่หรือที่เรียกกันว่าข้าวท่อน ปลายข้าวขนาดเล็กมักมีส่วนของจมูกข้าวซึ่งเป็นต้นอ่อนที่มีโปรตีน ไขมัน วิตามิน และแร่ธาตุมากกว่าส่วนอื่นของเมล็ดจึงเหมาะกับการเลี้ยงสัตว์มากกว่าเพราะสัตว์สามารถย่อยและใช้ประโยชน์ได้ดีกว่า ดังนั้นปลายข้าวขนาดเล็กจึงเป็นที่นิยมใช้เลี้ยงสัตว์มากกว่า และมักมีราคาแพงและหาซื้อได้ยาก



รูปที่ 2.4 แสดงลักษณะของปลายข้าว

ที่มา : http://www.rakbankerd.com/kaset/openweb.php?id=811&s=tblrice

2.3 ลูกแป้ง

ลูกแป้ง คือ กล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บในรูปเชื้อแห้ง เพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมัก ลูกแป้งมีหลายชนิด เช่น ลูกแป้งข้าวหมาก ลูกแป้งเหล้า ลูกแป้งน้ำส้มสายชู ลูกแป้งขนมถ้วยฟู แม้ลูกแป้งแต่ละชนิดมีจุลินทรีย์แตกต่างตามวัตถุประสงค์การใช้ แต่ก็มีส่วนที่เหมือนกัน คือ มีจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแป้งในวัตถุดิบให้เป็นน้ำตาล เพื่อให้จุลินทรีย์กลุ่มอื่นเปลี่ยนน้ำตาลเป็นผลผลิตที่ต้องการ เช่น ข้าวหมาก น้ำส้มสายชู สุรา และเมรัย (นภา โล่ทอง, 2535)

เข้าใจกันว่าลูกแป้งมีแหล่งกำเนิดที่ประเทศจีน และได้ถ่ายทอดไปยังประเทศเพื่อนบ้าน เช่น กลุ่มประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทยและมีชื่อเรียกต่างกันไปในแต่ละประเทศ เช่น อินโดนีเซียเรียก ragi หรือ raggi ฟิลิปปินส์ เรียก bubod ไต้หวัน เรียก pekka ทิเบต เรียก phab เกาหลี เรียก nuruk ส่วนประเทศไทยเรียก ลูกแป้ง (นภา โล่ทอง, 2535; สุมัลลิกา โมรากุล, 2545)

ลูกแป้งข้าวหมาก คือ แป้งเชื้อที่เป็นแหล่งจุลินทรีย์ และเอนไซม์ที่มีบทบาทต่อการหมักข้าวเหนียวนึ่งให้มีรสหวาน ลูกแป้งข้าวหมากที่ดีควรมีสีขาวนวล น้ำหนักเบาและมีกลิ่นหอม ไม่มีรอยแตกร้าว ก้อนแป้งเป็นรูพรุนซึ่งเกิดจากการฟูของแป้งขณะบ่ม เมื่อบิออกภายในค่อนข้างโปร่ง เห็นเส้นใยของราเกาะกับแป้งอยู่ทั่วไป เนื้อแป้งร่วนเป็นผุยไม่มีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว สีของลูกแป้งขึ้นกับปัจจัย 3 ประการคือ อายุของลูกแป้ง ชนิดเครื่องเทศ และปริมาณเครื่องเทศที่ใช้ ลูกแป้งที่ทำเสร็จใหม่ๆ มีสีขาวปนน้ำตาลในขณะที่ลูกแป้งที่เก็บไว้นานอาจมีสีเข้มขึ้น (พจนีย์ จันทมาลี, 2539)

2.3.1 จุลินทรีย์ในลูกแป้ง

ลูกแป้งข้าวหมากเป็นแป้งเชื้อ (mold bran) ชนิดหนึ่ง มีลักษณะภายนอกเป็นก้อนแป้งครึ่งวงกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3 เซนติเมตร การทำลูกแป้งข้าวหมากเป็นการเพาะเชื้อและขยายพันธุ์ราและยีสต์ โดยอยู่ในรูปของสปอร์หรือเซลล์คงทน องค์ประกอบที่สำคัญของลูกแป้งคือ ปลายข้าว ซึ่งใช้ได้ทั้งข้าวเหนียวและข้าวเจ้า นำมาผสมกับเครื่องเทศหรือสมุนไพรต่างๆ โดยคุณภาพของลูกแป้งขึ้นอยู่กับคุณภาพของข้าวและเครื่องเทศ การใส่เครื่องเทศและสมุนไพรต่างกันทั้งชนิดและปริมาณเป็นเหตุให้เกิดความแตกต่างของลูกแป้งซึ่งเป็นผลให้เกิดความหลากหลายของจุลินทรีย์ในลูกแป้งด้วย การผลิตลูกแป้งมักทำกันเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน โดยมีกรรมวิธีคล้ายคลึงกันแตกต่างกันเพียงองค์ประกอบของวัตถุดิบ ขนาด รูปร่าง ตลอดจนสายพันธุ์ของจุลินทรีย์เท่านั้น (มนตรี เชาวสังเกต, 2521)

รูปที่ 2.5 แสดงลักษณะตัวอย่างลูกแป้ง
ที่มา : http://www.bansuanporpeang.com/node/7200

เครื่องเทศและสมุนไพรที่เป็นส่วนผสมของลูกแป้งเป็นตัวจำกัดชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ จึงทำให้จุลินทรีย์ที่พบในลูกแป้งมีจำนวนไม่กี่ชนิด โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้า คือยีสต์และราซึ่งพบเพียงไม่กี่สกุล ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ลูกแป้งชนิดต่างๆ และจุลินทรีย์ในลูกแป้งของแต่ละประเทศ
(ชุลี ยมภักดี และคณะ, 2550)

ประเทศ	ชื่อหัวเชื้อ	ส่วนผสมหลัก	รูปร่าง	เชื้อ
จีน	Chu	Wheat, Barley, Millet, Rice (Whole grain, Grits or Flour)	ก้อน หรือก้อนเค้ก	*Rhizopus* sp. *Amylomyces* sp.
เกาหลี	Nuruk	Wheat, Rice, Barley (Whole grain, Grits or Flour)	ก้อนเค้กขนาดใหญ่	*Aspergillus* sp. *Rhizopus* sp. Yeast
	Meju	Soybean (Whole seed)	ก้อนขนาดใหญ่	*Aspergillus* sp. *Bacillus* sp.
ญี่ปุ่น	Koji	Wheat, Rice (Whole gain, Grits or Flour	ก้อนเล็ก-ผง	*Aspergillus* sp.
อินโดนีเซีย	Ragi	Rice (Flour)	ก้อนเค้กขนาดเล็ก	*Amylomyces* sp. *Endomycopsis* sp.

ตารางที่ 2.1 ลูกแป้งชนิดต่างๆ และจุลินทรีย์ในลูกแป้งของแต่ละประเทศ (ต่อ)
(ชุลี ยมภักดี และคณะ, 2550)

ฟิลิปปินส์	Bubod	Rice, Glutinous rice (Flour)	ก้อนเค้กขนาดเล็ก	Mucor Rhizopus Saccharomyces
ไทย	Lookpang	Rice bran	ก้อนเล็ก-ผง	*Amylomyces* sp. *Aspergillus* sp.
อินเดีย	Marcha, Murcha	Rice	ก้อนเค้กชนิดแบน	*Hansenula anomala* *Mucor frragilis* *Rhizopus arrhizus*

สมพร สินธารา (2544) รายงานว่า จากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก 38 ตัวอย่าง และลูกแป้งสุรา 19 ตัวอย่าง สามารถแยกยีสต์ได้ 43 ไอโซเลต แยกราได้ 91 ไอโซเลตจากตัวอย่างลูกแป้งข้าวหมาก และสามารถแยกยีสต์ได้ 49 ไอโซเลต ราได้ 35 ไอโซเลตจากตัวอย่างลูกแป้งสุรา และพบว่ายีสต์ที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *Saccharomycopsis fibuligera* ราที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็น *Rhizopus* spp. และ *Amylomyces* spp. และยังพบอีกว่ายีสต์และราดังกล่าวสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

ทศพร ทศนานนท์ (2547) คัดแยกเชื้อราจากลูกแป้งเหล้า จากแหล่งต่างๆ 15 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกราได้ 22 ไอโซเลต มี *Actinomucor* sp., *Amylomyces* sp., *Aspergillus* sp.,*Chlamydomucor* sp., *Mucor* sp., *Penicillium* sp. และ *Rhizopus* sp. และพบว่า *Rhizopus* sp.ที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้าจังหวัดศีรสะเกษสามารถเจริญและสร้างเอนไซม์อะมิเลสได้สูงที่สุด

2.3.2 บทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้ง

บทบาทของจุลินทรีย์ในลูกแป้งมี 2 ประการคือ

2.3.2.1 การเปลี่ยนแป้งในเม็ดข้าวให้เป็นน้ำตาลโดยจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะไมเลสมาย่อยแป้งภายนอกเซลล์ ซึ่งเป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลใหญ่ให้เป็นคาร์โบไฮเดรตโมเลกุลเล็กพอที่จุลินทรีย์จะนำเข้าสู่เซลล์เพื่อเข้าสู่กระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์สำหรับการสร้างพลังงานและสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ ที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตของเซลล์

2.3.2.2 การหมักน้ำตาลที่เกิดขึ้นให้เป็นเอธิลแอลฮอล์กับคาร์บอนไดออกไซด์โดยยีสต์ โดยบทบาทของจุลินทรีย์ทั้งสองประเภทนี้จะเกิดขึ้นต่อเนื่องกันตลอดระยะเวลาการหมัก (สมพร สินธารา, 2544)

เอนไซม์อะไมเลสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ถูกปล่อยออกมานอกเซลล์ (Extracellular enzyme) ซึ่งแบ่งตามการทำงานได้เป็น 2 ประเภท คือ

- Endoamylase ไฮโดรไลซ์แป้งแบบสุ่มที่พันธะอัลฟา-1, 4-ไกลโคซิดิก ถ้าเกิดการย่อยไม่สมบูรณ์จะได้ กลูโคส มอลโตส และเด็กซ์ตริน ถ้าเกิดการย่อยอย่างสมบูรณ์จะได้มอลโตสและกลูโคส ได้แก่ อัลฟาอะไมเลส

- Exoamylase ไฮโดรไลซ์แป้งจากปลายด้าน non-reducing เข้าไป โดยจะย่อยที่พันธะอัลฟา-1, 4-ไกลโคซิดิก และพันธะอัลฟา-1, 6-ไกลโคซิดิก ได้ D-glucoseได้แก่ เบต้าอะไมเลส และกลูโคอะไมเลส (จันทนา เก่าก่อน, 2535)

ชนิดของอะไมเลส

1. อัลฟาอะไมเลส หรือ α-1,4-glucan 4-glucanohydrolase, EC3.2.1.1 พบทั่วไปในอาณาจักรพืชและสัตว์ ในคนจะพบในส่วนของน้ำลาย ตับอ่อน ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายแป้ง เป็นโอลิโกและไดซัคคาไรด์ ซึ่งจะถูกย่อยต่อในลำไส้เล็กก่อนที่จะซึมผ่านผนังลำไส้สู่ร่างกาย มีมวลโมเลกุลประมาณ 50,000 มี ca^{2+} 1 ตัวต่อเอนไซม์ 1 โมเลกุล จะถูกกระตุ้นด้วยฮาโลเจนไอออนเช่น cl^- Br^- และ F^- ลักษณะสำคัญของเอนไซม์ในการย่อยสลายคือ เจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลของแป้งที่ อัลฟา-1,4 ในลักษณะตัดภายในของสายโพลิเมอร์อย่างอิสระ

ได้ผลเป็น glucan และ limit dextrin ที่มีหน่วยกลูโคสประมาณ 2-6 หน่วย และยังมี configuration เดิม (ปราณี อ่านเปรื่อง, 2535)

2. เบต้าอะไมเลส หรือ β-1,4-glucan maltohydrolase, EC 3.2.1.2 ซึ่งพบได้ทั่วไปในพืชชั้นสูง เช่น ข้าวบาร์เลย์ในลักษณะกำลังงอกเป็นข้าวมอลท์ ข้าวสาลี ข้าวไรย์ ถั่วเหลือง และมันเทศ และมักพบร่วมกับอัลฟาอะไมเลส มีมวลโมเลกุล 152,000 (กรณีมันเทศ) มีสารพวกซัลไฟดริล (sulfhydryl reagent) เป็นตัวยับยั้ง หรือกล่าวได้ว่ามีหมู่ซัลไฟดริลอยู่ในบริเวณเร่ง ปฏิกิริยาการย่อยสลายของเบต้าอะไมเลสจะเจาะจงต่อพันธะไกลโคซิลของแป้งที่อัลฟา-1,4 ในลักษณะการตัดสายโพลิเมอร์อย่างเป็น ระเบียบจากปลายสายด้านที่ไม่มีหมู่รีดิวซ์เข้าสู่ภายในสายไปทีละหนึ่งหน่วยของมอลโตส หรือทีละสองหน่วยของกลูโคส และจะหยุดปฏิกิริยาที่พันธะไกลโคซิลที่อัลฟา-1,6 ดังนั้นผลผลิตที่ได้จากปฏิกิริยาย่อยสลายแป้งหรือไกลโคเจนจะเป็น glucan limit dextrin และส่วนใหญ่เป็นมอลโตสที่มี configuration ต่างไปจากเดิมคือได้ β-configuration หรือ β-moltose

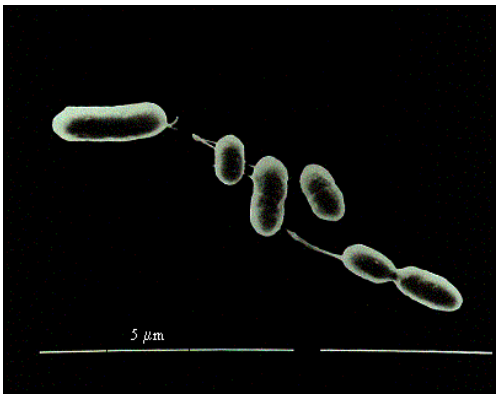
3. แกมมาอะไมเลส หรือ α-1,4-glucan glucohydrolase, EC 3.2.1.3 หรือ กลูโคอะไมเลส เป็นเอนไซม์ที่พบทั่วไปในจุลินทรีย์เช่นแบคทีเรีย รา ลักษณะที่สำคัญของปฏิกิริยาการย่อยสลายแป้งคือสามารถย่อยสลายได้หลายพันธะไม่ว่าจะเป็นพันธะไกลโคซิลที่เป็น α-1,4, α-1,6 และ α-1,3 แต่จะช้ากว่า α-1,4 การตัดสายโพลิเมอร์จะเหมือนกับเบตาอะไมเลสแต่ตัดปลายสายเข้าไปทีละ 1 หน่วยของกลูโคส ดังนั้นผลผลิตที่ได้ส่วนใหญ่จะเป็นกลูโคสที่มี configuration ต่างไปจากเดิม คือได้ β- configuration หรือ β-D-glucose และส่วนของ glucan และ limit dextrin

จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์กลูโคอะมิเลส โดยทั่วไปมีราหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์กลูโคอะไมเลส แต่ที่นิยมนำมาผลิตในทางการค้าได้แก่ เชื้อราพวก *Aspergillus* sp. และ *Rhizopus* sp. (Underkofler และ Hickey, 1954) ในปี 1982 Calmette ได้มีการศึกษา Amylomyces โดยทดลองแยกเชื้อราหลายชนิดจากลูกแป้งของจีน และจากการศึกษาเพื่อหาอัตราเร็วในการ saccharify แป้งของเชื้อราที่กล่าวมา พบว่า เชื้อราในสกุล Amylomyces สามารถย่อยแป้งให้เป็นน้ำตาลได้เร็วกว่าเชื้อราชนิดอื่นที่แยกได้ (Ellis และคณะ, 1976) และจากการศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งของเชื้อราในสายพันธุ์นี้ พบว่า Amylomyces ที่แยกได้จากลูกแป้ง และลูกแป้งเหล้าของไทย เป็นเชื้อราที่มีความสามารถในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลได้สูงสายพันธุ์หนึ่ง (ชัยวัฒน์ จาติกเสถียร, 2520; มนตรี เชาว์สังเกต, 2521; กฤติกานต์ มหาวรรณ, 2523) พบว่าเมื่อลูกแป้งถูกย่อยด้วยอะไมเลส จะมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปคือ มีความเป็นน้ำตาลรีดิวซ์สูงขึ้น การให้สีกับสารละลายไอโอดีนเปลี่ยนไป ความหนืดลดลง ความสามารถในการ

เบี่ยงเบนแสงลดลง (Bernfeld, 1995) ซึ่งจากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้น นำมาใช้ในการตรวจหาประสิทธิภาพของเอนไซม์ได้ เช่น ดูการเปลี่ยนแปลงจากโมเลกุลใหญ่เป็นโมเลกุลเล็กโดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของไอโอดีน และการตรวจหากลูโคสจากการวัดหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ด้วยวิธีต่างๆเช่น วิธีของ A.O.A.C. (1975) วิธีของ Nelson-Somogyi (Nelson, 1944) เป็นต้น

2.4 *Zymomonas mobilis*

Z. mobilis เป็นแบคทีเรียแกรมลบ จัดอยู่ในกลุ่มของ facultative anaerobic bacteria ลักษณะเป็นเซลล์รูปแท่งที่มีปลายโค้ง ขนาดกว้าง 1-1.4 ไมโครเมตร และยาว 2-6 ไมโครเมตร อยู่เป็นคู่หรือเดี่ยวๆ ติดสีแกรมลบไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยอาศัย flagella เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญแต่ได้เจริญได้ถ้ามีออกซิเจนเล็กน้อย สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) และฟรักโทส (fructose) ได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอล (ethanol) และคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนการใช้น้ำตาลซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนในการผลิตเอทานอล โดย *Z. mobilis* จะใช้เอนไซม์ Levansucrase และ Invertase ในการย่อยน้ำตาลซูโครสให้กลายเป็นกลูโคสและฟลุกโตสที่บริเวณภายนอกเมมเบรน จากนั้นจะลำเลียงเข้าสู่เซลล์ซึ่ง *Z. mobilis* เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอล เมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์ ซึ่งเป็นเชื้อดั้งเดิมที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลแล้ว สามารถผลิตเอทานอลในระดับที่สูงกว่า (Tao และคณะ, 2005) และพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* สามารถเจริญได้ในค่าความเป็นกรดเบสที่กว้าง คือตั้งแต่ 3.5-7.5 แต่ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมที่สุดจะอยู่ที่ 5-7 (ตารางที่ 2.3) และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *Z. mobilis* จะอยู่ในช่วง 30-38 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 2.4) (swings และDeley, 1977)



รูปที่ 2.6 ลักษณะเซลล์ของ *Zymomonas mobilis*

ที่มา : http://phonehealth.info/index.php?tp=81350e0ebb536599

ตารางที่ 2.2 ส่วนประกอบภายในเซลล์ *Zymomonas mobilis* (Swings และ Deley, 1977)

Component	Content (dry wt)
Proteins	
Growth phase	65-69%
Stationary phase	54%
RNA	17-22%
DNA	2.7%
Carbohydrates	4-5%
Poly-/3-hydroxybutyrate	0%
Polyphosphate	0%
Sulfur	0.5%
Ammonia	0.1-0.5,mol/mg
Amino acids	0.02-0.2 ,umol/mg
ATP	
Exponential phase	1-5 ,ug/mg
Starvation	0-0.4 pg/mg

ตารางที่ 2.3 ความสามารถในการเจริญของ *Z.mobilis* ที่ pH ต่างๆ (Swings และ Deley, 1977)

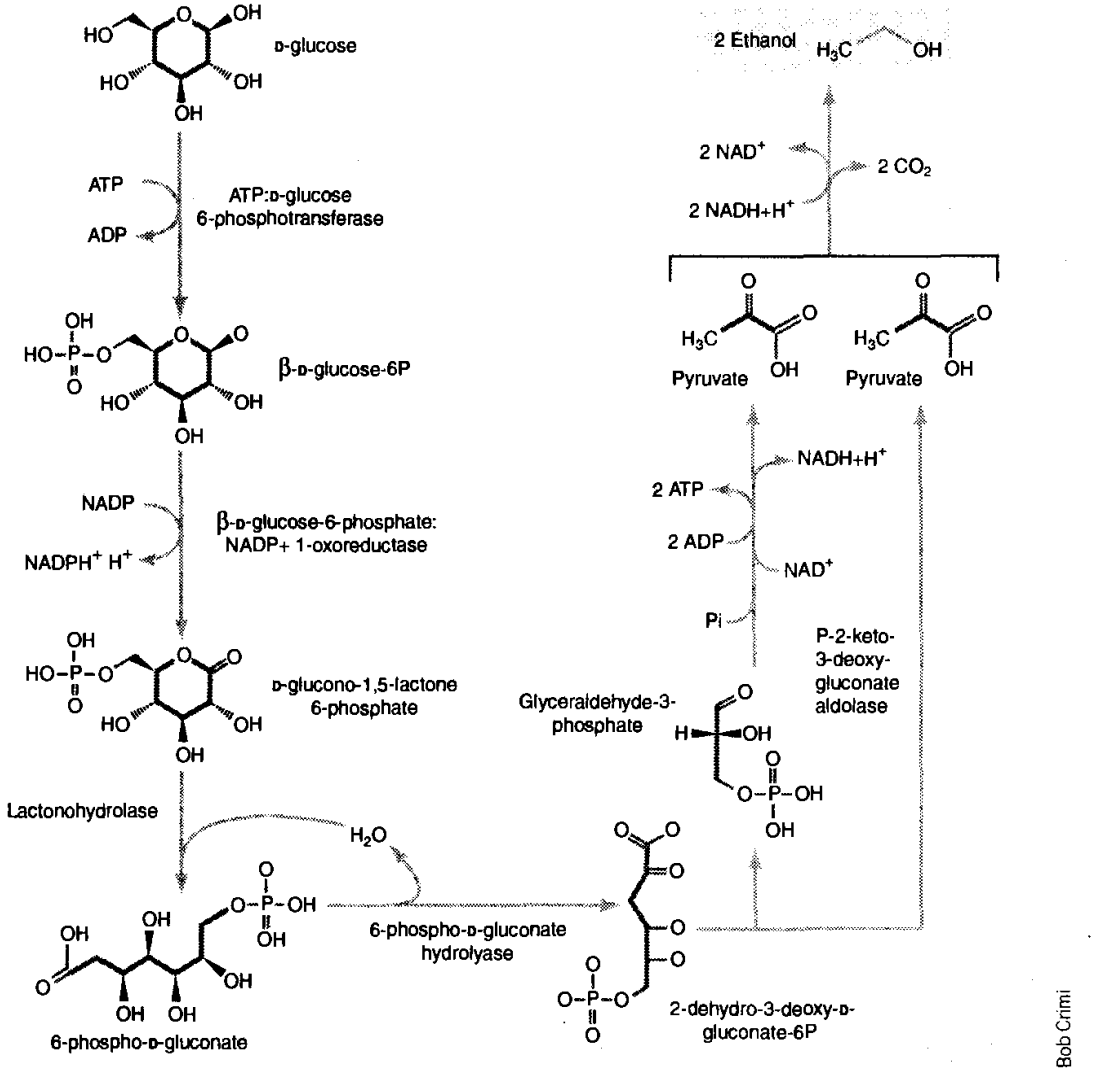
Initial pH	% of strains growing
3.05	0
3.5	43
3.7	71
3.85	90
5-7	100
7.50	87
8.0	0

ตารางที่ 2.4 ความสามารถในการเจริญ ของ *Z.mobilis* ที่อุณหภูมิต่างๆ (Swings และ Deley, 1977)

Incubation temp (^{o}C)	% of strains growing
30	100
34	97
36	97
38	74
40	5

ตารางที่ 2.5 เปรียบเทียบไคเนติกส์พารามิเตอร์ของเชื้อ *Z. mobilis* ในการผลิตในถังหมักแบบกะ (250 g 1^{-1} glucose media, pH = 5.0, T = 30 °C) (Roger, 1980)

Kinetic parameters	*Z. mobils*	*S. uvarum*	*S. uvarum*
	(non-aerated)	(non-aerated)	(aerobic)
Specific growth rate, p	0.133	0.055	0.12
Specific ethanol productivity, q_p	2.53	0.87	0.61
Specific glucose uptake rate, q_s	5.45	2.08	1.47
Cell yield, Yx/s	0.019	0.033	0.045
Ethanol yield, Yp/s	0.472	0.438	0.395
Ethanol yield, (% of theoretical)	92.5	85.9	77.5



รูปที่ 2.7 แสดงการใช้น้ำตาลกลูโคสของ *Zymomonas mobilis*
(Jeffries, 2005)

กระบวนการผลิตเอทานอลใน *Z. mobilis* จะทำการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็น 2 โมลของเอทานอลและ 1 โมล ATP *Z. mobilis* จะใช้ในกระบวนการสังเคราห์ที่ไม่มีออกซิเจน ซึ่งจะใช้พลังงานต่ำ และให้ผลผลิตเอทานอลที่สูง

คุณสมบัติที่เหมาะสมของ *Zymomonas* สำหรับการผลิตเอทานอล มีดังนี้ (Swings และ Deley, 1977; Roger, 1985)

1. ความสามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูง

จากรายงานพบว่า *Zymomonas* สามารถผลิตเอทานอลได้ 1.5-1.9 โมลต่อกลูโคส 1 โมล โดยใช้น้ำตาล 98 เปอร์เซ็นต์ เพื่อสร้างเอทานอล ส่วนอีก 2 เปอร์เซ็นต์ที่เหลือใช้สำหรับการเจริญ ในขณะที่ยีสต์ *Saccharomyces* สามารถผลิตเอทานอลได้ 1.55 โมลต่อกลูโคส 1 โมล และใช้น้ำตาล 90 เปอร์เซ็นต์ สำหรับผลิตเอทานอล ดังนั้น ปริมาณเอทานอลที่ผลิตจาก *Zymomonas* จึงมีปริมาณมากกว่าที่ผลิตจาก *Saccharomyces*

2. คุณภาพของเอทานอลที่ผลิตได้

เอทานอลที่ผลิตจาก *Zymomonas* จะมีเอทานอลโมเลกุลใหญ่ (คือ เอทานอลที่มีคาร์บอนอะตอมตั้งแต่ 3 คาร์บอนขึ้นไป เช่น propanol, butanol) เจือปนอยู่ 0.6 มิลลิลิตรต่อน้ำตาลกลูโคส 1 กรัม ซึ่งน้อยกว่ายีสต์ที่หมักในสภาพเดียวกันถึง 40 เท่า แต่การหมักโดย *Zymomonas* จะมีอะเซทัลดีไฮด์ถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลไม่สมบูรณ์

3. ความสามารถในการเจริญในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูง

Zymomonas ส่วนใหญ่สามารถเจริญ และหมักเอทานอลในสภาพที่มีน้ำตาลเข้มข้นถึง 25 เปอร์เซ็นต์ และบางสายพันธุ์ถึง 30 เปอร์เซ็นต์

4. ความสามารถเจริญในที่มีเอทานอลสูง

Zymomonas ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในเอทานอล 5.5 เปอร์เซ็นต์ และมีบางสายพันธุ์ที่ทนได้ถึง 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสอดคล้องกับความสามารถในการเจริญและการหมักในสภาพที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง

5. ความสามารถในการเจริญในที่มีอุณหภูมิสูง

โดยทั่วไป *Zymomonas* สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ 30-39 องศาเซลเซียส แต่มีบางสายพันธุ์สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิ 40-42 องศาเซลเซียส

6. ความสามารถเจริญในสภาพที่มีกรดสูง

Zymomonas สามารถเจริญในสภาพที่มีความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 3.4-4.0 ซึ่งจัดว่าเป็นค่าความเป็นกรดด่างที่ต่ำมาก สำหรับแบคทีเรียทั่วๆไป ลักษณะเช่นนี้ดีสำหรับป้องกันการปะปนของเชื้ออื่น

7. ความทนทานต่อซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2)

พบว่า *Zymomonas* ทน SO_2 ได้ถึง 500 ppm. ซึ่งเป็นปริมาณที่แบคทีเรีย และจุลินทรีย์หลายชนิดถูกยับยั้ง ลักษณะเช่นนี้เป็นประโยชน์ เมื่อใช้ SO_2 เป็นตัวทำละลายเชื้อที่ปะปนมาและการมี SO_2 ตกค้างอยู่จะไม่มีผลต่อการเจริญของ *Zymomonas*

8. ลักษณะการตกตะกอนของเซลล์

เซลล์ *Zymomonas* เมื่อเจริญจะมีการจับตัวตกตะกอน เรียกลักษณะนี้ว่า flocculation ซึ่งเหมาะและสะดวกในการแยกเซลล์หลังจากการหมัก

2.5 ประเภทของการหมัก

2.5.1 กระบวนการหมักแบบกะ (Batch fermentation)

กระบวนการหมักแบบกะ เป็นกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในระบบปิดที่มีสารอาหารเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ และเลี้ยงเชื้อภายใต้ภาวะที่เหมาะสม เป็นกระบวนการหมักที่ไม่มีการเติมสารอาหารเพิ่มลงไปในระหว่างกระบวนการหมัก เซลล์จะเจริญจนกระทั่งองค์ประกอบของสารอาหารที่จำเป็นหมดไปหรือเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม เนื่องจากเกิดการสะสมของสารพิษที่เกิดขึ้นในกระบวนการผลิตหรือค่าความเป็นกรดเบสมีการเปลี่ยนแปลงเป็นต้น การเจริญของเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบกะ แบ่งออกได้เป็น 4 ระยะ

1. ระยะพักตัว (lag phase) ระยะนี้จะเริ่มเมื่อมีการใส่จุลินทรีย์ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นระยะที่เซลล์ยังไม่มีการเจริญ เนื่องจากจุลินทรีย์กำลังทำการปรับตัว เพื่อให้สามารถเจริญได้ในสิ่งแวดล้อมใหม่ ระยะนี้จะใช้เวลานานเท่าใดขึ้นอยู่กับลักษณะและความสามารถของจุลินทรีย์แต่ละชนิด
2. ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) เป็นระยะที่เซลล์หลังจากทำการปรับสภาพเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้แล้วจะมีการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์ตามลำดับจนกระทั่งคงที่
3. ระยะการเจริญคงที่ (stationary phase) เมื่อสิ้นสุดระยะการเจริญแบบทวีคูณ อัตราการเจริญจะลดลงจนกระทั่งเป็นศูนย์ ระยะนี้ความหนาแน่นของเซลล์ค่อนข้างคงที่และไม่มีการเจริญของเซลล์ หรือเซลล์อาจมีการเจริญแต่มีอัตราเจิญเท่ากับอัตราการตาย ซึ่งการที่เซลล์หยุดการเจริญเนื่องจากสารอาหารที่จำเป็นถูกใช้จนหมดไป การสะสมสารพิษในกระบวนการที่จำเป็นถูกใช้จนหมดไป การสะสมสารพิษในระหว่างกระบวนการหมัก หรือสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงเชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น ค่าความเป็นกรดเบส

4. ระยะการเจริญแบบลดลง (death phase) เป็นระยะที่จุลินทรีย์มีระดับการตายมากกว่าอัตราการเจริญ

2.5.2 กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ (กึ่งกะfermentation)

กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ คือกระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ โดยมีการเติมสารอาหาร 1 ครั้งหรือมากกว่าลงไปในระหว่างกระบวนการหมักในระหว่างการเพาะเลี้ยงเชื้อ แต่ไม่มีการนำของเหลวที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อออกจากระบบจนสิ้นสุดการหมัก ปริมาตรของของเหลวในกระบวนการหมักแบบนี้จะเพิ่มขึ้น ความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมลงไปในระหว่างกระบวนการหมักสามารถควบคุมได้โดยการเปลี่ยนอัตราการเติมอาหาร และความเข้มข้นของสารอาหารที่จะเติมลงไป ดังนั้นกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ จึงได้เปรียบกว่ากระบวนการหมักแบบกะ

กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทโดยเทคนิคการเติมสารอาหาร โดยจุดประสงค์หลักของการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ คือการควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นวิธีการป้อนสารอาหารให้เหมาะสมจะมีผลต่อประสิทธิภาพในการหมัก

ข้อดีของกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ เมื่อเปรียบเทียบกับการหมักแบบกะ

1. กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ สามารถแก้ปัญหาการเกิด substrate inhibition หรืออาหารมีความเข้มข้นมากเกินไปจนทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญได้โดยทยอยเติมสารอาหารดังกล่าวลงไป ซึ่งทำให้ความเข้มข้นของสารอาหารไม่สูงเกินไป
2. สามารถเพาะเลี้ยงเพื่อให้ได้เซลล์ที่มีความหนาแน่นสูง เนื่องจากการเพาะเลี้ยงแบบกะ ที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทสูง อาจไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ ทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ต่ำ
3. ป้องกันการเกิด catabolite repression คือเมื่อทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ให้พลังงานอย่างรวดเร็ว เช่น กลูโคส อาจจะไปยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ ทำให้เมตาบอลิซึมของแหล่งพลังงานเกิดขึ้นได้ช้าลง ดังนั้นกระบวนการหมักแบบ กึ่งกะสามารควบคุมความเข้มข้นของสารอาหารให้ต่ำโดยแบ่งความเข้มข้นของสารที่นำเข้าแล้วทยอยเติม จะช่วยให้กระบวนการสังเคราะห์เอนไซม์ไม่ถูกยับยั้ง
4. สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์สายพันธุ์กลาย(mutant strain) ซึ่งอาจไม่สามารถสร้างสารบางชนิดได้ ให้เจริญภายใต้การควบคุมการป้อนสารอาหารที่จำเป็น เพื่อให้สามารถสะสมเมตาบอไลท์ที่ต้องการในปริมาณมากได้ ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

การให้สารอาหารที่จำเป็นในปริมาณที่มากเกินไปจะส่งผลให้มีการเจริญสูงแต่การสร้างผลิตภัณฑ์ต่ำ เนื่องจากการยับยั้งแบบ feedback inhibition

5. สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อผลิตสารที่ต้องการเมื่อเปลี่ยนภาวะการเลี้ยงเชื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.5.3 กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง (Semi-continuous fermentation)

กระบวนการหมักแบบกึ่งต่อเนื่องจะเริ่มต้นแบบการเพาะเลี้ยงแบบกะก่อน เมื่ออาหารที่ให้ในระบบใกล้จะหมด จะมีการดึงน้ำหมักบางส่วนออกจากระบบเพื่อเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ โดยจะเหลือน้ำหมักส่วนหนึ่งไว้ในถังหมัก หลังจากนั้นจะมีการป้อนสารอาหารใหม่เข้าไปในระบบในปริมาตรเท่ากับที่ดึงน้ำหมักออก เพื่อให้ปริมาตรทำงานคงที่ และเมื่ออาหารในระบบใกล้จะหมดอีก ก็จะมีการดึงน้ำหมักออกและป้อนสารอาหารเข้าไปใหม่อีกครั้ง ทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ คล้ายเป็นการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง ระบบจะเข้าสู่สภาวะที่เรียกว่า สภาวะคงที่เทียม (Pseudo-steady state) ข้อดีของกระบวนการหมักแบบนี้ คือ สามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ต่อเนื่อง ระบบไม่แพงเท่าระบบการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง และสารอาหารที่ให้เข้าไปมีการใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนข้อเสีย คือ ต้องระมัดระวังเรื่องการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตัวอื่นๆ ที่ไม่ต้องการ และต้องใช้แรงงานคนคอยดูแลติดตามการใช้อาหารของจุลินทรีย์ และการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์พร้อมกับการให้อาหารชุดใหม่

2.5.4 กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง (Continuous fermentation)

กระบวนการหมักแบบนี้จะมีการเติมอาหารให้แก่ระบบอย่างต่อเนื่อง พร้อมๆกับการมีการไหลออกของน้ำหมักอย่างต่อเนื่อง โดยมีอัตราการไหลเข้าและออกของระบบต้องไม่สูงกว่าอัตราการเจริญจำเพาะของจุลินทรีย์ เพื่อป้องกันการชะจุลินทรีย์ออกจากระบบ ทำให้ไม่มีจุลินทรีย์ในระบบการเพาะเลี้ยง การเพาะเลี้ยงในช่วงหลังจะคงที่ (Steady state) และไม่ขึ้นกับเวลา ระบบการเพาะเลี้ยงแบบนี้เหมาะกับระบบที่ต้องการการผลิตสูง

ข้อดีของการหมักแบบต่อเนื่อง

1. สามารถควบคุมและรักษาอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ได้
2. สามารถศึกษาถึงผลของการเปลี่ยนพารามิเตอร์ทางเคมีและกายภาพต่อการเจริญและการก่อเกิดผลิตภัณฑ์ที่อัตราการเจริญคงที่
3. สามารถรักษาระดับความเข้มข้นของมวลชีวภาพให้คงที่โดยการแปรค่าอัตราเจือจาง (dilution rate)

ข้อเสียของการหมักแบบต่อเนื่อง

1. ไม่เหมาะกับการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีความสัมพันธ์กับการเจริญ
2. การเจริญแบบต่อเนื่องในช่วงเวลานานอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เกิดจากการแทนที่ของสายพันธุ์อื่นที่เจริญได้เร็วกว่า
3. การเจริญในช่วงเวลานานอาจเกิดปัญหาการปนเปื้อน

Shene และ Bravo (2001) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลและซอบิทอล โดย *Z. mobilis* CP4 โดยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ซึ่งมีการแปรผันปัจจัย คือปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส น้ำตาลฟลุคโตส อัตราการให้อากาศและอัตราการเติมอาหาร พบว่าถ้ามีการให้อากาศในระหว่างกระบวนการหมักจะส่งผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่ในทางตรงกันข้ามความเข้มข้นของเอทานอลจะต่ำเมื่ออยู่ในภาวะที่มีการให้อากาศ โดยจะมีค่าการนำน้ำตาลไปใช้ในการเจริญและผลิตเอทานอล 0.032 กรัมต่อกรัม และ 0.411กรัมต่อกรัม ตามลำดับ และในการศึกษาของ Toma (2002) ทำการศึกษาผลของอัตราการกวนต่อการผลิตเอทานอลโดยทำการแปรผันอัตราการกวนเป็น 300 500 700 900 1100 รอบต่อนาที ตามลำดับ พบว่าจำนวนเซลล์เมื่อทำการกวน 1100 รอบต่อนาที จะมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่าของอัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที แต่ก็พบว่าภายใต้อัตราการกวนที่สูงอัตราการนำกลูโคสไปใช้และการสังเคราะห์เอทานอลมีอัตราที่ต่ำ

Cazetta และคณะ (2007) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลโดย *Z. mobilis* จาก sugarcane molasses โดยการหมักแบบกะและ ใช้การทดลองแบบแฟคตอเรียล มาใช้ในการหาภาวะที่เหมาะสมโดยแปรผันปัจจัยในการศึกษา 4 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของโมลาสตั้งต้น อุณหภูมิ อัตราการกวน และระยะเวลาในการหมัก ซึ่งผลจากการทดลองแบบแฟคตอเรียลพบว่าอัตราการกวนให้อากาศเป็นผลเสียต่อการผลิตเอทานอล ส่วนภาวะที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตเอทานอลจะอยู่ที่ ความเข้มข้นของน้ำตาลโมลาส 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 48 ชั่วโมง จะสามารถผลิตเอทานอลได้ 55.8 กรัมต่อลิตร และจากการทดลองยัง

พบว่าค่าความเป็นกรดด่างไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดการทดลอง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าโมลาสมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์

2.6 Factorial design

การทดลองแบบแฟคตอเรียล (factorial experiment) เป็นการทดลองหลายปัจจัยประเภทหนึ่ง ซึ่งนอกจากจะทำให้สามารถศึกษาอิทธิพลของแต่ละปัจจัยตามต้องการได้แล้ว ยังทำให้ทราบข้อมูลที่สำคัญที่ไม่สามารถจะหาได้จากการทดลองปัจจัยเดียว นั่นคือ รู้เกี่ยวกับอิทธิพลร่วม หรือปฏิสัมพันธ์ (interaction) ระหว่างปัจจัย

ทรีทเมนต์ที่ใช้ในการทดลองแบบแฟคตอเรียล เกิดจากการนำระดับ (levels) ของปัจจัยตั้งแต่สองปัจจัยขึ้นไปมาใช้รวมกัน ทำให้เกิดเป็นทรีทเมนต์คอมบิเนชั่น (treatment combination) ดังนั้นการทดลองแบบแฟคตอเรียล จึงเป็นเพียงการจัดรูปของทรีทเมนต์ที่ใช้ทดลองใหม่เท่านั้น

สัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลองแบบแฟคตอเรียล

การทดลองแบบแฟคตอเรียลเป็นการทดลองที่มีปัจจัยที่ต้องการศึกษาตั้งแต่ 2 ปัจจัยขึ้นไป โดยปัจจัยแต่ละปัจจัยจะมีจำนวนระดับตั้งแต่ 2 ระดับ สัญลักษณ์ที่ใช้ในการทดลองแบบแฟคตอเรียลที่นิยมใช้โดยทั่วไปอาจกำหนดได้ดังนี้

1. อักษรตัวใหญ่ (A , B , C ,...) แทนชื่อของปัจจัย (factor) เช่น ใช้ A แทนปัจจัยเกี่ยวกับความเข้มข้น และใช้ B แทนปัจจัยเกี่ยวกับระยะเวลา ในบางกรณีผู้ทดลองอาจใช้ตัวอักษรที่สื่อความหมายของปัจจัยนั้นๆแทน เช่น ใช้ C แทนปัจจัยเกี่ยวกับความเข้มข้น (concentration) และใช้ T แทนปัจจัยเกี่ยวกับระยะเวลา (time)
2. ใช้อักษรตัวเล็กพร้อมทั้งมีตัวเลขเป็นตัวห้อย (subscript) แทนระดับของปัจจัย
3. ถ้ากำหนดให้ปัจจัย A มีจำนวนระดับเท่ากับ a และปัจจัย B มีจำนวนระดับ b จะเรียกชื่อการทดลองเป็น a*b แฟคตอเรียล ดังนั้นการทดลองแบบ 2*3 แฟคตอเรียลจึงหมายถึงการทดลองที่มี 2 ปัจจัย โดยปัยจัยแรกมี 2 ระดับและปัจจัยที่สองมี 3 ระดับ โดยมีทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นเป็น a1b1 , a1b2 , a1b3 , a2b1 , a2b2 และ a2b3 ซึ่งจะมีจำนวนทรีทเมนต์คอมบิเนชั่นที่ใช้ทดลองเท่ากับ 6 ทรีทเมนต์ ซึ่งได้จากผลคูณระดับของแต่ละปัจจัย

อิทธิพลหลักและอิทธิพลร่วม

อิทธิพลของทรีทเมนต์ที่เกิดขึ้นในการทดลองแบบแฟคตอเรียล ที่เรียกว่า อิทธิพลของแฟคตอเรียล (factorial effects) อาจแยกได้เป็น 2 ประเภทคือ

1. อิทธิพลหลัก (main effects) ซึ่งเป็นอิทธิพลของปัจจัยแต่ละปัจจัย เช่น อิทธิพลหลักของปัจจัย A (A effect) จะหมายถึงความแตกต่างระหว่างระดับของปัจจัย A
2. อิทธพลร่วม (interactions) ซึ่งเป็นอิทธิพลของปัจจัยตั้งแต่ 2 ปัจจัยขึ้นไปซึ่งเกิดร่วมกันหรือมีปฏิกิริยาสัมพันธ์ต่อกัน เช่น อิทธิพลร่วมของ 2ปัจจัย (two-factor interactions)

2.7 การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง (Response Surface Design)

การออกแบบพื้นที่การตอบสนองเป็นเทคนิคหนึ่งที่นับว่ามีประโยชน์อย่างมากต่อการออกแบบในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ เป็นวิธีการที่สามารถประยุกต์ได้กับการพัฒนาทั้งสูตรการผลิตและกระบวนการผลิตของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการพัฒนา สามารถหาจุดที่เหมาะสมจากข้อมูลที่ได้จากการทดลองในรูปแบบการวางแผนการทดลองต่างๆ ทำให้นักพัฒนาผลิตภัณฑ์สามารถตัดสินใจจุดที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นแนวทางในการปฏิบัติในงานการผลิตในอุตสาหกรรม รวมทั้งใช้เป็นแนวทางในการปรับสูตร และกระบวนการผลิตที่เกิดจากการผลิตที่มีการเปลี่ยนแปลงกลไกบางอย่างในอุตสาหกรรม (ไพโรจน์ วิริยจารี, 2544)

ปัจจุบันมีความสนใจในการออกแบบเพื่อหาความสอดคล้องกับพื้นที่การตอบสนอง และประเมินความเหมาะสมในการทดลอง การออกแบบที่เรียกว่า Response Surface Design (RSD) และการวิเคราะห์ได้ถูกนำมาใช้เพื่อค้นหาคำตอบของการทดลองที่ประกอบด้วยจำนวนปัจจัยร่วมการทดลองหลายปัจจัย ซึ่งจะนำไปสู่การค้นพบการตอบสนองที่เหมาะสมที่สุด

การตอบสนองที่เหมาะสมสามารถพิจารณาได้ใน 2 ลักษณะ คือ การตอบสนองที่มากที่สุด (Maximum) หรือการตอบสนองที่ต่ำที่สุด (Minimum) ขึ้นอยู่กับการทดลอง วิธีนี้ได้ถูกพัฒนาขึ้นครั้งแรกและอธิบายโดย Box และ Wilsen (1951) ต่อมา Bradley (1958) ได้เขียนอธิบายเป็นเครื่องมือทางคณิตศาสตร์ และสถิติที่ใช้ในการกำหนดวิธีการของพื้นที่การตอบสนอง (Response surface methodology)

วิธีการของพื้นที่การตอบสนอง ประกอบด้วย กลุ่มของเทคนิคที่ใช้ในการศึกษาจากค่าสังเกตเพื่อกำหนดความสัมพันธ์ระหว่างค่าตอบสนอง (Response variable) ที่วัดได้ 1 หรือ 2 ค่า เช่น ผลผลิต ดัชนีค่าสี และความหนืด กับตัวแปรที่ใช้ในการทดลอง (Input variables) เช่น เวลา อุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส และความเข้มข้นของน้ำตาล เทคนิคดังกล่าว ได้ใช้เพื่อให้คำตอบต่างๆ เช่น

1. ค่าตอบสนองได้รับผลกระทบจากชุดสิ่งทดสอบบนพื้นที่เฉพาะที่น่าสนใจบางอย่างได้อย่างไร
2. ถ้าจำเป็น ชุดของสิ่งทดลองอะไรที่จะให้ผลิตภัณฑ์หนึ่งเป็นที่น่าพอใจตรงตามข้อกำหนดจำเพาะพร้อมๆกัน
3. ค่าอะไรของสิ่งทดลองที่จะให้ผลผลิตในจุดสูงสุดของพื้นที่เฉพาะหนึ่งๆ และพื้นที่การตอบสนองอะไรที่ใกล้กับค่าสูงสุดนี้ได้

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล

2.8.1 สารตั้งต้น

สิ่งที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในกระบวนการหมัก สามารถแบ่งออกเป็น 3 ชนิดหลักๆตามชนิดของวัตถุดิบ คือ

1. วัตถุดิบจำพวกน้ำตาล เช่น อ้อย โมลาส และผลไม้ต่างๆ ซึ่งจะสามารถถูกนำไปใช้ในการสร้างเอทานอลได้โดยตรง
2. วัตถุดิบจำพวกแป้ง เช่น ข้าวโพด มันสำปะหลัง ข้าว ปลายข้าว ซึ่งจะต้องถูกนำไปเปลี่ยนจากแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล (hydrolyzed) โดยเอนไซม์ หรือรา เสียก่อนเพื่อให้ง่ายแก่การนำไปใช้ในการผลิตเอทานอล
3. วัตถุดิบจำพวกเซลลูโลส เช่น ไม้ กากวัตถุดิบทางการเกษตร ซึ่งจะต้องมีการเปลี่ยนเซลลูโลสให้กลายเป็นน้ำตาลโดยกรด ซึ่งค่อนข้างนุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายเพิ่มขึ้น

2.8.2 ความเป็นกรดเบส

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า ความเป็นกรดเบส มีผลอย่างมากในการผลิตเอทานอลโดย *Z. mobilis* ซึ่งค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมในการผลิตจะขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *Z. mobilis* รวมถึงสารตั้งต้นที่ใช้อีกด้วย เพราะเมื่อเริ่มกระบวนการหมักจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก จะมีค่าความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ซึ่งจะส่งผลต่อเซลล์ในการผลิตเอทานอล ผลการศึกษาของ (Cazetta และคณะ, 2007) ได้ผลิตเอทานอล โดยใช้ molass เป็นสารตั้งต้น พบว่า molass มีความเป็นเบส เพราะในระหว่างกระบวนการผลิต ความเป็นกรดเบส ไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก แต่โดยทั่วไป *Z. mobilis* จะสามารถผลิตเอทานอลได้อยู่ในช่วงที่มีค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.0-7.0 และจะไม่สามารถผลิตได้เลยเมื่อค่าความเป็นกรดเบสต่ำกว่า 3.5 (Torres และ Baratti, 1987)

Tao (2005) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *Z. mobilis* ที่นำไปทำการกลายพันธุ์ให้มีความทนต่อความเป็นกรด และนำไปเลี้ยงที่ pH เท่ากับ 4.5 โดยทำการเปรียบเทียบถึงปัจจัยของอาหารที่ใช้เลี้ยงโดยนำไปเลี้ยงในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อาหารที่ผ่านการกรอง และอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยผลการทดลองปรากฏว่า ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้มีค่าใกล้เคียงกันคือ อาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อผลิตเอทานอลได้ 73.1กรัมต่อลิตร และอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อผลิตเอทานอลได้ 70.3 กรัมต่อลิตร

2.8.3 แหล่งไนโตรเจน

ในรายงานต่างๆพบว่า แหล่งไนโตรเจนนั้นมีผลต่อการเพิ่มการเจริญของเซลล์ โดย Zhang และคณะ (2010) ได้ศึกษาผลของความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อกระบวนการผลิตเอทานอลโดย *Z. mobilis* พบว่า การให้แหล่งคาร์บอนที่มีปริมาณที่เพียงพอ และให้แหล่งไนโตรเจนในปริมาณมาก มีผลช่วยเพิ่มการเจริญของ *Z. mobilis* และมีผลต่อการผลิตเอทานอล

2.8.4 อัตราการกวนให้อากาศ

Toma และคณะ (2003) ได้ศึกษาถึงผลของอัตราการกวนต่อการเจริญและการผลิตของเอทานอลของ *Z. mobilis* 113s โดยทำการแปรผันอัตราการกวนตั้งแต่ 300 ถึง 1,100 รอบต่อนาที พบว่า เมื่ออัตราการกวนเพิ่มมากขึ้น อัตราของน้ำตาลกลูโคสที่ถูกนำไปใช้ก็จะลดลง และพบว่า

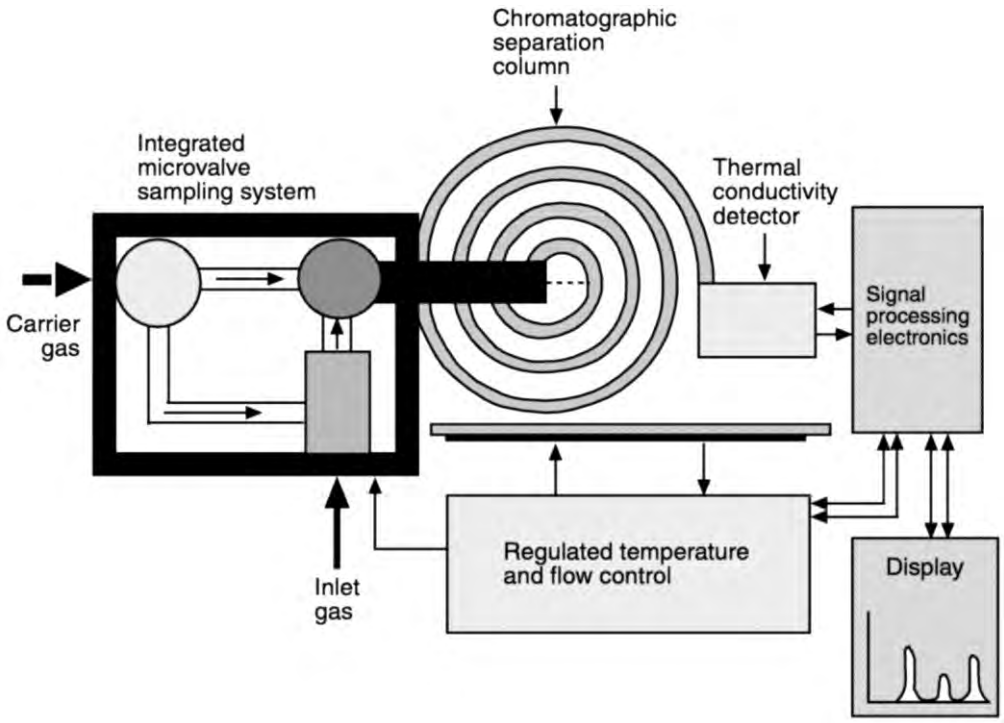
ปริมาณเซลล์ที่อัตราการกวน 1,100 รอบต่อนาที มีค่าเป็นสองเท่าของอัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที ในขณะที่อัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสและการผลิตเอทานอลมีค่าต่ำกว่าอัตราการกวนที่ 300 รอบต่อนาที และจากการศึกษาของ (Cazetta และคณะ, 2007) ที่ผลิตเอทานอลโดย *Z. mobilis* โดยศึกษาความเข้มข้นของสารตั้งต้น ค่าความเป็นกรดเบส อัตราการกวนให้อากาศ และเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ พบว่า อัตราการกวนให้อากาศส่งผลต่อการเจริญของเชื้อ และการผลิตเอทานอล

Bandaru (2005) ได้ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากแป้งสาคูโดยนำกระบวนการคำนวณทางสถิติเข้ามาช่วยในการทดลอง โดยในการทดลองกำหนดปัจจัยที่จะหาภาวะคือ อุณหภูมิ ความเป็นกรดเบส และเวลาในการผลิต โดยในการทดลองใช้ *Z. mobilis* MTCC92 โดยเอทานอลที่ผลิตได้มีความเข้มข้นสูงสุดที่ 55.3 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แป้งสาคูความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 32.4 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเบสเท่ากับ 4.93 และเวลาในการผลิต 17.24 ชั่วโมง

Hazgzhi (2008) ได้ทดลองใช้ *Z. mobilis* GZNS1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนความเป็นกรด ในการหมักเศษอาหารที่ได้จากโรงอาหารโดยไม่นำเศษอาหารไปผ่านการฆ่าเชื้อ และทำการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ปกติที่ถูกนำมาหมักกับเศษอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่ pH เท่ากับ 6 จะได้เอทานอล 52 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีปริมาณใกล้เคียงกับ *Z. mobilis* GZNS1 ที่นำไปหมักกับเศษอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อและหมักที่ pH เท่ากับ 4 คือ 48 กรัมต่อลิตร และมีค่ามากกว่า *Z. mobilis* GZNS1 ที่หมักในอาหารที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อเล็กน้อย คือ ได้เอทานอล 46 กรัมต่อลิตร

2.9 **การวิเคราะห์เอทานอล โดยวิธีก๊าซโครมาโทกราฟี** (Gas Chromatography ;GC)

ก๊าซโครมาโทกราฟี เป็นวิธีแยกสารผสมที่สามารถระเหยกลายเป็นไอได้โดยผ่านเข้าไปในคอลัมน์ที่ใช้แยก ซึ่งภายในบรรจุเฟสอยู่กับที่ (Stationary phase) ซึ่งเป็นของแข็ง หรือของเหลวก็ได้ ส่วนประกอบต่างๆของเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี แสดงดังรูปที่ 2.8



รูปที่ 2.8 แสดงระบบการทำงานของเครื่องก๊าซโครมาโทกราฟี

ที่มา : http://www.nap.edu/books/0309075556/xhtml/media/p20004753g94001.jpg

2.9.1 หลักการของก๊าซโครมาโทกราฟี

หลักการของก๊าซโครมาโทกราฟี คือ ก๊าซซึ่งเป็นเฟสเคลื่อนที่ หรือตัวพา จะถูกปล่อยออกจากถังที่ควบคุมความดัน สารตัวอย่างที่เป็นของเหลวจะถูกฉีดเข้า ก๊าซจะพาสารตัวอย่างซึ่งจะระเหยเป็นก๊าซเข้าไปในคอลัมน์ จะเกิดการแยกของสารตัวอย่างนั้น แล้วมายังเครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) จากนั้นสัญญาณที่ได้จะถูกส่งไปยังเครื่องบันทึกสัญญาณ เขียนออกมาเป็นโครมาโทแกรม

2.9.2 เครื่องมือก๊าซโครมาโทกราฟี

1. ก๊าซตัวพา (carrier gas) เป็นก๊าซที่ใช้พาสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปยังคอลัมน์แล้วออกไปสู่เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) ก๊าซที่ใช้จะต้องเฉื่อยต่อปฏิกิริยา ไม่ทำให้สารตัวอย่าง หรือสารในคอลัมน์เปลี่ยนไป เหมาะสมกับเครื่องตรวจวัดสัญญาณที่มีค่าการกระจายตัวต่ำ หรือมีน้ำหนักโมเลกุลสูง มี

ความบริสุทธิ์สูง และราคาถูก ก๊าซที่นิยมใช้ได้แก่ ไฮโดรเจน ฮีเลียม และไนโตรเจน

2. ช่องฉีดสาร (injector port) สารตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าสู่คอลัมน์ด้วยเข็มฉีดผ่านทางส่วนนี้ โดยผ่านยางกันรั่ว (septum) ส่วนของช่องฉีดสารนี้ จะให้ความร้อนสูงพอที่จะระเหยสารตัวอย่างที่ฉีดเข้าไปได้ ในกรณีที่ตัวอย่างเป็นของเหลว
3. คอลัมน์ (column) คอลัมน์ทั่วไปเป็นท่อยางทำด้วยโลหะ หรือแก้ว ภายในบรรจุสารที่ช่วยในการแยก (stationary phase) ปลายข้างหนึ่งติดกับช่องฉีดสาร (injector port) ส่วนอีกด้านหนึ่งต่อกับ detector และคอลัมน์ต้องอยู่ในตู้ให้ความร้อน (oven) เพื่อให้สารเป็นไออยู่ตลอดเวลา
4. เครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดปริมาณสารตัวอย่างที่ได้จากการแยกของคอลัมน์ และถูกพาโดยก๊าซตัวพา ในเครื่องตรวจวัดสัญญาณ ต้องให้ความร้อนสูงพอที่จะไม่ให้ตัวอย่างตกค้างในเครื่อง โดยปกติอุณหภูมิต้องสูงกว่าในคอลัมน์ประมาณ 10 องศาเซลเซียส ส่วนสมบัติของเครื่องตรวจวัดสัญญาณที่ดีต้องมีความว่องไวสูง ตรวจวัดสารปริมาณน้อยๆได้ดี วัดสารได้มากชนิด มีการตอบสนองที่ถูกต้อง ไม่ไวต่อการเปลี่ยนแปลงความดันของก๊าซ และอุณหภูมิ และต้องมีราคาถูก ที่นิยมใช้กันมากมี 2 ชนิดได้แก่ Flame Ionization Detector (FID) และ Thermal Conductivity Detector (TCD)
5. เครื่องบันทึกสัญญาณ (recorder) ทำหน้าที่แปลงสัญญาณจากเครื่องตรวจวัดสัญญาณ (detector) ออกมาเป็นโครมาโทแกรม สามารถหาความสูง หรือคำนวณพื้นที่ได้

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์และวิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. กล้องจุลทรรศน์คอมพาวด์ไมโครสโคป (compound microscope) Olympus รุ่น BX51 ของบริษัท Olympus optical Co.,Ltd., Japan
2. กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) Olympus รุ่น SZ60 ของบริษัท Olympus optical Co.,Ltd., Japan
3. กล้องดิจิตอล Olympus รุ่น DP71 ของบริษัท Olympus optical Co.,Ltd., Japan
4. ลูปเขี่ยเชื้อ
5. ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ของบริษัท PYREX
6. หลอดทดลอง (test tube) ของบริษัท PYREX
7. กระบอกตวง (Cylinder) ของบริษัท PYREX
8. บีกเกอร์ (Beaker) ของบริษัท PYREX
9. หลอดทดลองฝาเกลียว (screw-cap tube) ของบริษัท PYREX
10. เครื่องกำเนิดเสียงความถี่สูง ชนิดอ่าง รุ่น Soronex RK 100 ของบริษัท Bandelin Electronic, Germany
11. เครื่องเขย่า รุ่น Innova 2300 ของบริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA
12. เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ รุ่น Innova 4330 ของบริษัท New Brunwick Scientific Co., Inc., Edison, N.J., USA และรุ่น Gyromax 707R ของบริษัท Amerex Instruments, Inc., USA
13. เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG 2002-S และรุ่น PG 6002-S ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
14. เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น AG 204 และรุ่น AG 285 ของบริษัท Mettler Toledo Co., Ltd., Switzerland
15. เครื่องดูดอากาศ รุ่น A3-S ของบริษัท Eyela, Japan

16. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 และรุ่น ES-315 ของบริษัท Tomy Seiko Ltd., Japan รุ่น MLS 3020 ของบริษัท Sanyo Co., Ltd., Japan และรุ่น HV-25 ของบริษัท Hirayama Co., Ltd., Japan
17. เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (High speed refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota Corp., Tokyo, Japan
18. เครื่องปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (micro centrifuge) รุ่น Spectrafuge ของบริษัท National Labnet, Co., Edison, USA
19. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดตั้งโต๊ะ (bench-top centrifuge) รุ่น Mikro20 ของบริษัท Hettich zentrifugen, Germany
20. เครื่องวัดความเป็นกรดเบส (pH meter) รุ่น Cuberscan 1000 ของบริษัท Eutech Cybermatics, Singapore
21. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Spectronic 20 Genesys ของบริษัท Spectronic Unicam, USA, รุ่น Gensys 20 ของบริษัท Thermo Spectronic, USA และรุ่น Perkin Elmer instruments Lamda 25 UV/VIS Spectrometer ของบริษัท PerkinElmer, Inc., USA
22. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น K-550 GE ของบริษัท Scientific Industries, USA
23. ตู้เขี่ยเชื้อ ISSCO รุ่น BV-124, ของบริษัท International Scientific Supply Co., Ltd., Thailand, รุ่น Clear รุ่น V3-4 ของบริษัท Triwork 2000 Co., Ltd., Thailand และ Bosstech รุ่น HVB 120S ของบริษัท Boss Scientific Associate L.P., Thailand
24. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ของบริษัท Forma Scienctific, USA และ Sanyo Electric, Japan
25. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo Electric, Japan
26. ตู้แช่เย็น (freezer) อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของบริษัท Sanyo, Japan
27. ตู้อบความร้อนแห้ง (Hot air oven) รุ่น UE 600 ของบริษัท Memmert, Germany
28. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, Germany
29. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BE800 ของบริษัท Memmert, Germany
30. โถดูดความชื้น (desiccator)
31. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath)
32. ไมโครปิเปต (Micropipette) รุ่น P20, P100, P200, P1000, P5000 และP10000 ของบริษัท Gilson, France

33. ปิเปตทิป (Pipette tip) ขนาด 1-200 ไมโคลิตร, 1 ml, 5 ml และ 10 ml ของบริษัท Axygen Scientific, USA
34. หัวกรองชนิดเซลลูโลสอะซิเตต ขนาดความกว้างของรูกรอง 0.20 ไมครอน รุ่น SF-W13 ของบริษัท Gat Asia, Ltd., Hong Kong
35. ฮีมาไซโทมิเตอร์ ของบริษัท Schott Duran, Germany
36. ชุดเครื่องก๊าซโครมาโตรกราฟี (Gas Chromatography) รุ่น 3400C ของบริษัท Varian, USA
37. แคปพิลลารีคอลัมน์ (capillary column) ชนิด cabowax-PEG ขนาด 60 m×25 mm ID× 25 μm Df
38. ชุดเครื่องไฮเพอร์ฟอร์แมนซ์ลิควิดโครมาโทกราฟี (HPLC) สำหรับวิเคราะห์น้ำตาล กรดออร์แกนิค และแอลกอฮอล์ ของบริษัท Bio-Rad.
39. คอลัมน์ชนิด HPX-42C ขนาด 300 x 7.8 มิลลิเมตร ของบริษัท Bio-Rad.
40. เข็มฉีดสารตัวอย่าง ขนาด 100 ไมโครลิตร รุ่น EXMSR 100 ของบริษัท ITO Corporation, Japan
41. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร ของบริษัท นิโปร (ประเทศไทย) จำกัด
42. ถังหมัก (Fermentor) ขนาด 2 ลิตร ของบริษัท B.E. Marubishi. Japan

3.2 เคมีภัณฑ์

1. กลูโคส (Glucose) ของบริษัท Merk, Germany
2. กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท Merck, Germany
3. แบคโตเพปโตน (Bacto peptone) ของบริษัท Difco Laboratory, USA
4. แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Merck, Germany
5. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany
6. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany
7. สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) บริษัท Labscan Asia, Co., Ltd., Ireland
8. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Merck, Germany
9. แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) บริษัท Merck, Germany
10. กรดซัลฟูริก (H_2SO_4) บริษัท Merck, Germany
11. กรดไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัท Merck, Germany

12. กรดซัลฟูริกเข้มเข้น (H_2SO_4) ของบริษัท Merck, Germany
13. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ของบริษัท Merck, Germany
14. เมทานอล (Methanol) ของบริษัท Merk, Germany
15. เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท J.T. Baker. USA
16. บิวทานอล (Butanol) ของบริษัท Merk, Germany
17. กรดไดไนโตรสาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid) ของบริษัท Fluka Chemika, Switzerland
18. วุ้นผง (agar) ของบริษัท บิกเบน โปรดัคตอรา เดอ อะการ์ เอส.เอ., Chile
19. ก๊าซไฮโดรเจน (H_2) ของบริษัท PRAXAIR, Thailand
20. ก๊าซออกซิเจน (O_2) ของบริษัท TIG (Thai Industrial Gas), Thailand
21. ก๊าซไนโตรเจน (N_2) ของบริษัท PRAXAIR, Thailand

3.3 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.3.1 การเลี้ยงและการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

3.3.1.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย คือ *Zymomonas mobilis* TISTR 405 จากศูนย์รวมพันธุ์จุลินทรีย์ สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (TISTR Culture Collection Bangkok MIRCEN) เลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียง Z (*Zymomonas* medium) (ภาคผนวก ก) ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการถ่ายเชื้อทุก 3 สัปดาห์

3.3.1.2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัย

เขี่ยเชื้อแบคทีเรีย สายพันธุ์ *Z. mobilis* TISTR 405 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Z medium (ภาคผนวก ก) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จนกระทั่งวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 550 นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.2 นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำมาละลายเซลล์กลับในอาหารเหลวชนิดเดียวกับข้างต้น ที่มีกลีเซอรอลอยู่ 15% และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.3.2 การเก็บตัวอย่างลูกแป้ง

รวบรวมตัวอย่างลูกแป้งจากแหล่งต่างๆทั่วประเทศ ได้แก่ จังหวัดแพร่ เพชรบุรี สุพรรณบุรี สระบุรี เชียงใหม่ ชุมพร อุบลราชธานี กรุงเทพมหานคร และศรีสะเกษ โดยเก็บรักษาในถุงพลาสติกซิปล็อค แยกไม่ให้ปะปนกัน และนำไปเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และก่อนนำลูกแป้งไปทดลองต้องนำตัวอย่างลูกแป้งออกมาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำมาบดให้เป็นผงละเอียดโดยใช้โกร่งที่ฆ่าเชื้อแล้ว นำไปชั่งตัวอย่างตามที่ระบุเพื่อเตรียมใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

3.3.3 การเตรียมปลายข้าวเหนียวนึ่งและการหมักปลายข้าวเหนียวนึ่งกับลูกแป้ง

ใช้ปลายข้าวเหนียว 50 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปคลุกเคล้ากับตัวอย่างลูกแป้งบดละเอียด ปริมาณ 1 กรัม

3.3.4 การเตรียมตัวอย่างน้ำต้อยสำหรับนำไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาล

ทำการเก็บตัวอย่างเพื่อวัดความเข้มข้นของน้ำตาล โดยนำตัวอย่างน้ำต้อยไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที แล้วนำส่วนน้ำใสไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลตามวิธีดังข้อ 3.3.5 และ 3.3.6

3.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี Dinitrosalicylic acid (Miller, 1959)

นำน้ำต้อยที่ผลิตได้มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นจนมีความเข้มข้นที่เหมาะสม จากนั้นนำตัวอย่างน้ำต้อยปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาเติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid หรือ DNSA reagent, ภาคผนวก ข) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นทันทีโดยแช่ในอ่างน้ำแข็ง แล้วเติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานระหว่างกลูโคสและค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ภาคผนวก ค) หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร

3.3.6 ศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยวิธี 2^n factorial design analysis (Cazetta และคณะ 2005)

3.3.6.1 การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อโดยถ่ายแบคทีเรียสายพันธุ์ *Z. mobilis* TISTR 405 จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงจากข้อ 3.3.1.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Z medium (ภาคผนวก ก) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่าให้อากาศ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับค่าการดูดกลืนแสง ที่ 550 นาโนเมตร ให้มีค่า 0.2 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนเป็นส่วนประกอบ เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการทดลองต่อไป

3.3.6.2 ระดับความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Z. medium (ภาคผนวก ก) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็น 10เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยแปรผันระดับความเข้มข้นของน้ำตาลในช่วง 100 และ 200 กรัมต่อลิตร แล้วนำไปบ่มในอุณหภูมิต่างๆ ตามตารางที่ออกแบบโดยใช้ 2^n factorial design analysis (ภาคผนวก ง)

3.3.6.3 ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Z. medium (ภาคผนวก ก) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็น 10เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยแปรผันค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 5.5 – 6.5 แล้วนำไปบ่มในอุณหภูมิต่างๆ ตามตารางที่ออกแบบโดยใช้ 2^n factorial design analysis (ภาคผนวก ง)

3.3.6.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล

ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Z. medium (ภาคผนวก ก) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็น 10เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในช่วง 25 – 35 องศาเซลเซียส แล้วนำไปบ่มในอุณหภูมิต่างๆ ตามตารางที่ออกแบบโดยใช้ 2^n factorial design analysis (ภาคผนวก ง)

3.3.6.5 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมักเอทานอล

ถ่ายเชื้อจากหัวเชื้อตั้งต้นที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Z. medium (ภาคผนวก ก) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 125 มิลลิลิตร ให้มีปริมาตรรวมเป็น 50 มิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็น 10เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร โดยแปรผันระยะเวลาที่ใช้ในการหมักในช่วง 24 – 48 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มในอุณหภูมิต่างๆ ตามตารางที่ออกแบบโดยใช้ 2^n factorial design analysis (ภาคผนวก ง)

3.3.6.6 วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลอง 2^n factorial design analysis จากข้อ 3.3.6.1 ถึงข้อ 3.3.6.4 ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้โปรแกรม statistica version 8

3.3.7 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตเอทานอลในระดับขวดทดลอง

เตรียมหัวเชื้อโดยถ่ายแบคทีเรียสายพันธุ์ *Z. mobilis* TISTR 405 จากหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอียงจากข้อ 3.3.1.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Z medium (ภาคผนวก ก) ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยไม่มีการเขย่าให้อากาศ เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับค่าการดูดกลืนแสง ที่ 550 นาโนเมตร ให้มีค่า 0.2 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนเป็นส่วนประกอบ เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการทดลองต่อไป

3.3.8 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

เตรียมหัวเชื้อตามวิธีการทดลองในข้อ 3.3.5 โดยเปลี่ยนระดับความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Z medium (ภาคผนวก ก) เป็น 150 กรัมต่อลิตร และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส และปรับค่าความเป็นกรดเบสเท่ากับ 6.5

3.3.9 วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Z. mobilis*

นำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยพลาสติกที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว อบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้ง และคำนวณปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งในหน่วยกรัมต่อลิตร

3.3.10 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีของ Miller (1959)

นำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีดังข้อ 3.3.3.4

3.3.11 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol sulfuric acid (Dubois และคณะ, 1956)

นำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ตามวิธีดังข้อ 3.3.3.5

3.3.12 การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล

3.3.12.1 การเตรียมสารเคมี

ปิเปต absolute ethanol (99.8 %, 0.7908 กรัมต่อมิลลิลิตร) 0.253, 0.507, 0.760, 1.014 และ 1.267 ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 10 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐานเอทานอลความเข้มข้น 20, 40, 60, 80 และ 100 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จากนั้นปิเปตโพรพานอลมาตรฐาน (99.8 %, 0.8040 กรัมต่อมิลลิลิตร) มา 1.875 มิลลิลิตร ใส่ในขวดวัดปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

3.3.12.2 การเตรียมกราฟมาตรฐาน

ปิเปตสารละลายมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.3.13.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมสารละลายโพรพานอลที่เตรียมไว้หลอดละ 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำไปวิเคราะห์ด้วย (Gas chromatography; GC)

3.3.12.3 วิธีการวิเคราะห์

นำน้ำหมักปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาปั่นแยกเซลล์ โดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนน้ำใสมา 1 มิลลิลิตร เติมโพรพานอลปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็น internal standard ผสมให้เข้ากัน วิเคราะห์หาปริมาณเอทานอลโดยวิธีก๊าซโครมาโตรกราฟี (Gas chromatography) ภายใต้สภาวะดังนี้

ชนิดของคอลัมน์	: แคปพิลลารีคอลัมน์ ชนิด cabowax-PEG
	ขนาด 60 m×25 mm ID× 25 μm Df
อุณหภูมิของ injector	: 120 องศาเซลเซียส (isothermal)
อุณหภูมิของ column	: 50 องศาเซลเซียส
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	: N_2 อัตราการไหล 7.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว
ปริมาตรฉีด	: 1 ไมโครลิตร

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดเลือกตัวอย่างลูกแป้งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำต้อย

4.1.1 เก็บตัวอย่างลูกแป้งเพื่อคัดเลือกลูกแป้งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำต้อย

ตัวอย่างลูกแป้งจากแหล่งต่างๆจำนวน 10 แหล่ง สามารถรวบรวมลูกแป้งได้ทั้งหมด 26 ตัวอย่าง จากนั้นกำหนดรหัสลูกแป้ง ดังแสดงในตารางที่ 4.1ลูกแป้งทั้ง 26 ตัวอย่าง พบว่ามีลักษณะคล้ายกันทั้งหมด คือ มีลักษณะครึ่งวงกลม สีขาวนวล ขนาดประมาณ 1.5-3.5 x 3-4 ลูกบาศก์เซนติเมตร (รูปที่ 4.1)

รูปที่ 4.1 แสดงตัวอย่างลักษณะลูกแป้ง

ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างลูกแป้งที่รวบรวมได้จากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่มาของลูกแป้ง (จังหวัด)	รหัสลูกแป้ง
แพร่	แพร่ 1
	แพร่ 2
	แพร่ 3
	แพร่ 4
เพชรบุรี	เพชรบุรี 1
	เพชรบุรี 2
	เพชรบุรี 3
	เพชรบุรี 4
สุพรรณบุรี	สุพรรณบุรี 1
	สุพรรณบุรี 2
	สุพรรณบุรี 3
สระบุรี	สระบุรี 1
	สระบุรี 2
เชียงใหม่	เชียงใหม่ 1
	เชียงใหม่ 2
ชุมพร	ชุมพร 1
	ชุมพร 2
	ชุมพร 3
อุบลราชธานี	อุบลราชธานี 1
	อุบลราชธานี 2
	อุบลราชธานี 3
กทม	กทม 1
	กทม 2
ศรีสะเกษ	ศรีสะเกษ 1
	ศรีสะเกษ 2
ห้องทดลอง	LAB

4.1.2 การคัดเลือกลูกแป้งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำต้อย

หมักปลายข้าวโดยใช้ปลายข้าวเหนียวพันธุ์ กข6 ใช้ลูกแป้งจากแหล่งตัวอย่างทั้ง 26 แหล่ง โดยบดตัวอย่างลูกแป้ง 1 กรัม ใส่ในปลายข้าวเหนียวนึ่ง 50 กรัม ที่บรรจุในขวดขนาด 400 มิลลิลิตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เพื่อคัดเลือกลูกแป้งที่มีความสามารถในการเปลี่ยนของแข็ง (ปลายข้าวเหนียวนึ่ง) ให้กลายเป็นของเหลว (น้ำต้อย) และให้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (กรัมต่อลิตร) โดยเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เพื่อนำมาวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาล จากการทดลองพบว่าลูกแป้งจากทุกตัวอย่างจะให้ความเข้มข้นของน้ำต้อยสูงสุดในวันที่ 3 (ตารางที่ 4.2) เมื่อทราบปริมาณน้ำต้อยที่ผลิตได้ และทราบความเข้มข้นของน้ำตาลแล้ว จึงคัดเลือกเอาลูกแป้งที่ให้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่า 400 กรัมต่อลิตร ซึ่งในตารางที่ 4.2 จะพบว่าลูกแป้งที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกิน 400 กรัมต่อลิตร มีทั้งหมด 8 ตัวอย่าง

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการผลิตน้ำต้อยของลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ

ลำดับ	ตัวอย่างลูกแป้ง	ปริมาณน้ำต้อย (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำต้อย (กรัมต่อลิตร)
1	แพร่ 1	21.33	418.33
2	แพร่ 2	21.00	252.00
3	แพร่ 3	17.00	276.33
4	แพร่ 4	16.00	220.00
5	เพชรบุรี 1	21.33	395.00
6	เพชรบุรี 2	19.33	411.00
7	เพชรบุรี 3	21.66	376.00
8	เพชรบุรี 4	16.66	277.00
9	สุพรรณบุรี 1	25.33	270.00
10	สุพรรณบุรี 2	16.33	378.66
11	สุพรรณบุรี 3	22.33	445.33
12	สระบุรี 1	23.00	260.66
13	สระบุรี 2	18.66	382.66
14	เชียงใหม่ 1	20.33	390.66
15	เชียงใหม่ 2	21.00	347.33
16	ชุมพร 1	23.33	390.66
17	ชุมพร 2	23.33	443.33

ตารางที่ 4.2 ความสามารถในการผลิตน้ำต้อยของลูกแป้งจากแหล่งต่างๆ (ต่อ)

18	ชุมพร 3	23.66	410.33
19	อุบลราชธานี 1	24.33	416.33
20	อุบลราชธานี 2	26.33	443.66
21	อุบลราชธานี 3	22.00	354.33
22	กทม 1	17.33	342.33
23	กทม 2	21.66	404.66
24	ศรีสะเกษ 1	14.66	376.66
25	ศรีสะเกษ 2	22.00	385.33
26	LAB	15.00	375.33

หลังจากการทดลองหมักปลายข้าวโดยใช้ลูกแป้งจากสถานที่ต่างๆ จากนั้นคัดเลือกลูกแป้งที่ให้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงที่สุด 8 อันดับแรกมาทำการทดลองซ้ำ พบว่าตัวอย่างลูกแป้งที่สามารถผลิตน้ำต้อย(ของเหลวที่เกิดขึ้นหลังจากการผสมลูกแป้งกับปลายข้าวเหนียวนึ่ง) ที่ให้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงที่สุดทั้ง 8 ตัวอย่าง ได้แก่ลูกแป้งรหัส แพร่ 1 เพชรบุรี 2 สุพรรณบุรี 3 ชุมพร 2 ชุมพร 3 อุบลราชธานี 1 อุบลราชธานี 2 และ กทม 2 จากนั้นนำตัวอย่างลูกแป้งดังกล่าวมาทดลองอีกครั้งภายใต้ภาวะเดิม ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.3 พบว่า ลูกแป้งรหัสอุบลราชธานี 2 สามารถผลิตน้ำต้อยได้ 25.66 และให้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงสุด เท่ากับ 446.33 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างจากแหล่งอื่นๆแล้ว ลูกแป้งรหัสอุบลราชธานี 2 มีความสามารถในการผลิตน้ำต้อยได้ดีที่สุด และให้ปริมาณน้ำตาลมากที่สุด จึงเลือกลูกแป้งรหัสอุบลราชธานี 2 ใช้สำหรับการทดลองในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 4.3 ความสามารถในการผลิตน้ำต้อยของตัวอย่างลูกแป้งทั้ง 8 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ปริมาณน้ำต้อย (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำต้อย (กรัมต่อลิตร)
แพร่ 1	22.66 ±0.57	421.33 ±4.04
เพชรบุรี 2	26.33 ±0.57	411.66 ±2.08
สุพรรณบุรี 3	22.66 ±0.57	435.00 ±4.16
ชุมพร 2	25.33 ±0.57	418.66 ±2.08
ชุมพร 3	23.33 ±1.15	425.33 ±3.05
อุบลราชธานี 1	27.00 ±1.00	405.00 ±2.64
อุบลราชธานี 2	25.66 ±0.57	446.33 ±1.15
กทม 2	20.33 ±0.57	400.33 ±2.08

4.2 หาภาวะที่ดีที่สุดในการหมักปลายข้าวให้เป็นน้ำตาลโดยลูกแป้งรหัส อุบลราชธานี 2

4.2.1 ปริมาณน้ำที่เหมาะสมในการนึ่งปลายข้าวเหนียว

การทดลองทำโดยแปรผันปริมาณน้ำเป็น 55, 60, 65, 70, 75 และ 80 มิลลิลิตร ต่อปลายข้าวปริมาตร 50 กรัม จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็น แล้วนำปลายข้าวนึ่งคลุกเคล้าให้เข้ากับลูกแป้ง ด้วยอัตราส่วนลูกแป้ง 1 กรัมต่อปลายข้าวนึ่ง 50 กรัม หลังจากคลุกเคล้ากับลูกแป้งแล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเก็บน้ำต้อย โดยการกรองผ่านผ้าขาวบาง ติดตามผลโดยการวัดปริมาณน้ำต้อยที่เกิดขึ้น และวัดความเข้มข้นของน้ำตาลตามวิธีในข้อ 3.3.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.4 พบว่าปริมาณน้ำที่ใช้ในการนึ่งข้าวที่มีความเหมาะสมที่สุดในการผลิตน้ำต้อย คือ ปริมาณน้ำ 65 มิลลิลิตร สามารถผลิตน้ำต้อยได้ในปริมาณมากที่สุด คือ 27 มิลลิลิตร และให้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 448.33 กรัมต่อลิตร สามารถให้ปลายข้าวนึ่งที่มีลักษณะเหมาะสม คือ มีความชื้นพอสมควร แต่ไม่มากจนข้าวเละติดกัน ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้เป็นภาวะที่เหมาะแก่การเจริญของเชื้อรา และการผลิตน้ำต้อยของเชื้อรา ในขณะที่ข้าวที่นึ่งโดยใช้น้ำในปริมาณอื่นๆ จะให้ข้าวที่มีลักษณะที่แตกต่างออกไปคือ ข้าวที่นึ่งโดยเติมน้ำในปริมาณน้อยกว่า 65 มิลลิลิตร พบว่า ข้าวมีลักษณะสุกกำลังพอดี หรือข้าวบางส่วนยังมีลักษณะแข็ง ทำให้ในข้าวนั้นมีความชื้นต่ำ ซึ่งเป็นภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อราในการผลิตน้ำต้อย ส่วนข้าวที่เติมน้ำในปริมาณที่มากกว่า 65 มิลลิลิตรนั้น พบว่า ข้าวมีลักษณะอ่อนนิ่มแฉะเกินไป จึงไม่เหมาะสมในการผลิตน้ำต้อย

ตารางที่ 4.4 ผลของการแปรผันปริมาณน้ำที่ใช้ในการนึ่งข้าวเพื่อผลิตน้ำต้อย

ปริมาณน้ำ (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำต้อย (มิลลิลิตร)	ปริมาณน้ำตาลในน้ำต้อย (กรัมต่อลิตร)
55	น้อยกว่า 5	ไม่สามารถวัดได้
60	21.66 ±1.52	431.33 ±4.04
65	27.00 ±1.00	448.33 ±2.08
70	26.66 ±0.57	400.33 ±2.51
75	27.33 ±0.57	344.33 ±2.51
80	28.33 ±0.57	293.66 ±3.05

4.2.2 ผลของวิธีการนึ่งต่อการย่อยแป้ง

อุณหภูมิและความดันสูงในการนึ่งใน Autoclave อาจ มีผลทำให้รายย่อยสลายแป้งได้ดีขึ้นกว่าการนึ่งด้วยไอน้ำตามปกติ การทดลองนี้จึงเปรียบเทียบการย่อยปลายข้าวเหนียวที่นึ่งด้วยไอน้ำตามปกติกับปลายข้าวเหนียวที่นึ่งใน autoclave การย่อยใช้วิธีการเดียวกับการทดลองอื่นๆ คือ คลุกข้าวที่นึ่งแล้วกับผงลูกแป้งด้วยอัตราส่วนลูกแป้ง 1 กรัม ต่อปริมาณข้าวเหนียว 50 กรัม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นเก็บน้ำต้อยไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาล ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ความเข้มข้นน้ำตาลในน้ำต้อยจากปลายข้าวเหนียวที่นึ่งด้วยวิธีต่างกัน

นึ่งข้าวด้วยความร้อน (องศาเซลเซียส) 15 นาที	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร) (HPLC)	ค่าเฉลี่ยกลูโคส (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณกลูโคส (กรัมต่อลิตร) (DNSA)	ค่าเฉลี่ยกลูโคส (กรัมต่อลิตร)
100	225.35	231.39 ± 5.32	234.76	247.64 ± 11.23
100	235.39		252.84	
100	233.44		255.33	
121	265.45	266.33 ± 1.95	298.54	304.40 ± 5.14
121	268.57		308.12	
121	264.98		306.56	

จากตารางจะเห็นว่ากลูโคสที่เกิดจากปลายข้าวเหนียวที่นึ่งในเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (autoclave) สูงกว่าการนึ่งด้วยไอน้ำธรรมดา อย่างชัดเจน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อทำให้โครงสร้างของแป้งเปลี่ยนแปลงไปจึงถูกย่อยได้ง่ายขึ้น การเปลี่ยนแปลงนั้นอาจเป็นการพองตัวของสายแป้งแบบเดียวกับที่เซลลูโลสพองขึ้นเมื่อผ่านกระบวนการ steam explosion หรืออาจเกิดจากองค์ประกอบอื่นๆ เช่นโปรตีนเสียสภาพ (denatured) ไปก็ได้ ทั้งนี้ยังต้องการการพิสูจน์ต่อไป เป็นที่สังเกตว่าวิธีการวัดก็มีผลต่อความเข้มข้นที่อ่านได้ โดยการวัดด้วย HPLC มีค่าต่ำกว่าการวัดด้วยวิธี DNSA อยู่ 6.6-12.5%

4.2.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตน้ำต้อย

ชั่งปลายข้าวเหนียว 50 กรัม บรรจุในขวดแก้วปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำลงไปในปริมาณ 65 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วนำไปคลุกกับลูกแป้งข้าวหมากที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.3.2 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่มเป็น 30 35 และ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บน้ำต้อยโดยการกรองผ่านผ้าขาวบาง ติดตามผลโดยการวัดปริมาณน้ำต้อยที่เกิดขึ้น และวัดความเข้มข้นของน้ำตาลตามวิธีในข้อ 3.3.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4.6 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตน้ำต้อย

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณน้ำต้อย (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำต้อย (กรัมต่อลิตร)
30	27.66 ±1.52	447.66 ±3.05
35	22.33 ±1.52	400.66 ±3.05
40	14.33 ±2.08	272.00 ±5.29

ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 4.6 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักข้าวหมาก คือ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิโดยทั่วไปที่เชื้อราสามารถเจริญเติบโตได้ดี และจากผลการทดลองเป็นอุณหภูมิที่สามารถผลิตน้ำต้อยได้ในปริมาณมากที่สุด คือ 27.66 ±1.52มิลลิลิตร และให้ปริมาณน้ำตาลสูงสุด เท่ากับ 447.66 ±3.05กรัมต่อลิตร

4.2.4 ระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตน้ำต้อย

ชั่งปลายข้าวเหนียว 50 กรัม บรรจุในขวดแก้วปริมาตร 400 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำลงไปในปริมาณ 65 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วนำไปคลุกกับลูกแป้งข้าวหมากที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.3.2 นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มาแปรผันระยะเวลาในการหมักข้าวหมากในช่วง 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ7 วัน จากนั้นเก็บน้ำต้อย โดยการกรองผ่านผ้าขาวบาง ติดตามผลโดยการวัดปริมาณน้ำต้อยที่เกิดขึ้น และวัดความเข้มข้นของน้ำตาลตามวิธีในข้อ 3.3.4 ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 4.7 ผลของระยะเวลาในการหมักน้ำต้อย

ระยะเวลา (วัน)	ปริมาณน้ำต้อย (มิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของน้ำตาลในน้ำต้อย (กรัมต่อลิตร)
1	15.33 ±3.51	187.33 ±2.51
2	20.33 ±0.57	346.00 ±4.00
3	28.00 ±1.00	422.00 ±2.00
4	24.66 ±0.57	372.33 ±3.21
5	25.33 ±0.57	299.66 ±2.51
6	24.00 ±2.00	311.33 ±3.51
7	21.66 ±1.15	294.66 ±2.08

ผลการทดลองในตาราง 4.7 แสดงให้เห็นว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก 3 วัน สามารถผลิตน้ำต้อยได้ในปริมาณมากที่สุด คือ 28 มิลลิลิตร และให้ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงสุด เท่ากับ 422 กรัมต่อลิตร เนื่องจากลูกแป้งเป็นกล้าเชื้อผสม ที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่สำคัญในการเปลี่ยนสภาพแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลหรือแอลกอฮอล์ (กฤษฎา ขุนแหลม, 2542) ในระหว่างการหมักปลายข้าวด้วยลูกแป้งเชื้อราจะเจริญได้ในช่วง 2-3 วันแรก ของการหมัก ซึ่งเป็นสภาพการหมักที่ใช้อากาศ เนื่องจากการบรรจุข้าวในขวดหมักจะบรรจุเพียง 1ใน 4 ของปริมาตรขวด ทำให้ราได้รับออกซิเจนจากอากาศอย่างทั่วถึง จากนั้นเมื่อเกิดน้ำต้อยขึ้น และยีสต์เริ่มการหมัก ทำให้มีปริมาณแอลกอฮอล์ และสภาพไร้อากาศ ซึ่งเกิดจากการที่ยีสต์ปล่อยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา ทำให้ราตายไป (ชุลี ยมภักดี และคณะ, 2550) และน้ำตาลบางส่วนถูกใช้ไป ทำให้พบว่าหลังจากวันที่ 3 จะมีความเข้มข้นของน้ำตาลลดลง ดังนั้น ระยะเวลาที่เหมาะสม คือในช่วง 3 วันแรก แต่ในวันที่ 1 และวันที่2 เชื้อรายังเจริญได้ไม่เต็มที่ ทำให้มีปริมาณน้ำต้อยน้อย และความเข้มข้นของน้ำตาลไม่สูงเท่ากับวันที่ 3

จากผลการทดลองในการหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตน้ำต้อยจากปลายข้าวโดยลูกแป้งข้าวรหัสอุบลราชธานี 2 พบว่า ปริมาณน้ำต่อปริมาณปลายข้าว 50 กรัมที่ใช้ในการนึ่งปลายข้าวที่เหมาะสม คือ 65 มิลลิลิตร ทำการหมักปลายข้าวโดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตน้ำต้อย จึงใช้ภาวะในการผลิตน้ำต้อยดังกล่าวนี้สำหรับการย่อยปลายข้าวเพื่อนำน้ำต้อยไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

4.3 ศึกษาผลของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดย *Zymomonas mobilis* TISTR 405 ในระดับขวดทดลองโดยวิธี 2^n factorial design analysis (Cazetta และคณะ 2005)

ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอทานอล 4 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้น ค่าความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต มาหาภาวะที่เหมาะสมโดยวิธี 2^n factorial design analysis โดยกำหนดค่าของปัจจัยต่างๆ โดยให้ความเข้มข้นของน้ำต้อยเป็น 100-300 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 4-8 อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต 24-72 ชั่วโมง โดยแปรผันปัจจัยต่างๆตามตาราง (ภาคผนวก ง) เมื่อพิจารณาเอทานอลที่ผลิตได้จากผลของปัจจัยในแต่ละปัจจัย ได้ผลการทดลองตามตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการผลิตเอทานอลจากปัจจัย 4 ปัจจัย โดยวิธี 2^n factorial design analysis

ลำดับ	ปัจจัย	ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
1	A-/B-/C-/D-	2.85±3.24
2	A-/B-/C-/D+	34.24±3.31
3	A-/B-/C+/D-	1.71±4.22
4	A-/B-/C+/D+	15.94±3.56
5	A-/B+/C-/D-	36.78±2.08
6	A-/B+/C-/D+	50.10±1.80
7	A-/B+/C+/D-	51.78±3.45
8	A-/B+/C+/D+	45.65±4.46
9	A+/B-/C-/D-	4.19±3.87
10	A+/B-/C-/D+	4.39±4.32
11	A+/B-/C+/D-	4.17±2.33
12	A+/B-/C+/D+	3.33±1.21
13	A+/B+/C-/D-	7.20±4.36
14	A+/B+/C-/D+	3.90±3.44
15	A+/B+/C+/D-	46.03±2.31
16	A+/B+/C+/D+	21.99±4.37
17	A0/B0/C0/D0	65.69
18	A0/B0/C0/D0	64.80
19	A0/B0/C0/D0	60.15
20	A0/B0/C0/D0	55.40

หมายเหตุ

A	+	ความเข้มข้นน้ำตาล 300 กรัมต่อลิตร
	0	ความเข้มข้นน้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร
	-	ความเข้มข้นน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร
B	+	pH = 8
	0	pH = 6
	-	pH = 4
C	+	อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
	0	อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส
	-	อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
D	+	ระยะเวลา 72 ชั่วโมง
	0	ระยะเวลา 48 ชั่วโมง
	-	ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางที่ 4.9 เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอล โดยดูผลของปัจจัยทีละ 1 ปัจจัย

ปัจจัย	หมายเลขการทดลอง	ค่าเฉลี่ยเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
A-	1-8	239.13
A+	9-16	95.24
B-	1-4 , 9-12	70.85
B+	5-8 , 13-16	263.52
C-	1,2,5,6,9,10,13,14	140.14
C+	3,4,7,8,11,12,15,16	190.64
D-	1,3,5,7,9,11,13,15	127.40
D+	2,4,6,8,10,12,14,16	206.97

หมายเหตุ

A	+	ความเข้มข้นน้ำตาล 300 กรัมต่อลิตร
	-	ความเข้มข้นน้ำตาล 100 กรัมต่อลิตร
B	+	pH = 8
	-	pH = 4
C	+	อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส
	-	อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส
D	+	ระยะเวลา 72 ชั่วโมง
	-	ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

จากตารางที่ 4.9 เมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่ได้จากผลของปัจจัยจะพบว่า การใช้ปริมาณน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่ 100 กรัมต่อลิตร จะให้ผลของการผลิตเอทานอลได้ค่าที่สูงกว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 300 กรัมต่อลิตรเท่ากับ 60.25 เปอร์เซนต์ ส่วนค่าความเป็นกรดเบส พบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบส 8 จะให้ผลการผลิตเอทานอลได้ดีกว่าค่าความเป็นกรดเบส 4 เท่ากับ 73.38 เปอร์เซ็นต์ ส่วนที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะให้ผลผลิตเอทานอลมากกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยให้ผลผลิตเอทานอลที่มากกว่า 26.31 เปอร์เซ็นต์ และในการเพิ่มเวลาในการหมักจาก 24 ชั่วโมงเป็น 72 ชั่วโมง จะสามารถให้ผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 38.34 เปอร์เซ็นต์

ดังนั้นจากผลการทดลอง เมื่อนำมาพิจารณาในแต่ละปัจจัยแสดงให้เห็นว่าภาวะในการผลิตเอทานอล คือ น้ำตาลความเข้มข้นเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส เท่ากับ 8 อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต 72 ชั่วโมง เป็นภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอล

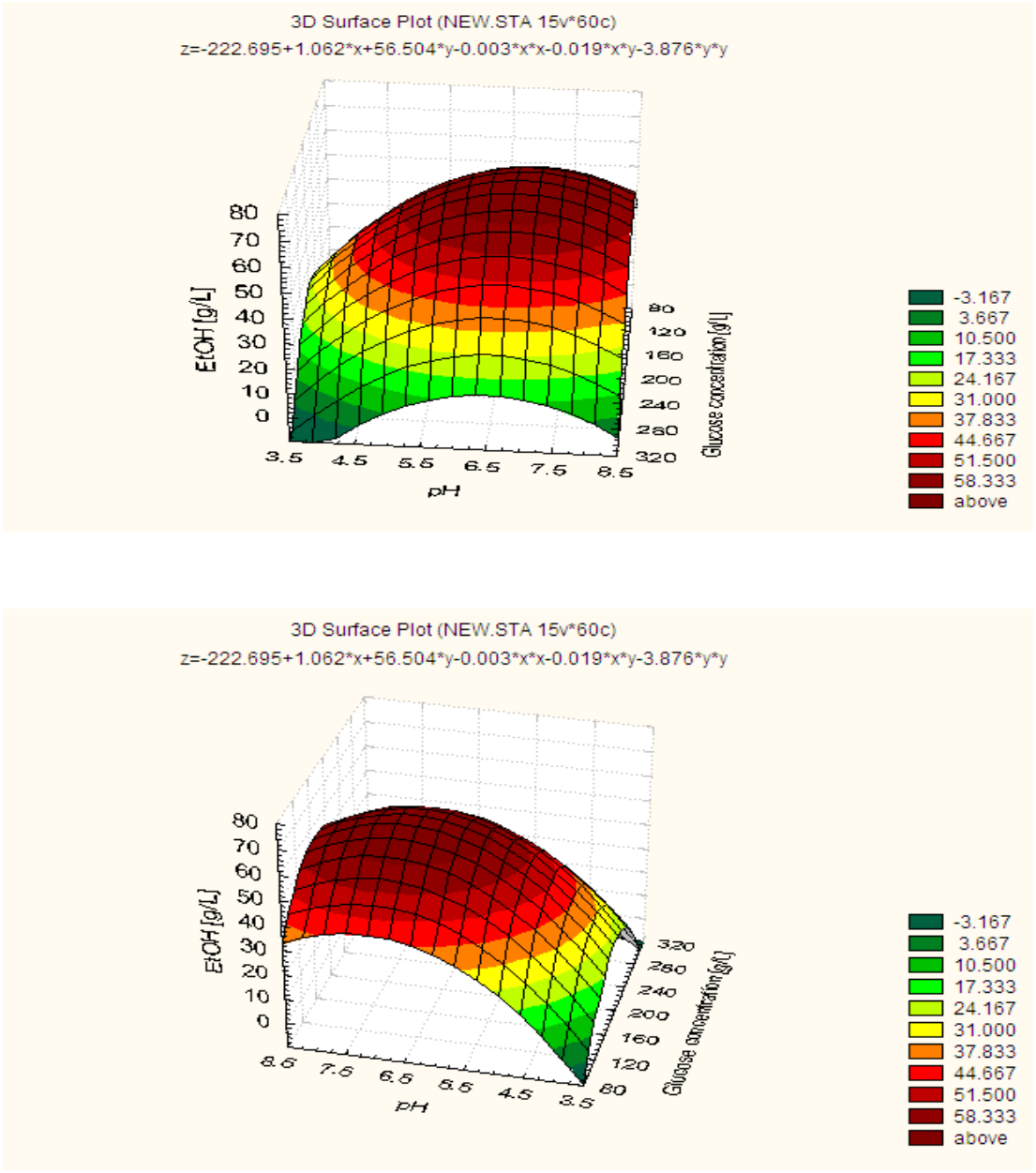
เมื่อพิจารณาถึงผลของปัจจัย 2 ปัจจัย ได้ใช้โปรแกรมทางสถิติ คือ โปรแกรม statistica มาช่วยในการวิเคราะห์ผลของความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัย โดยการสร้างภาพพื้นที่ผิวที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยขึ้น (Response surface methodology; RSM) เพื่อทำนายค่าที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ซึ่งเมื่อทำการสร้างภาพพื้นผิวตอบสนองจากข้อมูลที่ได้ จากตารางที่ 4.8 ผลปรากฏว่าได้ค่า R^2 เท่ากับ 0.794 (ภาคผนวก จ)

จากค่าสมการทำนายการผลิตเอทานอล เมื่อนำมาคำนวณผลของสมการเปรียบเทียบกับผลของเอทานอลที่ผลิตได้ตามการทดลองในข้อ 4.8 จะได้ผลตามตาราง 4.10

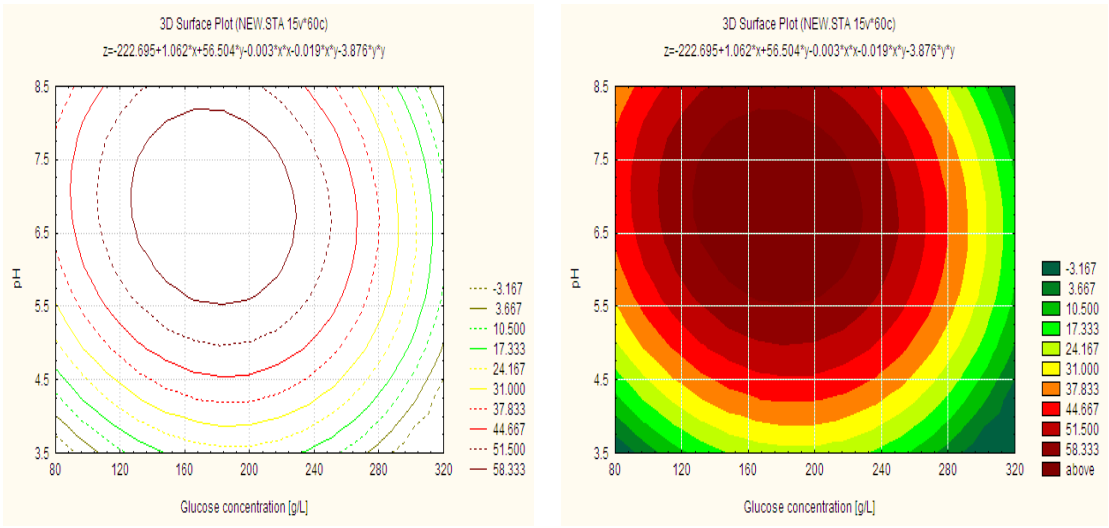
ตารางที่ 4.10 ผลการผลิตเอทานอลจากการทดลอง 2^n factorial design analysis และค่าเอทานอลที่ได้จากสมการทำนาย

หมายเลขการทดลอง	ปริมาณเอทานอลจากการทดลอง(กรัมต่อลิตร)	ปริมาณเอทานอลจากสมการ (กรัมต่อลิตร)
1 (A-/B-/C-/D-)	2.85	3.51
2 (A-/B-/C-/D+)	34.24	30.53
3 (A-/B-/C+/D-)	1.71	3.14
4 (A-/B-/C+/D+)	15.94	17.47
5 (A-/B+/C-/D-)	36.78	37.01
6 (A-/B+/C-/D+)	50.15	47.57
7 (A-/B+/C+/D-)	51.78	52.37
8 (A-/B+/C+/D+)	45.65	49.91
9 (A+/B-/C-/D-)	4.19	5.09
10 (A+/B-/C-/D+)	4.39	3.51
11 (A+/B-/C+/D-)	4.17	4.58
12 (A+/B-/C+/D+)	3.33	3.72
13 (A+/B+/C-/D-)	3.90	3.56
14 (A+/B+/C-/D+)	7.20	6.51
15 (A+/B+/C+/D-)	21.99	18.47
16 (A+/B+/C+/D+)	46.03	49.91

จากตารางที่ 4.8 เมื่อนำผลการผลิตเอทานอลที่ได้จากการทดลอง 2^n factorial design analysis ไปหาความสัมพันธ์ของปัจจัยแต่ละปัจจัย โดยโปรแกรม statistica เพื่อสร้างพื้นที่ผิวการตอบสนอง (Response surface methodology) จะได้ความสัมพันธ์ของแต่ละปัจจัย ดังรูปที่ 4.2-4.13

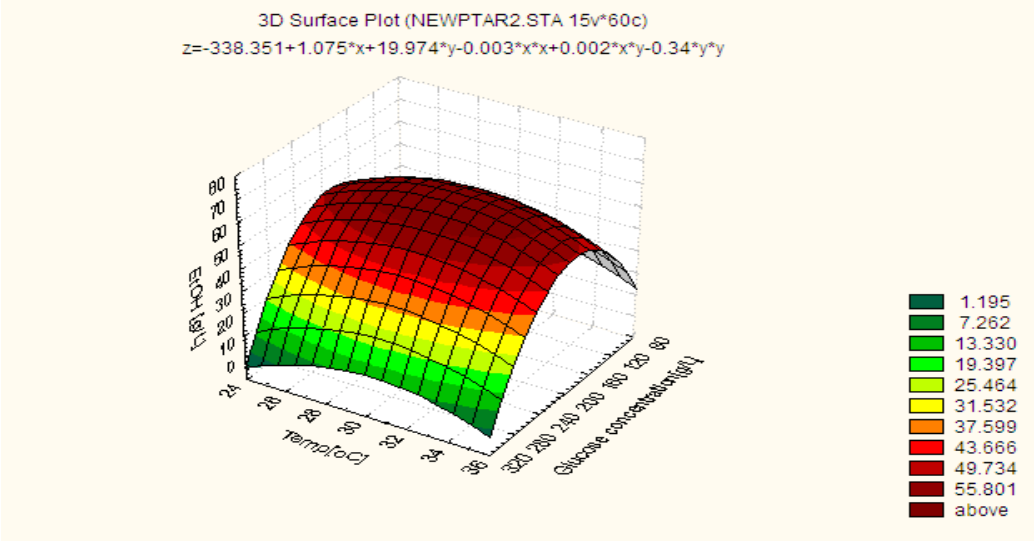


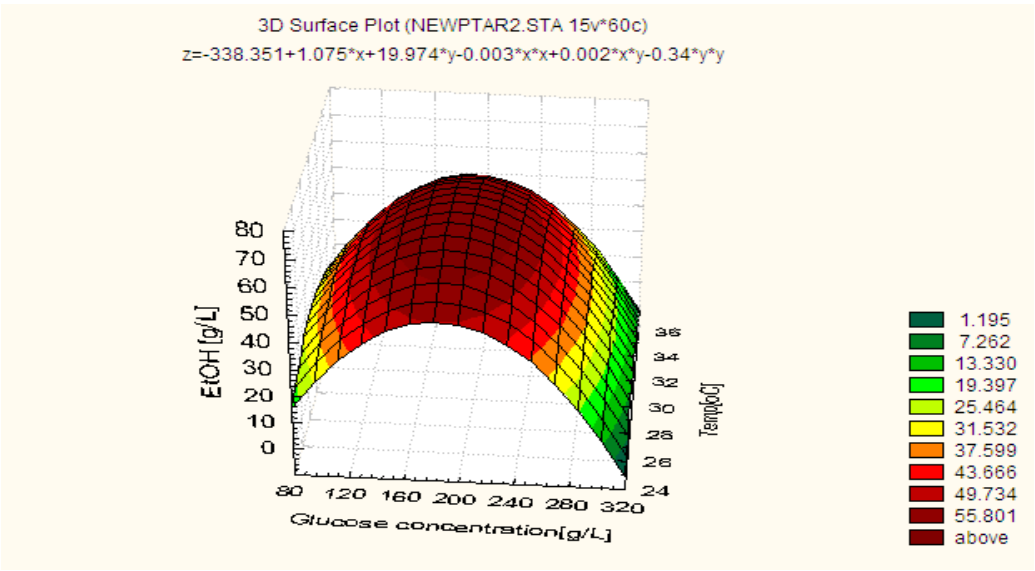
รูปที่ 4.2 แสดงภาพ Response surface ของค่าความเป็นกรดเบส และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล



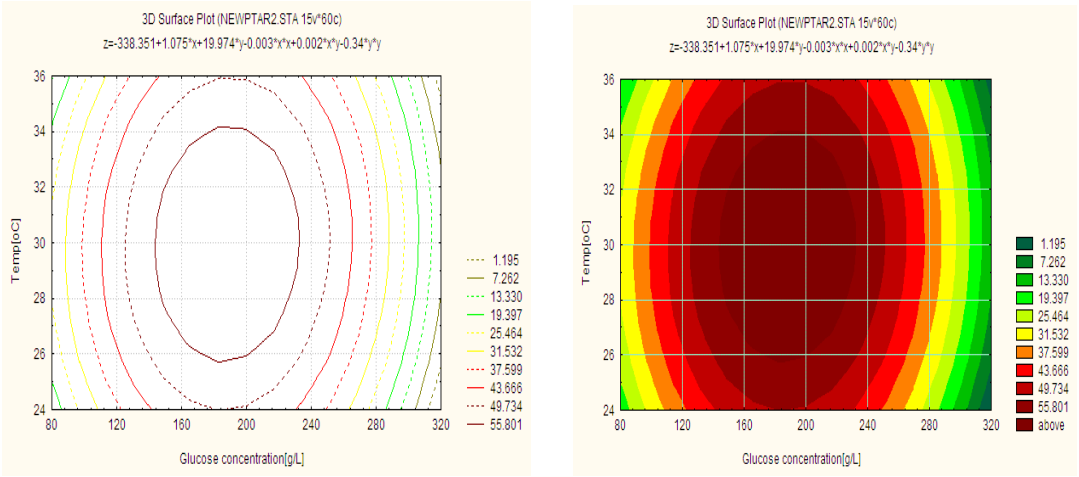
รูปที่ 4.3 แสดงภาพ Contour plot ของค่าความเป็นกรดเบส และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล

จากรูปที่ 4.2 แสดงผลความสัมพันธ์ของค่าความเป็นกรดเบส และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล เมื่อพิจารณาจากภาพพบว่าความเป็นกรดเบสที่อยู่ในช่วง 5.5 - 8 และค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่อยู่ระหว่าง125 - 230 กรัมต่อลิตร เป็นภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล และพบว่าที่ค่าความเป็นกรดเบสสูง ถ้าระดับความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่า 230 กรัมต่อลิตร หรือต่ำกว่า 125 กรัมต่อลิตร การผลิตเอทานอลจะลดลง ซึ่งเมื่อนำผลของปัจจัยที่มีการวิเคราะห์ทีละปัจจัยมาวิเคราะห์ร่วมด้วย (ตารางที่ 4.9) จะมีความสอดคล้องกันที่ว่า ที่ค่าความเป็นกรดเบสที่ 8 จะมีผลทำให้ผลิตเอทานอลได้มากกว่าค่าความเป็นกรดเบสที่ 4 มากถึง 73.38 เปอร์เซ็นต์



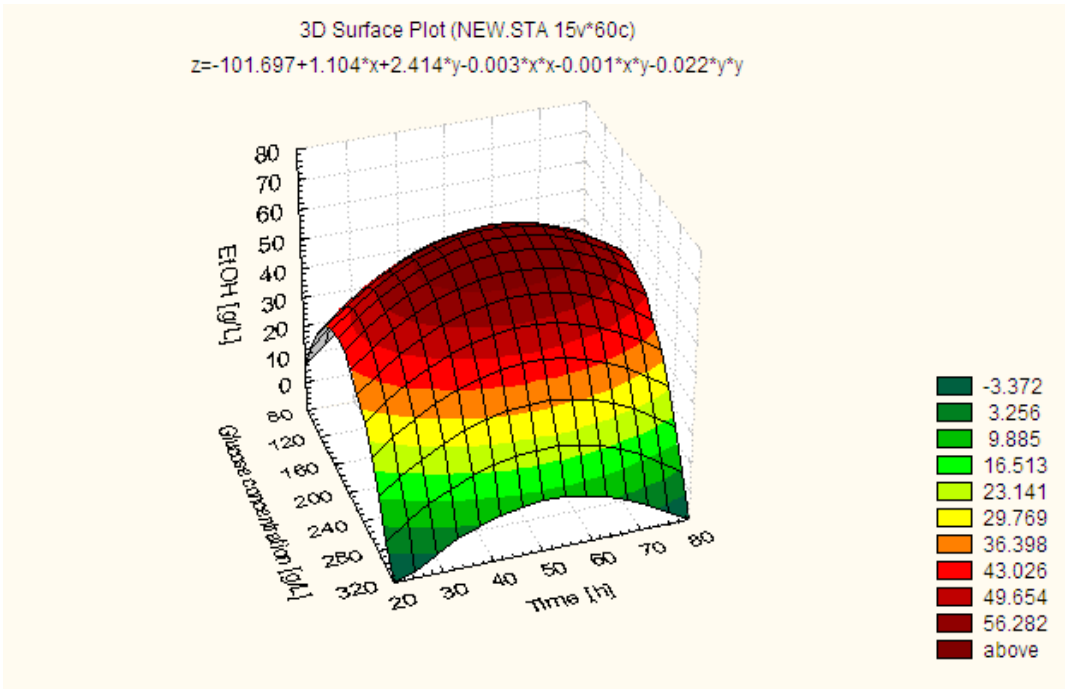


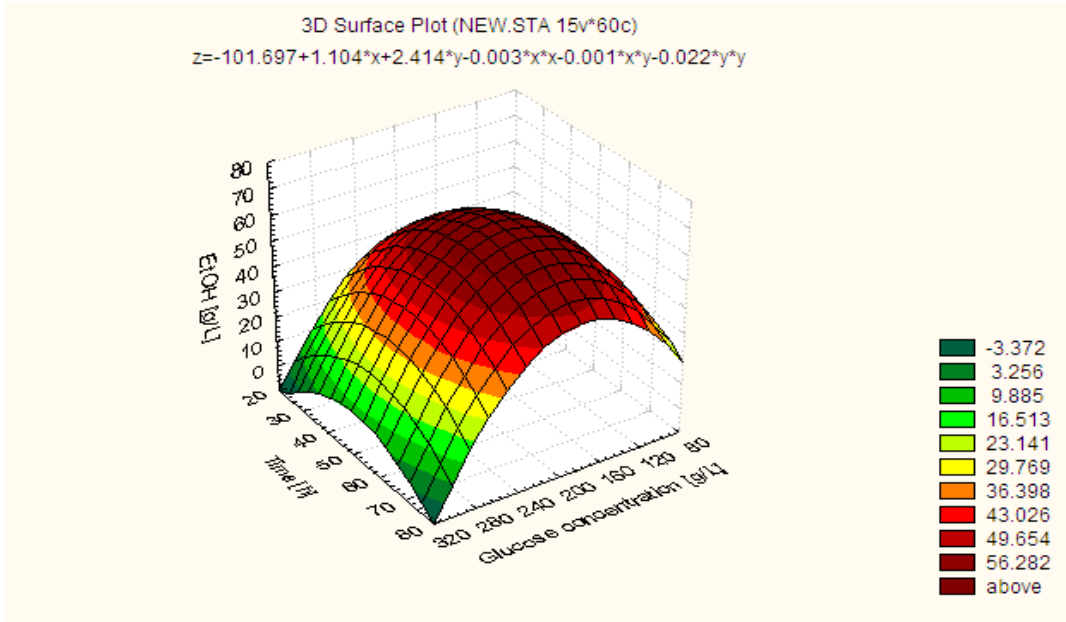
รูปที่ 4.4 แสดงภาพ Response surface ของอุณหภูมิ และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล



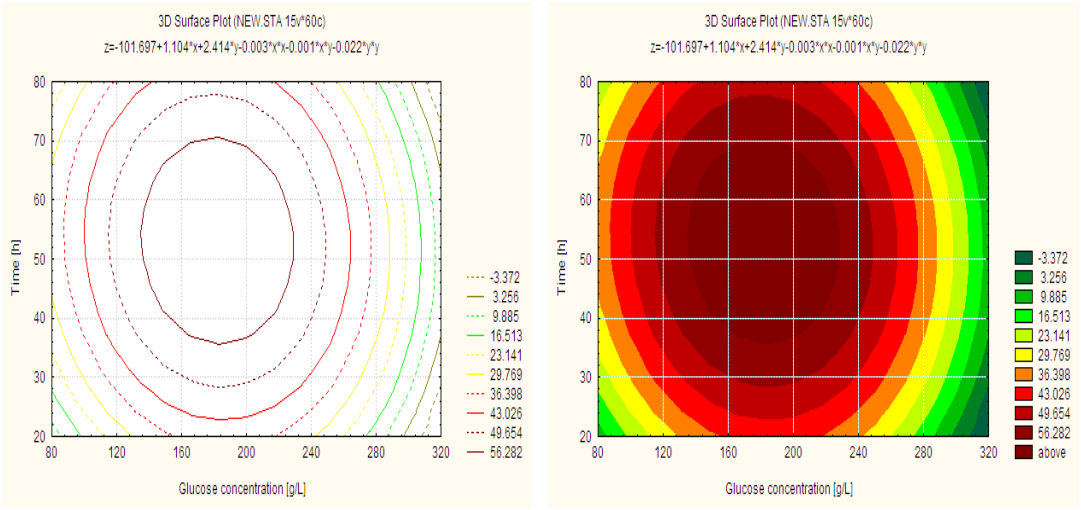
รูปที่ 4.5 แสดงภาพ Contour plot ของอุณหภูมิ และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล

เมื่อพิจารณาดูความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส และอุณหภูมิ จากรูปที่แสดงในรูปที่ 4.4 พบว่า ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 145 - 230 กรัมต่อลิตร และอุณหภูมิที่เหมาะสม คือช่วง 34- 36 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงที่แสดงการผลิตเอทานอลได้สูงที่สุดของความสัมพันธ์ 2 ปัจจัยนี้



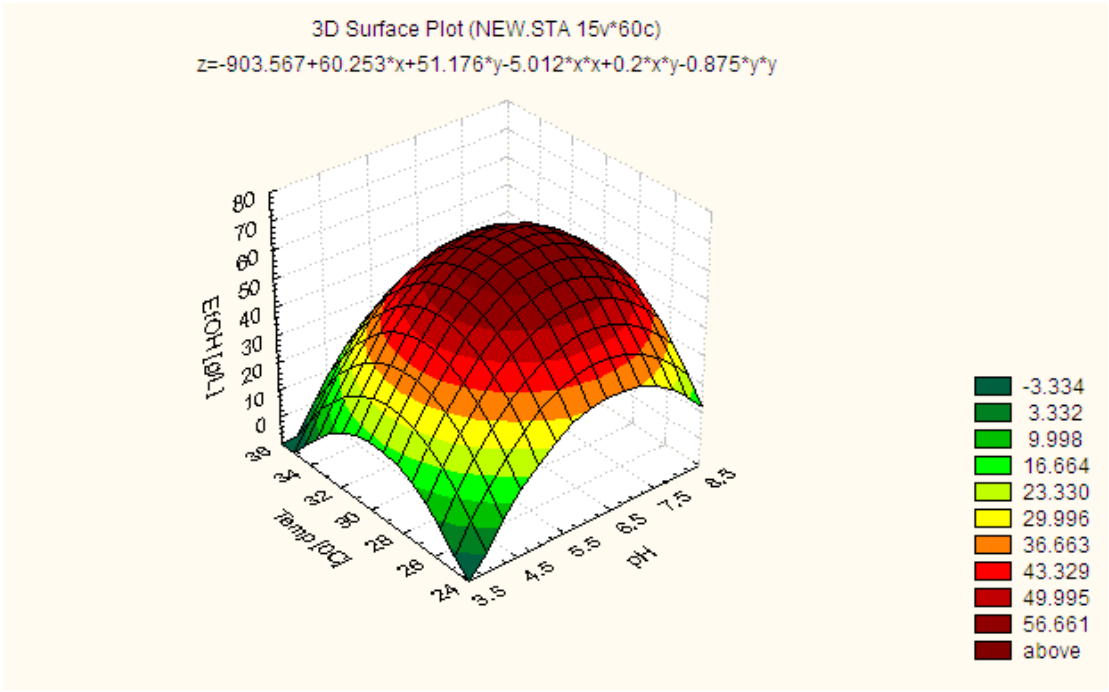


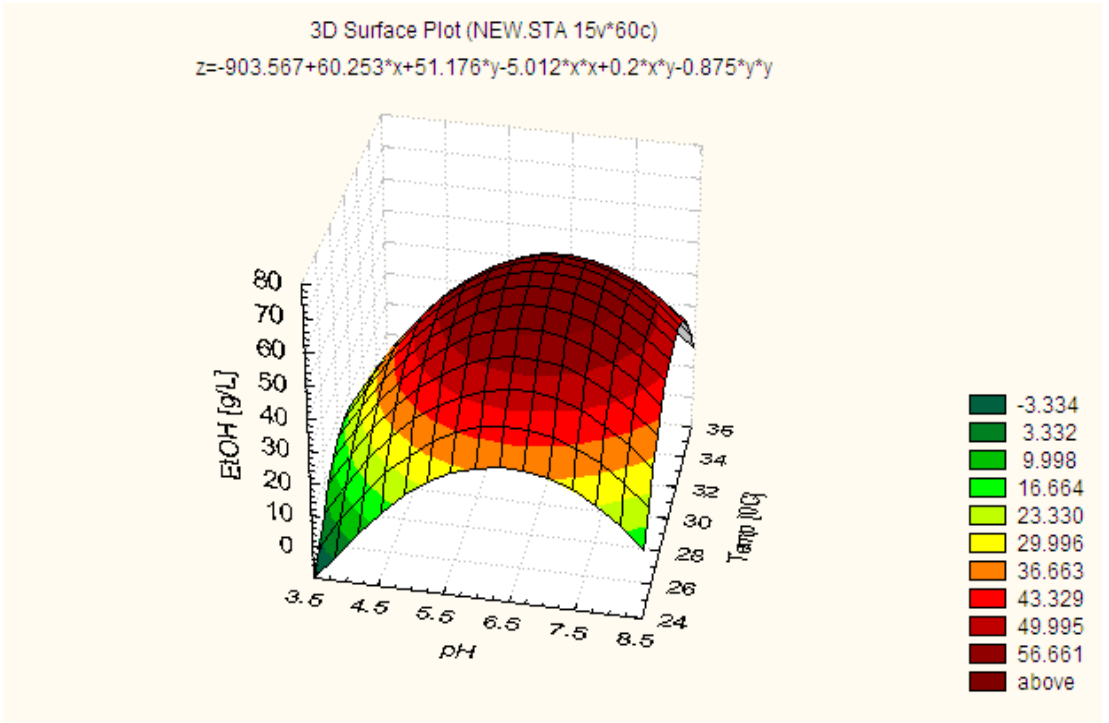
รูปที่ 4.6 แสดงภาพ Response surface ของเวลา และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล



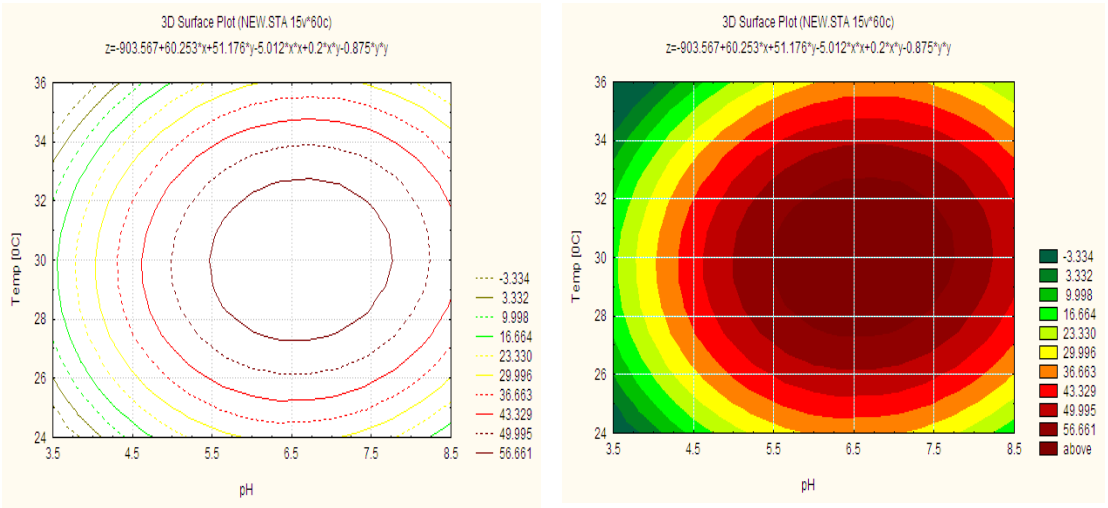
รูปที่ 4.7 แสดงภาพ Contour plot ของเวลา และความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสในการผลิตเอทานอล

จากรูปที่ 4.6 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของน้ำตาล และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอทานอล พบว่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นจะมีค่าที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 140 220 กรัมต่อลิตร และระยะเวลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผลิตเอทานอลจะอยู่ในช่วง 38 – 70 ชั่วโมง จะมีความเหมาะสมในการผลิตเอทอลได้สูงที่สุดสำหรับปัจจัย 2 ปัจจัยนี้



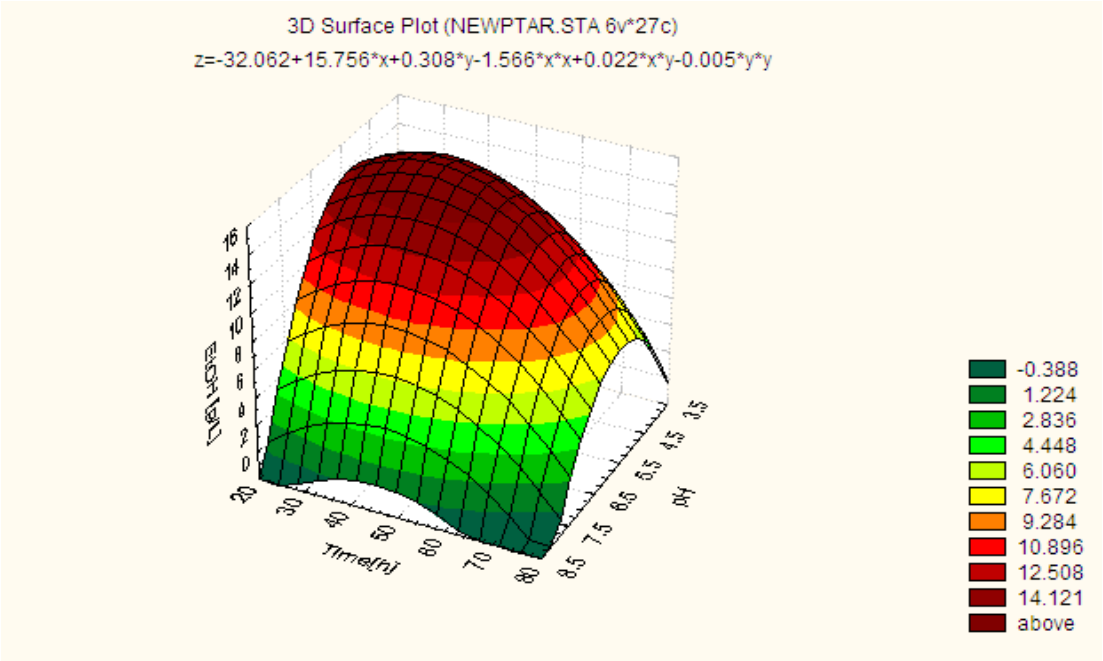


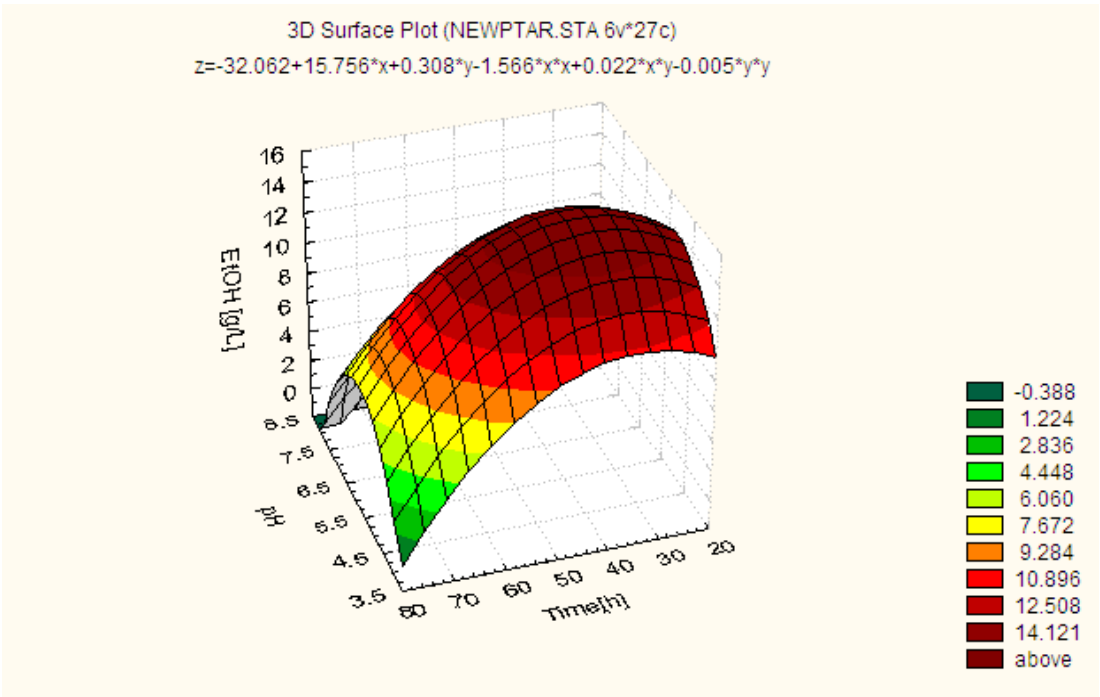
รูปที่ 4.8 แสดงภาพ Response surface ของความเป็นกรดเบส และอุณหภูมิในการผลิตเอทานอล



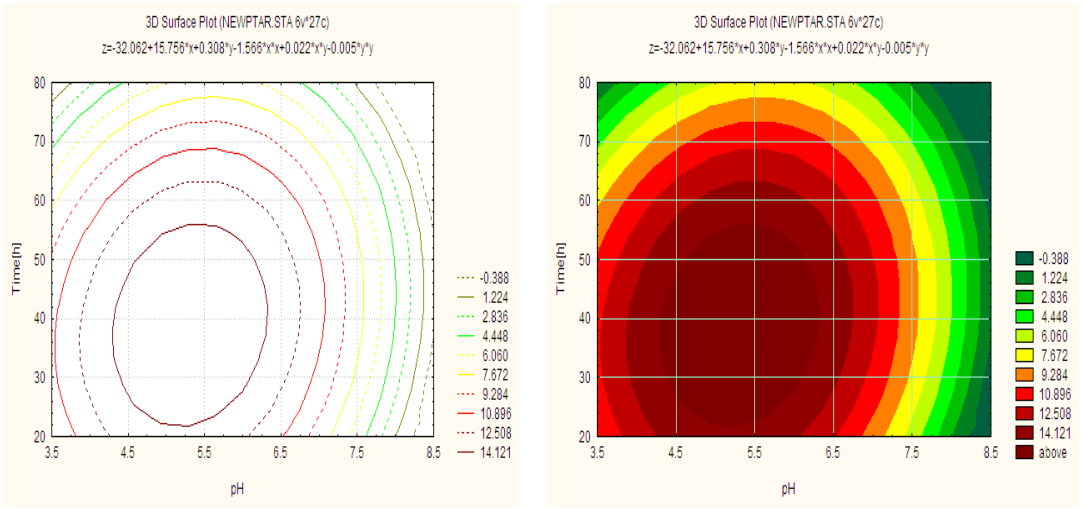
รูปที่ 4.9 แสดงภาพ Contour plot ของความเป็นกรดเบส และอุณหภูมิในการผลิตเอทานอล

เมื่อพิจารณาถึงปัจจัยระหว่างค่าความเป็นกรดเบส และอุณหภูมิ แสดงให้เห็นว่า จากรูป 4.8 ช่วงอุณหภูมิ 27 – 33 องศาเซลเซียส และที่ช่วงของค่าความเป็นกรดเบส 5.5 - 7.7 จะเป็นภาวะที่สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด จากแนวโน้มที่ปรากฏบนพื้นผิวตอบสนองระหว่าง 2 ปัจจัยนี้



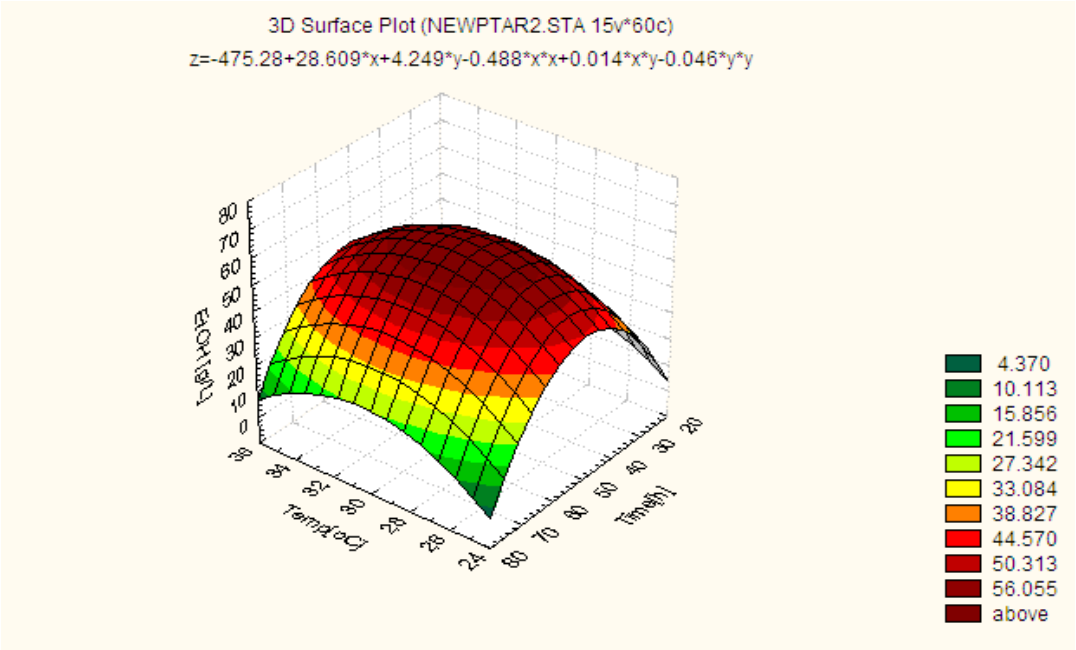


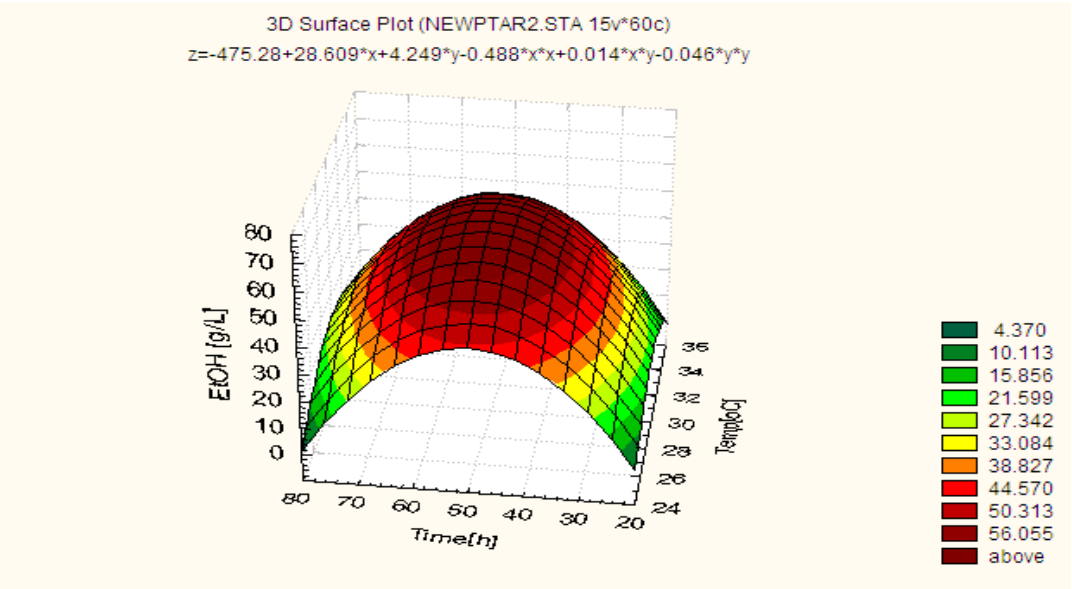
รูปที่ 4.10 แสดงภาพ Response surface ของความเป็นกรดเบส และเวลาในการผลิตเอทานอล



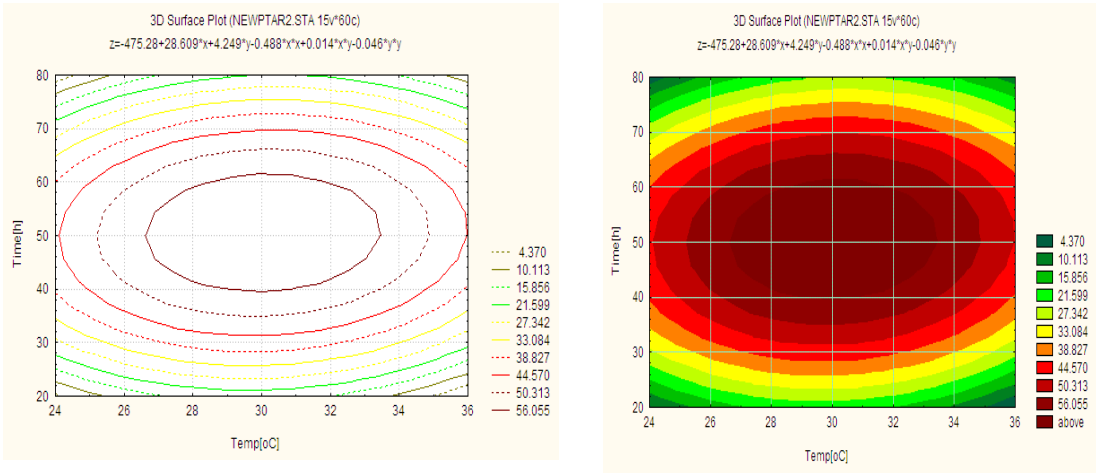
รูปที่ 4.11 แสดงภาพ Contour plot ของค่าความเป็นกรดเบส และระยะเวลาในการผลิตเอทานอล

จากรูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่าระยะเวลาและค่าความเป็นกรดเบสในการผลิตเอทานอล พบว่า เมื่อระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 23 – 55 ชั่วโมงและค่าความเป็นกรดเบสจะอยู่ในช่วง 4.2 - 6.1 ตามลำดับ จะเป็นค่าที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดในการผลิตเอทานอลเมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของทั้งสองปัจจัยนี้





รูปที่ 4.12 แสดงภาพ Response surface ของอุณหภูมิ และระยะเวลาในการผลิตเอทานอล



รูปที่ 4.13 แสดงภาพ Contour plot ของค่าความเป็นกรดเบสและระยะเวลาในการผลิตเอทานอล

จากรูปที่ 4.12 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตเอทานอล มีความเหมาะสมในการผลิตเอทอลได้สูงที่สุด พบว่า เมื่ออุณหภูมิที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 27 – 33 องศาเซลเซียสและระยะเวลาที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง 40 – 60 ชั่วโมง จะเป็นค่าที่ให้ผลผลิตเอทานอลสูงที่สุดในการผลิตเอทานอลเมื่อพิจารณาถึงความสัมพันธ์ของทั้งสองปัจจัยนี้

จากแผนภาพเมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ของทุกปัจจัยและหาช่วงของความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลสามารถสรุปได้ตามตารางที่ 4.11

ตารางที่ 4.11 แสดงความสัมพันธ์ของทุกปัจจัยและการหาช่วงเวลาที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล

ความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (ชั่วโมง)	กรดเบส
125 – 230	-	-	5.5 – 8
145 – 230	26 – 34	-	-
140 – 220	-	38 – 70	-
-	24 – 33	-	5.5 – 7.7
-	-	23 – 55	4.2 – 6.1
-	27-33	40 – 60	-
145-230	27-33	40-55	5.5-6.1

จากการวิเคราะห์ด้วย RSM ของปัจจัยต่างๆทีละคู่ แล้วเลือกช่วงที่จะให้ผลดีร่วมของทั้ง 4 ปัจจัยจะพบว่า ช่วงของสภาวะที่เหมาะสม สำหรับการผลิตแอลกอฮอล์ของ *Zymomonas mobilis* คือ ความเข้มข้นน้ำตาล 145-230 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดเบส 5.5-6.1 อุณหภูมิ 27-33 องศาเซลเซียส และเวลา 40-55 ชั่วโมง

เพื่อให้การผลิตเอทานอลเป็นไปอย่างสะดวกและยังได้ผลผลิตสูงจึงเลือกภาวะที่เหมาะสมดังนี้

ความเข้มข้นน้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร

ความเป็นกรดเบส 5.5

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

เวลา 48 ชั่วโมง

และเมื่อนำค่าที่เลือกมาทำการคำนวณตามสมการทำนายพบว่า

ปริมาณเอทานอล [กรัมต่อลิตร] = $-0.001464X_1^2-1.864237X_2^2-0.151331X_3^2-0.011620X_4^2-0.017856X_1X_2+0.016841X_1X_3+0.001212X_1X_4+0.891470X_2X_3+0.085123X_2X_4+0.021328X_3X_4+34.086116$

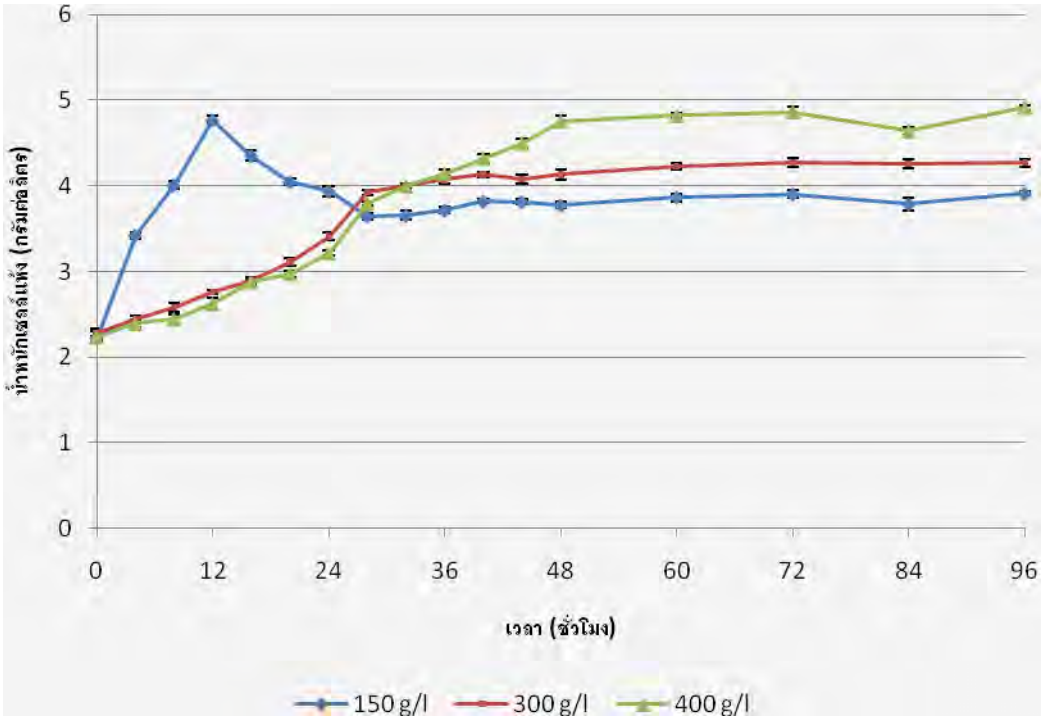
เมื่อกำหนด $X_1 = 150$, $X_2 = 5.5$, $X_3 = 30$ และ $X_4 = 48$

ซึ่งได้ปริมาณเอทานอล จากการสมการทำนายเท่ากับ 51.83 กรัมต่อลิตร

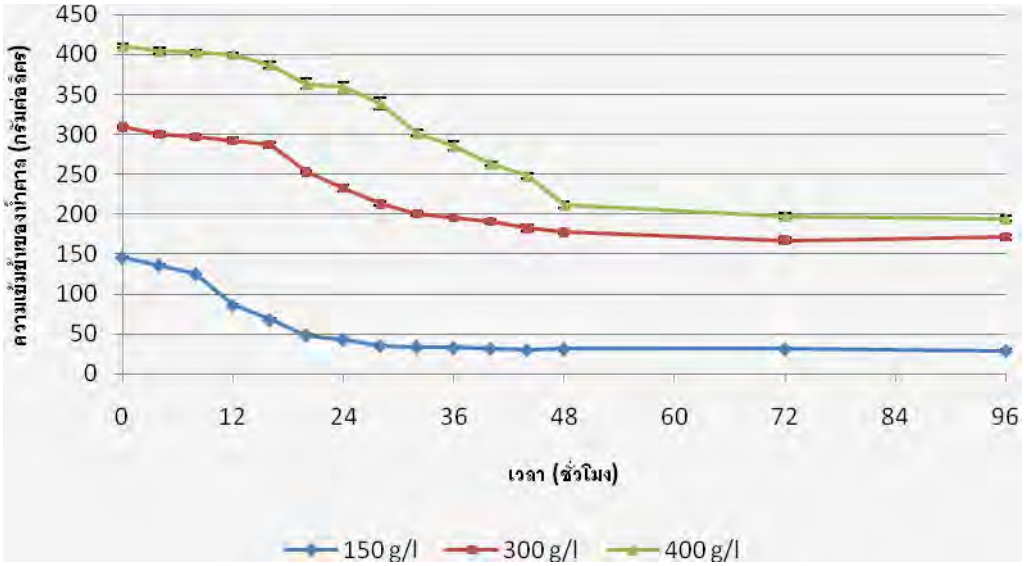
4.4 การผลิตเอทานอลในระดับขวดทดลองจากน้ำต้อยความเข้มข้น 150 300 และ 400 กรัมต่อลิตร

น้ำต้อยมาจากการย่อยแป้งในปลายข้าวด้วยเอนไซม์ซึ่งอาจมีสารอาหารจากข้าวปะปนมาช่วยให้สามารถผลิตเอทานอลได้ดีขึ้น จึงลองแปรผันความเข้มข้นของน้ำต้อยให้สูงกว่า 150 กรัมต่อลิตร

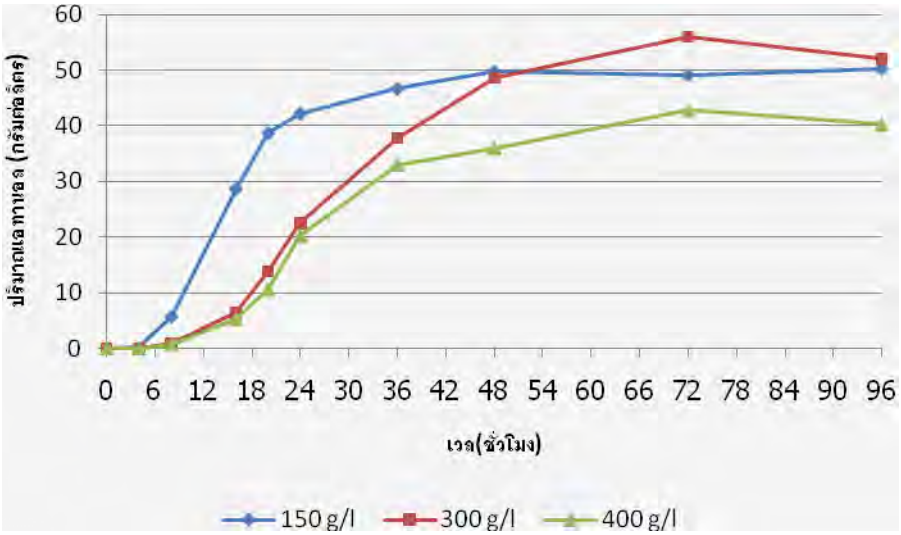
การทดลองนี้เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำต้อยเริ่มต้นต่อผลของการผลิตเอทานอล โดยทำการแปรผันความเข้มข้นของน้ำต้อยเริ่มต้นเป็น 150 300 และ 400 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้น้ำต้อยเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร ซึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ 56 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ ที่ความเข้มข้น 150 และ 400 กรัมต่อลิตร สามารถผลิตเอทานอลได้ 52.11 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ตารางที่4.12) ซึ่งพบว่า ที่ความเข้มข้นของน้ำต้อยเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ถึงจะผลิตเอทานอลได้ในปริมาณน้อยกว่าการทดลองที่มีความเข้มข้นน้ำต้อยเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตร แต่สามารถผลิตเอทานอลได้ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่4.16) และพบว่าที่ความเข้มข้นของน้ำต้อยเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร จะมีอัตราการลดลงของน้ำตาลอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งแตกต่างกับความเข้มข้นน้ำต้อยเริ่มต้นที่ 300 และ 400 กรัมต่อลิตรที่มีช่วงระยะเวลา lag phase ยาวถึงชั่วโมงที่ 12 (รูปที่ 4.15) จากการทดลองของ Loos และคณะ (1994) พบว่าการเจริญของ *Z. mobilis* จะมีช่วง lag phase ยาวขึ้นเมื่อเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นสูงขึ้น และจะมีการสะสมของสารผลิตภัณฑ์ เพื่อต้านแรงดันออสโมติกที่เกิดจากความเข้มข้นของน้ำตาล (Silverira และคณะ, 1999) ซึ่งอาจเป็นเพราะที่ความเข้มข้นของสารตั้งต้นที่สูงมากๆ จะไปมีผลยังยั้งต่อกระบวนการหมักที่ใช้ *Z. mobilis* (Roger และคณะ, 1979)



รูปที่ 4.14 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 โดยการแปรผันความเข้มข้นตั้งต้นเป็น 150 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดทดลอง



รูปที่ 4.15 แสดงการการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 โดยการแปรผันความเข้มข้นตั้งต้นเป็น 150 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดทดลอง



รูปที่ 4.16 แสดงการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 โดยการแปรผันความเข้มข้นตั้งต้นเป็น 150 300 และ 400 กรัมต่อลิตร ในระดับขวดทดลอง

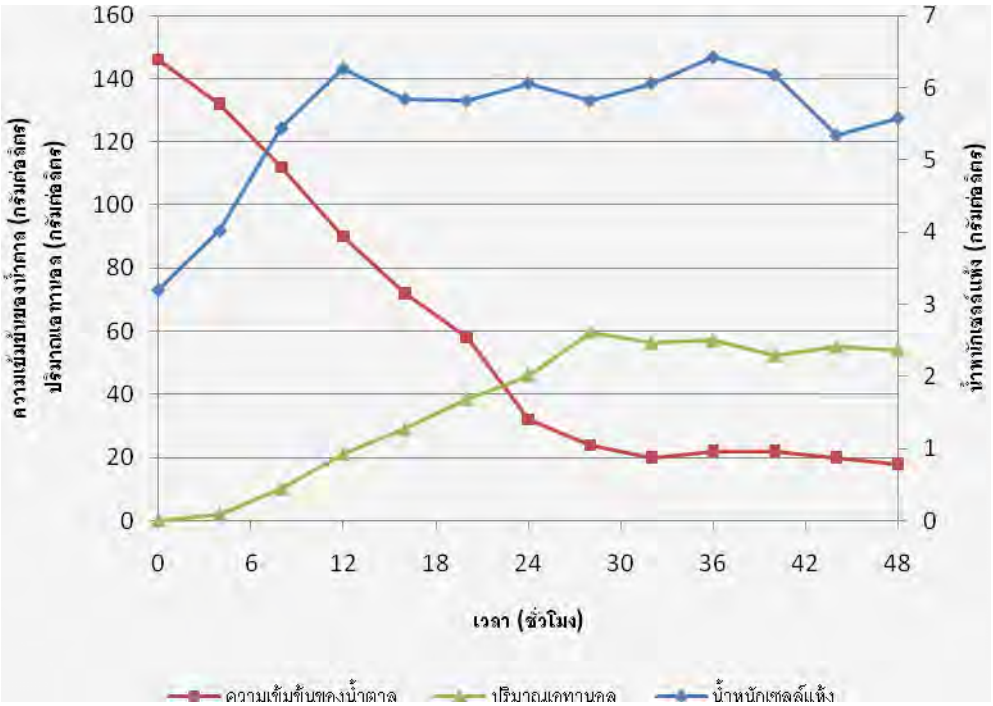
ตารางที่ 4.12 ผลความเข้มข้นของน้ำต้อยตั้งต้นต่อการผลิตเอทานอลจากปลายข้าวโดยการหมักแบบกะในระดับขวดทดลอง

ความเข้มข้นน้ำต้อยตั้งต้น (กรัมต่อลิตร)	150	300	400
ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	113	135	206
ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	49.72	56.23	42.78
อัตราการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	1.03	0.93	0.71
ผลได้ของเอทานอล (กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้)	0.432	0.421	0.207
ระยะเวลาที่ใช้ในการผลิต (ชั่วโมง)	48	72	72

จากข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่าที่ระดับความเข้มข้นของน้ำต้อย 150 กรัมต่อลิตรมีความเหมาะสมที่สุดในการผลิตเอทานอล เพราะเมื่อพิจารณาถึงอัตราการผลิตเอทานอล และผลได้ของเอทานอล คือ 1.03 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.432 กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้ (ตารางที่ 4.12) ซึ่งมีค่ามากที่สุดจากทั้ง 3 ความเข้มข้น

4.5 การผลิตเอทานอลจากน้ำต้อยที่ได้จากการย่อยปลายข้าวด้วยลูกแป้งข้าวหมากโดยใช้ *Z. mobilis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร

การผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยการนำภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากการศึกษาในระดับขวดทดลองมาใช้ในการผลิตในปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำต้อยที่ได้จากการย่อยปลายข้าวด้วยลูกแป้งข้าวหมาก โดยปรับปริมาณน้ำต้อยเริ่มต้นเป็น 150 กรัมต่อลิตร ปรับค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้นเป็น 5.5 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้หัวเชื้อคิดเป็น 10 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการกวน 60 รอบต่อนาที เพื่อให้เชื้อได้สัมผัสกับอาหารอย่างทั่วถึง และทำการหมักโดยให้มีปริมาตรทำการในถังเท่ากับ 1 ลิตร โดยผลการผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แสดงดังรูปที่ 4.15 พบว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลมีการลดลงอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24 ก่อนที่จะเริ่มมีค่าคงที่ ส่วนของปริมาณเอทานอลมีอัตราการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องและสามารถผลิตเอทานอลได้สูงสุดชั่วโมงที่ 28 ซึ่งสอดคล้องกับความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลที่ลดลง



รูปที่ 4.17 แสดงการเปลี่ยนแปลงของความเข้มข้นน้ำตาล ความเข้มข้นของเอทานอล และการเจริญของเซลล์ที่ช่วงเวลาต่างๆ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยการเลี้ยงแบบกะที่มีปริมาตรทำการเท่ากับ 1 ลิตร

จากผลการศึกษา เมื่อเปรียบเทียบกับในระดับขวดทดลอง พบว่า สามารถผลิตเอทานอลได้ 59.73 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีอัตราการผลิต 2.13 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของเอทานอลเท่ากับ 0.49 กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองในระดับขวดทดลอง จะพบว่าเมื่อนำมาทดลองในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะให้ผลผลิตเอทานอลที่ดีกว่า ดังแสดงในตารางที่ 4.13

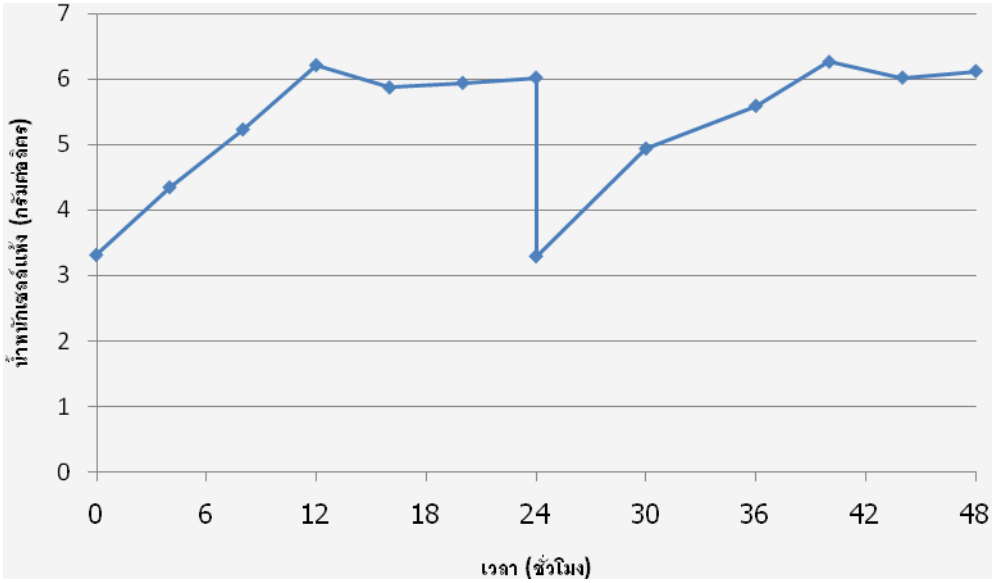
ตารางที่ 4.13 เปรียบเทียบผลการผลิตเอทานอลในระดับขวดทดลองและถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกะ

ระดับการทดลอง	ขวดทดลอง	ถังปฏิกรณ์ชีวภาพ
ความเข้มข้นน้ำต้อยตั้งต้น (กรัมต่อลิตร)	150	150
ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	113	126
ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	49.72	59.73
อัตราการผลิตเอทาอนล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	1.03	1.24
ผลได้ของเอทานอล (กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้)	0.43	0.46
ระยะเวลาในการผลิต (ชั่วโมง)	48	48

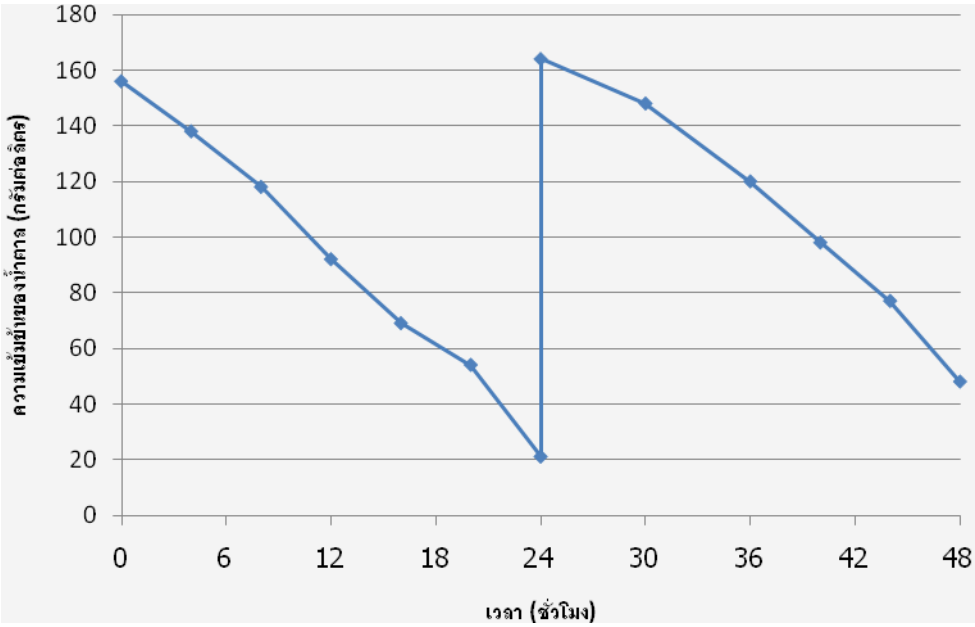
จากตารางที่ 4.13 เมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลในระดับขวดทดลองและในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำต้อยเริ่มต้นเท่ากันที่ 150 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดเบสเริ่มต้น เท่ากับ 5.5 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพมีการควบคุมความเป็นกรดเบสให้มีค่าคงตลอดการทดลอง และมีอัตราการกวน 60 รอบต่อนาที ซึ่งแตกต่างจากในระดับขวดทดลองที่ไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดเบส และไม่มีการกวนให้อากาศ ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการทดลอง พบว่าในระดับขวดทดลอง ค่าความเป็นกรดเบสจะลดลงจาก 5.5 ไปอยู่ที่ 3.8-3.95 ซึ่งเป็นค่าความเป็นกรดเบสที่ไม่เหมาะแก่การเจริญของเชื้อแบคทีเรีย *Z. mobilis* และในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีการกวน 60 รอบต่อนาที จะช่วยให้แบคทีเรียสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อได้อย่างทั่วถึง ซึ่งตรงกับการทดลองของ (Toma และคณะ, 2002) ที่ศึกษาผลของการกวนต่อการผลิตเอทานอล พบว่าการกวนมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของเชื้อ *Z. mobilis* เพราะการกวนนั้นจะทำให้มีอากาศละลายในอาหารมากขึ้น ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเชื้อ (Abate และคณะ, 1996)

4.6 การผลิตเอทานอลจากปลายข้าวในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ด้วยการหมักแบบกึ่งกะ

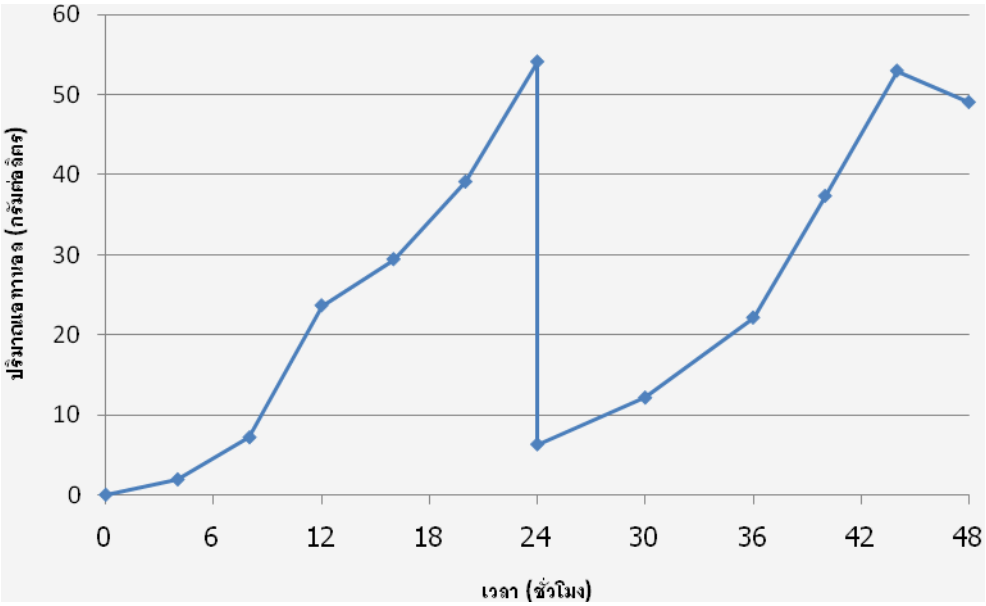
จากการทดลองผลิตเอทานอลแบบกะสามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของน้ำต้อยเริ่มต้นควรเป็น 150 กรัมต่อลิตร ในการทดลองนี้จึงผลิตเอทานอลโดยแบ่งการเติมน้ำตาลออกเป็น 2 ช่วง ให้มีค่าปริมาณน้ำตาลรวมประมาณ 150 กรัมต่อลิตร โดยการทดลองนี้จะเริ่มต้นด้วยการเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบส 5.5 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และเมื่อเชื้อเข้าสู่ประมาณชั่วโมงที่ 24 ซึ่งพบว่าน้ำตาลถูกใช้ไปจนเกือบหมด จึงทำการเติมน้ำต้อยลงไปเพื่อให้ความเข้มข้นของน้ำตาลมีค่าเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งเหมาะแก่การผลิตเอทานอล (การทดลองนี้นำน้ำหมักออก 1/2 ลิตร ก่อนเติมอาหาร 1.0 ลิตรจึงมีปริมาตรสุดท้าย 1.5 ลิตร) ซึ่งจะช่วยลดการเกิด end-product inhibition เพราะมีการนำน้ำหมักออกจากถังหมักจำนวนหนึ่ง และลดเวลาและต้นทุนการเตรียมหัวเชื้อ



รูปที่ 4.18 แสดงน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 ในการหมักแบบกึ่งกะ ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร



รูปที่ 4.19 แสดงความเข้มข้นของน้ำตาล (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 ในการหมักแบบกึ่ง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร



รูปที่ 4.20 แสดงการผลิตเอทานอล (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงเวลาต่างๆของ *Z. mobilis* TISTR 405 ในการหมักแบบกึ่ง ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร

ตารางที่ 4.14 ผลของการเติมน้ำตาลในการผลิตเอทานอลในถังปฏิกรณ์ชีวภาพแบบกึ่งกะ

ปริมาณน้ำตาลที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)	230
ความเข้มข้นเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	54.07
อัตราการผลิตเอทาอนล (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	2.25
ผลได้ของเอทานอล (กรัมของเอทานอลต่อกรัมของน้ำตาลที่ถูกใช้)	0.51
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	0.24
ระยะเวลาในการผลิต (ชั่วโมง)	48

ในส่วนของการผลิตเอทานอลนั้นจากการศึกษาก่อนหน้าแสดงให้เห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลมีค่าสูงเกินไปจะไปกระตุ้นให้มีแรงดันออสโมติกมาก ทำให้เชื้อ *Z. mobilis* มีช่วง lag phase ที่ยาวขึ้น และจะมีการนำน้ำตาลไปสร้างผลผลิตอย่างอื่นร่วมด้วย นอกเหนือจากการผลิตเอทานอล เช่น ซอร์บิทอล ทำให้เซลล์สูญเสียพลังงานบางส่วนไป ส่งผลให้การสร้างเอทานอลมีปริมาณลดลง (Doelle และ Green, 1985) ซึ่งสามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้โดยทำการเลี้ยงแบบกึ่งกะ จากภาวะเหมาะสมที่ได้จากการทดลองก่อนหน้านี้ได้แก่ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ความเป็นกรดเบส 5.5 อุณหภูมิ 30 นำภาวะดังกล่าวมาทดลองผลิตเอทานอลแบบกึ่งกะ เพราะการหมักแบบกึ่งกะ ช่วยลดการเกิด end-product inhibition เพราะมีการนำน้ำหมักออกจากถังหมักจำนวนหนึ่ง (การทดลองนี้นำน้ำหมักออก 1/2 ลิตร ก่อนเติมอาหาร 1.0 ลิตรจึงมีปริมาตรสุดท้าย 1.5 ลิตร) ซึ่งจะช่วยลดในเรื่องของเวลาและต้นทุนการเตรียมหัวเชื้อ

การหมักแบบกะในเวลา 24 ชั่วโมงแรกให้ผลคล้ายกับการทดลองที่ผ่านมา *Zymomonas mobilis* เจริญอย่างดีใน 12 ชั่วโมงแรกหลังจากนั้นน้ำหนักแห้งก็ค่อนข้างคงที่ ที่ 5.8 - 6.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการเจริญ 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่การใช้น้ำตาลเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ ตลอด 24 ชั่วโมงด้วยอัตรา 5.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การผลิตเอทานอลเกิดได้สม่ำเสมอตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และยังคงเกิดขึ้นแม้น้ำหนักเซลล์ไม่เพิ่มขึ้นแล้วก็ตาม อัตราการผลิตเอทานอลในช่วงเวลาดังกล่าวเท่ากับ 2.43 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

หลังจากการเอาอาหารออกและเติมอาหารใหม่ดังที่กล่าวมาแล้ว การหมักเป็นไปคล้ายเดิมแต่ช้าลงเล็กน้อย อัตราการเจริญลดลงเหลือ 0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การใช้น้ำตาลเหลือ 4.83 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและการผลิตเอทานอลเท่ากับ 2.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เมื่อคิดรวมอาหารทั้งหมด 2 ลิตร เป็นการใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 230 กรัมได้เอทานอลทั้งหมด 118.15 กรัมดังนั้นประสิทธิภาพการผลิตจึงเท่ากับ 0.51กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 การคัดเลือกตัวอย่างลูกแป้งที่มีประสิทธิภาพในการผลิตน้ำต้อย

ลูกแป้งรหัสอุบลราชธานี 2 เป็นลูกแป้งที่มีความสามารถในการย่อยปลายข้าวได้ดีที่สุด และสภาวะที่เหมาะสมในการย่อยปลายข้าว คือ มีอัตราส่วนของปลายข้าว 50 กรัม ต่อน้ำ 65 มิลลิลิตร โดยนำไปนึ่งที่ความร้อน 121 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็น เมื่อนำไปคลุกเคล้าให้เข้ากัน และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จะได้น้ำต้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูงที่สุด โดยจะมีความเข้มข้นของน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 446 กรัมต่อลิตร และมีค่าความเป็นกรดเบสอยู่ที่ 3.84 ถึง 3.92

5.1.2 การศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดย *Z. mobilis* TISTR 405

จากการศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลโดย *Z. mobilis* โดยการหมักแบบกะ ในระดับขวดทดลองพบว่า ช่วงการเจริญสูงสุดของเชื้อโดยใช้น้ำตาลกลูโคส 150 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า เชื้อมีอัตราการเจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 เมื่อทดสอบผลของปัจจัยต่างๆที่มีต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้ 2^4 central composite factorial design และนำผลที่ได้มาวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรมทางสถิติเพื่อสร้างภาพพื้นที่ผิว (Response surface methodology) เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยและหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล ซึ่งจากการศึกษาพบว่า สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล คือ ความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้น 150 กรัมต่อลิตร ค่าความเป็นกรดเบสเริ่มต้น เท่ากับ 5.5 อุณหภูมิในการผลิตเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการผลิต 48 ชั่วโมง โดยค่าที่ได้จากการทดลองมีความสอดคล้องกับที่มีการรายงานก่อนหน้าที่ว่า *Z. mobilis* สามารถเจริญได้ในค่าความเป็นกรดเบสที่กว้าง คือ ตั้งแต่ 3.5-7.5 แต่ค่าความเป็นกรดเบสที่เหมาะสมที่สุดจะอยู่ที่ 5-7 และอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อ *Z. mobilis* จะอยู่ในช่วง 30-38 องศาเซลเซียส (Swings และDeley, 1977)

จากการศึกษาการผลิตเอทานอลจากน้ำต้อยที่ย่อยได้จากปลายข้าว ศึกษาโดยการแปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้นเป็น 150 300 และ 400 กรัมต่อลิตร พบว่า ที่ความเข้มข้น 300 กรัมต่อลิตร จะสามารถผลิตเอทานอลได้สูงกว่าที่ความเข้มข้นของน้ำตาลตั้งต้น 150 กรัมต่อลิตรเล็กน้อย แต่จะใช้ระยะเวลาในการผลิตที่มากกว่า เพราะมีช่วง lag phase ที่นาน ซึ่งเป็นผลมาจากความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินไป ทำให้เชื้อต้องเผชิญภาวะที่มีความดันออสโมติกสูงกว่าปกติ จึงต้องใช้พลังงานบางส่วนไปในการรักษาสภาพเซลล์ก่อน จึงส่งผลให้ช่วง lag phase มีเวลานาน (Barros และCelligio, 2006) ซึ่งปริมาณเอทานอลในระยะเวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นของน้ำตาลที่ผลิตเอทานอลได้สูงสุด คือ 150 300 และ400 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะให้ความเข้มข้นของเอทานอลสูงที่สุดที่ 56.23 กรัมต่อลิตร แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการผลิตถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งจะให้ค่าความเข้มข้นของเอทานอล อัตราการผลิตเอทานอล และผลได้ของเอทานอล คือ 56.23 กรัมต่อลิตร 0.78 ต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.41 ตามลำดับ ดังนั้นความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอล คือ 150 กรัมต่อลิตร ซึ่งจะให้ความเข้มข้นของเอทานอล อัตราการผลิตเอทานอล และผลได้ของเอทานอล คือ 49.72 กรัมต่อลิตร 1.03 ต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 0.43 ตามลำดับ

การศึกษาการผลิตเอทานอลจากปลายข้าวโดยใช้ *Z. mobilis* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร ด้วยการหมักแบบกะ จากการนำสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลที่ได้จากการศึกษาในระดับขวดทดลอง โดยใช้ความเข้มของน้ำตาลตั้งต้นที่ 150 กรัมต่อลิตร ควบคุมความเป็นกรดเบสที่ 5.5 บ่มที่อุณภูมิ 30 องศาเซลเซียส และมีการกวนที่ 60 รอบต่อนาที โดยมีปริมาตรทำการเป็น 1 ลิตร และเติมหัวเชื้อเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้น 59.73 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอล 2.48 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และผลได้ของเอทานอลเท่ากับ 0.49 ซึ่งพบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้นั้นสูงกว่าในระดับขวดทดลอง ซึ่งเป็นเพราะมีการกวนทำให้เชื้อแบคทีเรียใช้อาหารในถังหมักได้อย่างทั่วถึง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ (Nowak และคณะ, 2000) ที่ทำการศึกษาการผลิตเอทานอลโดยการหมักแบบกะ และมีอัตราการกวน 150 รอบต่อนาที พบว่า การกวนช่วยให้สามารถผลิตเอทานอลได้สูงขึ้น และ (Toma และคณะ, 2002) ที่ศึกษาผลของการกวนต่อการผลิตเอทานอล พบว่าการกวนมีผลต่อการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลของเชื้อ *Z. mobilis* แต่ถ้ามีอัตราการกวนที่สูงเกินไปจะส่งผลไปยับยั้งการเจริญและการผลิตเอทานอลของเชื้อ เพราะการกวนนั้นจะทำให้มีอากาศละลายในอาหารมากขึ้น ซึ่งมีผลต่อการทำงานของเชื้อ (Abate และคณะ, 1996)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของน้ำตาลที่สูงเกินไปมีผลต่อการผลิตเอทานอล จากปลายข้าวโดยเชื้อ *Z. mobilis* TISTR 405 จึงสามารถแก้ปัญหานี้ได้โดยการหมักเอทานอลแบบกึ่งกะ ซึ่งเป็นวิธีการโดยทั่วไปที่มีการนำมาใช้ในการแก้ปัญหาในเรื่องความเข้มข้นของสารอาหาร การเพิ่มอัตราการผลิต และผลผลิต (Yamame และ Simizu, 1984) ซึ่งในการเลี้ยงแบบกึ่งกะนอกจากจะสามารถแก้ปัญหาในเรื่องข้อจำกัดของสารตั้งต้นแล้วยังช่วยในการลดผลของการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์ เช่น การสะสมของเอทานอลในระหว่างการผลิต ที่อาจมีผลอันตรายต่อเซลล์

การทดลองการผลิตเอทานอลแบบกึ่งกะในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 2 ลิตร โดยเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำตาลความเข้มข้น 150 กรัมต่อลิตร เมื่อเชื้อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งปริมาณน้ำตาลถูกใช้จนใกล้หมดจึงทำการนำน้ำหมักออกจากระบบปริมาณ 500 มิลลิลิตร เพื่อช่วยลดการเกิด end-product inhibition หลังจากนั้นทำการเติมน้ำต้อยปริมาณ 1 ลิตร ลงไปเพื่อให้มีปริมาณของน้ำตาลในระบบเป็น 150 กรัมต่อลิตรอีกครั้งเพื่อที่จะสามารถผลิตเอทานอลได้อย่างต่อเนื่องและช่วยในการลดเวลาและต้นทุนการเตรียมหัวเชื้อ ลงไปแล้วปรับค่าความเป็นกรดเบสให้เป็น 5.5 ผลที่ได้พบว่า

การหมักแบบกะในเวลา 24 ชั่วโมงแรกให้ผลคล้ายกับการทดลองในการหมักแบบกะที่ผ่านมา *Zymomonas mobilis* เจริญอย่างดีใน 12 ชั่วโมงแรกหลังจากนั้นน้ำหนักแห้งก็ค่อนข้างคงที่ ที่ 5.8-6.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็นอัตราการเจริญ 0.24 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในขณะที่การใช้น้ำตาลเป็นไปอย่างสม่ำเสมอ ตลอด 24 ชั่วโมงด้วยอัตรา 5.63 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การผลิตเอทานอลเกิดได้สม่ำเสมอตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 และยังคงเกิดขึ้นแม้น้ำหนักเซลล์ไม่เพิ่มขึ้นแล้วก็ตาม อัตราการผลิตเอทานอลในช่วงเวลาดังกล่าวเท่ากับ 2.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อถึงชั่วโมงที่ 24 ทำการเอาน้ำหมักออกปริมาตร 500 มิลลิลิตร แล้วทำการเติมน้ำต้อยเข้าไปในระบบเพื่อเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลให้มีค่าเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อเติมน้ำต้อยลงไปพบว่าปริมาณเชื้อ และควาเข้มข้นของเอทานอลมีปริมาณลดลงจนเกือบเท่ากับปริมาณเชื้อและความเข้มข้นของเอทานอลเมื่อเริ่มทำการทดลอง ซึ่งเป็นเพราะเชื้อและปริมาณเอทานอลส่วนหนึ่งถูกนำออกไปพร้อมกับน้ำหมักที่เอาออกจากระบบและยังถูกเจือจางด้วยปริมาณของน้ำต้อยที่ถูกเติมเข้าไปในระบบ

หลังจากการเอาอาหารออกและเติมอาหารใหม่ดังที่กล่าวมาแล้ว การหมักเป็นไปคล้ายเดิม แต่ช้าลงเล็กน้อย อัตราการเจริญลดลงเหลือ 0.19 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง การใช้น้ำตาลเหลือ 4.83 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมงและการผลิตเอทานอลเท่ากับ 2.33 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

เมื่อคิดรวมอาหารทั้งหมด 2 ลิตร เป็นการใช้น้ำตาลไปทั้งหมด 230 กรัมได้เอทานอลทั้งหมด 118.15 กรัมดังนั้นประสิทธิภาพการผลิตจึงเท่ากับ 0.51 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งดีกว่าในช่วงที่เป็นการเลี้ยงแบบกะ ซึ่งมีประสิทธิภาพการผลิต 0.46 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลอีกทั้งในการเลี้ยงแบบกึ่งกะสามารถทำการผลิตเอทานอลได้อย่างต่อเนื่องซึ่งช่วยลดต้นทุนในเตรียมหัวเชื้อและระยะเวลาที่ใช้ในการผลิตก็น้อยกว่า

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. คุณสมบัติของลูกแป้งมีความไม่แน่นอนของจุลินทรีย์ที่มีในลูกแป้ง ทำให้ผลผลิตน้ำต้อยในการย่อยปลายข้าวในแต่ละครั้งมีค่าไม่คงที่ ซึ่งควรมีการปรับปรุงลูกแป้งรวมทั้งจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในลูกแป้งให้มีความคงที่ และมีสายพันธุ์ที่มีความสามารถสูง
2. การศึกษาครั้งนี้ ศึกษาเฉพาะความเข้มข้นของน้ำตาลที่ได้จากปลายข้าว จึงควรมีการวิเคราะห์สารอื่นๆที่มีในปลายข้าว ซึ่งอาจมีผลต่อการผลิตเอทานอลด้วย
3. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกระบวนการเพิ่มผลผลิตเอทานอล เช่น การหมักแบบต่อเนื่อง เป็นต้น
4. ควรมีการศึกษาถึงปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลจากปลายข้าว เช่น แหล่งไนโตรเจน และแร่ธาตุต่างๆเป็นต้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กฤติกานต์ มหาวรรณ. 2523. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จันทนา เก่าก่อน. 2535. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสจากเชื้อรา *Aspergillus niger* จากแป้งข้าวเหนียว ปัญหาพิเศษ คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ วิทยาเขตมหาสารคาม.

ชัยวัฒน์ จาติกเสถียร. 2520. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อราและยีสต์ในลูกแป้งสำหรับการหมักข้าวหมาก วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ทศพร ทศนานนท์. 2547. การคัดแยกและการศึกษาการสร้างเอนไซม์อะมิเลสจากเชื้อราที่แยกได้จากลูกแป้งเหล้า โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นภา โล่ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพมหานคร : พันนี พับลิชชิง.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2535. เอนไซม์ทางอาหาร ตอนที่ 1 และ 2. กรุงเทพมหานคร : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พจนีย์ จันทมาลี. 2539. การหมักข้าวหมากด้วยลูกแป้งและเชื้อบริสุทธิ์ วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ไพโรจน์ วิริจารี. 2544. การออกแบบพื้นที่การตอบสนอง. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

มนตรี เชาว์สังเกต. 2521. การคัดเลือกสายพันธ์ยีสต์และราเพื่อใช้ผลิตไวน์ข้าว วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2529. เทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร : โอเดียนสโตร์.

สมพร สินธารา. 2544. การแยกการจัดจำแนก และการเก็บรักษายีสต์และราที่แยกได้จากลูกแป้งข้าวหมากและลูกแป้งเหล้าในประเทศไทย วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Bai, F.W., Anderson, W.A. and Young, M.M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. Biotechnology Advances. 26: 89-105.

Bandaru, V.V.R., Somalanka, S.R., Mendu, D.R., Madicherla, N.R. and Chityala, A. 2006. Optimization of fermentation conditions for the production of ethanol from sago starch by co-immobilized amyloglucosidase and cells of *Zymomonas mobilis* using response surface methodology. Enzyme Microbiology Technology 38: 209-214.

Behera, S., Mohanty, R.C. and Ray, R.C. 2010. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (Madhuca latifolia L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis*. Applied Energy. 87: 2352-2355.

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

Belo, I., Pinheiro, R. and Mota, M. 2005. Morphological and physiological changes in *Saccharomyces cerevisiae* by oxidative stress from hyperbaric air. Journal of Biotechnology. 115: 397-404.

Box, G.E.P., Hunter, S.W. and Hunter, J.S. 1978. Statistic for Experiments an Introduction to Design. Data Analysis and Model Building John Wiley, Inc., New York. pp. 653.

Cazetta, M.L., Celligoi, M.A.P.C., Buzato, J.B., Scarmino, I.S. and Silva, R.S.F. 2005. Optimization study for sorbitol production by *Zymomonas mobilis* in sugar cane molasses. Process Biochemistry. 40: 747–751.

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

Park, S.C. and Baratti, J.C. 1992. Continuous Ethanol Production from Sugar Beet Molasses Using an Osmotolerant Mutant Strain of *Zymomonas mobilis*. Journal of Fermentation and Bioengineering. 73: 16-21.

Davis, L., Young, J.J., Svenson, C., Rogers, P., Pearce, J. and Peiris, P. 2005. Evaluation of wheat stillage for ethanol production by recombinant *Zymomonas mobilis*. Biomass and Bioenergy. 29: 49-59.

Doelle, H.W. and Greenfield, P.F. 1985. The production of ethanol from sucrose using *Zymomonas mobilis*. Apply Microbiology Biotechnology. 22: 405-410.

Ellis, J., Wang, H.J. and Hesseltine. 1974. Rhizopus and chlamydomucor strains surveyed for milk-clotin, Amylolytic and antibiotic activities. Mycologia. 66: 593-599.

Hamsaveni, D.R., Prapulla, S.G. and Divakar, S. 2001. Response surface methodology approaches for the synthesis of isobutyl isobutyrate. Process Biochem. 36: 1103-1109.

Fu, N., Peiris, P., Markham, J. and Bavor, J. 2009. A novel co-culture process with *Zymomonas mobilis* and *Pichia stipitis* for efficient ethanol production on glucose/xylose mixtures. Enzyme and Microbial Technology. 45: 210-217.

Iida, T., Sakamoto, M., Izumida, H. and Akagi, Y. 1993. Characteristics of *Zymomonas mobilis* Immobilized by Photo-Crosslinkable Resin in Ethanol Fermentation. Journal of Fermentation and Bioengineering. 75: 28-31.

Ishikawa, H., Nobayashi, H. and Tanaka, H. 1990. Mechanism of Fermentation Performance of *Zymomonas mobilis* under Oxygen Supply in Batch Culture. Journal of Fermentation and Bioengineering. 70: 34-40.

Jeffries, T.W. 2005. Ethanol fermentation on the move. Microbial and Biochemical Technology. 23.

Kalnenieks, U. 2006. Physiology of *Zymomonas mobilis*: Some Unanswered Questions. Advance in Microbiology Physiology. 51: 74-117.

Kim, C.H., Abidin, Z., Ngee, C.C. and Rhee, S.K. 1992. Pilot-Scale Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis* from Simultaneously Saccharified Sago Starch. Bioresource Technology. 40: 1-6.

Lee, K.J., Lefebvre, M., Tribe, D.E. and Rogers, P.L. 1980. High productivity ethanol fermentations with *Zymomonas mobilis* using continuous cell recycle. Biotechnology Letters. 2: 487-492.

Lee, W.C. and Huang, C.T. 2000. Modeling of ethanol fermentation using *Zymomonas mobilis* ATCC 10988 grown on the media containing glucose and fructose. Biochemical Engineering Journal. 4: 217-227.

Lee, S.W., Ebata, T., Liu, I.Y.C. and Tanaka, H. 1993. Co-Immobilization of Three Strains of Microorganisms and Its Application in Ethanol Production from Raw Starch under Unsterile Conditions. Journal of Fermentation and Bioengineering. 75: 36-42.

Lezinou, V., Christakopoulos, P., Kekos, D. and Macris, B.J. 1994. Simultaneous saccharification and fermentation of sweet sorghum carbohydrates to ethanol. Biotechnology Letters. 16: 983-988.

Lin, Y. and Tanaka, S. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. Apply Microbiology Biotechnology. 69: 627-642.

Lyness, E. and Doelle, H.W. 1981. Ethanol production from cane juice by *Zymomonas Mobilis*. Biotechnology Letters. 3: 257-260.

Ma, H., Wang, Q., Qian, D., Gong, L. and Zhang, W. 2009. The utilization of acid-tolerant bacteria on ethanol production from kitchen garbage. Renewable Energy. 36:1466-1470.

Malvessi, E., Carra, S., Silveira, M.M., and Marco A.Z.A. 2010. Effect of substrate concentration, pH, and temperature on the activity of the complex glucose-fructose oxidoreductase/glucono-δ-lactonase present in calcium alginate-immobilized *Zymomonas mobilis* cells. Biochemical Engineering Journal. 51: 1-6.

Osman, Y.A. and Ingram, L.O. 1985. Mechanism of Ethanol Inhibition of Fermentation in *Zymomonas mobilis* CP4. Journal of Bacteriology. 164: 173-180.

Park, S.C. and Baratti, J. Comparison of ethanol production by *Zymomonas mobilis* from sugar beet substrates. Apply Microbiology Biotechnology. 35: 283-291.

Parker, C., Peekhaus, N., Zhang, X. and Conway, T. 1997. Kinetics of sugar transport and phosphorylation influence glucose and fructose cometabolism by *Zymomonas mobilis*. Apply Environmental Microbiology. 63: 3519-3525.

Patle, S. and Lal, B. 2008. Investigation of the potential of agro-industrial material as low cost substrate for ethanol production by using *Candida tropicalis* and *Zymomonas mobilis*. Biomass and Bioenergy. 32: 596-602.

Prasad, S., Singh, A. and Joshi, H.C. 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. Resources, Conservation and Recycling. 50: 1-39.

Rogers, P., Joachimsthal, E. and Haggett, K. 1997. Ethanol from lignocellulosics: potencial for *Zymomonas*-based process. Australasian Biotechnol. 7 (5): 304-309.

Rogers, P.L., Jeon, Y.J., Svenson and C.J. 2005. Application of biotechnology to industrial sustainability. Process Safety and Environmental Protection. 83: 499-503.

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

Shene, C. and Bravo, S. 2001. *Zymomonas mobilis* CP4 in fed-batch fermentations of glucose-fructose mixtures to ethanol and sorbitol. Apply Microbiology Biotechnology. 57: 323-328.

Silman, R.W. 1984. Ethanol Production by *Zymomonas mobilis* in Fed-batch Fermentations. Biotechnology and Bioengineering.6: 247-251.

Silveira, M.M., Wisbeck, E., Hoch, I. and Jonas, R. 2001. Production of glucose–fructose oxidoreductase and ethanol by *Zymomonas mobilis* ATCC 29191 in medium containing corn steep liquor as a source of vitamins. Apply Microbiology Biotechynol. 55: 442-445.

Skotnicki, M.L., Lee, K.J., Tribe, D.E. and Rogers, P.L. 1981. Comparison of Ethanol Production by Different Zymomonas Strains. Applied and Environmental Microbiology. 41: 889-893.

Suresh, K., Kiran, N. and Rao, L.V. 1999. Utilization of damaged sorghum and rice grains for ethanol production by simultaneous saccharification and fermentation. Bioresource Technology. 68: 301-304.

Swings, J. and DeLey, J. 1997. The biology of *Zymomonas mobilis*. Bacteriology. 41: 1-46.

Tanaka, K., Hilary Z.D. and Ishizaki, A. 1999. Investigation of the Utility of Pineapple Juice and Pineapple Waste Material as Low-Cost Substrate for Ethanol Fermentation by *Zymomonas mobilis*. Journal of bioscience and bioengineering. 87: 642-646.

Tano, M.S. and Buzato, J.B. 2003. Effect of presence of initial ethanol on ethanol production in sugar cane juice fermented *Zymomonas mobilis*. Brazillian Journal of Microbiology. 34: 242-244.

Tao, F., Miao, J.Y., Shi, G.Y. and Zhang, K.C. 2005. Ethanol fermentation by an acid tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. Process Biochemistry. 40: 183–187.

Toma, M.M., Kalnenieks, U., Berzins, A., Vigants, A., Rikmanis, M. and Viesturs, U. 2003. The effect of mixing on glucose fermentation by *Zymomonas mobilis* continuous culture. Process Biochemistry. 38: 1347-1350.

Tripetchkul, S., Tonokawa, M. and Ishizaki, A. 1992. Journal of Fermentation and Bioengineering. 74: 384-388.

Yamashita, Y., Kurosumi, A., Sasaki, C. and Nakamura, Y. 2008. Ethanol production from paper sludge by immobilized *Zymomonas mobilis*. Biochemical Engineering Journal. 42: 314-319.

ภาคผนวก ก
สูตรและวิธีเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **สูตรอาหารแข็ง Z-medium สำหรับเก็บรักษาเชื้อ** (stock culture medium)

   ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต $(NH_4)_2SO_4$	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต $(MgSO_4)$	2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	2	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
กลูโคส	200	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร โดยแยกนึ่งฆ่าเชื้อน้ำตาลด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วน mineral นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาผสมกันในภายหลัง

2. **สูตรอาหารเหลว Z-medium สำหรับเลี้ยงหัวเชื้อ** (seed culture medium)

   ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต $((NH_4)_2SO_4)$	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต $(MgSO_4)$	2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	2	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
กลูโคส	200	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร โดยแยกนึ่งฆ่าเชื้อน้ำตาลด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วน mineral นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาผสมกันในภายหลัง

3. **สูตรอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอทานอล** (Production medium)
ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	2	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$)	2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (Yeast Extract)	2	กรัม
Bacto peptone	5	กรัม
กลูโคส	150	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น และปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร โดยแยกนึ่งฆ่าเชื้อน้ำตาลด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ส่วน mineral นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาผสมกันในภายหลัง

ภาคผนวก ข
สารเคมีและวิธีเตรียมที่ใช้ในการทดลอง

1. **กลีเซอรอล 10 %**

เตรียมโดยนำกลีเซอรอล 87 % ปริมาตร 11.5 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 88.5 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. **สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์**

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl)	20	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น (Distilled water)	100	มิลลิลิตร

3. **สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์**

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5.84	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	100	มิลลิลิตร

4. **Sodium phosphate buffer ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์**

Disodium phosphate	13.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ปรับค่า pH เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

5. **เอทานอล 70%**

เอทานอล 99%	700	มิลลิลิตร
น้ำกลั่นปลอดประจุ	300	มิลลิลิตร

6. **สารละลายฟีนอล** (Phenol reagent) **ความเข้มข้น** 5 **เปอร์เซนต์**

ฟีนอล	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

7. **สารละลาย** Coomassie blue

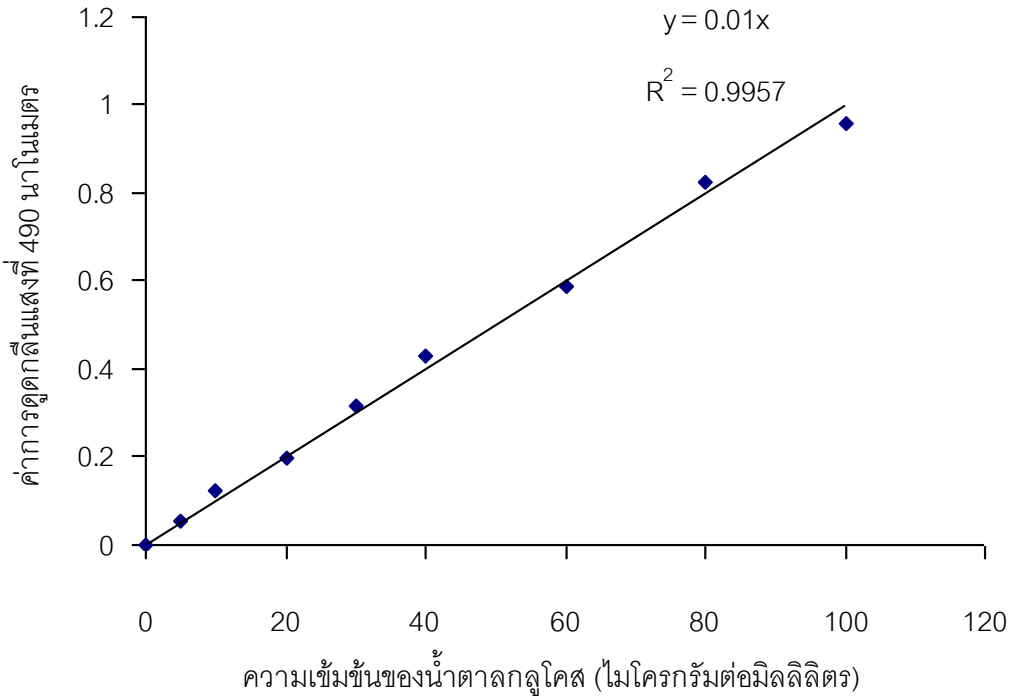
ชั่ง Coomassie blue G250 100 มิลลิกรัม ละลายในเอทานอลความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร คนจนละลายให้หมด แล้วจึงเติมกรดฟอสฟอริก ความเข้มข้น 85 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรของสารละลายด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร เป็น 1000 มิลลิลิตร

8. **สารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก** (DNSA reagent)

เตรียมโดยละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก 1 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ละลายบนเครื่องกวนสารแบบให้ความร้อน (Hotplate Stirrer) เติมโปแทสเซียมตาร์เตรต 30 กรัม จากนั้นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชา

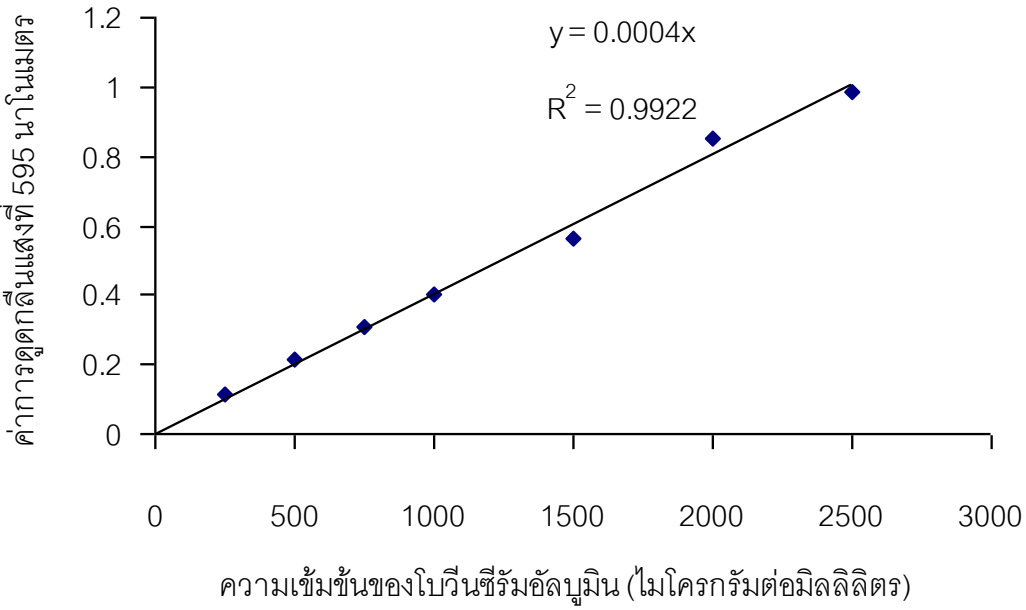
ภาคผนวก ค
กราฟมาตรฐาน

1. **กราฟมาตรฐานน้ำตาลทั้งหมดเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี** Phenol-Sulfuric acid (Dubois **และคณะ**, 1956)



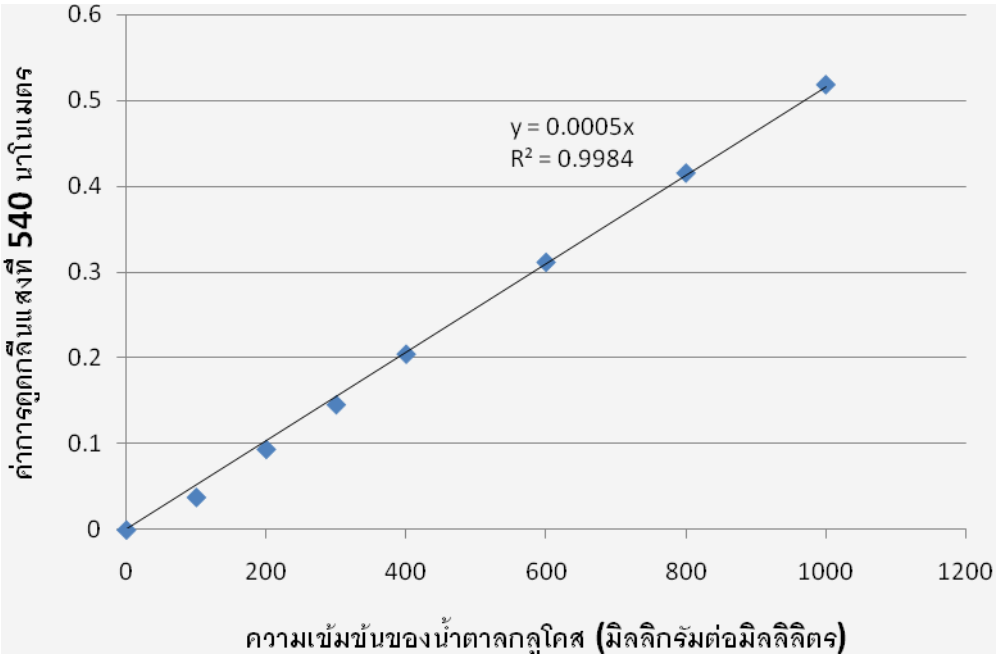
กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2. **กราฟมาตรฐานคาร์โบไฮเดรตเมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี** Protein Dye Binding (Bradford, 1976)



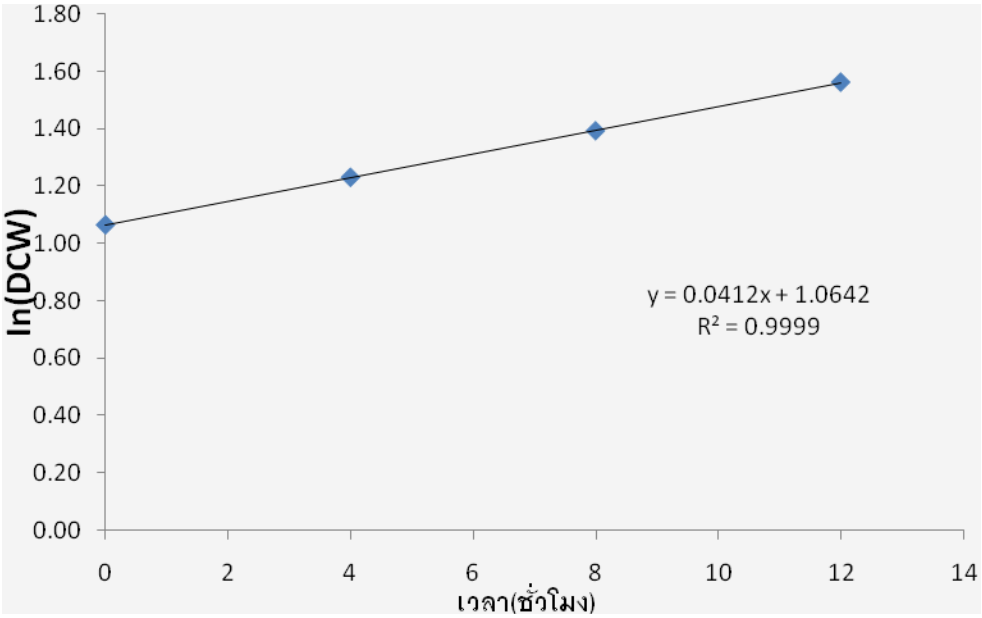
กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร กับโปรตีนมาตรฐานโบวีนซีรัมอัลบูมินความเข้มข้น 0-2500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3. **กราฟมาตรฐานน้ำตาลรีดิวซ์เมื่อวิเคราะห์ด้วยวิธี** Dinitrosalicylic acid (Miller, 1959)

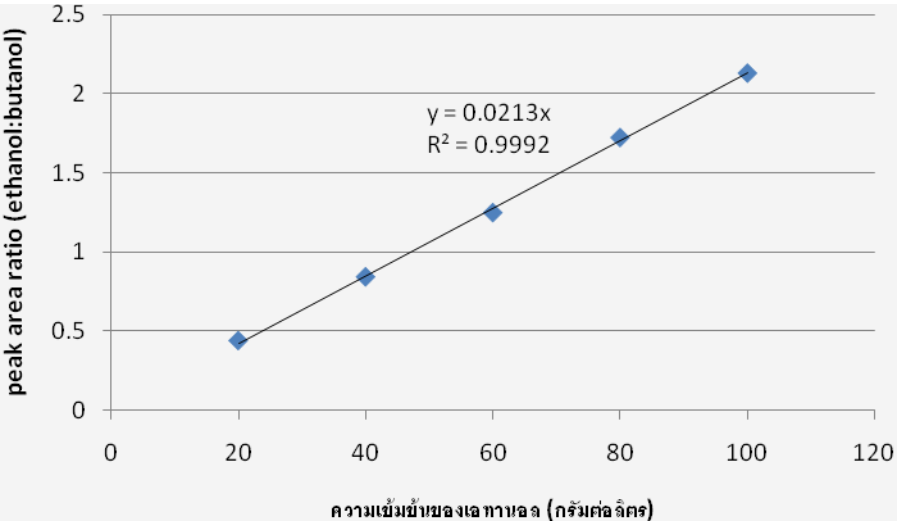


กราฟมาตรฐานแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร กับน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 0-1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. กราฟอัตราการเจริญจำเพาะของ *Zymomonas mobilis* TISTR 405



5. กราฟมาตรฐานเอทานอล



ภาคผนวก ง

ตารางที่ 1 2^4 Factorial experimental designs เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของน้ำตาล ค่าความเป็นกรดเบส อุณหภูมิ และระยะเวลา ที่มีผลต่อการผลิตเอทานอลของ *Z. mobilis* TISTR 405

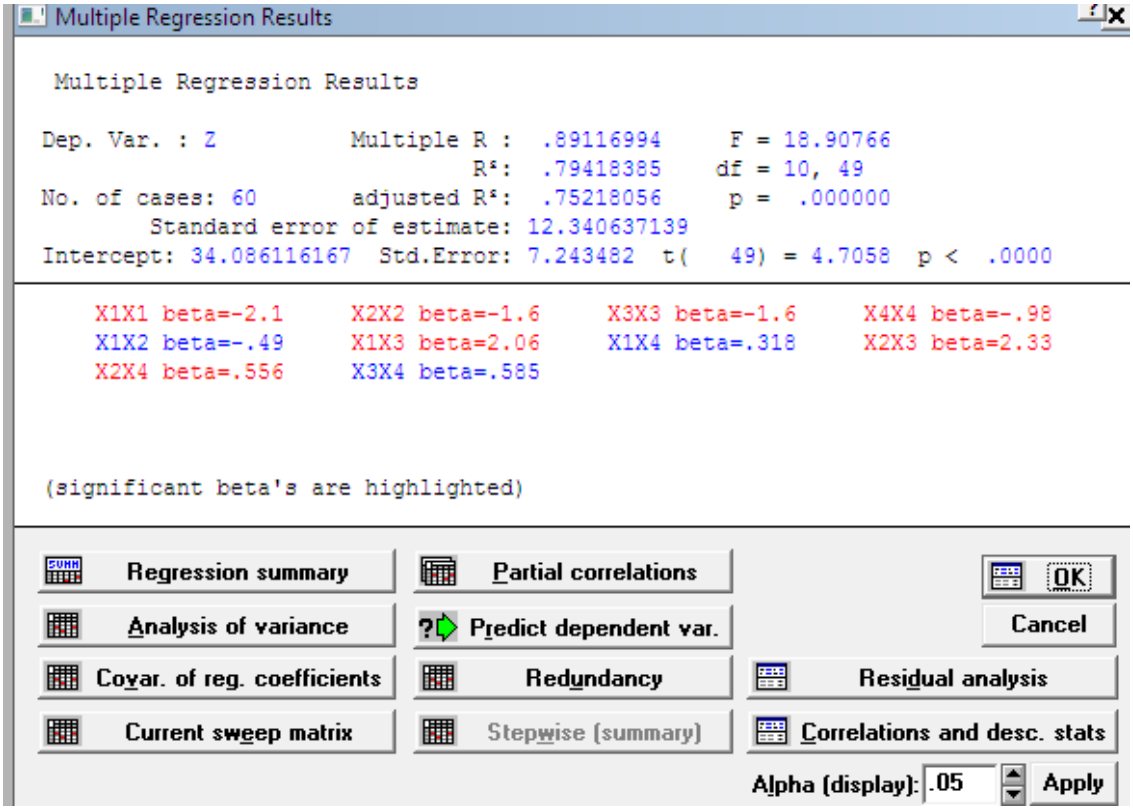
Run no.	Variables in Condition				Production yield	
	X_1	X_2	X_3	X_4	Ethanol (g L^{-1})	Biomass (g L^{-1})
1	-	-	-	-	2.85	1.16
2	-	-	+	-	1.71	1.22
3	-	+	-	-	36.78	2.60
4	-	+	+	-	51.78	3.56
5	-	-	-	+	34.24	2.86
6	-	-	+	+	15.94	1.28
7	-	+	-	+	50.10	2.80
8	-	+	+	+	45.65	5.12
9	+	-	-	-	4.19	0.96
10	+	-	+	-	4.17	1.06
11	+	+	-	-	7.20	5.70
12	+	+	+	-	46.03	5.50
13	+	-	-	+	4.39	1.98
14	+	-	+	+	3.33	4.63
15	+	+	-	+	3.90	2.62
16	+	+	+	+	21.99	5.52

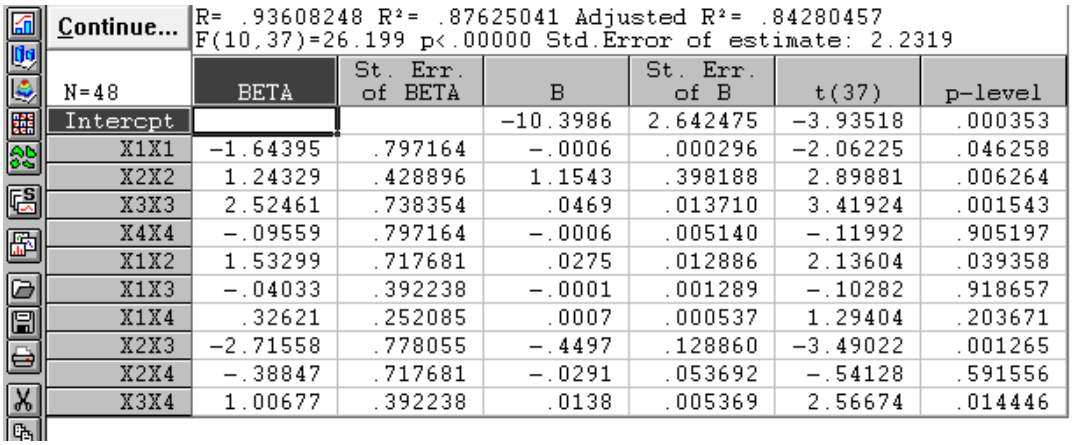
Variables		Coded levels	
		-	+
X_1	Glucose concentration (g L^{-1})	100	300
X_2	pH	4	8
X_3	Temperature (^oC)	25	35
X_4	Time of cultivation (h)	24	72

ภาคผนวก จ

(Response surface methodology)

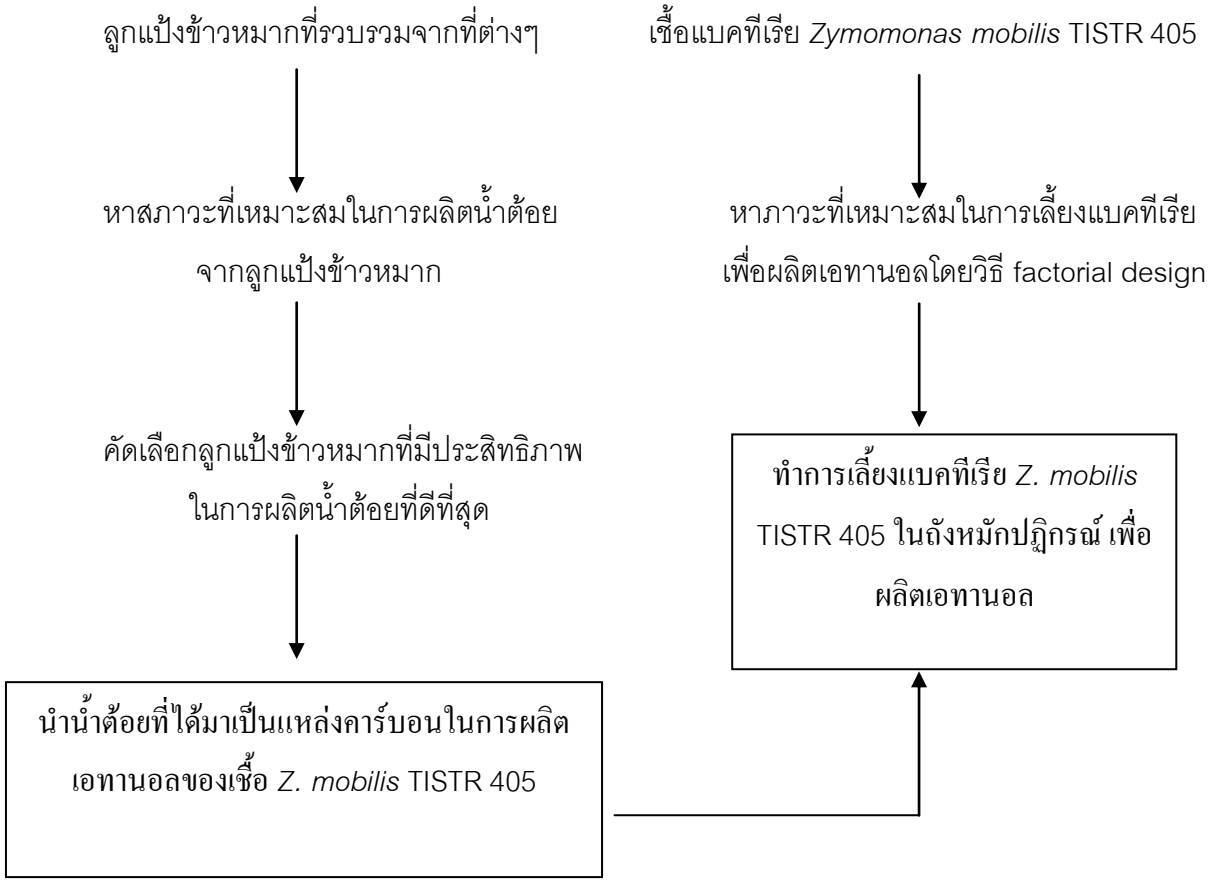
แสดงค่า R^2 และค่าสัมประสิทธิ์ของ RSM





N=48	BETA	St. Err. of BETA	B	St. Err. of B	t(37)	p-level
Intercept			-10.3986	2.642475	-3.93518	.000353
X1X1	-1.64395	.797164	-.0006	.000296	-2.06225	.046258
X2X2	1.24329	.428896	1.1543	.398188	2.89881	.006264
X3X3	2.52461	.738354	.0469	.013710	3.41924	.001543
X4X4	-.09559	.797164	-.0006	.005140	-.11992	.905197
X1X2	1.53299	.717681	.0275	.012886	2.13604	.039358
X1X3	-.04033	.392238	-.0001	.001289	-.10282	.918657
X1X4	.32621	.252085	.0007	.000537	1.29404	.203671
X2X3	-2.71558	.778055	-.4497	.128860	-3.49022	.001265
X2X4	-.38847	.717681	-.0291	.053692	-.54128	.591556
X3X4	1.00677	.392238	.0138	.005369	2.56674	.014446

ภาคผนวก ฉ
แผนผังงานวิจัย



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายเกษมชัย ทิวากรศศิธร เกิดวันจันทร์ที่ 29 ตุลาคม พ.ศ.2527 ได้รับปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2550 และสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 ปัจจุบันอาศัยอยู่บ้านเลขที่ 1169/16 ถ.กรุงเทพฯ-นนทบุรี 39 เขตบางซื่อ กรุงเทพมหานครฯ 10800

ผลงานตีพิมพ์เผยแพร่

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ได้เข้าร่วมเสนอผลงานในการประชุมทางวิชาการระดับชาติ “The 3rd Biochemistry and Molecular Biology International Conference” ระหว่างวันที่ 6-8 เมษายน 2554 ณ The Empress Convention Centre จังหวัดเชียงใหม่ ในหัวข้อเรื่อง “Optimization of fermentation condition for the production of ethanol by *Zymomonas mobilis* using response surface methodology”