การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ UBU

อนุพล ฤกษ์สว่าง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ETHANOL FERMENTATION FROM JERUSALEM ARTICHOKE JUICE AT HIGH TEMPERATURE BY THEMOTOLERANT YEAST *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* UBU STRAINS

ANUPOL RERKSAWANG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS

FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

MAJOR IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

YEAR 2013

COPYRIGHT OF UBON RATCHATHANI UNIVERSITY

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์

เรื่อง การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ UBU

ผู้วิจัย นายอนุพล ฤกษ์สว่าง

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ดร.สนม โนนกลาง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นารีรัตน์ ไชยคง)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชริดา ปุกหุต)

..... กรรมการ

(ดร.แก้วตา สูตรสุวรรณ)

..... คณบดี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์เพ็ญ อินทรประเสริฐ)

มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี รับรองแล้ว

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.อุทิศ อินทร์ประสิทธิ์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

ปฏิบัติราชการแทนอธิการบดี มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

ปีการศึกษา 2556

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือและสนับสนุนจากผู้ที่เกี่ยวข้องหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณ ดร. สนม โนนกลาง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชริดา ปุกหุต อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ทั้งสองที่ให้การช่วยเหลือและคำแนะนำ ข้อคิดในการศึกษาเป็นอย่างดี ตลอดจนแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จึงสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นารีรัตน์ ไชยคง ที่ให้คำปรึกษาแนะนำและให้การช่วยเหลือในด้านต่างๆ โดยเฉพาะการใช้เครื่อง GC เครื่อง HPLC และถังหมัก

ขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ให้การอบรมสั่งสอนและให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้ความสะดวกเรื่องอุปกรณ์ สารเคมี และแนะนำการใช้เครื่องมือ

ขอขอบคุณนางสาวภาวรี ศรีจันทร์ นางสาวนารีย์ สีมาขันธ์ นางสาวปราณี กัลปัตย์ และนางสาวกมลฉัตร เรณู นักศึกษาปริญญาตรีสาขาจุลชีววิทยา นางสาวมะโน ชาญสมรนักศึกษาปริญญาโทสาขาเทคโนโลยีชีวภาพที่ให้คำแนะนำ ให้ความช่วยเหลือและอยู่เป็นเพื่อนมาโดยตลอด สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา และทุกคนในครอบครัว ที่เลี้ยงดูให้เติบโต เป็นกำลังใจ ดูแลและให้การสนับสนุนการเรียนและการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จ

อนุพล ฤกษ์สว่าง

(นายอนุพล ฤกษ์สว่าง)

ผู้วิจัย

ฝ่ายหอสมุด สำนักวิทยบริการ ม.อุบลฯ
ได้รับอภินันทนาการจาก
กองบริการ ม.อุบลฯ
๓๑ ม.ค. ๒๕๕๗

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ UBU

โดย : อนุพล ฤกษ์สว่าง

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ

ประธานกรรมการที่ปรึกษา : ดร. สนม โนนกลาง

ศัพท์สำคัญ : เอทานอล แก่นตะวัน ยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ UBU

การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกยีสต์ *K. marxianus* จำนวนสองสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน แล้วนำยีสต์ที่คัดเลือกได้มาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม จากยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือก คือ UBU-1-2 และ UBU-1-8 โดยสามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับร้อยละ 5.03±1.24 และ 4.84±0.26 โดยปริมาตรตามลำดับ ต่อมาได้นำยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสม โดยทำการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที ปรับปริมาณเซลล์ยีสต์เริ่มต้นให้ได้ OD_{590} เท่ากับ 0.2 โดยในการศึกษาอิทธิพลของน้ำตาลเริ่มต้นนั้นได้ทำการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร พบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.37-0.38 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เมื่อมีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 100-150 กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลได้สูงสุด 0.37-0.39 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เมื่อมีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 150-200 กรัมต่อลิตร

นอกจากนี้ยังทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมัก โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส น้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร พบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่างกันในทุกอุณหภูมิ ซึ่งสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้ระหว่างร้อยละ 5.19-5.57 โดยปริมาตร และสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลได้ระหว่างร้อยละ 5.31-6.00 โดยปริมาตร สำหรับการศึกษาอิทธิพลของพีเอชนั้นได้ปรับพีเอชเป็น 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และไม่มีการปรับพีเอช โดยมีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร พบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 และ

สายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่างกันในทุกพีเอช โดยสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้ระหว่างร้อยละ 6.77-7.76 โดยปริมาตร ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลได้ระหว่างร้อยละ 4.94-5.69 โดยปริมาตร

เพื่อเป็นการศึกษาอิทธิพลของแอมโมเนียมซัลเฟตจึงทำการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 0, 0.025, 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนักลงในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน จากการทดลองพบว่า ในสายพันธุ์ UBU-1-2 เมื่อไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตผลิตเอทานอลเท่ากับร้อยละ 3.97±0.05 โดยปริมาตร แต่เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนัก ทำให้ผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 4.39±0.18 โดยปริมาตร อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณเป็นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักไม่ส่งผลให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น แต่สำหรับสายพันธุ์ UBU-1-8 การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอลโดยผลิตเอทานอลความเข้มข้นอยู่ได้ระหว่างร้อยละ 3.38-3.64 โดยปริมาตร

ในการศึกษาอิทธิพลของสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) นั้น น้ำคั้นแก่นตะวันถูกเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนัก จากการทดลองพบว่า ในสายพันธุ์ UBU-1-2 สามารถผลิตเอทานอลได้เท่ากับร้อยละ 4.01±0.25 โดยปริมาตร เมื่อไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ และปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักเท่านั้น ส่วนในสายพันธุ์ UBU-1-8 สามารถผลิตเอทานอลได้ร้อยละ 2.65±0.64 โดยปริมาตรเมื่อไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ และปริมาณเอทานอลจะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนักขึ้นไป อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์เป็นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักพบว่าเอทานอลที่ได้ไม่แตกต่างจากที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก

เพื่อเป็นการขยายขนาดการหมัก จึงได้การทดสอบการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่บรรจุน้ำคั้นหัวแก่นตะวันปริมาตร 3 ลิตร มีน้ำตาลเริ่มต้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 หมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที โดยไม่มีการให้อากาศ จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 8.46±0.40 โดยปริมาตร และสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดเท่ากับร้อยละ 7.72±0.67 โดยปริมาตร คิดเป็น Yield (p/s) เท่ากับ 0.48 และ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ถูกใช้ไปตามลำดับ

ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดย *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 คือน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร สามารถหมักได้ในช่วงอุณหภูมิระหว่าง 35-45 องศาเซลเซียส และพีเอชระหว่าง 4.5-6.0 การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความ

เข้มข้นร้อยละ 0.05-0.1 โดยน้ำหนัก และสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.5-2.5 โดยน้ำหนัก สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอลได้

ABSTRACT

TITLE : ETHANOL FERMENTATION FROM JERUSALEM ARTICHOKE JUICE AT HIGH TEMPERATURE BY THEMOTOLERANT YEAST *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* UBU STRAINS

BY : ANUPOL RERKSAWANG

DEGREE : MASTER OF SCIENCE

MAJOR : BIOTECHNOLOGY

CHAIR : SANOM NONKLANG, Ph.D

KEYWORDS : ETHANOL / JARUSALEM ARTICHOKE / THERMOTOLERANT YEAST / *KLUYVEROMYCES MARXIANUS* UBU STRAINS

The objective of present study was to select *Kluyveromyces marxianus* two from ten strains and then used for optimizing condition suitable for ethanol production from Jerusalem artichoke juice. Among ten of UBU strains, the ethanol concentrations of 5.03±1.24 and 4.84±0.26 %(v/v) were obtained from UBU-1-2 and UBU-1-8, respectively. Therefore, both strains were selected for further studies. In order to optimize fermentation condition, ethanol production was carried out in 250 ml Erlenmeyer flask containing 50 ml of Jerusalem artichoke juice and incubated at 40 °C with shaking at 150 rpm and initial cells concentration was adjusted to get OD_{590} = 0.2. To study the effect of initial sugar concentration, sugar concentrations in the juice were adjusted to 50, 100, 150 and 200 g/l. The results indicated that ethanol yield of 0.37-0.38 g ethanol/g sugar were obtained when initial sugar concentrations were 100-150 g/l in UBU-1-2. Whereas ethanol yield of 0.37-0.39 g ethanol/g sugar were obtained when initial sugar concentrations were 150-200 g/l in UBU-1-8.

Moreover, the effect of temperatures on ethanol fermentation was also studied. When the incubation temperatures were 35, 40 and 45 °C and initial sugar was 150 g/l. It was found that, in both strains, the maximum ethanol concentration obtained in each temperature was not significantly difference. In UBU-1-2 strain produced ethanol between 5.19-5.57 %(v/v) and UBU-1-8 strain produced ethanol between 5.31-6.00 %(v/v). In addition, the ethanol production

from the juice without pH adjustment was compared with that of pH adjustment to pH 4.5, 5.0, 5.5 and 6.0. The results showed that, in both strains, the maximum ethanol concentration obtained in each pH were not significantly difference. In UBU-1-2 strain produced ethanol between 6.77-7.76 %(v/v) and UBU-1-8 strain produced ethanol between to 4.94-5.69 %(v/v).

To study the effect of adding ammonium sulfate, Jerusalem artichoke juice was supplemented with 0, 0.025, 0.05 and 0.1 %(w/v) ammonium sulfate. The result showed that in UBU-1-2, without ammonium sulfate addition, ethanol concentration of 3.97±0.05%(v/v) was obtained and when increasing ammonium sulfate concentration to 0.05 %(w/v), ethanol concentration was increased to 4.39 ± 0.18%(v/v). However, increasing ammonium sulfate concentration higher than 0.1%(w/v) could not improve ethanol production. Whereas in UBU-1-8, addition of ammonium sulfate did not has any effect on ethanol production. Ethanol concentrations between 3.38-3.64 %(v/v) were obtained.

To study the effect of yeast extract addition on ethanol fermentation, the juice of Jerusalem artichoke was supplemented with 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 2.5 %(w/v) of yeast extract. Based on the results, in UBU-1-2, the ethanol concentration of 4.01±0.25 %(v/v) was obtained when without adding yeast extract. Whereas adding 2.5 %(w/v) yeast extract ethanol concentration was significantly increased. In contrast to UBU-1-8, the ethanol concentration of 2.65±0.64 %(v/v) was obtained when yeast extract was not added. and the amount of ethanol was significantly increased when adding yeast extract more than 0.5 %(w/v). However, Obtained ethanol concentration when increasing yeast extract concentration to 2.5 %(w/v) was not significantly difference with that of obtained in adding yeast 1.5 %(w/v).

To increase the fermentation size, ethanol fermentation was carried out in 5 liters fermenter with working volume of 3 liters. The sugar concentration was adjusted to 200 g/l. The experiment was performed at 40 °C with agitation rate at 150 rpm without oxygen supply. The result showed that the maximum ethanol concentration of 8.46±0.40 %(v/v) and 7.72±0.67 %(v/v) (ethanol yields of 0.48 and 0.45 g ethanol/g sugar) were obtained in UBU-1-2 and UBU-1-8, respectively.

In conclusion, optimal condition for ethanol fermentation from juice of Jerusalem artichoke by *K. marxianus* UBU strain were 200 g/l of initial sugar concentration, fermentation at

35 to 45 °C and pH should be 4.5 to 6.0. Supplementation of 0.05-0.1 %$(NH_4)_2SO_4$ and 1.5-2.5 %(w/v) yeast extract can improved ethanol production from Jerusalem artichoke juice.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	**ก**
บทคัดย่อภาษาไทย	**ข**
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	**จ**
สารบัญ	**ซ**
สารบัญตาราง	**ฎ**
สารบัญภาพ	**ฑ**
บทที่	
1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตการศึกษาค้นคว้า	3
1.5 คำนิยามศัพท์และคำย่อ	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 ยีสต์	5
2.2 ยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus*	10
2.3 เอทานอล	12
2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล	16
2.5 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล	18
2.6 กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอทานอล	20
2.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์	21
2.8 แก่นตะวัน	26
2.9 อินูลิน	28
2.10 เอนไซม์อินูลินเนส	29
2.11 การหมักเอทานอลจากแก่นตะวัน	29

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี 34
3.2 การเตรียมกล้าเชื้อ 36
3.3 การคัดเลือกยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน 36
3.4 การวิเคราะห์การเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU 37
3.5 การวิเคราะห์ 38
3.6 การทดสอบอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอล 38
3.7 การทดสอบอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอล 39
3.8 การทดสอบอิทธิพลของพีเอชต่อการหมักเอทานอล 39
3.9 การทดสอบอิทธิพลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการหมักเอทานอล 39
3.10 การทดสอบอิทธิพลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ต่อการหมักเอทานอล 40
3.11 การทดสอบการหมักเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร 40
3.12 สถิติและ จลนพลศาสตร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล 41

4 ผลการทดลอง

4.1 องค์ประกอบในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน 42
4.2 ผลการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน 42
4.3 อิทธิพลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอล 49
4.4 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอล 57
4.5 อิทธิพลของพีเอชต่อการหมักเอทานอล 64

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4 ผลการทดลอง

4.6 อิทธิพลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อหมักเอทานอล 73

4.7 อิทธิพลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ต่อการหมักเอทานอล 79

4.8 การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร 85

5 สรุปผล อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง 93

5.2 ข้อเสนอแนะในการทดลองครั้งต่อไป 99

เอกสารอ้างอิง **100**

ภาคผนวก

ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 109

ข วิธีการวิเคราะห์ 112

ค การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม The SAS system for windows v9.0 โดยวิธี duncan's multiple range test 124

ง ผลงานทางวิชาการ 127

ประวัติผู้วิจัย **129**

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	สารที่ได้จากการหมักเอทานอลโดยยีสต์	15
2.2	อิทธิพลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอล	22
4.1	องค์ประกอบภายในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน	42
4.2	ผลการหมักเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU (กลุ่มที่ 1)	44
4.3	กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU (กลุ่มที่1)	45
4.4	ผลการหมักเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU (กลุ่มที่ 2)	47
4.5	กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU (กลุ่มที่ 2)	48
4.6	เอทานอลสูงสุด yield และน้ำตาลคงเหลือเมื่อหมักน้ำคั้นแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้นตั้งแต่ 50-200 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-18 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	55
4.7	กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ในการหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นแตกต่างกันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	57
4.8	เอทานอลสูงสุด yield และน้ำตาลคงเหลือเมื่อหมักน้ำคั้นแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้น150 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-18 ที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส	62
4.9	กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ในการหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิแตกต่างกัน	64
4.10	เอทานอลสูงสุด yield และน้ำตาลคงเหลือเมื่อหมักน้ำคั้นแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้น150 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-18 ที่ไม่มีการปรับพีเอช พีเอช 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	70
4.11	กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ในการหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่พีเอชแตกต่างกัน	72

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
4.12	เอทานอลสูงสุด yield และการใช้น้ำตาลเมื่อหมักน้ำคั้นแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-18 ที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0, 0.025, 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	76
4.13	กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ในการหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นต่างกัน	78
4.14	เอทานอลสูงสุด yield และน้ำตาลคงเหลือเมื่อหมักน้ำคั้นแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-18 ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0, 0. 5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	82
4.15	กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ในการหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่เติมสารสกัดจากยีสต์เข้มข้นต่างกัน	85
4.15	พารามิเตอร์ทางจลนพลศาตร์ของการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันของ*K. marxianus* สายพันธุ์ UBUในถังหมักขนาด 5 ลิตร	92
ข.1	การเตรียมสารละลายฟรุกโตสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด	113
ข.2	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{490}) ที่ความเข้มน้ำตาลระดับต่างๆ	114
ข.3	การเตรียมสารละลายฟรุกโตสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์	116
ข.4	ค่าการดูดกลืนแสง (A_{540}) ที่ความเข้มน้ำตาลระดับต่างๆ	116
ข.5	การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่อง GC	119
ข.6	พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ	120
ข.7	ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{590}) และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8	122
ค.1	การจัดข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม The SAS system for windows v9.0	125

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
ค.2	ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม The SAS system for windows v9.0	126

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะเซลล์ของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU	12
2.2	Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway	16
2.3	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเอทานอล	18
2.4	ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นเอทานอลโดยยีสต์	19
2.5	ลักษณะดอก และต้นของแก่นตะวัน	28
2.6	โครงสร้างอินูลิน	29
3.1	ลักษณะของแก่นตะวันที่ซื้อจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น	34
4.1	การเจริญและการใช้น้ำตาล ของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-1, UBU-1-2, UBU-1-3, UBU-1-4 และ UBU-1-5 ที่เวลาต่างๆ เมื่อถูกเลี้ยงในน้ำคั้นแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที	43
4.2	ปริมาณการผลิตเอทานอลที่เวลาต่างๆของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU เมื่อถูกเลี้ยงในน้ำคั้นแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที	44
4.3	กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนส ที่เวลา 6 และ12 ชั่วโมงยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที	45
4.4	การเจริญและการใช้น้ำตาลของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-6, UBU-1-7, UBU-1-8, UBU-1-9 และUBU-1-10 ที่เวลาต่างๆ เมื่อถูกเลี้ยงในน้ำคั้นแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที	46
4.5	ปริมาณการผลิตเอทานอลที่เวลาต่างๆของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU เมื่อถูกเลี้ยงในน้ำคั้นแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.6	กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนส ที่เวลา 6 และ12 ชั่วโมงยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที	48
4.7	การเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักใน น้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	49
4.8	การใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	52
4.9	ปริมาณเอทานอลจากการหมัก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	53
4.10	กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสจากการหมัก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	56
4.11	การเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักใน น้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส	58
4.12	การใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักใน น้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส	59
4.13	การผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียส	61

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.14	กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสจากการหมัก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียสนาที	63
4.15	การเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่น้ำแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช, 4.5, 5.0 , 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	65
4.16	การใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่น้ำแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช, 4.5, 5.0 , 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	67
4.17	การการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่น้ำแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช, 4.5, 5.0 , 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	68
4.18	การผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่น้ำแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช, 4.5, 5.0 , 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	69
4.19	กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสจากการหมัก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่น้ำแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช, 4.5, 5.0 , 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	71
4.20	การเจริญและการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0, 0.025, 0.05, และ 0.1 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	73

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.21	การผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 0, 0.025, 0.05, และ 0.1 โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	75
4.22	กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0, 0.025, 0.05, และ 0.1 โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	77
4.23	การเจริญและการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0 , 0.5, 1.0, 1.5 , 2.0 และ2.5 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	80
4.24	การผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	81
4.25	กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0 , 0.5, 1.0, 1.5 , 2.0 และ2.5 โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส	84
4.26	การเจริญโดยการนับจำนวนเซลล์ของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการคนกวน 150 รอบต่อนาที	86
4.27	การเจริญโดยการวัดค่า OD_{590} ของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที	87

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.28	การใช้น้ำตาลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องสาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที	88
4.29	การผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที	89
4.30	การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการหมักของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการคนกวน 150 รอบต่อนาที	90
4.31	กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที	91
ข.1	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol sulfuric acid method	114
ข.2	กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS	117
ข.3	กราฟเอทาทานอลมาตรฐานที่ใช้คำนวณเอทานอลที่วิเคราะห์โดยเครื่อง GC	120
ข.4	กราฟเอทานอลมาตรฐานที่ใช้คำนวณเอทานอลที่วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC	122
ข.5	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{590}) และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2	123
ข.6	กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่น (OD_{590}) และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-8	123

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

จากสถานการณ์ราคาน้ำมันปิโตรเลียมที่ปรับตัวสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องส่งผลกระทบต่อเศรษฐกิจของประเทศในด้านต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งทางด้านการคมนาคมขนส่งที่จะต้องแบกรับภาระค่าเชื้อเพลิงที่สูงขึ้นบวกกับปัญหาการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของโลกที่มีสาเหตุส่วนหนึ่งมาจากการเผาไหม้น้ำมันปิโตรเลียมจึงมีกระแสรณรงค์ให้มีการใช้พลังงานทางเลือกเกิดขึ้น เอทานอลเป็นที่ยอมรับในระดับสากลว่าสามารถนำไปใช้เป็นพลังงานทางเลือกใช้แทนน้ำมันปิโตรเลียมได้เป็นอย่างดีและยังเป็นพลังงานสะอาดช่วยชะลอการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของโลกได้อีกด้วย ล่าสุดมีความเป็นไปได้สูงที่จะส่งเสริมให้ใช้เอทานอล E85 โดยมีการนำเอทานอลมาผสมกับเบนซินในอัตราส่วนสูงถึงร้อยละ 85 ซึ่งจะสามารถลดการนำเข้าน้ำมันปิโตรเลียมจากต่างประเทศได้ รัฐบาลจึงมีการรณรงค์ให้มีการใช้เอทานอลมากขึ้นจึงได้จัดทำแผนการพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี (พ.ศ. 2551-2565) โดยมีจุดมุ่งหมายเพื่อ ส่งเสริมให้เกิดการผลิตและการใช้เอทานอลไม่น้อยกว่า 9 ล้านลิตร/วัน ภายในปี 2565 เพื่อลดการพึ่งพาน้ำมันปิโตรเลียมเพิ่มมูลค่าและสร้างเสถียรภาพให้กับผลผลิตทางการเกษตร โดยการสร้างตลาดเอทานอลอย่างยั่งยืน รณรงค์ให้ความรู้และสร้างความเชื่อมั่นให้ผู้บริโภคอย่างจริงจัง ส่งเสริมอุตสาหกรรมเอทานอลแบบครบวงจรและเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงการพัฒนาระบบโลจิสติกส์เพื่อลดต้นทุน การวิจัยและพัฒนาพืชพลังงานใหม่ๆ เพื่อประเทศชาติและประชาชน เอทานอลสามารถเกิดขึ้นได้จากการหมักพืชที่มีแป้งหรือน้ำตาล เช่น มันสำปะหลัง อ้อย โดยเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมจึงมีศักยภาพเพียงพอในการผลิตเอทานอลจากพืช เนื่องจากมีวัตถุดิบที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล และมันสำปะหลัง อย่างไรก็ตามหากในอนาคตเป็นไปตามแผนการพัฒนาพลังงานทดแทน 15 จริงการหวังพึ่งผลผลิตหัวมันสำปะหลังสด และกากน้ำตาลจากการหีบอ้อยมาแปรรูปเป็นเอทานอลอาจจะไม่เพียงพอ ดังนั้นพืชน้องใหม่อย่างแก่นตะวันจึงเป็นพืชเสริมอีกชนิดหนึ่งที่มีความน่าสนใจในการนำมาผลิตเอทานอลในอนาคต

จากงานวิจัยเบื้องต้นพบว่าหัวแก่นตะวันสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลได้โดยหัวแก่นตะวันสด 1 ตัน แปรรูปเป็นเอทานอลได้ 80-100 ลิตรแต่อย่างไรก็ตามต้นทุน

การผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวันสดค่อนข้างสูง ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงใคร่ขอเสนอแนวทางการลดต้นทุนการผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวัน โดยศึกษาและทดลองการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงเพื่อลดค่าใช้จ่ายในส่วนของระบบหล่อเย็น โดยหันมาใช้เชื้อยีสต์ทนร้อนในตระกูล *Kluyveromyces marxianus* แทน *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งเป็นยีสต์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอลในปัจจุบัน จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ายีสต์ *K. marxianus* ยังสามารถผลิตเอนไซม์อินูลินเนสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการย่อยอินูลินซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักในหัวแก่นตะวัน

โดยปกติการใช้หัวแก่นตะวันเพื่อเป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอลนั้นจะต้องนำน้ำที่สกัดจากหัวแก่นตะวันมาผ่านกระบวนการย่อยด้วยไซม์อินูลินเนส เพื่อให้ได้น้ำตาลหน่วยย่อยก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลโดยที่ผ่านมามีการนำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อินูลินเนส เช่น เชื้อในสกุล *Kluyvermyces* และ *Aspergillus* มาใช้ในกระบวนการย่อยอินูลินให้ได้น้ำตาลหน่วยย่อยก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* หรือ *Zymomonas mobilis* การใช้เชื้อสองชนิดร่วมกันนั้นทำให้เกิดความยุ่งยากในขั้นตอนของการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอล เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีคุณลักษณะแตกต่างกัน นอกจากการใช้เอนไซม์ย่อยอินูลินแล้วยังสามารถใช้กรดเพื่อย่อยอินูลินได้เช่นกัน มีรายงานการใช้ กรดซัลฟิวริกพีเอช 2.0 และให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 40 นาที แล้วปรับพีเอชเท่ากับ 5 ก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักโดย *S. cerevisiae* ดังนั้นหากใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์อินูลินเนส และมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ในเวลาเดียวกัน จึงน่าจะเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งในการนำมาผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีอินูลินเป็นองค์ประกอบ เช่นหัวแก่นตะวันซึ่งหากใช้ยีสต์ *K. marxianus* จะสามารถลดค่าใช้จ่ายในส่วนของกรดหรือเอนไซม์ที่ใช้ย่อยอินูลินและลดต้นทุนในส่วนระบบหล่อเย็นระหว่างหมัก ลดขั้นตอนการย่อยอินูลินไปเป็นน้ำตาลฟรุกโตสได้อีกด้วย

จากความสามารถที่โดดเด่นของยีสต์ในกลุ่ม *K. marxianus* ทำให้มีความพยายามแยกเชื้อยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ใหม่ๆ เพื่อเป็นการค้นหายีสต์สายพันธุ์ที่ดียิ่งขึ้น ที่ผ่านมา ผศ.ดร. ชริดา ปุกหุต และคณะมหาวิทยาลัยอุบลราชธานีได้แยกยีสต์ทนร้อนจากกากหม้อกรอกของโรงงานน้ำตาลได้จำนวน 144 ไอโซเลท ซึ่งพบว่ามี 7 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากการทดสอบโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพบว่าเป็นยีสต์ในกลุ่ม *K. marxianus* จึงเป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งในการนำมาทดสอบการผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวันเพราะจากการสืบค้นข้อมูลยังไม่มีการรายงานถึงการทดสอบการผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวันโดยใช้ยีสต์ทนร้อนที่คัดแยกได้จากประเทศไทย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูง 2 สายพันธุ์

1.2.2 เพื่อทราบสภาวะ อุณหภูมิ ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น พีเอช แหล่งไนโตรเจน และปริมาณไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการหมักเอทานอจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU

1.2.3 เพื่อศึกษาการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ทราบถึงสายพันธุ์ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU 2 สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

1.3.2 ทราบถึงสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU

1.3.3 ทราบถึงผลการเพิ่มขนาดและปริมาณการหมักต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU

1.3.4 ได้ข้อมูลพื้นฐานของการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดยใช้ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ในระดับห้องปฏิบัติการเพื่อใช้เป็นแนวทางในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรมได้ในอนาคต

1.4 ขอบเขตการศึกษาค้นคว้า

1.4.1 ทดสอบการเจริญ การผลิตเอทานอล และการผลิตเอนไซม์อินูลินเนสโดยใช้หัวแก่นตะวันเป็นวัตถุดิบเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพที่สุด 2 สายพันธุ์

1.4.2 คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพที่สุด 2 สายพันธุ์มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลโดยใช้หัวแก่นตะวันเป็นวัตถุดิบ

1.4.3 ศึกษาการเจริญ การผลิตเอทานอลและการผลิตเอนไซม์อินูลินเนสโดยใช้หัวแก่นตะวันเป็นวัตถุดิบด้วยเชื้อสายพันธุ์ที่ดีที่สุด 2 สายพันธุ์โดยใช้สภาวะที่ดีที่สุดโดยทดสอบในถังหมักขนาด 5 ลิตร

1.5 คำนิยามศัพท์และคำย่อ

$kg\ m^{-3}$	: กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร
%(v/v)	: ร้อยละโดยปริมาตร
bar	: หน่วยวัดความดัน 1 บาร์มีค่าประมาณ 14.5037744 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi)
$Wm^{-1}K^{-1}$	: วัตต์ต่อเมตรต่อเคลวิน
CentiStoke	: หน่วยวัดความหนืด
pF	: พิโคฟารัด (เป็นหน่วยความจุทางไฟฟ้า)
$p>0.05$	: ข้อมูลไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95
μ	: อัตราการเจริญจำเพาะ
μ_{max}	: อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด
Yield (p/s)	: ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อสับสเตรท 1 กรัม
Yield (p/x)	: ปริมาณผลิตภัณฑ์ที่ได้ต่อเซลล์แห้ง 1 กรัม
Yield (x/s)	: ปริมาณผลผลิตเซลล์แห้งที่ได้ต่อสับสเตรท 1 กรัม
q_s	: อัตราจำเพาะการใช้น้ำตาล
q_p	: อัตราจำเพาะการเกิดผลิตภัณฑ์
td	: ระยะเวลาที่มีการเพิ่มมวลเซลล์ขึ้นเป็นสองเท่า
AR	: Analytical reagent grade
RPE	: Analytical grade reagents
p	: ผลิตภัณฑ์หรือเอทานอล (กรัมต่อลิตร)
s	: สับสเตรทหรือน้ำตาล (กรัมต่อลิตร)
x	: น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
p_0	: ผลิตภัณฑ์ที่ชั่วโมงที่ 0 หรือปริมาณเอทานอลที่ชั่วโมงที่ 0 (กรัมต่อลิตร)
s_0	: สับสเตรทเริ่มต้นหรือปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)
x_0	: น้ำหนักเซลล์แห้งที่เวลา 0 ชั่วโมง (กรัมต่อลิตร)
p_{max}	: ผลิตภัณฑ์สูงสุดหรือเอทานอลสูงสุด (กรัมต่อลิตร)
x_{max}	: น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (กรัมต่อลิตร)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ยีสต์

2.1.1 ความหมาย

ตามคำดั้งเดิมในหลายภาษามีความหมายสัมพันธ์กับความสามารถในการหมัก เช่น คำในภาษาอังกฤษว่า yeast และภาษาดัชท์ว่า gist มาจากภาษากรีก zestos ซึ่งหมายถึงเดือด เนื่องจากลักษณะการมีฟองปุดขึ้นจากแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ระหว่างการหมัก ส่วนคำในภาษาเยอรมันว่า hefe และภาษาฝรั่งเศสว่า levure มาจากภาษาละตินคำว่า levere หมายความว่า ขึ้นสูงขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะของฟองที่ปุดขึ้นเช่นกัน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.1.2 การดำรงชีพ

ยีสต์เป็นราที่มีการดำรงชีวิตเป็นเซลล์เดี่ยวสามารถพบได้ทั่วไปแบบไม่มีข้อจำกัดในชีวภาค (biosphere) พบได้ทั่วไปทั้งบนบก (terrestrial habitat) และในน้ำ (aquatic habitat)รวมทั้งแหล่งที่มีความรุนแรง (extreme habitat) เช่นที่มีความเค็มสูงและที่มีความเย็นจัด แหล่งที่ยีสต์ชอบอยู่คือ พืชโดยพบได้ทั้งที่ดอก ผล ใบ ลำต้น และยางไม้ ทั้งนี้เพราะพืชนอกจากจะมีความสามารถในการสังเคราะห์น้ำตาลและพอลิแซ็กคาไรด์หลายชนิดแล้วยังสามารถสังเคราะห์สารประกอบคาร์บอนอื่นๆ อีกหลายชนิดทำให้มีสับสเตรท (substrate) ที่หลากหลายสำหรับการเจริญของยีสต์ ยีสต์สามารถใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย เช่น น้ำตาล พอลิออล (polyol) กรดอินทรีย์ กรดไขมัน ไฮโดรคาร์บอน แอลกอฮอล์ และ พอลิเมอร์หลายชนิด ยีสต์บางชนิดมีความสัมพันธ์กับสัตว์โดยอยู่ร่วมกันแบบที่ฝ่ายหนึ่งได้รับประโยชน์และอีกฝ่ายหนึ่งไม่ได้รับประโยชน์หรือโทษ (commensalism) และอาจอยู่ร่วมกันแบบเป็นปรสิต (parasite) เช่น พบในลำไส้ของของสัตว์โดยไม่ทำอันตรายต่อสัตว์ บางชนิดมีความสัมพันธ์กับแมลงโดยแมลงเป็นเพียงพาหะที่แพร่กระจายยีสต์และไม่ได้รับประโยชน์จากยีสต์ซึ่งแมลงนอกจากทำหน้าที่เป็นพาหะแล้วอาจได้รับสารอาหารบางอย่างที่เป็นประโยชน์จากเซลล์ยีสต์ซึ่งเจริญอยู่บนอาหารของแมลงหรือในทางเดินอาหารของแมลงเอง เช่น *Metschnikowia hawaiiensis, M. pulcherrima, M. reukaufii, Torulopsis apicola* และ *T. magnolia* ที่พบอยู่กับผึ้งและ *Coccidiascus legeri* ซึ่งบบในเนื้อเยื่อบุผิวลำไส้ของแมลงหวี่ ยีสต์หลายชนิดพบในดินชนิดต่างๆที่มีความแตกต่างกันทั้งองค์ประกอบทางเคมี ลักษณะทางกายภาพ

ความชื้น พีเอช และตำแหน่งทางภูมิศาสตร์ ยีสต์ที่พบบ่อยในดิน ได้แก่ *Lipomyces, Debaryomyces* (*Schwanniomyces*) *occidiacus, Schizoblastosporion* sp. และ *Cryptococcus* บางสปีชีส์ส่วนยีสต์ที่พบในแหล่งน้ำ เช่น *Kluyveromyces aestuarii* และ *Metschnikowia sp.* (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.1.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการดำรงชีพของยีสต์

2.1.3.1 แหล่งของสารอาหารสำหรับยีสต์

การเจริญของยีสต์นั้นต้องการสารอาหารที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน รวมทั้งธาตุอาหารหลักอื่นๆ ได้แก่ ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส นอกจากนั้นยังต้องการธาตุอาหารบางชนิดในปริมาณค่อนข้างมากซึ่งจัดเป็น macroelement ประกอบไปด้วยแมกนีเซียม และโพแทสเซียมในขณะที่ธาตุอาหารบางชนิดยีสต์ต้องการในปริมาณที่ต่ำ หรือ microelement ได้แก่ ธาตุแคลเซียม เหล็ก ทองแดง แมงกานีส สังกะสี นิเกิล โคบอลต์ นอกจากนี้ยีสต์ยังต้องการสารประกอบบางชนิดเพื่อทำหน้าที่เป็น growth factor เช่น วิตามิน และนิวคลีโอไทด์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.1.3.2 อุณหภูมิ

ยีสต์ส่วนใหญ่เป็นยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง (mesophilic yeast) และเจริญได้ดีที่ 20-28 องศาเซลเซียส มีอุณหภูมิสูงสุด (maximal temperature) สำหรับการเจริญต่ำกว่า 46 องศาเซลเซียส และยังมียีสต์ในกลุ่มที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ (psychrophilic yeast) ซึ่งยีสต์กลุ่มนี้เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำสุด (minimal temperature) 5 องศาเซลเซียส และเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 20 องศาเซลเซียส ยีสต์กลุ่มนี้พบบริเวณแอนตาร์กติก เช่น *Cryptococcus vishniacii, Leucosporidium antracticum* เป็นต้น ส่วนยีสต์อีกกลุ่มคือยีสต์ชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic yeast) อุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญของยีสต์กลุ่มนี้คือ 48-50 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิต่ำสุดที่เชื้อยีสต์กลุ่มนี้สามารถเจริญได้เท่ากับ 20 องศาเซลเซียสซึ่งยีสต์ชอบอุณหภูมิสูงมีจำนวนน้อยกว่ายีสต์ชอบอุณหภูมิต่ำ เช่น *Candida slooffii, Cyniclomyces guttulatus*, *Saccharomyces telluris* เป็นต้น ยีสต์ทนความร้อนได้ต่ำกว่าแบคทีเรีย แอสโคสปอร์ (ascospore) ทนความร้อนมากกว่าเซลล์ประมาณ 10 องศาเซลเซียส ในบางสปีชีส์เซลล์กับสปอร์ทนอุณหภูมิได้ไม่แตกต่างกัน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.1.3.3 พีเอช

ยีสต์เจริญดีที่ พีเอช ระหว่าง 3.5 และ 6.5 พีเอชที่เจริญได้ค่อนข้างกว้าง คือ พีเอชในช่วง 3-11 ยีสต์ที่ทนพีเอชมากเช่น *Issatchenkia orientalis, Pichia membranaefaciens*, *Dekkera intermedia* และ *Saccharomyces exiguous* เจริญได้ที่พีเอช 1.3-1.7 พีเอชมีผลต่อกิจกรรมทางชีววิทยาของยีสต์น้อยกว่าอุณหภูมิเพราะเซลล์สามารถควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ได้เป็นอย่างดีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายนอกเซลล์พีเอชของอาหารมีผลต่อ

โครงสร้างและสภาพให้ซึมผ่านของเซลล์ (cell permeability) และพีเอชจะช่วยลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่นระหว่างกระบวนการหมักได้ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.1.3.4 ออกซิเจนละลาย

ภายใต้สภาวะที่มีอากาศยีสต์จะใช้น้ำตาลในการเจริญหรือเรียกว่าเกิดการหายใจ และในสภาวะที่ไม่มีอากาศยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอล อย่างไรก็ตามภายใต้สภาวะที่มีอากาศและมีน้ำตาลความเข้มสูง ยีสต์สามารถหมักน้ำตาลเป็นเอทานอลแทนการหายใจที่ให้คาร์บอนไดออกไซด์กับน้ำ หรือการหายใจถูกยับยั้งด้วยการหมัก (พงษ์เทพ อริยเจริญวงศ์ และคณะ, 2553) ออกซิเจนทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายในลูกโซ่ขนส่งอิเล็กตรอนและทำหน้าที่เป็น growth factor ของยีสต์โดยร่วมในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก เออร์กอสเตรอล และกรดนิโคตินิก ซึ่งส่งเสริมการเจริญของยีสต์ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.1.3.5 คาร์บอนไดออกไซด์

ยีสต์บางสายพันธุ์ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ในปริมาณต่ำสำหรับกระบวนการบางอย่างภายในเซลล์ เช่นการสร้างสารประกอบสี่คาร์บอน มีผู้รายงานว่าการใช้คาร์บอนไดออกไซด์เพียงร้อยละ 2.5 ของอากาศทั้งหมดสามารถเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อากาศร้อยละ 100 แต่ความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของยีสต์ คือร้อยละ 5 ของอากาศทั้งหมด (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.1.4 การสืบพันธุ์ของยีสต์

2.1.4.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

1) การแตกหน่อ (budding) เมื่อยีสต์มีการเจริญและเพิ่มขนาดจนถึงจุดวิกฤต (critical size) จะเกิดการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวน โดยจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (mitosis) เริ่มจากมีเวสิเคิล (vesicle) ที่เกิดจาก*เอน*โดพลาสมิกเรติคูลัม (endoplasmic recticulum) มาสะสมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ที่จะมีการสร้างหน่อจะมีทั้งเวสิเคิลที่บรรจุไลติกเอนไซม์ (lytic enzyme) ที่ทำหน้าที่ย่อยองค์ประกอบของผนังเซลล์โดยเฉพาะกลูแคน (glucan) ทำให้ผนังเซลล์อ่อนลงและเวสิเคิลที่บรรจุเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างผนังเซลล์หรือมีสารตั้งต้นในการสร้างผนังเซลล์จากนั้น เวสิเคิลต่างๆได้หลอมรวมกับผนังเซลล์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์อ่อนตัวลงเซลล์พองตัวออกและยืดออกเป็นหน่อ มีการเจริญและเพิ่มขนาดของผนังเซลล์บริเวณหน่อและจากนั้นเกิดแรงเต่งทำให้ไซโทพลาซึม (cytoplasm) ดันโป่งออกไปในพื้นที่ที่ล้อมรอบด้วยผนังเซลล์ที่สร้างขึ้นใหม่และมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซีส (mitosis) เข้าไปในหน่อและมีการสร้างผนังกั้นระหว่างเซลล์แม่และเซลล์ลูกโดยผนังกั้นชั้นแรกประกอบด้วยไคติน (chitin) จากนั้นสร้างผนังกั้นชั้นที่สองที่

ประกอบด้วยกลูแคนเป็นองค์ประกอบหลักเซลล์แม่และเซลล์ลูกจะแยกออกจากกันเมื่อสร้างผนังกั้นสมบูรณ์ ซึ่งการแตกหน่อจะแบ่งตามตำแหน่งการแตกหน่อได้สามแบบดังนี้

- การแตกหน่อขั้วเดียว (monopolar budding) จะเกิดที่ขั้วหรือปลายเพียงด้านเดียวโดยจะเกิดซ้ำๆที่ตำแหน่งเดิม

- การแตกหน่อสองขั้ว (bipolar budding) เกิดขึ้นที่ขั้วหรือปลายทั้งสองข้างของเซลล์โดยปกติจะเกิดขึ้นทีละขั้วหรืออาจเกิดขึ้นพร้อมกันทั้งสองขั้วก็ได้

- การแตกหน่อหลายขั้ว (mutipolar budding) เกิดขึ้นได้รอบเซลล์ทุกๆ ด้าน

2) การแบ่งเซลล์ (fission) เป็นการแบ่งเซลล์จะได้เซลล์ขนาดเท่ากัน 2 เซลล์โดยเซลล์ลูกจะเจริญไปทางด้านยาวจากขั้วที่ไม่มีแผลจากการแบ่งแบบฟิชชั่นจากนั้นเปลี่ยนเป็นการเจริญทั้งสองข้างจนได้เซลล์ที่มีความยาวคงที่และจะแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (mitosis) จนได้สองนิวเคลียส และมีการสร้างผนังกั้นและแบ่งไซโทพลาซึมเรียกว่า ไซโตไคนีซีส (cytokinesis) ซึ่งพบในยีสต์สกุลเดียวคือ *Schizosaccharomyces*

2.1.4.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

ยีสต์มีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบ่งเป็นสองพวก คือแอสโคไมซีตัสยีสต์ (ascomycetous yeast) และแบสิดิโอไมซีตัสยีสต์ (basidiomycetous yeast)โดยยีสต์ส่วนใหญ่เป็นแอสโคไมซีตัสยีสต์จะสร้างแอสโคสปอร์ (ascospore) ในโครงสร้างที่มีลักษณะคล้ายถุงที่เรียกว่าแอสคัส (ascus) ส่วนใหญ่จะมีปริมาณตั้งแต่ 1 ถึง 4 สปอร์เกิดจากการที่เซลล์หรือสปอร์ที่นิวเคลียสมีโครโมโซม 1 ชุด (happloid) มี mating type ตรงข้ามกันที่เข้ากันได้มารวมกันเกิดการรวมตัวของไซโทพลาซึมที่เรียกว่า plasmgamy ตามด้วยการรวมตัวของนิวเคลียสที่เรียกว่า karyogamy สร้างเป็นไซโกต (zygote) และเป็นเซลล์ที่มีโครโมโซมเป็น 2 ชุด (diploid) เมื่อสภาวะและแหล่งคาร์บอนไม่สมบูรณ์ และขาดไนโตรเจนอาจมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีส (miosis) ได้โครโมโซม 1 ชุดมีจำนวน 4 นิวเคลียสและพัฒนาไปเป็นแอสโคสปอร์ที่มีโครโมโซม 1 ชุดภายในเซลล์ที่เปลี่ยนไปเป็นแอสคัส

2.1.5 ยีสต์ทนร้อน

คือ ยีสต์ที่มีความสามารถในการปรับตัวต่อสภาวะแวดล้อมภายนอกเพื่อการอยู่รอดได้ อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่สุดในด้านลบต่อการเจริญ การที่ยีสต์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงต้องมีกลไกพิเศษช่วยให้มีชีวิตรอด ซึ่งเกี่ยวข้องกับสิ่งสำคัญอยู่ 3 ประการ คือ ความคงตัวของเซลล์เนื่องจากปฏิกิริยาของลิพิด (lipid) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ การสร้างองค์ประกอบของเซลล์ขึ้นมาทดแทนองค์ประกอบเดิมที่เสียสภาพไป และการที่ยีสต์นั้นทนต่ออุณหภูมิสูงอยู่ก่อนแล้ว

เกิดวิวัฒนาการอย่างต่อเนื่อง อุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ประมาณ 46-50 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของยีสต์ รวมทั้งสภาวะการเจริญ เช่น อิทธิพลของแหล่งคาร์บอน น้ำ ออกซิเจน ความเข้มข้นของเอทานอล และปัจจัยการเจริญอื่น (Strokes, 1971; Walker, 1998; Watson, 1987) การให้สารอาหารพิเศษบางชนิดสามารถช่วยให้ยีสต์เจริญที่อุณหภูมิสูงขึ้นได้ เช่น การเติมกรดไขมันอิ่มตัว (saturated fatty acid) และเออร์โกสเตอรอล (ergosterol) ในอาหารหมัก (Ohta and Hayashida, 1983) การที่ยีสต์มีการเจริญลดลงในที่ที่มีอุณหภูมิสูงขึ้น อาจเนื่องมาจากมีการสังเคราะห์ สเตอรอล (sterols) ได้น้อยลง (Anderson et al., 1986) เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นพบว่าสภาพการเป็นของไหลขององค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์มีแนวโน้มลดลง การมีชีวิตรอดของยีสต์จึงน้อยลง ทั้งนี้ เพราะโปรตีนหรือองค์ประกอบของกรดไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์เสียสภาพ (Swan and Watson, 1997)

โดยทั่วไปที่อุณหภูมิสูงอัตราการเจริญของยีสต์จะลดลงมีผลให้ชีวมวลโดยรวมลดลง เพราะฉะนั้นปริมาณโปรตีน กรดไรโบนิวคลีอิก กรดดีออกซีไรโบนิวคลีอิก และกรดอะมิโนอิสระต่าง ๆ ภายในเซลล์จึงลดลง และการที่อุณหภูมิเพิ่มขึ้นยังเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์แข็งตัวมากขึ้นทำให้ความสามารถในการไหลผ่านของสารละลายต่าง ๆ รวมทั้งสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง (Panchal, 1990)

ซึ่งปัจจัยที่อาจเป็นไปได้เกี่ยวกับการทนอุณหภูมิสูงของยีสต์นี้ก็คือการแสดงออกหรือไม่แสดงออกของ heat shock proteins (HSPs) ซึ่งในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงจะมีการเหนี่ยวนำให้เกิด HSPs ซึ่ง HSPs นี้เป็นตัวการในการทำให้เซลล์ยีสต์มีความทนต่ออุณหภูมิสูง (Van Uden, 1984) ได้มีการรายรายงานถึงการทำ heat shock ใน *S. cerevisiae* ว่าไม่เพียงเหนี่ยวนำให้เกิด HSPs และการทนอุณหภูมิสูงเท่านั้น แต่ยังมีส่วนช่วยให้ยีสต์ทนต่อระดับของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นด้วย อย่างไรก็ตามยีสต์ยังไม่สามารถหมักเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Watson and Cavicchioli, 1983)

ในการศึกษาคุณสมบัติของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญที่อุณหภูมิสูงของยีสต์ *S. cerevisiae* ซึ่งโปรตีน phospatase ในวิธี mitogen activated protein kinase มีผลต่อการเจริญที่อุณหภูมิสูงในกรณีของยีน PTC1 ซึ่งถอดรหัสไปเป็นโปรตีน typ2C serine/threonine phosphatase พบว่าเมื่อถูก delete แล้วทำให้ยีสต์มีคุณสมบัติ thermosensitive อย่างชัดเจนแสดงว่ายีน PTC1 มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อการเจริญที่อุณหภูมิสูงของยีสต์ทุกๆสายพันธุ์ ซึ่งมากน้อยขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ นอกจากนี้การเจริญในที่สูงยังมีความสัมพันธ์กับการรักษาความสมบูรณ์ของเซลล์บางส่วนภายใต้การทำงานของยีน PTC1 ส่วนยีน SSD1 ทำหน้าที่เกี่ยวกับการรักษาความสมบูรณ์ของเซลล์พบว่าเมื่อ delete ยีน SSD1 ทำให้ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูงลดลงดังนั้นยีน PTC1 มีความจำเป็นต่อการเจริญที่อุณหภูมิสูงของยีสต์ ขณะที่ยีน SSD1 มีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ที่อุณหภูมิสูง (Koedrith, 2007)

2.2. ยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus*

K. marxianus แต่เดิมมีชื่อเรียกว่า *Saccharomyces marxianus* เนื่องจากมีลักษณะคล้ายยีสต์สกุล *Saccharomyces* แต่เมื่อพบว่ามีความแตกต่างของสปอร์และลักษณะของแอสคัสและความสามารถในการหมักและออกซิไดซ์น้ำตาลที่แตกต่างกัน และการไฮบริไดซ์ระหว่างสายพันธุ์ที่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับยีสต์สกุล *Saccharomyces* จึงมีการจัดจำแนกใหม่ภายหลังโดยถูกจัดเป็นสกุลใหม่นั่นคือสกุล *Kluyveromyces* (Fonseca et al., 2008) ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* เป็นยีสต์ที่มีสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อและสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการสร้างแอสโคสปอร์ในแอสคัส ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส และยังสามารถผลิตเอทานอลได้ทั้งที่อุณหภูมิปกติและอุณหภูมิสูง *K. marxianus* ยังมีคุณสมบัติที่น่าสนใจคือการผลิตเอนไซม์ต่างๆมากมาย เช่น อินูลินเนส กาแลกโตซิเดส กลูโคซิเดส โปรตีนฟอสฟาเตส อะมิโนเปปติเดส และเอนไซม์อื่นๆ อีกมากมายที่น่าสนใจ นอกจากนั้นยังเป็นยีสต์ที่เจริญได้เร็วและใช้น้ำตาลได้หลากหลายเช่น แลกโตส กลูโคส ไซโลส นอกจากนั้นยังสามารถใช้ซูโครส อินูลินได้อีกด้วย

2.2.1 การจัดจำแนก

การจัดจำแนกของ *K. marxianus* จัดจำแนกดังต่อไปนี้

Kingdom: Fungi

Phylum: Ascomycota

Subphylum: Saccharomycotina

Class: Saccharomycetes

Order: Saccharomycetales

Family: Saccharomycetaceae

Genus: *Kluyveromyces*

Species: *K. marxianus*

2.2.2 การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับยีสต์ทนร้อน *K. marxianus*

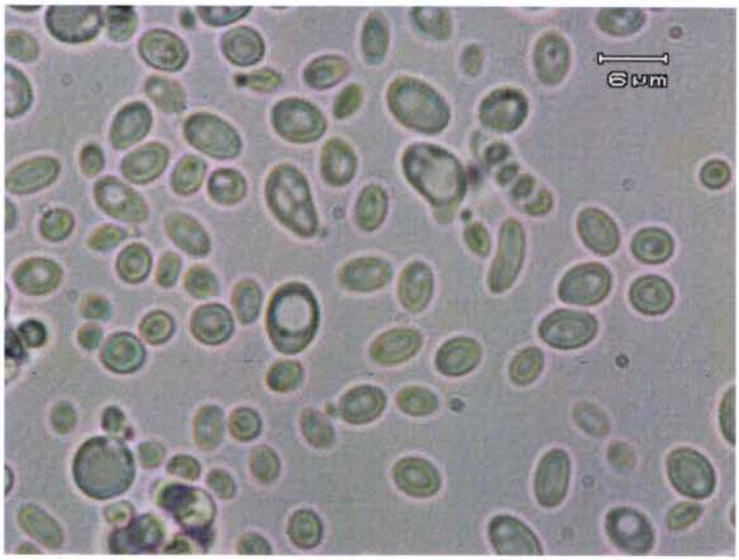
มีการศึกษา *K. marxianus* ทางด้านต่างๆ มากมายเช่นการหมักเอทานอลจาก อินูลิน โดย *K. marxianus* ATCC8554 และ *K. marxianus* PT-1 (HU et al., 2012 and Yuan et al., 2008[a]) นอกจากนั้นยังมีการพัฒนากระบวนการหมักให้เหมาะสำหรับการใช้ *K. marxianus* ในการหมักเอทานอลเช่น การหมักเอทานอลแบบ SSF จากแก่นตะวันโดย *K. cicerisporus* Y179 (YU et al., 2010) การหมักเอทานอลจากแก่นตะวันแบบ One-step fermentation โดย *K. marxianus* YX01 (Yuan et al., 2008[b]) และการหมักเอทานอลแบบ consolidated bioprocessing (CBP) ของ *K. marxianus* Y179 จากหัวแก่นตะวัน (Yuan et al., 2012) เป็นต้น นอกจากวัตถุดิบที่มีอินูลินเป็น

องค์ประกอบแล้วยังมีการนำวัตถุดิบอื่นๆมาหมักด้วย *K. marxianus* เช่น อ้อย หญ้า หรือ whey เป็นต้น นอกจากการผลิตเอทานอลแล้ว *K. marxianus* ยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตเอนไซม์อินูลินเนส จากน้ำตาลซูโครส (Cazetta et al., 2010) จากหัวดอกรักเร้ (Jain et al., 2012) เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตฟรุกโตสไซรัป หรือ ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ หรือการผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลกโตซิเดส (Cortes et al., 2005) และยิ่งไปกว่านั้นจากคุณสมบัติที่น่าสนใจของ *K. marxianus* คือการทนอุณหภูมิสูงซึ่งเป็นข้อได้เปรียบยีสต์สายพันธุ์ไม่ทนร้อนเช่น *S. cerevisiae* จึงมีการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรมใน *K. marxianus* เพื่อพัฒนาสายพันธุ์ยีสต์ให้มีความสามารถพิเศษเกี่ยวโยงกับการผลิตเอทานอลหรือเอนไซม์อินูลินเนส (สนม โนนกลาง, 2554) การศึกษาการหมักเอทานอลจาก *K. marxianus* ที่ คัดแยกได้ในประเทศไทยได้เริ่มมีการศึกษาเนื่องจากประเทศไทยเป็นเมืองร้อนหากหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้จะช่วยลดต้นทุนการวางระบบหล่อเย็นได้

Nonklang et al. (2008) ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยเชื้อ *K. marxianus* สายพันธุ์ DMKU3-1042 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้โดย ศ. สาวิตรี ลิ่มทองจากมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ (Limtong et al., 2007) จากการศึกษาพบว่าสายพันธุ์ DMKU3-1042 มีความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิสูง นอกจากนี้ยังได้ทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ และเปรียบเทียบกับ *S. cerevisiae* NCYC3233 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากโรงงานผลิตเอทานอลในประเทศบราซิล ซึ่งเป็นประเทศที่มีการผลิตเอทานอลเป็นลำดับต้นๆของโลก จากผลการทดลองพบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อ *K. marxianus* สายพันธุ์ DMKU3-1042 สามารถผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่างกับเชื้อ *S. cerevisiae* NCYC3233 แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการผลิตเอทานอลไปที่ 45 องศาเซลเซียส เชื้อ *S. cerevisiae* NCYC3233 ไม่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้เลย ในขณะที่ *K. marxianus* สายพันธุ์ DMKU3-1042 สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้และได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆอีกด้วย จากความสามารถที่โดดเด่นของเชื้อยีสต์ทนร้อนในกลุ่ม *K. marxianus* ทำให้เป็นที่สนใจในการศึกษาเชื้อยีสต์ดังกล่าวมากขึ้น

Pukahuta et al. (2009) มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ได้แยกเชื้อยีสต์ทนร้อนจากกากหม้อกรองโรงงานน้ำตาล ได้จำนวน 144 ไอโซเลท ซึ่งเมื่อทดสอบที่ 50 องศาเซลเซียส พบว่า 7 ไอโซเลทสามารถเจริญได้ดีกว่า *K. marxianus* สายพันธุ์ DMKU3-1042 พบว่า 10 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่อุณหภูมิสูง และ นอกจากนี้จากการทดสอบเบื้องต้นโดยเทคนิคทางชีวโมเลกุลพบว่าเชื้อยีสต์ทนร้อนที่แยกได้อยู่ในสกุล *K. marxianus* ซึ่งได้ตั้งชื่อภายหลังเป็น *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ซึ่งมีความสามารถในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงและใช้แหล่งคาร์บอนได้หลากหลาย สามารถผลิตเอนไซม์อินูลินเนสได้จึงมีความน่าสนใจในการนำมาหมัก

เอทานอลจากหัวแก่นตะวันจึงเป็นที่มาของการนำมาศึกษาในงานวิจัยครั้งนี้ ลักษณะเซลล์ของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ดังแสดงในภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.1 ลักษณะเซลล์ของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU

2.3 เอทานอล

2.3.1 ความหมาย

เอทานอล (ethanol, C_2H_5OH) หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นของเหลวใส ไม่มีสี จุดไฟติดง่าย ระเหยง่าย สามารถละลายน้ำและสารอินทรีย์อื่นได้ดี (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) มีจุดเดือดเท่ากับ 78.5 องศาเซลเซียส ความหนาแน่นที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเท่ากับ 789 kg m^{-3} ความดันไอที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.5 bar (15 kPa) การนำความร้อนที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.169 $Wm^{-1}K^{-1}$ ความหนืดที่อุณหภูมิ 10 เซลเซียสเท่ากับ 1.9 centiStoke แต่ความหนืดที่อุณหภูมิ 50 เซลเซียสเท่ากับ 0.9 centiStoke มีดรรชนีหักเหที่อุณหภูมิที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสเท่ากับ 1.36 มีค่าคงที่ไดอิเล็กตริกเท่ากับ 24 ค่าความต้านทานอะคูสติกเท่ากับ 95 mrayl ค่าความจุไฟฟ้าเท่ากับ 33 pF และค่าสัมประสิทธิ์ของการขยายตัวเท่ากับ 0.0011 องศาเซลเซียส$^{-1}$ (Jones, 2010) เอทานอลสามารถใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยมีข้อดีคือ เป็นของเหลวใช้ได้ทันทีต่างกับปิโตรเลียมที่ต้องผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ที่ซับซ้อน สามารถสร้างจากทรัพยากรธรรมชาติที่สามารถสร้างขึ้นมาทดแทนใหม่ได้ การเผาไหม้ของเอทานอลสะอาดกว่าการเผาไหม้น้ำมันเบนซิน และเอทานอลอาจใช้เป็นเชื้อเพลิงตามลำพังหรือใช้ผสมกับน้ำมันเบนซิน หรือดีเซลได้ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.3.2 การนำเอทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิง

เอทานอลสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงได้เช่นเดียวกับแก๊สโซลีน ปัจจุบันมีการนำเอทานอลมาใช้เป็นเชื้อเพลิงโดยการนำเอทานอลบริสุทธิ์ร้อยละ 99.5 มาผสมกับแก๊สโซลีนที่เรียกกันว่าแก๊สโซฮอล์ ที่ความเข้มข้นเอทานอลร้อยละ 10 (E10), ร้อยละ 20 (E20), และ ร้อยละ 22 (E22) นำไปใช้โดยไม่ต้องมีการปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์ แต่ในการผสมที่ระดับความเข้มข้นสูงเช่น เข้มข้นร้อยละ 85 (E85) หรือเข้มข้นร้อยละ 95 (E95) จะต้องมีการปรับเปลี่ยนเครื่องยนต์ให้เหมาะสม เอทานอลมีค่าออกเทน 113 ช่วยให้อัตราส่วนแรงอัดสูงในเครื่องยนต์เบนซิน (Roehr, 2001) ข้อดีของการใช้แก๊สโซฮอล์ มีข้อดีดังนี้ช่วยประหยัดเชื้อเพลิง เช่นเดียวกับน้ำมันเบนซินออกเทน 95 ไม่มีผลกระทบต่อสมรรถนะการใช้งานและอัตราการเร่งดีกว่าหรือไม่แตกต่าง จากน้ำมันเบนซิน 95 สามารถเติมผสมกับน้ำมันที่เหลืออยู่ในถังได้เลย โดยไม่ต้องรอให้น้ำมันในถังหมด เครื่องยนต์ช่วยให้เครื่องยนต์เผาไหม้สะอาดสมบูรณ์ยิ่งขึ้นมีการเผาไหม้ที่ดีขึ้นทำให้ช่วยลดมลพิษไอเสียทางอากาศและแก้ไขปัญหาสิ่งแวดล้อม

2.3.3 การผลิตเอทานอล

2.3.3.1 การสังเคราะห์ทางเคมี

เอทานอลที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมีไม่อนุญาตให้ใช้เป็นเครื่องดื่ม การสังเคราะห์เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างเมทานอล กับกรีญาร์รีเอเจนต์ (grignard reagent) ซึ่งกรีญารีเอเจนต์เกิดจากอัลคิลเฮไลน์ทำปฏิกิริยากับแมกนีเซียมใน anhydrous diethyl ether จะได้อัลคิลแมกนีเซียมแฮไลด์ ซึ่งเป็นกรีญารีเอเจนต์ โดยแมกนีเซียมแฮไลท์จะทำปฏิกิริยากับเมทานอลกลายเป็นเอทานอล นอกจากนั้นยังสามารถสังเคราะห์ได้จากปฏิกิริยาไฮเดรชั่น (hydration) ซึ่งเป็นการเติมน้ำให้กับเอทิลีน (ethylene) ให้ได้เอทานอล (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2555) การสังเคราะห์เอทานอลด้วยวิธีทางเคมีมีข้อดีคือ ปฏิกิริยาเกิดได้รวดเร็ว และให้ความถูกต้องที่สามารถคำนวณได้อย่างใกล้เคียงและแน่นอน ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความบริสุทธิ์ค่อนข้างสูงใช้เวลาไม่นานเหมือนการหมักด้วยจุลินทรีย์ แต่การสังเคราะห์ทางเคมีก็มีข้อเสียคือต้องใช้สารจำเพาะมาเป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์ซึ่งสารเหล่านี้มีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับวัตถุดิบที่ได้จากการเกษตร และสภาวะที่ใช้เกิดปฏิกิริยาค่อนข้างสูงหรือจำเพาะ (ภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ, 2551)

2.3.3.2 การสังเคราะห์ทางชีวภาพ

เป็นการหมักเอทานอลด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติในการใช้คาร์โบไฮเดรตในการเจริญและผลิตเป็นเอทานอล โดยจุลินทรีย์จะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ดังสมการ (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2555)

$$\underset{\text{(กลูโคส)}}{C_6H_{12}O_6} \longrightarrow \underset{\text{(เอทานอล)}}{2C_2H_5OH} + \underset{\text{(คาร์บอนไดออกไซด์)}}{2CO_2}$$

2.3.4 ทฤษฎีการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล

จากทฤษฎีการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นเอทานอลได้ร้อยละ 51.1 และส่วนที่เหลือร้อยละ 48.9 เป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในทางปฏิบัติมีน้ำตาลเพียงประมาณร้อยละ 95 เท่านั้นที่เปลี่ยนเป็นเอทานอลส่วนที่เหลือยีสต์จะใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างสารอื่นได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ อะซิตัลดีไฮด์ กรดอะซิติก กลีเซอรีน กรดแลกติก กรดซัลซินิก ฟูเซลออยล์ และเฟอฟูรอล (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) มีการกล่าวถึงว่าในระหว่างการหมัก ยีสต์มีการเจริญคาร์บอนจะถูกเปลี่ยนเป็นชีวมวลบางส่วนทำให้การผลิตเอทานอลได้จริงมีประมาณ 0.46 กรัมต่อกรัมคาร์บอน (ร้อยละ 46) คาร์บอนไดออกไซด์ 0.44 กรัมต่อกรัมคาร์บอน (ร้อยละ 44) และเป็นชีวมวล 0.10 กรัมต่อกรัมคาร์บอน (ร้อยละ 10) ซึ่งนั่นก็คือ ประมาณร้อยละ 90 ของคาร์บอนที่สามารถเปลี่ยนไปเป็นเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (ชุติมา ศรีงิ้ว, 2548; อ้างอิงจาก Lyons, 1984)

2.3.5 ชีวเคมีการหมักเอทานอลโดยยีสต์

เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจนยีสต์ส่วนใหญ่จะใช้น้ำตาลในการเจริญเพื่อผลิตเซลล์แต่การหมักเอทานอลจะเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำซึ่งยีสต์จะใช้น้ำตาลในการผลิตเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำตาลของยีสต์เกิดโดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway โดยวิถีไกลโคไลซิสนี้ไม่มีโมเลกุลของออกซิเจนเข้ามาเกี่ยวข้องไพรูเวตที่ได้ยีสต์จะเปลี่ยนเป็นอะซิตัลดีไฮด์ และเอทานอลตามลำดับดังเช่นในภาพที่ 2.1 (ชุติมา ศรีงิ้ว, 2548; อ้างอิงจาก Scragg, 1988) การหมักเอทานอลนั้นนอกจากจะได้ผลิตภัณฑ์เป็นเอทานอลแล้วยีสต์ยังใช้น้ำตาลในการสร้างสารอื่นๆ ด้วยโดย (ชุติมา ศรีงิ้ว, 2548; อ้างอิงจาก Paturau, 1969) ได้รายงานว่าในการหมักเอทานอลนั้นนอกจากยีสต์จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลแล้วยังมีสารอื่นๆเกิดขึ้นดังตารางที่ 2.1

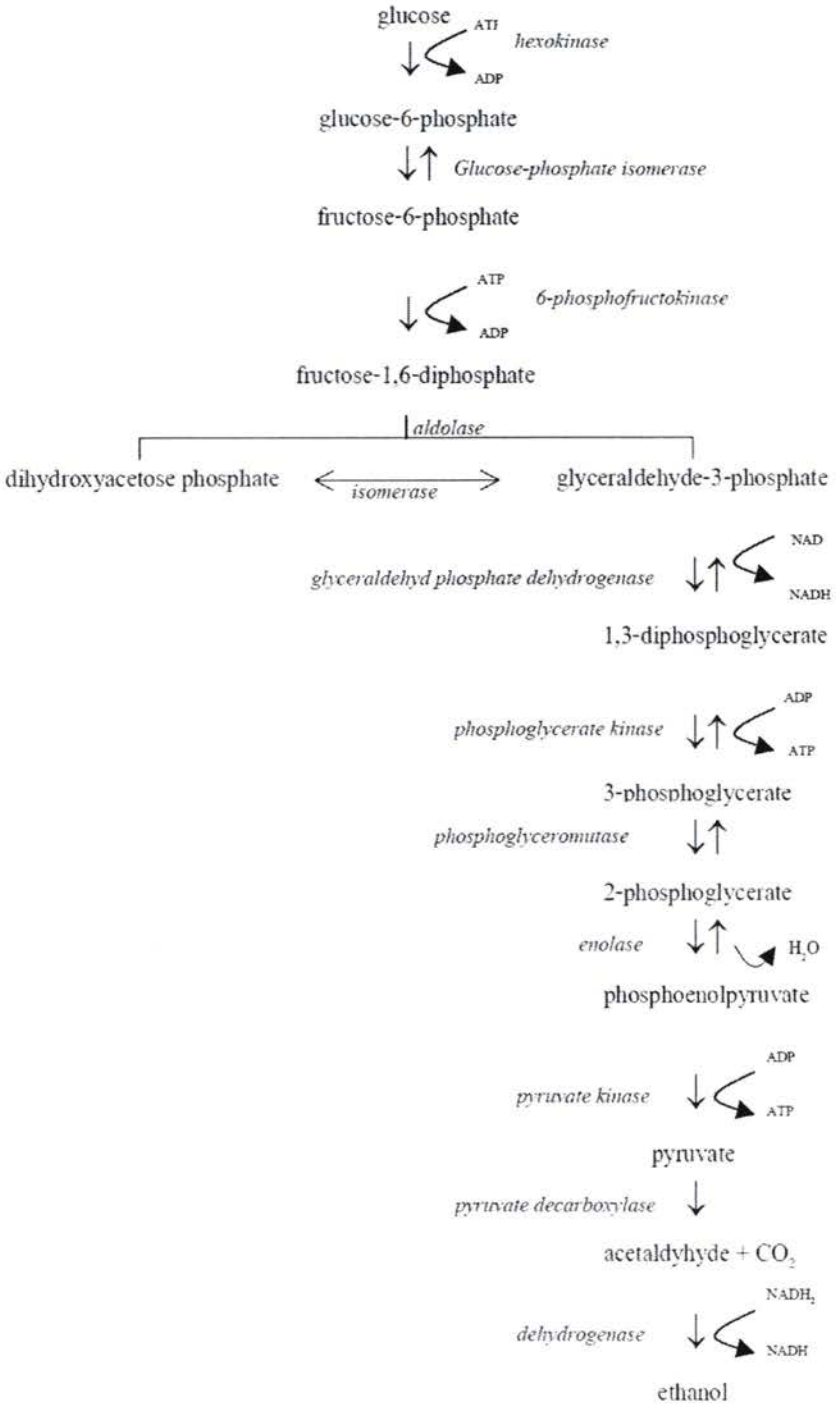
สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี
ขท 10 157
ข้อมูลท้องถิ่น

ตารางที่ 2.1 สารที่ได้จากการหมักเอทานอลโดยยีสต์ (ชุติมา ศรีงิ้ว, 2548; อ้างอิงจาก Paturau, 1969)

สารที่ได้จากการหมักเอทานอล	ร้อยละของสารทั้งหมด
Ethanol	48.4
Carbondioxide	46.5
Acetaldehyde	0-0.03
Acetic acid	0.05-0.25
Glycerol	2.5-3.6
Lactic acid	0-0.2
Succinic acid	0.5-0.77
Fuel oil	0.25-0.5
Furfural	trace

2.3.6 การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง

การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงคือการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงกว่าที่อุณหภูมิการหมักปกติ ซึ่งอุณหภูมิที่ใช้ในการหมักปกติคือช่วง 30-35 องศาเซลเซียส (พรรณนีย์ วิชชาชู, 2551) เนื่องจากการหมักจะเกิดความร้อนระหว่างการหมักจึงต้องรักษาอุณหภูมิให้อยู่ที่ 30-35 องศาเซลเซียส จะต้องใช้ระบบหล่อเย็นเพื่อระบายความร้อนออกจากระบบ ดังนั้นการใช้ยีสต์ทนร้อนจึงเป็นอีกทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจเนื่องจากไม่ต้องใช้ระบบหล่อเย็นซึ่งจะลดต้นทุนการผลิตเอทานอลได้ถึงร้อยละ 30-35 ปัจจุบันมีการศึกษาการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงเนื่องจากมียีสต์ที่สามารถเจริญและผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงได้เช่น *K. marxianus*, *Hansenula polymorpha* เป็นต้น โดยยีสต์ *K. marxianus* มีการทดสอบการผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงนอกจากข้อดีเรื่องของการประหยัดค่าใช้จ่ายการวางระบบหล่อเย็นแล้วยังช่วยลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์พวก mesophile หรือจุลินทรีย์พวกที่ชอบอุณหภูมิปานกลางในระหว่างกระบวนการหมักได้เป็นอย่างดี นอกจากนั้นยังช่วยประหยัดพลังงานและที่อุณหภูมิสูงยังช่วยเร่งปฏิกิริยาเคมีให้เกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจึงเหมาะสมเป็นอย่างยิ่งสำหรับการหมักเอทานอลในประเทศในเขตร้อน เช่น ประเทศไทย



ภาพที่ 2.2 Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway (ชุติมา ศรีงิ้ว, 2548)

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตเอทานอล

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่ใช้ในอุตสาหกรรมผลิตเอทานอลในปัจจุบันคือยีสต์ *S. cerevisiae* ส่วนแบคทีเรียยังไม่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมในขณะนี้ ซึ่งแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิต

เอทานอล เช่น *Clostridium thermocellum*, *Zymomonas mobilis* เป็นต้น (กรมโรงงานอุตสาหกรรม, 2555) สำหรับยีสต์ *S.cerevisiae* เป็นยีสต์ที่ทนต่อสภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่นๆดังนั้นการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงใช้ยีสต์ *S.cerevisiae* ในส่วนของ *Cl. thermocellum* และ *Z. mobilis* เป็นแบคทีเรียไม่ต้องการออกซิเจนสามารถหมักเซลลูโลสและเจริญที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส แต่ยังคงทนเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาการใช้ยีสต์ทนร้อนผลิตเอทานอลเพื่อช่วยลดต้นทุนการผลิตในส่วนของระบบหล่อเย็นระหว่างหมัก เช่น มีรายงานการศึกษา ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* ที่กำลังเป็นที่น่าสนใจโดย *K. marxianus* เป็นยีสต์ที่มีคุณสมบัติโดดเด่นหลายประการ เช่น สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูง มีอัตราการเจริญที่รวดเร็ว สามารถเจริญบนแหล่งคาร์บอนได้หลายแห่งโดยเฉพาะการเจริญบนน้ำตาลไซโลส อะราบิโนส และเซลโลไบโอส เป็นต้น และยังมีรายการการศึกษายีสต์ทนร้อน *Hansenula polymorpha* ที่สามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสและไซโลสเป็นเอทานอลที่อุณหภูมิสูงถึง 48 องศาเซลเซียสได้ (Andriy et al., 2009)

ตามทัศนคติของนักวิจัย จุลินทรีย์ที่ดี และมีความเหมาะสมในการผลิตเอทานอลควรมีลักษณะดังนี้ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

(1) ให้ผลผลิตสูง

(2) ทนต่อเอทานอล (ethanol tolerance)

(3) ทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerance)

(4) มีความคงตัวภายใต้สภาวะต่าง ๆ ของการหมัก

(5) ทนต่อพีเอชต่ำ (acid tolerance)

(6) ทนอุณหภูมิสูง (thermotolerance)

(7) มีอัตราการหมักเอทานอล (rate of ethanol fermentation) สูง

(8) เพิ่มจำนวน (propagation) ได้ง่าย

(9) ให้ความร้อนในระหว่างการหมักต่ำ

(10) การแสดงลักษณะตกตะกอนหรือไม่ตกตะกอนขึ้นอยู่กับลักษณะของกระบวนการหมักที่ผู้ผลิตต้องการ

(11) มีกิจกรรมการเป็นผู้ฆ่า (killer activity)

(12) นอกเหนือจากการใช้กลูโคส มีความสามารถในการใช้ไดแซ็กคาไรด์ หรือโพลีแซ็กคาไรด์

(13) มีความทนทานต่อสารพิษต่าง ๆ

2.5 วัตถุดิบในการผลิตเอทานอล

2.5.1 วัตถุดิบประเภทน้ำตาล

พืชที่มีน้ำตาลคือพืชที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวและน้ำตาลโมเลกุลคู่ซึ่งทำให้ง่ายต่อการเตรียมวัตถุดิบเพื่อการผลิตเอทานอล โดยไม่ต้องผ่านการย่อยเพื่อเป็นน้ำตาล (pretreatment) ใดๆ ไม่ยุ่งยากในการเตรียมวัตถุดิบเหมือนการเตรียมวัตถุดิบประเภทที่มีโพลีแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ พืชที่มีน้ำตาลซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลกันมาก คือ อ้อย ข้าวฟ่างหวาน และผักกาดหวาน ซึ่งใช้ในการผลิตน้ำตาลทรายหรือซูโครส นอกจากนั้นในการผลิตน้ำตาลทรายยังได้ผลพลอยได้และกากน้ำตาลที่สามารถนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้เป็นอย่างดี (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

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

(ซูโครส)	(น้ำ)	(กลูโคส)	(ฟรุกโตส)	(เอทานอล)	(คาร์บอนไดออกไซด์)
342 กรัม	18 กรัม	180 กรัม	180 กรัม	4×46	4×44
คิดเป็นผลได้ของเอทานอลเทียบกับน้ำตาลซูโครส				0.5380 กรัม	0.5146 กรัม

ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสไปเป็นเอทานอล (ภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ, 2551; อ้างอิงจาก สถาบันค้นคว้า พัฒนาผลผลิตทางการเกษตร, 2549)

ในการหมักเอทานอลจากน้ำตาลซูโครสนั้น ขั้นแรกจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสได้น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสอย่างละโมเลกุล จากนั้นน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสจะถูกยีสต์เปลี่ยนไปเป็นเอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์อย่างละ 4 โมเลกุล (ภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ, 2551) ดังภาพที่ 2.3

2.5.2 วัตถุดิบประเภทแป้ง

แป้งเป็นอาหารสะสมในเซลล์พืชพบทั้งในใบ ลำต้น ราก ผล และเมล็ด แป้งประกอบด้วยพอลิแซ็กคาไรด์ 2 ชนิด และทั้งสองชนิดมีหน่วยย่อยเป็นกลูโคสแต่มีมวลโมเลกุลและโครงสร้างต่างกัน พอลิแซ็กคาไรด์ทั้งสองชนิดในแป้งได้แก่ อะไมโลส (amylose) และอะไมโลเพกติน (amylopectin) พืชที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบมีหลายชนิด เช่น ธัญพืชชนิดต่างๆ ซึ่งรวมทั้งข้าว ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ มันสำปะหลัง มันเทศ สาคู และเผือก สำหรับการผลิตเอทานอลในแถบประเทศทางยุโรปและอเมริกาเหนือใช้ข้าวโพด ข้าวสาลี ข้าว มันฝรั่ง ผักกาดหวานเป็นวัตถุดิบ ในขณะที่ประเทศทางเขตร้อนจะใช้วัตถุดิบสำหรับการผลิต

เอทานอล คือ กากน้ำตาล และ มันสำปะหลังมันสำปะหลัง (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) การใช้แป้งเป็นวัตถุดิบจะต้องถูกย่อยให้เป็นน้ำตาลกลูโคสด้วยกรดหรือเอนไซม์ ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อน จากนั้นยีสต์จึงจะสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลได้ดังปฏิกิริยาเคมีที่แสดงในภาพที่ 2.4

$$\underset{\text{(แป้ง)}}{H(C_6H_{10}O_5)_NOH} \xrightarrow{\text{ย่อย}} \underset{\text{(กลูโคส)}}{nC_6H_{12}O_6} + \text{Yeast} \longrightarrow \underset{\text{(เอทานอล)}}{2C_2H_5OH} + 2nCO_2$$

ภาพที่ 2.4 ปฏิกิริยาการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นเอทานอลโดยยีสต์

2.5.3 วัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส

ลิกโนเซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทคาร์โบไฮเดรตที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์พืช โดยในวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรประเภทลิกโนเซลลูโลส เช่น วัตถุดิบลิกโนเซลลูโลส ได้แก่ ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด หญ้า เศษไม้เป็นต้น ลิกโนเซลลูโลสประกอบด้วยเซลลูโลส เฮมิเซลลูโลส และลิกนิน การผลิตเอทานอลจากเซลลูโลสหรือเฮมิเซลลูโลสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนการหมัก เซลลูโลสเป็นพอลิเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันเป็นสายยาวและอยู่ในรูปผลึกมีลักษณะเป็นใยเหนียวและไม่ละลายน้ำ ส่วนเฮมิเซลลูโลสเป็นโพลิเมอร์ของน้ำตาลเพนโทสหลายชนิด เช่น ไซโลส แมนโนส และอะราบิโนส เป็นต้น ส่วนลิกนินเป็นโพลิเมอร์ของของฟีนิวโพรเพน ซึ่งทนต่อการย่อยสลายเป็นอย่างมาก การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทเฮมิเซลลูโลสขั้นแรกต้องผ่านขั้นตอน 4 ขั้นตอนขั้นตอนแรก pretreatment คือขั้นตอนการปรับสภาพวัตถุดิบด้วยความร้อนให้พร้อมก่อนการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ ขั้นตอนที่สองคือ hydrolysis เพื่อเปลี่ยนโมเลกุลคาร์โบไฮเดรตหรือเฮมิเซลลูโลสให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวด้วยกรดหรือเอนไซม์ ขั้นตอนที่สามคือ fermentation เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนน้ำตาลให้ได้เป็นเอทานอลโดยยีสต์ และขั้นตอนสุดท้ายคือ dehydration เป็นขั้นตอนการดึงโมเลกุลของน้ำออกจากเอทานอล (Brian et al., 2010)

การหมักเอทานอลจากวัตถุดิบประเภทลิกโนเซลลูโลส ยังสามารถหมักแบบ simultaneous saccharification and fermentation ที่รวมขั้นตอนของการย่อยสลายเซลลูโลสและการหมักเอทานอลเข้าด้วยกันเป็นขั้นตอนเดียวการใช้เอนไซม์เซลลูเลส ร่วมกับเชื้อยีสต์ที่หมักเอทานอลได้ดีหรืออาจใช้จุลินทรีย์สองชนิดร่วมกันที่เรียกว่า co-culture โดยใช้จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสแต่หมักเอทานอลได้ต่ำ เช่น *Cl. thermocellum* ร่วมกับจุลินทรีย์ที่หมักเอทานอลได้ดี เช่น *Z. mobilis* นอกจากนั้นยังมีผู้พยายามใช้เชื้อเดี่ยว ที่มีความสามารถทั้งในการสร้างเอนไซม์

เซลลูเลส และหมักเอทานอลได้ เช่น *Monilia* sp. อย่างไรก็ตามการผลิตเอทานอลจากเซลลูโลส ยังมีปัญหาทางเทคโนโลยีและเศรษฐศาสตร์ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการย่อย สลายเซลลูโลสไปเป็นน้ำตาลกลูโคสซึ่งมีผลอย่างมากต่อการพัฒนา การใช้เซลลูโลสในอุตสาหกรรมและในปัจจุบันยังไม่มีการผลิตเอทานอลจากวัสดุประเภทลิกโนเซลลูโลส ในระดับอุตสาหกรรม (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

2.5.4 วัตถุดิบประเภทอินูลิน

อินูลิน (inulin) โอลิโกฟรุกโตส (oligofructose) และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide, FOS) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มของฟรุกแตน (fructan) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสที่เชื่อมต่อกันเป็นสายยาว (fructososyl-fructose links) ตรงส่วนปลายของโมเลกุลอาจมีกลูโคส 1 โมเลกุลเชื่อมต่ออยู่ โดยอินูลินพบในพืชทั่วไป เช่น กระเทียม หัวดอกรักเร้า แก่นตะวัน และ ชิโครี่ เป็นต้น การหมักเอทานอลจากวัสดุประเภทอินูลินนี้จำเป็นต้องย่อยอินูลินด้วยกรดหรือเอนไซม์อินูลินเนสเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดียวที่ยีสต์จะสามมารถใช้ได้ก่อนเช่นเดียวกับวัสดุประเภทแป้งและ ลิกโนเซลลูโลส (Rosa et al., 1971 and Thuesombat et al., 2007)

2.6 กระบวนการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตเอทานอล

2.6.1 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกะ (batch culture)

เป็นกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์โดยอาศัยการเติมสารอาหารและหัวเชื้อลงไปในถังหมักเพียงครั้งเดียวตลอดการหมัก ปฏิกิริยาชีวภาพจะดำเนินไปจนกว่าจะถึงจุดที่ต้องการแล้วจึงเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ โดยทั่วไปจะรอจนผลิตภัณฑ์มีปริมาณสูงสุดและมีอัตราการเปลี่ยนแปลงสั้นที่สุด โดยทั่วไปนิยมใช้ระบบนี้กับกระบวนการหมักขนาดเล็ก ควบคุมการทำงานง่าย เช่นการหมักไวน์ เบียร์ สุราและแอลกอฮอล์เป็นต้น (ภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ, 2551)

2.6.2 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งกะ (fed-batch culture)

เป็นกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพสูง ช่วยเพิ่มอัตราการผลิตชีวมวล (biomass) ได้เกือบสองเท่าเมื่อเทียบกับการหมักแบบกะที่มีการหมักหรืออาหารเพียงครั้งเดียวตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมัก กระบวนการหมักแบบกึ่งกะจะป้อนสารอาหารสารตั้งต้นเข้าสู่ระบบเป็นระยะๆ จนเต็มปริมาตรทำงานของถังหมัก การป้อนสารอาหารเข้าสู่ระบบทีละน้อยเพื่อลดปัญหาความเข้มข้นของสารอาหารสูงเกินไปจะเกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ทำให้การหมักหยุดชะงักลงก่อนการใช้สารอาหารหมด (พงษ์เทพ อริยเจริญวงศ์ และคณะ, 2553)

2.6.3 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่อง (semi-continuous culture)

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบกึ่งต่อเนื่องเป็นกระบวนการผลิตภัณฑ์โดยเริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบกะก่อนเมื่อสารอาหารใกล้จะหมด จะมีการดึงน้ำหมักบางส่วนออกจากระบบเพื่อเก็บ

เกี่ยวผลิตภัณฑ์โดยจะเหลือน้ำหมักส่วนหนึ่งไว้ในถังหมักจากนั้นเติมสารอาหารใหม่เข้าในในระบบปริมาตรเท่ากับปริมาตรที่ดึงออกจากระบบเพื่อให้ปริมาตรทำงานคงที่ เมื่อสารอาหารใกล้หมดอีกจะมีการดึงน้ำหมักและป้อนสารอาหารเข้าไปอีกครั้งทำเช่นนี้ไปเรื่อยๆ ข้อดีของการหมักแบบกึ่งต่อเนื่อง คือสามารถเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้อย่างต่อเนื่อง สารอาหารที่เติมเข้าไปมีการใช้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนข้อเสีย คือต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ

2.6.4 กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture)

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นกระบวนการผลิตภัณฑ์โดยการเติมสารอาหารเข้าสู่ระบบอย่างต่อเนื่องพร้อมๆกับการดึงน้ำหมักออกอย่างต่อเนื่องในอัตราการไหลของสารอาหารเข้าสู่ระบบเท่ากับอัตราการไหลออกจากระบบ โดยอัตราการไหลเข้าออกของระบบไม่ควรสูงกว่าอัตราการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อป้องกันการชะจุลินทรีย์ออกจากระบบ ทำให้ไม่มีจุลินทรีย์ในระบบการเพาะเลี้ยง ระบบการเพาะเลี้ยงแบบนี้เหมาะกับระบบที่ต้องการการผลิตสูงและมีการควบคุมระบบแบบอัตโนมัติ

2.7 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลของยีสต์

2.7.1 ความเข้มข้นของเอทานอล

ยีสต์หลายสกุลมีความอ่อนแอต่อการยับยั้งด้วยเอทานอลการมีเอทานอลสะสมอยู่ในถังหมักถือว่าเป็นปัญหาหลักอย่างหนึ่งที่ไปยับยั้งการเจริญของความเข้มข้นของเอทานอลเพียงร้อยละ 1-2 โดยน้ำหนัก ก็ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ช้าลง และที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยน้ำหนักทำให้การเจริญของจุลินทรีย์เกือบหยุดลง (Brown et al., 1981) อย่างไรก็ตาม การยับยั้งนั้นมีความซับซ้อนมาก ยิ่งไปกว่านั้นถ้ามีการเติมเอทานอลในช่วง log phase ทำให้อัตราการเจริญของยีสต์ลดลงอย่างรวดเร็วทำให้เซลล์ที่มีชีวิตลดลงทั้งนี้อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ถูกทำให้เสียสภาพอย่างถาวร และเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงช่วยส่งเสริมให้ความเป็นพิษของเอทานอลมีมากขึ้น การผลิตเอทานอลลดลงเมื่อยีสต์อยู่ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ และการผลิตเอทานอลมีมากขึ้นเมื่อยีสต์อยู่ในสภาวะของอุณหภูมิต่ำสุดของการเจริญ (Casey and Ingledew, 1985) เอทานอลไปมีผลต่อการยับยั้งแบบไม่แข่งขันในการขนส่งกลูโคส มอลโทส แอมโมเนีย และกรดอะมิโนต่าง ๆ ยีสต์สายพันธุ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวปริมาณมากสามารถมีชีวิตอยู่ได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเอทานอลสูง ๆ มากกว่ายีสต์สายพันธุ์ที่มีส่วนประกอบของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอยู่น้อย ซึ่งคล้ายกับว่าผลของเอทานอลไปส่งเสริมให้ไฮโดรเจนไอออนไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์มากขึ้น ซึ่งการไหลผ่านของไฮโดรเจนไอออนนี้ไม่ได้ผ่านทาง ATPase ของเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรง จึงทำให้เกิดความต่างระดับของโปรตอน (proton gradient)

กระจายไปทั่วเยื่อหุ้มเซลล์ จึงไปมีผลต่อการยับยั้งการขนส่งสารละลายต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบว่าไมโทคอนเดรียมีบทบาทสำคัญต่อการทนเอทานอลของยีสต์ และยีสต์ที่มีขนาดของเซลล์เล็กสามารถทนต่อเอทานอลได้ดีกว่ายีสต์ที่มีขนาดของเซลล์ใหญ่ (ชุติมา ศรีงิ้ว, 2548)

2.7.2 ความเข้มข้นของน้ำตาล

การใช้ยีสต์มาหมักในสภาวะที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูงมีผลทำให้การหมักเป็นไปได้ช้าๆ และเมื่อเลือกใช้ยีสต์ที่ทนต่อแรงดันออสโมซีส (osmotolerant yeast) เช่น *S. rouxii* พบว่าสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง แต่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลจะต่ำลง มีรายงานการศึกษาผลของแรงดันออสโมซีสต่อกระบวนการหมักของ brewing yeast (*S. cerevisiae*) ในอาหารที่มีความเข้มข้นน้ำตาลต่าง ๆ โดยใช้กลูโคสที่ความเข้มข้น 100, 200, 300 และ 400 กรัมต่อลิตร พบว่าที่กลูโคสความเข้มข้นสูงขึ้นการเจริญและการหมักของ brewing yeast ลดต่ำลงดังข้อมูลที่แสดในตารางที่ 2.2 ซึ่งจากผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าอัตราการเจริญอัตราการหมัก และประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลซึ่งดูจากค่าผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (theoretical ethanol yield) ลดลง เมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เป็นเพราะเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลภายในเซลล์ได้รับความเสียหาย จึงมีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาต่าง ๆ ภายในวิถี Embden-Meyerhof-Parnas

ตารางที่ 2.2 อิทธิพลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอล (ชุติมา ศรีงิ้ว, 2548; อ้างอิงจาก Panchal, 1990)

กลูโคส (กรัม/ลิตร)	อัตราการเจริญ (มิลลิกรัมของน้ำหนักแห้ง/มิลลิลิตร,ชั่วโมง)	การหมัก (โมลเอทานอล/มิลลิลิตร,ชั่วโมง)	ผลผลิตเอทานอลทางทฤษฎี (ร้อยละ)
100	0.33	54.0	93.5
200	0.24	52.7	66.4
300	0.11	42.5	59.0
400	0.03	14.2	23.6

อย่างไรก็ตามเมื่อมีการเติมไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated lipids) เช่น กรดลิโนลีอิก (linoleic acid) และสารอาหารบางอย่าง เช่น เปปโตน (peptone) และ สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ลงไปในอาหารสำหรับหมัก มีผลให้การยับยั้งเนื่องจากแรงดันออสโมซีสลดน้อยลงนั่นหมายความว่า

แรงดันออสโมซีสมีผลให้เซลล์ยีสต์ขาดสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญและการรักษาสภาพของเซลล์ ทั้งนี้เพราะแรงดันออสโมซีสไปมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะแข็งจึงมีผลกระทบต่อการนำสารอาหารเข้าไปในเซลล์ การเติมไขมันไม่อิ่มตัวเช่น กรดลิโนลีอิกจึงไปช่วยเพิ่มสภาพการเป็นของไหล ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้สารอาหารต่าง ๆ สามารถไหลผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดีขึ้น และเอทานอลภายในเซลล์สามารถแพร่ออกนอกเซลล์ได้เร็วขึ้น (ชุติมา ศรีงิ้ว, 2548; อ้างอิงจาก Paturau, 1969)

2.7.3 สารอาหาร และโคแฟกเตอร์

สารอาหารบางอย่างอาจมีไม่เพียงพอสำหรับการหมัก ซึ่งรวมถึงแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (เช่น แอมโมเนียมไอออน) วิตามิน หรือแร่ธาตุต่าง ๆ เช่น สังกะสี ฟอสฟอรัสซัลเฟอร์ แมกนีเซียม และแคลเซียม การเติมสารอาหารให้กับยีสต์มีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะเมื่อใช้น้ำตาลเริ่มต้นเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 16 (Rose and Harrison, 1971)

2.7.4 ไนโตรเจน

โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมไอออน (ammonium ion)ได้ซึ่งอาจเติมในรูปของไดแอมโมเนียมฟอสเฟต หรือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแอมโมเนียมไอออนนั้นจัดว่าเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (low molecular weight) ซึ่งยีสต์ *Saccharomyces* spp.สามารถใช้ได้ ขณะนี้ยังไม่พบว่ามีการนำยูเรียไปใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงยีสต์เพื่อผลิตอาหารสำหรับคนอย่างเป็นการค้าแต่มีการใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงโดยยูเรียจัดเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ยีสต์สามารถใช้ได้เช่นเดียวกันกับเกลือแอมโมเนียม (Rose and Harrison, 1971)

2.7.5 ฟอสฟอรัส

ปกติใส่ในรูปของฟอสเฟต ซึ่งเป็น ionic factor (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540) จัดเป็นธาตุอาหารที่มีความสำคัญต่อการเจริญของยีสต์ แต่ไม่ควรใส่จนมีความเข้มข้นเกินร้อยละ 4 ของน้ำหนักแห้ง (Rose and Harrison, 1971) บทบาทหลักของฟอสฟอรัสคือเป็นองค์ประกอบของน้ำตาลฟอสเฟต กรดนิวคลีอิก และนิวคลีโอไซด์ไดฟอสเฟต หรือนิวคลีโอไทด์ไทรฟอสเฟต มีความสำคัญในการควบคุมเมทาบอลิซึมของเซลล์ ให้ฟอสเฟตสะสม และให้พลังงาน (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.7.6 ซัลเฟอร์

ปกติในอุตสาหกรรมใช้ในรูปของแอมโมเนียมซัลเฟต จัดเป็นธาตุ อาหารที่มีความจำเป็นต่อการเจริญของยีสต์เช่นเดียวกับฟอสฟอรัส และความเข้มข้นที่ใส่โดยทั่วไปไม่ควรเกินร้อยละ 1 ของน้ำหนักแห้ง (Rose and Harrison, 1971) ถ้าใช้ความเข้มข้นสูงจะมีผลให้ยับยั้งการเจริญของยีสต์บางชนิดเช่น *S. cerevisiae* ยีสต์ทุกชนิดสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์จากซัลเฟตได้ เช่น cysteine, methionine (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549)

2.7.7 Trace element

สำหรับ brewer's yeast ความต้องการแร่ธาตุค่อนข้างหลากหลายโดยเฉพาะพวกที่เป็นประจุบวก (cation) ได้แก่ สังกะสี แมงกานีส แมกนีเซียม แคลเซียม ทองแดงโพแทสเซียม และเหล็ก โดยที่สังกะสี แมงกานีส เหล็ก ทองแดง และแมกนีเซียม ทำหน้าที่เป็นโคแฟกเตอร์ของเอนไซม์ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของแคทาไลติกเซ็นเตอร์ (catalytic center) ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา หรืออยู่ในสภาวะที่เสถียร ส่วนโพแทสเซียมนั้นเป็นส่วนประกอบของระบบการขนส่งสารอาหารเข้าสู่เซลล์ สำหรับแมกนีเซียมและแคลเซียมปริมาณการใส่อยู่ในช่วงกว้างแต่ในอาหารจะขาดธาตุทั้งสองชนิดนี้ไม่ได้ เพราะถ้าขาดจะมีผลให้หมักช้า กรณีของแมกนีเซียมช่วยให้อัตราในการผลิตเอทานอลเหมาะสม (Rose and Harrison, 1971) ขณะที่แคลเซียมกระตุ้นการเจริญและมีบทบาทต่อการตกตะกอนของเซลล์ยีสต์ (Smart, 2000)

2.7.8 วิตามิน

ความต้องการวิตามินในการเจริญขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของยีสต์ ส่วนมาก brewer's yeast มีความต้องการไบโอติน โดยไบโอตินถูกย่อยด้วยเอนไซม์คาร์บอกซีเลส(carboxylase) เพื่อใช้สำหรับสังเคราะห์กรดไขมันที่จำเป็น มียีสต์หลายสายพันธุ์ที่ต้องการแพนโททีเนตเป็นปัจจัยการเจริญ (growth factor) แม้ว่าบางครั้งจะผลิตได้มากและปลดปล่อยออกมาสู่อาหาร ซึ่งแพนโททีเนตนี้เป็นองค์ประกอบของโคเอนไซม์ เอ (coenzyme A) และมีความจำเป็นสำหรับกระบวนการเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตและลิพิด นอกจากนั้นเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ซัลเฟอร์เพื่อเป็นองค์ประกอบของกรดอะมิโนสำหรับอินอซิทอล (inositol) มีความต้องการเป็นบางครั้งเพราะใช้เป็นองค์ประกอบของฟอสฟอลิพิด ขณะที่ไพริดอกซิน (pyridoxine) และไทอะมีน (thiamine) นั้นมีความจำเป็นต่อ brewer's top yeasts หรือเอลยีสต์ ซึ่งวิตามินต่าง ๆ เหล่านี้เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตและเมแทบอลิซึมของกรดอะมิโน (Smart, 2000) ซึ่งการจะเติมสารอาหารใดลงไปนั้นควรคำนึงถึงผลต่อต้นทุนการผลิต สำหรับการเตรียมอาหารเพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงนั้นในทางกฎหมายไม่ได้จำกัดชนิดและความเข้มข้นของสารอาหารที่เติมลงไปเหมือนอย่างเช่นการผลิตเอทานอลสำหรับดื่ม ดังนั้นปริมาณที่ใส่จึงขึ้นอยู่กับความสามารถในการผลิตเอทานอลของยีสต์ที่เงื่อนไขนั้น ๆ (Rose and Harrison, 1971)

2.7.9 พีเอช

การที่เซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมต่างกัน ค่าพีเอชของโปรโตพลาซึมภายในเซลล์นั้นไม่เหมือนกัน ยีสต์สามารถรักษาระดับพีเอช ภายในเซลล์ได้ค่อนข้างดีเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าพีเอช ต่างกัน และยีสต์สามารถเจริญได้ค่อนข้างดีที่พีเอช ระหว่าง 3.6-6.0 แต่พีเอช ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญอยู่ระหว่าง 4.5-5.0 (Reed and Nagodawithana, 1991) สำหรับอาหารที่มีบัฟเฟอร์ต่ำ

พีเอช เริ่มต้นสำหรับการหมักที่เหมาะสมควรมีค่าประมาณ 5.5 แต่อาหารที่มีบัฟเฟอร์สูงพีเอช ที่ใช้ควรอยู่ในช่วง 4.5-4.7 (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

2.7.10 อุณหภูมิ

สำหรับยีสต์อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักจะสูงกว่าการเจริญ 5-10 องศาเซลเซียส (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540) ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญที่แตกต่างกัน ส่วนใหญ่สัมพันธ์กับกระบวนการทางชีวเคมีรวมทั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง ยีสต์ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส โดยพบว่าเซลล์ยีสต์ในระยะที่มีการเจริญเกิดการตายได้ ถ้านำไปไว้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 50-60 องศาเซลเซียส ในเวลาน้อยกว่า 30 นาที (Rose and Harrison, 1971) สำหรับการผลิตยีสต์ขนมปัง (baker's yeast) มักควบคุมอุณหภูมิระหว่างการหมักให้อยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส (ชุติมา ศรีงิ้ว, 2548; อ้างอิงจาก; Reed and Nagodawithana, 1991)

2.7.11 ออกซิเจน

ในกระบวนการหมักยีสต์ต้องการออกซิเจนสำหรับสังเคราะห์เยื่อหุ้มเซลล์เพื่อให้โครงสร้างที่เป็นลิพิดมีเสถียรภาพ และเพื่อรักษาสภาพของกระบวนการต่าง ๆ ที่มีอยู่ทั่วไปในเซลล์ อย่างไรก็ตามการให้ออกซิเจนในการหมักนั้นมีผลให้การผลิตเอทานอลลดลง และทำให้ชีวมวลของเซลล์เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นเพราะออกซิเจนส่งเสริมให้เกิด pasteur effect ในกรณีที่ใช้แบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์สำหรับการหมัก มีแบคทีเรียหลายชนิดที่ต้องอยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศเท่านั้น (strict anaerobes) ถึงจะมีอัตราการผลิตเอทานอลสูง และผลิตชีวมวลของเซลล์ต่ำ การที่ความเข้มข้นของเซลล์แบคทีเรียต่ำจึงทำให้พลังงานที่ใช้ในการเจริญลดลงภายใต้สภาวะที่ไม่มีการให้ออกซิเจน การใช้ ATP 1 โมเลกุลต่อกลูโคสหนึ่งโมลก็เพียงพอ ฉะนั้นการสลายกลูโคสจึงผ่านทางวิถี Entner-Doudoroff ขณะที่ยีสต์มีการใช้ ATP 2 โมเลกุล การสลายกลูโคสจึงผ่านทางวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (Smart, 2000)

2.7.12 คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์จะยับยั้งการเจริญของยีสต์ทั้งในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจนในที่ความดันสูงกว่าบรรยากาศคาร์บอนไดออกไซด์ยับยั้งการเจริญและการหมักรุนแรงมากขึ้น เช่นเดียวกับสภาวะที่อาหารพีเอชต่ำ และมีความเข้มข้นของเอทานอลสูงดูเหมือนว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีผลต่อการยับยั้งปฏิกิริยาดีคาร์บอกซีเลชันเท่านั้นแต่ก็พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีอิทธิพลต่อองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมบางอย่างของเอนไซม์ เปลี่ยนแปลงสภาพให้ซึมได้ (permeability) และการขนส่งตัวถูกละลาย (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2540)

2.8 แก่นตะวัน (Jerusalem artichoke)

แก่นตะวัน มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Helianthus tuberosus* เป็นพืชล้มลุกตระกูลเดียวกับทานตะวัน ลำต้นมีลักษณะเป็นขนคล้ายหนามกระจายทั่วลำต้น ขอบใบหยักรูปฟันปลาโดยที่พื้นผิวใบสาก ดอกมีสีเหลืองคล้ายดอกบัวตองแต่มีขนาดเล็กกว่า มีหัวมีลักษณะคล้ายขิง หรือ ข่า ทำหน้าที่สะสมอาหาร คือ อินูลิน แก่นตะวันมีถิ่นกำเนิดอยู่แถบอเมริกาเหนือ แต่สามารถปลูกและปรับตัวได้ดีในสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยแก่นตะวันมีอายุการเก็บเกี่ยวสั้น โดยมีอายุที่จะสามารถเก็บเกี่ยวได้ประมาณ 120-140 วันและสำหรับการปลูกในฤดูแล้งจะเก็บเกี่ยวผลผลิตที่อายุ 100-120 วัน ซึ่งใช้เวลาปลูกเพียง 4 เดือนลักษณะของแก่นตะวันดังแสดงในภาพที่ 2.5 หัวแก่นตะวันมีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบหลักร้อยละ 11-20 คาร์โบไฮเดรตทั้งหมดเป็นน้ำตาลประเภทอินูลินร้อยละ 70-90 ซึ่งอินูลิน ประกอบไปด้วยโมเลกุลของน้ำตาลฟรุกโตสเป็นสายยาวเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ $\beta(2 \longrightarrow 1)$ และมีโมเลกุลของกลูโคสที่ปลายสายโดยที่โมเลกุลของกลูโคสจะเชื่อมต่อกับโมเลกุลของฟรุกโตสด้วยพันธะ $\alpha\ (2 \longrightarrow 1)$ (Szambelan et al., 2004) อินูลินเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์อินูลินเนสจะได้น้ำตาลฟรุกโตส กลูโคส ซูโครส และ ฟรุกโตโอลิโกแซกคาไรด์ (Byun and Nahm, 1978)

ทัชชา อ่อนสร้อย (2551) ได้หาปริมาณสารสำคัญทั้งหมดในหัวแก่นตะวันพบว่าหัวของแก่นตะวันมีความชื้นร้อยละ 76.20 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (total soluble solid) 16.47 องศาบริกซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) 186.21 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส (fructose) 34 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (glucose) 4.40 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลซูโครส (sucrose) 5.20 กรัมต่อลิตร ปริมาณอินูลิน (inulin content) 168 กรัมต่อลิตร ปริมาณของฟีนอลลิก (Phenolic compound) 0.72 กรัมต่อลิตร เหล็ก (Fe) 14.40 มิลลิกรัมต่อลิตร สังกะสี (Zn) 2.05 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีส (Mn) 1.28 มิลลิกรัมต่อลิตรและไนโตรเจน (N) ฟอสฟอรัส (P) โพแตสเซียม (K) แคลเซียม (Ca) แมกนีเซียม (Mg) ซัลเฟอร์ (S) โซเดียม (Na) คอปเปอร์ (Cu) ปริมาณเล็กน้อย

ภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ (2551) ได้หาปริมาณสารสำคัญทั้งหมดในหัวแก่นตะวันพบว่าหัวแก่นตะวันมีความชื้นร้อยละ 76.20 ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด (Total soluble solid) 24.50 องศาบริกซ์ ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (total sugar) 286.21 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) 27.25 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลฟรุกโตส (fructose) 34 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลกลูโคส (glucose) 4.40 กรัมต่อลิตร ปริมาณน้ำตาลซูโครส (sucrose) 5.20 กรัมต่อลิตร ปริมาณอินูลิน (inulin content) 222.22 กรัมต่อลิตร ปริมาณของฟีนอลลิก (phenolic compound) 0.463 กรัมต่อลิตร เหล็ก (Fe) 14.40 มิลลิกรัมต่อลิตร แมงกานีส (Mn) 1.28 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนโตรเจน (N) 238มิลลิกรัมต่อลิตร ฟอสฟอรัส (P) 18 มิลลิกรัมต่อลิตร โพแตสเซียม (K) 262

มิลลิกรัมต่อลิตร แคลเซียม (Ca) 7 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียม (Mg) 34 มิลลิกรัมต่อลิตร ซัลเฟอร์ (S) 1 มิลลิกรัมต่อลิตร โซเดียม (Na) 26 มิลลิกรัมต่อลิตร และ คอปเปอร์ (Cu) 0.584 มิลลิกรัมต่อลิตร

ศิริพร ตันจอ และคณะ (2012)ได้ศึกษาอินูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในแก่นตะวันสายพันธุ์ต่างๆวิเคราะห์หาปริมาณอินูลิน และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (FOS ประกอบด้วย 1-kestose (หรือ 1-kestotriose; GF2), nystose (1, 1-kestotetraose; GF3), และ 1F-β-fructofuranosylnystose (1,1,1-kestopentaose; GF4)) ในแก่น 16 สายพันธุ์ ซึ่งมหาวิทยาลัยขอนแก่นได้มีการวิจัยปรับปรุงพันธุ์ให้สามารถเพาะปลูก และปรับตัวให้เหมาะสมต่อสภาพอากาศร้อนของประเทศไทย พบว่าปริมาณอินูลินในแก่นตะวันทั้งแบบปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือก อยู่ในช่วง 14.0 ถึง 20.4 กรัมต่อน้ำหนักสด 100 กรัม สายพันธุ์ที่พบอินูลิน ปริมาณสูงคือสายพันธุ์ JA 38 และ CN 52867 (79.2-84.9 และ 70.5-77.6 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม ตามลำดับ) ส่วนปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ อยู่ในช่วง 3.0-6.6 กรัมต่อน้ำหนักสด 100 กรัม ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 19 ถึง 40 ของอินูลินทั้งหมด สายพันธุ์ที่พบปริมาณฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์สูงคือสายพันธุ์ HEL 69 และ JA 38 (20.8-23.3 และ 20.9-22.7 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ) สำหรับปริมาณน้ำตาลทั้งหมดพบว่ามีปริมาณน้อยกว่า 3.5 กรัมต่อน้ำหนักสด 100 กรัม เมื่อพิจารณาถึงปริมาณอินูลิน GF-3, GF-4 และ FOS พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในแก่นตะวันแบบปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือก แก่นตะวันทั้ง 16 สายพันธุ์จัดเป็นพืชหัวที่มีอินูลินและฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ในระดับสูงมาก

ในประเทศไทยได้มีการปลูกแก่นตะวันในพื้นที่ต่างๆซึ่งให้ผลผลิตมากน้อยแตกต่างกันขึ้นอยู่กับพื้นที่เพาะปลูกและสายพันธุ์ของแก่นตะวันจากที่มีการรายงานไว้พบว่า

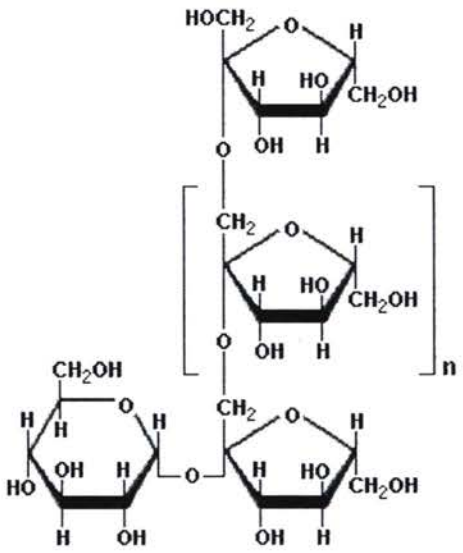
ประภาส ช่างเหล็ก และคณะ (2553) ทดลองปลูกแก่นตะวัน บนพื้นที่สูง ณ. สถานีวิจัยเพชรบูรณ์ 16 สายพันธุ์ สายพันธุ์ที่ให้ผลผลิตหัวสดเฉลี่ยสูงสุดคือ 10,476 กิโลกรัมต่อไร่ นอกจากนั้นยังมีการรายงานว่าแปลงปลูกที่จังหวัดขอนแก่นให้ผลผลิตที่อยู่ 2,000 กิโลกรัมต่อไร่ และที่จังหวัดลพบุรีให้ผลผลิตที่ 6,000 กิโลกรัมต่อไร่

อัตถ์ อัจฉริยมนตรี (2555) ทดลองปลูกในสภาพเกษตรอินทรีย์ ได้ผลผลิตหัวแก่นตะวัน 2,857.5 กิโลกรัมต่อไร่

ภาพที่ 2.5 ลักษณะดอก และต้นของแก่นตะวัน

2.9 อินูลิน

อินูลิน(inulin)โอลิโกฟรุกโตส (oligofructose) และฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ (fructo-oligosaccharide, FOS) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ในกลุ่มของฟรุกแตน (fructan) ซึ่งประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสที่เชื่อมต่อกันเป็นสายยาว (fructososyl-fructose links) มีทั้งชนิดที่เรียกว่า อินูลิน ซึ่งพบในพืชทั่วไปและลีแวน (levan) ซึ่งเป็นผลผลิตที่ได้จากเชื้อราหรือแบคทีเรียมีโครงสร้างที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ β-(2-1) โดยอินูลินมีจำนวนความยาวสาย (degree of polymerization, DP) 2 ถึง 60 หน่วย (DP 2-60) ซึ่งปลายด้านหนึ่งของโครงสร้างอาจมีน้ำตาลกลูโคสเชื่อมต่ออยู่ ส่วนโอลิโกฟรุกโตสมีลักษณะเดียวกันแต่เชื่อมต่อกันด้วยน้ำตาลฟรุกโตส 2 ถึง10 หน่วย (DP 2-10) ในขณะที่ฟรุกโตโอลิโกแซคคาไรด์ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุกโตสที่เชื่อมต่อกันเพียง 2-4 หน่วย ได้แก่ 1-kestose (1-kestotriose; GF2), nystose (1,1-kestotetraose; GF3), และ 1F-β-fructofuranosylnystose (1,1,1-kestopentaose; GF4) โดย G หมายถึงน้ำตาลกลูโคส และ F หมายถึงน้ำตาลฟรุกโตส โดยทั่วไป FOS อาจมีความหมายเดียวกับโอลิโกฟรุกโตสและสามารถสร้างได้จากน้ำตาลซูโครสด้วย (ศิริพร ตันจอ และคณะ, 2555) โครงสร้างโมเลกุลของอินูลินดังแสดงในภาพที่ 2.6



ภาพที่ 2.6 โครงสร้างอินูลิน (Boughida N, 2011; อ้างอิงจาก; Zamora, 2005)

2.10 เอนไซม์อินูลินเนส

อินูลิเนส (inulinase) เป็นเอนไซม์ที่มีกิจกรรมต่ออินูลิน แบ่งตามรูปแบบของการไฮโดรไลซ์ออกเป็น 2 ชนิด คือ เอนโดอินูลิเนส และเอกโซอินูลิเนส โดยเอนโดอินนูลิเนส (endoinulinase, 2, 1 β-D-fructan fructanohydrolase; EC 3.2.1.7) ย่อยฟรุกแทนภายในอินูลินแบบ สุ่ม ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอินูโลโอลิโกแซ็กคาไรด์ (inulo-oligosaccharides) ซึ่งเป็นสารให้ความหวานพลังงานต่ำ จัดเป็นพรีไบโอติก (prebiotic) และใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารสุขภาพส่วนเอกโซอินูลิเนส (exoinulinase, β-D-fructan fructohydrolase; EC 3.2.1.80) ตัดพันธะบีตา 2, 1 ของฟรุกโตสของอินูลินออกทีละโมเลกุลทางด้านปลายนอนรีดิวซิงค์ ใช้ในการผลิตฟรุกโทสไซรัปจากอินูลิน และสามารถอาศัยความจำเพาะต่อสับสเทรตที่ต่างกัน ได้แก่ อัตราส่วนของอินูลิเนสต่ออินเวอร์เทส (I/S ratio) ในการแยกความแตกต่างของอินูลิเนสจากอินเวอร์เทส (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และคณะ, 2547)

2.11 การหมักเอทานอลจากแก่นตะวัน

แก่นตะวันที่ใช้ในการหมักเอทานอลจะคั้นเอาเฉพาะน้ำ และน้ำที่สกัดได้จะต้องผ่านกระบวนการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์อินูลินเนสเพื่อให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการหมักเป็นเอทานอล ซึ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มจีนัส *Kluyveromyces* และ *Aspergillus* สามารถสร้างเอนไซม์อินูลินเนสได้สามารถย่อยอินูลินเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวได้ (Rose et al., 1971, Singh and Gill, 2006) ก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักโดยเชื้อ *S. cerevisiae* หรือเชื้อ

Zymomonas mobilis ดังนั้นการหมักเอทานอลจากอินูลินหรือวัตถุดิบที่มีอินูลินเป็นองค์ประกอบจึงมีการใช้จุลินทรีย์สองชนิดร่วมกัน โดยที่เชื้อชนิดหนึ่งสามารถสร้างเอนไซม์ inulinase ได้และอีกชนิดหนึ่งสามารถผลิตเอทานอลได้ เช่น การใช้เชื้อ *Aspergillus niger* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (Ohta et al., 1983, Ge and Zhange, 2005) การใช้เชื้อ *K. fragilis* ร่วมกับเชื้อ *Z. mobilis* หรือการใช้เชื้อ *K. frailis* ร่วมกับเชื้อ *S. cerevisiae* (Szambelan et al., 2004) ในการหมักโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์สองชนิดร่วมกันนั้นทำให้เกิดความยุ่งยากในการใช้สภาวะที่เหมาะสมในการหมักเนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีคุณสมบัติและต้องการสภาวะต่างๆที่แตกต่างกัน นอกจากการใช้จุลินทรีย์ในการย่อยอินูลินแล้วยังสามารถใช้กรดในการย่อยสลายอินูลินได้อีกด้วย เคยมีการใช้กรดซัลฟิวริกพีเอช 2.0 พร้อมทั้งให้ความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที และปรับพีเอช เท่ากับ 5 ก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักเอทานอลด้วยเชื้อยีสต์ *S. cerevisiae* (Thuesombat et al., 2007)

อย่างไรก็ตาม หากใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์อินูลินเนส และมีความสามารถในการผลิตเอทานอลได้ในเวลาเดียวกันจึงน่าจะเหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับการผลิตเอทานอลจากวัตถุดิบที่มีสารอินูลินเป็นองค์ประกอบหลักเช่นหัวแก่นตะวัน ที่ผ่านมามีรายงานหลายฉบับกล่าวถึงการนำเชื้อ *K. marxianus* มาทดสอบการผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวัน เชื้อยีสต์ *K. marxianus* เป็นเชื้อที่มีคุณสมบัติโดดเด่นหลายประการ เช่น สามารถเจริยและผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิสูงมีอัตราการเจริญรวดเร็ว สามารถเจริญได้บนแหล่งคาร์บอนหลายแหล่งโดยเฉพาะความสามารถในการเจริญบนน้ำตาลไซโลส อะราบิโนส และเซลโลไบโอส เป็นต้น (Fonseca et al., 2008, Limtong et al., 2007, Nonklang et al., 2008)

มีการศึกษาการหมักเอทานอลจากอินูลินและวัตถุดิบที่มีอินูลินเป็นองค์ประกอบมากมายเพื่อพัฒนาการหมักเอทานอลจากวัตถุดิบใหม่ๆและพัฒนาการหมักเพื่อลดค่าใช้จ่ายจากการหมักเอทานอลด้วยวัตถุดิบที่มีอินูลินเป็นองค์ประกอบไม่ว่าจะเป็นการย่อยด้วยกรด เอนไซม์ หรือการใช้จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์อินูลินเนสร่วมกับจุลินทรีย์ผลิตเอทานอล หรือแม้กระทั้งการใช้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์อินูลินเนสพร้อมกับผลิตเอทานอลในการหมัก

Lim et al. (2011) ได้หมักเอทานอลโดยใช้แป้งแก่นตะวันโดยใช้ยีสต์ *S.cerevisiae* KCCM50549 โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ pretreatment เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ ATCC96581 และสายพันธุ์ NCYC625 โดยใช้แป้งแก่นตะวันเริ่มต้น 135 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยบ่มที่ 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าได้เอทานอลจากการหมัก 28.9, 13.7 และ 18.2 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จากนั้นศึกษาการหมักโดย *S.cerevisiae* KCCM50549 ในถังหมักขนาด

5 ลิตร โดยใช้ผงแก่นตะวันเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร มีเอทานอลเกิดขึ้น 36.2 กรัมต่อลิตรที่เวลา 34 ชั่วโมงซึ่ง *S.cerevisiae* KCCM50549 เป็นยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักคาร์โบไฮเดรตประเภทอินูลินได้โดยตรงโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการ pretreatment ลดความยุ่งยากและลดค่าใช้จ่ายในกระบวนการวัตถุดิบสำหรับการหมักได้

Bonciu et al. (2010) ได้ทำการคัดแยกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากหลายๆแหล่งสำหรับใช้ในการหมักเอทานอลโดยใช้อินูลินที่ผ่านการย่อยเป็นน้ำตาลฟรุกโตสแล้วซึ่งคัดแยกได้ 12 ไอโซเลท จากแก่นตะวัน ดินจากแก่นตะวัน น้ำผึ้ง เบียร์ ผึ้ง กล้วย ดอกไม้ และโยเกิร์ต โดยคัดแยกเชื้อที่หมักเอทานอลจากฟรุกโตสได้ 10 ไอโซเลท มาทำการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ wickerham medium ที่มีฟรุกโตสเข้มข้นร้อยละ 20 พบว่ามีเอทานอลเกิดขึ้นสูงสุดเท่ากับร้อยละ 5.57 โดยปริมาตรที่เวลา 168 ชั่วโมงจากยีสต์ที่แยกจากเบียร์

Charoensopharat et al. (2010)ได้คัดแยกยีสต์ทนร้อนเพื่อหมักเอทานอลจากแก่นตะวันโดยคำนึงถึงการลดต้นทุนในส่วนของระบบหล่อเย็น โดยประโยชน์ของการใช้ยีสต์ทนร้อนนอกจากจะลดต้นทุนการผลิตแล้วยังลดการปนเปื้อน mesophic microorganism และเร่งปฏิกิริยาการหมักอีกด้วย โดยเขาได้คัดแยกยีสต์จากแก่นตะวันและดินจากแก่นตะวันคัดแยกได้ถึง 50 ไอโซเลท แต่มีเพียง 6 ไอโซเลทที่สามารถใช้อินูลินในการหมักเอทานอลได้อย่างมีประสิทธิภาพซึ่ง 6 ไอโซเลทนี้ทนเอทานอลได้ที่ความเข้มข้นเอทานอลเท่ากับร้อยละ 4 ซึ่งทนอุณหภูมิได้สูง 46 องศาเซลเซียส

Zhang et al. (2010) ได้ศึกษาการหมักเอทานอลจากอินูลินและกากหัวแก่นตะวันโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces sp.*W0 โดยใช้อินูลินเนสที่ผลิตจาก *Pichia pastoris X-33*/ pPICZaA-*INU1* เปลี่ยนอินูลินเป็นน้ำตาลที่ยีสต์สามารถให้หมักเป็นเอทานอลได้ พบว่าเกิดเอทานอล 14.6 มิลลิลิตรต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (0.384 กรัมเอทานอลต่อกรัมอินูลิน) ขณะที่มีการใช้น้ำตาลทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 98.9 โดยหลังจากนั้นเขาได้ทดสอบการหมักโดยการเติมกากถั่วเหลืองที่ผ่านการย่อยแล้วลงไปโดยใช้ปริมาณที่แตกต่างกันหมัก 120 ชั่วโมงพบว่าเติมกากถั่วเหลืองร้อยละ 4 โดยน้ำหนักพบว่าเอทานอลสูงสุด 14.9 มิลลิลิตรต่อ100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อและมีการใช้น้ำตาลเท่ากับร้อยละ 98.9 ส่วนการหมักจากกากหัวแก่นตะวัน พบว่าผลิตเอทานอลสูงสุด 12.05 มิลลิลิตรต่อ100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ 144 ชั่วโมง

Hu et al. (2012) หมักเอทานอลจากอาหารที่มีอินูลินเป็นองค์ประกอบร้อยละ 20 และมีสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร เปปโตน 4 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 1 กรัมต่อลิตรโดย *K. marxianus* ATCC8554 ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ได้คือ 81.2 กรัมต่อลิตรหรือร้อยละ 10.29 โดยปริมาตร (Yuan et al., 2008[a]) มีการทดสอบการหมักเอทานอลจากแป้งหัวแก่นตะวัน 200 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลล์เซียสโดย *K. marxianus* PT-1 พบว่าผลิตเอทานอลได้ 73.6 กรัมต่อลิตรหรือความเข้มข้นร้อยละ 9.33 โดยปริมาตร

Yuan et al. (2008[a]) มีการทดสอบการหมักเอทานอลจากแก่นตะวันมากมายที่ได้มีการรายงานไว้ เช่นการหมักเอทานอลจากอาหารที่มีอินูลินเป็นองค์ประกอบร้อยละ 20 และมีสารสกัดจากยีสต์ 4 กรัมต่อลิตร เปปโตน 4 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 1 กรัมต่อลิตรโดย *K. marxianus* ATCC8554 ที่อุณหภูมิ 38 องศาเซลเซียส ปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ได้คือ 81.2 กรัมต่อลิตร หรือความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 10.29 โดยปริมาตร

Yu et al. (2010) ได้ศึกษาการหมักเอทานอลแบบ SSF จากหัวแก่นตะวันโดย *K. cicerisporus* Y179 ศึกษาอิทธิพลของปริมาณเชื้อเริ่มต้น การให้อากาศ และอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอลพบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีผลเพียงเล็กน้อย ในขณะที่สภาวะไม่มีออกซิเจนเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลิตเอทานอลได้มากกว่าที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียสในอาหารที่มีน้ำตาลร้อยละ 22 โดยน้ำหนัก และยังศึกษาการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการคนกวน 300 รอบต่อนาทีภายใต้สภาวะไม่มีออกซิเจนหลังจากผ่านไป 144 ชั่วโมง ผลิตเอทานอลได้เท่ากับร้อยละ 12.3 โดยปริมาตร คิดเป็นร้อยละ 86.9 ตามทฤษฎี และมีการใช้น้ำตาลร้อยละ 93.6

Yuan et al. (2008[b]) ศึกษาการหมักเอทานอลจากแก่นตะวันแบบ one-step fermentation โดย *K. marxianus* YX01 โดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอนไซม์อินูลินเนสและหมักเอทานอลอยู่ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสและการหมักที่ไม่มีการให้ออกซิเจนทำให้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลเพิ่มขึ้นซึ่งน้ำตาล 235 กรัมต่อลิตรหมักเอทานอลได้ 92.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็นร้อยละ 85 ตามทฤษฎี

Bajpai and Margaritis (1982) ศึกษาจลนพลศาสตร์ของเอทานอลที่มีผลยับยั้งการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* UCD(FST)55-82 โดยการหมักแบบกะโดยใช้อินูลินจากแก่นตะวันร้อยละ 10 โดยน้ำหนัก ศึกษาปริมาณเอทานอลเริ่มต้น 0-80 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีผลให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) ลดลงจาก 0.42 เป็น 0.09 ชั่วโมง$^{-1}$

Argyrios Margaritis and Pratima Bajpai (1983) ยังได้ศึกษาอิทธิพลของอินูลินต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* UCD(FST) 55-82 พบว่าผลิตเอทานอลได้สูงสุด 102 กรัมต่อลิตร ที่น้ำตาล 250 กรัมต่อลิตร แต่ที่ 50 กรัมต่อลิตรมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด(μ_{max}) สูงที่สุด 0.44 ชั่วโมง$^{-1}$ เมื่อเพิ่มอินูลินป็น 300 กรัมต่อลิตร (μ_{max}) ลดลงเป็น 0.13 ชั่วโมง$^{-1}$ และเมื่ออินูลินเพิ่มขึ้น Yield (x/s) ลดลง

Yuan et al. (2012) ศึกษาการหมักเอทานอลแบบ consolidated bioprocessing (CBP) ของ *K. marxianus* Y179 จากหัวแก่นตะวันเมื่อเวลาการหมักเพิ่มขึ้นกิจกรรมของอินูลิเนสเพิ่มขึ้นแต่การส่งเสริมการผลิตเอทานอลค่อนข้างต่ำและการหมักแบบ CBP นี้เหมาะสมสำหรับการหมักโดยไม่มีการเติมอากาศซึ่งการเติมเพกติเนสในการหมักช่วยลดความหนืดของอาหารที่ใช้หมักด้วย

การใช้เชื้อยีสต์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลจากแก่นตะวันเช่น *K. marxianus* จะช่ายลดความยุ่งยากของกระบวนการและลดต้นทุนการผลิตได้เป็นอย่างดี จึงมีความน่าสนใจที่จะนำมาผลิตเอทานอลจากหัวแก่นตะวันในอนาคต

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 จุลินทรีย์

ยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ UBU จำนวน 10 สายพันธุ์ ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ. ดร. ชริดา ปุกหุต มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนความร้อนได้ถึง 50 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar (Pukahuta et al., 2009)

3.1.2 หัวแก่นตะวัน

หัวแก่นตะวันที่ใช้ในการทดลองคือสายพันธุ์เบอร์ 3 หรือสายพันธุ์ CN52867 ได้มาจากคณะเกษตรศาสตร์มหาวิทยาลัยขอนแก่น (ภาพที่ 3.2) ซึ่งขั้นตอนการเตรียมเริ่มจากการล้างหัวแก่นตะวันให้สะอาดแล้วทำการปอกเปลือกล้างอีกครั้งด้วยน้ำสะอาด จากนั้นนำหัวแก่นตะวันมาคั้นด้วยเครื่องคั้นน้ำผลไม้แล้วทำการคั้นเอาเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำมากรองด้วยผ้าขาวบางก่อน จากนั้นนำมากรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรองกาแฟแล้วเก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 3.1 ลักษณะของแก่นตะวันที่ซื้อจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.1.3 อุปกรณ์

อุปกรณ์	ยี่ห้อ	รุ่น	ประเทศที่ผลิต
Gas Chromatography	Shimadzu	GC-17A	Japan
High performance liquid chromatography	Shimadzu	LC10vp	Japan
Stirred Tank Reactor	-	Biostat B	Germany
Spectrophotometer	Perkin Elmer	Lamda20	USA
Spectrophotometer	WPA Colourwave	CO7500 Colorimiter	UK
Autoclave	ALP	KT-30L	Japan
Incubator shaker	Innova	Innova 4900	USA
Hot air oven	Memmert	-	Germany
Centrifuge	Hettich	Mikro 20	Germany
pH Meter	Metrohm	713 pH meter	Switzerland
Auto pipette	Gilson	-	France
Water bath	Contherm	-	Newzealand
Erlenmeyer flask	Pyrex	-	USA
Test tube	Pyrex	-	USA

3.1.4 สารเคมี

สารเคมี	สูตรเคมี	เกรด*	ยี่ห้อ	ประเทศ
Acetic acid	$C_2H_4O_2$	AR	BHD	UK
Ammonium sulphate	$(NH_4)_2SO_4$	RPE	CARLO ERBA	Italy
Buthanol	$C_4H_{10}O$	AR	Fisher chemical	UK
Casein peptone	-	-	HIMEDIA	India
Conc. Sulfuric acid	H_2SO_4	AR	Ajax	Newzealand
Dextrose	$C_6H_{12}O_6$	-	Fluka	Switzerland
3,5 Dinitrosalicylic acid	$(NO_2)_2C_6H_2(OH)CO OH.nH_2O$	RPE	CARLO ERBA	Italy
Ethanol (Absolute)	C_2H_5OH	AR	RCI labscand	Thailand

Fructose	$C_6H_{12}O_6$	RPE	MERCK	Germany
Inulin (from chicory)	$C_{6n}H_{10n+2}O_{5n+1}$	-	SIGMA	USA
Phenol	C_6H_2OH	RPE	CARLO ERBA	Italy
Sodium acetate	CH_3COONa	RPE	CARLO ERBA	Italy
Sodium hydroxide	NaOH	RPE	CARLO ERBA	Italy
Sodium potassium tratrate	$C_4H_4KN_3O_6.4H_2O$	RPE	CARLO ERBA	Italy
Trypanblue	$C_{34}H_{24}N_6Na_4O_{14}S_4$	-	MERCK	Germany
Yeast extract	-	-	HIMEDIA	India

หมายเหตุ * AR: Analytical reagent grade, RPE: Analytical grade reagents

3.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

ย้ายเชื้อ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU จากอาหารแข็ง YPD 1 ลูปลงเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตรแล้วนำไป บ่มเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง

3.3 การคัดเลือกยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 100 กรัมต่อลิตร จากนั้นบรรจุน้ำคั้นหัวแก่นตะวันปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟอยล์แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นถ่ายเชื้อจากขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อ ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยการวัดความขุ่นของเชื้อเริ่มต้น (OD_{590}) เท่ากับ 0.2 หลังจากนั้นทำการบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญโดยการวัดค่า OD_{590} และเก็บตัวอย่างเพื่อทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที และเก็บส่วนใสแล้วแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณเอทานอล และกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนส

3.4 การวิเคราะห์การเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU

3.4.1. การวัดค่าความขุ่น (Optical density)

เริ่มจากเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมก่อนนำมาวัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตรด้วย spectrophotometer (Biochrom WPA Colourwave CO 7500 Colorimiter, Germany) โดยใช้น้ำคั้นหัวแก่นตะวันเป็น blank

3.4.2 การนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องด้วย hemacytometer

เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้อยู่ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมจากนั้นย้อมด้วยสี trypan blue ในอัตราส่วนตัวอย่างต่อสีย้อม 1:1 ผสมให้เข้ากันตรวจนับจำนวนเซลล์ด้วย hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่าโดยนับจากจำนวนช่องทั้งหมด 25 ช่อง

การคำนวณปริมาณเซลล์

1 ช่องเล็ก = 0.0025×0.1 = 0.0025 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

25 ช่อง = 25× 0.0025 = 0.00625 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ดังนั้นจำนวนเซลล์ทั้งหมด = จำนวนเซลล์ที่นับได้จาก 25 ช่อง ×1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (1 มิลลิลิตร) /0.00625 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ตัวอย่างเช่น

25 ช่องเล็กนับเซลล์ได้ 90 เซลล์ จะคำนวณได้ดังนี้

0.00625 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีเซลล์ 90 เซลล์

1000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (1 มิลลิลิตร) จะมีเซลล์ทั้งหมด 90×1000/0.00625

= 14400000 หรือ 1.44×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3.4.3 การวัดปริมาณน้ำหนักแห้ง

โดยเริ่มจากการนำถ้วยอลูมิเนียมฟอยล์อบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ประมาณ 24 ชั่วโมงแล้วนำออกมาใส่ในโถดูดความชื้น เมื่อเย็นเท่าอุณหภูมิห้องนำมาชั่งน้ำหนักแห้งที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง ดูดตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดเซ็นตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นครั้งละ 1 มิลลิลิตรจำนวน 2 ครั้ง ละลายตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร เทสารละลายตะกอนเซลล์ลงในถ้วยอลูมิเนียมฟอยล์ ล้างด้วยน้ำกลั่น 5 ครั้งๆ ละ 1 มิลลิลิตร เทน้ำลงในถ้วยอลูมิเนียมฟอยล์ แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมงแล้วนำถ้วยไปใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วชั่งน้ำหนักแห้งที่แน่นอนด้วยเครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง บันทึกค่าน้ำหนักที่ได้

การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง

น้ำหนักเซลล์แห้งรวมกับน้ำหนักถ้วยอลูมิเนียม – น้ำหนักถ้วยอลูมิเนียม

(ในหน่วยกรัมต่อมิลลิลิตร)

ข้อมูลที่ได้นำมาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่น (OD_{590}) และค่าน้ำหนักแห้งเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบน้ำหนักแห้งจากค่าความขุ่นที่วัดได้ (ภาคผนวก ข)

3.5 การวิเคราะห์

น้ำตาลรีดิวซ์วิเคราะห์ด้วยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959) และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดวิเคราะห์ด้วยวิธี phenol sulfuric acid (ลภัสรดา มุ่งหมาย, 2549) ส่วนเอทานอลวิเคราะห์ด้วยเครื่อง gas chromatography (GC) (Shimadzu GC-17A, Japan) และเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, LC10vp Japan) รวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนส (Yuan et al., 2008) การวิเคราะห์ทั้งหมดได้อธิบายไว้ในภาคผนวก ข

3.6 การทดสอบอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอล

K. marxianus สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลมากที่สุดถูกนำมาศึกษาอิทธิพลของสภาวะต่างๆต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดยเริ่มจากการทดสอบอิทธิพลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลโดยเริ่มจากการปรับระดับความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันให้ได้ความเข้มข้น 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร จากนั้นบรรจุน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟอยล์แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้องจากนั้นถ่ายเชื้อ *K. marxianus* สายพันธุ์UBU 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อลงในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยการวัดความขุ่นของเชื้อเริ่มต้น (OD_{590}) เท่ากับ 0.2 จากนั้นทำการบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญโดยการวัดค่า OD_{590} และเก็บตัวอย่างเพื่อทำการปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที และเก็บส่วนที่เป็นสารละลายแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเอทานอล และกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนส

3.7 การทดสอบอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอล

ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันให้ได้ 150 กรัมต่อลิตร บรรจุน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นแล้วปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี และปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟอยล์จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นถ่ายเชื้อ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อลงในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยการวัดความขุ่น (OD_{590}) เท่ากับ 0.2 จากนั้นทำการบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมงเพื่อวัดการเจริญโดยการวัดค่า OD_{590} และเก็บตัวอย่างเพื่อปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที และเก็บส่วนที่เป็นสารละลายแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเอทานอล และกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนส

3.8 การทดสอบอิทธิพลของพีเอชต่อการหมักเอทานอล

ปรับพีเอชในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตรให้ได้พีเอชเริ่มต้น 4.0, 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 จากนั้นบรรจุน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ปรับพีเอชเริ่มต้นแล้วปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี และปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟอยล์แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นถ่ายเชื้อ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อลงในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยการวัดความขุ่นของเชื้อเริ่มต้น (OD_{590}) เท่ากับ 0.2 จากนั้นทำการบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญโดยการวัดค่า OD_{590} และเก็บตัวอย่างเพื่อปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที และเก็บส่วนที่เป็นสารละลายแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเอทานอล และกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนส

3.9 การทดสอบอิทธิพลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการหมักเอทานอล

เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ0, 0.025, 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนัก ลงในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีการปรับปริมาตรน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตรจากนั้นบรรจุน้ำคั้นหัวแก่นตะวันปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลีและปิด

ทับด้วยอลูมิเนียมฟอยล์แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นถ่ายเชื้อ *K. marxianus* สายพันธุ์UBU 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่ผ่านขั้นตอน การเตรียมกล้าเชื้อลงในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยการวัดความขุ่นของเชื้อเริ่มต้น (OD_{590}) เท่ากับ 0.2 จากนั้นทำการบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญโดยการวัดค่า OD_{590} และเก็บตัวอย่างเพื่อปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที และเก็บส่วนที่เป็นสารละลายแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเอทานอล และกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนส

3.10 การทดสอบอิทธิพลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ต่อการหมักเอทานอล

เติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, และ 2.5 โดยน้ำหนัก ลงในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีการปรับปริมาณน้ำตาลเริ่มต้น150 กรัมต่อลิตรจากนั้นบรรจุน้ำคั้นหัวแก่นตะวันปริมาตร 50 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ปิดด้วยจุกสำลี และปิดทับด้วยอลูมิเนียมฟอยล์แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นถ่ายเชื้อ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่ผ่านขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อลงในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นโดยการวัดความขุ่นของเชื้อเริ่มต้น (OD_{590}) เท่ากับ 0.2 จากนั้นทำการบ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12 และ 24 ชั่วโมง เพื่อวัดการเจริญโดยการวัดค่า OD_{590} และเก็บตัวอย่างเพื่อปั่นเหวี่ยงแยกตะกอนเซลล์ ที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที และเก็บส่วนที่เป็นสารละลายแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเอทานอล และกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนส

3.11 การทดสอบการหมักเอทานอลในถังหมักขนาด 5 ลิตร

เตรียมน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดยปรับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 จากนั้นบรรจุน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่เตรียมไว้ปริมาตร 3 ลิตร ลงในถังหมักขนาด 5 ลิตร (Stirred tank reactor, Biostat B) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นถ่ายเชื้อ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่เตรียมจากขั้นตอนการเตรียมกล้าเชื้อลงในถังหมักให้ได้จำนวนเซลล์เซลล์เริ่มต้นเท่ากับ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการคนกวน150 รอบต่อนาทีโดยไม่มี

การให้อากาศโดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 120 ตัวอย่างนำมาวิเคราะห์การเจริญโดยการวัดค่า OD_{590} และนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ วัดค่าพีเอชพร้อมทั้งเก็บตัวอย่างเพื่อทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกตะกอนเซลล์ที่ 10,000 รอบต่อนาทีนาน 5 นาที และเก็บส่วนใสแล้วแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด ปริมาณเอทานอล และกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนส

3.12 สถิติและ จลนพลศาสตร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ผล

3.12.1 การวิเคราะห์ทางสถิติด้วยโปรแกรม The SAS system for windows v9.0

การวิเคราะห์ทางสถิติจะใช้โปรแกรมทางสถิติ The SAS system for windows v9.0 วิเคราะห์โดยใช้ วิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

3.12.2 จลนพลศาสตร์ที่ใช้เพื่อวิเคราะห์ผล

จลนพลศาสตร์ที่ใช้เพื่อวิเคราะห์ผลในงานวิจัยคือ

(1) หาอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) คือ ค่าความชันที่ได้จากสมการเส้นตรงจากกราฟระหว่างแกน x คือ เวลา และ แกน y คือ lnx

(2) growth yield $(Yx/s) = (x_{max} - x_0)/(s_0-s_t)$

(3) product yield $(Yp/s) = (p_{max} - p_0)/(s_0-s_t)$

(4) product yield $(Yp/x) = (p_{max} - p_0)/(x_t-x_0)$

(5) หาค่า biomass doubling time (t_d) ซึ่ง $td = \ln 2/\mu$

(6) หาค่า $q_s = \mu/(Yx/s)$

(7) หาค่า q_p $Yp/x.\mu$

(8) หาค่า maximum specific growth rate (μ_{max}) คือค่าความชันที่ได้จากกราฟระหว่างแกน x คือ $1/\mu$ และแกน y คือ 1/s

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 องค์ประกอบในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

ตารางที่ 4.1 องค์ประกอบภายในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

องค์ประกอบ	ปริมาณ	วิธีวิเคราะห์
น้ำตาลทั้งหมด	321.27 กรัมต่อลิตร	Phenol-sulfuric acid method
ไนโตรเจนทั้งหมด*	29,030.40 มิลลิกรัมต่อลิตร	Kjeldahl method
ฟีนอลลิกทั้งหมด**	0.299 กรัมต่อลิตร	Folin-ciocalteau method
ความชื้น**	ร้อยละ 82.1	อบในตู้ oven ที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส
พีเอช	5.45	pH meter

หมายเหตุ: *ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่ศูนย์วิเคราะห์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี

** ส่งตัวอย่างวิเคราะห์ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

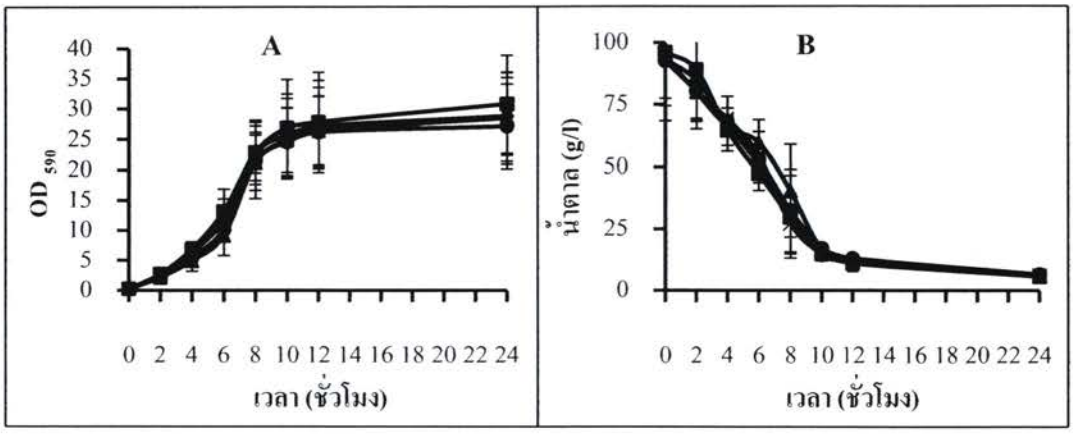
เมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันพบว่าในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 321.27 กรัมต่อลิตร ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 29,030.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณฟีนอลลิกทั้งหมด 0.299 กรัมต่อลิตร มีความชื้นร้อยละ 82.1 และพีเอชเท่ากับ 5.45 (ตารางที่ 4.1)

4.2 ผลการคัดเลือกยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

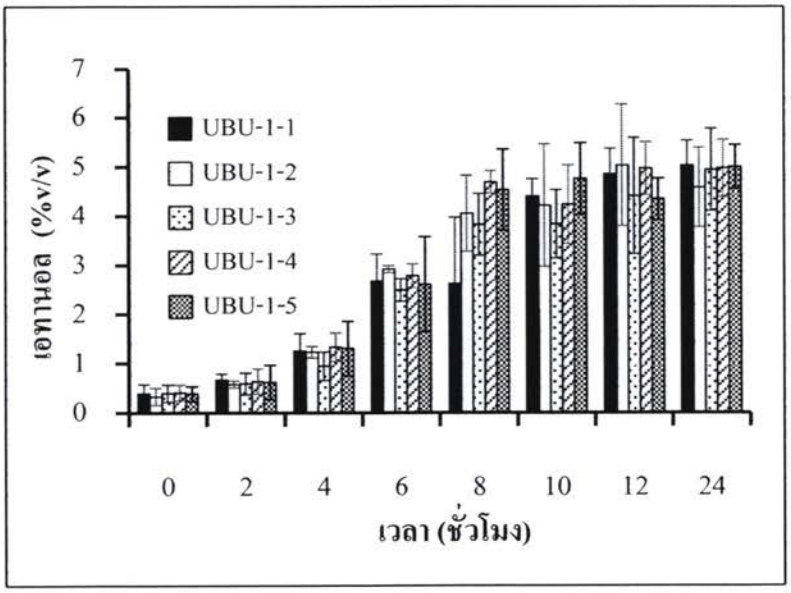
เพื่อคัดเลือกยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ UBU ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันจำนวนสองสายพันธุ์จากทั้งหมด 10 สายพันธุ์ โดยทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีการปรับน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 100 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร บ่มเขย่าที่ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยแบ่งยีสต์ออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ประกอบด้วยสายพันธุ์ UBU-1-1, UBU-1-2, UBU-1-3, UBU-1-4 และUBU-1-5 กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยสายพันธุ์UBU-1-6, UBU-1-7, UBU-1-8, UBU-1-9 และ UBU-1-10

จากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่ 1 ยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์มีแนวโน้มการเจริญ โดยการวัดค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 590 นาโนเมตร (OD_{590}) เป็นไปในแนวเดียวกัน คือ 2 ชั่วโมงแรกยีสต์ไม่มีการเจริญและเจริญอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 4 จนถึงชั่วโมงที่ 8 (ระยะ exponential phase) หลังจากนั้นการเจริญคงที่ (ระยะ stationary phase) ซึ่งพบว่าทุกสายพันธุ์มีการเจริญเท่ากันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p > 0.05$) (ภาพที่ 4.1A) ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกเป็นระยะที่เซลล์มีการปรับตัวเข้ากับน้ำคั้นหัวแก่นตะวันเนื่องจากก่อนหน้านั้นได้เพาะเลี้ยงเซลล์ในอาหาร YPD การเจริญจึงเป็นไปอย่างช้าๆ

เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลของยีสต์พบว่าทุกสายพันธุ์มีการใช้น้ำตาลไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วหลังจากเริ่มกระบวนการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 10 หลังจากนั้นอัตราการใช้น้ำตาลของยีสต์ทั้งหมดช้าลงและคงที่เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก ที่ 24 ชั่วโมงมีน้ำตาลคงเหลือเฉลี่ย 6.23±0.37 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีการใช้น้ำตาลเฉลี่ยเท่ากับร้อยละ 93.07 (ภาพที่ 4.1B) นอกจากนั้นเมื่อพิจารณาปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักพบว่ามีแนวโน้มในทิศทางเดียวกับกับการเจริญซึ่งมีการเพิ่มขึ้นของเอทานอลอย่างรวดเร็วที่ชั่วโมงที่ 4 จนถึงชั่วโมงที่ 8 หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลเริ่มคงที่ ซึ่งทุกสายพันธุ์มีการผลิตเอทานอลไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ซึ่งผลิตได้อยู่ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 4.94-5.03 โดยปริมาตร เมื่อคิดเป็นค่า Yield (p/s) อยู่ในช่วง 0.42-0.44 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล (ภาพที่ 4.2 และตารางที่ 4.2)



ภาพที่ 4.1 การเจริญ (A) การใช้น้ำตาล (B) ของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-1 (■) UBU-1-2 (▲) UBU-1-3 (♦) UBU-1-4 และ (×) UBU-1-5 ที่เวลาต่างๆ เมื่อถูกเลี้ยงในน้ำคั้นแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที

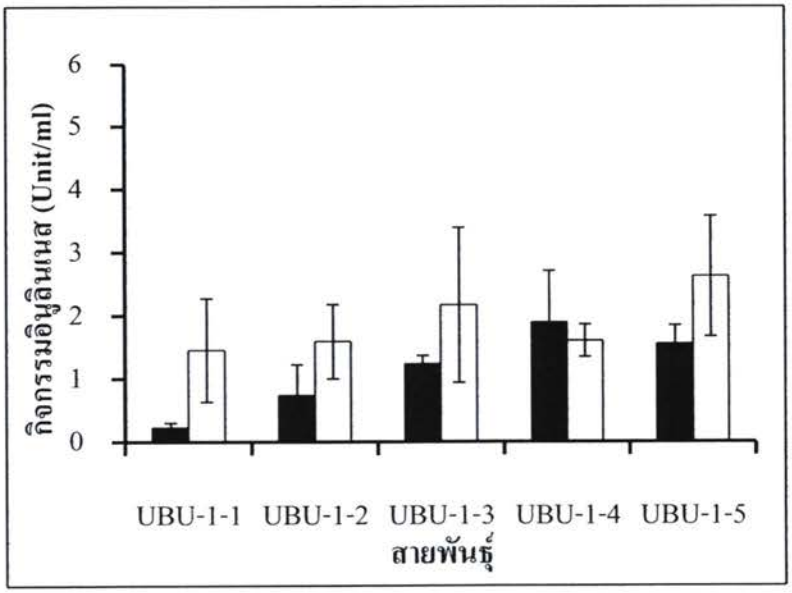


ภาพที่ 4.2 ปริมาณการผลิตเอทานอลที่เวลาต่างๆของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU เมื่อถูกเลี้ยงในน้ำคั้นแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที

ตารางที่ 4.2 ผลการหมักเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU (กลุ่มที่ 1)

สายพันธุ์	เอทานอลสูงสุด (ร้อยละโดยปริมาตร)	Yield (p/s) (กรัม/กรัม)	น้ำตาลคงเหลือ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
UBU-1-1	5.03±0.50 ^{A}(24 ชม.)	0.44±0.10 ^{A}	6.59±1.65 ^{A}	92.48±3.01 ^{A}
UBU-1-2	5.03±1.24 ^{A} (12 ชม.)	0.44±0.17 ^{A}	5.61±0.86 ^{A}	93.86±2.03 ^{A}
UBU-1-3	4.94±0.84 ^{A} (24 ชม.)	0.42±0.18 ^{A}	6.26±0.37 ^{A}	92.99±2.00 ^{A}
UBU-1-4	4.97±0.58 ^{A} (24 ชม.)	0.43±0.10 ^{A}	6.36±0.82 ^{A}	93.02±1.66 ^{A}
UBU-1-5	5.00±0.44 ^{A} (24 ชม.)	0.44±0.03 ^{A}	6.34±0.54 ^{A}	93.01±1.43 ^{A}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนส ที่เวลา 6 (■) และ12 (□) ชั่วโมงของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที

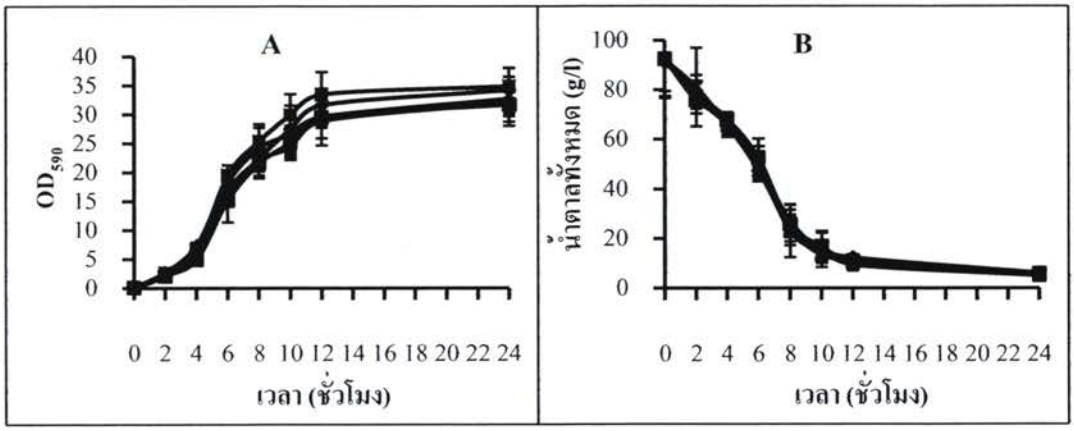
ตารางที่ 4.3 กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU (กลุ่มที่1)

เวลา (ชั่วโมง)	UBU-1-1	UBU-1-2	UBU-1-3	UBU-1-4	UBU-1-5
6	0.26 ± 0.08^{D}	0.73 ± 0.50^{CD}	1.24 ± 0.14^{BC}	1.9 ± 0.82^{AB}	1.55 ± 0.30^{AB}
12	1.46 ± 0.83^{BC}	1.59 ± 0.59^{B}	2.17 ± 1.23^{AB}	1.61 ± 0.26^{AB}	2.62 ± 0.95^{A}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

จากการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสพบว่าทุกสายพันธุ์ที่ชั่วโมงที่ 6 มีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำกว่าชั่วโมงที่ 12 ยกเว้นสายพันธุ์ UBU-1-4 โดยสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสสูงที่สุดคือสายพันธุ์ UBU-1-5 มีกิจกรรมของเอนไซม์เท่ากับ 2.62±0.95 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.3 และตารางที่ 4.3)

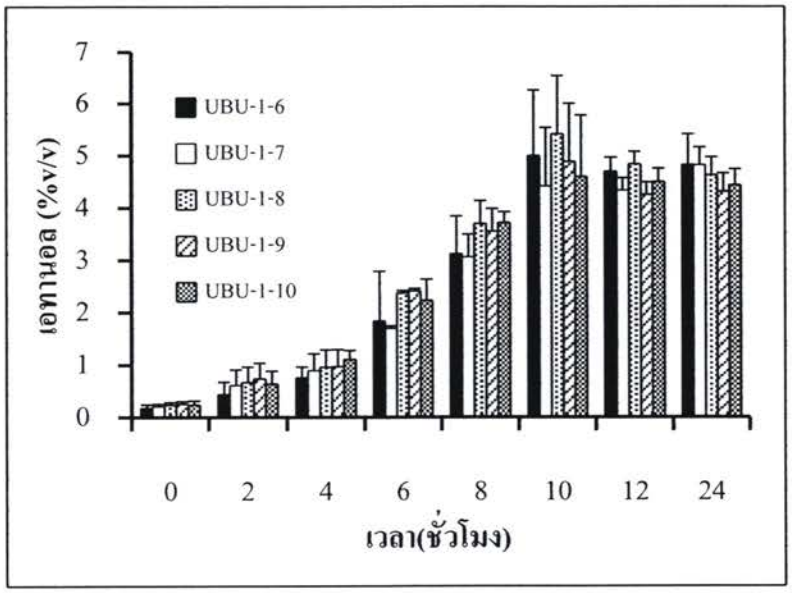
สำหรับผลการทดสอบยีสต์ในกลุ่มที่ 2 พบว่ายีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์มีการเจริญหลังจากเริ่มกระบวนการหมักและจะเจริญอย่างรวดเร็วหรือเข้าสู่ระยะ exponential phase ในช่วงเวลาชั่วโมงที่ 4 ถึงชั่วโมงที่ 10 หลังจากนั้นการเจริญเริ่มคงที่หรือเข้าสู่ระยะ stationary phase โดยทุกสายพันธุ์เจริญได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p>0.05$) (ภาพที่ 4.4A)



ภาพที่ 4.4 การเจริญ (A) การใช้น้ำตาล (B) ของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-6 (●) UBU-1-7 (■) UBU-1-8 (▲) UBU-1-9 และ (♦) UBU-1-10 (×) ที่เวลาต่างๆ เมื่อถูกเลี้ยงในน้ำคั้นแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที

เมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลพบว่าสอดคล้องกับการเจริญ ซึ่งเซลล์มีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วหลังจากเริ่มต้นกระบวนการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 10 ซึ่งทุกสายพันธุ์มีแนวโน้มการใช้น้ำตาลไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ซึ่งมีการใช้เฉลี่ยร้อยละ 93.84 (ภาพที่ 4.4B) และเมื่อพิจารณาการผลิตเอทานอลของยีสต์ทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่ามีการผลิตเอทานอลอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 4 ถึงชั่วโมงที่ 10 ทุกสายพันธุ์ผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยผลิตเอทานอลอยู่ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 4.31-4.84 โดยปริมาตร และทุกสายพันธุ์มีค่า Yield (p/s) ไม่แตกต่างกันซึ่งอยู่ในช่วง 0.28-0.43 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล (ภาพที่ 4.5)

ผลการทดสอบความสามารถในการผลิตเอทานอลพบว่าสายพันธุ์ที่จะถูกใช้ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงคือ สายพันธุ์ UBU-1-2 และ สายพันธุ์ UBU-1-8 ซึ่งมีการผลิตเอทานอลความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 5.03±1.24 และ 4.84±0.26 โดยปริมาตร ตามลำดับซึ่งเป็นค่าตัวเลขที่สูงที่สุด



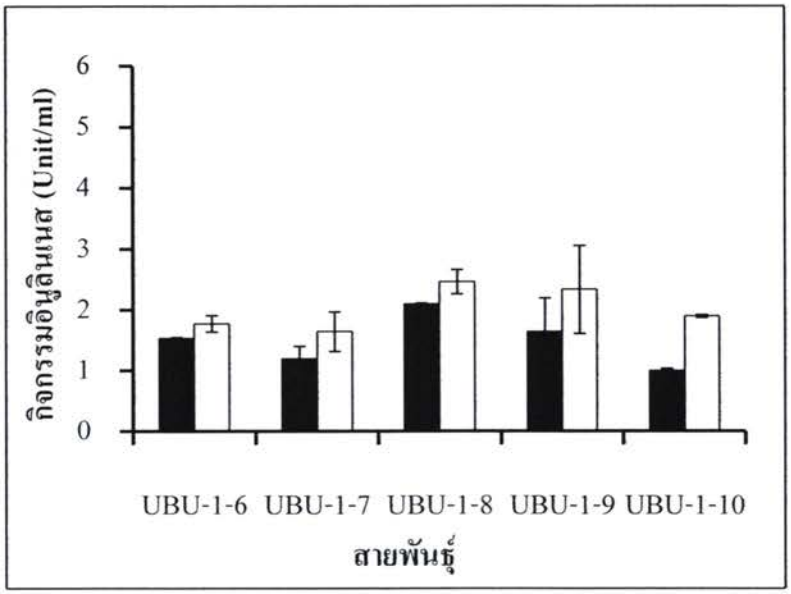
ภาพที่ 4.5 ปริมาณการผลิตเอทานอลที่เวลาต่างๆของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU เมื่อถูกเลี้ยงในน้ำคั้นแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที

ตารางที่ 4.4 ผลการหมักเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU (กลุ่มที่ 2)

สายพันธุ์	เอทานอลสูงสุด (ร้อยละโดยปริมาตร)	Yield (p/s) (กรัม/กรัม)	น้ำตาลคงเหลือ (กรัม/ลิตร)	น้ำตาลที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
UBU-1-6	4.83±0.59 ^{A} (24 ชม.)	0.42±0.03 ^{A}	5.13±0.45 ^{A}	94.34±1.18 ^{A}
UBU-1-7	4.82±0.30 ^{A} (24 ชม.)	0.43±0.07 ^{A}	5.82±0.33 ^{A}	93.57±1.32 ^{A}
UBU-1-8	4.84±0.26 ^{A} (24 ชม.)	0.42±0.09 ^{A}	5.18±0.57 ^{A}	94.28±1.40 ^{A}
UBU-1-9	4.31±0.29 ^{A} (24 ชม.)	0.31±0.25 ^{A}	6.14±1.13 ^{A}	93.22±1.31 ^{A}
UBU-1-10	4.60±1.18 ^{A} (24 ชม.)	0.28±0.07 ^{A}	5.33±0.69 ^{A}	93.77±1.40 ^{A}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ทั้ง 5 สายพันธุ์ชั่วโมงที่ 6 ต่ำกว่าชั่วโมงที่ 12 โดยพบว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 และ UBU-1-9 มีกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสไม่แตกต่างกันซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์อื่นๆ เท่ากับ 2.46±0.02 และ2.33±0.72 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับที่ชั่วโมงที่ 12 (ภาพที่ 4.6 และตารางที่ 4.5)



ภาพที่ 4.6 กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนส ที่เวลา 6 (■) และ12 (□)ชั่วโมงยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ในระหว่างการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น100 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที

ตารางที่ 4.5 กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU (กลุ่มที่ 2)

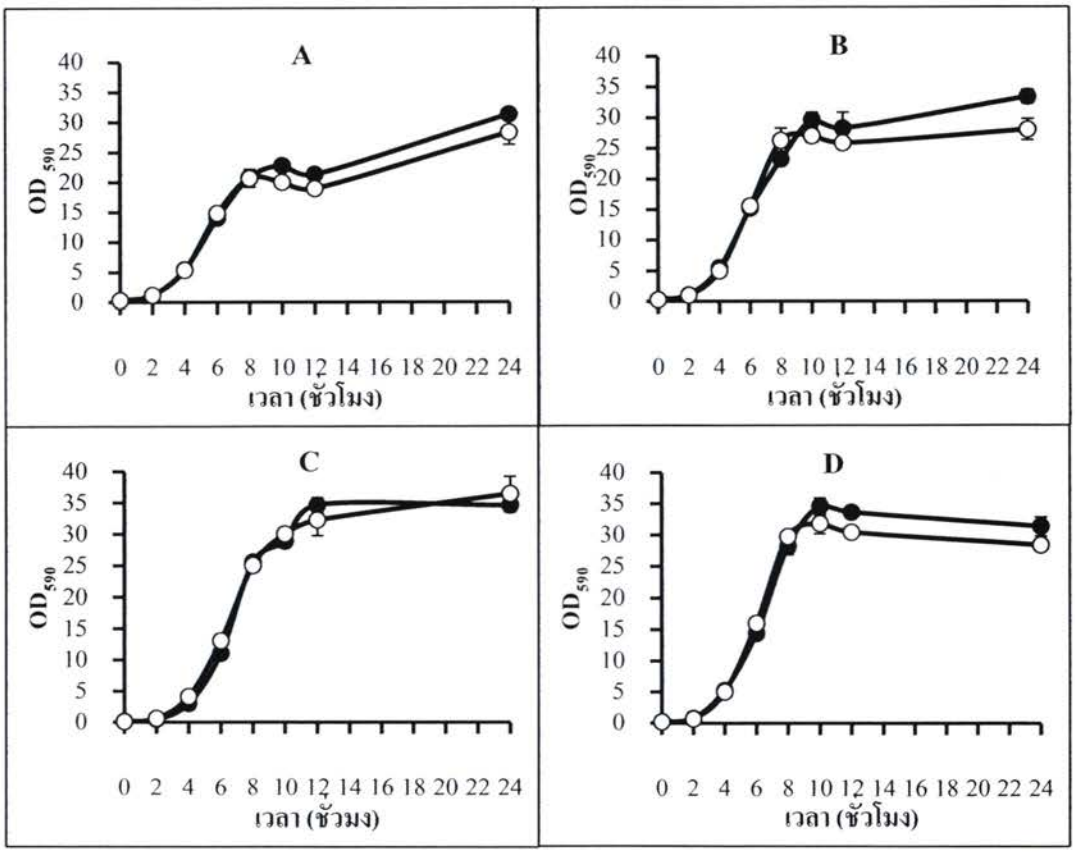
เวลา(ชั่วโมง)	UBU-1-6	UBU-1-7	UBU-1-8	UBU-1-9	UBU-1-10
6	1.54 ± 0.02^{CD}	1.20 ± 0.21^{EF}	2.10 ± 0.02^{AB}	1.64 ± 0.55^{ED}	0.99 ± 0.04^{F}
12	$1.78\pm0.13B^{CD}$	1.65 ± 0.33^{CDE}	2.46 ± 0.02^{A}	2.33 ± 0.72^{AB}	1.89 ± 0.02^{ABC}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3 อิทธิพลของปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอล

4.3.1 อิทธิพลน้ำตาลเริ่มต้นต่อการเจริญของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8

หลังจากขั้นตอนการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงพบว่า *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 คือสายพันธุ์ที่ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป จากการทดสอบอิทธิพลของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-1-8 ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้นแตกต่างกันคือ 50, 100, 150 และ200 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.7 การเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 50 (A) 100 (B) 150 (C) และ 200 (D) กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากผลการเจริญจากค่า OD_{590} พบว่าที่น้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร เซลล์ยีสต์เจริญเข้าสู่ระยะ exponential phase หลังจากชั่วโมงที่ 2 จนถึงชั่วโมงที่ 8 ของการหมักหลังจากนั้นการเจริญมีการลดลงเล็กน้อยในชั่วโมงที่ 10 และเพิ่มขึ้นอีกครั้งจนถึงชั่วโมงที่ 24 ในทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่ง 8 ชั่วโมงแรกของการหมักนั้นทั้ง 2 สายพันธุ์เจริญเท่ากัน ($p>0.05$) แต่หลังจากนั้น สายพันธุ์ UBU-1-2 เจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 โดยสายพันธุ์ UBU-1-2 วัดค่า OD_{590} สูงสุดเท่ากับ 31.33±0.58 ที่เวลา 24 ชั่วโมง และสายพันธุ์ UBU-1-8 วัดค่า OD_{590} สูงสุดเท่ากับ 28.33±2.08 ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.7A)

เมื่อปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นถูกเพิ่มขึ้นเป็น 100 กรัมต่อลิตร ระยะexponential phase ของสายพันธุ์ UBU-1-2 อยู่ในช่วง ชั่วโมงที่ 2 ถึงชั่วโมงที่ 10 ของการหมัก ซึ่งนานกว่าการหมักที่น้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรในขณะที่สายพันธุ์ UBU-1-8 มีระยะ exponential phase อยู่ในช่วงชั่วโมงที่ 2 ถึงชั่วโมงที่ 8 ของการหมักเช่นเดียวกับการหมักในน้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรแต่ที่น้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร มีการเจริญสูงกว่าที่ 50 กรัมต่อลิตรและพบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 เจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 หลังจากชั่วโมงที่ 10 ของการหมักโดยสายพันธุ์ UBU-1-2 วัดค่า OD_{590} ได้สูงสุดเท่ากับ 33.33±1.15 ที่เวลา 24 ชั่วโมง และสายพันธุ์ UBU-1-8 วัดค่า OD_{590} ได้สูงสุดเท่ากับ 28.00 ±1.73 ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.7B)

เมื่อพิจารณาการเจริญในการหมักที่น้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร พบว่า 2 ชั่วโมงแรกของการหมักเซลล์ยังคงอยู่ในระยะ lag phase หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะ exponential phase ระยะนี้ดำเนินไปจนถึงถึงชั่วโมงที่ 12 ของการหมักในทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งนานกว่าการหมักที่น้ำตาลเริ่มต้น 50 และ 100 กรัมต่อลิตร ก่อนจะเข้าสู่ระยะ stationary phase โดยทั้ง 2 สายพันธุ์เจริญได้ไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาการหมักยกเว้นชั่วโมงที่ 12 ที่สายพันธุ์ UBU-1-2 เจริญได้มากกว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 และการเจริญที่น้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ดีกว่าที่น้ำตาลเริ่มต้น 50 และ100 กรัมต่อลิตร โดยสายพันธุ์ UBU-1-2 วัดค่า OD_{590} ได้สูงสุดเท่ากับ 34.63±1.25 ที่เวลา 12 ชั่วโมง และสายพันธุ์ UBU-1-8 วัดค่า OD_{590} ได้สูงสุดเท่ากับ 36.40 ±2.80 ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.7 C)

เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 200 กรัมต่อลิตร ในเวลา 2 ชั่วโมงแรกของการหมักเซลล์ยังคงอยู่ในระยะ lag phase เช่นเดียวกับการหมักที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้นความเข้มข้นอื่นๆ หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะ exponential phase จนถึงชั่วโมงที่ 10 ของการหมักซึ่งสั้นกว่าการหมักที่น้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร โดยในสายพันธุ์ UBU-1-2 เจริญได้น้อยกว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 ในช่วง 10 ชั่วโมงแรกหลังจากนั้นสายพันธุ์ UBU-1-2 เจริญได้ดีกว่า เมื่อเปรียบเทียบการเจริญกับการหมักที่น้ำตาล 150 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.7 D)

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าการเพิ่มระดับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นจาก 50 ถึง 150 กรัมต่อลิตรทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระดับน้ำตาลขึ้นเป็น 200 กรัมต่อลิตร พบว่าการเจริญใกล้เคียงกับที่ 150 กรัมต่อลิตร

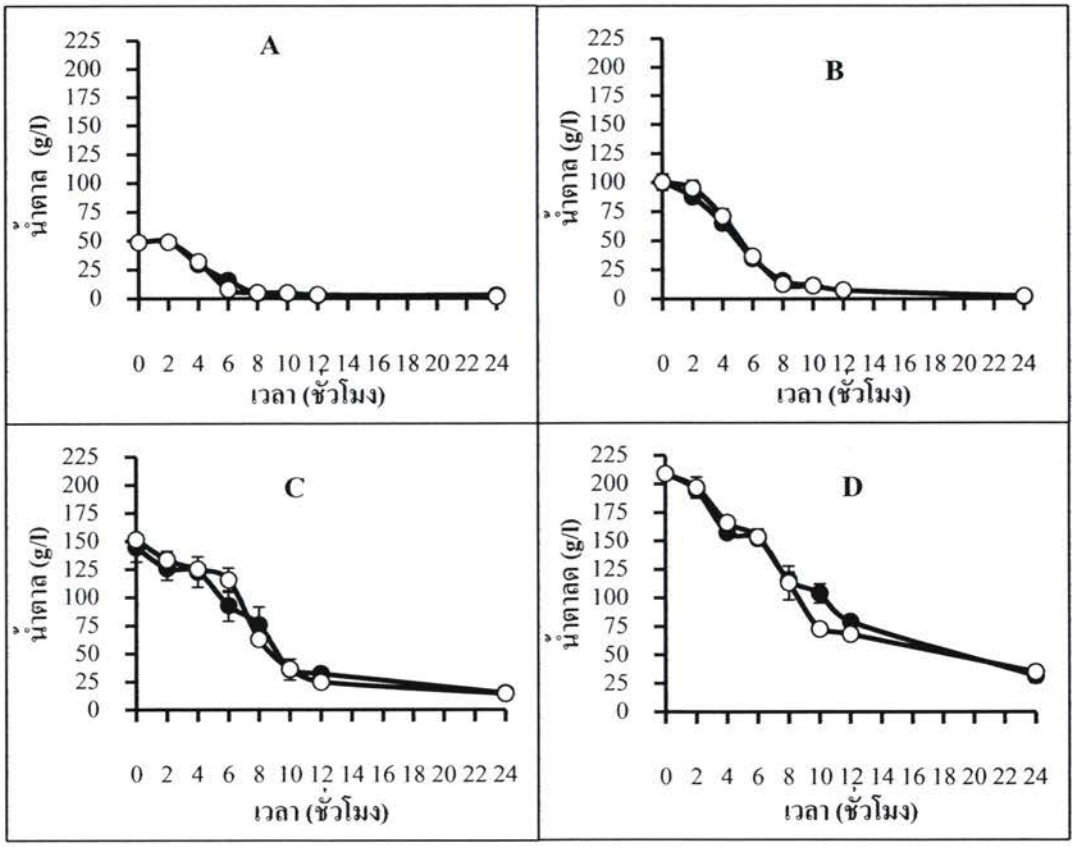
4.3.2 อิทธิพลของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการใช้น้ำตาลระหว่างกระบวนการหมักของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8

จากการหมักยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่น้ำตาลเริ่มต้น 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร พบว่าการหมักที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้น 50 และ100 กรัมต่อลิตรในทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ช่วง 2 ชั่วโมงแรกยังไม่มีการใช้น้ำตาลซึ่งสอดคล้องกับการเจริญ แต่ที่น้ำตาลเริ่มต้น 150 และ200 กรัมต่อลิตรเริ่มมีการใช้น้ำตาลหลังจากเริ่มต้นการหมัก เมื่อพิจารณาที่การหมักแต่ละความเข้มข้นของน้ำตาลเริ่มต้นจะเห็นว่าที่น้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตรยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการใช้น้ำตาลไม่แตกต่างกันซึ่งมีการใช้อย่างรวดเร็วในช่วงระยะเวลาหลังจาก 2 ชั่วโมงแรกของการหมักจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 8 ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญ โดยเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีการใช้น้ำตาลไปทั้งหมดร้อยละ 94.10±0.00 และ 96.68±0.21 ในสายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.8A และ ตารางที่ 4.6)

เมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 100 กรัมต่อลิตรพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีการใช้น้ำตาลไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 2 ถึง ชั่วโมงที่ 8 ของการหมัก หลังจากนั้นมีการใช้น้ำตาลน้อยมากซึ่งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักมีการใช้น้ำตาลเท่ากับร้อยละ 98.25±0.07 และ 97.45± 2.01 ในสายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-1-8 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.8B และตารางที่ 4.6)

ที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตรมีการใช้น้ำตาลหลังจากเริ่มกระบวนการหมักจนถึงชั่วโมงที่ 10 หลังจากนั้นน้ำตาลถูกใช้ช้าลง เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักของสายพันธุ์ UBU-1-2 และ สายพันธุ์ UBU-1-8 ใช้น้ำตาลไปร้อยละ 89.52±1.14 และ 90.56±0.76 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.8C และตารางที่ 4.6)

ที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตรพบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการใช้น้ำตาลอย่างต่อเนื่องหลังจากเริ่มต้นการหมัก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 24 ชั่วโมงสายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 มีการใช้น้ำตาลเท่ากับร้อยละ 84.93±2.81 และ 83.27±2.14 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.8 D และตารางที่ 4.5) เนื่องจากมีน้ำตาลคงเหลือที่ 24 ชั่วโมงค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลคงเหลือในการหมักโดยใช้น้ำตาลเริ่มต้นความเข้มข้นอื่นๆ หากเพิ่มระยะเวลาของการหมักน่าจะช่วยให้เซลล์ยีสต์มีการใช้น้ำตาลและผลิตเอทานอลได้เพิ่มขึ้น



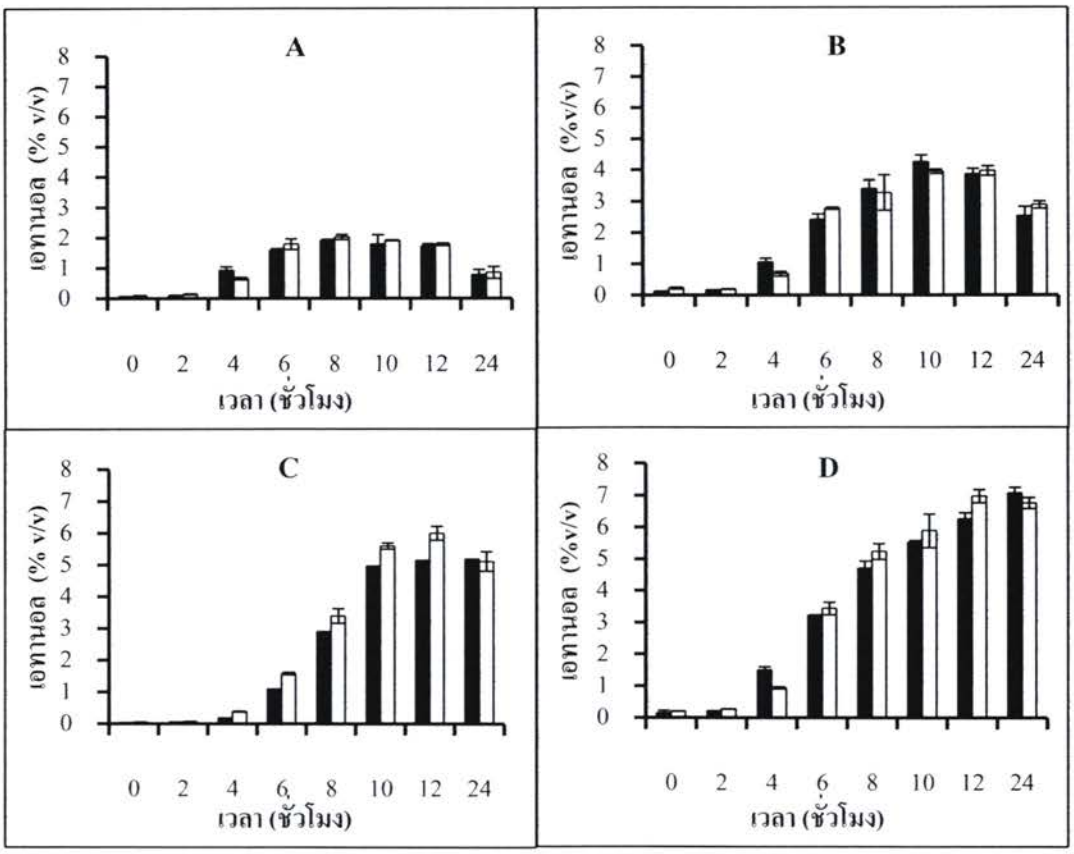
ภาพที่ 4.8 การใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 50 (A) 100 (B) 150 (C) และ 200 (D) กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลพบว่าที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 50 และ100 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลมากกว่าร้อยละ 94 แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 150 และ 200 กรัมต่อลิตร พบว่าการใช้น้ำตาลลดลงเนื่องจากสภาวะที่มีความเข้มข้นน้ำตาลสูงมีผลทำให้การหมักเป็นไปได้ช้าอันเนื่องมาจากแรงดันออสโมซีส (ชุติมา, 2548; อ้างอิงจาก Panchal, 1990)

4.3.3 อิทธิพลของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8

อิทธิพลของความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการหมักเอทานอลเนื่องจากแรงดันออสโมซีสเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลสูงเกินไป เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลภายในเซลล์จะได้รับความเสียหาย จึงมีผลในการยับยั้งปฏิกิริยาต่างๆ ภายในวิถี Embden-Meyerhof-Parnas ซึ่งแรงดันออสโมซีสมีผลทำให้เซลล์ยีสต์ขาดสารอาหารที่

จำเป็นสำหรับการเจริญและการรักษาสภาพของเซลล์ เพราะไปมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะแข็งจึงมีผลกระทบต่อการนำสารอาหารเข้าไปในเซลล์ (ชุติมา, 2548; อ้างอิงจาก Panchal, 1990) จากการทดสอบการหมักเอทานอลในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ระดับน้ำตาลเริ่มต้น 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-1-8 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่าที่น้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร การผลิตเอทานอลเริ่มที่ชั่วโมงที่ 4 ซึ่งชั่วโมงที่ 4 สายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้สูงกว่า UBU-1-8 แต่หลังจากนั้นทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) โดยสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 8 โดยผลิตความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ1.91±0.05 โดยปริมาตร คิดเป็น 0.33±0.02 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ 2.11±0.14 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 8 เช่นกัน โดยผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 2.04±0.08 โดยปริมาตร คิดเป็น 0.36±0.02 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลและ 2.22±0.23 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ (ภาพที่ 4.9 A และตารางที่ 4.6)



ภาพที่ 4.9 ปริมาณเอทานอลจากการหมัก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และ UBU-1-8 (□) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 50 (A) 100 (B) 150 (C) และ 200 (D) กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

เมื่อเพิ่มระดับน้ำตาลเริ่มต้นเป็น 100 กรัมต่อลิตรพบว่ามีการผลิตเอทานอลที่ชั่วโมงที่ 4 เช่นเดียวกับที่น้ำตาลเริ่มต้น 50 กรัมต่อลิตร ในสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 4.27±0.21 โดยปริมาตร คิดเป็น 0.38±0.02 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ 3.33±0.28 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ที่ชั่วโมงที่ 10 ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 3.98±0.16 โดยปริมาตร คิดเป็น 0.33±0.02 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ 3.48±0.21 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.9 B และตารางที่ 4.6)

เมื่อพิจารณาผลการหมักเอทานอลที่น้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตรพบว่าเอทานอลเริ่มถูกผลิตที่ชั่วโมงที่ 4 และผลิตได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ในทั้ง 2 สายพันธุ์ สายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 5.19±0.43 โดยปริมาตรคิดเป็น 0.37±0.04 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ 3.44±0.21 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 6.00±0.22 โดยปริมาตรคิดเป็น 0.37±0.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ 4.23±0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ (ภาพที่ 4.9 C และตารางที่ 4.6)

เมื่อระดับน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้นเป็น 200 กรัมต่อลิตร พบว่าการผลิตเอทานอลจะเกิดขึ้นหลังจากชั่วโมงที่ 4 และสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตได้สูงสุดเข้มข้นเท่ากับ 7.08±0.18 โดยปริมาตร ที่ชั่วโมงที่ 24 คิดเป็น 0.31±0.0 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ 5.20±0.24 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ซึ่งปริมาณเอทานอลไม่แตกต่างจากปริมาณเอทานอลสูงสุดที่ผลิตโดยสายพันธุ์ UBU-1-8 ซึ่งผลิตได้ความเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 6.98±0.20 โดยปริมาตร คิดเป็น 0.39±0.00 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ 5.20±0.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ (ภาพที่ 4.9 D และตารางที่ 4.6)

จากผลการทดสอบอิทธิพลของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 แสดงให้เห็นว่าเมื่อระดับน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มสูงขึ้นระยะเวลาของการหมักนานขึ้นและปริมาณเอทานอลก็เพิ่มขึ้นเช่นกันแต่เมื่อพิจารณาที่ค่า Yield (p/s) พบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 ที่น้ำตาล 100 และ 150 กรัมต่อลิตรมีค่า Yield (p/s) ไม่แตกต่างกันซึ่งสูงกว่าระดับ 50 และ 200 กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่น้ำตาล 150 และ 200 กรัมต่อลิตรมีค่า Yield (p/s) ไม่แตกต่างกันซึ่งสูงกว่าที่ 50 และ 100 กรัมต่อลิตร และจากข้อมูลในตารางที่ 4.4 ยังพบว่าร้อยละของการใช้น้ำตาลของยีสต์ยังลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้นแสดงว่าน้ำตาลเริ่มต้นมีผลต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันของยีสต์ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาที่ค่า Yield (p/x) พบว่าเมื่อน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้น Yield (p/x) เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันดังนั้นในการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นน้ำตาลต่อการหมักเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU อาจจะต้องเพิ่มระดับความเข้มข้นน้ำตาลและระยะเวลาในการหมักมากกว่านี้เพื่อที่จะได้เห็นผลที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น (ตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 เอทานอลสูงสุด yield และน้ำตาลคงเหลือเมื่อหมักน้ำคั้นแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้นตั้งแต่ 50-200 กรัมต่อลิตรโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-18 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์	น้ำตาลเริ่มต้น (กรัม/ลิตร)	เอทานอลสูงสุด (ร้อยละโดยปริมาตร)	Yield (p/s) (กรัม/กรัม)	Yield (x/s) (กรัม/กรัม)	น้ำตาลที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
UBU-1-2	50	1.91 ± 0.05^{E} (8 ชม.)	0.33 ± 0.02^{BC}	2.11 ± 0.14^{D}	94.10 ± 0.07^{B}
	100	4.27 ± 0.21^{D} (10 ชม.)	0.38 ± 0.02^{A}	3.33 ± 0.28^{C}	98.25 ± 0.07^{A}
	150	5.19 ± 0.43^{C} (12 ชม.)	0.37 ± 0.04^{A}	3.44 ± 0.21^{C}	89.52 ± 1.14^{C}
	200	7.08 ± 0.18^{A} (24 ชม.)	0.31 ± 0.0^{C}	5.20 ± 0.24^{A}	84.93 ± 2.81^{D}
UBU-1-8	50	2.04 ± 0.08^{E} (8 ชม.)	0.36 ± 0.02^{AB}	2.22 ± 0.23^{D}	96.68 ± 0.21^{A}
	100	3.98 ± 0.16^{D} (12ชม.)	0.33 ± 0.02^{BC}	3.48 ± 0.21^{C}	97.45 ± 0.20^{A}
	150	6.00 ± 0.22^{B} (12ชม.)	0.37 ± 0.01^{A}	4.23 ± 0.48^{B}	90.56 ± 0.76^{C}
	200	6.98 ± 0.20^{A} (12ชม.)	0.39 ± 0.00^{A}	5.20 ± 0.01^{A}	83.27 ± 2.14^{D}

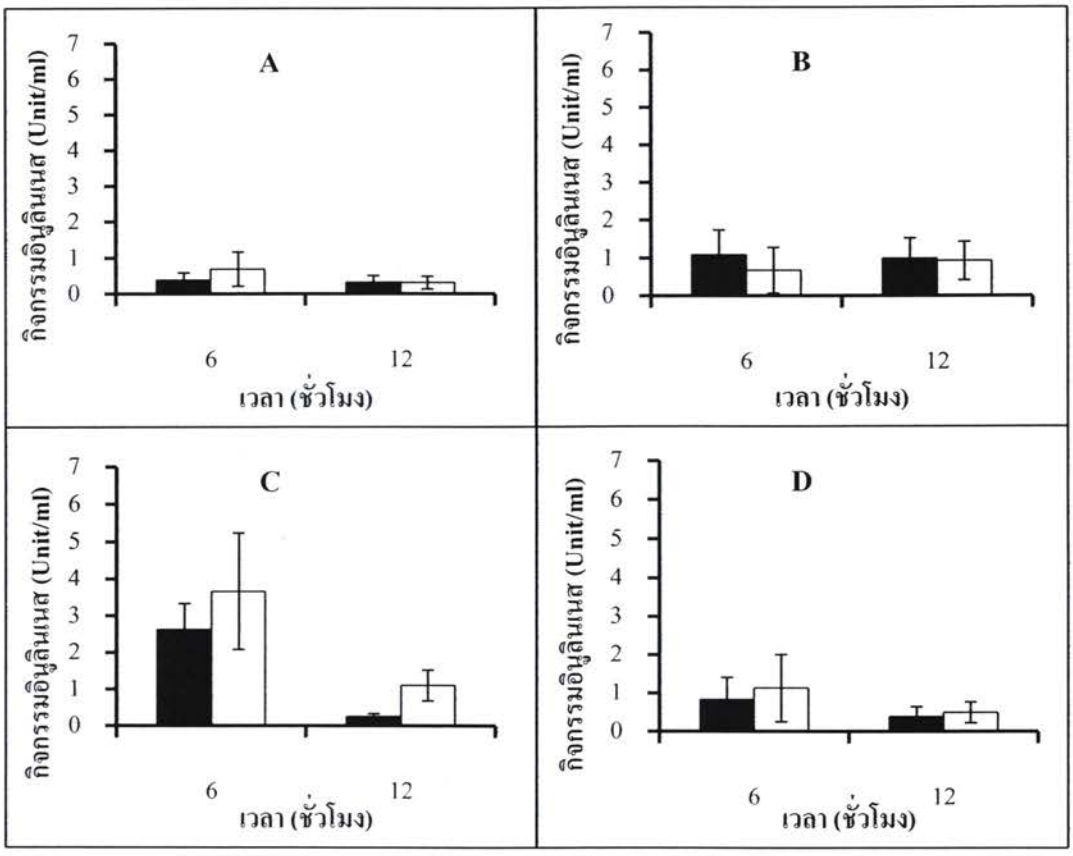
หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ดังนั้นเมื่อพิจารณาการเจริญพบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นจาก 50 เป็น 150 กรัมต่อลิตรทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น แต่เมื่อเพิ่มระดับน้ำตาลขึ้นเป็น 200 กรัมต่อลิตรพบว่าการเจริญใกล้เคียงกับที่ 150 กรัมต่อลิตร และเมื่อพิจารณาการใช้น้ำตาลพบว่าที่น้ำตาลเริ่มต้นเริ่มต้น 50 และ100 กรัมต่อลิตรมีการใช้น้ำตาลมากกว่าร้อยละ 94 แต่เมื่อเพิ่มน้ำตาลเริ่มต้นมากกว่า 100 กรัมต่อลิตรการใช้น้ำตาลจะลดลง และเมื่อความเข้มข้นน้ำตาลเพิ่มขึ้นการผลิตเอทานอล

เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน แต่ Yield (p/s) สูงสุด ในสายพันธุ์ UBU-1-2 ที่น้ำตาลเริ่มต้น 100 และ150 กรัมต่อลิตร ขณะที่ UBU-1-8 อยู่ที่น้ำตาลเริ่มต้น150 และ200 กรัมต่อลิตร และนอกจากนี้เมื่อน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้นค่า Yield (p/x) ทั้ง 2 สายพันธุ์มีค่าเพิ่มขึ้นเช่นกัน

4.3.4 อิทธิพลของน้ำตาลเริ่มต้นต่อกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8

จากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสพบว่าที่เวลาชั่วโมงที่ 6 และ 12 ของการหมักของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ มีกิจกรรมอินูลินเนสไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ในทุกระดับน้ำตาลเริ่มต้น ยกเว้นที่ 150 กรัมต่อลิตรซึ่งที่เวลา 6 ชั่วโมงมีกิจกรรมสูงกว่าที่ 12 ชั่วโมงซึ่งที่เวลา 6 ชั่วโมงมีกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสสูงที่สุดเท่ากับ 2.62±0.71 และ 3.65±1.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในสายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.10 และตารางที่ 4.7)



ภาพที่ 4.10 กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสจากการหมัก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และ UBU-1-8 (□) ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร (A) 100 กรัมต่อลิตร (B) 150 กรัมต่อลิตร (C) และ 200 กรัมต่อลิตร (D)

ตารางที่ 4.7 กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 UBU-1-8 ในการหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นแตกต่างกันที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์	น้ำตาลเริ่มต้น (กรัมต่อลิตร)	เวลา (ชั่วโมง)	
		6	12
UBU-1-2	50	0.39 ± 0.22^{C}	0.33 ± 0.19^{C}
	100	1.09 ± 0.64^{C}	0.99 ± 0.54^{C}
	150	2.62 ± 0.71^{B}	0.26 ± 0.07^{C}
	200	0.83 ± 0.58^{C}	0.38 ± 0.26^{C}
UBU-1-8	50	0.70 ± 0.48^{C}	0.32 ± 0.18^{C}
	100	0.68 ± 0.61^{C}	0.93 ± 0.51^{C}
	150	3.65 ± 1.58^{A}	1.10 ± 0.42^{C}
	200	1.13 ± 0.88^{C}	0.50 ± 0.27^{C}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

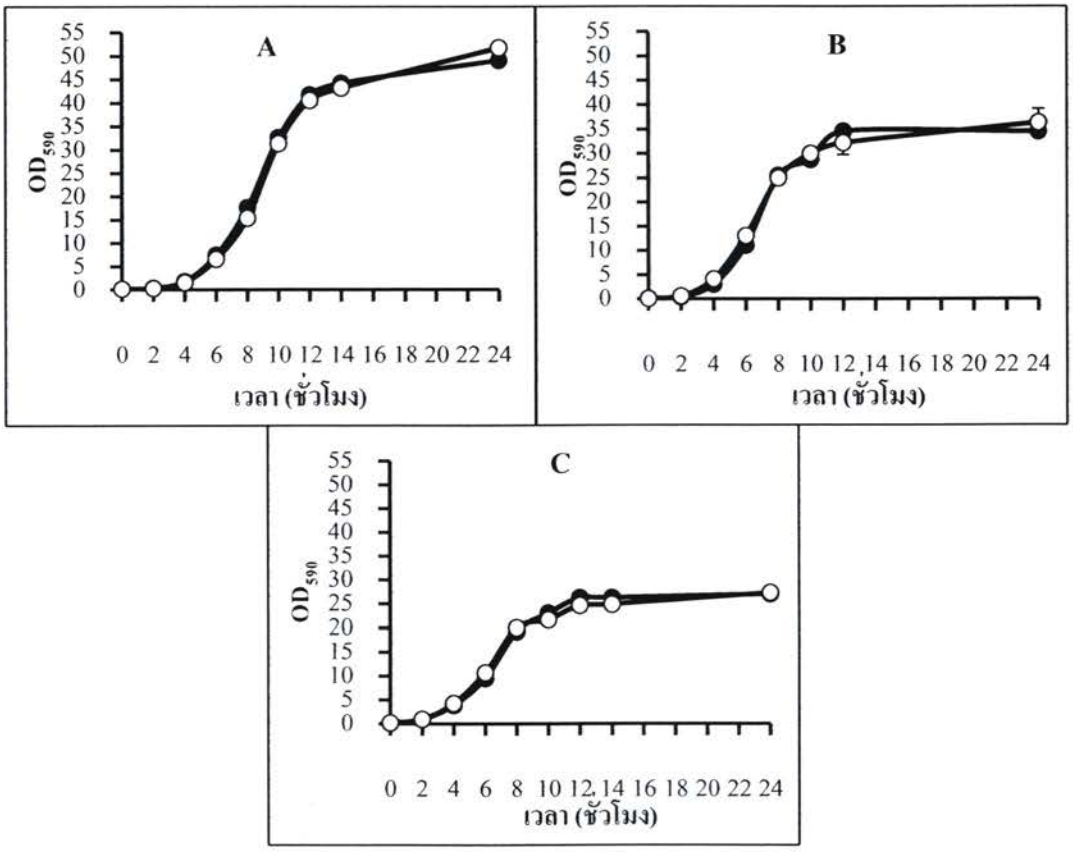
4.4 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอล

อุณหภูมิเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่สำคัญที่มีผลต่อการหมักเอทานอล จากผลการทดสอบอิทธิพลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 ซึ่งได้ทดสอบที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 3 ระดับ คืออุณหภูมิ 35, 40 และ 45 องศาเซลเซียสโดยใช้น้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ผลการทดลองได้ผลดังต่อไปนี้

4.4.1 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

จากผลการทดลองพบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเจริญไม่แตกต่างกันโดยสองชั่วโมงแรกยังไม่มีการเจริญหรือยังอยู่ในระยะปรับตัวเข้ากับน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน (ระยะ lag phase) ของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ซึ่งเริ่มมีการเจริญตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 จนถึงชั่วโมง

ที่ 12 ของการหมักจากนั้นยังคงมีการเจริญอย่างต่อเนื่องแต่อัตราการเจริญถือว่าน้อยกว่าช่วง 4 ถึง 12 ชั่วโมงของการหมัก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 24 ชั่วโมงพบว่าให้ค่า OD_{590} สูงสุดโดยสายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 มีค่า OD_{590} เท่ากับ 49.07±0.92 และ 51.73±0.92 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.11 A)

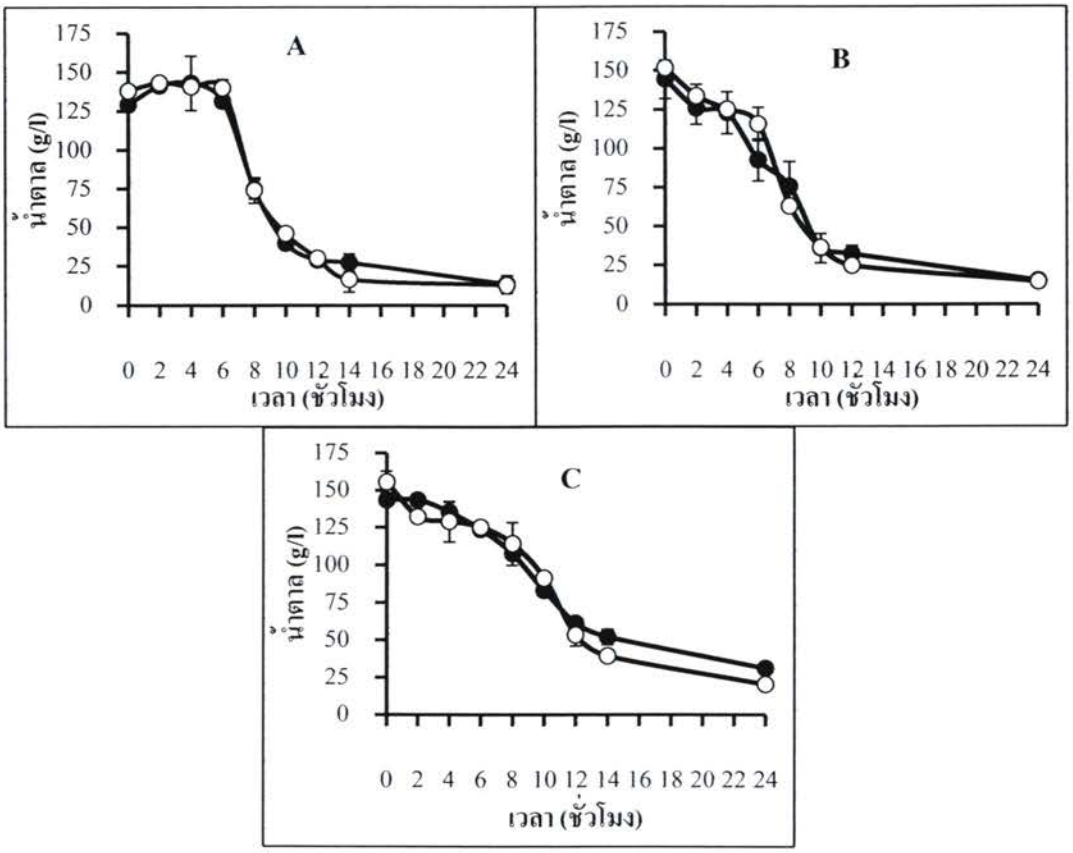


ภาพที่ 4.11 การเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 (A) 40 (B) และ45 (C) องศาเซลเซียส

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิการหมักเป็น 40 องศาเซลเซียสพบว่าการเจริญลดลงเมื่อเทียบกับที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งระยะ 2 ชั่วโมงแรกยังคงอยู่ในระยะ lag phase และเริ่มมีการเจริญตั้งแต่ชั่วโมงที่ 4 ของการหมักละเจริญอย่างรวดเร็ว (ระยะ exponential phase) จนถึงชั่วโมงที่ 10 ซึ่งจะเห็นว่าระยะ exponential phase สั้นกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งค่า OD_{590} สูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมงในสายพันธุ์ UBU-1-2 วัดได้ 34.60±2.57 ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 มีค่า OD_{590} สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมงซึ่งวัดได้ 36.40±1.73 (ภาพที่ 4.11 B)

เมื่ออุณหภูมิการหมักเพิ่มเป็น 45 องศาเซลเซียส พบว่าที่เวลาสองชั่วโมงแรกของการหมักยังคงอยู่ในระยะ lag phase ซึ่งหลังจากนั้นการเจริญของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เข้าสู่ระยะ exponential phase จนถึงชั่วโมงที่ 12 ของการหมักจากนั้นเข้าสู่ระยะ stationary phase เมื่อเปรียบเทียบการเจริญกับอุณหภูมิของการหมักที่ 35 และ40 องศาเซลเซียสพบว่าที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมีการเจริญน้อยกว่าซึ่งสายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่า OD_{590} สูงสุดเท่ากับ 26.93±0.92 ที่เวลา 24 ชั่วโมง และสายพันธุ์ UBU-1-8 มีค่า OD_{590} สูงสุดเท่ากับ 27.20±0.00 ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.11 C) จากผลการทดลองสรุปได้ว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นส่งผลทำให้การเจริญลดลง

4.4.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการใช้น้ำตาลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน



ภาพที่4.12 การใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○)ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 (A) 40 (B) และ 45 (C) องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสพบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการใช้น้ำตาลน้อยมากที่ 6 ชั่วโมงแรกหลังจากนั้นมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 14 ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่เวลา 24 ชั่วโมง สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 มีการใช้น้ำตาลไปร้อยละ 89.82±4.16 และ 90.85±1.11 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.12 A และตารางที่ 4.8)

ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีอัตราการใช้น้ำตาลไม่แตกต่างกันยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์เริ่มมีการใช้น้ำตาลหลังจากเริ่มกระบวนการหมักและใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 10 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่เวลา 24 ชั่วโมง สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ใช้น้ำตาลร้อยละ 92.79±0.31 และ 90.39±0.32 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.12 Bและตารางที่ 4.7) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์เริ่มมีการใช้น้ำตาลหลังจากเริ่มการหมักจนกระทั่งสิ้นสุดการหมักที่เวลา 24 ชั่วโมง ในสายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ใช้น้ำตาลไปร้อยละ 78.35±1.28 และ 87.05±1.10 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.12 C และตารางที่ 4.8)

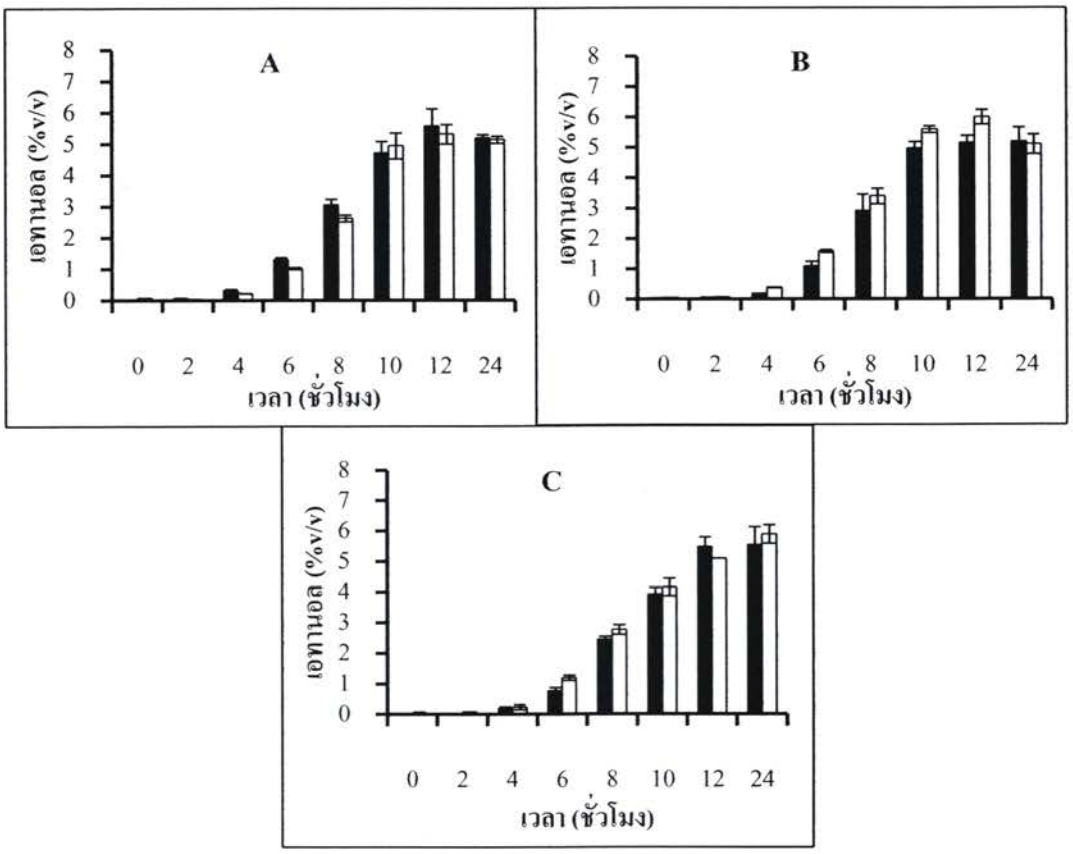
ที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียสยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์มีการใช้น้ำตาลใกล้เคียงกันแต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 45 องศาเซลเซียสพบว่ามีการใช้น้ำตาลลดลง

4.4.3 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

จากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่น้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35, 40 และ45 องศาเซลเซียสพบว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสยีสต์ทั้งสองสายพันธุ์ผลิตเอทานอลไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ซึ่ง 4 ชั่วโมงแรกของการหมักยังไม่มีการผลิตเอทานอลโดยจะเริ่มมีการผลิตเอทานอลตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ซึ่งสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลสูงสุดเข้มข้นร้อยละ 5.57±0.56 โดยปริมาตร ซึ่งคิดเป็น Yield (p/s) 0.39±0.05 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และคิดเป็น Yield (p/x) เท่ากับ 3.06±0.34 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลสูงสุดเข้มข้นร้อยละ 5.31±0.31 โดยปริมาตร ซึ่งคิดเป็น Yield (p/s) 0.36±0.01กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และคิดเป็น Yield (p/x) เท่ากับ 2.96±0.03 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ผลิตเอทานอลสูงสุดที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.13 A และตารางที่ 4.8)

เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียสพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์เริ่มมีการผลิตเอทานอลหลังชั่วโมงที่ 4โดยสายพันธุ์ UBU-1-2 สามารถผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่างกับที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยผลิตเอทานอลได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 5.19±0.47 โดยปริมาตรคิดเป็น Yield (p/s) เท่ากับ 0.37±0.03 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และคิดเป็น Yield (p/x) เท่ากับ 3.42±0.28

กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลได้สูงสุด เข้มข้นร้อยละ 6.00±0.24 โดยปริมาตร คิดเป็น Yield (p/s) เท่ากับ 0.37±0.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และคิดเป็น Yield (p/x) เท่ากับ 4.23±0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ที่เวลา 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.13 B และตารางที่ 4.8)



ภาพที่ 4.13 การผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และ UBU-1-8 (□) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 (A) 40 (B) และ 45 (C) องศาเซลเซียส

ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอทานอลช้ากว่าที่ 40 องศาเซลเซียส แต่เมื่อพิจารณาเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุดพบว่าไม่แตกต่างกันทั้ง 3 อุณหภูมิ ซึ่งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง สายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 5.54±0.58 โดยปริมาตร คิดเป็น Yield (p/s) 0.39±0.05 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และคิดเป็น Yield (p/x) เท่ากับ 5.07±0.65 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลสูงสุด

เข้มข้นร้อยละ 5.88±0.31 โดยปริมาตร คิดเป็น Yield (p/s) 0.34±0.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ คิดเป็น Yield (p/x) เท่ากับ 5.25±0.27 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ (ภาพที่ 4.13 C และตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.8 เอทานอลสูงสุด yield และน้ำตาลคงเหลือเมื่อหมักน้ำคั้นแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้น150 กรัมต่อลิตรโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-18 ที่อุณหภูมิ 35 40 และ 45 องศาเซลเซียส

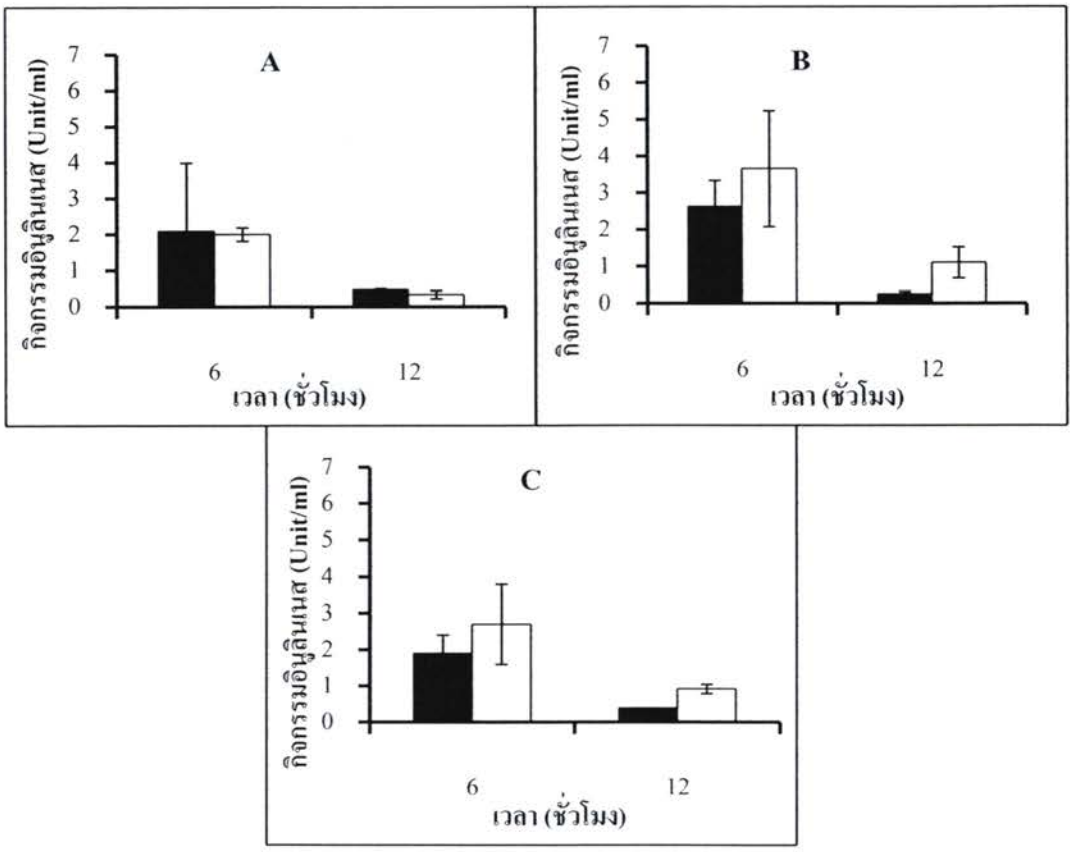
สายพันธุ์	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เอทานอลสูงสุด (ร้อยละโดยปริมาตร)	Yield (p/s) (กรัม/กรัม)	Yield (p/x) (กรัม/กรัม)	น้ำตาลที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
UBU-1-2	35	5.57 ± 0.56^{A} (10 ชม.)	0.39 ± 0.05^{A}	3.06 ± 0.34^{C}	89.82 ± 4.16^{AB}
	40	5.19 ± 0.47^{A} (12 ชม.)	0.37 ± 0.03^{A}	3.42 ± 0.28^{C}	92.79 ± 0.31^{A}
	45	5.54 ± 0.58^{A} (24 ชม.)	0.39 ± 0.05^{A}	5.07 ± 0.65^{A}	78.35 ± 1.28^{C}
UBU-1-8	35	5.31 ± 0.31^{A} (10 ชม.)	0.36 ± 0.01^{A}	2.96 ± 0.03^{C}	90.85 ± 1.11^{A}
	40	6.00 ± 0.24^{A} (12 ชม.)	0.37 ± 0.01^{A}	4.23 ± 0.48^{B}	90.39 ± 0.32^{AB}
	45	5.88 ± 0.31^{A} (24 ชม.)	0.34 ± 0.01^{A}	5.25 ± 0.27^{A}	87.05 ± 1.10^{B}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ดังนั้นจากตารางที่ 4.7 จะเห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญ และการใช้น้ำตาลแต่ไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการเจริญจะน้อยลง ส่วนการใช้น้ำตาลพบว่าเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นเป็น 45 องศาเซลเซียส ปรากฏว่ามีน้ำตาลได้น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 35 และ 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามเอทานอลที่ผลิตได้ที่อุณหภูมิดังกล่าวไม่แตกต่างกันแต่เมื่อพิจารณาที่ค่า Yield (p/x) พบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจะมีค่าเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

4.4.4 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8

K. marxianus ทั้ง 2 สายพันธุ์มีกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสที่เวลา 6 ชั่วโมงสูงกว่าที่ 12 ชั่วโมงในทุกอุณหภูมิ ในสายพันธุ์ UBU-1-2 ที่เวลา 6 ชั่วโมงกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีกิจกรรม 2.62±0.71 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง มีกิจกรรมเอนไซม์สูงสุด 0.47±0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสใกล้เคียงกับอุณหภูมิอื่นๆ ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่เวลา 6 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสสูงสุด 3.65±1.58 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ส่วนที่ 12 ชั่วโมงกิจกรรมสูงสุด 1.10±0.42 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสเช่นเดียวกัน (ภาพที่ 4.14 และตารางที่ 4.9)



ภาพที่ 4.14 กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสจากการหมัก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และ UBU-1-8 (□) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 35 (A) 40 (B) และ 45 (C) องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.9 กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-1-8 ในการหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิแตกต่างกัน

สายพันธุ์	อุณหภูมิ	เวลา (ชั่วโมง)	
		6	12
UBU-1-2	35	2.09 ± 1.91^{BCD}	0.47 ± 0.03^{EFG}
	40	$2.62\pm0.71A^{BC}$	0.26 ± 0.07^{G}
	45	1.90 ± 0.51^{BCDEF}	$0.39\pm0.00F^{G}$
UBU-1-8	35	2.00 ± 0.19^{BCDE}	0.33 ± 0.11^{G}
	40	3.65 ± 1.58^{A}	1.10 ± 0.42^{CDEFG}
	45	$2.70\pm1.10A^{B}$	0.92 ± 0.13^{DEFG}

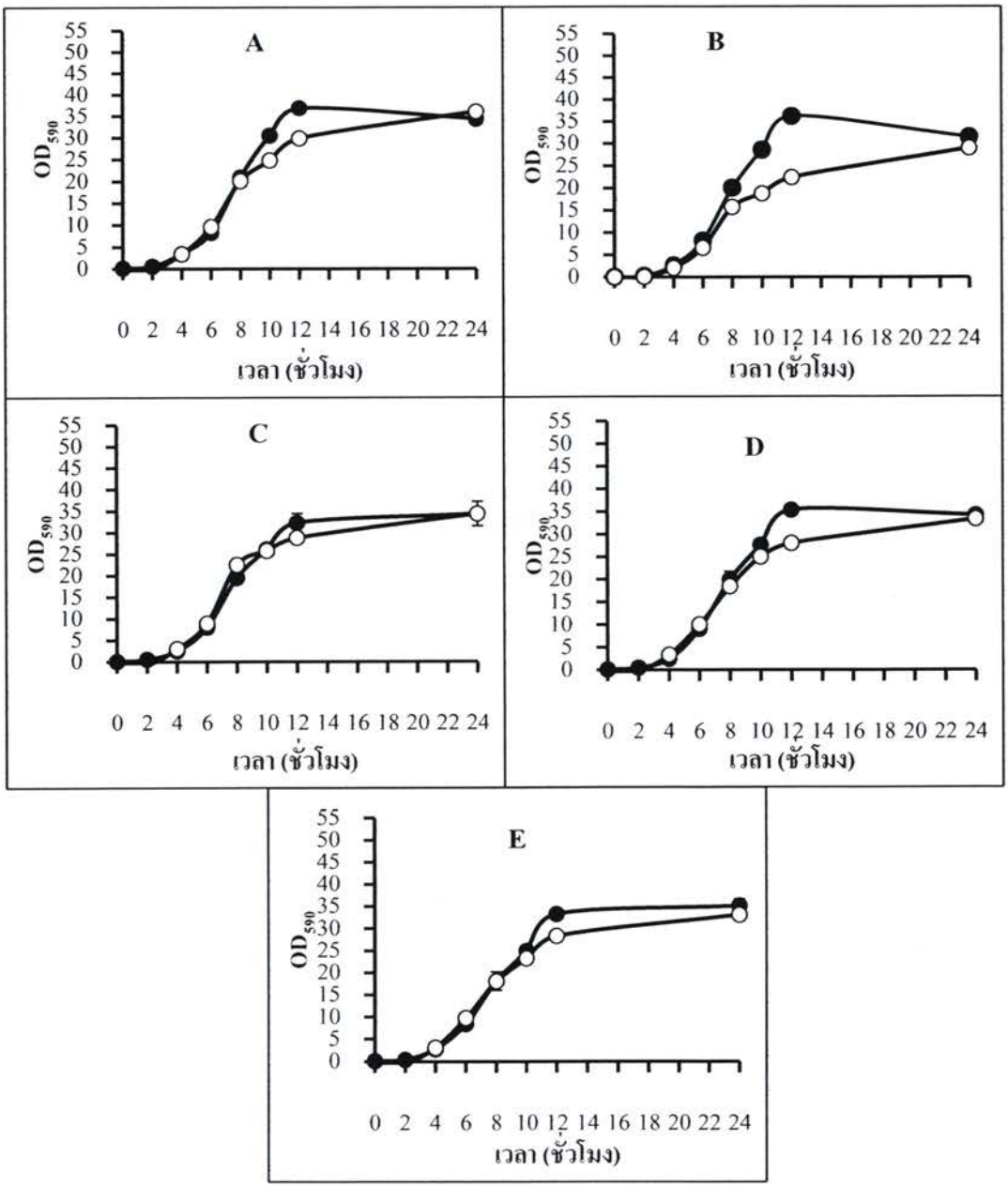
หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.5 อิทธิพลของพีเอชต่อการหมักเอทานอล

จากการทดสอบอิทธิพลของพีเอชต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 โดยน้ำคั้นหัวแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร บ่มเขย่าที่ 40 องศาเซลเซียส 150 รอบต่อนาที พีเอชที่ใช้ทดสอบคือพีเอช 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 โดยเปรียบเทียบกับน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอชเพื่อให้ทราบถึงพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ซึ่งผลการทดลองได้อธิบายแต่ส่วนดังนี้

4.5.1 อิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

จากการทดลองพบว่าที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมงแรกของการหมักยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ยังคงอยู่ในระยะ lag phase หลังจากนั้นเริ่มเจริญและเข้าสู่ระยะ exponential phase จนถึงชั่วโมงที่ 12 ของการหมักโดยเมื่อพิจารณาจากค่า OD_{590} ช่วงเวลา 10 และ 12 ชั่วโมง สายพันธุ์ UBU-1-2 มีแนวโน้มเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 ในทุกพีเอช และจากผลการทดลองที่ชั่วโมงที่ 24 สังเกตได้ว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 การเจริญคงที่แล้วแต่สายพันธุ์ UBU-1-8 ยังเห็นแนวโน้มการเจริญอยู่



ภาพที่ 4.15 การเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่น้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช (A) พีเอช 4.5 (B) พีเอช 5.0 (C) พีเอช 5.5 (D) และ พีเอช 6.0 (E) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ที่พีเอช 4.5 สายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่า OD_{590} สูงสุด 36.17±0.36 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 มีค่า OD_{590} สูงสุด 29.00±0.13 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ที่พีเอช 5.0 สายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่า OD_{590} สูงสุด 34.33±2.84 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 มีค่า OD_{590} สูงสุด 34.33±0.02 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ที่พีเอช5.5 สายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่า OD_{590} สูงสุด 35.33±1.01 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 มีค่า OD_{590} สูงสุด 33.33±0.01 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ที่พีเอช 6.0 สายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่า OD_{590} สูงสุด 35.00±1.53 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 มีค่า OD_{590} สูงสุด 33.00±0.00 ที่เวลา 24 ชั่วโมงเช่นเดียวกัน

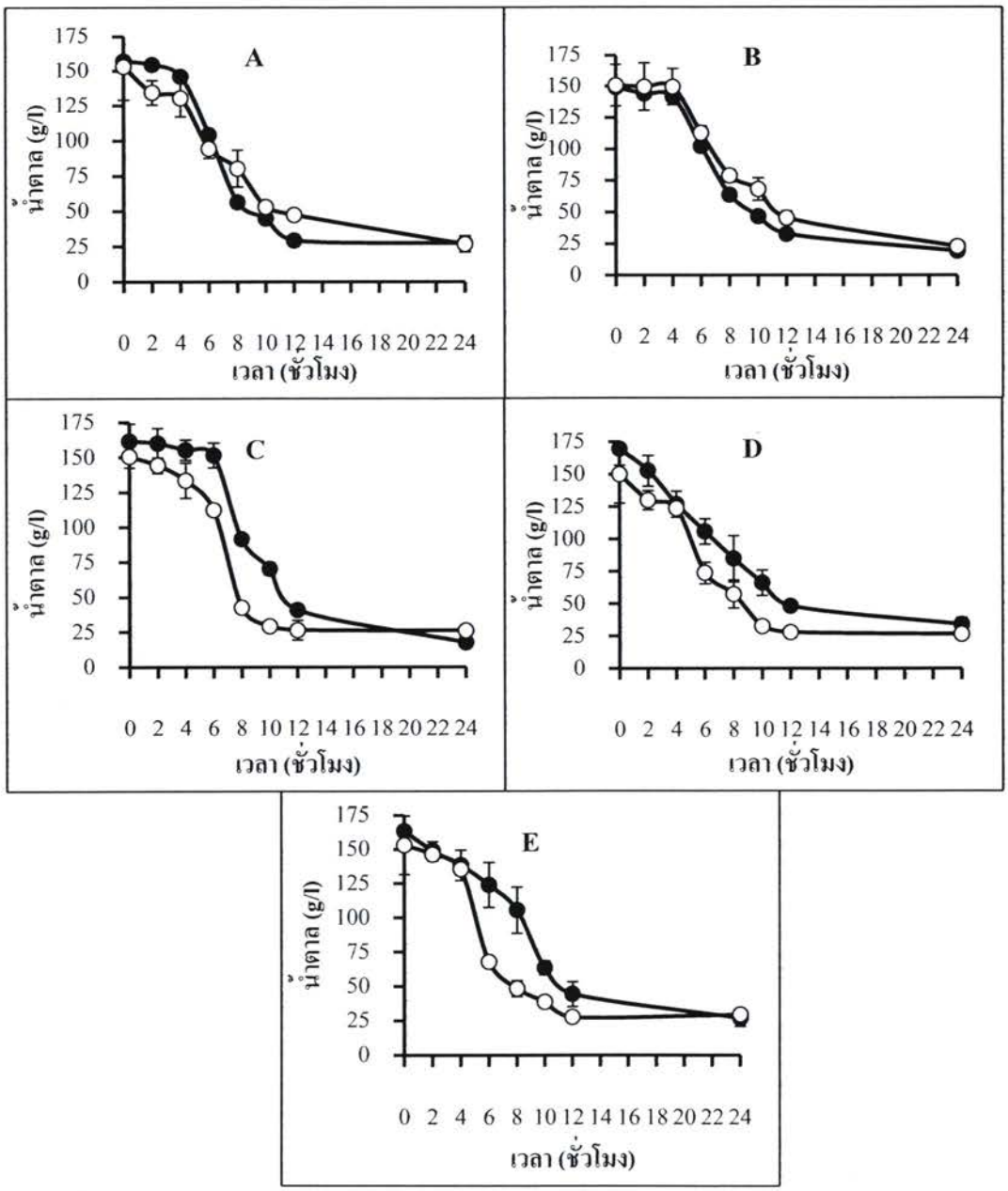
และที่น้ำคั้นหัวแก่นตะวันซึ่งไม่มีการปรับพีเอช (พีเอชเริ่มต้นอยู่ที่ 5.65±0.01 ในสายพันธุ์ UBU-1-2 และ5.56±0.01ในสายพันธุ์ UBU-1-8) พบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่า OD_{590} สูงสุด 36.83±0.36 ที่เวลา 12 ชั่วโมง สายพันธุ์ UBU-1-8 มีค่า OD_{590} สูงสุด 36.00±0.00 ที่เวลา 24 ชั่วโมง จากภาพที่ 4.11 จะเห็นได้ว่าการเจริญที่พีเอชต่างๆ ไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก (ภาพที่ 4.15)

4.5.2 อิทธิพลของพีเอชต่อการใช้น้ำตาลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ สายพันธุ์ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

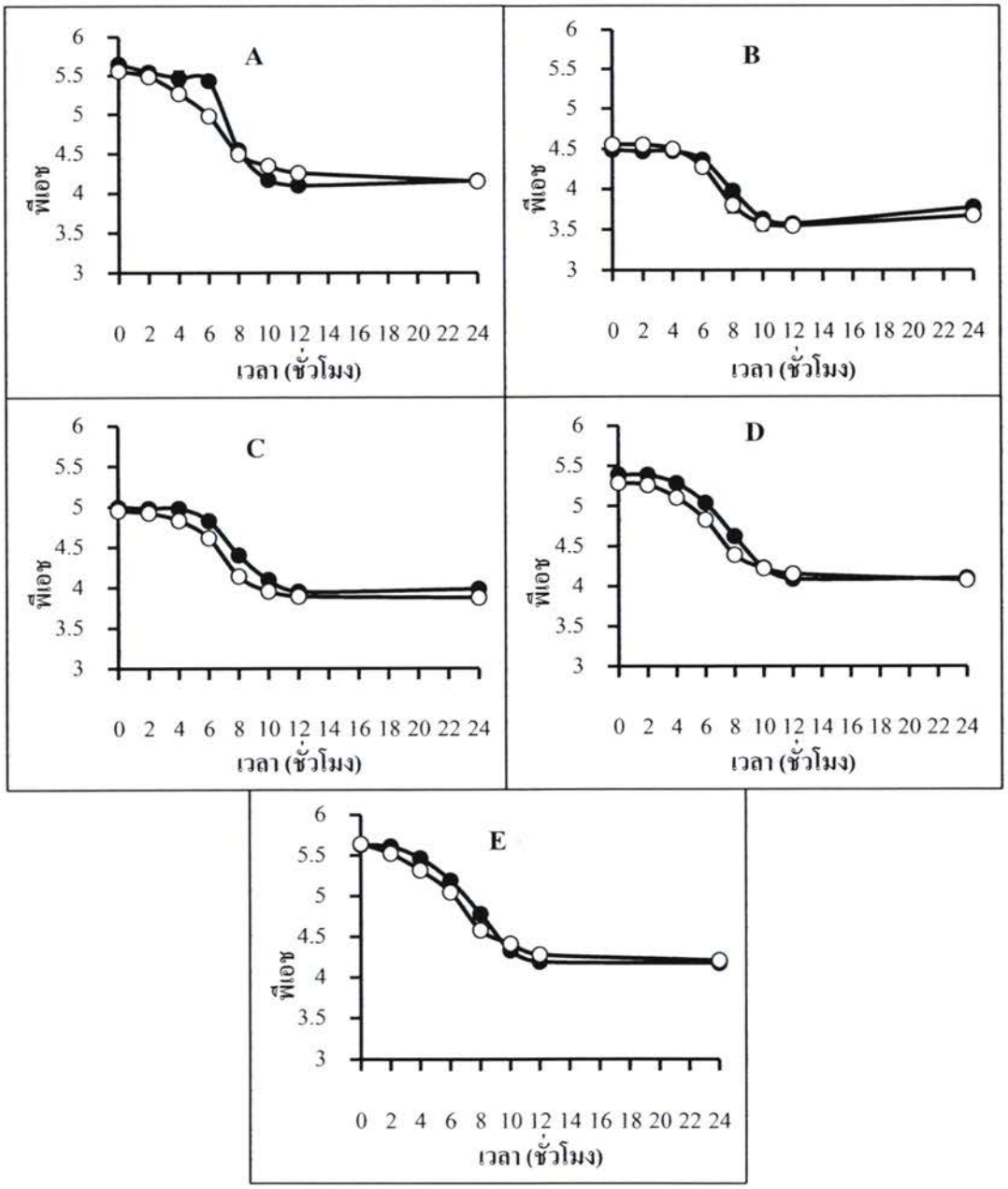
จากการทดลองพบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 ที่พีเอช 4.5 และน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอชมีการใช้น้ำตาลได้เร็วกว่า ที่พีเอช 5.0, 5.5 และ6.0 เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในสายพันธุ์ UBU1-2 ที่พีเอช 5.0 ใช้น้ำตาลไปร้อยละ 88.60±0.95 ซึ่งมากกว่าที่พีเอชอื่นๆ ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่พีเอช 5.0, 5.5 และ6.0 ใช้น้ำตาลเร็วกว่าที่พีเอช 4.5 เมื่อสิ้นสุดการหมักที่พีเอช 4.5 ใช้น้ำตาลได้ไม่แตกต่างกับที่พีเอช 5.5 ซึ่งใช้น้ำตาลได้มากกว่าพีเอชอื่นๆ (ภาพที่ 4.16 และตารางที่ 4.10)

4.5.3 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชระหว่างกระบวนการหมัก

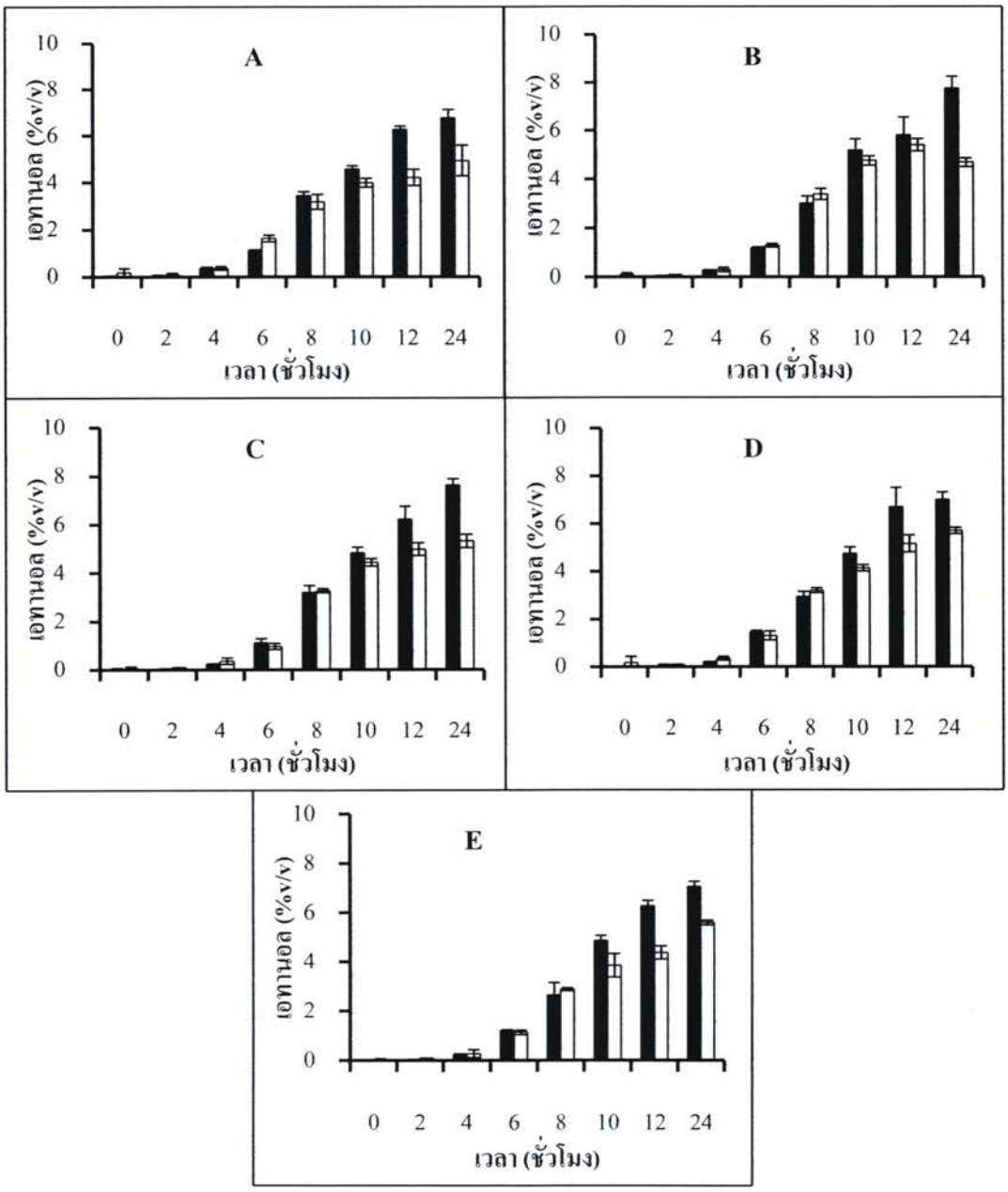
เมื่อเริ่มดำเนินการหมักพบว่าหลังจากชั่วโมงที่ 4 พีเอชในทุกๆ การทดลองลดลงอย่างรวดเร็วในยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์จนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นคงที่ถึงเวลา 24 ชั่วโมง ในทางปฏิบัติมีน้ำตาลเพียงร้อยละ 95 เท่านั้นที่เปลี่ยนเป็นเอทานอลส่วนที่เหลือยีสต์จะใช้ในการเจริญเติบโตและสร้างสารอื่นๆ เช่นคาร์บอนไดออกไซ อะซิตัลดีไฮด์ กรดอะซิติก กลีเซอรีน กรดแลกติก กรดซัลซินิก ฟูเซซลออลย์ และเฟอฟูลอย (วราวุฒิ ครูส่ง, 2529) จึงทำให้มีพีเอชที่ลดลงระหว่างกระบวนการหมัก (ภาพที่ 4.17)



ภาพที่ 4.16 การใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่น้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช (A) พีเอช 4.5 (B) พีเอช 5.0 (C) พีเอช 5.5 (D) และ พีเอช 6.0 (E) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.17 การการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่น้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช (A) พีเอช4.5 (B) พีเอช 5.0 (C) พีเอช 5.5 (D) และพีเอช 6.0 (E) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 4.18 การผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และ UBU-1-8 (□) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่น้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช (A) พีเอช4.5 (B) พีเอช 5.0 (C) พีเอช 5.5 (D) และ พีเอช 6.0 (E) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

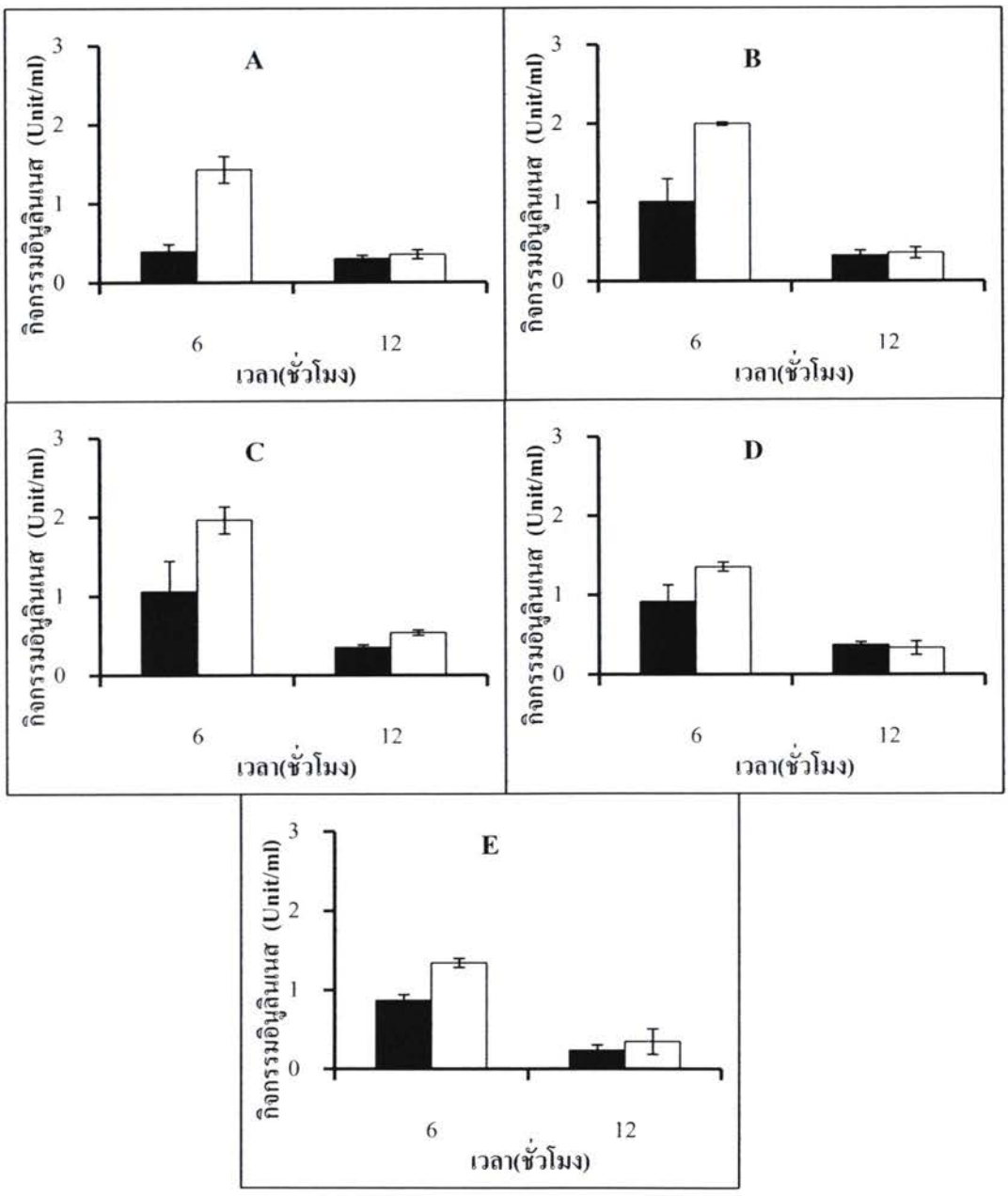
4.5.4 อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ สายพันธุ์ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

ตารางที่ 4.10 เอทานอลสูงสุด yield และน้ำตาลคงเหลือเมื่อหมักน้ำคั้นแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-18 ที่ไม่มีการปรับพีเอช พีเอช 4.5 5.0 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์	พีเอชเริ่มต้น	เอทานอลสูงสุด (ร้อยละโดยปริมาตร)	Yield (p/s) (กรัมต่อกรัม)	Yield (x/s) (กรัม/กรัม)	น้ำตาลที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
UBU-1-2	ไม่ปรับ	6.77 ± 0.35^{A} (24 ชม.)	0.49 ± 0.02^{A}	5.12 ± 0.05^{AB}	81.85 ± 3.39^{CD}
	4.5	7.76 ± 0.50^{A} (24 ชม.)	0.45 ± 0.05^{A}	5.64 ± 0.69^{A}	87.66 ± 1.57^{AB}
	5.0	7.64 ± 0.25^{A} (24 ชม.)	0.44 ± 0.03^{A}	5.15 ± 0.61^{AB}	88.60 ± 0.95^{A}
	5.5	7.00 ± 0.30^{A} (24 ชม.)	0.45 ± 0.06^{A}	4.72 ± 0.22^{ABC}	77.55 ± 3.83^{D}
	6.0	7.05 ± 0.22^{A} (24 ชม.)	0.45 ± 0.04^{A}	4.60 ± 0.39^{ABC}	82.59 ± 4.76^{BCD}
UBU-1-8	ไม่ปรับ	4.94 ± 0.66^{B} (24 ชม.)	0.31 ± 0.07^{B}	2.97 ± 0.45^{D}	81.88 ± 4.41^{CD}
	4.5	5.41 ± 0.25^{B} (12 ชม.)	0.35 ± 0.03^{B}	3.51 ± 0.70^{CD}	85.92 ± 0.82^{ABC}
	5.0	5.32 ± 0.27^{B} (24 ชม.)	0.33 ± 0.03^{B}	3.48 ± 0.17^{D}	82.72 ± 1.30^{BCD}
	5.5	5.69 ± 0.14^{B} (24 ชม.)	0.33 ± 0.02^{B}	3.73 ± 0.27^{BCD}	83.51 ± 1.58^{ABC}
	6.0	5.58 ± 0.10^{B} (24 ชม.)	0.35 ± 0.03^{B}	3.78 ± 0.05^{BCD}	81.03 ± 0.60^{CD}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ

4.5.5 อิทธิพลของพีเอชต่อกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน



ภาพที่ 4.19 กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสจากการหมัก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และ UBU-1-8 (□) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่น้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช (A) พีเอช4.5 (B) พีเอช 5.0 (C) พีเอช 5.5 (D) และ พีเอช 6.0 (E) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.11 กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-1-8 ในการหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่พีเอชแตกต่างกัน

สายพันธุ์	พีเอช	เวลา (ชั่วโมง)	
		6	12
UBU-1-2	ไม่ปรับ	0.39 ± 0.09^{D}	0.30 ± 0.04^{D}
	4.5	1.01 ± 0.29^{CD}	0.33 ± 0.07^{D}
	5.0	1.06 ± 0.39^{CD}	0.35 ± 0.04^{D}
	5.5	0.92 ± 0.21^{CD}	0.37 ± 0.04^{D}
	6.0	0.87 ± 0.07^{CD}	0.23 ± 0.07^{D}
UBU-1-8	ไม่ปรับ	1.43 ± 0.17^{CB}	0.35 ± 0.06^{D}
	4.5	2.00 ± 0.02^{A}	0.36 ± 0.07^{D}
	5.0	1.96 ± 0.17^{B}	0.53 ± 0.03^{D}
	5.5	1.35 ± 0.06^{CB}	0.33 ± 0.08^{D}
	6.0	1.35 ± 0.06^{CB}	0.35 ± 0.16^{D}

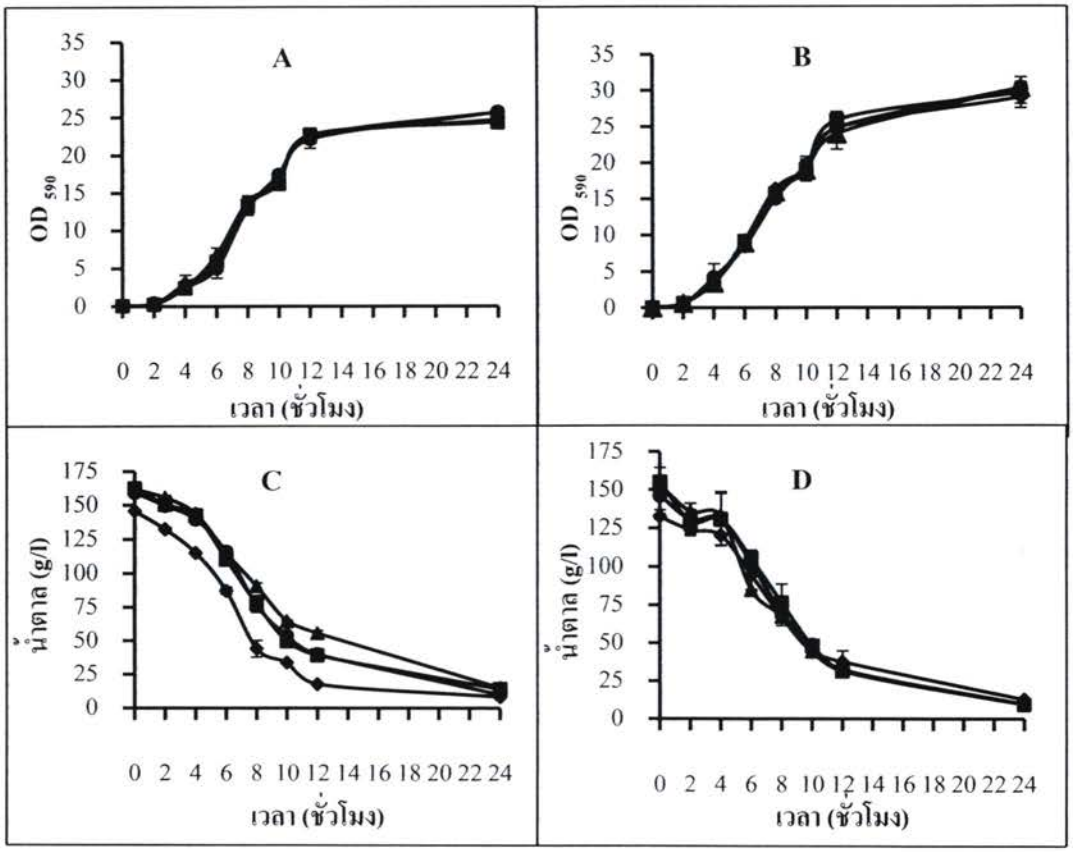
หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

กิจกรรมอินูลินเนสที่ผลิตจาก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-1-8 พบว่าในทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เวลา 6 ชั่วโมงมีกิจกรรมสูงกว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง ในทุกระดับพีเอช ซึ่งสายพันธุ์ UBU-1-2 ที่เวลา 6 ชั่วโมงมีกิจกรรมเอนไซม์ไม่แตกต่างกันทุกระดับพีเอชซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์อยู่ในช่วง 0.87-1.06 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มากกว่าในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอชที่มีกิจกรรม 0.39 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมงมีกิจกรรมไม่แตกต่างกันในทุกระดับพีเอชมีกิจกรรมอยู่ที่ 0.23-0.37 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่เวลา 6 ชั่วโมงมีกิจกรรมสูงสุดที่พีเอช 4.5 มีกิจกรรม 2.00±0.02 ยูนิตต่อมิลลิลิตร แต่ที่เวลา 12 ชั่วโมงมีกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสไม่แตกต่างกันในทุกระดับพีเอชซึ่งมีกิจกรรม 0.33-0.36 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.19 และตารางที่ 4.11)

4.6 อิทธิพลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการหมักเอทานอล

โดยทั่วไปยีสต์สามารถใช้แอมโมเนียมไอออน (ammonium ion)ได้ซึ่งอาจเติมในรูปของไดแอมโมเนียมฟอสเฟต หรือแอมโมเนียมซัลเฟต โดยแอมโมเนียมไอออนนั้นจัดว่าเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดสอบอิทธิพลการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่มีต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยทดสอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที โดยเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.025, 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนักซึ่งผลการทดลองได้อธิบายไว้เป็นส่วนๆ ดังนี้

4.6.1 อิทธิพลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการเจริญของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8



ภาพที่ 4.20 การเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (A) และ UBU-1-8 (B) และการใช้น้ำตาล สายพันธุ์ UBU-1-2 (C) และ UBU-1-8 (D) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0 (A) 0.025 (B) 0.05 (C) และ 0.1 (D) โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

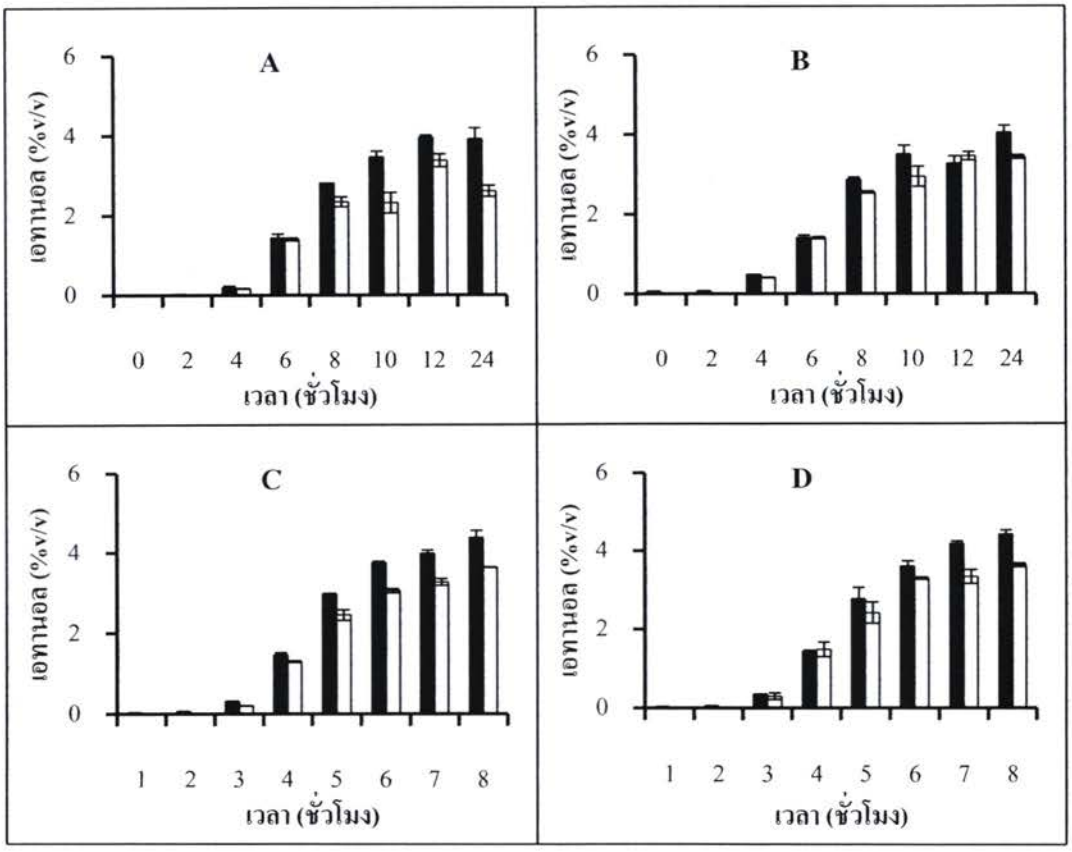
จากการทดสอบพบว่าในสายพันธุ์ UBU-1-2 การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตไม่ส่งผลต่อรูปแบบการเจริญ กล่าวคือ ยีสต์เริ่มมีการเจริญที่ชั่วโมงที่ 4 และเจริญอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 12 (ระยะ exponential phase) หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะ stationary phase ในช่วงแรกของการเจริญในแต่ละความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมพบว่าไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาการหมักโดยที่เวลา 24 ชั่วโมง น้ำคั้นแก่นตะวันที่เติมที่แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 0, 0.025, 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนัก วัดค่า OD_{590} ได้สูงสุดเท่ากับ 25.67±0.58, 24.33±0.58, 25.67±0.58 และ 24.67±1.25 ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาที่การเจริญของสายพันธุ์ UBU-1-8 พบว่า น้ำคั้นแก่นตะวันที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ทุกความเข้มข้น ในสองชั่วโมงแรกเซลล์ยังอยู่ในระยะ lag phase หลังจากนั้นเข้าสู่ระยะ exponential phase จนถึงชั่วโมงที่ 12 และค่า OD_{590} วัดได้สูงสุดที่เวลา 24 ชั่วโมง เช่นเดียวกับสายพันธุ์ UBU-1-2 โดยน้ำคั้นแก่นตะวันที่เติมที่แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 0, 0.025, 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนัก วัดค่า OD_{590} ได้สูงสุดเท่ากับ 30.33±1.53, 29.67±1.53, 30.33±0.58 และ 29.00±1.41 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.20)

4.6.2 อิทธิพลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการใช้น้ำตาลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8

สายพันธุ์ UBU-1-2 เริ่มมีการใช้น้ำตาลหลังจากเริ่มต้นการหมักและมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วที่ชั่วโมงที่ 4 ถึงชั่วโมงที่ 12 ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญที่เจริญอย่างรวดเร็วในช่วงเวลาเดียวกันโดยพบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต เข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก มีการใช้น้ำตาลมากที่สุดเมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 24 ชั่วโมงมีการใช้น้ำตาลร้อยละ 94.26±0.17 ส่วนที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 และ0.025 โดยน้ำหนัก การใช้น้ำตาลใกล้เคียงกันจนถึงชั่วโมงที่ 12 แต่ชั่วโมงที่ 24 ที่ ร้อยละ 0 โดยน้ำหนักใช้น้ำตาลได้มากกว่าการเติมที่ร้อยละ 0.025 โดยน้ำหนัก ซึ่งใช้น้ำตาลไปร้อยละ 93.67±0.58 และ 91.30±0.22 ตามลำดับส่วนการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักใช้น้ำตาลได้น้อยที่สุดเมื่อสิ้นสุดการหมักใช้ไปร้อยละ 90.68±1.22 (ภาพที่ 4.20 และตารางที่ 4.11) ส่วนในสายพันธุ์ UBU-1-8 เริ่มมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 4 จนถึงชั่วโมงที่ 12 ในทุกระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เช่นเดียวกับสายพันธุ์ UBU-1-2 มีการใช้น้ำตาลไม่แตกต่างกันจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักใช้น้ำตาลได้น้อยกว่าการเติมระดับอื่นๆ เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 24 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.025 และ 0.05 โดยน้ำหนักใช้น้ำตาลไม่แตกต่างกันซึ่งมากกว่าที่ระดับอื่นๆ โดยใช้น้ำตาลไปร้อยละ 93.66±1.16 และ 93.82±1.05 ตามลำดับ รองลงมาคือที่ไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งใกล้เคียงกับที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.025 และ 0.05 โดยน้ำหนักซึ่งใช้น้ำตาลไปร้อยละ 93.00±0.20 และการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักมีการใช้น้ำตาลน้อยที่สุดใช้ไปร้อยละ 91.14±1.43 (ภาพที่ 4.20 และตารางที่ 4.12)

เมื่อเปรียบเทียบการใช้น้ำตาลของยีสต์สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 พบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับต่างๆ ใช้น้ำตาลได้ใกล้เคียงกันเมื่อสิ้นสุดการหมัก UBU-1-2 ใช้น้ำตาลได้มากที่สุดเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักในขณะที่ UBU-1-8 ใช้น้ำตาลได้มาสุดเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.025 และ0.05 โดยน้ำหนัก

4.6.3 อิทธิพลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8



ภาพที่ 4.21 การผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และUBU-1-8 (□)ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0 (A) 0.025 (B) 0.05 (C) และ 0.1 โดยน้ำหนัก (D) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ในสายพันธุ์ UBU-1-2 เมื่อเลี้ยงในน้ำคั้นแก่นตะวันที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.025 โดยน้ำหนัก ผลิตเอทานอลได้เข้มข้นร้อยละ 4.04±0.18 โดยปริมาตร ที่เวลา

24 ชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างกับเอทานอลที่ผลิตในน้ำคั้นแก่นตะวันที่ไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งผลิตได้เข้มข้นเท่ากับร้อยละ 3.97±0.05 โดยปริมาตร ที่เวลา 12 ชั่วโมง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนักพบว่าปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 4.39±0.18 และ4.42±0.10 โดยปริมาตร ตามลำดับ ซึ่งการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนัก เอทานอลไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) และเมื่อคิดเป็นค่า Yield (p/s) ได้เท่ากับ 0.26±0.00, 0.21±0.01, 0.24±0.01 และ0.24±0.00 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลที่ใช้ไป เมื่อหมักในน้ำคั้นแก่นตะวันที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.025, 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนักตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติ ($p>0.05$) แต่เมื่อพิจารณาที่ค่า Yield (p/x) การหมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักมีค่าสูงกว่าที่ระดับอื่นๆ คือ 4.15±0.39 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์

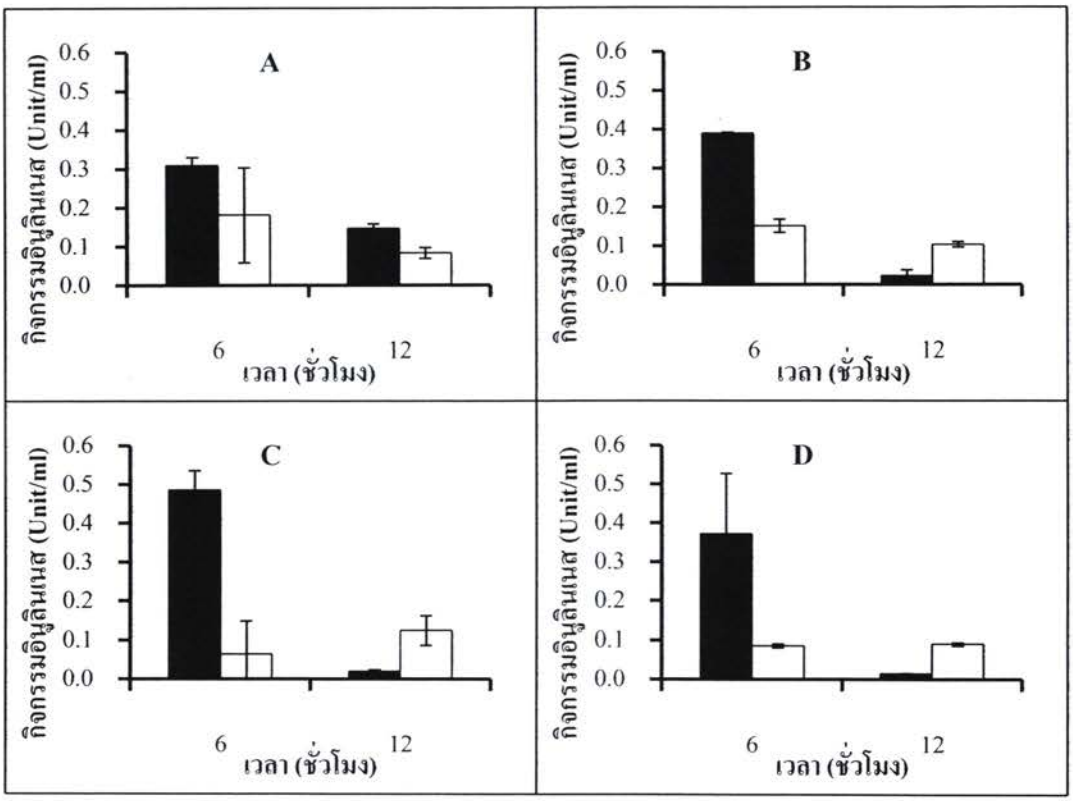
ตารางที่ 4.12 เอทานอลสูงสุด yield และการใช้น้ำตาลเมื่อหมักน้ำคั้นแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-18 ที่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0, 0.025, 0.05 และ 0.1 โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์	$(NH_4)_2SO_4$ (ร้อยละ)	เอทานอลสูงสุด (ร้อยละโดยปริมาตร)	Yield (p/s) (กรัม/กรัม)	Yield (x/s) (กรัม/กรัม)	น้ำตาลที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
UBU-1-2	0	3.97 ± 0.05^{B} (12ชม.)	0.26 ± 0.00^{A}	3.51 ± 0.38^{ABC}	93.67 ± 0.58^{A}
	0.025	4.04 ± 0.18^{B} (24ชม.)	0.21 ± 0.01^{A}	3.77 ± 0.23^{AB}	91.30 ± 0.22^{BC}
	0.05	4.39 ± 0.18^{A} (24ชม.)	0.24 ± 0.01^{A}	3.82 ± 0.24^{AB}	90.68 ± 1.22^{C}
	0.1	4.42 ± 0.10^{A} (24ชม.)	0.24 ± 0.00^{A}	4.15 ± 0.39^{A}	94.26 ± 0.17^{A}
UBU-1-8	0	3.38 ± 0.16^{C} (12ชม.)	0.24 ± 0.01^{A}	3.12 ± 0.24^{BCD}	93.00 ± 0.20^{AB}
	0.025	3.46 ± 0.10^{C} (12ชม.)	0.19 ± 0.07^{A}	2.10 ± 0.95^{E}	93.66 ± 1.16^{A}
	0.05	3.64 ± 0.01^{C} (24ชม.)	0.21 ± 0.01^{A}	2.64 ± 0.21^{DE}	93.82 ± 1.05^{A}
	0.1	3.62 ± 0.05^{C} (24ชม.)	0.21 ± 0.05^{A}	2.84 ± 0.09^{CDE}	91.14 ± 1.43^{BC}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ส่วนอิทธิพลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการผลิตเอทานอลโดย *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-8 พบว่า เซลล์เริ่มมีการผลิตเอทานอลที่ชั่วโมงที่ 4 ซึ่งทุกความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตผลิตเอทานอลไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) อยู่ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 3.38-3.64 โดยปริมาตร และมีค่า Yield (p/s) ไม่แตกต่างกันซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.19-0.24 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล (ภาพที่ 4.21 และตารางที่ 4.12) แต่เมื่อพิจารณาที่ค่า Yield (p/x) การหมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตมีค่าสูงกว่าที่ระดับอื่นๆ คือ 3.12±0.24 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์

4.6.4 อิทธิพลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8



ภาพที่ 4.22 กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และUBU-1-8 (□) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ร้อยละ 0 (A) 0.025 (B) 0.05 (C) และ 0.1 โดยน้ำหนัก (D) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์ UBU-1-2 มีกิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสที่เวลา 6 ชั่วโมงสูงกว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง ที่เวลา 6 ชั่วโมงพบว่าเมื่อไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟต และที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0.025, และ 0.1 โดยน้ำหนักในน้ำคั้นแก่นตะวันให้กิจกรรมอินูลินเนสที่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักซึ่งมีกิจกรรม 0.49±0.05 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 12 ชั่วโมงเมื่อไม่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตมีกิจกรรมสูงกว่าที่ระดับอื่นๆซึ่งมีกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนส 0.15±0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในสายพันธุ์ UBU-1-8 พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสที่เวลา 6 ชั่วโมงและ 12 ชั่วโมงของการหมักมีกิจกรรมอินูลินเนส ต่ำมาก ที่เวลา 6 ชั่วโมงเอนไซม์อินูลินเนส มีกิจกรรม 0.18±0.12 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งมากกว่าการเติมแอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนที่ 12 ชั่วโมง การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 โดยน้ำหนักมีกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสสูงสุด 0.12±0.04 ยูนิตต่อมิลลิลิตรแต่ก็ถือว่าใกล้เคียงกับที่ระดับอื่นๆ (ภาพที่ 22 และตารางที่ 4.13)

ตารางที่ 4.13 กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-1-8 ในการหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นต่างกัน

สายพันธุ์	$(NH_4)_2SO_4$ (ร้อยละ)	เวลา (ชั่วโมง)	
		6	12
UBU-1-2	0	0.31 ± 0.02^{B}	0.15 ± 0.01^{CD}
	0.025	0.39 ± 0.00^{B}	0.02 ± 0.01^{E}
	0.05	0.49 ± 0.05^{A}	0.02 ± 0.00^{E}
	0.1	0.37 ± 0.16^{B}	0.02 ± 0.00^{E}
UBU-1-8	0	0.18 ± 0.12^{C}	0.08 ± 0.01^{CDE}
	0.025	0.15 ± 0.02^{CD}	0.10 ± 0.01^{CDE}
	0.05	0.06 ± 0.08^{DE}	0.12 ± 0.04^{CD}
	0.1	0.09 ± 0.00^{CDE}	0.09 ± 0.00^{CDE}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.7 อิทธิพลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ต่อการหมักเอทานอล

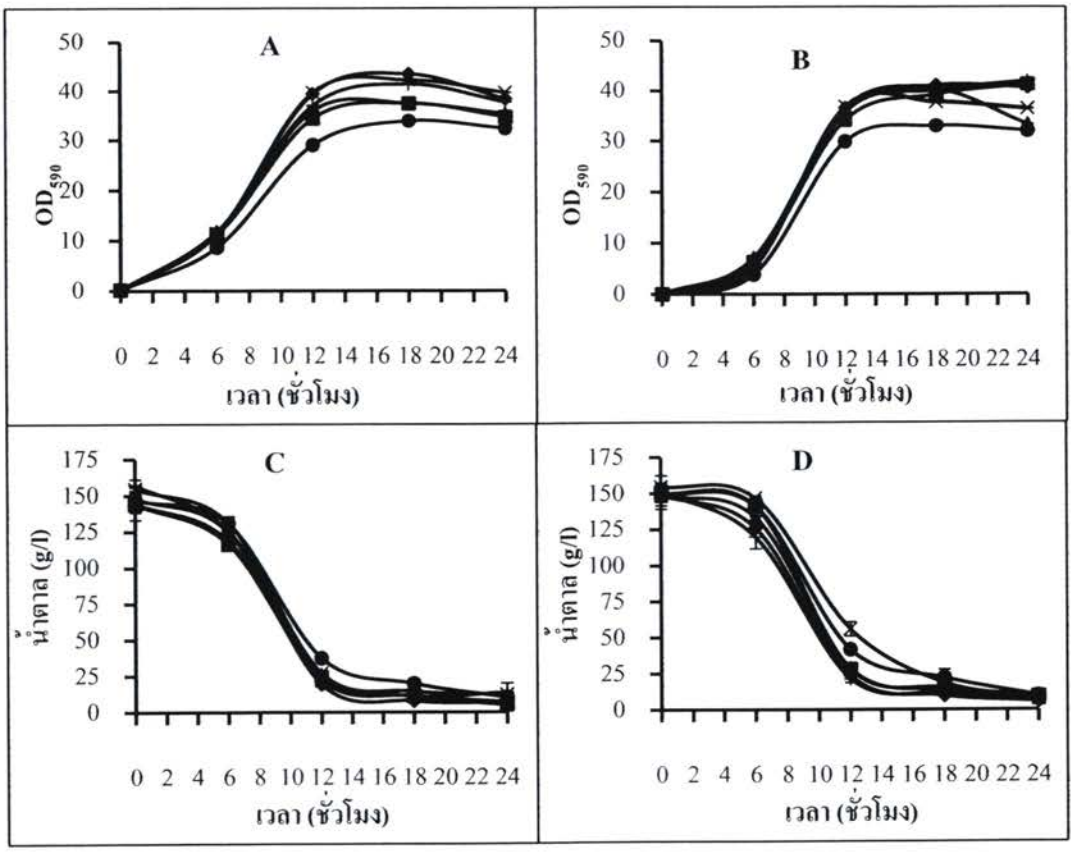
จากการทดสอบอิทธิพลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 โดยการเติมสารสกัดจากยีสต์ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนัก หมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยติดตามกิจกรรมการหมักทุก 6 ชั่วโมงจนถึงชั่วโมงที่ 24 ผลการทดลองได้อธิบายไว้ดังนี้

4.7.1 อิทธิพลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ต่อการเจริญของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

เมื่อพิจารณาการเจริญในสายพันธุ์ UBU-1-2 พบว่าเมื่อมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ทำให้การเจริญเพิ่มขึ้น โดย OD_{590} 33.90±0.01 และเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1.5 โดยน้ำหนัก พบว่ามีการเจริญเพิ่มขึ้นโดยวัดค่า OD_{590} สูงสุดได้เท่ากับ 37.50±0.00 และ 37.50±0.02 ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจากการวิเคราะห์ทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 พบว่าค่าที่ได้ไม่ต่างกัน นอกจากนั้นยังพบว่าเมื่อเพิ่มสารสกัดจากยีสต์เป็นร้อยละ 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนัก พบว่ามีการเจริญเพิ่มขึ้นอีก โดยวัดค่า OD_{590} สูงสุดได้เท่ากับ 42.30±0.01, 41.40±0.01 และ 43.50±0.00 (ภาพที่ 4.23 A)

เมื่อพิจารณาการเจริญของสายพันธุ์ UBU-1-8 พบว่าการเจริญในสายพันธุ์ UBU-1-8 เจริญได้ช้ากว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 และพบว่าเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์มีผลทำให้การเจริญเพิ่มมากขึ้นซึ่งวัดค่า OD_{590} สูงสุดเมื่อหมักโดยมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนัก ถัดมาคือร้อยละ 1.5, 0.5, 1.0, 2.0 และ 0 โดยน้ำหนัก ซึ่งมีค่า OD_{590} เท่ากับ 42.00±0.03, 41.10±0.01, 41.33±0.04, 40.20±0.02, 37.80±0.03 และ 33.90±0.01 ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแล้วพบว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์ที่ความเข้มข้นต่างๆให้ค่า OD_{590} สูงสุดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 แต่มากกว่าที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ (ภาพที่ 4.2 B)

ดังนั้นการเติมสารสกัดจากยีสต์จะมีผลทำให้ยีสต์สามารถเจริญเพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์จากการหมักยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์



ภาพที่ 4.23 การเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (A) และ UBU-1-8 (B) และการใช้น้ำตาล สายพันธุ์ UBU-1-2 (C) และ UBU-1-8 (D) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0 (●) 0.5 (■) 1.0 (▲)1.5 (♦) 2.0 (x) และ 2.5 โดยน้ำหนัก (+) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

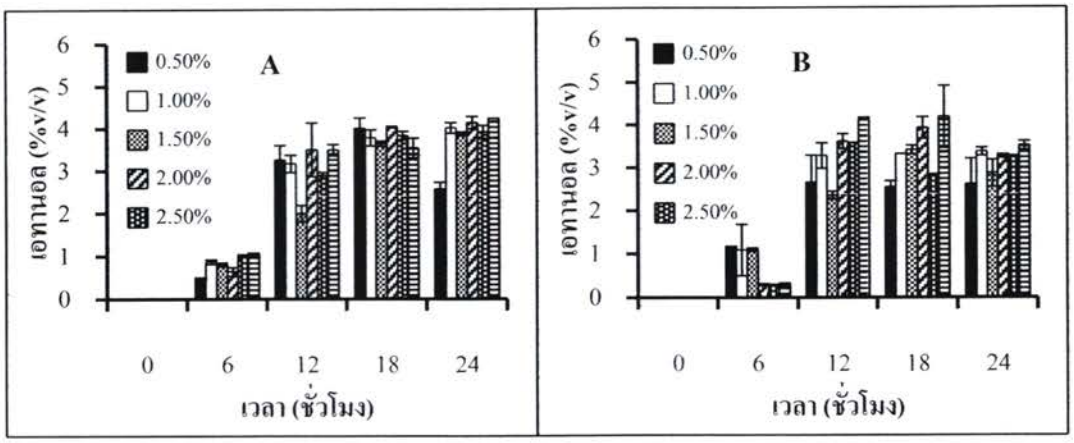
4.7.2 อิทธิพลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ต่อการใช้น้ำตาลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

จากการทดลองพบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ UBU-1-2 มีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วในช่วงเวลา 6 ถึง 12 ชั่วโมงของการหมักในทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ที่ การใช้น้ำตาลจะใช้ได้เร็วขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าการใช้น้ำตาลของยีสต์เมื่อมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.5, 1.5 และ 1.0 โดยน้ำหนัก ใช้น้ำตาลไปร้อยละ 96.51±0.07, 95.35±0.11 และ94.91±0.05 ตามลำดับ ซึ่งใช้น้ำตาลได้มากกว่าที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งใช้ไปเพียงร้อยละ 92.91±0.22 แต่เมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนักพบว่ามีการใช้น้ำตาลน้อยกว่าการหมักที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ซึ่งใช้ไปร้อยละ 92.11±0.23 และ91.35±0.36 ตามลำดับ (ภาพที่ 23 C และตารางที่ 4.14)

ส่วนในสายพันธุ์ UBU-1-8 พบว่าเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ทุกระดับความเข้มข้นใช้น้ำตาลได้เร็วกว่าการหมักที่ไม่เติมสารสกัดจากยีสต์ยกเว้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนักซึ่งใช้ได้ช้าที่สุด เมื่อสิ้นสุดการหมักพบว่าการหมักที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์มีการใช้น้ำตาลมากกว่าที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ (ภาพที่ 23 D และตารางที่ 4.14)

4.7.3 อิทธิพลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

จากการทดลองพบว่าในสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้สูงสุดไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ในช่วงความเข้มข้นร้อยละ 3.87-4.14 โดยปริมาตร เมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ทุกระดับความเข้มข้นยกเว้นที่ความเข้มข้นร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักซึ่งผลิตเอทานอลร้อยละ 4.24 โดยปริมาตร ซึ่งมากกว่าที่ความเข้มข้นสารสกัดจากยีสต์ระดับอื่นๆ เมื่อคิดเป็นค่า Yield (p/s) การเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 1.0 โดยน้ำหนัก มีค่า Yield (p/s) เท่ากับ 0.29±0.11 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลซึ่งมากกว่าระดับอื่นๆที่มีค่าไม่แตกต่างกันมีค่าในช่วง 0.20-0.23 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เมื่อพิจารณาที่ค่า Yield (p/x) พบว่าไม่แตกต่างกันในทุกระดับความเข้มข้นของ สารสกัดจากโดยมีค่าอยู่ในช่วง ยีสต์ 2.25-2.74 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ (ภาพที่ 4.24 และตารางที่ 4.14)



ภาพที่ 4.24 การผลิตเอทานอลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (A) และUBU-1-8 (B)ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับต่างๆ ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.14 เอทานอลสูงสุด yield และน้ำตาลคงเหลือเมื่อหมักน้ำคั้นแก่นตะวันมีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-18 ที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0, 0. 5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สายพันธุ์	Yeast extract (ร้อยละ)	เอทานอลสูงสุด (ร้อยละโดยปริมาตร)	Yield (p/s) (กรัม/กรัม)	Yield (p/x) (กรัม/กรัม)	น้ำตาลที่ถูกใช้ (ร้อยละ)
UBU-1-2	0	4.01 ± 0.25^{AB} (18 ชม.)	0.23 ± 0.03^{AB}	2.74 ± 0.25^{A}	92.91 ± 0.22^{G}
	0.5	4.02 ± 0.13^{AB} (24 ชม.)	0.23 ± 0.01^{AB}	2.68 ± 0.12^{A}	96.51 ± 0.07^{A}
	1.0	3.87 ± 0.05^{AB} (24 ชม.)	0.29 ± 0.11^{A}	2.54 ± 0.07^{A}	94.91 ± 0.05^{CD}
	1.5	4.14 ± 0.15^{AB} (24 ชม.)	0.22 ± 0.02^{AB}	2.40 ± 0.15^{A}	95.35 ± 0.11^{BC}
	2	3.92 ± 0.16^{AB} (18ชม.)	0.20 ± 0.01^{AB}	2.31 ± 0.34^{A}	92.11 ± 0.23^{H}
	2.5	4.24 ± 0.00^{A} (24 ชม.)	0.23 ± 0.01^{AB}	2.25 ± 0.57^{A}	91.35 ± 0.36^{I}
UBU-1-8	0	2.65 ± 0.64^{C} (12 ชม.)	0.22 ± 0.04^{AB}	1.90 ± 0.31^{A}	93.48 ± 0.21^{FG}
	0.5	3.37 ± 0.09^{BC} (24 ชม.)	0.18 ± 0.03^{B}	1.74 ± 0.38^{A}	93.82 ± 0.30^{EF}
	1.0	$3.42\pm0.10A^{BC}$ (18 ชม.)	0.19 ± 0.02^{B}	1.79 ± 0.18^{A}	94.33 ± 0.86^{DE}
	1.5	3.93 ± 0.25^{AB} (18 ชม.)	0.23 ± 0.02^{AB}	2.17 ± 0.09^{A}	96.00 ± 0.03^{AB}
	2.0	3.58 ± 0.00^{AB} (12 ชม.)	0.29 ± 0.00^{A}	3.11 ± 3.98^{A}	94.58 ± 0.00^{CDE}
	2.5	4.18 ± 0.72^{AB} (18 ชม.)	0.24 ± 0.05^{AB}	2.37 ± 0.42^{A}	95.34 ± 0.31^{BC}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

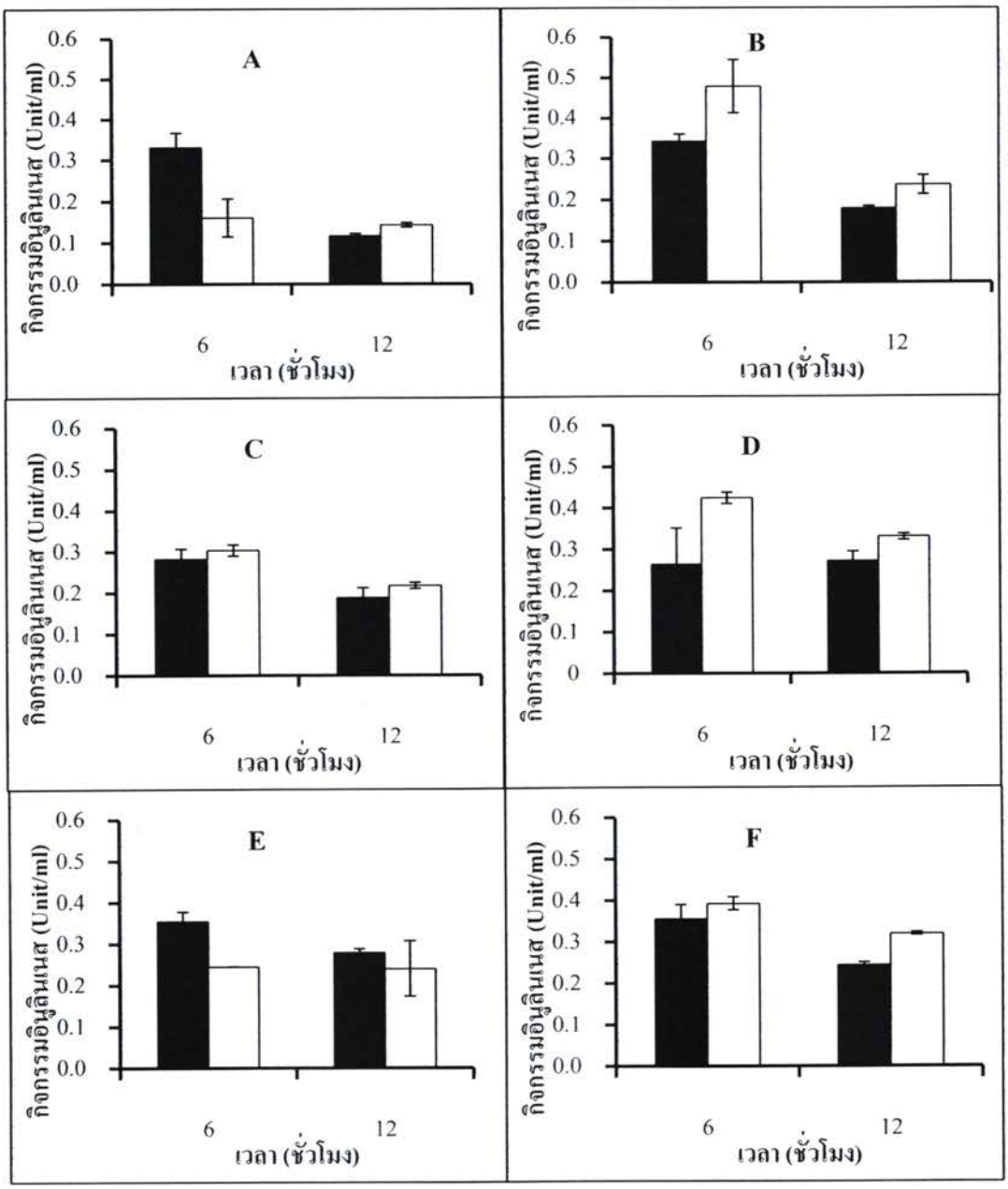
ส่วนการหมักเอทานอลโดยสายพันธุ์ UBU-1-8 นั้นพบว่าเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์มากขึ้นทำให้ปริมาณการผลิตเอทานอลของยีสต์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ ซึ่งการหมักที่ไม่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์หมักได้เอทานอลสูงสุดร้อยละ 2.65±0.64 โดยปริมาตร เมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันร้อยละ 0.5 และ 1.0 โดยน้ำหนักพบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เพิ่มขึ้นซึ่งสองระดับความเข้มข้นนี้ไม่แตกต่างกัน โดยผลิตเอทานอลร้อยละ 3.37-3.42 โดยปริมาตร และเมื่อเพิ่มระดับความเข้มข้น

สารสกัดจากยีสต์เป็นร้อยละ 1.5, 2.0 และ2.5 โดยน้ำหนัก พบว่าเอทานอลเพิ่มขึ้นมากกว่าที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ1.0 โดยน้ำหนัก แต่ทั้งสามระดับนี้ทำให้ยีสต์ผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่างกันซึ่งมีเข้มข้นร้อยละ 3.93±0.25, 3.58±0.00 และ4.18±0.72 โดยปริมาตร ตามลำดับ การเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ2.5 โดยน้ำหนักและเมื่อคิดเป็นค่า Yield(p/s) เท่ากับ 0.22±0.04, 0.18±0.03, 0.19±0.02, 0.23±0.02, 0.29±0.00 และ0.24±0.05 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลตามลำดับ ส่วนค่า Yield (p/x) ไม่แตกต่างกันในทุกระดับความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ซึ่งมีค่า 1.74-3.11 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ (ภาพที่ 4.24 และตารางที่ 4.14)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์มีผลต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ทำให้การเจริญและการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.7.4 อิทธิพลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ต่อกิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

จากการเติมสารสกัดจากยีสต์ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 โดยน้ำหนักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันเมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสพบว่าในสายพันธุ์ UBU-1-2 ที่เวลา 6 ชั่วโมง กิจกรรมอินูลินเนสสูงสุดเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์น้อยละ 2.0 ละ2.5 โดยน้ำหนักซึ่งมีกิจกรรมเท่ากันคือ 0.36±0.02 และ 0.36±0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเวลาผ่านไปที่ 12 ชั่วโมงกิจกรรมอินูลินเนสลดลงซึ่งวัดกิจกรรมได้สูงสุด 0.28±0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 2.0 โดยน้ำหนัก เมื่อพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสพบว่าในสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่เวลา 6 ชั่วโมงมีกิจกรรมสูงสุด 0.48±0.07 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ซึ่งใกล้เคียงกับการเติมร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก ซึ่งมีกิจกรรมอินูลินเนส 0.44±0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตรเมื่อเวลาการหมักผ่านไป 12 ชั่วโมงกิจกรรมอินูลินเนสลดลงที่ชั่วโมงที่ 12 ในการหมักที่เติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนักมีกิจกรรมสูงที่สุดซึ่งมี 0.35±0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตรใกล้เคียงกับที่เติมที่ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักซึ่งมีกิจกรรม 0.32±0.00 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ภาพที่ 4.25 และตารางที่ 4.15)



ภาพที่ 4.25 กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และUBU-1-8 (□) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตรโดยมีการเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 0 (●) 0.5 (■) 1.0 (▲) 1.5 (♦) 2.0 (x) และ2.5 โดยปริมาตร(+) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.15 กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และUBU-1-8 ในการหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่เติมสารสกัดจากยีสต์เข้มข้นต่างกัน

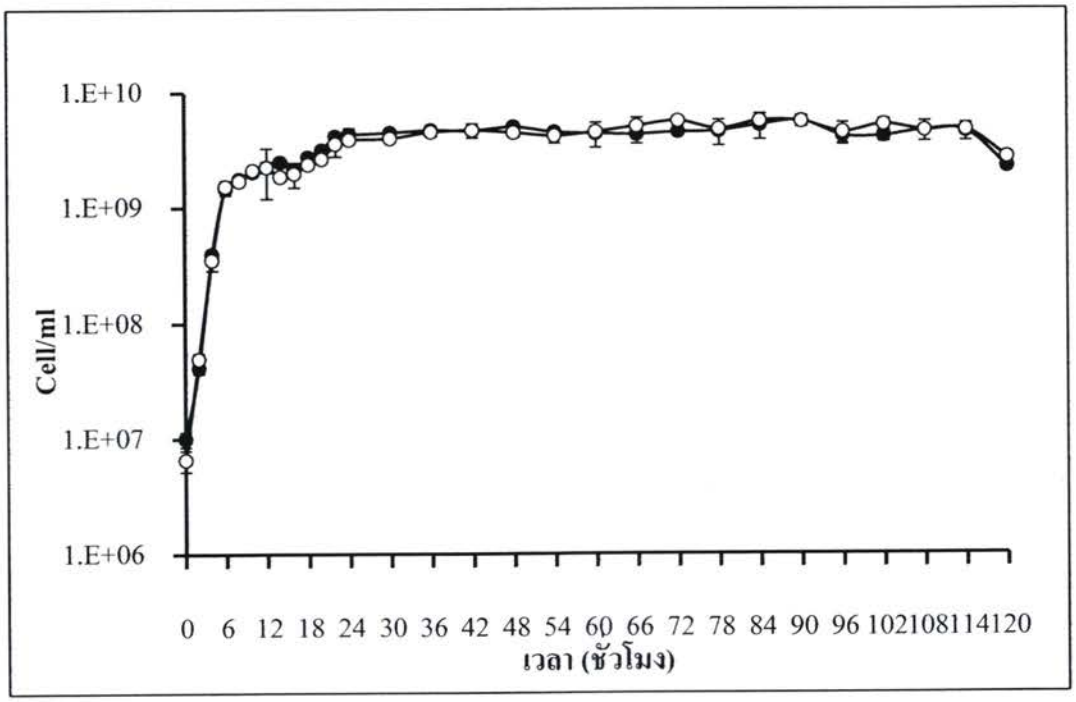
สายพันธุ์	Yeast extract (ร้อยละ)	เวลา (ชั่วโมง)	
		6	12
UBU-1-2	0	0.33 ± 0.04^{CDEFG}	0.12 ± 0.01^{M}
	0.5	0.34 ± 0.02^{CDEF}	0.18 ± 0.01^{JKLM}
	1.0	0.28 ± 0.02^{EFGHI}	0.19 ± 0.02^{JK}
	1.5	0.26 ± 0.09^{GHI}	0.27 ± 0.02^{FGHI}
	2.0	0.36 ± 0.02^{CD}	0.28 ± 0.01^{EFGHI}
	2.5	0.36 ± 0.03^{CD}	0.24 ± 0.01^{HIJ}
UBU-1-8	0	0.16 ± 0.05^{KLM}	0.14 ± 0.01^{LM}
	0.5	0.48 ± 0.07^{A}	0.24 ± 0.02^{HIJ}
	1.0	0.30 ± 0.03^{DEFGH}	0.22 ± 0.01^{IJK}
	1.5	0.44 ± 0.01^{AB}	0.35 ± 0.01^{CDEF}
	2.0	0.24 ± 0.00^{HIJ}	0.24 ± 0.07^{HIJ}
	2.5	0.39 ± 0.02^{BC}	0.32 ± 0.00^{DEFG}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำการทดลองแต่ละการทดลองวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในคอลัมน์เดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.8 การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

การทดสอบการหมักในถังหมักขนาด 5 ลิตรดำเนินการโดยการหมัก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีการปรับน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตรโดยมีการปรับพีเอชเริ่มต้นเป็น 5.5 ดำเนินการหมักที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการคนกวน 150 รอบต่อนาที ซึ่งผลการทดลองจะอธิบายเป็นข้อๆ ดังนี้

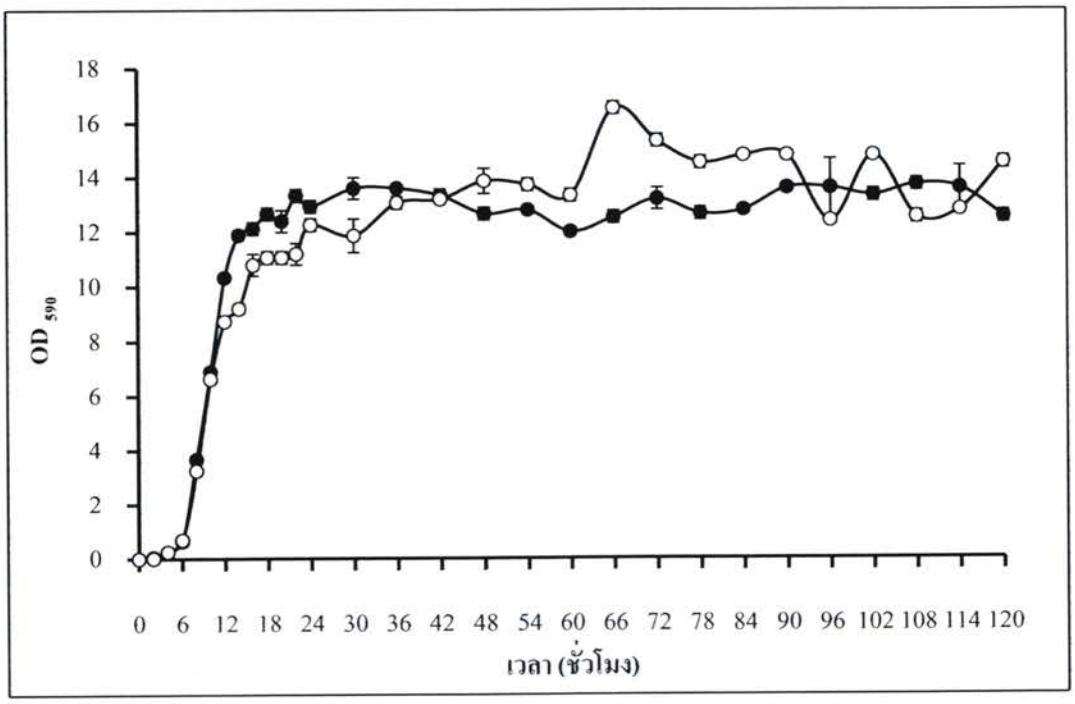
4.8.1 การเจริญของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันในถังหมักขนาด 5 ลิตร



ภาพที่ 4.26 การเจริญโดยการนับจำนวนเซลล์ของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องสาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

การวัดการเจริญของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 ทำการวัดโดยการนับจำนวนเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และการวัดค่าความขุ่น (OD_{590}) เมื่อพิจารณาที่ผลการนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1×10^{7} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (จำนวนเซลล์จริง $1\times10^{7}\pm1\times10^{6}$ และ$7\times10^{6}\pm1\times10^{6}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตรในสายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 ตามลำดับ) เมื่อเริ่มต้นกระบวนการหมักยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลา 36 ชั่วโมงเซลล์เพิ่มจาก 1×10^{7}เป็น $4.70\times10^{9}\pm1\times10^{8}$ และ $4.53\times10^{9}\pm4\times10^{8}$เซลล์ต่อมิลลิลิตรในสายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ตามลำดับหลังจากนั้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ของทั้ง 2 สายพันธุ์เกินขึ้นช้าๆ ในสายพันธุ์ UBU-1-2 มีจำนวนเซลล์มากที่สุด $5.62\times10^{9}\pm6\times10^{8}$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 90 ชั่วโมงของการหมัก ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 มีจำนวนเซลล์มากที่สุด $5.62\times10^{9}\pm1\times10^{8}$เซลล์ต่อมิลลิลิตร ที่เวลา 72 ชั่วโมงของการหมัก (ภาพที่ 4.26)

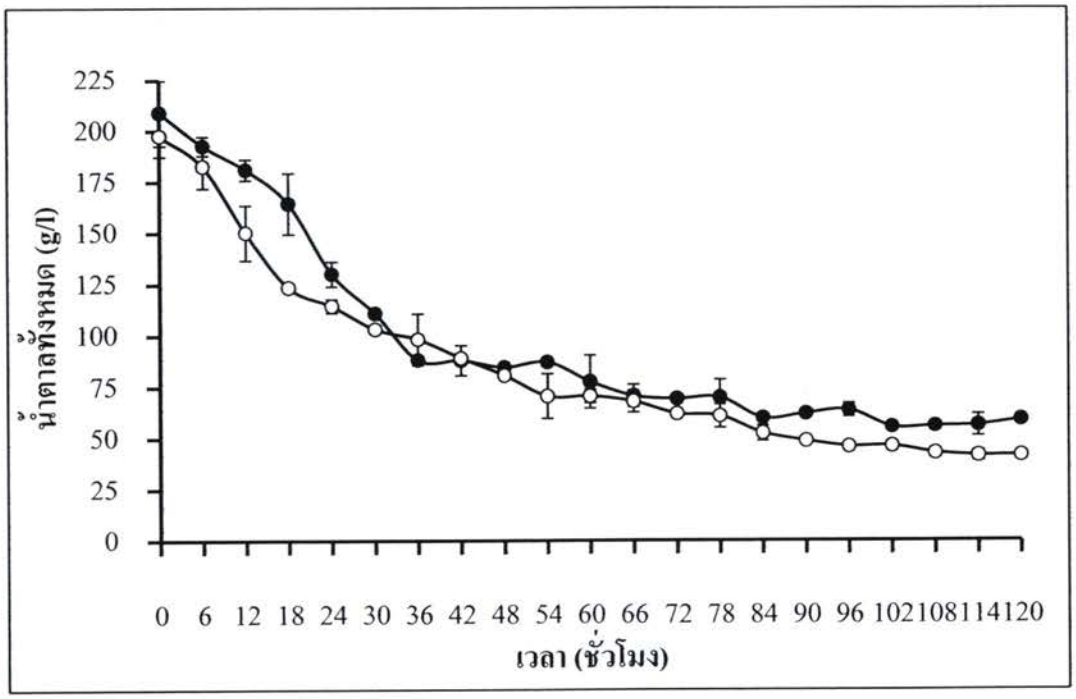
และเมื่อพิจารณาที่ค่า OD_{590} ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เจริญอย่างรวดเร็วหลังจากเริ่มต้นหมักจนถึงชั่วโมงที่ 24 จากนั้นการเจริญจะช้าโดยสายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่า OD_{590} สูงสุดเท่ากับ13.73±0.23 ที่เวลา 108 ชั่วโมง และสายพันธุ์ UBU-1-8 มีค่า OD_{590}สูงสุดเท่ากับ 16.53±0.23 ที่เวลา 66 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.27)



ภาพที่ 4.27 การเจริญโดยการวัดค่า OD_{590} ของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

4.8.2 การใช้น้ำตาลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันในถังหมักขนาด 5 ลิตร

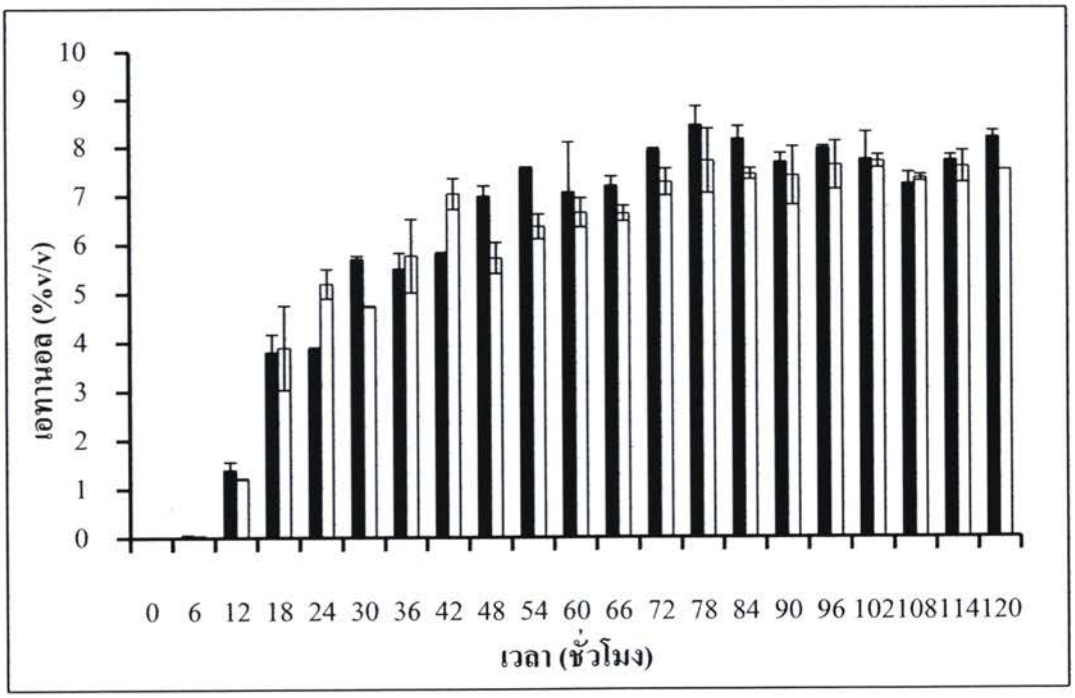
ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญและการสังเคราะห์สารต่างๆ หลังจากเริ่มต้นการหมัก สายพันธุ์ UBU-1-2 ใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้นการใช้น้ำตาลเริ่มช้าลง เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 120 ชั่วโมงมีน้ำตาลคงเหลือ 59.12±1.11 กรัมต่อลิตร คิดเป็น การใช้น้ำตาลไปทั้งหมดร้อยละ 66.53 ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 หลังจากเริ่มต้นการหมักมีการใช้น้ำตาลอย่างรวดเร็วจนถึงชั่วโมงที่ 54 หลังจากนั้นการใช้น้ำตาลช้าลง เมื่อสิ้นสุดการหมักที่ 120 ชั่วโมงมีน้ำตาลคงเหลือ 41.63±1.78 กรัมต่อลิตรคิดเป็นการใช้น้ำตาลไปทั้งหมดร้อยละ 65.40 (ภาพที่ 4.28 และตารางที่ 4.16)



ภาพที่ 4.28 การใช้น้ำตาลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ คือ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

4.8.3 การผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8

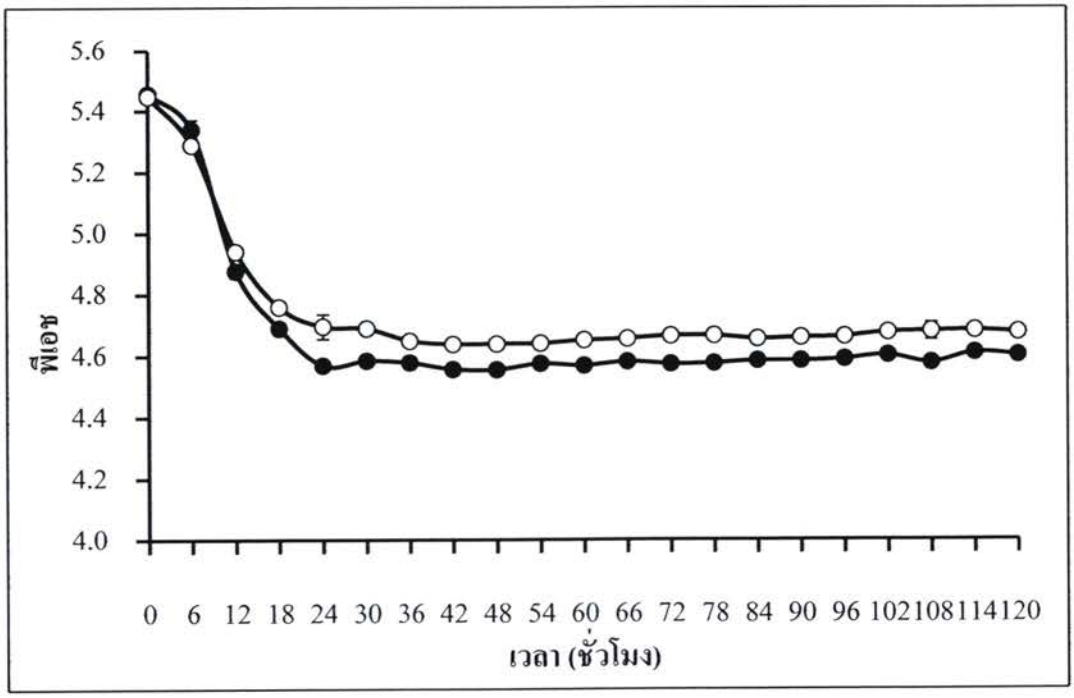
จากการวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการหมัก *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตรในถังหมักขนาด 5 ลิตร หลังจากเริ่มต้นการหมักยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์มีการใช้น้ำตาลในการเจริญและการผลิตเอทานอลเมื่อพิจารณาที่ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้พบว่าทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอทานอลได้สูงสุดที่เวลา 78 ชั่วโมงของการหมัก ซึ่งสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลเข้มข้นเท่ากับร้อยละ 8.46±0.39 โดยปริมาตร เมื่อคิดเป็นค่า Yield(p/s) ได้เท่ากับ 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลคิดเป็นร้อยละ 93.93 จากทฤษฎี ส่วนในสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลสูงสุดเข้มข้นร้อยละ 7.72±0.67 โดยปริมาตร เมื่อคิดเป็นค่า Yield(p/s) ได้เท่ากับ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลคิดเป็นร้อยละ 88.06 จากทฤษฎี ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติพบว่าค่า Yield(p/s) ทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (ภาพที่ 4.29 และตารางที่ 4.16)



ภาพที่ 4.29 การผลิตเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และ UBU-1-8 (□) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

4.8.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 จากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันในถังหมักขนาด 5 ลิตร

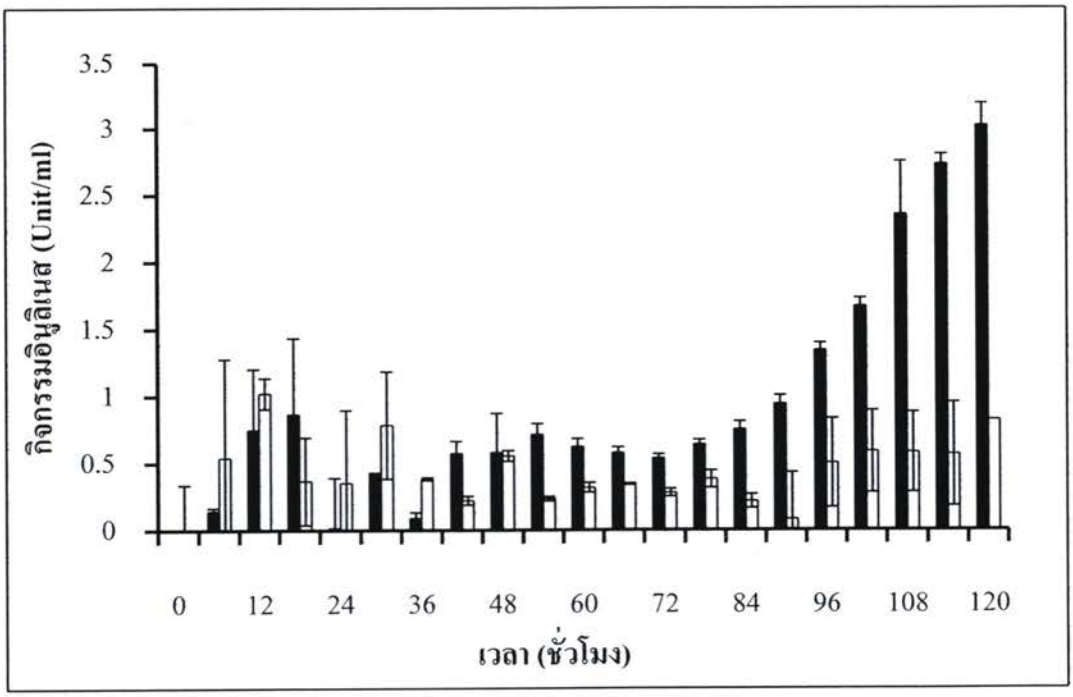
การหมักเอทานอลในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 เมื่อเริ่มต้นการหมักในทั้ง 2 สายพันธุ์พีเอชลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นพีเอชเริ่มคงที่เนื่องจากมีการสร้างผลิตภัณฑ์ที่นอกจากจะผลิตเอทานอลแล้วยีสต์ยังสร้างผลิตภัณฑ์จำพวกกรด เช่น Lactic acid, Acetic acid, Succinic acid เป็นต้น ซึ่งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 24 ชั่วโมงวัดค่าพีเอชได้เท่ากับ 4.6±0.00 และ 4.7±0.00 ในการหมักของสายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.30)



ภาพที่ 4.30 การเปลี่ยนแปลงพีเอชระหว่างการหมักของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (●) และ UBU-1-8 (○) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

4.7.5 กิจกรรมอินูลินเนสของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันในถังหมักขนาด 5 ลิตร

ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อินูลินเนสเพื่อย่อยโครงสร้างของอินูลินให้ได้น้ำตาลโมเลกุลเดียวที่ยีสต์สามารถใช้ในการเจริญแล้วการผลิตเอทานอลได้เมื่อพิจารณาที่กิจกรรมเอนไซม์อินูลินเนสที่ยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตขึ้น พบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 มีกิจกรรมอินูลินเนสสูงสุด 3.02±0.17 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่เวลา 120 ชั่วโมงของการหมักซึ่งมากกว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่มีกิจกรรมอินูลินเนส 1.02±0.74 ยูนิตต่อมิลลิลิตรที่เวลา 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 4.31 และตารางที่ 4.16)



ภาพที่ 4.31 กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนสของยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 (■) และ UBU-1-8 (□) ที่หมักในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที

จากการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่น้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตร ที่พีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พิจารณาค่าทางจลนพลศาตร์จะเห็นว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 เจริญได้ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันได้ดีกว่า UBU-1-2 โดยพิจารณาตั้งแต่อัตราจำเพาะสูงสุด และเมื่อพิจารณาค่า biomass doubling time (td) พบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 แบคทีเรียสามารถเพิ่มมวลขึ้นเป็นสองเท่าในระยะเวลาที่สั้นกว่า UBU-1-8 ดังนั้นสายพันธุ์ UBU-1-2 เพิ่มจำนวนเซลล์ได้เร็วกว่าซึ่งสอดคล้องกับผลการเจริญจะเห็นจากกราฟการเจริญช่วงระยะ log phase สายพันธุ์ UBU-1-2 จะแบ่งเซลล์ได้เร็วกว่า และเมื่อพิจารณาจากค่า Yield (x/s) พบว่าน้ำตาลหนึ่งกรัมทำให้ได้มวลของ UBU-1-8 เพิ่มขึ้น 0.04 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งมากกว่า UBU-1-2 ที่ได้เพียง 0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาล เมื่อพิจารณาการผลิตเอทานอลพบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลสูงสุดเข้มข้นร้อยละ 8.46±0.40 โดยปริมาตร คิดเป็น 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ 15.23 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ที่เวลา 78 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละ 93.93 ตามทฤษฎี ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ผลิตเอทานอลสูงสุดเข้มข้นร้อยละ 7.72±0.67 โดยปริมาตร คิดเป็น 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และ 12.01 กรัมเอทานอลต่อกรัมเซลล์ ที่เวลา 78 ชั่วโมงเช่นกัน คิดเป็นร้อยละ 88.06 ตามทฤษฎี อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแล้วพบว่ายีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ผลิตเอทานอลไม่แตกต่างกัน

อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และเมื่อพิจารณาที่ค่า q_s หรืออัตราการจำเพาะการใช้น้ำตาลบ่งบอกว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 ใช้น้ำตาลได้เร็วกว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 ในแต่ละชั่วโมงสอดคล้องกับปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงกว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 เช่นเดียวกับค่า q_p หรือ อัตราการจำเพาะการเกิดผลิตภัณฑ์ซึ่งจะเห็นว่า สายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่ามากกว่า UBU-1-8 แสดงให้เห็นว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 ผลิตเอทานอลได้เร็วกว่าสายพันธุ์ UBU-1-8 ในแต่ละชั่วโมง (ตารางที่ 4.16)

ตารางที่ 4.16 พารามิเตอร์ทางจลนพลศาตร์ของการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBUในถังหมักขนาด 5 ลิตร

พารามิเตอร์ทางจลนพลศาตร์	สายพันธุ์	
	UBU-1-2	**UBU-1-8**
เอทานอลสูงสุด (ร้อยละโดยปริมาตร)	8.46 ± 0.40^{A}	7.72 ± 0.67^{A}
Yield(p/s) (กรัมต่อกรัม)	0.48^{A}	0.45^{A}
การผลิตเอทานอลเทียบกับทฤษฎี (ร้อยละ)	93.93	88.06
Yield(p/x) (กรัมต่อกรัม)	15.23	12.01
Yield(x/s) (กรัมต่อกรัม)	0.03	0.04
อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด (μ_{max}) (ชั่วโมง$^{-1}$)	0.003	0.036
q_s (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)	8.26	3.69
q_p (กรัมต่อกรัมต่อชั่วโมง)	3.78	1.77
biomass doubling time (td) (ชั่วโมง$^{-1}$)	2.80	4.70
น้ำตาลคงเหลือ (กรัมต่อกรัม)	59.12 ± 1.11^{A}	41.63 ± 1.78^{B}
น้ำตาลที่ถูกใช้ไป (ร้อยละ)	73.26 ± 2.16^{B}	81.16 ± 3.84^{A}
อินูลินเนส (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	3.02 ± 0.17^{A}	1.02 ± 0.74^{A}

หมายเหตุ: ข้อมูลแต่ละช่องคือค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 2 ซ้ำ และการวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเฉพาะในแถวเดียวกันซึ่งสัญลักษณ์ตัวอักษรเหมือนกันคือค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันเมื่อวิเคราะห์โดยวิธี duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

บทที่ 5
สรุปผล อภิปราย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุป และอภิปรายผลการทดลอง

5.1.1 องค์ประกอบภายในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

องค์ประกอบภายในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 321.27 กรัมต่อลิตร ไนโตรเจนทั้งหมด 29,030.40 มิลลิกรัมต่อลิตร ฟีนอลลิกทั้งหมด 0.299 กรัมต่อลิตร พีเอช 5.45 ซึ่งเป็นแก่นตะวันจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นแก่นตะวันสายพันธุ์ที่เรียกกันว่าสายพันธุ์เบอร์ 3 หรือสายพันธุ์ CN52867 ซึ่งแก่นตะวันมีอินูลินเป็นองค์ประกอบหลัก จึงพิจารณาที่ปริมาณอินูลิน มีการรายงานว่าแก่นตะวันสายพันธุ์นี้มีอินูลิน 20 กรัมต่อหัวสด 100 กรัม แต่จากการทดลองของทัชชา อ่อนสร้อย (2551) พบว่าแก่นตะวันมีอินูลินร้อยละ 90.22 ของน้ำตาลทั้งหมด ส่วนการทดลองของภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ (2551) วัดปริมาณสารต่างๆในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันพบว่ามีอินูลินร้อยละ 77.64 ของน้ำตาลทั้งหมด และนอกจากนั้น ศิริพร ตันจอ และคณะ (2012)ได้เปรียบเทียบปริมาณอินูลินในหัวแก่นตะวัน 16 สายพันธุ์ซึ่งรวมทั้งสายพันธุ์ CN 52867 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ด้วยพบว่าปริมาณอินูลินเฉลี่ยอยู่ที่ 68.55-68.97 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัม ซึ่งสายพันธุ์ CN 52867 ปริมาณอินูลินอยู่ที่ 70.49 และ 77.56 กรัมต่อน้ำหนักแห้ง 100 กรัมในแก่นตะวันที่ปอกเปลือกและไม่ปอกเปลือกตามลำดับ

5.1.2 การคัดเลือกยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

ยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ในกลุ่มการทดลองที่ 1 ทุกสายพันธุ์มีการเจริญ ความสามารถในการใช้น้ำตาล และผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่างกันโดยมีการใช้น้ำตาลมากกว่าร้อยละ 90 และผลิตเอทานอลความเข้มข้นอยู่ระหว่างร้อยละ 4.94-5.03 โดยปริมาตร และมีค่า Yield (p/s) อยู่ระหว่าง 0.42-0.44 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล เช่นเดียวกับผลการคัดเลือกยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ในกลุ่มการทดลองที่ 2 ทุกสายพันธุ์มีการเจริญ ความสามารถในการใช้น้ำตาล และผลิตเอทานอลได้ไม่แตกต่างกัน มีการใช้น้ำตาลมากกว่าร้อยละ 90 และผลิตเอทานอลความเข้มข้นอยู่ระหว่างร้อยละ 4.31-4.84 โดยปริมาตร และมีค่า Yield (p/s) อยู่ระหว่าง 0.28-0.43 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลอย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบผลเอทานอลที่ได้จากการรายงานการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดย *Z. mobilis* โดยทัชชา อ่อนสร้อย (2551) ซึ่งให้ค่า Yield (p/s)

สูงสุด 0.41 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล แต่เป็นการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นถึงร้อยละ 10 โดยปริมาตร ซึ่งจะเห็นว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้ใกล้เคียงกับ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU แต่ถึงอย่างไรก็ตาม *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ย่อมมีข้อได้เปรียบเนื่องจากไม่จำเป็นต้องผ่านกระบวนการย่อยน้ำคั้นหัวแก่นตะวันด้วยกรดหรือเอนไซม์ก่อนดังเช่นการหมักด้วย *Z. mobilis* และภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ (2551) ได้รายงานการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดย *S. cerevisiae* ซึ่งถือว่าเป็นยีสต์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลในปัจจุบัน ซึ่งผลได้เอทานอลอยู่ในช่วง 0.36-0.50 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งถือว่ามีค่าไม่แตกต่างกับการหมักโดย *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU แต่อย่างไรก็ตาม *S. cerevisiae* ไม่สามารถหมักน้ำคั้นหัวแก่นตะวันได้โดยตรงต้องผ่านการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ก่อนการหมัก นอกจากนั้นยังเป็นการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่ง *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ยังถือว่าได้เปรียบเพราะสามารถหมักที่อุณหภูมิ 40 และ 45 องศาเซลเซียสได้

5.1.3 อิทธิพลของน้ำตาลเริ่มต้นต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

ผลของน้ำตาลเริ่มต้นที่ระดับ 50, 100, 150 และ 200 กรัมต่อลิตรต่อการหมักเอทานอลอย่างไรก็ตามเมื่อเจือจางระดับน้ำตาลในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันให้ต่ำลงไม่เพียงแต่น้ำตาลที่ถูกเจือจางสารอาหารอื่นๆ ก็จะถูกเจือจางด้วยเช่นเดียวกันนี่เป็นปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้แต่อย่างไรก็ตามผลการทดลองได้แสดงให้เห็นว่า เมื่อน้ำตาลเพิ่มขึ้นจาก 50 เป็น 100 และ 150 กรัมต่อลิตร การเจริญของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกันแต่ที่ระดับน้ำตาล 200 กรัมต่อลิตร การเจริญใกล้เคียงกับที่ระดับ 150 กรัมต่อลิตร ส่วนการใช้น้ำตาลลดลงเมื่อระดับน้ำตาลเริ่มต้นเพิ่มขึ้น ส่วนการผลิตเอทานอลพบว่าสายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่า Yield (p/s) ที่น้ำตาลเริ่มต้น 100 และ 150 กรัมต่อลิตรไม่แตกต่างกันมีค่า 0.37-0.38 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งมากกว่าที่ระดับ 50 และ 200 กรัมต่อลิตร ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่น้ำตาลเริ่มต้น 150 และ 200 กรัมต่อลิตรมีค่า Yield (p/s) ไม่แตกต่างกันมีค่า 0.37-0.39 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งมากกว่าที่ระดับ 50 และ 100 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากผลการทดลองถือว่าปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นที่ให้ Yield (p/s) สูงสุด ยังต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันโดย *K. marxianus* UCD (FST) 55-82 ค่า Yield (p/s) สูงสุดที่น้ำตาลเริ่มต้น 300 กรัมต่อลิตร เท่ากับ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล แต่เป็นการหมักที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (Mararitis and Bajpai, 1982) ดังนั้นจึงน่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะทดสอบอิทธิพลของน้ำตาลเริ่มต้นมากกว่าที่ระดับ 150 กรัมต่อลิตรที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสหากมีการศึกษาในครั้งต่อไป แต่อย่างไรก็ตามถือว่าสอดคล้องกับน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับ *K. marxianus* DMKU3-1042 ที่หมักในน้ำอ้อยที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสซึ่งให้ Yield (p/s) สูงสุดที่น้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร (Limtong et al., 2007) และสอดคล้องกับการ

ทดลองของ Yuan W.J. et al. (2008)[3] ที่พบว่า *K. marxianus* ATCC8554 ที่น้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 200 กรัมต่อลิตรให้ผลเอทานอลสูงสุดมีค่า Yield (p/s) เท่ากับ 0.47 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล และเมื่อเปรียบเทียบกับ *Z. mobilis* ถือว่า *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ความเข้มข้นน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมต่ำกว่า *Z. mobilis* ซึ่งน้ำตาลเริ่มต้นที่เหมาะสมซึ่งให้ค่า Yield (p/s) สูงสุดที่ความเข้มข้น 250 กรัมต่อลิตร (ทัชชา อ่อนสร้อย, 2551) จากการรายงานการทดลองทั้งหมดที่ได้กล่าวมามีการทดสอบน้ำตาลเริ่มต้นสูงกว่าที่ระดับ 200 กรัมต่อลิตร และจะเห็นอิทธิพลของน้ำตาลต่อการหมักที่ชัดเจนเมื่อน้ำตาลเริ่มต้นมากกว่าระดับ 200 กรัมต่อลิตรในการศึกษาครั้งต่อไปอาจจะต้องเพิ่มระดับน้ำตาลเริ่มต้นที่ความเข้มข้นมากกว่า 200 กรัมต่อลิตร

5.1.4 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญและการใช้น้ำตาลของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นการเจริญและการใช้น้ำตาลจะลดลงแต่อุณหภูมิช่วง 35-45 องศาเซลเซียสไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอลซึ่งมีค่า Yield (p/s) อยู่ระหว่าง 0.34-0.39 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล นอกจากนั้นที่อุณหภูมิสูงยังช่วยส่งเสริมให้มีการผลิตเอทานอลของเซลล์เพิ่มขึ้นซึ่งเห็นได้จาก Yield (p/x) ที่เพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการหมักเอทานอลโดย *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ทั้ง 10 สายพันธุ์ใน YP+2% Glucose ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งอุณหภูมิเพิ่มขึ้นการเจริญลดลง แต่การผลิตเอทานอลพบว่าความเข้มข้นสูงสุดเฉลี่ยร้อยละ 0.79 และ 0.77 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียสตามลำดับซึ่งใกล้เคียงกันมาก (Sutthikhampa et al., 2010) แต่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *K. marxianus* DMKU3-1042 ผลิตเอทานอลใกล้เคียงกันที่อุณหภูมิ 37 และ 40 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส การผลิตเอทานอลจะลดลง (Limtong et al., 2007) มีการใช้เทคโนโลยีทางด้านพันธุวิศวกรรมมาพัฒนาสายพันธุ์ *S. cerevisiae* ซึ่งถือว่าเป็นโมเดลยีสต์ให้มีคุณสมบัติในการทนต่ออุณหภูมิสูงเช่น Shahsavarani et al. (2013) ได้หมักเอทานอลแบบ semi-simultaneous saccharification and fermentation ด้วยวัสดุเซลลูโลสโดย *S. cerevisiae* TJ14 ที่อุณหภูมิสูง (39 องศาเซลเซียส) ซึ่งเซลลูโลส 100 กรัมโดยน้ำหนักต่อลิตร (g(w/v)/l) ผลิตเอทานอลได้ 45 กรัมต่อลิตร แต่ถึงอย่างไรก็ตามยังถือว่าอุณหภูมินั้นยังต่ำกว่าอุณหภูมิที่ยีสต์สกุล *K. marxianus* สามารถเจริญและผลิตเอทานอลได้ และเมื่อพิจารณาการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 250 กรัมต่อลิตรโดย *Z. mobilis* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสจากการรายงานของ Thanonkeo et al. (2011) แล้วพบว่าค่า Yield (p/s) สูงกว่าการหมักของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ที่น้ำตาลเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตรจากการศึกษาครั้งนี้แต่อย่างไรก็ตามพวกเขาได้ทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคสด้วยเชื้อ *Z. mobilis* ที่คัดแยกในประเทศไทย 4 สายพันธุ์

แล้วพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการหมักเอทานอลของ *Z. mobilis* อยู่ที่ 30-35 องศาเซลเซียส เท่านั้น

5.1.5 อิทธิพลของพีเอชต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

สายพันธุ์ UBU-1-2 ที่พีเอช 4.5 มีการเจริญสูงที่สุดซึ่งมีค่า OD_{590} สูงกว่าที่พีเอชอื่นๆ แต่ค่ายังน้อยกว่าน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ไม่มีการปรับพีเอช และนอกจากนั้นมีการใช้น้ำตาลร้อยละ 87.66±1.57 ซึ่งใกล้เคียงกับพีเอช 5.0 ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 ที่พีเอช 5.5 เจริญได้ดีที่สุดในช่วง พีเอช 5.0-6.0 ส่วนที่พีเอช 4.5 มีการใช้น้ำตาลไม่แตกต่างจากพีเอช 5.5 ซึ่งสูงกว่าพีเอชอื่นๆ พีเอชในช่วง 4.5-6.0 ไม่มีผลต่อการผลิตเอทานอลของทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่า Yield (p/s) อยู่ในช่วง 0.44-0.49 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 มีค่า Yield (p/s) อยู่ในช่วง 0.31-0.35 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน โดย *S. cerevisiae* หมักที่พีเอชเริ่มต้น 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยพีเอชไม่มีผลต่อปริมาณเอทานอลที่หมักโดย *S. cerevisiae* ซึ่งมีค่า Yield (p/s) อยู่ระหว่าง 0.39-0.44 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล (Thuesombat et al., 2007) แต่การทดลองของ ภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ (2551) รายงานการทดสอบอิทธิพลของพีเอชต่อการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* ที่พีเอช 5.0-6.0 Yield (p/s) ไม่แตกต่างกันมีค่าอยู่ระหว่าง 0.40-0.42 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล แต่ที่พีเอช 4.5 มีค่า Yield (p/s) เพียง 0.36 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล อย่างไรก็ตามปริมาณเอทานอลที่ได้ใกล้เคียงกันมีค่าระหว่าง 72.29-76.29 กรัมต่อลิตร และยังไม่สอดคล้องกับรายงานการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการหมักเอทานอลจากแก่นตะวันด้วย *K. marxianus* ATCC8554 ในสภาพไร้อากาศโดย Yuan W.J. et al. (2008)[3] ทดสอบพีเอชช่วง 3.8-5.0 ซึ่ง เอทานอลผลิตได้สูงสุดที่พีเอช 4.6 จากการทดลองในครั้งนี้ช่วงพีเอช 4.5-6.0 ไม่มีผลต่อการหมักเอทานอล อาจเนื่องมาจากยีสต์เจริญดีที่พีเอชค่อนข้างกว้างซึ่งยีสต์เจริญดีที่ พีเอชระหว่าง 3.5 ถึง 6.5 โดยพีเอชมีผลต่อกิจกรรมทางชีววิทยาของยีสต์น้อยเพราะเซลล์สามารถควบคุมความเข้มข้นของไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ได้อย่างดีเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายนอกเซลล์ (สาวิตรี ลิ่มทอง, 2549) จากการที่พีเอชลดลงระหว่างการหมักนั้นสอดคล้องกับการหมักเอทานอลจากผงแก่นตะวันที่น้ำตาลเริ่มต้น 180 กรัมต่อลิตร โดย *S. cerevisiae* KCCM50549 ซึ่งเมื่อเวลาผ่านไปพีเอชระหว่างการหมักจะลดลง โดยผลิตเอทานอลสูงสุด 36.2 กรัมต่อลิตรที่เวลา 36 ชั่วโมง (Lim et al., 2011)

5.1.6 อิทธิพลของการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มเข้นร้อยละ 0.025-0.1 โดยน้ำหนักไม่มีผลต่อการเจริญในทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่งสายพันธุ์ UBU-1-2 ที่แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.1

โดยน้ำหนักใช้น้ำตาลได้มากกว่าระดับอื่นๆ แต่สายพันธุ์ UBU-1-8 ที่แอมโมเนียมซัลเฟตเข้มข้นร้อยละ 0.025-0.05 โดยน้ำหนัก ใช้น้ำตาลได้มากที่สุด แต่การเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.025-0.1 โดยน้ำหนักไม่มีผลต่อการหมักเอทานอลในทั้ง 2 สายพันธุ์ เมื่อพิจารณาจากค่า Yield (p/s) ซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 0.19-0.26 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ (2551) รายงานการทดสอบอิทธิพลของแอมโมเนียมซัลเฟตต่อการหมักเอทานอลของ *S. cerevisiae* ในน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.25, 0.50, 0.75 และ 0.1 โดยน้ำหนัก ซึ่งไม่มีผลต่อการหมักเอทานอลเมื่อเปรียบเทียบกับการหมักที่ไม่มีการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งมีค่า Yield (p/s) อยู่ในช่วง 0.34-0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล นอกจากนั้นการเติมแหล่งไนโตรเจนอื่นๆเช่น ยูเรีย แอมโมเนียมไนเตรท และ ไดแอมโมเนียมฟอสเฟตที่ความเข้มข้นต่างๆยังไม่มีผลต่อการหมักเอทานอลแต่การเติม แอมโมเนียมไนเตรทกลับให้ปริมาณเอทานอลสูงกว่าแหล่งอื่นๆ นอกจากนั้น Limtong et al. (2007) ทดสอบการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นร้อยละ 0-0.1 โดยน้ำหนักซึ่งหมักน้ำอ้อยด้วย *K. marxianus* DMKU3-1042 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่ามีผลผลิตเอทานอล Yield (p/s) คิดเป็นร้อยละ 55.4-58.8 จากทฤษฎี (น้ำตาล 1 กรัมสามารถเปลี่ยนเป็นเอทานอลได้ 0.511 กรัม) เนื่องจากไนโตรเจนในน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน มีเพียงพอต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลจึงอาจจะไม่ต้องเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มเติมแต่จากผลการทดลองของ ภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ ทำให้เห็นว่าการเติมแอมโมเนียมไนเตรทส่งเสริมการผลิตเอทานอลได้ถึงแม้ว่าระดับความเข้มข้นจะไม่มีผลต่อการหมักเอทานอลก็ตามซึ่งมีค่า Yield (p/s) 0.45-0.50 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจหากมีการศึกษาแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ มากกว่านี้เพื่อที่จะส่งเสริมให้มีการผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้น

5.1.7 อิทธิพลของการเติมสารสกัดจากยีสต์ต่อการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวัน

การเติมสารสกัดจากยีสต์ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.5-2.5 โดยน้ำหนักช่วยส่งเสริมการเจริญของยีสต์ทั้ง 2 สายพันธุ์ให้มีการเจริญเพิ่มขึ้นและยังช่วยส่งเสริมให้เกิดการใช้น้ำตาลได้เร็วขึ้นโดยสายพันธุ์ UBU-1-2 ที่สารสกัดจากยีสต์เข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยน้ำหนัก ใช้น้ำตาลได้มากกว่าระดับอื่นๆ แต่สายพันธุ์ UBU-1-8 ที่สารสกัดจากยีสต์เข้มข้นร้อยละ 1.5 โดยน้ำหนัก ใช้น้ำตาลได้มากที่สุด ในขณะที่การเติมสารสกัดจากยีสต์ร้อยละ 2.5 โดยน้ำหนักมีปริมาณเอทานอลมากที่สุดในทั้ง 2 สายพันธุ์แต่เมื่อพิจารณาที่ค่า Yield (p/s) พบว่าการเติมสารสกัดจากยีสต์ทุกระดับความเข้มข้นให้ค่า Yield (p/s) ใกล้เคียงกัน สายพันธุ์ UBU-1-2 มีค่าอยู่ที่ 0.20-0.29 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ในขณะที่สายพันธุ์ UBU-1-8 มีค่าอยู่ที่ 0.18-0.29 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งมีการกล่าวว่าสารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) เมื่อเติมลงไปในอาหารสำหรับหมักมีผลให้การยับยั้งเนื่องจาก

แรงดันออสโมซีสลดน้อยลง (Panchal, 1990) ทำให้ประสิทธิภาพในการใช้น้ำตาล และผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน การทดลองนี้มีแนวโน้มเดียวกันกับการทดสอบการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักเอทานอลแบบ very high gravity (VHG) โดย *S. cerevisiae* โดยเติมสารสกัดจากยีสต์ และเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการ autolysis ให้ได้ไนโตรเจน 0.141 โมลต่อลิตรเทียบกับชุดควบคุมที่เติมสารสกัดจากยีสต์ที่มีไนโตรเจนเริ่มต้น 0.049 โมลต่อลิตรซึ่งพบว่าเมื่อเติมสารสกัดจากยีสต์ปริมาณเอทานอล และการใช้น้ำตาลเพิ่มมากขึ้นจากชุดควบคุม 85 กรัมต่อลิตรเป็น 103 กรัมต่อลิตร แต่ค่า yield กลับไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนการเติมเซลล์ยีสต์ที่ผ่านการ autolysis การผลิตเอทานอลและการใช้น้ำตาลไม่แตกต่างจากการเติมสารสกัดจากยีสต์ (Bafrncova et al., 1999) เช่นเดียวกับการหมักเอทานอลจาก whey ที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 100 กรัมต่อลิตร โดย *K. marxianus* ทดสอบอิทธิพลของสารสกัดจากยีสต์เปรียบเทียบกับแอมโมเนียมซัลเฟตและการเติมสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟตซึ่งพบว่าการหมักที่มีการเติมสารสกัดจากยีสต์ เจริญมากที่สุดและใกล้เคียงกับการเติมสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับแอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งทั้งสองมีการเจริญได้ดีกว่าการเติมเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟต (Parrondo et al., 2009) ในการศึกษาการเติมสารสกัดจากยีสต์นั้นการศึกษาทดลองครั้งต่อไปอาจจะต้องทดสอบการเติมสารสกัดจากยีสต์ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เพื่อพัฒนาการหมักเอทานอลให้มีประสิทธิภาพและได้ผลผลิตเอทานอลที่สูงขึ้น

5.1.8 การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร

สายพันธุ์ UBU-1-2 เจริญอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาเพียง 18 ชั่วโมงจากนั้นการเจริญเริ่มจะคงที่ มีการใช้น้ำตาลไปร้อยละ 73.26±2.16 และผลิตเอทานอลสูงสุดเข้มข้นร้อยละ 8.46±0.40 โดยปริมาตร ที่เวลา 78 ชั่วโมงซึ่งคิดเป็นค่า Yield (p/s) 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลเท่ากับร้อยละ 93.93 ตามทฤษฎี ส่วนสายพันธุ์ UBU-1-8 เจริญอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาเพียง 18 ชั่วโมงเช่นเดียวกันจากนั้นการเจริญเริ่มจะคงที่ มีการใช้น้ำตาลไปร้อยละ 81.16±3.84 และผลิตเอทานอลสูงสุดเข้มข้นร้อยละ 7.72±0.67 โดยปริมาตร ที่เวลา 78 ชั่วโมงซึ่งคิดเป็นค่า Yield (p/s) 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล ซึ่งเท่ากับร้อยละ 88.06 ตามทฤษฎี

ซึ่งถือว่าค่า Yield (p/s) ที่ได้ต่ำกว่าการหมักเอทานอลจากหัวแก่นตะวันโดย *K. cicerisporus* ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่ใช้น้ำตาลเริ่มต้นความเข้มข้น 220 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการคนกวน 300 รอบต่อนาทีในสภาวะไร้ออกซิเจนพบว่า ผลิตเอทานอลได้สูงสุดเข้มข้นร้อยละ 12.30 โดยปริมาตร ที่เวลา 144 ชั่วโมง คิดเป็นร้อยละ 96.9 ตามทฤษฎี และมีการใช้น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 93.6 (Yu et al., 2010) แต่ก็ถือว่า *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU ได้เปรียบในเรื่องของการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูง แต่ผลการทดลองนี้ก็ใกล้เคียงกับการหมักเอทานอลจาก

หัวแก่นตะวันโดย *K. marxianus* YX01 หมักในถังหมักขนาด 2.5 ลิตรพบว่าการให้อากาศในระบบทำให้การผลิตเอทานอลลดลงในการหมักครั้งนี้ใช้น้ำตาล 235 กรัมต่อลิตร ผลิตเอทานอลได้สูงสุดในสภาวะที่ไม่มีอากาศซึ่งผลิตเอทานอล 92.2 กรัมต่อลิตร คิดเป็น 0.44 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลหรือร้อยละ 85.5 ตามทฤษฎี (Yuan et al.,2008[b]) ซึ่งถือว่า Yield (p/s) ใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้ ภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ (2551) ทดสอบการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันจาก *S. cerevisiae* ในถังหมักขนาด 5 ลิตรที่มีน้ำตาลเริ่มต้น 316.50 กรัมต่อลิตร อัตราการกวน 100 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าใช้น้ำตาลไป 274.44 กรัมต่อลิตร และผลิตเอทานอลสูงสุด 114.42 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมงซึ่งคิดเป็นค่า Yield (p/s) 0.42 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาล หรือเท่ากับร้อยละ 82.35 ตามทฤษฎี ซึ่งถือว่าค่า Yield (p/s) ใกล้เคียงกับการทดลองในครั้งนี้นอกจากนั้น ทัชชา อ่อนสร้อย (2551) ทดสอบการหมักเอทานอลจาก *Z. mobilis* ในถังหมักขนาด 5 ลิตรโดยมีน้ำตาลเริ่มต้น 253 กรัมต่อลิตร พีเอชเริ่มต้น 5.0 และปริมาณเชื้อเริ่มต้นเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร พบว่ามีการใช้น้ำตาลไป 186.26 กรัมต่อลิตร และผลิตเอทานอลได้สูงสุด 75.79 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 36 ชั่วโมงซึ่งคิดเป็นค่า Yield (p/s) 0.41 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลหรือเท่ากับร้อยละ 79.85 ตามทฤษฎี ซึ่งน้อยกว่าการทดลองในครั้งนี้ถึงแม้ว่าการหมักของ *Z. mobilis* จะเกิดขึ้นได้เร็วกว่า *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU แต่การใช้ยีสต์ในสกุล *K. marxianus* มีความเหมาะสมในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงเนื่องจากสามารถหมักได้โดยตรงไม่ต้องผ่านการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ก่อนเหมือนดั่งเช่นการหมักด้วย *S. cerevisiae* และ *Z. mobilis*

5.2 ข้อเสนอแนะในการทดลองครั้งต่อไป

เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้มีข้อจำกัดในเรื่องของระยะเวลาและงบประมาณจึงยังมีอีกหลายปัจจัยที่ยังไม่ได้ทำการศึกษา เช่น การเติมอากาศในปริมาณที่เหมาะสม ปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสม รวมถึงการทดสอบแหล่งไนโตรเจนที่หลากหลายกว่าแอมโมเนียมซัลเฟตหรือสารสกัดจากยีสต์ เช่น แอมโมเนียมไนเตรท ที่มีการรายงานว่าช่วยส่งเสริมการผลิตเอทานอลสูงกว่าแหล่งไนโตรเจนอื่นๆ เป็นต้น ดังนั้นหากจะมีการศึกษาต่อยอดปัจจัยเหล่านี้จึงมีความน่าสนใจในการนำมาศึกษาเนื่องจากปัจจัยเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอล

และหากมีการศึกษาทดลองขั้นต่อไปอาจจะต้องมีการวิเคราะห์องค์ประกอบภายในหัวแก่นตะวันให้มากกว่าแค่ปริมาณน้ำตาลหรือไนโตรเจนทั้งหมด อาจจะต้องวิเคราะห์สารอื่นๆ ด้วยเพราะองค์ประกอบอื่นๆก็มีผลต่อการหมักเช่นเดียวกันแต่เนื่องจากข้อจำกัดด้านงบประมาณและเวลาการทดลองครั้งนี้จึงวิเคราะห์เพียงบางองค์ประกอบเท่านั้น

เอกสารอ้างอิง

เอกสารอ้างอิง

กระทรวงพลังงาน. "แก๊สโซฮอล์", กระทรวงพลังงาน. http://www.energy.go.th/index.php?q=node/384. มกราคม, 2556.

กรมพัฒนาพลังงานทดแทนและอนุรักษ์พลังงานกระทรวงพลังงาน. แผนพัฒนาพลังงานทดแทน 15 ปี. http://www.enconfund.go.th/pdf/index/REDP_15_yrs.pdf. มกราคม, 2556.

กรมโรงงานอุตสาหกรรม. คู่มือความปลอดภัยทางชีวภาพสำหรับโรงงานที่ใช้จุลินทรีย์ดัดแปลงพันธุกรรมอุตสาหกรรมผลิตเอทิลแอลกอฮอล์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์บริษัท พี.เอ. ลีฟวิ่ง จำกัด, 2555.

ชุติมา ศรีงิ้ว. การผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงจากน้ำอ้อยโดยยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2548.

ทัชชา อ่อนสร้อย. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอทานอลจากน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันโดยใช้ *Zymomonas mobilis* TISTR 548 ด้วยวิธีการหมักแบบกะ. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2551.

ประภาส ช่างเหล็ก และคณะ. "การเจริญเติบโตและผลผลิต Jerusalem artichoke บนพื้นที่สูง ณ สถานีวิจัยเพชรบูรณ์", ใน การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตบางเขน ครั้งที่ 48. น.200-206. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2553.

พงษ์เทพ อริยเจริญวงศ์, ลักขณา เหล่าไพบูลย์ และพัฒนา เหล่าไพบูลย์. "กลยุทธ์การผลิตเอทานอลความเข้มข้นสูงของยีสต์โดยกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ", วารสารศูนย์บริการวิชาการ. 18(1) : 31-36 ; มกราคม-มีนาคม, 2553.

พรรณนีย์ วิชชาชู. "มันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล", มันสำปะหลังเพื่อผลิตเอทานอล. http://web.sut.ac.th/cassava/?name=11cas_research&file=readknowledge&id=57. เมษายน, 2556.

ภัควิรุฬห์ ถือสมบัติ. ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการหมักเอทานอลแบบกะจากน้ำคั้นจากหัวแก่นตะวันโดย *Saccharomyces cerevisiae* TISTR 5048. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2551.

ลภัสรดา มุ่งหมาย. การเพาะเลี้ยงและการหาลักษณะเฉพาะเชิงโมเลกุลด้วยเทคนิค อาร์เอพีดีของสาหร่ายกินได้บางชนิดจากแม่น้ำน่าน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต : มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2549.

วราวุฒิ ครูส่ง. เทคโนโลยีชีวภาพ. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, 2529.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

ศิริพร ตันจอ, และคณะ. "อินูลินและฟรุกโตโอลิโกแซ็กคาไรท์ในแก่นตะวันสายพันธุ์ต่างๆ", KKU Res.J. 17(1) : 25-34 ; มกราคม-กุมภาพันธ์, 2555.

สนม โนนกลาง. "ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทรานสฟอร์มเมชั่นดีเอ็นเอเส้นตรงในยีสต์ *Kluyveromyces marxianus* UBU-1-1", ใน การประชุมทางวิชาการ มอบ.วิจัยครั้งที่ 5. น.511-517. อุบลราชธานี : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2554.

สาวิตรี ลิ่มทอง. ยีสต์และยีสต์เทคโนโลยี. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2540.

_____. ยีสต์: ความหลากหลายและเทคโนโลยีชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2549.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล และคณะ. "การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์อินูลิเนส", ใน การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 42. น.362-369. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2547.

อัตถ์ อัจฉริยมนตรี. ศักยภาพการให้ผลผลิตและลักษณะการเจริญเติบโตของแก่นตะวัน (*Helianthus tuberosus*) ในสภาพเกษตรอินทรีย์. รายงานต่อกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2555.

Apiradee Sripiromrak. Isolation and characterization of thermotolerant yeast for ethanol production. Master thesis: Suranaree University of Technology, 2006.

Anderson, P.J., Mcneil, K. and Watson, K. "High-Efficiency Carbohydrate Fermentation of Ethanol at Temperature above 40°C by *Kluveromyces marxianus* var. Isolated from Sugar Mills", Appl. Environ. Microbiol. 51(6): 1314-1320; June, 1986.

Andriy, Y. and et al. "Development of strains of the thermotolerant yeast *Hansenula polymorpha* capable of alcoholic fermentation of starch and xylan", Metab. Eng. 11(4): 234-242; July-September, 2009.

Bafrncová, P. and et al. "Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*", Biotechnol Lett. 21(4): 337-341; April, 1999.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Bajpai, P. and Margaritis, A. "Ethanol inhibition kinetics of *Kluyveromyces marxianus* grown on Jerusalem artichoke juice", Appl. Environ. Microbiol. 44(6): 1325-1329; December, 1982.

Bonciu, C., Tabacaru, C. and Bahrim G. "Yeast isolation and selection for bioethanol production from inulin hydrolysates", Innovative Romanian Food Biotechnology. 6: 29-34; March, 2010.

Boughida, N. Effect of Inulin on the Survival of Lactic Acid and Probiotic Bacteria in Ice Cream. Master thesis: Wisconsin: University of Wisconsin-Stout, 2011.

Brian, A. F., Mark, R. W. and Ibrahim M. B. "Ethanol production through simultaneous saccharification and fermentation of switchgrass using *Saccharomyces cerevisiae* D5A and thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* IMB strains", Bioresour. Technol. 101(7): 2273-2279; April, 2010.

Brown, S.W. and et al. "Ethanol inhibition of yeast growth and fermentation: Differences in the magnitude and complexity of the effect", Appl. Microbiol. Biotechnol. 11(3): 151-155; September, 1981.

Byun, S.M. and Nahm, B.H. "Production of fructose from Jerusalem artichoke by enzyme hydrolysis", J. Food Sci. 43(6): 1871-1973; November, 1978.

Casey, G.P. and Ingledew, W.M. "Reevaluation of Alcohol Synthesis and Tolerance in Brewer's Yeast", ASBC J. 43(2): 75-83,1985.

Cazetta, M.L., Monti, R., and Contiero, J. "Effects of culture conditions on the production of inulinase by *Kluyveromyces marxianus*", Braz. arch. biol. technol. 53(3): 701-707; May-June, 2010.

Cazetta, M.L. and Contiero, J. "Influence of nitrogen source and sucrose concentration on inulinase production by *Kluyveromyces marxianus* in fed-batch fermentation", African J. Biotech. 10(56): 12012-12017; September, 2011.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Chang, B. and et al. "Ethanol production from Jerusalem artichoke juice using self-flocculating yeast", in Annual Meeting and Exhibition 2008. p.22-23. Sandiego: Society for Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008.

Charoensopharat, K., Thanonkeo, S. and Thanonkeo, P. "Isolation and characterization of thermotolerant yeast for bioethanol production from Jerusalem artichoke", Journal of Biotech. 150: 140; November, 2010.

Fonseca, G.G. and et al. "The yeast *Kluyveromyces marxianus* and its biotechnological potential", Appl Microbiol Biotechnol. 79(3): 339-354; June, 2008

Ge, X.Y. and Zhang, W.G. "A shortcut to the production of high ethanol concentration from Jerusalem artichoke tubers", Food Tech Biotechnol. 43(3): 241-246; July-September, 2005.

Hu, N. and et al. "Thermotolerant *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae* strains representing potentials for bioethanol production from Jerusalem artichoke by consolidated bioprocessing", Appl. Microbiol. Biotechnol. 95(5): 1359-1368; September, 2012.

Jain, S.C., Jain, P.C. and Kango, N. "Production of inulinase from *Kluyveromyces marxianus* using Dahlia tuber extract", Braz. J. Microbiol. 43(1): 62-69; March, 2012.

Jones J.C. 2010. "Alcohol-containing fuels", Hydrocarbons Physical Properties and their Relevance to Utilization. http://bookboon.com/en/textbooks/chemistry-chemical engineering/hydrocarbons. January, 2013.

Koedrith, P. Identification and characterization of genes required for high temperature growth from a natural isolate of *Saccharomyces cerevisiae*. Doctor thesis: Mahidol University, 2007.

Lim, S.H. and et al. "Ethanol fermentation from Jerusalem artichoke powder using *Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549 without pretreatment for inulin hydrolysis", Bioresour. Technol. 102(2): 2109-2111; January, 2011.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Limtong, S., Sringiew, C. and Yongmanitchai, W. "Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marxianus*", Bioresour. Technol. 98(17): 3367-3374; December, 2007.

Margaritis, A. and Bajpai, P. "Effect of sugar concentration in Jerusalem artichoke extract on *Kluyveromyces marxianus* growth and ethanol production", Appl. Environ. Microbiol. 45(2): 723-725; February, 1983.

Miller, G.L. "Use of Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar", Analytical Chemistry. 31(3): 426-428; March, 1959.

Nonklang, S. and et al. "High-temperature ethanol fermentation and transformation with linear DNA in the thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* DMKU 3-1042", Appl. Environ. Microbiol. 74(24): 514-7521; December, 2008.

Ohta, K. and Hayashida, S. "Role of Tween 80 and Monoolein in a Lipid-Sterol-Protein Complex which Enhances Ethanol Tolerance of Sake Yeast", Appl. Enviro. Microbiol. 46(4): 821-825; October, 1983.

Onsoy, T. and et al. "Ethanol production from Jerusalem artichoke by *Zymomonas mobilis* in batch fermentation", KMITL Sci. Tech.J. 7(1): 55-60; November, 2007.

Panchal, C.J. 1990. Yeast Strain Selection. Vol.8. New York: Marcel Dekker Incorporated INC.

Parrondo, J., García, L.A., and Díaz, M. "Nutrient balance and metabolic analysis in a *Kluyveromyces marxianus* fermentation with lactose added whey", Braz. J.Chem. Eng. 26(3): 445-456; July-September, 2009.

Pukahuta, C. and et al. "Screening of thermotolerant yeast for ethanol production at 45°C", in The 3rd International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products with Joint Program. p.67-68. Khon Kaen : Khon Kaen University, 2009.

Reed, G. and Nagodawithana, T.W. 1991. Yeast Technology. 2 nd ed. New York: Van Nostrand Reinhold.

Roehr, M. The Biotechnology of Ethanol : Classical and Future Applications. Weinheim: WILEY-VCH, 2001.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

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

Shahsavarani, H. and et al. "Enhanced bio-ethanol production from cellulosic materials by semi-simultaneous saccharification and fermentation using high temperature resistant *Saccharomyces cerevisiae* TJ14", J Biosci Bioeng. 115(1): 20-23; January, 2013.

Sheng, J. and et al. "Purification and characterization of extracellular inulinase from a marine yeast *Cryptococcus aureus* G7a and inulin hydrolysis by the purified inulinase", Appl. Biochem.Biotechnol. 144(2): 111-121; February, 2008.

Singh, P. and Gill, P.K. "Production of inulinases: recent advances", Food Tech Biotechnol. 44(2): 151-162; April-June, 2006.

Singh, R.S., Sooch, B.S. and Puri, M. "Optimization of medium and process parameters for the production of inulinase from a newly isolated *Kluyveromyces marxianus* YS-1", Bioresour. Technol. 98 (13): 2518-2525; September, 2007.

Singh, R. S.and Bhermi, H. K. "Production of extracellular exoinulinase from *Kluyveromyces marxianus* YS-1 using root tubers of *Asparagus officinalis*", Bioresour. Technol. 99(15): 7418-7423; October, 2008.

Smart, K. Brewing Yeast Fermentation Performance. Weinheim: WILEY-VCH, 2000.

Stoke, J.L. "Influence of Temperature on Growth and Metabolism of Yeast", in Rose, A.H. and Harrison, J.S. Physiology and Biochemistry of Yeast. The Yeast. Vol.2. London: Academic Press, 1971.

Sutthikhampa, S. and et al. "Glucose and xylose utilization of thermotolerant yeasts, UBU-1", in The 2nd Joint Seminar in Asian Core Program (ACP). p.62-63, Khon Kaen: Khon Kaen University, 2010.

Swan, T. and Watson, K. "Membrane Fatty Acid Composition and Membrane Fluidity as Parameter of Stress Tolerance in Yeast", Can. J. Microbiol. 43(1): 70-77; January, 1997.

Szambelan, K., Nowak, J. and Czarnecki, Z. "Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fraggilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers", Biotechnol Lett. 26(10): 845-848; May, 2004.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

Thanonkeo, P. and et al. "Ethanol production from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) by *Zymomonas mobilis* TISTR548", AJB. 10(52): 10691-10697; September, 2011.

Thuesombat, P. and et al. "The batch ethanol fermentation of Jerusalem artichoke using *Saccharomyces cerevisiae*", KMITL. Sci.Tech. J. 7(2): 93-96; November, 2007.

Van Uden, N. "Temperature Profiles of Yeast", in Advances in microbial Physiology. Anthony, H. and Rose, D. W. p.195-251. vol. 25. London: Academic Press. 1985.

Walker, G.M. Yeast Physiology and Biotechnology. West Sussex: John Wiley and Sons Ltd, 1998.

Watson, K. and Cavicchioli, R. "Acquisition of Ethanol Tolerance in Yeast Cells by Heat Shock", Biotechnol Lett. 5(10): 683-688; October, 1983.

Watson, K. "Temperature relations", In: Rose, A.H.and Harrison, J.S. The Yeasts . Vol. 2, London: Academic Press, 1987.

Yu, J. and et al. "Simultaneous saccharification and fermentation of Jerusalem artichoke tubers to ethanol with an inulinase-hyperproducing yeast *Kluyveromyces cicerisporus*", Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 26(7): 982-90; July, 2010.

[a]Yuan, W. J. and et al. "Ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* from Jerusalem artichoke grown in saline and irrigated with a mixture of seawater and freshwater", J Appl Microbiol. 105(6): 2076-2083; December, 2008.

Yuan, W. J. and et al. "Consolidated bioprocessing strategy for ethanol production from Jerusalem artichoke tubers by *Kluyveromyces marxianus* under high gravity conditions", J Appl Microbiol. 112(1): 38-44; January, 2012.

[b]Yuan, W. and et al. "One-step ethanol fermentation with *Kluyveromyces marxianus* YX01 from Jerusalem artichoke", Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 24(11): 1931-1936; November, 2008.

Zhang, T. and et al. "Bioethanol production from hydrolysates of inulin and the tuber meal of Jerusalem artichoke by *Saccharomyces* sp.W0", Bioresour. Technol. 101(21): 8166-8170; November, 2010.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Yeast extract peptone dextrose agar (YPD agar)

สูตรอาหาร YPD agar 1 ลิตรมีส่วนประกอบดังนี้ (กรัม)

Yeast extract	10
Casein peptone	20
Dextrose	20
Agar	20

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตรให้ความร้อนจนวุ้นละลายแล้วแบ่งใส่ขวดเตรียมอาหารจากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

2. Yeast extract peptone dextrose broth (YPD broth)

สูตรอาหาร YPD broth 1 ลิตรมีส่วนประกอบดังนี้ (กรัม)

Yeast extract	10
Casein peptone	20
Dextrose	20

ผสมส่วนประกอบทั้งหมดเข้าด้วยกันเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร คนสารทั้งหมดให้ละลายแล้วแบ่งใส่ขวดรูปชมพู่จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

3. สารละลาย ฟีนอล ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยปริมาตร (5% phenol)

ชั่ง ฟีนอล 5 กรัมละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตรภายในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร แล้วนำเก็บในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4. สารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4.6 (sodium acetate buffer pH 4.6)

สารละลาย A : 0.2 M กรดอะซิติก (11.55 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M โซเดียมอะซิเตท ($C_2H_3O_2Na$ 16.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตร 1000 มิลลิลิตร หรือ $C_2H_3O_3 . 3H_2O$ 27.2 กรัมละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรเป็น 100

มิลลิลิตร) เมื่อต้องการพีเอช 4.6 ผสมสารละลาย A ปริมาตร 25.5 มิลลิลิตร กับสารละลาย B ปริมาตร 24.5 มิลลิลิตร จะได้พีเอชเท่ากับ 4.6

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดย phenol sulfuric acid method (ลภัสรดา มุ่งหมาย, 2549)

1.1 สารเคมี

สารละลายฟีนอลความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก

กรดซัลฟิวริกความเข้มข้นร้อยละ 96

1.2 วิธีการ

1.2.1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

1.2.1.1 ชั่งน้ำตาลฟรุกโตส 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรจะได้สารละลายน้ำตาลฟรุกโตสเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก

1.2.1.2 นำสารละลายน้ำตาลฟรุกโตสเข้มข้นร้อยละ1 โดยน้ำหนักมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก

1.2.1.3 เตรียมน้ำตาลให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008 และ 0.01 โดยน้ำหนักลงในหลอดทดลองดังตารางที่ ข1

ตารางที่ ข.1 การเตรียมสารละลายฟรุกโตสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลทั้งหมด

ความเข้มข้นน้ำตาล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ฟรุกโตสเข้มข้นร้อยละ 0.01 โดยน้ำหนัก (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
Blank	0	1000
0.002	200	800
0.004	400	600
0.006	600	400
0.008	800	200
0.01	1000	0

1.2.1.4 เติมฟีนอล 1 มิลลิลิตร จากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

1.2.1.5 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 96 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

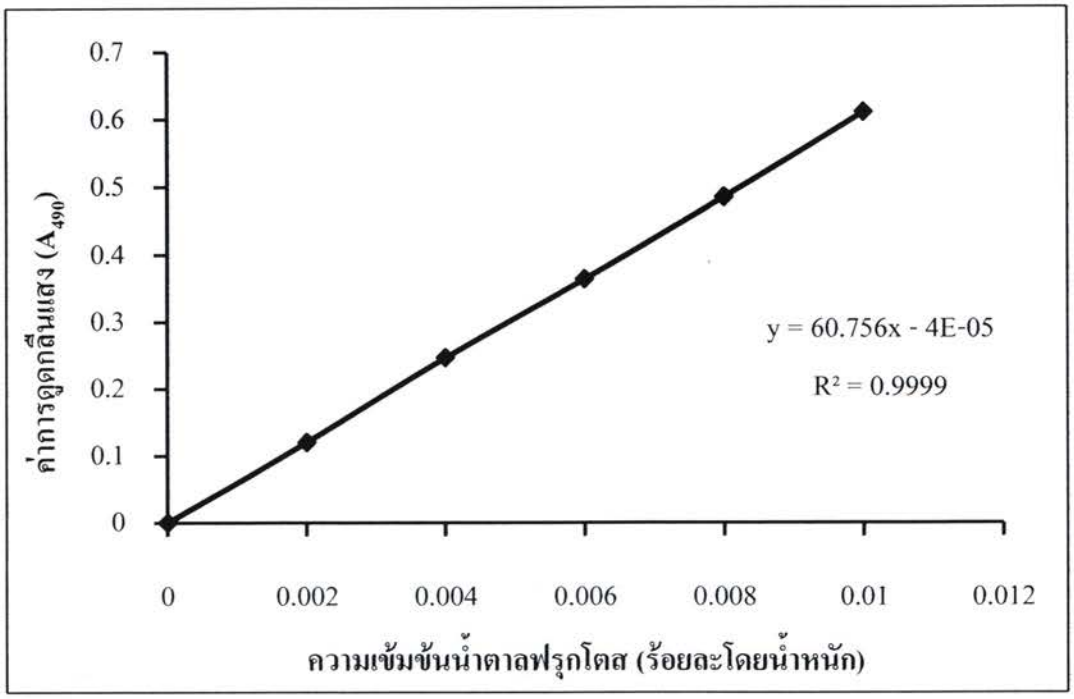
1.2.1.6 บ่มในที่มืด 40 นาที

1.2.1.7 วัดค่าการดูดกลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Perkin Elmer Lamda20, USA) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตรแล้วนำข้อมูลที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ ก1

ตารางที่ ข.2 ค่าการดูดกลืนแสง (A_{490}) ที่ความเข้มน้ำตาลระดับต่างๆ

ความเข้มข้นสารละลายฟรุกโตสมาตรฐาน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ค่าการดูดกลื่นแสง (A_{490})*
0.002	0.1200
0.004	0.2464
0.006	0.3635
0.008	0.4836
0.01	0.6090

* ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ



ภาพที่ ข.1 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยวิธี phenol sulfuric acid method

1.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

1.2.2.1 เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วใส่ตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง

1.2.2.2 เติมฟีนอลเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก ปริมาตร 1 มิลลิลิตร

1.2.2.3 เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นร้อยละ 96 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วเขย่าให้เข้ากัน

1.2.2.4 บ่มในที่มืด 40 นาที

1.2.2.5 วัดค่าการดูดกลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Perkin Elmer Lamda20, USA) ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

1.2.2.6 คำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมดโดยการเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธี dinitrosalicylic acid (DNS) (Miller, 1959)

2.1 สารเคมี

สารละลาย DNS : ละลาย กรด 3,5-ไดไนโตรซาลิไซลิก (DNS) 2.5 กรัม ใน 2N โซเดียมไฮดรอกไซด์ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วเติม โซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทรต 75 กรัม คนให้ละลายจากนั้นปรับปริมาตรให้ได้ 250 มิลลิลิตร

2.2 วิธีการ

2.2.1 การเตรียมสารละลายน้ำตาลมาตรฐาน

2.2.1.1 ชั่งน้ำตาลฟรุกโตส 1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตรจะได้สารละลายน้ำตาลฟรุกโตสเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก

2.2.1.2 นำน้ำตาลฟรุกโตสเข้มข้นร้อยละ 1 โดยน้ำหนักมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนัก

2.2.1.3 เตรียมน้ำตาลให้ได้ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.1 โดยน้ำหนักลงในหลอดทดลองดังตารางที่ ข3

2.2.1.4 เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตรเขย่าให้เข้ากัน

2.2.1.5 นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที

2.2.1.6 หลังจากต้มนำลงแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที 10 นาที

2.2.1.7 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

2.2.1.8 วัดค่าการดูดกลื่นแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Perkin Elmer Lamda20, USA) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

ตารางที่ ข.3 การเตรียมสารละลายฟรุกโตสมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์

ความเข้มข้นน้ำตาล (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ฟรุกโตสเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยปริมาตร (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)
Blank	0	1000
0.02	200	800
0.04	400	600
0.06	600	400
0.08	800	200
0.1	1000	0

ตารางที่ ข.4 ค่าการดูดกลืนแสง (A_{540}) ที่ความเข้มข้นน้ำตาลระดับต่างๆ

ความเข้มข้นสารละลายน้ำตาลฟรุกโตสมาตรฐาน (ร้อยละโดยน้ำหนัก)	ค่าการดูดกลื่นแสง (A_{540})*
0.02	0.0655
0.04	0.1430
0.06	0.2160
0.08	0.2865
0.1	0.3590

* ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ

2.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

2.2.2.1 เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมใช้ตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตรลงใส่ในหลอดทดลอง

2.2.2.2 เติมสารละลาย DNS 1 มิลลิลิตรจากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

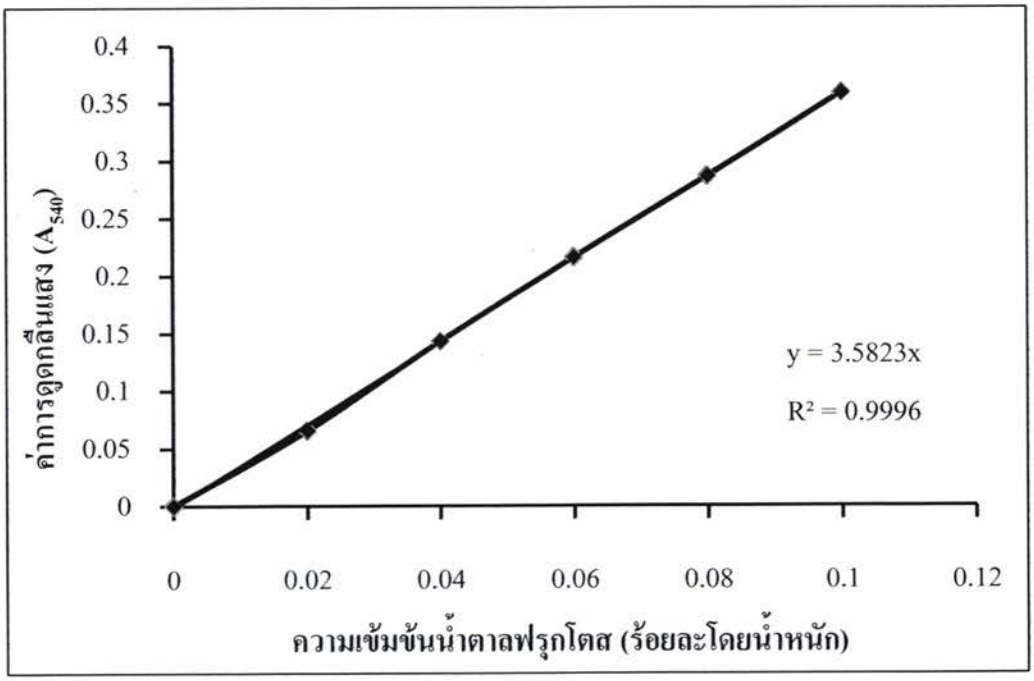
2.2.2.3 นำไปต้มในน้ำเดือด 10 นาที

2.2.2.4 หลังจากต้มนำลงแช่ในอ่างน้ำแข็งทันที 10 นาที

2.2.2.5 เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร

2.2.2.6 วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer (Perkin Elmer Lamda20, USA) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.2.2.7 คำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยเทียบกับกราฟน้ำตาลมาตรฐาน



ภาพที่ ข.2 กราฟมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS

3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนส (Yuan et al., 2008)

3.1 สารเคมี

ตัวอย่างน้ำหมัก (crude enzyme)

สารละลาย DNS

อินูลินความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตร ที่ละลายในสารละลายโซเดียมอะซิเตท บัฟเฟอร์พีเอช 4.6

3.2 วิธีการ

3.2.1 การทดลอง A

3.2.1.1 เติมอินูลินความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรในสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4.6 ลงในหลอดเซ็นตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร 300 ไมโครลิตร

3.2.1.2 เติมตัวอย่างน้ำหมัก (crude enzyme) 300 ไมโครลิตร

3.2.1.3 ปั่นเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer

3.2.1.4 บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที

3.2.1.5 ปั่นเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer

3.2.1.6 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS

3.2.2 การทดลอง B

3.2.2.1 เติมน้ำกลั่นลงในหลอดเซ็นตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร 300 ไมโครลิตร

3.2.2.2 เติมตัวอย่างน้ำหมัก (crude enzyme) 300 ไมโครลิตร

3.2.2.3 ปั่นเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer

3.2.2.4 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS

3.2.3 การทดลอง C

3.2.3.1 เติมอินูลินความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรในสารละลายโซเดียมอะซิเตทบัฟเฟอร์พีเอช 4.6 ลงในหลอดเซ็นตริฟิวส์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร 300 ไมโครลิตร

3.2.3.2 เติมน้ำกลั่น300 ไมโครลิตร

3.2.3.3 ปั่นเขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer

3.2.3.4 วัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นโดยวิธี DNS

3.2.4 สูตร การคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนส

ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้น = (ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จาก การทดลอง A - ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จาก การทดลอง B) - ค่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จาก การทดลอง C จะได้ค่าสมมติเป็นค่าร้อยละโดยน้ำหนัก ..... (1)

สูตรการคำนวณกิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนส หาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่เกิดขึ้นจากค่าร้อยละที่ได้

ใน 100 มิลลิลิตรมีน้ำตาลรีดิวซ์ (1) กรัม

ถ้า 0.6 มิลลิลิตรมีน้ำตาลรีดิวซ์ ((1)×0.6)/100 .....(2) กรัม

จากนั้นเปลี่ยนหน่วยเป็นไมโครกรัม (2)×10^3 ..... (3) ไมโครกรัม

กิจกรรมของเอนไซม์อินูลินเนส = ((3) ไมโครกรัม/180.16)/20 นาที..... (4) ยูนิต

4. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง gas chromatography

4.1 สารเคมี

เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร

บิวทานอลเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร

น้ำกลั่น

4.2 วิธีการ

4.2.1 การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน

4.2.1.1 เตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ โดยการผสมสารดังตารางที่ ข5

ตารางที่ ข.5 การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์เอทานอลด้วยเครื่อง GC

เอทานอลเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร (ไมโครลิตร)	น้ำกลั่น (ไมโครลิตร)	บิวทานอลเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร (ไมโครลิตร)	เอทานอลเข้มข้น (ร้อยละโดยปริมาตร)
100	400	500	0.2
200	300	500	0.4
300	200	500	0.6
400	100	500	0.8
500	0	500	1.0

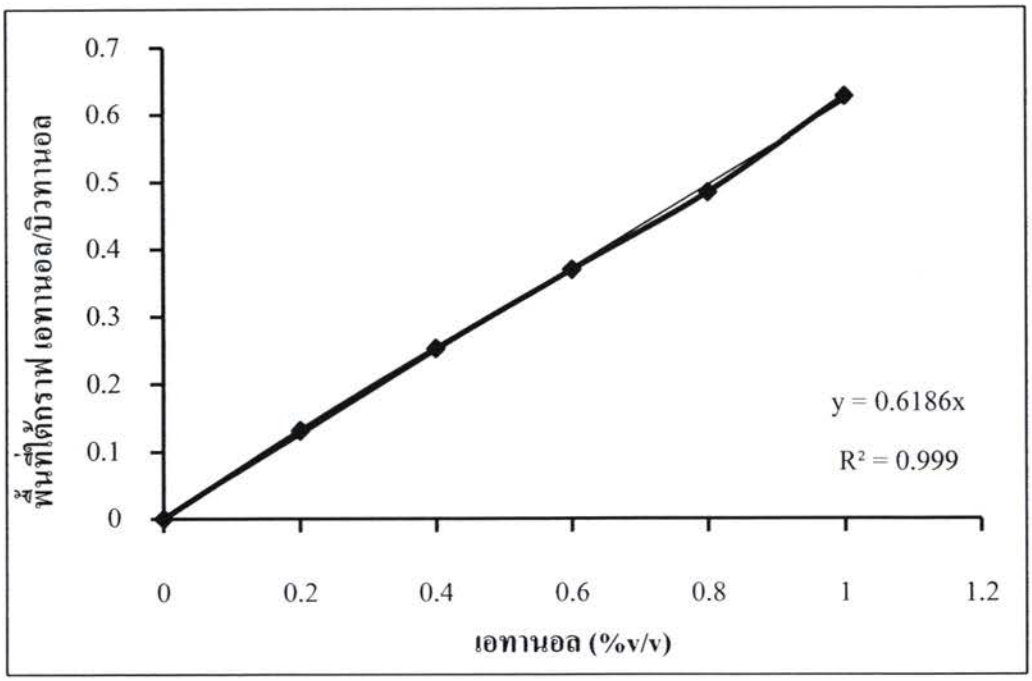
4.2.1.2 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง gas chromatography โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร โดยใช้สภาวะของเครื่อง column oven (100 องศาเซลเซียส) injection port (150 องศาเซลเซียส) และ detector (FID, 180 องศาเซลเซียส)

4.2.1.3 นำค่าพื้นที่ใต้กราฟที่ได้ในแต่ละความเข้มข้นของสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ ดังตารางภาคที่ ข6 มาสร้างกราฟมาตรฐานดังภาพที่ ข3

ตารางที่ ข.6 พื้นที่ใต้กราฟของสารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้นต่างๆ

เอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)	ซ้ำที่1		ซ้ำที่2		E/B		เฉลี่ย
	E*	B**	E	B	ซ้ำที่1	ซ้ำที่2	
0	0***	0	0	0	0	0	0
0.2	32149	237018	29977	236578	0.1356	0.1267	0.1312
0.4	59350	235698	59482	235371	0.2518	0.2527	0.2523
0.6	81038	219891	82366	223359	0.3685	0.3688	0.3686
0.8	105711	221116	106028	216770	0.4781	0.4891	0.4836
1.0	148993	238153	149385	238786	0.6256	0.6256	0.6256

*E = พื้นที่ใต้กราฟเอทานอล **B = พื้นที่ใต้กราฟบิวทานอล *** ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ



ภาพที่ ข.3 กราฟเอทาทานอลมาตรฐานที่ใช้คำนวณเอทานอลที่วิเคราะห์โดยเครื่อง GC

4.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

4.2.2.1 เจือจางตัวอย่างด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นเอทานอลที่เหมาะสม

4.2.2.2 ผสมตัวอย่าง 500 ไมโครลิตร กับบิวทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ปริมาตร 500 ไมโครลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน

4.2.2.3 วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง gas chromatography โดยฉีดตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตรโดยใช้สภาวะของเครื่อง column oven (100 องศาเซลเซียส) injection port (150 องศาเซลเซียส) และdetector (FID, 180 องศาเซลเซียส) แล้วนำข้อมูลคำนวณหาปริมาณเอทานอลจากกราฟมาตรฐาน

5. การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC)

การวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (Shimadzu, LC10vp Japan)โดยใช้ คอลัมน์ Shodex SC1011 (packing material: styrene divinylbenzene copolymer sulfo (Ca^{2+})) สภาวะที่ใช้คือ column oven (80 องศาเซลเซียส), detector (RID Detector), flow rate 1.0 มิลลิลิตรต่อนาที และใช้น้ำกลั่นเป็น mobile phase

5.1 สารเคมี

เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 10 โดยปริมาตร

น้ำกลั่น

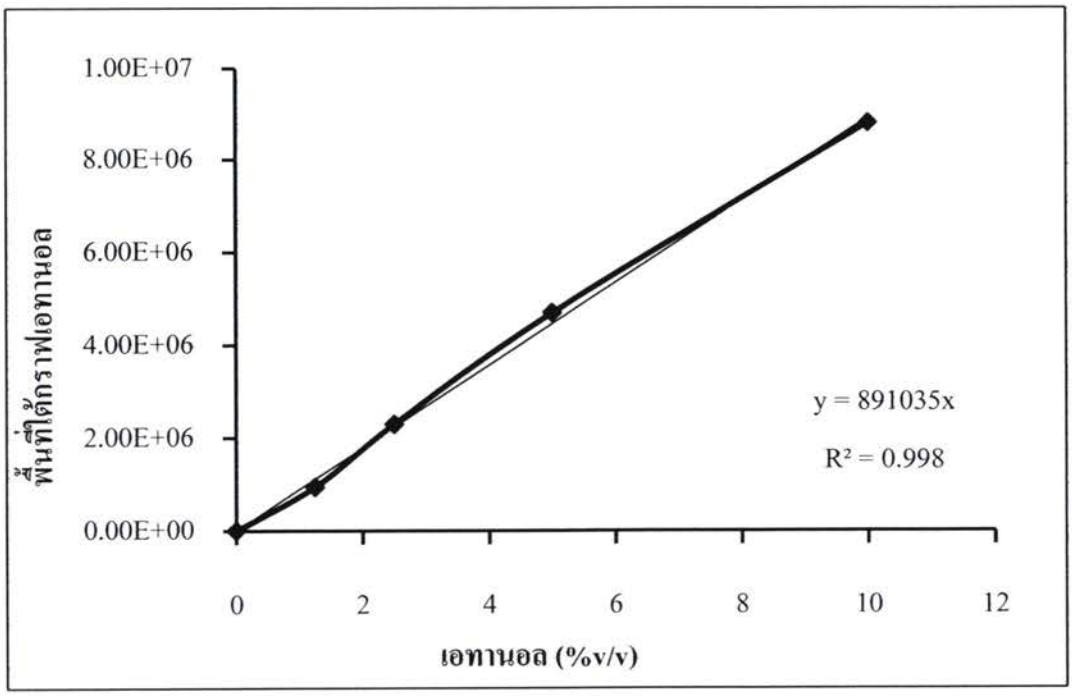
5.2 วิธีการ

5.2.1 การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน

เริ่มจากการเตรียมสารละลายมาตรฐานโดยใช้เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 1.25, 2.50, 5.0, และ 10.0 โดยปริมาตร กรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ฉีดวิเคราะห์ปริมาณเอทานอลปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC ปริมาตร 20 ไมโครลิตรแล้วนำข้อมูลพื้นที่ใต้กราฟมาสร้างกราฟมาตรฐาน

.5.2.2 การวิเคราะห์ตัวอย่าง

ตัวอย่างกรองผ่านกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร จากนั้นทำการฉีดวิเคราะห์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร คำนวณปริมาณเอทานอลเทียบกับกราฟมาตรฐาน



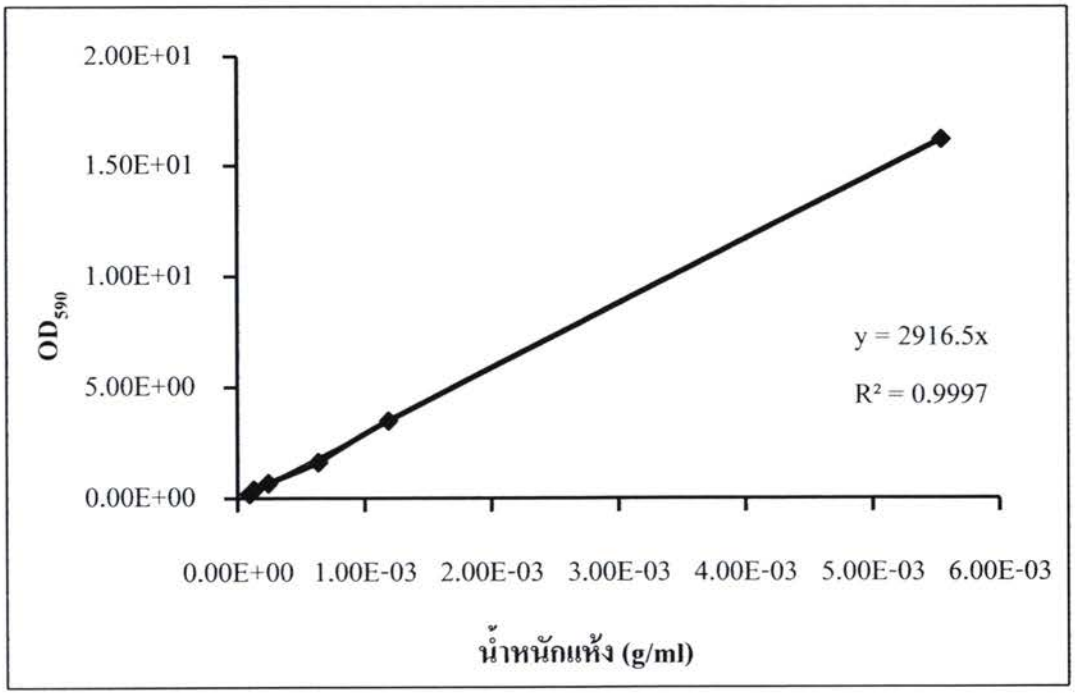
ภาพที่ ข.4 กราฟเอทานอลมาตรฐานที่ใช้คำนวณเอทานอลที่วิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC

6. กราฟมาตรฐานหระว่างค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{590}) และน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์

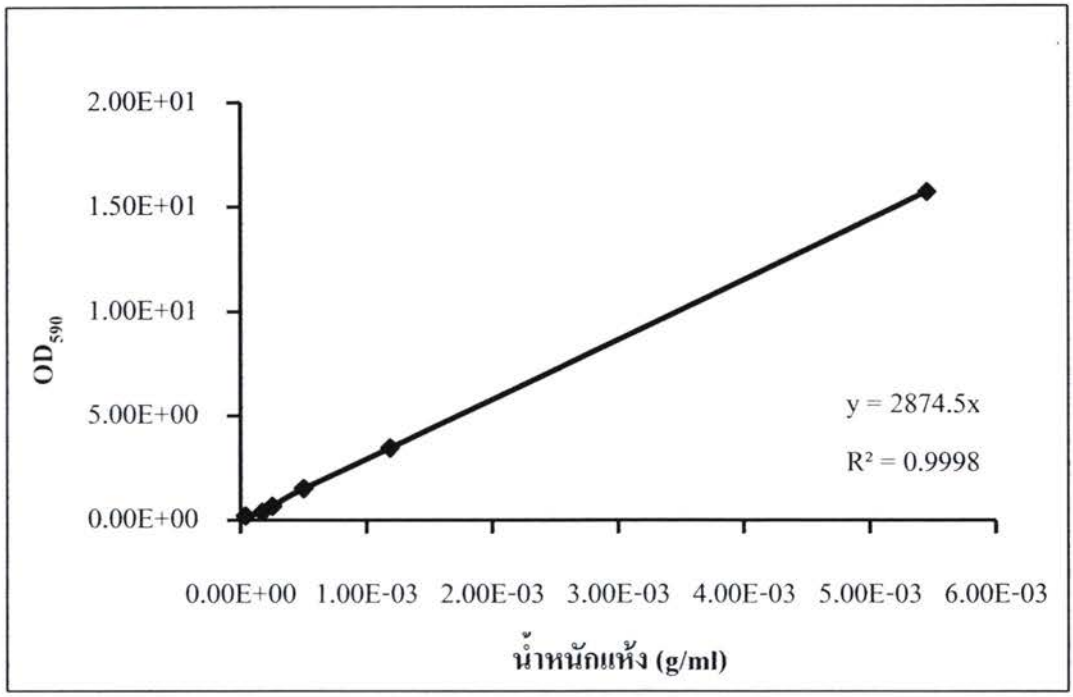
ตารางที่ ข.7 ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{590}) และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2 และ UBU-1-8

UBU-1-2		**UBU-1-8**	
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/มิลลิลิตร)*	**OD_{590}***	**น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/มิลลิลิตร)***	**OD_{590}***
0.00009	0.20	0.00004	0.20
0.00013	0.39	0.00017	0.39
0.00024	0.68	0.00025	0.67
0.00063	1.62	0.00050	1.51
0.00119	3.48	0.00119	3.45
0.00555	16.2	0.00545	15.67

* ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 3 ซ้ำ



ภาพที่ ข.5 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่นของเซลล์ (OD_{590}) และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-2



ภาพที่ ข.6 กราฟมาตรฐานระหว่างค่าความขุ่น (OD_{590}) และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *K. marxianus* สายพันธุ์ UBU-1-8

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม The SAS system for windows v9.0 โดยวิธี duncan's multiple range test

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม The SAS system for windows v9.0โดยวิธี duncan's multiple range test

1. ตัวอย่างการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม The SAS system for windows v9.0 โดยวิธี duncan's multiple range test

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติที่ใช้ในวิทยานิพนธ์เล่มนี้ยกตัวอย่างการวิเคราะห์สถิติโดยใช้การทดลองในขั้นตอนการคัดเลือกยีสต์ที่มีประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลจากน้ำคั้นหัวแก่นตะวันของยีสต์กลุ่มที่ 1 เพื่อเป็นตัวอย่าง
จัดเรียงข้อมูลดังตารางต่อไปนี้

ตารางที่ ค.1 การจัดข้อมูลเพื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม The SAS system for windows v9.0

ชื่อตัวอย่าง	ซ้ำของการทดลอง	ความเข้มข้นเอทานอล (ร้อยละโดยปริมาตร)
UBU-1-1	1	5.094
UBU-1-1	2	4.492
UBU-1-1	3	5.495
UBU-1-2	1	3.694
UBU-1-2	2	6.135
UBU-1-2	3	5.259
UBU-1-3	1	5.581
UBU-1-3	2	3.992
UBU-1-3	3	5.241
UBU-1-4	1	4.418
UBU-1-4	2	5.572
UBU-1-4	3	4.915
UBU-1-5	1	4.65
UBU-1-5	2	4.848
UBU-1-5	3	5.498

เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม The SAS system for windows v9.0 ด้วยวิธี duncan's multiple range test จะได้ข้อมูลดังตารางที่ ค2 ซึ่งจะเรียงจากค่าเฉลี่ยที่มากที่สุดไปหาน้อยที่สุด

ตารางที่ ค.2 ผลการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม The SAS system for windows v9.0

Duncan grouping	mean	N	TRT
A*	5.0293	3	UBU-1-2
A	5.0270	3	UBU-1-1
A	4.9987	3	UBU-1-5
A	4.9683	3	UBU-1-4
A	4.9380	3	UBU-1-3

หมายเหตุ: A คือ ค่าการจัดกลุ่มด้วยวิธี duncan's multiple range test

mean คือ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของเอทานอลโปรแกรมจะเรียงข้อมูลจากค่าสูงสุดไปต่ำสุด

N คือ จำนวนซ้ำ

TRT คือ ชื่อตัวอย่าง

ซึ่งจากตารางที่ ค2 ค่า duncan grouping อยู่ในกลุ่ม A เหมือนกันนั่นหมายความว่าค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มตัวอย่างมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ภาคผนวก ง
ผลงานทางวิชาการ

ผลงานทางวิชาการ

อนุพล ฤกษ์สว่าง, ภาวรี ศรีจันทร์, ชริดา ปุกหุต และสนม โนนกลาง. " การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ UBU", การประชุมวิชาการ มอบ. วิจัย ครั้งที่ 6. น. 290-297. อุบลราชธานี : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2555.

Rerksawang, A., Simakhan, N., Pukahuta, C. and Nonklang, S. "Ethanol fermentation from the Jerusalem Artichoke's juice at high temperature by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* UBU strains", the 38th Congress on Science and Technology of Thailand. p.245. Chiang Mai: The science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the king, 2012.

Rerksawang, A., Pukahuta, C. and Nonklang, S. "Effect of initial sugar concentrations on ethanol production from the Jerusalem artichoke juice at high temperature by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* strain UBU-1-8", The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. p.353-356. Ubon Ratchathani: Thai Society for Biotechnology, 2012.

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ นายอนุพล ฤกษ์สว่าง

ประวัติการศึกษา มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, พ.ศ.2550 - 2553
วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนกันทรารมณ์
อำเภอกันทรารมย์ จังหวัดศรีสะเกษ, พ.ศ.2547-2549

ประวัติการวิจัย

Sutthikhampa, S., **Rerksawang, A.**, Nonklang, S., Lorroengsil, S. and Pukahuta, C. "Glucose and xylose utilization of thermotolerant yeasts, UBU-1", in The 2nd Joint Seminar in Asian Core Program (ACP). p.62-63, Khon Kaen: Khon Kaen University, 2010.

อนุพล ฤกษ์สว่าง, ภาวรี ศรีจันทร์, ชริดา ปุกหุต และสนม โนนกลาง. " การหมักเอทานอลจากน้ำคั้นแก่นตะวันที่อุณหภูมิสูงโดยยีสต์ทนร้อน *Kluyveromyces marxianus* สายพันธุ์ UBU", การประชุมวิชาการ มอบ. วิจัย ครั้งที่ 6. น. 290-297. อุบลราชธานี : มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี, 2555.

Rerksawang, A., Simakhan, N., Pukahuta, C. and Nonklang, S. "Ethanol fermentation from the Jerusalem Artichoke's juice at high temperature by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* UBU strains", the 38th Congress on Science and Technology of Thailand. p.245. Chiang Mai: The science Society of Thailand under the Patronage of His Majesty the king, 2012.

Rerksawang, A., Pukahuta, C. and Nonklang, S. "Effect of initial sugar concentrations on ethanol production from the Jerusalem artichoke juice at high temperature by thermotolerant yeast *Kluyveromyces marxianus* strain UBU-1-8", The 24th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. p.353-356. Ubon Ratchathani: Thai Society for Biotechnology, 2012.