การผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง
โดยใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Bacillus* sp. ที่ย่อยแป้ง และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01

นางสาวศิริวรรณ พูนศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2549
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY MIXED CULTURE OF AMYLOLYTIC *Bacillus* sp. AND *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01

Miss Siriwan Poonsri

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2006

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Bacillus* sp. ที่ย่อยแป้ง และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01
โดย	นางสาวศิริวรรณ พูนศรี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…… ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์.ดร.สุเทพ ธนียวัน)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา)

…… กรรมการ
(ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป)

…… กรรมการ
(ดร.วศิมน เรืองเล็ก)

นางสาวศิริวรรณ พูนศรี : การผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง โดยใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *Bacillus* sp. ที่ย่อยแป้ง และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01. (BIOETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY MIXED CULTURE OF AMYLOLYTIC *Bacillus* sp. AND *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01) อ. ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา, 154 หน้า.

การผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้ *B. amyloliquefaciens* IFO14141 และ *S. cerevisiae* SKP-01 พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการย่อยแป้งของ *B. amyloliquefaciens* IFO14141 คือ เพาะกล้าเชื้อที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทที่ได้มีค่าเท่ากับ 0.1774 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรวม ภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกล้าเชื้อ *S. cerevisiae* SKP-01 คือ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ได้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.1537 ต่อชั่วโมง และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เท่ากับ 8.23 กรัมต่อลิตร การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร โดยเพาะกล้าเชื้อยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าได้ผลผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 6.03 กรัมต่อลิตร เพื่อเพิ่มผลผลิตเอทานอลจึงเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเป็น 150 กรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลรวมซึ่งได้จากการย่อยแป้งด้วยแบคทีเรียเท่ากับ 95.30 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 21.78 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 16 ของการเลี้ยงเชื้อ คิดเป็นผลได้ต่อผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทเท่ากับ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ประสิทธิ ภาพการหมักเท่ากับ 88.24 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.36 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง สามารถเพิ่มผลผลิตเอทานอลให้สูงขึ้นได้อีก โดยเพาะกล้าเชื้อยีสต์พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแบคทีเรีย พบว่าได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของแบคทีเรียสูงสุดในชั่วโมงที่ 22 เท่ากับ 9.09 (log(CFU/ml)) และยีสต์สูงสุดในชั่วโมงที่ 28 เท่ากับ 8.21 (log(CFU/ml)) การผลิตเอทานอลโดยวิธีนี้ให้ผลใกล้เคียงกับการเพาะกล้าเชื้อยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และเติมกลูโคอะมิเลส โดยได้เอทานอลเท่ากับ 63.24 กรัมต่อลิตร (ที่เวลา 22 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ) และ 63.79 กรัมต่อลิตร (ที่เวลา 70 ชั่วโมง) ผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทสูงสุดเท่ากับ 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม (ที่เวลา 16 ของการเลี้ยงเชื้อ) และ 0.49 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม (ที่เวลา 64 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ) คิดเป็นประสิทธิภาพการหมักเอทานอลเท่ากับ 94.12 และ 96.08 เปอร์เซ็นต์เทียบกับค่าทางทฤษฎี เทียบเป็นอัตราการผลิตเท่ากับ 2.87 และ 0.91 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ สำหรับการผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อยีสต์พร้อมกับกลูโคอะมิเลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งโดยแบคทีเรียที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ได้เอทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 66.19 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 46 ชั่วโมง คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทเท่ากับ 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 94.25 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี และอัตราการผลิตเท่ากับ 1.44 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง

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

สาขาวิชา.....จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม.... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา.....2549.....

4772500023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEY WORD: bioethanol/ cassava/ mixed culture / *Bacillus* / *Saccharomyces*

SIRIWAN POONSRI : BIOETHANOL PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH BY MIXED CULTURE OF AMYLOLYTIC *Bacillus* sp. AND *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 . THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SONGSRI KULPREECHA Ph. D., 154 pp.

Bioethanol production from cassava starch by *B. amyloliquefaciens* IFO14141 and *S. cerevisiae* SKP-01 has been studied. The suitable conditions for growth and starch hydrolysis of *B. amyloliquefaciens* IFO14141 were as follows; inoculating 7 h - bacterial culture into MSM medium containing 15 g/l of cassava starch and 3 g/l of $(NH_4)_2SO_4$ at pH 7.0 , incubated on a shaker at 37 ^{o}C for 4 h. Yx/s was 0.1774 g cell/g total sugar. The optimal growth condition for seed culture of *S. cerevisiae* SKP-01 were YPD medium containing 50 g/l glucose , pH 5.0 with shaking at 35^{o}C for 12 h. The maximum specific growth rate was 0.1537 h^{-1} with 8.23 g/l cell weight. Ethanol production from 15 g/l cassava starch was investigated by inoculating seed culture of yeast into culture medium containing hydrolysed starch after sterilization, followed by glucoamylase hydrolysis for 48 h., resulting in maximum ethanol concentration of 6.03 g/l. In order to increase ethanol yield, 150 g/l of cassava starch was used. The result revealed that maximum ethanol concentration of 21.78 g/l was produced from 95.30 g/l total sugar at 16 h. of cultivation, Yp/s 0.45 g ethanol/g total sugar, equivalent to 88.24 % of theoretical value and productivity 1.36 g ethanol/l.h. Ethanol yield could be increased by inoculating yeast seed culture and glucoamylase into medium containing bacterial hydrolysed starch. The highest viable cell number of bacteria was 9.09 (log CFU/ml) at 22 h and the highest cell number of yeast was 8.21 (log CFU/ml) at 28 h. Ethanol yield obtained by this process was nearly equal to that of the process of inoculating yeast seed culture into medium after sterilization and then adding glucoamylase i.e, the highest ethanol concentration 63.24 g/l (at 22 h. of cultivation) and 63.79 g/l (at 70 h. of cultivation),, the maximum Yx/s 0.48 g ethanol/ g total sugar (at 16 h) and 0.49 g ethanol/ g total sugar (at 64 h of cultivation) equivalent to fermentation efficiency 94.12 and 96.08 % of theoretical values, productivity 2.87 and 0.91 g ethanol/l.h respectively. Bioethanol production by inoculating yeast seed culture and glucoamylase into medium containing bacterial hydrolysed starch after sterilization resulted in increasing ethanol to 66.19 g/l at 46 h, Yx/s 0.48 g ethanol/g total sugar, fermentation efficiency 94.25 % of theoretical value and productivity 1.44 g ethanol/l.h.

Department……Microbiology…….... Student's signature……

Field of study……Industrial Microbiology….. Advisor's signature……

Academic year….2006……

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รศ.ดร.ส่งศรี กุลปรีชา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ที่ท่านได้กรุณาให้ความรู้ ให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดระยะเวลาการทำวิจัย รวมถึงได้ช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์และถูกต้องยิ่งขึ้น ศิษย์ขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานสอบ ดร.สุชาดา จันทร์ประทีป และ ดร.วศิมน เรืองเล็ก ที่กรุณารับเป็นกรรมการสอบ และแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ วาสนา โตเลี้ยง ตลอดจนคณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาที่ได้ให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา ตลอดจนพี่ น้อง และเพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และอำนวยความสะดวกในงานวิจัยด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณคุณปิยะนาฎ ศิริบรรณ คุณสุดารัตน์ บุญยงค์ และน้อง ๆ ในห้องปฏิบัติการ 462 ที่ได้ช่วยสร้างเสียงหัวเราะ และเติมเต็มความสุขในระหว่างการทำงาน รวมถึงคุณอภิรัฐ ชายกวด ที่ช่วยหาวารสารงานวิจัยที่ไม่มีในเมืองไทยมาให้

ขอขอบคุณ ดร.พิเชษฐ์ อิฐกอ ที่ได้เอื้อเฟื้อเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งมันสำปะหลัง

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และขอขอบคุณน้องชาย สำหรับความรัก ความห่วงใย และความหวังดีที่ไม่มีวันสิ้นสุด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย……ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ.....ช

สารบัญตาราง.....ฐ

สารบัญภาพ.....ด

คำย่อ.....น

บทที่ 1 บทนำ.....1

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม.....3

2.1 ชีวมวลที่มีศักยภาพสำหรับการผลิตเอทนอล……..……..4

2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล.....8

2.2.1 กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่.....9

2.2.1.1 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis)……..9

2.2.1.2 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการหมัก (fermentation)……9

2.3 การผลิตเอทานอลจากแป้ง.....12

2.3.1 การเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคสประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน.....12

2.3.1.1 gelatinization……..……12

2.3.1.2 liquefaction…..……12

2.3.1.3 saccharification.....12

2.3.2 เอนไซม์อะมิเลสที่ได้จากจุลินทรีย์.....14

2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อย่อยแป้ง และผลิตเอทานอล……..……17

2.3.3.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source).....17

2.3.3.2 แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source)…… ……..18

2.3.3.3 อุณหภูมิ.....19

2.3.3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)…….. ……20

2.3.4 การใช้เชื้อผสมเพื่อย่อยแป้งและหมักได้เอทานอล……..……21

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย.....24

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี.....24

3.1.1 อุปกรณ์ ……..……24

3.2.1 เคมีภัณฑ์.....25

3.2 จุลินทรีย์……25

หน้า

3.2.1 *Bacillus* sp. CU-03.....25
3.2.2 *Bacillus subtilis* IFO14140 26
3.2.3 *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....27
3.2.4 *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01.....27
3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....28
3.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ (stock culture medium).....28
3.3.2 สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ (seed culture medium).....29
3.3.3 สูตรอาหารเหลว MSM (Mineral Salt Medium) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. เพื่อการย่อยแป้ง และเพื่อการผลิตเอทานอลเมื่อใช้จุลินทรีย์ผสม.....30
3.4 การเก็บรักษาจุลินทรีย์.....31
3.5 การคัดเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ย่อยแป้งได้ดี.....31
3.5.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่สามารถย่อยแป้งได้.....31
3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ.....31
3.5.3 การเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง.....31
3.5.4 การเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่เจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ดี.....32
3.6 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยแป้งของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้.....32
3.6.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน 32
3.6.2 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน.....32
3.6.3 ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....33
3.6.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการย่อยแป้ง.....34
3.7 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล.....33
3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ.....33
3.7.2 ศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสม.....33
3.7.3 ศึกษาค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสม.....34
3.7.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ.....34
3.7.5 ศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญของกล้าเชื้อ.....34
3.8 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 จากแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ หรือเอนไซม์ทางการค้า.....35
3.8.1 การผลิตเอทานอลโดยการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิด เมื่อเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส.....35
3.8.2 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า.....35

หน้า

3.9 การผลิตเอทานอลจากการใช้จุลินทรีย์ผสม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง.....36
3.9.1 ศึกษาการเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เมื่อใช้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร.....36
3.9.2 การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง.....36
3.9.2.1 การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้.....36
3.9.2.2 การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้.....36
3.9.2.3 การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว.....36
3.9.2.4 การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วและย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส.....37
3.10 การวิเคราะห์.....38
3.10.1 การวัดการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง.....38
3.10.2 การวัดการเจริญของ *Bacillus* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 โดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต.....38
3.10.3 การหาปริมาณน้ำตาลรวม โดยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟูริค.....39
3.10.4 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....39
3.10.5 การหาปริมาณแหล่งไนโตรเจน.....39
3.10.5.1 หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต.....39
3.10.5.1 หาปริมาณยูเรีย.....39
3.10.6 การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH).....40
3.10.7 การหาปริมาณเอทานอล โดยวิธี Gas Chromatography (GC)… 40
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....41
4.1 การคัดเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ย่อยแป้งได้ดี.....41
4.1.1 การคัดเลือก *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่สามารถย่อยแป้งได้.....41
4.1.2 การเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสม.....43

หน้า

4.1.3 การเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่เจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ดี.....44
4.1.3.1 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *Bacillus subtilis* IFO14140.....45
4.1.3.2 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....48
4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....51
4.2.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน 51
4.2.2 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน.....55
4.2.3 ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ.....59
4.2.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการย่อยแป้ง.....63
4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล.....66
4.3.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ.....66
4.3.2 ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ.....67
4.3.3 อุณหภูมิที่เหมาะต่อการเลี้ยงกล้าเชื้อ.....70
4.3.4 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกล้าเชื้อ.....74
4.4 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiea* SKP-01 จากแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 หรือเอนไซม์ทางการค้า.....76
4.4.1 การผลิตเอทานอลโดยการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิด เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cereviaias* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส.....76
4.4.2 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า.....81
4.5 การผลิตเอทานอลจากการใช้จุลินทรีย์ผสม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง.....85
4.5.1 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร.....85
4.5.2 การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร.....89
4.5.2.1 การเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....89

4.5.2.2 การเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....93
4.5.2.3 การเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว.....97
4.5.2.4 การเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens*.....101
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย.....109
5.1 การคัดเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ย่อยแป้งได้ เพื่อนำไปใช้ในการวิจัย..... 109
5.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 109
5.3 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01.....109
5.4 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cereviaias* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส และการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส.....110
5.5 การผลิตเอทานอลจากการใช้จุลินทรีย์ผสม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง.....110
5.5.1 การศึกษาการเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร.....110
5.5.2 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร.....110
5.5.2.1 ผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....110
5.5.2.2 ผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....111

5.5.2.3 ผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว.....111

5.5.2.4 ผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส.....111

รายการอ้างอิง.....112

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.....120

1. การเตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง.....120
2. การย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ทางการค้า.....120
3. การเตรียมสารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร).....121
4. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA reaget).....121
5. การเตรียมสารละลายยูเรียเอส (urease).....121
6. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแหล่งไนโตรเจน.....121
7. การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล.....122

ภาคผนวก ข.....123

1. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้ง.....123
2. การคำนวณจำนวนเซลล์ที่ชีวิต.....123
3. การคำนวณน้ำหนักเซลล์แห้งจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต.....123
   - 3.1 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Baciilus subtiis* IFO14140.....123
   - 3.2 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Baciilus amyloliquefaciens* IFO14141.....124
4. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรวม.....124
5. การคำนวณปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์.....125
6. การคำนวณปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย.....125
   - 6.1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต.....125
   - 6.2 ปริมาณยูเรีย.....126
7. การคำนวณปริมาณเอทานอล.....126
8. การคำนวณค่าสมมูลเดกซ์โทรส (Dextrose Equivalent ; DE).....127
9. การคำนวณหา μ $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$, และ Q_P.....127

ภาคผนวก ค.....128

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....154

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ขนาด รูปร่างของเม็ดแป้ง และปริมาณอะมิโลส ที่พบในแป้งชนิดต่างๆ โดยประมาณ.....6

2.2 ความแตกต่างของอะมิโลส และอะมิโลเพกติน.....8

2.3 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะมิเลส.....15

2.4 แหล่งคาร์บอนที่ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถใช้ได้.....18

2.5 ตัวอย่างแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตแอลฟาอะมิเลสของแบคทีเรียจีนัส *Bacillus*.....19

2.6 ตัวอย่างค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคทีเรียจีนัส *Bacillus*.....21

4.1 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* IFO14140 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร.....47

4.2 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร.....50

4.3 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน.....53

4.4 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร.....58

4.5 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0.....62

4.6 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส.....65

4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหาร BSM และ YPD.....67

4.8 การเจริญ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ และค่า pH เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....69

4.9 การเจริญ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ และค่า pH เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส.....72

4.10 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที.....75

ตารางที่ หน้า

4.11 การผลิตเอทานอล และค่าพารามิเตอร์ โดยการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิด เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และย่อยแป้งต่อด้วยกลูโคอะมิเลส.....79
4.12 การผลิตเอทานอล และค่าพารามิเตอร์ โดยการเพาะ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส.....83
4.13 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส หรือน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส 84
4.14 การย่อยแป้งโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 และเอนไซม์ทางการค้า.....84
4.15 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร.....88
4.16 การผลิตเอทานอล และพารามิเตอร์ โดยเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....92
4.17 การผลิตเอทานอล และค่าพารามิเตอร์ โดยเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....96
4.18 การผลิตเอทานอล และพารามิเตอร์ โดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว.....100
4.19 การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และกลูโคอะมิเลส.....104
4.20 ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการผลิตเอทานอลด้วยวิธีต่าง ๆ.....105
4.21 เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่น.....107
ค.1 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* IFO14140.....128
ค.2 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* IFO14140.....128
ค.3 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* IFO14140.....128

ตารางที่ หน้า

ค.4 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* IFO14140.....129
ค.5 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....130
ค.6 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....130
ค.7 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....131
ค.8 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....131
ค.9 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....132
ค.10 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.36 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....132
ค.11 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร 133
ค.12 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร 133
ค.13 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร 134
ค.14 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0.....134
ค.15 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0.....135

ตารางที่ หน้า

ค.16 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.0.....135

ค.17 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 7.0.....136

ค.18 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 8.0.....136

ค.19 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส 137

ค.20 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส.....137

ค.21 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส.....138

ค.22 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....138

ค.23 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....139

ค.24 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น เท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....139

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ หน้า

2.1 พื้นที่การเพาะปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทย....3

2.2 ขนาด และรูปร่างของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง เมื่อถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ อิเล็คตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope) กำลังขยาย 1,000 เท่า……5

2.3 การเรียงตัวกันของหน่วยโมเลกุลกลูโคสในอะมิโลส……..6

2.4 การเรียงตัวกันของหน่วยโมเลกุลกลูโคสในอะมิโลเพกติน....7

2.5 แนวโน้มความต้องการเอทานอลที่สูงขึ้นในสังคมโลก……9

2.6 วิถีการสร้างเอทานอลโดยผ่าน Emden-Meyerhof-Panas pathway ……11

2.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส……14

3.1 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* sp. CU-03 เจริญบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) อายุ 24 ชั่วโมง....25

3.2 *Bacillus* sp. CU-03 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า....26

3.3 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus subtilis* IFO14140 เจริญบนอาหารแข็งสูตร Nakamura และคณะ (1999) อายุ 24 ชั่วโมง……...26

3.4 *Bacillus subtilis* IFO14140 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า……...26

3.5 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เจริญบนอาหารแข็งสูตร Nakamura และคณะ (1999) อายุ 24 ชั่วโมง……..27

3.6 *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า……27

3.7 ลักษณะโคโลนีของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เจริญบนอาหารแข็ง Yeast Peptone Dextrose (YPD) อายุ 48 ชั่วโมง……..27

3.8 ลักษณะรูปร่างของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า....28

4.1 ความสามารถในการย่อยแป้งของ *Bacillus* sp. จำนวน 3 สายพันธุ์ เลี้ยงบนอาหาร starch agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ……...42

4.2 การเจริญของ *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อติดตามการเจริญโดยหาความเข้มข้นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร…...43

4.3 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* IFO14140……45

4.4 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus subtilis* IFO14140……46

4.5 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141……48

ภาพประกอบ หน้า

4.6 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....49
4.7 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร และ ยูเรียความเข้มข้น 1.36 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....52
4.8 เปรียบเทียบผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน.....53
4.9 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น เท่ากับ 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน 56
4.10 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตเริ่มต้นเท่ากับ 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....57
4.11 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0.....60
4.12 เปรียบเทียบผลของ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....61
4.13 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่ม บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส 64
4.14 เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิ ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส.....65
4.15 การเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BSM และ YPD.....66
4.16 การเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 4.5 5.0 และ5.5.....68
4.17 การเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคส เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 25 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส.....70
4.18 การเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส.....73

ภาพประกอบ หน้า

4.19 การผลิตเอทานอลโดยการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิด เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และกลูโคอะมิเลส.....77
4.20 โครมาโตแกรมของเอทานอลมาตรฐาน วิเคราะห์ด้วยวิธี Gas Chromatography.....80
4.21 โครมาโตแกรมของเอทานอลที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 58 วิเคราะห์ด้วยวิธี Gas Chromatography.....80
4.22 การผลิตเอทานอลเมื่อเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส.....81
4.23 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....86
4.24 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens*.....86
4.25 การผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อผสม เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....90
4.26 การผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อผสม โดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....94
4.27 การผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว.....98
4.28 การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และกลูโคอะมิเลส.....102
ก.1 สารละลายแป้งมันสำปะหลังก่อนต้ม และหลังต้ม.....122
ข.1 กราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Bacillus subtilis* IFO14140 และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Bacillus subtilis* IFO14140.....123
ข.2 กราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141.....124
ข.3 กราฟมาตรฐานของกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.0102.....124
ข.4 กราฟมาตรฐานของกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.9997.....125

ภาพประกอบ หน้า

ข.5 กราฟมาตรฐานของแอมโมเนียม-ไนโตรเจน ในช่วงความเข้มข้น 0-3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.2089.....125
ข.6 กราฟมาตรฐานของยูเรีย ในช่วงความเข้มข้น 0-3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.2217.....126
ข.7 กราฟมาตรฐานของเอทานอล ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100 กรัมต่อลิตร ความชันเท่ากับ 1.0143.....126
ข.8 กราฟแสดงค่าสมมูลเดกซ์โทรสของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยแอลฟาอะมิเลสและกลูโคอะมิเลส.....127
ค.1 การคำนวนค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* IFO14140 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน.....140
ค.2 การคำนวนค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....141
ค.3 การคำนวณค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร และยูเรีย 1.36 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....142
ค.4 การคำนวนค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน.....143
ค.5 การคำนวณค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ15 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0.....144
ค.6 การคำนวณค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส.....145
ค.7 การคำนวนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ในการเพาะเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BSM และ YPD โดยมีกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน.....146

ภาพประกอบ หน้า

ค.8 การคำนวนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ในการเพาะเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD โดยมีกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 4.5 5.0 และ 5.5.....147

ค.9 การคำนวนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ในการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD โดยมีกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 25 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส.....148

ค.10 การคำนวนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ในการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD โดยมีกลูโคสเท่ากับ 20 30 40 และ 50กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส.....149

ค.11 การประเมินค่าพารามิเตอร์ เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cereviaias* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และกลูโคอะมิเลส.....150

ค.12 การประเมินค่าพารามิเตอร์ เมื่อเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส.....151

ค.13 การคำนวนค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการแลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส.....152

ค.14 การคำนวณค่าผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทจากการใช้แป้งความเข้มข้นเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร.....153

คำย่อ

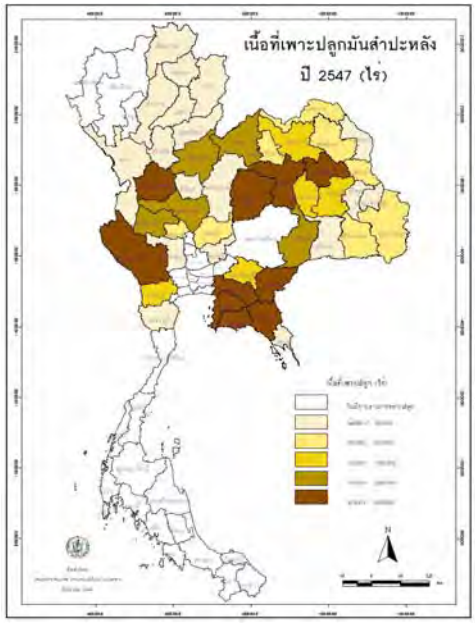
คำย่อ	คำอธิบาย
μ	อัตราการเจริญจำเพาะ
Yx/s	ผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท
Yp/s	ผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรท
Qp	อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์
Xo	ความเข้มข้นของมวลของจุลินทรีย์ที่เวลาเริ่มต้น
Xt	ความเข้มข้นของมวลของจุลินทรีย์ที่เวลาใด ๆ
So	ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เวลาเริ่มต้น
St	ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เวลาใด ๆ
Po	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เวลาเริ่มต้น
Pt	ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่เวลาใด ๆ
t	เวลา
h	ชั่วโมง
g/g	กรัมต่อกรัม
g/l	กรัมต่อลิตร
g/l/h	กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง
v/v	ปริมาตรต่อปริมาตร
DCW	น้ำหนักเซลล์แห้ง
^{o}C	องศาเซลเซียส
cm	เซนติเมตร
µm	ไมโครเมตร
DE	ค่าสมมูลย์เดกซ์โทรส
GC	ก๊าซโครมาโทกราฟฟี
CFU/ml	จำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรม

แนวคิดและทฤษฎี

ขณะนี้วิกฤตการณ์ด้านพลังงานเป็นปัญหาที่สำคัญอันดับต้น ๆ ของประเทศและทั่วโลก อันเนื่องมาจากน้ำมันเชื้อเพลิงจากปิโตรเลียมมีราคาสูงขึ้นและมีแนวโน้มที่จะมีราคาสูงขึ้นอีกในอนาคต ปัจจุบัน “เอทานอล” จัดได้ว่าเป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่มีศักยภาพสูง เอทานอลที่ผลิตจากวิธีทางชีวภาพโดยการหมักเรียกว่า ไบโอเอทานอล (bioethanol) อีกทั้งยังมีการผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบประเภทแป้งกันอย่างกว้างขวาง (Hisayori และคณะ, 2004 , Nyerhovwo, 2004) ทั้งนี้เนื่องจากแป้งเป็นวัตถุดิบที่ราคาถูก สะอาด ไม่เป็นพิษ รวมถึงเป็นแหล่งคาร์บอนทดแทน (renewable carbon source) (Kutluö และคณะ, 2002) สำหรับประเทศผู้ผลิตแป้งรายใหญ่ที่สุดของโลก คือ สหรัฐอเมริกา โดยผลิตแป้งข้าวโพดเป็นหลัก รองลงมาคือกลุ่มประเทศตลาดร่วมยุโรป ซึ่งส่วนใหญ่แล้วผลิตแป้งข้าวโพด แป้งสาลี และแป้งมันฝรั่ง (Roy และ Gupta, 2004) ในสหรัฐอเมริกานั้นพบว่า แป้งที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร รองลงมาคือการนำแป้งไปหมักเป็นแอลกอฮอล์ และคาดว่าแอลกอฮอล์ทั้งหมดที่ผลิตในอนาคตจะได้มาจากการใช้แป้งเป็นวัตถุดิบ สำหรับประเทศไทยนั้น ประเทศไทยเป็นประเทศเดียวที่ใช้มันสำปะหลังมาผลิตเป็นแป้งมากที่สุด ถือได้ว่าเป็นผู้ผลิตแป้งมันสำปะหลังรายใหญ่ที่สุดของโลก มีเทคโนโลยีการผลิตแป้งมันสำปะหลังที่สูงกว่าทุกประเทศ แป้งมันสำปะหลังจึงถือได้ว่าเป็น “แป้งไทย” ที่สามารถผลิตได้มากที่สุด มีคุณภาพสูง (มีสิ่งปลอมปนน้อย) และราคาถูกที่สุด (กล้าณรงค์ ศรีรอต และคณะ, 2542)



รูปที่ 2.1 พื้นที่การเพาะปลูกมันสำปะหลังในประเทศไทย
ที่มา: http://www.doae.go.th/data/rice/มันสำปะหลัง.jpg

การเปลี่ยนแป้งให้เป็นเอทานอลในวิธีการเดิมนั้น ต้องอาศัยกระบวนการหลายขั้นตอน ได้แก่

liquefaction และsaccharification ซึ่งเป็นขั้นตอนในการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลโดยสมบูรณ์ ได้น้ำตาลกลูโคส ซึ่งการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังในประเทศไทยส่วนใหญ่นิยมใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยแป้ง โดยใช้เอนไซม์แอลฟาอะมิเลส (alpha-amylase) ในขั้นตอนที่เรียกว่า liquefaction และเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (glucoamylase) ในขั้นตอนที่เรียกว่า saccharification แล้วจึงเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการหมัก (fermentation) โดยจุลินทรีย์ต่อไป (Shigechi และคณะ, 2004) ในทางอุตสาหกรรมนิยมใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล แต่ในสายพันธุ์ปกติ (wild type) ไม่มีแอกทิวิตี (activity) ของแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นเอทานอลได้โดยตรง (KutluÖ และคณะ, 2002) แต่ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการเปลี่ยนแป้งเป็นเอทานอลในขั้นตอนเดียว (simultaneous saccharification and fermentation, SSF) ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี หนึ่งในวิธีที่นิยมคือ การใช้จุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ระหว่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งได้ (amylolytic microorganism) กับจุลินทรีย์ที่สามารถหมักเอทานอลได้ (ethanol-fermenting microorganism) (Yoshitishi และคณะ, 1997) ทำให้ลดต้นทุนการผลิต รวมถึงลดเวลาและขั้นตอนการทำงานที่ต้องใช้สำหรับการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยเอนไซม์ทางการค้า (Hisayori และคณะ, 2004)

Bacillus sp. เป็นจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Carlos และคณะ, 1999) ในงานวิจัยนี้ใช้จุลินทรีย์ผสมเพื่อการผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีราคาถูกและหาง่ายในประเทศไทย โดยคัดเลือกแบคทีเรีย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่มีแอกทิวิตีของอะมิเลสสูง สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังเป็นน้ำตาลกลูโคสได้ดี และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 สายพันธุ์ที่ผลิตเอทานอลจากน้ำตาลได้ในปริมาณสูง (11.53 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)) เมื่อใช้กากน้ำตาลเพียงอย่างเดียวเป็นอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ (ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์, 2547) เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปผลิตไบโอเอทานอลในระดับขยายส่วน และอาจสามารถนำไปสู่การแก้ปัญหาการขาดแคลนเชื้อเพลิงและพลังงานต่อไป

2.1 ชีวมวลที่มีศักยภาพสำหรับการผลิตเอทานอล

ไบโอเอทานอล (bioethanol) หรือ เอทานอลที่ผลิตโดยใช้วิธีการทางชีวภาพด้วยการหมักนั้น สามารถผลิตได้จากผลผลิตทางการเกษตรและวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร ซึ่งทุกส่วนของพืชสามารถนำมาใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับผลิตเอทานอลได้ อย่างไรก็ตามเทคโนโลยีที่นำมาใช้ผลิตจะมีความแตกต่างกันไปตามประเภทของวัตถุดิบ และให้ผลผลิตเอทานอลที่แตกต่างกันด้วย

วัตถุดิบที่ใช้ผลิตเอทานอล สามารถแบ่งออกเป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ดังนี้ (คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร , 2543)

1. วัตถุดิบประเภทแป้ง ได้แก่ ผลผลิตทางการเกษตรประเภทธัญพืช เช่น ข้าวเจ้า ข้าวสาลี ข้าวโพด ข้าวบาร์เลย์ ข้าวฟ่าง และพวกพืชหัว เช่น มันสำปะหลัง มันฝรั่ง มันเทศ เป็นต้น
2. วัตถุดิบประเภทน้ำตาล ได้แก่ อ้อย กากน้ำตาล หัวบีต ข้าวฟ่างหวาน เป็นต้น

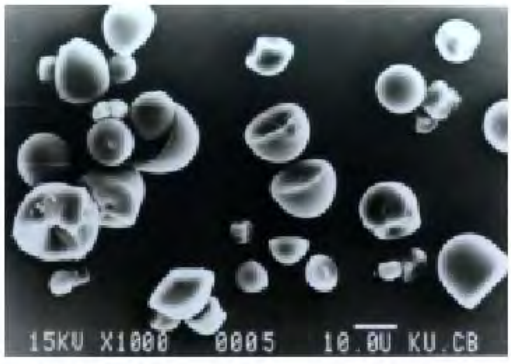
3. วัตถุดิบประเภทเส้นใยส่วนใหญ่เป็นผลพลอยได้จากผลผลิตทางการเกษตร เช่น ฟางข้าว ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว เศษไม้ เศษกระดาษ ขี้เลื่อย วัชพืช รวมทั้งของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น โรงงานกระดาษ เป็นต้น

การที่มีวัตถุดิบอยู่หลายชนิดที่สามารถนำมาผลิตเป็นเอทานอลได้ ทำให้แต่ละประเทศที่ผลิตเอทานอลเป็นเชื้อเพลิงใช้วัตถุดิบที่แตกต่างกันไป เช่น ประเทศบราซิลซึ่งเป็นผู้ผลิตเอทานอลรายใหญ่ที่สุดของโลก ใช้อ้อยเป็นวัตถุดิบหลัก ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ข้าวโพด เป็นต้น (Kádár และคณะ, 2004)

มันสำปะหลังถือได้ว่าเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ทั้งนี้เป็นที่ยอมรับกันในความทนแล้งได้ดี ขยายพันธุ์ง่าย ต้นทุนการเพาะปลูกไม่สูง จึงเป็นที่นิยมของเกษตรกรโดยทั่วไป โดยเฉพาะเกษตรกรซึ่งมีรายได้น้อย มันสำปะหลังสามารถปลูกอยู่ทั่วไปกระจายไปทุกภาค บริเวณที่มีการปลูกมากที่สุดคือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออก ในบรรดาประเทศที่ปลูกมันสำปะหลังมาก ๆ เช่น บราซิล ไนจีเรีย อินโดนีเซีย และประเทศไทย ประเทศไทยเป็นประเทศเดียวที่ใช้มันสำปะหลังมาผลิตเป็นแป้งมากที่สุด (กล้าณรงค์ ศรีรอต, 2542) ดังนั้นเพื่อเป็นการเพิ่มมูลค่าให้กับวัตถุดิบ แป้งมันสำปะหลังจึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในการนำมาผลิตเป็นเอทานอล

แป้งมันสำปะหลัง

แป้งมันสำปะหลัง (tapioca, cassava, manihot flour/starch) ที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมมีความหมาย คือ แป้งที่ทำจากหัวมันสำปะหลัง *Manihot utilissima* ลักษณะของแป้งเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ประกอบด้วยเม็ดแป้งที่ยาวตั้งแต่ 5 ถึง 35 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยประมาณ 15 ไมโครเมตร เม็ดแป้งส่วนมากมีลักษณะเป็นรูปไข่ซึ่งปลายข้างหนึ่งถูกตัดออก และผิวตรงส่วนที่ตัดออกมีลักษณะเว้าเข้าข้างใน บางเม็ดอาจมีริมด้านหนึ่งโค้ง อีกด้านหนึ่งแบนไม่สม่ำเสมอกัน เม็ดแป้งเหล่านี้จะแสดงให้เห็นรอยบุ๋ม (eccentric hilum) อย่างชัดเจน และในบางครั้งอาจเห็นชั้นของแป้งด้วย โดยแป้งมันสำปะหลังที่ดีต้องเป็นผงละเอียด มีสีขาว หรือสีครีมอ่อน ไม่เกิดการหมัก ไม่เหม็นอับ หรือมีกลิ่นน่ารังเกียจ ไม่มีแมลง และสารแปลกปลอมอื่น ๆ ปะปน (สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม, 2516)



รูปที่ 2.2 ขนาด และรูปร่างของเม็ดแป้งมันสำปะหลัง เมื่อถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ อิเล็คตรอนแบบสแกน (Scanning Electron Microscope) กำลังขยาย1,000 เท่า
ที่มา : กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ (2543)

องค์ประกอบภายในเม็ดแป้ง

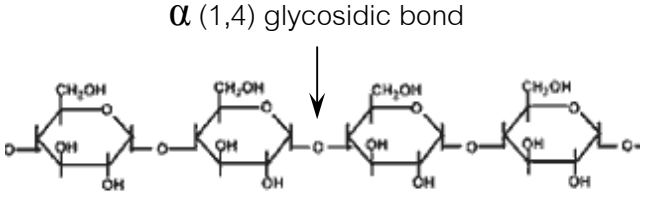
แป้งถูกจัดให้อยู่ในพวกคาร์โบไฮเดรตชนิดหนึ่ง มีสูตรโมเลกุลคือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ โดยแป้งเป็นโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่ประกอบด้วยหน่วยพื้นฐานคือ D-anhydroglucose ซึ่งส่วนใหญ่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α (1,4) glycosidic linkage โดยใช้ปฏิกิริยา condensation polymerization ซึ่งเป็นปฏิกิริยาการรวมตัวของกลูโคส 2 โมเลกุล และสูญเสียน้ำ 1 โมเลกุล ภายในโมเลกุลของแป้งประกอบด้วยโครงสร้างที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ อะมิโลส (amylose) และอะมิโลเพกติน (amylopectin) ซึ่งมีความแตกต่างกันในด้านขนาด รูปร่าง และการเชื่อมกันของกลูโคส นอกจากนี้ยังพบว่าแป้งจากแหล่งที่ต่างกัน จะมีอัตราส่วนของอะมิโลส และอะมิโลเพกตินแตกต่างกัน ทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน (Forgaty และ Kelly, 1979)

ตารางที่ 2.1 ขนาด รูปร่างของเม็ดแป้ง และปริมาณอะมิโลส ที่พบในแป้งชนิดต่างๆ โดยประมาณ
ที่มา : ดัดแปลงจาก Ellis และคณะ (1998) และ Oates (1996)

1) อะมิโลส

ชนิดแป้ง	**ขนาดเม็ดแป้ง** (μm.)	**ขนาดเม็ดแป้งโดยเฉลี่ย** (μm.)	**ปริมาณอะมิโลสโดยเฉลี่ย (%)**	**รูปร่างของเม็ดแป้ง**
มันสำปะหลัง	4-35	20	18	กลม คล้ายรูปถ้วย
มันฝรั่ง	5-100	30	22	กลม รูปไข่มีวงคล้ายเปลือกหอย
ข้าวโพด	3-26	15	27	กลม แบน มีหลายเหลี่ยม
ข้าวสาลี	1-40	10	23	กลม ค่อนข้างรี

อะมิโลสเป็นโฮโมโพลิเมอร์เชิงเส้นประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 10^2 ถึง 10^4 หน่วย เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α (1,4) glycosidic แต่จากการศึกษาในปัจจุบันพบว่า อะมิโลสไม่ใช่โมเลกุลที่เป็นเส้นตรงโดยสิ้นเชิง แต่มีกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ α (1,6) glycosidic อยู่บ้างเล็กน้อย ขนาดโมเลกุลของอะมิโลสอยู่ที่ประมาณ 10^5 ถึง 10^6 ดาลตัน (Hizukuri, 1996)



รูปที่ 2.3 การเรียงตัวกันของหน่วยโมเลกุลกลูโคสในอะมิโลส
ที่มา : http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates.html

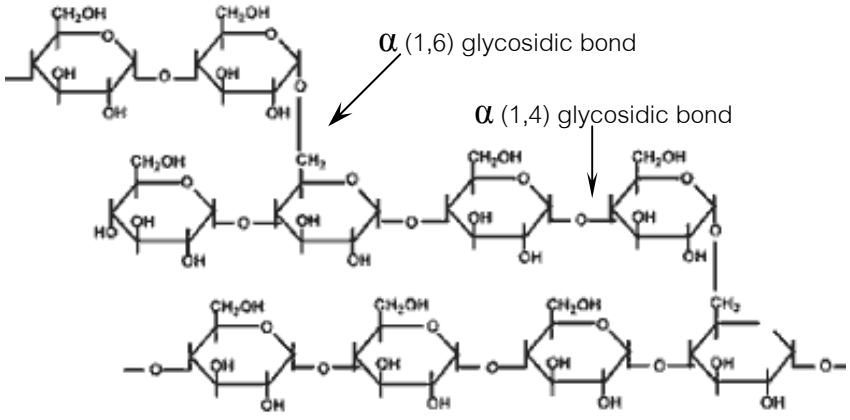
หมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ในโมเลกุลของอะมิโลส จะเป็นตัวให้สมบัติความเป็น hydrophilic แก่โพลิเมอร์ มีผลให้อะมิโลสมี affinity ต่อความชื้น และสามารถกระจายตัวได้ใน

น้ำ (ละลายน้ำได้) แต่อย่างไรก็ตาม เนื่องจากอะมิโลสมีลักษณะโมเลกุลเป็นเส้นยาว และมีหมู่ไฮดรอกซิล จึงมีแนวโน้มที่จะมาเรียงตัวขนานกัน และอยู่ชิดกัน ทำให้เกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างสายโพลิเมอร์ของอะมิโลสได้ ซึ่งปรากฏการณ์นี้ทำให้ affinity ที่มีต่อโมเลกุลของน้ำลดลง รวมถึงมีการรวมตัวกันของสายโพลิเมอร์ของอะมิโลสทำให้ตกตะกอน ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า รีโทรเกรเดชัน (retrogradation) ตำแหน่งของอะมิโลสภายเม็ดแป้งขึ้นกับสายพันธุ์ของพืช โดยบางส่วนอาจอยู่ในสภาพอิสระ หรืออาจรวมกับไขมันในรูปของสารเชิงซ้อนที่ไม่ละลายน้ำ หรืออาจอยู่รวมกับอะมิโลเพกตินเป็นเกลียวคู่ (double helix) (Biliaderis, 1992)

อะมิโลสสามารถรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับไอโอดีนและสารประกอบอินทรีย์อื่น ๆ ได้ เช่น กรดไขมัน (fatty acid) สารลดแรงตึงผิว (surfactants) ฟีนอล (phenol) บิวทานอล (butanol) และไฮโดรคาร์บอนต่าง ๆ (hydrocarbons) โดยสารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้จะไม่ละลายในน้ำ โดยอะมิโลสจะพันเป็นเกลียวล้อมรอบสารดังกล่าว กรณีการเกิดสารประกอบเชิงซ้อนของอะมิโลสกับไอโอดีนนั้น จะให้สีน้ำเงิน ซึ่งสมบัติดังกล่าวสามารถใช้ทดสอบแป้งที่มีอะมิโลสได้ (Galliard และ Bowler, 1987 อ้างถึงใน กล้าณรงค์ ศรีรอต และเกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2543)

2) อะมิโลเพกติน

เป็นโฮโมโพลิเมอร์เชิงกิ่งที่มีขนาดใหญ่ประกอบด้วยกลูโคส 10^4 ถึง 10^5 หน่วย ในบริเวณที่เป็นเส้นตรงโมเลกุลของกลูโคสเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α (1,4) glycosidic ส่วนที่เป็นกิ่งก้านแยกออกไปจะเชื่อมต่อด้วยพันธะ α (1,6) glycosidic โดยแต่ละกิ่งที่แยกออกไปนั้นจะประกอบด้วยกลูโคสประมาณ 20 ถึง 30 หน่วย อะมิโลเพกตินหนึ่งโมเลกุล จะมีพันธะ α (1,6) glycosidic ประมาณ 4 ถึง 5 เปอร์เซ็นต์ โดยปกติอะมิโลเพกตินมีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่าอะมิโลสมาก มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10^7 ถึง 10^9 ดาลตัน และทำปฏิกิริยากับสารละลายไอโอดีนได้สารประกอบเชิงซ้อนสีม่วงแดง (Jacobs และ Delcour, 1998)



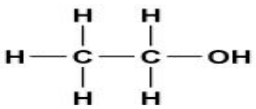
รูปที่ 2. 4 การเรียงตัวกันของหน่วยโมเลกุลกลูโคสในอะมิโลเพกติน
ที่มา: http://www.scientificpsychic.com/fitness/carbohydrates.html

ตารางที่ 2.2 ความแตกต่างของอะมิโลส และอะมิโลเพกติน
ที่มา: Aiyer (2005) และ ปราณี อ่านเปรื่อง (2547)

สมบัติ	อะมิโลส	อะมิโลเพกติน
โครงสร้างโมเลกุล	ส่วนใหญ่เป็นกลูโคสต่อกัน เป็นเส้นตรงไม่มีกิ่ง	กลูโคสต่อกันเป็นกิ่งก้านสาขา
จำนวนน้ำตาลกลูโคสใน โมเลกุล (degree of polymerization)	10^2-10^4	10^4-10^5
จำนวนน้ำตาลกลูโคสในสาย (average chain lenge)	10^2-10^4	20-30
น้ำหนักโมเลกุล (ดาลตัน)	10^5-10^6	10^7-10^9
เมื่อต้มในน้ำ	ข้นหนืดน้อย และขุ่น	ข้นหนืดมาก และใส
ความคงตัวในเมื่ออยู่ในน้ำ	เกิด retrogradation	คงตัว
การเกิดสีกับไอโอดีน	สีน้ำเงิน	สีม่วงแดง

2.2 กระบวนการผลิตเอทานอล

เอทานอล (ethanol) หรือที่เรียกอีกชื่อว่า เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นสารอินทรีย์มีสูตรทางเคมีคือ C_2H_2OH เป็นของเหลวใส ไม่มีสี ระเหยง่าย ละลายในน้ำและในสารอินทรีย์อื่น ๆ ได้ดี ซึ่งเอทานอลยังมีประโยชน์อีกหลายประการ เช่น ใช้เป็นเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ ใช้ในการผลิตยา ใช้เป็นตัวทำละลายในการผลิตผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ใช้เป็นเชื้อเพลิงเพื่อขับเคลื่อนเครื่องยนต์ และใช้เป็นสารเพิ่มค่าออกเทนให้แก่น้ำมันเบนซินสำหรับรถยนต์ เป็นต้น (ธีรภัทร ศรีนรคุตร, 2544)



สูตรโครงสร้าง

สูตรโมเลกุล C_2H_5OH

จุดเดือด 78.32 °C

น้ำหนักโมเลกุล 46.07

ความหนาแน่น 0.789 กรัมต่อมิลลิลิตร

จุดหลอมเหลว -130 °C

ที่มา: http://www.chemtrack.org/MSDS-Result.asp

รูปที่ 2.5 แนวโน้มความต้องการเอทานอลที่สูงขึ้นในสังคมโลก
ที่มา : http://www.abengoabioenergy.com/bioethanol

2.2.1 กระบวนการผลิตเอทานอลสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ (Alfenore และคณะ , 2004)

2.2.1.1 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี (chemical synthesis)

เป็นการผลิตเอทานอลจากอนุพันธ์สารปิโตรเลียม โดยการนำเอทีลีน (ethylene) มาทำปฏิกิริยากับน้ำที่อุณหภูมิสูง ความดันสูง และใช้ทังสเตนออกไซด์ (P_2O_5) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ดังสมการ (Wade, 1995)

$$H_2C{=}CH_2 + H_2O \xrightarrow[\text{catalyst}]{\text{100 - 300 atm, 300 °C}} CH_3\text{-}CH_2\text{-}OH$$

แต่เดิมนิยมผลิตเอทานอลด้วยกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เพราะเป็นกระบวนการที่รวดเร็ว และไม่ยุ่งยาก แต่ต้องใช้สารเริ่มต้นที่เป็นผลผลิตจากปิโตรเลียม ซึ่งในปัจจุบันมีการขึ้นราคาน้ำมันปิโตรเลียม และเกิดภาวการณ์ขาดแคลนน้ำมันปิโตรเลียม จึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ทำให้การผลิตเอทานอลจากกระบวนการหมักสารชีวมวลได้รับความนิยมมากขึ้นในปัจจุบัน เพราะมีต้นทุนที่ถูกกว่า (พรวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์, 2545)

2.2.1.2 เอทานอลที่ผลิตจากกระบวนการหมัก (fermentation)

เป็นการผลิตเอทานอลโดยใช้จุลินทรีย์ ซึ่งจุลินทรีย์จะเป็นตัวเปลี่ยนวัตถุดิบให้กลายเป็นเอทานอล จุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถผลิตเอทานอล ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา จุลินทรีย์ซึ่งเป็นที่สนใจสำหรับการผลิตเอทานอลระดับอุตสาหกรรม คือ ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*), *Shizosaccharomyces pombe* และ *Kluyveromyces fragilis* ยีสต์เหล่านี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่เหมือนกัน แต่เนื่องจาก *Saccharomyces*

cerevisiae เป็นยีสต์ที่ทนต่อภาวะแวดล้อมต่างๆ ที่ไม่เหมาะสมได้ดีกว่ายีสต์ชนิดอื่น ดังนั้นในปัจจุบันการผลิตเอทานอลส่วนใหญ่จึงใช้เชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* นอกจากนี้ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการผลิตเอทานอลโดยใช้แบคทีเรียจีนัส *Zymomonas* คือ *Zymomonas mobilis* และจีนัส *Clostridium* คือ *Clostridium. thermocellum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนสามารถหมักเซลลูโลส และเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียทั้งสองจีนัสดังกล่าวมีความทนต่อเอทานอลได้ต่ำกว่ายีสต์ ดังนั้นจึงไม่นิยมนำแบคทีเรียมาใช้ผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม (Waites และ Michael, 2001 อ้างถึงใน ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์, 2547)

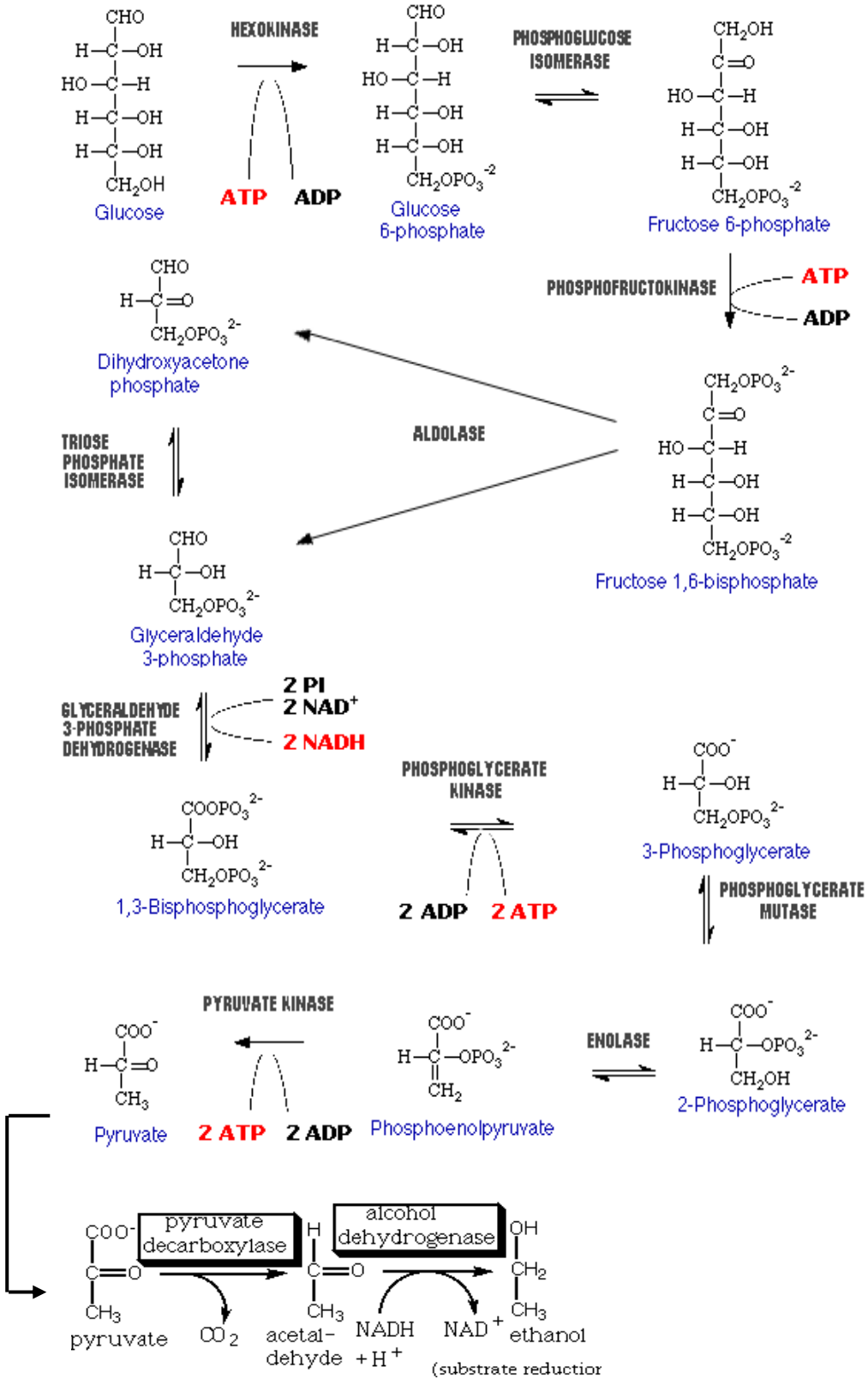
การผลิตเอทานอลจากน้ำตาลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* จะประกอบด้วย 2 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกยีสต์จะใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) เป็นอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอลโดยผ่านกระบวนการ glycolysis หรือ Emden-Meyerhof-Panas pathway ดังแสดงในรูปที่ 2.6 จากนั้น pyruvate ที่สร้างขึ้นจากวิถีไกลโคไลซิสจะถูก decarboxylation โดยมีเอนไซม์ pyruvate decarboxylase ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้เป็น acetaldehyde ซึ่ง acetaldehyde จะถูกรีดิวซ์ต่อไปเป็นเอทานอล โดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ที่อาศัย $NADH_2$ ($NADH_2$ dependent alcohol dehydrogenase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Paturau, 1987)

วิถีโดยย่อของการเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นเอทานอลโดยยีสต์เป็นดังนี้

$$\underset{\text{กลูโคส}}{C_6H_{12}O_6} \xrightarrow{\text{ยีสต์}} \underset{\text{เอทิลแอลกอฮอล์}}{2\ CH_3CH_2OH} + \underset{\text{คาร์บอนไดออกไซด์}}{2\ CO_2} + \underset{\text{พลังงาน}}{26.0\ \text{แคลอรี่}}$$

ตามทฤษฎี น้ำตาลกลูโคส 100% จะถูกเปลี่ยนเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และเอทานอล 48.89 และ 51.11 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักของน้ำตาลกลูโคส ตามลำดับ แต่ในทางปฏิบัติเอทานอลที่ผลิตได้จะอยู่ในช่วง 90 ถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เนื่องจากอาจเกิดการสูญเสียไปเป็นสารประกอบอื่นๆ หรืออาจถูกใช้เพื่อการสร้างเซลล์ของยีสต์ ทำให้ได้เอทานอลน้อยกว่าค่าทางทฤษฎี (Paturau, 1987)

ขั้นตอนที่ 2 เป็นการนำเอทานอลที่ได้มาผ่านการกลั่นหากต้องการให้เอทานอลมีความเข้มข้นและบริสุทธิ์สูงขึ้น



รูปที่ 2.6 วิถีการสร้างเอทานอลโดยผ่าน Emden-Meyerhof-Panas pathway

ที่มา: http://www.library.csi.cuny.edu/~davis/Bio101_Davis/Glycolysis_Fermentation/Glycolysis.htm

2.3 การผลิตเอทานอลจากแป้ง

ในการใช้แป้งเป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตเอทานอลด้วย *Saccharomyces cervisiae* ในสายพันธุ์ธรรมชาติ (wild type) นั้น ต้องทำการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลกลูโคสก่อน เนื่องจากยีสต์ในสายพันธุ์ธรรมชาติสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ฟรักโตส ซูโครส มอลโตส และมอลโตไตรโอส (maltotriose) ได้ แต่ไม่สามารถใช้แป้งได้โดยตรง (Waites และMichael, 2001)

2.3.1 การเปลี่ยนแป้งเป็นกลูโคสประกอบด้วยขั้นตอนหลัก 3 ขั้นตอน ได้แก่

2.3.1.1 gelatinization

เป็นกระบวนการให้ความร้อนแก่น้ำแป้งที่อุณหภูมิสูง ทำให้พันธะไฮโดรเจนที่ยึดโครงสร้างใน เม็ดแป้งอ่อนลง มีผลให้โมเลกุลของน้ำเข้าไปแทรกตัวอยู่ในเม็ดแป้ง เม็ดแป้งจึงพองตัว (swelling) และแตกออก ก่อให้เกิดสารลักษณะข้นหนืด (starch paste) ซึ่งสารละลายข้นหนืดที่ได้เป็นส่วนผสมของอะมิโลส และอะมิโลเพกติน ที่หลุดออกมาจากเม็ดแป้ง เรียกกระบวนการนี้ว่า gelatinization (Kimura และ Robyt, 1996) แต่หากปล่อยให้สารละลายแป้งที่เกิด gelatinization แล้วเย็นลง โมเลกุลของแป้งบางส่วนโดยเฉพาะโมเลกุลของอะมิโลสที่อยู่ใกล้กันจะเกิดการจัดเรียงตัวกันใหม่ด้วยพันธะไฮโดรเจนระหว่างโมเลกุลของสาย มีผลให้เกิดการตกตะกอน เกิดลักษณะเจลที่หนืดเหนียว เรียกปรากฏการณ์นี้ว่าการเกิด retrogradation (Maarel และคณะ, 2002)

กระบวนการ gelatinization นี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญในการปรับสภาพแป้งให้เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลในขั้นตอนต่อไป เนื่องจากเอนไซม์โดยส่วนใหญ่ไม่สามารถย่อยเม็ดแป้งที่อยู่ในสภาพสมบูรณ์ได้ แต่มักจะย่อยเม็ดแป้งที่เสียสภาพแล้วเท่านั้น (Mitsuiki และคณะ, 2005)

2.3.1.2 liquefaction

เป็นขั้นตอนลดความหนืดของแป้งที่ผ่านการเจลลาติไนซ์แล้ว โดยการย่อยโมเลกุลแป้งแบบสุ่ม (random hydrolysis) ของลูกโซ่กลูโคส เมื่อการไฮโดรไลซ์เกิดขึ้น ทำให้ขนาดโมเลกุลของลูกโซ่กลูโคส และความหนืดลดลง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากขั้นตอนนี้ส่วนใหญ่เป็น เด็กซ์ตริน มอลโตส และกลูโคส โดยทั่วไปแล้วในขั้นตอนนี้นิยมใช้เอนไซม์แอลฟาอะมิเลสในการย่อยแป้ง (Park และคณะ, 2005)

α –amylase (α -1,4 –glucan 4- glucanohydrolase (EC 3.2.1.1)) มีชื่อสามัญว่า ไดแอสเทส (diastase) พบได้ในพืช สัตว์ และจุลินทรีย์บางชนิด (Tanyildizi และคณะ, 2005) โดยลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ในการย่อยสลายคือ เจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะ α -1,4 glycosidic แบบสุ่ม (random hydrolysis) ในอะมิโลส อะมิโลเพกติน และไกลโคเจน หากเกิดการย่อยไม่สมบูรณ์จะได้ เด็กซ์ตริน มอลโตส และกลูโคส แต่ถ้าเกิดการย่อยสมบูรณ์จะได้มอลโตส และกลูโคส ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จะมีโครงรูป (configuration) แบบเดิมคือ α- configuration (Forgaty และ Kelly, 1979)

ภาวะการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลสในขั้นตอนนี้ โดยส่วนใหญ่แล้วช่วงอุณหภูมิที่ใช้มีค่าประมาณ 70 ถึง 105 องศาเซลเซียส โดยค่า pH ของสารละลายแป้ง มักปรับให้อยู่ในช่วงประมาณ 5.0 ถึง 6.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์ และเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการในขั้นตอนนี้อาจมีการให้ความร้อน หรือปรับค่า pH ของน้ำแป้ง เพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์ น้ำแป้งที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ในขั้นตอนนี้ควรมีค่า

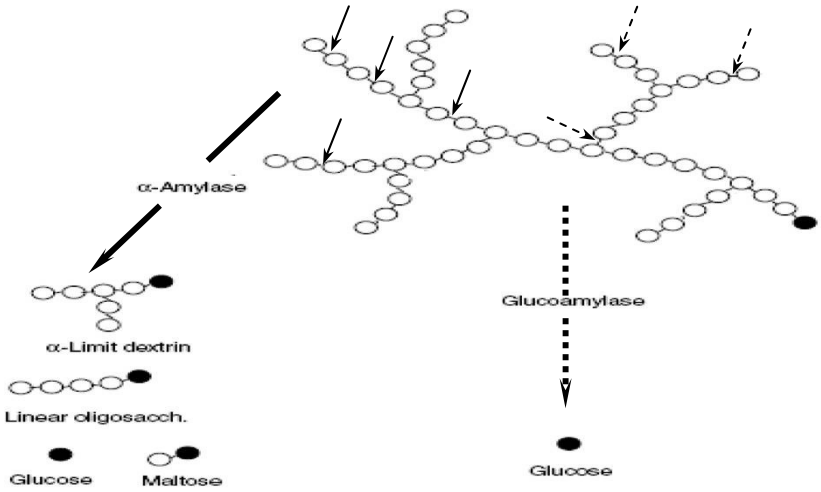
เปอร์เซ็นต์ DE (Dextrose Equivalence หรือ ค่าสมมูลเดกซ์โทรส) ประมาณ 10 ถึง 20 ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิด retrogradation ของแป้ง รวมถึงเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคอะมิเลสในขั้นตอนต่อไป (กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2543)

2.3.1.3 saccharification

เป็นการไฮโดรไลซ์แป้งให้กลายเป็นโมเลกุลน้ำตาลหากเป็นการไฮโดรไลซ์ที่สมบูรณ์จะได้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสทั้งหมด แต่ในทางปฏิบัติอาจได้น้ำตาลมอลโทส หรือมอลโทไตรโอสด้วย โดยทั่วไปแล้วในขั้นตอนนี้นิยมใช้เอนไซม์กลูโคอะมิเลสในการย่อยแป้ง (Crabb และ Mitchinson, 1997)

glucoamylase (1,4 - α -D-glucan glucohydrolase,(EC 3.2.1.3) หรือ γ – amylase หรือ amyloglucosidase) ส่วนใหญ่พบได้ในจุลินทรีย์ เช่น รา แบคทีเรีย โดยลักษณะที่สำคัญของเอนไซม์ในการย่อยสลายคือ เจาะจงต่อการย่อยสลายพันธะไกลโคซิลชนิด α -1,3 α -1,4 และ α -1,6 โดยจะตัดสายโพลิเมอร์ของกลูโคสจากปลายทางด้านไม่เป็นรีดิวซ์ (non-reduce) ไปทีละหน่วยของกลูโคส หากมีการย่อยสลายแบบสมบูรณ์จะได้กลูโคสเพียงอย่างเดียว โดยกลูโคสจะมีโครงรูปต่างไปจากเดิม คือได้ β–D-glucose (Forgaty และ Kelly, 1979)

โดยส่วนใหญ่แล้วการย่อยแป้งด้วยกลูโคอะมิเลสในขั้นตอนนี้มักใช้เวลาค่อนข้างนาน คือ ตั้งแต่ 8 ถึง 72 ชั่วโมง ซึ่งเวลาที่ใช้ขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์ และผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ช่วงอุณหภูมิที่ใช้ในการย่อยแป้งมีค่าประมาณ 50 ถึง 70 องศาเซลเซียส และค่า pH มักปรับให้อยู่ในช่วง 4.5 ถึง 5.5 (ขึ้นอยู่กับแหล่งของเอนไซม์) ซึ่งเมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการในขั้นตอนนี้แล้ว บางครั้งอาจต้องปรับค่า pH หรือ ใช้ความร้อนเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์กลูโคอะมิเลส แต่การใช้ความร้อนเพื่อหยุดการทำงานของเอนไซม์นั้นเป็นที่นิยมมากกว่า เพราะนอกจากเป็นการหยุดการทำงานของเอนไซม์แล้ว ยังเป็นการทำลายจุลินทรีย์ที่ปะปนเข้ามาด้วย (กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2543) เช่น มีการเพิ่มอุณหภูมิให้เท่ากับ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ภายหลังจากการย่อยแป้งด้วยกลูโคอะมิเลสแล้ว (ประเสริฐ หาญเมืองใจ, 2543) สำหรับการผลิตน้ำตาลกลูโคสนั้น ค่าเปอร์เซ็นต์ DE ที่ได้ควรมีค่ามากกว่า 95 (กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, 2543)



รูปที่ 2.7 ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส
ที่มา: Bertoldo และ Antranikian (2002)

การย่อยแป้งในขั้นตอน liquefaction และ saccharification สามารถใช้กรดแทนการใช้เอนไซม์ได้ (Kutluö และคณะ, 2002) โดยเริ่มจากการค้นพบการผลิตกลูโคสของ Kirchhoff ในปี 1811 โดยการนำแป้งผสมกรด H_2SO_4 แล้วนำไปให้ความร้อนจนเดือด พบว่าผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นมีรสหวาน และเมื่อเย็นลงสามารถตกผลึกได้ ต่อมาได้มีการนำกรดต่าง ๆ มาใช้ย่อยแป้งมากขึ้น เช่น H_2CO_3 HCl และ HNO_3 แต่เนื่องจากการใช้กรดนั้นต้องมีความระมัดระวังสูง รวมถึงอุปกรณ์และเครื่องมือต้องสามารถทนต่อการกัดกร่อนของกรดได้ (ซึ่งมีราคาสูง) นอกจากนี้ก่อนนำน้ำตาลที่ได้จากการย่อยด้วยกรดไปใช้ต้องปรับสภาพให้เป็นกลางก่อนด้วยเบส ทำให้เกิดเกลือปริมาณมาก อีกทั้งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเป็นแบบไม่จำเพาะ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้อาจไม่บริสุทธิ์ (ไม่ใช่กลูโคสทั้งหมด) (สุนีย์ โชตินีรนาท, 2539) การย่อยแป้งโดยใช้กรด แม้ว่าจะให้เปอร์เซ็นต์น้ำตาลรีดิวซ์ (reducing sugar) สูงถึง 98.8% แต่วิธีการนี้ก็ยังไม่เป็นที่ยอมรับ เพราะจะให้ผลผลิตแอลกอฮอล์ที่ต่ำ เนื่องจากอาจได้น้ำตาลที่ไม่สามารถหมักได้ (non-fermentable sugar) อยู่เป็นจำนวนมาก รวมถึงผลิตผลพลอยได้อาจเป็นพิษต่อเซลล์ของยีสต์ (Menezes, 1978 อ้างถึงใน สมชาย ดอนคงดี ,2537) จากเหตุผลดังกล่าวทำให้ปัจจุบันนิยมใช้เอนไซม์ในการย่อยแป้งมากกว่าการใช้กรด

2.3.2 **เอนไซม์อะมิเลสที่ได้จากจุลินทรีย์**

อะมิเลสที่ได้จากจุลินทรีย์มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมผลิตกระดาษ อุตสาหกรรมผลิตแอลกอฮอล์ และอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น โดยจุลินทรีย์ที่สร้างอะมิเลส ได้แก่ แบคทีเรีย ยีสต์ และรา

ตารางที่ 2.3 ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะมิเลส (Pandey และคณะ, 2000)

alpha-amylase	beta-amylase	glucoamylase
Aeromonas caviae	*Bacillus cereus*	*Acremonium zonatum*
Alicyclobacillus acidocaldarius	*Bacillus circulans*	*Amylomyces rouxii*
Alteromonas haloplanetis	*Bacillus megatarium*	*Arxula adeninivorans*
Aspergillus awamorei	*Bacillus polymyxa*	*Aspergillus* sp.
Aspergillus flavus	*Clostridium thermocellum*	*Aspergillus awamori*
Aspergillus fumigatus	*Pseudomonas* sp.	*Aspergillus candidus*
Aspergillus kawachi	*Rhizopus japonicus*	*Aspergillus foetidus*
Aspergillus niger	*Streptomyces* sp.	*Aspergillus niger*
Aspergillus oryzae		*Aspergillus oryzae*
Aspergillus usanii		*Aspergillus phoenicus*
Bacillus acidocoldarius		*Aspergillus saitri*
Bacillus amyloliquefaciens		*Aspergillus terreus*
Bacillus brevis		*Bacillus firmus/lentus*
Bacillus circulans		*Bacillus stearothermophillus*
Bacillus coagulans		*Candida famata*
Bacillus flavothermus		*Candida fennica*
Bacillus globisporus		*Cephalosporium charticola*
Bacillus licheniformis		*Chalara paradoxa*
Bacillus megaterium		*Clostridium* sp.
Bacillus stearothermophilus		*Clostridium acetobutylicum*
Bacillus subtilis		*Clostridium thermohydrosulfuricum*
Chloroflexus aurantiacus		*Clostridium thermosaccharolyticum*
Clostridium acetobutylicum		*Clostridium thermosulfurogenes*
Clostridium butricum		*Collectotrichum gloesporoides*
Clostridium thermosulfurogenes		*Coniophora cerebella*
Filobasidium capsuligenum		*Endomyces* sp.
Halobacterium halobium		*Endomycopsis capsularis*
Halobacterium salinarium		*Endomycopsis fibuligera*
Humicola insolens		*Flavobacterium* sp.

ตารางที่ 2.3 (ต่อ) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะมิเลส (Pandey และคณะ, 2000)

alpha-amylase	beta-amylase	glucoamylase
Humicola lanuginosa		*Fusidium* sp.
Humicola stellata		*Halobacter sodamense*
Lactobacillus brevis		*Humicola lanuginosa*
Lactobacillus cellobiosus		*Lactobacillus brevis*
Malbrachea pulchella var.		*Monscus kaoling*
sulfurea		*Mucor rouxianus*
Micrococcus luteus		*Mucor javanicus*
Micrococcus varians		*Neurospora crassa*
Micromonospora vulgaris		*Neurospora sitophila*
Mucor pusillus		*Paecilomyces globosus*
Myceliophthora thermophila		*Paecilomyces varioti*
Myxococcus coralloides		*Penicillium italicum*
Nocardia asteroides		*Penicillium oxalicum*
Penicillium brunneum		*Piricularia oryzae*
Pseudomonsa stutzeri		*Rhizoctania solani*
Pycnoporus sanguineus		*Rhizopus delemar*
Pyrococcus woesei		*Rhizopus javanicus*
Rhizopus sp.		*Rhizopus niveus*
Scytalidium sp.		*Rhizopus oligospora*
Schizophyllum commune		*Rhizopus oryzae*
Talaromyces thermophilus		*Rhizooctonia solani*
Thermoactinomyces sp.		*Saccharomyces diastaticus*
Thermoactinomyces vulgaricus		*Schizophyllum commune*
Thermococcus profundus		*Schwanniomyces alluvius*
Thermomonospora viridis		*Schwanniomyces occidentalis*
Thermonospora curvata		*Thermomyces lanuginosus*
Thermonospora vulgaris		*Torula thermophilla*
Thermomyces lanuginosus		*Trichoderma reesei*
Thermotoga maritima		*Trichoderma viride*

Bacillus sp. เป็นแบคทีเรียชนิดหนึ่งที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง (amylolytic enzymes) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Carlos และคณะ (1999) และ Reddy และคณะ (2003)) ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะผลิตแอลฟาอะมิเลสในปริมาณสูง ทำให้มีการนำไปผลิตเอนไซม์ทางการค้ามากมาย ตัวอย่างสายพันธุ์แบคทีเรียชนิด *Bacillus* ที่ใช้ในการผลิตแอลฟาอะมิเลสในระดับอุตสาหกรรม ได้แก่ *Bacillus subtilis* *Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus licheniformis* *Bacillus stearothermophilus* *Bacillus megaterium* และ *Bacillus circulans* เป็นต้น (Qader และคณะ, 2006) ซึ่งคุณสมบัติและการทำงานของเอนไซม์จะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต ภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นนับว่ามีผลต่อการเจริญและการผลิตแอลฟาอะมิเลสจาก *Bacillus* sp.

2.3.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อย่อยแป้ง และผลิตเอทานอล

2.3.3.1 แหล่งคาร์บอน (carbon source)

แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ และการผลิตแอลฟาอะมิเลสของ *Bacillus* sp.

งานวิจัยส่วนใหญ่พบว่า แป้ง และคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลใหญ่สามารถชักนำให้เกิดการสร้างแอลฟาอะมิเลสในแบคทีเรีย *Bacillus* ได้ดี ส่วนแหล่งคาร์บอนที่เซลล์สามารถนำไปใช้ได้ง่าย เช่น น้ำตาลกลูโคส มอลโทส อาจมีผลให้การผลิตแอลฟาอะมิเลสลดลงได้ เนื่องจากการเกิด catabolite repression (Konsula และ Kyriakides, 2004) เช่น Teodoro และ Martins (2000) พบว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนทำให้แบคทีเรีย *Bacillus* sp. ผลิตแอลฟาอะมิเลสลดลง แต่อย่างไรก็ตามก็มีบางรายงานวิจัยที่พบว่าการใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอนมีผลให้ *Bacillus subtilis* ผลิตแอลฟาอะมิเลสได้น้อยกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคส (Anto และคณะ, 2006 , Jamuna และ Ramakrishna, 1992 อ้างถึงใน Sarikaya และ Gürgün,2000) และมีบางรายงานวิจัยที่พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีแป้ง หรือไม่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบเลย แบคทีเรียก็สามารถผลิตแอลฟาอะมิเลสได้เช่นกัน ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่าอะมิเลสที่ผลิตโดยจุลินทรีย์นี้เป็นเอนไซม์ที่ต้องถูกชักนำเป็นบางส่วนโดยสับสเตรท (Aiyer, 2004)

แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces* sp.

ภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยีสต์จำเป็นต้องใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและพลังงาน ส่วนใหญ่สารอินทรีย์ที่ใช้คือน้ำตาล กลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ แต่กลูโคสอาจไม่ได้เป็นน้ำตาลที่เกิดเมแทบอลิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพที่สุดในยีสต์ทุกชนิด โดยปกติในธรรมชาติกลูโคสจะไม่ได้มีอยู่อย่างอิสระ แต่จะอยู่รูปของพอลิเมอร์จำพวกเซลลูโลส แป้ง และพอลิแซ็กคาไรด์ (Berry และคณะ,1987) การหมักเอทานอลที่ความเข้มข้นน้ำตาลสูงสามารถช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ แต่ปริมาณความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์และการหมักเอทานอลได้เช่นกัน โดยการยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้เกิดจากการเกิด catabolite repression และการเกิดพลาสโมไลซิส (plasmolysis) สำหรับความเข้มข้นของน้ำตาลที่สามารถยับยั้งการหมักนั้น แท้ที่จริงแล้วเกิดจากลักษณะของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ซึ่ง

โดยส่วนใหญ่แล้วหากความเข้มข้นของน้ำตาลสูงกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จะส่งผลให้อัตราการหมักเริ่มต้นลดลง (Jones และคณะ, 1981)

ตารางที่ 2.4 แหล่งคาร์บอนที่ *Saccharomyces cerevisiae* สามารถใช้ได้ (Berry และคณะ,1987)

glucose	melezitose
galactose	maltotriose
mannose	raffinose
fructose	lactate
sucrose	succinate
maltose	glucitol
melibiose	glycerol
trehalose	mannitol
deoxyribose	ethanol

2.3.3.2 **แหล่งไนโตรเจน** (nitrogen source)

แหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญ และการผลิตแอลฟาอะมิเลสของ *Bacillus* sp.

การเลือกใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดใดนั้นขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ โดยแหล่งไนโตรเจนที่ดีนั้นควรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่หาได้ง่าย และราคาถูก นอกจากนี้ควรกระตุ้นให้เกิดการเจริญ และการสร้างเอนไซม์ด้วย แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่นิยมใช้ในการผลิตแอลฟาอะมิเลสด้วยแบคทีเรีย *Bacillus* ได้แก่ ยูเรีย สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) สารสกัดจากถั่วเหลือง (soyabean meal) สารสกัดจากเนื้อ (beef extract) corn steep liquor พอลิเปปโทน (polypeptone) และ เปปโทน (peptone) เป็นต้น (Goyal และคณะ, 2005) ในกรณีแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ ได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$) แอมโมเนียมไนเตรท (NH_4NO_3) แอมโมเนียมคลอไรด์ (NH_4Cl) โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$) ฯลฯ (Haq และคณะ, 2002) โดยชนิดและปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตแอลฟาอะมิเลสแสดงไว้ในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ตัวอย่างแหล่งไนโตรเจนที่ใช้ในการผลิตแอลฟาอะมิเลสของแบคทีเรียจีนัส *Bacillus*

ชนิดสายพันธุ์แบคทีเรีย *Bacillus*	**แหล่งไนโตรเจน**	**เอกสารอ้างอิง**
Bacillus sp. I-3	peptone	Aiyer (2004)
Bacillus subtilis	$(NH_4)_2SO_4$ และ tryptone	Konsula และ Liakopoulou (2004)
Bacillus subtilis	$(NH_4)_2SO_4$	Sarikaya และ Gürgün (2000)
Bacillus amyloliquefaciens I	yeast extract	Sarikaya และ Gürgün (2000)
Bacillus amyloliquefaciens II	$(NH_4)_2SO_4$	Sarikaya และ Gürgün (2000)
Bacillus licheniformis	soyabean meal	Goyal และคณะ (2005)

แหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces* sp.

ยีสต์มีไนโตรเจนภายในเซลล์ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง สารหลายชนิดสามารถใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ โดยแหล่งไนโตรเจนที่มีโมเลกุลขนาดเล็กและใช้ง่ายได้แก่ แอมโมเนียมไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียมไนเตรต แอมโมเนียมคลอไรด์ และแอมโมเนียมซัลเฟต โดยเฉพาะแอมโมเนียมซัลเฟตมักใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงยีสต์ เพราะนอกจากให้ไนโตรเจนแล้วยังให้ซัลเฟอร์ด้วย ซึ่งยีสต์ทุกชนิดสามารถใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนได้ ส่วนไนเตรทและไนไตรท์นั้นโดยทั่วไปยีสต์ไม่สามารถนำมาใช้ได้นอกจากยีสต์บางชนิด เช่น *Candida* sp. และ *Pichia* sp.เป็นต้น

นอกจากนี้ในทางอุตหสาหกรรมก็มีการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการผลิตเอทานอลเช่นกัน แต่อย่างไรก็ตาม *Saccharomyces* sp. จะสามารถใช้ยูเรียได้ดีก็ต่อเมื่อมีเติมการไบโอตินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย (Berry และคณะ,1987)

2.3.3.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตแอลฟาอะมิเลสของ *Bacillus* sp.

แบคทีเรียจีนัส *Bacillus* จัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงอุณหภูมิค่อนข้างกว้าง โดย *Bacilus* แต่ละสายพันธุ์มีความต้องการอุณหภูมิเพื่อการเจริญ และการผลิตแอลฟาอะมิเลสที่แตกต่างกัน มีรายงานว่า *Bacillus* สายพันธุ์ที่นิยมใช้ในการผลิตแอลฟาอะมิเลสทางการค้าได้แก่ *Bacillus amyloliquefaciens* *Bacillus subtilis* *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus stearothermophilus* ผลิตแอลฟาอะมิเลส ในช่วงอุณหภูมิ 37 ถึง 60 องศาเซลเซียส (Sivaramakrishnan และคณะ, 2006) มีหลายรายงานการวิจัยที่พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลฟาอะมิเลสเป็นอุณหภูมิเดียวกัน (Qader, 2006) อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลฟาอะมิเลส อาจแตกต่างกัน เช่น Mamo และ Gessesse (1999) รายงานว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ WN11 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิเท่ากับ 65 องศาเซลเซียส

ในขณะที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต และการทำงานของแอลฟาอะมิเลสเท่ากับ 55 องศาเซลเซียส จากการวิจัยของ Qader และคณะ (2006) กล่าวว่า ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส *Bacillus licheniformis* CUM 305 ไม่มีการผลิตแอลฟาอะมิเลส ถึงแม้ว่าที่อุณหภูมิดังกว่าเป็นอุณหภูมิมี่ทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดีที่สุดก็ตาม นอกจากนี้อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการทำงาน (กิจกรรม) ของแอลฟาอะมิเลส อาจแตกต่างไปจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์ เช่นในรายงานการวิจัยของ Goyal และคณะ (2005) พบว่า *Bacillus* sp. I-3 สามารถเจริญ และผลิตแอลฟาอะมิเลสได้ที่ที่สุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ในขณะที่อุณหภูมิที่ทำให้แอลฟาอะมิเลสมีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส

อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces* sp.

ในระหว่างการหมักเอทานอลจะมีความร้อนเกิดขึ้น โดยกลูโคส 1 โมเลกุล จะให้ปริมาณความร้อน 26 แคลอรี่ดังสมการ

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 26.0 \text{ แคลอรี่}$$

ยีสต์ส่วนใหญ่จะเจริญได้รวดเร็วที่อุณหภูมิ 20 ถึง 30 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์ทั่วไปสามารถเจริญได้คือ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส มียีสต์บางสายพันธ์เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่านี้เล็กน้อย ไม่มีรายงานว่ามียีสต์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส ปัจจัยที่สำคัญที่จุลินทรีย์สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากน้อยต่างกันมีหลายประการ เช่น การสังเคราะห์เอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ กลไกการควบคุมภายในเซลล์ การนำอาหารเข้ามาสู่เซลล์ และองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น (Hutter และ Oliver,1998) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการหมักเอทานอลควรอยู่ระหว่าง 25 ถึง 30 องศาเซลเซียส เนื่องจากปฏิกิริยาการหมักเอทานอลเกิดความร้อนทำให้อุณหภูมิในถังหมักสูงขึ้น ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตเอทานอลจะต้องลดอุณหภูมิของถังหมักลงและรักษาอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 32 ถึง 33 องศาเซลเซียส หรือที่อุณหภูมิต่ำกว่า 35 องศาเซลเซียส โดยวิธีการต่างๆ เช่น การพ่นน้ำให้เป็นฝอยทั่วผิวนอกของถังหมัก ใช้ cooling coil ในถังหมัก หรือผ่านส่าออกไปทำให้เย็นลงนอกถังหมัก (Paturau, 1987)

2.3.3.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตแอลฟาอะมิเลสของ *Bacillus* sp.

การรักษาค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแอลฟาอะมิเลส โดยส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* สามารถเจริญได้ในช่วง pH ค่อนข้างกว้าง ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิต และการทำงานของแอลฟาอะมิเลส มักอยู่ในช่วงที่เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ เช่น *Bacillus* sp. K-12 เจริญได้ดีในช่วงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 4.5 ถึง 10.5 โดยค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อต่อการผลิตแอลฟาอะมิเลสอยู่ในช่วง 6.0 ถึง 8.0 (Kiran และคณะ, 2005) *Bacillus licheniformis* TCRDC-B13 เจริญได้ในช่วงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 3.0 ถึง 11.0 โดยค่า pH ที่สามารถผลิตแอลฟาอะมิเลสได้อยู่ในช่วง 5.0 ถึง 10.0 ซึ่งแอลฟาอะมิเลสของจุลินทรีย์ดังกล่าวมีแอกทิวิตีสูงสุดในช่วง pH เท่ากับ 6.0 ถึง 9.0 (Bajpai, 1989 อ้างถึงใน Kiran และคณะ, 2005)

ตัวอย่างค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟาอะมิเลสที่ได้จากแบคทีเรีย *Bacillus* ในแต่ละสายพันธุ์แสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคทีเรียจีนัส *Bacillus*

แบคทีเรีย	ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของแอลฟาอะมิเลส	เอกสารอ้างอิง
Bacillus sp.	5.5	Pandey และคณะ , 2005
Bacillus sp.	11.0-12.0	Pandey และคณะ , 2005
Bacillus licheniformis	6.0-8.0	Pandey และคณะ , 2005
Bacillus subtilis	5.6	Pandey และคณะ , 2005
Bacillus subtilis	5.4-6.4	Pandey และคณะ , 2005
Bacillus amyloliquefaciens	4.0-7.0	Gangadharan และคณะ, 2006
Bacillus amyloliquefaciens I	5.9	Sarikaya และ GÜrgÜn, 2000
Bacillus amyloliquefaciens II	5.9	Sarikaya และ GÜrgÜn, 2000

ค่า pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces* sp.

โดยทั่วไปยีสต์ส่วนมากเจริญได้ดีในช่วง pH 3.5 ถึง 7.0 ค่า pH เริ่มต้นและ buffer capacity ของการหมักเอทานอลควรอยู่ในสภาพที่ยีสต์จะเกิดการหมักได้ตลอดกระบวนการหมัก เนื่องจากในระหว่างกระบวนการหมักเอทานอลจะมีการสร้างกรดโดยยีสต์และแบคทีเรียบางชนิดที่เจริญอยู่ด้วย (Rose และ Harrison ,1970) จึงต้องมีการปรับ pH เพื่อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม และเพื่อเป็นการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นจึงปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 4.0 ถึง 4.5 (Bazas และคณะ,1989) หรือ 4.0 ถึง 5.0 หรือ 4.8 ถึง 5.0 (Paturau, 1987)

2.3.4 การใช้เชื้อผสมเพื่อย่อยแป้งและหมักได้เอทานอล

การเปลี่ยนแป้งให้เป็นเอทานอลในวิธีการดั้งเดิมนั้นต้องอาศัยกระบวนการหลายขั้นตอน อันประกอบด้วย liquefaction , saccharification ซึ่งเป็นขั้นตอนในการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นน้ำตาล (ซึ่งอาจใช้กรด หรือเอนไซม์ (amylolytic enzymes) ดังที่ได้กล่าวมาแล้วข้างต้น แล้วจึงเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ด้วยกระบวนการหมักของ anaerobic bacteria หรือ anaerobic yeast ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae*

ถือว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ส่วนใหญ่ใช้ในทางอุตสาหกรรมเพื่อการผลิตเอทานอล แต่อย่างไรก็ตาม ข้อเสียของยีสต์ชนิดนี้คือ การขาดกิจกรรมของอะมิเลส(amylase) และกลูโคอะมิเลส (glucoamylase) ทำให้ยีสต์ชนิดนี้ไม่สามารถเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นเอทานอลได้โดยตรง (Kutluö และคณะ,2002) ดังนั้นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเอทานอลจากแป้งโดยใช้จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นในการเพิ่มประสิทธิภาพในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นเอทานอลในขั้นตอนเดียว ซึ่งสามารถทำได้หลายวิธี หนึ่งในวิธีที่นิยมคือ การใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งได้กับจุลินทรีย์ที่สามารถหมักเอทานอลได้ (Yoshitoshi และคณะ,1997) ทำให้ลดเวลา และขั้นตอนการทำงานที่ต้องใช้สำหรับการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยเอนไซม์ทางการค้า ซึ่งส่งผลให้ลดต้นทุนการผลิต (Hisayori และคณะ, 2004)

Dostálek และ Häggström (1983) (อ้างถึงใน Yoshitoshiและคณะ,1997) ได้ใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Saccharomyces fibuliger* และ *Zymomonas mobilis* ในการผลิตเอทานอลจากแป้งที่ละลายน้ำที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 30 กรัมต่อลิตร พบว่า เอทานอลที่ได้เป็น 9.7 กรัมต่อลิตร โดยอัตราการผลิตเอทานอลเป็น 0.54 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

Kamini และ Gunasekaran (1986) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลจากเชื้อร่วมระหว่าง *Kluyveromyces fragilis* NRRL 665 กับ *Zymomonas mobilis* NRRL B4286 พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 61.29 กรัมต่อลิตร แต่หากใช้เชื้อเดี่ยวของ *Kluyveromyces fragilis* NRRL 665 เพียงอย่างเดียว เอทานอลที่ผลิตได้ลดลงเป็น 52.98 กรัมต่อลิตร

Lezinou และคณะ (1994) ได้ผลิตเอทานอลจากข้าวฟ่างหวาน โดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *Fusarium oxysporum* กับ *Zymomonas mobilis* พบว่าปริมาณเอทานอลที่ได้เป็น 29.7 กรัมต่อ100 กรัมของข้างฟ่างแห้ง นอกจากนี้ยังได้ทดลองใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* กับ *Zymomonas mobilis* พบว่าเอทานอลที่ได้เป็น 29 กรัมต่อลิตร ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ผลิตนี้สามารถเพิ่มขึ้นได้หากทำการเติมหัวเชื้อ *Zymomonas mobilis* เพื่อการหมักเอทานอล ในชั่วโมงที่ 12 ของการเจริญเติบโตของ *Saccharomycopsis fibuligera* ที่อยู่ใน liquefied starch

Reddy และ Basappa (1996) การหมักแป้งมันสำปะหลังเป็นเอทานอลโดยการใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Endomycopsis fibuligera* กับ *Zymomonas mobilis* พบว่าได้ปริมาณเอทานอลมากขึ้น (10.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้เชื้อผสมชนิดอื่นและการใช้เชื้อเดี่ยว เมื่อมีการเติมกลูโคอะมิเลสลงในเชื้อผสมพบว่าผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นจาก 88 เปอร์เซ็นต์ เป็น 98 เปอร์เซ็นต์ของค่าทางทฤษฎี เมื่อใช้เชื้อผสมระหว่าง *Zymomonas mobilis* และ *Saccharomyces cerevisiae* พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ต่อน้ำตาลที่ถูกนำไปใช้เท่ากับ 0.5 กรัมต่อกรัม และได้ค่าอัตราการผลิตโดยปริมาตรเท่ากับ 15 กรัมเอทานอลต่อชั่วโมง

Verma และคณะ (2000) รายงานการผลิตเอทานอลจากแป้งดิบที่ไม่ได้ผ่านการย่อย(raw unhydrolysed starch) ความเข้มข้นเท่ากับ 60 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าถ้าใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดเดียวที่สามารถผลิตเอนไซม์อะมิเลสได้ ซึ่งได้แก่ *Saccharomyces diastaticus* และ *Endomycopsis capsularis* ปริมาณเอทานอลที่ได้จะเท่ากับ 16.8 และ 9.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ แต่หากใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Saccharomyces diastaticus* และ *Saccharomyces cerevisiae* 21 ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 24.8 กรัมต่อลิตร หรือหากใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Endomycopsis capsularis* และ *Saccharomyces. cerevisiae* 21 ได้ปริมาณเอทานอลเท่ากับ 16.0 กรัมต่อลิตร

Farid และคณะ (2002) ได้การศึกษาผลของการใช้อัตราการกวนที่แตกต่างกันต่อการหมักเอทานอลโดยใช้เซลล์อิสระและเซลล์ตรึงของ *Saccharomyces cerevisiae* ในการใช้เชื้อร่วมกับเซลล์อิสระของ *Aspergillus awamori* พบว่าอัตราการกวนมีผลต่อการย่อยแป้งและปริมาณกลูโคส การสะสมกลูโคอะมิเลสและแอลฟาอะมิเลสในอาหารที่ใช้ในการหมัก (fermentation medium) พบว่าได้ปริมาณเอนไซม์สูงสุดที่อัตราการกวนเท่ากับ 150-200 รอบต่อนาที หลังจาก 72 ชั่วโมง ในขณะที่อัตราการกวนที่ 200-300 รอบต่อนาที ทำให้การเจริญและการสะสมกลูโคสได้สูงสุด การผลิตแอลกอฮอล์ถูกกระตุ้นโดยอัตราการกวนต่ำ (50 รอบต่อนาที) และลดลงเมื่ออัตราการกวนเพิ่มขึ้น ผลการศึกษายังแสดงให้เห็นว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่ผลิตได้ขึ้นอยู่กับเวลาการเติมกล้าเชื้อยีสต์ เมื่อเติมกล้าเชื้อยีสต์หลังจากเชื้อราเจริญเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าปริมาณแอลกอฮอล์ที่เพิ่มขึ้นเป็น 84 75 89 และ 68 เปอร์เซ็นต์ ที่ 50 100 150 และ 250 รอบต่อนาทีตามลำดับ เมื่อเทียบกับการผลิตโดยใช้การเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์ 2 ชนิดลงไปพร้อมกันตั้งแต่เริ่มต้นของการหมัก การเลี้ยงเชื้อแบบแบตช์ของจุลินทรีย์ 2 ชนิดโดยใช้แป้งข้าวโพด 12 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อัตราการกวน 50 รอบต่อนาที ที่เวลา 72 ชั่วโมง ในทางกลับกันเมื่อใช้สภาวะเลี้ยงเชื้อเดียวกันและใช้ยีสต์ที่ถูกตรึงร่วมกับ *Aspergillus awamori* พบว่าได้แอลกอฮอล์มากขึ้นเป็น 3.7 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อัตราการกวน 200 รอบต่อนาที

Tanaka และคณะ(1986) (อ้างถึงใน Yoshitoshi และคณะ,1997) ได้ผลิตเอทานอลจากแป้งที่ละลายน้ำที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร โดยใช้เชื้อร่วมระหว่าง *Aspergillus awamori* กับ *Zymomonas mobilis* โดยใช้เทคนิค co-immobilization เข้าช่วย พบว่าเอทานอลที่ได้เท่ากับ 22.0 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 อุปกรณ์

อุปกรณ์	บริษัทผู้ผลิต , ประเทศ
กล้องจุลทรรศน์ (light microscope) รุ่น CH30	Olympus, Japan
เครื่องก๊าซโครมาโตกราฟี (gas chromatography) รุ่น CP3800	Varian, USA
แคปพิลลารี คอลัมน์ (capillary column)	Varian, USA
ชนิด CP-WAX 52 CB	
เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 30 ม.	
เครื่องกวนแบบมีแม่เหล็ก (magnetic stirrer/ hotplate) รุ่น 502P-2	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (psycrotherm incubator shaker)	New Brunswick Scientific, USA
รุ่น Innova 4330 หมุนแบบ rotary	
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น PB2002	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องชั่งหยาบ (laboratory balance) รุ่น PG2002-S	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องชั่งละเอียด (analytical balance) รุ่น AG204	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (centrifuge) รุ่น 6500	Kubota, Japan
เครื่องปั่นเหวี่ยงอุณหภูมิต่ำ (centrifuge) รุ่น J-30I	Beckman, USA
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Thermospectronic) รุ่น genesys 20	Spectronic Instruments, USA
เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น SevenEasy	Mettler Toledo, Switzerland
เครื่องผสม (vortex mixer) รุ่น Genie2	Scientific Industries, USA
เครื่องให้ความร้อน (stirring hot plate) รุ่น DS 201 HS	ISSCO, USA
ตู้ถ่ายเชื้อแบบ laminar flow รุ่น BV-124	Memmert, Germany
ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น UL-60	Memmert, Germany
ตู้อบแห้ง (dryer oven) รุ่น UL60	Gilson, France
ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 20 100 200 1,000 และ 5,000 มล.	Tomy, Japan
หม้ออบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (autoclave) รุ่น SS-325	Memmert, Germany
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (water bath shaker)	Amerex Instruments. USA
รุ่น Gyromax 939XL	

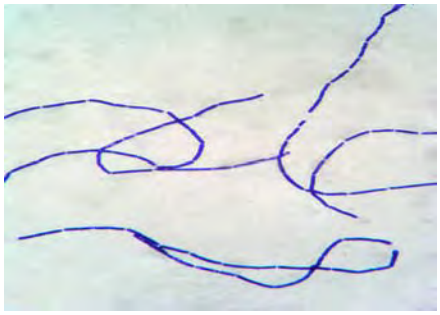
3.2.1 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต , ประเทศ
โพแทสเซียมคลอไรด์(KCl)	Carlo Erba, Italy
โพแทสเซียมโซเดียมทาร์เทรต ($C_4H_4KNaO_6.4H_2O$)	Univar, Australia
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	Unilab, USA.
ฟีนอล (C_6H_5OH)	E. Merk Damstadt, Germany
เฟอร์รัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	Carlo Erba, Italy
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต ($MnCl_2.4H_2O$)	E. Merk Damstadt, Germany
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต ($MgSO_4.7H_2O$)	E. Merk Damstadt, Germany
ยูเรีย (N_4H_4CO)	E. Merk Damstadt, Germany
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	Difco, USA
สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	Difco, USA
เอทานอล (C_2H_5OH)	E. Merk Damstadt, Germany
เอนไซม์กลูโคอะมิเลส (Dextrozyme GA)	Novozymes, Denmark
เอนไซม์แอลฟา-อะมิเลส (Kleistase)	Daiwa Kasei K.K., Japan
เอนไซม์ยูเรียเอส (EC3.5.1.5)	E. Merk Damstadt, Germany
แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)	E. Merk Damstadt, Germany
แอมโมเนียมโมลิบเดรตเตตระไฮเดรต ($(NH_4)_6Mo_7.4H_2O$)	J.T.Baker, USA.
แอมโมเนียมซัลเฟตเฮกซาไฮเดรต $(NH_4)_2Fe(SO_4)_2.6H_2O$	E. Merk Damstadt, Germany

3.2 จุลินทรีย์

3.2.1 *Bacillus* sp. CU-03 **(แยกและคัดเลือกโดย วิภาวี วงศ์ชนะ, 2545)**

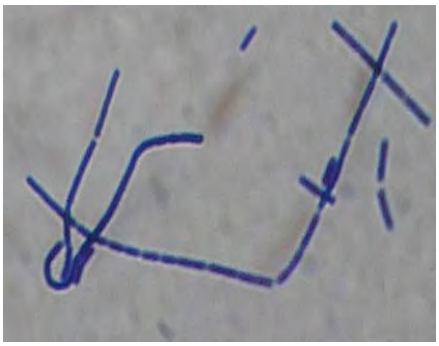
รูปที่ 3.1 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* sp. CU-03 เจริญบนอาหารแข็ง Nutrient Agar (NA) อายุ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.2 *Bacillus* sp. CU-03 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า

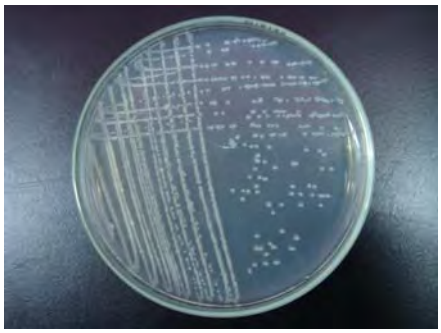
3.2.2 ***Bacillus subtilis*** IFO14140

รูปที่ 3.3 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus subtilis* IFO14140 เจริญบนอาหารแข็งสูตร Nakamura และคณะ (1999) อายุ 24 ชั่วโมง

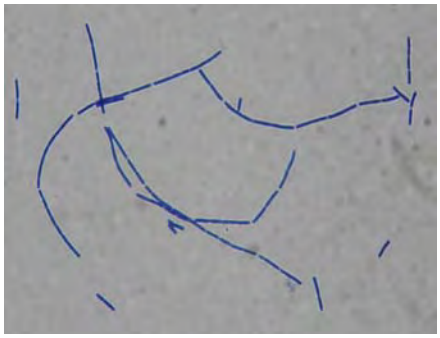


รูปที่ 3.4 *Bacillus subtilis* IFO14140 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.2.3 *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141



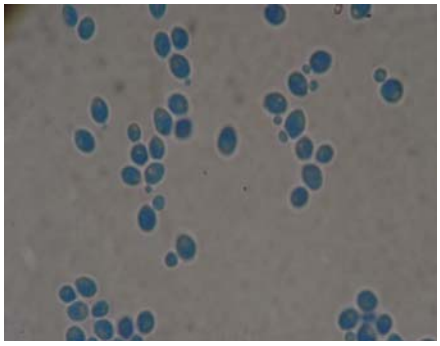
รูปที่ 3.5 ลักษณะโคโลนีของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เจริญบนอาหารแข็งสูตร Nakamura และคณะ (1999) อายุ 24 ชั่วโมง



รูปที่ 3.6 *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อย้อมสีแกรม กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.2.4 *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01

รูปที่ 3.7 ลักษณะโคโลนีของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เจริญบนอาหารแข็ง Yeast Peptone Dextrose (YPD) อายุ 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.8 ลักษณะรูปร่างของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.3.1 สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ (stock culture medium)

สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ *Bacillus* sp. CU-03 **และสำหรับคัดเลือก** *Bacillus* spp. **สายพันธุ์ที่ย่อยแป้งได้ดี คือ** starch agar (Difco manual, 1984) 1 **ลิตร ประกอบด้วย**

แป้งที่ละลายน้ำได้	10	กรัม
สารสกัดจากเนื้อ	3	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (การนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน)

สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* IFO14140 **และ** *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 **ใช้สูตรของ** Nakamura **และคณะ** (1999) **ใน** 1 **ลิตร ประกอบด้วย**

พอลิเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1	กรัม
วุ้นผง	15	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

สูตรอาหารแข็งสำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 **คือ** Yeast Peptone Dextrose (YPD) **ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย**

กลูโคส	20	กรัม
พอลิเปปโตน	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม
วุ้นผง	18	กรัม

ปรับ pH เป็น 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.2 **สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ** (seed culture medium)

สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus subtilis* IFO14140 **และ** *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 **ใช้สูตรของ** Nakamura **และคณะ** (1999) **ใน** 1 **ลิตร ประกอบด้วย**

พอลิเปปโตน	10	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	2	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	1	กรัม

ปรับ pH เป็น 7.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

สูตรอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 **ได้แก่**

อาหารเลี้ยงเชื้อ Basal Salt Medium (BSM) **ใช้สูตรของ** Winter, Luret **และ** Uribelarrae (1989) **ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย**

กลูโคส	20	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	3	กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	3	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตโดเดคะไฮเดรต	3	กรัม
โซเดียมกลูตาเมต	1	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ไดไฮเดรต	0.25	กรัม
แมกนีเซียมเฮปตะไฮเดรต	0.25	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	5	มิลลิกรัม
แอมโมเนียมเฟอรัสซัลเฟตเฮกซะไฮเดรต	1.5	มิลลิกรัม

ปรับ pH เป็น 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลูโคส	20	กรัม
พอลิเปปโตน	20	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	10	กรัม

ปรับ pH เป็น 4.5 และนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.3.3 **สูตรอาหารเหลว** MSM (Mineral Salt Medium) **สำหรับเลี้ยงเชื้อ** *Bacillus* spp. **เพื่อการย่อยแป้ง และเพื่อการผลิตเอทานอลเมื่อใช้จุลินทรีย์ผสม ซึ่งศึกษาโดย สุรเชษฐ์ วงศ์สิทธิ์ธนะกิจ** (2547) **ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย**

แป้งมันสำปะหลัง	10	กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	3	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	0.6	กรัม
แมกนีเซียมเฮปตาไฮเดรต	0.2	กรัม
สารสกัดจากยีสต์	0.1	กรัม
สารละลาย trace element	1	มิลลิลิตร

สารละลาย trace element **เตรียมโดย**

สารละลาย trace element ใน 1 โมลาร์ กรดไฮโดรคลอริก 1 ลิตร ประกอบด้วย

แคลเซียมคลอไรด์	20	กรัม
ซิงค์ซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต	1.30	กรัม
เฟอรัสซัลเฟตเฮปตะไฮเดรต	0.20	กรัม
แอมโมเนียมโมลิบเดต	0.60	กรัม
กรดบอริก	0.60	กรัม
แมงกานีสคลอไรด์เตตระไฮเดรต	0.08	กรัม
โคบอลต์คลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.50	กรัม
คอปเปอร์ซัลเฟตเพนตะไฮเดรต	0.05	กรัม
นิกเกิลคลอไรด์เฮกซะไฮเดรต	0.02	กรัม

แยกละลายแอมโมเนียมซัลเฟต โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟ แมกนีเซียมเฮปตาไฮเดรต สารสกัดจากยีสต์ และ trace element เมื่อละลายแล้วจึงนำมารวมกับส่วนของสารละลายแป้งมันสำปะหลังที่ต้มจนใส (วิธีการเตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลังดังภาคผนวก ก) ปรับ pH 7.0 แล้วนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

3.4 การเก็บรักษาจุลินทรีย์

เขี่ยเชื้อ *Bacillus* spp. โดยใช้ลูปเขี่ยเชื้อลาก (streak) ลงบนอาหารแข็งเอียง (agar slant) สำหรับเก็บรักษากล้าเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (กรณี *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง) เททับด้วยกลีเซอรอลปลอดเชื้อ แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3.5 การคัดเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ย่อยแป้งได้ดี

3.5.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่สามารถย่อยแป้งได้

นำแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus* sp. CU-03 *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 มาขีดเป็นแนวยาวบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (สำหรับ *Bacillus* sp. CU-03 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม (สุรเชษฐ์ วงศ์สิทธิ์ธนะกิจ, 2547) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งโดยสังเกตจากบริเวณใสรอบโคโลนี เมื่อหยดสารละลายไอโอดีนทับลงบนโคโลนีเลือก *Bacillus* สายพันธุ์ที่บริเวณใสรอบโคโลนีกว้างมาศึกษาต่อไป

3.5.2 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

เลี้ยง *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ศึกษาได้จากข้อ 3.5.1 ได้แก่ *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 บนอาหารแข็งโดยใช้อาหารสูตรของ Nakamura และคณะ (1999) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) กระจาย (suspend) เชื้อ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4

3.5.3 การเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพในการย่อยแป้ง

ถ่าย *Bacillus* spp. 2 สายพันธุ์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็น

เวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร แล้วเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

3.5.4 การเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่เจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ดี

ถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.5.3 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแปรความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 10 15 20 และ25 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษารูปแบบการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวม และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาต่าง ๆ

3.6 ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยแป้งของ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

3.6.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.4 ตามวิธีในข้อ 3.5.3 จำนวนหนึ่งสายพันธุ์ ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 3.5.4 โดยชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่ศึกษาได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย โดยให้ความเข้มข้นของธาตุไนโตรเจนเท่ากับ 0.636 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 1.36 กรัมต่อลิตร) ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษารูปแบบการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณแหล่งไนโตรเจน และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาต่าง ๆ

3.6.2 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.4 ตามวิธีในข้อ 3.5.3 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 3.5.4 และชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 3.6.1 โดยแปรผันปริมาณของธาตุไนโตรเจนเท่ากับ 0.212 0.424 และ 0.636 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 0.45 0.90 และ 1.36 กรัมต่อลิตร) ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษารูปแบบการเจริญและการย่อย

แป้งมันสำปะหลังโดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณแหล่งไนโตรเจน และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาต่าง ๆ

3.6.3 ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.4 ตามวิธีในข้อ 3.5.3 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 3.5.4 3.6.1 และ 3.6.2 ตามลำดับ โดยแปรค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษารูปแบบการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณแหล่งไนโตรเจน และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาต่าง ๆ

3.6.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการย่อยแป้ง

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.4 ตามวิธีในข้อ 3.5.3 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ชนิดของแหล่งไนโตรเจน ปริมาณแหล่งไนโตรเจน และค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 3.5.4 3.6.1 3.6.2 และ 3.6.3 ตามลำดับ เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยแปรอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ศึกษารูปแบบการเจริญและการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี spread plate วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณแหล่งไนโตรเจน และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วงเวลาต่าง ๆ

3.7 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

3.7.1 การเตรียมหัวเชื้อสำหรับเป็นกล้าเชื้อ

เลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 บนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) กระจาย (suspend) เซลล์ แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 640 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.4

3.7.2 ศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.7.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อเปรียบเทียบกัน 2 ชนิด ได้แก่ YPD และ BSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลอง

ขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.5 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาหาค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์การเจริญเติบโต โดยหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ

3.7.3 ศึกษาค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสม

ถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.7.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 3.7.2 บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร แปรค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาหาค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์การเจริญเติบโต โดยหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ

3.7.4 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงกล้าเชื้อ

ถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.7.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 3.7.2 บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมตามผลการศึกษาในข้อ 3.7.3 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยแปรค่าอุณหภูมิเท่ากับ 25 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาหาค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์การเจริญเติบโต โดยหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ

3.7.5 ศึกษาความเข้มข้นน้ำตาลกลูโคสที่เหมาะสมต่อการเจริญของกล้าเชื้อ

ถ่ายหัวเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 3.7.1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 3.7.2 แปรค่าความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากับ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมตามผลการศึกษาในข้อ 3.7.3 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยปรับค่าอุณหภูมิให้เหมาะสมตามผลการศึกษาในข้อ 3.7.4 ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาหาค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิเคราะห์การเจริญเติบโต โดยหาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ เพื่อเลือกความเข้มข้นของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเจริญของกล้าเชื้อ

3.8 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 จากแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ หรือเอนไซม์ทางการค้า

3.8.1 การผลิตเอทานอลโดยการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิด เมื่อเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.4 ตามวิธีในข้อ 3.5.3 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร โดยปรับภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมตามผลการศึกษาในข้อ 3.6 เลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่ได้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุด ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 (ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์, 2547) และเหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคอะมิเลส (Novozyme, Denmark) ฆ่าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็น แล้วเติมสารละลายกลูโคอะมิเลส ปริมาตร 0.001 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามที่ศึกษาจากข้อ 3.7 แล้วนำกล้าเชื้อที่มีอายุเหมาะสมในการผลิตเอทานอลมาปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อที่ได้ลงในน้ำหมักที่ได้จากข้อ 3.8.1.1 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 (ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์, 2547) เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ปริมาณเอทานอล และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.8.2 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส เป็นแหล่งคาร์บอน (วิธีการเตรียมตามภาคผนวก ก) สำหรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับให้มีค่าเท่ากับ 4.5 นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นแล้วเติมเซลล์กล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 (วิธีเตรียมเซลล์กล้าเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.8.1) บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ปริมาณเอทานอล และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.9 การผลิตเอทานอลจากการใช้จุลินทรีย์ผสม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

3.9.1 ศึกษาการเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เมื่อใช้ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร โดยให้ปริมาณแหล่งไนโตรเจนเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร (กรณีใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน) หรือ 4.5 กรัมต่อลิตร (กรณีใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน) แปรค่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้เหมาะตามผลการศึกษาจากข้อ 3.6 นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.4 ตามวิธีในข้อ 3.5.3 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ในข้อ 3.9.1.1 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมตามผลการศึกษาในข้อ 3.6 ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์การเจริญ โดยการ spead plate ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแหล่งไนโตรเจน และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในแต่ละช่วงเวลา

3.9.2 การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

3.9.2.1 การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.5.4 ตามวิธีในข้อ 3.5.3 ถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ที่มีความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ชนิดของแหล่งไนโตรเจน และปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมที่ได้จากผลการศึกษาในข้อ 3.9.1 เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ โดยปรับอุณหภูมิให้เหมาะสมตามผลการศึกษาในข้อ 3.6 ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามที่ศึกษาจากข้อ 3.7 แล้วนำกล้าเชื้อที่มีอายุเหมาะสมในการผลิตเอทานอลมาปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus* sp. ที่เตรียมไว้ดังที่กล่าวก่อนหน้านี้ เลี้ยงเชื้อผสมบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Baciilus* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ปริมาณเอทานอล และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.9.2.2 **การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ** *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 **พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย** *Bacillus* sp. **สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้**

เริ่มโดยย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ตามวิธีที่กล่าวในข้อ 3.9.2.1 เลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามที่ศึกษาจากข้อ 3.7 แล้วนำกล้าเชื้อที่มีอายุเหมาะสมในการผลิตเอทานอลมาปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับสารละลายเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (ปริมาตร 0.03 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรอง (membrane filter) ขนาดรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร เลี้ยงเชื้อผสมบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Baciilus* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ปริมาณเอทานอล และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.9.2.3 **การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ** *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 **พร้อมกับกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย** *Bacillus* sp. **สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว**

เริ่มจากย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ตามวิธีในข้อ 3.9.2.1 เลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 4.5 แล้วฆ่าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามที่ศึกษาจากข้อ 3.7 แล้วนำกล้าเชื้อที่มีอายุเหมาะสมในการผลิตเอทานอลมาปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับสารละลายเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (ปริมาตร 0.03 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรอง (membrane filter) ขนาดรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ปริมาณเอทานอล และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.9.2.4 **การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ** *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 **ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย** *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 **ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส**

ย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ ตามวิธีในข้อ 3.9.2.1 เลี้ยงเชื้อจนถึงชั่วโมงที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงสุด ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 4.5 ซึ่งเหมาะสมต่อการผลิตเอทานอล และเหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคอะมิเลส ฆ่าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่อุณหภูมิ 110 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็น แล้วเติมสารละลายเอนไซม์กลูโคอะมิเลส (ปริมาตร 0.03 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรอง (membrane filter) ขนาดรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ภายใต้ภาวะที่เหมาะสมตามที่ศึกษาจากข้อ 3.7 แล้วนำกล้าเชื้อที่มีอายุเหมาะสมในการผลิตเอทานอลมาปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ดังที่กล่าวมาข้างต้น เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง วิเคราะห์หาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ปริมาณน้ำตาลรวม ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ ปริมาณแหล่งไนโตรเจน ปริมาณเอทานอล และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.10 การวิเคราะห์

3.10.1 การวัดการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 โดยการหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นปั่นล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง ที่ความเร็วและเวลาเท่าเดิม จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปใส่ในถ้วยอลูมิเนียมที่ทราบน้ำหนักแน่นอนแล้ว นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง ชั่งน้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์อบแห้งจนคงที่ คำนวณหาปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร

3.10.2 การวัดการเจริญของ *Bacillus* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 โดยการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

นำน้ำหมักมาเจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) จนได้ความเข้มข้นเซลล์ที่เหมาะสม spread เชื้อเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ

การวัดการเจริญของ *Bacillus* sp. ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NA (กรณีเลี้ยงเชื้อผสม เติม cyclohexamide เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ NA) แล้วบ่มที่อุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

การวัดการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD (กรณีเลี้ยงเชื้อผสม เติม penicillin G เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Bacillus* sp. ความเข้มข้นเท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD) แล้วบ่มที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

นับจำนวนโคโลนี คำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ภาคผนวก ข) หน่วยเป็น Colony Forming Unit ต่อ มิลลิลิตร (CFU/ml)

3.10.3 การหาปริมาณน้ำตาลรวม โดยวิธีฟีนอล-กรดซัลฟูริค (Dubois และคณะ, 1956)

นำน้ำหมักมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงไปอย่างรวดเร็ว ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้นาน 10 นาที ผสมให้เข้ากันแล้วแช่ในอ่างน้ำเย็นนาน 5 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรวม (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร และน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข)

3.10.4 การหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ โดยวิธีของ Bernfeld (1955)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 1 เติมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA) ปริมตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปต้มในอ่างน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นในอ่างน้ำเย็น เป็นเวลา 10 นาที เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร และน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข)

3.10.5 การหาปริมาณแหล่งไนโตรเจน โดยวิธีของ Kemper (1974)

3.10.5.1 หาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุตามความเหมาะสม ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลไนโตรพัสไซด์ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ในน้ำกลั่นปลอดประจุเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวนหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณแอมโมเนียม-ไนโตรเจน (NH_4^+- N) และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

3.10.5.2 หาปริมาณยูเรีย

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุตามความเหมาะสม ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเอนไซม์ยูเรียเอส (urease) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ 5 มิลลิลิตร เติมสารละลาย EDTA 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 นาที จากนั้นเติมสารละลายฟีนอลไนโตรพัสไซด์ 2 มิลลิลิตร เติมสารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคลอไรท์ 4 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดประจุ 8 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปอุ่นในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ในน้ำกลั่นปลอดประจุเป็นตัวเปรียบเทียบ) คำนวนหาปริมาณยูเรีย (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างปริมาณยูเรีย และค่าการดูดกลืนแสงที่ 636 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข)

3.10.6 **การหาค่าความเป็นกรด-ด่าง** (pH)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้ว มาวัดค่า pH ด้วยเครื่องวัด pH (pH meter)

3.10.7 **การหาปริมาณเอทานอล โดยวิธี** Gas Chromatography (GC)

นำน้ำหมักที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นตามความเหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน eppendoff เติมสารละลาย internal standard 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นฉีดตัวอย่าง 1 ไมโครลิตร วิเคราะห์หาปริมาณโดยวิธีก๊าซโครมาโตรกราฟี (Gas Chromatography) ภายใต้สภาวะดังนี้

ชนิดของ column	:	แคปพิลลารี คอลัมน์ (capillary column) รุ่น CP-WAX 52 CB เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 มม. ความยาว 30 ม.
อุณหภูมิของ injector	:	250 องศาเซลเซียส
อุณหภูมิของ column	:	40 องศาเซลเซียส (5 นาที) เพิ่มอุณหภูมิให้เท่ากับ 130 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเท่ากับ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที
อุณหภูมิของ detector	:	250 องศาเซลเซียส (ใช้ detector ชนิด FID)
ก๊าซตัวพา (carrier gas)	:	ก๊าซไนโตรเจน (อัตราการไหล 2 มิลลิลิตรต่อนาที)
ปริมาตรตัวอย่าง	:	1 ไมโครลิตร

คำนวนหาปริมาณเอทานอล (หน่วยเป็นกรัมต่อลิตร) โดยเปรียบเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างอัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟของเอทานอล ต่อบิวทานอล และความเข้มข้นของเอทานอล (ภาคผนวก ข)

บทที่ 4

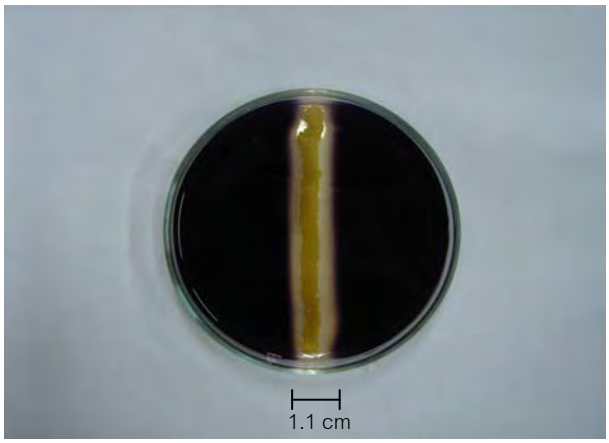
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การคัดเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ย่อยแป้งได้ดี

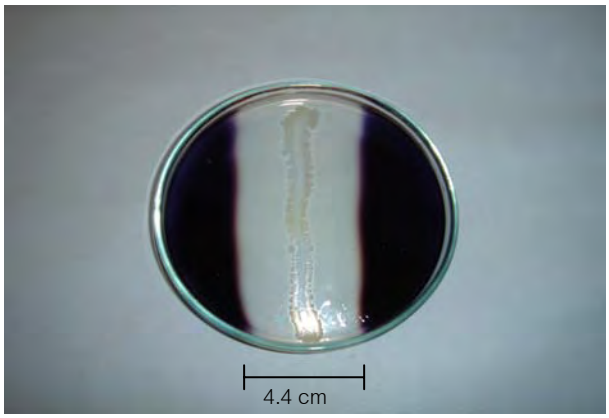
4.1.1 การคัดเลือก *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่สามารถย่อยแป้งได้

วิธีการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้ง (จุลินทรีย์มีเอนไซม์อะมิเลส) เบื้องต้นซึ่งสามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว และเป็นที่นิยม คือ การเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด starch agar ตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งจากบริเวณใสรอบโคโลนีที่เกิดขึ้นหลังจากที่หยดสารละลายไอโอดีนทับลงบนโคโลนี (Forgaty และ Kelly, 1979 , Saxena และคณะ, 2007)

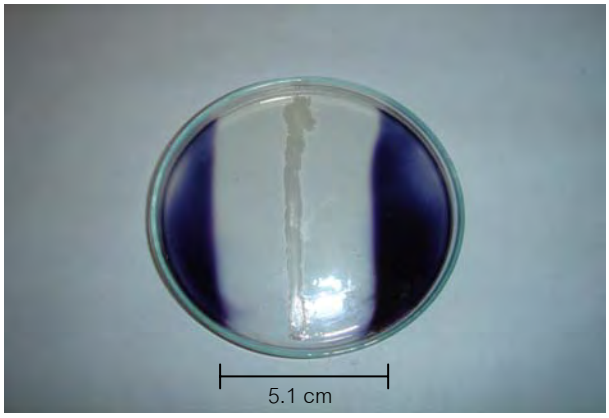
การคัดเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่สามารถย่อยแป้งได้ทำโดย นำแบคทีเรียจำนวน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus* sp. CU-03 *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 มาขีดเป็นแนวยาวบริเวณกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ starch agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับ *Bacillus* sp. CU-03 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม (สุรเชษฐ์ วงศ์สิทธิ์ธนะกิจ, 2547) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการย่อยแป้งโดยสังเกตจากบริเวณใสรอบโคโลนีเมื่อหยดสารละลายไอโอดีนทับลงบนโคโลนี ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.1 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยแป้งเบื้องต้น โดยสังเกตจากบริเวณใสรอบโคโลนีหลังจากการหยดสารละลายไอโอดีนทับลงบนโคโลนี ผลการศึกษาพบว่าบริเวณใสรอบโคโลนีของ *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 กว้างกว่าบริเวณใสรอบโคโลนีของ *Bacillus* sp. CU-03 ซึ่งบริเวณใสรอบโคโลนีของ *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 มีความกว้างเท่ากับ 4.4 และ 5.1 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยจึงเลือก *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เพื่อนำไปคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการย่อยแป้งในขั้นตอนต่อไป



ก) *Bacillus* sp. CU-03



ข) *Bacillus subtilis* IFO14140



(ค) *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

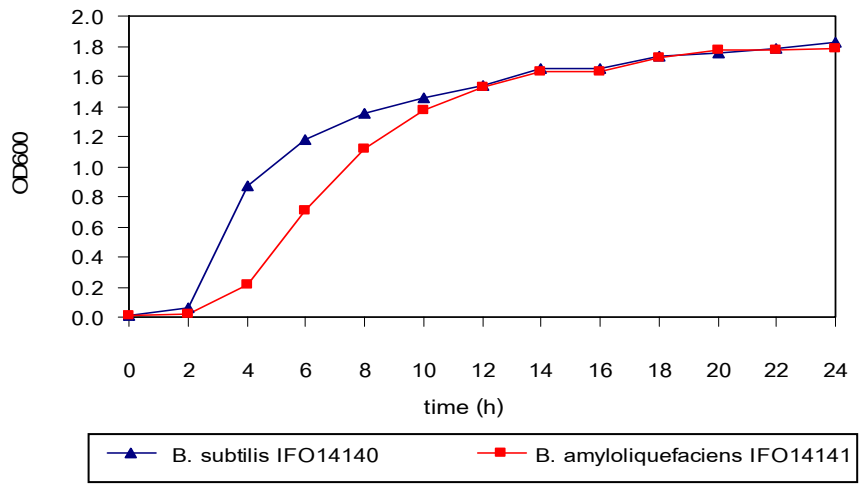
รูปที่ 4.1 ความสามารถในการย่อยแป้งของ *Bacillus* spp. จำนวน 3 สายพันธุ์ เลี้ยงบนอาหาร starch agar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.1.2 การเลือกอายุกล้าเชื้อที่เหมาะสม

เนื่องจากคุณภาพของกล้าเชื้อเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมให้การย่อยแป้งมีประสิทธิภาพดีขึ้น คุณสมบัติของกล้าเชื้อที่ดีตามที่ Stanbury และคณะ (1999) กล่าวไว้ ได้แก่ เซลล์ต้องมีความสมบูรณ์แข็งแรง และเป็นช่วงอายุที่มีแอกทิวิตีที่ดี ซึ่งจะทำให้เวลาของระยะ lag phase ของขั้นตอนต่อไปสั้นลง นอกจากนี้กล้าเชื้อที่ดีควรมีจำนวนมากเพียงพอรวมถึงปราศจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการย่อยแป้ง ทำโดยเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร บรรจุอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อปริมาณ 50 มิลลิลิตร โดยอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อที่ใช้ ใช้สูตรของ Nakamura และคณะ (1999) ซึ่งมีคุณสมบัติกระตุ้นให้จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดผลิตแอลฟาอะมิเลส ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.2 พบว่า *Bacillus subtilis* IFO14140 มีอัตราการเจริญในช่วงชั่วโมงที่ 2 ถึง 10 สูงกว่า *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 หลังจากชั่วโมงที่ 12 การเจริญมีอัตราใกล้เคียงกัน โดยการเจริญของ *Bacillus subtilis* IFO14140 เริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณ (log phase) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 และเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) หลังจากเลี้ยงเชื้อได้ 12 ชั่วโมง และได้พบว่าเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะกลางของช่วงการเจริญแบบทวีคูณที่เวลา 6 ชั่วโมง ดังนั้นในงานวิจัยจึงเลือก *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ IFO14140 ที่มีอายุ 6 ชั่วโมง สำหรับการเป็นกล้าเชื้อเพื่อใช้ในการวิจัยขั้นต่อไป

สำหรับ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ IFO14141 พบว่าการเจริญเริ่มเข้าสู่ระยะการเจริญแบบทวีคูณในชั่วโมงที่ 2 และเริ่มเข้าสู่ระยะการเริญแบบคงที่ในชั่วโมงที่ 12 เช่นเดียวกับ *Bacillus subtilis* IFO14140 โดยช่วงกลางของระยะการเจริญแบบทวีคูณอยู่ที่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 8 ดังนั้นจึงเลือกกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง สำหรับใช้ในการวิจัยขั้นต่อไป



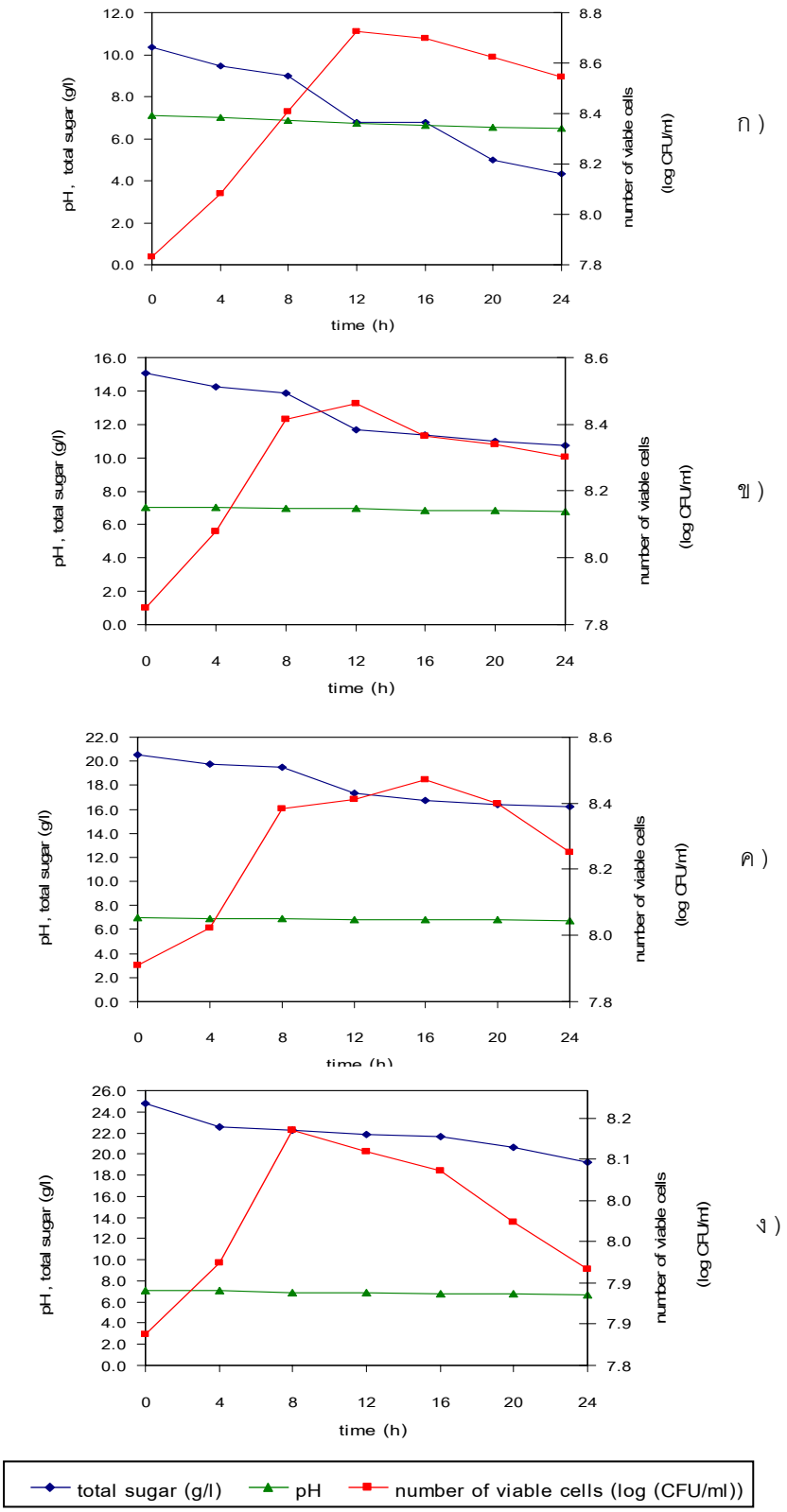
รูปที่ 4.2 การเจริญของ *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อติดตามการเจริญโดยหาความเข้มข้นของเซลล์จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

4.1.3 การเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่เจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ดี

เนื่องจากอัตราการถ่ายเทออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบจะลดลงเมื่อแป้งมีความเข้มข้นสูงขึ้น ส่งผลให้ปริมาณออกซิเจนที่เชื้อสามารถนำไปใช้ได้ลดลง (Vlaev และ Valeva, 1992) ซึ่งโดยทั่วไปแล้วพบว่าการผลิตอะมิเลสโดยแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* จำเป็นต้องใช้ออกซิเจน (Milrer และคณะ, 1996) ดังนั้นหากไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงจำเป็นต้องหาปริมาณความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตเอนไซม์เพื่อการย่อยแป้ง ดังรายงานการวิจัยของ Qader และคณะ (2006) ศึกษาความสามารถในการเจริญ และการผลิตแอลฟาอะมิเลสของ *Bacillus* sp. AS -1 ที่ความเข้มข้นแป้งที่ละลายน้ำเริ่มต้นเท่ากับ 5 10 15 20 และ 30 กรัมต่อลิตร (โดยไม่มีการควบคุมปริมาณออกซิเจน) พบว่าความเข้มข้นของแป้งเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้จุลินทรีย์มีการเจริญ และผลิตแอลฟาอะมิเลสสูงสุด โดยความเข้มข้นของแป้งต่ำกว่า 20 กรัมต่อลิตร จุลินทรีย์สามารถเจริญ และผลิตแอลฟาอะมิเลสได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นแป้งสูงกว่า 20 กรัมต่อลิตร

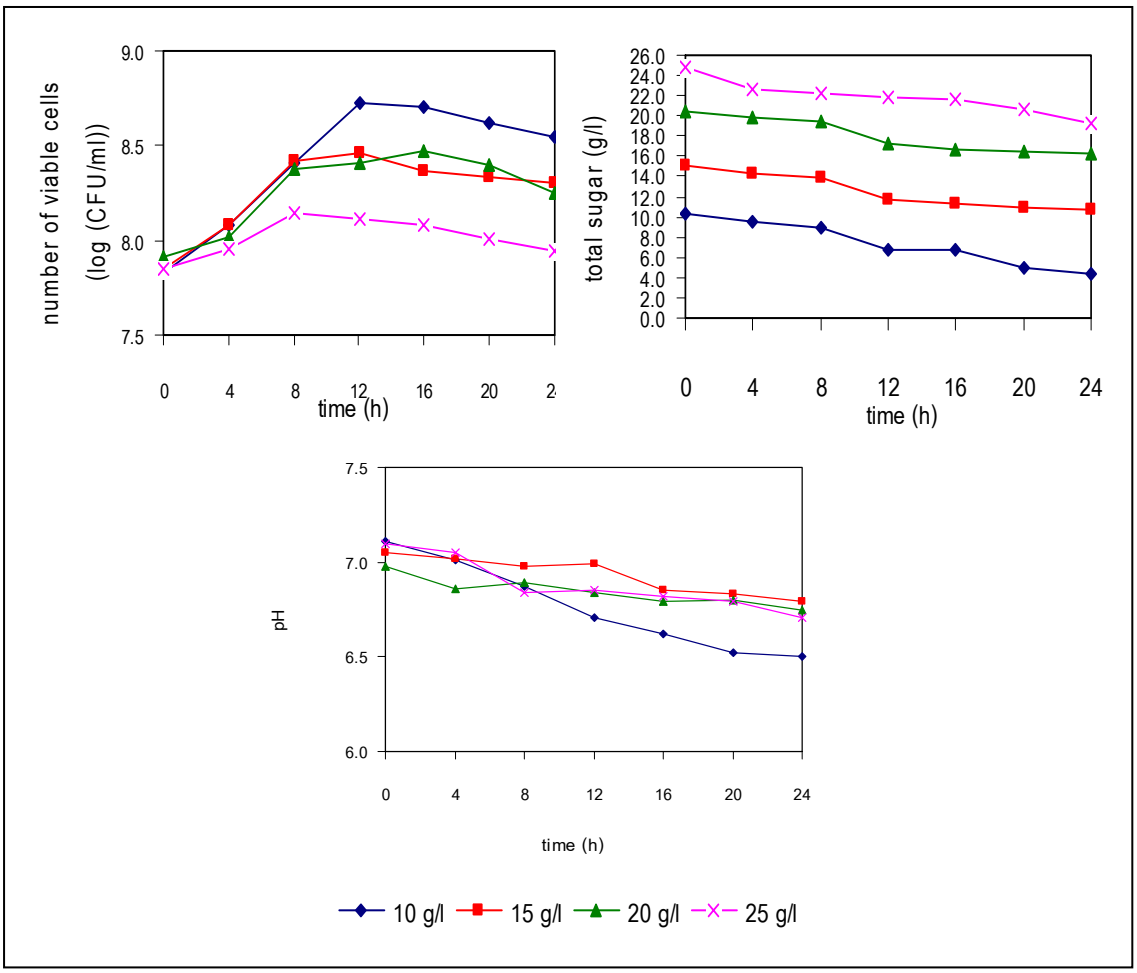
การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการคัดเลือก *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่สามารถเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ดี ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้ศึกษาอายุของกล้าเชื้อที่เหมาะสมที่เตรียมโดยวิธีในข้อ 4.1.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแปรความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ผลการศึกษาแสดงในข้อ 4.1.3.1 และ 4.1.3.2

4.1.3.1 **การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ** *Bacillus subtilis* IFO14140



รูปที่ 4.3 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 (ก) 15 (ข) 20 (ค) และ 25 (ค) กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* IFO 14140

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.3 พบว่าการเลี้ยงเชื้อในทุกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ศึกษา การเจริญของจุลินทรีย์เริ่มเพิ่มขึ้นตามเวลาการเลี้ยงเชื้อโดยเมื่อเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเท่ากับ 10 และ 15 กรัมต่อลิตร ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.72 และ 8.46 (log (CFU/ml)) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.57 และ 1.52 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ ค.1 และ ค.2 ในภาคผนวก ค) หากเลี้ยงเชื้อในแป้งความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 16 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่าเท่ากับ 8.47 (log (CFU/ml)) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.52 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ ค.3 ในภาคผนวก ค) และการเลี้ยงเชื้อในแป้งความเข้มข้น 25 กรัมต่อลิตร ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่าเท่ากับ 8.17 (log (CFU/ml) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.47 กรัมต่อลิตร (ตารางที่ ค.4 ในภาคผนวก ค) ในการเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร มีการใช้น้ำตาลจากการย่อยแป้งโดยจุลินทรีย์ โดยน้ำตาลรวมลดลงเหลือเท่ากับ 4.32 10.75 16.18 และ 21.22 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่า pH ของน้ำหมักลดลงเล็กน้อยจาก 7.11 7.05 6.98 และ 7.10 เหลือเท่ากับ 6.50 6.79 6.75 และ 6.71 ตามลำดับ (ตารางที่ ค.1 ถึง ค.4 ในภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.4 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus subtilis* IFO14140

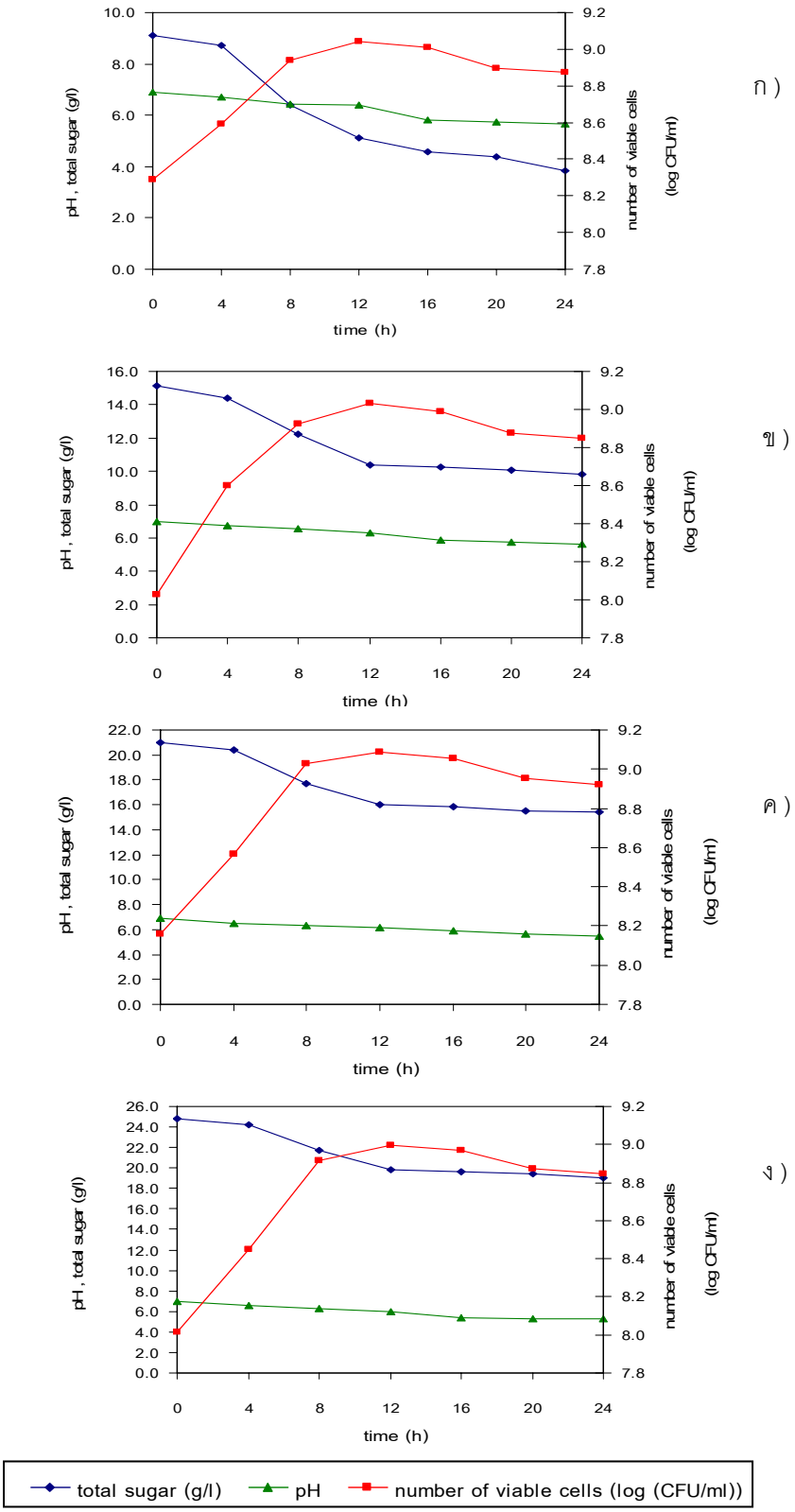
ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.4 การเจริญของ *Bacillus subtilis* IFO14140 ซึ่งแสดงในรูปของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต มีการเพิ่มขึ้นตามลำดับในทุกความเข้มข้นของแป้งที่ใช้ ซึ่งหลังจากได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดแล้วพบว่าการเจริญค่อย ๆ ลดลง โดยการเจริญของ *Bacillus subtilis* IFO14140 ที่ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับ 10 และ 25 กรัมต่อลิตร ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุด และต่ำสุด ในทุกช่วงเวลาของการเลี้ยงจุลินทรีย์ การเลี้ยง *Bacillus subtilis* ในอาหารที่มีความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus subtilis* IFO14140 เมื่อคิดจากปริมาณน้ำตาลรวมที่ถูกนำไปใช้ คำนวนได้เท่ากับ 6.01 4.31 4.33 และ 3.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจากเวลาเริ่มต้น จงถึงเวลาสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.1 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus subtilis* IFO14140 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร

starch (g/l)	Yx/s (g_X/g_S) **สูงสุด**	Yx/s (g_X/g_S) **ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ**
10	0.071 (ชั่วโมงที่ 8)	0.021
15	0.081 (ชั่วโมงที่ 8)	0.016
20	0.072 (ชั่วโมงที่ 8)	0.016
25	0.025 (ชั่วโมงที่ 8)	0.002

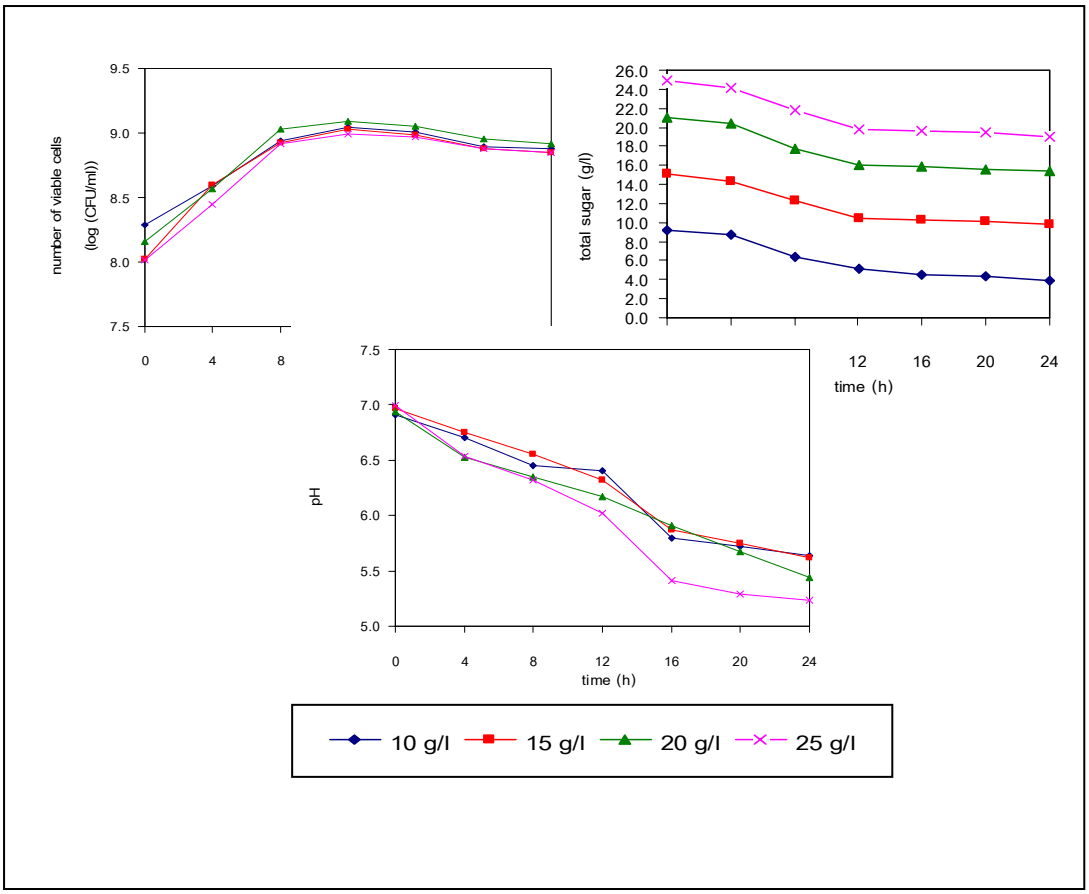
ดังแสดงในตารางที่ 4.1 การเลี้ยงเชื้อในทุกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง ให้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 โดยการเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ได้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุดเท่ากับ 0.081 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรวม (การคำนวนแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.1) จากข้อมูลดังกล่าวเป็นไปได้ว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความหนืดของแป้งต่ำ หรือความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังต่ำ ส่งผลให้ *Bacillus subtilis* IFO14140 สามารถนำออกซิเจนที่มีอยู่ไปใช้ได้ง่าย ทำให้จุลินทรีย์มีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และความสามารถในการย่อยแป้งได้สูงกว่าเมื่อเทียบกับการเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความหนืดของแป้งสูง และการที่ความเข้มข้นของแป้งเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร เหมาะสมกว่าความเข้มข้นของแป้งเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร อาจเป็นไปได้ว่าเป็นความเข้มข้นที่ไม่สูงเกินไป และเป็นภาวะที่เซลล์ของจุลินทรีย์ สับสเตรท คือแป้ง และออกซิเจน สัมผัสกันได้ดี จึงมีความเหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์ ส่งผลให้มีการย่อยแป้งได้ดีกว่าองค์ประกอบที่มีแป้งความเข้มข้นสูงหรือต่ำกว่านี้

4.1.3.2 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141



รูปที่ 4.5 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 (ก) 15 (ข) 20 (ค) และ 25 (ง) กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.5 พบว่าการเลี้ยงเชื้อในทุกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ศึกษา การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 9.05 9.03 9.09 และ 9.00 (log (CFU/ml)) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.99 1.99 2.0 และ 1.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่ามีการใช้น้ำตาลจากการย่อยแป้งโดยจุลินทรีย์ โดยน้ำตาลรวมลดลงเหลือเท่ากับ 3.84 9.80 15.43 และ 18.99 กรัมต่อลิตรที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจาก 6.91 6.97 6.94 และ 6.99 เหลือเท่ากับ 5.64 5.62 5.44 และ 5.23 ตามลำดับ (ตารางที่ ค.5 ถึง ค.8 ในภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.6 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญและย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.6 สรุปได้ว่าที่ความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร ความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อคิดจากปริมาณน้ำตาลรวมที่ลดลงมีค่าเท่ากับ 5.27 5.34 5.60 และ 5.86 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ การเจริญของจุลินทรีย์มีการเพิ่มตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยการเลี้ยงเชื้อในทุก ๆ ความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่มีในแต่ละช่วงเวลามีค่าใกล้เคียงกัน โดยได้จำนวนเซลล์ที่มี

ชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งภายหลังจากนั้นการเจริญค่อย ๆ ลดลง ค่า pH ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ลดลงมากกว่าการเลี้ยงในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10 15 และ 20 กรัมต่อลิตร เล็กน้อย

ตารางที่ 4.2 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 15 20 และ 25 กรัมต่อลิตร

starch (g/l)	Yx/s (g_x/g_s) **สูงสุด**	Yx/s (g_x/g_s) **ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ**
10	0.166 (ชั่วโมงที่ 4)	0.024
15	0.177 (ชั่วโมงที่ 4)	0.030
20	0.144 (ชั่วโมงที่ 4)	0.028
25	0.141 (ชั่วโมงที่ 4)	0.029

ดังแสดงในตารางที่ 4.2 พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่ทุกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังให้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุดในชั่วโมงที่ 4 โดยการเลี้ยงเชื้อที่แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเท่ากับ 15 และ 25 กรัมต่อลิตร ให้ค่าสูงและต่ำสุดตามลำดับ และค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อในแป้งความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ให้ค่าสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในแป้งความเข้มข้นอื่นที่ศึกษาที่ชั่วโมงดังกล่าว (การคำนวนแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.2)

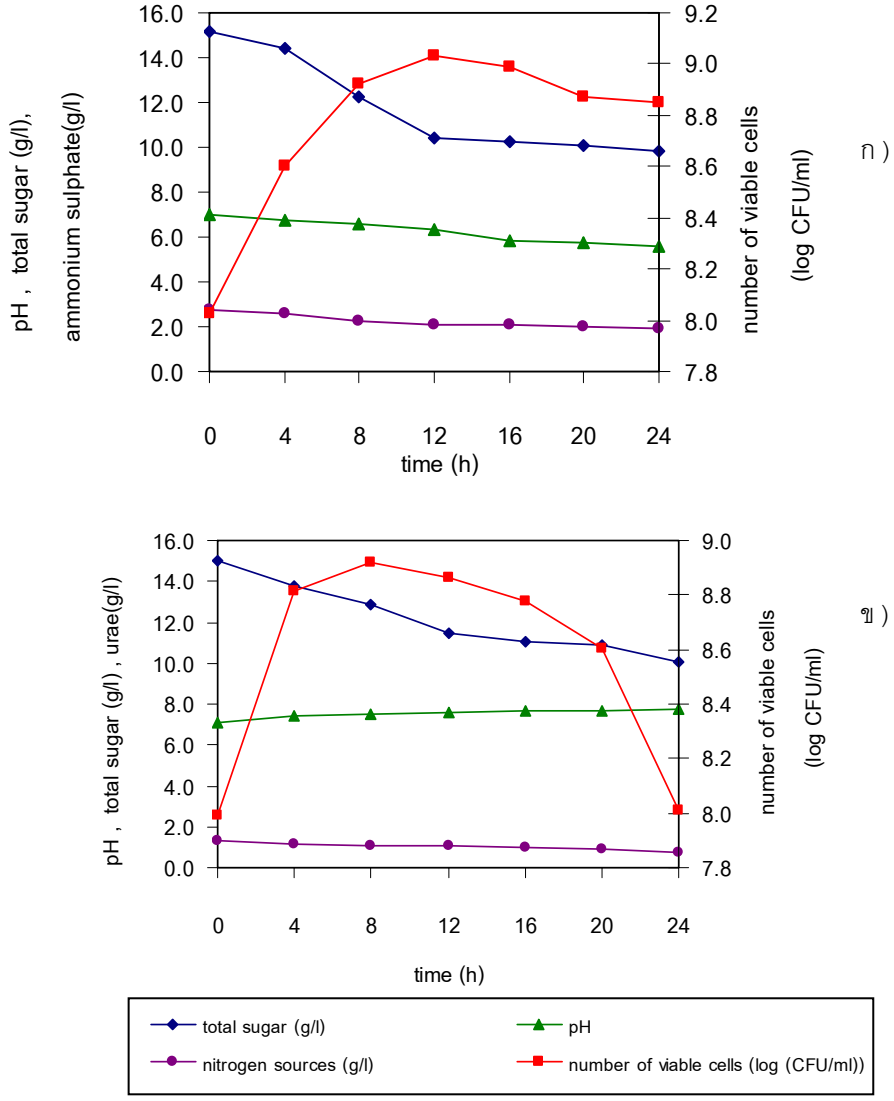
จากผลการทดลองในข้อ 4.1.3.1 และ 4.1.3.2 ผู้วิจัยจึงได้เลือก *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เพื่อใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการย่อยแป้งกับ *Bacillus subtilis* IFO14140 โดยพิจารณาปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่จุลินทรีย์นำไปใช้ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ค่าที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในทุกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังมีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillis subtilis* IFO14140 โดยความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นที่เลือกใช้เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ต่อ คือ 15 กรัมต่อลิตร เนื่องจากให้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อด้วยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นอื่น ๆ

4.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยแป้งของ*Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

4.2.1 ชนิดของแหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนที่ดีนั้นควรเป็นแหล่งไนโตรเจนที่หาได้ง่าย ราคาถูก ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ นอกจากนี้ควรกระตุ้นให้เกิดการเจริญ และการสร้างเอนไซม์ด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต (แหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์) และยูเรีย (แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ทั้งยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* และแบคทีเรีย *Bacillus* สามารถใช้ได้ นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ และแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ชนิดอื่นแล้วก็นับว่ามีราคาค่อนข้างถูก งานวิจัยที่ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต หรือยูเรีย ในการผลิตแอลฟาอะมิเลส เช่น Konsula และคณะ (2004) ศึกษาการย่อยแป้งที่ละลายน้ำความเข้มข้นตั้งแต่ 0.5 ถึง 4 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการย่อยแป้งในช่วงความเข้มข้นดังกล่าวคือ 2 กรัมต่อลิตร Syu และ Chen (1997) ศึกษาการผลิตแอลฟาอะมิเลสจากแป้งที่ความเข้มข้นเริ่มต้นตั้งแต่ 0.9 ถึง 108.4 กรัมต่อลิตร ด้วยจุลินทรีย์ *Bacillus amyloliquefaciens* โดยแหล่งไนโตรเจนที่ใช้เพื่อการผลิตคือ แอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 5 กรัมต่อลิตร Saxena (2007) ศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการผลิตแอลฟาอะมิเลสของ *Bacillus* sp. PN5 พบว่ายูเรียสามารถกระตุ้นให้เกิดสร้างเอนไซม์ได้ดีกว่าการใช้โพแทสเซียมไนเตรท โซเดียมไนเตรท แอมโมเนียมไนเตรท และแอมโมเนียมคลอไรด์ Palit และ Banerjee (2001) ใช้ยูเรียความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 0.5 กรัมต่อลิตร ในการผลิตแอลฟาอะมิเลสจาก *Bacillus circulans* GRS313 เมื่อใช้ข้าวสาลีความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน

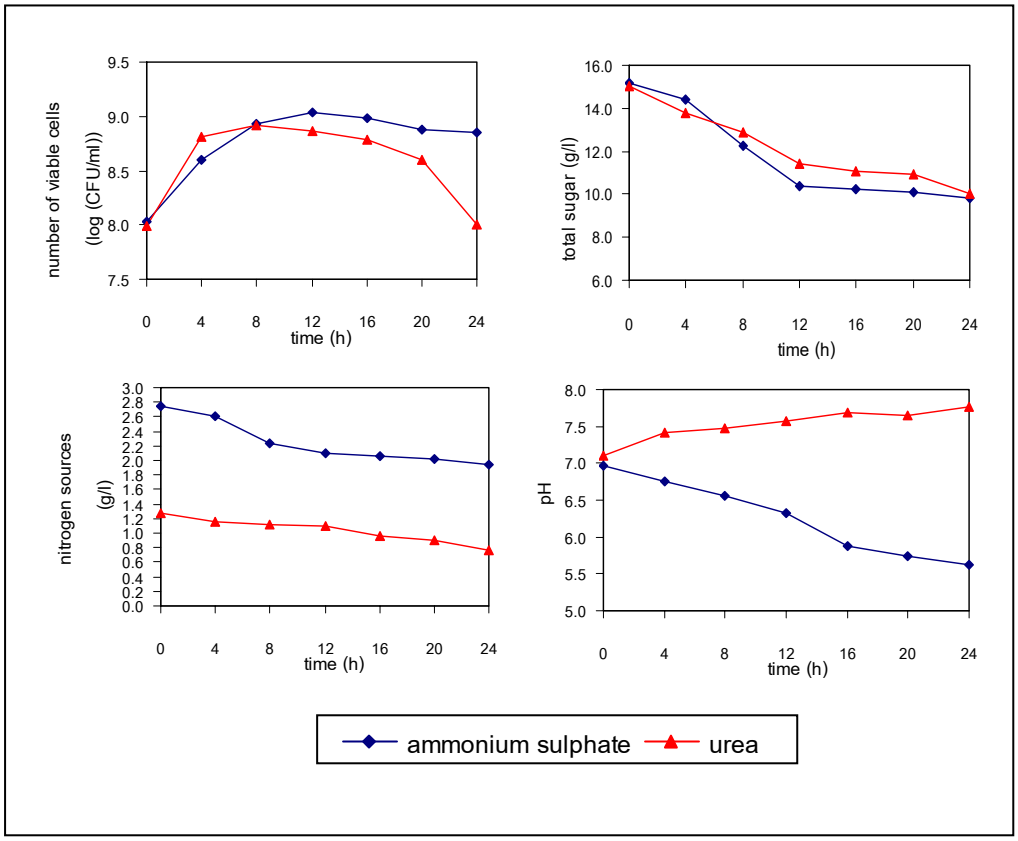
การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาชนิดแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร โดยชนิดของแหล่งไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย ให้ความเข้มข้นของธาตุไนโตรเจนเท่ากับ 0.636 กรัมต่อลิตร (คิดเป็นความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของยูเรียเท่ากับ 1.36 กรัมต่อลิตร) คิดเป็นค่าคาร์บอนต่อไนโตรเจนเท่ากับ 10.49 ต่อ 1 ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ผลการศึกษาเป็นดังนี้



รูปที่ 4.7 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตร (ก) และ ยูเรียความเข้มข้น 1.36 กรัมต่อลิตร (ข) เป็นแหล่งไนโตรเจน

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.7 พบว่าเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดแอมโมเนียมซัลเฟต จุลินทรีย์เจริญเพิ่มขึ้นตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 9.03 (log (CFU/ml)) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.99 กรัมต่อลิตร ซึ่งภายหลังจากชั่วโมงดังกล่าว จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเริ่มลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง พบว่ามีการใช้น้ำตาลจากการย่อยแป้ง และการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โดยน้ำตาลรวมเหลือเท่ากับ 9.80 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงจาก 2.75 เหลือเท่ากับ 1.93 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจาก 6.97 เป็น 5.62 (ตารางที่ ค.9 ในภาคผนวก ค) หากเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนที่เป็นยูเรีย จุลินทรีย์เจริญเพิ่มขึ้นตามเวลาการเลี้ยงเชื้อเช่นกัน โดยได้จำนวน

เซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 เท่ากับ 8.92 (log (CFU/ml)) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.96 กรัมต่อลิตร น้ำตาลรวมลดลงเหลือเท่ากับ 10.04 กรัมต่อลิตร ปริมาณยูเรียลดลงจาก 1.28 เหลือเท่ากับ 0.77 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่า pH ของน้ำหมักเพิ่มขึ้นจาก 7.99 เป็น 8.01 (ตารางที่ ค.10 ในภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.8 เปรียบเทียบผลของชนิดแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

ตารางที่ 4.3 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

nitrogen source	Yx/s (g_x/g_s) **สูงสุด**	Yx/s (g_x/g_s) **ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ**
ammonium sulphate	0.177 (ชั่วโมงที่ 4)	0.030
urea	0.144 (ชั่วโมงที่ 4)	0.003

ผลที่แสดงดังรูปที่ 4.8 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย พบว่าความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อคิดจากปริมาณน้ำตาลรวมที่ลดลงมีค่าเท่ากับ 5.34 และ 5.0 กรัมต่อลิตร จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 และ 8 เมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหาร

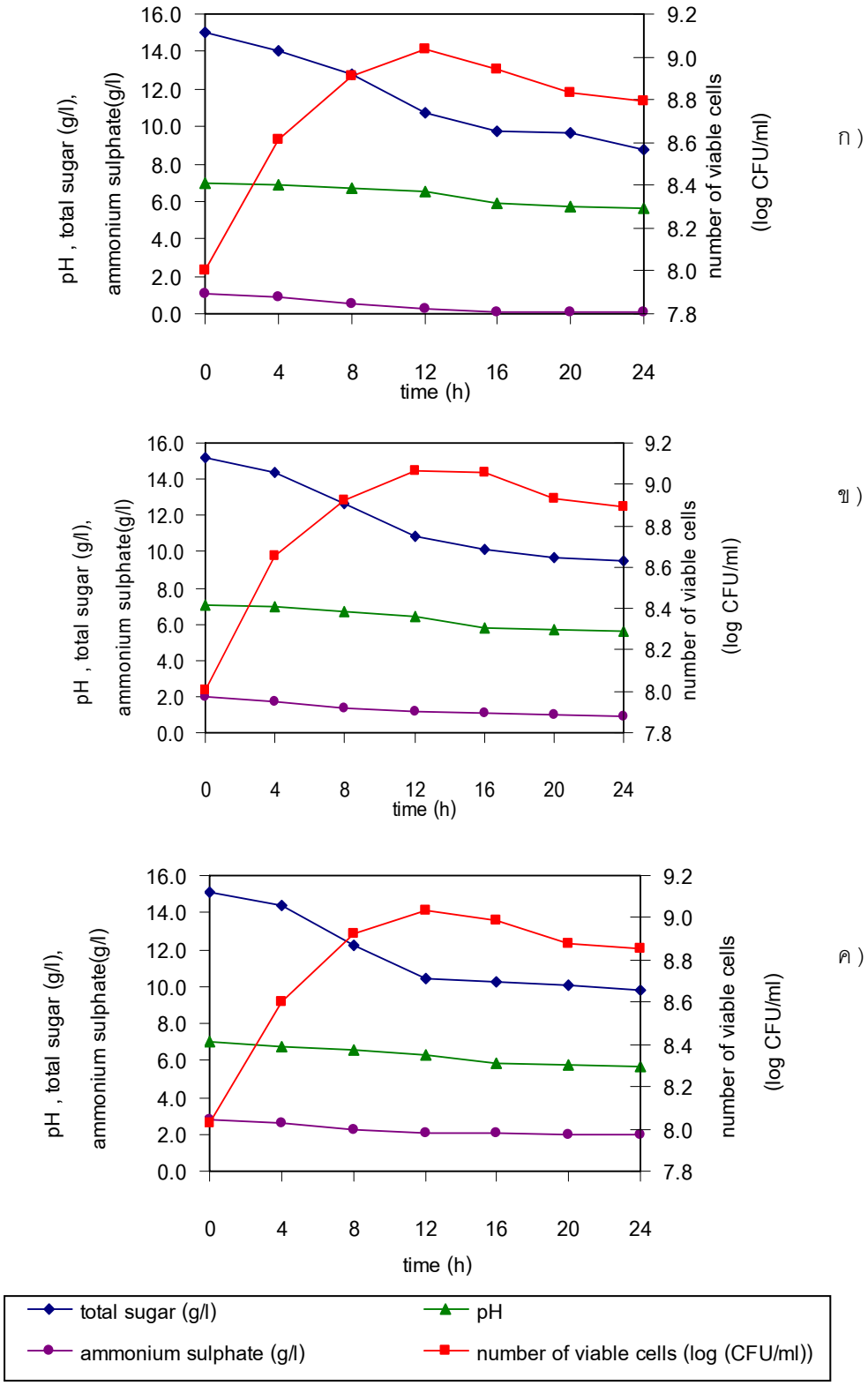
เลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนตามลำดับ เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มียูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายหลังจากชั่วโมงที่ 8 จนกระทั่งสิ้นสุดการเลี้ยงจุลินทรีย์ มีจำนวนน้อยกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้มีปริมาณน้อยกว่าการใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจน และจากตารางที่ 4.3 พบว่าค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุดจากการเลี้ยงเชื้อในแหล่งไนโตรเจนชนิดแอมโมเนียมซัลเฟต มีค่าสูงกว่าการใช้ยูเรีย โดยค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุดที่คำนวนได้ที่เวลา 4 ชั่วโมง และที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อด้วยแหล่งไนโตรเจนชนิดแอมโมเนียมซัลเฟตก็ให้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงกว่าการใช้ยูเรียเช่นกัน (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.3) การใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนมีผลให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นเบสเพิ่มขึ้นกว่าใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โดยค่า pH ที่เพิ่มขึ้นนี้อาจมีผลให้การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังลดลง ทั้งนี้มีบางรายงานการวิจัยที่พบว่าแหล่งไนโตรเจนที่ใช้มีผลให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลง รวมถึงความสามารถในการผลิตแอลฟาอะมิเลสลดลงด้วย Qader และคณะ (2006) พบว่าสารสกัดจากยีสต์แม้เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการผลิตแอลฟาอะมิเลสของ *Bacillus* sp. AS-I แต่ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์มากกว่า 4.0 กรัมต่อลิตร มีผลให้ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเพิ่มขึ้น ส่งผลให้แอกทิวิตีของแอลฟาอะมิเลสลดลง

จากผลการศึกษาดังกล่าว ในงานวิจัยจึงได้เลือกใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการเจริญ และการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในขั้นตอนต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทที่เวลา 4 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ สูงกว่าการใช้ยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจน

4.2.2 ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน

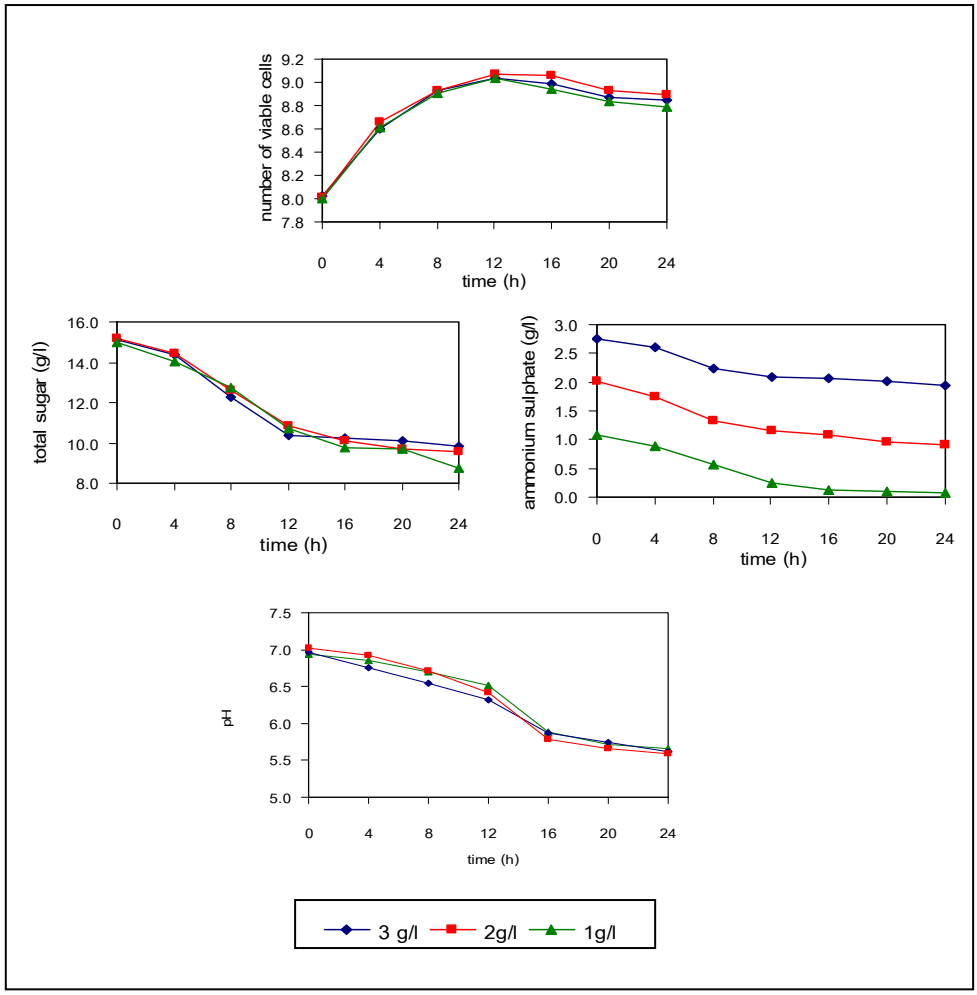
ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนนับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการเจริญ และการผลิตแอลฟาอะมิเลสของจุลินทรีย์ ทำให้มีหลายงานวิจัยได้ทำการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ได้แก่ Aiyer (2004) ศึกษาอัตราส่วนระหว่างธาตุคาร์บอน และไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลฟาอะมิเลสของ *Bacillus licheniformis* SPT 27 เมื่อใช้แป้งมันฝรั่งเป็นแหล่งคาร์บอน (ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร) โดยการแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ตั้งแต่ 2 5 10 20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร พบว่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแอมโมเนียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร Santos และ Martins (2003) ศึกษาความเข้มข้นของสารสกัดจากยีสต์ที่เหมาะสมต่อการผลิตแอลฟาอะมิเลสของ *Bacillus* sp. โดยแปรค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของสารสกัดจากยีสต์เท่ากับ 2.5 5.0 7.5 และ 10.0 กรัมต่อลิตร พบว่า*Bacillus* sp. มีการเจริญเพิ่มมากขึ้นเมื่อสารสกัดจากยีสต์เข้มข้นสูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม แอกทิวิตีของแอลฟาอะมิเลสที่ได้จากจุลินทรีย์ดังกล่าวมีค่าสูงสุดเมื่อสารสกัดจากยีสต์มีความเข้มข้นเท่ากับ 5.0 กรัมต่อลิตร โดยแอกทิวิตีของเอนไซม์มีการลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อสารสกัดจากยีสต์มีความเข้มข้นมากกว่า 5.0 กรัมต่อลิตร ผลการศึกษาดังกล่าวนี้อาจสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนช่วงหนึ่งอาจเหมาะสมต่อการเจริญ แต่อาจไม่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ หรือแอกทิวิตีของแอลฟาอะมิเลส

งานวิจัยในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร โดยแปรความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ผลการศึกษาเป็นดังนี้



รูปที่ 4.9 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1 (ก) 2 (ข) และ 3 (ค) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.9 พบว่าเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร จุลินทรีย์เจริญเพิ่มขึ้นตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 9.03 9.07 และ 9.03 (log (CFU/ml)) ตามลำดับ คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.99 กรัมต่อลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน ภายหลังจากชั่วโมงดังกล่าวจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเริ่มลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง พบว่ามีการใช้น้ำตาลจากการย่อยแป้ง และการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โดยน้ำตาลรวมเหลือเท่ากับ 8.72 9.53 และ 9.80 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงเหลือเท่ากับ 0.07 0.90 และ 1.93 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจาก 6.94 7.02 และ 6.97 เป็น 5.66 5.59 และ 5.62 (ตารางที่ ค.11 ถึง ค.13 ในภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.10 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

ผลที่แสดงดังรูปที่ 4.10 แสดงให้เห็นว่า เมื่อเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ทั้งหมด (เมื่อพิจารณาจากปริมาณน้ำตาลรวมที่ลดลง) มีค่าเท่ากับ 6.27 5.67 และ 5.34 กรัม

ต่อลิตร ตามลำดับ การเจริญของจุลินทรีย์มีการเพิ่มตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยการเลี้ยงเชื้อในทุก ๆ ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ศึกษา จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่มีในแต่ละช่วงเวลามีค่าใกล้เคียงกัน โดยได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งภายหลังจากนั้นการเจริญค่อย ๆ ลดลง ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจากเวลาเริ่มต้น จนถึงเวลาสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.4 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟต ความเข้มข้น 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร

ammonium sulphate (g/l)	Yx/s (g_X/g_S) **สูงสุด**	Yx/s (g_X/g_S) **ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ**
1	0.143 (ชั่วโมงที่ 4)	0.022
2	0.185 (ชั่วโมงที่ 4)	0.028
3	0.177 (ชั่วโมงที่ 4)	0.030

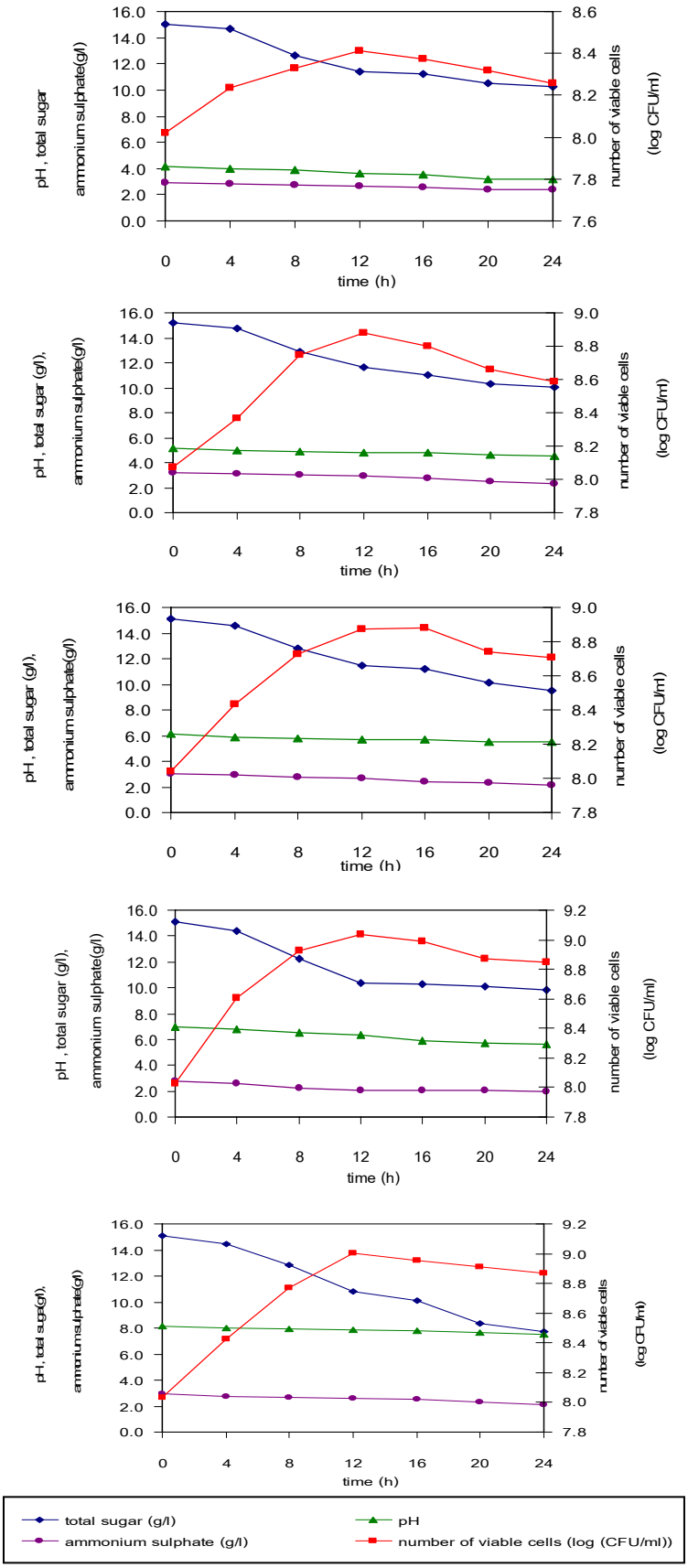
ตารางที่ 4.4 เมื่อคำนวณค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทจากการเลี้ยงเชื้ออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 1 2 และ 3 กรัมต่อลิตร พบว่ามีค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่าเท่ากับ 0.143 0.185 และ 0.177 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรวม ตามลำดับ (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.4)

ผลการศึกษาดังกล่าวทำให้ทราบว่าช่วงความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1 ถึง 3 กรัมต่อลิตร สามารถใช้เพื่อการเจริญ และการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ได้ไม่แตกต่างกัน เนื่องจากที่ช่วงความเข้มข้นดังกล่าวจุลินทรีย์สามารถเจริญและย่อยแป้งได้ นอกจากนี้เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อก็ยังพบว่ามีแอมโมเนียมซัลเฟตเหลืออยู่ แต่อย่างไรก็ตามหากต้องนำน้ำหมักที่ได้จากการย่อยแป้งไปใช้ต่อเพื่อการผลิตเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในขั้นตอนต่อไป การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร จึงเหมาะสมที่สุด เนื่องจากน่าจะมีปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเหลือมากพอต่อการผลิตเอทานอลจากเชื้อผสมเป็นเวลามากกว่า 48 ชั่วโมง

4.2.3 ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

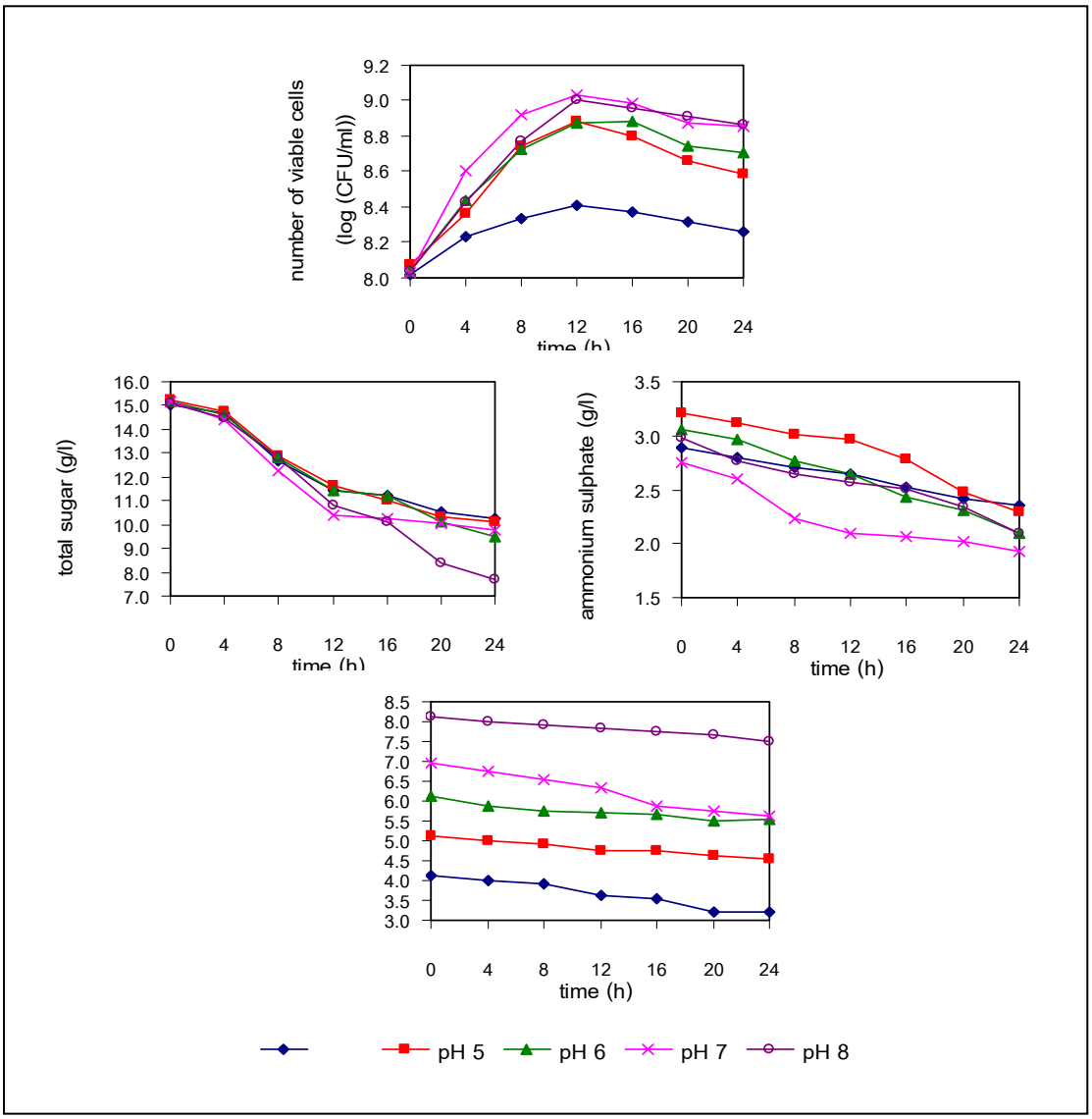
โดยส่วนใหญ่แล้วแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* สามารถเจริญได้ในช่วง pH ค่อนข้างกว้าง ซึ่งค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิต และการทำงานของแอลฟาอะมิเลส มักอยู่ในช่วงที่เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ เช่น *Bacillus* sp. K-12 เจริญได้ดีในช่วงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อประมาณ 4.5 ถึง 10.5 โดยค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อต่อการผลิตแอลฟาอะมิเลสอยู่ในช่วง 6.0 ถึง 8.0 (Kiran และคณะ, 2005) อย่างไรก็ตาม การเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในระดับขวดเขย่านั้น ไม่สามารถปรับค่า pHในระหว่างการเลี้ยงเชื้อได้ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษารูปแบบของการเจริญ และการย่อยแป้งที่ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อค่าต่าง ๆ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปประกอบการอธิบายรูปแบบการผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อผสมในระดับขวดเขย่าได้ต่อไป ทั้งนี้มีหลายงานวิจัยที่พบว่า เมื่อค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนแปลง การผลิตเอนไซม์ และแอกทิวิตีของเอนไซม์อาจเปลี่ยนแปลงไป เช่น งานวิจัยของ Sarikaya และ Gürgün (2000) พบว่าค่า pH ที่เหมาะสมต่อเจริญ และการผลิต แอลฟาอะมิเลสของ *Bacillus amyloliquefaciens* สายพันธุ์ I และ II มีค่าเท่ากับ 7.0 โดยเอนไซม์มีแอกทิวิตีสูงสุดที่ค่า pH เท่ากับ 5.9 และยังคงมีแอกทิวิตีเมื่ออยู่ช่วง pH ระหว่าง 5.0 ถึง 7.0 Gangadharan และคณะ (2006) รายงานว่า *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถผลิตแอลฟาอะมิเลส ได้ในช่วง pH ระหว่าง 3.0 ถึง 9.0 โดยเอนไซม์มีแอกทิวิตีสูงสุดที่ค่า pH เท่ากับ 4.0

งานวิจัยในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ศึกษาค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ผลการศึกษาเป็นดังนี้



รูปที่ 4.11 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 (ก) 5.0 (ข) 6.0 (ค) 7.0 (ง) และ 8.0 (จ)

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.11 พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 8.41 8.88 8.88 9.03 และ 9.00 (log (CFU/ml)) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.85 1.95 1.95 1.99 และ 1.98 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ พบว่ามีการใช้น้ำตาลจากการย่อยแป้งโดยจุลินทรีย์ และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โดยน้ำตาลรวมลดลงเหลือเท่ากับ 10.22 10.08 9.47 9.80 และ 7.72 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงเหลือเท่ากับ 2.36 2.30 2.10 1.93 และ 2.10 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ตามลำดับ ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจาก 4.12 5.12 6.14 6.97 และ 8.11 เหลือเท่ากับ 3.22 4.53 5.54 5.62 และ 7.51 ตามลำดับ (ตารางที่ ค.14 ถึง ค.18 ในภาคผนวก ค)



รูปที่ 4.12 เปรียบเทียบผลของ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

จากรูปที่ 4.12 การเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ไปทั้งหมด (พิจารณาจากค่าน้ำตาลรวม) มีค่าเท่ากับ 4.82 5.13 5.68 5.34 และ 7.36 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตในแต่ละช่วงเวลามีแนวโน้มเช่นเดียวกัน คือ เพิ่มขึ้นตามลำดับในช่วงแรกของการทดลอง และสูงสุดในช่วงโมงที่ 12 ซึ่งจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตภายหลังจากชั่วโมงดังกล่าวเริ่มลดลงจนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ส่งผลให้จำนวนเซลล์ที่ชีวิตในแต่ละช่วงเวลามีมากที่สุดถึงน้อยที่สุดเป็นดังนี้ 7.0 8.0 6.0 5.0 และ 4.0 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตทั้งหมดที่ถูกใช้มีค่าเท่ากับ 0.53 0.91 0.95 0.82 และ 0.88 กรัมต่อลิตร ค่า pH ของน้ำหมักลดลงจากเวลาเริ่มต้น จนถึงเวลาสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.5 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0

pH	Yx/s (g_x/g_s) **สูงสุด**	Yx/s (g_x/g_s) **ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ**
4.0	0.129 (ชั่วโมงที่ 4)	0.011
5.0	0.140 (ชั่วโมงที่ 4)	0.022
6.0	0.158 (ชั่วโมงที่ 4)	0.023
7.0	0.177 (ชั่วโมงที่ 4)	0.030
8.0	0.136 (ชั่วโมงที่ 4)	0.022

จากตารางที่ 4.5 เมื่อคำนวณ พบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 5.0 6.0 7.0 และ 8.0 ได้ค่าค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุดที่เวลา 4 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 0.129 0.140 0.158 0.177 และ 0.136 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรวม ตามลำดับ (การคำนวนแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.5) ดังนั้นจึงเลือกค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เพื่อใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป เนื่องจากให้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงที่สุด (ชั่วโมงที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้ค่า pH ค่าอื่นที่ชั่วโมงเดียวกัน นอกจากนี้ข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 สามารถมีการเจริญได้ในช่วง pH กว้าง

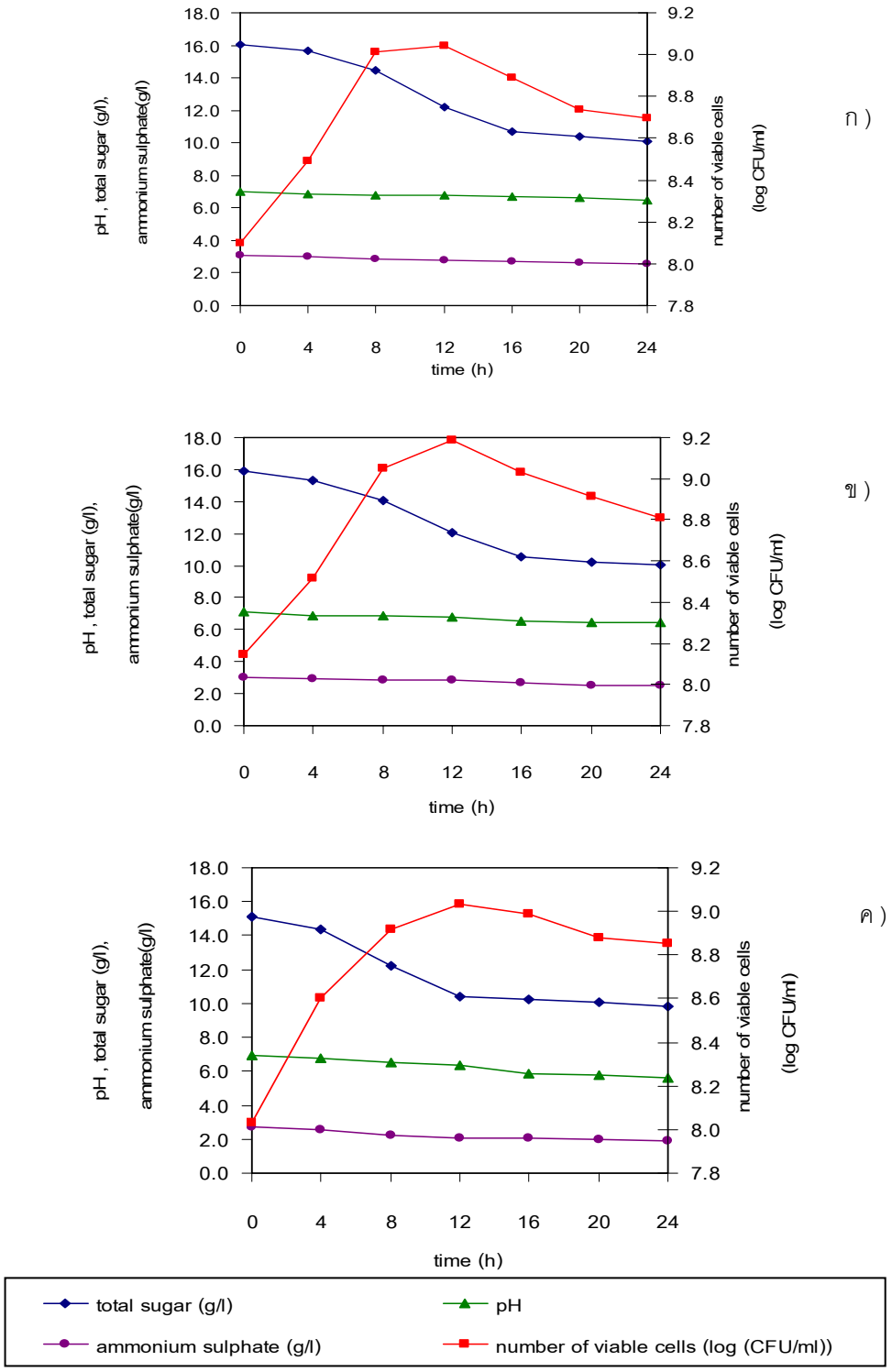
4.2.4 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการย่อยแป้ง

เนื่องจากอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการผลิตแอลฟาอะมิเลสของแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* อาจเป็นอุณหภูมิเดียวกัน หรือต่างกันได้ ทั้งนี้ขึ้นกับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Mamo และ Gessesse (1999) และ Qader และคณะ (2006)) โดยมีบางรายงานการวิจัยที่พบว่า *Bacillus amyloliquefaciens* สามารถเจริญ และผลิตเอนไซม์ในช่วงอุณหภูมิ 30 ถึง 60 องศาเซลเซียส เช่นในงานวิจัยของ Gangadharan และคณะ (2007) และ Sivaramakrishnan และคณะ (2007)

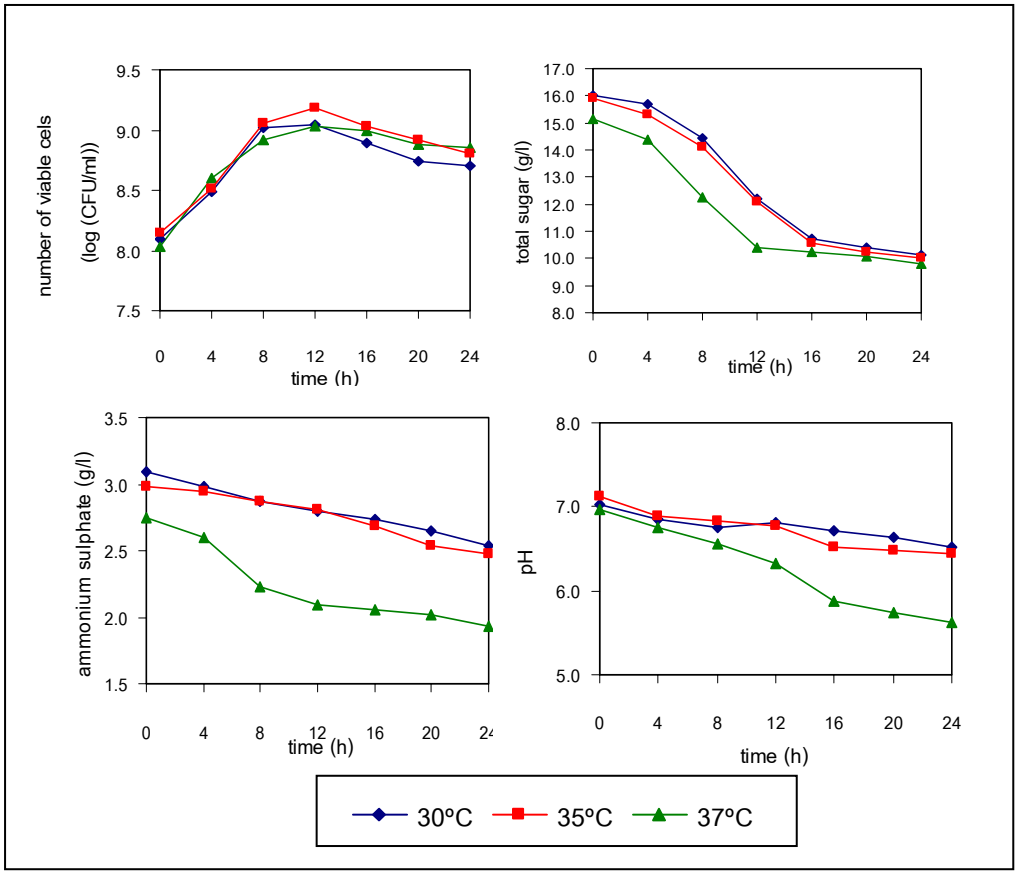
งานวิจัยในหัวข้อนี้เป็นการศึกษาค่าของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 35 และ37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ผลการศึกษาเป็นดังนี้

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.13 พบว่าเมื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์เจริญเพิ่มขึ้นตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ และได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 9.04 9.18 และ 9.03 (log (CFU/ml)) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.99 2.02 และ 1.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งภายหลังจากชั่วโมงดังกล่าว จำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเริ่มลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง พบว่ามีการใช้น้ำตาลจากการย่อยแป้ง และการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โดยน้ำตาลรวมลดลงเหลือเท่ากับ 10.11 10.01 และ 9.80 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงเหลือเท่ากับ 2.54 2.48 และ 1.93 กรัมต่อลิตร ค่า pH ของน้ำหมักลดลงเป็นเท่ากับ 6.51 6.44 และ 5.62 ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ ค.19 ถึง ค.21 ในภาคผนวก ค)

ผลที่แสดงดังรูปที่ 4.14 แสดงให้เห็นว่าการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตมีแนวโน้มคล้ายกัน คือ เพิ่มจำนวนมากขึ้นตามลำดับในช่วงแรกของการทดลอง และสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งภายหลังจากชั่วโมงดังกล่าว จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 24 ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ทั้งหมด (พิจารณาจากปริมาณ น้ำตาลรวม) มีค่าเท่ากับ 5.93 5.86 และ 5.34 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่ถูกใช้ทั้งหมดมีค่าเท่ากับ 0.55 0.50 และ 0.82 กรัมต่อลิตร เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อค่า pH ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสมีค่าต่ำกว่าการเลี้ยงที่ 30 และ 35 องศาเซลเซียสเล็กน้อย



รูปที่ 4.13 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่ม บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส



รูปที่ 4.14 เปรียบเทียบผลของอุณหภูมิ ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อเลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 4.6 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส

temperature (ºC)	Yx/s(g_x/g_s) **สูงสุด**	Yx/s (g_x/g_s) **ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ**
30	0.084 (ชั่วโมงที่ 8)	0.016
35	0.141 (ชั่วโมงที่ 4)	0.021
37	0.177 (ชั่วโมงที่ 4)	0.030

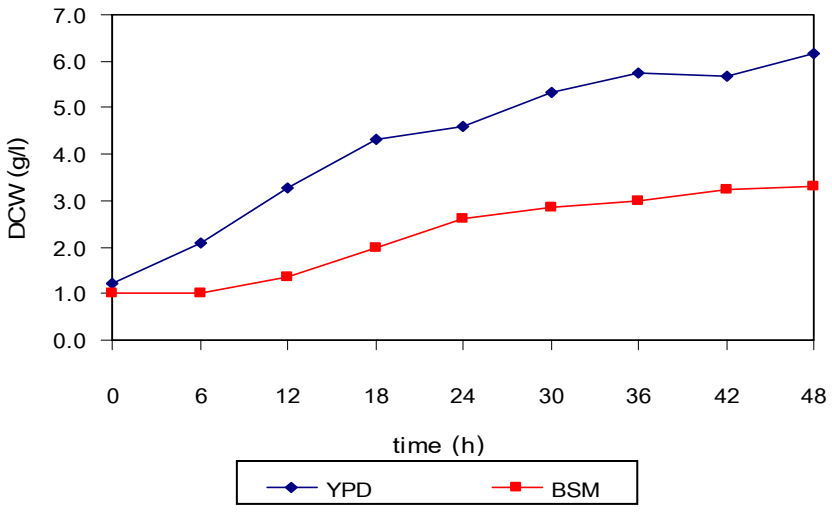
จากตารางที่ 4.6 เมื่อคำนวณค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท พบว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ได้ค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่าเท่ากับ 0.084 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรวม หากเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 และ 37 องศาเซลเซียส ได้ค่าสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่าเท่ากับ 0.141 และ 0.177 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรวม ตามลำดับ (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.6) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส (อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* SKP-01) *B. amyloliquefaciens* IFO14141 ยังคงมีความสามารถในการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้เลือกอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส เนื่องจากให้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลาเดียวกัน

4.3 การหาภาวะที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอล

4.3.1 ชนิดของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

คุณภาพของกล้าเชื้อเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้กระบวนการหมักมีประสิทธิภาพดีขึ้น ซึ่งปัจจัยที่สำคัญที่ส่งผลต่อคุณภาพของกล้าเชื้อคือ อาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อ พบว่าการพัฒนาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงกล้าเชื้อให้เหมาะสมต่อการเจริญของกล้าเชื้อสามารถช่วยลดระยะ lag phase ให้สั้นลงได้ อายุของกล้าเชื้อก็มีความสำคัญต่อคุณภาพของกล้าเชื้อ เพราะกล้าเชื้อที่อยู่ในช่วงที่มีกิจกรรมของเซลล์ที่ดี จะส่งผลต่อการเจริญและการผลิตสารผลิตภัณฑ์ได้ดีในขั้นตอนการผลิต โดยกล้าเชื้อที่อยู่ในระยะการเจริญแบบทวีคูณจะมีอัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate; μ) สูง (Mansi และ Charlie, 1999)

การศึกษาชนิดอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ที่เหมาะสมทำโดย เลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มี 2 สูตร ได้แก่ BSM (Basal Salt Medium) และ YPD (Yeast Peptone Dextrose) โดยอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีการเติมกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.5 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ผลการศึกษาพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD ส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเติบโตดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BSM ดังแสดงในรูปที่ 30 และตารางที่ 13 ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD มากกว่าค่าที่ได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด BSM ในทุกช่วงเวลาของการทดลอง โดยปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM และ YPD เท่ากับ 3.31 (ชั่วโมงที่ 48) และ 6.18 (ชั่วโมงที่ 48) กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อคิดค่าอัตราการเจริญจำเพาะพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อชนิด YPD ให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 ของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 0.0888 ต่อชั่วโมง ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อ BSM ให้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับ 0.0427 ต่อชั่วโมง (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.7) ดังนั้นในงานวิจัยจึงเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD สำหรับเป็นอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ เนื่องจากค่าอัตราการเจริญจำเพาะ และน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD มีค่าสูงกว่าการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM



รูปที่ 4.15 การเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ BSM และ YPD

ตารางที่ 4.7 น้ำหนักเซลล์แห้ง อัตราการเจริญจำเพาะ และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อใช้อาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหาร BSM และ YPD

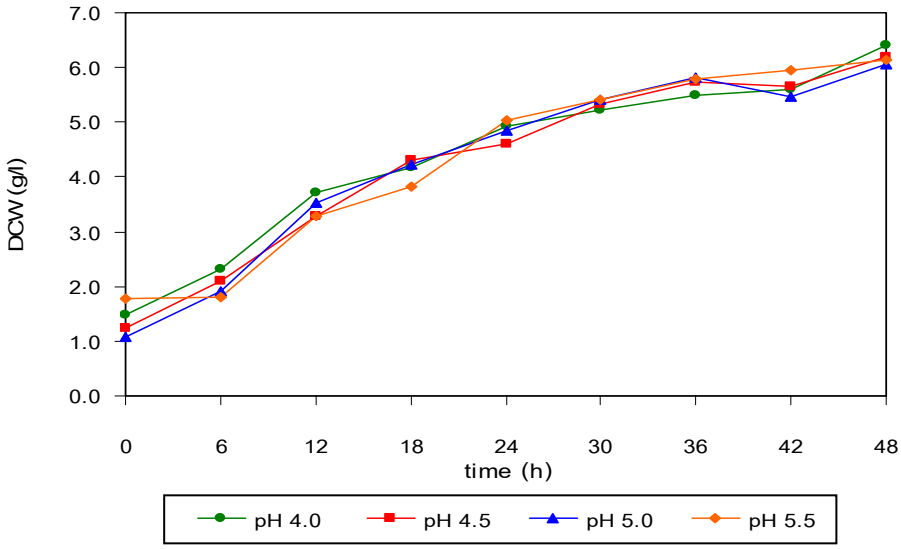
	time (h)	DCW (g/l)	specific growth rate (h^{-1})	pH
BSM medium	0	1.01	-	4.48
	6	1.02	0.0016	4.53
	12	1.38	0.0257	4.41
	18	1.99	0.0389	4.31
	24	2.61	**0.0427**	4.35
	30	2.86	0.0399	4.26
	36	3.01	0.0355	4.28
	42	3.24	0.0318	4.17
	48	3.31	0.0281	4.11
YPD medium	0	1.23	-	4.53
	6	2.10	**0.0888**	4.48
	12	3.28	0.0816	4.42
	18	4.31	0.0701	4.35
	24	4.61	0.0560	4.32
	30	5.33	0.0474	4.20
	36	5.74	0.0406	4.19
	42	5.66	0.0342	4.12
	48	6.18	0.0299	4.07

4.3.2 ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ

ไฮโดรเจนไอออน (H ion) หรือโปรตอน มีความสำคัญมากในเชิงสรีระวิทยาของยีสต์ โดย pH ทั้งภายนอกและภายในเซลล์มีอิทธิพลมากต่อการเจริญและเมทาบอลิซึมของยีสต์ โดยทั่วไปยีสต์ส่วนมากเจริญได้ดีในช่วง pH 3.5-7.0 ค่า pH เริ่มต้น และ buffer capacity ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ควรอยู่สภาพที่ยีสต์สามารถเจริญและหมักเอทานอลได้ตลอดกระบวนการ เนื่องจากการเจริญที่รวดเร็วของยีสต์เมื่อมีการนำน้ำตาลไปใช้ ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรด ซึ่งเป็นผลรวมจากการปลดปล่อยโปรตอนระหว่างการขนส่งสารอาหาร การปลดปล่อยกรดอินทรีย์ และการเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ pH ภายในเซลล์ที่กำลังเจริญจะมีการควบคุมภายในช่วงแคบ ๆ เท่านั้น (โดยการทำงานของเอนไซม์ ATPase ที่พลาสมาเมมเบรน) (Isaac และ Jenning (1995) , Walker (1998)) ดังนั้นจึงต้องมีการปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม

ในขั้นตอนนี้ได้ศึกษาค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ที่เหมาะสม โดยเลี้ยงเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ด้วยอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มี

การเติมกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร แปรค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.16 และตารางที่ 4.8



รูปที่ 4.16 การเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 4.5 5.0 และ5.5

เมื่อเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 แล้ววัดการเจริญของยีสต์ โดยวิเคราะห์จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่า *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 สามารถเจริญได้ในทุกค่า pH ที่ศึกษา โดย ยีสต์มีการเจริญเพิ่มมากขึ้นตามลำดับตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในแต่ละช่วงเวลามีค่าใกล้เคียงกัน โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงในรูปที่ 4.16 และผลการทดลองในตารางที่ 4.8 สรุปได้ว่า น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ที่ได้จากการเลี้ยงที่ค่า pH เริ่มต้นต่าง ๆ มีค่าใกล้เคียงกันในแต่ละช่วงเวลาของการเลี้ยงเชื้อ ดังกล่าวแล้วก่อนหน้านี้ โดยน้ำหนักเซลล์แห้งมีการเพิ่มขึ้นเท่ากับ 4.95 4.95 4.97 และ 4.37 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีการลดลงตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยที่ 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ค่า pH มีค่าลดลงจากค่า pH เริ่มต้นประมาณ 0.4 ถึง 0.5 สำหรับค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่คำนวณได้ พบว่าได้ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.0983 ต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ค่า pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 และอัตราการเจริญจำเพาะลดลงเป็น 0.0888 0.0771 และ 0.0515 ต่อชั่วโมง (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.8) เมื่อเลี้ยงเชื้อที่ค่า pH เท่ากับ 4.5 4.0 และ 5.5 ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยขั้นต่อไปจึงเลือกค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD เท่ากับ 5.0 เนื่องจากให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อที่ค่าpHเริ่มต้นค่าอื่น

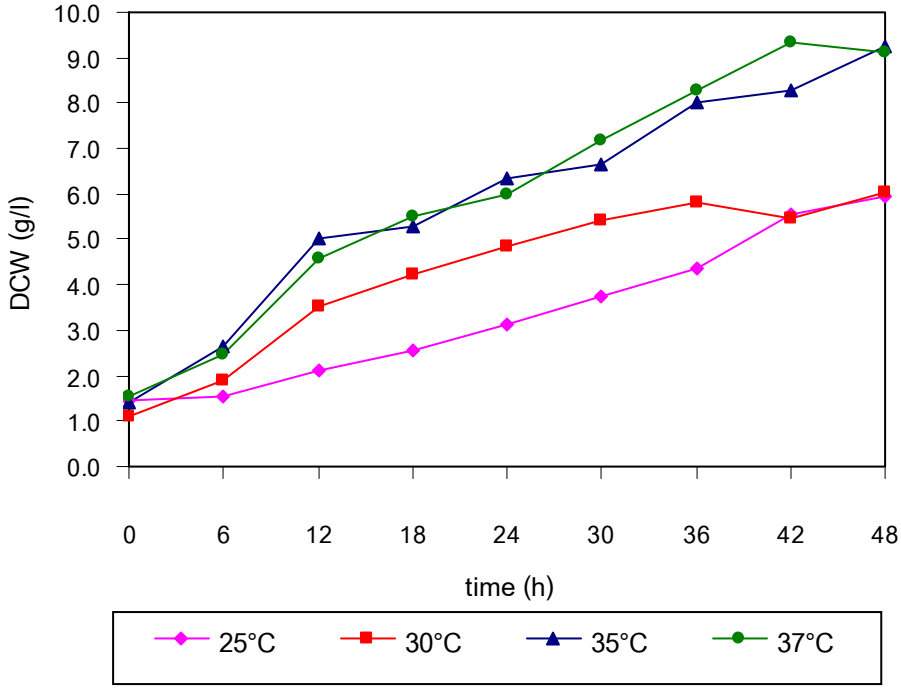
ตารางที่ 4.8 การเจริญ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ และค่า pH เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 4.0 4.5 5.0 และ 5.5 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

time (h)	pH 4.0			pH 4.5			pH 5.0			pH 5.5		
	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH
0	1.47	-	3.97	1.23	-	4.53	1.08	-	5.02	1.77	-	5.61
6	2.33	0.0764	4.12	2.10	**0.0888**	4.48	1.91	0.0950	5.17	1.81	0.0033	5.54
12	3.71	**0.0771**	4.02	3.28	0.0816	4.42	3.52	**0.0983**	4.95	3.29	**0.0515**	5.48
18	4.16	0.0598	3.97	4.31	0.0701	4.35	4.22	0.0783	4.86	3.82	0.0484	5.42
24	4.92	0.0500	3.89	4.61	0.0560	4.32	4.84	0.0632	4.82	5.05	0.0474	5.39
30	5.23	0.0415	3.80	5.33	0.0474	4.20	5.40	0.0525	4.76	5.41	0.0420	5.21
36	5.48	0.0348	3.74	5.74	0.0406	4.19	5.83	0.0444	4.70	5.79	0.0368	5.16
42	5.60	0.0295	3.65	5.66	0.0342	4.12	5.48	0.0364	4.63	5.95	0.0319	5.03
48	**6.42**	0.0265	3.57	**6.18**	0.0299	4.07	**6.05**	0.0314	4.57	**6.14**	0.0279	5.10

4.3.3 อุณหภูมิที่เหมาะต่อการเลี้ยงกล้าเชื้อ

ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงของยีสต์เป็นลักษณะเฉพาะตัวของยีสต์แต่ละสายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic strain) อุณหภูมิต่ำสุดที่สามารถเจริญได้คือ 5 ถึง 10 องศาเซลเซียส และไม่มีการเจริญที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ความทนต่ออุณหภูมิสูงมากขึ้นเมื่อเชื้อเจริญในอาหารที่สมบูรณ์ (Rose และ Harison, 1970)

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 โดยเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ อุณหภูมิที่ศึกษาเท่ากับ 25 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.17 และตารางที่ 4.9



รูปที่ 4.17 การเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 25 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส แล้ววัดการเจริญของยีสต์ โดยวิเคราะห์จากค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 สามารถเจริญได้ในทุกค่าอุณหภูมิที่ศึกษา โดยยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในชั่วโมงที่ 48 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 และ 37 องศาเซลเซียส มีค่าใกล้เคียงกัน และสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 25 องศาเซลเซียส ดังแสดงในรูปที่ 4.17

จากข้อมูลในตารางที่ 4.9 แสดงให้เห็นว่าเมื่อเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD โดยบ่มที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส ยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับเวลาการเลี้ยงเชื้อ การเจริญของยีสต์สูงสุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.27 กรัมต่อลิตร และพบว่าได้น้ำหนักเซลล์แห้งต่ำกว่าเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 30 และ 37 องศาเซลเซียส ส่วนค่า pH ของน้ำหมักที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 และ 35 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มขึ้นเล็กน้อย สำหรับการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 และ 37 องศาเซลเซียส ค่า pH ลดลงเล็กน้อย ค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่คำนวณได้ พบว่ามีค่าสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เท่ากับ 0.1061 ต่อชั่วโมง และอัตราการเจริญจำเพาะมีค่าต่ำกว่าโดยมีค่าเท่ากับ 0.0983 0.0657 และ 0.0551 ต่อชั่วโมง (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.9) เมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิเท่ากับ 30 37 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยขั้นต่อไปจึงเลือกค่าอุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงกล้าเชื้อเท่ากับ 35 องศาเซลเซียสเนื่องจากให้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่าอุณหภูมิค่าอื่น

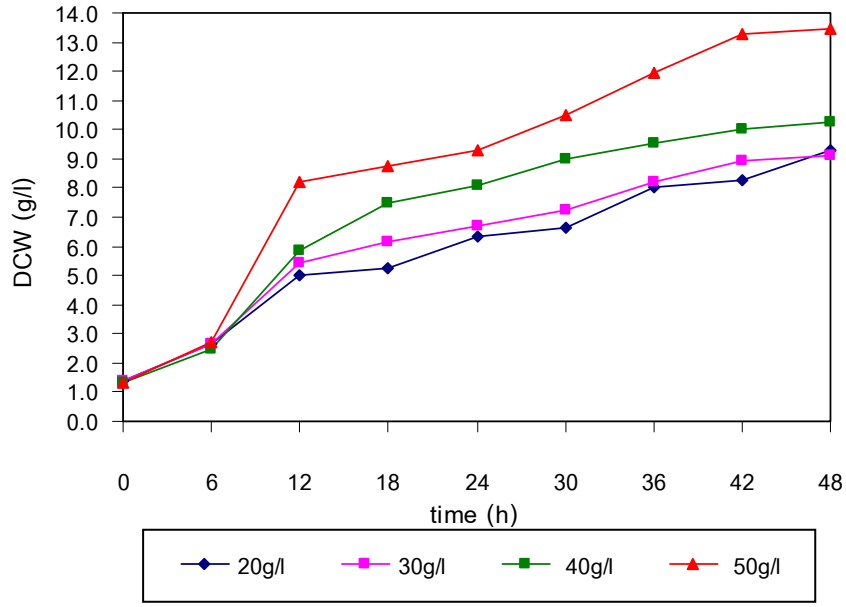
ตารางที่ 4.9 การเจริญ ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ และค่า pH เมื่อเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 ที่อุณหภูมิเท่ากับ 25 30 35 และ 37 องศาเซลเซียส

time (h)	25ºC			30ºC			35ºC			37ºC		
	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH
0	1.44	-	5.01	1.08	-	5.02	1.41	-	5.05	1.53	-	5.03
6	1.53	0.0101	4.97	1.91	0.0950	5.17	2.67	**0.1061**	4.92	2.47	0.0283	4.90
12	2.13	0.0326	4.87	3.52	**0.0983**	4.95	5.02	0.1057	5.17	4.58	**0.0657**	5.03
18	2.56	0.0343	4.99	4.22	0.0783	4.86	5.28	0.0765	5.15	5.52	0.0591	5.06
24	3.12	**0.0344**	5.22	4.84	0.0632	4.82	6.35	0.0615	5.21	6.00	0.0487	5.10
30	3.75	0.0338	5.25	5.40	0.0525	4.76	6.64	0.0495	4.99	7.20	0.0431	5.14
36	4.36	0.0327	5.32	5.83	0.0444	4.70	8.02	0.0433	5.03	8.29	0.0390	4.95
42	5.53	0.0328	5.73	5.48	0.0364	4.63	8.27	0.0375	5.15	9.33	0.0357	4.88
48	**5.96**	0.0315	5.72	**6.05**	0.0314	4.57	**9.27**	0.0336	5.17	**9.13**	0.0316	4.80

4.3.4 ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกล้าเชื้อ

ภายในเซลล์ยีสต์มีคาร์บอนประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักเซลล์แห้ง ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องใช้สารประกอบอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ส่วนใหญ่สารอินทรีย์ที่ใช้คือน้ำตาล และน้ำตาลกลูโคสก็เป็นน้ำตาลที่ยีสต์ทุกชนิดสามารถนำไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้ (Berry และคณะ 1987) ความเข้มข้นของน้ำตาลนับว่าเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ โดยส่วนใหญ่แล้วที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงจะมีผลยับยั้งการเจริญ โดยเซลล์ของยีสต์จะเกิดพลาสโมไลซิส (plasmolysis) เมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 14 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) (Jones และคณะ, 1981) ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์ (2547) รายงานว่า การเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในน้ำตาลความเข้มข้นเท่ากับ 260 กรัมต่อลิตร มีผลให้ได้การเจริญ และการผลิตเอทานอลลดลง เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในน้ำตาลความเข้มข้น 165 และ 220 กรัมต่อลิตร เนื่องจากเซลล์เกิดพลาสโมไลซิส

ในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ทำโดยเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ผลการศึกษาแสดงในรูป 4.18 และตารางที่ 4.10



รูปที่ 4.18 การเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.18 แสดงว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสความเข้มข้นเท่ากับ 20 ถึง 50 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่ศึกษา โดยรวมพบว่าการเจริญของยีสต์เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าเมื่อความเข้มข้นของน้ำตาลเพิ่มขึ้น มีผลให้เซลล์นำ

น้ำตาลไปใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม และส่งผลให้มีการเจริญสูงสุด โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 13.49 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อใช้น้ำตาลความเข้มข้นสูงสุดที่ศึกษา (50 กรัมต่อลิตร) ในการวิจัยนี้ ในทำนองเดียวกัน การเจริญของยีสต์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นต่ำกว่า (20 ถึง 40 กรัมต่อลิตร) น้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์ที่ได้ลดลงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของน้ำตาล กล่าวคือ ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 9.27 9.09 และ 10.27 เมื่อใช้น้ำตาลเท่ากับ 20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่เวลา 48 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ

ผลการทดลองดังตารางที่ 4.10 สำหรับค่าน้ำหนักเซลล์แห้งดังกล่าวแล้วก่อนหน้านี้ โดยการเจริญของยีสต์สูงสุดเมื่อใช้กลูโคส 50 กรัมต่อลิตร และพบว่าการเจริญมีน้อยกว่า เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสต่ำกว่า (20 30 และ 40 กรัมต่อลิตร) สำหรับค่าอัตราการเจริญจำเพาะที่คำนวณได้ พบว่าค่าสูงสุดเท่ากับ 0.1537 ต่อชั่วโมง เมื่อเลี้ยงยีสต์ในอาหารที่มีกลูโคสสูงสุดเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร และค่าอัตราการเจริญจำเพาะลดลงเป็น 0.1251 0.1127 และ 0.1061 ต่อชั่วโมง (วิธีคำนวณแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.10) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส 40 30 และ 20 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ดังนั้นในงานวิจัยจึงเลือกค่าความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่ใช้ในการเลี้ยงกล้าเชื้อเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร เนื่องจากให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสอื่น

ตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 20 30 40 และ 50 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.0 บนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที

time (h)	20 (g/l)			30 (g/l)			40 (g/l)			50 (g/l)		
	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH	DCW (g/l)	μ (h^{-1})	pH
0	1.41	-	5.05	1.40	-	5.01	1.30	-	4.98	1.30	-	4.98
6	2.67	**0.1061**	4.92	2.67	0.1076	4.94	2.50	0.1087	4.94	2.74	0.1240	4.94
12	5.02	0.1057	5.17	5.42	**0.1127**	4.85	5.84	**0.1251**	4.48	8.23	**0.1537**	4.48
18	5.28	0.0765	5.15	6.17	0.0859	5.23	7.50	0.1018	4.83	8.78	0.1139	4.83
24	6.35	0.0615	5.21	6.70	0.0661	5.20	8.08	0.0792	4.96	9.30	0.0850	4.96
30	6.64	0.0495	4.99	7.22	0.0528	5.21	9.02	0.0641	5.01	10.53	0.0676	5.01
36	8.02	0.0433	5.03	8.23	0.0447	5.04	9.51	0.0528	5.01	11.98	0.0564	5.01
42	8.27	0.0375	5.15	8.96	0.0388	5.02	10.01	0.0444	4.92	13.27	0.0485	4.92
48	**9.27**	0.0336	5.17	**9.09**	0.0336	5.01	**10.27**	0.0378	4.80	**13.49**	0.0417	4.80

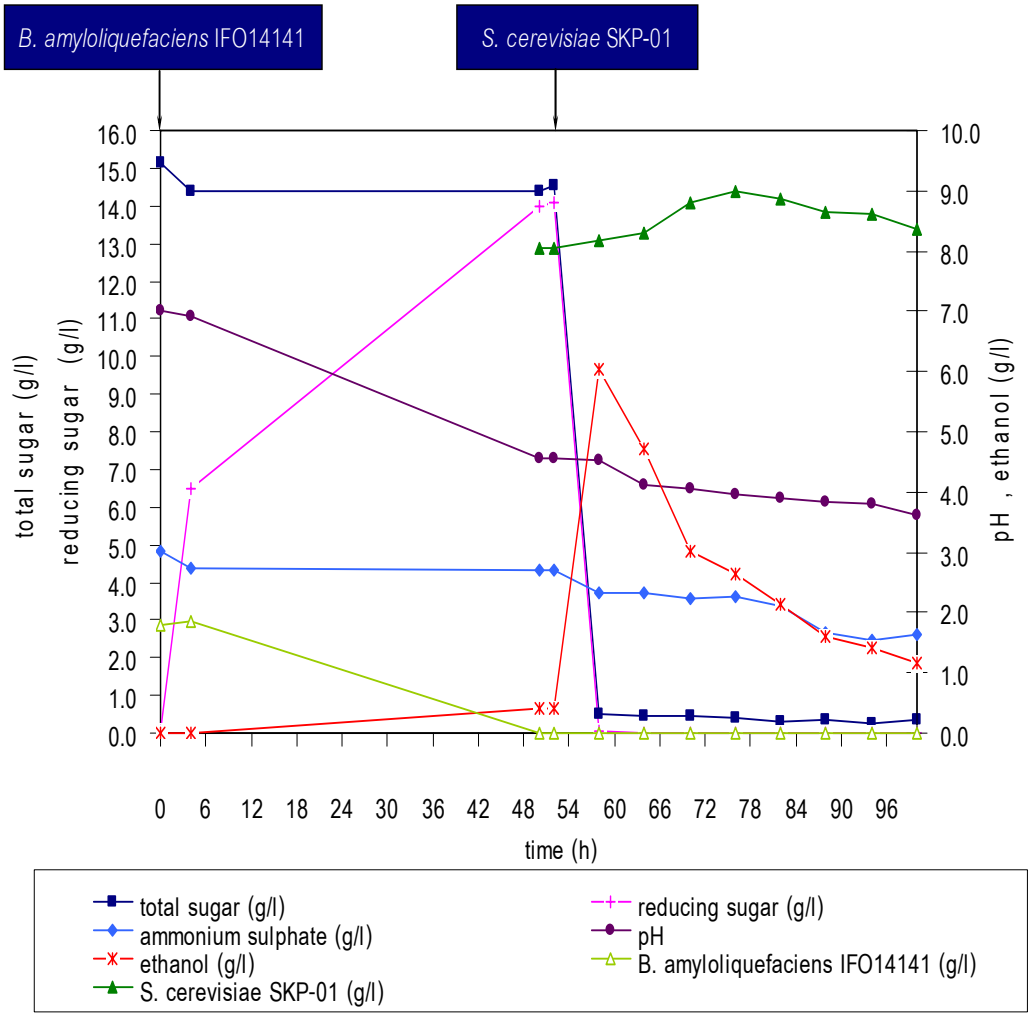
4.4 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiea* SKP-01 จากแป้งมันสำปะหลังที่ย่อยด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 หรือเอนไซม์ทางการค้า

4.4.1 การผลิตเอทานอลโดยการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิด เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cereviaias* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส

ผลการศึกษาที่รายงานในข้อ 4.1 และ 4.2 พบว่าการย่อยแป้งโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ได้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ประมาณ 6 ถึง 7 กรัมต่อลิตร (ข้อมูลไม่ได้แสดง) จากแป้ง 15 กรัมต่อลิตร ดังนั้นเพื่อให้ได้ปริมาณน้ำตาลเพิ่มขึ้น ในการศึกษานี้จึงเติมกลูโคอะมิเลสเพื่อให้การย่อยแป้งสมบูรณ์ขึ้น

การผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อผสมเริ่มจาก ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน บรรจุในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยเวลาดังกล่าวได้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุด ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 4.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของกลูโคอะมิเลส และเหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็น แล้วเติมสารละลายเอนไซม์กลูโคอะมิเลส ปริมาตร 0.001 มิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ซึ่งมีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที ควบคุมอุณหภูมิอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อที่ได้ลงในน้ำหมักที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่เตรียมไว้ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 (ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์, 2547) เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.19 และตารางที่ 4.11



รูปที่ 4.19 การผลิตเอทานอลโดยการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิด เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส

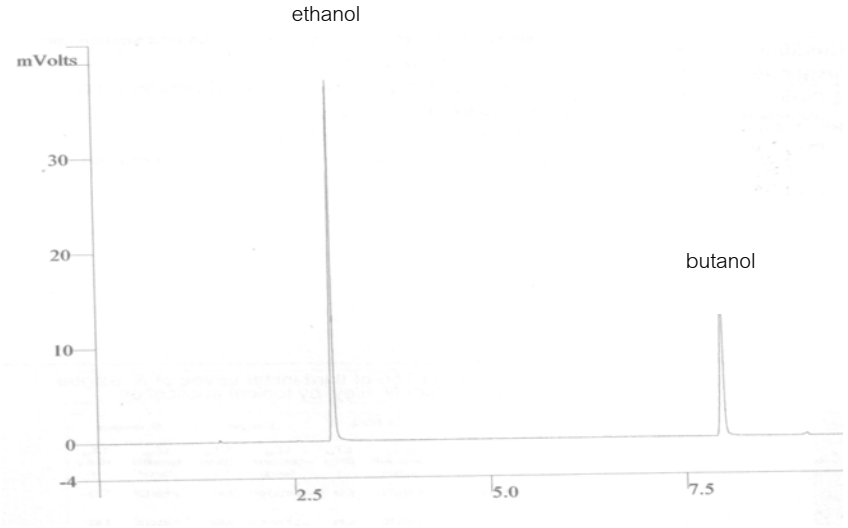
ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.19 และตารางที่ 4.11 ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 พบว่าการเจริญเติบโตของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจาก 0.03 เป็น 6.47 กรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเล็กน้อย

เมื่อย่อยแป้งที่เหลือต่อด้วยกลูโคอะมิเลสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นจาก 6.47 เป็นเท่ากับ 14.01 กรัมต่อลิตร และเมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงไปพบว่ายีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยตามเวลาของการเลี้ยงเชื้อ และได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในชั่วโมงที่ 76 ของการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะกล้าเชื้อยีสต์) เท่ากับ 8.98 กรัมต่อลิตร และได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.005 ต่อชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญของยีสต์เริ่มลดลงอย่างช้า ๆ ปริมาณน้ำตาลรวม และน้ำตาลรีดิวซ์ ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 58 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเอทานอลเพิ่ม

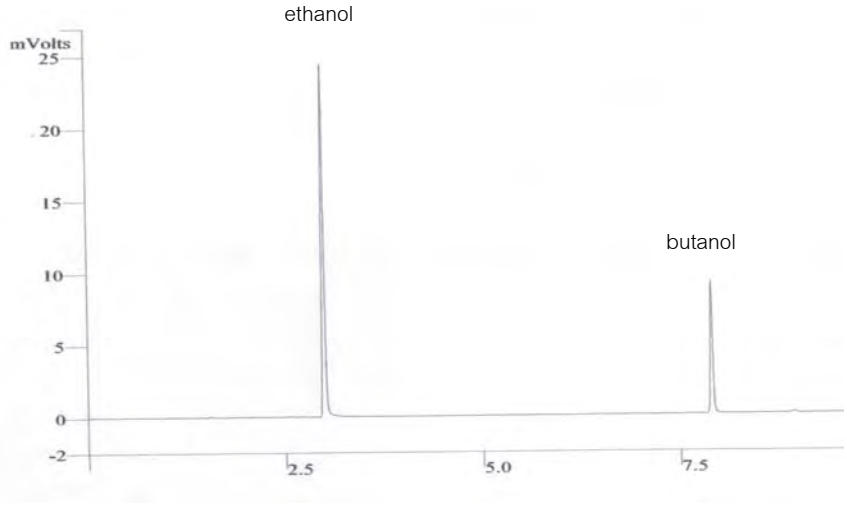
สูงขึ้น และสูงสุดในชั่วโมงดังกล่าว โดยได้เท่ากับ 6.03 กรัมต่อลิตร (0.76 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)) คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรท เท่ากับ 0.40 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 78.43 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.10 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งภายหลังจากชั่วโมงดังกล่าว ปริมาณน้ำตาลรวมและน้ำตาลรีดิวส์มีแนวโน้มคงที่ ปริมาณเอทานอลลดลงตามลำดับจนเหลือเท่ากับ 1.17 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อค่อย ๆ ลดลง โดยเหลือ 1.64 กรัมต่อลิตร ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง และมีค่าเท่ากับ 3.62 เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ให้ยีสต์หมักน้ำตาลได้เอทานอลในเวลาอันสั้น จึงใช้กล้าเชื้อยีสต์ปริมาณมาก ผลการศึกษาจึงพบว่าน้ำตาลถูกใช้และผลิตเป็นเอทานอลในเวลาอันสั้น โดยยีสต์มีการเจริญเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 4.11 การผลิตเอทานอล และค่าพารามิเตอร์ โดยการใช้จุลินทรีย์ 2 ชนิด เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส

time (h)	total sugar (g/l)	reducing Sugar (g/l)	ammonium Sulphate (g/l)	pH	DCW (g/l)		μ (h^{-1})	Yx/s (g_X/g_S)	ethanol (g/l)	Yp/s (g_P/g_S)	Qp (g_p/l.h)	fermentation efficiency (%)
					B. amyloliquefaciens IFO14141 (g/l)	*S. cerevisiae* SKP-01 (g/l)						
0	15.17	0.03	3.03	7.02	1.79	0	0	0	0	0	0	0
4	14.41	6.47	2.73	6.91	**1.84**	0	0.0069	0.0658	0	0	0	0
52 (ก่อนเติมยีสต์)	14.41	14.01	2.71	4.59	0	0	0	0	0	0	0	0
52 (หลังเติมยีสต์)	14.54	14.11	2.71	4.57	0	8.07	0	0	0.41	0	0	0
58	0.48	0.06	2.31	4.52	0	8.17	0.0020	0.0068	**6.03**	**0.40**	**0.10**	**78.43**
64	0.46	0.01	2.34	4.11	0	8.30	0.0023	0.0114	4.71	0.35	0.07	68.63
70	0.44	0.01	2.23	4.06	0	8.81	0.0046	0.0251	3.01	0.30	0.04	58.82
76	0.38	0.02	2.26	3.95	0	**8.98**	**0.0048**	0.0352	2.64	0.26	0.03	50.98
82	0.29	0.02	2.11	3.91	0	8.88	0.0039	0.0398	2.13	0.23	0.03	45.10
88	0.37	0.02	1.65	3.85	0	8.65	0.0027	**0.0400**	1.60	0.21	0.02	41.18
94	0.23	0.01	1.55	3.81	0	8.63	0.0019	0.0399	1.42	0.18	0.02	35.29
100	0.35	0.02	1.64	3.62	0	8.37	0.0011	0.0376	1.17	0.17	0.01	33.33



รูปที่ 4.20 โครมาโตแกรมของเอทานอลมาตรฐาน วิเคราะห์ด้วยวิธี Gas Chromatography

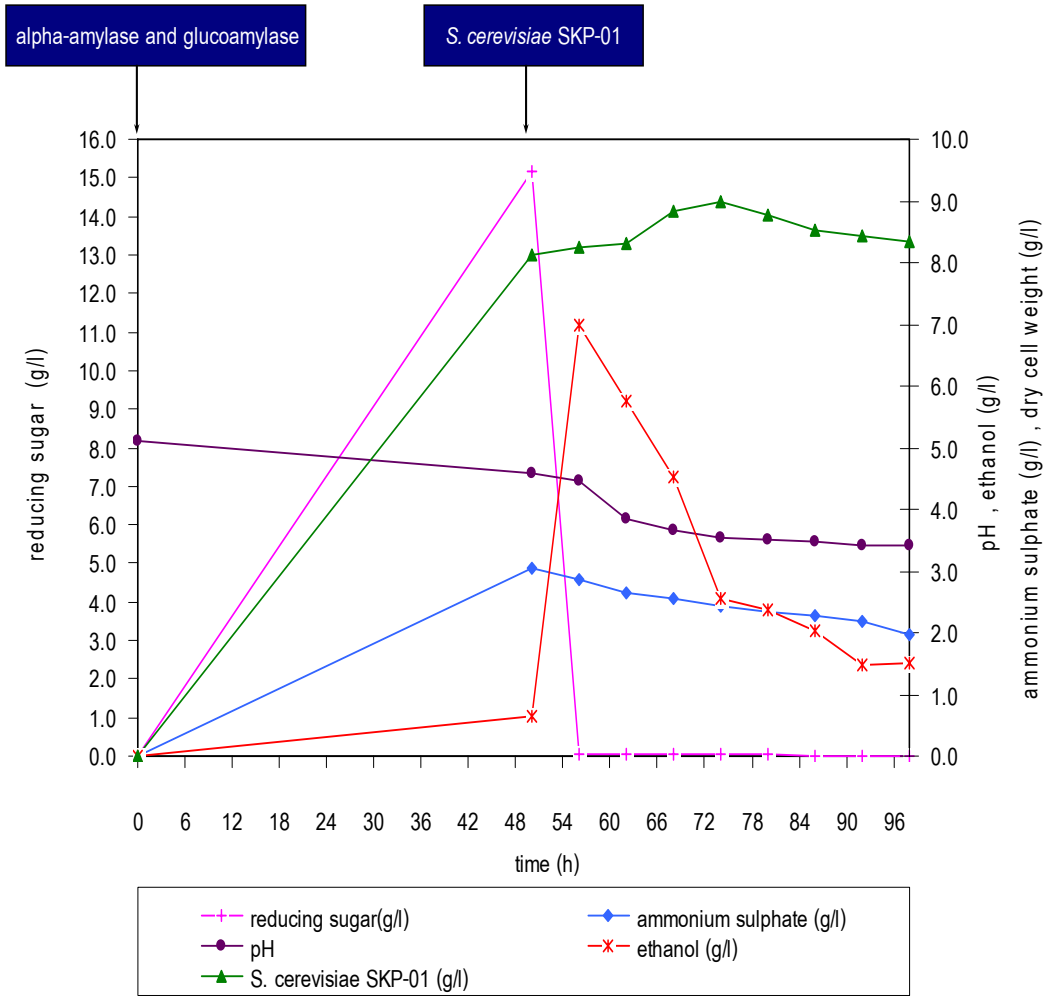


รูปที่ 4.21 โครมาโตแกรมของเอทานอลที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 58 วิเคราะห์ด้วยวิธี Gas Chromatography

จากรูปที่ 4.20 และ 4.21 แสดงโครมาโตแกรมที่วิเคราะห์โดย Gas Chromatography รูปที่ 4.20 และ 4.21 แสดงพีคของเอทานอลมาตรฐาน และเอทานอลจากตัวอย่างที่เวลา 58 ชั่วโมง ที่อยู่ในคอลัมน์ของสาร (retention time) ที่ 2.98 นาที และของบิวทานอลซึ่งเป็นสารมาตรฐานภายใน ที่เวลา 7.67 นาที

4.4.2 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยเอนไซม์ทางการค้า

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ในขวดทดลองขนาด 250 มิลลิลิตร โดยมีน้ำตาลความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส เป็นแหล่งคาร์บอน (วิธีการเตรียมตามภาคผนวก ก) และมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรับให้มีค่าเท่ากับ 4.5 นึ่งฆ่าเชื้อแบบมาตรฐาน รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นแล้วเติมเซลล์กล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 (วิธีเตรียมเซลล์กล้าเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 4.4.1) บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงในรูป 4.22 และตารางที่ 4.12



รูปที่ 4.22 การผลิตเอทานอลเมื่อเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส

จากรูปที่ 4.22 และตารางที่ 4.12 เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ภายหลังจากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลสเป็นเวลา 50 ชั่วโมง พบว่ายีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 มีการเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในชั่วโมงที่ 74 ของการเลี้ยงเชื้อ (ชั่วโมงที่ 24 ของการเพาะหัวเชื้อยีสต์) เท่ากับ 8.99 กรัมต่อลิตร และได้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดในชั่วโมงดังกล่าว เท่ากับ 0.005 ต่อชั่วโมง หลังจากนั้นการเจริญของยีสต์เริ่มลดลง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 56 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยปริมาณเอทานอลเพิ่มสูงขึ้นและสูงสุดในชั่วโมงดังกล่าว ได้ปริมาณเอทานอล เท่ากับ 6.97 กรัมต่อลิตร (0.88 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)) คิดเป็นผลได้ต่อผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.42 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 82.35 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.12 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งภายหลังจากเวลาดังกล่าว ปริมาณน้ำตาลรีดิวส์มีแนวโน้มคงที่โดยมีค่าอยู่ในช่วงเท่ากับ 0.01 ถึง 0.07 กรัมต่อลิตร จนสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเอทานอลได้ลดลงเรื่อย ๆ จนมีค่าเท่ากับ 1.49 กรัมต่อลิตร ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงตามเวลาการเลี้ยงเชื้อโดยเหลือเท่ากับ 1.98 กรัมต่อลิตร ส่วนค่า pH ลดลงตามเวลาโดยเหลือเท่ากับ 3.42 เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ

ตารางที่ 4.12 การผลิตเอทานอล และค่าพารามิเตอร์ โดยการเพาะ*Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส

time (h)	reducing sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	*S. cerevisiae* SKP-01 (g/l)	pH	μ (h^{-1})	Yx/s (g_X/g_S)	ethanol (g/l)	Yp/s (g_P/g_S)	Qp (g_p/l.h)	fermentation efficiency (%)
o	0	0	0	5.12	0	0	0	0	0	0
50	15.10	3.05	8.11	4.58	0	0	0.63	0	0	0
56	0.07	2.87	8.26	4.47	0.0030	0.010	6.97	0.42	0.12	82.35
62	0.07	2.65	8.30	3.86	0.0019	0.011	5.75	0.38	0.09	74.51
68	0.06	2.54	8.84	3.66	0.0044	0.023	4.52	0.34	0.07	66.67
74	0.06	2.43	8.99	3.55	0.0045	0.032	2.57	0.29	0.04	56.86
80	0.06	2.33	8.77	3.51	0.0034	0.034	2.37	0.25	0.03	49.02
86	0.02	2.27	8.54	3.48	0.0021	0.033	2.03	0.22	0.02	43.14
92	0.02	2.20	8.43	3.41	0.0012	0.031	1.49	0.20	0.02	39.22
98	0.01	1.98	8.33	3.42	0.0006	0.029	1.49	0.18	0.02	35.29

ตารางที่ 4.13 ค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส (ก) หรือน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส (ข)

	ethanol (g/l)	μ (h^{-1})	Yx/s (g_X/g_S)	Yp/s (g_P/g_S)	Qp (g_p/l.h)	fermentation efficiency (%)
ก)	6.03	0.005	0.04	0.40	0.10	78.43
ข)	6.97	0.005	0.03	0.42	0.12	82.35

จากตารางที่ 4.13 อัตราการเจริญจำเพาะ และค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ที่ได้จากการผลิตเอทานอลทั้งสองวิธีมีค่าใกล้เคียงกัน สำหรับค่าผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรท อัตราการผลิตเอทานอล และประสิทธิภาพในการหมักเอทานอลที่ได้จากการเพาะกล้าเชื้อยีสต์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส มีค่าต่ำกว่าการเพาะกล้าเชื้อยีสต์ลงในน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส

ตารางที่ 4.14 การย่อยแป้งโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 และเอนไซม์ทางการค้า

	starch (g/l)	reducing sugar (g/l)	time (h)	conditions	Qp (g_p/l.h)
B. amyloliquefaciens IFO14141	15	7	4	37 °C , pH 7.0	1.75
B. amyloliquefaciens IFO14141 และ glucoamylase	15	14	52	37 °C , pH 7.0 (4 h) และ 60°C , pH 4.5 (48 h)	0.27
alpha-amylase และ glucoamylase	15	15	50	70°C , pH 6.0 (2 h) และ 60°C , pH 4.5 (48 h)	0.30

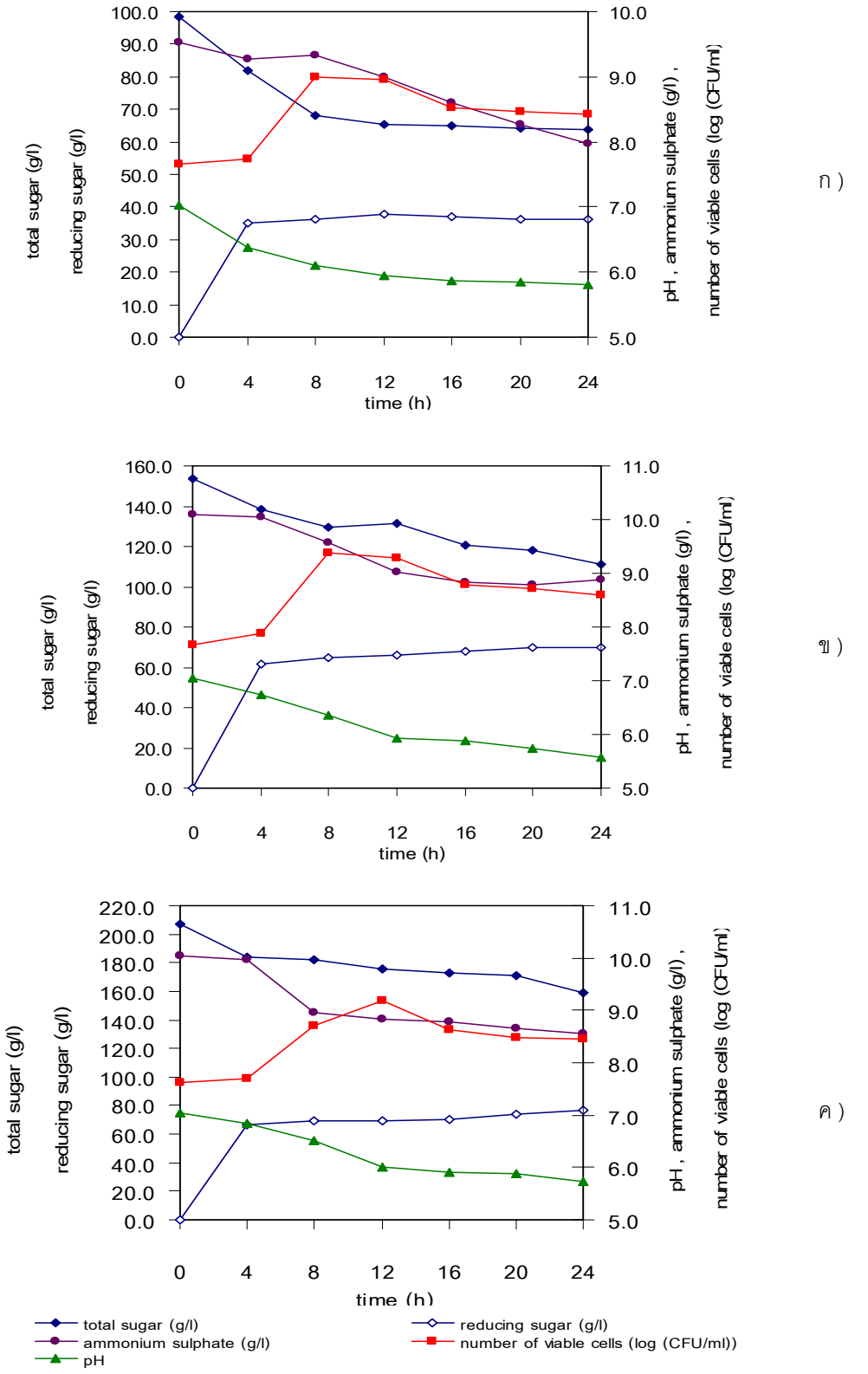
จากตารางที่ 4.14 พบว่าการใช้ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร พบว่าได้ปริมาณน้ำตาลสูงสุดประมาณ 7 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งนับว่าเป็นการย่อยแป้งได้น้ำตาลในระยะเวลาสั้น มีผลให้อัตราการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์มีค่าสูง ภาวะที่ใช้ในการย่อยแป้งไม่ซับซ้อน และสิ้นเปลืองพลังงานในการให้ความร้อนต่ำเมื่อเทียบกับการย่อยแป้งด้วยวิธีอื่นที่ศึกษา อย่างไรก็ตามแป้งอาจถูกย่อยได้ไม่สมบูรณ์ด้วยแบคทีเรียดังกล่าว แต่หากมีการใช้กลูโคอะมิเลสร่วมด้วยจะมีผลให้ได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น โดยได้น้ำตาลรีดิวซ์สูงสุดเท่ากับ 14 กรัมต่อลิตร แต่อัตราการผลิตน้ำตาลรีดิวซ์จะมีค่าลดลง เนื่องจากในขั้นตอนการย่อยแป้งต่อด้วยเอนไซม์กลูโคอะมิเลสใช้เวลานาน และเมื่อพิจารณาการย่อยแป้งโดยใช้เอนไซม์ทางการค้าสองชนิด พบว่าวิธีดังกล่าวให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูงกว่าการย่อยแป้งด้วยวิธีอื่น แต่ใช้ภาวะในการย่อยแป้งที่ซับซ้อนมากกว่า และสิ้นเปลืองพลังงานมากกว่าวิธีอื่น รวมถึงใช้เวลาค่อนข้างนาน

4.5 การผลิตเอทานอลจากการใช้จุลินทรีย์ผสม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

4.5.1 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร

งานวิจัยขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาความสามารถในการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลัง เนื่องจากผลการศึกษาในข้อ 4.4 ทำให้ทราบว่า สามารถเพิ่มผลผลิตเอทานอลได้หากเพิ่มปริมาณน้ำตาลซึ่งได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลัง โดยเริ่มจาก ถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการย่อยแป้ง MSM ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน บรรจุในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาเป็นดังนี้

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.23 พบว่าการเลี้ยงเชื้อในทุกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังที่ศึกษา การเจริญของจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเท่ากับ 100 และ 150 กรัมต่อลิตร ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.99 และ 9.37 (log (CFU/ml)) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 1.98 และ 2.06 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ หากเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 9.19 (log (CFU/ml)) คิดเป็นน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.02 กรัมต่อลิตร ซึ่งภายหลังจากชั่วโมงดังกล่าวจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเริ่มลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ถูกผลิตเพิ่มขึ้น อย่างรวดเร็วภายใน 4 ชั่วโมงแรกของการเพาะเชื้อ โดยได้เท่ากับ 34.99 61.85 และ 66.29 กรัมต่อลิตร พบว่าจุลินทรีย์มีการใช้น้ำตาลจากการย่อยแป้ง และใช้แอมโมเนียมซัลเฟต โดยน้ำตาลรวมลดลงเหลือเท่ากับ 63.70 111.0 และ 159.01 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงเหลือเท่ากับ 7.98 8.88 และ 8.54 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ค่า pH ของน้ำหมักลดลงเหลือเท่ากับ 5.81 5.58 และ 5.74 ตามลำดับ ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ (ตารางที่ ค.22 ถึง ค.24 ในภาคผนวก ค)

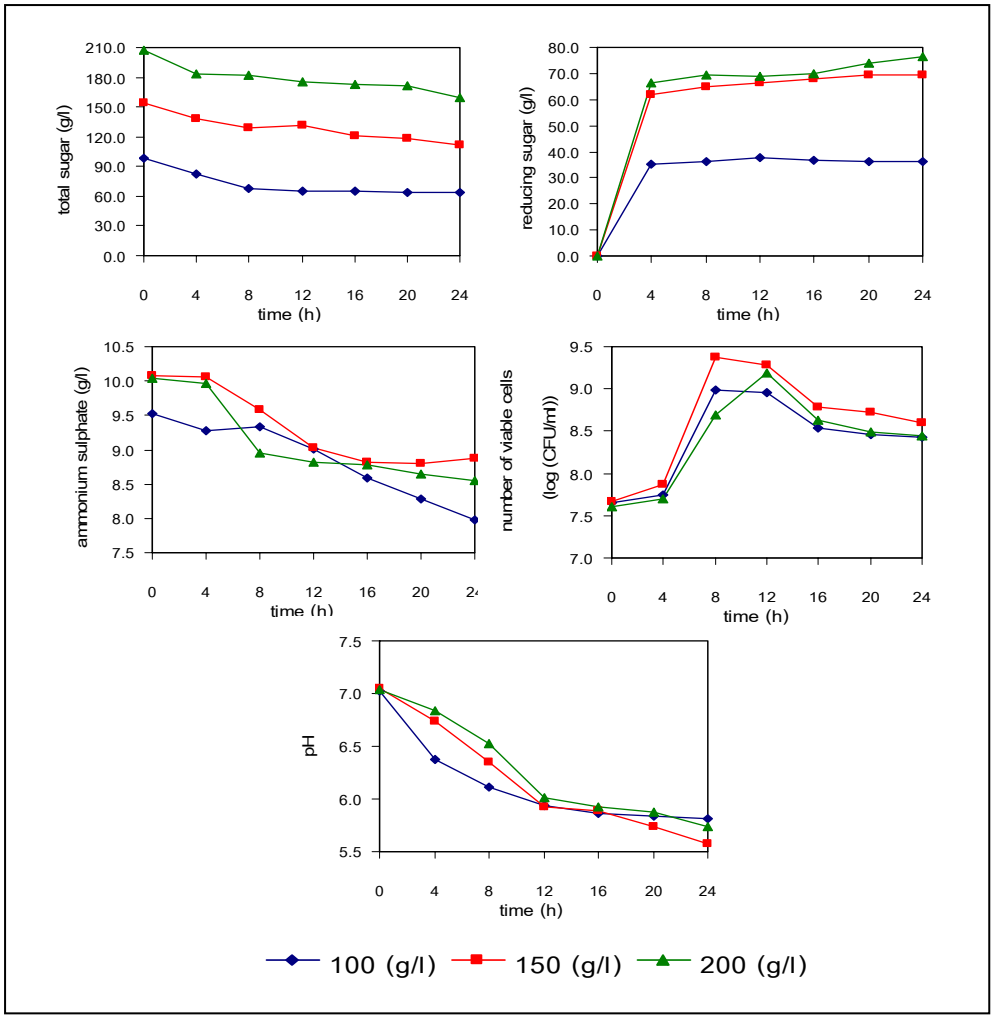


ก)

ข)

ค)

รูปที่ 4.23 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 (ก) 150 (ข) และ 200 (ค) กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน



รูปที่ 4.24 เปรียบเทียบผลของความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร ที่มีต่อการเจริญ และย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus amyloliquefaciens*

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.24 สรุปได้ว่าการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร การเจริญของจุลินทรีย์มีการเพิ่มตามเวลาการเลี้ยงเชื้อโดยได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 8 8 และ 12 ตามลำดับ โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร มีจำนวนสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นอื่นในทุกช่วงเวลา ปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ไปทั้งหมด (พิจารณาจากค่าน้ำตาลรวม) มีค่าเท่ากับ 34.83 42.85 และ 48.32 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตทั้งหมดที่ถูกใช้มีค่าเท่ากับ 1.54 1.21 และ 1.50 กรัมต่อลิตร การเปลี่ยนแปลงของค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีแนวโน้มใกล้เคียงกัน

ในชั่วโมงที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ พบว่าปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร เพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วโดยมีค่าเท่ากับ 34.99 61.85

และ 66.29 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ไปทั้งหมดจนถึงชั่วโมงดังกล่าว มีค่าเท่ากับ 16.53 15.49 และ 23.54 กรัมต่อลิตร

ตารางที่ 4.15 ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท เมื่อเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร

starch (g/l)	Yx/s (g_x/g_s) **สูงสุด**	Yx/s (g_x/g_s) **ที่เวลา 24 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ**
100	0.0098 (ชั่วโมงที่ 12)	0.0072
150	0.0159 (ชั่วโมงที่ 12)	0.0056
200	0.0093 (ชั่วโมงที่ 12)	0.0050

ดังแสดงในตารางที่ 4.15 เมื่อคำนวณค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นแป้งมันสำปะหลังเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร พบว่าค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ให้ค่ามากที่สุด (วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค รูปที่ ค.13)

จากข้อมูลดังกล่าว งานวิจัยนี้จึงเลือกแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เพื่อใช้ในงานวิจัยขั้นต่อไป เนื่องจากที่เวลา 12 ชั่วโมงภายหลังการเพาะกล้าเชื้อให้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุดเมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นอื่นที่ศึกษา และในชั่วโมงที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังมีค่าสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 100 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณที่ได้ใกล้เคียงกับการใช้แป้งความเข้มข้น 200 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณแป้งมันสำปะหลังที่ถูกใช้ไปมีค่าต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นอื่นที่ศึกษา

4.5.2 การผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร

4.5.2.1 การเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

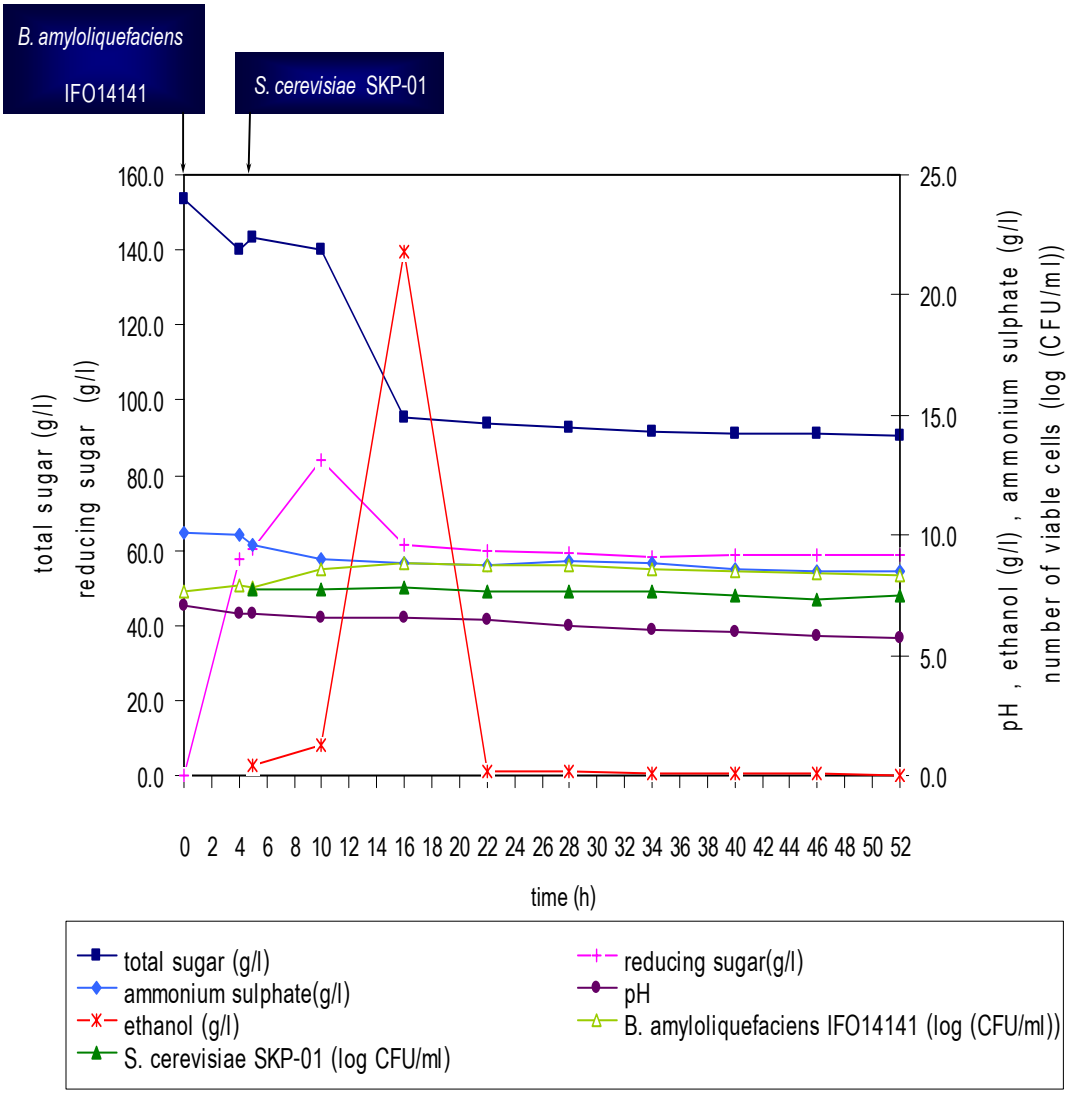
ในปี 2004 González และคณะรายงานว่า ผลการทดลองที่ดีที่สุดในการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Endomycopsis fibuligera* และ *Zymomonas mobilis* ในการเปลี่ยนแป้งมันสำปะหลังที่ไม่ถูกย่อย (unhydrolysed cassava starch) ในความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เป็นเอทานอล พบว่าที่เวลา 96 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อผสมได้เอทานอลเท่ากับ 31.4 กรัมต่อลิตร คิดเป็นค่าผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรท และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.21 กรัมเอทานอลต่อกรัมแป้ง และ 0.33 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ

Dostálek และ Häggström (1983) ได้ศึกษาการผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Saccharomycopsis fibuligera* และ *Zymomonas mobilis* พบว่า ในการใช้แป้งที่ละลายน้ำ (soluble starch) ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 30 กรัมต่อลิตร สามารถให้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 9.7 กรัมต่อลิตร ความสัมพันธ์ของจุลินทรีย์ทั้งสองเป็นแบบพึ่งพาอาศัยกัน (commensalism) แต่ก็มีการแข่งขันกันใช้น้ำตาลกลูโคสด้วยเช่นกัน ซึ่งข้อดีของการใช้เชื้อผสมคือ น้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Saccharomycopsis fibuligera* ส่วนใหญ่ถูกใช้เพื่อผลิตเอทานอลโดย *Zymomonas mobilis* อย่างรวดเร็ว ทำให้ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งปริมาณน้ำตาลกลูโคสดังกล่าวส่งผลให้ไม่เกิดการยับยั้งการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้ง ดังนั้นน้ำตาลรีดิวซ์ที่ไม่ใช่กลูโคสจึงถูกย่อยเป็นกลูโคสเรื่อย ๆ แต่อย่างไรก็ตาม การเลี้ยง *Saccharomycopsis fibuliger*a ในภาวะที่ใช้ในการผลิตเอทานอลของ *Zymomonas mobilis* อาจทำให้ปริมาณเอทานอลที่ได้ไม่สูงมากนัก เพราะภาวะที่ไม่เหมาะสมดังกล่าวมีผลให้อัตราการผลิตน้ำตาลกลูโคสจากย่อยแป้งของ *Saccharomycopsis fibuliger*a ไม่สูงเพียงพอเมื่อเทียบกับอัตราการใช้น้ำตาลกลูโคสเพื่อผลิตเอทานอล

งานวิจัยในขั้นตอนนี้เป็นการผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 โดยเริ่มจากถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน บรรจุในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ด้วยอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อที่ได้ลงในน้ำหมักที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่เตรียมไว้ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 (ปริษฎางค์ วงศ์

ปราชญ์, 2547) เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.25 และตารางที่ 4.16



รูปที่ 4.25 การผลิตเอทานอลโดยใช้เชื้อผสม เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.25 และตารางที่ 4.16 พบว่าในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างรวดเร็ว น้ำตาลรวมลดลงเหลือเท่ากับ 140.29 กรัมต่อลิตร น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัดเจนจาก 0.05 กรัมต่อลิตร เป็น 57.57 กรัมต่อลิตร ส่วนปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตค่อนข้างคงที่ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเล็กน้อย

เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงไปพบว่าจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 และแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เพิ่มมากขึ้นเล็กน้อย โดยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ทั้งสองมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 16 ของการ

เลี้ยงเชื้อ และหลังจากนั้นจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ทั้งสองเริ่มลดจำนวนลงอย่างช้า ๆ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์มีการเพิ่มอย่างชัดเจนในช่วงชั่วโมงที่ 4 ถึง10 ของการเลี้ยงเชื้อผสม โดยสูงสุดในชั่วโมงที่ 10 (83.85 กรัมต่อลิตร) ซึ่งหลังจากนั้นในช่วงชั่วโมงที่ 10 ถึง16 ได้ถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลอย่างรวดเร็วสอดคล้องกับปริมาณน้ำตาลรวมและน้ำตาลรีดิวซ์ที่ลดลง ปริมาณเอทานอลสูงสุดในชั่วโมงที่ 16 ของการเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 21.78 กรัมต่อ (2.75 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)) คิดเป็นผลได้ต่อผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทเท่ากับ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 88.24 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.36 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งภายหลังจากนั้นปริมาณน้ำตาลรวมและน้ำตาลรีดิวส์มีแนวโน้มคงที่ ปริมาณเอทานอลลดลงตามลำดับจนมีค่าเท่ากับ 0.01 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 52 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงตามเวลาการเลี้ยงเชื้อโดยเหลือเท่ากับ 8.53 กรัมต่อลิตร ส่วนค่า pH ลดลงตามเวลาเช่นกัน จากเริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 7.05 ลดลงเป็น 5.72 เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ

จากผลการทดลองนี้ทำให้ทราบว่าการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ไม่ส่งผลลบต่อกัน และเชื้อแต่ละชนิดสามารถมีชีวิตอยู่ได้ โดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ลดลงตามเวลา ส่วนยีสต์เจริญเพิ่มขึ้น แล้วเริ่มคงที่ จากนั้นลดลงเล็กน้อยตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ ส่วนการที่ปริมาณเอทานอลลดลงภายหลังจากชั่วโมงที่ 16 ของการเลี้ยงเชื้อนั้น อาจเกิดจากการเลี้ยงจุลินทรีย์ในระดับขวดเขย่าทำให้ไม่สามารถปรับภาวะที่ใช้ในการเจริญ เช่น อุณหภูมิ การให้อากาศ และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ซึ่งภาวะที่เกิดขึ้นดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ทำให้การเจริญของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ลดลง ส่งผลให้ความสามารถในการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลลดลงเช่นกัน และถึงแม้ว่าภายหลังจากชั่วโมงที่ 16 ของการเลี้ยงเชื้อ ยังคงมีน้ำตาลรีดิวซ์อยู่ในปริมาณหนึ่ง (58.13 ถึง 59.92 กรัมต่อลิตร) แต่น้ำตาลรีดิวซ์ที่เหลือดังกล่าวอาจมิได้อยู่ในรูปที่ยีสต์สามารถนำไปใช้เพื่อการผลิตเอทานอลได้ สังเกตได้จากปริมาณเอทานอลที่ได้ไม่เพิ่มขึ้น โดยมีบางรายงานการวิจัยที่พบว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* ได้แก่ กลูโคส มอลโทส มอลโทไตรโอส มอลโทเฮกโซส โอลิโกแซคคาไรด์ และเดกซ์ทริน (Forgaty และ Kelly, 1979 และ Chaplin, 2004) ดังนั้นจึงอาจเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดอาจไม่สามารถใช้ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยแป้งอื่น ๆ ที่ไม่ใช่กลูโคส หรือ น้ำตาลโมเลกุลเล็กเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญ จากงานวิจัยของ Abatte และคณะ (1999) ที่รายงานว่าผลผลิตเอทานอลที่ได้จากการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Bacillus amyloliquefaciens* และ *Zymomonas mobilis* เมื่อใช้แป้งที่ละลายน้ำความเข้มข้นเท่ากับ 40 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 0.8 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 8 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อผสม ซึ่งภายหลังจากชั่วโมงดังกล่าวปริมาณเอทานอลลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้เนื่องจากในระยะการเจริญแบบคงที่ (stationary phase) ของ *Bacillus amyloliquefaciens* มีการผลิตโปรติเอสปริมาณสูง ทำให้แอลฟาอะมิเลสที่ผลิตได้ถูกย่อย น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* จึงไม่เพิ่มขึ้น จุลินทรีย์ทั้งสองชนิดจึงใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการเจริญเติบโต ดังนั้นในผลงานวิจัยนี้อาจเป็นไปได้ในลักษณะที่มีรายงานไว้ในงานวิจัยดังกล่าว

ตาราง 4.16 การผลิตเอทานอล และพารามิเตอร์ โดยเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

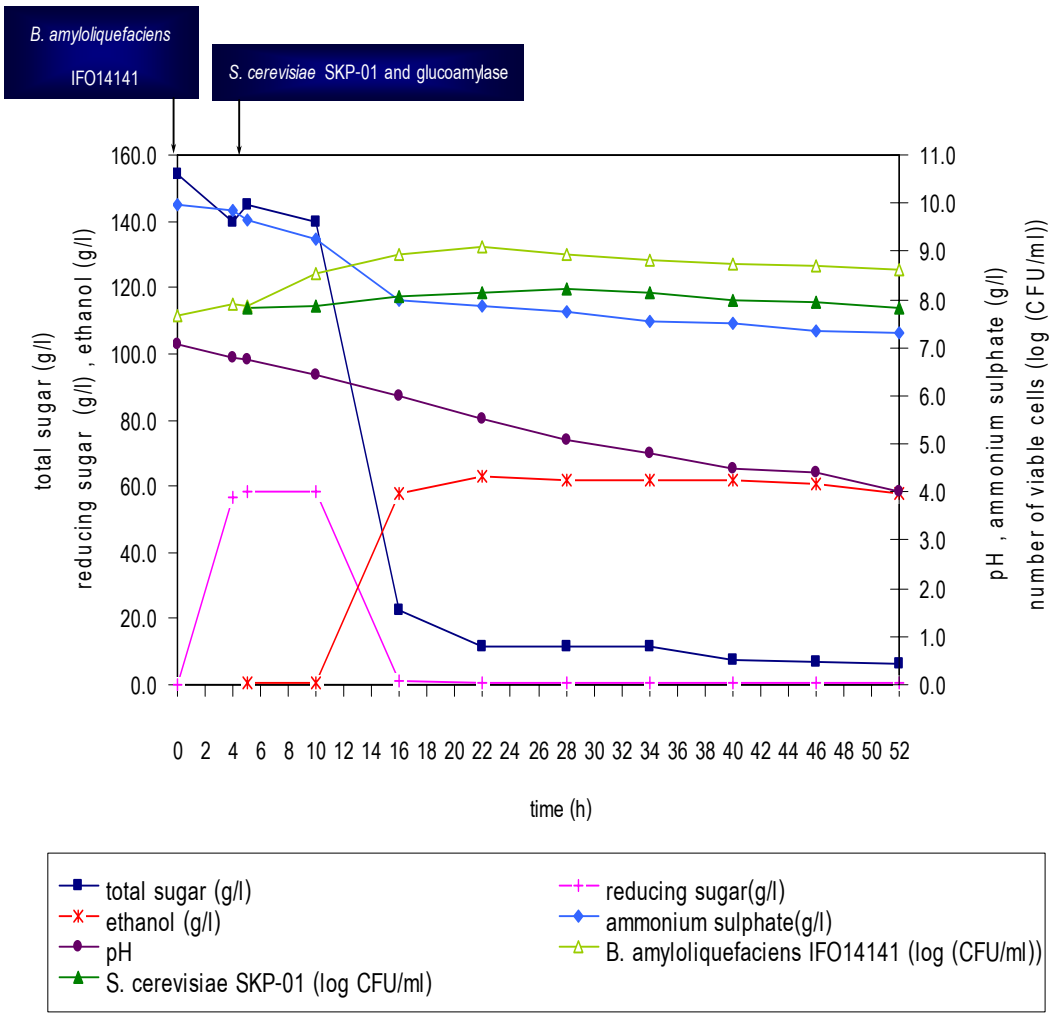
time(h)	total sugar (g/l)	reducing sugar(g/l)	ammonium sulphate(g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))		pH	ethanol (g/l)	Yp/s (g_P/g_S)	Qp (g_P/l.h)	fermentation efficiency (%)
				B. amyloliquefaciens IFO14141	*S. cerevisiae* SKP-01					
0	153.50	0.05	10.09	7.67	0	7.05	0	0	0	0
4 (ก่อนเติมหัวเชื้อยีสต์)	140.29	57.57	10.05	7.88	0	6.74	0	0	0	0
4 (หลังเติมหัวเชื้อยีสต์)	143.52	60.11	9.57	7.86	7.72	6.70	0.39	0	0	0
10	139.87	83.85	9.02	8.54	7.72	6.58	1.27	0.24	0.13	47.06
16	95.13	61.33	8.83	**8.81**	**7.81**	6.55	**21.78**	**0.45**	**1.36**	**88.24**
22	93.62	59.92	8.79	8.79	7.68	6.47	0.15	0.21	0.01	41.18
28	92.79	59.21	8.88	8.72	7.66	6.21	0.13	0.13	0	25.49
34	91.69	58.13	8.81	8.60	7.67	6.05	0.09	0.08	0	15.69
40	91.28	58.79	8.56	8.49	7.52	5.94	0.07	0.06	0	11.76
46	90.86	58.60	8.54	8.38	7.36	5.81	0.06	0.04	0	7.84
52	90.72	58.55	8.53	8.30	7.46	5.72	0.01	0.03	0	5.88

4.5.2.2 การเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

ในการผลิตเอทานอลจากแป้งนั้น เพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลที่สูงขึ้น ทำให้มีบางรายงานการวิจัยได้ทำการเติม amylolytic enzyme ช่วยในการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล เช่น การหมักแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 225 กรัมต่อลิตร โดยการใช้เชื้อผสมระหว่าง *Endomycopsis fibuligera* กับ *Zymomonas mobilis* พบว่าวันที่ 4 ของการหมัก ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) คิดเป็นประสิทธิภาพการผลิตเอทานอลเท่ากับ 88 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าที่ได้ทางทฤษฎี ซึ่งปริมาณเอทานอลที่ได้นี้มากกว่าการใช้เชื้อผสมชนิดอื่น หรือการใช้เชื้อเดี่ยว เมื่อมีการเติมกลูโคอะมิเลสลงในเชื้อผสม พบว่าผลผลิตเอทานอลเพิ่มขึ้นโดยได้ผลผลิตเอทานอลเท่ากับ 13.2 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) คิดเป็นประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 98 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าที่ได้ทางทฤษฎี (Reddy และ Basappa, 1998)

งานวิจัยขั้นตอนนี้เป็นการผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อผสม โดยเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 โดยเริ่มจากถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน บรรจุในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นเวลาที่ให้ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์สูง

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ด้วยอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อที่ได้ลงในน้ำหมักที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่เตรียมไว้พร้อมกับสารละลายกลูโคอะมิเลส (ปริมาตร 0.03 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรอง (membrane filter) ขนาดรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร เลี้ยงเชื้อผสมบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.26 และตารางที่ 4.17



รูปที่ 4.26 การผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อผสม โดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.26 และตารางที่ 4.17 พบว่า ในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 การเจริญเติบโตของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ปริมาณน้ำตาล ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาในข้อ 4.5.2.1

เมื่อทำการเติม *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับกลูโคอะมิเลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าทั้งแบคทีเรีย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 และยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 มีการเจริญเพิ่มขึ้น โดยแบคทีเรียมีจำนวนเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 22 และยีสต์มีจำนวนเซลล์สูงสุดในชั่วโมงที่ 28 (ชั่วโมงที่ 24 ภายหลังจากการเพาะกล้าเชื้อยีสต์) ภายหลังจากนั้นจุลินทรีย์ทั้งสองเริ่มลดจำนวนลงอย่างช้า ๆ จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรวมและน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงอย่างชัดเจนในชั่วโมงที่ 16 ซึ่งได้ปริมาณเอทานอลที่เพิ่มสูงขึ้น โดยภายหลังจากเวลาดังกล่าวจนถึงสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเอทานอลเริ่มคงที่ โดยอยู่ในช่วงประมาณ 57 ถึง 63 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทเท่ากับ 0.46 ถึง 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม การผลิตเอทานอลด้วยวิธีนี้ให้อัตราการผลิต

สูงสุดเท่ากับ 3.62 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง และได้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 94.12 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าที่ได้ทางทฤษฎี ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต ลดลงตามเวลาการเลี้ยงเชื้อโดยเหลือเท่ากับ 7.30 กรัมต่อลิตร ส่วนค่า pH ลดลงตามเวลาเช่นกัน จากเริ่มต้นการเลี้ยงเชื้อมีค่าเท่ากับ 7.05 ลดลงเป็น 4.02 เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อ

จากผลการศึกษาการเติมกลูโคอะมิเลสมีผลให้รูปแบบการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด และปริมาณน้ำตาลแตกต่างจากการไม่เติมเอนไซม์ เนื่องจากกลูโคอะมิเลสมีส่วนช่วยให้แป้งถูกเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลในรูปที่จุลินทรีย์ทั้งสองสามารถใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ ซึ่งน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยกลูโคอะมิเลสส่วนใหญ่อยู่ในรูปของน้ำตาลกลูโคส (Tatsumi และKatano, 2005) ทุกช่วงเวลาภายหลังจากการเติมกลูโคอะมิเลส จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ทั้งสองมีจำนวนมากกว่าการไม่เติมกลูโคอะมิเลส (จากข้อ 4.5.2.1) นอกจากนี้ปริมาณน้ำตาลรวม และน้ำตาลรีดิวซ์มีการลดลง และถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลมากขึ้น โดยเหลือเท่ากับ 6.61 และ 0.68 กรัมต่อลิตร ที่ชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อตามลำดับ

ตารางที่ 4.17 การผลิตเอทานอล และค่าพารามิเตอร์ โดยเพาะเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

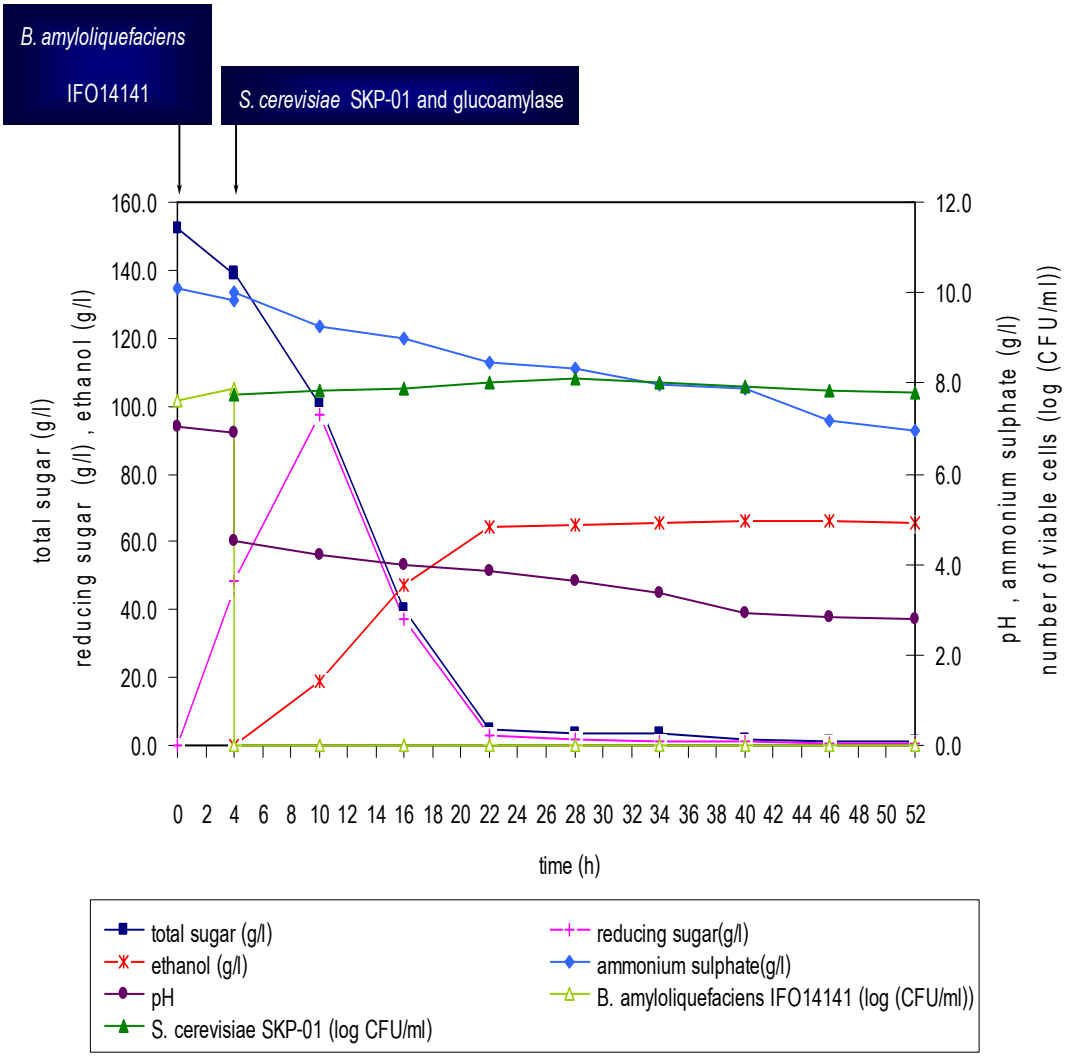
time(h)	total sugar (g/l)	reducing sugar(g/l)	ammonium sulphate(g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))		pH	ethanol (g/l)	Yp/s (g_P/g_S)	Qp (g_P/l.h)	fermentation efficiency (%)
				B. amyloliquefaciens IFO14141	*S. cerevisiae* SKP-01					
0	154.05	0.01	9.98	7.66	0	7.05	0	0	0	0
4 (ก่อนเติมหัวเชื้อยีสต์)	140.01	56.34	9.86	7.89	0	6.81	0	0	0	0
4 (หลังเติมหัวเชื้อยีสต์)	144.97	58.13	9.64	7.85	7.83	6.75	0.36	0.00	0	0
10	139.87	58.29	9.23	8.53	7.85	6.42	0.69	0.06	0.07	11.76
16	22.58	1.13	7.99	8.92	8.06	6.01	57.85	**0.48**	**3.62**	**94.12**
22	11.84	0.85	7.85	**9.09**	8.15	5.52	**63.24**	0.48	2.87	94.12
28	11.43	0.75	7.76	8.93	**8.21**	5.09	61.70	0.47	2.20	92.16
34	11.36	0.70	7.55	8.83	8.16	4.82	61.71	0.47	1.82	92.16
40	7.43	0.67	7.52	8.72	7.97	4.5	61.76	0.47	1.54	92.16
46	6.88	0.69	7.36	8.71	7.94	4.42	60.47	0.46	1.31	90.20
52	6.61	0.68	7.30	8.62	7.84	4.02	57.79	0.46	1.11	90.20

4.5.2.3 การเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

จากการศึกษาขั้นตอนที่กล่าวมา มีจุลินทรีย์ 2 ชนิดเจริญอยู่ด้วยกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นเพื่อให้ได้ปริมาณเอทานอลที่สูงขึ้น งานวิจัยในขั้นตอนนี้จึงศึกษาการลดการใช้น้ำตาลโดย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO 14141 ในช่วงที่มีการเติมกลูโคอะมิเลส ทั้งนี้มีบางรายงานการวิจัยได้รายงานไว้ว่าน้ำตาลที่ใช้เพื่อผลิตเอทานอลลดน้อยลง เนื่องจากต้องถูกนำไปใช้เพื่อการเจริญของจุลินทรีย์ (Reddy และ Basappa, 1996)

งานวิจัยในขั้นตอนนี้เป็นการผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อผสม โดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยเริ่มจากถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน บรรจุในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 4.5 แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ด้วยอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อที่ได้ลงในน้ำหมักที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่เตรียมไว้ พร้อมกับสารละลายกลูโคอะมิเลส (ปริมาตร 0.03 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรองขนาดรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร เลี้ยงเชื้อผสมบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.27 และตารางที่ 4.18



รูปที่ 4.27 การผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.27 และตารางที่ 4.18 พบว่าในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO 14141 การเจริญเติบโตของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO 14141 ปริมาณน้ำตาล ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาในข้อ 4.5.2.1 และ 4.5.2.2

เมื่อทำการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วพบว่า *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 28 (ชั่วโมงที่ 24 ภายหลังจากการเติมหัวเชื้อยีสต์) หลังจากนั้นจำนวนยีสต์ที่มีชีวิตเริ่มลงตามลำดับ ปริมาณน้ำตาลรวม และน้ำตาลรีดิวซ์ ลดลงภายหลังจากการเพาะกล้าเชื้อยีสต์ ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เพิ่มสูงขึ้น โดยปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 16 มีค่าเท่ากับ

47.46 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นปริมาณเอทานอลเพิ่มขึ้นโดยมีค่าประมาณ 64 ถึง 66 กรัมต่อลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 22 จนถึงสิ้นสุดการเลี้ยงเชื้อที่ 52 ชั่วโมง คิดเป็นผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทประมาณ 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม การผลิตเอทานอลด้วยวิธีนี้ให้อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 2.97 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 94.25 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตลดลงตามลำดับตลอดการเลี้ยงเชื้อ โดยในชั่วโมงสุดท้ายของการผลิตเอทานอลเหลือเท่ากับ 6.96 กรัมต่อลิตร ส่วนค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มลดลงตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ ภายหลังจากปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 4.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 และต่อกิจกรรมการย่อยแป้งด้วยกลูโคสอะมิเลส โดยในชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเอทานอล ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเหลือเท่ากับ 2.78

การผลิตเอทานอลด้วยวิธีนี้ปริมาณเอทานอลเริ่มสูงขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่การไม่ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (ดังข้อ 4.5.2.2) ปริมาณเอทานอลเริ่มสูงขึ้นในชั่วโมงที่ 16 ของการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งผลผลิตเอทานอลที่ได้จากวิธีนี้เร็วกว่านั้นอาจเนื่องจาก การปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลของยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 และต่อการทำงานของกลูโคอะมิเลส แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาชั่วโมงที่ 22 ถึงชั่วโมงที่ 52 ของการผลิตเอทานอลด้วยวิธีทั้งสอง ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้เริ่มคงที่ โดยเมื่อเปรียบเทียบการผลิตเอทานอลด้วยวิธีนี้กับวิธีที่ศึกษาดังข้อ 4.5.2.2 พบว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ในชั่วโมงที่ 22 เท่ากับ 64.62 และ 63.24 กรัมต่อลิตร ค่าผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทมีค่าเท่ากับ 0.48 และ 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 94.25 และ 94.12 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี และอัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 2.94 และ 2.87 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่า การมีชีวิตของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO 14141 ซึ่งคาดว่าจะมีการนำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้นั้น ไม่ส่งผลต่อการหมักเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01

ดังนั้นเพื่อเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอลจากการเติมกลูโคอะมิเลส ในงานวิจัยขั้นต่อไปจึงทำการย่อยแป้งให้ได้น้ำตาลปริมาณสูงขึ้นด้วยการใช้แอลฟาอะมิเลสจาก *Bacillus amyloliquefaciens* IFO 14141 และกลูโคอะมิเลสในภาวะที่เหมาะสมก่อน แล้วจึงเติมหัวเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01

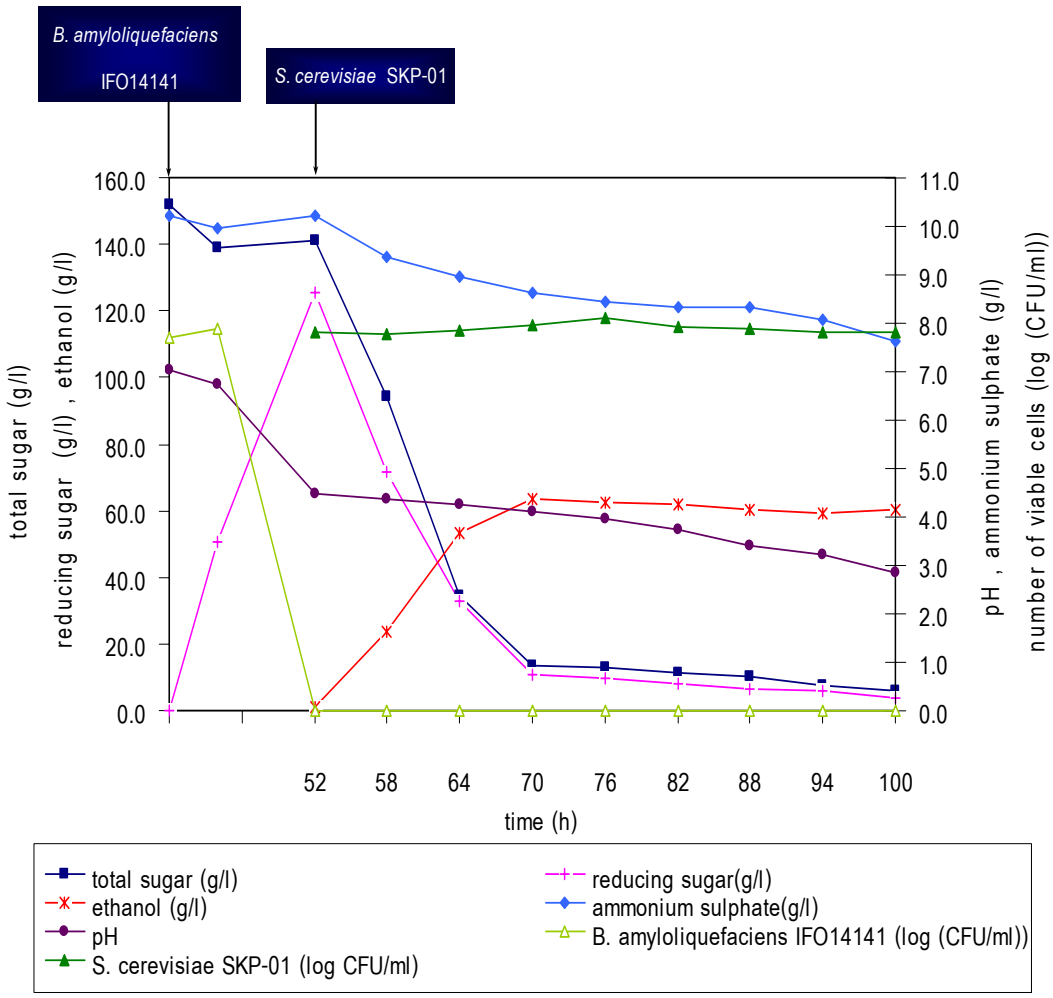
ตารางที่ 4.18 การผลิตเอทานอล และพารามิเตอร์ โดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

time(h)	total sugar (g/l)	reducing sugar(g/l)	ammonium sulphate(g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))		pH	ethanol (g/l)	Yp/s (g_P/g_S)	Qp (g_P/l.h)	fermentation efficiency (%)
				B. amyloliquefaciens IFO14141	*S. cerevisiae* SKP-01					
0	152.19	0.05	10.08	7.63	0	7.02	0	0	0	0
4 (ก่อนเติมหัวเชื้อยีสต์)	138.91	46.17	9.83	7.89	0	6.90	0	0	0	0
4 (หลังเติมหัวเชื้อยีสต์)	139.05	48.52	10.02	0	7.73	4.51	0.10	0	0	0
10	100.50	97.42	9.26	0	7.85	4.21	18.63	**0.48**	1.86	**94.25**
16	40.20	37.26	8.99	0	7.89	3.98	47.46	0.48	**2.97**	94.25
22	4.72	2.66	8.46	0	8.01	3.85	64.62	0.48	2.94	94.25
28	3.58	1.53	8.33	0	**8.11**	3.65	65.18	0.48	2.33	94.25
34	3.27	1.22	7.96	0	8.03	3.35	65.25	0.48	1.92	94.25
40	1.61	0.90	7.89	0	7.92	2.94	65.95	0.48	1.65	94.25
46	1.10	0.85	7.18	0	7.82	2.84	**66.19**	0.48	1.44	94.25
52	0.98	0.76	6.96	0	7.79	2.78	65.28	0.48	1.26	94.25

4.5.2.4 การเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส

ในการเพิ่มอัตราการผลิตเอทานอลโดยการเติมกลูโคอะมิเลสเพื่อเพิ่มการย่อยแป้ง งานวิจัยในขั้นตอนนี้เป็นการผลิตเอทานอลจากการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส โดยเริ่มจากถ่ายกล้าเชื้อ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่มีอายุ 7 ชั่วโมง ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน บรรจุในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 4.5 แล้วฆ่าเชื้อ *Bacillus* sp. ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็น แล้วเติมสารละลายกลูโคอะมิเลส (ปริมาตร 0.03 มิลลิลิตร) ที่ปลอดเชื้อโดยการกรองผ่านเยื่อกรอง ขนาดรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ด้วยอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีการเติมกลูโคสความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 50 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 บ่มเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ปั่นแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ถ่ายเซลล์กล้าเชื้อที่ได้ลงในน้ำหมักที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลสที่เตรียมไว้ เลี้ยงเชื้อบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 100 รอบต่อนาที ซึ่งเป็นภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงในรูปที่ 4.29 และตารางที่ 4.19



รูปที่ 4.29 การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และกลูโคอะมิเลส

ผลการศึกษาดังแสดงในรูปที่ 4.29 และตารางที่ 4.19 พบว่าในช่วง 4 ชั่วโมงแรกของการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO 14141 การเจริญเติบโตของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO 14141 ปริมาณน้ำตาล ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับผลการศึกษาในข้อ 4.5.2.1 4.5.2.2 และ 4.5.2.3

เมื่อเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตสูงสุดในชั่วโมงที่ 76 (ชั่วโมงที่ 24 ภายหลังจากการเติมหัวเชื้อยีสต์) เป็นชั่วโมงเดียวกับการผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อผสมด้วยวิธีในข้อที่ 4.5.2.2 และ 4.5.2.3 ซึ่งหลังจากชั่วโมงดังกล่าว จำนวนยีสต์ที่มีชีวิตเริ่มลงตามลำดับเวลาการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรวมและน้ำตาลรีดิวซ์ลดลงตามลำดับภายหลังจากการเพาะกล้าเชื้อยีสต์ และได้ปริมาณเอทานอลที่สูงขึ้น โดยปริมาณเอทานอลในชั่วโมงที่ 64 (ชั่วโมงที่ 12 ของการเติมหัวเชื้อยีสต์) มีค่าเท่ากับ 53.47 กรัมต่อลิตร และภายหลังจากชั่วโมงดังกล่าว ปริมาณเอทานอลเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการเลี้ยงเชื้อ โดยอยู่ในช่วงประมาณ 60 ถึง 64 กรัมต่อลิตร การผลิตเอทานอลด้วยวิธีนี้ให้ค่าผลได้

ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทสูงสุดเท่ากับ 0.49 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม อัตราการผลิตเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 0.91 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง และประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 96.08 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ส่วนปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตนั้น พบว่าลดลงตามเวลาการเลี้ยงเชื้อ โดยในชั่วโมงสุดท้ายของการผลิตเอทานอลเหลือเท่ากับ 7.64 กรัมต่อลิตร ส่วนค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อค่อย ๆ ลดลงภายหลังจากปรับค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เท่ากับ 4.5 ซึ่งเป็นค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลด้วย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 และต่อกิจกรรมการย่อยแป้งด้วยกลูโคสอะมิเลส โดยในชั่วโมงสุดท้ายของการหมักเอทานอล ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงโดยมีค่าเท่ากับ 2.86

ตารางที่ 4.19 การผลิตเอทานอลโดยการเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส

time(h)	total sugar (g/l)	reducing sugar(g/l)	ammonium sulphate(g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))		pH	ethanol (g/l)	Yp/s (g_P/g_S)	Qp (g_P/l.h)	fermentation efficiency (%)
				B. amyloliquefaciens IFO14141	*S. cerevisiae* SKP-01					
0	152.13	0.01	10.23	7.72	0	7.05	0	0	0	0
4 (ก่อนเติมหัวเชื้อยีสต์)	139.05	50.88	9.96	7.90	0	6.74	0	0	0	0
52 (หลังเติมหัวเชื้อยีสต์)	141.11	125.31	10.21	0	7.81	4.48	0.90	0	0	0
58	94.44	71.60	9.38	0	7.79	4.37	23.51	0.48	0.41	94.12
64	34.42	32.79	8.95	0	7.86	4.25	53.47	**0.49**	0.84	**96.08**
70	13.63	10.65	8.63	0	7.97	4.11	**63.79**	0.49	**0.91**	96.08
76	12.94	9.85	8.45	0	**8.10**	3.98	62.33	0.49	0.82	96.08
82	11.56	8.29	8.33	0	7.94	3.75	61.96	0.48	0.76	94.12
88	10.05	6.68	8.33	0	7.90	3.41	60.39	0.47	0.69	92.16
94	7.33	5.72	8.06	0	7.83	3.21	59.31	0.46	0.63	90.20
100	5.78	3.90	7.64	0	7.81	2.86	60.22	0.46	0.60	90.20

ตารางที่ 4.20 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลด้วยวิธีต่าง ๆ ในงานวิจัยนี้

วิธีผลิตเอทานอล	เวลาหลังเพาะกล้าเชื้อยีสต์ (h)	เวลาของการเลี้ยงเชื้อ (h)	ethanol (g/l)	ethanol (%(v/v))	Yp/s (g_P/g_S)	fermntation efficiency (%)	Qp (g_P/l.h)
ก)	12	16	**21.78**	**2.75**	**0.45**	**88.24**	**1.36**
	18	22	0.15	0.02	0.21	41.18	0.01
ข)	12	16	57.85	7.32	**0.48**	**94.12**	**3.62**
	18	22	**63.24**	**8.00**	0.48	94.12	2.87
ค)	6	10	18.63	2.36	**0.48**	**94.25**	1.86
	12	16	47.46	6.00	0.48	94.25	**2.97**
	18	22	64.62	8.17	0.48	94.25	2.94
	42	46	**66.19**	8.37	0.48	94.25	1.44
ง)	12	64	53.47	6.76	**0.49**	**96.08**	0.84
	18	70	**63.79**	**8.07**	0.49	96.08	**0.91**

หมายเหตุ ก) หมายถึง การผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 (ข้อ 4.5.2.1)

ข) หมายถึง การผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 (ข้อ 4.5.2.2)

ค) หมายถึง การผลิตเอทานนอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ข้อ 4.5.2.3)

ง) หมายถึง การผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และกลูโคอะมิเลส (ข้อ 4.5.2.4)

จากตารางที่ 4.20 สรุปได้ว่าสามารถผลิตเอทานอลได้ความเข้มข้นสูงที่สุดเท่ากับ 63.24 และ 63.79 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กระบวนการผลิตตามวิธีข้อ ข) และ ง) ตามลำดับ และสามารถเพิ่มเอทานอลได้เป็น 66.19 กรัมต่อลิตร เมื่อผลิตโดยกระบวนการตามวิธีข้อ ค) โดยเวลาที่ได้เอทานอลสูงสุดแตกต่างกันขึ้นอยู่กับวิธีการผลิต ซึ่งแตกต่างกันตั้งแต่ 16 ถึง 70 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทใกล้เคียงกัน โดยได้ประมาณ 0.45 ถึง 0.49 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ส่วนประสิทธิภาพการหมักพบว่าการผลิตโดยกระบวนการตามวิธีข้อ ข) ค) และ ง) ได้ผลใกล้เคียงกัน โดยได้เท่ากับ 94.12 ถึง 96.08 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี ได้พบว่าอัตราการผลิตเอทานอลแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยมีอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 3.62 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อผลิตโดยกระบวนการตามวิธีข้อ ข) และมีอัตราการผลิตเท่ากับ

2.97 1.36 และ 0.91 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อผลิตโดยกระบวนการตามวิธีข้อ ค) ก) และ ง) ตามลำดับ ดังนั้นสามารถกล่าวได้ว่าการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้จุลินทรีย์ผสมระหว่าง *B. amyloliquefaciens* IFO14141 และ *S. cerevisiae* SKP-01 สามารถเพิ่มผลผลิตเอทานอลได้หากมีการเติมกลูโคอะมิเลสลงไปเพื่อให้เกิดการย่อยแป้งที่สมบูรณ์มากขึ้น และการอยู่ร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดนี้ไม่ส่งผลลบต่อกัน โดยเชื้อแต่ละชนิดสามารถมีชีวิตอยู่ได้ดังเช่นการผลิตเอทานอลด้วยวิธี ก) และ ข) ปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้ในภายหลังจากการเพาะกล้าเชื้อยีสต์เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากวิธี ข) ค) และ ง) มีค่าใกล้เคียงกัน ข้อมูลดังกล่าวทำให้ทราบว่าการมีชีวิตของ *B. amyloliquefaciens* IFO14141 ซึ่งคาดว่าจะมีผลต่อการนำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้เพื่อการเจริญ และเป็นผลเสียต่อการเจริญและผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP-01 นั้น จากผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าไม่ส่งผลต่อการผลิตเอทานอลของ *S. cerevisiae* SKP-01

งานวิจัยนี้เป็นการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เชื้อผสมในระดับขวดเขย่า ซึ่งไม่สามารถปรับภาวะที่ใช้ในการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งสอง การย่อยแป้งของ *B. amyloliquefaciens* IFO14141 และการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP-01 ได้ แต่หากได้ผลิตเอทานอลในถังหมัก (fermentor) คาดว่าปริมาณเอทานอลที่ผลิตได้จะมากขึ้น เนื่องจากสามารถปรับภาวะต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ การให้อากาศ และการกวน ให้เหมาะสมในแต่ละช่วงเวลาของการผลิตเอทานอลได้ จากผลการวิจัยพบว่าน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร มีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วภายหลังจากการย่อยแป้งด้วย *B. amyloliquefaciens* IFO14141 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง โดยมีค่าเท่ากับ 66.29 กรัมต่อลิตร (น้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เป็นเวลา 4 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 61.85 กรัมต่อลิตร) คาดว่า *B. amyloliquefaciens* IFO14141 จะสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นมากกว่า 200 กรัมต่อลิตร ได้ถ้าเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ในภาวการณ์เลี้ยงเชื้อที่ควบคุมได้ ได้แก่การเลี้ยงเชื้อในถังหมัก แต่งานวิจัยได้เลือกแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ในการผลิตเอทานอล เนื่องจากเคยมีการศึกษาโดย ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์ (2547) ก่อนแล้วว่า *S. cerevisiae* SKP-01 สามารถผลิตเอทานอลจากน้ำตาลความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 165 กรัมต่อลิตร ได้มากกว่า 220 กรัมต่อลิตร เพราะที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 220 กรัมต่อลิตร มีผลให้ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวเจริญต่ำกว่าการใช้น้ำตาลความเข้มข้น 165 กรัมต่อลิตร ซึ่งสาเหตุอาจเกิดจากผลของแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ทำให้เซลล์เกิดพลาสโมไลซิส (plasmolysis) แต่การผลิตเอทานอลจากแป้งก็สามารถเพิ่มผลผลิตได้ หากใช้วิธีหมักเอทานอลแบบเฟด-แบตช์ (fed-batch culture) หรือหมักแบบต่อเนื่อง (continuous culture) เพราะการหมักด้วยสองวิธีดังกล่าวสามารถควบคุมความเข้มข้นของน้ำตาลให้เหมาะสมต่อการผลิตเอทานอลโดย *S. cerevisiae* SKP-01 โดยค่อย ๆ ป้อนน้ำหมักที่มีน้ำตาลจากการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *B. amyloliquefaciens* IFO14141 ลงในถังหมักที่มี *S. cerevisiae* SKP-01 หรือ *S. cerevisiae* SKP-01 กับกลูโคอะมิเลส โดยวิธีดังกล่าวสามารถลดค่าใช้จ่ายเรื่องเอนไซม์ที่ต้องใช้ในการย่อยแป้งชนิดแอลฟาอะมิเลสได้ เพราะเอนไซม์ที่ใช้ในการย่อยแป้งของ *B. amyloliquefaciens* IFO14141 สามารถเพิ่มมากขึ้นได้เองตลอดเท่าที่แบคทีเรียยังมีชีวิต แต่หากใช้เอนไซม์ทางการค้าในการย่อยแป้งจะมีข้อจำกัด เนื่องจากไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้เอง และไม่สามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้หากไม่ใช้วิธีการตรึงเอนไซม์ รวมถึงภาวะที่ใช้ในการย่อยแป้งโดย *B. amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อเทียบกับการใช้เอนไซม์ทางการค้า มีความซับซ้อน และเสียค่าใช้จ่ายในด้านพลังงานต่ำกว่า

ตารางที่ 4.21 เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่น

substrate	type of fermentation	microorganisms	ethanol (g/l)	Yp/s(g_p/g_s)	Qp (g/l.h)	references
cassava starch 150 g/l	flask , batch	*Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141, glucoamylase , *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01	63.24	0.48	2.82	**งานวิจัยนี้**
cane molasses 165 g/l	fermentor,fed-batch	*Saccharomyces cerevisiae* SKP-01	91.09	0.48	1.08	ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์ (2004)
sago starch 150 g/l	fermentor , batch	alpha-amylase , co-immobilized glucoamylase and *Zymomonas mobilis*	55.3	-	3.20	Bandaru และคณะ, 2006
cassava starch 150 g/l	- , batch	*Endomycopsis fiburigera* , *Zymomonas mobilis*	31.4	0.21	0.33	González และคณะ, 2004
Jerusalem artichocke 230 g/l	flask , batch	*Kluyveromyces fragilis* , *Zymomonas mobilis* , *Saccharomyces cerevisiae*	78.21	0.48	-	Szambelan และคณะ, 2004
corn starch 120 g/l	fermentor, batch	*Aspergillus awamori* , Immobilized *S. cerevisiae*	29.23	-	0.41	Farid และคณะ , 2002
cassava 200 g/l	- , batch	alpha-amylase , co-immobilized *Saccharomyces diastaticus* and *Zymomonas mobilis*	46.7	0.38	1.11	Amuta และ Gunasekaran , 2001

ตารางที่ 4.21 (ต่อ) เปรียบเทียบผลผลิตเอทานอลในงานวิจัยนี้กับงานวิจัยอื่น

substrate	type of fermentation	microorganisms	ethanol (g/l)	Yp/s(g_p/g_s)	Qp (g/l.h)	references
wheat starch 250 g/l	- , batch	crude culture filtrate from *Bacillus subtilis* VB2, *Saccharomyces cerevisiae* VSJ4	34.76	-	0.43	Suresh และคณะ , 1999
soluble starch 40 g/l	flash , batch	*Bacillus amyloliquefaciens* , *Zymomonas mobilis*	0.8	-	0.10	Abate และคณะ, 1999
sucrose 200 g/l	flask , batch	*Zymomonas mobilis* , *Saccharomyces cerevisiae*	96.6	0.5	1.5	Abate และคณะ, 1996
soluble starch 20 g/l	- , batch	co-immobilized *Aspergillus awamori* and *Zymomonas mobilis*	3.5	0.28	0.04	John และคณะ , 1996
soluble starch 40 g/l	- , batch	crude culture filtrate from *Talaromyces emersonii* , *Kluyveromyces marxianus*	12	-	0.75	Ward และคณะ , 1995
lactose 250 g/l	flask , batch	*Kluyveromyces fragilis* , *Zymomonas mobilis*	0.46	61.29	1.28	Kamini และคณะ, 1989

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

เนื่องจากแหล่งพลังงานที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบันได้มาจากเชื้อเพลิงปิโตรเลียม ได้แก่ น้ำมันเบนซิน และน้ำมันดีเซล ซึ่งกำลังมีแนวโน้มที่ลดลง และคาดว่าจะหมดไปในที่สุดในอนาคตอันใกล้นี้ ดังนั้นในหลายประเทศจึงพยายามหาพลังงานอื่นมาทดแทนในรูปแบบต่าง ๆ เช่น พลังงานลม พลังงานน้ำ พลังงานแสงอาทิตย์ และพลังงานชีวมวล จากเหตุการณ์ดังกล่าว ประเทศไทยก็ได้รับผลกระทบเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากประเทศไทยมีทรัพยากรธรรมชาติด้านพลังงานค่อนข้างจำกัด ซึ่งไม่เพียงพอต่อความต้องการใช้ภายในประเทศ ทำให้ประเทศไทยจำเป็นต้องนำเข้าพลังงานเชื้อเพลิงเป็นจำนวนมาก ส่งผลให้ต้องสูญเสียเงินตราไปต่างประเทศจำนวนไม่น้อยในแต่ละปี

พลังงานชีวมวล (biomass) หมายถึง พลังงานที่ได้จากสิ่งมีชีวิต ทั้งพืชและสัตว์ รวมถึงผลพลอยได้และของเสียที่ได้มากจากสิ่งมีชีวิต เช่น อ้อย แป้ง กากน้ำตาล แกลบ และมูลสัตว์ เป็นต้น จุดเด่นของพลังงานชีวมวล คือ สามารถผลิตขึ้นทดแทนได้ (renewable energy) (Wheals และคณะ, 1999) ทำให้ปัจจุบันนี้หลาย ๆ ประเทศได้ให้ความสำคัญ และส่งเสริมการใช้พลังงานทดแทนชนิดนี้อย่างจริงจัง โดยเฉพาะการผลิตเอทานอลจากผลผลิตทางการเกษตร (bioethanol)

เอทานอล หรือเอทิลแอลกอฮอล์ (C_2H_5OH) เป็นแหล่งพลังงานทดแทนที่มีศักยภาพสูง เพราะสามารถนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงทดแทนจากปิโตรเลียมที่มีราคาสูงขึ้น และกำลังจะหมดไปรวมถึงสามารถผลิตขึ้นได้จากชีวมวล โดย 70 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการผลิต สามารถผลิตได้จากการหมักด้วยวิธีทางชีวภาพโดยใช้ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* (Waites และคณะ, 2001) ปัจจุบันมีการผลิตเอทานอลโดยใช้วัตถุดิบประเภทแป้งกันอย่างกว้างขวาง ประเทศไทยมีแป้งมันสำปะหลังปริมาณมาก ดังนั้นสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตเอทานอลได้ แต่การเปลี่ยนแป้งให้เป็นเอทานอลในวิธีการเดิมนั้น ต้องอาศัยกระบวนการหลายขั้นตอนได้แก่ liquefaction และ saccharification ซึ่งเป็นขั้นตอนในการเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นน้ำตาลกลูโคส แล้วจึงเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสให้เป็นเอทานอลด้วยกระบวนการหมัก (fermentation) โดยจุลินทรีย์ต่อไป แต่ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ที่ใช้ในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล ในสายพันธุ์ปกติ (wild type) ไม่มีแอกทิวิตี (activity) ของเอนไซม์อะมิเลส (amylase) และกลูโคอะมิเลส (glucoamylase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่ใช้ในการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนแป้งให้กลายเป็นเอทานอลได้โดยตรง (Kutluö และคณะ, 2002) วิธีการเปลี่ยนแป้งเป็นเอทานอลในขั้นตอนเดียวโดยการใช้จุลินทรีย์ผสม (mixed culture) ระหว่างจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยแป้งได้ (amylolytic microorganism) กับจุลินทรีย์ที่สามารถหมักเอทานอลได้ (ethanol-fermenting microorganism) เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นิยมใช้ในการผลิตเอทานอลในปัจจุบัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

ผลิตไบโอเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลัง ด้วยจุลินทรีย์ผสม 2 ชนิด คือ *Bacillus* sp. และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 โดยศึกษาภาวะการเลี้ยงจุลินทรีย์ เพื่อให้ได้ผลผลิตเอทานอลสูงในระยะเวลาอันสั้น

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลการผลิตเอทานอลโดยการใช้ *Bacillus* sp. ร่วมกับ *Saccharomyces serevisiae* SKP-01 จากแป้งมันสำปะหลัง ซึ่งมีราคาถูก และหาได้ง่ายในประเทศเป็นวัตถุดิบ ซึ่งอาจนำไปใช้ผลิตเอทานอลในระดับขยายส่วนได้ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ศึกษาหา *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่ย่อยแป้งได้ดี
2. เลี้ยง *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 1 จำนวน 1 สายพันธุ์ โดยใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยแป้งโดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ศึกษา
3. ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม และปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01
4. ผลิตเอทานอลจากจุลินทรีย์ผสม โดย *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่เลือก และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย

5.1 การคัดเลือก *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ย่อยแป้งได้ เพื่อนำไปใช้ในการวิจัย

จากการคัดเลือกเบื้องต้น พบว่า *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14140 สามารถย่อยแป้งได้ดีกว่า *Bacillus* sp. CU-03 งานวิจัยจึงเลือก *Bacillus subtilis* IFO14140 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เพื่อนำไปศึกษาความสามารถในการเจริญ และการย่อยแป้งต่อไป

Bacillus amyloliquefaciens IFO14141 สามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ได้ดีกว่า *Bacillus subtilis* IFO14140 ดังนั้นจึงเลือก *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เพื่อใช้ในการผลิตเอทานอลโดยการใช้เชื้อผสมต่อไป เนื่องจากค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทที่ได้จากการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในทุกความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังมีค่าสูงกว่าค่าได้จาก *Bacillus subtilis* IFO14140

5.2 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และปัจจัยที่มีผลต่อการย่อยแป้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

เมื่อศึกษาการใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 10 ถึง 25 กรัมต่อลิตร พบว่าภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงจุลินทรีย์ MSM เพื่อการย่อยแป้ง คือ ใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน มีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เนื่องจากให้ค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.1774 กรัมเซลล์ต่อกรัมน้ำตาลรวม และชั่วโมงดังกล่าวพบว่ามีน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 6.47 กรัมต่อลิตร

5.3 การหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01

ภาวะที่เหมาะสมต่อการกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 คือ เลี้ยงในอาหารเลี้ยงกล้าเชื้อ YPD ที่มีกลูโคสความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เนื่องจากให้ค่าผลได้อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 0.1537 ต่อชั่วโมง โดยน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในชั่วโมงดังกล่าวมีค่าเท่ากับ 8.23 กรัมต่อลิตร

5.4 การผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cereviaias* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แล้วย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส และการผลิตเอทานอลโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส

จากการใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร พบว่าการผลิตเอทานอลด้วยสองวิธีนี้ได้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของยีสต์สูงสุดใกล้เคียงกัน โดยได้เท่ากับ 8.98 และ 8.99 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากัน โดยได้เท่ากับ 0.005 ต่อชั่วโมง ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 6.03 กรัมต่อลิตร การผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์ทางการค้าได้เอทานอลสูงกว่าเล็กน้อยโดยได้เท่ากับ 6.97 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้ต่อผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทใกล้เคียงกัน โดยได้เท่ากับ 0.40 และ 0.42 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวมตามลำดับ ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 78.43 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.10 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง ส่วนการผลิตเอทานอลโดยใช้เอนไซม์ 2 ชนิดได้ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 82.35 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 0.12 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง

5.5 การผลิตเอทานอลจากการใช้จุลินทรีย์ผสม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลัง

5.5.1 การศึกษาการเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 150 และ 200 กรัมต่อลิตร

พบว่าความเข้มข้นของแป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่เหมาะต่อการนำไปผลิตเอทานอลด้วยเชื้อผสม โดยในทุกช่วงเวลาของการเลี้ยงเชื้อที่ความเข้มข้นดังกล่าวได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และน้ำหนักเซลล์แห้งสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อในแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นอื่น และให้ผลได้เซลล์ต่อสับสเตรทสูงกว่าการเลี้ยงเชื้อที่แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นอื่น โดยได้ค่าสูงสุดเท่ากับ 0.0159 ในชั่วโมงที่ 12 ของการเลี้ยงเชื้อ ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการเพาะกล้าเชื้อยีสต์คือ 4 ชั่วโมงภายหลังจากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เนื่องจากชั่วโมงดังกล่าวได้น้ำตาลรีดิวซ์สูง โดยได้ค่าเท่ากับ 61.85 กรัมต่อลิตร

5.5.2 เปรียบเทียบการผลิตเอทานอลจากแป้งมันสำปะหลังความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร

5.5.2.1 ผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

การผลิตเอทานอลด้วยวิธีนี้ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ*Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 และ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 สูงสุดในชั่วโมงที่ 16 ของการเลี้ยงเชื้อ ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแบคทีเรียมีค่าสูงสุดในชั่วโมงที่ 10 โดยมีค่าเท่ากับ 83.85 กรัมต่อลิตร ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 21.78 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 16 ของการเลี้ยงเชื้อ คิดเป็นผลได้ต่อผลิตภัณฑ์ต่อ

สับสเตรทเท่ากับ 0.45 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ประสิทธิภาพการหมักเท่ากับ 88.24 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าทางทฤษฎี อัตราการผลิตเอทานอลเท่ากับ 1.36 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง

5.5.2.2 ผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

การผลิตเอทานอลด้วยวิธีนี้ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ*Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 สูงสุดในชั่วโมงที่ 22 และ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 สูงสุดในชั่วโมงที่ 28 ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 63.24 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 22 ของการเลี้ยงเชื้อ ผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทสูงสุดเท่ากับ 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ในชั่วโมงที่ 16 ของการเลี้ยงเชื้อ โดยได้ประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 94.12 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าที่ได้ทางทฤษฎี และให้อัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 3.62 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง

5.5.2.3 ผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลส ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

การผลิตเอทานอลด้วยวิธีนี้ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ*Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 สูงสุดในชั่วโมงที่ 22 ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 66.19 กรัมต่อลิตร ที่เวลา 46 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ มีอัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 2.97 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่เวลา 16 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อ ผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทสูงสุดเท่ากับ 0.48 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ที่ชั่วโมงที่ 10 ของการเลี้ยงเชื้อ คิดเป็นประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 94.25 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าที่ได้ทางทฤษฎี

5.5.2.4 ผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และย่อยต่อด้วยกลูโคอะมิเลส

การผลิตเอทานอลด้วยวิธีนี้ได้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ*Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 สูงสุดในชั่วโมงที่ 76 ได้ปริมาณเอทานอลสูงสุดเท่ากับ 63.79 กรัมต่อลิตร อัตราการผลิตสูงสุดเท่ากับ 0.91 กรัมเอทานอลต่อลิตรต่อชั่วโมง ที่ชั่วโมงที่ 70 ของการเลี้ยงเชื้อ ผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทสูงสุดเท่ากับ 0.49 กรัมเอทานอลต่อกรัมน้ำตาลรวม ในชั่วโมงที่ 64 ของการเลี้ยงเชื้อ คิดเป็นประสิทธิภาพการหมักเอทานอลสูงสุด เท่ากับ 96.08 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับค่าที่ได้ทางทฤษฎี

ผลการศึกษาทราบว่าสามารถเพิ่มผลผลิตเอทานอลได้หากมีการเติมกลูโคอะมิเลสลงไป ซึ่งทำให้เกิดการย่อยแป้งที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และการมีชีวิตอยู่ร่วมกันของแบคทีเรียและยีสต์ ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการนำน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อไปใช้และมีผลลบต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลโดยยีสต์นั้น จากผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียและยีสต์สามารถอยู่ร่วมกันในกระบวนการผลิตเอทานอลได้

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กล้าณรงค์ ศรีรอต, เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ, วัชรี เลิศมงคล, จำลอง เจียมจำนรรจา, ปิยะ ควงพัตรา, เอ็จ สโรบล, ปิยะวุฒิ พูลสงวน, เจริญศักดิ์ โรจนฤทธิ์พิเชษฐ์, และวิจารณ์ วิชชุกิจ. 2542. การแปรรูปและการใช้ประโยชน์มันสำปะหลัง. เอกสารเผยแพร่ทางวิชาการ โครงการเพื่อบรรเทาผลกระทบทางสังคม เนื่องจากวิกฤตการณ์ทางเศรษฐกิจ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร.

กล้าณรงค์ ศรีรอต และ เกื้อกูล ปิยะจอมขวัญ. 2543. เทคโนโลยีของแป้ง. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

คณะกรรมาธิการพลังงาน สภาผู้แทนราษฎร. 2545. พลังงานทดแทน เอทานอลและไบโอดีเซล. กรุงเทพมหานคร: แปลนปริ้นท์ติ้ง.

ธีรภัทร ศรีนรคุตร. 2544. เชื้อเพลิงเอทานอล:ทฤษฎีเกี่ยวกับเอทานอล. วารสารการวิจัย และพัฒนา. 1: 57-64.

นิธิยา รัตนาปนนท์. 2549. เคมีอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. เอนไซม์ทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ปริษฎางค์ วงศ์ปราชญ์. 2547. การปรับปรุงการผลิตเอทานอลจากกากน้ำตาลอ้อยโดย *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในการเลี้ยงเชื้อแบบเฟด-แบตช์. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประเสริฐ หาญเมืองใจ. 2543. การผลิตกรดมะนาวจากแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้วด้วยยีสต์ *Candida oleophila* C-73. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พรรณวิไล กิ่งสุวรรณรัตน์. 2545. การผลิตเอทานอลจากเหง้ามันสำปะหลัง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาวิศวกรรมเคมี คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม. 2516. มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์มัน. กรุงเทพมหานคร: กระทรวงอุตสาหกรรม.

สมชาย ดอนคงดี. 2537. การหมักแอลกอฮอล์จากมันสำปะหลัง โดยใช้ระบบต่อเนื่องในถังหมักทรงสูงพร้อมระบบหมุนเวียนเซลล์กลับ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุรเชษฐ์ วงศ์สิทธิ์ธนะกิจ . 2547. การศึกษาการย่อยแป้งมันสำปะหลังโดย *Bacillus* sp. CU-03 เพื่อการผลิตเอทานอลร่วมกับยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการ. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Abate, C., Callieri, D., Rodriguez, E., and Garro, O. 1996. Ethanol production by a mixed culture of flocculent strains of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces* sp. Applied Microbiology and Biotechnology. 45: 580-583.

Agrawal, R., and Basappa, S. C.1996. Role of antimicrobial agents in simultaneous saccharification and fermentation of paddy malt mash to ethanol by mixed cultures of *Saccharomyces cerevisiae* PHO3 and *Zymomonas mobilis* ZM4. Biotechnology Letters.18: 673–678.

Aiyer, P. V. D. 2004. Effect of C:N ratio on alpha amylase production by *Bacillus licheniformis* SPT 27. African Journal of Biotechnology. 3 (10): 519-522.

Aldridge, S. 2000. The Agbiotech Revolution. In J. Sterling (ed.), Genetic Engineering News, pp.80-81. USA: Mary Ann Liebert.

Alfenore, S., Cameleyre, X., Benbadis, L., Bideaux, C., Uribelarrea, J. L., Goma, G., Molina, J.C., and Guillouet, S. E. 2004. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. Applied Microbiology and Biotechnology. 63: 537-542.

Amutha, R., and Gunasekaran, P. 2001. Production of ethanol from liquefied cassava starch using co-immobilized cells of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces diastaticus*. Bioscience and Bioengineering. 92(6): 560-564.

Ang, D. C., Abd-Aziz, S., Yusof, H. M., Karim, M. I. A., Ariff, A., Uchiyama, K., and Shioya, S. 2001. Partial Purification and Characterisation of Amylolytic Enzymes Obtained from Direct Fermentation of Sago Starch to Ethanol by Recombinant Yeast. Pakistan Journal of Biological Sciences. 4 (3): 266-270.

Anto, H., Trivedi, U., and Patel, K. 2006. Alpha Amylase Production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 Using Solid-State Fermentation. Food Technology and Biotechnology. 44 (2): 241–245.

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

Bazas, Zs., Dallmann, K., and Szajani, B. 1989. Influence of pH on the growth and ethanol production of free and immobilized Saccharomyces cerevisiae cells. Biotechnology Bioengineering. 34: 882 – 884.

Bernfeld, F.1955. Amylase alpha and beta. In P.S. Colowich, and O.N. Kaplan (eds.), Method in Enzymology, p.149. London: Academic Press.

Berry, D. R., Russell, I., and Stewart, G.G. 1987. Yeast biotechnology. England: St. Edmondsbury Press.

Bertoldo, C., and Antranikian, G. 2002. Starch-hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. Chemical Biology. 6: 151–160

Biliaderis, C. G. 1992. Structure and phase transitions of starch in food systems. Food Technology. 46(6): 98-109.

Fogarty, W. M., and Kelly, C. T. 1979. Starch-degrading enzyes of microbial origin. In Bull, M. J. (ed.), Progess in industrial microbiology, p. 87-141. New York: Elsevier Scientific Publishing Co.

Carlos, M. A., Guillermo, R. C., Faustino, S. and Danley, A. S. C. 1999. Production of amylolytic enzymes by *Bacillus amyloliquefaciens* in pure culture and in co-culture with *Zymomonas mobolis*. Biotechnology Letters. 21: 249-252.

Crabb, W. D., and Mitchinson, C. 1997. Emzymes involved in the processing of starch to sugars. *Focus*. 15: 349-352.

Difco Manual. 1984. Dehydrated culture media and reagents for microbiology. 10th ed. New York: McGraw-Hill.

Dostalek, M., and Häggström, M. 1983. Mixed culture of *Saccharomycopsis fibuliger* and *Zymomonas mobilis* on starch - Use of oxygen as a regulator. Applied Microbiology and Biotechnology. 17: 269–274.

Dubois, M, Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Rebers, P.A., and Smith, F. 1956. Colorometric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 28(3): 350-356.

Ellis, R.P., Cochrane, M.P., Dale, M.F.B., Duffus, C.M., Lynn, A., Morrison, I.M. Prentice, R.D.M., Swanston, J.S., and Tiller, S.A. 1998. Starch production and industrial use. Journal of Science of Food and Agriculture. 77: 289-311.

Farid, M.A., Enshasy, E. H., Noor, E. D. A. 2002. Alcohol production from starch by mixed cultures of *Aspergillus awamori* and immobilized *Saccharomyces cerevisiae* at different agitation speeds. Basic Microbiology. 42(3): 162-71.

Gangadharan, D., Sivaramakrishnan, S., Nampoothiri, K. M., and Pandey, A. 2006. Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha-amylase production. Food Technology and Biotechnology. 44(2): 269-274.

González, C., Delgado, O., Baigorí, M., Abate, C., Callieri, D. A., and De Figueroa, L. I. C. 2004. Ethanol production from native cassava starch by a mixed culture of *Endomycopsis fibuligera* and *Zymomonas mobilis*. Acta Biotechnologica. 18(2): 149-155.

Goyal, N, Gupta, J.K., and Soni, S.K. 2005. A novel raw starch digesting thermostable alpha-amylase from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. Enzyme and Microbial Technology. 37: 723-734.

Gunasekaran, P. and Raj, K. C. (ed.) 2004. Ethanol fermentation technology – *Zymomonas mobilis* [online]. (n.d.). Available from: http://www.ias.ac.in/currsci/jul10/articles14.htm [2005, July 15]

Haq, I.U, Rani, S, Ashraf, H, and Qadeer, M.A. 2002. Biosynthesis of alpha-amylase by chemically treated mutant of *Bacillus subtilis*. Biological Sciences. 2: 73-75.

Hisayori, S., Yasuya, F., Jun, K., Mitsuyoshi, U., Hideki, F., and Akihiko, K. 2004. Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and alpha-amylase. Biochemical Engineering Journal. 18: 149-153.

Hizukuri, S. 1996. Starch: Analytical aspects. In A.C. Eliasson (ed.), Carbohydrates in food, pp. 347-429. New York: Marcel Dekker.

Hutter, A., and Oliver, S.G. 1998. Ethanol production using nuclear petite yeast mutants. Applied Microbiology and Biotechnology. 49: 511 – 516.

Isaac, S. and Jenning, D. 1995. Microbial culture. Oxford: Bios Scientific Publishers.

Jacobs, H., and Delcour, J.A. 1998. Hydrothermal modifications of granular starch with retention of the granular structure: A review. Agricalture Food Chemistry. 46(8): 2895-2905.

John, G., Eberhardt, I., Zeitz, A., Hellendoorn, L., and Schugerl, K. 1996. Coimmobilized aerobic/anaerobic mixed cultures in shaked Flasks. Journal of Biotechnology. 46: 209-219.

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

Kamini, N. R., Gunasekaran, P. 1986. Ethanol production from lactose by coculture of *Kluyveromyees fragilis* and *Zymomonas mobilis*. Fermentation and Bioengineering. 68: 305-309.

Kemper, A.J. 1974. Determination of sub-micro quantities of ammonium and nitrate in soils with phenol, sodium nitropusside and hypochlorite. Geoderma. 12: 201-206.

Kimura, A., and Robyt, F.J. 1996. Reaction of enzymes with starch granules: enhanced reaction of glucoamylase with gelatinized starch granules. Carbohydrate research. 288: 233-240.

Kiran, ö., Çömlekçioğlu, U., and Arikan, B. 2005. Effect of carbon soirces and various chemicals on the production of a novel amylase from a thermophilic *Bacillus* sp.. Turkish journal of Biology. 29: 99-103.

Kutluö, Ö. Ü., Basak, S., Önsan, Z. I., and Betül, K. 2002. Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* YPG-AB. Process Biochemistry. 37: 1157-1168.

Konsula, Z. and Liakopoulou, K. M. 2004. Hydrolysis of starches by the action of an alpha-amylase from *Bacillus subtilis*. Process Biochemistry. 39: 1745–1749.

Kádár, Zs. Szengyel, Zs. And Réczey, K. 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. Industrial Crops and Products. 20: 103-110.

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

Mamo, G., and Gessesse, A. 1999. Effect of cultivation conditions on growth and alpha-amylase production by a thermophilic *Bacillus* sp.. Letters in Applied Microbiology. 29: 61-65.

Mansi, E.I., and Charlie, B. 1999. Fermentation microbiology and biotechnology. London :Taylor & Francis.

Mitsuiki, S., Mukae, K., Sakai, M., Goto, M., Hayashida, S., and Furukawa, K. 2005. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing alpha-amylase from various *Bacillus* strains. Enzyme and Microbial Technology. 37: 410-416.

Nakamura, L.K., Roberts, M.S., and Cohan, F.M. 1999. Relationship of *Bacillus subtilis* clades associated with strains 168 and W23: a proposal for *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* subsp. nov. and *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii* subsp. nov.. International Journal of Systematic Bacteriology. 49 : 1211-1215.

Nakamura, Y., Kobayashi, F., Ohnaga, M., and Sawada, T. 1997. Alcohol fermentation of starch by a genetic recombinant yeast having glucoamylase activity. Biotechnology and Bioengineering. 53: 21–5.

Nyerhovwo, J.T. 2004. Cassava and the future of starch. Journal of Biotechnology. [Online]. Available from http://www.ejbiotechnology.info/content/vol7/issue1/issues/2/ [2005, June 29]

Pandey, A., Nigam, P., Soccol, C. R., Soccol, V. T., Singh, D.,and Mohan, R. 2000. Review: Advances in microbial amylases. Biotechnology Applied Biochemistry. 31: 135–152.

Park, D., Ham, S., Jang, K., Ahn, I., and Kim, W. 2005. Immobilization of starch-converting enzymes on surface-modified carried using single and co-immobilized systems : Properties and application to starch hydrolysis. Process Biochemistry. 40: 53-61.

Paturau, J.M. 1987. By-products of cane sugar industry. Amsterdams:Elsevier.

Qader, S.A.U., Bano, S., Aman, A., Syed, N., and Azhar, A. 2006. Enhanced production and extracellular activity of commercially important amylolytic enzyme by a newly isolated strain of *Bacillus* sp. AS-1. Turkish Journal of Biochemistry. 31(3): 135-140.

Reddy, N.S., Nimmagadda, A., and Rao, S. 2003. Minireview : Anoverview of the microbial alpha-amylase family. African Journal of Biotechnology. 2(12): 645-648

Reddy, O.V.S., and Basappa, S.C. 1996. Direct fermentation of cassava starch to ethanol by mixed cultures of *Endomycopsis fibuligera* and *Zymomonas mobilis*: synergism and limitations. Biotechnology Letters. 18(11): 1315-1318.

Rose, A.H., and Harrison J.S. 1970. Yeast technology. vol.3: The yeast. London : Academic Press.

Roy, I., and Gupta, N.M. 2004. Hydrolysis of starch by a mixture of glucoamylase and pullulanase entrapped individually in calcium alginate beads. Enzyme and Microbial Technology. 34 : 26-32.

Santabury, P.F., Whitaker, A., and Hall, S. J. 1999. Principles of fermentation technology. 2nd ed. Butter Worth: Heinemann.

Sarikaya, E and Gürgün, V. 2000. Increase of the alpha-amylase yield by some Bacillus strains. Turkish Journal of Biology. 24: 299-308.

Sauer, J., Sigurskjold, W.B., Christensen, U., Frandsen, P.T.,Mirgorodskaya, E., Harrison, M., Roepstorff, P., and Svensson, B. 2000. Review : Glucoamylase: structure/function relationships, and protein engineering. Biochimica et Biophysica Acta.1543: 275-293.

Saxena, R. K., Dutt, K., Agarwal, L., and Nayyar, P. 2007. A highly thermostable and alkaline amylase from a *Bacillus* sp. PN5. Bioresource Technology. 98: 260–265.

Shigechi, H., Fujita,Y., Koh, J., Uedac, M., Fukuda, H., and Kondo, K. 2004. Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and alpha-amylase. Biochemical Engineering Journal. 18:149–153.

Sivaramakrishnan, S., Gangadharan, D., Madhavan, K., Soccol, C. R., and Pandey, A. 2006. Alpha-amylase from microbial sources- An overview on recent developments. Food Technology and Biotechnology. 40(2): 173-184.

Suresh, K., Kiransree, N., and Rao, L. V. 1999. Production of ethanol by raw starch hydrolysis and fermentation of damaged grains of wheat and sorghum. Bioprocess Engineering. 21: 165-168.

Syu, M. J., and Chen, Y. H. 1997. A study of the alpha-amylase fermentation performed by *Bacillus amyloliquefaciens*. Chemical Engineering Journal. 65: 237-247.

Szambelan, K., Nowak, J., and Czarnecki, Z. 2004. Use of *Zymomonas mobilis* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed with *Kluyveromyces fragilis* for improved ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. Biotechnology Letters. 26: 845-848.

Tanyildizi, S. M., özer, D., and Elibol, M. 2005. Optimization of alpha-amylase production by *Bacillus* sp. using reponse surface methodology. Process Biochemistry. 40: 2291-2296.

Tatsumi, H., and Katano, H. 2005. Kinetics of the surface hydrolysis of raw starch by glucoamylase. Agricultural and Food Chemistry. 53: 8123-8127.

Teodoro, C. E. S., and Meire Lelis Leal Martins, M. L. L. 2000. Culture conditions for the production of thermostable amylase by *Bacillus* sp. Brazillian Journal of Microbiology. 31: 298-302.

Mansi, E.I., and Charlie, B. 1999. Fermentation microbiology and biotechnology. London: Taylor & Francis.

Milner, J. A., Martin, D. J., and Smith, A. 1996. Oxygen transfer conditions in the production of alpha-amylase by *Bacillus amyloliquefaciens*. Enzyme and Microbial Technology. 18: 507-512.

van der Maarel, M. J. E., van der Veen, B., Uitdehaag, J. C. M., Leemhuis, H., and Dijkhuizen, L. 2002. Properties ans applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. Journal of Biotechnology. 94: 137-155.

Verma, G., Nigam, P., Singh, D., and Chaudhary, K. 2000. Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by co-culture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21. Bioresource Technology. 72: 261-266.

Vlaev, S. D., and Valeva, M. 1992. Oxygen transfer deficiencies in starch-based media. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 264-266.

Waites, M. J., Morgan, N. L., Rockey, J. S., and Higton, G. 2001. Fuels and industrial chemicals. Industrial microbiology : an introduction. London: Blackwell science.

Walker, G. M. 1998. Yeast Physiology and Biotechnology. Chichester: John Wiley & Sons Ltd.

Ward, C., Nolan, A. M., O'Hanlon, K., McAree, T., Barron, N., McHale, L., and McHale, A. P. 1995 Production of ethanol at 45°C on starch-containing media by mixed cultures of the thermotolerant, ethanol-producing yeast *Kluyveromyces marxianus* IMB3 and the thermophilic filamentous fungus *Talaromyces emersonii* CBS 814.70. Applied Microbiology and Biotechnology. 43: 408-411.

Wheals, A. E., Basso, L. C., Alves, D. M. G., and Amorim, H. V. 1999. Fuel ethanol after 25 years. Trends in Biotechnology. 17(2): 482-487.

Winter, J.F., Loret, M.O., and Uribelarrea, J.L. 1989. Inhibition and growth factor deficiencies in alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. Current Microbiology. 18: 247-252.

Yoshitoshi, N., Fumihisa, K., Makoto, O., and Tatsuro, S. 1997. Alcohol fermentation of starch by a genetic recombinant yeast having glucoamylase activity. Biotechnology and Bioengineering. 53: 21-25.

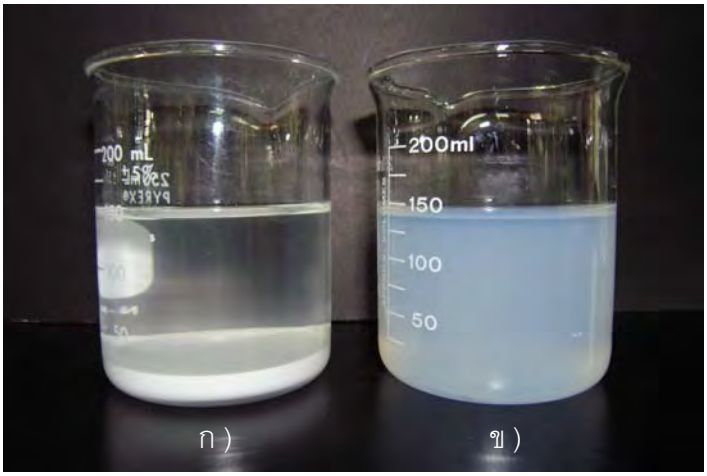
ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมสารที่ใช้ในงานวิจัย

1. การเตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลัง

นำแป้งมันสำปะหลังใส่ลงในหม้อสเตนเลส (stainless) เติมน้ำกลั่นลงไปพอประมาณ ปรับค่า pH ตามความเหมาะสม แล้วนำขึ้นต้มบนเตาแก๊ส ใช้แท่งแก้วสะอาดคนสารละลายแป้งมันสำปะหลังระหว่างการต้ม เพื่อป้องกันแป้งมันสำปะหลังจับตัวเป็นก้อน ต้มจนกระทั่งสารละลายแป้งมันสำปะหลังมีสีใส แล้วนำไปรวมกับส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหลือต่อไป



รูปที่ ก.1 สารละลายแป้งมันสำปะหลัง ก) ก่อนต้ม ข) หลังต้ม

2. การย่อยแป้งมันสำปะหลังโดยใช้เอนไซม์ทางการค้า

2.1 เตรียมสารละลายแป้งมันสำปะหลังเข้มข้น 60 กรัมต่อลิตร (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำลาย) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร บรรจุในขวดทดลองขนาด 1 ลิตร ปรับค่า pH ของสารละลายแป้งมันสำปะหลังให้เท่ากับ 6.0

2.2 เติมแอลฟาอะมิเลสปริมาตร 0.006 มิลลิลิตร

2.3 บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ที่อุณหภูมิเท่ากับ 70 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 125 รอบต่อนาที จนได้ค่าสมมูลเดกซ์โทรสอยู่ในช่วงเท่ากับ 10 ถึง 20 เปอร์เซ็นต์

2.4 ลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และควบคุมอุณหภูมิให้เท่ากับ 60 องศาเซลเซียส

2.5 ปรับค่า pH ของสารละลายแป้งมันสำปะหลังให้อยู่ในช่วงเท่ากับ 4.3 ถึง 4.5

2.6 เติมกลูโคอะมิเลสปริมาตร 0.012 มิลลิลิตร

2.7 บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ที่อุณหภูมิเท่ากับ 60 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบเท่ากับ 125 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. การเตรียมสารละลายฟีนอล ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร)

ละลายฟีนอล 5 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

4. การเตรียมสารละลายกรดไดไนโตรซาลิไซลิก (dinitrosalicylic acid, DNSA reaget)

ละลายกรด 3,5 ไดไนโตรซาลิไซลิก ปริมาณ 1.0 กรัม ในสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 2 โมลาร์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 50 มิลลิลิตร เติมโพแตสเซียมโซเดียมตาร์เตรต 30 กรัม ปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชา

5. การเตรียมสารละลายยูเรียเอส (urease)

5.1 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ เตรียมจากการละลายโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตไดไฮเดรต ปริมาณ 3.28 กรัม และไดโซเดียวไฮโดรเจนฟอสเฟต ปริมาณ 0.57 กรัม ในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.1 ปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 250 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

5.2 สารละลายยูเรียเอส เตรียมจากการละลายเอนไซม์ยูเรียปริมาณ 1.75 กรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 250 มิลลิลิตร ผสมให้กันแล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

6. การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแหล่งไนโตรเจน

6.1 สารละลายโปแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ เตรียมจากการละลายโปแทสเซียมคลอไรด์ ปริมาณ 150 กรัมน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

6.2 สารละลายฟีนอลไนโตรพัสซายด์ เตรียมจากการละลายฟีนอล 7 กรัม และโซเดียมไนโตรพัสซายด์ ปริมาณ 34 มิลลิกรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ 80 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.3 สารละลายบัฟเฟอร์ไฮโปคอไรต์ เตรียมจากการละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาณ 1.48 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุ ปริมาตร 70 มิลลิลิตร เติมโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตปริมาณ 4.98 กรัม และสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (คลอรอกซ์ 5-5.25 เปอร์เซ็นต์) ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 11.4 -12.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 นอร์มอล ปรับปริมาตรสุทธิให้เน 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

6.4 สารละลาย EDTA เตรียมจากการลาย EDTA ไดโซเดียมซอลท์ ปริมาณ 6 กรัม ในน้ำกลั่นปลอดประจุปริมาตร 80 มิลลิลิตร ปรับ pH ให้เป็น 7.0 แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นปลอดประจุ

7. การเตรียมสารละลายมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณเอทานอล

7.1 การเตรียมสารละลายเอทานอลมาตรฐาน เตรียมโดยปิเปตสารละลาย absolute ethanol (ความเข้มข้นเท่ากับ 99.8 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) ความถ่วงจำเพาะเท่ากับ0.7908 กรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 1.27 1.01 0.76 0.51 0.25 และ 0 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 10 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จะได้สารละลายเอทานอลมาตรฐานความเข้มข้น 100 80 60 40 20 และ 0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ

7.2 การเตรียมสารละลาย internal standard เตรียมโดยปิเปตสารละลาย n-butanol (99.5 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร)) ปริมตร 0.01 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรสุทธิให้เป็น 10 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

ภาคผนวก ข

สูตรคำนวณ และกราฟมาตรฐาน

1. การคำนวนน้ำหนักเซลล์แห้ง

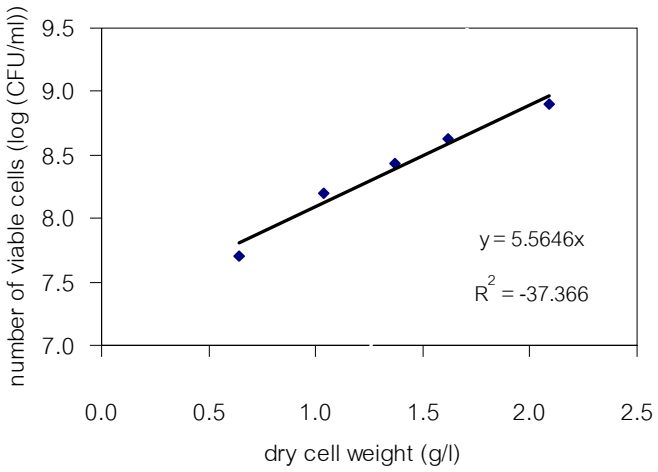
$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{น้ำหนักถ้วยที่มีเซลล์} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า}) \times 1{,}000}{10}$$

2. การคำนวณจำนวนเซลล์ที่ชีวิต

จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) = จำนวนโคโลนี x 10 x ค่าการเจือจาง

3. การคำนวนน้ำหนักเซลล์แห้งจากจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

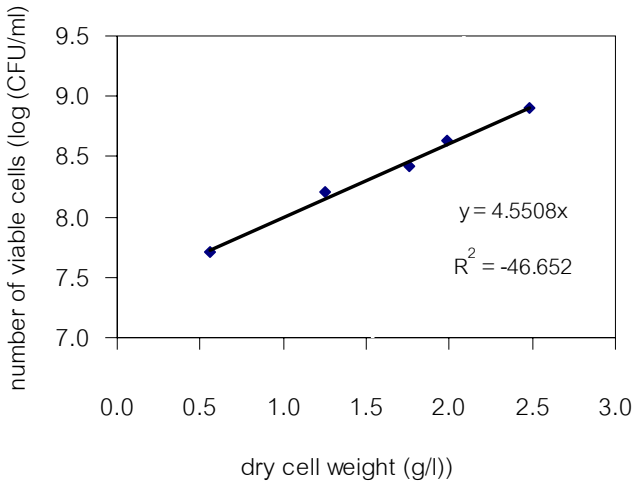
3.1 น้ำหนักเซลล์แห้งของ *Baciilus subtilis* IFO14140



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Bacillus subtilis* IFO14140 และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Bacillus subtilis* IFO14140

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้งของ } \textit{Baciilus subtilis} \text{ IFO14140 (กรัมต่อลิตร)} = \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)}$$

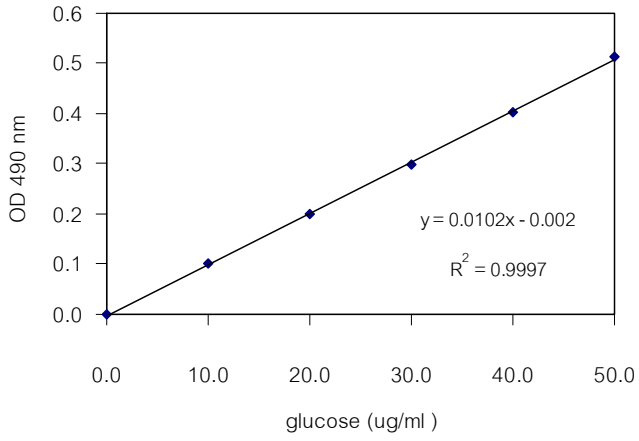
3.2 **น้ำหนักเซลล์แห้งของ** *Baciilus amyloliquefaciens* IFO14141



รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้งของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 และจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้งของ } \textit{Baciilus subtilis} \text{ IFO14140 (กรัมต่อลิตร)} = \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml)}$$

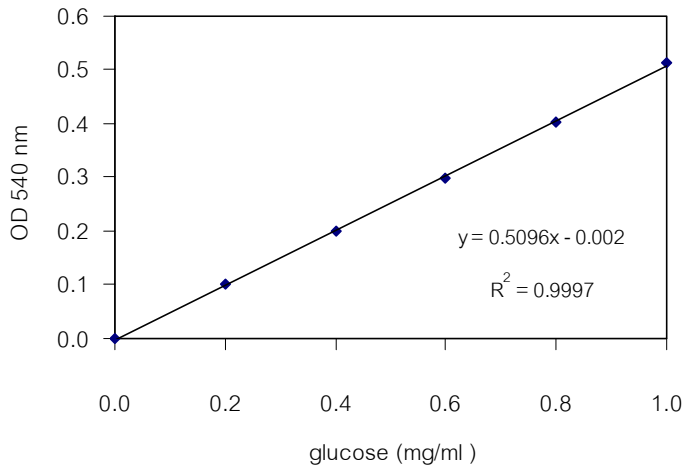
4. การคำนวนปริมาณน้ำตาลรวม



รูปที่ ข.3 กราฟมาตรฐานของกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-50.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.0102

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรวม (กรัมต่อลิตร)} = \frac{1}{\text{ความชัน}} \times OD_{490} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times 10^{-3}$$

5. การคำนวนปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์

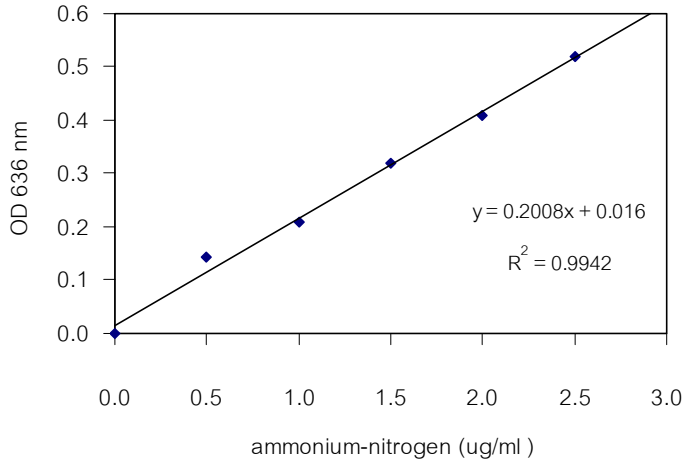


รูปที่ ข.4 กราฟมาตรฐานของกลูโคสในช่วงความเข้มข้น 0-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.9997

$$\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{1}{\text{ความชัน}} \times OD_{540} \times \text{ค่าการเจือจาง}$$

6. การคำนวณปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย

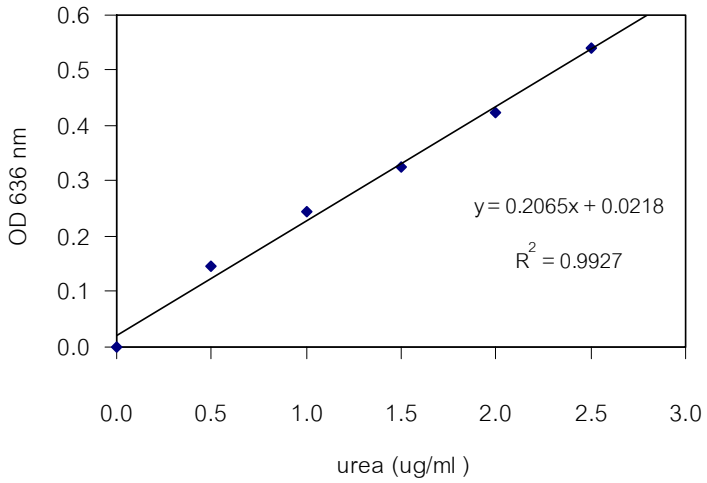
6.1 ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต



รูปที่ ข.5 กราฟมาตรฐานของแอมโมเนียม-ไนโตรเจน ในช่วงความเข้มข้น 0-3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.2089

$$\text{ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัมต่อลิตร)} = \frac{1}{\text{ความชัน}} \times OD_{636} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times \frac{132}{28} \times 10^{-3}$$

6.2 **ปริมาณยูเรีย**

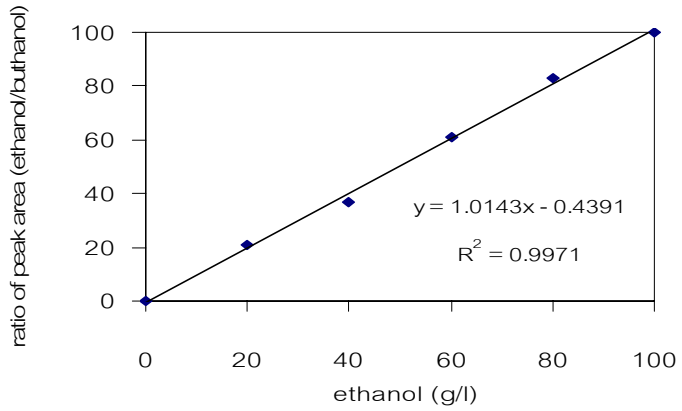


รูปที่ ข.6 กราฟมาตรฐานของยูเรีย ในช่วงความเข้มข้น 0-3.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความชันเท่ากับ 0.2217

$$\text{ปริมาณยูเรีย(กรัมต่อลิตร)} = \frac{1}{\text{ความชัน}} \times OD_{636} \times \text{ค่าการเจือจาง} \times \frac{60}{28} \times 10^{-3}$$

หมายเหตุ 28 คือ น้ำหนักโมเลกุลของธาตุไนโตรเจนในแอมโมเนียมซัลเฟต และยูเรีย
60 คือ น้ำหนักโมเลกุลของยูเรีย
132 คือ น้ำหนักโมเลกุลของแอมโมเนียมซัลเฟต

7. **การคำนวนปริมาณเอทานอล**



รูปที่ ข.7 กราฟมาตรฐานของเอทานอล ในช่วงความเข้มข้น 0 ถึง 100 กรัมต่อลิตร ความชันเท่ากับ 1.0143

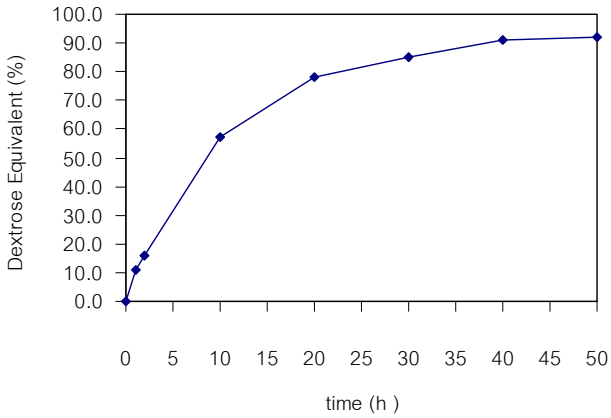
$$\text{ปริมาณเอทานอล (กรัมต่อลิตร)} = \frac{1}{\text{ความชัน}} \times \text{อัตราส่วนพื้นที่ใต้กราฟระหว่างเอทานอล ต่อบิวทานอล}$$

ปริมาณเอทานอล % (น้ำหนัก ต่อปริมาตร) = ปริมาณเอทานอล(กรัมต่อลิตร) / 10

$$\text{ปริมาณเอทานอล \% (ปริมาตร ต่อปริมาตร)} = \frac{\text{ปริมาณเอทานอล \%(น้ำหนักต่อปริมาตร)}}{\text{ค่าความถ่วงจำเพาะของเอทานอล}}$$

หมายเหตุ ค่าความถ่วงจำเพาะของเอทานอลเท่ากับ 0.79 กรัมต่อมิลลิลิตร

8. **การคำนวณค่าสมมูลเดกซ์โทรส** (Dextrose Equivalent ; DE)



รูปที่ ข.8 กราฟแสดงค่าสมมูลเดกซ์โทรสของแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส

$$\text{เปอร์เซ็นต์สมมูลเดกซ์โทรส} = \frac{\text{ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (กรัมต่อลิตร)} \times 100}{\text{ปริมาณของแข็งทั้งหมด (กรัมต่อลิตร)}}$$

9. **การคำนวณหา** μ $Y_{X/S}$ $Y_{P/S}$, **และ** Q_P

$$\mu = \frac{\ln X_t - \ln X_o}{t}$$

$$Y_{X/S} = \frac{X_t - X_0}{S_0 - S_t}$$

$$Y_{P/S} = \frac{P_t - P_0}{S_0 - S_t}$$

$$Q_p = \frac{P_t - P_0}{(S_0 - S_t) \times t}$$

$$\text{fermentation efficiency (\%)} = \frac{Y_{P/S} \times 100}{0.51}$$

ภาคผนวก ค

ตารางข้อมูลการทดลอง และการประเมินค่าพารามิเตอร์

ตารางที่ ค.1 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* IFO14140

time (h)	total sugar (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	10.33	7.83	1.41	7.11	-
4	9.44	8.08	1.45	7.01	0.0479
8	8.97	8.41	1.51	6.87	**0.0709**
12	6.76	**8.72**	**1.57**	6.71	0.0434
16	6.78	8.70	1.56	6.62	0.0413
20	4.97	8.62	1.55	6.52	0.0279
24	4.32	8.54	1.54	6.50	0.0208

ตารางที่ ค.2 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* IFO14140

time (h)	total sugar (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.06	7.85	1.41	7.05	-
4	14.25	8.08	1.45	7.02	0.0523
8	13.86	8.41	1.51	6.98	**0.0805**
12	11.68	**8.46**	**1.52**	6.99	0.0300
16	11.36	8.36	1.50	6.85	0.0227
20	11.00	8.34	1.50	6.83	0.0187
24	10.75	8.30	1.49	6.79	0.0158

ตารางที่ ค.3 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* IFO14140

time (h)	total sugar (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	20.51	7.91	1.42	6.98	-
4	19.76	8.02	1.44	6.86	0.0286
8	19.46	8.38	1.51	6.89	**0.0717**
12	17.33	8.41	1.51	6.84	0.0269
16	16.77	**8.47**	**1.52**	6.79	0.0242
20	16.41	8.40	1.51	6.80	0.0206
24	16.18	8.25	1.48	6.75	0.0160

ตารางที่ ค.4 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus subtilis* IFO14140

time (h)	total sugar (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	24.82	7.85	1.41	7.10	-
4	23.59	8.04	1.44	7.05	0.0129
8	22.72	**8.17**	**1.47**	6.84	**0.0249**
12	22.37	8.11	1.46	6.85	0.0240
16	21.66	8.08	1.45	6.82	0.0212
20	21.44	8.01	1.44	6.79	0.0110
24	21.22	7.94	1.43	6.71	0.0023

ตารางที่ ค.5 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

time (h)	total sugar (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	9.11	8.29	1.82	6.91	-
4	8.71	8.59	1.89	6.70	**0.1664**
8	6.41	8.94	1.96	6.45	0.0467
12	5.11	**9.05**	**1.99**	6.40	0.0382
16	4.56	9.01	1.98	5.80	0.0328
20	4.36	8.90	1.96	5.72	0.0280
24	3.84	8.88	1.95	5.64	0.0237

ตารางที่ ค.6 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

time (h)	total sugar (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.14	8.03	1.76	6.97	-
4	14.40	8.60	1.89	6.75	**0.1774**
8	12.26	8.92	1.96	6.55	0.0615
12	10.41	**9.03**	**1.99**	6.32	0.0419
16	10.24	8.99	1.97	5.87	0.0372
20	10.07	8.88	1.95	5.75	0.0329
24	9.80	8.85	1.94	5.62	0.0295

ตารางที่ ค.7 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

time (h)	total sugar (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	21.03	8.16	1.79	6.94	-
4	20.38	8.57	1.88	6.53	**0.1435**
8	17.74	9.03	1.98	6.35	0.0530
12	16.02	**9.09**	**2.00**	6.17	0.0387
16	15.86	9.05	1.99	5.91	0.0349
20	15.55	8.95	1.97	5.67	0.0308
24	15.43	8.92	1.96	5.44	0.0280

ตารางที่ ค.8 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 25 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141

time (h)	total sugar (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	24.85	8.01	1.76	6.99	-
4	24.16	8.45	1.86	6.54	**0.1407**
8	21.73	8.91	1.96	6.32	0.0579
12	19.84	**9.00**	**1.98**	6.02	0.0405
16	19.62	8.97	1.97	5.41	0.0363
20	19.45	8.88	1.95	5.29	0.0327
24	18.99	8.85	1.94	5.23	0.0292

ตารางที่ ค.9 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	ammonium-nitrogen (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.14	2.75	0.58	8.03	1.76	6.97	-
4	14.40	2.60	0.55	8.60	1.89	6.75	**0.1774**
8	12.26	2.23	0.47	8.92	1.96	6.55	0.0615
12	10.41	2.09	0.44	**9.03**	**1.99**	6.32	0.0419
16	10.24	2.06	0.44	8.99	1.97	5.87	0.0372
20	10.07	2.02	0.43	8.88	1.95	5.75	0.0329
24	9.80	1.93	0.41	8.85	1.94	5.62	0.0295

ตารางที่ ค.10 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมียูเรียความเข้มข้นเท่ากับ 1.36 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

time (h)	total sugar (g/l)	urea (g/l)	ammonium-nitrogen (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.04	1.28	0.60	7.99	1.76	7.1	-
4	13.78	1.15	0.54	8.81	1.94	7.42	**0.1444**
8	12.89	1.11	0.52	**8.92**	**1.96**	7.48	0.0976
12	11.45	1.09	0.51	8.86	1.95	7.57	0.0496
16	11.09	0.96	0.45	8.78	1.93	7.69	0.0362
20	10.90	0.90	0.42	8.60	1.89	7.64	0.0260
24	10.04	0.77	0.36	8.01	1.76	7.77	0.0026

ตารางที่ ค.11 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 1 กรัมต่อลิตร

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	14.99	1.07	8.00	1.76	6.94	-
4	14.06	0.88	8.61	1.89	6.85	**0.1431**
8	12.76	0.56	8.91	1.96	6.70	0.0862
12	10.72	0.25	**9.03**	**1.99**	6.52	0.0480
16	9.76	0.13	8.94	1.96	5.88	0.0346
20	9.68	0.10	8.83	1.94	5.71	0.0286
24	8.72	0.07	8.79	1.93	5.66	0.0223

ตารางที่ ค.12 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 2 กรัมต่อลิตร

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.18	2.01	8.01	1.76	7.02	-
4	14.42	1.74	8.65	1.90	6.93	**0.1850**
8	12.64	1.32	8.92	1.96	6.72	0.0710
12	10.87	1.16	**9.07**	**1.99**	6.42	0.0474
16	10.11	1.09	9.06	1.99	5.78	0.0391
20	9.70	0.96	8.93	1.96	5.66	0.0323
24	9.53	0.90	8.89	1.95	5.59	0.0282

ตารางที่ ค.13 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.14	2.75	8.03	1.76	6.97	-
4	14.40	2.60	8.60	1.89	6.75	**0.1774**
8	12.26	2.23	8.92	1.96	6.55	0.0615
12	10.41	2.09	**9.03**	**1.99**	6.32	0.0419
16	10.24	2.06	8.99	1.97	5.87	0.0372
20	10.07	2.02	8.88	1.95	5.75	0.0329
24	9.80	1.93	8.85	1.94	5.62	0.0295

ตารางที่ ค.14 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.04	2.89	8.02	1.76	4.12	-
4	14.66	2.80	8.23	1.81	4.02	**0.1293**
8	12.65	2.70	8.33	1.83	3.90	0.0233
12	11.43	2.65	**8.41**	**1.85**	3.62	0.0199
16	11.21	2.52	8.37	1.84	3.55	0.0176
20	10.56	2.41	8.32	1.83	3.21	0.0139
24	10.22	2.36	8.26	1.82	3.22	0.0105

ตารางที่ ค.15 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.21	3.21	8.08	1.77	5.12	-
4	14.72	3.12	8.37	1.84	5.00	**0.1404**
8	12.89	3.01	8.75	1.92	4.92	0.0603
12	11.64	2.97	**8.88**	**1.95**	4.77	0.0480
16	11.00	2.78	8.80	1.93	4.77	0.0386
20	10.32	2.48	8.66	1.90	4.61	0.0284
24	10.08	2.30	8.59	1.89	4.53	0.0223

ตารางที่ ค.16 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.0

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.15	3.05	8.04	1.77	6.14	-
4	14.62	2.97	8.44	1.85	5.87	**0.1584**
8	12.78	2.76	8.72	1.92	5.74	0.0550
12	11.44	2.64	**8.88**	**1.95**	5.69	0.0438
16	11.21	2.43	8.88	1.95	5.66	0.0408
20	10.09	2.31	8.74	1.92	5.50	0.0300
24	9.47	2.10	8.71	1.91	5.54	0.0232

ตารางที่ ค.17 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.14	2.75	8.03	1.76	6.97	-
4	14.40	2.60	8.60	1.89	6.75	**0.1774**
8	12.26	2.23	8.92	1.96	6.55	0.0615
12	10.41	2.09	**9.03**	**1.99**	6.32	0.0419
16	10.24	2.06	8.99	1.97	5.87	0.0372
20	10.07	2.02	8.88	1.95	5.75	0.0329
24	9.80	1.93	8.85	1.94	5.62	0.0295

ตารางที่ ค.18 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 8.0

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.08	2.98	8.03	1.77	8.11	-
4	14.48	2.76	8.43	1.85	7.98	**0.1364**
8	12.83	2.65	8.77	1.93	7.91	0.0647
12	10.78	2.57	**9.00**	**1.98**	7.85	0.0449
16	10.08	2.51	8.95	1.97	7.77	0.0372
20	8.36	2.34	8.91	1.96	7.68	0.0268
24	7.72	2.10	8.87	1.95	7.51	0.0215

ตารางที่ ค.19 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	16.04	3.09	8.10	1.78	7.02	-
4	15.69	2.98	8.49	1.87	6.85	0.0750
8	14.44	2.87	9.01	1.98	6.76	**0.0840**
12	12.21	2.80	**9.04**	**1.99**	6.81	0.0448
16	10.73	2.73	8.89	1.95	6.72	0.0277
20	10.41	2.65	8.74	1.92	6.63	0.0199
24	10.11	2.54	8.70	1.91	6.51	0.0157

ตารางที่ ค.20 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.89	2.98	8.14	1.79	7.12	-
4	15.31	2.95	8.52	1.87	6.88	**0.1412**
8	14.10	2.87	9.05	1.99	6.83	0.1092
12	12.09	2.81	**9.18**	**2.02**	6.77	0.0574
16	10.54	2.69	9.03	1.98	6.52	0.0344
20	10.22	2.54	8.92	1.96	6.48	0.0261
24	10.01	2.48	8.81	1.94	6.44	0.0206

ตารางที่ ค.21 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 บ่มบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส

time (h)	total sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s (g_x/g_s)
0	15.14	2.75	8.03	1.76	6.97	-
4	14.40	2.60	8.60	1.89	6.75	**0.1774**
8	12.26	2.23	8.92	1.96	6.55	0.0615
12	10.41	2.09	**9.03**	**1.99**	6.32	0.0419
16	10.24	2.06	8.99	1.97	5.87	0.0372
20	10.07	2.02	8.88	1.95	5.75	0.0329
24	9.80	1.93	8.85	1.94	5.62	0.0295

ตารางที่ ค.22 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

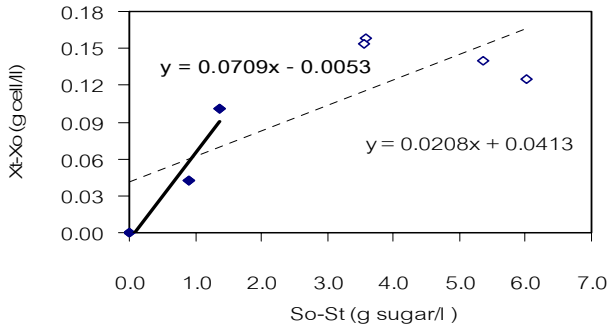
time(h)	total sugar (g/l)	reducing sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s
0	98.53	0.00	9.52	7.65	1.68	7.02	-
4	82.00	34.99	9.27	7.74	1.70	6.37	0.0013
8	68.11	36.18	9.33	**8.99**	**1.98**	6.11	0.0078
12	65.46	37.80	9.01	8.95	1.97	5.94	**0.0098**
16	65.02	36.88	8.60	8.53	1.87	5.86	0.0086
20	64.36	36.07	8.28	8.46	1.86	5.84	0.0078
24	63.70	36.12	7.98	8.43	1.85	5.81	0.0072

ตารางที่ ค.23 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 150 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

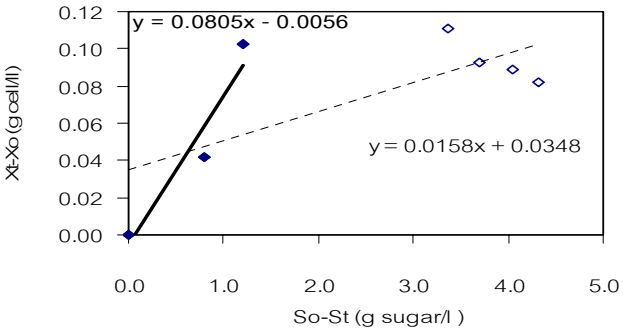
time(h)	total sugar (g/l)	reducing sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s
0	153.85	0.05	10.09	7.66	1.68	7.05	-
4	138.36	61.85	10.05	7.88	1.73	6.74	0.0033
8	129.58	65.05	9.57	**9.37**	**2.06**	6.35	0.0142
12	131.65	66.24	9.02	9.28	2.04	5.92	**0.0159**
16	120.81	67.92	8.83	8.79	1.93	5.89	0.0107
20	118.22	69.54	8.79	8.72	1.92	5.74	0.0082
24	111.00	69.65	8.88	8.60	1.89	5.58	0.0056

ตารางที่ ค.24 การเจริญ และการย่อยแป้งมันสำปะหลังที่ความเข้มข้นเริ่มต้นเท่ากับ 200 กรัมต่อลิตร ของ *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อมีแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นเท่ากับ 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน

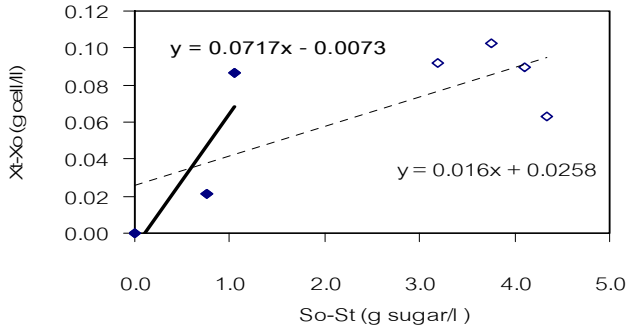
time(h)	total sugar (g/l)	reducing sugar (g/l)	ammonium sulphate (g/l)	number of viable cells (log (CFU/ml))	DCW (g/l)	pH	Yx/s
0	207.33	0.05	10.04	7.61	1.67	7.04	-
4	183.79	66.29	9.96	7.70	1.69	6.84	0.0009
8	182.14	69.38	8.95	8.70	1.91	6.52	0.0058
12	175.94	69.11	8.83	**9.19**	**2.02**	6.01	**0.0093**
16	172.43	69.97	8.77	8.62	1.89	5.92	0.0082
20	171.40	74.14	8.65	8.49	1.87	5.88	0.0073
24	159.01	76.36	8.54	8.45	1.86	5.74	0.0050



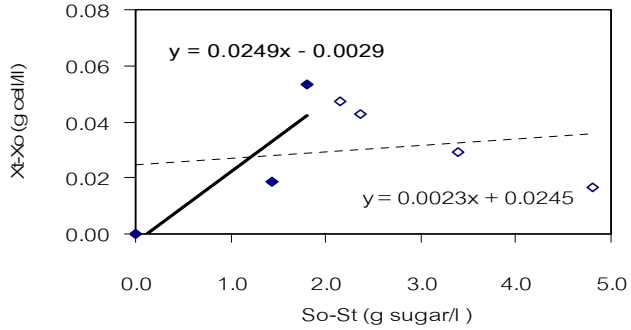
ก) Yx/s = 0.0709 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 8)



ข) Yx/s = 0.0805 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 8)

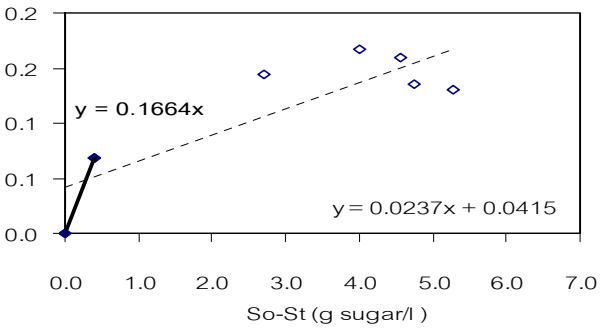


ค) Yx/s = 0.0717 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 8)

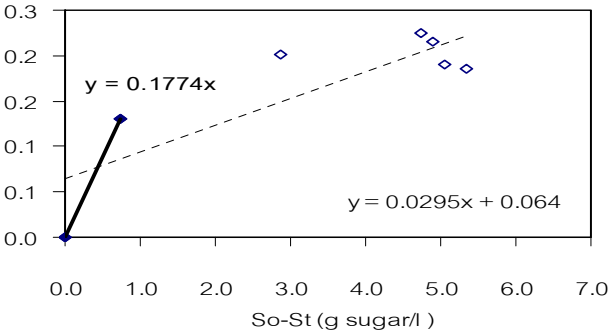


ง) Yx/s = 0.0249 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 8)

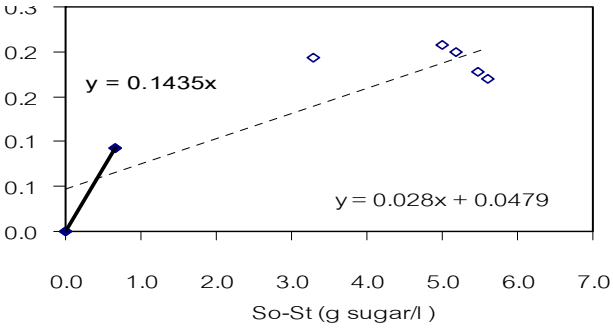
รูปที่ ค.1 การคำนวนค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus subtilis* IFO14140 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 10(ก) 15(ข) 20(ค) และ 25 (ง) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้น 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน



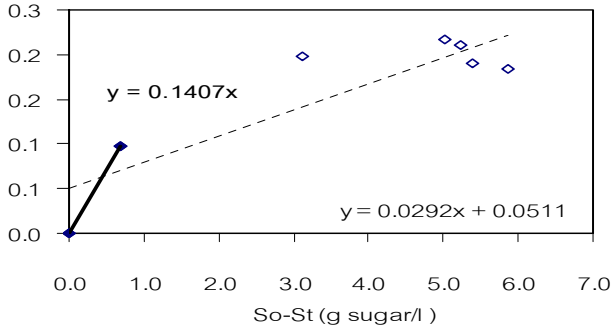
ก) Yx/s = 0.1664 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)



ข) Yx/s = 0.1774 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

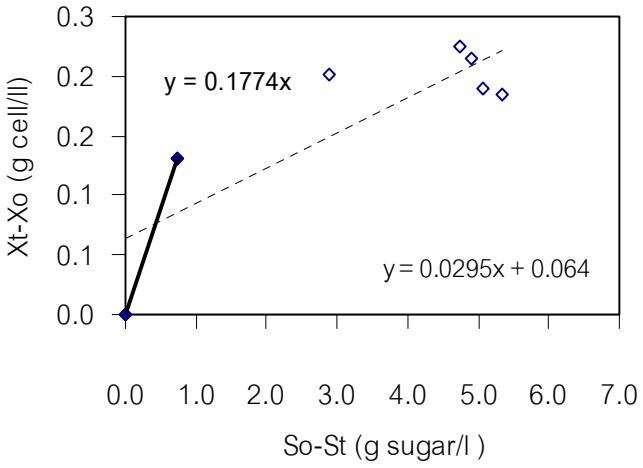


ค) Yx/s = 0.1435 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

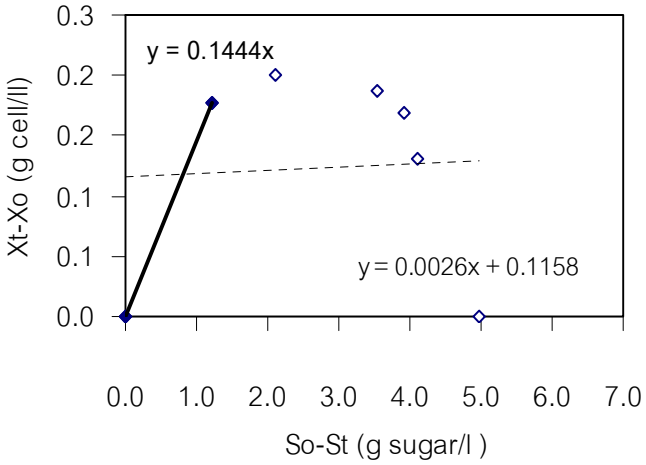


ง) Yx/s = 0.1407 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

รูปที่ ค.2 การคำนวนค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 10 (ก) 15 (ข) 20 (ค) และ 25 (ง) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน

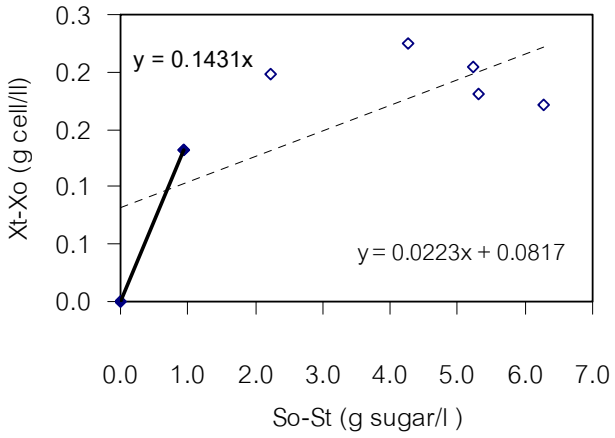


ก) Yx/s = 0.1774 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

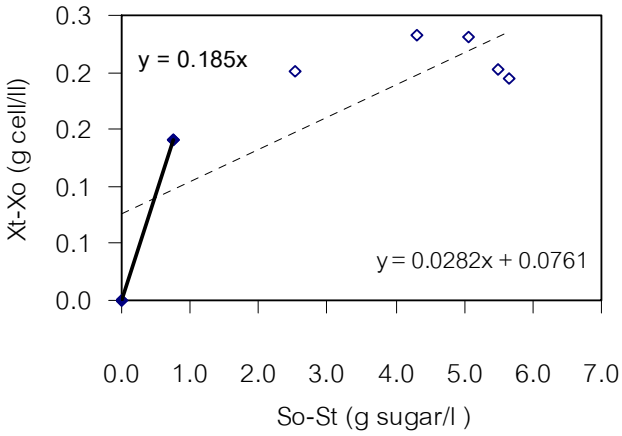


ข) Yx/s = 0.1444 g cell/ g total suagr
(ชั่วโมงที่ 4)

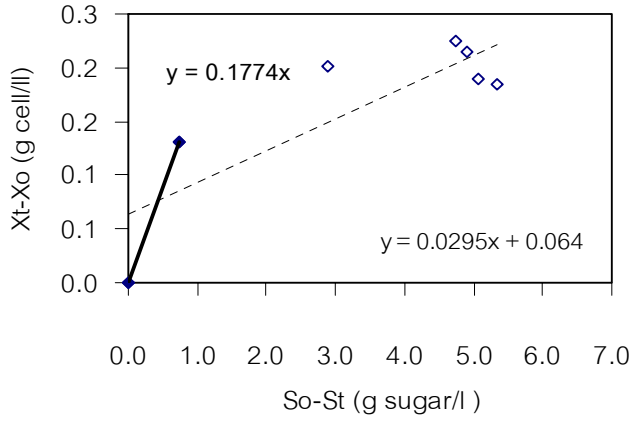
รูปที่ ค.3 การคำนวณค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร (ก) และยูเรีย 1.36 กรัมต่อลิตร (ข) เป็นแหล่งไนโตรเจน



ก) Yx/s = 0.1431 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

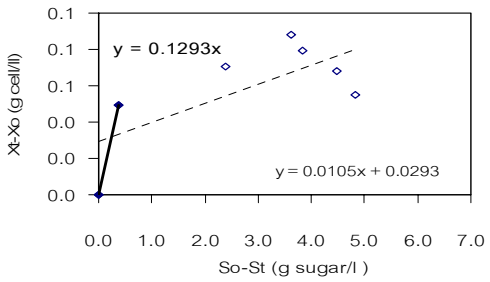


ข) Yx/s = 0.1850 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

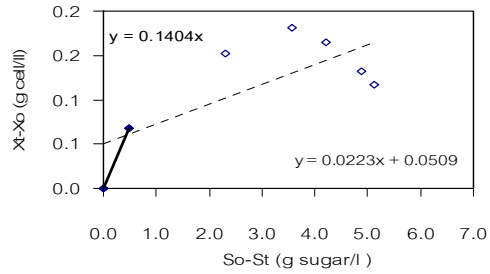


ค) Yx/s = 0.1770 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

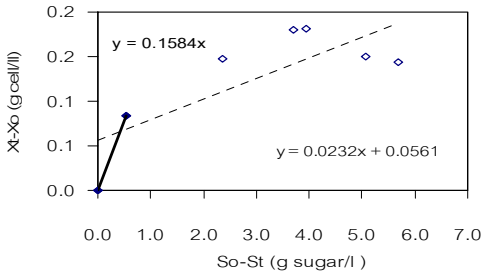
รูปที่ ค.4 การคำนวนค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 1 (ก) 2 (ข) และ 3 (ค) กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจน



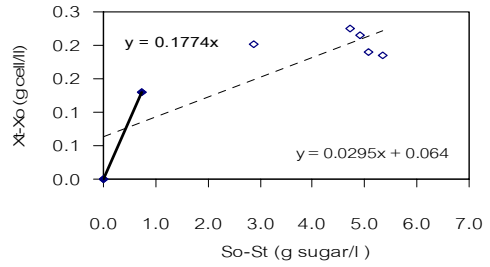
ก) Yx/s = 0.1293 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)



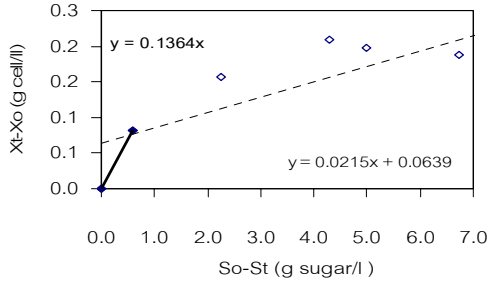
ข) Yx/s = 0.1404 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)



ค) Yx/s = 0.1584 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

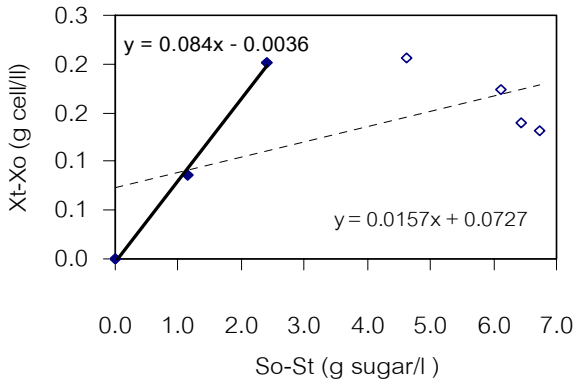


ง) Yx/s = 0.1774 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

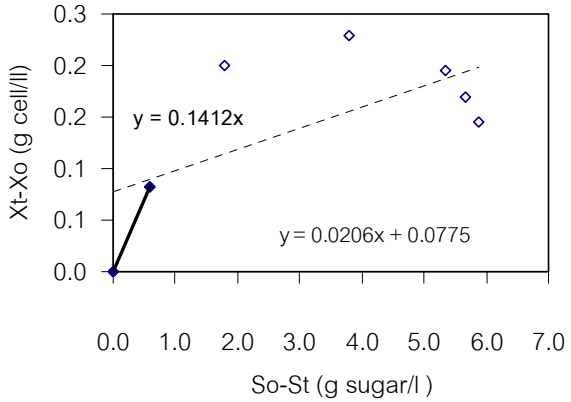


จ) Yx/s = 0.1364 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

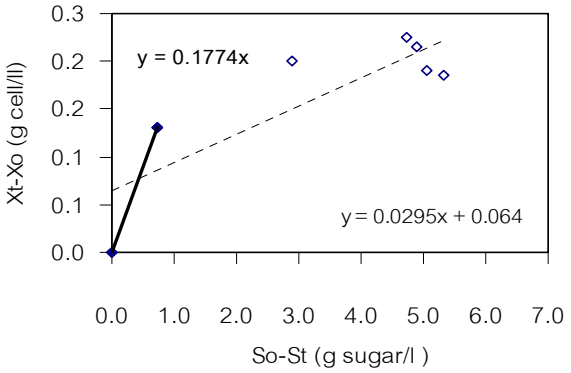
รูปที่ ค.5 การคำนวณค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ15 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 (ก) 5.0 (ข) 6.0 (ค) 7.0 (ง) และ 8.0 (จ)



ก) Yx/s = 0.084 g cell/g total sugar
(ชั่วโมงที่ 8)

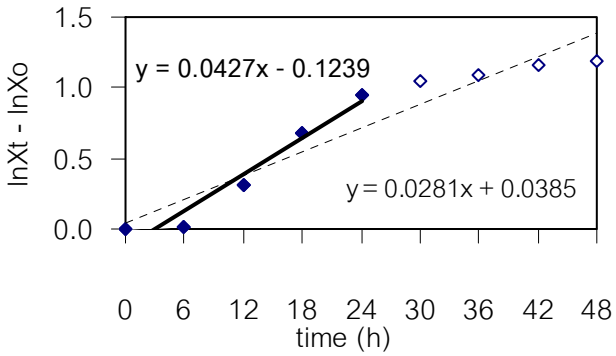


ข) Yx/s = 0.1412 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

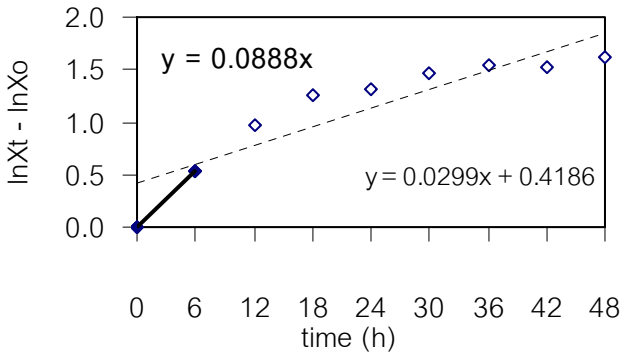


ค) Yx/s = 0.1774 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 4)

รูปที่ ค.6 การคำนวณค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเพาะเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังเท่ากับ 15 กรัมต่อลิตร และแอมโมเนียมซัลเฟตเท่ากับ 3 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 30 (ก) 35 (ข) และ 37 (ค) องศาเซลเซียส

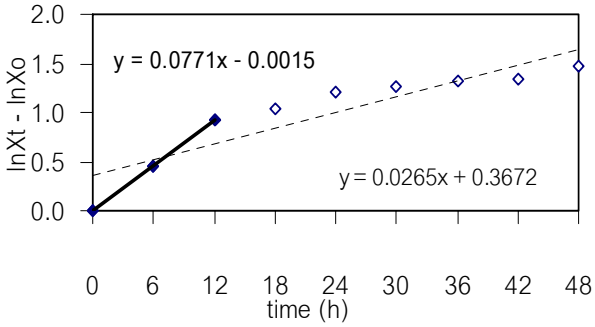


ก) μ =0.0427 h^{-1}
(ชั่วโมงที่ 24)

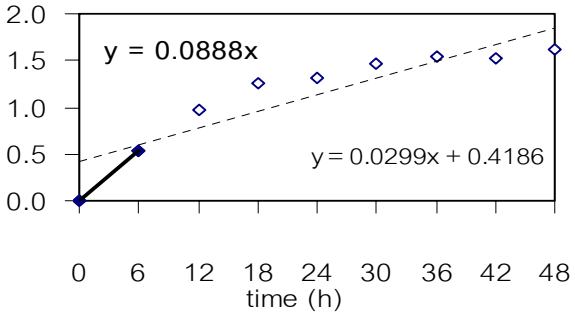


ข) μ =0.0888 h^{-1}
(ชั่วโมงที่ 6)

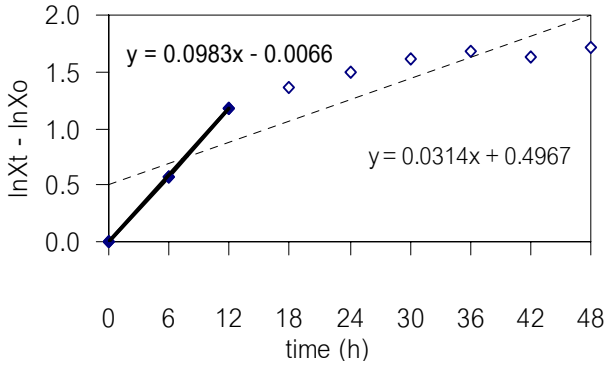
รูปที่ ค.7 การคำนวนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ในการเพาะเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ BSM (ก) และ YPD (ข) โดยมีกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งคาร์บอน



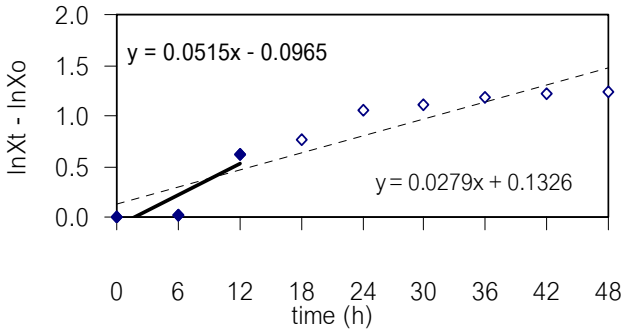
ก) μ =0.0771 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 12)



ข) μ =0.0888 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 6)

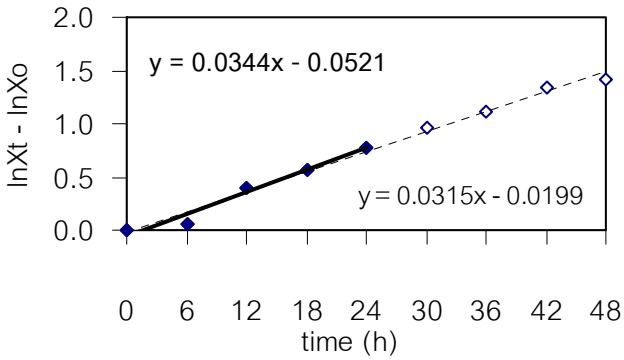


ค) μ =0.0983 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 12)

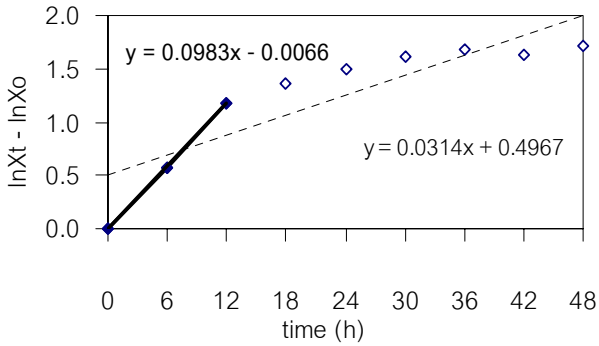


ง) μ =0.0515 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 12)

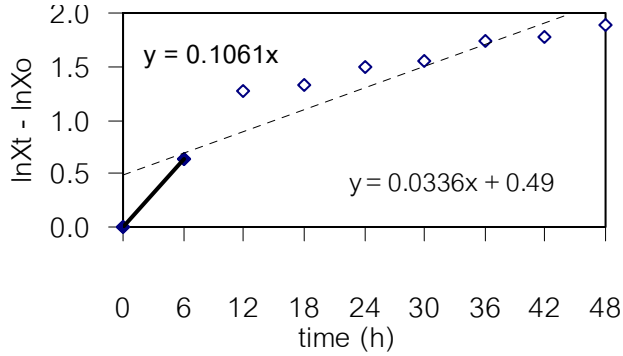
รูปที่ ค.8 การคำนวนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ในการเพาะเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD โดยมีกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 4.0 (ก) 4.5 (ข) 5.0 (ค) และ 5.5 (ง)



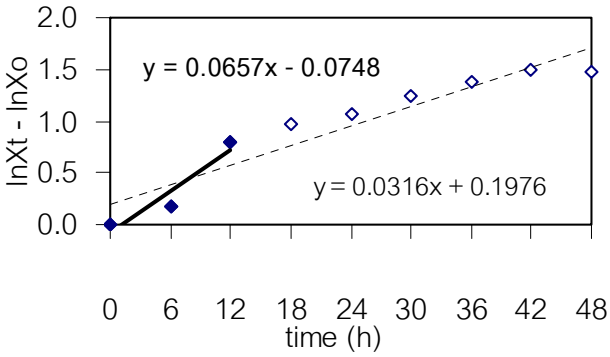
ก) μ =0.0344 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 24)



ข) μ =0.0983 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 12)

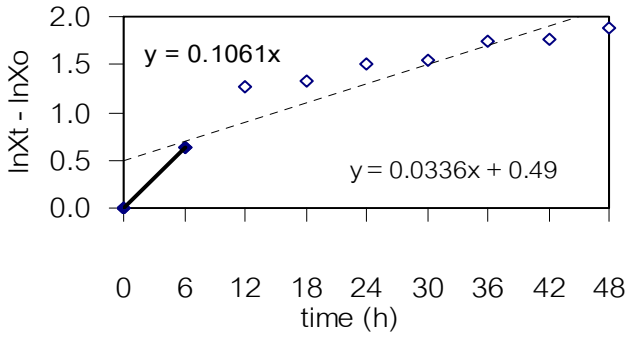


ค) μ =0.1061 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 6)

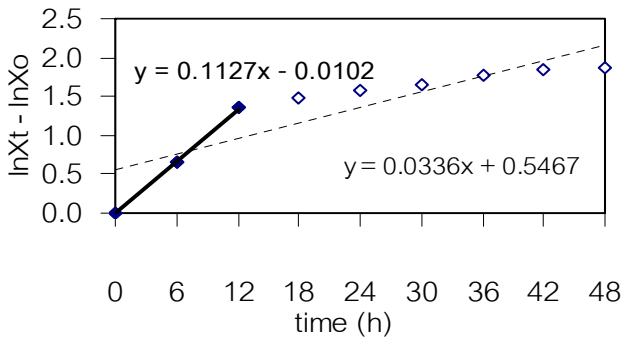


ง) μ =0.0657 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 12)

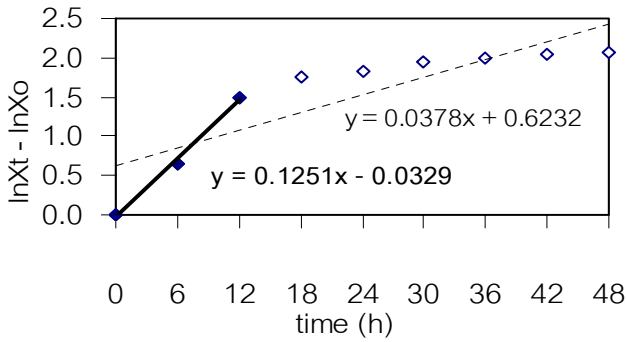
รูปที่ ค.9 การคำนวนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ในการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD โดยมีกลูโคสเท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 25 (ก) 30 (ข) 35 (ค) และ 37 (ง) องศาเซลเซียส



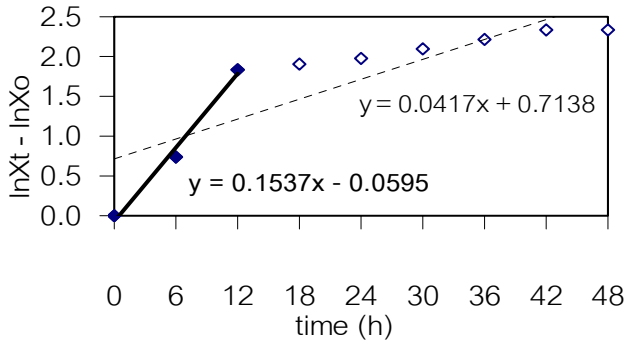
ก) μ =0.1061 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 6)



ข) μ =0.1127 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 12)

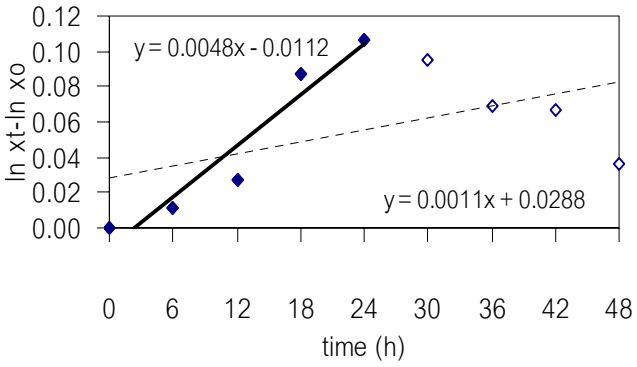


ค) μ =0.1251 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 12)

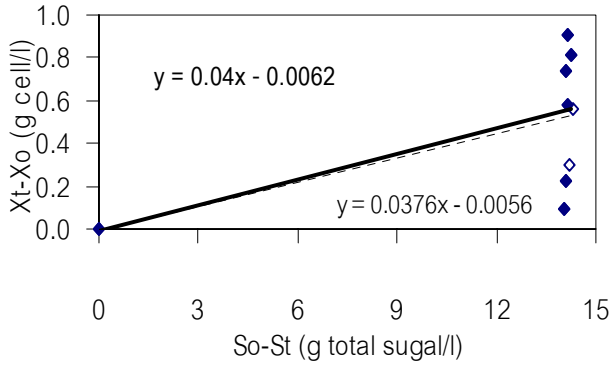


ง) μ =0.1537 h^{-1} (ชั่วโมงที่ 12)

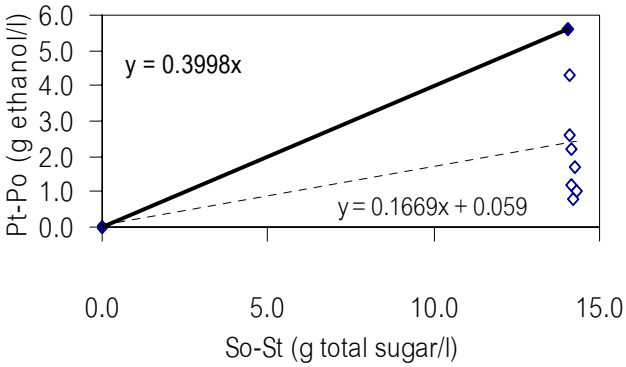
รูปที่ ค.10 การคำนวนค่าอัตราการเจริญจำเพาะ ในการเลี้ยง *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD โดยมีกลูโคสเท่ากับ 20 30 40 และ 50กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส



μ = 0.0048 h^{-1}
(ชั่วโมงที่ 76)

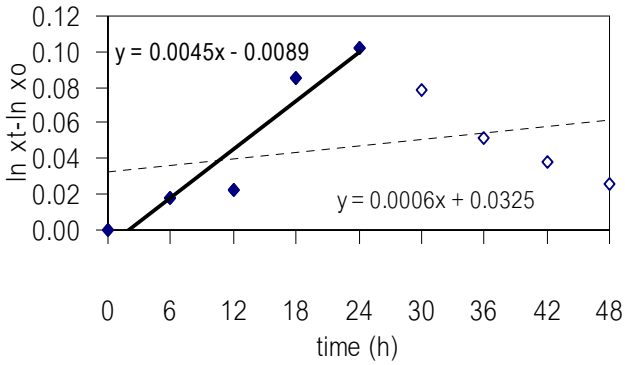


Yx/s = 0.04 g cell/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 88)



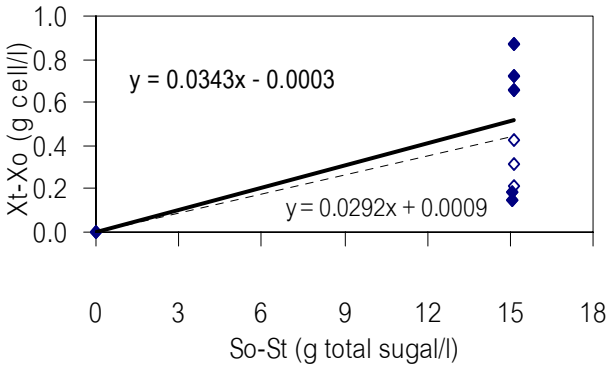
Yp/s = 0.3998 g ethanol/ g total sugar
(ชั่วโมงที่ 58)

รูปที่ ค.11 การประเมินค่าพารามิเตอร์ เมื่อเพาะกล้าเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cereviaias* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งความเข้มข้น 15 กรัมต่อลิตร ด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และกลูโคอะมิเลส



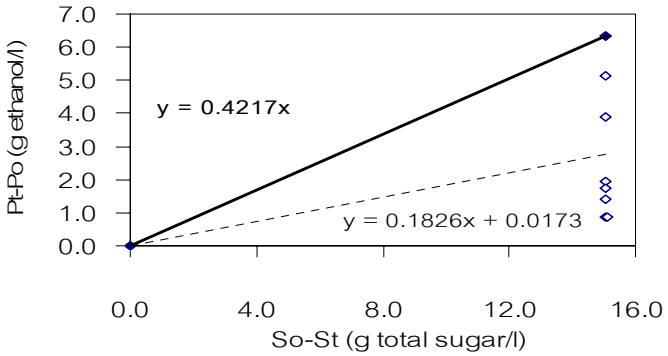
μ = 0.0045 h^{-1}

(ชั่วโมงที่ 54)



Yx/s = 0.0343 g cell/ g total sugar

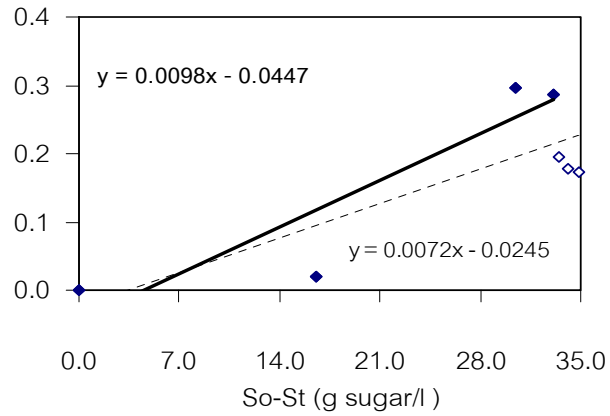
(ชั่วโมงที่ 78)



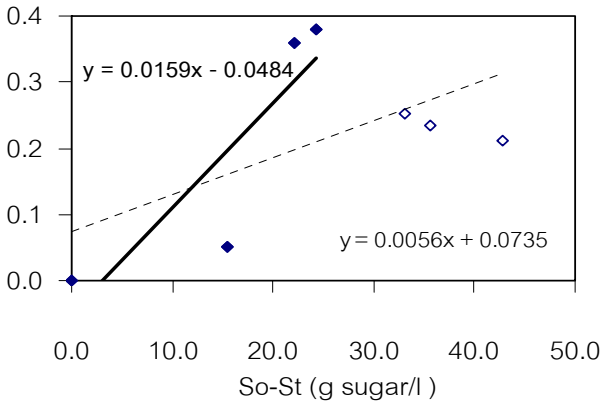
Yp/s = 0.4217 g ethanol/ g total sugar

(ชั่วโมงที่ 54)

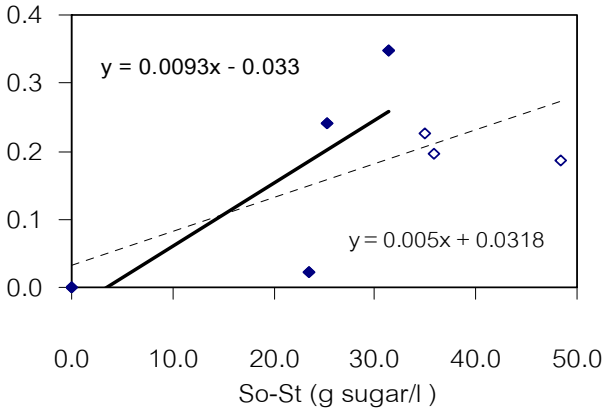
รูปที่ ค.12 การประเมินค่าพารามิเตอร์ เมื่อเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในน้ำตาลที่ได้จากการย่อยแป้งด้วยแอลฟาอะมิเลส และกลูโคอะมิเลส



ก) Yx/s=0.0098 g cell/ g total sugar (ชั่วโมงที่ 12)

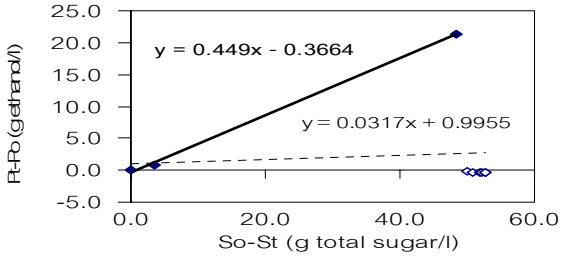


ข) Yx/s=0.0159 g cell/ g total sugar (ชั่วโมงที่ 12)

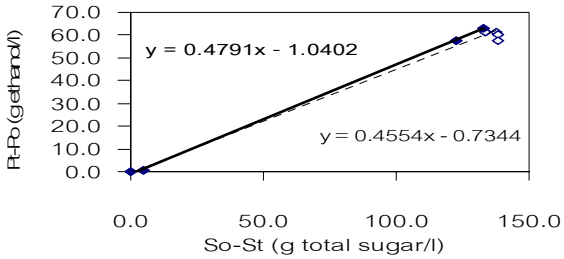


ค) Yx/s=0.0093 g cell/ g total sugar (ชั่วโมงที่ 12)

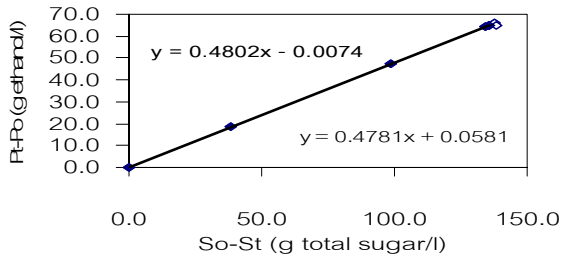
รูปที่ ค.13 การคำนวนค่าผลได้เซลล์ต่อสับสเตรท ในการเลี้ยง *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MSM เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลัง 100 (ก) 150 (ข) และ 200 (ค) กรัมต่อลิตร โดยมีแอมโมเนียมซัลเฟต 10 กรัมต่อลิตร ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เลี้ยงบนเครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส



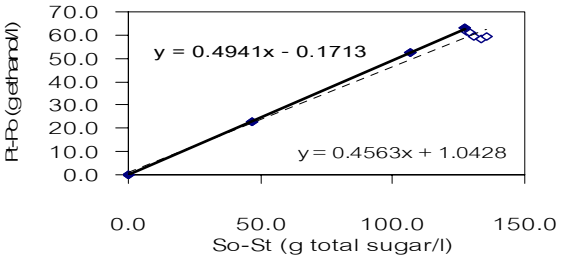
ก) Yp/s = 0.48 g ethanol/g total sugar (ชั่วโมงที่ 16)



ข) Yp/s = 0.48 g ethanol/g total sugar (ชั่วโมงที่ 16)



ค) Yp/s = 0.48 g ethanol/g total sugar (ชั่วโมงที่ 10)



ง) Yp/s = 0.48 g ethanol/g total sugar (ชั่วโมงที่ 64)

รูปที่ ค.14 การคำนวณค่าผลได้ผลิตภัณฑ์ต่อสับสเตรทจากการใช้แป้งความเข้มข้นเริ่มต้น 150 กรัมต่อลิตร โดย

การผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 (ก)

การผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 (ข)

การผลิตเอทานนอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 พร้อมกับเติมกลูโคอะมิเลสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ค)

การผลิตเอทานอลโดยเพาะกล้าเชื้อ *Saccharomyces cerevisiae* SKP-01 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการย่อยแป้งด้วย *Bacillus amyloliquefaciens* IFO14141 และกลูโคอะมิเลส (

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวศิริวรรณ พูนศรี เกิดวันที่ 15 กรกฎาคม 2524 ที่อำเภอเมือง จังหวัดสระบุรี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตราบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับสอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2546 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับบัณฑิตศึกษา หลักสูตรจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยา ในปีการศึกษา 2547 ระหว่างการศึกษาได้ร่วมเสนอผลงานในงานจุฬาฯ วิชาการครั้งที่ 10 ผลการทดลองส่วนหนึ่งได้เผยแพร่ในงานประชุมวิชาการครั้งที่ 15 ณ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย